



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Chimie-Biologie-Santé*

---

Présentée et soutenue par *Marion RIVAUD*  
Le 27 février 2012

**Titre :** *Les Benzo[c]phénanthridines antipaludiques d'origine naturelle : Synthèse d'analogues et étude de leur mode d'action*

---

### JURY

*Pr. Alexis VALENTIN, Président du jury*  
*Pr. Guy LEWIN, Rapporteur*  
*Dr. Didier STIEN, Rapporteur*  
*Dr. Jidong ZHANG, Examineur*  
*Pr. Vania BERNARDES GENISSON, Examinatrice*  
*Dr. Valérie JULLIAN, Directrice de thèse*

---

**Ecole doctorale :** *Ecole doctorale Sciences de la Matière*  
**Unité de recherche :** *UMR 152 PharmaDEV IRD-UPS*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. Valérie JULLIAN*  
**Rapporteurs :** *Pr. Guy LEWIN et Dr. Didier STIEN*

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>10</b>
<b>1 CONTEXTE / PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 GENERALITES SUR LE PALUDISME</b> .....	<b>12</b>
1.1.1 <i>Le parasite et son vecteur</i> .....	12
1.1.2 <i>Situation géographique</i> .....	12
1.1.3 <i>Cycle du parasite</i> .....	13
<b>1.2 PRINCIPAUX TRAITEMENTS ANTIPALUDIQUES</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 <i>Les inhibiteurs des acides nucléiques</i> .....	14
1.2.2 <i>L'artémisinine et ses dérivés</i> .....	16
1.2.3 <i>Les associations d'anti-paludiques ou ACT</i> .....	17
1.2.4 <i>Les inhibiteurs de détoxification de l'hème</i> .....	18
<b>1.3 LA FORMATION D'HEMOZOINE DANS PLASMODIUM SP.</b> .....	<b>19</b>
<b>1.4 OPTIMISATION PAR SYNTHÈSE D'INHIBITEURS DE FORMATION D'HEMOZOINE</b> .....	<b>23</b>
1.4.1 <i>Travail sur les xanthones (2002)</i> .....	23
1.4.2 <i>Travail sur les acridones (2009)<sup>57</sup></i> .....	24
1.4.3 <i>Travail sur les néocryptolépines et cryptolépines (2009)</i> .....	26
<b>1.5 LES BENZO[C]PHENANTHRIDINES</b> .....	<b>28</b>
1.5.1 <i>Généralités et études des propriétés biologiques</i> .....	28
1.5.2 <i>Synthèses publiées de benzo[c]phénanthridines</i> .....	38
<b>1.6 TRAVAUX PRELIMINAIRES AU LABORATOIRE</b> .....	<b>53</b>
1.6.1 <i>Etude bio-guidée de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i><sup>127</sup></i> .....	53
1.6.2 <i>Etude des propriétés biologiques de la nitidine</i> .....	54
1.6.3 <i>Etude du mode d'action de la nitidine : Inhibition de la détoxification de l'hème</i> .....	57
1.6.4 <i>Localisation et accumulation de la nitidine dans le parasite</i> .....	59
<b>2 SYNTHÈSE DES BZPS ET DES DERIVES</b> .....	<b>62</b>
<b>2.1 OBJECTIFS ET STRATEGIE EMPLOYEE</b> .....	<b>62</b>
<b>2.2 SYNTHÈSE DE LA NORINITIDINE 34</b> .....	<b>64</b>
2.2.1 <i>Synthèse de la benzylimine 99</i> .....	64
2.2.2 <i>Synthèse de l'alcyne aromatique 101</i> .....	64
2.2.3 <i>Synthèse de l'isoquinoline 102</i> .....	65
2.2.4 <i>Oxydation de l'alcool 102a en aldéhyde 103</i> .....	67
2.2.5 <i>Synthèse de la norinitidine 34</i> .....	67
<b>2.3 SYNTHÈSE DE LA NORFAGARONINE 66</b> .....	<b>68</b>

2.3.1 Synthèse de l'alcyne aromatique.....	68
2.3.2 Synthèse de l'isoquinoline 169.....	70
2.3.3 Oxydation de l'alcool 169 en aldéhyde 170.....	73
2.3.4 Synthèse de la norfagaronine.....	74
2.3.5 Synthèse de la norfagaronine acétylée.....	75
<b>2.4 DERIVES DE LA FAGARONINE ET DE LA NORFAGARONINE.....</b>	<b>76</b>
2.4.1 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie A.....	76
2.4.2 O-alkylation de la norfagaronine 66.....	76
2.4.3 N-méthylation des composés 171 et 66.....	77
2.4.4 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie B.....	78
2.4.5 Synthèse de la fagaronine.....	80
2.4.6 Synthèse des dérivés de la fagaronine.....	83
<b>2.5 DERIVES DE LA NITIDINE.....</b>	<b>85</b>
2.5.1 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie A.....	85
2.5.2 N-alkylation de la nornitidine.....	85
2.5.3 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie B.....	87
2.5.4 Synthèse des dérivés de la nitidine.....	88
<b>3 PROPRIETES ANTIPALUDIQUES, CYTOTOXIQUES ET LEISHMANICIDES.....</b>	<b>90</b>
<b>3.1 TESTS ANTIPALUDIQUES IN VITRO.....</b>	<b>90</b>
3.1.1 Fagaronine, dérivés et intermédiaires.....	90
3.1.2 Dérivés de la nitidine et intermédiaires de synthèse.....	93
3.1.3 Comparaison Fagaronine / Nitidine.....	94
<b>3.2 TESTS DE CYTOTOXICITE SUR CELLULES CANCEREUSES IN VITRO.....</b>	<b>95</b>
3.2.1 Fagaronine et dérivés.....	95
3.2.2 Dérivés de la nitidine.....	96
<b>3.3 ACTIVITE ANTIPALUDIQUE DE LA FAGARONINE 28 IN VIVO.....</b>	<b>96</b>
<b>3.4 TESTS LEISHMANICIDES IN VITRO.....</b>	<b>100</b>
3.4.1 Généralités.....	100
3.4.2 Activité leishmanicide sur amastigotes axéniques et macrophages.....	101
3.4.3 Tests leishmanicides sur les macrophages infectés.....	102
<b>3.5 TESTS BIOLOGIQUES LEISHMANICIDES IN VIVO.....</b>	<b>103</b>
<b>3.6 CONCLUSIONS SUR LES TESTS BIOLOGIQUES.....</b>	<b>105</b>
<b>4 ETUDE DU MODE D'ACTION DE LA FAGARONINE.....</b>	<b>106</b>
4.1 ETUDE D'AFFINITE AVEC L'HEME.....	106
4.2 LOCALISATION DANS LE PARASITE.....	108
4.2.1 Fluorimétrie.....	108
4.2.2 Observation en microscopie optique.....	110
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>111</b>
<b>5 PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>112</b>
5.1 GENERALITES.....	112
5.2 SYNTHESE DE LA NORNITIDINE :.....	113

5.2.1	1-(2-bromo-4,5-dimethoxy-phenyl)-N-tert-butyl-methanimine <b>99</b> .....	113
5.2.2	4-(1,3-benzodioxol-5-yl)but-3-yn-1-ol <b>101</b> .....	113
5.2.3	2-[3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-6,7-dimethoxy-4-isoquinolyl]ethanol <b>102a</b> .....	114
5.2.4	2-[3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-6,7-dimethoxy-4-isoquinolyl]acetaldehyde <b>103</b> .....	115
5.2.5	Nornitidine <b>34</b> .....	116
<b>5.3</b>	<b>SYNTHESE DE LA NORFAGARONINE ET DE LA NORFAGARONINE ACETYLEE : .....</b>	<b>117</b>
5.3.1	Acetate de (4-bromo-2-methoxy-phenyl) <b>167a</b> .....	117
5.3.2	Acetate de [4-(4-hydroxybut-1-ynyl)-2-methoxy-phenyl] <b>168a</b> .....	117
5.3.3	Acetate de [4-[4-(2-hydroxyethyl)-6,7-dimethoxy-3-isoquinolyl]-2-methoxy-phenyl] <b>169a</b> 118	
5.3.4	Acetate de [4-[6,7-dimethoxy-4-(2-oxoethyl)-3-isoquinolyl]-2-methoxy-phenyl] <b>170a</b> ....	120
5.3.5	Norfagaronine <b>66</b> .....	121
5.3.6	Norfagaronine acétylée <b>171</b> .....	122
<b>5.4</b>	<b>SYNTHESE DES DERIVES DE LA NORFAGARONINE :.....</b>	<b>123</b>
5.4.1	4-bromobutoxynorfagaronine <b>158</b> .....	123
5.4.2	5-bromopentoxynorfagaronine <b>159</b> .....	123
5.4.3	6-bromohexoxynorfagaronine <b>160</b> .....	124
<b>5.5</b>	<b>SYNTHESE DE LA FAGARONINE ET DE SES DERIVES :.....</b>	<b>125</b>
5.5.1	Isopropyloxy de [4-(4-hydroxybut-1-ynyl)-2-methoxy-phenyl] <b>168b</b> .....	125
5.5.2	Iodure d'acétate de [4-[4-(2-hydroxyethyl)-6,7-dimethoxy-2-methyl-isoquinolin-2-ium-3-yl]-2-methoxy-phenyl] <b>173</b> .....	126
5.5.3	Isopropyloxy de [4-[4-(2-hydroxyethyl)-6,7-dimethoxy-3-isoquinolyl]-2-methoxy-phenyl] <b>169c</b>	127
5.5.4	Isopropyloxy de [4-[6,7-dimethoxy-4-(2-oxoethyl)-3-isoquinolyl]-2-methoxy-phenyl] <b>170b</b> 128	
5.5.5	Iodure d'acétate de [4-[6,7-dimethoxy-2-methyl-4-(2-oxoethyl)isoquinolin-2-ium-3-yl]-2-methoxy-phenyl] <b>174a</b> .....	129
5.5.6	Iodure d'isopropyl de [4-[6,7-dimethoxy-2-methyl-4-(2-oxoethyl)isoquinolin-2-ium-3-yl]-2-methoxy-phenyl] <b>174b</b> .....	130
5.5.7	Iodure de fagaronine <b>28</b> .....	131
5.5.8	Iodure de fagaronine isopropylée <b>175</b> .....	132
<b>5.6</b>	<b>SYNTHESE DES DERIVES DE LA NITIDINE : .....</b>	<b>133</b>
5.6.1	Bromure de 2-[3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(4-bromobutyl)-6,7-dimethoxy-isoquinolin-2-ium-4-yl]acetaldehyde <b>182</b> .....	133
5.6.2	Bromure de N-4-bromobutylnornitidine <b>155</b> .....	133
5.6.3	Bromure de 2-[3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-(4-bromopentyl)-6,7-dimethoxy-isoquinolin-2-ium-4-yl]acetaldehyde <b>183</b> .....	134
<b>5.7</b>	<b>CULTURE CELLULAIRE .....</b>	<b>135</b>
5.7.1	<i>Plasmodium falciparum</i> .....	135
5.7.2	Cellules de mammifères.....	135
5.7.3	<i>Leishmania</i> sp. : Amastigotes axéniques.....	136
<b>5.8</b>	<b>MESURE DE LA PARASITEMIE (PLASMODIUM) .....</b>	<b>137</b>
5.8.1	Frottis.....	137
5.8.2	Coloration.....	137
5.8.3	Microscopie optique.....	137
<b>5.9</b>	<b>TESTS ANTIPALUDIQUES IN VITRO.....</b>	<b>138</b>

---

<b>5.10 TESTS SUR CELLULES MCF7 ET VERO IN VITRO .....</b>	<b>139</b>
<b>5.11 TESTS ANTIPALUDIQUES IN VIVO.....</b>	<b>139</b>
<b>5.12 AFFINITE AVEC L'HEME.....</b>	<b>140</b>
<b>5.13 FLUORIMETRIE .....</b>	<b>141</b>
<b>5.14 TESTS LEISHMANICIDES IN VITRO ET IN VIVO.....</b>	<b>142</b>
5.14.1 Tests in vitro sur amastigotes axéniques.....	142
5.14.2 Infection des macrophages.....	142
5.14.3 Tests in vitro sur macrophages infectés.....	142
5.14.4 Tests leishmanicides in vivo.....	142
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>144</b>
<b>STRUCTURES DES MOLECULES TESTEES .....</b>	<b>154</b>

## Remerciements

Ma thèse a été menée à l'UMR 152 PharmaDEV anciennement LPSNPR (Laboratoire de Pharmacochimie des Substances Naturelles et Pharmacophores Redox) situé à la faculté de pharmacie dans l'équipe PEPS anciennement B2SNA.

Je remercie tout d'abord Françoise NEPVEU, précédente directrice de l'unité, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie Valérie JULLIAN pour avoir proposé ce sujet et pour avoir dirigé et encadré mes recherches pendant la durée de ma thèse, pour m'avoir soutenue et aidée malgré les difficultés rencontrées.

J'exprime mes profonds remerciements aux différents membres du jury. Monsieur Guy LEWIN, Professeur à la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry, et Monsieur Didier STIEN, Chargé de recherche au CNRS-ICSN à Gif sur Yvette, je vous suis reconnaissante pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs. Monsieur Jidong ZHANG, Responsable de la Chimie des Produits Naturels et Glycochimie à Sanofi-Aventis de Vitry sur Seine, Madame Vania BERNARDES GENISSON, Professeur de chimie thérapeutique à la faculté de pharmacie de Toulouse et Monsieur Alexis VALENTIN, Professeur de parasitologie à la faculté de pharmacie de Toulouse, je tiens à vous remercier pour votre participation à mon jury en tant qu'examineurs.

Je remercie Anne-Cécile LE LAMER pour m'avoir conseillée lorsque je ne trouvais pas d'idées.

Je remercie aussi Alexis VALENTIN et Béatrice MOUKARZEL sans qui mes tests biologiques n'auraient pas été possibles. Merci de m'avoir fait partager votre travail, d'avoir pris le temps de m'expliquer ce que vous faisiez et comment vous le faisiez et de m'avoir formée à quelques techniques de biologie. Merci aussi à Michel SAUVAIN pour son aide et ses explications ainsi que pour son implication dans mon projet et sans qui certains tests n'auraient pas été faits.

Je remercie Pierre PERIO pour l'aide qu'il m'a apportée concernant la spectrométrie de masse tant pour la réalisation des spectres que l'analyse des résultats.

Je remercie Marie-Agnès BELLIERES pour m'avoir aidée à chaque fois que j'en avais besoin pour les commandes, les missions...

Je remercie aussi Pierre-Louis DUHOUX pour m'avoir soutenue quoiqu'il arrive, m'avoir remonté le moral. Je remercie aussi mon rayon de soleil, Maude pour sa présence, ses sourires, ses yeux rieurs et tout ce qu'elle est.

Je remercie les membres de ma famille et mes amis qui m'ont soutenue ainsi que les thésards et stagiaires rencontrés pendant ma thèse : Luke, Billy, Nawal, Yen, Thu, Jérôme, Fanny, Rina, Anne-Sophie ainsi que Hugo qui m'a aidée en effectuant son stage avec moi.

## Résumé

L'équipe de recherche PEPS du laboratoire PharmaDEV recherche de nouvelles molécules actives contre des pathologies du sud dans les plantes utilisées localement comme remèdes traditionnels. Des benzo[c]phénanthridines telles que la nitidine ont été extraites de *Zanthoxylum rhoifolium*, plante utilisée traditionnellement contre le paludisme en Guyane. Ce type de molécules possède des activités intéressantes contre le paludisme et des études au laboratoire ont montré que la nitidine se lie à l'hème inhibant sa détoxification en hémozoïne, laissant supposer un mode d'action similaire à celui de la chloroquine.

Le but de ce travail était de déterminer le potentiel antipaludique de la fagaronine et de synthétiser des dérivés de celle-ci ainsi que des dérivés de la nitidine en introduisant une chaîne aminoalkyle sur les composés. Cet ajout a pour but de favoriser un mode d'action d'inhibition de la formation d'hémozoïne grâce à l'accumulation des composés aminoalkylés dans la vacuole digestive.

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé la norfagaronine en utilisant une synthèse publiée pour la nornitidine puis nous avons adapté cette synthèse pour obtenir la fagaronine. Nous avons également pu obtenir des dérivés de la nitidine *N*-substitués. Les dérivés aminoalkylés envisagés pourront être obtenus rapidement à partir de la fagaronine.

L'activité antipaludique des composés obtenus a été évaluée sur *P. falciparum in vitro*. La fagaronine très active *in vitro* a également été testée *in vivo*. Le résultat majeur est la mise en évidence pour ce produit d'une excellente activité sur souris impaludées, équivalente à celle de la chloroquine, le composé de référence.

Afin de déterminer le mode d'action de la fagaronine, nous avons réalisé une étude d'affinité de la fagaronine avec l'hème ainsi qu'un essai d'observation microscopique dans le parasite. La fagaronine montre une capacité à former un complexe 1-1 avec l'hème avec une affinité équivalente à celle de la nitidine mais inférieure à la chloroquine. Par contre, ses propriétés fluorescentes médiocres n'ont pas permis l'observation de sa localisation au sein du parasite.

Le potentiel leishmanicide de plusieurs benzo[c]phénanthridines naturelles et de synthèse a également été évalué *in vitro* et puis *in vivo* pour les composés les plus prometteurs. La chélérythrine possède une excellente activité *in vitro*, mais n'est pas active *in vivo*. La fagaridine par contre, malgré une activité plus modeste *in vitro* est active *in vivo*. La fagaronine n'est pas très active *in vitro* et n'a pas été évaluée *in vivo*.

Ce travail montre donc l'intérêt des benzo[c]phénanthridines comme antiparasitaires et ouvre la voie pour synthétiser des dérivés aminoalkylés susceptibles d'améliorer leur activité antipaludique.

## Liste des Abréviations

sp. : species  
Ac : acétyle  
ACN : acétonitrile  
ACT : artemisinine combined therapy  
Bn : benzyle  
Boc : tert-butoxycarbonyle  
BZP : benzo[c]phénanthridine  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CI<sub>50</sub> : concentration inhibitrice 50%  
CMI : concentration minimale d'inhibition  
COSY : correlation spectroscopy  
CQ : chloroquine  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DCM : dichlorométhane  
DE<sub>50</sub> : dose efficace 50  
DIPA : diisopropylamine  
DIPEA : diisopropyléthylamine  
DMAP : 4-diméthylaminopyridine  
DMF : diméthylformamide  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DO : densité optique  
dppe : 1,2-Bis(diphénylphosphino)éthane  
DT : dose tolérable  
éq. : équivalent  
Et : éthyle  
F : fagaronine  
Fe(II)PPIX : Protoporphyrine IX de fer II  
Fe(III)PPIX : Protoporphyrine IX de fer III  
FITC : Fluorescein isothiocyanate  
FP : ferriprotoporphyrine  
GI<sub>50</sub> : inhibition de croissance 50  
GRP : globules rouges parasités  
GRS : globules rouges sains  
HDP : Heme detoxification protein  
HMBC : Heteronuclear multiple-bond correlation  
HRP : histidine rich protein  
HSQC : Heteronuclear single quantum correlation  
IP : intra-péritonéale  
iPr : isopropyle  
IS : indice de sélectivité  
Kd : constante de dissociation  
LC-MS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry  
LDA : lithium diisopropylamidure  
MDR : multidrug resistant  
MOG : monooleoylglycerol  
Ms : mésyl  
NOESY : Nuclear overhauser effect spectroscopy

PD : patte droite  
PG : patte gauche  
Ph : phényle  
Quant. : quantitatif  
RI : réduction de l'infection  
sp. : species  
syn : synonyme  
t : temps  
T : température  
TA : température ambiante  
TEM : transmission electron microscopy  
Tf : triflate  
TFA : acide trifluoroacétique  
THF : tétrahydrofurane  
XAD-7 : résine amberlite polymère

## Introduction

Le paludisme, maladie infectieuse due au parasite du genre *Plasmodium* inoculé à l'homme par la piqûre de l'anophèle, est aujourd'hui l'affection tropicale la plus répandue. La découverte en 1820 de la quinine, antipaludique naturel de la famille des alcaloïdes, a conduit au développement, au vingtième siècle, de molécules apparentées possédant le motif quinoléine. La chloroquine, molécule synthétique efficace et bon marché, apparaît alors comme le traitement de choix contre le paludisme. Malheureusement, le premier cas de résistance à la chloroquine se manifeste au début des années 1960, c'est pourquoi de nouveaux efforts de recherche ont été menés. Plusieurs nouveaux antipaludiques ont été découverts que ce soit par extraction de composés naturels tels que l'artémisinine ou par synthèse de dérivés de l'artémisinine tels que l'artésunate ou l'artéméter, ou de la chloroquine tels que la méfloquine ou l'amodiaquine. Bien que possédant de bonnes propriétés antipaludiques ces molécules ne sont pas toujours accessibles aux pays les plus touchés en raison de leur coût élevé et commencent à induire des résistances chez le parasite.

Le paludisme est traditionnellement soigné par des remèdes à bases de plantes dans les pays tropicaux. Certains de ces remèdes sont issus de plantes de la famille des rutacées (*Zanthoxylum sp.* ou *Toddalia sp.*).

Plusieurs composés de la famille alcaloïdique des benzo[c]phénanthridines ont été isolés de ces rutacées et ont été étudiés pour leurs propriétés biologiques intéressantes. Certains des plus connus sont la nitidine, la sanguinarine, la chélérythrine ou la fagaronine. Des dérivés de ces composés ont aussi été synthétisés dans le but d'optimiser certaines activités biologiques.

Les benzo[c]phénanthridines qu'elles soient naturelles ou synthétiques ont été étudiées principalement pour leurs propriétés anticancéreuses mais elles sont aussi antipaludiques, antifongiques ou antibactériennes. Les propriétés antipaludiques de ces composés ont beaucoup été associées à leurs propriétés anticancéreuses mais il se peut que les benzo[c]phénanthridines possèdent un mode d'action antipaludique propre ressemblant à celui de la chloroquine. Cette molécule inhibe la détoxification de l'hème en hémotoïne par le parasite en entrant dans la vacuole digestive grâce à sa chaîne aminoalkyle et en se liant avec l'hème. Ce processus induit la mort du parasite pour lequel l'hème est toxique.

Le laboratoire PharmaDev UMR 152 isole des molécules antipaludiques par extraction bio-guidée de plantes utilisées comme remèdes traditionnels contre le paludisme. De nombreuses plantes sont utilisées venant des pays du sud et sélectionnées après des études ethnobotaniques et ethnopharmacologiques.

Une étude sur *Zanthoxylum rhoifolium* a permis d'isoler par bio-guidage plusieurs benzo[c]phénanthridines dont la nitidine. L'activité et la sélectivité antipaludique de cette dernière ont été évaluées et ont montré une activité intéressante mais à améliorer. Une étude a montré qu'elle possède une forte affinité avec l'hème ce qui permet d'émettre l'hypothèse de l'inhibition de la formation de l'hémotoïne. Malheureusement la colocalisation de la nitidine dans le parasite ne permet pas de valider cette hypothèse.

Le but de ce travail est de synthétiser des dérivés issus de la nitidine et de la fagaronine afin d'optimiser leurs propriétés antipaludiques tout en réduisant leurs cytotoxicités. Pour ce faire, des chaînes aminoalkyles possédant des similitudes avec celle de la chloroquine vont être introduites sur la nitidine ou la fagaronine. Les activités de ces dérivés vont être évaluées et leur mode d'action antiparasitaire va être étudié pour une meilleure compréhension de l'activité de ces composés.

La première partie consiste en une étude bibliographique. Après un bref rappel du paludisme et de ses traitements connus, l'évolution de la controverse sur la digestion de l'hémoglobine a été étudiée. La littérature concernant les benzo[c]phénanthridines, leurs propriétés biologiques ainsi que leurs différentes synthèses publiées a été étudiée et présentée ainsi que les travaux préalablement faits au laboratoire sur le sujet.

Dans les chapitres suivants sont exposés les travaux réalisés au cours de la thèse.

Le deuxième chapitre décrit la synthèse d'un composé voulu : la fagaronine ainsi que les premières étapes d'obtention des dérivés de la nitidine et de la fagaronine, les problèmes rencontrés ainsi que les solutions apportées.

La troisième partie traite des tests biologiques réalisés sur les composés obtenus. Le modèle biologique utilisé en priorité a été la culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. La fagaronine a également été évaluée sur un modèle de paludisme murin. Les composés ont aussi été évalués sur *Leishmania amazonensis in vitro* et pour les plus prometteurs *in vivo*.

Le quatrième chapitre propose l'étude du mode d'action antipaludique de la fagaronine. Tout d'abord, l'étude de son affinité avec l'hème est réalisée et la constante d'association du complexe hème-fagaronine est calculée puis enfin l'étude de la fluorescence de la fagaronine est présentée afin de trouver une méthode pour localiser cette dernière dans le parasite.

# 1 Contexte / Partie Bibliographique

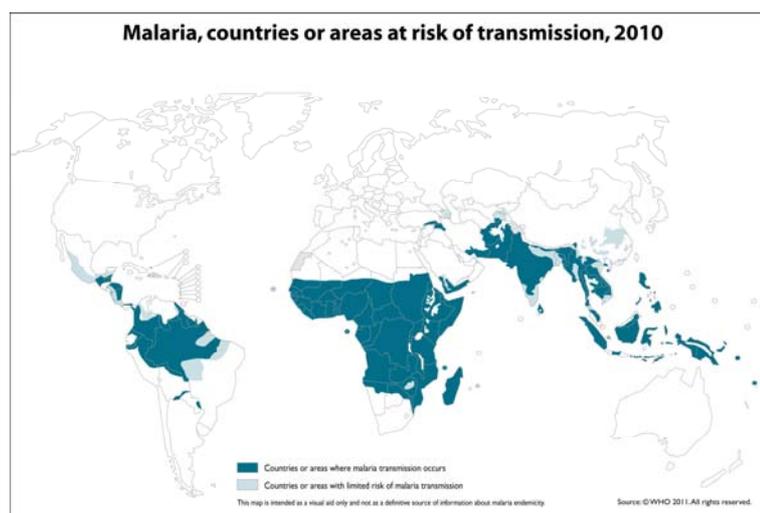
## 1.1 Généralités sur le paludisme

### 1.1.1 Le parasite et son vecteur

Le mot paludisme originaire du latin « palus » signifie « marais »<sup>1</sup> et le mot malaria, originaire de l'italien, désigne le mauvais air. En effet, dès l'antiquité, le paludisme touche des régions marécageuses. En 1880, la véritable cause du paludisme est découverte : c'est un parasite unicellulaire (protozoaire) appelé *Plasmodium*. Il existe quatre types de paludisme humain : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, les deux premiers étant les plus répandus. Selon l'OMS, *Plasmodium knowlesi*, un paludisme du singe, aurait été enregistré dans certains cas de paludisme chez l'homme. L'infection par *Plasmodium falciparum* est de loin la plus dangereuse car sans traitement elle peut conduire à la mort du patient par anémie (destruction des globules rouges) ou par paludisme cérébral (obstruction des capillaires irriguant le cerveau). Entre 1897 et 1898, le vecteur du paludisme est identifié il s'agit du moustique anophèle femelle (genre *Anopheles*).

### 1.1.2 Situation géographique

Le paludisme est la maladie parasitaire la plus répandue dans le monde et est avec la tuberculose et le SIDA une des trois causes majeures de mortalité par maladie infectieuse. En 2008, 247 millions de cas de paludisme ont été enregistrés (4% de la population mondiale) et plus d'un million de décès principalement chez des enfants de moins de cinq ans vivant en Afrique.<sup>1</sup> Initialement, la maladie était répandue dans le monde entier mais a été éradiquée de nombreux pays tempérés au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle pour ne toucher qu'essentiellement les pays les plus pauvres (Carte 1). Les symptômes du paludisme apparaissent sous 10 à 15 jours après la piqûre infectante de l'anophèle sous forme de fièvre, de céphalées ainsi que de vomissements.



Carte 1 : Le paludisme dans le monde (source OMS)

### 1.1.3 Cycle du parasite

Pour se développer, le parasite a besoin de deux hôtes successifs ce qui rend son cycle biologique complexe. L'anophèle est l'hôte définitif, où se déroule le cycle sexué, tandis que l'homme est l'hôte intermédiaire hébergeant la reproduction asexuée (Schéma 1).<sup>2</sup>

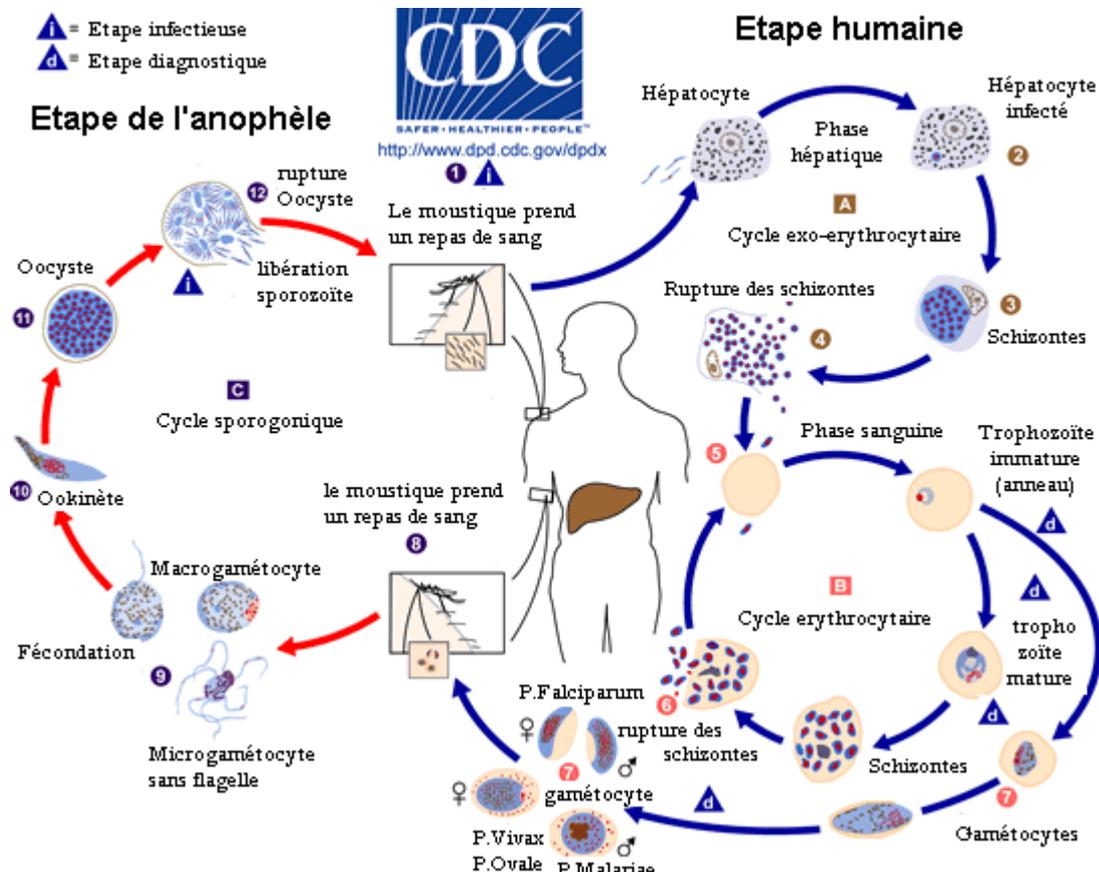


Schéma 1: Le cycle du parasite chez l'homme et le moustique

#### 1.1.3.1 Chez l'homme

Ce cycle est divisé en deux parties, l'une exoérythrocytaire (ou stade hépatique) et l'autre endoérythrocytaire (ou stade sanguin).

##### 1.1.3.1.1 Cycle exoérythrocytaire

L'anophèle femelle infecté, en prenant le sang nécessaire à sa ponte, inocule chez l'hôte des milliers de parasites sous forme sporozoïtes. Ceux-ci migrent jusqu'au foie *via* la circulation sanguine devenant ainsi des trophozoïtes hépatocytaires. Ces trophozoïtes se divisent activement pour donner après seulement quelques jours plusieurs milliers de jeunes parasites appelés mérozoïtes. Selon les espèces, une partie de la souche peut rester dans le foie et donner plusieurs accès dits de reviviscence à partir de la souche hépatique initiale. Ces rechutes sont observées pour les espèces *P. vivax* ou *P. ovale*. Le foie sert alors d'organe réservoir pendant plusieurs années. Les mérozoïtes libérés par le foie intègrent les hématies en moins d'une minute.

### 1.1.3.1.2 Cycle endoérythrocytaire

C'est pendant le stade endoérythrocytaire qu'apparaissent les signes cliniques de l'infection. Après intégration dans le globule rouge, le mérozoïte se développe et forme un élément annulaire appelé trophozoïtes. Ce dernier est le siège d'une activité métabolique intense qui comprend la digestion de l'hémoglobine, afin de récupérer les acides aminés nécessaires à sa croissance, ainsi que la polymérisation de l'hème issu de cette digestion en hémozoïne (ou pigment malarique). Le parasite augmente alors de taille et son noyau se divise pour donner un schizonte qui en éclatant provoque la libération d'une vingtaine de mérozoïtes qui envahissent à nouveau les hématies. L'éclatement des schizontes entraîne une poussée de fièvre due à la libération de l'hémozoïne et de débris membranaires dans le sang.

La durée totale du cycle endoérythrocytaire est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* provoquant des fièvres tierces. Ce cycle dure 72 heures pour *P. malariae* provoquant des fièvres quartes.

Après plusieurs cycles asexués, certains trophozoïtes se différencient en gamétocytes, mâles ou femelles, qui permettent la poursuite du cycle chez le moustique.

### 1.1.3.2 Chez l'anophèle femelle

Le cycle sexué du parasite (ou sporogonie) chez l'anophèle commence lorsque la femelle prend un repas sanguin chez un individu impaludé et qu'elle ingère quelques gamétocytes. Les gamétocytes femelles se transforment en macrogamètes et sont fécondés par les gamètes flagellés issus des gamétocytes mâles donnant naissance à un œuf mobile. Cet œuf, appelé ookinète, traverse la paroi gastrique de l'anophèle et s'enkyste dans la cavité coelomique en formant un oocyste (œuf immobile). A l'intérieur de celui-ci les noyaux se divisent et donnent, après éclatement, de nouveaux sporozoïtes qui migrent jusqu'aux glandes salivaires du moustique d'où ils seront éjectés lors de la prochaine piqûre infestante.

## 1.2 Principaux traitements antipaludiques

---

Face à la résistance plasmodiale, la compréhension des modes d'action cellulaire des médicaments antipaludiques est essentielle afin d'optimiser leur emploi et de comprendre les mécanismes impliqués dans cette résistance. Le *Plasmodium* dispose pour son développement intra-érythrocytaire d'un métabolisme et de moyens de défense spécifiques qui constituent autant de cibles aux anti-paludiques. Les différents traitements présentés dans ce rapport sont tout d'abord les inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques (antifolates, naphthoquinones, antibiotiques), puis l'artémisinine et dérivés, souvent associés à d'autres antipaludiques sous l'appellation ACT (Artemisinin Combination Therapy) et pour finir les inhibiteurs de la détoxification de l'hème (dérivés quinoléiques).

### 1.2.1 Les inhibiteurs des acides nucléiques

Ce sont des antimétabolites qui bloquent la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates et les naphthoquinones. Les antibiotiques seront classés dans cette catégorie bien qu'ils inhibent la synthèse protéique au niveau des ribosomes.

### 1.2.1.1 Les antifolates

Ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques. Les antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) produisant l'acide folique tandis les antifoliniques inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) produisant l'acide folinique. Parmi les anti-folates les plus connus il y a le proguanil **1** et la sulfadoxine **2** (Figure 1).

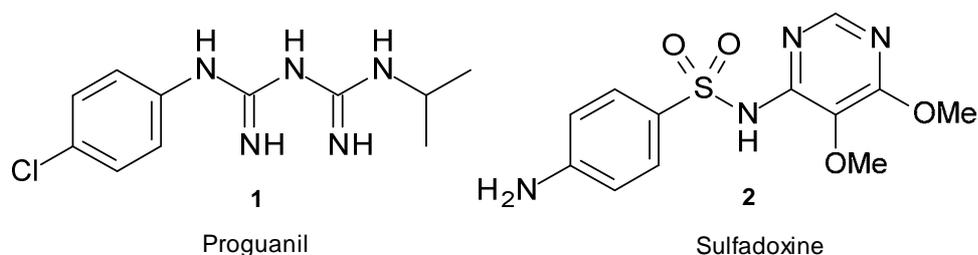


Figure 1 : Exemple d'antifolate

La sulfadoxine **2** s'utilise principalement avec la pyriméthamine<sup>3</sup> et même en combinaison avec l'amodiaquine ou la méfloquine<sup>4</sup> tandis que le proguanil **1** s'utilise avec l'atovaquone ou la chloroquine.<sup>5-9</sup>

### 1.2.1.2 Les naphtoquinones

Le composé le plus connu de ce groupe est l'atovaquone **3** (Figure 2). Cet antipaludique est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondriales. Seule, elle a peu d'impact thérapeutique mais en combinaison avec un autre anti-métabolite (proguanil **1**),<sup>5-7</sup> on observe une synergie d'action intéressante grâce à une inhibition de la synthèse des pyrimidines.

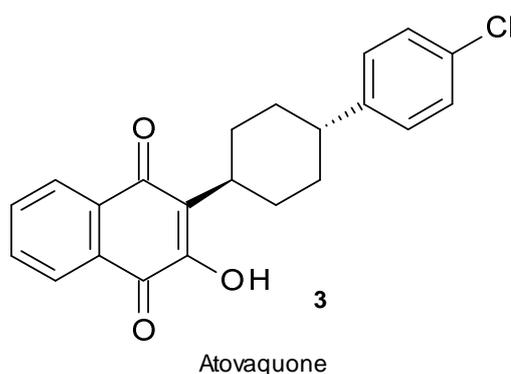


Figure 2 : Structure de l'atovaquone

### 1.2.1.3 Les antibiotiques

Les tétracyclines (doxycycline **4**),<sup>10, 11</sup> les macrolides (érythromicine **5**, azythromicine)<sup>12, 13</sup> (Figure 3) inhibent certaines fonctions de l'apicoplaste ce qui provoque une baisse de la synthèse protéique.

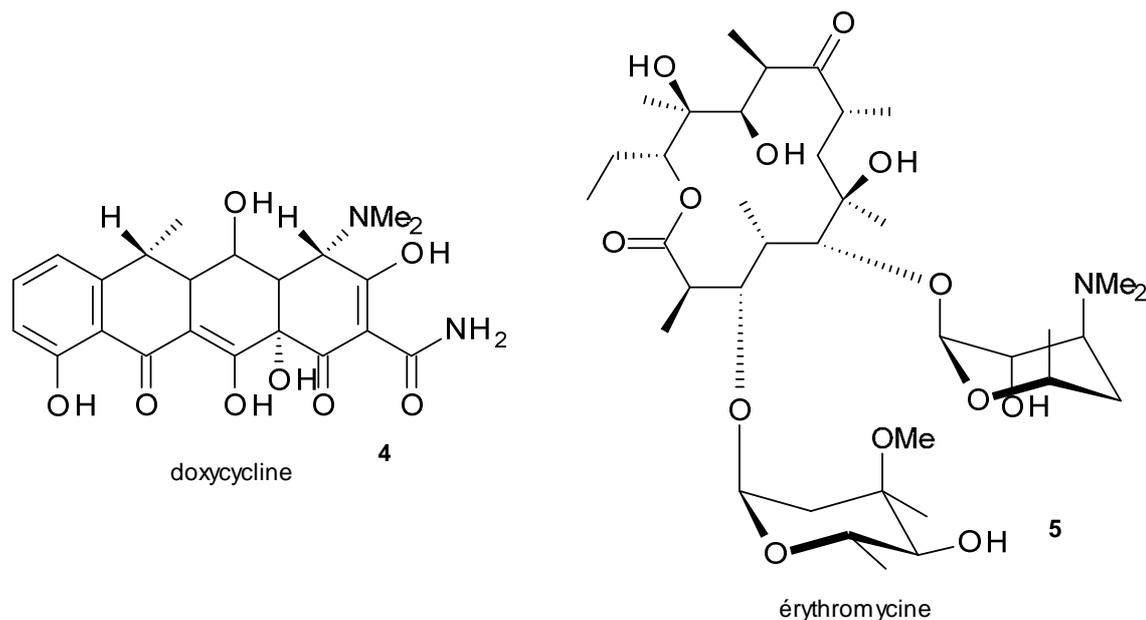


Figure 3 : Structure de deux antibiotiques

### 1.2.2 L'artémisinine et ses dérivés

En 1967, le gouvernement chinois lance un programme de criblage des plantes utilisées en médecine traditionnelle en relation avec la recherche de nouveaux composés antipaludiques.<sup>14</sup> Il a fallu attendre 1972 pour que des chercheurs chinois isolent, par extraction des feuilles de *Artemisia annua* à basse température, le composé actif appelé artémisinine **6**. L'artémisinine **6** est une lactone sesquiterpénique portant une fonction trioxane, indispensable à l'activité antipaludique.<sup>15</sup>

De nombreux dérivés, plus solubles, ont été synthétisés car l'artémisinine **6**, bien qu'employée cliniquement, présente une faible biodisponibilité. Une série de dérivés dits de première génération a été obtenue à partir de la dihydroartémisinine **7a** incluant parmi de nombreux composés l'artémether **7b** ou l'artésunate de sodium **7d** (Figure 4).<sup>16</sup>

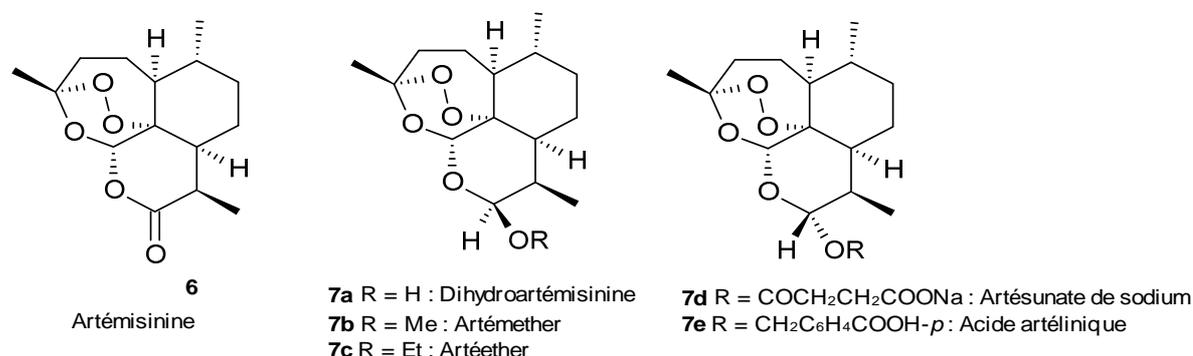


Figure 4 : Structure de l'artémisinine et de ses dérivés

Un des avantages de l'artésunate **7d** est qu'il peut être administré par voie intraveineuse, ce qui permet au composé d'agir plus rapidement que par voie intramusculaire.

L'acide artélinique **7e** (Figure 4) possède un temps de demi-vie plus long que l'artémisinine **6**. Néanmoins les temps de demi-vie de ces composés sont relativement courts, ce qui induit des traitements d'une durée de 5 à 7 jours avant l'élimination totale du parasite.

Des études de relation structure-activité ont été menées afin de connaître les éléments structuraux indispensables à l'activité des endoperoxydes. A partir de cette étude, de nombreux endoperoxydes synthétiques ont été produits (Figure 5).<sup>17, 18</sup>

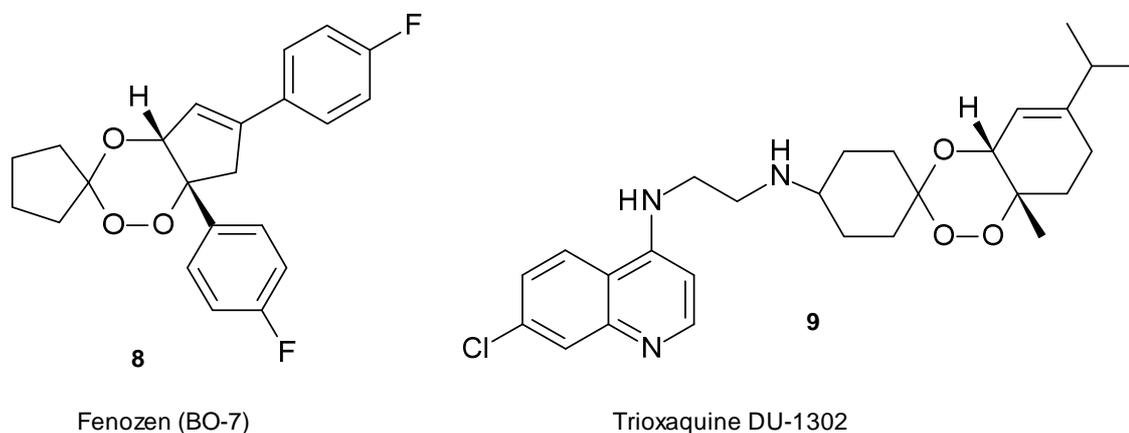


Figure 5 : Exemple d'endoperoxydes synthétiques

Le mode d'action de l'artémisinine **6** a fait l'objet d'études détaillées. La coupure homolytique de la liaison O-O, due à l'action d'un atome de fer sur le pont endoperoxide, entraîne la formation des radicaux carbonés par réarrangement. Ces radicaux présentent des propriétés alkylantes de l'hème et des protéines du parasite conduisant à la mort du parasite. Les molécules endoperoxides synthétiques possèdent un mode d'action similaire à celui de l'artémisinine.<sup>19-22</sup>

### 1.2.3 Bithérapies comprenant des dérivés d'artémisinine ou ACT

Une pharmacorésistance croissante aux médicaments antipaludiques s'est très rapidement répandue, compromettant les efforts de lutte antipaludique. En effet, les soins à base de chloroquine échouent à plus de 25% dans les pays d'Afrique, ceci est dû à une mutation sur une protéine entraînant l'efflux de la chloroquine hors de la cellule parasitée. La SP (Sulfadoxine 1-Pyriméthamine) contourne la résistance à la chloroquine mais il n'a suffi que de cinq ans pour que des souches parasitaires résistantes apparaissent.

En 2002, l'OMS a publié une recommandation sur la nécessité d'utiliser les ACT dans les pays touchés par les résistances aux antipaludéens classiques. Ceux-ci sont une association médicamenteuse comportant de l'artémisinine **6** ou un de ses dérivés **7**.<sup>1, 23, 24</sup>

Le groupe pharmaceutique Novartis commercialise le Co-artem® association de l'artéméter **7b** et de la luméfantrine tandis que le groupe Sanofi-Aventis fabrique l'Asaq® à base d'artésunate **7d** et d'amodiaquine. Il existe d'autres ACT sur le marché tels que Eurartekin® ou Duocotexin® (Dihydroartémisinine-Pipéraquine) ou Artequick® (Artémisinine-Pipéraquine).

Produit en assez faibles quantités, les ACT sont plus chers que la chloroquine. Un traitement de première ligne chloroquine ou SP coûte actuellement entre 0,2 et 0,5 USD (dollars USA) alors qu'un traitement ACT oscille entre 1,2 et 2,4 USD. Malheureusement peu de personnes en Afrique peuvent payer cette différence de prix et seule une fabrication à plus grande échelle ou une aide

financière plus importante des pays riches pourrait significativement faire baisser les coûts de production.

### 1.2.4 Les inhibiteurs de détoxification de l'hème

Au début du XVII<sup>ème</sup> siècle, la découverte de l'activité fébrifuge de l'écorce de Cinchona, arbre de la biodiversité péruvienne, marque un tournant important dans l'histoire du paludisme.<sup>14</sup> En 1820, les deux principaux alcaloïdes responsables de cette activité sont isolés par deux pharmaciens français : il s'agit de la quinine **10** et de la cinchonine **11** (Figure 6). La quinine **10** représente le traitement antipaludique principal jusqu'aux années 1930. A partir de ce moment-là, de nouveaux antipaludiques, conservant le motif quinoléique, ont été développés : la chloroquine **12**, la méfloquine **13**, l'amodiaquine **14** (amino-4-quinoléines) (Figure 7), la pamaquine **15**, la primaquine **16** (amino-8-quinoléines) (Figure 8).<sup>23</sup>

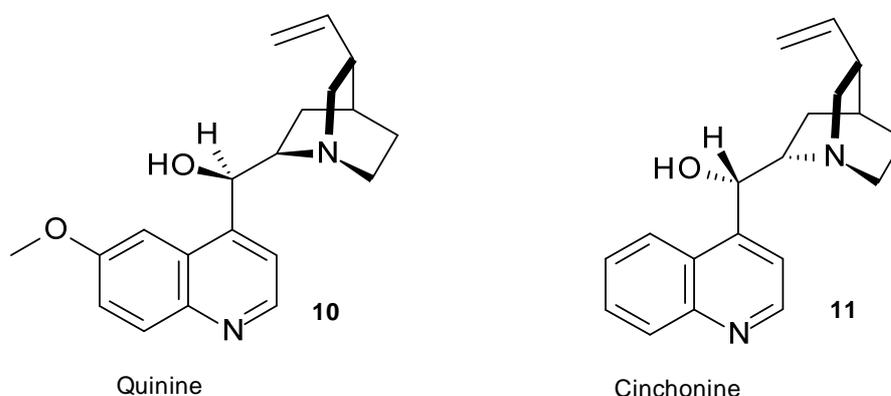


Figure 6 : Structure de la quinine et de la cinchonine

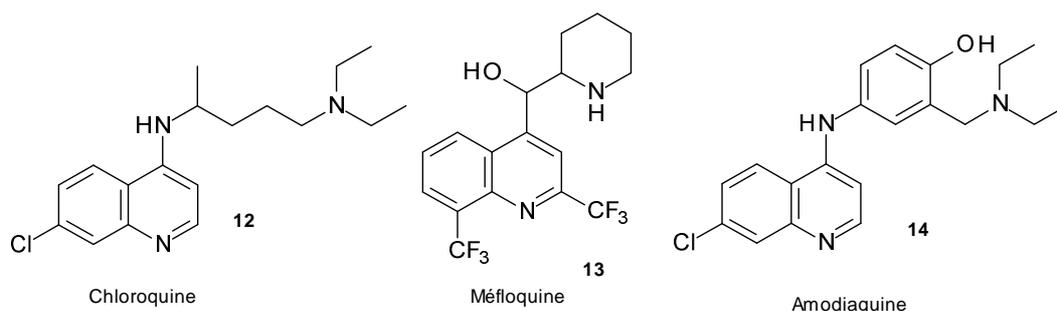


Figure 7 : Structure de quelques amino-4-quinoléines et de la méfloquine

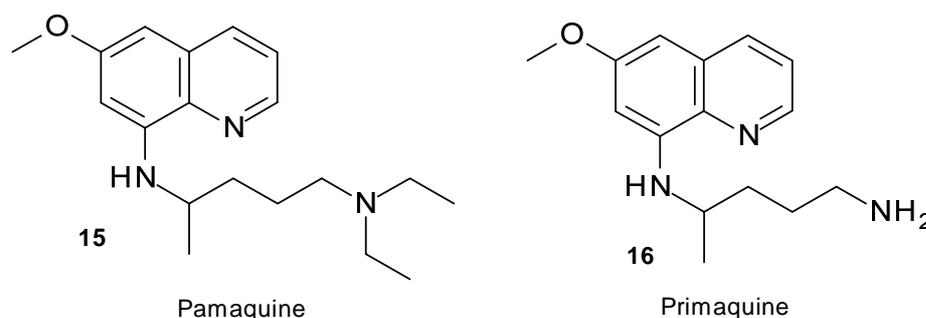


Figure 8 : Structure de la pamaquine et de la primaquine

Les amino-4-quinoléines agissent, pour la plupart, en inhibant la formation d'hémozoïne par interaction de type  $\pi$ - $\pi$  entre le noyau quinoléique et le squelette porphyrinique de l'hème.<sup>25</sup> Ainsi, l'accumulation de l'hème dans la vacuole digestive conduit à la mort du parasite.

Les amino-8-quinoléines agissent elles comme gamétocytocides aussi bien sur le stade endo-érythrocytaire que sur le stade exo-érythrocytaire.

Au début des années 1960, des cas de résistance à la chloroquine **12** apparaissent en Thaïlande et en Amérique du Sud. Aujourd'hui, la plupart des souches de *P. falciparum* sont résistantes à la majorité des quinoléines, ceci du à un usage excessif en prophylaxie et d'une métabolisation trop lente en raison d'un temps de vie trop long.

### 1.3 La formation d'hémozoïne dans *Plasmodium sp.*

Au cours du cycle endoérythrocytaire, le parasite digère entre 60% et 80% de l'hémoglobine contenue dans le globule rouge infecté.<sup>26, 27</sup> L'hémoglobine de la cellule hôte est transportée dans un compartiment du parasite (figure 9 étape a puis b) appelé vacuole digestive ayant un pH acide de 5,2 et est dégradée par plusieurs enzymes telles que des plasmepsines et des falcipainines qui produisent des peptides (figure 9 étape c)<sup>26, 28-30</sup> qui sont ensuite dégradés en aminoacides par des aminopeptidases (figure 9 étape d).<sup>26, 31</sup> Les acides aminés fournis sont utilisés par le parasite entre autre pour sa synthèse protéique. Le processus de dégradation de l'hémoglobine fournit aussi de l'hème, composé toxique pour le parasite (figure 9 étape e). L'hème Fe(II)PPIX est oxydé en hème Fe(III)PPIX (figure 9 étape f) puis est déttoxié à 90% environ en un cristal insoluble appelé hémozoïne (figure 9 étape de h à l).<sup>26, 32, 33</sup> Ce processus se déroule également dans la vacuole digestive, à pH légèrement acide (Figure 9). Le processus de déttoxication de l'hème a été beaucoup étudié afin de comprendre son mécanisme et a induit de nombreux débats.

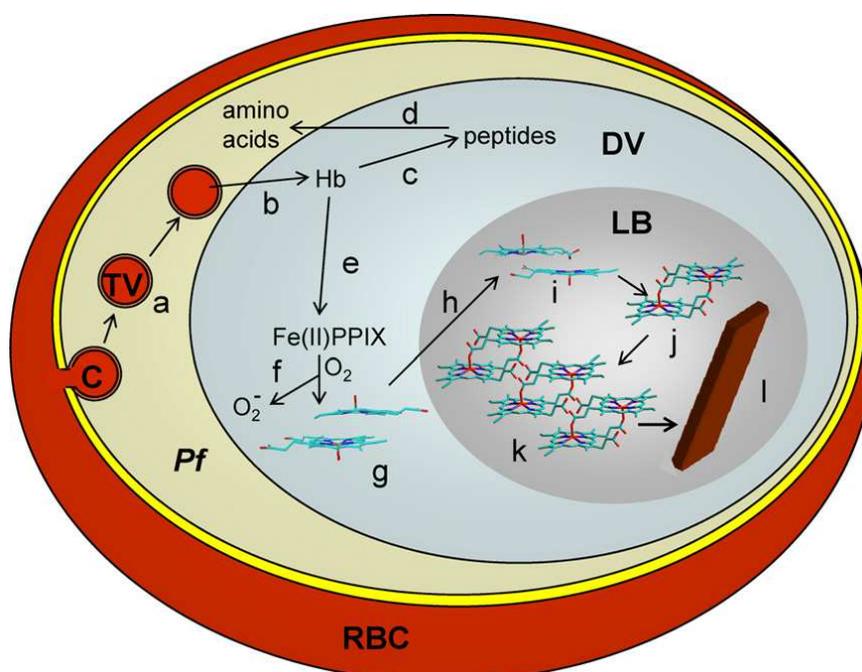


Figure 9 : Digestion de l'hémoglobine dans le GRP<sup>26</sup>

C : cytosome, TV : transport vesicle (vésicule de transport), Pf : parasite, RBC : Red Blood Cell (GR), DV : digestive vacuole (vacuole digestive), LB : lipids body (corps lipidiques)

La plupart des expériences réalisées par les différentes équipes sur l'étude de la formation de l'hémozoïne et son inhibition l'ont été dans des conditions de réaction chimique c'est-à-dire sans

matériel biologique. Ces expériences sont notées *in vitro* (chimie) pour éviter toute confusion avec des expériences réalisées sur des cultures de parasites.

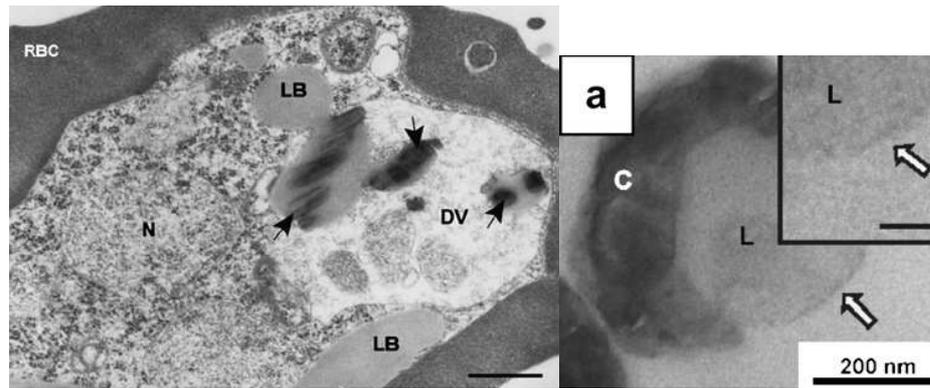
La controverse a commencé à la fin des années 80 lorsque Fitch et Slater proposèrent que l'hémozoïne soit composée uniquement de ferriprotoporphyrine (FP) sous forme de complexe voire de polymère.<sup>26, 34, 35</sup> Slater proposa même que la polymérisation de l'hème en hémozoïne était catalysée par une enzyme « haem polymerase » car la formation d'hémozoïne serait sensible à la chaleur (disparition de l'activité après chauffage) et aurait un pH de formation optimum (pH = 5).<sup>26,</sup>

<sup>36</sup> D'autres études ont montré que l'hémozoïne est un complexe formé de FP (45% environ) et d'un polypeptide particulièrement riche en glycine ayant une forte affinité pour la ferriprotoporphyrine.<sup>26,</sup>

<sup>37</sup> A partir de 1995, de nouvelles études remettent en question l'idée d'un mécanisme enzymatique intervenant dans la formation d'hémozoïne. Dorn et al. montrent que le facteur responsable de la formation d'hémozoïne n'est pas désactivé par le changement de température ni de pH<sup>26, 38</sup> et cette formation apparaît comme spontanée lorsqu'on met de l'hème Fe(III)PPIX en présence d'acide acétique concentré ou d'acides aminés.<sup>26, 39, 40</sup>

De nombreux facteurs entraînant la formation d'hémozoïne ont été étudiés comme des lysats de parasites, des lysats de vacuoles digestives, des lipides, un « noyau » d'hémozoïne ou des protéines de type HRP (Histidine-Rich Protein).<sup>26, 40</sup> Ziegler et Papalexis ont démontré que la protéine HRPII se liait à l'hème Fe(III)PPIX et qu'elle entraînait la formation d'hémozoïne *in vitro* (chimie)<sup>26, 41, 42</sup> suggérant que ce serait le principal facteur de détoxification dans le parasite même si seulement 3% de cette protéine se situe dans la vacuole digestive tandis que les 97% restant évitent l'endocytose en restant à la périphérie du cytosol érythrocytaire.<sup>26, 42, 43</sup> *In vitro* (chimie), la formation de l'hémozoïne en présence de HRPII seule étant trop lente pour être une hypothèse valable dans le parasite, un processus impliquant à la fois HRPII et des lipides a été proposé.<sup>26, 44</sup> Sullivan et Noland apportèrent un argument contre l'hypothèse d'une participation des protéines HRP en observant la formation d'hémozoïne dans des clones de *P. falciparum* ne produisant ni HRPII, ni HRPIII.<sup>26, 45, 46</sup> De plus, Noland a montré que les cristaux d'hémozoïne formés dans ces clones sont morphologiquement identiques aux cristaux d'hémozoïne formés par des souches produisant les HRP.<sup>26, 45</sup>

L'hypothèse concernant une implication des HRP étant de plus en plus improbable, plusieurs équipes se sont penchées sur les lipides et leur rôle dans la formation d'hémozoïne. Dorn et al. ont montré que les lipides contenus dans les lysats de trophozoïtes catalysaient la formation d'hémozoïne *in vitro* (chimie)<sup>26, 40</sup> et Fitch, qui a caractérisé plusieurs de ces lipides, a obtenu de bons rendements de formation d'hémozoïne catalysée par le mono-oleoylglycerol (MOG) *in vitro* (chimie) (60% d'hémozoïne formée en 24h à 37°C).<sup>26, 47</sup> Dans des cultures de parasites, des lipides (colorés avec le Nile Red ou le Malachite Green) ont été observés autour des cristaux d'hémozoïne dans la vacuole digestive par TEM (Transmission Electron Microcopy).<sup>26, 48-50</sup> Ces lipides ont été analysés par CCM et LC-MS et contiennent principalement des acides gras saturés (de type palmitique et stéarique) ainsi qu'une petite quantité d'acides gras insaturés (de type oléique et linoléique) et leur activité *in vitro* (chimie) a été confirmée.<sup>26, 50</sup> Ce mode de formation d'hémozoïne catalysée par les lipides (figure 9 étape de h à l) a été étudié *in vitro* (chimie) dans les conditions physiologiques et la réaction se fait à l'interface eau/lipides<sup>51, 52</sup> ce qui correspond aux conditions observées dans la vacuole digestive (Photo 1).<sup>51, 52</sup>



**Photo 1 : Formation d'hémozoïne à l'interface eau/lipides**

RBC : Red Blood Cell (GR), N : nucleus (noyau), LB : lipids body, DV : digestive vacuole (vacuole digestive), C : hemozoin (hémozoïne) et L : lipids (lipides)

En effet on peut voir sur les photos que l'hémozoïne (indiquée par des flèches ou marquée C) se trouve à proximité des lipides (LB ou L) présents que ce soit dans des conditions chimiques comme dans des cultures de parasites.

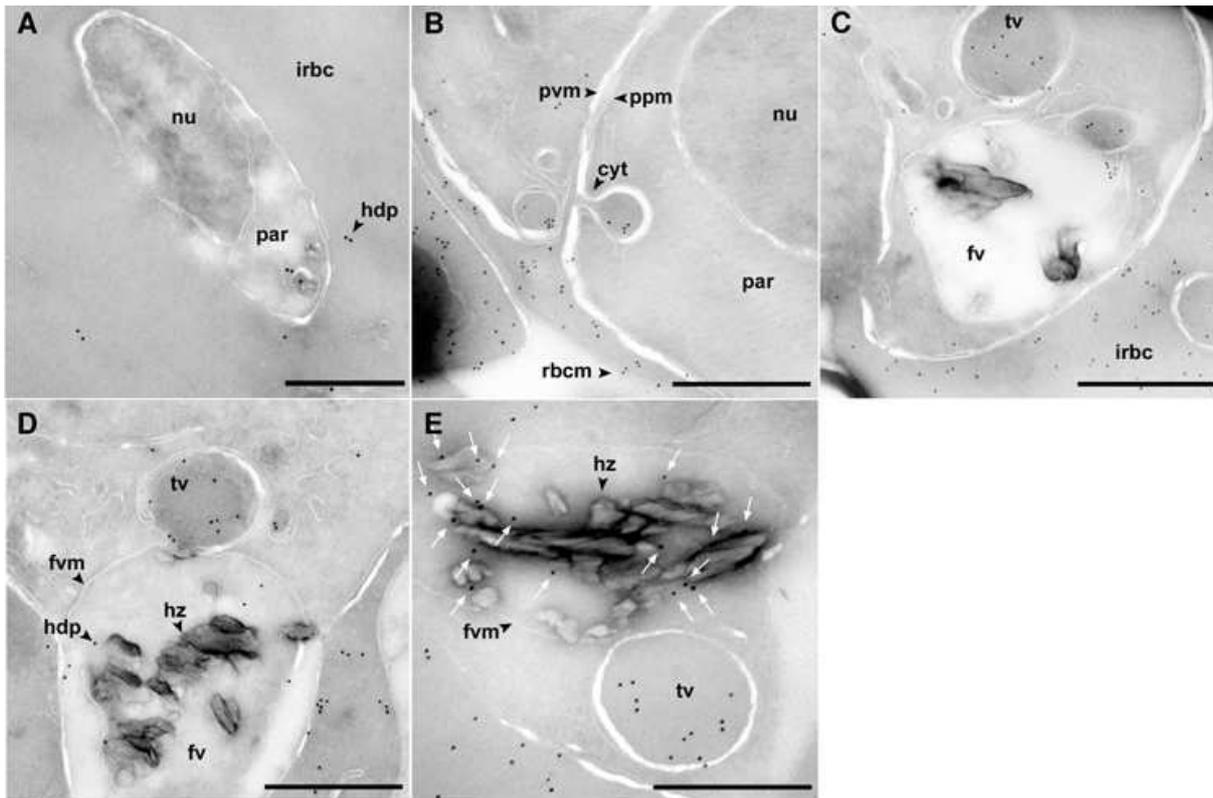
La controverse a été relancée en 2008 par une équipe du Virginia Tech Institute qui a découvert une nouvelle protéine nommée Heme Detoxification Protein (HDP).<sup>53</sup> L'HDP se lie à l'hème avec une constante  $K_d$  de 80 nM (constante de dissociation) et les expériences menées *in vitro* (chimie) ont montré que la protéine convertit la quasi-totalité de l'hème en hémozoïne en 20 min alors qu'elle est présente en quantité catalytique.

Lors de cette étude, le pH optimal pour l'activité *in vitro* (chimie) de l'HDP a été étudié : celui-ci est de 5,2 ce qui correspond au pH de la vacuole digestive du parasite.

