

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

HÉMISYNTHÈSE ET ÉVALUATION BIOLOGIQUE

DE DÉRIVÉS DE BRÉVIFOLIOL

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR

PAUL MARTIAL KAZE ZOGOU

FÉVRIER 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [a] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

À mon père, à ma mère

À tous ceux qui me sont chers,

REMERCIEMENTS

Je ne saurais commencer la rédaction de ce travail sans adresser au Pr Livain Breau ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche. Je le remercie pour les connaissances en synthèse organique et études de produits naturels sans cesse transmises durant tous mes séjours au laboratoire. Sa grande disponibilité, malgré ses multiples occupations à la direction du Département de Chimie de l'UQAM, et son optimisme m'ont permis de forger en moi une grande ardeur au travail, une passion pour la chimie organique et la volonté de toujours faire mieux.

Je remercie également la Professeure Diana Averill et le Dr. Ahmed Bettaieb pour les tests biologiques réalisés sur les différents dérivés synthétisés au laboratoire, ainsi que pour m'avoir permis de comprendre et interpréter les résultats des tests.

Je remercie les professeurs du Département de Chimie de l'UQAM pour leur disponibilité, les enseignements et l'apport scientifique aussi bien dans ma quête de connaissances que la finalisation de mes travaux de recherche. Un grand merci également aux techniciennes du Département de Chimie de l'UQAM.

Je remercie également mes stagiaires en intégration Gabrielle Boillard et Bianca pour leur aide précieuse dans l'accomplissement de mes projets de recherche. Un grand merci aussi à mes anciens collègues de laboratoire Sébastien Arseneau, Kevin, Sana Meshbahi et Dr. David Perelle pour la belle ambiance de travail et de collaboration entretenue au laboratoire.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail, notamment à Mme Lethanh et au Dr. Alexandre Arnold pour les analyses de Résonance Magnétique Nucléaire, Mme Isabelle Rheault et Dr. Hu Van Tra pour la spectrométrie de masse.

Enfin, je remercie mes très chers parents Jean Zogou et Berthe Ngoungméné pour leur support moral et financier tout au long de mon cursus académique. Un grand merci également à mes ami (s/es) pour leurs encouragements et leur présence.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	x
LISTE DES SYMBOLES	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
CHAPITRE I	
PRÉSENTATION DE LA RECHERCHE	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Les types de cancers.....	8
1.1.3 Les principales causes du cancer.....	9
1.1.4 Prévention du cancer.....	10
1.1.5 Modes de traitement du cancer.....	11
1.1.6 Substances naturelles en chimiothérapie du cancer.....	23
1.2 Les taxoïdes : le paclitaxel (Taxol [®] , Yewtaxan [®]).....	28
1.3 Le brevifoliol.....	30
1.3.1 Isolation et caractérisation.....	31
1.3.2 Activités biologiques du brevifoliol.....	31
1.3.3 Activités biologiques des dérivés de brevifoliol.....	32

1.4 Hypothèse de travail	35
1.5 But de la recherche	36
CHAPITRE II RÉSULTATS ET DISCUSSION	37
2.1 Introduction	37
2.2 Isolation et caractérisation du brevifoliol	40
2.3 Hémi-synthèse de dérivés de brevifoliol	42
2.3.1 Synthèse des dérivés 5- et 13- <i>p,m</i> -diméthylcinnamoyl brevifoliol	44
2.3.2 Synthèse et caractérisation du dérivé 5,13-bis- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol	53
2.3.3 Synthèse et caractérisation des dérivés 5- et 13- <i>p</i> -méthylcinnamoyl brevifoliol	56
2.3.4 Synthèse et caractérisation des dérivés 5- et 13- <i>p</i> -chlorocinnamoyl brevifoliol	58
2.3.5 Synthèse et caractérisation du dérivé 5- <i>p</i> -fluorocinnamoyl brevifoliol.....	60
2.3.6 Synthèse et caractérisation du dérivé 5- <i>p</i> -trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol.....	62
2.3.7 Synthèse et caractérisation du dérivé 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol	63
2.4 Test de cytotoxicité et de cytométrie à flux.....	65
CONCLUSION	81
PERSPECTIVES.....	82
CHAPITRE III MATÉRIELS ET MÉTHODES	83
3.1 Généralités.....	83