De même, cette étude a montré que la HDP est thermostable. Même chauffée à 94°C pendant 10 min elle garde son activité, ce qui explique que les extraits parasitaires gardent leur activité catalytique sur la formation d'hémozoïne après avoir été chauffés.

Le Virginia Tech Institute a aussi étudié la détoxification de l'hème par l'HDP dans le parasite (Photo 2).

Selon cette étude, la HDP est sécrétée par le cytosol des cellules infectées (A) avant l'apparition de l'hémozoïne dans le parasite. Le parasite absorbe la HDP sécrétée (B) en capturant celle-ci dans le cytosome à l'aide des membranes du parasite. La HDP, dans la vésicule de transport, est transportée jusqu'à la vacuole digestive (C et D) et est trouvée à proximité des cristaux formés d'hémozoïne (E).



**Photo 2 : Formation d'hémozoïne induite par l'HDP**

nu : nucleus (noyau), par : parasite, hdp : HDP, irbc : infected red blood cell (GRP), pvm : parasitophorous vacuole membrane, ppm : parasite plasma membrane, cyt : cytosome, rbc : membrane RBC, tv : transport vesicle, hz : hemozoin, fv : food vacuole (vacuole digestive), fvm : membrane de fv

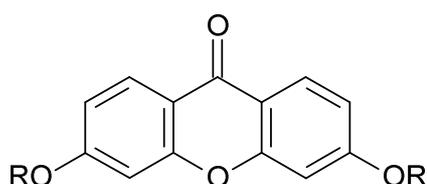
Cette étude n'exclut pas une action commune HDP-lipides dans la formation de l'hémozoïne dans le parasite.

L'hème, issue de la digestion de l'hémoglobine par le parasite, est transformé en hémozoïne par celui-ci afin de diminuer sa toxicité. Le mécanisme de cette détoxification n'a pas été élucidé même si de nombreux débats et études ont permis d'émettre des hypothèses. Ces études ont été principalement menées dans des conditions éloignées des conditions biologiques ce qui a permis de découvrir plusieurs précurseurs potentiels à la formation d'hémozoïne mais qui n'a pas permis de confirmer leur rôle dans les cellules parasitaires. Une étude potentielle pourrait se concentrer sur la formation d'hémozoïne induite par les lipides, la HDP voir les deux concomitamment.

## 1.4 Optimisation de l'activité antipaludique de composés naturels par synthèse de dérivés

### 1.4.1 Travail sur les xanthones (2002)

Au début des années 2000, Kelly et Riscoe ont étudié les hydroxyxanthones et leurs propriétés antipaludiques (activité et affinité avec l'hème).<sup>54</sup> En 2002, afin d'améliorer l'activité de ces composés, ils ont synthétisé une nouvelle série de xanthones : les 3,6-bis- $\omega$ -diéthylaminoalkoxyxanthones **17** (Figure 10).



R = H : **17-0**  
 R = (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NEt<sub>2</sub> : **17-n** (n de 2 à 8)

Figure 10 : Structure des 3,6-bis- $\omega$ -diéthylaminoalkoxyxanthones

Le but de cette modification structurale, ajoutant deux sites protonables en conditions acides, est de permettre l'accumulation des molécules dans la vacuole digestive et de fournir deux sites ioniques forts s'associant avec les groupements propionates de l'hème.<sup>55, 56</sup>

Tableau 1 : Activité in vitro des dérivés de xanthone

Composés	CI <sub>50</sub> (μM)		
	D6	W2	F86
3,6-hydroxyxanthone <b>17-0</b>	>100		
Composé <b>17-2</b>	2,2 ± 0,5		
Composé <b>17-3</b>	1,5 ± 0,7		
Composé <b>17-4</b>	0,65 ± 0,08		
Composé <b>17-5</b>	0,1 ± 0,05	0,12 ± 0,07	0,11 ± 0,06
Composé <b>17-6</b>	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,02
Composé <b>17-8</b>	0,43 ± 0,03		

(D6 est une souche MultiDrug Sensible, W2 est une souche MultiDrug-Resistante, F86 est une souche chloroquino-résistante)

L'intégration des deux chaînes aminoalkyles sur les groupes hydroxyles de la xanthone permet de réduire significativement les CI<sub>50</sub> sur la souche D6 (souche sensible). En effet, la 3,6-hydroxyxanthone **17-0** est inactive sur D6 tandis que pour les composés **17-5** et **17-6** les CI<sub>50</sub> sont excellentes. L'équipe de Riscoe et Kelly a évalué les CI<sub>50</sub> des deux composés **17-5** et **17-6** sur deux souches résistantes et celles-ci sont identiques. Les composés **17-5** et **17-6** se comportent de la même façon quelque soit le profil de résistance des souches utilisées (Tableau 1).<sup>55</sup>

Riscoe et al. ont aussi évalué les constantes d'association des composés avec l'hème. Pour chaque composé testé, une solution d'hème est titrée par des solutions de composés à différentes

concentrations. Une variation de l'absorbance de l'hème en fonction de la concentration est alors observée par spectroscopie UV qui permet ensuite de calculer la constante d'association.

**Tableau 2 : Constante d'association composé-hème**

Composés	17-2	17-3	17-4	17-5	17-6	17-8	CQ 12	Quinine 10
Ka ( $10^5 \text{ M}^{-1}$ )	3,44	3,84	6,95	8,26	9,02	7,97	4,0	0,21

Les constantes d'association composé-hème des dérivés des xanthones sont supérieures aux constantes d'association de la chloroquine **12** et de la quinine **10** mesurées dans les mêmes conditions (Tableau 2) et les composés se lient à l'hème avec une stoechiométrie unique : 1 molécule de composé pour 1 molécule de dimère d'hème.<sup>55</sup>

Riscoe et Kelly ont montré par microscopie confocale que les dérivés de xanthones s'accumulent dans la vacuole digestive (colocalisation avec le LysoTracker Red colorant des compartiments acides).<sup>56</sup> Les dérivés d'hydroxyxanthone sont bien piégés dans la vacuole digestive et s'y accumulent (Photo 3). Ci-dessous, on visualise la colocalisation du composé **17-5** (bleu) avec le LysoTracker Red, colorant des compartiments acides donc de la vacuole digestive du parasite.



**Photo 3 : Colocalisation du 17-5 et du LysoTracker Red (microscopie confocale)**

#### 1.4.2 Travail sur les acridones (2009)<sup>57</sup>

Suite à leur travail sur les xanthones, l'équipe de Riscoe a travaillé sur les acridones. Dans l'optique d'améliorer leur activité antipaludique, deux chaînes aminoalkyles ont été insérées sur les acridones permettant d'introduire deux propriétés importantes : l'introduction d'azotes basiques permet comme précédemment l'accumulation des composés dans la vacuole digestive, mais également,

l'introduction de la substitution sur l'azote de l'acridone permet de diminuer la résistance à la chloroquine **12** (Figure 11).

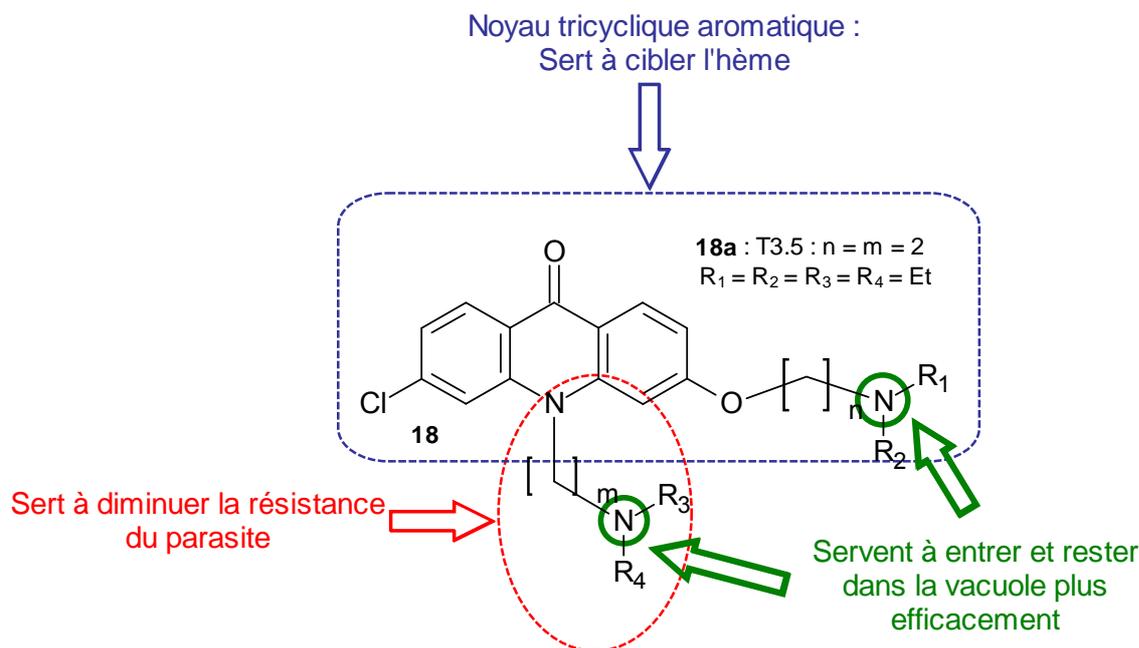


Figure 11 : Structure générale des dérivés des acridones

Un dérivé plus actif que les autres est ressorti : le T3.5 pour lequel les évaluations ont été plus poussées (Tableau 3).

Tableau 3 : Activité *in vitro* contre différentes souches de *P. falciparum*

Composé	CI <sub>50</sub> (nM)			
	D6	Dd2	7G8	Tm90-C2B
T3.5 <b>18a</b>	44,8 ± 5,2	77,3 ± 6,0	85,9 ± 6,8	71,3 ± 7,4
Chloroquine <b>12</b>	8,4 ± 1,9	124,7 ± 9,9	235,7 ± 25,6	122,7 ± 10,5
Quinine <b>10</b>	19,4 ± 1,1	87,2 ± 9,7	77,3 ± 6,9	55,8 ± 5,5

(D6 : souche chloroquino-sensible, Dd2, 7G8 et Tm90-C2B : souches MDR)

Le composé T3.5 montre des activités *in vitro* très bonnes et ces activités sont particulièrement intéressantes lorsqu'il s'agit de souches résistantes à plusieurs composés (MDR : MultiDrug-Resistant) car elles sont du même ordre de grandeur que celles de la quinine **10** et inférieures à celles de la chloroquine **12**. Des études de potentialisation entre le composé T3.5 et des antipaludiques connus ont été réalisées et montrent une synergie entre le T3.5 et la chloroquine **12**, l'amodiaquine **14**, la quinine **10** et la pipéraquine ainsi qu'un antagonisme avec la méfloquine **13**. L'effet réverseur de résistance du T3.5 a été évalué et les tests montrent que ce composé a une action similaire au vérapamil avec la chloroquine **12** ou la quinine **10**.

Le T3.5 (bleu), observé en microscopie confocale (Photo 4) est localisé dans les cellules parasitées et forme, avec une constante d'association élevée, un complexe soluble avec l'hème au pH de la vacuole. Riscoe et al. précisent que le composé s'accumule dans la vacuole digestive du parasite et que le phénomène est visible par microscopie confocale mais ne publient pas leur protocole d'observation ni de photos montrant la colocalisation.

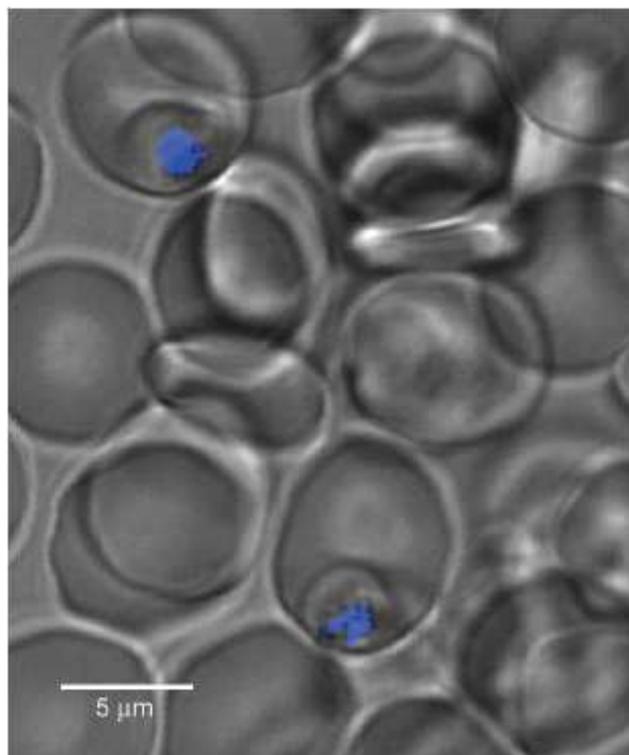


Photo 4 : Microscopie confocale du T3.5 dans *P. falciparum*

Des tests *in vivo* sur des souris infectées par une souche de *P. yoelii* sensible à la quinine **10** ont été réalisés et ont montré la synergie entre la quinine **10** et le composé T3.5 (Tableau 4).

Tableau 4 : Synergie entre le T3.5 et la quinine *in vivo*

	Dose (mg.kg <sup>-1</sup> .j <sup>-1</sup> )		
	T3.5 seul	Quinine seule	T3.5 : Quinine
DE <sub>50</sub>	56 ± 7	39 ± 4	14 : 14 ± 4 : 4
DE <sub>75</sub>	70 ± 11	57 ± 9	19 : 19 ± 4 : 4
DE <sub>90</sub>	88 ± 20	85 ± 25	24 : 24 ± 7 : 7

En effet, l'association du T3.5 et de la quinine **10** permet une réduction des dosages des deux composés. Ainsi les doses pour une DE<sub>90</sub> passent de 88 et 85 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour respectivement le T3.5 et la quinine **10** à un dosage de 24 : 24 mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup> pour l'association des deux composés.

#### 1.4.3 Travail sur les néocryptolépines (2009)

La 5-méthyl-5H-indolo[3,2-b]quinoline ou cryptolépine a été isolée de la plante *Cryptolepis sanguinolenta* dont les racines sont utilisées comme traitement traditionnel contre le paludisme. Les cryptolépines sont connues pour avoir de bonnes activités antipaludiques contre des souches chloroquino-résistantes et chloroquino-sensibles ainsi que pour inhiber la formation d'hémozoïne mais également pour leur cytotoxicité du fait de leurs propriétés intercalantes de l'ADN et inhibitrice de topoisomérase II.<sup>58</sup>

El Sayed et al. ont étudié l'influence de l'introduction de certains groupements sur la néocryptolépine **19** sur l'activité antipaludique et la cytotoxicité.<sup>58</sup>

L'hypothèse de travail de El Sayeb et al. est que l'introduction d'une chaîne basique aminoalkyle (N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-diethylpentane-1,4-diamine) (Figure 12) sur la néocryptolépine **19** va permettre d'améliorer l'activité antiplasmodiale via l'accumulation des dérivés dans la vacuole digestive. En effet, cette

chaîne aminoalkyle permet une augmentation très intéressante de l'activité sur *P. falciparum* par rapport à la néocryptolépine **19**. Les dérivés en position 2, 3 et 8 possèdent des  $CI_{50}$  du même ordre de grandeur que la chloroquine **12** sur cette souche (Tableau 5).

L'introduction de cette chaîne aminoalkyle ne permet pas de faire baisser la cytotoxicité des dérivés testés mais les  $CI_{50}$  sur MRC5 sont du même ordre de grandeur que celle de la néocryptolépine **19** ce qui induit une augmentation de la sélectivité des dérivés testés en faveur de *P. falciparum*. En effet, lorsque le groupement R est en position 8, le composé est 1800 fois plus actif sur cette souche de *P. falciparum* que toxique sur les cellules de mammifère MRC5 (Tableau 5).

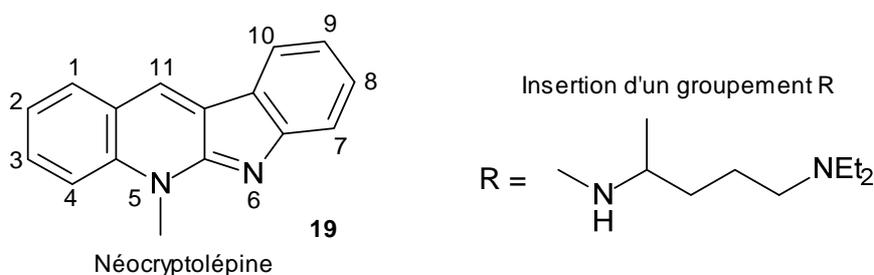


Figure 12 : Structure de la néocryptolépine et de ses dérivés

Tableau 5 : Activité antipaludique, cytotoxicité et index de sélectivité de plusieurs composés

Composé	<i>P. falciparum</i>	MRC5	IS (MRC5/Pf)
	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)		
Chloroquine <b>12</b>	0,01		
Néocryptolépine <b>19</b>	11	27	2,45
R en position 2	0,03	7,2	240
R en position 3	0,015	16	1067
R en position 8	0,01	18	1800
R en position 9	0,14	16	114
R en position 11	0,62	20	32

(Souche chloroquino-sensible de *P. falciparum* du Ghana)

Les composés ayant une chaîne aminoalkyle montrent une inhibition de la formation d'hémozoïne mesurée *in vitro* meilleure que la néocryptolépine **19** excepté pour le dérivé dont le groupement R se situe en position 9 (Tableau 6).

Tableau 6 : Inhibition de la formation d'hémozoïne

Composés	Inhibition formation d'hémozoïne ( $CI_{50}$ en meq)
Néocryptolépine <b>19</b>	5,97
R en position 2	1,45
R en position 3	Pas déterminé
R en position 8	4,40
R en position 9	20% inhibition à 5 meq
R en position 11	4,11
Chloroquine <b>12</b>	2,56

meq = milli-équivalent =  $10^{-3}$  équivalent, Hz : Hémozoïne

L'introduction de la chaîne aminoalkyle sur la néocryptolépine **19** a permis d'améliorer les activités antipaludiques ainsi que l'index de sélectivité par rapport à la cytotoxicité mais aussi de garder la propriété inhibitrice de la formation d'hémozoïne de la néocryptolépine **19**. Certains composés ont

été testés en *in vivo* (*P. berghei* sur des souris) mais n'ont pas été assez efficaces ou trop toxiques pour permettre la suite des tests (résultats non fournis dans la publication).

Une étude plus récente a été menée par Lavrado et al. sur l'influence de l'introduction d'une chaîne aminoalkyle sur la cryptolépine. Cette publication montre que l'introduction de cette chaîne améliore l'activité antipaludique de la cryptolépine mais aussi la sélectivité antipaludique. L'étude montre que la cryptolépine et ses dérivés ont tendance à s'accumuler dans le noyau du parasite mais Lavrado et al. précisent que l'hème désactive 60% de l'intensité de la fluorescence des cryptolépines et que l'ADN ne désactive que 20% de cette intensité de fluorescence ce qui expliquerait le fait que l'accumulation dans le noyau est plus facilement visible.

## 1.5 Les Benzo[c]phénanthridines

### 1.5.1 Généralités et études des propriétés biologiques

#### 1.5.1.1 Alcaloïdes naturels (structure et origine végétale)

Les benzo[c]phénanthridines sont des alcaloïdes présentant un squelette commun (Figure 13) dont il existe un très grand nombre de dérivés naturels.

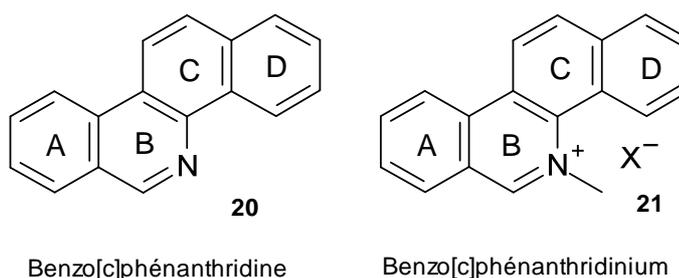


Figure 13 : Structure des benzo[c]phénanthridines

Ces molécules sont extraites de plantes de la famille des Rutacées<sup>59-72</sup> et plus particulièrement de deux genres *Toddalia*<sup>59-63</sup> et *Zanthoxylum*.<sup>64-72</sup>

L'espèce *T. asiatica* est la plus étudiée dans le genre *Toddalia* et de cette espèce ont été isolées la nitidine **22** et la dihydronitidine **25**<sup>59, 60, 62, 63</sup> ainsi que la chélérythrine **23**, la norchélérythrine **24**, l'oxychélérythrine **26** et l'oxyavicine **27** (Figure 14).<sup>61</sup>

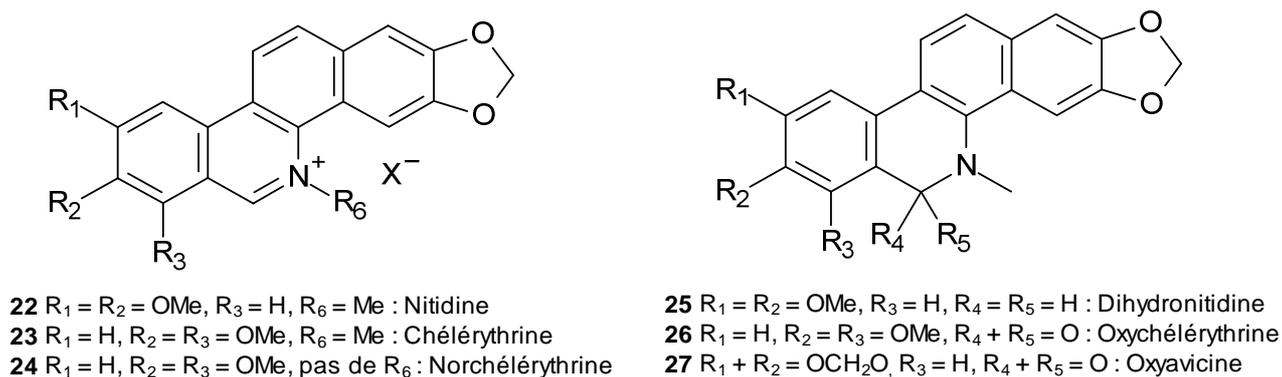


Figure 14 : Structure de benzo[c]phénanthridines issues de *T. asiatica*

Concernant le genre *Zanthoxylum*, beaucoup d'espèces ont été étudiées comme *Z. myriacanthum*,<sup>67</sup> *Z. madagascariense*<sup>69</sup> ou bien *Z. nitidum*.<sup>72</sup>

Plusieurs benzo[c]phénanthridines ont été isolées d'espèces de *Zanthoxylum* (Tableau 7) : la nitidine **22**, la chélérythrine **23**, la norchélythrine **24**, l'oxyavicine **27** (Figure 14) ainsi que la fagaronine **28**, la sanguinarine **29**, la térihanine **30**, l'isotérihanine **31**, la décarine **32**, la rhoifoline A **33** et la nornitidine **34** (Figure 15).

La nitidine **22** et la chélérythrine **23** sont présentes dans un grand nombre d'espèces du genre *Zanthoxylum* dont plusieurs en commun (*Z. nitidum*, *williamsii*, *flavum* et *dipetalum*). *Zanthoxylum nitidum* est riche en benzo[c]phénanthridines puisqu'elle en contient six différentes. Dans d'autres espèces une ou deux benzo[c]phénanthridines ont été isolées seulement (*Z. monophyllum*, *myriacanthum* ou *zanthoxyloides*) (Tableau 7).

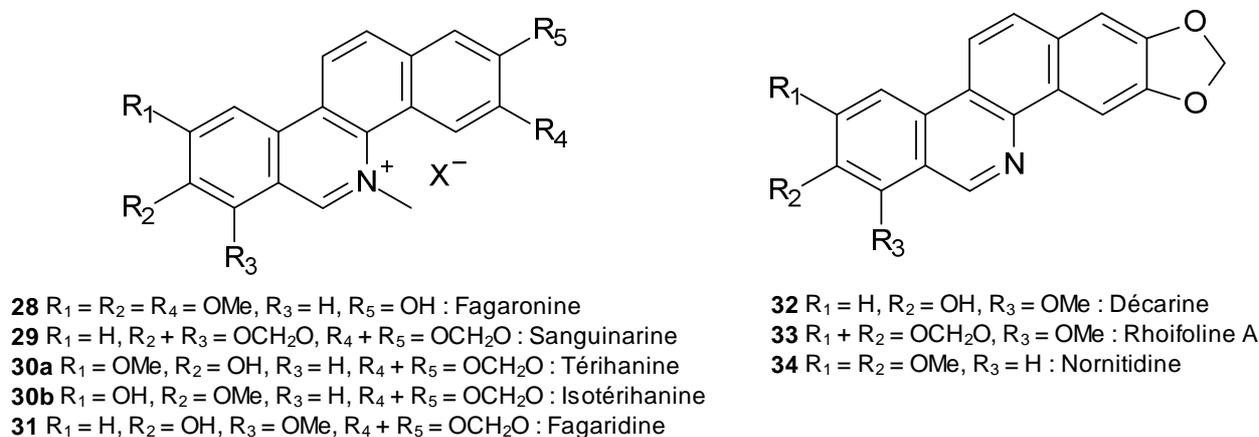


Figure 15 : Structure de benzo[c]phénanthridines issues du genre *Zanthoxylum*

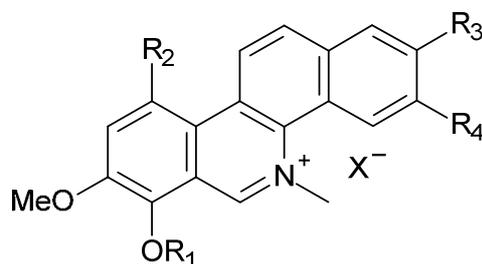
**Tableau 7 : Produits extraits de *Zanthoxylum***

Composés (n°)	22	23	24	27	28	29	30	31	32	33	34
Espèces de <i>Zanthoxylum</i>	Publications concernées (numéro)										
<i>nitidum</i>	72	72		72		72			72	72	
<i>ovalifolium</i>	71						71	71			
<i>williamsii</i>	66	66									
<i>monophyllum</i>		66									
<i>madagascariense</i>			69						69		69
<i>myriacanthum</i>											67
<i>flavum</i>	65	65									
<i>dipetalum</i>	64	64									
<i>zanthoxyloides</i>			70		68, 70						

Beaucoup de ces composés ont été étudiés pour leurs propriétés biologiques intéressantes : cytotoxiques, antipaludiques, antibactériennes ou même antivirales.

### 1.5.1.2 Propriétés cytotoxiques

Plusieurs études sur les propriétés des benzo[*c*]phénanthridines ont été menées en particulier sur les propriétés cytotoxiques. Qu'elles soient synthétiques ou bien extraites de plantes, les benzo[*c*]phénanthridines ont une bonne activité *in vitro* contre des lignées cancéreuses de tous types. Des activités *in vitro* de benzo[*c*]phénanthridines naturelles ou synthétiques (Figure 16) ont été publiées sur la lignée HeLa S3 (Tableau 8)<sup>73-76</sup>.



- 35 R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OMe : Sanguilutine  
 36 R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = OMe, R<sub>3</sub> + R<sub>4</sub> = OCH<sub>2</sub>O : Chélilutine  
 37 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> + R<sub>4</sub> = OCH<sub>2</sub>O : NK109

Figure 16 : Structure de la chélilutine, la sanguilutine et du NK109

Tableau 8 : Activités sur la lignée HeLa S3

Composés	CI <sub>50</sub> (μM)
Nitidine <b>22</b>	0,105
Fagaronine <b>28</b>	0,82
Chélérythrine <b>23</b>	2,61
Fagaridine <b>31</b>	8,65
Sanguilutine <b>35</b>	0,88
Chélilutine <b>36</b>	1,66
Sanguinarine <b>29</b>	0,35
Nornitidine <b>34</b>	>30
Norfagaronine <b>66</b>	NA
NK109 <b>37</b>	0,17
Doxorubicine	0,035

Les produits les plus actifs sur la lignée HeLa S3 sont la nitidine **22**, le NK109 **37** et la sanguinarine **29** avec des activités de l'ordre de 100 à 350 nM. Ces composés sont toutefois moins actifs que la doxorubicine, composé de référence, dont la  $CI_{50}$  est trois fois moindre que celle de la nitidine **22**. Deux composés sont inactifs ou très peu actifs, il s'agit de la nornitidine **34** et de la norfagaronine. Ces deux composés sont les deux seuls à ne pas avoir d'atome d'azote quaternaire ce qui laisse supposer que la quaternarisation de l'azote aromatique est très importante pour l'activité cytotoxique des benzo[c]phénanthridines.

*In vitro*, la fagaronine **28** est également active sur la lignée leucémique résistante P388, sur la lignée K562 mais peut-être considérée comme inactive sur la lignée P388 CPTO.3 (Tableau 9).<sup>77, 78</sup>

**Tableau 9 : Activités cytotoxiques de la fagaronine sur des lignées de leucémies**

Lignées	P388	P338 CPTO.3	K562
$CI_{50}$ ( $\mu$ M)	0,47	>10	3

D'autres références décrivent des activités antiprolifératives des benzo[c]phénanthridines sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (60) provenant de neuf types de cancers différents.<sup>79-82</sup> Les résultats (Tableau 10) sont une moyenne des  $CI_{50}$  mesurés sur les 60 lignées cellulaires. Ces résultats sont donnés pour la fagaronine **28** ainsi que les composés actifs de référence sur différentes lignées cellulaires testées.

**Tableau 10 : Activité antiproliférative de la fagaronine**

Composés	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)
Fagaronine <b>28</b>	9,48
Cyclophosphamide	210
5-fluorouracil	17,6
paclitaxel	0,02

La fagaronine a une bonne activité antiproliférative sur différentes lignées cancéreuses du même ordre que celle du 5-fluorouracil. Elle est plus active que le cyclophosphamide mais moins que le paclitaxel qui possède une excellente activité antiproliférative.

Les composés ont été évalués *in vivo* sur des souris auxquelles ont été inoculées des cellules P-388 par voie IP (jour 0). Les solutions contenant les composés ont été injectées au jour 1. Les souris ont ensuite été observées sur une période de 30 jours. T/C est le rapport entre le temps moyen de survie chez le groupe traité et le temps moyen de survie chez le groupe contrôle (Tableau 11).<sup>74, 78, 83-85</sup>

**Tableau 11 : Activité *in vivo* de benzo[c]phénanthridines sur P-388**

Composés	Dose (mg/kg)	Temps moyen de survie (jour)	T/C (%)
Contrôle		9,3	100
NK109 <b>37</b>	150,0	23,5	261
	75,0	14,3	159
	50,0	13,2	147
Chélérythrine <b>23</b>	25,0	1,1	12
	12,5	10,0	111
	6,25	10,0	111
Sanguinarine <b>29</b>	50,0	1,1	12
	25,0	2,3	25
	12,5	9,5	102
Fagaronine <b>28</b>	75,0	1,3	14
	50,0	9,5	102
	25,0	9,5	102
Nitidine <b>22</b>	75,0	4,3	46
	50,0	9,5	102
	25,0	10,0	108

La plupart des composés testés sont toxiques à une trop forte concentration car le temps moyen de survie diminue et ils ont une activité *in vivo* modérée puisque les T/C sont proches de 100%. Seul le NK109 **37** présente de très bons résultats même à forte concentration (T/C>100%).

Ishii et al. ont testé les activités des benzo[c]phénanthridines *in vivo* contre Sarcoma 180 (Tableau 12).<sup>86</sup> T/C est le rapport entre la croissance de la tumeur traitée (T) et la croissance de la tumeur contrôle (C). Les activités des composés sont mesurées à l'aide d'un hématocrite. L'hématocrite est le rapport entre le volume qu'occupent les cellules circulantes du sang après centrifugation sur le volume centrifugé. Le sarcome étant un cancer des tissus conjonctifs et le sang étant lui-même un tissu conjonctif, l'hématocrite permet d'évaluer l'évolution du sarcome et l'activité des drogues injectées.

**Tableau 12 : Activités *in vivo* des benzo[c]phénanthridines sur Sarcoma 180**

Benzo[c]phénanthridines	Activité anticancéreuse		Benzo[c]phénanthridines	Activité anticancéreuse		
	Dose (mg/kg/5j)	T/C (%)		Dose (mg/kg/5j)	T/C (%)	
Nitidine <b>22</b>	100	Toxique	Sanguinarine <b>29</b>	30	Toxique	
	30	4		10	1	
	10	15		3	87	
	3	40	Chélirubine	30	Toxique	
	1	80		10	7	
Chélérythrine <b>23</b>	30	Toxique	Sanguirubine	3	46	
	10	4		30	2	
	3	26		Chélilutine <b>36</b>	10	Toxique
	1	81			3	120
Avicine	100	38	Sanguilutine <b>35</b>	100	Toxique	
	30	58		30	27	

Ces tests *in vivo* montrent que la chélitutine **36** est le composé le plus toxique (10 mg/kg/5j) et le moins efficace, puisqu'il ne provoque aucune diminution de la tumeur. La chélérythrine **23**, la sanguinarine **29** et la chélirubine sont les composés les plus actifs, mais ne sont pas dénués de toxicité. La nitidine **22** garde une activité intéressante et présente une toxicité moindre. L'avicine, quoique peu active est la molécule la moins toxique.

Les propriétés cytotoxiques des benzo[*c*]phénanthridines ont été reliées au fait que ces composés sont d'une part des intercalants de l'ADN<sup>87, 88</sup> (Tableau 13) et d'autre part des inhibiteurs de topoisomérase I et II (Tableau 14).<sup>78, 88, 89</sup>

**Tableau 13 : Affinités ADN - benzo[*c*]phénanthridine**

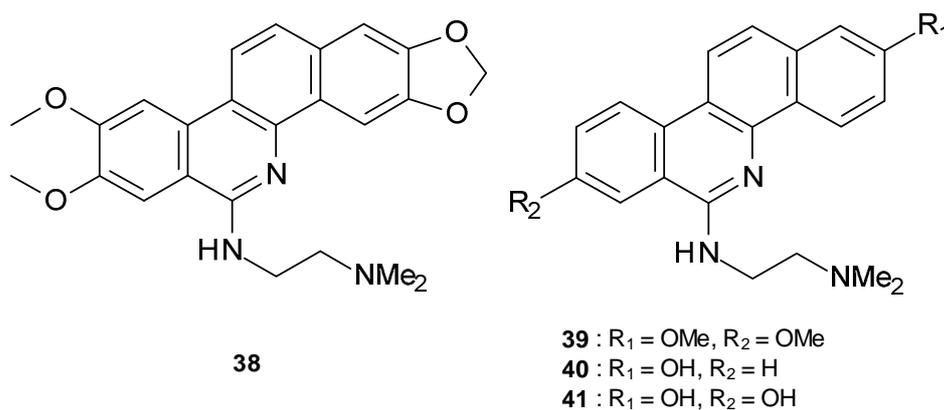
Association composé - ADN	Ka (M <sup>-1</sup> )
Chélérythrine <b>23</b> - ADN de saumon	46,6 ± 4,2 * 10 <sup>4</sup>
Fagaronine <b>28</b> - ADN de thymus de veau	10 <sup>6</sup>

La structure plane des benzo[*c*]phénanthridines leur permet de s'insérer entre les deux brins de la double hélice d'ADN et de se combiner avec les bases de l'ADN, rompant ainsi les interactions entre l'ADN et les protéines environnantes.<sup>62, 87</sup>

Les benzo[*c*]phénanthridines ont généralement des constantes d'association de l'ordre de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> comme par exemple la constante d'association chélérythrine **23** – ADN (saumon).<sup>87</sup> La fagaronine **28** a, elle, une constante d'association fagaronine **28** – ADN (veau) plus élevée qui atteint 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.<sup>88</sup>

Les topoisomérase sont des enzymes qui aident à la réplication de l'ADN en séparant les brins de la double hélice. Les inhibiteurs de topoisomérase sont des cytotoxiques car ils empêchent la séparation des deux brins de l'ADN, étape nécessaire à la division cellulaire.

Les benzo[*c*]phénanthridines, de par leur structure plane, ont la propriété de s'insérer entre les brins de l'ADN et d'inhiber la réplication de celui-ci par les topoisomérase. L'activité inhibitrice de topoisomérase a été déterminée pour la fagaronine **28** ainsi que pour plusieurs benzo[*c*]phénanthridines synthétiques (Figure 17).



**Figure 17 : Structure de quelques benzo[*c*]phénanthridines inhibitrices de topoisomérase**

**Tableau 14 : Inhibition des topoisomérases par la fagaronine comparé aux produits de référence**

Composé	CIM ( $\mu\text{M}$ )	
	Topoisomérase I	Topoisomérase II
Fagaronine <b>28</b>	0,1	>10
Composé <b>38</b>	0,3	1
Composé <b>39</b>	1	10
Composé <b>40</b>	>10	1
Composé <b>41</b>	1	3
Camptothécine	0,01	>100
Etoposide	>100	0,1

CIM est la concentration minimale requise pour l'inhibition des topoisomérases I et II par les composés présentés. Les benzo[c]phénanthridines sont des inhibiteurs de topoisomérases I et II avec toutefois une inhibition plus prononcée pour la topoisomérase I. La fagaronine **28** est l'inhibiteur de topoisomérase I le plus actif concernant les benzophénanthridines testées tandis que les composés **38** et **40** sont les deux produits les plus actifs sur l'inhibition de la topoisomérase II. Les benzo[c]phénanthridines ont des activités toutefois inférieures aux composés de référence, la camptothécine et l'étoposide.<sup>78, 88, 89</sup> Ces benzo[c]phénanthridines ne sont pas quaternaires ce qui pose la question de l'importance de la quaternarisation sur l'activité des benzo[c]phénanthridines sur les topoisomérases.

### 1.5.1.3 Propriétés antipaludiques

Les benzo[c]phénanthridines ont été moins étudiées pour leurs propriétés antipaludiques bien qu'elles soient issues de plantes utilisées comme remèdes traditionnels dans plusieurs pays contre le paludisme.<sup>60, 62, 68</sup>

Gakunju et al.<sup>60</sup> ont étudié la rutacée *T. asiatica*, issue d'un remède traditionnel kenyan (tribu Pokot) contre les fièvres et autres symptômes du paludisme. La partie de la plante utilisée est l'écorce des racines selon la préparation traditionnelle. L'extrait méthanolique provenant de cette plante a montré de bonnes activités contre différentes souches de *P. falciparum* (chloroquino-sensible et résistante). Deux molécules ont été extraites de cette plante, la nitidine **22** et la dihydronitidine **25** et leurs activités ont aussi été évaluées sur différentes souches de *P. falciparum* (Tableau 15)

**Tableau 15 : Activité *in vitro* d'extraits et de composés de *T. asiatica***

Décoction, extrait et composés	CI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	K67	K39	M24
<i>Toddalia asiatica</i> (extrait aqueux)	5		20
Extrait méthanolique	0,7	0,78	1,46
Nitidine <b>22</b>		0,045	
Dihydronitidine <b>25</b>		1,03	
Chloroquine <b>12</b>		0,004	

(K67, K39 et M24 sont des souches chloroquino-sensibles)

La nitidine **22** possède une bonne activité *in vitro* contre la souche K39 mais toutefois dix fois moindre que celle de la chloroquine **12**. La dihydronitidine **25** n'a pas d'activité antipaludique. L'activité de la nitidine **22** sur différentes souches de *P. falciparum* sensibles et résistantes à la chloroquine **12** et la comparaison de ces données avec la chloroquine **12** a également été réalisée au cours de la même étude (Tableau 16).

**Tableau 16 : Activités *in vitro* de la chloroquine et de la nitidine sur différentes souches de *P. falciparum***

Souches <i>P. falciparum</i>	Sensibilité chloroquine	CI <sub>50</sub> (nM)	
		Chloroquine <b>12</b>	Nitidine <b>22</b>
UPA	sensible	50	141
K39	sensible	13,8	94,9
SL/D6	sensible	20,6	159,9
HB3	sensible	18,5	154,8
Moyenne des CI <sub>50</sub> des souches sensibles		25,7±16,5	137,6±29,6
ItD12	résistante	206	88,4
FCR3	résistante	148,2	347,1
FCB	résistante	88,8	100
Moyenne des CI <sub>50</sub> des souches résistantes		147,6±47,8	178,4±119,3

Sur des souches chloroquino-résistantes, la nitidine **22** possède des activités du même ordre de grandeur que celles de la chloroquine **12**. En revanche sur des souches de *P. falciparum* chloroquino-sensibles, la nitidine **22** est moins active que la chloroquine **12**. Les activités de la nitidine **22** sont tout de même de l'ordre de 100 nM ce qui signifie que la nitidine **22** est quand même active sur les souches concernées.

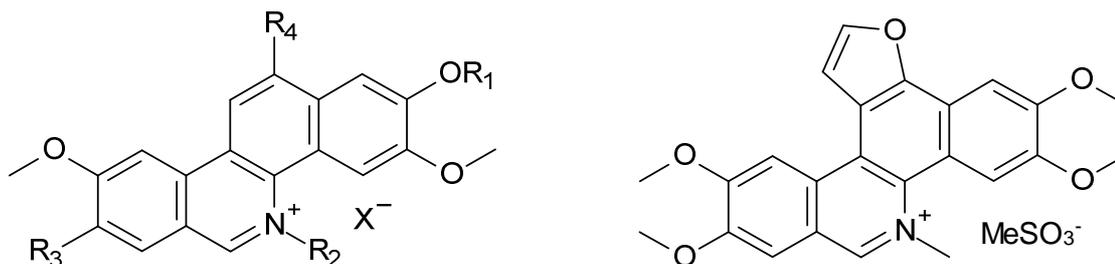
L'effet de *Fagara zanthoxyloïdes* (syn. *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*) sur *P. falciparum* a été étudié par Kassim et al.<sup>68</sup> Les racines de cette plante utilisées en Afrique sous forme de brosse à dents naturelle ont montré des bonnes activités sur des cultures de *P. falciparum*. L'étude bio-guidée de la plante a permis de montrer que l'activité de la plante vient d'un composé : la fagaronine **28** (Tableau 17).

**Tableau 17 : Activités des différents extraits de *F. Zanthoxyloïdes* et de la fagaronine** (Souche utilisée : 3D7)

Fraction	CI <sub>50</sub> (µg/mL)
Extrait aqueux brut	4,9 ± 0,6
Fagaronine <b>28</b>	0,018
Chloroquine <b>12</b>	0,011 ± 0,002

La fagaronine **28** montre une très bonne activité *in vitro* sur la souche 3D7 (chloroquino-sensible) du même ordre de grandeur que celle de la chloroquine **12**. Ces résultats sont encourageants mais les résultats de Kassim et al. ne portent que sur une souche chloroquino-sensible.

Nyangulu et al. ont étudié les activités antipaludiques de benzo[c]phénanthridines de synthèse.<sup>62</sup> L'étude porte sur la modification ou l'ajout de certains substituants (Figure 18) et l'impact de ces modifications sur l'activité antipaludique (Tableau 18).



- 42** : R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = OMe, R<sub>4</sub> = H, X = MeSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
**43** : R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = OMe, R<sub>4</sub> = OEt, X = MeSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
**44** : R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = OMe, R<sub>4</sub> = OEt, X = MeSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
**45** : R<sub>1</sub> = Et, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = OMe, R<sub>4</sub> = H, X = MeSO<sub>3</sub><sup>-</sup>  
**46** : R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = Et, R<sub>3</sub> = OMe, R<sub>4</sub> = H, X = I<sup>-</sup>  
**47** : R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = Et, R<sub>3</sub> = OMe, R<sub>4</sub> = OEt, X = I<sup>-</sup>  
**48** : R<sub>1</sub> = Me, R<sub>2</sub> = Me, R<sub>3</sub> = SMe, R<sub>4</sub> = H, X = MeSO<sub>3</sub><sup>-</sup>

**49**

**Figure 18 : Structure de benzo[c]phénanthridines synthétiques**

**Tableau 18 : Activités de benzo[c]phénanthridines de synthèse**

Composé	K39 (μM)	V1/S (μM)
Fagaronine <b>28</b>	2,3	1,8
Composé <b>42</b>	0,07	0,3
Composé <b>43</b>	0,12	0,12
Composé <b>44</b>	0,26	0,26
Composé <b>45</b>	0,8	0,74
Composé <b>46</b>	0,09	0,12
Composé <b>47</b>	0,04	0,05
Composé <b>48</b>	0,19	0,9
Composé <b>49</b>	0,009	0,11

(la souche K39 est une souche chloroquino-sensible tandis que la souche V1/S est chloroquino-résistante)

La fagaronine **28** montre des activités modérées sur les souches K39 et V1/S tandis que les benzo[c]phénanthridines de synthèse ont des activités plus intéressantes.

La méthylation du phénol (composé **42**) de la fagaronine **28** (en R<sub>1</sub>) permet d'augmenter nettement les activités tandis que l'éthylation du même phénol (composé **45**) améliore les activités de la fagaronine **28** mais est moins intéressante que la méthylation.

L'ajout d'un groupement OEt en R<sub>4</sub> sur la fagaronine **28** permet d'augmenter les activités (comparaison de la fagaronine au composé **43**) sur les deux souches mais ce même ajout sur d'autres composés dérivés de la fagaronine **28** (comparaison du composé **42** au composé **44** et du composé **46** au composé **47**) change peu ou pas les activités sur les souches de *P. falciparum*.

Le composé le plus actif sur la souche K39 est le composé **49** qui possède un cycle furane avec une CI<sub>50</sub> de 9 nM tandis que sur la souche V1/S le composé le plus actif se trouve être le composé **47** avec une CI<sub>50</sub> de 50 nM.

Nyangulu et al. postulent que l'activité antipaludique des benzo[c]phénanthridines vient de leur propriété à s'insérer entre les bases de l'ADN du parasite. Les activités anticancéreuses des produits synthétisés n'ont pas été publiées.

## 1.5.1.4 Autres propriétés biologiques

### 1.5.1.4.1 Activité antituberculeuse :

A ce jour, la meilleure thérapie contre la tuberculose est une association de plusieurs médicaments pris sur une période de 6 mois consécutifs. Le premier traitement est l'association de l'éthambutol, de l'isoniazide, de la pyrazinamide et de la rifampicine. Dans les cas où le premier traitement ne fonctionne pas, le second traitement est l'association de l'acide *p*-aminosalicyclique, de la ciprofloxacine, de la cyclosérine et de la kanamycine. Beaucoup de personnes atteintes de la tuberculose ne répondent pas à ces traitements à long terme.

Certaines des benzo[c]phénanthridines montrent de bons résultats contre *Mycobacterium tuberculosis* sur la lignée H37Rv cultivée *in vitro*. La chélérythrine **23**, l'avicine, la chélirubine, la nitidine **22** et la sanguinarine **29** montrent des taux d'inhibition de croissance supérieurs à 90% à une concentration de 12,5 µg/mL.<sup>90</sup>

### 1.5.1.4.2 Activité antibactérienne :

*In vitro*, la chélérythrine **23** montre une CI<sub>50</sub> de 28,7 µM contre *Bacillus subtilis* contre 3,1 µM pour le produit de référence, le chloramphénicol. Cette activité inférieure à celle du chloramphénicol reste toutefois intéressante.<sup>70</sup>

La sanguinarine **29** et la chélérythrine **23** ont été testées sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* pour lesquels elles présentent des activités modérées. La sanguinarine **29** montre une activité respectivement de 30 µM et 54 µM sur *S. aureus* et sur *E. coli* tandis que la chélérythrine **23** montre des activités respectivement de 120 µM et de 448 µM.<sup>84</sup>

### 1.5.1.4.3 Activité antifongique :

Une autre propriété testée des benzo[c]phénanthridines est la propriété antifongique sur *Cladosporium cucumerium* où la fagaronine **28** montre une très bonne activité avec une CI<sub>50</sub> de 0,21 µM soit dix fois inférieure à celle du composé de référence le miconazole (2,4 µM) et cent fois inférieure à celle de la chélérythrine **23** (28,7 µM).<sup>70</sup>

## 1.5.2 Synthèses publiées de benzo[c]phénanthridines

Les synthèses ont été classées de la manière suivante : Tout d'abord sont présentées les synthèses de benzo[c]phénanthridines de type nor puis l'obtention de benzo[c]phénanthridines quaternaires par méthylation de benzo[c]phénanthridines de type nor et enfin l'obtention directe de benzo[c]phénanthridines quaternaires.

### 1.5.2.1 Synthèse des benzo[c]phénanthridines de type nor

#### 1.5.2.1.1 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par réaction radicalaire

Dans leurs travaux, Budén et al. présentent une synthèse rapide du squelette des benzo[c]phénanthridines (Schéma 2).<sup>91,92</sup>

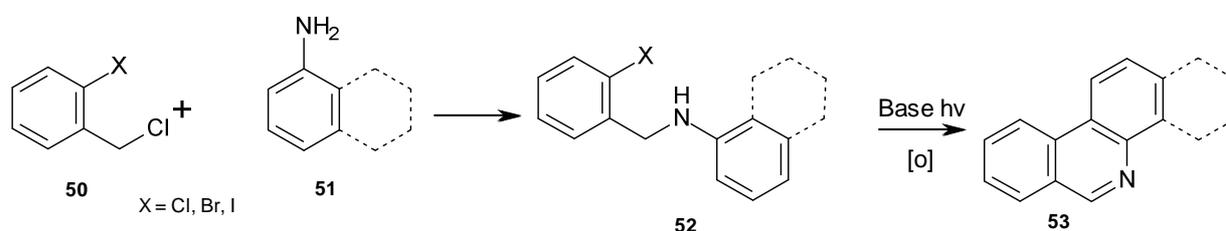


Schéma 2 : Synthèse du squelette des benzo(c)phénanthridines par réaction radicalaire

Le squelette des BZPs **20** est obtenu avec 62% de rendement global. Budén et al. ont aussi synthétisé des molécules plus substituées mais il s'agit de phénanthridines avec seulement les trois cycles aromatiques A, B et C. La seconde étape fournit des phénanthridines fonctionnalisées avec des rendements allant de 78 à 85% selon les différents substituants.<sup>92</sup>

#### 1.5.2.1.2 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Kock et al.

Kock et al. proposent une synthèse du squelette des benzo[c]phénanthridines (Schéma 3).<sup>93</sup> Cette synthèse de 4 étapes permet d'obtenir le squelette facilement mais avec de très faibles rendements globaux (5%).

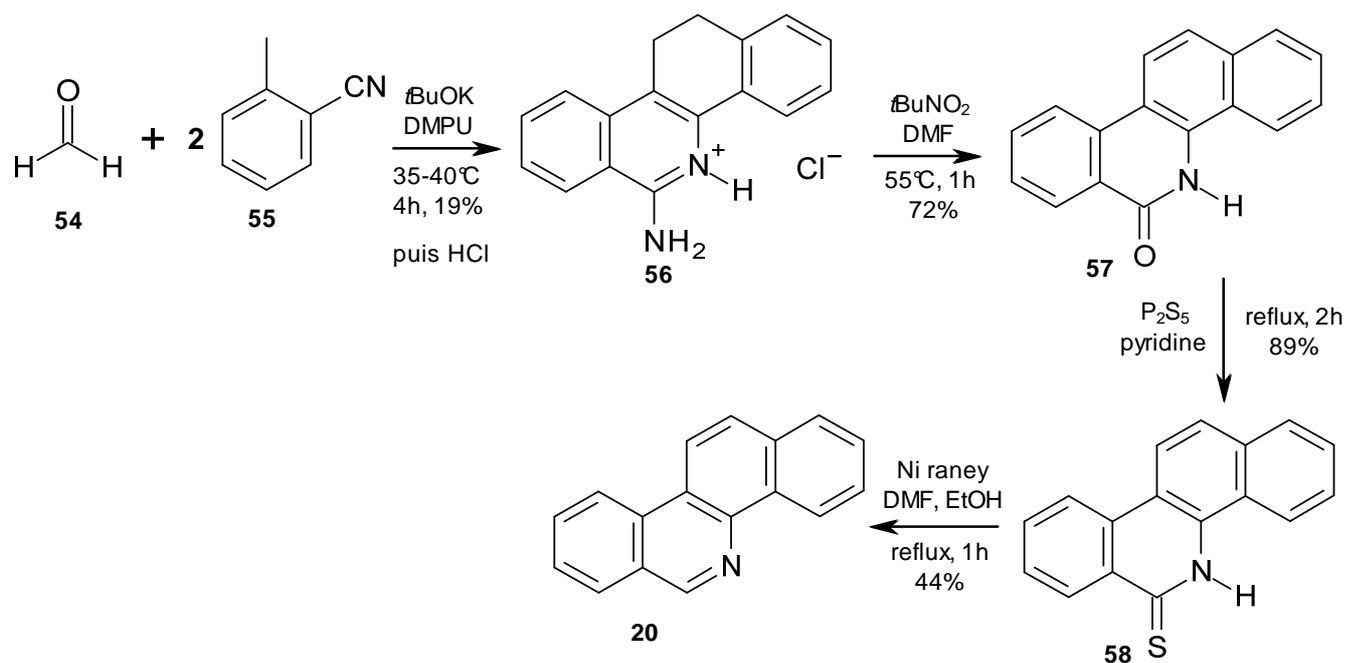


Schéma 3 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Kock et al.

La première étape permet de former un composé presque entièrement aromatique d'une façon originale. Le mécanisme réactionnel est détaillé (Schéma 4).

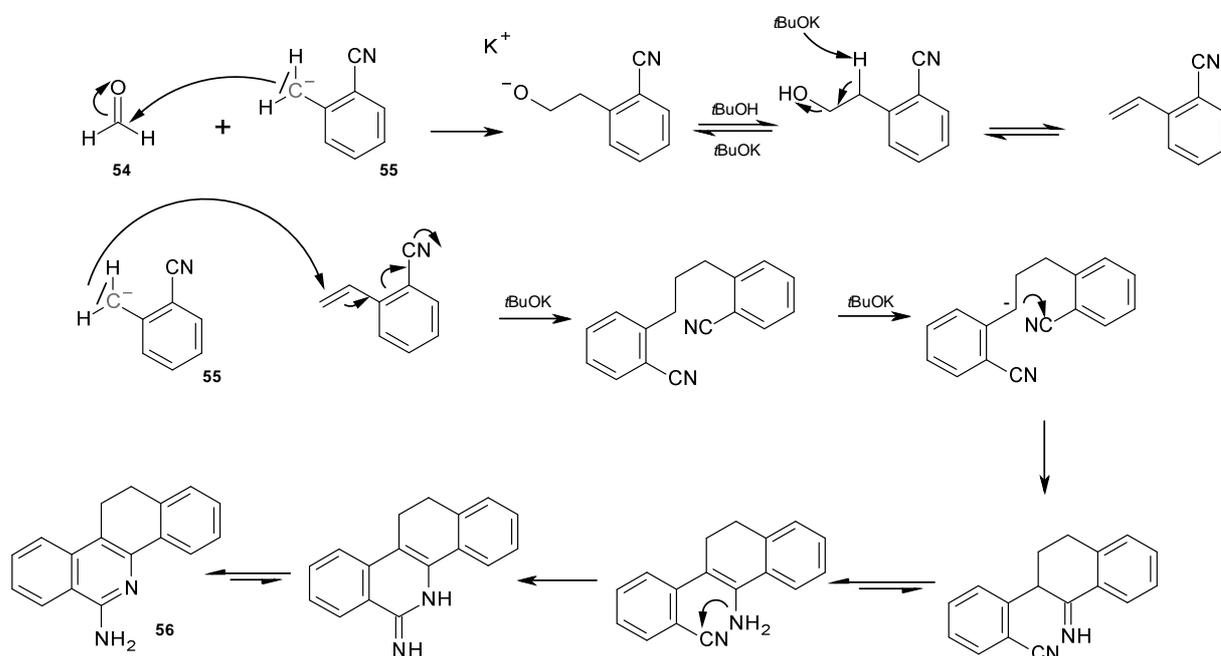


Schéma 4 : Schéma réactionnel de la formation du composé 56

La même équipe a publié une synthèse donnant des composés aminés en  $\alpha$  de l'azote (composé **59**) (Schéma 5) mais n'obtient pas de très bons rendements globaux. Selon le groupement R, le rendement de la première étape varie entre 10 et 53 % et celui de la seconde étape entre 14 et 38 %.<sup>81</sup>

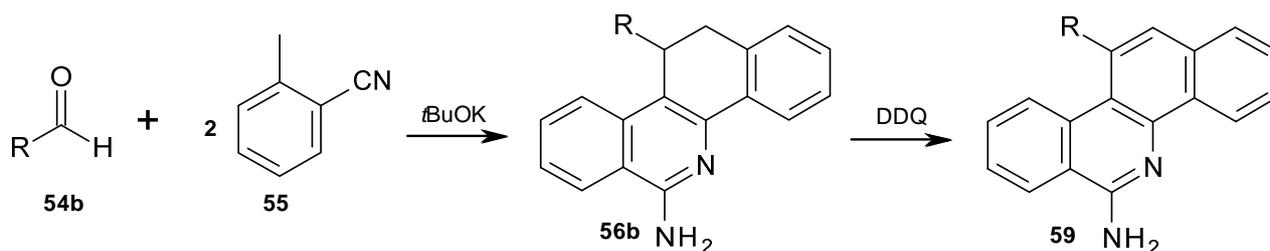


Schéma 5 : Synthèse du composé 59

Cette synthèse démarrante par une condensation de 2 molécules d'ortho-cyanotoluène **55** avec un aldéhyde **54b**, la possibilité de faire des BZPs ayant des groupements différents sur chaque cycle semble restreinte et seule la synthèse de composés ayant un groupement R aromatique ou pas de groupement est décrite.

### 1.5.2.1.3 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Gillespie et al.

En 1974, Gillespie et al. ont publié une synthèse de la norfagaronine **66** (Schéma 6) en 6 étapes dont le rendement global est de 18%.<sup>84, 94</sup>

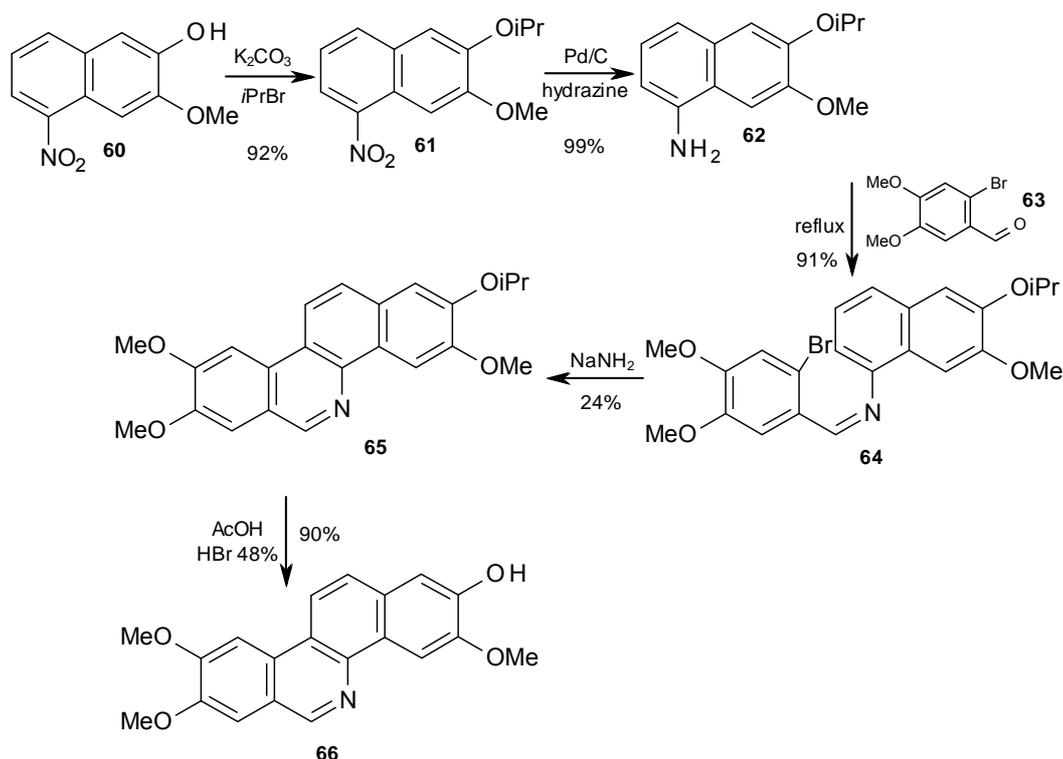


Schéma 6 : Synthèse de la norfagaronine 66 par Gillespie et al.

La synthèse originalement publiée par Gillespie et al. a été reprise et améliorée afin de obtenir de meilleurs rendements et une grande variété de benzo[c]phénanthridines.

Cette voie de synthèse a permis d'obtenir plusieurs benzo[c]phénanthridines<sup>73, 84, 95-103</sup> telle que la norchélythrine **24**,<sup>95</sup> la décarine **32**,<sup>96, 99</sup> l'isodécarine<sup>103</sup> ou la nornitidine **34**.<sup>97</sup> A chaque fois, la synthèse a été adaptée puisqu'il faut protéger les groupements OH éventuels (*i*Pr, Ac, Bn)<sup>73, 74, 94, 96, 98-103</sup> et partir de produits de départ différents suivant les substitutions souhaitées.

#### *1.5.2.1.4 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Olugbade et al.*

Cette synthèse, publiée en 1990 par Olugbade et al., se fait 6 étapes et fournit des benzo[c]phénanthridines avec des rendements très variables. En effet, selon le type de groupement R, le rendement global varie de 7 à 30 % (Schéma 7).<sup>104</sup>

D'autres équipes ont repris cette synthèse pour obtenir d'autres benzo[c]phénanthridines. Des benzo[c]phénanthridines ayant des groupements OH sont synthétisées via une protection du phénol concerné (OMs, OEt, O*i*Pr). Ces différentes protections permettent de synthétiser la norfagaronine **66** ainsi que des dérivés de la norfagaronine **66** (substitution en position 12 du H par des alkyloxy) avec des rendements globaux intéressants (38% pour la norfagaronine **66** par exemple).<sup>88, 105, 106</sup> Lynch et al. ont également transposé la synthèse à d'autres benzo[c]phénanthridines.<sup>88, 105, 106</sup>

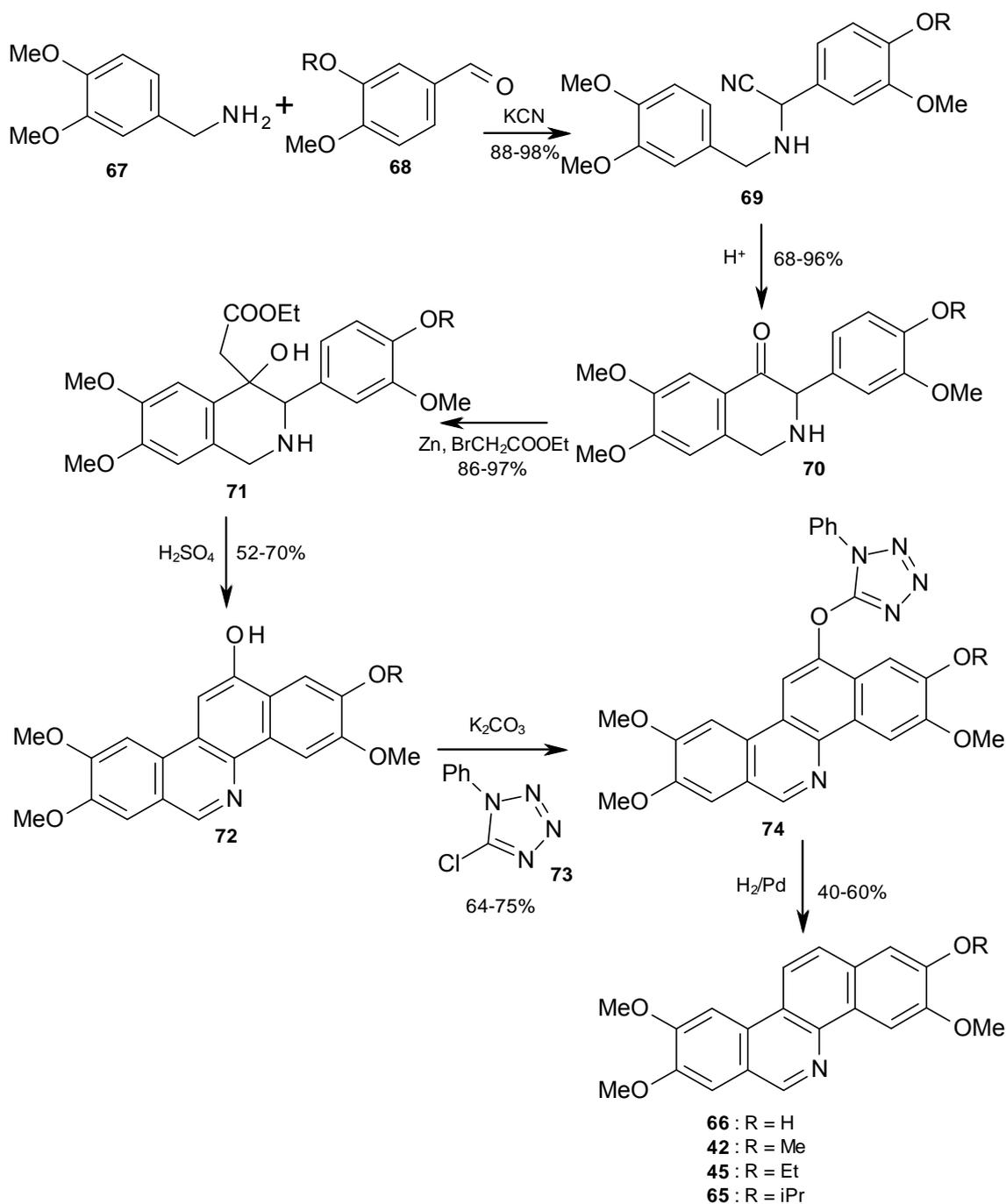


Schéma 7 : Synthèse de la norfagaronine 66 et dérivés par Olubade et al.

### 1.5.2.1.5 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Kohno et al.

Kohno et al. ont publié cette synthèse qui permet d'obtenir différents composés.<sup>107</sup>

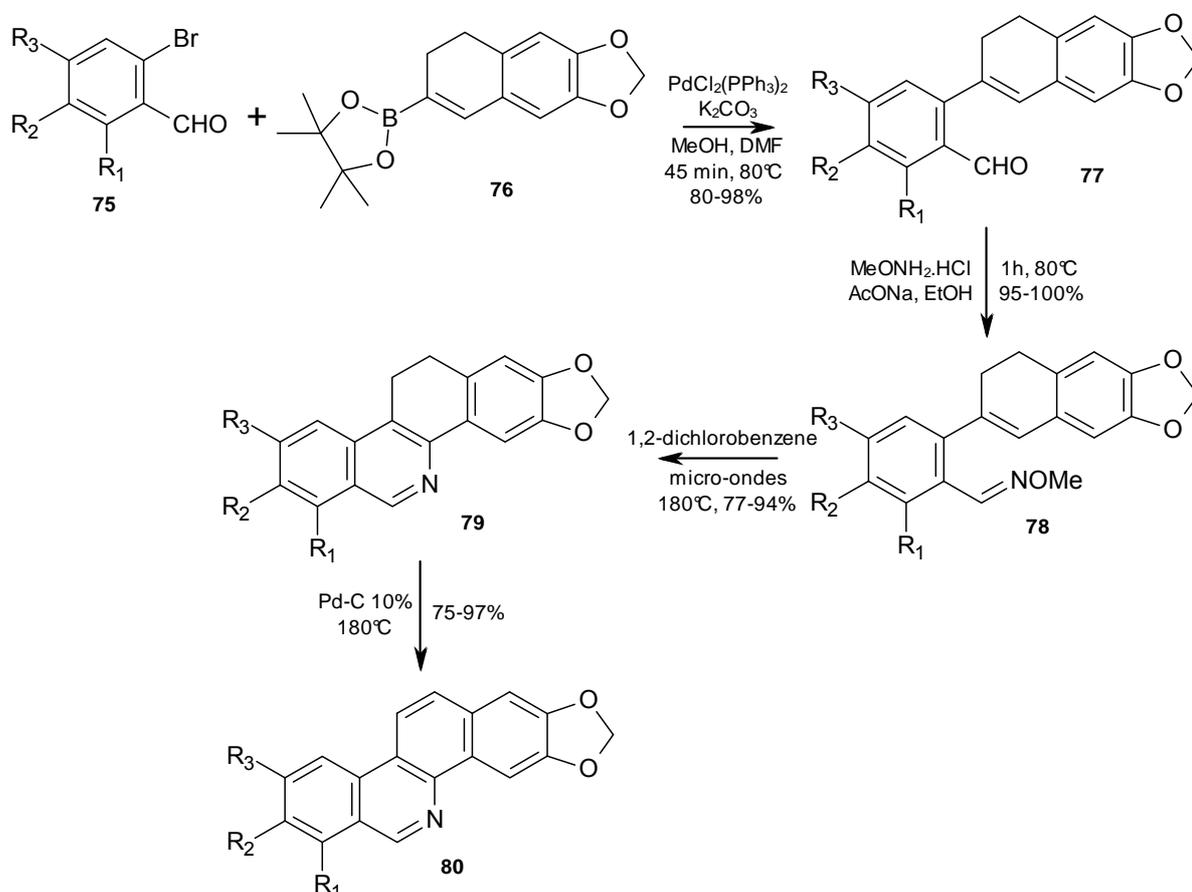


Schéma 8 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Kohno et al.

La synthèse présentée ci-dessus (Schéma 8) se fait en 4 à 6 étapes avec un rendement global variant de 46 à 76%. Le boronate **76** doit toutefois être synthétisé et se fait en 7 étapes (synthèse non présentée ici) avec 42% de rendement. La synthèse totale (11 à 13 étapes) fournit des composés avec 19 à 32% de rendement selon les groupements.

Cette synthèse a fourni plusieurs benzo[c]phénanthridines différentes à partir de produits de départ **75** différemment substitués. De même, même si un seul boronate **76** a été utilisé, on peut envisager de synthétiser des analogues, en protégeant les groupements sensibles OH éventuels. La synthèse longue du boronate limite cependant le nombre d'analogues qu'on peut ainsi obtenir.

### 1.5.2.1.6 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Katemani et Ishii

Kametani et al.<sup>108</sup> et Ishii et al.<sup>109</sup> ont publié une synthèse de benzo[c]phénanthridines (Schéma 9) de 5 étapes. Différents essais ont été réalisés sur plusieurs composés possédant différents types de groupements.

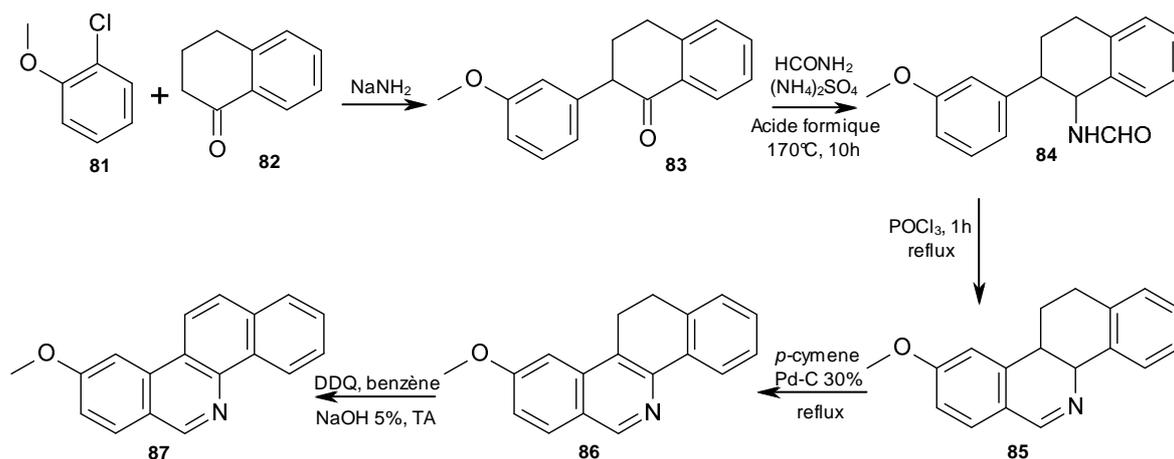


Schéma 9 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Kametani et al. et Ishii et al.

Cette synthèse est intéressante car elle peut être adaptée pour obtenir différentes benzo[c]phénanthridines du fait de la simplicité structurale du dérivé **81**. Cette synthèse n'a pas été adaptée aux benzo[c]phénanthridines phénoliques. Zee-Cheng et al. ont synthétisé la nitidine **22** et l'allonitidine à l'aide de la même synthèse.<sup>110, 111</sup>

#### 1.5.2.1.7 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Janin et al.

En 1993, Janin et al. ont publié la synthèse de dérivés de benzo[c]phénanthridines ayant une chaîne aminoalkyle en  $\alpha$  de l'atome d'azote aromatique.<sup>78</sup> (Schéma 10).

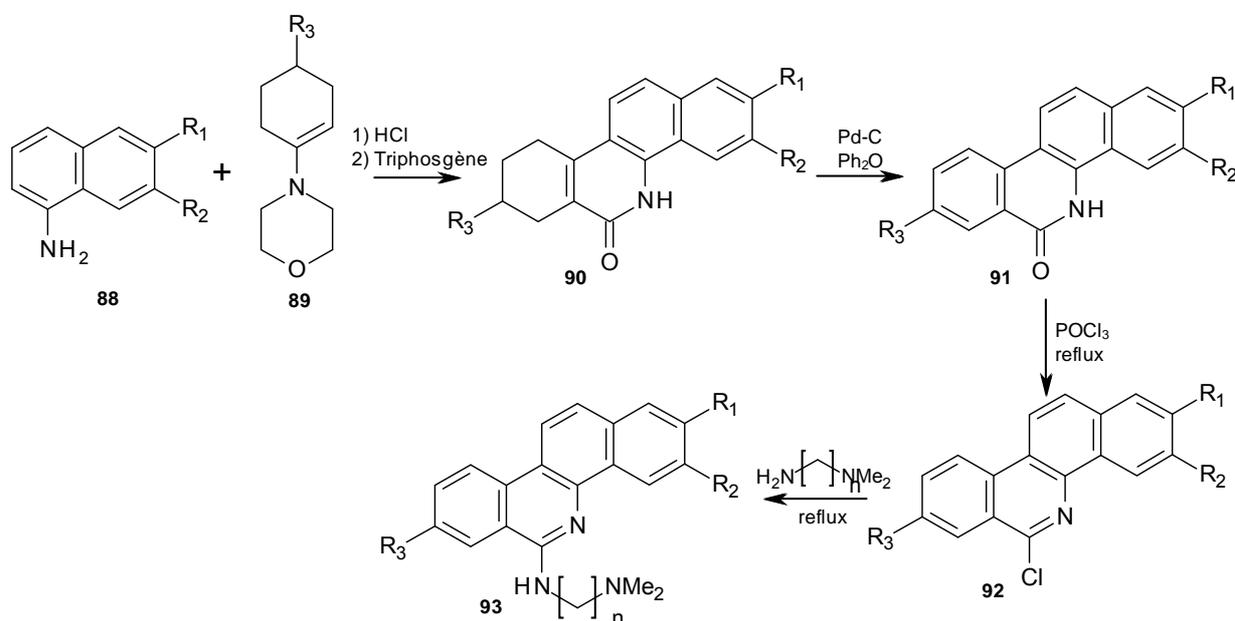


Schéma 10 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Janin et al.

Janin et al. ne précisent pas de rendements pour les étapes de la synthèse sauf pour la première dont le rendement varie de 10 à 20% selon les différents composés obtenus. Cette synthèse présente l'inconvénient de produire des composés ayant un substituant en  $\alpha$  de l'atome d'azote aromatique et d'avoir de faibles rendements sur la première étape.

#### 1.5.2.1.8 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Geen et al.

Cette synthèse, publiée en 1996 puis en 1998 par Geen et al. permet de synthétiser un grand nombre de benzo[c]phénanthridines différemment substituées (Schéma 11).<sup>112, 113</sup>

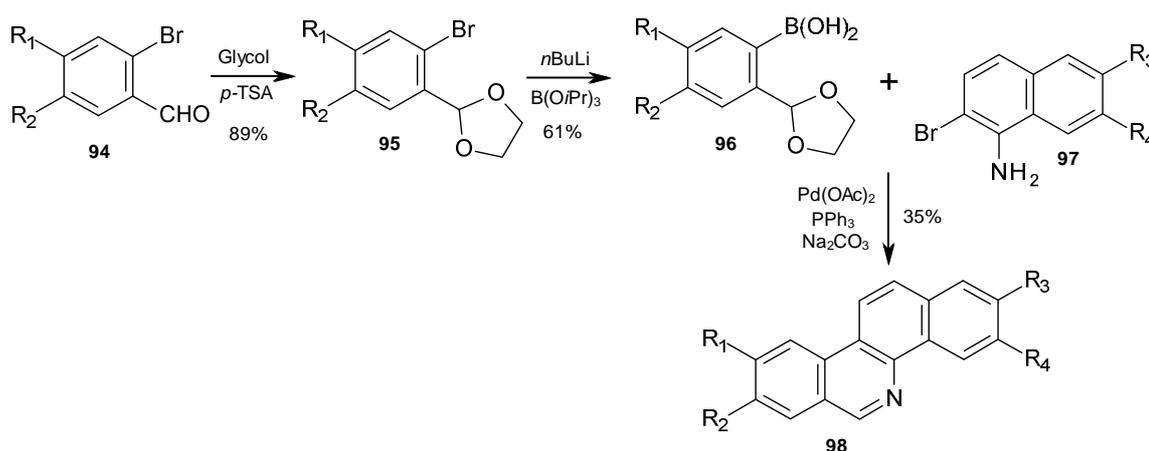


Schéma 11 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Geen et al.

Le produit de départ **94** est assez simple et commercial ce qui permet à la synthèse d'être adaptable à d'autres composés ayant des groupements ailleurs sur le cycle. Cette synthèse en 3 étapes fournit la nornitidine **34** avec 63% de rendement, la norallonitidine 82% et la noravicine 58%.<sup>112, 113</sup> Geen et al. n'ont pas fait d'essais de synthèse de benzo[c]phénanthridines phénoliques.

#### 1.5.2.1.9 Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Luo et al.

En 2006, Luo et al. ont publié une synthèse rapide de la nornitidine **34**.<sup>114</sup> Cette synthèse permet d'obtenir la nornitidine **34** avec un rendement global de 35% pour une synthèse comprenant 5 étapes (Schéma 12).

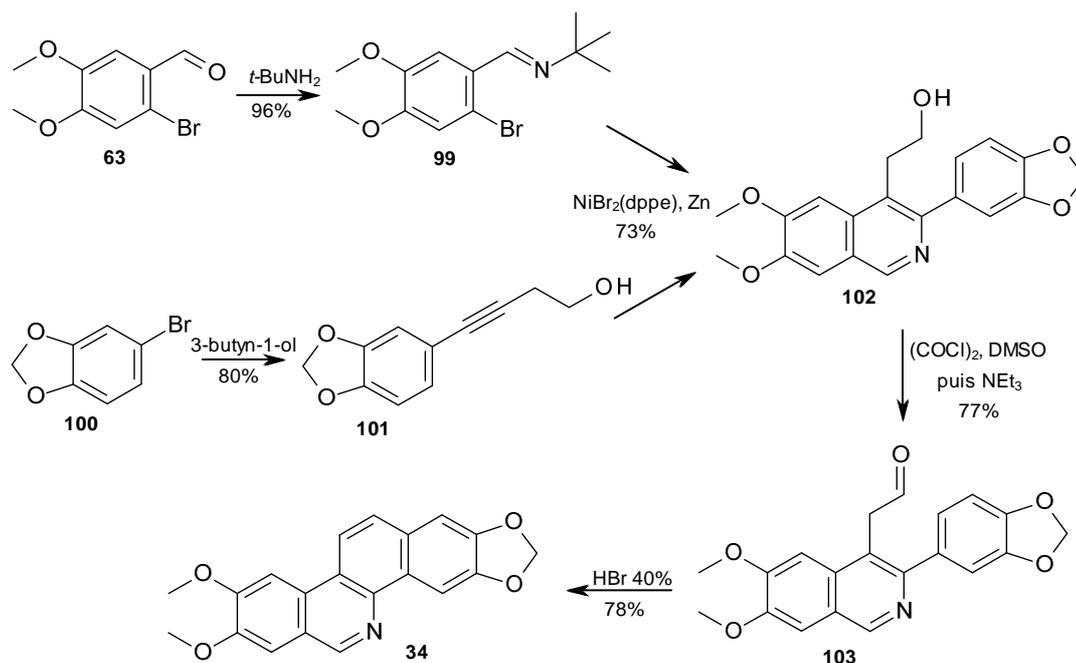


Schéma 12 : Synthèse de la nornitidine par Luo et al.

Cette synthèse peut être transposable à d'autres benzo[c]phénanthridines du fait de la simplicité des produits de départ (composés **63** et **100**). Cependant, lors de cette étude, seule la synthèse de la nornitidine a été réalisée.

Korivi et al. ont utilisé le même type de synthèse que celle de Luo mais l'ont adaptée afin d'obtenir des oxybenzo[c]phénanthridines ou des dihydrobenzo[c]phénanthridines.<sup>115</sup>

### 1.5.2.2 Méthylation des benzo[c]phénanthridines de type nor

La première façon de quaternariser les benzo[c]phénanthridines nor est d'utiliser des agents alkylants très puissants. Les différentes conditions décrites dans la littérature sont rappelées ci-dessous.

Le méthanesulfonate de méthyle  $\text{MeSO}_3\text{Me}$  :

La quaternarisation avec  $\text{MeSO}_3\text{Me}$  se fait à l'aide d'une base, usuellement  $(i\text{Pr})_2\text{NEt}$ , au reflux de celle-ci (170-180°C) pendant 30 minutes environ.<sup>77, 88, 105, 106</sup> Les différents essais de quaternarisation avec  $\text{MeSO}_3\text{Me}$  ont été réalisés pour obtenir la fagaronine ou la 12-OEt-fagaronine et les différents groupements OH ont été protégés afin de ne pas être méthylés à leur tour. Les rendements obtenus vont de 73% pour obtenir la 12-OEt-fagaronine à 93% pour la fagaronine **28**.

Le sulfate de diméthyle  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  :

La quaternarisation avec  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  se fait au reflux du xylène ou du nitrobenzène pendant 1h.<sup>84, 94, 97, 99, 110, 111, 116, 117</sup> Les différents essais de quaternarisation avec  $\text{Me}_2\text{SO}_4$  ont été réalisés pour obtenir la fagaronine **28**,<sup>94</sup> la nitidine **22**,<sup>97, 110</sup> la chélérythrine **23**<sup>99, 116</sup> ainsi que des dérivés de fagaronine **28** (isofagaronine).<sup>84</sup> Les groupements OH ont été protégés par des groupes isopropyles<sup>84, 94</sup> ou benzyles<sup>84</sup> afin de ne pas être méthylés à leur tour. Les rendements obtenus vont de 20% pour la fagaronine **28**<sup>94</sup> à 70% pour la chélérythrine **23**.<sup>99, 116</sup>

Le triflate de méthyle  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Me}$  :

La quaternarisation avec  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Me}$  se fait dans un tube scellé à  $90^\circ\text{C}$  dans le toluène pendant 3h. Styskala et al. ont décrit la quaternarisation de l'isodécarine protégée avec un groupement benzyle. Ils ont obtenu le composé désiré (le NK109 benzylé) avec un excellent rendement de 96%.<sup>103</sup>

Le fluorosulfonate de méthyle  $\text{MeSO}_3\text{F}$  :

La quaternarisation avec  $\text{MeSO}_3\text{F}$  se fait dans le nitrobenzène à  $110\text{-}120^\circ\text{C}$  pendant 10 minutes environ. Zee-Cheng et al. ont méthylié des benzo[c]phénanthridines ayant des groupements méthoxy, méthylènedioxy ou phénoliques protégés par des acétates. Les méthylations des 2,3,8,9-tetraacétoxybenzo[c]phénanthridine et 2,3,8,9-tetraméthoxybenzo[c]phénanthridine donnent les composés voulus avec un rendement quantitatif.<sup>83</sup>

Le 2-nitrobenzènesulfonate de méthyle :

La quaternarisation avec le 2-nitrobenzènesulfonate de méthyle se fait au reflux du toluène pendant 3 jours minimum.<sup>73, 100-102</sup> Les différents essais de quaternarisation avec le 2-nitrobenzènesulfonate de méthyle ont été réalisés sur plusieurs benzo[c]phénanthridines dont la nornitidine **34**,<sup>73</sup> la norfagaronine **66**, la décarine **32**<sup>102</sup> ou l'isodécarine<sup>102</sup> ainsi que d'autres composés phénoliques.<sup>73, 100-102</sup> Les produits ayant un groupement OH ont été protégés par des groupes benzyles<sup>73, 100-102</sup> et la réaction de quaternarisation fournit les benzo[c]phénanthridines quaternaires avec des rendements de 55% pour la nitidine **22**,<sup>73</sup> 79% pour la fagaridine **31**,<sup>101</sup> 98% pour la 7-hydronitidine benzylée<sup>73</sup> ou 80 % pour le NK109 benzylé.<sup>100, 102</sup>

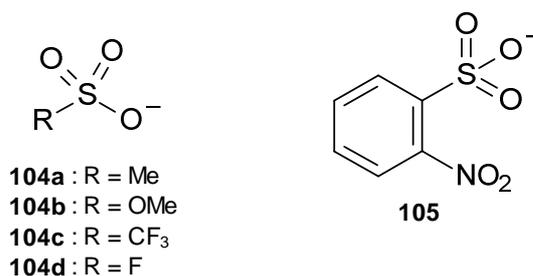


Figure 19 : Contre-ions du aux méthylations

Dans la plupart des publications, la quaternarisation est suivie d'un échange de contre-ion pour  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{I}^-$ .

Ishii et al. ont décrit une seconde voie pour quaternariser les benzo[c]phénanthridines de type nor qui consiste à réduire le noyau aromatique, à alkyler l'azote secondaire puis à oxyder à nouveau le noyau afin de retrouver l'aromaticité du composé.<sup>117</sup>

### 1.5.2.3 Synthèse des benzo[c]phénanthridines quaternaires

Synthèse n°1 :

Cette synthèse publiée par Ishii et al. permet d'obtenir une très grande variété de benzo[c]phénanthridines. Cette synthèse a déjà été utilisée par la même équipe afin d'obtenir des benzo[c]phénanthridines de type nor.

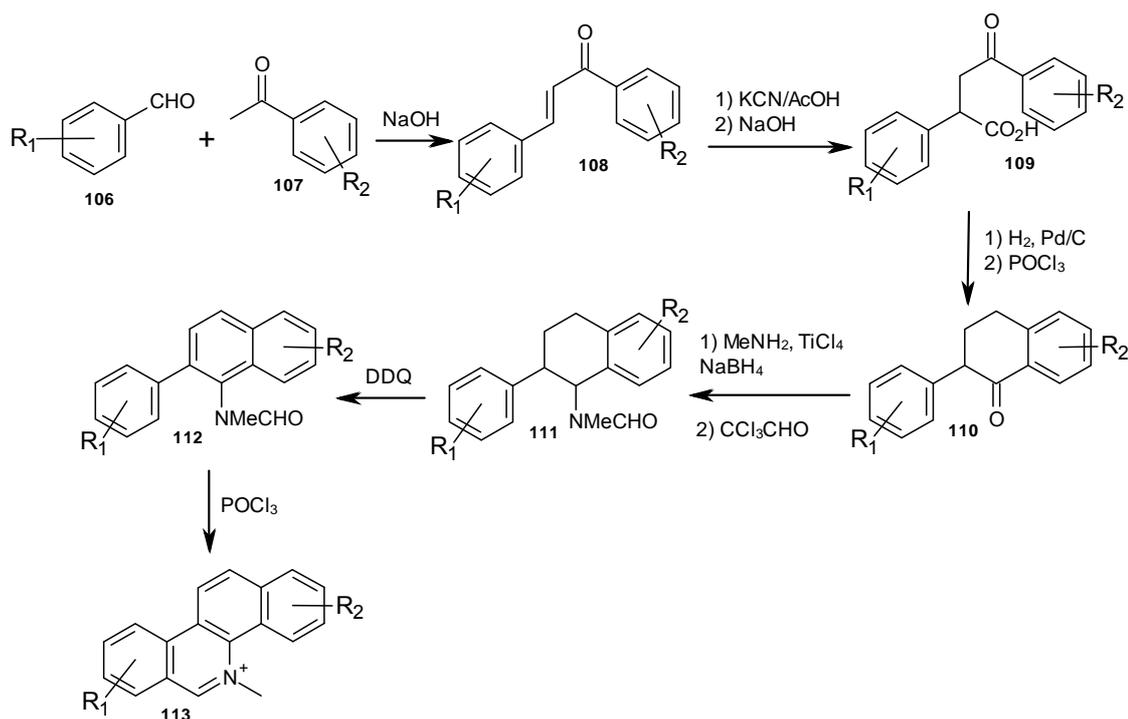


Schéma 13 : Synthèse des benzo[c]phénanthridines quaternaires par Ishii et al.

Dans cette synthèse, la méthylation du composé est effectuée avant la cyclisation du composé **112** en composé **113**.<sup>86, 90, 118-120</sup> Cette synthèse a permis d'obtenir des benzo[c]phénanthridines ayant des groupements méthoxyles, méthylènedioxy et même phénoliques.<sup>90, 119, 120</sup>

Synthèse n°2 :

Cette synthèse, déjà utilisée par Geen et al. afin d'obtenir des benzo[c]phénanthridines de type nor, a été adaptée pour les benzo[c]phénanthridines quaternaires grâce à une étape de méthylation du composé **117**. On observe, lors de cette synthèse, une réaction de Suzuki (obtention du composé **117**) suivie d'une réaction de Bishler-Napieralsky (obtention du composé **36**).

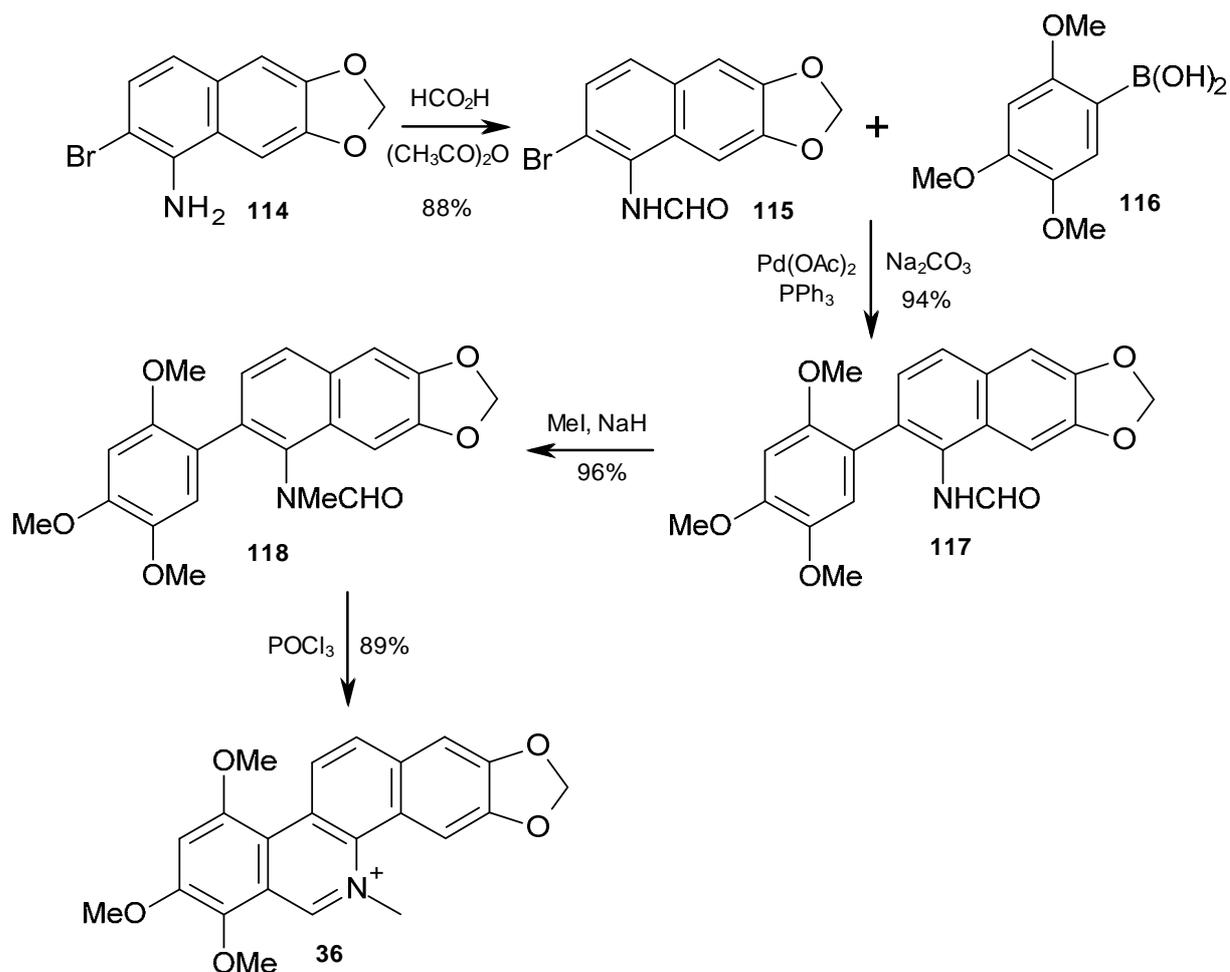


Schéma 14 : Synthèse de la chélilutine par Geen et al.

Cette synthèse permet d'obtenir la chélilutine **36** avec un rendement de 72% pour 4 étapes.<sup>112, 113</sup> Les benzo[c]phénanthridines comportant des groupements phénoliques n'ont pas été synthétisées.

Synthèse n°3 :

Cette synthèse a été publiée en 1995 par Séraphin et al.<sup>121</sup> puis reprise en 2007 par Vanquelef et al.<sup>82</sup> Elle permet d'obtenir des benzo[c]phénanthridines, ici la fagaronine **28**, à partir du composé **119** avec 26% de rendement (Schéma 15).

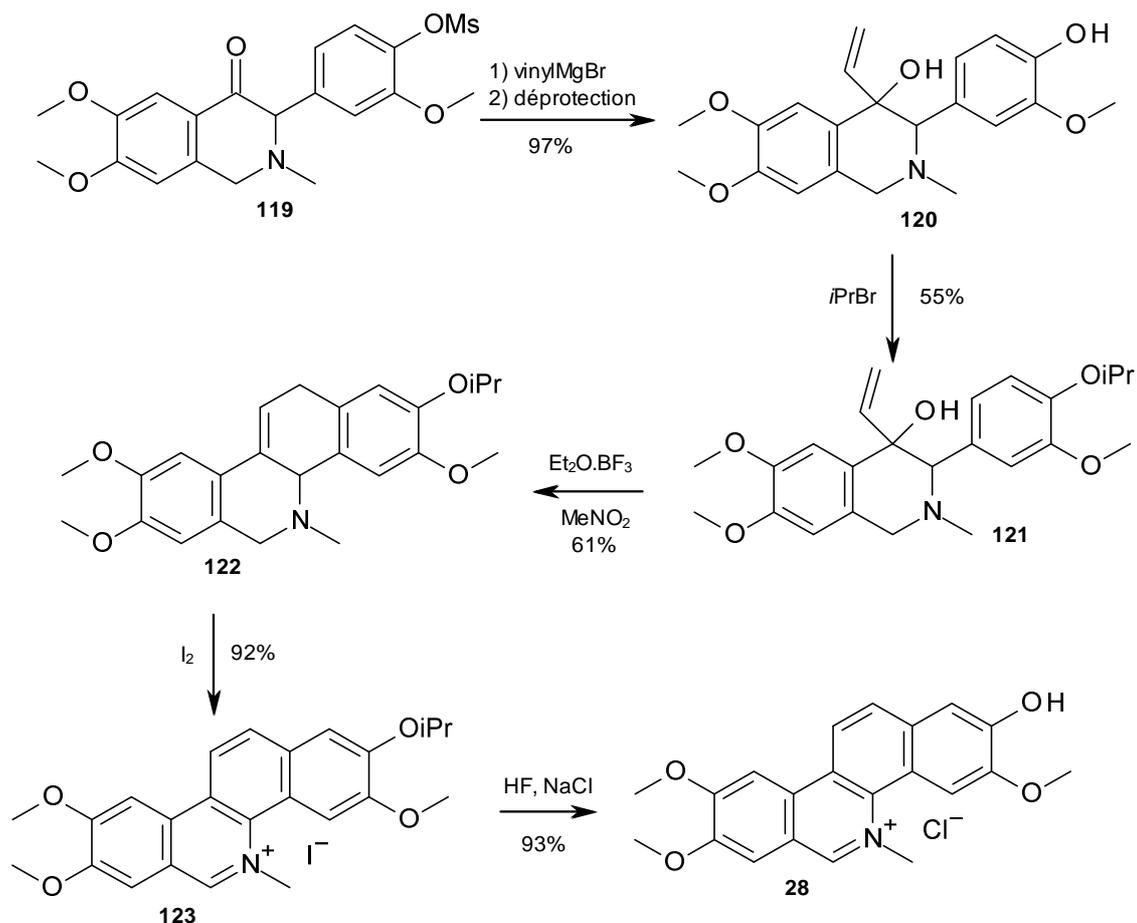


Schéma 15 : Synthèse de la fagaronine 28 par Séraphin et al. et Vanquelef et al.

Le composé **119** peut facilement être synthétisé en trois étapes dont les deux premières sont décrites par Lynch et al. (Schéma 16)<sup>88</sup>. A partir du composé **70**, il suffit de méthyler l'amine secondaire pour obtenir le composé **119**.

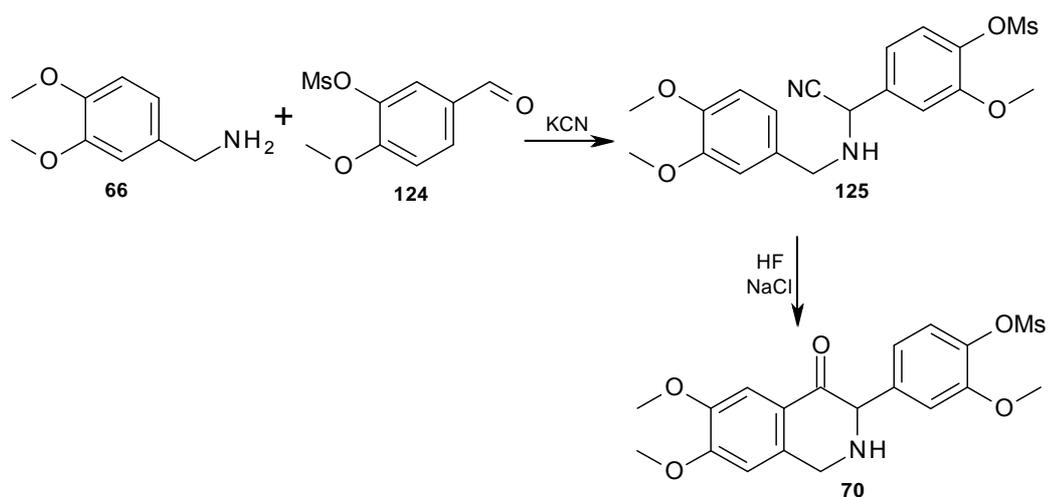


Schéma 16 : Synthèse du composé 119

Cette synthèse est intéressante car elle permet de partir de composés simples et donc dérivatisables et commerciaux même si elle pourrait être améliorée concernant les rendements.

## Synthèse n°4 :

Cette synthèse publiée par Ishikawa et al. en 1995 permet d'obtenir la mascarpine **132** avec un rendement global de 10% (Schéma 17).<sup>122</sup>

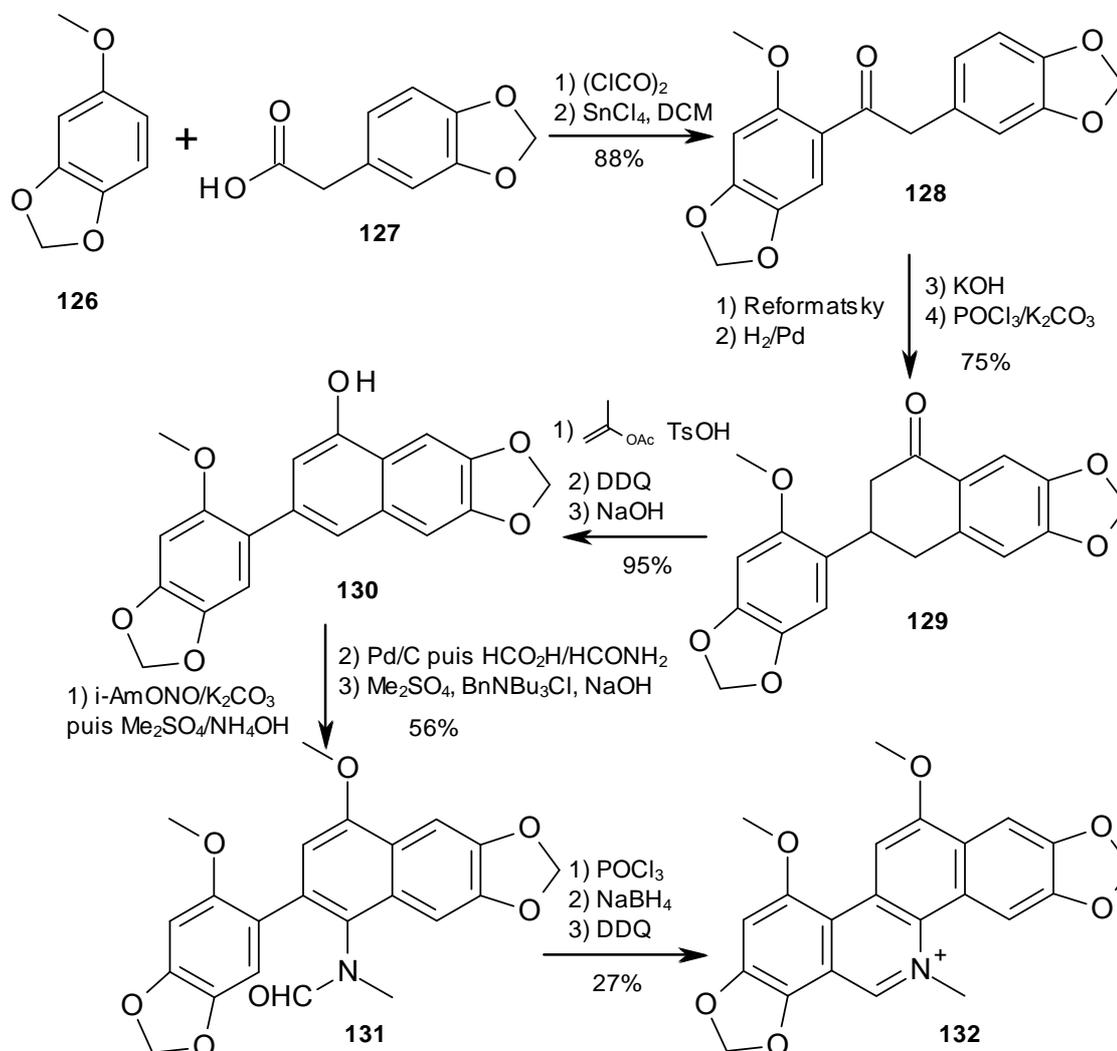


Schéma 17 : Synthèse de la mascarpine **132** par Ishikawa et al.

Les produits de départ sont simples donc facilement dérivatisables et commerciaux ce qui permet d'envisager la synthèse à d'autres benzo[c]phénanthridines.

Watanabe et al. ont publié en 2003 une synthèse semblable leur permettant d'obtenir de la 12-méthoxychélérythrine.<sup>123</sup> Cette synthèse présente beaucoup d'inconvénients car du aux nombreuses protections et déprotections elle est longue (24 étapes) et donne le composé avec un rendement global de 8%.

## Synthèse n°5 :

Cette synthèse, publiée en 2002, permet de synthétiser plusieurs types de benzo[c]phénanthridines en 7 étapes avec un rendement global variant de 15 à 30% (Schéma 18).<sup>124</sup> Cette synthèse ne comprend pas d'étapes de protection et déprotection qu'il faut intégrer pour des composés ayant des groupements phénoliques.

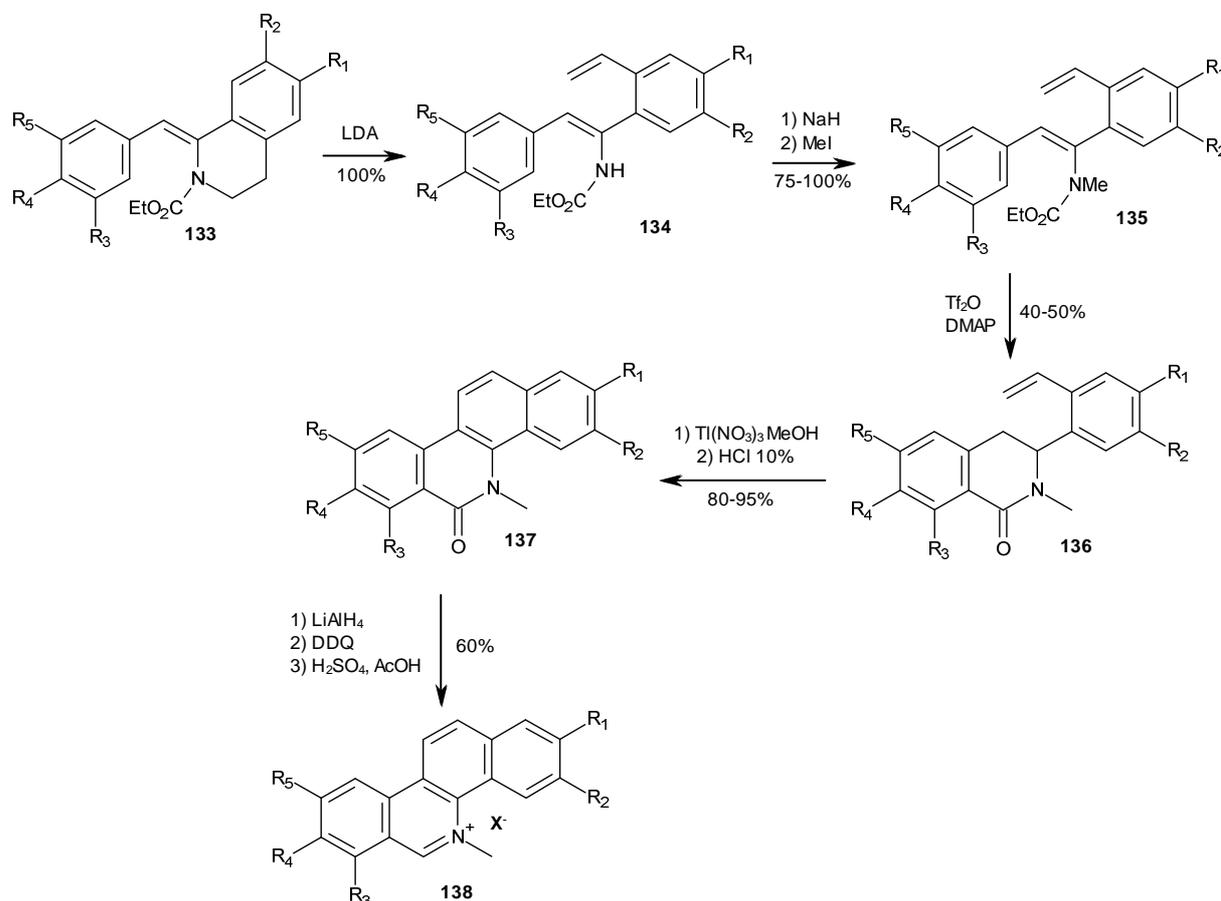


Schéma 18 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Treus et al.

Le produit de départ **133** doit être synthétisé mais Treus et al. n'expliquent pas le protocole utilisé.

Onda et al. ont publié une synthèse de la sanguinarine **29** à partir d'un autre produit naturel, la protopine **139**.<sup>125</sup> Cette synthèse possède des similitudes avec la fin de la synthèse publiée par Treus et al. (Schéma 19).

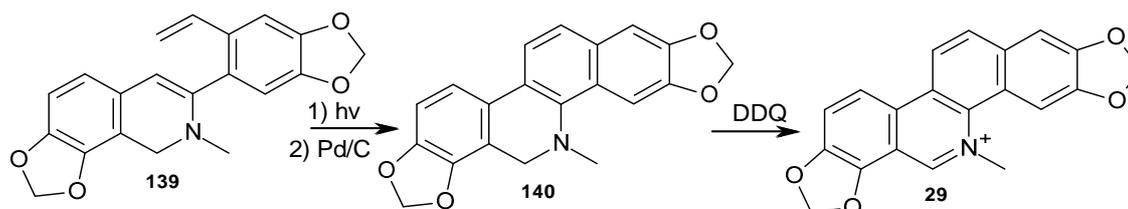


Schéma 19 : Synthèse de la sanguinarine **29** à partir de la protopine **139**

Synthèse n°6 :

Sotomayor et al. ont publié une synthèse permettant d'obtenir une benzo[c]phénanthridine complexe substituée en  $\alpha$  de l'atome d'azote et ayant un groupement benzyle sur celui-ci.<sup>126</sup>

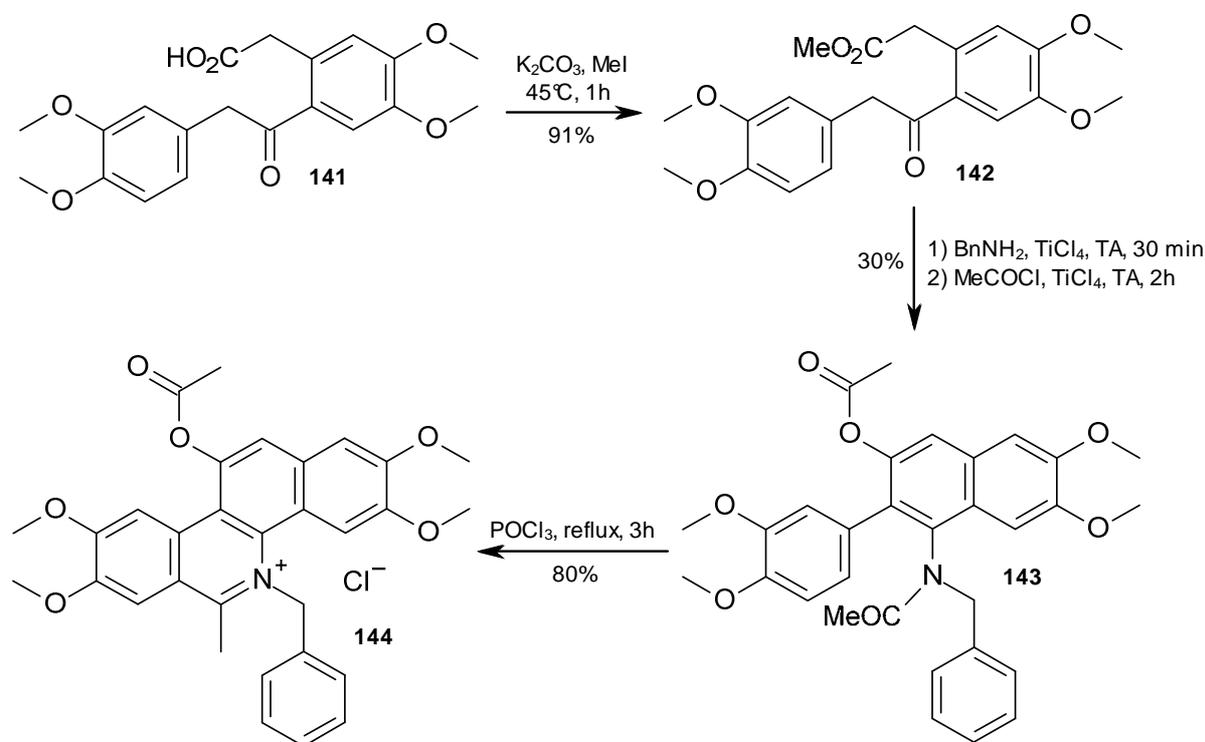


Schéma 20 : Synthèse de benzo[c]phénanthridines par Sotomayor et al.

Cette synthèse permet d'obtenir une benzo[c]phénanthridine en seulement trois étapes avec un rendement global moyen de 20%. Cette synthèse est très courte mais l'étape de formation du cycle [C] (30%) fait chuter le rendement global. Le produit de départ est également à synthétiser mais sa synthèse n'est pas décrite dans la publication.

## 1.6 Travaux Préliminaires au laboratoire

### 1.6.1 Etude bio-guidée de *Zanthoxylum rhoifolium*<sup>127</sup>

Après une étude ethnopharmacologique poussée, il a été montré par Bertani et al.<sup>128</sup> que *Zanthoxylum rhoifolium* est utilisé comme remède traditionnel antipaludique en Guyane française sous forme de tisane d'écorce. Une extraction bio-guidée des alcaloïdes contenus dans la poudre d'écorce a conduit à plusieurs composés de type benzo[c]phénanthridines : la dihydroavicine, la dihydronitidine **25**, l'oxyavicine **27**, l'oxynitidine, la fagaridine, l'avicine et la nitidine **22**. Les résultats des tests sur *P. falciparum* souche FCB1 montrent que la nitidine **22** est l'alcaloïde le plus actif sur *P. falciparum* avec une  $CI_{50}$  du même ordre de grandeur que la chloroquine **12** sur une souche chloroquino-résistante (Tableau 19) corroborant les résultats obtenus par Gakunju et al.<sup>60</sup>

**Tableau 19 : Activités antiplasmodiales *in vitro* des benzo[c]phénanthridines issues de *Z. rhoifolium***

Composés	Souche FCB1	
	CI <sub>50</sub> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µM)
Fraction alcaloïdique	3,3	
Hydroxide de nitidine <b>22</b>	< 0,1	< 0,27
Chloroquine <b>12</b>		0,175

L'étude de *Z. rhoifolium* au laboratoire a donc validé l'utilisation de celle-ci comme remède traditionnel antipaludique et a montré que son activité venait de la nitidine **22**.

## 1.6.2 Etude des propriétés biologiques de la nitidine

La nitidine **22** étant le composé le plus actif issu de *Z. rhoifolium* sur la souche FCB1 de *P. falciparum*, une étude a été menée au laboratoire afin de déterminer plusieurs de ses propriétés biologiques. L'étude a été faite sur le chlorure de nitidine **22**.

### 1.6.2.1 Activités *in vitro* de la nitidine sur *P. falciparum*

L'activité du chlorure de nitidine **22**, isolé au laboratoire, a été réalisée sur plusieurs souches de *P. falciparum* de sensibilités différentes vis-à-vis de la chloroquine **12**.

**Tableau 20 : Activités du chlorure de nitidine sur *P. falciparum***

Composé	Souches	
	CI <sub>50</sub> (µM)	
	FCB1	FCM29
Chloroquine <b>12</b>	0,089	
Chlorure de nitidine <b>22</b>	0,7 ± 0,21	0,47 ± 0,06

(FCB1 et FCM29 : souches chloroquino-résistantes)

Le chlorure de nitidine **22** a une activité équivalente sur les deux souches et sachant que chaque souche possède une sensibilité différente à la chloroquine **12**, on peut en déduire que l'activité du chlorure de nitidine **22** est indépendante de la chloroquine-résistance. Cela prouve que la nitidine **22** est une drogue qui contourne les voies de résistance développées par le parasite contre la chloroquine **12**.

Le moment d'action de la nitidine **22** sur le cycle érythrocytaire du parasite a été déterminé par mise en contact d'une culture synchronisée de *P. falciparum* avec le chlorure de nitidine **22** pendant des fenêtres d'incubation de 8 heures (Figure 20).

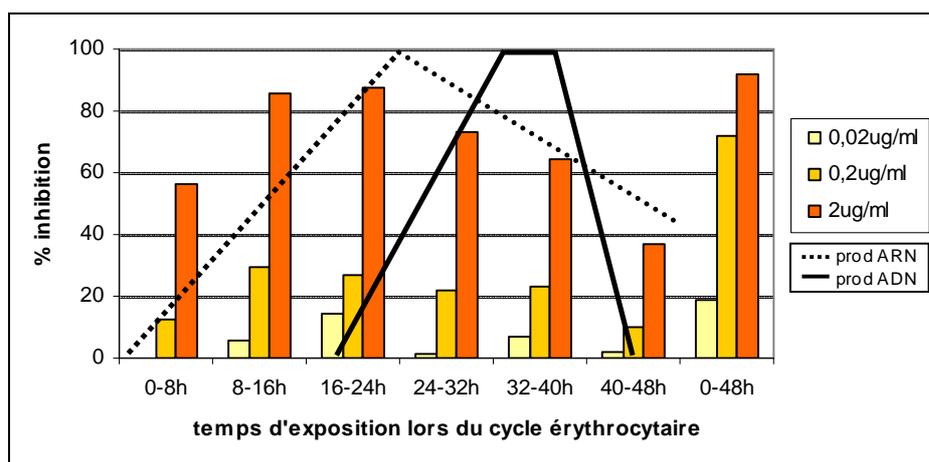


Figure 20 : Inhibition de la parasitémie par la nitidine

Ce graphique permet de déterminer le moment d'action de la nitidine **22** sur le parasite et corréler aux courbes de production d'ARN et d'ADN donne une indication sur un éventuel mode d'action. Pour la plus faible concentration ( $0.1 \cdot CI_{50}$ ), on voit que la nitidine **22** a un pic d'action situé entre 16 et 24 heures (inhibition maximale) ce qui correspond à la production d'ARN par le parasite. En revanche pour la concentration équivalente à l' $CI_{50}$  de la nitidine **22** ( $0.2 \mu\text{g/mL}$ ), l'action de la nitidine **22** sur le parasite semble plus diffuse dans le temps. Les résultats à la concentration de  $0.1 \cdot CI_{50}$  laissent penser à une possible action sur les protéines parasitaires.

### 1.6.2.2 Cytotoxicités *in vitro* de la nitidine

L'activité du chlorure de nitidine **22** a été mesurée sur les cellules tumorales mammaires humaines MCF7 pour déterminer son potentiel cytotoxique sur cellules cancéreuses et sur les cellules épithéliales de rein de singe VERO pour déterminer sa cytotoxicité sur cellules saines.

Les cellules MCF7 permettent de rendre compte de l'effet cytotoxique sur cellules cancéreuses des produits tandis que les cellules VERO rendent mieux compte de la toxicité des produits sur des cellules saines de mammifères.

Tableau 21 : Cytotoxicité du chlorure de nitidine **22**

Composé	Souches	
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
	MCF7	VERO
Chlorure de nitidine	$0.52 \pm 0.04$	$23.4 \pm 3$
Camptothécine	$0.28 \pm 0.14$	

L'activité du chlorure de nitidine **22** sur MCF7 est de  $0.52 \mu\text{M}$  ce qui confirme les résultats de la littérature décrivant une activité intéressante sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses.

La nitidine **22** possède une  $CI_{50}$  sur VERO de  $23,4 \mu\text{M}$  ce qui permet d'obtenir un bon indice de sélectivité antipaludique de 50 ( $IS = CI_{50}[\text{Vero}] / CI_{50}[\text{FcM29}]$ ).

### 1.6.2.3 Activité *in vivo* de la nitidine sur *P. falciparum*

L'activité de la nitidine **22** sur le paludisme a été déterminée *in vivo* grâce au test de Peters sur des souris Swiss femelles infectées par *P. vinckei petteri*. Le test de Peters consiste en l'injection par voie intra-péritonéale de parasites (J0) puis à l'administration du composé à évaluer par voie IP pendant 4 jours (J0 à J3). La nitidine **22** a été testée à 4 dosages différents dans du DMSO (0.1, 1, 10 et 20 mg/kg), le groupe témoin a reçu des injections de DMSO seul et deux groupes contrôles ont reçu des traitements de chloroquine **12** (1 et 10 mg/kg).

A la fin du traitement (J4), la parasitémie a été évaluée par frottis sanguin et par cytométrie de flux afin de déterminer la DE<sub>50</sub> de la nitidine **22**. De plus, la survie des souris a été suivie pendant 11 jours.

Tableau 22 : Inhibition de la parasitémie *in vivo*

	Nombre de souris	Parasitémie moyenne	Ecart-type	Inhibition parasitémie
Contrôle	10	69.8	12.8	
CQ 1 mg/kg	5	78.9	8.2	0
CQ 10 mg/kg	5	1.1	1.2	98
Nitidine 10 mg/kg	5	62.1	8.9	11
Nitidine 20 mg/kg	5	31.5	14.4	55

Lors de ce test, la dose effective à 50% (DE<sub>50</sub>) a été trouvée égale à 18.9 mg/kg pour la nitidine **22** et 5 mg/kg pour la chloroquine **12**. La valeur du témoin chloroquine **12** correspond bien à la littérature.<sup>129</sup>

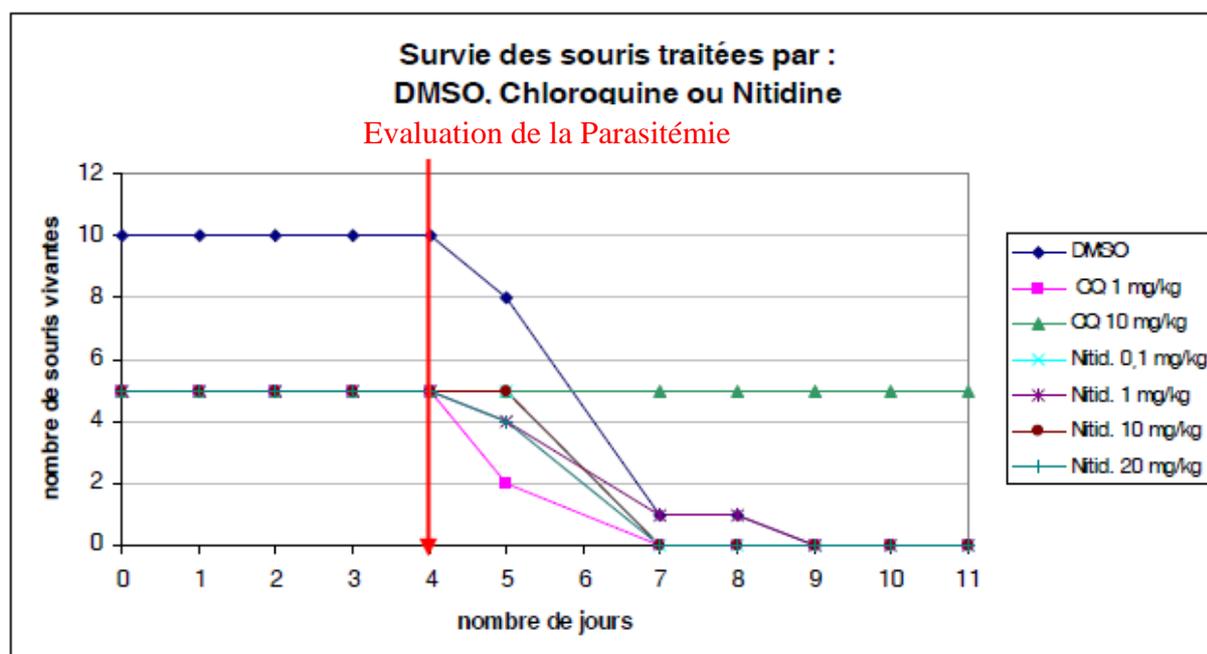


Figure 21 : Survie des souris après traitement par CQ ou nitidine

Le test révèle que la nitidine **22** a bien une action thérapeutique supérieure à sa toxicité. En effet, on observe une diminution de la parasitémie de 55% à 20 mg/kg. La DE<sub>50</sub> est donc située aux alentours

de 20 mg/kg. De plus, aucune souris n'est morte durant le traitement, ce qui montre une toxicité limitée de la nitidine **22** à cette dose. Par contre, toutes les souris sont mortes environ trois jours après arrêt du traitement par la nitidine. Ceci est vraisemblablement dû à la reprise de la parasitémie. Il sera donc nécessaire d'établir la  $DE_{100}$  lors de prochains tests.

### 1.6.3 Etude du mode d'action de la nitidine : Inhibition de la détoxification de l'hème

La chloroquine **12** inhibe la détoxification de l'hème en se liant à l'hème ce qui empêche son agrégation. La nitidine **22** possède une structure plane et aromatique qui lui permet d'interagir et de s'insérer entre d'autres molécules telles que l'ADN ou l'hème par exemple.

Afin de déterminer le potentiel inhibiteur de la nitidine **22** vis-à-vis de la détoxification de l'hème, une étude *in vitro* de l'interaction de la nitidine **22** avec l'hème a été menée. Cette étude a été menée en parallèle avec la chloroquine **12** pour valider les essais et permet de déterminer la géométrie des complexes hème-nitidine **22** et hème-chloroquine **12** formés. Cela permet aussi d'évaluer la constante de dissociation de ces complexes.

#### 1.6.3.1 Titration dans le DMSO

Les manipulations de titration de l'hème par la chloroquine **12** et par la nitidine **22** ont tout d'abord été réalisées dans un mélange eau/DMSO tamponné à pH 7 suivant le protocole décrit par Egan.<sup>130</sup>

Les courbes de titration ont été analysées par le logiciel de modélisation specfit. La stoechiométrie trouvée pour les complexes hème-chloroquine **12** et hème-nitidine **22** est de 1-1 avec des constantes de dissociation respectivement de  $10^{-5,17}$  et  $10^{-4,5}$ .

La valeur de référence pour la constante concernant le complexe chloroquine-hème est retrouvée pour les manipulations faites au laboratoire, ce qui valide les mesures faites. La valeur du log K pour le complexe nitidine-hème est assez proche de celle du complexe chloroquine-hème. La nitidine **22** a une bonne affinité pour l'hème dans une solution DMSO 40%.

#### 1.6.3.2 Titration dans une solution aqueuse

Des essais de titration ont été réalisés dans une solution aqueuse tamponnée à pH 6,5 afin d'être le plus proche des conditions biologiques. Afin de limiter l'agrégation de l'hème sur les parois de la verrerie utilisée celle-ci sera lavée selon un protocole établi<sup>131</sup>

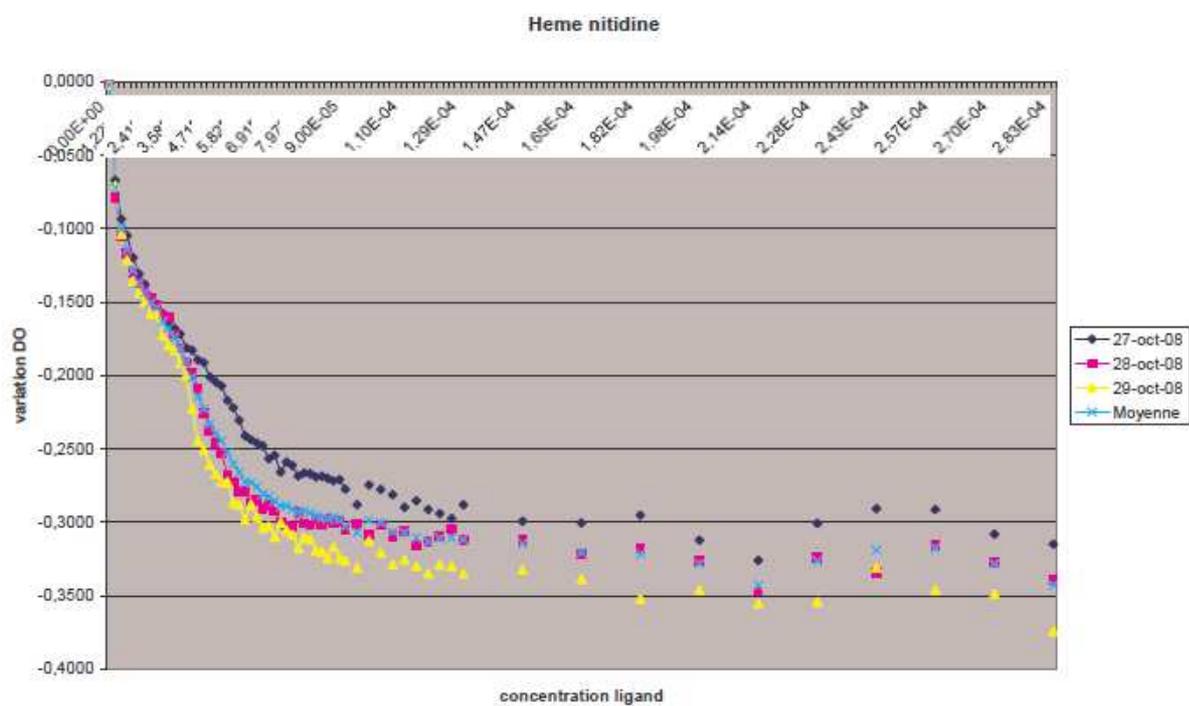


Figure 22 : Courbes de titration de l'hème par le chlorure de nitidine (solution pH = 6,5, c = 10 mM)

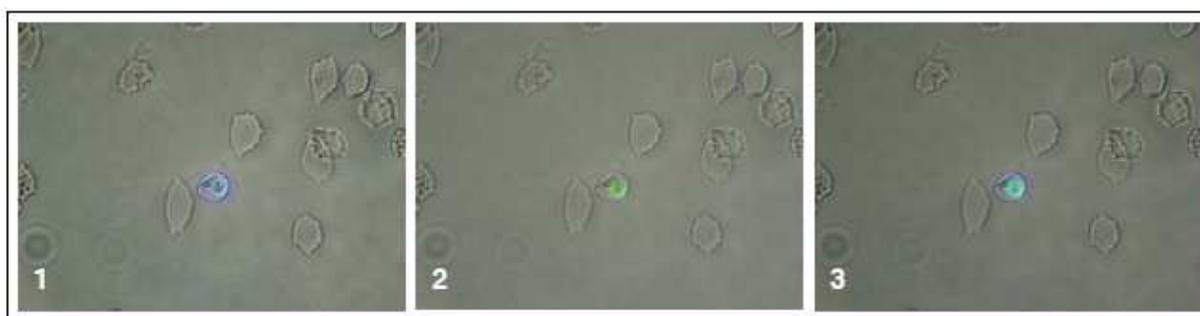
Les courbes obtenues par titration de l'hème par la nitidine **22** en solution aqueuse tamponnée pH = 6,5 ne sont pas exploitables par le logiciel specfit.

## 1.6.4 Localisation et accumulation de la nitidine dans le parasite

### 1.6.4.1 Localisation de la nitidine dans le parasite par microscopie optique

Une observation, par microscopie optique (filtres DAPI et FITC), de parasites mis en présence de nitidine **22** permet de rendre compte des différentes fluorescences (bleu et vert) de celle-ci. L'utilisation du Hoechst, marqueur de l'ADN, (bleu) pose problème pour localiser la nitidine **22** dans le parasite car leur fluorescence va se superposer (Photo 5).

L'essai d'incubation des parasites avec la nitidine et le hoechst permet de voir que la nitidine se concentre uniquement dans les globules rouges parasités (Photo 5)



**Photo 5 : Photos de GRP incubés avec du Hoechst et de la nitidine**

Image 1 : Observation du colorant Hoechst. Image 2 : Observation de la Nitidine. Image 3 : Superposition des images 1 et 2.