3.2 Matériel.....	85
3.3 Essais in vitro	86
3.3.1 Culture cellulaire	86
3.3.2 Test de prolifération cellulaire.....	86
3.3.3 Analyse d'accumulation intracellulaire d'adriamycine par cytométrie en flux.....	87
3.4 Description des protocoles et des produits	87
3.4.1 Synthèse de l' <i>o</i> -méthoxyvanilline	87
3.4.2 Synthèse de l'acide <i>p,m</i> -diméthoxycinnamique	88
3.4.3 Synthèse des dérivés 5- et 13- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol	89
3.4.4 Synthèse du dérivé 5,13-bis- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol.....	94
3.4.5 Synthèse des dérivés 5- et 13- <i>p</i> -méthylcinnamoyl brevifoliol	97
3.4.6 Synthèse des dérivés 5- et 13- <i>p</i> -chlorocinnamoyl brevifoliol	102
3.4.7 Synthèse du dérivé 5- <i>p</i> -fluorocinnamoyl brevifoliol.....	107
3.4.8 Synthèse du dérivé 5- <i>p</i> -trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol.....	110
3.4.9 Synthèse du dérivé 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol	113
RÉFÉRENCES ET NOTES	116

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Organisation d'une cellule animale eucaryote.....	2
1.2 Représentation d'une membrane cellulaire.	2
1.3 Les six mécanismes fondamentaux de l'oncogénèse.....	4
1.4 Les principaux facteurs de risques de cancer.	10
1.5 Quelques agents anticancéreux formant des adduits covalents avec l'ADN.....	19
1.6 Quelques agents anticancéreux anti-métabolites.	20
1.7 Quelques agents anticancéreux antimitotiques.	21
1.8 Quelques agents anticancéreux inhibiteurs de topoisomérase.....	22
1.9 Feuilles et fleurs de <i>Catharanthus roseus</i> ou pervenche de Madagascar.	25
1.10 Dérivés de brevifoliol synthétisés par Chattopadhyay et ses collaborateurs.	33
1.11 Dérivés de brevifoliol synthétisés par Yu Zhao et ses collaborateurs.	34
2.1 Spectre de RMN ¹ H du brevifoliol (42) dans le CDCl ₃	41
2.2 Mécanisme de la réaction de couplage au DCC.	43
2.3 Mécanisme de la réaction de condensation de Knoevenagel modifiée par Doebner....	45
2.4 Spectre proton du composé 5- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol (60) dans le CDCl ₃	49
2.5 Spectre proton du composé 13- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol (62) dans le CDCl ₃	51
2.6 Spectre proton du composé 5,13-bis- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol (64) dans le CDCl ₃	54