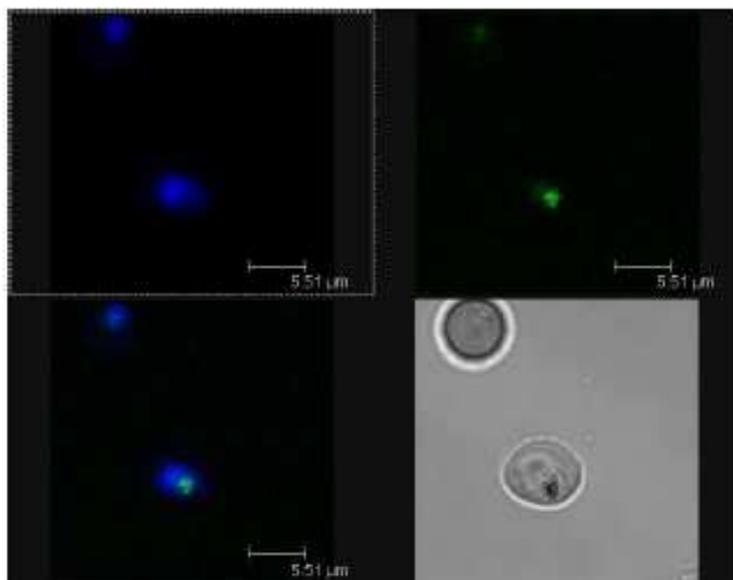
Afin de poursuivre la localisation de la nitidine **22** dans les stades intra-érythrocytaires de *P. falciparum*, il est donc nécessaire d'utiliser d'autres fluorochromes ayant une émission différente de celles de la nitidine **22** (bleue et verte).

De plus, l'observation au microscope optique permet seulement de différencier des GRS de GRP mais pas d'observer les différents compartiments du parasite.

### 1.6.4.2 Localisation par microscopie confocale

L'utilisation du microscope confocal est utile pour obtenir une meilleure qualité d'image, une résolution 3D et pour différencier les compartiments des parasites ce qui n'est pas possible avec la microscopie optique. Les couleurs visualisées sur les photos ne sont pas les couleurs réelles, il s'agit de couleurs ajoutées par traitement informatique.

Le Draq5® est un marqueur des acides nucléiques et donc du noyau. Son utilisation avec la nitidine **22** et leur observation en microscopie confocale peuvent permettre de savoir si la nitidine **22** se concentre dans le noyau (Photo 6).

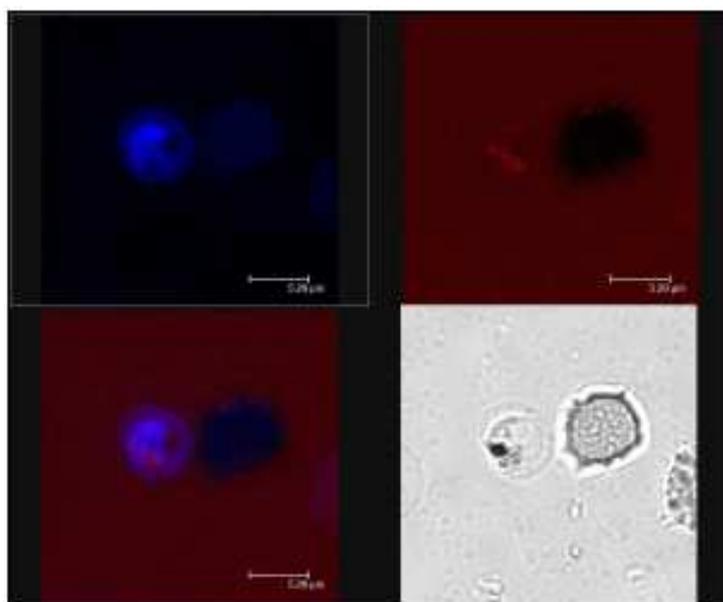


**Photo 6 : Localisation de la nitidine (bleu) et du Draq5 (vert)**

Image 1 : Observation de la nitidine. Image 2 : Observation du colorant Draq. Image 3 : Superposition des images 1 et 2. Image 4 : Observation à la lumière blanche.

On voit que la nitidine **22**, ici en bleu, et le Draq5®, ici en vert, ne colocalisent pas en microscopie confocale. La nitidine **22** ne se concentre pas dans le noyau du parasite.

Le Lysotracker® est un marqueur des compartiments acides et donc de la vacuole digestive du parasite. Son utilisation avec la nitidine **22** et leur observation en microscopie confocale peut permettre de savoir si la nitidine **22** se concentre dans la vacuole digestive, comme nous le supposons de par son affinité avec l'hème (Photo 7).



**Photo 7 : Localisation de la nitidine (bleu) et du Lysotracker (rouge)**

Image 1 : Observation de la nitidine. Image 2 : Observation du colorant Lysotracker Red. Image 3 : Superposition des images 1 et 2. Image 4 : Observation à la lumière blanche.

L'utilisation du Lysotracker® n'a pas donné de fluorescence claire lors des expériences malgré les concentrations et les temps d'incubation variés. Le marquage semble trop petit et trop faible pour démontrer la présence de la vacuole digestive qui occupe normalement à ce stade un large espace

chez *Plasmodium sp.* Pour autant la nitidine **22b** semble trop diffuse pour marquer seulement la vacuole digestive comme nous le pensions. Nous retiendrons donc que la nitidine **22b** se concentre dans le cytoplasme parasitaire.

#### **1.6.4.3 Accumulation de la nitidine par microscopie**

En plus des observations de la nitidine **22b** faites par microscopie optique et confocale, il a été possible de déterminer par mesure de fluorescence, la quantité de nitidine **22b** se concentrant dans le parasite. Cette concentration est de 5 mM, ce qui représente une concentration très élevée en comparaison de la concentration de la solution utilisée pour l'incubation des parasites et qui est de 0.12 mM. Il existe donc une réelle rétention de la nitidine **22b** à l'intérieur de *Plasmodium* ce qui pourrait être à l'origine de son action antiparasitaire.

## 2 Synthèse des BZPs et des dérivés

### 2.1 Objectifs et stratégie employée

L'hypothèse d'un mode d'action d'inhibition de la détoxification de l'hème a été mise à mal par le fait que la nitidine **22** ne s'accumule pas dans la vacuole digestive (expérience de colocalisation). Afin de privilégier ce mode d'action antipaludique, l'ajout d'une chaîne aminoalkyle sur la nitidine **22** ou sur la fagaronine **28** est envisagé. En effet, l'ajout d'un atome d'azote basique permettrait le piégeage des composés dans la vacuole digestive du parasite où a lieu la digestion de l'hémoglobine. Les chaînes aminoalkyles insérées sur la nitidine **22** et la fagaronine **28** fournissent les composés **145** à **150** (Figure 23).

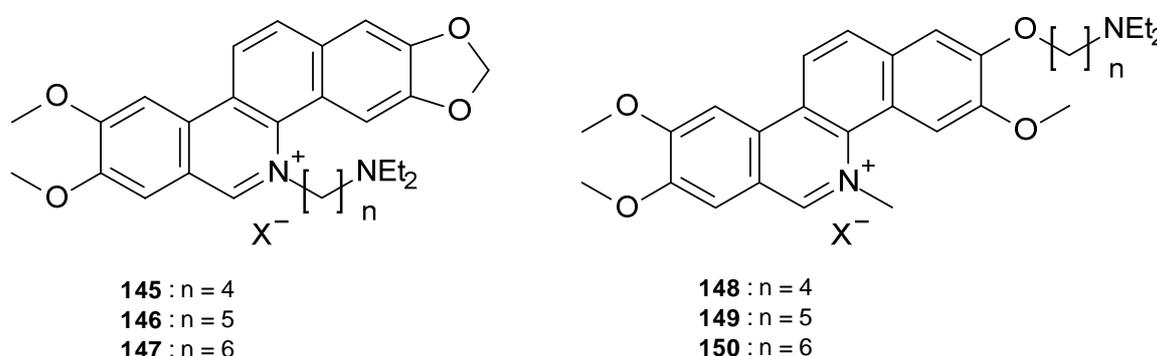


Figure 23 : Structure des dérivés de la nitidine **22** et de la fagaronine **28**

La stratégie de synthèse employée est, tout d'abord, de synthétiser la nornitidine **34** selon la synthèse publiée par Luo (Schéma 12) ainsi que la norfagaronine **66** en adaptant la synthèse (Schéma 21).<sup>114</sup>

En effet, cette synthèse a l'avantage d'être courte (5 étapes), simple, facile de mise en œuvre et facilement adaptable à beaucoup d'autres benzo[c]phénanthridines telles que la norfagaronine **66** par exemple du fait des produits de départ simples et dont les différents dérivés sont commerciaux.

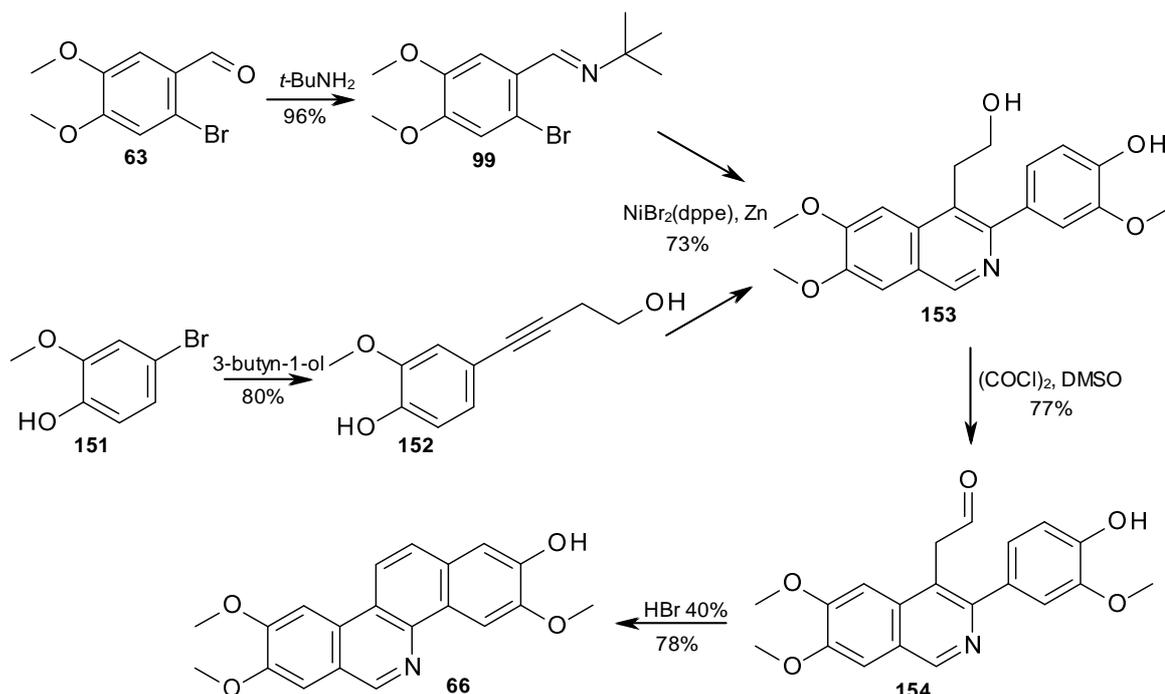


Schéma 21 : Synthèse de la norfagaronine 66 via la synthèse de Luo et al.

Une fois la nornitidine **34** synthétisée, l'objectif est de *N*-alkyler et de substituer le brome par la diéthylamine afin d'obtenir les composés **145** à **147** (Schéma 22).

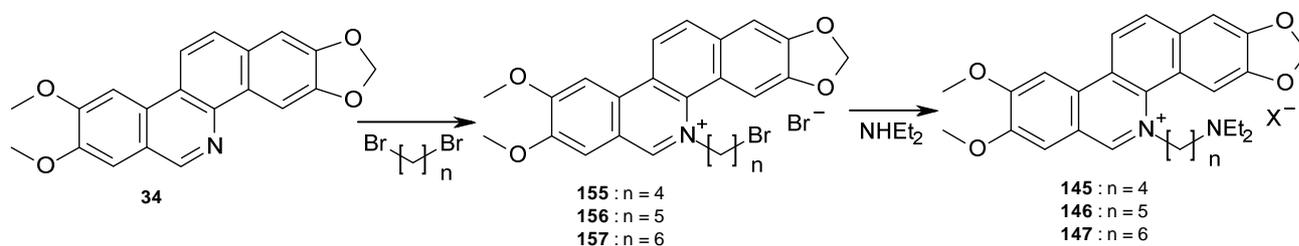


Schéma 22 : Synthèse des dérivés de la nitidine à partir de la nornitidine 34

Pour obtenir les composés **148** à **150** à partir de la norfagaronine **66**, l'objectif est de *O*-alkyler celle-ci puis de la *N*-méthyle et enfin de substituer l'atome de brome par la diéthylamine (Schéma 23).

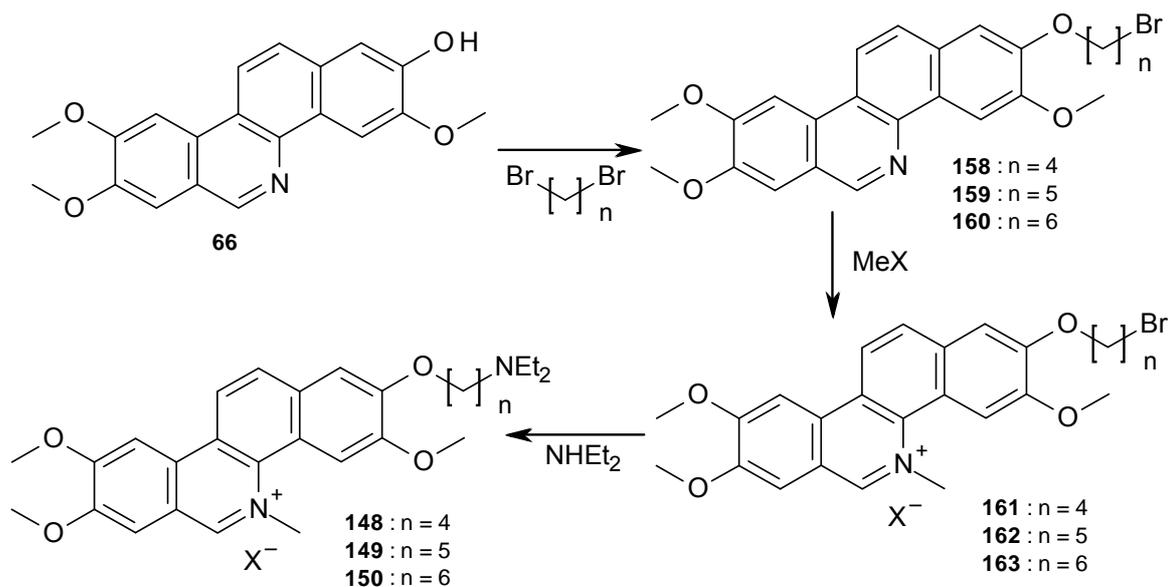
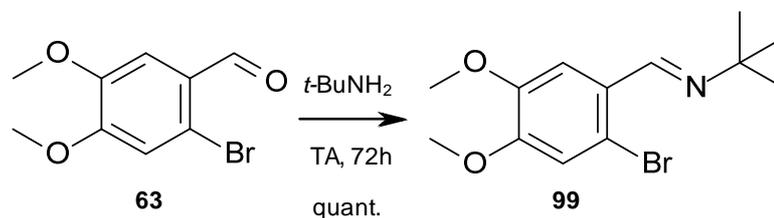


Schéma 23 : Synthèse des dérivés de la fagaronine 28 à partir de la norfagaronine 66

## 2.2 Synthèse de la Nornitidine 34

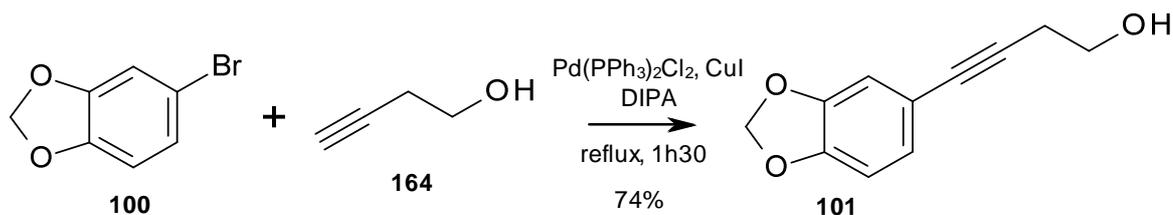
### 2.2.1 Synthèse de la benzylimine 99



Équation 1 : Synthèse de la benzylimine

Cette réaction consiste en la condensation de la *tert*-butylamine sur le bromovératraldéhyde **63**. Cette réaction se fait à température ambiante et ne nécessite qu'une distillation afin d'éliminer la *tert*-butylamine en excès et l'eau provenant de la réaction. Cette réaction ne pose aucun problème et est quantitative.

### 2.2.2 Synthèse de l'alcyne aromatique 101



Équation 2 : Synthèse de l'alcyne

Cette réaction est un couplage de Sonogashira et permet de créer une liaison carbone-carbone entre un carbone aromatique  $sp^2$  et un carbone  $sp$ . Cette réaction fournit le produit voulu, le composé **101**, avec de bons rendements. Il a fallu toutefois adapter le traitement de la réaction décrit par Luo pour éviter la dégradation du composé **101** en composé **165** (Figure 24).

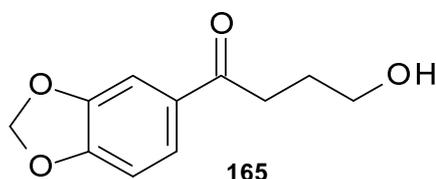
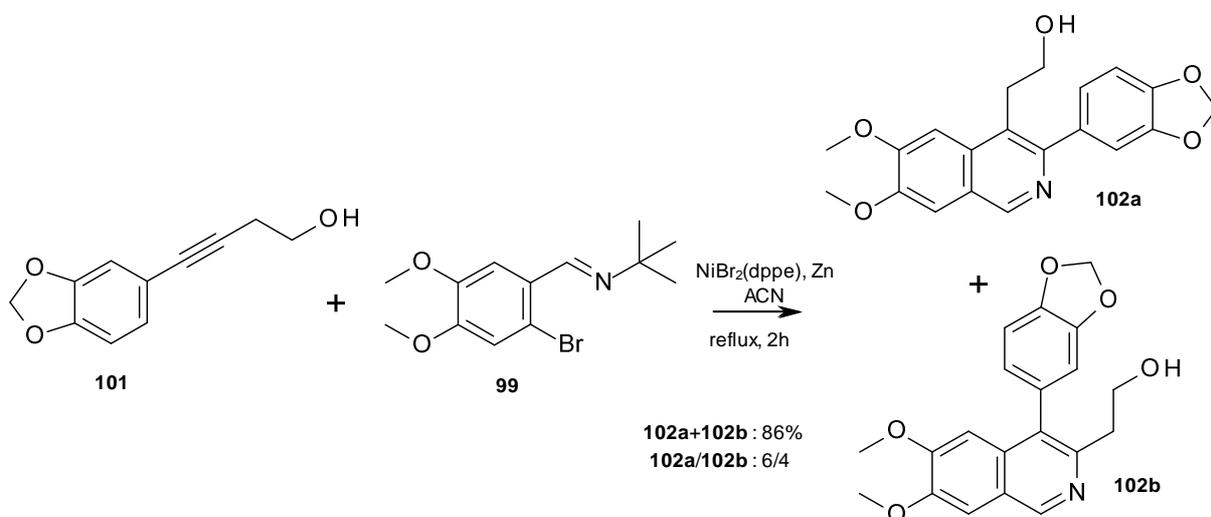


Figure 24 : Structure de la cétone **165** issue de la dégradation de l'alcyne **101**

En effet, en milieu acide, une triple liaison peut facilement s'hydrater et donner un émol qui se met sous forme plus stable pour donner le composé **165** correspondant. Cette dégradation a été décrite par Pal et al. qui ont étudié les effets des différents groupements de l'aromatique sur la proportion relative alcyne/cétone et sur les rendements de réaction.<sup>132</sup> Il convient donc d'être prudent lors du lavage acide du milieu réactionnel : minimiser le temps de contact de la phase organique avec la phase aqueuse acide et neutraliser l'acidité résiduelle dans la phase organique par un lavage basique.

### 2.2.3 Synthèse de l'isoquinoline **102**



Équation 3 : Synthèse de l'isoquinoléine **102**

Cette cyclisation à l'aide d'un catalyseur au nickel permet de créer le cycle isoquinoléique. Selon Luo et al., un seul produit **102a** est obtenu. Nous avons au contraire observé la formation des deux régioisomères **102a** et **102b**. Le composé **102a** est obtenu avec un rendement de 52% et le composé **102b** est obtenu avec un rendement de 34%. Le rendement global de la réaction est donc de 86% et la proportion relative **102a/102b** est de 6/4.

Les conditions de cette réaction de couplage ont été étudiées par Korivi et al.,<sup>133</sup> en particulier l'influence des alcynes sur la régiosélectivité, le rendement et sur le mécanisme réactionnel.

A partir des composés **101** et **99**, on peut proposer le schéma réactionnel suivant. La réaction commence par une réduction du Ni(II) en Ni(0) par le Zn en poudre. S'ensuit un cycle catalytique qui fournit le composé majoritaire **102a** ainsi que son régioisomère **102b** (Schéma 24). La première

réaction du cycle donnant l'intermédiaire réactionnel **166** est une insertion oxydante, suivie d'une transmétallation donnant les deux régioisomères **167a** et **167b** puis d'une élimination réductrice fournissant les régioisomères récupérés **102a** et **102b**.

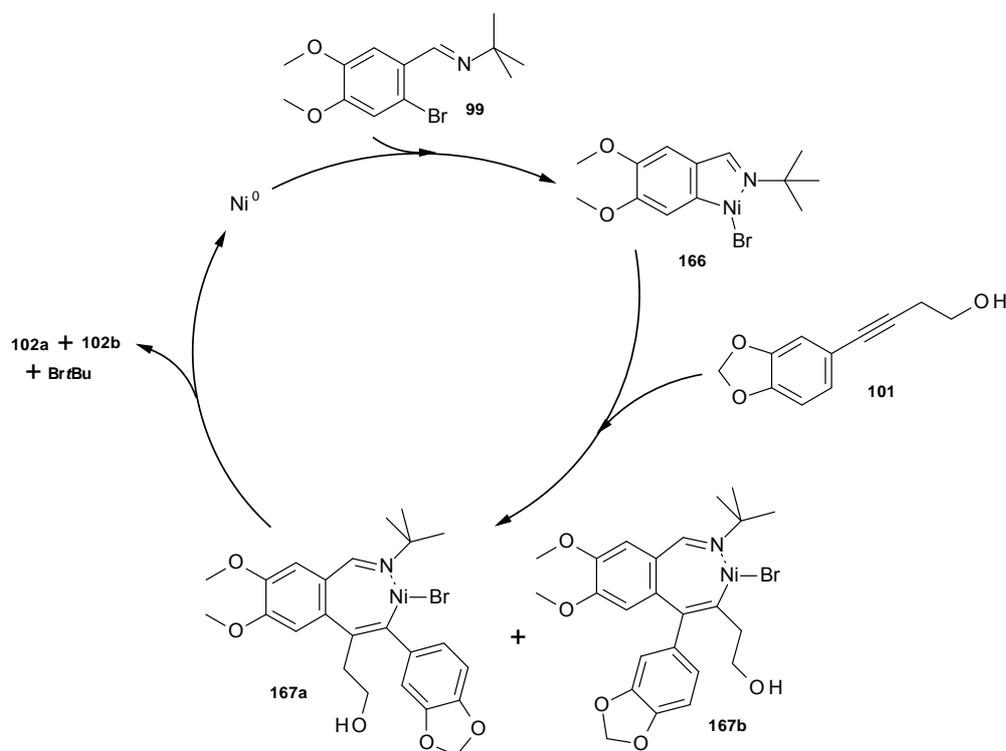


Schéma 24 : Mécanisme réactionnel de la cyclisation au nickel par Korivi et al.

Selon les essais de Korivi et al. il n'y a pratiquement qu'un seul régioisomère fourni, celui qui correspond au produit voulu **102a**, correspondant à l'intermédiaire de réaction **167a** mais les essais ont été menés avec des alcynes aromatiques simples (pas de substituants sur l'aromatique et sans groupement hydroxy au bout de la chaîne carbonée). Korivi ainsi que Roesch<sup>134</sup> montre également qu'une imine riche en électron inverse la régiosélectivité. C'est notre cas ici et cela expliquerait les mauvais ratios obtenus bien que favorable au régioisomère **102a** voulu.

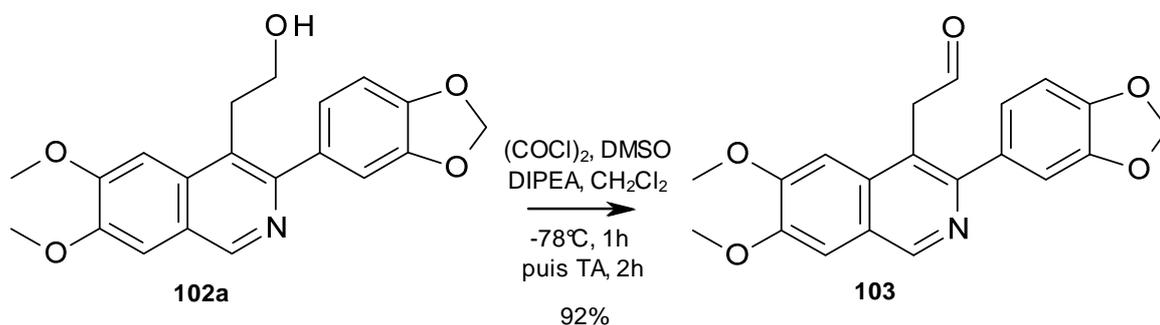
La réaction fournit quand même le régioisomère **102a** majoritairement mais pas dans les proportions espérées. Le fait que le régioisomère **102b** soit obtenu est peut-être dû au fait que le groupement OH de la chaîne carbonée peut se complexer sur le nickel pour former un cycle à 5 chaînons (schéma 24).

Les deux régioisomères **102a** et **102b** sont difficiles à séparer et des conditions d'élution sur gel de silice ont dû être trouvées afin de palier ce problème.

Le même type de réaction sans halogène sur le composé **99** et donnant des isoquinoléines a été étudié par Guimond et al.<sup>135</sup> La réaction se fait avec un catalyseur au rhodium et permet d'obtenir de bons rendements. Le fait d'utiliser une imine non halogénée permet de pouvoir adapter la synthèse à beaucoup d'isoquinoléines différentes. Le problème concerne la régiosélectivité de la réaction puisque Guimond et al. précisent que lorsqu'un alcyne dissymétrique est utilisé, le groupement le plus volumineux se place le plus loin de l'azote.

Les composés **102a** et **102b** ont été déterminés complètement par RMN à l'aide de la RMN 1H, 13C, HSQC et HMBC.

## 2.2.4 Oxydation de l'alcool 102a en aldéhyde 103

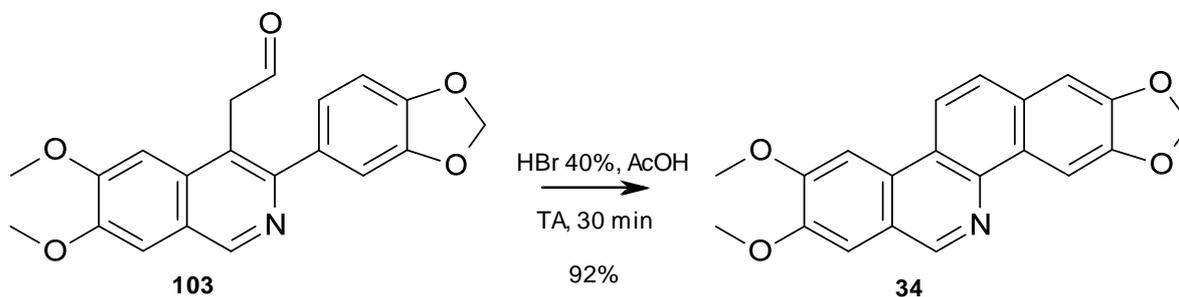


Équation 4 : Oxydation de l'alcool 102a en aldéhyde (conditions de Swern)

L'oxydation du régioisomère **102a** se fait selon les conditions classiques de l'oxydation de Swern (Equation 4). La réaction donne l'aldéhyde **103** correspondant sans aucun problème et avec de bons rendements. On remarque que lors de l'oxydation d'un mélange de régioisomères **102a** et **102b**, l'oxydation du régioisomère **102a** est plus rapide que l'oxydation du régioisomère **102b**.

L'oxydation du composé **102b** n'a pas été observée dans les conditions de Swern.

## 2.2.5 Synthèse de la nornitidine 34



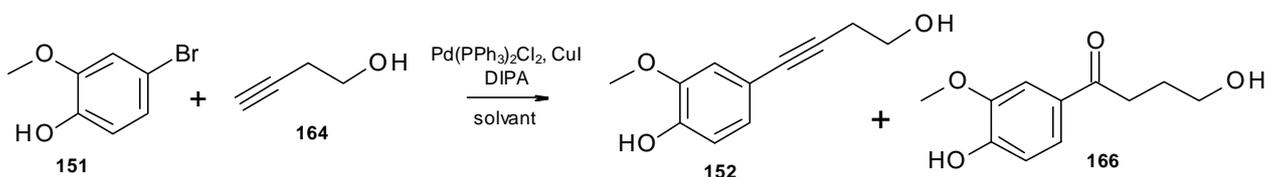
Équation 5 : Synthèse de la nornitidine 34. Cyclisation en milieu acide

Afin d'obtenir la nornitidine **34** une cyclisation en milieu acide est effectuée. Cette réaction fournit la nornitidine **34** à partir du composé **103** avec de très bons rendements selon les conditions de Luo et al. (Equation 5).

## 2.3 Synthèse de la Norfagaronine 66

### 2.3.1 Synthèse de l'alcyne aromatique

#### 2.3.1.1 Réaction de Sonogashira sur le bromométhoxyphénol 151



Équation 6 : Réaction de Sonogashira sur le bromométhoxyphénol 151

Afin d'adapter la synthèse de la nornitidine **34** à la norfagaronine **66**, la réaction est menée avec le composé **151** correspondant (Équation 6). Ce produit n'étant pas soluble dans les conditions utilisées pour la nornitidine **34**, plusieurs conditions (solvants, températures et temps) ont été testées (Tableau 23).

Tableau 23 : Conditions réactionnelles

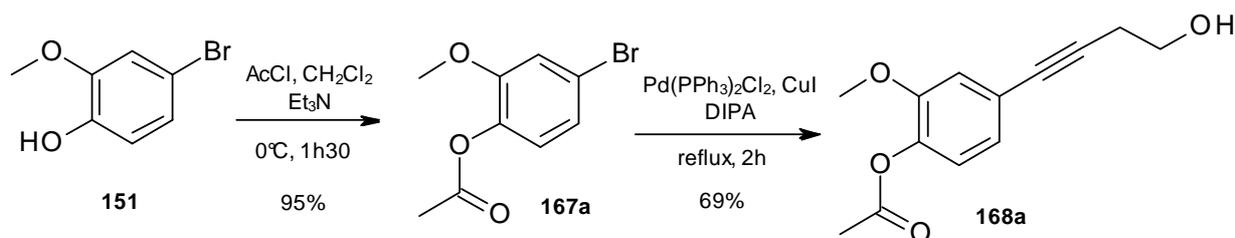
Entrée	Solvant	Conditions	Résultats
1		Reflux, 2h	Dégradation en composé <b>166</b>
2	DMF	85°C, 1h30	23% de composé <b>152</b>
3	THF	Reflux, 1h30	Produits de départ
4	DMF	85°C, 8h	Produits de départ
5	DMF	TA, 24h	Produits de départ
6	DMF	TA, 72h	Produits de départ

Le produit voulu **152** n'est obtenu qu'avec de faibles rendements (maximum 23% : entrée 2) ainsi que la cétone **166** (Équation 6) correspondant à la dégradation suite à une hydratation en milieu acide du composé **152** (entrée 1).<sup>132</sup> Les autres conditions expérimentales<sup>136, 137</sup> n'ayant pas conduit au produit **152** voulu (entrée 3 à 6), un changement de stratégie est envisagé. En effet, le produit utilisé comporte un phénol et celui-ci étant la seule différence par rapport à la synthèse de la nornitidine **34**, il convient de le protéger.

#### 2.3.1.2 Protection du phénol (acétyle) puis réaction de Sonogashira

Suite aux difficultés rencontrées lors de la réaction de Sonogashira sur le composé **151**, un groupement protecteur pour le phénol a été recherché. Le phénol peut être protégé par un acétate,<sup>138</sup> un benzyle<sup>139</sup> ou un BOC<sup>139</sup> voire même un groupe isopropyle sans entraver la réaction de Sonogashira et sans qu'il y ait déprotection lors de celle-ci.

Le choix du groupement protecteur se porte sur l'acétate, facile à insérer et à cliver. La réaction de protection se fait selon les conditions classiques et fournit le composé **167a** avec un excellent rendement (Équation 7).



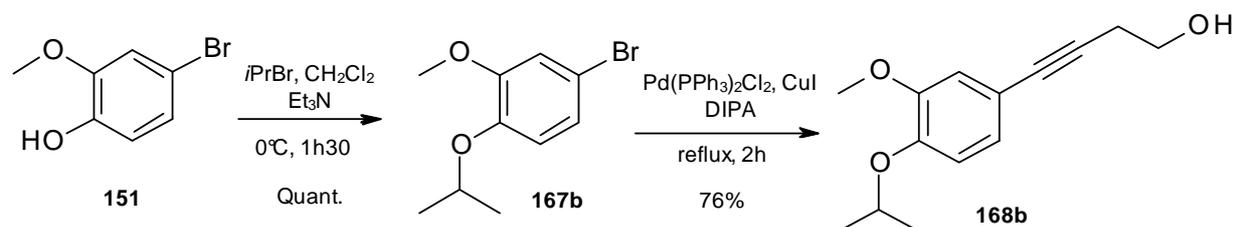
Équation 7 : Synthèse de l'alcyne aromatique protégé par un acétate

Une fois le phénol protégé, la réaction de Sonogashira avec les conditions expérimentales de Luo et al. ne pose plus aucun problème et fournit le composé **168a** avec de bons rendements (Équation 7).

La cétone correspondant à la dégradation de l'alcyne **168a** n'a pas été retrouvée dans les essais faits avec l'acétate. Cela est dû aux précautions mises en place pour éviter son obtention.

### 2.3.1.3 Protection du phénol (isopropyle) puis réaction de Sonogashira

Une réaction de protection du composé **151** à l'aide d'un groupement isopropyle est mise en oeuvre afin de comparer l'influence du groupement sur la synthèse de la fagaronine. Cette réaction fournit le composé **167b** et le groupement isopropyle n'influence pas de manière significative la réaction de Sonogashira (Équation 8).

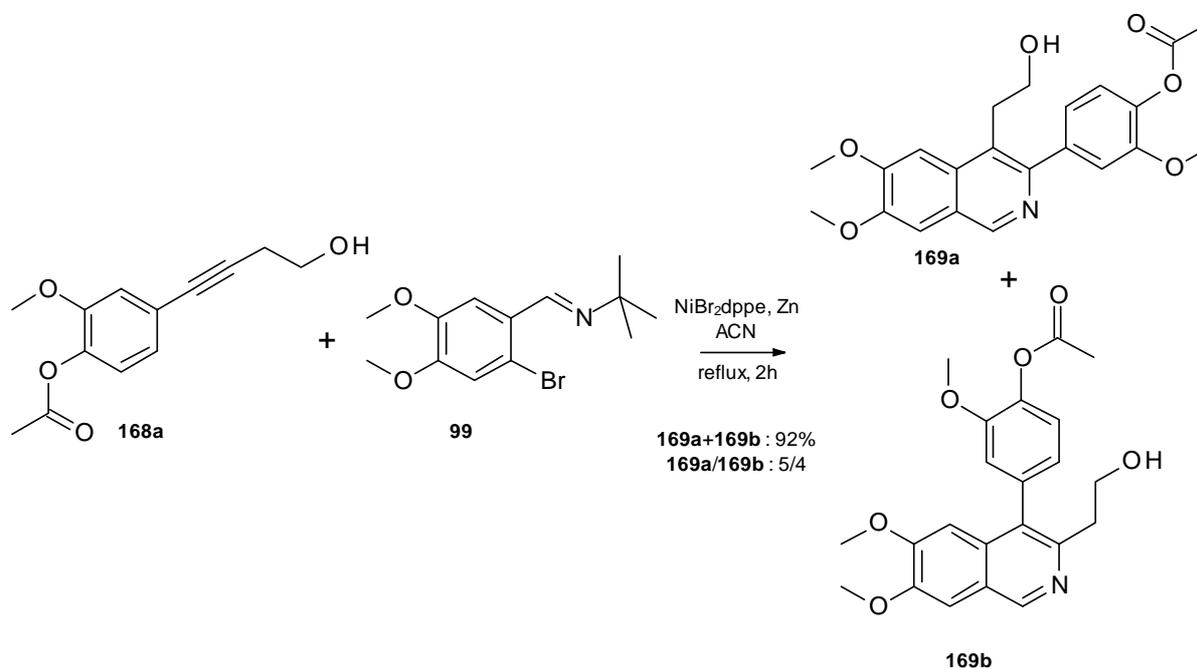


Équation 8 : Synthèse de l'alcyne aromatique protégé par un isopropyle

Le composé **168b** est obtenu au terme des deux réactions de manière comparable aux essais précédents.

## 2.3.2 Synthèse de l'isoquinoléine 169

### 2.3.2.1 Cyclisation avec la protection acétyle



Équation 9 : Synthèse de l'isoquinoléine 169a

Cette réaction s'effectue dans les conditions préalablement utilisées pour la synthèse de la norritidine. Elle fournit deux régioisomères dans un rapport **169a/169b** : 5/4. Le régioisomère **169a** voulu est toujours majoritaire par rapport au second régioisomère **169b** (Équation 9).

Hormis un rapport de régiosélectivité moins avantageux par rapport à la synthèse pour la norritidine **34**, le groupement acétate ne pose aucun problème pour le déroulement de la réaction. L'acétate n'est pas clivé dans les conditions utilisées lors de la réaction ainsi que lors du traitement.

Les deux produits **169a** et **169b** sont très difficiles à séparer comme lors de la même étape pour la synthèse de la norritidine **34** mais des conditions d'élution sur gel de silice ont été trouvées afin d'isoler les deux régioisomères. Ces conditions nécessitent quand même plusieurs colonnes et la purification reste longue. Le composé **169a** est obtenu avec un rendement de 51%, le composé **169b** est obtenu avec un rendement de 41%. Le rendement global de la réaction est donc de 92% et le ratio **169a/169b** est de 5/4.

Les composés **169a** et **169b** ont été déterminés complètement par RMN à l'aide de la RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC. La NOESY a permis de différencier les régioisomères entre eux.

La NOESY du composé **169a** montre une corrélation entre le proton aromatique  $\text{H}_5$  et les deux protons  $\text{H}_{15}$ .

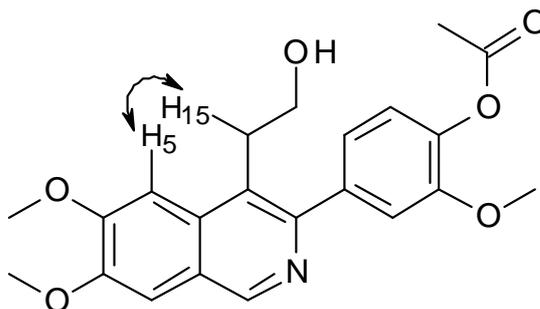


Figure 25 : Corrélation NOESY du composé 169a permettant d'établir la régiosélectivité de la formation du cycle B

La NOESY du composé **169b** montre une corrélation entre le proton aromatique H<sub>5</sub> et le proton aromatique H<sub>10</sub>.

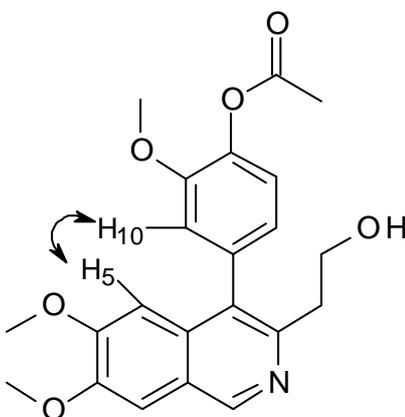
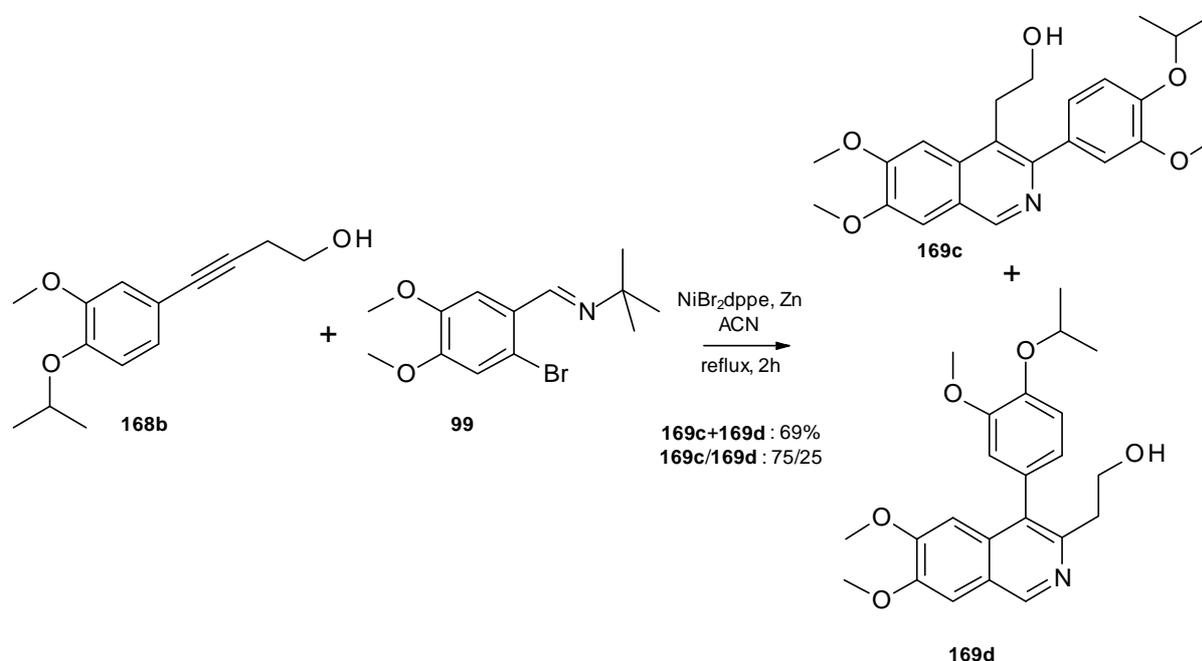


Figure 26 : Corrélation NOESY du composé 169b permettant d'établir la régiosélectivité de la formation du cycle B

### 2.3.2.2 Cyclisation avec la protection isopropyle

La réaction a été menée sur le composé **168b** afin d'obtenir les composés **169c** et **169d** (Équation 10).



Équation 10 : Synthèse de l'isoquinoléine **169c**

Le groupement protecteur isopropyle permet d'obtenir un rapport de régiosélectivité **169c/169d** plus avantageux pour le composé **169c** comparé au groupement acétate (75/25) mais un rendement plus faible est obtenu avec le groupement isopropyle (69%). Un mode opératoire a été mis au point afin de séparer les deux régioisomères avec une seule chromatographie. Cette méthode permet d'obtenir le composé **169c** pur mais ne permet pas d'obtenir le composé **169d** seul. Le composé **169d** est obtenu en mélange avec le composé **169c**.

Le composé **169c** est finalement purifié par précipitation dans du dichlorométhane afin d'effectuer sa détermination RMN. Les composés **169c** et **169d** ont été déterminés complètement par RMN à l'aide de la RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC et HMBC. La NOESY a permis de différencier les régioisomères entre eux. La NOESY du composé **169c** montre une corrélation entre le proton aromatique  $\text{H}_5$  et les deux protons  $\text{H}_{15}$ .

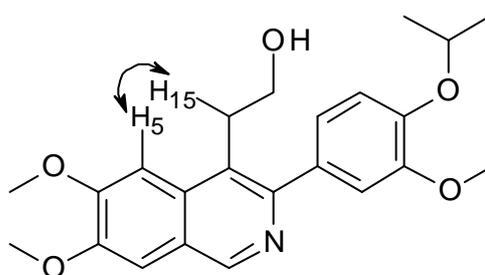


Figure 27 : Corrélation NOESY du composé **169c** permettant d'établir la régiosélectivité de la formation du cycle B

La NOESY du composé **169d** montre une corrélation entre le proton aromatique H<sub>5</sub> et les deux protons aromatiques H<sub>10</sub> et H<sub>14</sub> selon la position du groupe phényle dans l'espace.

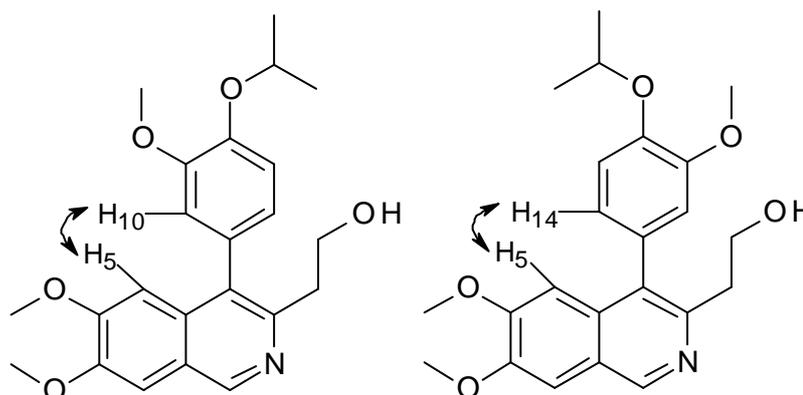
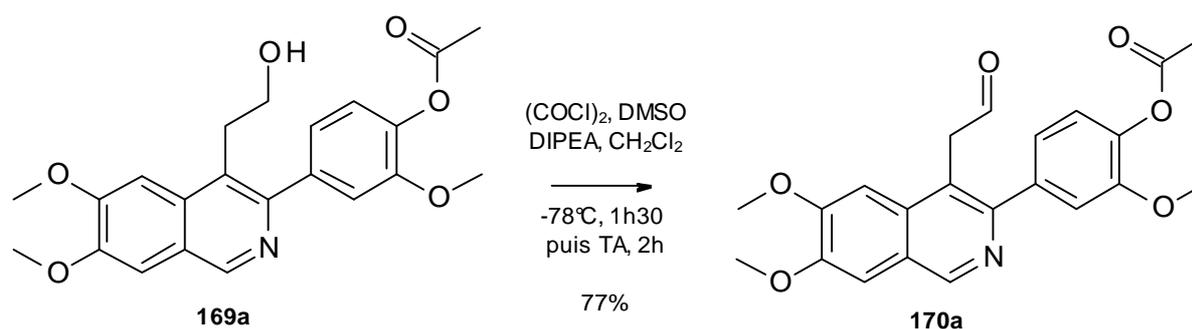


Figure 28 : Corrélation NOESY du composé **169d** permettant d'établir la régiosélectivité de la formation du cycle B

### 2.3.3 Oxydation de l'alcool **169** en aldéhyde **170**

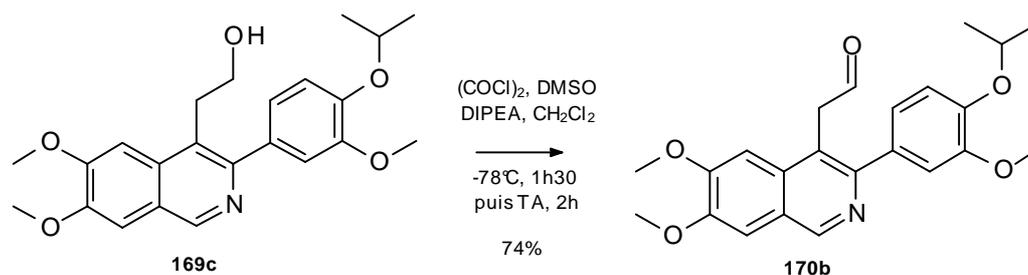


Équation 11 : Oxydation de l'alcool **169a** par les conditions de Swern

L'oxydation du régioisomère **169a** se fait selon les mêmes conditions que lors de la synthèse de la norritidine **34** (Équation 11). La réaction donne le produit **170** correspondant avec de bons rendements. La réaction n'est pas impactée par la présence du groupement protecteur acétyle sur la molécule.

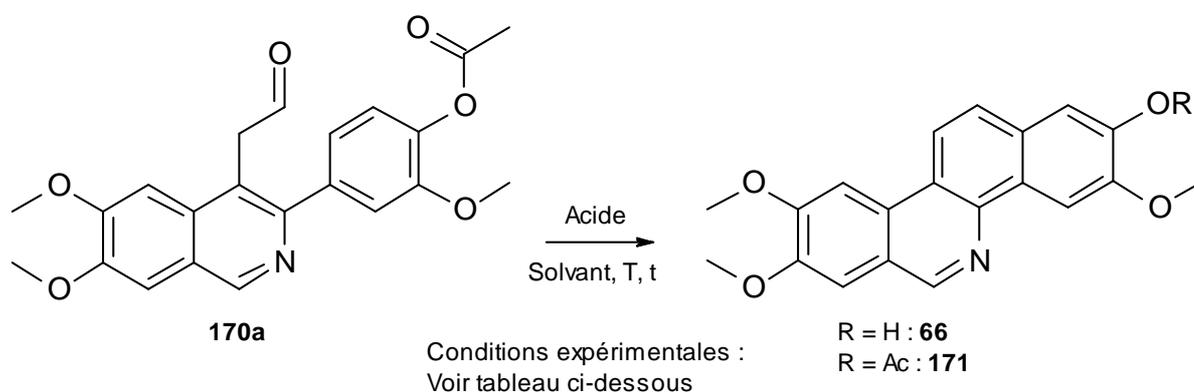
L'oxydation a été menée aussi sur un mélange des deux régioisomères **169a** et **169b** et l'on remarque que lors de cette réaction le régioisomère **169a** s'oxyde plus rapidement que le régioisomère **169b**.

L'oxydation du composé **169c** ne pose aucun problème et le groupement isopropyle ne change ni les conditions réactionnelles ni le rendement (Équation 12).



Équation 12 : Oxydation de l'alcool **169c** par les conditions de Swern

### 2.3.4 Synthèse de la norfagaronine



Équation 13 : Synthèse de la norfagaronine **66** et de la norfagaronine acétylée **171**

Selon les conditions expérimentales utilisées pour la synthèse de la norritidine **34**, un mélange des produits **66** et **171** est obtenu (Entrée 1, Tableau 24). Plusieurs essais ont donc été menés afin de trouver des conditions réactionnelles permettant d'obtenir soit la norfagaronine **66**, soit le composé **171**.

Le composé **171** est recherché afin de pouvoir faire des essais de *N*-méthylation sans avoir besoin de protéger le phénol de la norfagaronine **66** à nouveau. Cela permettra aussi de comparer les activités antipaludiques de la norfagaronine **66** avec et sans protection.

Des essais en changeant la température de réaction (Entrée 2 et 4, Tableau 24) ainsi que la force de l'acide de Brønsted (Entrée 3 et 4, Tableau 24) utilisé ont permis de trouver des conditions d'obtention de la norfagaronine **66** avec d'excellents rendements (Entrée 2, Tableau 24). D'autres acides tels que le TFA,<sup>140, 141</sup> l'acide méthanesulfonique<sup>141, 142</sup> ou l'acide polyphosphorique<sup>141, 143-145</sup> ont été envisagés mais non testés au vu des résultats obtenus avec le HBr 40% au reflux de l'acide acétique.

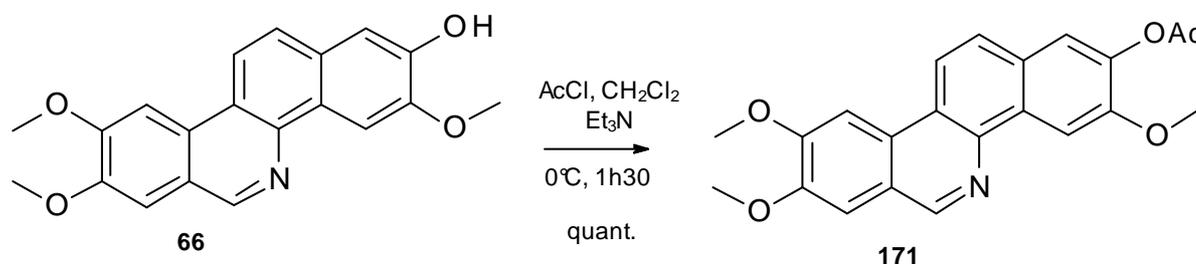
Afin d'obtenir le composé **171**, des essais de cyclisation en conditions aprotiques avec des acides de Lewis ou la résine amberlyst 15 ont été étudiés.<sup>141, 146</sup> Seuls le  $\text{FeCl}_3$  (Entrée 5, Tableau 24) et la résine Amberlyst (Entrée 6, Tableau 24) ont été testés mais n'ont pas fourni le composé **171** voulu avec des rendements ainsi qu'une sélectivité intéressants.

Tableau 24 : Conditions réactionnelles étape de cyclisation en milieu acide

Entrée	Acide	Solvant	Conditions	Rendement (%)		
				170	66	171
1	HBr 40%	Acide acétique	TA, 1h	traces	39	34
2	HBr 40%	Acide acétique	reflux	—	90	traces
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide acétique	TA, 1h	traces	30	25
4	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide acétique	reflux	—	75	traces
5	FeCl <sub>3</sub>	Trichloroéthane	100°C, 1h	54	21	15
6	Amberlyst 15	Trichloroéthane	100°C, 2h	76	—	13

Des conditions expérimentales ont été trouvées pour obtenir la norfagaronine **66** mais le produit **171** n'est obtenu que dans des faibles quantités et avec une pureté qui n'est pas satisfaisante malgré les différents essais.

### 2.3.5 Synthèse de la norfagaronine acétylée **171**



Équation 14 : Synthèse de la norfagaronine acétylée **171** à partir de la norfagaronine **66**

Afin d'obtenir le composé **171**, une acétylation de la norfagaronine **66** est réalisée (Équation 14). Cette réaction fournit le produit **171** assez rapidement avec un rendement quantitatif et sans aucun problème.

Les conditions de cyclisation en milieu acide de l'aldéhyde **170a** sans perte du groupement protecteur n'étant pas satisfaisantes, la norfagaronine acétylée est obtenue à partir de **170a** en deux étapes. Le rendement global des deux réactions est de 90% et le produit obtenu est d'une pureté satisfaisante.

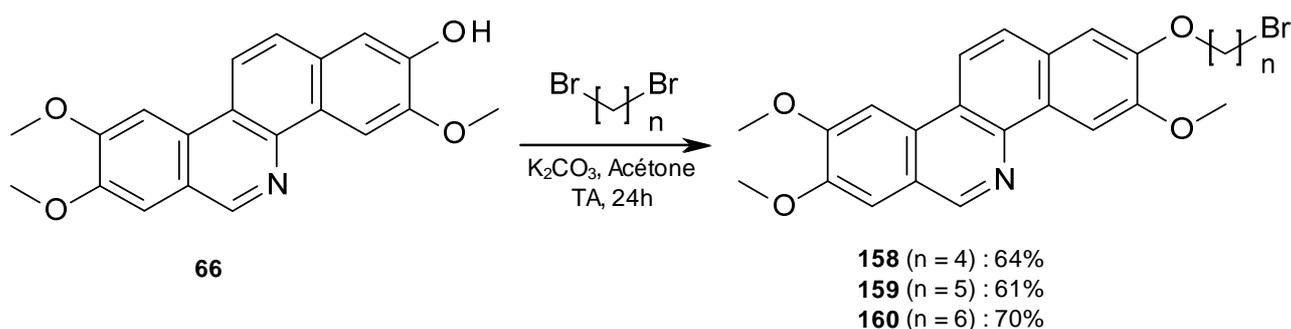
## 2.4 Dérivés de la Fagaronine et de la Norfagaronine

### 2.4.1 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie A

La stratégie de synthèse adoptée ici correspond à celle exposée précédemment (Schéma 23).

La première étape consiste à *O*-alkyler la norfagaronine **66** par des chaînes dibromoalcanes. Cette étape permet d'obtenir les composés **158** à **160** et de protéger le phénol de la norfagaronine **66** pour la seconde étape. Celle-ci consiste en la *N*-méthylation des composés **158** à **160** donnant les composés **161** à **163**. Cette étape permet de quaternariser la norfagaronine **66** et de conférer aux composés obtenus le groupe méthyle nécessaire aux activités biologiques des benzo[*c*]phénanthridines. La dernière étape de cette synthèse est la substitution de l'atome de brome terminal par la diéthylamine fournissant les composés **148** à **150**. Cette étape est envisagée en dernier en raison de la forte réactivité des amines vis-à-vis des agents méthylyants.

### 2.4.2 *O*-alkylation de la norfagaronine **66**



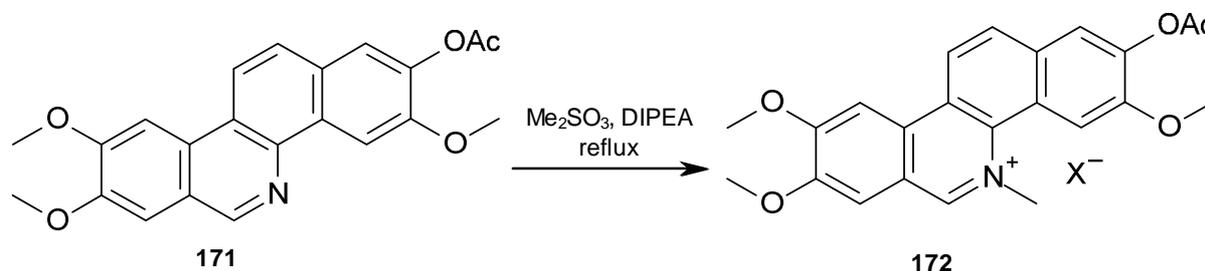
Équation 15 : *O*-alkylation de la norfagaronine

Les *O*-alkylations de la norfagaronine **66** se font sans aucun problème dans des conditions classiques d'alkylation de phénols (Équation 15).<sup>82, 106, 147-151</sup>

Les composés sont isolés après filtration du milieu réactionnel et ensuite purifiés par simple rinçage du brut réactionnel au cyclohexane et obtenus avec des rendements tout à fait corrects variant de 60% à 70%.

### 2.4.3 *N*-méthylation des composés **171** et **66**

La méthylation des composés **158** à **160** est l'étape suivante. Les premiers essais de méthylation sont réalisés sur le composé **171** disponible en plus grande quantité.



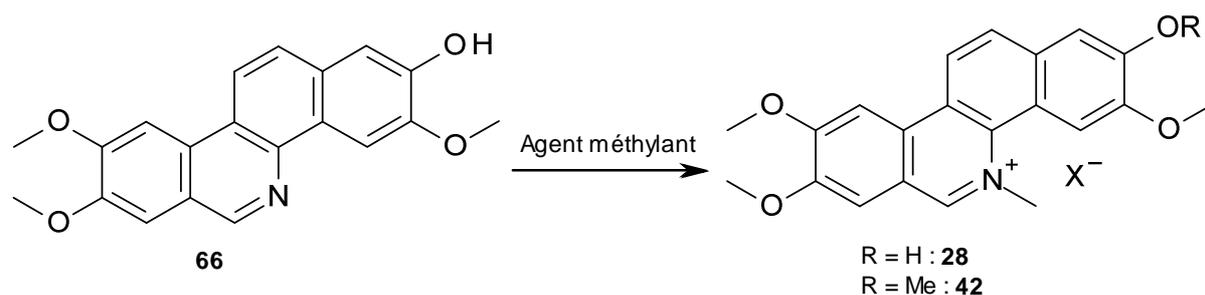
Équation 16 : *N*-méthylation de la norfagaronine acétylée **171**

Un essai est mis en œuvre avec le  $\text{MeSO}_3\text{Me}$  et une base de type amine tertiaire (DIPEA) selon les modes opératoires décrits.<sup>77, 88, 105, 106</sup> Des essais sans DIPEA ont été aussi réalisés car des problèmes d'élimination de la DIPEA ont été rencontrés lors du traitement de la réaction. Les conditions de réaction sans DIPEA ont permis un meilleur traitement de la réaction et n'empêchent pas la réaction de se faire (suivi par CCM).

Les différents essais de *N*-méthylation réalisés sur le produit **171** n'ont soit pas fonctionné (uniquement du produit de départ en suivi CCM) soit fourni un mélange réactionnel contenant plusieurs produits (essai sans DIPEA). Ceux-ci ont été séparés et purifiés avec difficulté mais n'ont pas été caractérisés en raison des faibles quantités obtenues.

Le groupement acétate peut gêner la *N*-méthylation. En effet, une dégradation de celui-ci n'est pas improbable.

Afin de vérifier que la *N*-méthylation est bien possible des essais sont lancés sur la norfagaronine **66**, même si la 5-méthyl-2,3,8,9-tetraméthoxybenzo[*c*]phénanthridine **42** peut être formée.



Équation 17 : Méthylation de la norfagaronine **65**

Les conditions réactionnelles utilisées pour les différents essais de méthylation sont regroupées (Tableau 25).

**Tableau 25 : Essais de méthylation de la norfagaronine 66. Conditions réactionnelles**

Entrée	Agent méthylant	Eq.	T (°C)	temps	solvant	conclusion
1	MeSO <sub>3</sub> Me	25	180	24h		dégradation
2	MeSO <sub>3</sub> Me	25	180 sous pression	4h		49 % de rendement
3	MeSO <sub>3</sub> Me	50	180 sous pression	12h		14 % de rendement
4	4-nitrobenzènesulfonate de méthyle	2	Reflux	1h	Toluène	Pas de solubilisation
5	4-nitrobenzènesulfonate de méthyle	2	Reflux	1h	Toluène + Chlorobenzène	Pas de solubilisation
6	4-nitrobenzènesulfonate de méthyle	2	Reflux	4h	Toluène + Nitrobenzène	Pas de solubilisation
7	CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> Me	3	Reflux	24h	Dichloroéthane	Pas de réaction

Des premiers essais de *N*-méthylation ont été lancés sur la norfagaronine **66** avec le MeSO<sub>3</sub>Me sans DIPEA (Équation 17). La fagaronine **28** est obtenue avec un rendement maximal de 49% et la méthylation sur le phénol n'a pas lieu, ce qui est dû vraisemblablement à l'emploi de conditions réactionnelles non basiques.

Des nouveaux essais ont été réalisés avec d'autres agents méthylants : le 4-nitrobenzènesulfonate de méthyle (un analogue du 2-nitrobenzènesulfonate)<sup>73, 100-102</sup> et le CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Me.<sup>103</sup> Ces essais ont été réalisés avec le plus grand soin car le CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Me est très toxique et volatil. Le 4-nitrobenzènesulfonate de méthyle est solide et a posé problème en raison de sa faible dissolution dans les solvants utilisés pour les essais (toluène + nitrobenzène). De plus, la norfagaronine **66** n'est pas non plus soluble dans ces solvants.

La réalisation de la *N*-méthylation de la norfagaronine **66** à l'aide de MeSO<sub>3</sub>Me sans solvant dans un tube scellé reste la meilleure option même si le rendement reste moyen.

Le groupement acétyle ayant été remis en question lors des essais de *N*-méthylation du composé **171**, des essais avec un groupement protecteur isopropyle sont envisagés. Cependant, l'isopropylation de la norfagaronine **66** fournissant un mélange de deux composés avec de faibles rendements, cet essai n'a pas été réalisé.

#### 2.4.4 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie B

En raison des difficultés rencontrées pour obtenir la fagaronine **28** à partir de la norfagaronine **66** via la *N*-méthylation, une nouvelle stratégie de synthèse a été élaborée à partir du composé **169a** (Schéma 25). La méthylation des isoquinolines est largement décrite dans la littérature et se fait sans problème. Deux possibilités de synthèse à partir du composé **169** sont envisageables : tout d'abord la méthylation du composé **169** donnant le composé **173** puis l'oxydation de ce dernier afin d'obtenir le composé **174** ou alors la stratégie inverse qui consiste à oxyder le produit **169** en composé **170** puis de méthyler ce dernier pour fournir le composé **174**.

Une fois le composé **174** obtenu, une cyclisation en milieu acide reste envisageable afin de synthétiser la fagaronine **28**.

Les essais de synthèse seront d'abord lancés sur la *N*-méthylation du composé **169a** ainsi que l'oxydation du composé méthylié **173** obtenu. Si cette voie pose problème, la seconde voie sera testée.

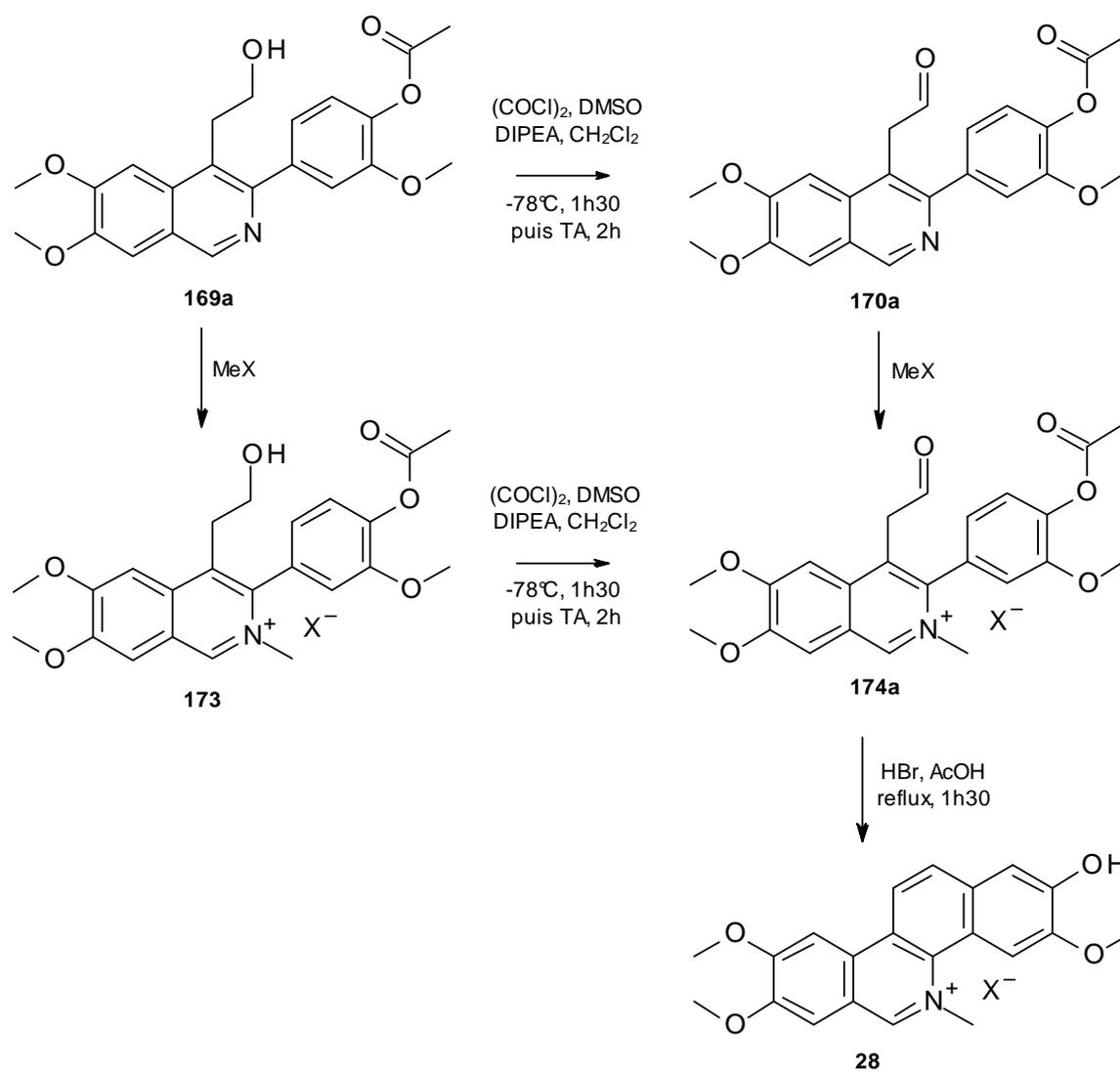
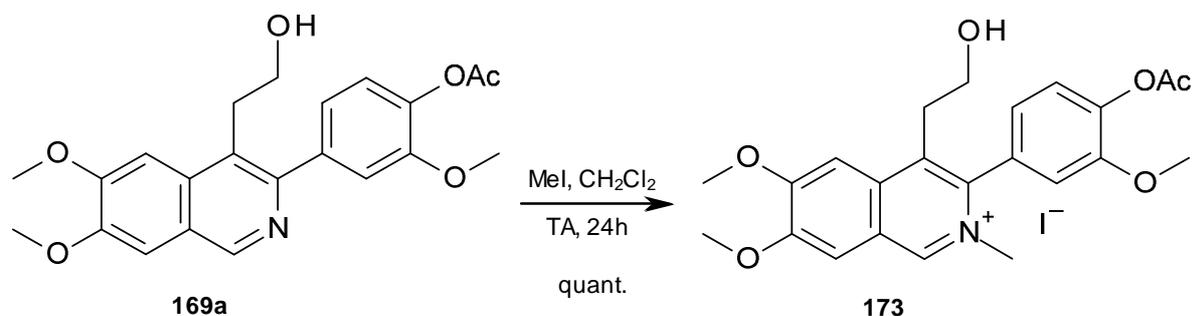


Schéma 25 : Nouvelle stratégie d'obtention de la fagaronine 28

## 2.4.5 Synthèse de la fagaronine

### 2.4.5.1 Méthylation de l'alcool 169a

Cette étape consiste en la *N*-méthylation du composé **169a**. Ce composé est une isoquinoline classique et l'agent méthylyant le plus fréquemment utilisé dans ce cas est le MeI dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à température ambiante pendant 24h.<sup>152-154</sup>

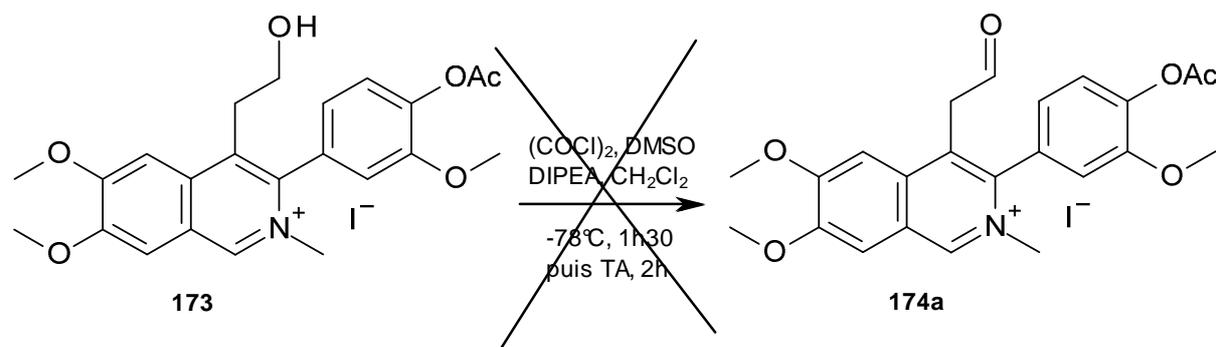


Équation 18 : *N*-méthylation du composé 169a

Cette réaction donne le composé méthylyé **173** avec un rendement quantitatif.

### 2.4.5.2 Oxydation de l'alcool méthylyé 173

Après avoir méthylyé le composé **169a** sans problème, le but est d'oxyder le produit obtenu. Le composé **169a** s'oxyde très bien dans les conditions de Swern mais la présence de l'isoquinolinium peut poser problème pour l'oxydation de l'alcool.



Équation 19 : Essai d'oxydation de swern du composé 173

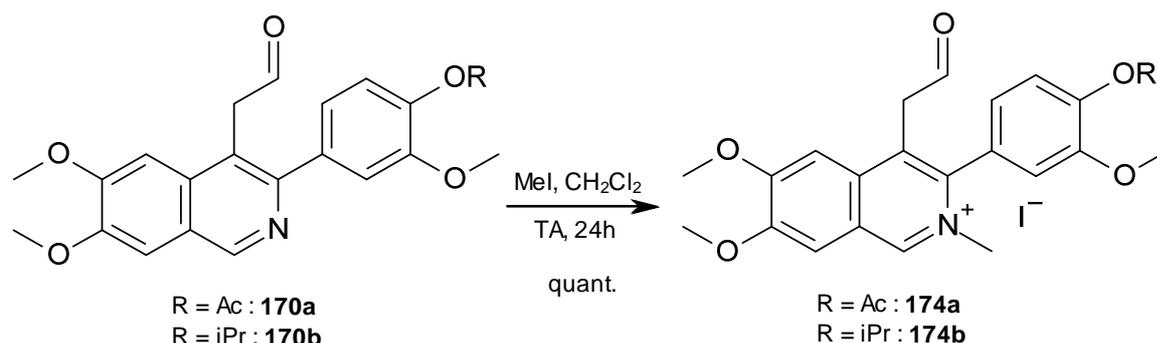
Les essais d'oxydation de l'alcool **173** ont été menés selon le même mode opératoire que pour l'oxydation de l'alcool **169a**.

Le mélange réactionnel de l'oxydation est composé de plusieurs produits difficiles à séparer en raison de leur forte polarité. Ces produits sont obtenus en trop faibles quantités et pas assez purs pour une caractérisation. Il y a manifestement un problème de réactivité potentiellement dû au motif isoquinolinium électrophile dans des conditions de Swern générant des intermédiaires nucléophiles.

L'oxydation du composé **173** selon les conditions de Swern n'aboutissant pas à l'obtention du composé **174a**, la seconde voie passant d'abord par l'oxydation du composé **169a** puis par sa méthylation est étudiée.

### 2.4.5.3 Méthylation de l'aldéhyde 170

L'oxydation du composé **169a** se fait sans problème selon les conditions décrites précédemment. Il s'agit maintenant de *N*-méthyle l'aldéhyde **170a** afin d'obtenir le composé **174a**.



Équation 20 : *N*-méthylation du régioaldéhyde **170a**

Cette *N*-méthylation se fait selon les mêmes conditions que pour la *N*-méthylation de l'alcool **169a** : MeI dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à température ambiante pendant 24h.<sup>152-154</sup>

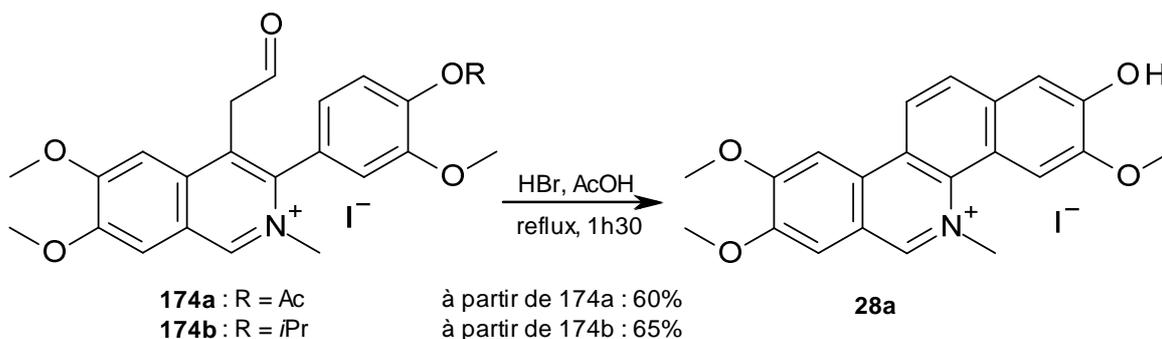
Le composé **174a** est obtenu sans aucun problème via la *N*-méthylation de l'aldéhyde **170a** avec des rendements quantitatifs. Le produit brut est d'une pureté satisfaisante.

Une fois l'obtention du composé **174a** mise au point, le même protocole a été lancée afin d'obtenir le composé **174b**.

Le groupement protecteur isopropyle ne change pas la réaction et celle-ci fournit le composé **174b** à partir de l'aldéhyde **170b** de façon quantitative.

#### 2.4.5.4 Cyclisation acide de l'aldéhyde méthylé 174

Afin d'obtenir la fagaronine **28** à partir des composés **174a** et **174b** une cyclisation en milieu acide est lancée. Cette cyclisation est lancée selon les mêmes conditions que précédemment qui ont permis de synthétiser la norfagaronine **66**. La réaction sera suivie par CCM pour la mise au point de la température et du temps de chauffage.



Équation 21 : Cyclisation en milieu acide. Obtention de la fagaronine **28**

La réaction se fait sans problème dans les mêmes conditions de temps et de température pour de petites quantités, de l'ordre de quelques dizaines de milligrammes. Pour des quantités plus importantes, de l'ordre de quelques centaines de milligrammes, le temps réactionnel nécessaire doit être augmenté à 3h de chauffage au reflux de l'acide acétique.

Le traitement de la réaction nécessite une mise au point par rapport au protocole utilisé pour la norfagaronine **66**, qui était extraite du milieu réactionnel après neutralisation de celui-ci à pH = 8 et extraction de la phase aqueuse obtenue par un solvant organique. La fagaronine **28** étant très peu soluble en milieu aqueux comme dans la plupart des solvants organiques, un autre protocole devait être mis au point. Le milieu est donc neutralisé et chromatographié sur une résine XAD-7 pour séparer les sels de la neutralisation de la fagaronine **28**. Cette méthode est intéressante pour de petites quantités de fagaronine **28** mais est assez fastidieuse pour des quantités plus importantes. De plus, cela ne permet pas d'obtenir la fagaronine **28** avec une bonne pureté et une purification supplémentaire est requise.

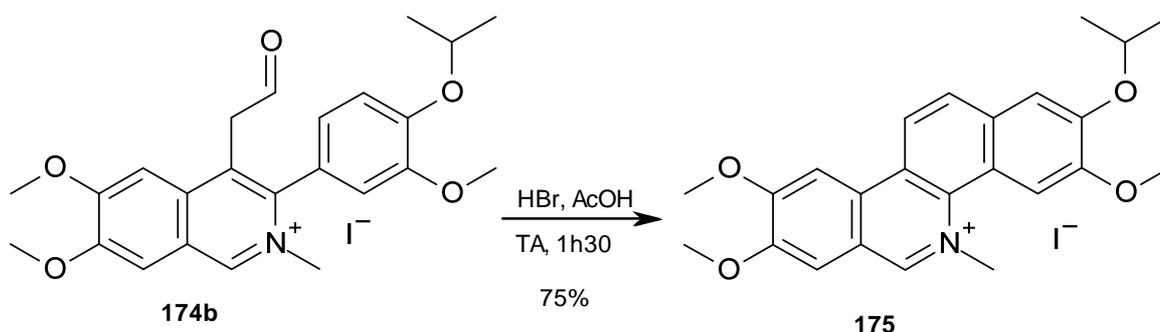
Des essais de purification de la fagaronine **28** sont réalisés par chromatographie sur gel de silice en phase inverse ou purification par chromatographie de partage centrifuge. Ces différentes méthodes ne permettent pas d'obtenir la fagaronine **28** pure avec de bons rendements de purification. Une purification de la fagaronine **28** à partir du mélange réactionnel par précipitation dans le MeOH a finalement donné les meilleurs résultats.

Le protocole de purification finalement retenu a été une simple filtration du milieu réactionnel suivie du rinçage du précipité à l'eau. Ce précipité est ensuite recristallisé dans le méthanol pour donner l'iodure de fagaronine **28** avec un rendement de 40% à partir de **174a** et de 34% à partir de **174b**. Le filtrat méthanolique est composé majoritairement d'un mélange de iodure et de bromure de fagaronine (analyse par spectrométrie de masse).

Cette réaction permet d'obtenir la fagaronine **28** de façon simple et l'optimisation du traitement et de la purification de la réaction permet de l'obtenir pure avec des rendements moyens et ce quelque soit le groupement protecteur utilisé (acétyle ou isopropyle). Un rendement plus important en iodure de fagaronine peut être espérer en utilisant HI au lieu de HBr dans la réaction.

### 2.4.5.5 Obtention de la fagaronine isopropylée 175

Un essai a été lancé afin d'obtenir la fagaronine isopropylée à partir de l'aldéhyde **174b** (Équation 22).



Équation 22 : Cyclisation en milieu acide. Obtention de la fagaronine isopropylée 175

Afin d'obtenir la fagaronine isopropylée **175**, l'aldéhyde **174b** est mis en réaction avec de l'acide bromhydrique. Le mélange n'est pas chauffé pour éviter la déprotection du phénol. La réaction est rapide et fournit la fagaronine isopropylée **175** avec de bons rendements.

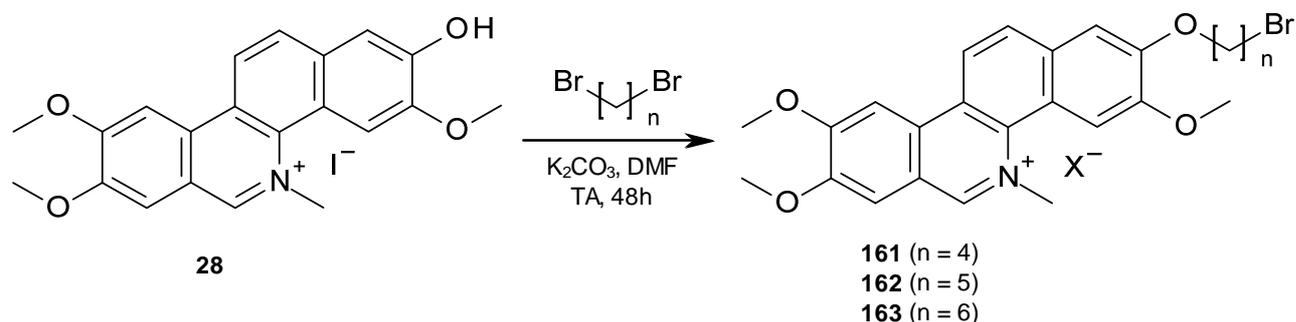
### 2.4.6 Synthèse des dérivés de la fagaronine

A partir de la fagaronine **28** il faut alkyler celle-ci sur l'atome d'oxygène porté par C-2 puis substituer le brome par la diéthylamine. Ces deux types de réactions sont des réactions classiques et ne posent aucun problème en théorie. Les premiers essais de réactions sont toutefois menés sur de petites quantités de produits afin de mettre au point le protocole à appliquer aux benzo[c]phénanthridines.

#### 2.4.6.1 O-alkylation de la fagaronine

Ces réactions sont lancées selon le mode opératoire utilisé pour la O-alkylation de la norfagaronine **66** : avec un excès de dibromoalcane, du  $K_2CO_3$  dans de l'acétone à température ambiante pendant 24h.<sup>82, 106, 146-151</sup>

Après avoir remarqué que la fagaronine **28** n'est pas soluble dans l'acétone, un solvant susceptible de dissoudre la fagaronine **28** a été recherché. Le DMF est le meilleur solvant pour dissoudre la fagaronine **28** et est un bon solvant permettant les alkylations.



**Équation 23 : O-alkylation de la fagaronine 28**

Des précautions sont à prendre en raison de l'instabilité de la fagaronine **28** en milieu basique. Le traitement se fait par acidification du milieu et lavage pour éliminer l'agent alkylant en excès. La réaction a été menée avec le dibromobutane et le brut réactionnel est en cours de purification afin de déterminer par RMN et spectrométrie de masse le produit obtenu.

En conclusion, la fagaronine est obtenue selon une synthèse adaptée de Luo. Deux groupements protecteurs ont été utilisés afin de débiter la synthèse : acétyle et isopropyle. La protection avec le groupement acétyle permet d'obtenir un rendement global de 15% tandis que la protection isopropyle permet d'obtenir un rendement global de 16%. Les rendements sont similaires pour les deux protections utilisées.

La protection avec un groupement isopropyle augmente la sélectivité de l'étape de cyclisation en faveur du composé voulu **169c** mais en revanche fait baisser le rendement de la réaction par rapport à la protection par un groupe acétyle.

La synthèse des dérivés de la fagaronine est en cours et les essais de O-alkylations de la fagaronine sont encourageants.

## 2.5 Dérivés de la Nitidine

### 2.5.1 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie A

Une fois la nornitidine **34** obtenue, l'objectif est de synthétiser des dérivés *N*-alkylés. Le but est de remplacer le groupe méthyle de la nitidine **22** par des chaînes aminoalkyles de longueur variable et ressemblant à la chaîne aminoalkyle de la chloroquine **12**.

Le but est donc de partir de la nornitidine **34** obtenue précédemment sans problème et d'obtenir les dérivés grâce à deux étapes : la *N*-alkylation de la nornitidine **34** puis la substitution du brome par la diéthylamine (Schéma 26).

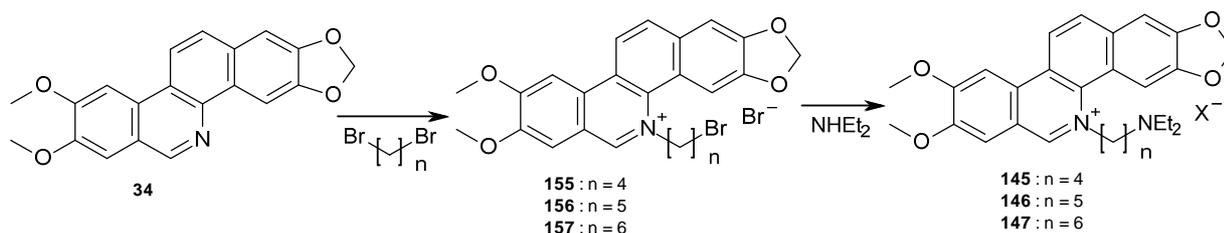
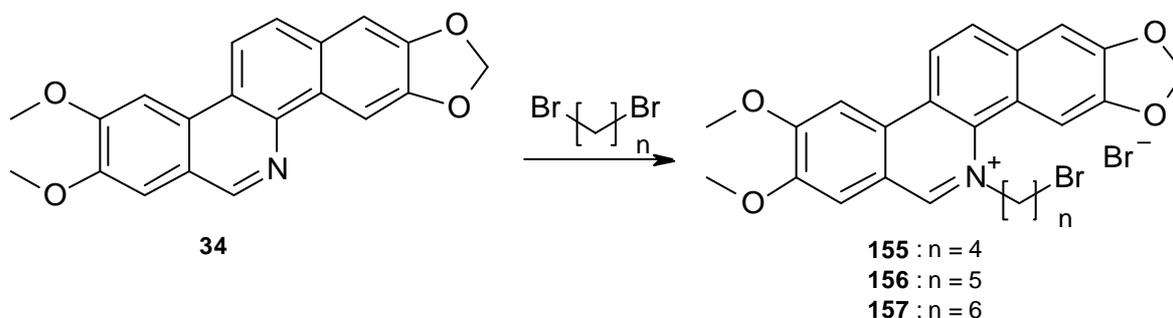


Schéma 26 : Stratégie de synthèse des dérivés de la nitidine 22

### 2.5.2 *N*-alkylation de la nornitidine

Afin de mettre au point le protocole de *N*-alkylation de la nornitidine **34**, les premiers essais ont été menés avec le dibromobutane (Équation 24).



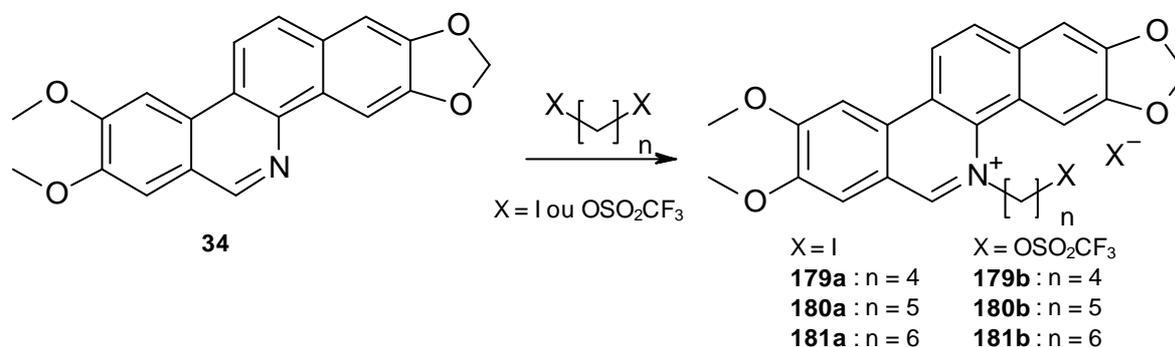
Équation 24 : *N*-alkylation de la nornitidine 34 avec les dibromoalcanes

Malgré de nombreux essais de butylation de la nornitidine **34** à l'aide du dibromobutane (Tableau 26) la réaction ne fournit qu'un mélange de nornitidine **34** et de dibromobutane.

Tableau 26 : Essais de *N*-alkylation avec le dibromobutane

Quantité	Solvants	Température	Temps
5 eq	ACN	reflux	24h
5 eq	ACN + DMF	reflux de l'ACN	24h
5 eq	CHCl <sub>3</sub>	reflux	48h
15 eq	CHCl <sub>3</sub>	reflux	48h
15 eq		60°C	24h

Suite aux échecs des essais avec le dibromobutane, d'autres produits alkylant sont recherchés. Des essais ont été menés à l'aide du diiodobutane préalablement synthétisé ainsi qu'avec un ditriflate issu de la réaction avec le butanediol (Équation 25).



Équation 25: *N*-alkylation de la nornitidine **34** avec le diiodobutane ou le ditriflate de butanediol

Ces essais ne se sont pas révélés concluants et ont fourni un mélange de nornitidine **34** avec l'agent alkylant utilisé (Tableau 27). Il convient de trouver une nouvelle stratégie afin de synthétiser les dérivés voulus de la nitidine **22**.

Tableau 27 : Essais de *N*-alkylation avec le diiodobutane ou le ditriflate de butanediol

Agent alkylant	Quantité	Solvants	Température	Temps
diiodobutane	15 eq		80°C	24h
diiodobutane	15 eq		80°C	48h
diiodobutane	5 eq	CHCl <sub>3</sub>	reflux	48h
triflate de diol	1,1 eq	Nitrobenzène	TA	24h
triflate de diol	5 eq	Nitrobenzène	TA	24h
triflate de diol	5 eq	Nitrobenzène	100°C	24h
triflate de diol	5 eq	Nitrobenzène + Xylène	TA	48h
triflate de diol	5 eq	Nitrobenzène + Xylène	150°C sous pression	48h

## 2.5.3 Stratégie de synthèse des dérivés : Voie B

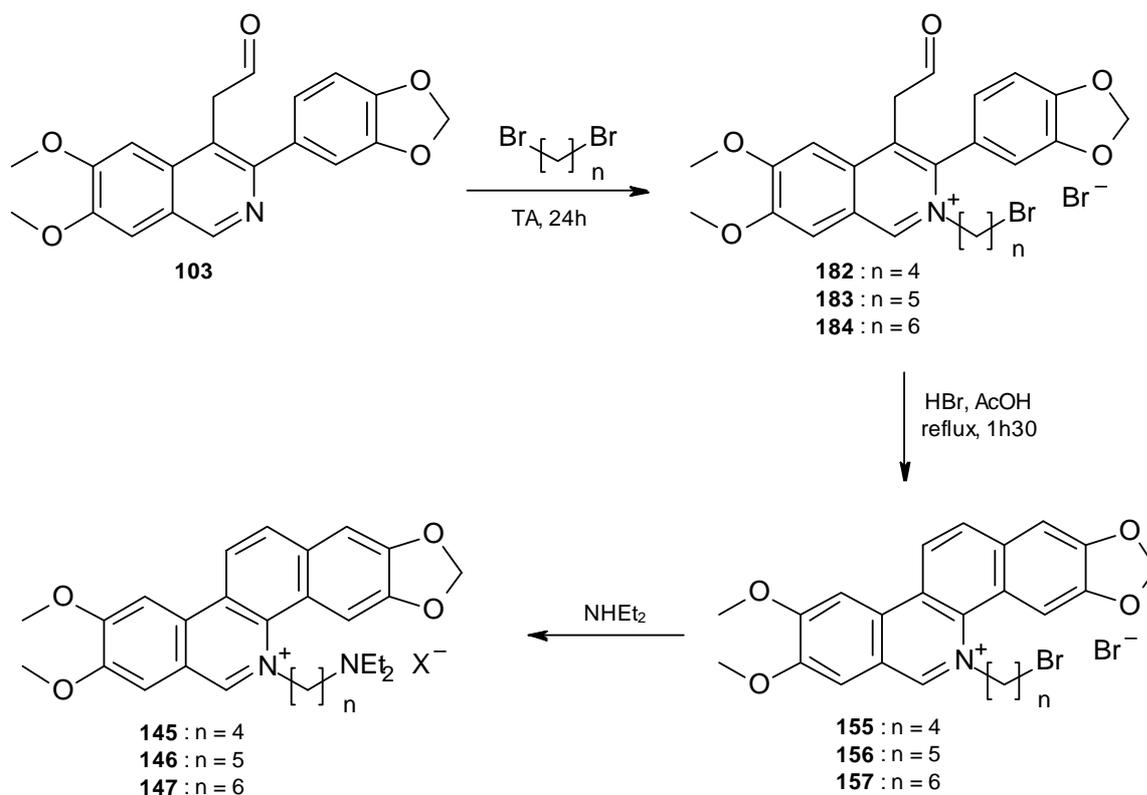


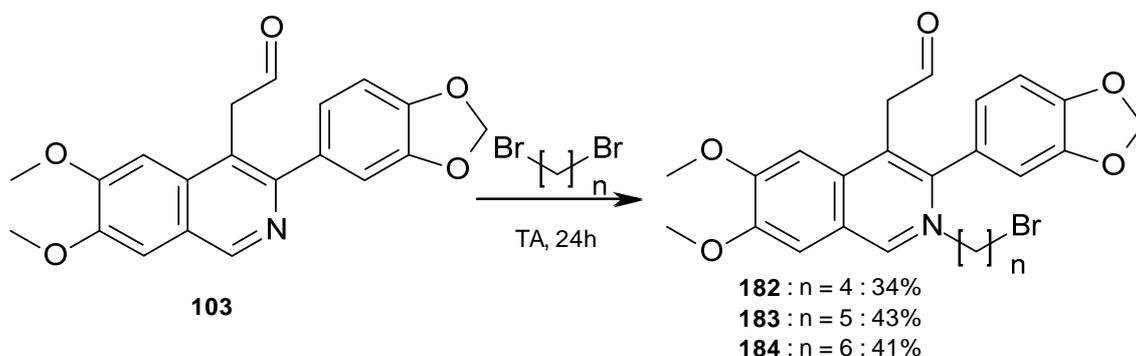
Schéma 27 : Nouvelle stratégie d'obtention des dérivés de la nitidine

Suite au changement de stratégie pour la synthèse des dérivés de la fagaronine **28** et au succès rencontré grâce à cette nouvelle stratégie, la synthèse pour les dérivés de la nitidine **22** est adaptée selon le même type de synthèse (Schéma 27). L'agent méthylation nécessaire pour l'obtention de la fagaronine **28** est remplacé par les différents agents alkylants nécessaires pour obtenir les trois dérivés voulus. Les essais sont menés avec les agents alkylants bromés.

## 2.5.4 Synthèse des dérivés de la nitidine

### 2.5.4.1 *N*-alkylation du régioaldéhyde **103**

Le but de cette étape est de *N*-alkyler le composé **103** afin d'obtenir les dérivés *N*-alkylés **182** à **184** à l'aide des dibromoalcanes correspondants (Équation 26).



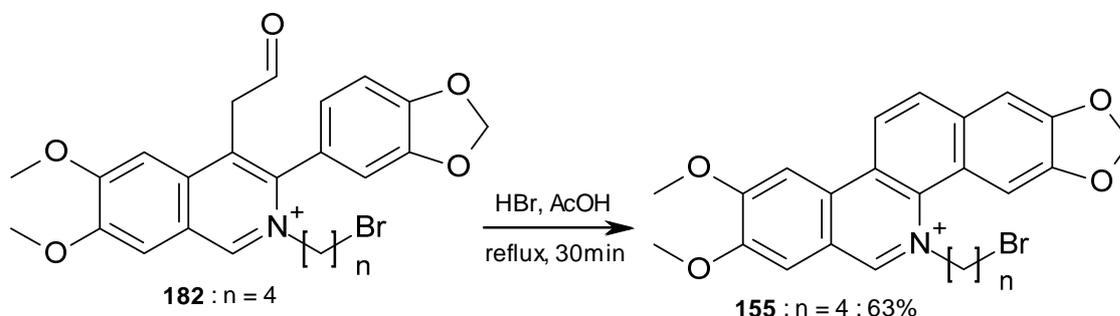
Équation 26 : *N*-alkylation de l'aldéhyde **103**

Le protocole de *N*-alkylation de l'aldéhyde **103** est tout d'abord mis au point avec le dibromobutane. Le premier essai se fait au reflux du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pendant 72h. Le rendement de 34% est moyen et la réaction peut-être améliorée. On obtient néanmoins suffisamment de produit **182** pour continuer la synthèse. Les réactions de *N*-alkylation avec le dibromopentane et le dibromohexane fournissent les composés **183** et **184** voulus avec un rendement légèrement supérieur à la *N*-bromobutylation.

L'optimisation des étapes suivantes se fera sur le composé **182** celui-ci étant obtenu en plus grande quantité.

### 2.5.4.2 Cyclisation en milieu acide des aldéhydes *N*-alkylés

Cette étape permet la cyclisation des composés **182** à **184** afin d'obtenir les dérivés bromés de la nitidine **155** à **157** (Équation 27).



Équation 27 : Obtention des dérivés bromés de la nitidine

Les essais de cyclisation en milieu acide fournissent les composés voulus avec des rendements corrects. La réaction se fait donc en conditions acides mais le reflux est arrêté rapidement pour éviter la dégradation du produit de départ.

Le composé **155** est assez sensible à l'hydrolyse et des précautions doivent être prises lors de son stockage (stockage au frigo sous atmosphère inerte).

A l'heure actuelle, les essais de réaction n'ont pas permis d'obtenir suffisamment de composé **155** pour continuer la synthèse et commencer les essais de substitution du brome par la diéthylamine.

### 3 Propriétés antipaludiques, cytotoxiques et leishmanicides

#### 3.1 Tests antipaludiques *in vitro*

##### 3.1.1 Fagaronine, dérivés et intermédiaires

##### 3.1.1.1 Fagaronine **28** et dérivés

L'activité de la fagaronine **28** est évaluée sur plusieurs souches de *P. falciparum* afin d'étudier l'influence de la chloroquino-résistance des souches sur l'activité de la fagaronine **28** (Tableau 28).

Tableau 28 : Activité de la fagaronine sur *P. falciparum*

	IC <sub>50</sub> (nM)	
	Fagaronine	Chloroquine
FcB1	5,8 ± 3,8	89
FcM29	11,1 ± 5,5	
3D7	5,2 ± 1	34,4 ± 6

FcB1 : souche chloroquino-résistante, 3D7 : souche chloroquino-sensible, FcM29 : souche chloroquino-résistante intermédiaire.

Nos résultats sur 3D7 sont plus prometteurs que ceux trouvés par Kassim et al.<sup>68</sup> puisque la fagaronine **28** possède dans ce cas une activité de 37,7 nM tandis que nos tests ont permis de déterminer une activité 10 fois plus élevée (5,2 nM). La différence entre les deux échantillons de fagaronine **28** testée vient du fait que Kassim a extrait la fagaronine de *Fagara zanthoxyloides* tandis que la fagaronie **28** testée dans notre laboratoire est synthétique.

La fagaronine **28** montre une très bonne activité antipaludique *in vitro* sur *P. falciparum*. Ces activités sont suffisamment intéressantes pour qu'un test antipaludique *in vivo* sur des souris soit envisagé pour la fagaronine **28** ainsi qu'une étude d'affinité de l'hème et de colocalisation dans le parasite.

La cytotoxicité de la fagaronine **28** a été évaluée (Tableau 29) et les résultats montrent une toxicité moindre de la fagaronine **28** sur VERO.

Tableau 29 : Activité cytotoxique de la fagaronine

	IC <sub>50</sub> (μM)
VERO	> 21

Grace aux valeurs trouvées pour la fagaronine **28a**, des indices de sélectivité (IS) peuvent être calculés :

Tableau 30 : Indices de sélectivité de la fagaronine **28**

IS (VERO/FcB1)	2500
IS (VERO/FcM29)	1400
IS (VERO/3D7)	3500

Les indices de sélectivité montrent deux choses importantes.

La fagaronine **28** possède un très bon indice de sélectivité antipaludique par rapport à sa cytotoxicité. La fagaronine **28** est donc beaucoup efficace sur les parasites du paludisme qu'elle n'est cytotoxique sur cellules saines.

Il est important d'évaluer maintenant l'activité antipaludique *in vivo* de la fagaronine **28** afin de déterminer si la fagaronine **28** peut être utilisée pour combattre le paludisme chez l'homme.

Quelques produits proches de la fagaronine au niveau structural ont été testés sur FcB1 et sur VERO (Tableau 31).

**Tableau 31 : Activités antipaludiques de quelques composés**

Composé	IC <sub>50</sub> (μM)	
	FcB1	VERO
Norfagaronine <b>66</b>	11,6	< 3,0
composé <b>171</b>	6,4	< 2,7
composé <b>175</b>	4,8	

Les activités de la norfagaronine **66** et du composé **171** montrent l'importance du groupe méthyle sur l'atome d'azote aromatique pour l'activité antipaludique. En effet, la quaternarisation de la norfagaronine **66** permet d'augmenter fortement l'activité.

L'activité antipaludique du produit **175** montre une importance certaine du phénol puisque la substitution de l'atome d'hydrogène par un groupement isopropyle fait diminuer l'activité du composé de plusieurs ordres de grandeur. Cette activité est également faible par rapport à l'activité de la nitidine. L'encombrement du groupement substituant le phénol serait alors délétère à l'activité antipaludique.

La norfagaronine **66** et le produit **171** montrent une certaine toxicité sur VERO. Ces résultats permettent de calculer les indices de sélectivité (VERO/FcB1) de ces deux composés. La norfagaronine **66** et le composé **171** ont un indice de sélectivité inférieur respectivement à 0,25 et 0,47. Ces deux composés sont respectivement 4 et 2 fois plus toxiques qu'antipaludiques.

### 3.1.1.2 Intermédiaires de synthèse

Les intermédiaires de synthèse de la fagaronine **28** et de ses dérivés ont été testés sur FcB1 (Tableau 31).

**Tableau 32 : Activités antipaludiques des intermédiaires de synthèse de la fagaronine**

Composés	FcB1 CI <sub>50</sub> (μM)	VERO CI <sub>50</sub> (μM)	IS (VERO/FcB1)
Fagaronine <b>28</b>	5,8 (nM)	> 21	2500
composé <b>169a</b>	67,9	25,2	0,4
composé <b>169b</b>	57,9	65,4	1,1
composé <b>170a</b>	30,4	15,2	0,5
composé <b>173</b>	142,8	>185,4	>1,3
composé <b>174a</b>	10,2	94,9	9,3
composé <b>174b</b>	3,9		
composé <b>158</b>	> 21,3		
composé <b>159</b>	> 20,6		
composé <b>160</b>	> 20,1		

Les intermédiaires de synthèse ne montrent pas des activités très intéressantes mais cela peut nous permettre d'étudier la relation structure-activité.

Les deux régioisomères **169a** et **169b** ont une activité similaire, on en conclut donc que la position du cycle aromatique et de la chaîne éthanol sur l'isoquinoline n'influe pas sur l'activité antipaludique.

L'influence de la N-méthylation de la quinoline reste très variable puisqu'elle diminue l'activité antipaludique du composé **173** par rapport à l'alcool **169a** tandis qu'elle augmente l'activité des composés **174a** et par rapport à celle de l'aldéhyde **170a**. Ces changements d'activités sont toutefois faibles puisque les ordres de grandeurs des activités sont assez similaires.

L'oxydation de l'alcool **169** donnant le composé **170a** permet d'augmenter l'activité antipaludique. Une augmentation significative de l'activité du composé **169a** par la combinaison de l'oxydation de l'alcool et de la N-méthylation de la quinoline donnant le composé **174a** dont la CI<sub>50</sub> est 10 fois moins élevée que celle du composé **169a**.

Ces composés ont aussi été testés sur VERO et leurs indices de sélectivité ont été calculés. Ces composés ne sont pas très antipaludiques et ne sont pas très sélectifs par rapport à leur toxicité.

Trois composés dérivés de la norfagaronine **66** : les composés **158**, **159** et **160** ont été testés sur FcB1 afin de voir si l'ajout d'une chaîne bromoalkyle sur le phénol de la norfagaronine changeait son activité antipaludique. Le composé **158** a montré lors d'un test une activité *in vitro* sur *P. falciparum* intéressante de 1,9 μM malheureusement ce résultat n'a pas pu être confirmé par des tests ultérieurs sur **158**, **159** et **160**. Les composés dérivés de la norfagaronine **66** ayant une chaîne bromoalkyle ne sont pas de meilleurs antipaludiques que celle-ci.

### 3.1.2 Dérivés de la nitidine et intermédiaires de synthèse

Un dérivé bromoalkyl **155** de la nitidine a été testé sur la souche FcB1 de *P. falciparum* afin de voir si un changement de groupement sur l'atome d'azote aromatique permet de voir une différence significative de l'activité antipaludique. L'aldéhyde **103** ainsi que son dérivé, le composé **183** ont été aussi testés. Les deux alcools **102a** et **102b** ont aussi été testés sur FcB1 et VERO (Tableau 33).

Tableau 33 : Activités antipaludiques de composés dérivés de la nitidine

Composés	FcB1 CI <sub>50</sub> (μM)	VERO CI <sub>50</sub> (μM)	SI (VERO/FcB1)
<b>102a</b>	26	11,3	0,4
<b>102b</b>	73,6	175,4	2,4
<b>103</b>	8,5		
<b>183</b>	12,0		
<b>155</b>	0,5		
Nitidine Cl <b>22b</b>	0,7 ± 0,2	23,4 ± 3	33,4

Les activités des deux composés **102** ne sont pas très intéressantes et ceux-ci ne présentent pas d'intérêt antipaludique et leurs indices de sélectivité montrent qu'ils n'ont pas une activité intéressante par rapport à leur toxicité.

L'oxydation de l'alcool **102a** en aldéhyde **103** permet de réduire la CI<sub>50</sub> d'un facteur 10 et donc d'augmenter l'activité antipaludique. Le fait d'ajouter une chaîne bromoalkyle et plus précisément bromopentyle sur l'atome d'azote aromatique de l'aldéhyde **103**, afin d'obtenir le composé **183**, ne change pas l'activité antipaludique. Les activités des composés **103** et **183** sur la souche FcB1 sont similaires.

La cyclisation du composé **183**, permettant d'obtenir le produit **155**, augmente fortement l'activité antipaludique en diminuant la CI<sub>50</sub> d'un facteur 100 malheureusement seul un seul test a été mené sur ces deux composés ne permettant pas de vérifier la reproductibilité des valeurs. Les deux produits n'ont pas été testés sur VERO ne permettant pas de calculer leur index de sélectivité.

### 3.1.3 Comparaison fagaronine / nitidine

La fagaronine **28** a une activité plus importante sur *P. falciparum* que la nitidine **22**, on va étudier les activités de ses dérivés par rapport aux activités des dérivés de la nitidine afin de voir s'il en est de même pour ceux-ci.

Tableau 34 : Comparaison des séries fagaronine et nitidine

Série Fagaronine			Série Nitidine		
Composé	IC <sub>50</sub> (μM)	Indice Sélectivité	Indice Sélectivité	IC <sub>50</sub> (μM)	Composé
Fagaronine <b>28</b>	FcB1 : 5,8 ± 3,8 nM FcM29 : 11,1 ± 5,5 nM	VERO/FcB1 > 3600 VERO/FcM29 > 1900	VERO/FcB1 33,4 VERO/FcM29 49,8	FcB1 : 0,7 ± 0,21 FcM29 : 0,47 ± 0,06	Nitidine <b>22</b>
Fagaronine iPr <b>175</b>	FcB1 : 4,81				
<b>169a</b>	FcB1 : 67,93	VERO/FcB1 0,37	VERO/FcB1 0,43	FcB1 : 26	<b>102a</b>
<b>169b</b>	FcB1 : 57,87	VERO/FcB1 1,13	VERO/FcB1 2,38	FcB1 : 73,57	<b>102b</b>
<b>170a</b>	FcB1 : 30,35	VERO/FcB1 0,5		FcB1 : 8,54	<b>103</b>
<b>174a</b>	FcB1 : 10,24	VERO/FcB1 9,27			
<b>174b</b>	FcB1 : 3,92				
				FcB1 : 12,04	<b>183</b>
				FcB1 : 0,49	<b>155</b>

La fagaronine **28** est très active comparée à la nitidine **22** (100 fois plus) ce qui avait déjà été remarqué. L'activité du composé **175** sur FcB1 permet de poser l'hypothèse de l'importance du phénol dans l'activité de la fagaronine **28**. En effet, la nitidine **22** ne possède pas de phénol et la fagaronine perd son activité lorsqu'elle est isopropylée.

Les alcools **102a** et **169a** sont les deux régioisomères voulus lors de la cyclisation au nickel. On remarque que leurs activités sur FcB1 ainsi que leurs indices de sélectivité ne sont pas bons. En effet, les alcools **102a** et **169a** possèdent des indices inférieurs à 1 et sont donc plus toxiques qu'antipaludiques.

Les alcools **102b** et **169b** ont des activités similaires à leurs homologues **102a** et **169a**. Leurs sélectivités sont toutefois meilleures car leurs indices sont supérieurs à 1 mais la sélectivité ne permet pas d'en faire des composés intéressants.

L'aldéhyde **103** possède une activité légèrement plus importante que l'aldéhyde **170a** mais ces deux composés ne sont pas très antipaludiques. L'aldéhyde **170a** ne possède pas non plus une bonne sélectivité antipaludique.

## 3.2 Tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses in vitro

Les tests de cytotoxicité des différents composés ont été menés sur la lignée cellulaire MCF7. Cette lignée cellulaire est une lignée de cellules tumorales mammaires.

Les tests cytotoxiques ont été menés sur plusieurs composés. Certains composés qui n'ont pas montré d'activité antipaludique n'ont pas fait l'objet de tests cytotoxiques.

### 3.2.1 Fagaronine et dérivés

L'activité sur cellules cancéreuses de la fagaronine **28** est déterminée.

**Tableau 35 : Activité cytotoxique de la fagaronine sur cellules cancéreuses**

	IC <sub>50</sub> (μM)
MCF7	9,22

La fagaronine **28** montre une activité sur cellules cancéreuses MCF7 modérée.

Les activités de certains composés proches de la fagaronine **28** sont évaluées (Tableau 36).

**Tableau 36 : Activité cytotoxique de quelques composés sur cellules cancéreuses**

Composés	Souches	CI <sub>50</sub> (μM)
	MCF7	
Norfagaronine <b>66</b>		< 2,98
composé <b>171</b>		4,5
composé <b>169a</b>		55,35
composé <b>169b</b>		35,22
composé <b>170a</b>		12,64
composé <b>173</b>		>185,40
composé <b>174a</b>		63,27

Les composés testés ne sont pas très actifs sur la souche MCF7.

Seule l'activité de la norfagaronine **66** mériterait d'être déterminée avec plus de précision afin d'évaluer réellement son activité sur les cellules cancéreuses MCF7.

Il est à noter que la norfagaronine **66** a été testée sur des cellules HeLa S3 par Nakanishi et al. et ne s'est pas montrée active.<sup>73-75</sup>

### 3.2.2 Dérivés de la nitidine

**Tableau 37 : Activités sur MCF7 des alcools 102**

Composés	MCF7 CI <sub>50</sub> (μM)
composé <b>102a</b>	11,32
composé <b>102b</b>	101,87

Parmi les dérivés et intermédiaires de la nitidine, seuls les alcools **102a** et **102b** ont été testés sur MCF7. Ces deux composés ne possèdent pas de bonne activité sur cellules cancéreuses.

Il serait intéressant de tester d'autres composés parmi les intermédiaires de synthèse et les dérivés de la nitidine sur les cellules cancéreuses MCF7 afin de déterminer leur potentiel anticancéreux.

### 3.3 *Activité antipaludique de la fagaronine 28 in vivo*

Les tests antipaludiques *in vitro* pour la fagaronine **28** montrant une très bonne activité et une bonne sélectivité antipaludique, un test *in vivo* sur des souris parasitées par *P. berghei* est donc effectué suivant le protocole classique du test de Peters.<sup>155</sup>

Trois concentrations de fagaronine **28** sont testées 2.5 mg/kg/j, 5 mg/kg/j et 10 mg/kg/j ainsi qu'un témoin positif (CQ 10 mg/kg/j) et un témoin négatif (DMSO).

Les souris sont infectées à J0 puis traitées à J0, J1, J2 et J3. Des frottis sont faits à J4 pour évaluer la parasitémie moyenne de chaque groupe de souris et ainsi déterminer la DE<sub>50</sub> de la fagaronine **28a**.

**Tableau 38 : Test 1 de la fagaronine 28 in vivo**

	Dose (mg/kg/j)	Parasitémie moyenne (J4)	Ecart-type	Inhibition parasitémie (%)
DMSO		70,8	8,3	
CQ	10	1,4	0,6	98,0
F2,5	2,5	39,2	10,5	44,6
F5	5	25,2	7,1	64,4
F10	10	38,3	12,1	45,9

L'inhibition de la parasitémie d'un lot donné représente l'écart en pourcentage entre la parasitémie évaluée chez le lot de souris traitées par du DMSO (témoin négatif) et la parasitémie évaluée chez le lot de souris considéré.

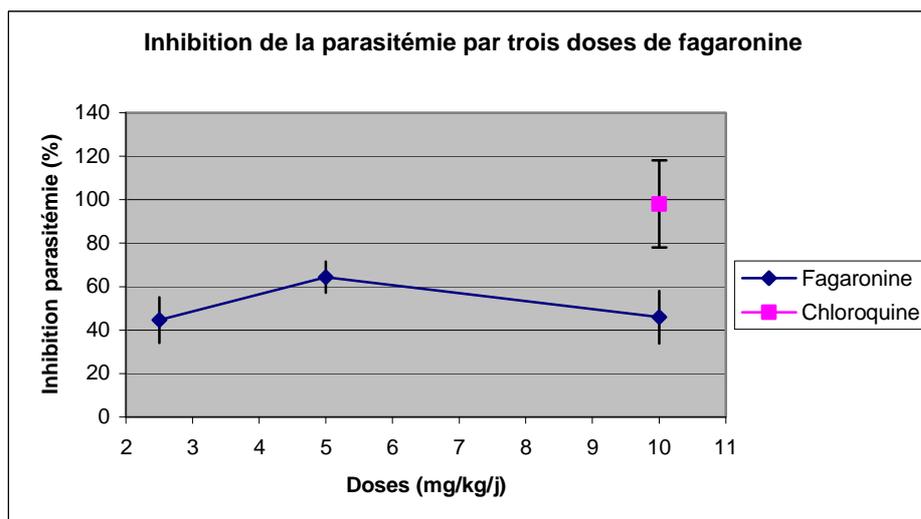


Figure 29 : Inhibition de la parasitémie en fonction de la dose de produit (test 1)

Lors de ce test, une action de la fagaronine **28** est remarquée mais les résultats ne permettent pas d'évaluer cette action correctement. En effet, l'action de la fagaronine **28** augmente avec la dose de 2,5 mg/kg/j à 5 mg/kg/j mais diminue ensuite. Etant donné les résultats, un deuxième test est nécessaire afin de confirmer l'action antipaludique de la fagaronine **28** et de déterminer sa  $DE_{50}$ .

La survie des souris est suivie pendant plusieurs jours après la fin du traitement (jusqu'à J11) (Figure 30).

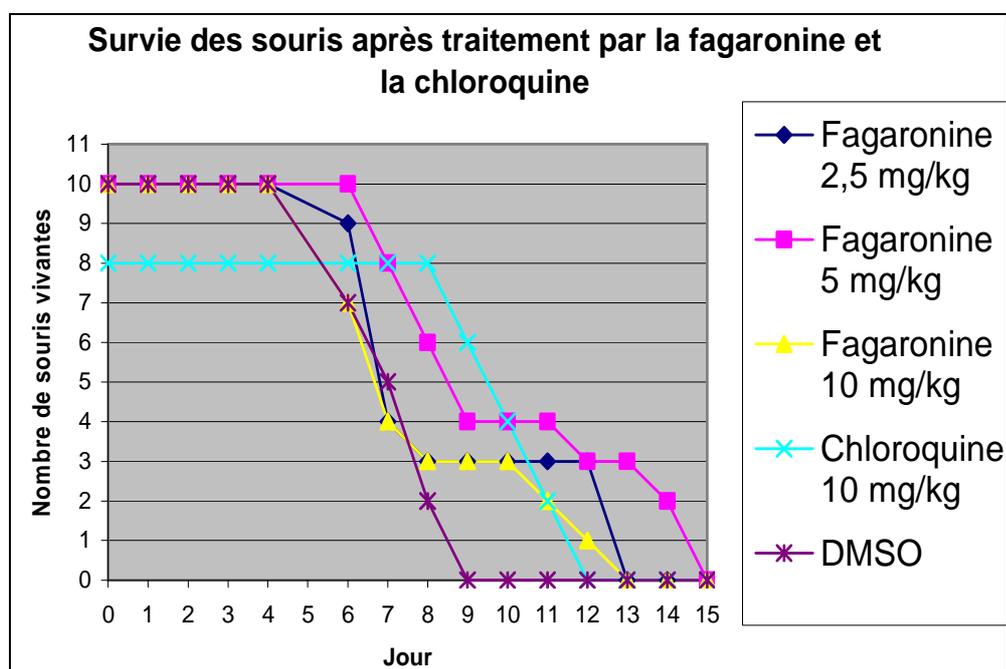


Figure 30 : Etude de la survie des souris après traitement par la fagaronine **28a**

L'étude de la survie des souris montre un léger effet de la fagaronine sur la survie des souris, notamment à 5 mg/kg/j, cependant on constate que les souris sont toutes mortes à J15, même lorsqu'elles sont traitées avec 10 mg/kg/j de chloroquine **12**. On peut conclure que le plasmodium utilisé était particulièrement virulent (injection de  $2 \times 10^7$  parasites).

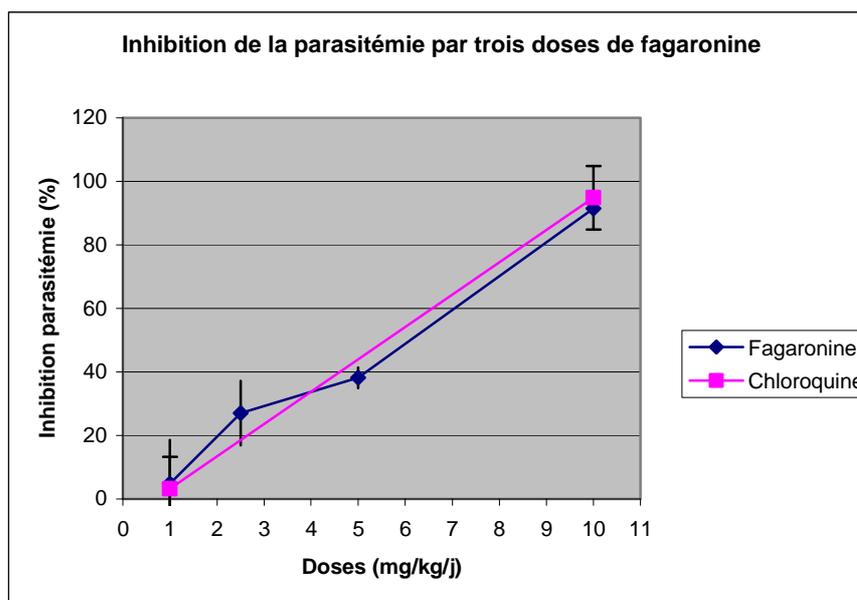
Un second test antipaludique de la fagaronine **28** *in vivo* est effectué avec quatre doses de fagaronine **28** (1 mg/kg/j, 2,5 mg/kg/j, 5 mg/kg/j et 10 mg/kg/j), deux doses de chloroquine **12** (1 et 10 mg/kg) afin de déterminer les DE<sub>50</sub> de deux produits ainsi que 2 témoins négatifs (un DMSO et un sans traitement).

Ce test diffère du premier test par l'espèce de *plasmodium* injecté (*P. vinckei petteri*) ainsi que par la quantité de parasites injectés (10<sup>6</sup> parasites soit 20 fois moins que lors du premier test).

**Tableau 39 : Test 21 de la fagaronine 28 *in vivo***

	Dose (mg/kg)	Parasitémie moyenne	Ecart-type	Inhibition parasitémie
Non traité		36,8	9,1	
DMSO		37	8,7	
CQ 1	1	35,8	7,1	3,2
CQ 10	10	1,9	2,5	94,9
F 1	1	35,2	7,8	4,9
F 2,5	2,5	27	13,7	27,0
F 5	5	16,7	10,1	38,1
F 10	10	2,3	3,3	91,5

L'inhibition de la parasitémie est là aussi déterminée à partir de la parasitémie moyenne du témoin DMSO.



**Figure 31 : Inhibition de la parasitémie en fonction de la dose de produit (test 2)**

Les résultats de ce test sont plus cohérents et sont exploitables pour déterminer des DE<sub>50</sub> de la fagaronine **28** et de la chloroquine **12**. La fagaronine **28**, possède bel et bien une action antipaludique *in vivo*, confirmée par ce deuxième test.

La DE<sub>50</sub> de la fagaronine **28** est évaluée à 6 mg/kg/j tandis que celle de la chloroquine **12** est de 5,5 mg/kg/j. La valeur de la DE<sub>50</sub> de la chloroquine **12** correspond à la littérature ce qui permet de valider l'étude de l'action antipaludique de la fagaronine **28** *in vivo*. La fagaronine **28** possède une très bonne action antipaludique *in vivo* avec une DE<sub>50</sub> de l'ordre de celle de la chloroquine **12**.

La survie des souris a été suivie pendant plusieurs jours après la fin du traitement.

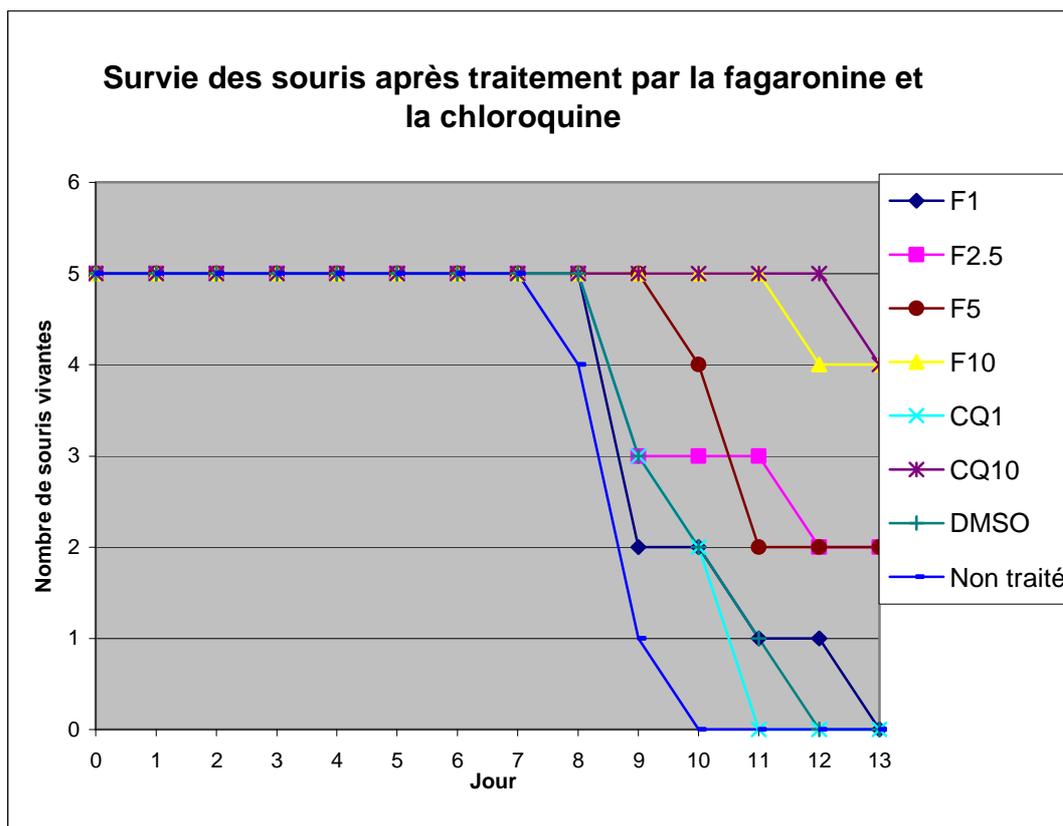


Figure 32 : Etude de la survie des souris après traitement par la fagaronine 28

L'étude de la survie des souris révèle plusieurs choses.

Tout d'abord, les souris traitées par la dose de 10 mg/kg de fagaronine 28 se comportent de la même manière que les souris traitées par la dose de 10 mg/kg de chloroquine 12. Leur survie est similaire.

Les souris non traitées ou traitées par des doses faibles de fagaronine, chloroquine ou par du DMSO meurent assez rapidement révélant une activité moindre de la fagaronine 28 à 1 mg/kg tout comme la chloroquine 12 à la même dose.

Un troisième groupe de souris, celles traitées par des doses intermédiaires (2,5 et 5 mg/kg) de fagaronine 28, possède une survie différente. Une partie des souris meurt assez rapidement puis leur nombre se stabilise. Là encore, on observe un effet dose de la fagaronine 28.

Ce deuxième test confirme donc l'intérêt de la fagaronine 28 comme antimalarique en montrant pour ce produit une activité *in vivo* équivalente à celle de la chloroquine 12 tant en termes de  $DE_{50}$  que de survie des souris traitées. On constate également que la fagaronine 28 ne pose aucun problème de toxicité immédiate aux doses utilisées. Il serait intéressant d'effectuer un test avec des doses plus élevées pour éventuellement observer une élimination totale de la parasitémie.

## 3.4 Tests leishmanicides *in vitro*

---

### 3.4.1 Généralités

La leishmaniose est une maladie chronique à manifestation cutanée et/ou viscérale due à des protozoaires appartenant au genre *Leishmania* et transmise par la piqûre de certaines espèces de phlébotomes. C'est une zoonose commune au chien et à l'homme. Il existe une trentaine d'espèces infectant les mammifères dont plusieurs peuvent être transmises à l'homme.

Il existe différents types de leishmanioses amenant des manifestations cliniques allant d'affection cutanées résorbables à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires causant de graves défigurations. Les différents types de leishmanioses sont retrouvés dans les régions tropicales et subtropicales ainsi que sur le bassin méditerranéen. La leishmaniose viscérale touche à 90 % le Bangladesh, le Brésil, l'Inde, le Népal et le Soudan, les pays les plus touchés par la leishmaniose cutanée sont l'Afghanistan, l'Algérie, le Brésil, l'Iran, le Pérou, l'Arabie Saoudite et la Syrie. La leishmaniose mucocutanée se retrouve principalement au Pérou, en Bolivie et au Brésil.

Le parasite *Leishmania* a besoin de deux hôtes pour se développer : le phlébotome et un mammifère. Chez le moustique, on retrouve une forme du parasite appelé promastigote qui vit dans un milieu extracellulaire tandis que chez le mammifère, les promastigotes se transforment en amastigotes axéniques afin de vivre dans un milieu intracellulaire une fois phagocytés par les macrophages.

Les benzo[c]phénanthridines n'ont pas été beaucoup étudiées comme leishmanicides naturels. En effet, seules deux publications ont été répertoriées, l'une sur des dérivés naturels de la dihydrochélérythrine<sup>156</sup> tandis que l'autre porte sur des benzo[c]phénanthridines ayant des activités sur le modèle promastigote de la leishmaniose.<sup>157</sup>

Les produits testés au cours de ce travail ont été évalués tout d'abord *in vitro* sur amastigotes axéniques et sur macrophages péritonéaux de souris afin d'évaluer leur activité sur le parasite et leur index de sélectivité. Ensuite les produits les plus actifs seront évalués sur amastigotes intramacrophagiques. *In vivo*, les produits les plus actifs seront testés sur des souris infectées par *Leishmania amazonensis*.

### 3.4.2 Activité leishmanicide sur amastigotes axéniques et macrophages

Plusieurs benzo[c]phénanthridines, naturelles ou synthétiques, ont été testées sur *Leishmania amazonensis*. Les  $CI_{10}$ ,  $CI_{50}$  et  $CI_{90}$  ont été déterminées. Seules les  $CI_{50}$  sont présentées. Certaines benzo[c]phénanthridines ont été testées mais ne sont pas du tout actives, elles ne sont donc pas présentes dans le tableau suivant. Les benzo[c]phénanthridines, testées sur les amastigotes axéniques, ont été testées sur les macrophages afin de déterminer leur cytotoxicité. Les  $DT_{10}$  et  $DT_{50}$  (doses tolérables) ont été déterminées. Seules les  $DT_{50}$  sont présentées (Tableau 40).

**Tableau 40 : Tests leishmanicide *in vitro* (amastigotes axéniques et macrophages) des benzo[c]phénanthridines**

Composé	Amastigotes axéniques $CI_{50}$ ( $\mu M$ )	Macrophages $DT_{50}$ ( $\mu M$ )	IS ( $DT_{50}/CI_{50}$ )
Nitidine <b>22</b>	0,4 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,2	11,2
Fagaronine <b>28</b>	0,4 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,8	54,2
Chélérythrine <b>23</b>	0,02 $\pm$ 0,005	3,0 $\pm$ 0,05	148,5
Fagaridine <b>31</b>	0,46 $\pm$ 0,16	18,9 $\pm$ 1,2	41,1
Avicine <b>Cl</b>	0,3 $\pm$ 0	25,6 $\pm$ 0,4	94,8
Composé <b>155</b>	1,5 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,09	1,3
Composé <b>158</b>	101,8 $\pm$ 2,9	40,2 $\pm$ 3,4	0,4
Composé <b>159</b>	> 100	14 $\pm$ 2,2	
Composé <b>160</b>	> 100	201,7	
Norfagaronine <b>66</b>	> 150	125,2 $\pm$ 7,0	
Composé <b>171</b>	> 130	244,9 $\pm$ 14,9	
Nornitidine <b>34</b>	> 150	> 300	
Composé <b>103</b>	12,3 $\pm$ 2,4	53,5 $\pm$ 2,7	4,3
Amphotéricine B	0,2 $\pm$ 0,02	4,2 $\pm$ 0,2	26,1

Les résultats présentés montrent l'importance de la quaternarisation de l'azote aromatique puisque les benzo[c]phénanthridines les moins actives sont celles dont l'atome d'azote n'est pas quaternaire (composés **158**, **159**, **160**, **66**, **171** et **34**). Seule la  $CI_{50}$  du composé **158** est calculée et elle est beaucoup plus élevée que celle des autres composés testés. Les composés **34**, **66**, **171** et **160**, non actifs sur la leishmaniose, ne possèdent aucune cytotoxicité envers les macrophages. Ces quatre composés n'étant pas du tout actifs sur les amastigotes axéniques, ils ne sont pas intéressants pour des tests sur des macrophages infectés par la leishmaniose. Les composés **158** et **159** possèdent une toxicité moyenne et ne sont pas intéressants non plus contre la leishmaniose.