2.7	Sommaire des tests de cytotoxicité du dérivé 13-acétyl bréviolol	66
2.8	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl bréviolol	67
2.9	Sommaire des tests de cytotoxicité du 13- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl bréviolol	68
2.10	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5,13-bis- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl bréviolol	68
2.11	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5- <i>p</i> -méthylcinnamoyl bréviolol	69
2.12	Sommaire des tests de cytotoxicité du 13- <i>p</i> -méthylcinnamoyl bréviolol	70
2.13	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5- <i>p</i> -Chlorocinnamoyl bréviolol	71
2.14	Sommaire des tests de cytotoxicité du 13- <i>p</i> -Chlorocinnamoyl bréviolol	71
2.15	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5- <i>p</i> -fluorocinnamoyl bréviolol.....	72
2.16	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5- <i>p</i> -trifluorométhylcinnamoyl bréviolol	72
2.17	Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-(3'-phénylpropanoyl) bréviolol	73
2.18	Sommaire des tests de cytométrie à flux du 13-acétyl bréviolol.....	76
2.19	Sommaire des tests de cytométrie à flux du : (a) 5- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl bréviolol et (b) 5- <i>p</i> -chlorocinnamoyl bréviolol	77
2.20	Sommaire des tests de cytométrie à flux du : (a) 13- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl bréviolol, (b) 5- <i>p</i> -méthylcinnamoyl bréviolol, (c) 13- <i>p</i> -chlorocinnamoyl bréviolol et (d) 5-(3'-phénylpropanoyl) bréviolol.	78
2.21	Sommaire des tests de cytométrie à flux du : (a) 5,13-bis- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl bréviolol, (b) 13- <i>p</i> -méthylcinnamoyl bréviolol, (c) 5- <i>p</i> -fluorocinnamoyl bréviolol et (d) 5- <i>p</i> -trifluorométhylcinnamoyl bréviolol	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Quelques types de cancer.	9
1.2 Composition en paclitaxel, baccatin III, 10-déacetylbaaccatin III et brevifoliol de quelques plantes du genre <i>Taxus</i>	28
1.3 Propriétés cytotoxiques (IC 90 en µg/mL) de divers taxanes isolés de <i>Taxus wallichiana</i>	31
2.1 Attribution des protons et carbones du composé 5- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol (60) en comparaison avec ceux du 5-acétylbrevifoliol (59) et du brevifoliol (42).....	49
2.2 Attribution des protons et carbones du composé 13- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol (62) en comparaison avec celui du 13-acétyl brevifoliol (61).	52
2.3 Attribution des protons et carbones du composé 5,13-bis- <i>p,m</i> -diméthoxycinnamoyl brevifoliol (64) en comparaison avec celui du 5,13-bisacétyl brevifoliol (63).....	55
2.4 Récapitulatif des rotations optiques des composés synthétisés	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Ac	Acétyle
Ac ₂ O	Anhydride acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
aq.	Aqueux
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
C _{aro}	Carbone aromatique
CaH ₂	Hydruure de calcium
CAM	Molybdate d'ammonium et de cérium (IV)
cat.	Catalytique
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CH ₃ CN	Acétonitrile
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> , anglais, Spectroscopie de corrélation H-H
DMSO	Sulfoxyde de diméthyle
<i>E</i>	<i>E</i> , <i>entgegen</i> , allemand, opposé. Symbole de configuration pour un alcène selon la convention de Cahn-Ingold-Prelog
éq.	Équivalent
Et	Éthyle
Et ₂ O	Oxyde de diéthyle, éther éthylique
Et ₃ N	Triéthylamine
H _{aro}	Hydrogène aromatique
HETCOR	<i>Heteronuclear correlation spectroscopy</i> , anglais, spectroscopie de corrélation hétéronucléaire
Hex	Hexanes
Hz	Hertz
HCl	Chlorure d'hydrogène
HF	Fluorure d'hydrogène
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier

APTS	Acide paratoluènesulfonique
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
K ₂ CO ₃	Carbonate de potassium
KHMDS	Hexaméthylidisilamidure de potassium
KMNO ₄	Permanganate de potassium
<i>m</i>	Méta
Me	Méthyle
MeOH	Méthanol
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
N ₂	Azote gazeux
nOe	<i>Nuclear Overhauser effect</i> , anglais, effet nucléaire Overhauser
NH ₄ Cl	Chlorure d'ammonium
NaBH ₄	Borohydrure de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaH	Hydrure de sodium
NaHCO ₃	Hydrogénocarbonate de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
<i>o</i>	Ortho
<i>p</i>	Para
PET	Éther de pétrole
pf	Point de fusion (°C)
Ph	Phényle
ppm	Partie par million
Rdt	Rendement
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SM(IES)	Spectrométrie de masse en ionisation par électrospray
<i>t</i>	Tert, tertiaire
THF	Tétrahydrofurane
t.p.	Température de la pièce

UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée
Z	<i>Zusammen</i> , allemand, ensemble. Symbole de configuration pour un alcène selon la convention de Cahn-Ingold-Prelog
RMN	Résonance magnétique nucléaire
δ	Déplacement chimique (ppm)
b	Broad, anglais, large
d	Doublet
dd	Doublet de doublet
dt	Doublet de triplet
q	Quartet
J	Constante de couplage (Hz)
m	Multiplet
s	Singulet
t	Triplet

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
cm	Centimètre
%	Pourcentage
g	Gramme
L	Litre
M	Molaire, concentration (mol/L)
M+	Ion moléculaire (en SM)
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
mmol	Millimole
mol	Mole
m/z	Rapport masse/charge
μM	Micromilaire
μg	Microgramme