Parmi les benzo[c]phénanthridines quaternaires, la moins active est le dérivé *N*-bromobutylé de la nitidine **155** tandis que la plus active est la chélérythrine **23** avec une  $CI_{50}$  de l'ordre de 20 nM. La fagaronine **28**, la nitidine **22**, la fagaridine **31** et l'avicine ont, pour leur part, une activité similaire. Le composé **155** ne possède pas un bon indice de sélectivité ni une bonne activité leishmanicide donc celui-ci ne sera pas testé sur les macrophages infectés.

La fagaronine **28**, la fagaridine **31**, l'avicine possèdent des  $DT_{50}$  dix fois supérieures à celle de l'amphotéricine B, le composé de référence. Les indices de sélectivité de l'avicine et des composés **28**, **31** montrent une bonne sélectivité leishmanicide et font de ces composés de bons candidats pour des tests sur macrophages infectés.

La chélérythrine **23** montre un très bon indice de sélectivité leishmanicide et sera testée sur les macrophages infectés. L'indice de sélectivité de la nitidine **22** montre que celle-ci n'est pas très sélective mais en raison de sa très bonne activité celle-ci sera testée aussi sur les macrophages infectés.

Plusieurs intermédiaires de synthèse ont été testés, principalement des isoquinolines et des isoquinoliniums. Les tests biologiques sur les intermédiaires ne permettent pas pour la plupart d'obtenir des  $CI_{50}$  car les composés ne sont pas actifs aux doses testées. Seuls les résultats pour le composé **103** ont permis d'obtenir son  $CI_{50}$ .

Le composé **103** ne possède pas une bonne activité sur la leishmaniose mais sa  $DT_{50}$  sur les macrophages est 10 fois supérieure à celle de l'amphotéricine B. Son indice de sélectivité de 1,53 n'en fait toutefois pas un bon composé leishmanicide car il n'est pas assez sélectif de la leishmaniose.

Ce composé ne sera pas testé sur les macrophages infectés par la leishmaniose.

### 3.4.3 Tests leishmanicides sur les macrophages infectés

Cinq benzo[c]phénanthridines ont été testées sur les macrophages infectés par *L. amazonensis* : la nitidine **22**, la chélérythrine **23**, la fagaronine **28**, la fagaridine **31** et l'avicine.

Après avoir infecté les macrophages par *L. amazonensis*, la réduction de l'infection est évaluée (RI).

**Tableau 41 : Réduction maximale de l'infection sur macrophages infectés**

Composé et numéro		RI maximal % (concentration utilisée en $\mu\text{M}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
Nitidine Cl	<b>22</b>	77,3 (2,6)	1,6 $\pm$ 0,8
Chélérythrine	<b>23</b>	84,4 (2,6)	0,5 $\pm$ 0,0
Fagaronine I	<b>28</b>	52,9 (10,5)	10,0 $\pm$ 0,4
Fagaridine	<b>31</b>	41,3 (13,6)	ND
Avicine		35,2 (13,6)	ND
Amphotéricine B		96,6 (2)	0,4 $\pm$ 0,07

Seuls trois composés testés, la nitidine **22**, la chélérythrine **23** et la fagaronine **28** réduisent l'infection de plus de 50% ce qui permet de déterminer leur  $CI_{50}$ . En effet, la nitidine **22** et la chélérythrine **23** réduisent l'infection des macrophages de plus de 75% à une concentration donnée. La fagaronine **28** est moins active et ne réduit pas cette infection de plus de 55% à 10,5  $\mu\text{M}$ . L'avicine et la fagaridine **31** ne réduisent pas de façon considérable l'infection des macrophages.

La nitidine **22** et la fagaronine **28** ne seront pas testées *in vivo* en raison de trop faibles quantités disponibles. Seules la fagaridine **31**, la chélérythrine **23** et l'avicine seront testées car elles sont disponibles en quantité suffisante pour permettre des tests *in vivo*.

### 3.5 Tests biologiques leishmanicides *in vivo*

Les tests leishmanicides *in vitro* sur des amastigotes axéniques et sur des macrophages infectés étant prometteurs pour quelques benzo[c]phénanthridines, des tests *in vivo* sur des souris infectées par *L. amazonensis* sont donc menés.

Les benzo[c]phénanthridines testées sont la chélérythrine **23**, l'avicine et la fagaridine **31**. A ces trois composés s'ajoutent le glucantime, composé control positif, et un control négatif c'est-à-dire sans traitement.

Les tests se font à une dose définie et identique pour chaque composé, celle ci est de 5 mg/kg.

Le test *in vivo* contre la leishmaniose est plus long que celui contre le paludisme. Les souris sont infectées la première semaine, le traitement commence une semaine après l'infection et les souris sont traitées deux fois par semaine pendant trois semaines. Le traitement s'effectue en intralésionnel sur une des deux pattes infectées (la droite). Les charges parasitaires sont évaluées à la 3<sup>ème</sup> et à la 6<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement.

Pour chaque produit testé, est mesuré le poids de tissu infecté (PTI) en mg, la charge parasitaire totale (CPT) \*10<sup>6</sup> et ce pour chacune de deux pattes infectées. Afin de mieux représenter l'évolution de l'infection, les résultats présentés ici sont la charge parasitaire / le poids de tissu infecté (CPT/PTI) ainsi que le ratio de ce nouveau résultat par rapport au contrôle négatif.

**Tableau 42 : CPT (\*10<sup>6</sup>) / PTI (mg). Tests *in vivo* antileishmaniose**

composés	Charges parasitaires (*10 <sup>6</sup> ) / poids des tissus (mg)			
	PG 3sem	PG 6sem	PD 3sem	PD 6sem
Chélérythrine Cl	1,2 ± 0,6	6,7 ± 1,6	0,6 ± 0,1	6,8 ± 0,3
Fagaridine Cl	1,1 ± 0,3	8,5 ± 2,1	0,3 ± 0,1	4,0 ± 0,5
Avicine Cl	1,2 ± 0,4	7,1 ± 0,3	1,0 ± 0,4	10,3 ± 0,4
Glucantime	0,8 ± 0,1	7,2 ± 0,5	0,0 ± 0,1	0,3 ± 0,4
Controle	0,7 ± 0,1	8,7 ± 0,6	0,7 ± 0,1	9,7 ± 0,7

(PG : patte gauche, PD : patte droite)

La patte gauche qui n'est pas traitée montre l'évolution de la leishmaniose en fonction du temps lorsqu'aucun traitement n'est appliqué. Cette patte sert de témoin pour vérifier l'activité des produits.

La patte droite, traitée par injection dans la lésion, montre l'activité du produit utilisé pour le traitement au cours du temps.

L'avicine ne réduit pas l'infection. En effet, trois semaines après le début du traitement la charge parasitaire sur le poids tissulaire ne diminue pas de façon significative et celle-ci augmente même au bout de six semaines après le début du traitement.

La chélérythrine **23** diminue de moitié l'infection trois semaines après le début du traitement mais son action ne dure pas dans le temps puisqu'au bout de six semaines après le début du traitement la charge parasitaire sur le poids tissulaire pour la patte droite (traitée) est identique à celle de la patte gauche (non traitée).

La fagaridine **31** possède une bonne action leishmanicide puisqu'au bout de trois semaines après le début du traitement, l'infection réduit de plus des deux tiers et que celle-ci augmente au bout de six semaines après le début du traitement mais reste tout de même nettement inférieure à l'infection sur la patte non traitée (deux fois moindre).

Le glucantime étant un composé de contrôle positif, il permet une vérification sur la viabilité du test réalisé. Ce test montre bien que le glucantime possède une forte action leishmanicide et ce même au bout de six semaines.

Le ratio des charges parasitaires rapporté au poids tissulaire des produits testés sur le contrôle négatif permet de mettre en évidence l'action des composés.

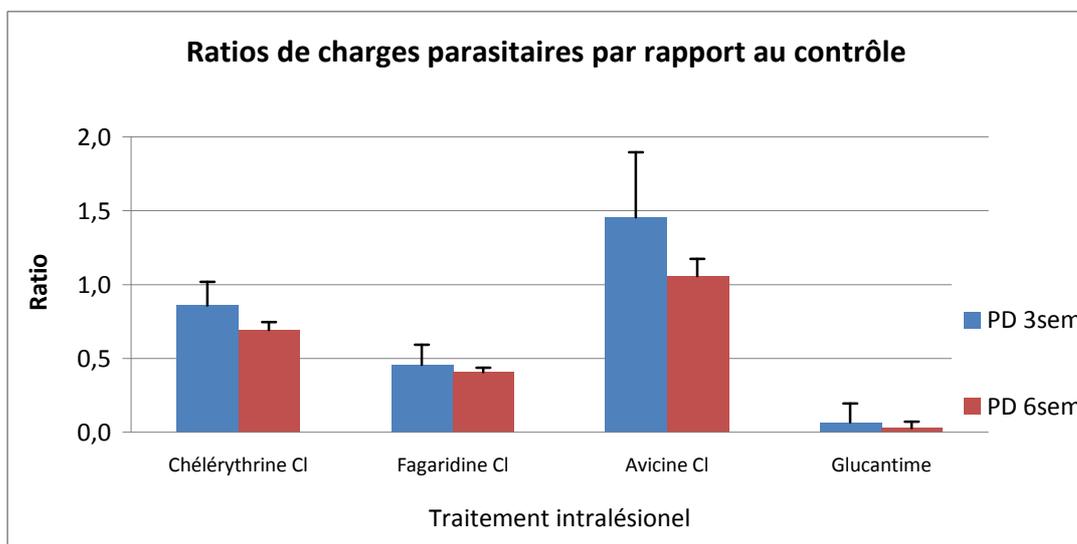
**Tableau 43 : ratio activité par rapport au contrôle négatif. Tests *in vivo* antileishmaniose**

composés	Ratio de l'activité par rapport au contrôle négatif			
	PG 3sem	PG 6sem	PD 3sem	PD 6sem
Chélérythrine Cl	1,8	0,8	0,9	0,7
Fagaridine Cl	1,6	1,0	0,5	0,4
Avicine Cl	1,9	0,8	1,5	1,1
Glucantime	1,2	0,8	0,1	0,0

Le ratio s'interprète facilement puisqu'une valeur supérieure ou égale à 1 montre un composé non actif *in vivo* contre *L. amazonensis* tandis qu'une valeur inférieure à 1 montre un composé actif *in vivo* contre *L. amazonensis*.

Les ratios confirment les précédents résultats. L'avicine n'est pas active *in vivo* contre la leishmaniose, la chélérythrine **23** est active mais faiblement, la fagaridine **31** est active de façon plus importante que la chélérythrine **23**. La fagaridine **31** est un bon leishmanicide *in vivo* mais est moins active que le glucantime utilisé comme composé de référence actif.

Le graphique ci-dessous représente l'évolution de la charge parasitaire par rapport au poids du tissu sur la patte traitée en fonction du temps selon le produit testé. Il permet de mieux visualiser les résultats.



**Figure 33 : Graphique des ratios des tests *in vivo* leishmanicide**

De toutes les benzo[c]phénanthridines testées contre la leishmaniose *in vitro* et *in vivo*, la chélérythrine **23** se trouve être la plus active *in vitro* tandis que la fagaridine **31** est la plus active *in vivo*.

### 3.6 Conclusions sur les tests biologiques

---

La fagaronine **28** est un très bon antipaludique *in vitro* ainsi que *in vivo* sur des souris puisque ses activités sont comparables à celles de la chloroquine **12**. Sa cytotoxicité faible en fait un composé très intéressant pour combattre le paludisme mais des tests supplémentaires sont nécessaires. En effet, il convient de déterminer la DE<sub>100</sub> de la fagaronine **28** pour une injection par voie intra-péritonéale ainsi que la voie d'absorption la plus appropriée (voie orale, voie intraveineuse, intrapéritonéale). En effet, la fagaronine **28** possède une très bonne activité antipaludique mais cette activité peut être améliorée selon le mode de traitement.

Plusieurs composés apparentés aux benzo[c]phénanthridines ont été testés contre la leishmaniose. Ceux-ci étaient pour la plupart d'origine naturelle et isolés de plantes mais d'autres étaient des intermédiaires de synthèse dans l'obtention de la fagaronine et de ses dérivés. Parmi tous ces composés testés, deux se sont démarqués des autres. La chélérythrine **23** pour sa bonne activité antileishmaniose *in vitro* et la fagaridine **31** pour sa bonne activité *in vivo*. Il serait intéressant de tester la nitidine **22** et la fagaronine **28** contre la leishmaniose *in vivo* afin de déterminer leur potentiel leishmanicide sur un modèle murin.

Il est intéressant de noter que les deux benzo[c]phénanthridines actives sur la leishmaniose possèdent toutes deux des groupements substituants aux mêmes positions sur le cycle A du squelette. A contrario, la fagaronine **28** et la nitidine **22**, qui ont une bonne activité contre le paludisme, ont une activité moindre contre la leishmaniose. Leurs groupements substituants sur le cycle A ne sont pas au même endroit que ceux pour la fagaridine **31** et la chélérythrine **23**.

Il serait intéressant de voir si les composés fagaridine **31** et chélérythrine **23** n'agissent pas sur une cible enzymatique particulière du parasite *L. amazonensis* expliquant ainsi leurs bonnes activités par rapport à celles de la nitidine **22** et de la fagaronine **28**.

## 4 Etude du mode d'action de la fagaronine

### 4.1 Etude d'affinité avec l'hème

Afin de déterminer le potentiel inhibiteur de la fagaronine **28** vis-à-vis de la détoxification de l'hème, une étude *in vitro* de l'interaction de la fagaronine **28** avec l'hème a été menée. Cette étude a été menée en parallèle avec la chloroquine **12** pour valider les essais. Elle permet de déterminer la géométrie du complexe hème-fagaronine **28** formé ainsi que d'évaluer la constante de dissociation de ce complexe.

Les manipulations de titration de l'hème par la chloroquine **12** et par la fagaronine **28** ont été réalisées dans un mélange eau/DMSO tamponné à pH 7 suivant le protocole classique décrit par Egan.<sup>130</sup> Les manipulations ont été réalisées trois fois de manière indépendante (Figure 34).

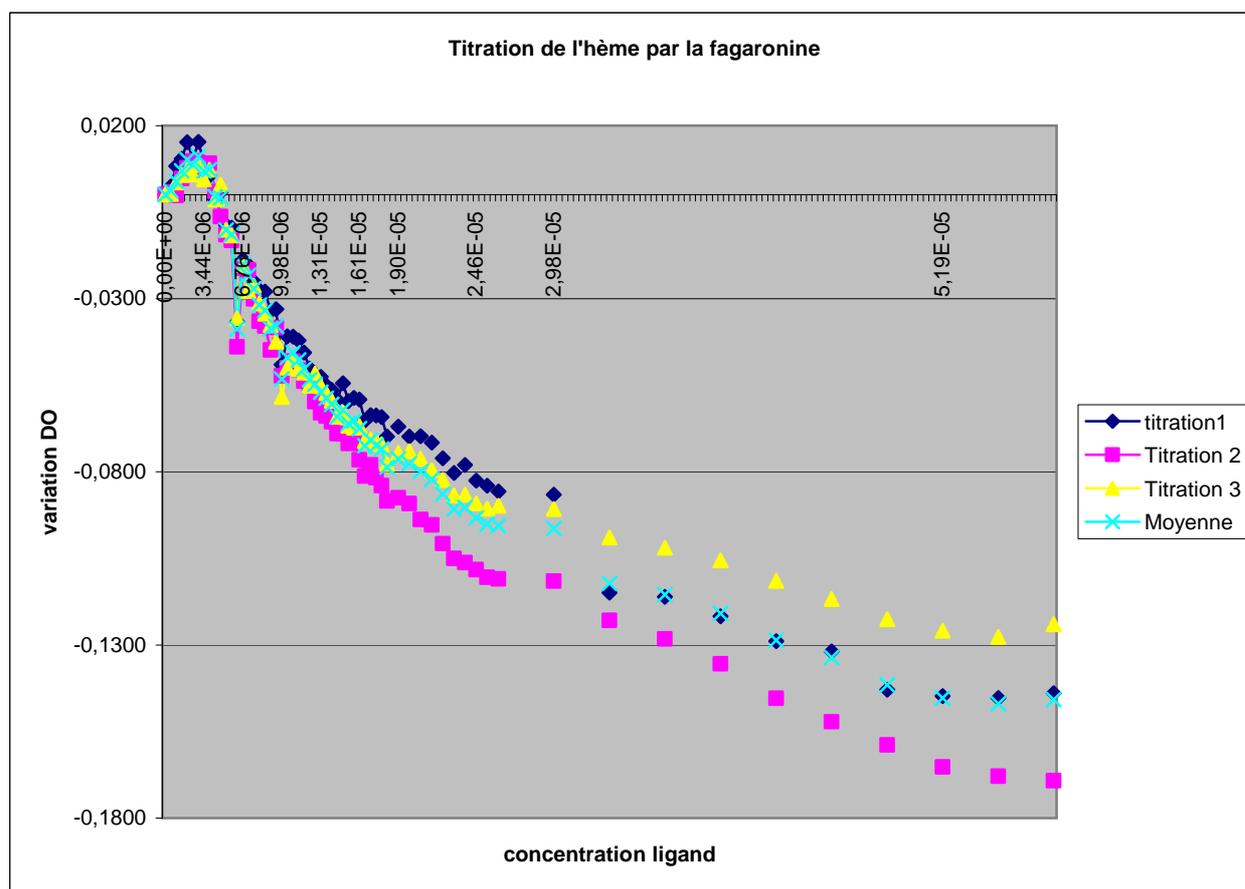


Figure 34 : Courbes de titration de l'hème par la fagaronine 28

La titration de l'hème par la chloroquine à 20°C fournit de bons résultats quasi-identiques à ceux décrit par Egan à 25°C (Figure 35).

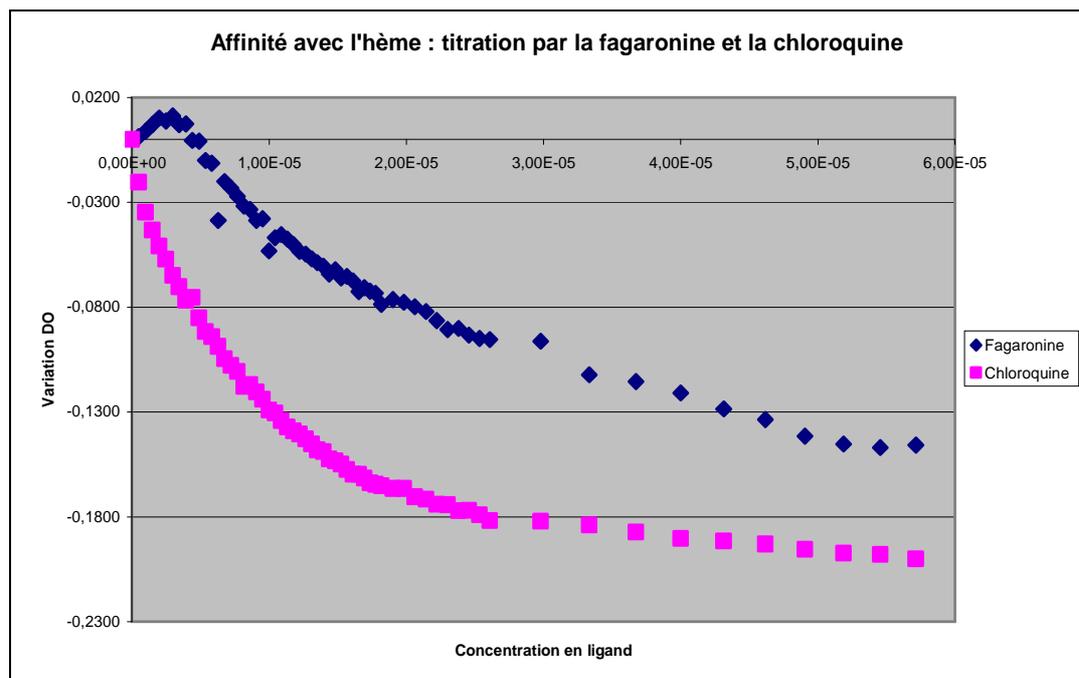


Figure 35 : Titration de l'hème par la chloroquine 12 et la fagaronine 28

Les courbes de titration ont été analysées par le logiciel de modélisation specfit. La stoechiométrie trouvée pour les complexes hème-chloroquine **12** et hème-fagaronine **28** est de 1-1 avec des constantes de dissociation respectivement de  $10^{-5,16}$  et  $10^{-4,49}$ .

Les résultats de l'étude d'affinité de la fagaronine pour l'hème montre qu'il y a en effet interaction et formation d'un complexe 1-1 tout comme pour la chloroquine. La chloroquine possède un mode d'action lié à l'hème puisqu'elle forme un complexe avec celle-ci et inhibe sa détoxification en hémozoïne par le parasite.

## 4.2 Localisation dans le parasite

### 4.2.1 Fluorimétrie

Afin de pouvoir visualiser la fagaronine **28** dans le parasite par microscopie optique et microscopie confocale, une étude de fluorimétrie de la fagaronine **28** a d'abord été réalisée. La fluorescence de la fagaronine **28** a été étudiée suivant le pH du solvant dans lequel elle est solubilisée afin de prendre en compte les conditions biologiques du parasite. Les trois solvants utilisés sont H<sub>2</sub>O distillée, PBS (phosphate buffered saline) tamponné à pH = 5 (pH de la vacuole digestive) et PBS tamponné à pH = 7 (pH du cytoplasme du parasite).

Tout d'abord, afin de savoir à quelle longueur d'onde la fagaronine est excitée, des spectres UV de la fagaronine **28**, à une concentration de 0.01 mg/mL, ont été réalisés (Figure 36).

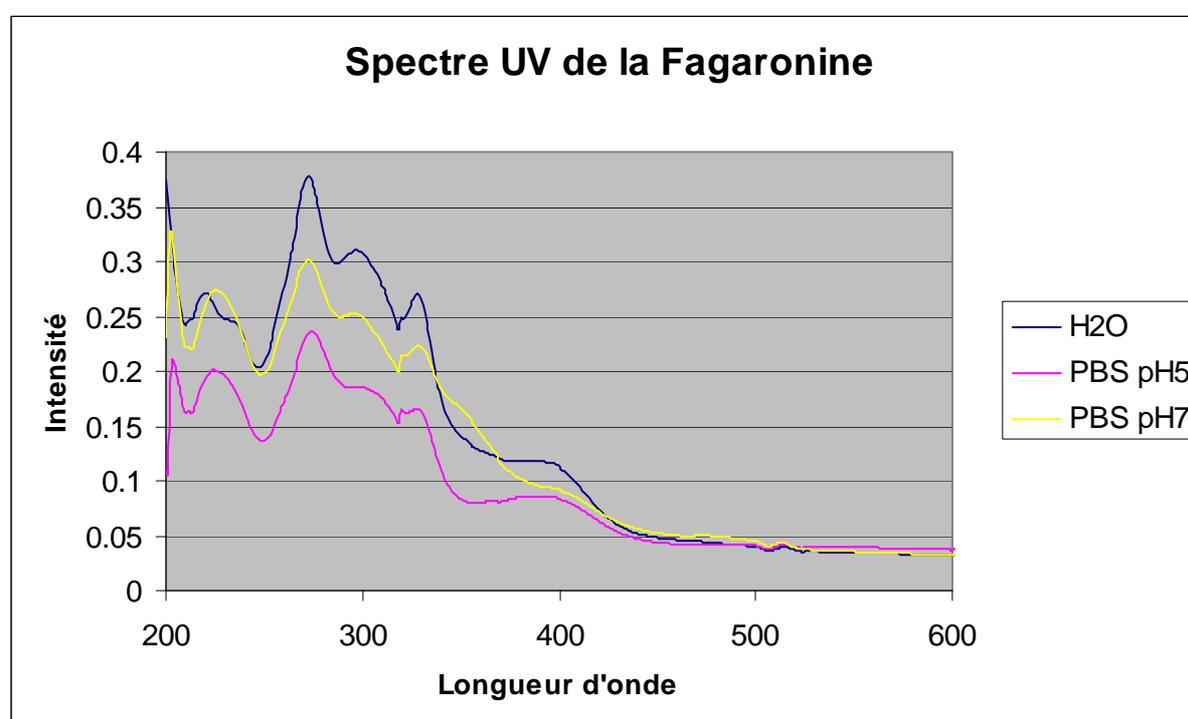


Figure 36 : Absorbance de la fagaronine **28** selon les solvants et le pH

Le profil UV de la fagaronine **28** change très peu en fonction du pH et les pics principaux sont retrouvés.

Plusieurs longueurs d'onde ont été sélectionnées pour effectuer des scans d'émission à une longueur d'onde d'excitation donnée. A ces longueurs d'onde sont rajoutées les longueurs d'onde correspondant aux filtres DAPI, FITC et TRITC disponibles au laboratoire pour l'observation en microscopie optique et confocale.

Les longueurs d'onde concernées sont donc : 272, 295, 305, 320, 330, 366, 372, 384, 390, 490, 515 et 541 nm.

La fagaronine ne fluoresce que très peu. Elle absorbe à une longueur d'onde d'excitation autour de 275 nm et émet à une longueur d'onde comprise entre 400 et 500 nm avec un maximum à 450 nm. Les essais ont été réalisés dans différents solvants et à différents pH (H<sub>2</sub>O, PBS pH = 5 et PBS pH =

7) mais ces paramètres n'améliorent pas la fluorescence de la fagaronine **28** (Figure 37) contrairement à celle de la nitidine **22** (Figure 38).

En effet, le milieu phosphate tamponné améliore légèrement la fluorescence de la nitidine mais atténue celle de la fagaronine à pH = 7 et l'éteint à pH = 5.

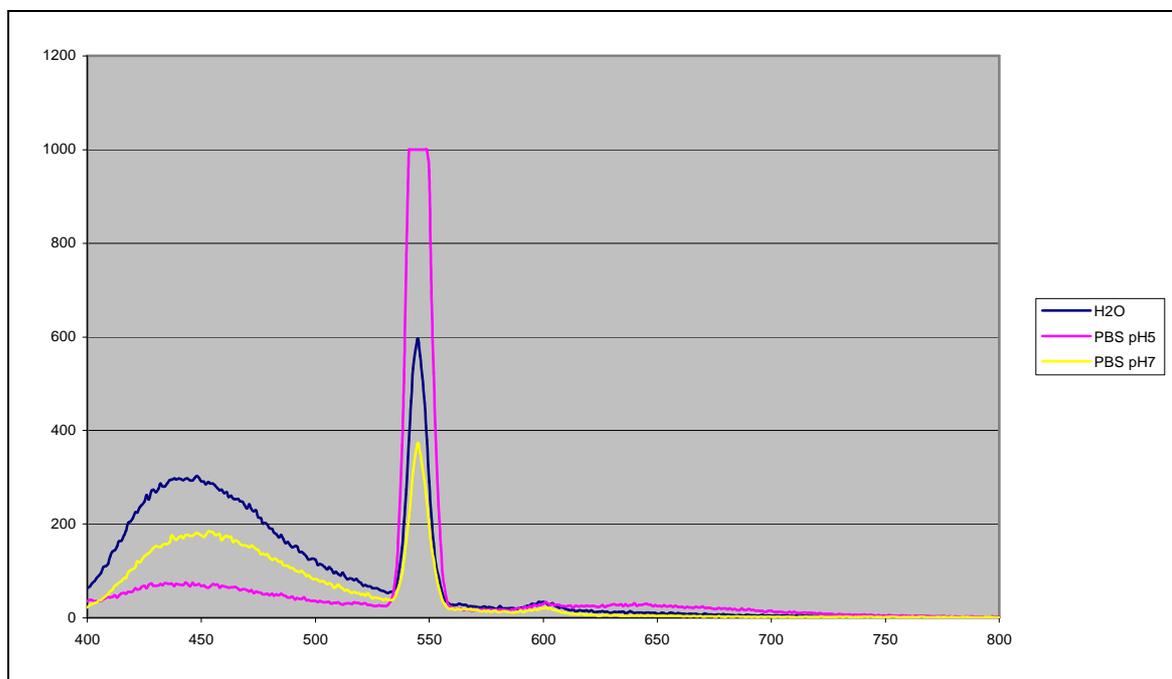


Figure 37 : Fluorescence de la fagaronine (excitation 272nm)

Pic harmonique autour de 550 nm

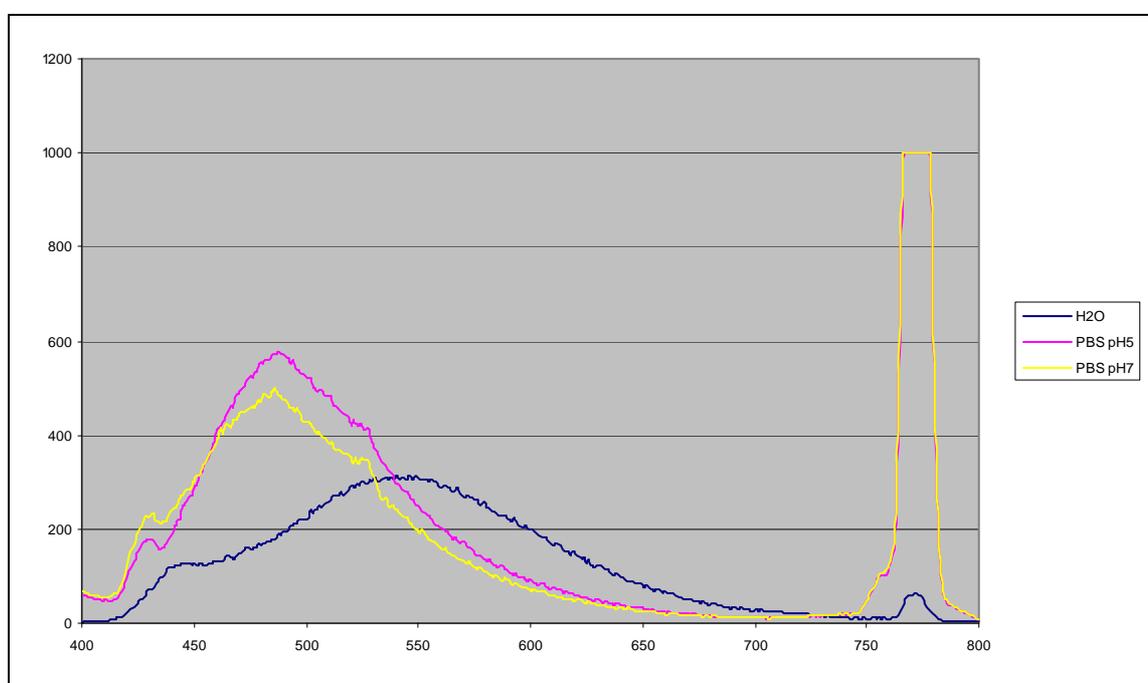


Figure 38 : Fluorescence de la nitidine (excitation 385 nm)

Pic harmonique entre 750 et 800 nm

L'intensité de la fluorescence de la fagaronine est faible comparée à celle de la nitidine et la détection de la fagaronine **28** dans les globules rouges, dans les parasites ainsi que dans ses

compartiments sera donc sans doute difficile. Des essais seront tout de même réalisés en microscopie optique.

#### 4.2.2 Observation en microscopie optique

Malgré la faible fluorescence de la fagaronine, des essais d'observation en microscopie optique ont été réalisés. La fagaronine a été incubée avec une culture de *P. falciparum* puis observée au microscope avec différents filtres. Les filtres fournis avec le microscope, DAPI, FITC et TRITC, ne permettent pas d'observer la fagaronine car leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission ne coïncident pas avec celles de la fagaronine.

## Conclusions et perspectives

Le but de ce travail était de synthétiser la fagaronine et des dérivés aminoalkylés de celle-ci ainsi que des dérivés aminoalkyles de la nitidine dans le but de mimer la chaîne aminoalkyle de la chloroquine et de faciliter un mode d'action antiparasitaire via la vacuole digestive du parasite du genre *plasmodium*.

La synthèse utilisée, synthèse publiée précédemment par Luo et al., a été adaptée à l'aide d'une protection du phénol de la fagaronine ainsi qu'une méthylation de l'atome d'azote aromatique permettant de passer de la norfagaronine à la fagaronine. La fagaronine a été obtenue en quantité satisfaisante et des tests biologiques ont été menés afin de déterminer son potentiel antipaludique, leishmanicide et anticancéreux. La fagaronine est un très bon antipaludique *in vitro* ce qui avait déjà été mis en évidence. Nous avons montré pour la première fois sa très bonne activité *in vivo* équivalente à la chloroquine. Celle-ci n'est que peu cytotoxique ce qui permet d'augmenter sa sélectivité antipaludique. Son activité leishmanicide reste à approfondir mais semble moins prometteuse.

Le mode d'action est en voie d'exploration. La fagaronine possède une forte affinité avec l'hème. Malheureusement elle est bien moins fluorescente que la nitidine et une adaptation des tests d'observation et de colocalisation dans le parasite est également nécessaire.

La synthèse des dérivés de la fagaronine ainsi que celle des dérivés de la nitidine est en cours. Les essais de *O*-alkylation de la fagaronine sont encourageants et les essais des substitutions du brome par la diéthylamine pourront être lancés dès la détermination par RMN et spectrométrie de masse de la structure des composés obtenus par alkylation de la fagaronine.

Les essais de *N*-bromobutylation de l'aldéhyde correspondant à la série nitidine sont également encourageants mais nécessitent une amélioration quant à leur traitement et la purification des composés obtenus. Une fois ceci fait, les essais de substitution du brome par la diéthylamine pourront eux aussi être menés.

Les dérivés de la fagaronine et de la nitidine obtenus ainsi devront être testés afin de déterminer leur potentiel antipaludique, anticancéreux et cytotoxique ainsi que leur index de sélectivité antipaludique. Dans le cas d'une bonne activité antipaludique, l'étude de leur mode d'action sera nécessaire afin de déterminer le rôle de l'ajout de la chaîne aminoalkyle dans le mode d'action de ces composés ainsi que dans le changement d'activité (augmentation ou diminution de la  $CI_{50}$ ).

## 5 Partie Expérimentale

### 5.1 Généralités

Toutes les réactions se sont faites sous argon. Les solvants sont de pureté HPLC, l'acétonitrile et l'acétone ont été distillés avant utilisation, la DIPA a été dégazée sous argon. Les solvants anhydres ou secs sont conservés sur tamis moléculaire et sous argon. L'évolution des réactions a été suivie par CCM. Les produits de départ ont été vérifiés par RMN.

Les chromatographies sur gel de silice ont été réalisées avec de la silice 60 de taille 40-63  $\mu\text{m}$ . Les CCM ont été réalisées sur feuilles d'aluminium et gel de silice 60 F<sub>254</sub> provenant de chez Merck ou VWR.

Les spectres de RMN ont été effectués sur un spectromètre BRUKER Avance 300. Les solvants qui ont été utilisés sont le  $\text{CDCl}_3$ , le  $\text{CD}_3\text{OD}$ , le DMSO- $d_6$ .

Les spectres ont été calibrés selon les tables de déplacements chimiques des solvants.<sup>158</sup> Pour le  $\text{CDCl}_3$  : 7,26 ppm, pour le MeOD : 3,31 ppm et pour le DMSO : 2,50 ppm.

La détermination RMN des composés a été réalisée grâce aux spectres de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC et HMBC ou par analogie avec des composés analogues. La structure des alcools isoquinoléiques a été vérifiée par RMN NOESY.

La spectrométrie de masse a été réalisée soit en impact électronique (IE) au service commun de masse du bâtiment 2R1 (UPS Toulouse) soit en ionisation électrospray (ESI) sur le spectromètre de l'UMR 152. La spectrométrie de masse haute résolution a été réalisée en ESI sur le spectromètre du service commun de masse du bâtiment 2R1. Le spectromètre de masse de l'UMR 152 est un LCQ DECA XP MAX de la marque Thermo Electron Incorporation. Le spectromètre de masse utilisé pour la haute résolution est un UPLC Xevo G2 Q TOF de la marque Waters. Le spectromètre de masse utilisé pour l'impact électronique est un DSQ II de la marque Thermo Fisher.

Les composés ont été testés *in vitro* sur différentes souches de *P. falciparum*, sur une lignée cellulaire humaine cancéreuse (MCF7) et sur une lignée non cancéreuse (VERO, rein de singe). Les composés ont été testés *in vivo* sur des souris mâles Swiss de 20g infectées par *P. berghei* pour le premier test et par *P. vinckei petteri* pour le second test.

La lecture des microplaques lors des tests leishmanicide sur les amastigotes axéniques a été réalisée avec un lecteur de microplaques de marque Merteck et de modèle 960.

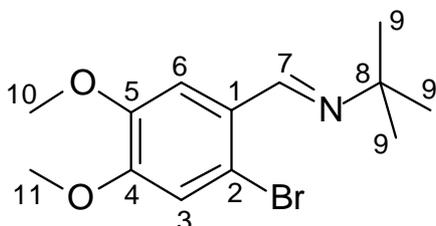
Les mesures d'absorbances UV pour les spectres UV de la fagaronine ainsi que pour la titration de l'hème par la fagaronine et par la chloroquine ont été réalisées sur un spectromètre UV Specord 205 de la marque analytikjena. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz. Le logiciel utilisé pour collecter et analyser les données est WinAspect.

Les mesures de fluorescence de la fagaronine et de la nitidine ont été réalisées sur un spectrofluorimètre CaryEclipse de la marque Varian. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz. Le logiciel utilisé pour collecter et analyser les mesures est Scan CaryEclipse WinFLR de Varian.

Les essais d'observation de la fagaronine dans le parasite ont été réalisés sur un microscope optique Nikon Eclipse 80i possédant un set de trois filtres (DAPI, FITC et TRITC).

## 5.2 Synthèse de la norritidine :

### 5.2.1 N-(2-bromo-4,5-diméthoxybenzylidène)-*tert*-butyl-amine **99**



Aspect : solide blanc

$M_w = 300.19 \text{ g.mol}^{-1}$

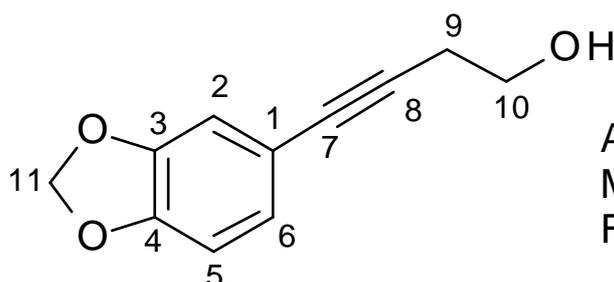
Formule :  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{BrNO}_2$

Un mélange de 2-bromo-4,5-diméthoxybenzaldéhyde **63** (1 g ; 4,08 mmol) et de *tert*-butylamine (6,5 mL ; 40,8 mmol) est agité sous argon à température ambiante pendant 72h. L'excès de *tert*-butylamine est éliminé par distillation après ajout de cyclohexane et le produit est séché sous vide. 1,22 g de composé **99** sont obtenus sous forme d'un solide blanc (rendement quantitatif).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,31$  (s, 9H, **H9**) ; 3,90 (s, 3H, **H10** ou **H11**) ; 3,95 (s, 3H, **H10** ou **H11**) ; 6,99 (s, 1H, **H3** ou **H6**) ; 7,57 (s, 1H, **H3** ou **H6**) ; 8,51 (s, 1H, **H7**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 29,8$  (**C9**) ; 56,1 (**C10** ou **C11**) ; 56,2 (**C10** ou **C11**) ; 57,6 (**C8**) ; 109,9 (**C3** ou **C6**) ; 114,9 (**C3** ou **C6**) ; 116,5 (**C2**) ; 128,0 (**C1**) ; 148,6 (**C4** ou **C5**) ; 151,2 (**C4** ou **C5**) ; 154,2 (**C7**) ppm.

### 5.2.2 4-(3,4-méthylènedioxyphényl)-3-butyn-1-ol **101**



Aspect : huile marron

$M_w = 190.195 \text{ g.mol}^{-1}$

Formule :  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_3$

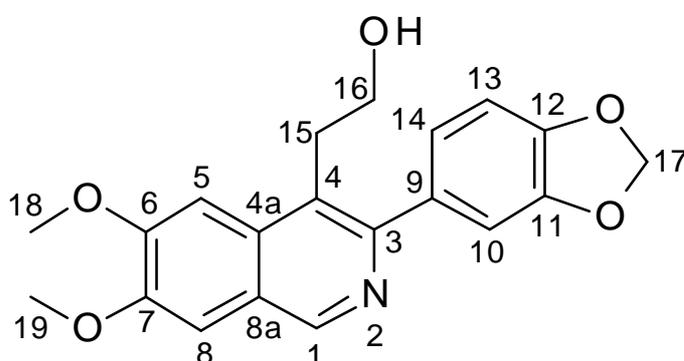
Un mélange de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (107 mg ; 0,15 mmol), de  $\text{CuI}$  (29 mg ; 0,15 mmol), de 3,4-méthylènedioxybromobenzène **100** (1 g ; 4,97 mmol) et de 3-butyn-1-ol **164** (384 mg ; 5,5 mmol) est chauffé au reflux de la DIPA (3 mL), préalablement dégazée, pendant 1h30 sous argon. Le milieu réactionnel est refroidi puis filtré. La phase obtenue est lavée deux fois avec du  $\text{HCl}$  0,1N puis deux fois avec de l'eau distillée. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée. Le brut réactionnel obtenu est purifié sur gel de silice ( $\text{AcOEt}$  /  $\text{CyHex}$  : 4 / 6) et 705 mg de composé **101** (rendement : 74 %) sont obtenus.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 2,19$  (s broad, 1H, OH) ; 2,66 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$  Hz, 2H, **H9**) ; 3,79 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$  Hz, 2H, **H10**) ; 5,95 (s, 2H, **H11**) ; 6,73 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, 1H, **H5**) ; 6,87 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 1,6$  Hz, 1H, **H2**) ; 6,93 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,6$  Hz, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 23,7$  (**C9**) ; 61,1 (**C10**) ; 82,2 (**C7**) ; 84,6 (**C8**) ; 101,2 (**C11**) ; 108,3 (**C5**) ; 111,7 (**C2**) ; 116,6 (**C1**) ; 126,1 (**C6**) ; 147,3 (**C3** ou **C4**) ; 147,5 (**C3** ou **C4**) ppm.

**SM** (ESI) :  $m/z = 191$  ( $\text{MH}^+$ )

### 5.2.3 6,7-diméthoxy-4-(2-hydroxyéthyl)-3-(3,4-méthylènedioxyphényl)-isoquinoline **102a**



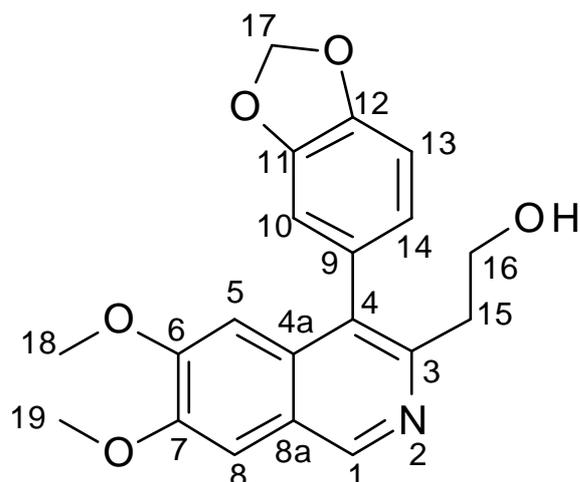
Aspect : solide jaunâtre  
 $M_w = 353.37 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_5$

Dans un ballon sous argon du  $\text{NiBr}_2(\text{dppe})$  (180 mg ; 0,28 mmol), de la poudre de zinc (375 mg ; 5,77 mmol), et du composé **99** (860 mg ; 2,86 mmol) sont mélangés. Une solution d'alcyne **101** (710 mg ; 3,73 mmol) dissout dans de l'ACN (30 mL) fraîchement distillé est ajoutée et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 2h. Le mélange est refroidi, filtré and concentré. Le brut réactionnel est purifié plusieurs fois sur gel de silice ( $\text{AcOEt} / \text{DCM} : 6 / 4$ ), 490 mg de composé **102a** (rendement : 52 %) et 318 mg de composé **102b** (rendement : 34%) sont obtenus.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 3,32$  (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, **H15**) ; 3,86 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, **H16**) ; 4,04 (s, 3H, **H18** ou **H19**) ; 4,07 (s, 3H, **H18** ou **H19**) ; 6,01 (s, 2H, **H17**) ; 6,88 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, **H13**) ; 6,93-6,98 (m, 2H, **H10** et **H14**) ; 7,23 (s, 1H, **H5** ou **H8**) ; 7,36 (s, 1H, **H5** ou **H8**) ; 8,96 (s, 1H, **H1**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 32,1$  (**C15**) ; 56,1 (**C18** ou **C19**) ; 56,2 (**C18** ou **C19**) ; 62,5 (**C16**) ; 101,1 (**C17**) ; 102,3 (**C5**) ; 105,9 (**C8**) ; 108,1 (**C13**) ; 110,1 (**C10**) ; 123,0 (**C14**) ; 123,8 (**C4a** ou **C8a**) ; 124,1 (**C9**) ; 132,6 (**C4**) ; 134,8 (**C4a** ou **C8a**) ; 147,2 (**C6**) ; 147,5 (**C12**) ; 147,5 (**C1**) ; 150,1 (**C3**) ; 151,1 (**C7**) ; 153,5 (**C11**) ppm.

**SM** (ESI) :  $m/z = 354$  ( $\text{MH}^+$ )

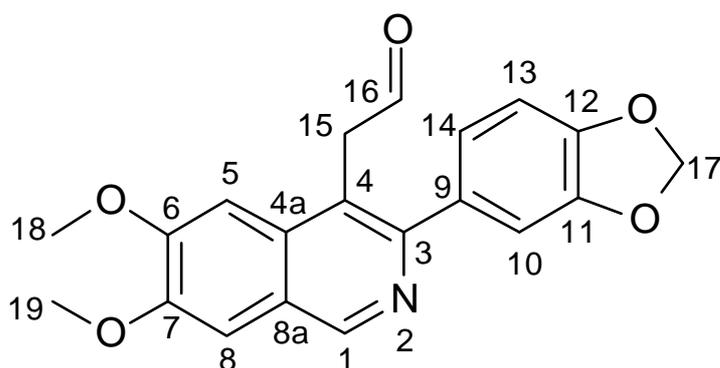
**Composé 102b** : 6,7-diméthoxy-3-(2-hydroxyéthyl)-4-(3,4-méthylènedioxyphényl)-isoquinoline

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 2,92 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,4 Hz, **H15**) ; 3,82 (s, 3H, **H18**) ; 3,96 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,4 Hz, **H16**) ; 4,05 (s, 3H, **H19**) ; 6,09 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 15,4 Hz, **H17**) ; 6,10 (d, 1H, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 15,4 Hz, **H17**) ; 6,71 (s, 1H, **H5**) ; 6,74 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,6 Hz, **H14**) ; 6,76 (d, 1H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1,6 Hz, **H10**) ; 6,97 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,7 Hz, **H13**) ; 7,23 (s, 1H, **H8**) ; 8,97 (s, 1H, **H1**) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 35,9 (**C15**) ; 56,0 (**C18**) ; 56,1 (**C19**) ; 62,3 (**C16**) ; 101,3 (**C17**) ; 103,5 (**C5**) ; 105,3 (**C8**) ; 108,7 (**C13**) ; 110,3 (**C10**) ; 123,4 (**C14**) ; 123,1 (**C4a** ou **C8a**) ; 130,0 (**C4**) ; 130,6 (**C9**) ; 133,2 (**C4a** ou **C8a**) ; 147,2 (**C11**) ; 147,8 (**C1**) ; 148,0 (**C12**) ; 149,9 (**C7**) ; 150,0 (**C3**) ; 153,3 (**C6**) ppm.

**SM** (ESI) : m/z = 354 (MH<sup>+</sup>)

#### 5.2.4 6,7-diméthoxy-3-(3,4-méthylènedioxyphényl)- 4-(2-oxoéthyl)-isoquinoline **103**



Aspect : solide jaunâtre  
 M<sub>w</sub> = 351.35 g.mol<sup>-1</sup>  
 Formule : C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>

Une solution de chlorure d'oxalyle (0,202 mL ; 2,09 mmol) dans 8 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est refroidie à -80°C. Une solution de DMSO (0,38 mL ; 4,18 mmol) dans 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est ajoutée goutte à goutte et le mélange est agité pendant 15 min. Une solution d'alcool **102a** (380 mg ; 1,045 mmol) dans 28 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> est ajoutée goutte à goutte et l'agitation est poursuivie pendant 30 min. 2,66 mL de DIPEA (15,66 mmol) sont ajoutés doucement, le milieu est agité pendant 15 min à -80°C puis pendant 2h à TA. La réaction est arrêtée avec l'ajout d'eau distillée, la phase organique est

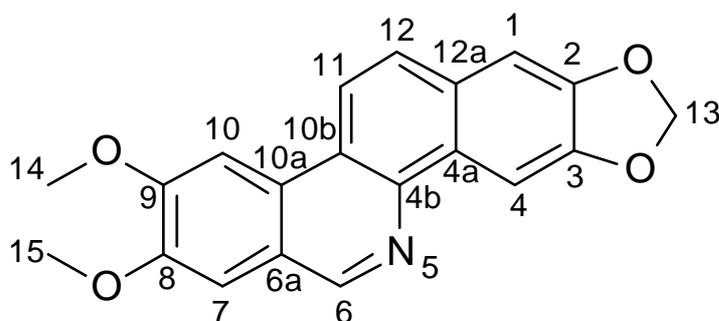
récupérée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée. Le brut obtenu est purifié sur gel de silice (AcOEt / DCM : 5 / 5) pour donner 352 mg de composé **103** (rendement : 92 %).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 3,84 (s, 3H, **H18**) ; 3,90 (s, 3H, **H19**) ; 4,05 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 2,0$  Hz, **H15**) ; 5,95 (s, 2H, **H17**) ; 6,80 (s, 1H, **H5**) ; 7,02 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9$  Hz, **H14**) ; 7,19 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz, **H13**) ; 7,29 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9$  Hz, **H10**) ; 7,41 (s, 1H, **H8**) ; 8,51 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 2,0$  Hz, **H16**) ; 8,98 (s, 1H, **H1**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 45,2 (**C15**) ; 55,9 (**C19**) ; 56,1 (**C18**) ; 67,1 (**C17**) ; 101,9 (**C5**) ; 106,0 (**C8**) ; 113,8 (**C10**) ; 118,2 (**C4**) ; 121,7 (**C14**) ; 122,6 (**C13**) ; 123,8 (**C8a**) ; 132,5 (**C4a**) ; 139,6 (**C12**) ; 139,7 (**C9**) ; 149,2 (**C1**) ; 150,3 (**C6**) ; 151,1 (**C11**) ; 152,1 (**C3**) ; 153,7 (**C7**) ; 199,2 (**C16**) ppm.

**SM** (ESI) :  $m/z = 352$  ( $\text{MH}^+$ ) ; 384 ( $\text{MH} + \text{MeOH}^+$ )

### 5.2.5 Nornitidine **34**



Aspect : solide jaunâtre  
 $M_w = 333.34 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{NO}_4$

A une solution d'aldéhyde **103** (350 mg ; 0,996 mmol) dans de l'acide acétique (10 mL), est ajouté 4 mL d'acide bromhydrique 40%. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 30 min. Le milieu est neutralisé (pH = 7) par l'ajout d'une solution de NaOH concentrée puis est extrait avec du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La phase organique est séchée et évaporée et le mélange réactionnel obtenu est purifié sur gel de silice (AcOEt/DCM : 3/7). 310 mg de nornitidine **34** sont obtenus (rendement : 92%).

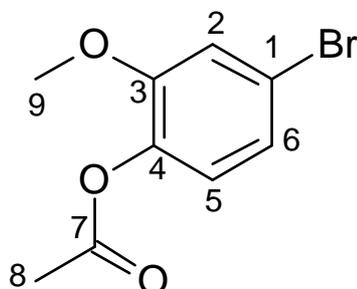
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 4,13 (s, 3H, **H14** ou **H15**) ; 4,20 (s, 3H, **H14** ou **H15**) ; 6,16 (s, 2H, **H13**) ; 7,30 (s, 1H, **H1**) ; 7,43 (s, 1H, **H10**) ; 7,87 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0$  Hz, **H12**) ; 7,93 (s, 1H, **H4**) ; 8,33 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0$  Hz, **H11**) ; 8,75 (s, 1H, **H7**) ; 9,28 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 55,9 (**C14** ou **C15**) ; 56,0 (**C14** ou **C15**) ; 101,0 (**C7**) ; 101,6 (**C13**) ; 101,8 (**C4**) ; 104,7 (**C1**) ; 107,5 (**C10**) ; 118,1 (**C11**) ; 121,9 (**C**) ; 126,2 (**C**) ; 127,2 (**C12**) ; 128,8 (**C**) ; 129,2 (**C**) ; 139,9 (**C**) ; 146,8 (**C**) ; 148,5 (**C**) ; 148,7 (**C6**) ; 149,6 (**C3**) ; 153,1 (**C2**) ppm.

**SM** (ESI) :  $m/z = 334$  ( $\text{MH}^+$ )

## 5.3 Synthèse de la norfagaronine et de la norfagaronine acétylée :

### 5.3.1 4-acétoxy-3-méthoxybromobenzène **167a**



Aspect : Huile incolore

$M_w = 245.070 \text{ g.mol}^{-1}$

Formule :  $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrO}_3$

A une solution de 4-bromoguaiacol **151** (2,58 g ; 12,7 mmol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 mL) est ajouté 1 mL de chlorure d'acétyle (13,97 mmol) à  $0^\circ\text{C}$  sous argon. 2 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$  sont ajoutés lentement à  $0^\circ\text{C}$  et le milieu réactionnel est remonté à TA puis agité pendant 1h. La réaction est arrêtée par l'ajout d'eau distillée, la phase organique est ensuite lavée avec du  $\text{HCl}$  0,01 N, du  $\text{NaHCO}_3$  saturé ainsi que de l'eau distillée. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée pour donner 2,973 g de composé **167a** (rendement : 95%).

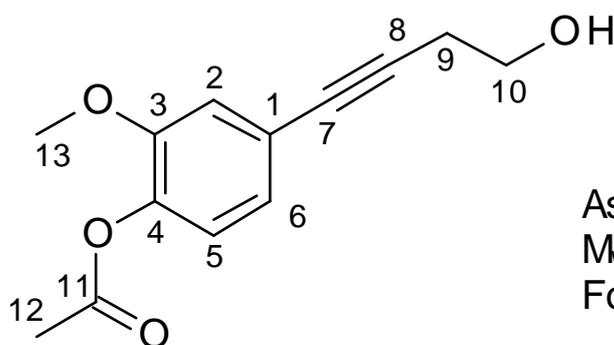
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 2,31$  (s, 3H, **H8**) ; 3,83 (s, 3H, **H9**) ; 6,92 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,8 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{HH}} = 0,8 \text{ Hz}$ , **H6**) ; 7,07-7,11 (m, 2H, **H2** et **H5**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 20,6$  (**C8**) ; 56,1 (**C9**) ; 116,0 (**C5**) ; 119,5 (**C6**) ; 123,7 (**C2**) ; 124,0 (**C1**) ; 139,0 (**C3**) ; 151,8 (**C4**) ; 168,7 (**C7**) ppm.

**SM (IE)** :  $m/z = 244 / 246 : 1/1$  ( $\text{M}^+$ )

**IR** : 1023,6 (Br-Ph) ; 1199,6 et 1219,1 ((C=O)-O) ; 1259,9 (O-CH3) ; 1599,0 (Ph) ; 1768,5 (C=O)  $\text{cm}^{-1}$

### 5.3.2 4-(4-acétoxy-3-méthoxyphényl)-3-butyn-1-ol **168a**



Aspect : solide jaune

$M_w = 234.25 \text{ g.mol}^{-1}$

Formule :  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$

Un mélange de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (77 mg ; 0,105 mmol), de CuI (21 mg ; 0,105 mmol), de composé **167a** (856 mg ; 3,5 mmol) et de 3-butyn-1-ol **164** (270 mg ; 3,85 mmol) est chauffé pendant 1h sous argon au reflux de la DIPA (9 mL), préalablement dégagée. Le milieu réactionnel est refroidi puis filtré. La phase obtenue est lavée deux fois avec du HCl 0,1N puis avec de l'eau distillée (deux fois). La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et concentrée. Le mélange réactionnel obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (AcOEt / CyHex : 4 / 6) et 579 mg de composé **168a** (rendement : 69 %) est obtenu.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 2,32 (s, 3H, **H12**) ; 2,69 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,3 Hz, **H9**) ; 3,80-3,84 (m, 5H, **H10** et **H13**) ; 6,96 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9,0 Hz, **H6**) ; 7,01-7,04 (m, 2H, **H2** et **H5**) ppm.

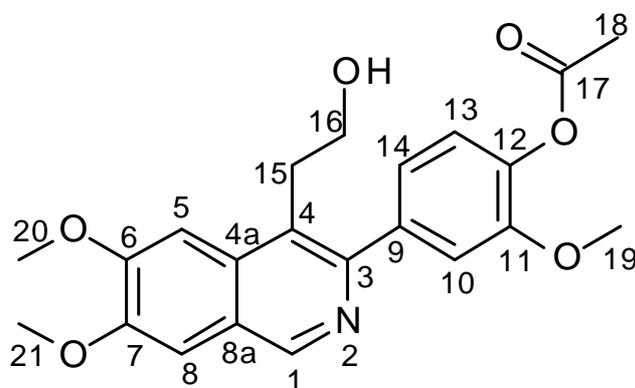
**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 20,6 (**C12**) ; 23,7 (**C9**) ; 55,9 (**C13**) ; 61,1 (**C10**) ; 81,7 (**C7**) ; 86,4 (**C8**) ; 115,6 (**C2**) ; 122,0 (**C1**) ; 122,8 (**C5**) ; 124,4 (**C6**) ; 139,7 (**C4**) ; 150,8 (**C3**) ; 168,9 (**C11**) ppm.

**SM** (IE positif) : m/z = 234 (M<sup>+</sup>)

**SMHR** (ESI, positif) : C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub> calculé/mesuré : 235,0970/235,0971

**IR** : 1015 (CH<sub>2</sub>OH) ; 1034 et 1266 (Ph-O) ; 1165 et 1211 ((C=O)-O) ; 1405 (CH<sub>2</sub>OH) ; 1598 (Ph) ; 1765 (C=O) ; 2235 (triple liaison) ; 2940 (OMe) ; 3412 (CH<sub>2</sub>OH) cm<sup>-1</sup>

### 5.3.3 3-(4-acétoxy-3-méthoxyphényl)-6,7-diméthoxy-4-(2-hydroxyéthyl)-isoquinoléine **169a**



Aspect : solide blanc  
M<sub>w</sub> = 397.42 g.mol<sup>-1</sup>  
Formule : C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>

Dans un ballon sous argon du NiBr<sub>2</sub>(dppe) (70 mg ; 0,111 mmol), de la poudre de zinc (144 mg ; 2,22 mmol), et du composé **99** (335 mg ; 1,11 mmol) sont mélangés. Une solution d'alcyne **168a** (340 mg ; 1,45 mmol) dissout dans de l'ACN (20 mL) fraîchement distillée est ajoutée et le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 2h. Le mélange est refroidi, filtré et concentré. Le mélange réactionnel est purifié plusieurs fois sur gel de silice (AcOEt / DCM : 7/3), 225 mg de composé **169a** (rendement : 51 %) et 180 mg de composé **169b** (rendement : 41 %) sont obtenus.

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 2,33 (s, 3H, **H18**) ; 2,43 (sl, 1H, **OH**) ; 3,27 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,3 Hz, **H15**) ; 3,82 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7,3 Hz, **H16**) ; 3,83 (s, 3H, **H19**) ; 4,04 (s, 3H, **H20** ou **H21**) ; 4,05 (s, 3H, **H20** ou **H21**) ; 7,02-7,08 (m, 2H, **H13**+**H14**) ; 7,15 (d, 1H, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0,9 Hz, **H10**) ; 7,21 (s, 1H, **H8**) ; 7,35 (s, 1H, **H5**) ; 8,92 (s, 1H, **H1**) ppm.

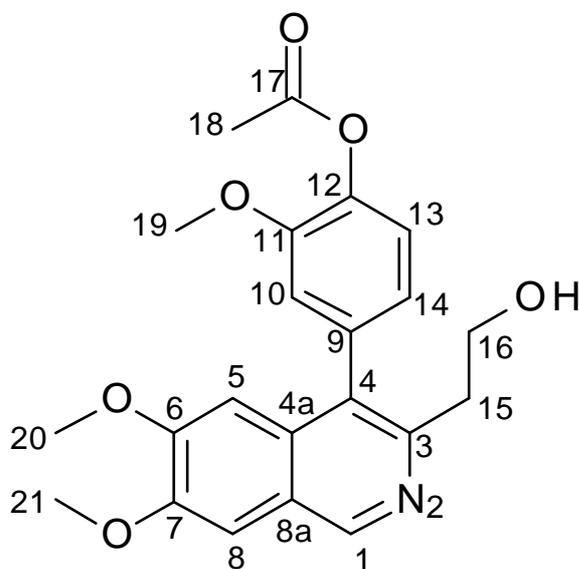
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 20,7$  (C18) ; 32,2 (C15) ; 55,9 (C19) ; 56,1 (C20 ou C21) ; 56,2 (C20 ou C21) ; 62,5 (C16) ; 102,3 (C5) ; 105,9 (C8) ; 114,0 (C10) ; 121,7 (C14) ; 122,3 (C13) ; 124,0 (C4+C4a) ; 132,3 (C8a) ; 139,2 (C12) ; 140,3 (C9) ; 147,9 (C1) ; 150,0 (C6) ; 150,8 (C11) ; 151,4 (C3) ; 153,2 (C7) ; 169,1 (C17) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 398$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) ; 356 ( $\text{M}-\text{Ac}+\text{H}^+$ )

**SMHR** (ESI positif) :  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{NO}_6$  calculé/mesuré : 398,1604/398,1604

**IR** : 1199,6 et 1219,1 ((C=O)-O) ; 1258,4 (O-CH<sub>3</sub>) ; 1581,7 et 1622,8 (Aromatiques) ; 1759,4 (C=O) ; 2900-3554 (OH)

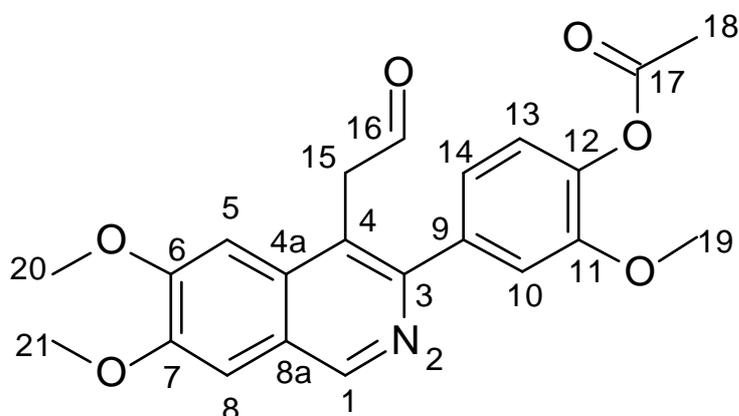
**Composé 169b** : 4-(4-acétoxy-3-méthoxyphényl)-6,7-diméthoxy-3-(2-hydroxyéthyl)-isoquinoléine



**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 2,39$  (s, 3H, H18) ; 3,01 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,5$  Hz, H15) ; 3,80 (s, 3H, H20) ; 3,84 (s, 3H, H19) ; 3,97 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,5$  Hz, H16) ; 4,05 (s, 3H, H21) ; 6,67 (sl, 1H, H5) ; 6,88 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, H14) ; 6,90 (sl, 1H, H10) ; 7,21 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz, 1H, H13) ; 7,28 (s, 1H, H8) ; 9,08 (s, 1H, H1) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 20,7$  (C18) ; 35,6 (C15) ; 56,0 (C19 ou C20 ou C21) ; 56,1 (C19 ou C20 ou C21) ; 56,2 (C19 ou C20 ou C21) ; 62,3 (C16) ; 103,5 (C5) ; 105,5 (C8) ; 114,0 (C10) ; 122,2 (C14) ; 123,0 (C4a ou C8a) ; 123,3 (C13) ; 129,9 (C4) ; 133,1 (C4a ou C8a) ; 135,4 (C12) ; 139,6 (C9) ; 148,2 (C1) ; 148,6 (C3) ; 150,4 (C7) ; 151,6 (C11) ; 154,0 (C6) ; 168,9 (C17) ppm.

### 5.3.4 3-(4-acétoxy-3-méthoxyphényl)-6,7-diméthoxy-4-(2-oxoéthyl)-isoquinoléine **170a**



Aspect : solide marronâtre  
 $M_w = 395.40 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_6$

Une solution de chlorure d'oxalyle (0,20 mL ; 1,61 mmol) dans 6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est refroidie à  $-80^\circ\text{C}$ . Une solution de DMSO (0,32 mL ; 3,22 mmol) dans 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est ajoutée goutte à goutte et le mélange est agité pendant 15 min. Une solution d'alcool **169a** (320 mg ; 0,805 mmol) dans 24 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est ajoutée goutte à goutte et l'agitation est poursuivie pendant 30 min. 2,5 mL de DIPEA (12,08 mmol) sont ajoutés doucement, le milieu est agité pendant 15 min à  $-80^\circ\text{C}$  puis pendant 2h à TA. La réaction est arrêtée avec l'ajout d'eau distillée, la phase organique est récupérée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée. Le mélange réactionnel obtenu est purifié sur gel de silice (AcOEt / CyHex : 7 / 3) pour donner 251 mg de composé **170a** (rendement : 77 %).