RÉSUMÉ

Le cancer, la malaria et bien d'autres infections bactériennes sont de plus en plus résistants aux traitements existants. Dans le but de trouver de nouveaux médicaments plus efficaces contre les agents potentiellement responsables de ces maladies, l'homme a de plus en plus recouru aux plantes comme source de nouveaux principes actifs. Près de 40% des médicaments approuvés entre 1983 et 1994 étaient des produits naturels ou leurs dérivés; et 80% des anticancéreux et antibiotiques sont d'origine naturelle. Le brevifoliol, un abéotaxane, isolé des aiguilles et tiges de *Taxus brevifolia* du Pacifique, est très peu cytotoxique mais il est capable d'inhiber l'activité de transport de médicaments anti-cancer de la glycoprotéine-P (P-gp), une protéine membranaire en partie responsable du phénomène de la multi-résistance aux médicaments en chimiothérapie. Dans le cadre de ce projet, du fait de sa grande quantité relative dans la plante, nous nous sommes intéressés à synthétiser de nouveaux dérivés de brevifoliol susceptibles d'augmenter son profil thérapeutique. Les travaux consistent à effectuer des réactions de couplage du brevifoliol avec différents dérivés d'acide cinnamique. Ensuite, l'activité inhibitrice de la P-gp de ces dérivés a été évaluée sur des cultures cellulaires des CH^RC5 au laboratoire de la professeure Averill du Département des Sciences Biologiques de l'UQAM. Des dix dérivés du brevifoliol synthétisés, quatre de ces dérivés à savoir : 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (64), 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (66), 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol (69) et 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol (70) ont démontré un potentiel inhibiteur de P-gp supérieur à celui de la cyclosporine A. Les dérivés 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (62), 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (67), 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol (71) et 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (65) possèdent une activité cytotoxique et anti-P-gp bonne ou moyenne. Ces dérivés favorisent une accumulation cellulaire d'adriamycine dans les cellules. Par contre les dérivés 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (60) et 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (68) ont une activité moindre.

Mots clé : Héli-synthèse, Brevifoliol, Glycoprotéine-P, Cytotoxicité.

CHAPITRE I

PRÉSENTATION DE LA RECHERCHE

1.1 Le cancer

Le cancer est une maladie qui représente la seconde cause de mortalité en Amérique du Nord, et la troisième dans le monde. D'après des rapports de Statistique Canada, environ 40 % de la population canadienne sera atteinte d'un cancer au cours de sa vie et plus de la moitié en mourra. Également, selon des statistiques de l'Institut National du Cancer du Canada, le cancer de la prostate est le type de cancer le plus fréquent chez l'homme avec une probabilité d'être atteint de 12 %, ensuite arrive le cancer du poumon avec 8,8 %. Chez la femme, les cancers les plus fréquemment rencontrés sont les cancers du sein avec 11,4 %, du côlon et du rectum avec 6,1 %. Chez l'homme comme chez la femme, le cancer du poumon est celui qui enregistre le plus grand nombre de décès avec une probabilité d'en mourir de 8,3 % et de 5,0 % respectivement.^{1,2}

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormalement importante de cellules au sein d'un tissu normal de l'organisme. Il en résulte des masses appelées tumeurs.

1.1.1 Généralités

La cellule représente la plus petite entité vivante de l'organisme (**figure 1.1**)³. Le corps humain compte des milliards de cellules et chaque cellule fait partie d'un organe spécifique de l'organisme. Chaque cellule est différente de par sa taille, sa forme ou même sa fonction. Les cellules jouent un rôle important dans le bon fonctionnement des organismes et assurent la survie de l'organe dont elles font partie. Certaines cellules sont le lieu de biosynthèse et de dégradation des molécules organiques, notamment des enzymes. C'est aussi

le lieu de transmission de l'information génétique par la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire.