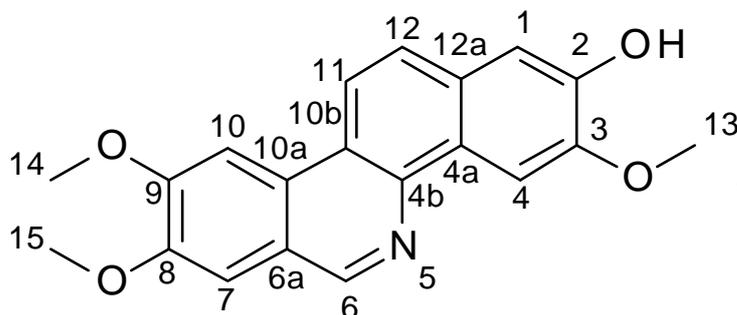
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 2,35$  (s, 3H, **H18**) ; 3,88 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**) ; 4,04 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**) ; 4,07 (s, 3H, **OCH<sub>3</sub>**) ; 4,15 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 1,7 \text{ Hz}$ , **H15**) ; 7,00 (s, 1H, **H5**) ; 7,02 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$ ,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9 \text{ Hz}$ , **H14**) ; 7,12 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$ , **H13**), 7,15 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9 \text{ Hz}$ , 1H, **H10**) ; 7,28 (s, 1H, **H8**) ; 9,07 (s, 1H, **H1**) ; 9,84 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 1,7 \text{ Hz}$ , **H16**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 20,7$  (**C18**) ; 45,2 (**C15**) ; 55,9 (**C19**) ; 56,1 (**C20** ou **C21**) ; 56,1 (**C20** ou **C21**) ; 101,9 (**C5**) ; 106,0 (**C8**) ; 113,8 (**C10**) ; 118,2 (**C4**) ; 121,7 (**C14**) ; 122,6 (**C13**) ; 123,8 (**C8a**) ; 132,5 (**C4a**) ; 139,5 (**C12**) ; 139,7 (**C9**) ; 149,17 (**C1**) ; 150,3 (**C6**) ; 151,1 (**C11**) ; 152,1 (**C3**) ; 153,7 (**C7**) ; 169,0 (**C17**) ; 199,2 (**C16**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 396$  ( $\text{MH}^+$ ) ; 354 ( $\text{MH}^+ - \text{Ac}$ )

**SMHR** (ESI positif) :  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_6$  calculé/mesuré : 396,1447/396,1452 ;

**IR** : 1199 et 1215 ((C=O)-O) ; 1259 (O-CH<sub>3</sub>) ; 1580 et 1621 (Aromatiques) ; 1719 (C=O ald) ; 1764 (C=O) ; 2938 (CH ald)  $\text{cm}^{-1}$

5.3.5 Norfagaronine **66**

Aspect : solide marronâtre  
 $M_w = 335.35 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_4$

**Procédure générale A :** Une solution d'aldéhyde **170a** et d'acide dans de l'acide acétique est chauffée au reflux pendant 30 min. Le milieu réactionnel est neutralisé avec de la soude en solution jusqu'à pH = 8 puis est extrait avec du  $\text{CHCl}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée.

**HBr 40 % :** aldéhyde **170a** (40 mg ; 0,101 mmol), acide acétique (1 mL), acide bromhydrique 40 % (1 mL). La réaction fournit 30,2 mg de norfagaronine **66** (rendement : 90 %).

**$\text{H}_2\text{SO}_4$  96 % :** aldéhyde **170a** (28,4 mg ; 0,072 mmol), acide acétique (1 mL), acide sulfurique 96 % (1 mL). La réaction fournit 18 mg de norfagaronine **66** (rendement : 75 %).

**Procédure générale B :** L'aldéhyde **170a** est dissout dans du trichloroéthane, l'acide de lewis est ajouté et le milieu réactionnel est agité à  $120^\circ\text{C}$  pendant 2h. Le milieu réactionnel est filtré puis lavé avec du HCl 1N. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et le brut est concentré sous vide. Le mélange réactionnel est purifié sur gel de silice pour donner un mélange de norfagaronine **66** et de norfagaronine acétylée **171**.

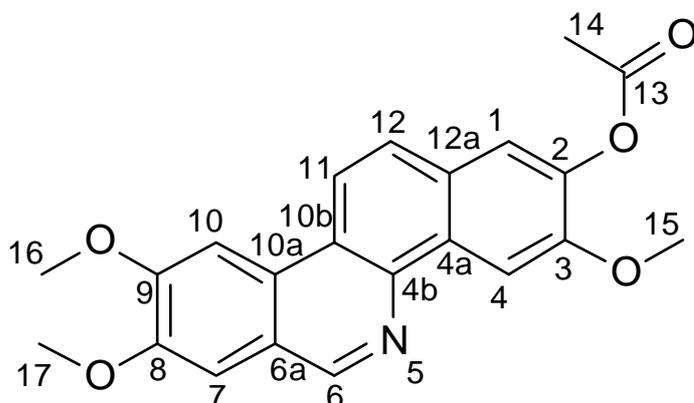
**$\text{FeCl}_3$  :** aldéhyde **170a** (20 mg ; 0,05 mmol), trichloroéthane (2 mL) and  $\text{FeCl}_3$  (9,1 mg). La réaction fournit 3,5 mg de norfagaronine **66** (rendement : 21 %) and 2,8 mg de norfagaronine acétylée **171** (rendement : 15 %).

**Résine Amberlyst 15 :** aldéhyde **170a** (15 mg ; 0,0375 mmol), trichloroéthane (1,5 mL) and amberlyst 15 (6,6 mg). La réaction fournit 1,8 mg de norfagaronine acétylée **171** (rendement : 13 %).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  : 2/1) :  $\delta = 4,03$  (s, 3H, **H13**) ; 4,10 (s, 3H, **H14** ou **H15**) ; 4,12 (s, 3H, **H14** ou **H15**) ; 7,31 (s, 1H, **H1**) ; 7,34 (s, 1H, **H10**) ; 7,74 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,9$  Hz, 1H, **H11** ou **H12**) ; 7,81 (s, 1H, **H4**) ; 8,18 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,9$  Hz, 1H, **H11** ou **H12**) ; 8,58 (s, 1H, **H7**) ; 9,13 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  : 2/1) :  $\delta = 55,9$  (**C13** ou **C15**) ; 55,9 (**C14**) ; 56,0 (**C13** ou **C15**) ; 101,5 (**C7**) ; 103,7 (**C**) ; 107,2 (**C4**) ; 110,5 (**C1**) ; 117,8 (**C10**) ; 119,6 (**C11**) ; 121,9 (**C**) ; 126,2 (**C**) ; 126,6 (**C12**) ; 128,8 (**C**) ; 129,2 (**C**) ; 139,9 (**C**) ; 146,8 (**C**) ; 148,5 (**C**) ; 149,2 (**C6**) ; 149,6 (**C3**) ; 153,1 (**C**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 336$  ( $\text{MH}^+$ )

5.3.6 2-O-acétyl-norfagaronine **171**

Aspect : solide marronâtre  
 $M_w = 377.39 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_5$

50 mg de norfagaronine **66** (0,15 mmol) sont dissout dans 2 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sous argon à  $0^\circ\text{C}$  puis 120  $\mu\text{L}$  de chlorure d'acétyle sont ajouté goutte à goutte. Après 15 min d'agitation est ajoutée doucement 0,5 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$ . Le milieu réactionnel est laissé remonter à TA puis agité pendant 1h. La réaction est arrêtée avec ajout d'eau, puis la phase organique est lavée successivement par du HCl 0,01 N, du  $\text{NaHCO}_3$  saturée puis de l'eau distillée. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée afin de fournir 56 mg de fagaronine acétylée **171** (rendement quantitatif).

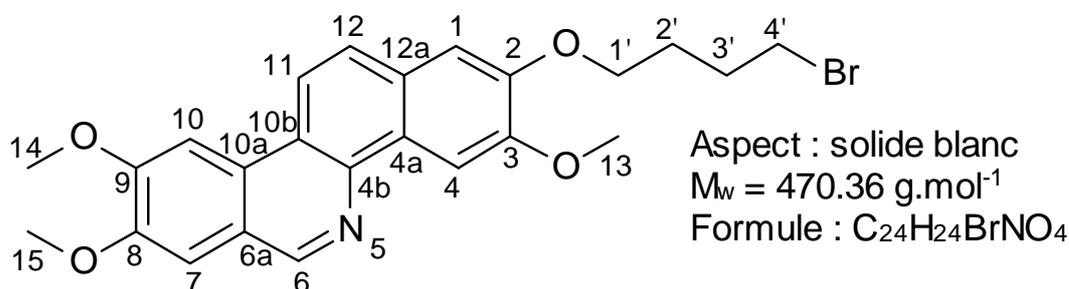
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 2,43$  (s, 3H, **H14**) ; 4,10 (s, 3H, **H15**) ; 4,15 (s, 3H, **H16** ou **H17**) ; 4,18 (s, 3H, **H16** ou **H17**) ; 7,37 (s, 1H, **H1**) ; 7,61 (s, 1H, **H10**) ; 7,82 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,1 \text{ Hz}$ , 1H, **H11**) ; 7,85 (s, 1H, **H4**) ; 8,22 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,1 \text{ Hz}$ , 1H, **H12**) ; 8,83 (s, 1H, **H7**) ; 9,24 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 20,8$  (**C14**) ; 56,2 (**C15**) ; 56,3 (**C16** ou **C17**) ; 56,4 (**C16** ou **C17**) ; 101,8 (**C4**) ; 105,5 (**C7**) ; 107,3 (**C1**) ; 118,1 (**C12**) ; 120,6 (**C10**) ; 121,0 (**C10a**) ; 122,2 (**C12a**) ; 126,8 (**C11**) ; 127,4 (**C4b**) ; 128,8 (**C6a**) ; 141,0 (**C2**) ; 146,8 (**C4a**) ; 148,5 (**C10b**) ; 148,8 (**C6**) ; 150,2 (**C3**) ; 151,1 (**C8**) ; 153,3 (**C9**) ; 169,2 (**C13**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 378$  ( $\text{MH}^+$ )

## 5.4 Synthèse des dérivés de la norfagaronine :

### 5.4.1 2-O-(4'-bromobutyl)-norfagaronine **158**



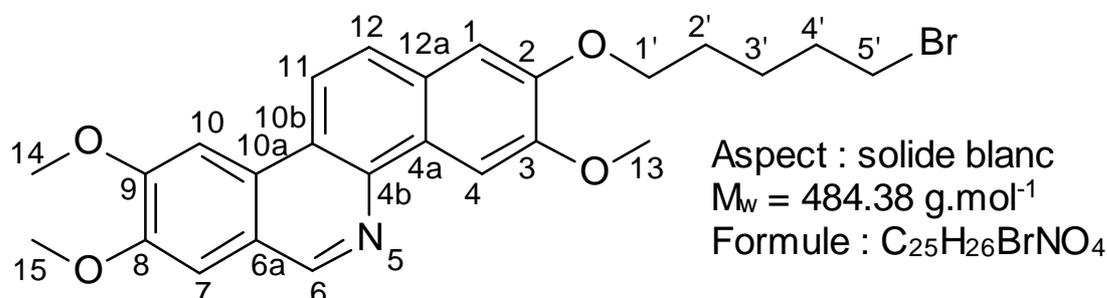
La norfagaronine **66** (50 mg ; 0,15 mmol) est dissoute dans 2 mL d'acétone anhydre. Le 1,4-dibromobutane (324 mg ; 1,5 mmol) est ajouté ainsi que du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (50 mg). Le milieu réactionnel est agité sous argon à température ambiante pendant 24h. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau distillée et le produit est extrait avec du  $\text{CHCl}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée sous vide. Le mélange réactionnel est lavé avec du cyclohexane afin d'éliminer le dibromobutane en excès. 45 mg de produit sont obtenus (rendement : 64%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 2,13\text{-}2,22$  (m, 4H, **H2'** et **H3'**) ; 3,58 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3 \text{ Hz}$ , 2H, **H4'**) ; 4,12 (s, 3H, **H14**) ; 4,19 (s, 3H, **H15**) ; 4,20 (s, 3H, **H13**) ; 4,27 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,2 \text{ Hz}$ , 2H, **H1'**) ; 7,31 (s, 1H, **H1**) ; 7,42 (s, 1H, **H10**) ; 7,87 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0 \text{ Hz}$ , 1H, **H12**) ; 7,93 (s, 1H, **H7**) ; 8,32 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0 \text{ Hz}$ , 1H, **H11**) ; 8,75 (s, 1H, **H4**) ; 9,28 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 27,8$  (**C2'** ou **C3'**) ; 29,5 (**C2'** ou **C3'**) ; 33,5 (**C4'**) ; 56,1 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 56,2 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 56,2 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 67,9 (**C1'**) ; 101,6 (**C7**) ; 104,4 (**C4**) ; 107,3 (**C10**) ; 108,4 (**C1**) ; 118,0 (**C11**) ; 119,8 (**C10b**) ; 122,1 (**C6a**) ; 126,2 (**C12**) ; 127,5 (**C12a**) ; 128,1 (**C4a**) ; 129,0 (**C10a**) ; 140,1 (**C4b**) ; 149,3 (**C2**) ; 149,5 (**C6**) ; 149,7 (**C9**) ; 150,2 (**C3**) ; 153,0 (**C8**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 470 / 472 : 1/1$  ( $\text{MH}^+$ )

### 5.4.2 2-O-(5'-bromopentyl)-norfagaronine **159**



La norfagaronine **66** (40 mg ; 0,12 mmol) est dissoute dans 2 mL d'acétone anhydre. Le 1,5-dibromopentane (276 mg ; 1,2 mmol) est ajouté ainsi que du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (40 mg). Le milieu réactionnel est agité sous argon à température ambiante pendant 24h. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau

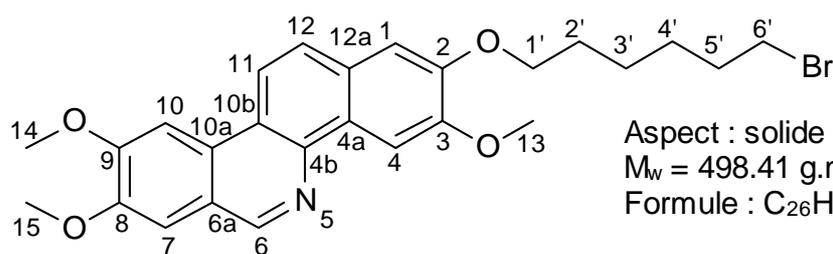
distillée et le produit est extrait avec du  $\text{CHCl}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée sous vide. Le mélange réactionnel est lavé avec du cyclohexane afin d'éliminer le dibromopentane en excès. 35 mg de produit sont obtenus (rendement : 61%).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,7\text{-}1,8$  (m, 2H, **H3'**) ; 2,03 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7$  Hz, 4H, **H2'** et **H4'**) ; 3,5 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,9$  Hz, 2H, **H5'**) ; 4,12 (s, 3H, **H14**) ; 4,19 (s, 3H, **H15**) ; 4,20 (s, 3H, **H13**) ; 4,25 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,7$  Hz, 2H, **H1'**) ; 7,31 (s, 1H, **H1**) ; 7,43 (s, 1H, **H10**) ; 7,88 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0$  Hz, 1H, **H12**) ; 7,93 (s, 1H, **H7**) ; 8,33 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0$  Hz, 1H, **H11**) ; 8,75 (s, 1H, **H4**) ; 9,29 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 27,8$  (**C2'** ou **C3'**) ; 29,5 (**C2'** ou **C3'**) ; 33,5 (**C4'**) ; 33,6 (**C5'**) ; 56,1 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 56,2 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 56,2 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 67,9 (**C1'**) ; 101,6 (**C7**) ; 104,4 (**C4**) ; 107,3 (**C10**) ; 108,4 (**C1**) ; 118,0 (**C11**) ; 119,8 (**C10b**) ; 122,1 (**C6a**) ; 126,2 (**C12**) ; 127,5 (**C12a**) ; 128,1 (**C4a**) ; 129,0 (**C10a**) ; 140,1 (**C4b**) ; 149,3 (**C2**) ; 149,5 (**C6**) ; 149,7 (**C9**) ; 150,2 (**C3**) ; 153,0 (**C8**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 484 / 487 : 1/1$  ( $\text{MH}^+$ )

### 5.4.3 2-O-(6'-bromohexyl)-norfagaronine **160**



Aspect : solide blanc  
 $M_w = 498.41$  g.mol $^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{BrNO}_4$

La norfagaronine **66** (50 mg ; 0,15 mmol) est dissoute dans 2 mL d'acétone anhydre. Le 1,6-dibromohexane (366 mg ; 1,5 mmol) est ajouté ainsi que du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (50 mg). Le milieu réactionnel est agité sous argon à température ambiante pendant 24h. La réaction est arrêtée en ajoutant de l'eau distillée et le produit est extrait avec du  $\text{CHCl}_3$ . La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée sous vide. Le mélange réactionnel est lavé avec du cyclohexane afin d'éliminer le dibromohexane en excès. 52 mg de produit sont obtenus (rendement : 70%).

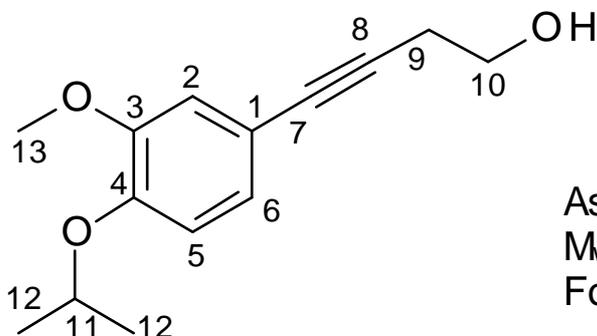
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,58\text{-}1,65$  (m, 4H, **H3'** et **H4'**) ; 1,92-2,05 (m, 4H, **H2'** et **H5'**) ; 3,48 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,7$  Hz, 2H, **H6'**) ; 4,10 (s, 3H, **H14**) ; 4,17 (s, 3H, **H15**) ; 4,20 (s, 3H, **H13**) ; 4,25 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6,7$  Hz, 2H, **H1'**) ; 7,30 (s, 1H, **H1**) ; 7,40 (s, 1H, **H10**) ; 7,86 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,2$  Hz, 1H, **H12**) ; 7,91 (s, 1H, **H7**) ; 8,30 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,2$  Hz, 1H, **H11**) ; 8,74 (s, 1H, **H4**) ; 9,27 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 24,8$  (**C3'**) ; 28,3 (**C2'**) ; 32,5 (**C4'**) ; 33,6 (**C5'**) ; 33,9 (**C6'**) ; 56,1 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 56,2 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 56,2 (**C13**, **C14** ou **C15**) ; 68,6 (**C1'**) ; 101,6 (**C7**) ; 104,4 (**C4**) ; 107,3 (**C10**) ; 108,3 (**C1**) ; 117,9 (**C11**) ; 119,8 (**C10b**) ; 122,1 (**C6a**) ; 126,2 (**C12**) ; 127,4 (**C12a**) ; 128,2 (**C4a**) ; 129,0 (**C10a**) ; 140,2 (**C4b**) ; 149,4 (**C2**) ; 149,6 (**C6**) ; 149,7 (**C9**) ; 150,2 (**C3**) ; 153,0 (**C8**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 498 / 500 : 1/1$  ( $\text{MH}^+$ )

## 5.5 Synthèse de la fagaronine et de ses dérivés :

### 5.5.1 4-(4-isopropoxy-3-méthoxyphényl)-3-butyn-1-ol **168b**



Aspect : solide jaune

$M_w = 234.29 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Formule :  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_3$

Un mélange de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$  (210 mg ; 0,3 mmol), de  $\text{CuI}$  (57 mg ; 0,3 mmol), de 4-bromo-1-*O*-isopropylguaïacol (2,43 g ; 9,92 mmol) et de 3-butyn-1-ol **164** (764 mg ; 10,9 mmol) est chauffé pendant 4h sous argon au reflux de la DIPA (8 mL), préalablement dégazée. Le milieu réactionnel est refroidi puis filtré. La phase obtenue est lavée deux fois avec du  $\text{HCl}$  0,1N puis avec de l'eau distillée (deux fois). La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et concentrée. Le mélange réactionnel obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice ( $\text{AcOEt}$  /  $\text{CyHex}$  : 25 / 75 puis 50/50) et 1,76 g de composé **168b** (rendement : 76 %) sont obtenus.

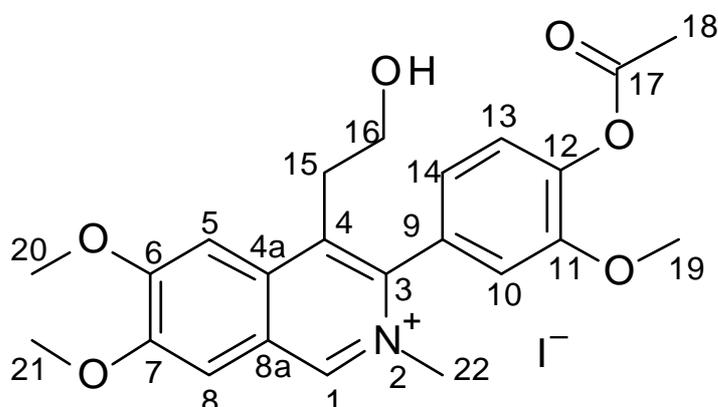
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,39$  (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz, 6H, **H12**) ; 2,70 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,3$  Hz, **H9**) ; 3,83 (m, 2H, **H10**) ; 3,86 (s, 3H, **H13**) ; 4,56 (sept,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz, 1H, **H11**) ; 6,82 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz, **H5**) ; 6,95 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, **H2**) ; 7,00 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,2$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, **H6**) ppm.

**SM** (IE positif) :  $m/z = 234$  ( $\text{M}^+$ )

**SMHR** (ESI, positif) :  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_3$  calculé/mesuré : 235,1336/235,1334

**IR** : 1037 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) ; 1136 et 1172 ( $\text{OiPr}$ ) ; 1109 et 1264 ( $\text{Ph-O}$ ) ; 1412 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) ; 1596 ( $\text{Ph}$ ) ; 2935 (triple liaison) ; 2976 ( $\text{OMe}$ ) ; 3421 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ )  $\text{cm}^{-1}$

### 5.5.2 Iodure de 3-(4-acétoxy-3-méthoxyphényl)-4-(2-hydroxyéthyl)-6,7-diméthoxy-2-méthylisoquinoléinium **173**



Aspect : huile jaune  
 $M_w = 539.36 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{NO}_6.\text{I}$

Le composé **169a** (35 mg ; 0,088 mmol) est dissout dans 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et 60  $\mu\text{L}$  d'iodure de méthyle (125 mg ; 0,88 mmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. Lorsque la réaction est terminée, l'iodure de méthyle et le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sont évaporés sous vide afin d'obtenir 48 mg de produit **173** (rendement quantitatif).

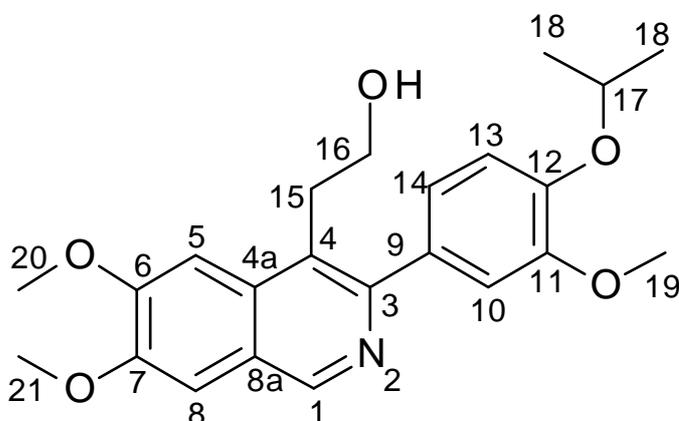
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz, MeOD) :  $\delta = 2,23$  (s, 3H, **H18**) ; 3,04 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, 2H, **H15**), 3,65 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7,2$  Hz, 2H, **H16**) ; 3,78 (s, 3H, **H20**) ; 3,93 (s, 3H, **H19** ou **H21**) ; 3,94 (s, 3H, **H19** ou **H21**) ; 4,03 (s, 3H, **H22**) ; 7,05 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 2,1$  Hz, 1H, **H14**) ; 7,23 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz, 1H, **H13**) ; 7,32 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2,1$  Hz, 1H, **H10**) ; 7,49 (s, 1H, **H8**) ; 7,68 (s, 1H, **H5**) ; 9,43 (s, 1H, **H1**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 24,8$  (**C18**) ; 46,2 (**C15**) ; 50,1 (**C19**) ; 56,1 (**C20** ou **C21**) ; 56,2 (**C20** ou **C21**) ; 56,3 (**C22**) ; 68,6 (**C16**) ; 101,6 (**C1**) ; 104,4 (**C10**) ; 107,3 (**C8**) ; 108,3 (**C13**) ; 117,9 (**C4a** ou **C8a**) ; 119,8 (**C5**) ; 122,1 (**C3**) ; 126,2 (**C9**) ; 127,4 (**C14**) ; 128,2 (**C4**) ; 129,0 (**C4a** ou **C8a**) ; 149,4 (**C11**) ; 149,6 (**C6**) ; 149,7 (**C7**) ; 150,2 (**C12**) ; 153,0 (**C17**) ppm.

**SM** (ESI ionisation positive) :  $m/z = 412$  ( $\text{M}^+$ )

**SM** (ESI ionisation négative) :  $m/z = 127$  (**I**)

### 5.5.3 6,7-diméthoxy-4-(2-hydroxyéthyl)-3-(4-isopropoxyphényl-3-méthoxy)-isoquinoléine **169c**



Aspect : solide blanchâtre  
 $M_w = 397.18 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_5$

L'imine **99** (885 mg, 2,73 mmol) et l'alcyne **168b** (830 mg, 3,55 mmol) sont mis en réaction suivant le protocole de cyclisation décrit p.118. Le mélange réactionnel obtenu est purifié par chromatographie flash sur colonne de silice (acétate d'éthyle /dichlorométhane: 5/5 and 7/3) pour donner 185 mg de composé **169c**, et 562 mg d'un mélange de **169c** et **169d**. L'analyse par RMN  $^1\text{H}$  du mélange montre un ratio **169c/169d** de 67/33 (le rendement global est donc de 69%, et le ratio **169c/169d** de 75/25). A des fins d'analyse, **169d** a pu être précipité de ce mélange à l'aide de dichlorométhane.

Une optimisation de la purification du composé **169c** a été réalisée : le mélange réactionnel a été soumis à une colonne de silice moyenne pression éluée avec un mélange acétone/cyclohexane 60/40 pour donner **169c** avec un rendement de 73%.

**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,41$  (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz, 6H, **H18**) ; 3,34 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, **H15**) ; 3,86 (s, 3H, **H19**) ; 3,87 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,1$  Hz, **H16**) ; 4,04 (s, 3H, **H20** ou **H21**) ; 4,05 (s, 3H, **H20** ou **H21**) ; 4,58 (sept, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz, **H17**) ; 6,93 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz, **H13**) ; 6,99 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,1$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, **H14**) ; 7,06 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 1,8$  Hz, **H10**) ; 7,20 (s, 1H, **H8**) ; 7,36 (s, 1H, **H5**) ; 8,93 (s, 1H, **H1**) ppm.

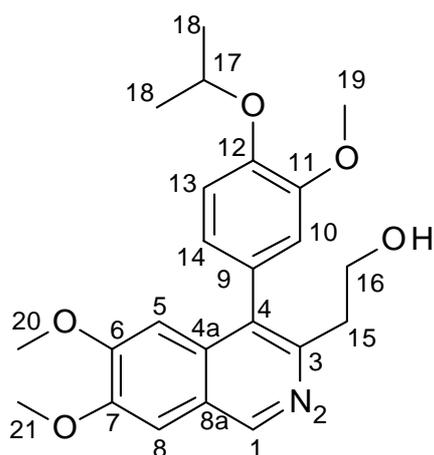
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 22,1$  (**C18**) ; 32,2 (**C15**) ; 56,0 (**CH<sub>3</sub>O**) ; 56,1 (**CH<sub>3</sub>O**) ; 56,2 (**CH<sub>3</sub>O**) ; 62,7 (**C16**) ; 71,5 (**C17**) ; 102,3 (**C5**) ; 105,9 (**C8**) ; 113,5 (**C10**) ; 115,4 (**C13**) ; 121,7 (**C14**) ; 123,7 (**C4** + **C8a**) ; 132,6 (**C4a**) ; 134,2 (**C9**) ; 146,9 (**C12**) ; 147,7 (**C1**) ; 150,0 (**C11** ou **C7**) ; 150,1 (**C11** ou **C7**) ; 151,7 (**C3**) ; 153,3 (**C6**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 398$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) ; 429 ( $\text{M}+\text{MeOH}^+$ )

**SMHR** (ESI positif) :  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{NO}_5$  calculé/ mesuré: 398,1967/398,1962

**IR** : 1138 et 1167 (OiPr) ; 1259 (O-CH<sub>3</sub>) ; 1581,7 et 1622,8 (Aromatiques) ; 2900-3554 (OH)

Composé **169d** : 6,7-diméthoxy-3-(2-hydroxyéthyl)-4-(4-isopropoxyphényl-3-méthoxy)-isoquinoléine

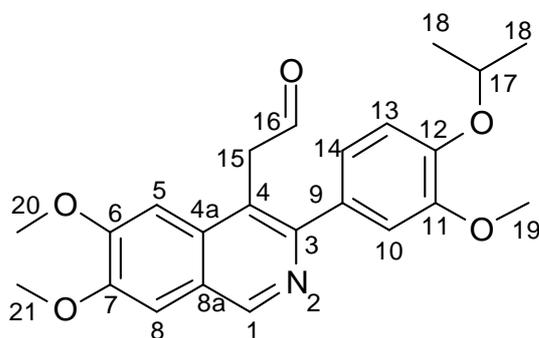


**RMN  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 1,44 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,1$  Hz, 3H, **H18**) ; 1,45 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,1$  Hz, 3H, **H18**) ; 3,25-3,30 (m, 2H, **H15**) ; 3,79 (s, 3H, **H20**) ; 3,83 (s, 3H, **H19**) ; 4,03 (s, 3H, **H21**) ; 4,19-4,24 (m, 2H, **H16**) ; 4,64 (sept, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,1$  Hz, **H17**) ; 6,70 (s, 1H, **H5**) ; 6,76 (d, 1H,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9$  Hz, **H10**) ; 6,77 (dd, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,8$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9$  Hz, **H14**) ; 7,03 (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,8$  Hz, **H13**), 7,36 (s, 1H, **H8**) ; 9,13 (s, 1H, **H1**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 22,1 (**C18**) ; 22,2 (**C18**) ; 33,3 (**C15**) ; 56,2 (**C19** et **C20**) ; 56,5 (**C21**) ; 64,2 (**C16**) ; 71,5 (**C17**) ; 103,9 (**C5**) ; 106,1 (**C8**) ; 113,2 (**C10**) ; 115,4 (**C13**) ; 122,2 (**C14**) ; 123,5 (**C4a** ou **C8a**) ; 127,9 (**C9**) ; 133,0 (**C4**) ; 135,2 (**C4a** ou **C8a**) ; 146,4 (**C3**) ; 147,4 (**C12**) 148,8 (**C1**) ; 150,7 (**C11**) ; 151,2 (**C7**) ; 155,6 (**C6**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 398$  ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>

#### 5.5.4 6,7-diméthoxy-3-(4-isopropoxy-3-méthoxyphényl)-4-(2-oxoéthyl)-isoquinoléine **170b**



Aspect : solide marronâtre  
 $M_w = 395,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{NO}_5$

Une solution de chlorure d'oxalyle (180  $\mu\text{L}$  ; 2,084 mmol) dans 8 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est refroidie à  $-80^\circ\text{C}$ . Une solution de DMSO (300  $\mu\text{L}$  ; 4,168 mmol) dans 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est ajoutée goutte à goutte et le mélange est agité pendant 15 min. Une solution d'alcool **169c** (400 mg ; 1,042 mmol) dans 30 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  est ajoutée goutte à goutte et l'agitation est poursuivie pendant 30 min. 2,7 mL de DIPEA (15,63 mmol) sont ajoutés lentement, le milieu est agité pendant 15 min à  $-80^\circ\text{C}$  puis pendant 2h à TA. La réaction est arrêtée avec l'ajout d'eau distillée, la phase organique est

récupérée, séchée sur  $\text{MgSO}_4$  et concentrée. Le mélange réactionnel obtenu est purifié sur gel de silice (Acétone /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 3 / 7) pour donner 290 mg de composé **170b** (rendement : 72 %).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 1,41 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz, 6H, **H18**) ; 3,88 (s, 3H, **OCH3**) ; 4,02 (s, 3H, **OCH3**) ; 4,05 (s, 3H, **OCH3**) ; 4,14 (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 2,1$  Hz, **H15**) ; 4,60 (sept, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,0$  Hz, **H17**) ; 6,97 (m, 2H, **H13** et **H14**) ; 7,00 (s, 1H, **H5** ou **H8**) ; 7,06 (m, 1H, **H10**), 7,28 (s, 1H, **H5** ou **H8**) ; 9,06 (s, 1H, **H1**) ; 9,82 (t, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 2,1$  Hz, **H16**) ppm.

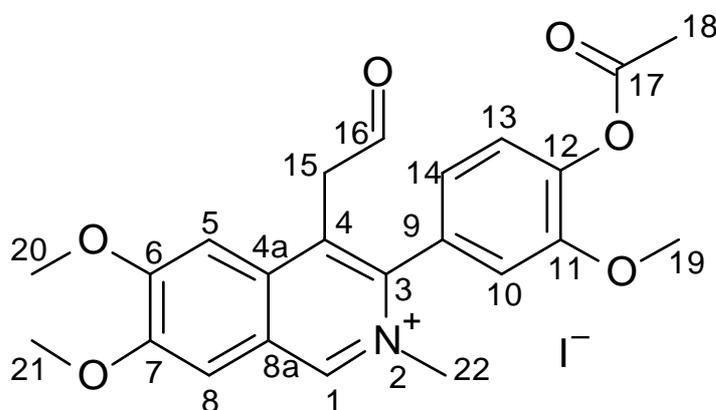
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 22,1 (**C18**) ; 45,3 (**C15**) ; 56,0 (**C19**) ; 56,1 (**C20** ou **C21**) ; 56,1 (**C20** ou **C21**) ; 71,6 (**C17**) ; 101,8 (**C5** ou **C8**) ; 106,1 (**C5** ou **C8**) ; 113,4 (**C10**) ; 115,4 (**C14**) ; 118,1 (**C4**) ; 121,8 (**C13**) ; 123,6 (**C8a**) ; 132,7 (**C4a**) ; 133,6 (**C12**) ; 147,3 (**C9**) ; 148,9 (**C1**) ; 150,2 (**C6**) ; 150,3 (**C11**) ; 152,6 (**C3**) ; 153,8 (**C7**) ; 199,5 (**C16**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 396$  ( $\text{MH}^+$ ) ; 428 ( $\text{M}+\text{MeOH}^+$ )

**SMHR** (ESI positif) :  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{NO}_5$  calculé/ mesuré: 396,1811/396,1815

**IR** : 1137 et 1164 (OiPr) ; 1256 (O-CH3) ; 1581 et 1621 (Aromatiques) ; 1719 (C=O ald) ; 2974 (CH ald)  $\text{cm}^{-1}$

### 5.5.5 Iodure de 3-(4-acétoxy-3-méthoxyphényl)-6,7-diméthoxy-2-méthyl-4-(2-oxoéthyl)-isoquinoléinium **174a**



Aspect : solide orange  
 $M_w = 537.34 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{NO}_6.\text{I}$

Le composé **170a** (40 mg ; 0,101 mmol) est dissout dans 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et 70  $\mu\text{L}$  d'iodure de méthyle (145 mg ; 1,01 mmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. Lorsque la réaction est terminée, l'iodure de méthyle et le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sont évaporés sous vide afin d'obtenir 55 mg de produit **174a** (rendement quantitatif).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 2,35 (s, 3H, **H18**), 3,84 (s, 3H, **H19**) ; 4,04 (s, 3H, **H20** ou **H21**) ; 4,12 (s, 3H, **H20** ou **H21**) ; 4,14 (s, 3H, **H22**) ; 4,24 (sl, 2H, **H15**) ; 6,92 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9$  Hz, 1H, **H14**) ; 7,15 (s, 1H, **H5**) ; 7,18 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 1,9$  Hz, 1H, **H10**) ; 7,22 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0$  Hz, 1H, **H13**) ; 8,00 (s, 1H, **H8**) ; 9,82 (s, 1H, **H16**) ; 10,20 (s, 1H, **H1**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  = 20,6 (**C18**) ; 45,2 (**C15**) ; 47,8 (**C22**) ; 56,7 (**C19**) ; 57,3 (**C20** ou **C21**) ; 57,9 (**C20** ou **C21**) ; 103,1 (**C5**) ; 108,3 (**C8**) ; 113,5 (**C10**) ; 121,3 (**C14**) ; 123,7 (**C8a**) ;

124,3 (C13) ; 127,2 (C4) ; 129,4 (C9) ; 135,6 (C4a) ; 141,7 (C12) ; 143,2 (C3) ; 146,3 (C1) ; 152,3 (C11) ; 152,7 (C6 ou C7) ; 158,7 (C6 ou C7) ; 168,4 (C17) ; 197,2 (C16) ppm.

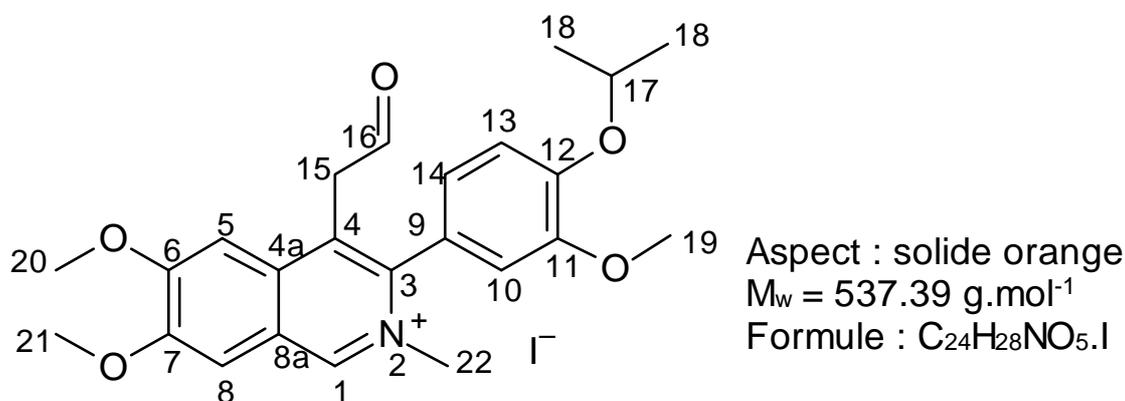
SM (ESI positif) : m/z = 350 (M<sup>+</sup>-Ac), 410 (M<sup>+</sup>), 442 (M<sup>+</sup>+MeOH)

SM (ESI négatif) : m/z = 127 (I<sup>-</sup>)

SMHR (ESI positif) : C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>6</sub> calculé/mesuré : 410,1598/410,1601

IR : 1175 et 1217 ((C=O)-O) ; 1260 (O-CH<sub>3</sub>) ; 1508 et 1613 (Aromatiques) ; 1781 (C=O ald et C=O) ; 2879 (<sup>+</sup>NCH<sub>3</sub>) ; 2981 (CH ald) cm<sup>-1</sup>

### 5.5.6 Iodure de 6,7-diméthoxy-3-(4-isopropoxy-3-méthoxyphényl)-2-méthyl-4-(2-oxoéthyl)-isoquinoléinium **174b**



Le composé **169c** (100 mg ; 0,253 mmol) est dissout dans du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et 160 μL d'iodure de méthyle (360 mg ; 2,53 mmol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 24h. Lorsque la réaction est terminée, l'iodure de méthyle et le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sont évaporés sous vide afin d'obtenir 135 mg de produit (rendement quantitatif).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 1,45 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6,0 Hz, 6H, H18) ; 3,86 (s, 3H, H19) ; 4,08 (s, 3H, H20 ou H21) ; 4,14 (s, 3H, H20 ou H21) ; 4,17 (s, 3H, H22) ; 4,25 (sl, 2H, H15) ; 4,65 (m, 1H, H17) ; 6,86 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2,0 Hz, 1H, H14) ; 6,95 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2,0 Hz, 1H, H10) ; 7,03 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,1 Hz, 1H, H13) ; 7,13 (s, 1H, H5) ; 8,06 (s, 1H, H8) ; 9,86 (s, 1H, H16) ; 10,36 (s, 1H, H1) ppm.

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 22,0 (C18) ; 45,3 (C15) ; 47,6 (C22) ; 56,5 (C19) ; 57,3 (C20 ou C21) ; 57,9 (C20 ou C21) ; 71,5 (C17) ; 102,9 (C5) ; 108,3 (C8) ; 112,4 (C10) ; 114,7 (C13) ; 121,6 (C14) ; 122,6 (C9) ; 123,5 (C8a) ; 127,2 (C4) ; 135,6 (C4a) ; 141,1 (C3) ; 146,1 (C1) ; 149,5 (C12) ; 150,9 (C11) ; 152,6 (C6 ou C7) ; 158,6 (C6 ou C7) ; 197,2 (C16) ppm.

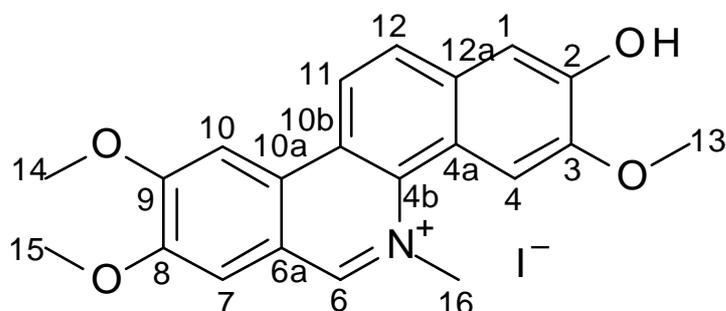
SM (ESI positif) : m/z = 350 : (M<sup>+</sup>-iPr), 410 (M<sup>+</sup>)

SM (ESI négatif) : m/z = 127 (I<sup>-</sup>)

SMHR (ESI positif) : C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>5</sub> calculé/trouvé : 410,1967/410,1965

**IR** : 1141 et 1175 (OiPr) ; 1267 (O-CH<sub>3</sub>) ; 1508 et 1615 (Aromatiques) ; 1718 (C=O ald) ; 2835 (<sup>+</sup>NCH<sub>3</sub>) ; 2977 (CH ald) cm<sup>-1</sup>

### 5.5.7 Iodure de fagaronine **28**



Aspect : solide jaune  
 M<sub>w</sub> = 477.29 g.mol<sup>-1</sup>  
 Formule : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>.I

Le composé **174a** (30 mg ; 0,056 mmol) est dissout dans 0,5 mL de AcOH. 0,3 mL de HBr 40% sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité au reflux pendant une heure. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante. Du MeOH est ajouté afin de faire précipiter la fagaronine, le précipité est filtré et lavé à l'eau puis séché. 16 mg de fagaronine sont obtenus (rendement : 60%).

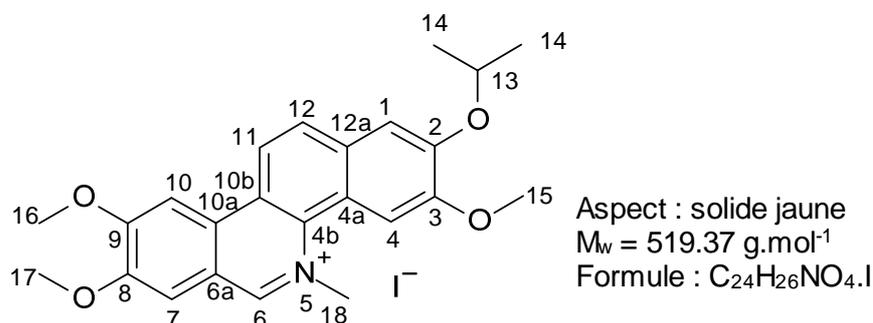
Le composé **174b** (28 mg ; 0.052 mmol) est dissout dans 0,5 mL de AcOH. 0,3 mL de HBr 40% sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité au reflux pendant une heure. Le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante. Du MeOH est ajouté afin de faire précipiter la fagaronine, le précipité est filtré et lavé à l'eau puis séché. 16 mg de fagaronine sont obtenus (rendement : 65%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO) : δ = 4,04 (s, 3H, **H14**) ; 4,10 (s, 3H, **H13** ou **H15**) ; 4,22 (s, 3H, **H13** ou **H15**) ; 5,00 (s, 3H, **H16**) ; 7,60 (s, 1H, **H10**) ; 7,90 (s, 1H, **H4**) ; 8,15 (s, 1H, **H1**) ; 8,17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, 1H, **H12**) ; 8,31 (s, 1H, **H7**) ; 8,80 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8,4 Hz, 1H, **H11**) ; 9,93 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD : 1/1) : δ = 51,9 (**C16**) ; 54,8 (**C13** ou **C15**) ; 55,1 (**C13** ou **C15**) ; 57,5 (**C14**) ; 101,1 (**C7**) ; 108,5 (**C10**) ; 108,9 (**C4**) ; 111,3 (**C1**) ; 118,1 (**C11**) ; 118,7 (**C10b**) ; 120,2 (**C4a**) ; 124,4 (**C12a**) ; 129,8 (**C12**) ; 130,5 (**C10a**) ; 131,8 (**C6a**) ; 141,1 (**C2**) ; 149,6 (**C4b**) ; 150,0 (**C6**) ; 150,5 (**C3**) ; 152,3 (**C9**) ; 159,2 (**C8**) ppm.

**SM** (ESI positif) : m/z = 350 (M<sup>+</sup>), 335 (M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>)

**SM** (ESI négatif) : m/z = 127 (I<sup>-</sup>)

5.5.8 Iodure de 2-O-isopropylfagaronine **175**

Le composé **174b** (50 mg ; 0,093 mmol) est dissout dans 1 mL de AcOH. 0,5 mL de HBr 40% sont ajouté et le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une heure. Du MeOH est ajouté afin de faire précipiter la fagaronine isopropylée, le précipité est filtré et lavé à l'eau distillée puis séché. 36 mg de fagaronine isopropylée sont obtenus (rendement : 75%).

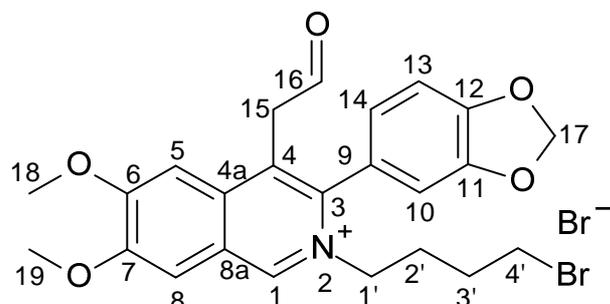
**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ ) :  $\delta = 1,52$  (d, 6H,  $^3J_{\text{HH}} = 5 \text{ Hz}$  ; **H14**) ; 4,16 (s, 6H, **H15** et **H16**) ; 4,30 (s, 3H, **H17**) ; 4,94 (sept, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 5 \text{ Hz}$ , **H13**) ; 5,05 (s, 3H, **H18**) ; 7,60 (s, 1H, **H1**), 7,84 (s, 1H, **H4** ou **H10**), 8,10 (s, 1H, **H4** ou **H10**), 8,20 (s, 1H, **H7**), 8,22 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0 \text{ Hz}$ , 1H, **H12**), 8,65 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9,0 \text{ Hz}$ , 1H, **H11**), 9,71 (s, 1H, **H6**) ppm.

**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 21,1$  (**C14**) ; 50,9 (**C18**) ; 55,9 (**C15** ou **C16**) ; 56,1 (**C15** ou **C16**) ; 56,7 (**C17**) ; 71,3 (**C13**) ; 102,3 (**C7**) ; 107,5 (**C4** ou **C10**) ; 108,1 (**C4** ou **C10**) ; 110,7 (**C1**) ; 118,1 (**C11**) ; 118,7 (**C10b**) ; 120,2 (**C4a**) ; 124,4 (**C12a**) ; 129,8 (**C2**) ; 130,5 (**C12**) ; 131,7 (**C10a**) ; 133,1 (**C6a**) ; 149,6 (**C4b**) ; 150,0 (**C6**) ; 150,5 (**C3**) ; 152,3 (**C9**) ; 159,2 (**C8**) ppm.

**SM** (ESI positif) :  $m/z = 392$  ( $\text{M}^+$ ), 349 ( $\text{M}^+ - \text{iPr}$ )

## 5.6 Synthèse des dérivés de la nitidine :

### 5.6.1 Bromure de 2-(4'-bromobutyl)-6,7-diméthoxy-3-(3,4-méthylènedioxyphényl)-4-(2-oxoéthyl)-isoquinoléinium **182**

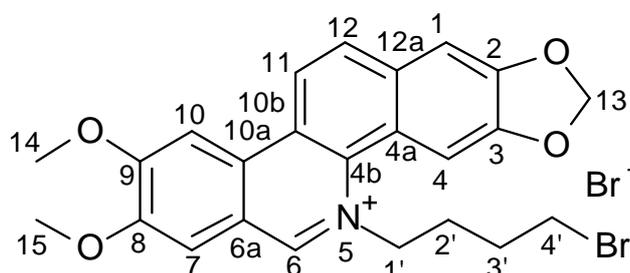


Aspect : huile marron  
 $M_w = 567.27 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{BrNO}_5.\text{Br}$

10 mg de composé **103** (0,028 mmol ; 1 éq) sont dissous dans 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . 5 éq de dibromobutane (0,14 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous argon pendant 48h. 2 mL de cyclohexane sont ajoutés afin de faire précipiter les composés **103** et **182**. Le mélange réactionnel est filtré puis purifié sur gel de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : 100 % puis  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  : 95 / 5). 8 mg de composé **182** sont obtenus (rendement : 50 %).

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta = 1,85\text{-}1,92$  (m, 2H, **H2'** ou **H3'**) ;  $2,00\text{-}2,10$  (m, 2H, **H2'** ou **H3'**) ;  $3,33$  (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 5,1 \text{ Hz}$ , **H4'**) ;  $4,10$  (s, 3H, **H18** ou **H19**) ;  $4,17$  (s, 3H, **H18** ou **H19**) ;  $4,26$  (d, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 5,1 \text{ Hz}$ , **H15**) ;  $4,57\text{-}4,70$  (m, 2H, **H1'**) ;  $6,15$  (s, 2H, **H17**) ;  $6,79$  (s, 1H, **H10**) ;  $6,80$  (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0 \text{ Hz}$ , **H13** ou **H14**) ;  $7,01$  (d, 1H,  $^3J_{\text{HH}} = 8,0 \text{ Hz}$ , **H13** ou **H14**) ;  $7,23$  (s, 1H, **H5** ou **H8**) ;  $8,10$  (s, 1H, **H5** ou **H8**) ;  $9,84$  (s, 1H, **H16**) ;  $10,79$  (s, 1H, **H1**) ppm.

### 5.6.2 Bromure de N-(4'-bromobutyl)-nornitidinium **155**



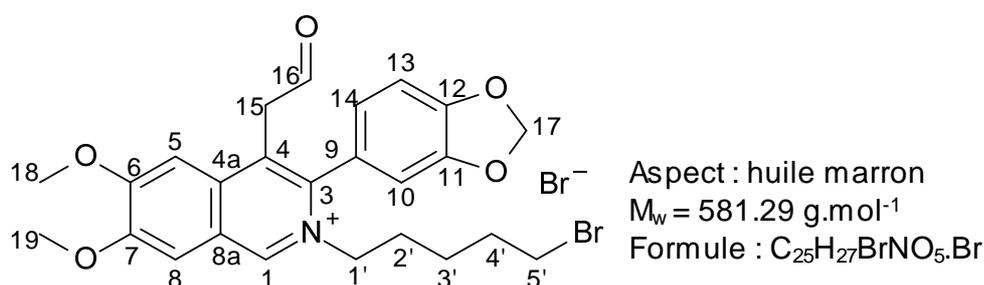
Aspect : solide jaune  
 $M_w = 549.25 \text{ g.mol}^{-1}$   
 Formule :  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{BrNO}_4.\text{Br}$

8 mg de composé **182** (0,014 mmol) est dissous dans 1 mL de AcOH. 1mL de HBr à 40% est ajouté et le mélange réactionnel est chauffé à  $40^\circ\text{C}$  pendant 1h. Un précipité se forme et la réaction est arrêtée. Le mélange réactionnel est filtré et lavé avec  $\text{H}_2\text{O}$  et MeOH. 5 mg de composé **155** sont obtenus (rendement : 65%).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO) :  $\delta$  = 1,71-1,77 (m, 2H, **H3'**) ; 2,19-2,25 (m, 2H, **H2'**) ; 4,05-4,15 (m, 2H, **H4'**) ; 4,08 (s, 3H, **H14** ou **H15**) ; 4,26 (s, 3H, **H14** ou **H15**) ; 5,26-5,32 (m, 2H, **H1'**) ; 6,37 (s, 2H, **H13**) ; 7,81 (s, 1H) ; 8,00 (s, 1H) ; 8,07 (s, 1H) ; 8,32 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9 Hz, **H11** ou **H12**) ; 8,41 (s, 1H, **H**) ; 8,94 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9 Hz, **H11** ou **H12**) ; 10,05 (s, 1H, **H6**) ppm.

**SM** (ESI positif) : m/z = 468/470 : 1/1 (M<sup>+</sup>), 334 (M-bromobutyl+H)<sup>+</sup>

### 5.6.3 Bromure de 2-(5'-bromopentyl)-6,7-diméthoxy-3-(3,4-méthylènedioxyphényl)-4-(2-oxoéthyl)-isoquinoléinium **183**



10 mg de composé **103** (0,028 mmol ; 1 éq) sont dissous dans 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. 5 éq de dibromobutane (0,14 mmol) sont ajoutés et le mélange réactionnel est agité à température ambiante sous argon pendant 48h. 2 mL de cyclohexane sont ajoutés afin de faire précipiter les composés **103** et **183**. Le mélange réactionnel est filtré puis purifié sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : 100 % puis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH : 95 / 5). 6 mg de composé **183** sont obtenus (rendement : 37 %).

**RMN <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 1,35-1,46 (m, 2H, **H3'**) ; 1,66-1,79 (m, 2H, **H4'**) ; 1,85-1,93 (m, 2H, **H2'**) ; 3,31 (t, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,1 Hz, **H5'**) ; 4,09 (s, 3H, **H18**) ; 4,14 (s, 3H, **H19**) ; 4,30 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,1 Hz, **H15**) ; 4,47-4,57 (m, 2H, **H1'**) ; 6,15 (s, 2H, **H17**) ; 6,77 (s, 1H, **H10**) ; 6,78 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,0 Hz, **H14**) ; 6,98 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5,0 Hz, **H13**) ; 7,28 (s, 1H, **H5** ou **H8**) ; 8,14 (s, 1H, **H5** ou **H8**) ; 9,81 (s, 1H, **H16**) ; 10,64 (s, 1H, **H1**) ppm.

**MS** (ESI ionisation positive) : m/z = 352 (MH-bromopentyl<sup>+</sup>), 421 (M-Br<sup>+</sup>), 500/502 : 1/1 (M<sup>+</sup>), 532 (M+MeOH<sup>+</sup>)

## 5.7 Culture cellulaire

### 5.7.1 *Plasmodium falciparum*

Selon la méthode développée par Trager et Jensen.<sup>159</sup>

La culture de *P. falciparum* intra-érythrocytaire nécessite un changement journalier du milieu nutritif afin que les cellules ne manquent pas de nutriments et que le pH reste dans les limites de leur survie (7,2). En effet, lors de leur croissance, les parasites produisent une quantité importante d'acide lactique qui abaisse le pH. Une épaisseur de milieu défini (1 cm) doit recouvrir le tapis cellulaire pour que les échanges gazeux entre l'air environnant, enrichi à 5% de CO<sub>2</sub> dans l'incubateur, et la culture soit optimal et ne modifie pas le pH. La culture est maintenue à une température de 37°C dans l'incubateur. Pour un bon développement des parasites, la parasitémie est maintenue à 2%. Un frottis sanguin est réalisé tous les jours et est coloré au Diff-Quick ou au Giemsa. La parasitémie est déterminée par comptage du nombre de parasite pour 500 globules rouges au microscope à immersion. Si la parasitémie est supérieure à 2%, elle est abaissée en divisant le culot globulaire et en y ajoutant des globules rouges non parasités. Pendant le week-end, la parasitémie est ramenée à 0,7%. Le changement de milieu se fait toutes les 24 heures en centrifugeant (800 g) la culture pour remettre une partie du culot globulaire parasité dans un nouveau milieu complet.

**Tableau 44 : Composition du milieu de culture des parasites *P. falciparum***

	Boîtes 25 cm <sup>2</sup>	Boîtes 75 cm <sup>2</sup>
RPMI 1640	9 mL	27 mL
SHAB 7%	700 µL	2,1 mL
L-Glutamine 1mM	100 µL	300 µL
Globule rouges totaux 4%	400 µL	1,2 mL

### 5.7.2 Cellules de mammifères

#### 5.7.2.1 MCF-7

MCF-7 est une lignée de cellules tumorales mammaires. Les MCF-7 se cultivent dans du milieu DMEM enrichi à 10% en sérum de veau foetal (SVF). Deux fois par semaine, quand les cellules sont confluentes, il faut les passer, c'est-à-dire les décoller de leur support afin de les reprendre pour réaliser d'autres cultures ou des tests.

Le passage s'effectue en ajoutant sur le tapis cellulaire 3 ml de trypsine-EDTA en laissant incubé 3 minutes à 37°C. La trypsine-EDTA permet de casser les liaisons entre les cellules et leur support et de les récupérer en suspension. La réaction est arrêtée par ajout de DMEM avec sérum.

Le nombre de cellules est ensuite compté sur cellule de Malassez. Une coloration au bleu Trypan est effectuée afin de déterminer le pourcentage de cellules mortes (qui ne devrait pas dépasser 30%).

Les cellules sont réensemencées au nombre de 3 millions par boîte de 75 cm<sup>2</sup> dans 30 ml de DMEM + 10% SVF et placées dans l'incubateur (37°C, air humidifié, 5% CO<sub>2</sub>).

### 5.7.2.2 VERO

Les VERO sont des cellules épithéliales de rein de singe. Elles se cultivent de la même façon que les MCF-7, mais dans du milieu EMEM complété de 10% de SVF, de 5 mL de NEAA (acides aminés non essentiels) 50x, de 5 mL de solution de pyruvate de sodium à 200 mM, de 12,5 mL d'HEPES et de 10 mL de L-glutamine.

### 5.7.2.3 THP1

Les THP1 sont dénombrés sur une cellule de Malassez. La culture estensemencée dans une plaque 96 puits à raison de  $2 \cdot 10^4$  cellules par puits dans 100  $\mu$ L de milieu. Afin de déclencher la transformation de monocytes en macrophages on ajoute 40 ng.mL<sup>-1</sup> de PMA puis les plaques sont incubées pendant 48h. La culture de monocytes est maintenue à  $36 \pm 1$  °C dans un air humidifié enrichi en CO<sub>2</sub> (5%) en utilisant comme milieu de culture le RPMI supplémenté avec 10% de SVF.

### 5.7.3 *Leishmania* sp. : Amastigotes axéniques

Les évaluations d'activité antileishmanienne effectuées sur des cultures d'amastigotes axéniques permettent l'obtention des résultats sur la phase responsable des différentes manifestations cliniques chez l'hôte vertébré. En effet, la forme amastigote se développe à l'intérieur des macrophages. Ils sont adaptés à la vie intracellulaire et de forme ronde ou ovale. La culture des amastigotes axéniques imite parfaitement les conditions biologiques observées *in vivo* c'est-à-dire à l'intérieur du macrophage (pH acide et température supérieure à 32°C).

Les évaluations biologiques ont été réalisées sur des amastigotes axéniques de *L. amazonensis*. Les parasites sont maintenus par repiquages tout les cinq jours en utilisant le milieu MAA/20 avec un pH de 5,8 (Milieu de croissance Axénique pour Amastigote). Ce milieu est préparé à partir du milieu modifié 199 (Gibco BRL) supplémenté avec 0,5% de Trypto Caséine de Soja, 15 mM de D-Glucose, 5 mM de L-Glutamine, 25 mM d'HEPES, 4 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 0,023 mM d'hémine et 20% de sérum bovin fœtal. Les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* sont maintenus à  $32 \pm 1$  °C à saturation de vapeur d'eau et CO<sub>2</sub> (5%).<sup>160</sup>

## 5.8 Mesure de la parasitémie (Plasmodium)

---

### 5.8.1 Frottis

Pour réaliser un frottis, la culture doit être tout d'abord homogénéisée. 100 µl sont prélevés et centrifugés (mini-centrifugeuse 800 g). Le culot est repris dans un volume égal de surnageant. Enfin 5 µl sont étalés sur lame à l'aide d'une autre lame et séchés avec le sèche-cheveux.

Pour les tests *in vivo*, la queue des souris est coupée tout au bout. Une goutte de sang est prélevée, déposée sur une lame puis étalée à l'aide d'une autre lame.

### 5.8.2 Coloration

Une coloration du frottis sanguin est nécessaire afin de discerner les globules rouges sains de ceux parasités.

Le Giemsa est un colorant neutre composé d'un colorant acide (éosinate azur) et de colorants basiques (violet de méthyle, bleu de méthyle et azur de méthyle) précipitant dans l'eau. Le précipité obtenu est un colorant neutre insoluble dans l'eau mais soluble dans l'alcool méthylique. Le colorant neutre n'est pas actif en solution alcoolique mais il l'est quand il est libéré dans l'eau et cette libération se traduit par sa précipitation. Les protozoaires dissocient le colorant neutre : les noyaux (ADN) se colorent en rouge tandis que les cytoplasmes se colorent en bleu.

Préparation du Giemsa :

0,76 g de Giemsa solide sont pesés puis dissous dans 50 mL de glycérol chauffé à 60°C. Le mélange est refroidi à température ambiante puis 50 mL de méthanol sont ajoutés. Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante à l'abri de la lumière.

La solution de Giemsa est diluée dans du tampon phosphate pH 7,2 juste avant son utilisation.

Le tampon phosphate pH 7,2 est préparé selon le protocole suivant : 0,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 0,75 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  sont dissous dans 1 L d'eau millipore.

Le Diff-Quick commercial repose sur le même principe que le Giemsa, sauf que les 2 colorants acide et basique sont séparés. Il permet une coloration rapide des frottis.

Avant fixation, les frottis sont fixés au méthanol sous une hotte pendant plus d'une minute

Les lames sont ensuite colorées dans une solution de Giemsa diluée extemporanément à 10% dans du tampon phosphate pH 7,2 pendant 1h (fixation longue) ou à l'aide du Diff-Quick (fixation rapide). Dans le cas de la coloration au Diff-Quick, les lames sont trempées successivement dans le colorant acide puis le colorant basique.

Les lames sont ensuite lavées à grande eau et séchées à l'air libre.

Pour des raisons pratiques, le colorant Giemsa a été utilisé pour la coloration d'un grand nombre de lames (pour les tests *in vivo*) tandis que le Diff-Quick a été utilisé pour colorer de petites quantités de lames (moins d'une dizaine).

### 5.8.3 Microscopie optique

Les frottis colorés sont observés au microscope optique à immersion à un grossissement x1000.

Sur des champs pris au hasard, le nombre total de globules rouges est compté ainsi que le nombre de globules rouges parasités. En routine, on dénombre au moins 500 globules rouges pour évaluer la parasitémie. Lors de test d'activité antipaludique, on en compte entre 1000 et 5000.

$$\text{Parasitémie} = \text{Nb de GRP} / (\text{Nb de GRNP} + \text{Nb de GRP})$$

## 5.9 Tests antipaludiques in vitro

L'activité antipaludique des différents produits est évaluée par la microméthode radioactive décrite par Desjardin et al.<sup>161</sup> Le test est réalisé sur des plaques de culture à 96 puits sur des cultures principalement au stade anneau. Les parasites sont mis en contact avec les produits pendant 48h à 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). La croissance du parasite est estimée par le test d'incorporation d'hypoxanthine tritiée.

L'hypoxanthine est un acide nucléique s'incorporant naturellement à l'ADN. Son marquage au tritium permet de rendre compte de la croissance des cellules du fait de son incorporation à l'ADN dans les cellules vivantes. Les valeurs de CI<sub>50</sub> sont déterminées graphiquement sur les courbes des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.

Tableau 45 : Plan type d'une plaque 96 puits

		produit 1			produit 2			produit 3				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		GRP	100			100			100			
C		GRP	10			10			10			
D		GRP	1			1			1			
E		GRP	0,1			0,1			0,1			
F		GRP	0,01			0,01			0,01			
G		GRP	CQ 0,05			CQ 0,1			GRNP			
H												

Le 1er jour, la plaque estensemencée avec un hématocrite de 2% et une parasitémie de 2% dans 100 µl du milieu complet auquel sont rajoutés 100 µl des drogues aux différentes concentrations à tester (Tableau 45).

Après 24 heures d'incubation, 20 µl de solution d'hypoxanthine tritiée à 10 µCi/ml (740 Bq/puits) sont ajoutés dans chaque puits.

Après 48 heures d'incubation, la plaque est mise au congélateur afin de provoquer la lyse des globules rouges au moment de la décongélation.

Enfin le contenu de la plaque est déposé sur filtre grâce au collecteur de cellules. Le filtre est déposé dans un sachet avec 4 ml de liquide de scintillation, soudé, puis placé dans une cassette. La cassette est finalement insérée dans le compteur b (1450-Microbeta Trilux, Wallac Perkin Elmer) qui permet de mesurer la radioactivité de chaque puit (Photo 8).

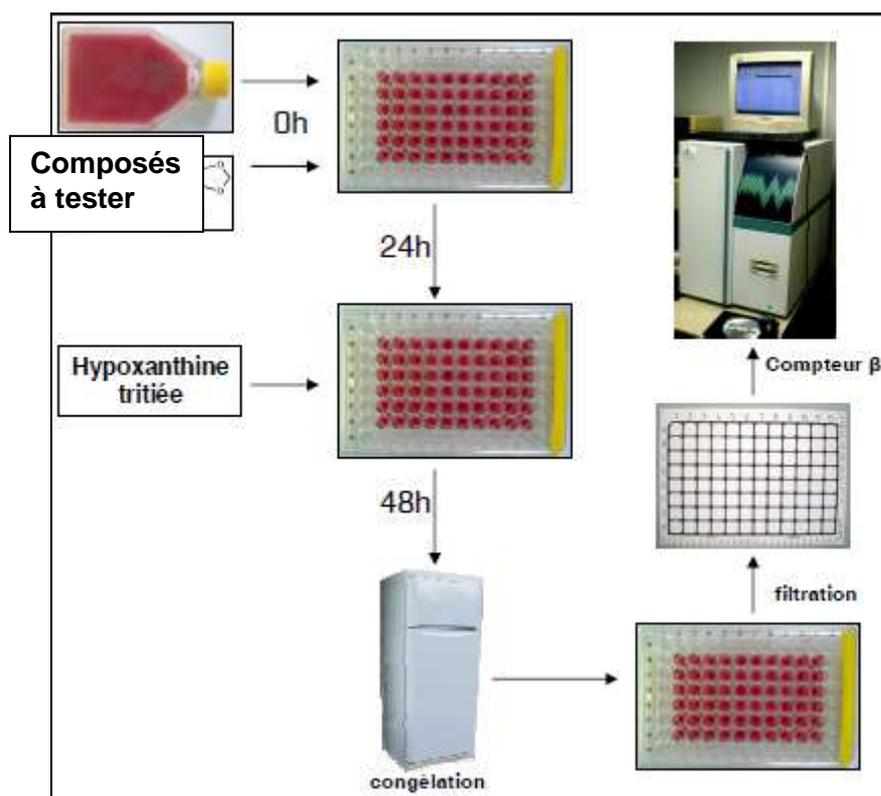


Photo 8 : Principe des tests antipaludiques

### 5.10 Tests sur cellules MCF7 et VERO in vitro

L'évaluation de la cytotoxicité suit la même méthode que le test de l'activité antipaludique, mais en remplaçant *P. falciparum* par des cellules de mammifères, comme par exemple MCF-7, cellules tumorales mammaires ou VERO, cellules de rein de singe.

Cependant, il existe quelques modifications mineures, du fait du mode de culture différent. En effet, les cellules utilisées pour les tests de cytotoxicité sont des cellules adhérentes et leur croissance est plus lente. C'est pourquoi leur ensemencement en plaque 96 puits se fait 24 heures avant leur mise en contact avec les produits à tester. Après 24 h, les cellules adhèrent au fond du puit, le milieu est changé, les puits lavés, puis les drogues sont ajoutées, leur dilution étant réalisée dans du milieu complet. Le milieu utilisé dépend des cellules utilisées (DMEM ou EMEM).

De même que pour le test d'activité antipaludique, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée 24 heures après la mise en contact avec les produits et la plaque est mise au congélateur 48 heures après. Enfin la mesure de la radioactivité se fait comme le test d'activité antipaludique.

### 5.11 Tests antipaludiques in vivo

Les tests *in vivo* ont été réalisés selon le protocole mis au point par Peters.<sup>155</sup>

Le premier test a été réalisé comme suit :

L'activité antipaludique de la fagaronine **28** a été évaluée sur des souris Swiss males (20 g +/- 2) infectées par *P.berghei*. Avant infection des souris ayant servi pour le test, les parasites ont été décongelés, injectés et maintenus dans 4 souris. Le sang parasité a été prélevé au niveau du sinus rétro-orbital et chaque souris a été infectée par  $2 \times 10^7$  parasites par voie intra-péritonéale (J0). Les

animaux infectés ont été divisés par lots de 10 par cage et ont été traités intra-péritonéalement chaque jour pendant 4 jours (J0 à J3).

A la fin du traitement, un frottis sanguin a été réalisé à partir d'une goutte de sang provenant de la queue de chaque souris, fixé au méthanol et coloré au Giemsa (J4). Les lames ont été examinées au microscope et la parasitémie comptée pour 5000 globules rouges.

La survie des souris a été suivie pendant plusieurs jours.

La fagaronine **28** a été testée à 3 concentrations (10, 5 et 2,5 mg/kg) diluée dans du DMSO de manière à ce que chaque souris reçoive 100 µl de solution. L'expérience a inclu 10 souris parasitées témoins recevant 100 µl de DMSO ainsi qu'un lot contrôle de 8 souris traitées par une solution de chloroquine à 10 mg/kg diluée dans de l'eau.

Le second test de la fagaronine **28** a été réalisé comme suit :

L'activité antipaludique de la fagaronine **28** a été évaluée sur des souris Swiss males (20 g +/- 2) infectées par *P. vinckei petteri*. Avant infection des souris ayant servi pour le test, les parasites ont été décongelés, injectés et maintenus dans 4 souris. Le sang parasité a été prélevé au niveau du sinus rétro-orbital et chaque souris a été infectée par  $1 \times 10^6$  parasites par voie intra-péritonéale (J0). Les animaux infectés ont été divisés par lots de 5 par cage et ont été traités intra-péritonéalement chaque jour pendant 4 jours (J0 à J3).

A la fin du traitement, un frottis sanguin a été réalisé à partir d'une goutte de sang provenant de la queue de chaque souris, fixé au méthanol et coloré au Giemsa (J4). Les lames ont été examinées au microscope et la parasitémie comptée pour 5000 globules rouges.

La survie des souris a été suivie pendant plusieurs jours.

La fagaronine **28** a été testée à 4 concentrations (1, 2,5, 5 et 10 mg/kg) diluée dans du DMSO de manière à ce que chaque souris reçoive 100 µl de solution. L'expérience a inclu 5 souris parasitées témoins recevant 100 µl de DMSO, 5 souris parasitées témoins ne recevant aucun traitement ainsi que deux lots contrôle de 5 souris chacun traitées respectivement par une solution de chloroquine à 1 et 10 mg/kg diluée dans de l'eau.

## 5.12 Affinité avec l'hème

Le protocole utilisé est adapté du protocole publié par Egan.<sup>130</sup> La différence avec ce protocole est qu'ici la titration se fera à concentration constante en hémine.

Les manipulations de titration se font à une température constante de 20°C.

Une solution stock d'hémine 1 mM dans le DMSO est préparée. Celle-ci est re préparée chaque jour. Une solution du produit titrant 1 mM (dans le DMSO pour la fagaronine et dans l'H<sub>2</sub>O pour la chloroquine) est préparée.

Une solution d'HEPES 0.2 M est préparée à partir d'une solution d'HEPES 1M.

Une solution A est préparée selon le protocole suivant :

Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 4 mL de DMSO, 1 mL de solution HEPES à 0.2 M, 20 µL de solution d'hémine à 1 mM puis compléter à 10 mL avec de l'eau distillée

Concentration en hémine : 2 µM

Une solution B est préparée selon le protocole suivant :

Dans une fiole jaugée de 5 mL, ajouter 1 mL de DMSO pour la fagaronine et 2 mL de DMSO pour la chloroquine, 0.5 mL de solution HEPES à 0.2 M, 1 mL de solution de titrant (fagaronine ou chloroquine) et 10 µL de solution d'hémine à 1 mM. Compléter à 5 mL avec de l'eau distillée.  
Concentration en titrant : 200 µM

Une solution de référence (blanc de l'UV) est préparée selon le protocole suivant :  
Dans une fiole jaugée de 10 mL, ajouter 4 mL de DMSO, 1 mL de solution HEPES à 0.2 M puis compléter à 10 mL avec de l'eau distillée.

Une titration à blanc est nécessaire pour corriger les valeurs obtenues lors de la titration avec la fagaronine. Cette titration est réalisée avec des solutions A et B réalisées selon les protocoles précédemment établis mais pour lesquelles la solution d'hémine à 1 mM n'aura pas été ajoutée.

Le protocole de titration utilisé est le suivant :  
On titre 2 mL de solution A, contre la solution de référence, en mesurant l'absorbance à 402 nm.  
42 points de 5 µL en 5 µL de 1 à 42  
10 points de 10 µL en 10 µL de 43 à 52  
10 points de 50 µL en 50 µL de 53 à 62  
La première mesure se fait avant ajout de la solution B (point 1)

L'expérience de titration de la solution A par la solution B est réalisée trois fois afin de vérifier la validité et la reproductibilité des résultats.

### 5.13 Fluorimétrie

---

Trois solutions de fagaronine à 0.01 mg/mL respectivement dans H<sub>2</sub>O, PBS tamponné à pH 5 et PBS tamponné à pH 7 sont préparées. Le pH du PBS est modifié à l'aide d' HCl.  
Les spectres UV de ces trois solutions ont été réalisés et les longueurs d'onde d'excitation de la fagaronine ont été déterminées.

Les scans d'émission de la fagaronine en excitant aux différentes longueurs d'onde d'absorption ont été réalisés afin de déterminer la fluorescence de la molécule.  
Certains scans d'excitation de la fagaronine à une longueur d'onde d'émission donnée ont été aussi réalisés.

Les mêmes manipulations ont été réalisées sur la nitidine afin d'avoir un point de comparaison.

## 5.14 Tests leishmanicides *in vitro* et *in vivo*

### 5.14.1 Tests *in vitro* sur amastigotes axéniques

Les parasites sont dénombrés sur une cellule de Malassez puis ensemencés dans une plaque de 96 puits à une concentration de  $2 \times 10^5$  parasites/puits dans 90  $\mu\text{L}$  de milieu. Les échantillons à tester ainsi que l'amphotéricine B, préalablement dilués aux concentrations voulues, sont alors additionnés en triplicat dans les puits pour un volume additionnel de 10  $\mu\text{L}$ . Après 72h d'incubation (à  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ ), on ajoute un volume de 10  $\mu\text{L}$  de MTT ( $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) et les plaques sont remises dans les incubateurs. Après 3h30 d'incubation, la réaction de réduction est arrêtée par ajout d'une solution d'isopropanol 50% et SDS 10% (pH 5,4). Puis les plaques sont remises à incuber pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque puit est mesurée à 600 nm sur un lecteur de microplaques.

### 5.14.2 Infection des macrophages

Après les 48h d'incubation requises pour la transformation des THP1 en macrophages (voir 5.7.2.3), les macrophages sont infectés avec les amastigotes axéniques de *L. amazonensis*. Pour cela chaque puit est rincé avec 100  $\mu\text{L}$  de RPMI (supplémenté avec 10% SVF) puis les parasites sont ajoutés dans un volume de milieu de 100  $\mu\text{L}$ . En effet, la concentration de parasites est de  $32 \times 10^5$  parasites par mL, ce qui correspond à un ratio d'infection entre les parasites et les cellules de 16/1. Puis les plaques sont mises à incuber pendant 4h.

### 5.14.3 Tests *in vitro* sur macrophages infectés

Après l'infection des macrophages par les amastigotes axéniques, chaque puit est rincé avec 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 10% SVF puis 90  $\mu\text{L}$  de RPMI 10% SVF sont ajoutés ainsi que 10  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon à tester ou de drogue controle en triplicat. Les plaques sont ensuite remises à incuber à  $37^\circ\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$ .

La lecture des plaques se fait au bout de 24, 48, 72 et 96h. 90  $\mu\text{L}$  de surnageant sont prélevés puis 40  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse GLO sont ajoutés. Les plaques sont laissées pendant 7 à 9 minutes puis la lyse cellulaire est vérifiée à l'aide d'un microscope. Puis 40  $\mu\text{L}$  de tampon luciférase sont ajoutés. Enfin, chaque puit est mélangé, 70  $\mu\text{L}$  de surnageant sont prélevés et transférés sur une plaque blanche. Cette plaque est lue sur un luminomètre VICTOR.

### 5.14.4 Tests leishmanicides *in vivo*

L'activité leishmanicide des composés testés *in vivo* (chélérythrine **23**, fagaridine **31** et avicine) a été déterminée sur des souris infectées par *L. amazonensis* (souche LV79).

Chaque produit a été testé sur un groupe de 6 souris de type BALB/c âgée de 6 semaines infectées par  $5 \times 10^4$  amastigotes par patte, sur les deux pattes postérieures, au niveau des coussinets plantaires.

Les produits sont testés à une dose unique de 5 mg/kg en injection dans la lésion provoquée par l'infection. Le traitement débute une semaine après l'infection et dure trois semaines durant lesquelles les souris sont traitées deux fois par semaines.

Afin de déterminer l'activité des composés testés, la charge parasitaire totale est évaluée ainsi que le poids tissulaire infecté et ce à la 3<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement et à la 6<sup>ème</sup> semaine après le début du traitement. Pour cela, à chaque évaluation (3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> semaine) 3 souris de chaque groupe sont euthanasiées, les tissus infectés sont prélevés et pesés. Ceux-ci sont ensuite mis en contact avec un perturbateur cellulaire afin d'extraire les amastigotes des cellules. Les amastigotes sont comptés à l'aide d'un microscope à fluorescence. Grâce à ces deux résultats, pour chaque composé testé, la charge parasitaire par poids tissulaire infecté est calculée. Cette charge peut être divisée par celle correspondant au contrôle afin d'obtenir un ratio indicateur de l'activité d'un composé.

## Références bibliographiques

1. [http://www.who.int/health\\_topics/malaria/fr](http://www.who.int/health_topics/malaria/fr)
2. Thayer, A. M., New antimalarial drugs are needed to ensure that effective and affordable treatments continue to be available and are not lost to parasite resistance. *Chemical and Engineering News* **2005**, 83, (43), 69-82.
3. Djaman, J. A.; Kauffy, P. C.; Yavo, W.; Basco, L. K.; Kone, M., Évaluation in vivo de l'efficacité thérapeutique de l'association sulfadoxine-pyriméthamine au cours du paludisme non compliqué chez les enfants de Yopougon (Abidjan, Côte d'Ivoire). *Bulletin de la société de pathologie exotique* **2004**, 97, (3), 180-182.
4. Dinis, D. V.; Schapira, A., Comparative study of sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine + sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of malaria caused by chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in Maputo, Mozambique *Bulletin de la société de pathologie exotique* **1990**, 83, (4), 521-527.
5. Blondé, R.; Naudin, J.; Bigirimana, Z.; Holvoet, L.; Fenneteau, O.; Vitoux, C.; Bourdon, O.; Angoulvant, F.; Lorrot, M.; D'Ortenzio, E.; Bourrillon, A.; Le Bras, J.; Matheron, S.; Faye, A., Tolérance et efficacité de l'atovaquone-proguanil dans le traitement du paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* de l'enfant en France métropolitaine : expérience d'un centre hospitalier parisien. *Archives de Pédiatrie* **2008**, 15, (3), 245-252.
6. Vatan, R.; Pistone, T.; Millet, P.; Etienne, G.; Mercié, P.; Longy-Boursier, M.; Malvy, D., Analyse rétrospective de 107 cas de paludisme d'importation chez l'adulte: Intérêt de l'association orale atovaquone-proguanil dans le traitement de l'accès simple à *Plasmodium falciparum*. *La Presse Médicale* **2006**, 35, (4, Part 1), 571-577.
7. Malvy, D.; Djossou, F.; Vatan, R.; Pistone, T.; Etienne, G.; Longy-Boursier, M., Expérience de l'association atovaquone-proguanil en traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* - à propos de 112 cas. *Medecine Tropicale* **2002**, 62, (3), 229-231.
8. Hovette, P.; Blasco, G.; Touze, J. E.; Laroche, R., Severe *Plasmodium falciparum* malaria attacks during chemoprophylaxis with chloroquine and proguanil. *Presse Medicale* **1992**, 21, (1), 41-42.
9. Sarrouy, J.; Cellier, C.; Migliani, R.; Todesco, A.; Favier, G.; Linden, L.; Pull, J.; Pascal, B.; Baudon, D.; Delolme, H., Association of chloroquine and proguanil for *Plasmodium falciparum* malaria chemoprophylaxis in french soldiers staying in a high prevalence of chloroquine resistance area (Gabon). *Bulletin de la société de pathologie exotique* **1991**, 84, (1), 80-93.
10. Gras, C.; Laroche, R.; Guelain, J.; Martet, G.; Merlin, M.; Touze, J. E.; Bessueille, G., Chemoprophylaxis of malaria by doxycycline in Cambodia *Presse Medicale* **1993**, 22, (10), 491-492.
11. Gras, C.; Laroche, R.; Guelain, J.; Martet, G.; Merlin, M.; Pottier, G.; Guisset, M.; Touze, J. E., Present place of doxycycline in prophylaxis treatment of *falciparum* Malaria. *Bulletin de la société de pathologie exotique* **1993**, 86, (1), 52-55.
12. Imbert, P.; Yen, K. K.; Migliani, R.; Sokhan, C.; Martin, Y. N., Malaria in children in Sihanoukville, Cambodia. *Bulletin de la société de pathologie exotique* **1994**, 87, (4), 253-260.
13. Charmot, G.; Simon, F.; LeBras, J., 2 cases of multiresistant *Plasmodium falciparum* malaria contracted in Douala with atypical clinical presentation *bulletin de la société de pathologie exotique filliales* **1987**, 80, (3), 447-451.
14. Robert, A.; Meunier, B., Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? *Chemical Society Reviews* **1998**, 27, (4), 273-274.
15. Klayman, D. L., Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science* **1985**, 228, (4703), 1049-1055.

16. Borstnik, K.; Paik, I.-h.; Shapiro, T. A.; Posner, G. H., Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. *International Journal for Parasitology* **2002**, 32, (13), 1661-1667.
17. Jefford, C. W.; McGoran, E. C.; Boukouvalas, J.; Richardson, G.; Robinson, B. L.; Peters, W., Synthesis of New 1,2,4-Trioxanes and their Antimalarial Activity. *Helvetica Chimica Acta* **1988**, 71, (7), 1805-1812.
18. Dechy-Cabaret, O.; Benoit-Vical, F.; Loup, C.; Robert, A.; Gornitzka, H.; Bonhoure, A.; Vial, H.; Magnaval, J. F.; Séguéla, J. P.; Meunier, B., Synthesis and Antimalarial Activity of Trioxaquine Derivatives. *Chemistry – A European Journal* **2004**, 10, (7), 1625-1636.
19. Meshnick, S. R., Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology* **2002**, 32, (13), 1655-1660.
20. Wu, W.-M.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yao, Z.-J.; Zhou, C.-M.; Li, Y.; Shan, F., Unified Mechanistic Framework for the Fe(II)-Induced Cleavage of Qinghaosu and Derivatives/Analogues. The First Spin-Trapping Evidence for the Previously Postulated Secondary C-4 Radical. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, (14), 3316-3325.
21. Robert, A.; Dechy-Cabaret, O.; Cazelles, J. r. m.; Meunier, B., From Mechanistic Studies on Artemisinin Derivatives to New Modular Antimalarial Drugs. *Accounts of Chemical Research* **2002**, 35, (3), 167-174.
22. Asawamasakda, W.; Ittarat, I.; Pu, Y. M.; Ziffer, H.; Meshnick, S. R., Reaction of antimalarial endoperoxides with specific parasite proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38, (8), 1854-1858.
23. Wiesner, J.; Ortmann, R.; Jomaa, H.; Schlitzer, M., New Antimalarial Drugs. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42, (43), 5274-5293.
24. White, N. J.; Nosten, F.; Looareesuwan, S.; Watkins, W. M.; Marsh, K.; Snow, R. W.; Kokwaro, G.; Ouma, J.; Hien, T. T.; Molyneux, M. E.; Taylor, T. E.; Newbold, C. I.; Ruebush II, T. K.; Danis, M.; Greenwood, B. M.; Anderson, R. M.; Olliaro, P., Averting a malaria disaster. *The Lancet* **1999**, 353, (9168), 1965-1967.
25. Sullivan, D. J.; Matile, H.; Ridley, R. G.; Goldberg, D. E., A Common Mechanism for Blockade of Heme Polymerization by Antimalarial Quinolines. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, 273, (47), 31103-31107.
26. Egan, T. J., Haemozoin formation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2008**, 157, (2), 127-136.
27. Krugliak, M.; Zhang, J.; Ginsburg, H., Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2002**, 119, (2), 249-256.
28. Banerjee, R.; Liu, J.; Beatty, W.; Pelosof, L.; Klemba, M.; Goldberg, D. E., Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, (2), 990-995.
29. Rosenthal, P. J.; Sijwali, P. S.; Singh, A.; Shenai, B. R., Cysteine Proteases of Malaria Parasites: Targets for Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design* **2002**, 8, (18), 1659-1672.
30. Eggleston, K. K.; Duffin, K. L.; Goldberg, D. E., Identification and Characterization of Falcilysin, a Metallopeptidase Involved in Hemoglobin Catabolism within the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, (45), 32411-32417.
31. Gavigan, C. S.; Dalton, J. P.; Bell, A., The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, 117, (1), 37-48.
32. Egan, T. J.; Combrinck, J. M.; Egan, J.; Hearne, G. R.; Marques, H. M.; Ntenti, S.; Sewell, B. T.; Smith, P. J.; Taylor, D.; van Schalkwyk, D. A.; Walden, J. C., Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, 365, (2), 343-347.

33. Gligorijevic, B.; McAllister, R.; Urbach, J. S.; Roepe, P. D., Spinning Disk Confocal Microscopy of Live, Intraerythrocytic Malarial Parasites. 1. Quantification of Hemozoin Development for Drug Sensitive versus Resistant Malariae *Biochemistry* **2006**, 45, (41), 12400-12410.
34. Fitch, C. D.; Kanjanangulpan, P., The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, 262, (32), 15552-15555.
35. Slater, A. F.; Swiggard, W. J.; Orton, B. R.; Flitter, W. D.; Goldberg, D. E.; Cerami, A.; Henderson, G. B., An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, 88, (2), 325-329.
36. Slater, A. F. G.; Cerami, A., Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* **1992**, 355, (6356), 167-169.
37. Ashong, J. O.; Blench, I. P.; Warhurst, D. C., The composition of haemozoin from *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83, (2), 167-172.
38. Dorn, A.; Stoffel, R.; Matile, H.; Bubendorf, A.; Ridley, R. G., Malarial haemozoin/ $\beta$ -haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* **1995**, 374, (6519), 269-271.
39. Egan, T. J.; Ross, D. C.; Adams, P. A., Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of  $\beta$ -haematin (malaria pigment). *FEBS Letters* **1994**, 352, (1), 54-57.
40. Dorn, A.; Vippagunta, S. R.; Matile, H.; Bubendorf, A.; Vennerstrom, J. L.; Ridley, R. G., A Comparison and Analysis of Several Ways to Promote Haematin (Haem) Polymerisation and an Assessment of Its Initiation *In Vitro*. *Biochemical Pharmacology* **1998**, 55, (6), 737-747.
41. Ziegler, J.; Chang, R. T.; Wright, D. W., Multiple-Antigenic Peptides of Histidine-Rich Protein II of *Plasmodium falciparum*: Dendrimeric Biomineralization Templates. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, (11), 2395-2400.
42. Papalexis, V.; Siomos, M.-A.; Campanale, N.; Guo, X.-g.; Kocak, G.; Foley, M.; Tilley, L., Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, 115, (1), 77-86.
43. Akompong, T.; Kadekoppala, M.; Harrison, T.; Oksman, A.; Goldberg, D. E.; Fujioka, H.; Samuel, B. U.; Sullivan, D.; Haldar, K., trans Expression of a *Plasmodium falciparum* Histidine-rich Protein II (HRPII) Reveals Sorting of Soluble Proteins in the Periphery of the Host Erythrocyte and Disrupts Transport to the Malarial Food Vacuole. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, (32), 28923-28933.
44. Pandey, A. V.; Babbarwal, V. K.; Okoyeh, J. N.; Joshi, R. M.; Puri, S. K.; Singh, R. L.; Chauhan, V. S., Hemozoin formation in malaria: a two-step process involving histidine-rich proteins and lipids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, 308, (4), 736-743.
45. Noland, G. S.; Briones, N.; Sullivan, D. J., The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2003**, 130, (2), 91-99.
46. Sullivan, D. J., Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *International Journal for Parasitology* **2002**, 32, (13), 1645-1653.
47. Fitch, C. D.; Cai, G.-z.; Chen, Y.-F.; Shoemaker, J. D., Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1999**, 1454, (1), 31-37.
48. Jackson, K. E.; Klonis, N.; Ferguson, D. J. P.; Adisa, A.; Dogovski, C.; Tilley, L., Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* **2004**, 54, (1), 109-122.

49. Coppens, I.; Vielemeyer, O., Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities. *International Journal for Parasitology* **2005**, 35, (6), 597-615.
50. Pisciotta, J. M.; Coppens, I.; Tripathi, A. K.; Scholl, P. F.; Shuman, J.; Bajad, S.; Shulaev, V.; Sullivan, D. J., The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochem J* **2007**, 402, (1), 197-204.
51. Egan, T. J., Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, (5-6), 1288-1299.
52. Egan, T. J.; Chen, J. Y. J.; de Villiers, K. A.; Mabothe, T. E.; Naidoo, K. J.; Ncokazi, K. K.; Langford, S. J.; McNaughton, D.; Pandiancherri, S.; Wood, B. R., Haemozoin ( $\beta$ -haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. *FEBS Letters* **2006**, 580, (21), 5105-5110.
53. Jani, D.; Nagarkatti, R.; Beatty, W.; Angel, R.; Slobodnick, C.; Andersen, J.; Kumar, S.; Rathore, D., HDP - A Novel Heme Detoxification Protein from the Malaria Parasite. *PLoS Pathog* **2008**, 4, (4), 1-15.
54. Kelly, J.; Winter, R.; Riscoe, M.; Peyton, D. H., A spectroscopic investigation of the binding interactions between 4,5-dihydroxyxanthone and heme. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2001**, 86, (2-3), 617-625.
55. Kelly, J. X.; Winter, R.; Peyton, D. H.; Hinrichs, D. J.; Riscoe, M., Optimization of Xanthenes for Antimalarial Activity: the 3,6-Bis- $\omega$ -Diethylaminoalkoxyxanthone Series. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, (1), 144-150.
56. Kelly, J. X.; Winter, R. W.; Cornea, A.; Peyton, D. H.; Hinrichs, D. J.; Riscoe, M., The kinetics of uptake and accumulation of 3,6-bis-[ $\omega$ ]-diethylamino-amyloxyxanthone by the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2002**, 123, (1), 47-54.
57. Kelly, J. X.; Smilkstein, M. J.; Brun, R.; Wittlin, S.; Cooper, R. A.; Lane, K. D.; Janowsky, A.; Johnson, R. A.; Dodean, R. A.; Winter, R.; Hinrichs, D. J.; Riscoe, M. K., Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype. *Nature* **2009**, 459, (7244), 270-273.
58. El Sayed, I.; Van der Veken, P.; Steert, K.; Dhooche, L.; Hostyn, S.; Van Baelen, G.; Lemieère, G.; Maes, B. U. W.; Cos, P.; Maes, L.; Joossens, J.; Haemers, A.; Pieters, L.; Augustyns, K., Synthesis and Antiplasmodial Activity of Aminoalkylamino-Substituted Neocryptolepine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, (9), 2979-2988.
59. Rashid, M. A.; Gustafson, K. R.; Kashman, Y.; Cardellina, J. H.; McMahan, J. B.; Boyd, M. R., Anti-HIV Alkaloids from *Toddalia asiatica*. *Natural Product Letters* **1995**, 6, (2), 153 - 156.
60. Gakunju, D. M.; Mberu, E. K.; Dossaji, S. F.; Gray, A. I.; Waigh, R. D.; Waterman, P. G.; Watkins, W. M., Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a Kenyan herbal remedy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, (12), 2606-2609.
61. Tsai, I.-L.; Chang, R.-G.; Fang, S.-C.; Ishikawa, T.; Chen, I.-S., Chemical constituents from the root bark of Formosan *Toddalia asiatica*. *Chinese Pharmaceutical Journal* **1996**, 48, (1), 63-75.
62. Nyangulu, J. M.; Hargreaves, S. L.; Sharples, S. L.; Mackay, S. P.; Waigh, R. D.; Duval, O.; Mberu, E. K.; Watkins, W. M., Antimalarial benzo[c]phenanthridines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, 15, (8), 2007-2010.
63. Iwasaki, H.; Okabe, T.; Takara, K.; Toda, T.; Shimatani, M.; Oku, H., Tumor-selective cytotoxicity of benzo[c]phenanthridine derivatives from *Toddalia asiatica* Lam. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2010**, 65, (4), 719-726.
64. Fish, F.; Gray, A. I.; Waterman, P. G., Alkaloids, coumarins, triterpenes and a flavanone from the root of *Zanthoxylum dipetalum*. *Phytochemistry* **1975**, 14, (9), 2073-2076.
65. Waterman, P. G., Alkaloids and coumarins from *Zanthoxylum flavum*: Dihydrorutaecarpine, a novel  $\beta$ -indoloquinazoline alkaloid. *Phytochemistry* **1976**, 15, (4), 578-579.

66. Stermitz, F. R.; Caolo, M. A.; Swinehart, J. A., Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. *Phytochemistry* **1980**, 19, (7), 1469-1472.
67. Sukari, M. A.; Salim, W. S. W.; Ibrahim, N. H.; Rahmani, M.; Aimi, N.; Kitajima, M., Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. *Fitoterapia* **1999**, 70, (2), 197-199.
68. Kassim, O. O.; Loyevsky, M.; Elliott, B.; Geall, A.; Amonoo, H.; Gordeuk, V. R., Effects of Root Extracts of *Fagara zanthoxyloides* on the In Vitro Growth and Stage Distribution of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, (1), 264-268.
69. Martin, M. T.; Rasoanaivo, L. H.; Raharisololalao, A., Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum madagascariense*. *Fitoterapia* **2005**, 76, (6), 590-593.
70. Queiroz, E. F.; Hay, A.-E.; Chaaib, F.; van Diemen, D.; Diallo, D.; Hostettmann, K., New and Bioactive Aromatic Compounds from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Med* **2006**, 72, (08), 746,750.
71. Halstead, C. W.; Forster, P. I.; Waterman, P. G., Alkaloids from the stem bark of an Australian population of *Zanthoxylum ovalifolium*. *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* **2006**, 20, (10), 940 - 945.
72. Hu, J.; Zhang, W.-D.; Shen, Y.-H.; Zhang, C.; Xu, L.; Liu, R.-H.; Wang, B.; Xu, X.-K., Alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. *Biochemical Systematics and Ecology* **2007**, 35, (2), 114-117.
73. Nakanishi, T.; Suzuki, M., Synthesis and Cytotoxic Activities of a New Benzo[c]phenanthridine Alkaloid, 7-Hydroxynitidine, and Some 9-Oxygenated Benzo[c]phenanthridine Derivatives. *Organic Letters* **1999**, 1, (7), 985-988.
74. Nakanishi, T.; Suzuki, M.; Saimoto, A.; Kabasawa, T., Structural Considerations of NK109, an Antitumor Benzo[c]phenanthridine Alkaloid. *Journal of Natural Products* **1999**, 62, (6), 864-867.
75. Nakanishi, T.; Masuda, A.; Suwa, M.; Akiyama, Y.; Hoshino-Abe, N.; Suzuki, M., Synthesis of derivatives of NK109, 7-OH Benzo[c]phenanthridine alkaloid, and evaluation of their cytotoxicities and reduction-resistant properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, 10, (20), 2321-2323.
76. Slunská, Z.; Gelnarová, E.; Hammerová, J.; Tábořská, E.; Slaninová, I., Effect of quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguilutine and chelilutine on normal and cancer cells. *Toxicology in Vitro* **2010**, 24, (3), 697-706.
77. Mackay, S.; Comoe, L.; Desoize, B.; Duval, O.; Jardillier, J. C.; Waigh, R., The effect of 12-alkoxy modification on the in vitro antileukaemic activity of N-methyl 2,3,8,9-tetramethoxybenzocphenanthridinium salts. *Anti-Cancer Drug Design* **1998**, 13, (7), 797-813.
78. Janin, Y. L.; Croisy, A.; Riou, J. F.; Bisagni, E., Synthesis and evaluation of new 6-amino-substituted benzo[c]phenanthridine derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, 36, (23), 3686-3692.
79. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M., Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute* **1991**, 83, (11), 757-766.
80. Boyd, M. R.; Paull, K. D., Some practical considerations and applications of the national cancer institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research* **1995**, 34, (2), 91-109.
81. Clement, B.; Weide, M.; Wolschendorf, U.; Kock, I., A Two-Step Synthesis of Cytostatically Active Benzo[c]phenanthridine Derivatives. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, 44, (4), 635-638.
82. Vanquelef, E.; Helesbeux, J.-J.; Duval, O.; Debiton, E.; Barthomeuf, C.; Jarry, C.; Forfar, I.; Richomme, P., Synthesis and PC3 androgen-independent prostate cells antiproliferative effect of

- fagaronine derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2007**, 22, (5), 647-654.
83. Zee-Cheng, R. K. Y.; Cheng, C. C., Preparation and antileukemic activity of some alkoxybenzo[c]phenanthridinium salts and corresponding dihydro derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **1975**, 18, (1), 66-71.
84. Stermitz, F. R.; Gillespie, J. P.; Amoros, L. G.; Romero, R.; Stermitz, T. A.; Larson, K. A.; Earl, S.; Ogg, J. E., Synthesis and biological activity of some antitumor benzophenanthridinium salts. *Journal of Medicinal Chemistry* **1975**, 18, (7), 708-713.
85. Arisawa, M.; Pezzuto, J. M.; Bevelle, C.; Cordell, G. A., Potential Anticancer Agents XXXI. N-Demethylation of Fagaronine. *Journal of Natural Products* **1984**, 47, (3), 453-458.
86. Ishii, H.; Ichikawa, Y.-I.; Kawanabe, E.; Ishikawa, M.; Ishikawa, T.; Kuretani, K.; Inomata, M.; Hoshi, A., Studies on the Chemical Constituents of Rutaceous Plants, LX. Development of a Versatile Method for Syntheses of the Antitumor Benzo[c]phenanthridine Alkaloids. (9). Efficient Syntheses and Antitumor Activities of Nitidine and Related Nonphenolic Benzo[c]phenanthridine Alkaloids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1985**, 33, (10), 4139-4151.
87. Parenty, A. D. C.; Smith, L. V.; Guthrie, K. M.; Long, D.-L.; Plumb, J.; Brown, R.; Cronin, L., Highly Stable Phenanthridinium Frameworks as a New Class of Tunable DNA Binding Agents with Cytotoxic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, (14), 4504-4506.
88. Lynch, M. A.; Duval, O.; Sukhanova, A.; Devy, J.; MacKay, S. P.; Waigh, R. D.; Nabiev, I., Synthesis, biological activity and comparative analysis of DNA binding affinities and human DNA topoisomerase I inhibitory activities of novel 12-alkoxy-benzo[c]phenanthridinium salts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11, (19), 2643-2646.
89. Wang, L. K.; Johnson, R. K.; Hecht, S. M., Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine. *Chemical Research in Toxicology* **1993**, 6, (6), 813-818.
90. Ishikawa, T., Benzo[c]phenanthridine Bases and their antituberculosis activity. *Medical Research Review* **2001**, 21, (1), 61-72.
91. Budén, M. E.; Rossi, R. A., Syntheses of phenanthridines and benzophenanthridines by intramolecular ortho-arylation of aryl amide ions with aryl halides via SRN1 reactions. *Tetrahedron Letters* **2007**, 48, (49), 8739-8742.
92. Budén, M. E.; Dorn, V. B.; Gamba, M.; Pierini, A. B.; Rossi, R. A., Electron-Transfer-Mediated Synthesis of Phenanthridines by Intramolecular Arylation of Anions from N-(ortho-Halobenzyl)arylamines: Regiochemical and Mechanistic Analysis. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, (7), 2206-2218.
93. Kock, I.; Clement, B., A New Synthetic Approach to the Benzo[c]phenanthridine Ring System. *Synthesis* **2005**, (07), 1052,1054.
94. Gillespie, J. P.; Amoros, L. G.; Stermitz, F. R., Synthesis of fagaronine. Anticancer benzophenanthridine alkaloid. *The Journal of Organic Chemistry* **1974**, 39, (22), 3239-3241.
95. Harayama, T.; Akamatsu, H.; Okamura, K.; Miyagoe, T.; Akiyama, T.; Abe, H.; Takeuchi, Y., Synthesis of trisphaeridine and norchelerythrine through palladium-catalyzed aryl-aryl coupling reactions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2001**, (5), 523-528.
96. Abe, H.; Kobayashi, N.; Takeuchi, Y.; Harayama, T., Synthesis of Zanthoxyline and its related compounds : Revision of the Reported Structure. *Heterocycles* **2010**, 80, (2), 873-877.
97. Beugelmans, R.; Chastanet, J.; Ginsburg, H.; Quintero-Cortes, L.; Roussi, G., Studies in SRN1 series. Part 14. Direct synthesis of benzo[c]phenanthridines and benzo[c]phenanthridones via SRN1 reactions. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, 50, (24), 4933-4938.
98. Ninomiya, I.; Naito, T.; Ishii, H., Synthesis of N-Demethylfagaronine. *Heterocycles* **1975**, 3, (4), 307-309.
99. Kessar, S. V.; Gupta, Y. P.; Balakrishnan, P.; Sawal, K. K.; Mohammad, T.; Dutt, M., Benzyne cyclization route to benzo[c]phenanthridine alkaloids. Synthesis of chelerythrine, decarine, and nitidine. *The Journal of Organic Chemistry* **1988**, 53, (8), 1708-1713.

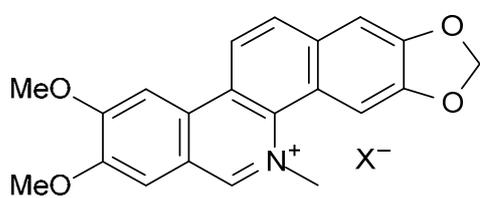
100. Ramani, P.; Fontana, G., A new synthetic approach to 7-hydroxynitidine. *Tetrahedron Letters* **2008**, 49, (36), 5262-5264.
101. Nakanishi, T.; Suzuki, M., Revision of the Structure of Fagaridine Based on the Comparison of UV and NMR Data of Synthetic Compounds. *Journal of Natural Products* **1998**, 61, (10), 1263-1267.
102. Nakanishi, T.; Suzuki, M.; Mashiba, A.; Ishikawa, K.; Yokotsuka, T., Synthesis of NK109, an Anticancer Benzo[c]phenanthridine Alkaloid. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, 63, (13), 4235-4239.
103. Styskala, J.; Cankar, P.; Soral, M.; Hlavac, J.; Hradil, P.; Simanek, V., Synthesis of Isodecarine. *Heterocycles* **2007**, 73, 769-775.
104. Olugbade, T. A.; Waigh, R. D.; Mackay, S. P., A very short route to fully aromatic 2,3,8,9- and 2,3,8,9,12-oxygenated benzo[c]phenanthridines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1990**, (10), 2657-2660.
105. Lynch, M. A.; Duval, O.; Pochet, P.; Waigh, R. D., High-yielding total synthesis of fagaronine chloride. *Bulletin de la Societe Chimique de France* **1994**, 131, 718-722.
106. Vanquelef, E.; Amoros, M.; Boustie, J.; Lynch, M. A.; Waigh, R. D.; Duval, O., Synthesis and Antiviral Effect against Herpes Simplex Type 1 of 12-substituted Benzo[c]phenanthridinium Salts. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2004**, 19, (6), 481-487.
107. Kohno, K.; Azuma, S.; Choshi, T.; Nobuhiro, J.; Hibino, S., A new synthesis of the benzo[c]phenanthridines nornitidine, noravicine, and isodecarine, based on a microwave-assisted electrocyclic reaction of the aza  $6\pi$ -electron system. *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, (5), 590-592.
108. Kametani, T.; Kigasawa, K.; Hiiragi, M.; Kusama, O.; Hayashi, E.; Ishimaru, H., Phenolic Cyclization. IX. Syntheses of Benzo[c]phenanthridine and Related Compounds (Studies on the Syntheses of Heterocyclic Compounds. CDIX). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1971**, 19, (6), 1150-1157.
109. Ishii, H.; Harada, K.-I.; Ishida, T.; Deushi, T.; Masuda, T.; Sakamoto, M.; Ichikawa, Y.-I.; Takahashi, T.; Ishikawa, M.; Ishikawa, T., The Development of a Versatile Method for the Synthesis of Antitumor-Active Benzo[c]phenanthridine Alkaloids. (4). Limitation of Bischler-Napieralski Cyclisation and Detailed Examination of the Dehydrogenation of the Bischler-Napieralski Products in the Robinson Synthetic Pathway for Benzo[c]phenanthridine Alkaloids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1984**, 32, (8), 2971-2983.
110. Zee-Cheng, K. Y.; Cheng, C. C., Synthesis of 5,6-dihydro-6-methoxynitidine and a practical preparation of nitidine chloride. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1973**, 10, (1), 85-88.
111. Zee-Cheng, K. Y.; Cheng, C. C., Synthesis of allonitidine and related compounds. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1973**, 10, (5), 867-870.
112. Geen, G. R.; Mann, I. S.; Mullane, M. V.; McKillop, A., A versatile synthesis of benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1996**, (14), 1647-1648.
113. Geen, G. R.; Mann, I. S.; Valerie Mullane, M.; McKillop, A., A versatile synthesis of fully aromatic benzo[c]phenanthridine alkaloids. *Tetrahedron* **1998**, 54, (33), 9875-9894.
114. Luo, Y.; Mei, Y.; Zhang, J.; Lu, W.; Tang, J., A concise synthesis of nornitidine via nickel- or palladium-catalyzed annulation. *Tetrahedron* **2006**, 62, (39), 9131-9134.
115. Korivi, R. P.; Cheng, C.-H., Protecting-Group-Free Total Synthesis of Isoquinoline Alkaloids by Nickel-Catalyzed Annulation of o-Halobenzaldimine with an Alkyne as the Key Step. *Chemistry – A European Journal* **2010**, 16, (1), 282-287.
116. Bailey, A. S.; Worthing, C. R., Synthetical Experiments in the Chelidonine-Sanguinarine Group of the Alkaloids. Part IV. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction I* **1956**, 4535-4543.
117. Ishii, H.; Ishikawa, T.; Ichikawa, Y.-I.; Sakamoto, M.; Ishikawa, M.; Takahashi, T., The Development of a Versatile Method for the Synthesis of Antitumor-Active Benzo[c]phenanthridine

- Alkaloids. (5). A New Method for Quaternization of the Benzo[c]phenanthridine Nucleus. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1984**, 32, (8), 2984-2994.
118. Ishii, H.; Ishikawa, T.; Takeda, S.; Suzuki, M.; Harayaya, T., Total Synthesis of Chelerythrine, a Benzo[c]phenanthridine Alkaloid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1992**, 40, (8), 2002-2006.
119. Ishii, H.; Chen, I.-S.; Ishikawa, T., Studies on the Chemical Constituents of Rutaceous Plants. Part 62. Efficient Synthesis of Fagaronine, a phenolic Benzo[c]phenanthridine Alkaloid with Antileukaemic Activity. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1 : Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1987**, (3), 671-676.
120. Ishii, H.; Chen, I.-S.; Ueki, S.; Akaike, m.; Ishikawa, T., Structural Establishment of Oxyterihanine, a phenolic Benzo[c]phenanthridone Alkaloid. Syntheses of Phenolic Benzo[c]phenanthridine alkaloids, Terihanine and Isoterihanine, and Related Compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1987**, 35, (7), 2717-2725.
121. Séraphin, D.; Lynch, M. A.; Duval, O., A simple and efficient synthetic route to benzo[c]phenanthridines. *Tetrahedron Letters* **1995**, 36, (32), 5731-5734.
122. Ishikawa, T.; Saito, T.; Ishii, H., Synthesis of macarpine and its cytotoxicity: Toward a synthetic route for 12-alkoxybenzo[c]phenanthridine alkaloids through aromatic nitrosation under basic condition. *Tetrahedron* **1995**, 51, (31), 8447-8458.
123. Watanabe, T.; Ohashi, Y.; Yoshino, R.; Komano, N.; Eguchi, M.; Maruyama, S.; Ishikawa, T., Total synthesis of 12-methoxydihydrochelerythrine and anti-tumour activity of its quaternary base: toward an efficient synthetic route for 12-alkoxybenzo[c]phenanthridine bases via naphthoquinone monooxime from 2-benzofuranyl-1-tetralone derivative. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, (17), 3024-3032.
124. Treus, M.; Estévez, J. C.; Castedo, L.; Estévez, R. J., A new route to 3-(2-vinylphenyl)-2-methyl-2H-isoquinolin-1-ones and benzo[c]phenanthridines: total synthesis of fagaronine. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, (30), 5323-5325.
125. Onda, M.; Yonezawa, K.; Abe, K., Transformation of Protopine to Sanguinarine. Photocyclization of Anhydroprotopine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1969**, 17, (2), 404-406.
126. Sotomayor, N.; Dominguez, E.; Lete, E., Bischler-Napieralski Cyclization-N/C-Alkylation Sequences for the Construction of Isoquinoline Alkaloids. Synthesis of Protoberberines and Benzo[c]phenanthridines via C-2'-Functionalized 3-Arylisoquinolines1. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, 61, (12), 4062-4072.
127. Jullian, V.; Bourdy, G.; Georges, S.; Maurel, S.; Sauvain, M., Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *Journal of Ethnopharmacology* **2006**, 106, (3), 348-352.
128. Bertani, S.; Bourdy, G.; Landau, I.; Robinson, J. C.; Esterre, P.; Deharo, E., Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 98, (1-2), 45-54.
129. Portet, B.; Fabre, N.; Roumy, V.; Gornitzka, H.; Bourdy, G.; Chevalley, S.; Sauvain, M.; Valentin, A.; Moulis, C., Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* **2007**, 68, (9), 1312-1320.
130. Egan, T. J.; Mavuso, W. W.; Ross, D. C.; Marques, H. M., Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1997**, 68, (2), 137-145.
131. De Villiers, K.; Kaschula, C.; Egan, T.; Marques, H., Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not  $\mu$ -oxo dimer formation. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2007**, 12, (1), 101-117.

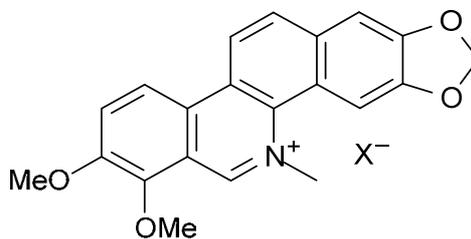
132. Pal, M.; Parasuraman, K.; Gupta, S.; Yeleswarapu, K. R., Regioselective Synthesis of 4-Substituted-1-Aryl-1-butanones Using a Sonogashira-Hydration Strategy: Copper-Free Palladium-Catalyzed Reaction of Terminal Alkynes with Aryl Bromides. *Synlett* **2002**, 2002, (12), 1976-1982.
133. Korivi, R. P.; Cheng, C.-H., Highly Efficient Synthesis of Isoquinolines via Nickel-Catalyzed Annulation of 2-Iodobenzaldimines with Alkynes: Evidence for Dual Pathways of Alkyne Insertion. *Organic Letters* **2005**, 7, (23), 5179-5182.
134. Roesch, K. R.; Zhang, H.; Larock, R. C., Synthesis of Isoquinolines and Pyridines by the Palladium-Catalyzed Iminoannulation of Internal Alkynes. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, (24), 8042-8051.
135. Guimond, N.; Fagnou, K., Isoquinoline Synthesis via Rhodium-Catalyzed Oxidative Cross-Coupling/Cyclization of Aryl Aldimines and Alkynes. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, (34), 12050-12051.
136. Dyker, G.; Stirner, W.; Henkel, G., Oxidative Heterocyclization of 2-Alkynylbenzaldehydes with 1,2-Phenylenediamine. *European Journal of Organic Chemistry* **2000**, 2000, (8), 1433-1441.
137. Ahmed, M. S.; Mori, A., Sonogashira coupling with aqueous ammonia directed to the synthesis of azotolane derivatives. *Tetrahedron* **2004**, 60, (44), 9977-9982.
138. Liang, Z.; Ma, S.; Yu, J.; Xu, R., Double annulations of dihydroxy- and diacetoxy-dialkynylbenzenes. An efficient construction of benzodifurans. *Tetrahedron* **2007**, 63, (52), 12877-12882.
139. Montes, V. A.; Pohl, R.; Shinar, J.; Anzenbacher, P., Effective Manipulation of the Electronic Effects and Its Influence on the Emission of 5-Substituted Tris(8-quinolinolate) Aluminum(III) Complexes. *Chemistry – A European Journal* **2006**, 12, (17), 4523-4535.
140. Diel, B. N.; Han, M.; Kole, P. L.; Boaz, D. B., Synthesis of [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Ring-(U)]-(±)-benzo[a]pyrene metabolites from [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Ring-(U)]benzene. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **2007**, 50, (5-6), 551-553.
141. Bradsher, C. K., Formation of six-membered aromatic rings by cyclialkylation of some aldehydes and ketones. *Chemical Reviews* **1987**, 87, (6), 1277-1297.
142. Leon, A. A.; Daub, G. H.; VanderJagt, D. L., Synthesis of 4-, 5-, 11-, and 12-chloromethylbenzo[a]pyrene. *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, 50, (5), 553-556.
143. Pratap, R.; Tominaga, Y.; Lee, M. L.; Castle, R. N., Synthesis of pyreno[b]thiophenes. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1981**, 18, (5), 973-975.
144. Tedjamulia, M. L.; Tominaga, Y.; Castle, R. N.; Lee, M. L., The synthesis of phenanthro[4,5-bcd]thiophene and the four monomethylphenanthro[4,5-bcd]thiophenes. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1983**, 20, (5), 1149-1152.
145. Young, R. J.; Harvey, R. G., Syntheses of methylene-bridged benzopyrenes, carcinogenic components of automobile exhaust residue. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (48), 6603-6606.
146. Kim, B. H.; Lee, J. G.; Yim, T.; Kim, H.-J.; Lee, H. Y.; Kim, Y. G., Highly efficient two-step selective synthesis of 2,6-dimethylnaphthalene. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, (44), 7727-7730.
147. Chiba, T.; Akizawa, T.; Matsukawa, M.; Nishi, M.; Kawai, N.; Yoshioka, M., Total Syntheses of Spidamine and Joramine, Polyamine Toxins from the Joro Spider, *Nephila clavata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1996**, 44, (5), 972-979.
148. McKay, M. G.; Cwele, T.; Friedrich, H. B.; Maguire, G. E. M., Microwave-assisted synthesis of a new series of resorcin[4]arene cavitand-capped porphyrin capsules. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, (19), 3958-3968.
149. Li, H.-Q.; Shi, L.; Li, Q.-S.; Liu, P.-G.; Luo, Y.; Zhao, J.; Zhu, H.-L., Synthesis of C(7) modified chrysin derivatives designing to inhibit  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) as antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**, 17, (17), 6264-6269.
150. Dosa, P. I.; Strah-Pleyne, S.; Jayakumar, H.; Casper, M.; Decaire, M.; Xiong, Y.; Lehmann, J.; Choi, K.; Elwell, K.; Wong, A.; Webb, R. R.; Adams, J. W.; Ramirez, J.; Richman, J. G.; Thomsen, W.; Semple, G.; Teegarden, B. R., Solubilized phenyl-pyrazole ureas as potent, selective

- 5-HT<sub>2A</sub> inverse-agonists and their application as antiplatelet agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, (18), 5486-5489.
151. Chen, J.-k.; Weith, H. L.; Grewal, R. S.; Wang, G.; Cushman, M., Synthesis of Novel Phosphoramidite Reagents for the Attachment of Antisense Oligonucleotides to Various Regions of the Benzophenanthridine Ring System. *Bioconjugate Chemistry* **1995**, 6, (4), 473-482.
152. Dondela, B.; Sliwa, W., Alkylbenzophthyrinones and benzophthyrinium quaternary salts. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2000**, 36, (7), 830-836.
153. Mikata, Y.; Mizukami, K.; Hayashi, K.; Matsumoto, S.; Yano, S.; Yamazaki, N.; Ohno, A., NAD/NADH Models with Axial/Central Chiralities : Superiority of the Quinoline Ring System. *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, (5), 1590-1599.
154. Bernardo, P. H.; Wan, K.-F.; Sivaraman, T.; Xu, J.; Moore, F. K.; Hung, A. W.; Mok, H. Y. K.; Yu, V. C.; Chai, C. L. L., Structure Activity Relationship Studies of Phenanthridine-Based Bcl-XL Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, 51, (21), 6699-6710.
155. Peters, W., Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. III. Multiple drug resistance. *Experimental Parasitology* **1965**, 17, (1), 97-102.
156. Fotie, J.; Bohle, D. S.; Olivier, M.; Adelaida Gomez, M.; Nzimiro, S., Trypanocidal and Antileishmanial Dihydrochelerythrine Derivatives from *Garcinia lucida*. *Journal of Natural Products* **2007**, 70, (10), 1650-1653.
157. Fuchino, H.; Kawano, M.; Mori-Yasumoto, K.; Sekita, S.; Satake, M.; Ishikawa, T.; Kiuchi, F.; Kawahara, N., *In Vitro* Leishmanicidal Activity of Benzophenanthridine Alkaloids from *Bocconia pearcei* and Related Compounds. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2010**, 58, (8), 1047-1050.
158. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A., NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **1997**, 62, (21), 7512-7515.
159. Trager, W.; Jensen, J. B., Human Malaria Parasites in Continuous Culture. *Journal of Parasitology* **2005**, 91, (3), 484-486.
160. Sereno, D.; Lemesre, J. L., Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **1997**, 41, (5), 972-976.
161. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, J. D.; Chulay, J. D., Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, 16, (6), 710-718.

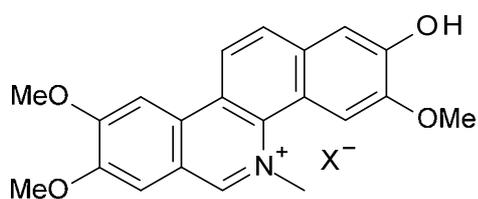
## Structures des molécules testées



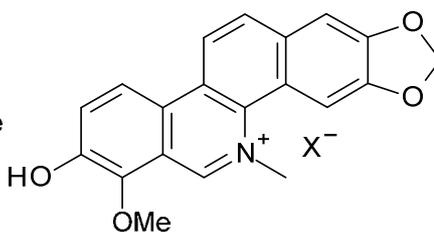
**22a** : X = OH Hydroxyde de nitidine  
**22b** : X = Cl Chlorure de nitidine



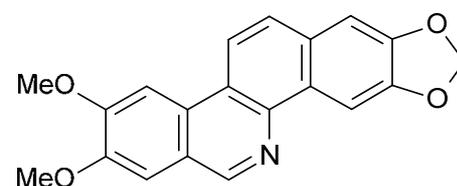
**23** Chelerythrine



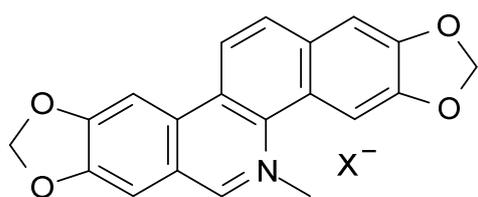
**28a** : X = I Iodure de fagaronine



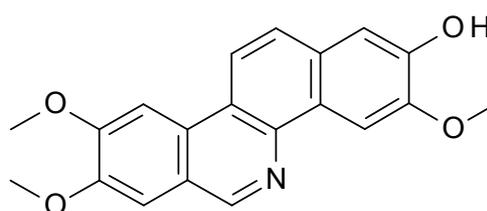
**31** Fagaridine



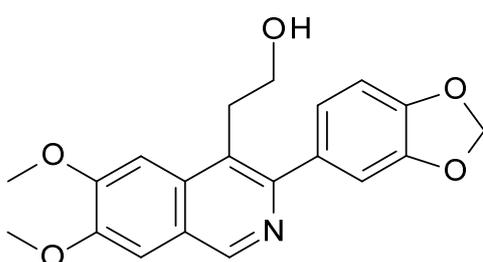
**34** Noritidine



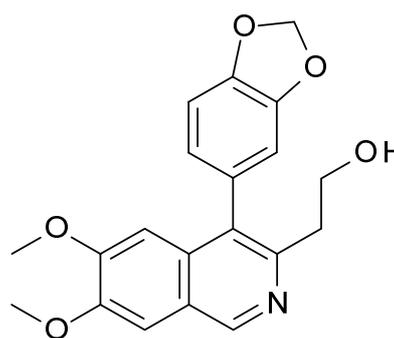
**27b** Avicine



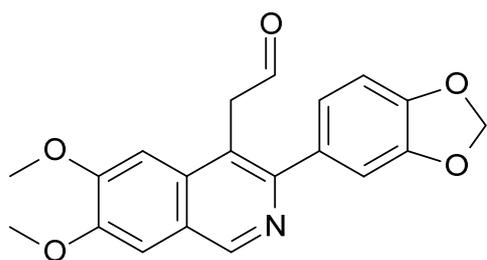
**66** Norfagaronine



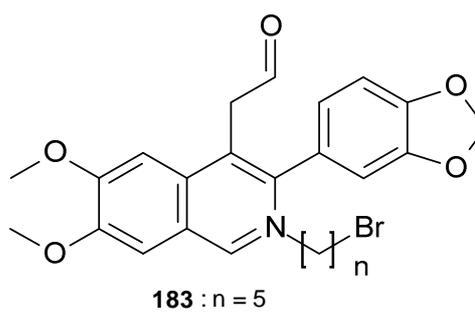
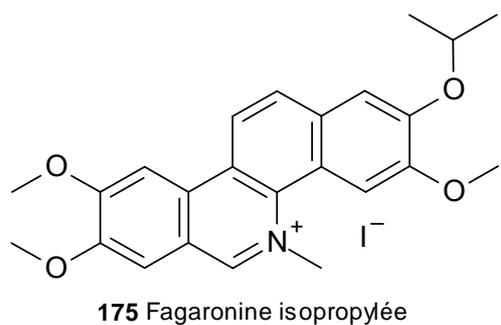
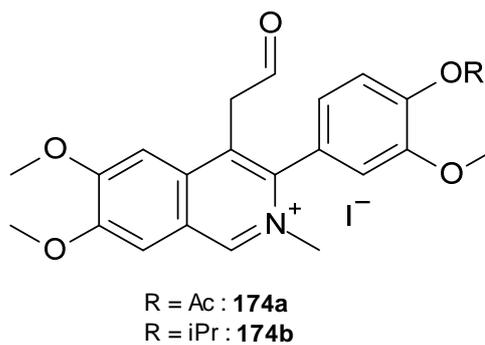
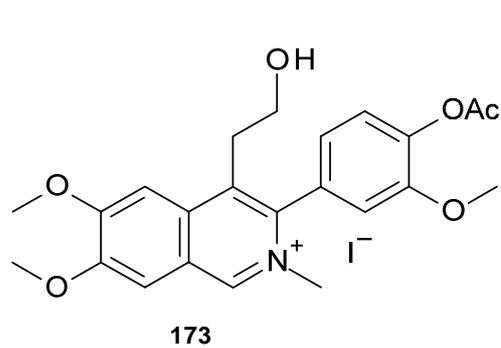
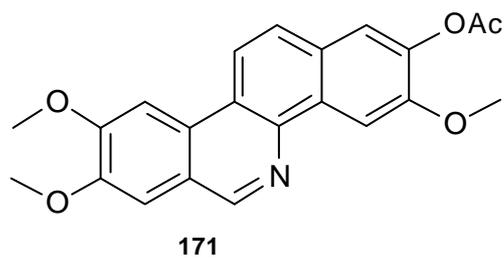
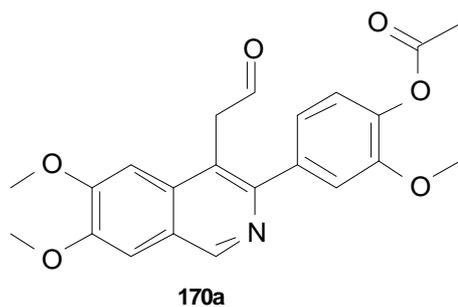
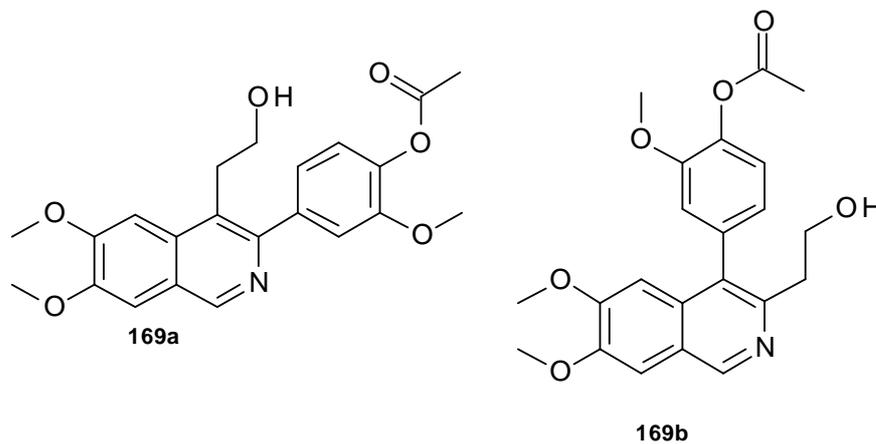
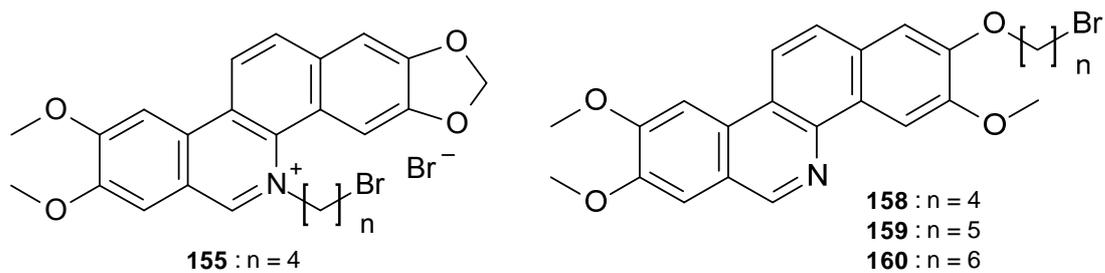
**102a**



**102b**



**103**



## **Les benzo[c]phénanthridines antipaludiques d'origine naturelle : Synthèse d'analogues et étude de leur mode d'action**

Lors de précédents travaux au laboratoire PharmaDev, des benzo[c]phénanthridines telles que la nitidine ont été extraites de *Zanthoxylum rhoifolium*, plante utilisée traditionnellement contre le paludisme en Guyane. Ce type de molécules possède des activités intéressantes contre le paludisme et des études au laboratoire ont montré que la nitidine pouvait avoir un mode d'action similaire à celui de la chloroquine.

Le but de ce travail est de synthétiser des dérivés de benzo[c]phénanthridines comportant une chaîne aminoalkyle. Cet ajout a pour but de favoriser l'inhibition de la formation d'hémozoïne au sein du parasite grâce à l'accumulation des composés aminoalkylés dans la vacuole digestive.

Au cours de ce travail, nous avons synthétisé la norfagaronine en utilisant une synthèse publiée pour la nornitidine puis nous avons adapté cette synthèse pour obtenir la fagaronine. Nous avons, également pu obtenir des dérivés de la nitidine N-substitués. Les dérivés aminoalkylés envisagés devraient être obtenus rapidement à partir de la fagaronine et des dérivés synthétisés.

La fagaronine très active *in vitro* sur *P. falciparum* a également été testée *in vivo*. Ce produit a une excellente activité sur souris impaludées, équivalente à celle de la chloroquine.

Le potentiel leishmanicide de la fagaronine et plusieurs autres benzo[c]phénanthridines a également été évalué. La chélérythrine possède une excellente activité *in vitro*, mais n'est pas active *in vivo*.

La fagaridine par contre, malgré une activité plus modeste *in vitro* est active *in vivo*.

Ce travail montre donc l'intérêt des benzo[c]phénanthridines comme antiparasitaires et ouvre la voie pour synthétiser des dérivés aminoalkylés susceptibles d'améliorer leur activité antipaludique.

Mots-clé : Paludisme, leishmaniose, benzo[c]phénanthridines, fagaronine, synthèse.

### **Antiplasmodial benzo[c]phenanthridines of natural origin: synthesis of analogs and study of their mechanism of action.**

During previous work in Phamadev laboratory, nitidine and others benzo[c]phenanthridines have been isolated from *Zanthoxylum rhoifolium*, a plant traditionally used in French Guyana to treat malaria. Benzo[c]phenanthridines are known for their interesting antiplasmodial activities, and we showed that nitidine could have the same mechanism of action as chloroquine.

The aim of this work is to synthesize benzo[c]phenanthridines bearing an aminoalkyl sidechain, in order to promote their accumulation in the plasmodial food vacuole, and optimize their antiplasmodial activity.

During this work, norfagaronine was synthesized using a synthesis previously published for nornitidine. This synthesis was then adapted to obtain fagaronine. N-substituted derivatives of nitidine have also been obtained. The targeted aminoalkyl derivatives should be obtained rapidly.

Fagaronine was shown to be very active against *P. falciparum* *in vitro* and was therefore tested *in vivo*. Fagaronine showed a very good *in vivo* activity, similar to chloroquine, on mice infected with *P. vinckei petteri*.

Antileishmanial activity of fagaronine and other benzo[c]phenanthridines has also been evaluated. Chelerythrine showed the best activity *in vitro*, but a lower activity *in vivo*. Fagaridine was the most active benzo[c]phenanthridine tested *in vivo*.

This work shows that benzo[c]phenanthridines are interesting antimalarial and antileishmanial molecules and paves the way for structural optimisation.

Keywords : Malaria, leishmaniasis, benzo[c]phenanthridines, fagaronine, synthesis