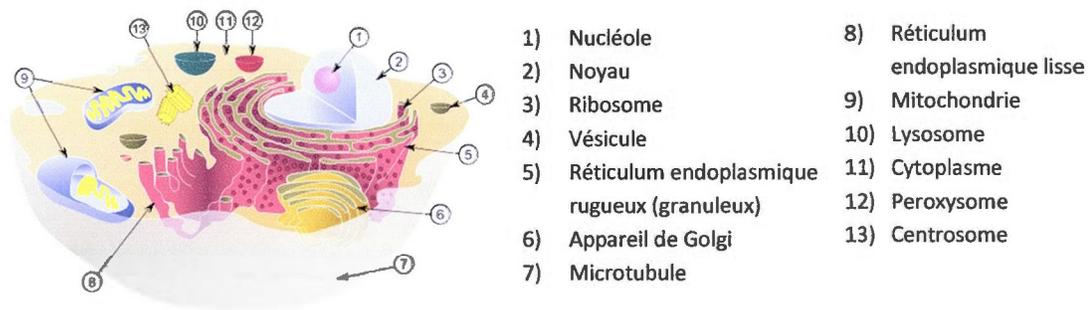


Figure 1.1 Organisation d'une cellule animale eucaryote.

Chaque cellule est délimitée par une membrane qui est une surface d'échange avec le milieu externe à la cellule. La membrane cellulaire est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle se trouvent intercalées plusieurs protéines (**figure 1.2**)⁴. Elle agit comme filtre et assure la transmission d'informations nécessaires à la réactivité de la cellule. Ceci en fonction des changements dans l'environnement immédiat de la cellule et en coordination avec d'autres cellules.

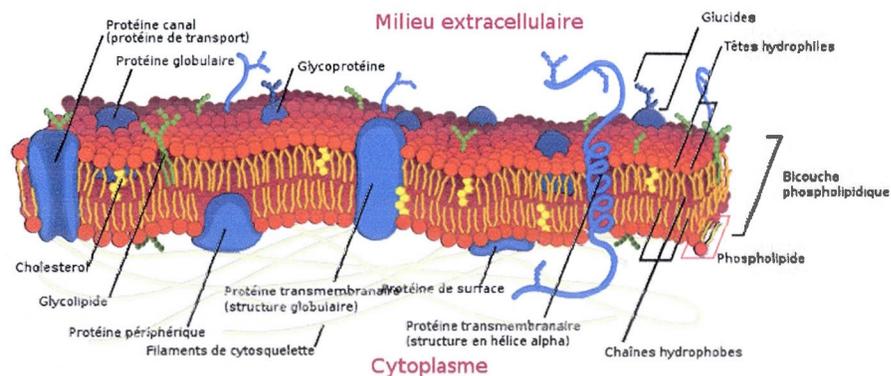


Figure 1.2 Représentation d'une membrane cellulaire.

La cellule constitue l'élément de base essentiel à la vie. Son cycle de vie se résume en deux phases distinctes. La première phase est celle pendant laquelle la cellule croît et assure ses différentes fonctions liées au développement de l'organisme. Dans la seconde phase, la plupart des cellules assurent leur fonction de reproduction à travers le processus de division cellulaire. Chez une cellule normale, le processus de division cellulaire est programmé et s'effectue à un moment donné de son existence. À la fin de son cycle, certaines cellules meurent : c'est l'apoptose.

Lorsque la division cellulaire devient incontrôlée, on assiste à une division continue des cellules qui deviennent ainsi des tumeurs. Des études récentes sur l'origine et les traitements du cancer ont permis d'établir que le cancer est provoqué par un changement dynamique des génomes des cellules.⁵ Nous pouvons énumérer entre autres la découverte des mutations qui produisent l'oncogène, gène ayant un fort potentiel d'activité chez les cellules cancéreuses et dont l'expression favorise l'apparition des cancers. Ce gène commande la synthèse d'onco-protéines (protéines stimulant la division cellulaire) et déclenche la prolifération désordonnée des cellules. On peut également citer la découverte des gènes suppresseurs de tumeur qui, quant à eux, perdent de leur activité chez les cellules cancéreuses. Ces deux gènes ont été identifiés grâce à leur altération dans les cellules cancéreuses humaines et animales.^{5,6}

Les altérations génétiques provoquent une transformation progressive des cellules humaines normales en cellules hautement malignes. Dans ses articles de 2000 et 2011, Hanahan et Weinberg^{5,7} ont énuméré 6 altérations importantes dans la physiologie cellulaire qui dictent collectivement le développement des tumeurs malignes (**figure 1.3**)⁸.

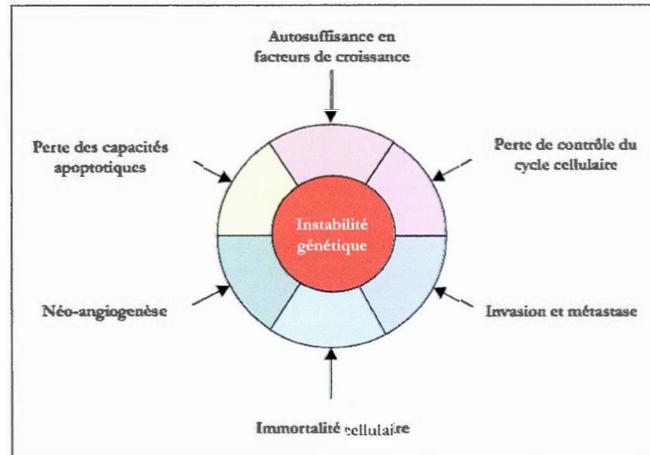


Figure 1.3 Les six mécanismes fondamentaux de l'oncogenèse.

a Autosuffisance en facteurs de croissance

Les tissus normaux de l'organisme contrôlent avec rigueur la production et la libération des signaux de croissance qui induisent l'entrée et la progression des cellules vers leur croissance et leur cycle de division cellulaire. Ceci permet d'assurer l'équilibre du nombre de cellules et de maintenir l'architecture et la fonction des tissus normaux. En général le signal de croissance est transmis par des facteurs de croissance tels que le TGF (Tumor Growth Factor) ou le PDGF (Platelet Derived Growth Factor) qui se lient aux récepteurs membranaires contenant un domaine tyrosine kinase intercellulaire. Ce dernier émet des signaux qui permettent de réguler la progression du cycle cellulaire. Ces signaux affectent également les propriétés biologiques des cellules telles que la survie et le métabolisme d'énergie.^{5,7,8}

Les cellules cancéreuses, en dérégulant ce signal, deviennent maîtresses de leur destinée. Elles le font en contrôlant ou en soutenant la production des signaux de croissance. Ceci peut se faire par diverses voies^{5,9} :

- la production par elles-mêmes des ligands de facteurs de croissances auxquels elles peuvent répondre via l'expression du récepteur cognate;
- l'émission des signaux pour stimuler les cellules normales environnantes qui fournissent réciproquement divers facteurs de croissances aux cellules cancéreuses;
- En rendant les récepteurs protéiques des cellules cancéreuses hypersensibles à toute limite en quantité de facteurs de croissance.

b Perte de contrôle du cycle cellulaire

En plus d'être capable de contrôler et de produire les signaux de croissances, les cellules cancéreuses interagissent également sur les mécanismes qui régulent la prolifération cellulaire. Certains de ses programmes dépendent de la production de gènes suppresseurs de tumeur tels que les protéines RB et p53. Ces gènes permettent de limiter la croissance, la prolifération des cellules et constituent un moyen par lequel l'organisme lutte contre les tumeurs. Les protéines RB collectent les signaux intra et extra cellulaires, puis en réponse dictent si la cellule peut croître ou se diviser.^{10,11} Dans les cellules cancéreuses, ces gènes sont inactivés.

c Perte des capacités apoptotiques

L'apoptose est la mort programmée des cellules. Elle joue un rôle de barrière naturelle dans le développement du cancer. L'apoptose est notamment induite suite à diverses transformations physiologiques cellulaires, un taux élevé d'oncogènes ainsi qu'aux

dommages de l'ADN associés à l'hyper-prolifération. Dans les cellules cancéreuses, l'apoptose est atténuée.^{12,13}

d Acquisition du phénotype d'immortalité cellulaire

Les cellules cancéreuses ont la capacité de se diviser indéfiniment, générant ainsi des tumeurs, contrairement aux cellules normales qui ne peuvent se diviser qu'un nombre de fois précis. Cette limitation est liée à deux barrières distinctes de prolifération :

- **La première est la sénescence**

C'est un état d'arrêt irréversible ou réversible de la croissance des cellules somatiques. C'est un état viable qui peut être induit par différents stimuli exogènes (par des radiations UV ou des drogues chimiothérapeutiques) ou endogènes (par activation des oncogènes *Ras* et *Raf* ou le stress oxydatif). Elle représente un autre programme de protection de l'organisme contre toute capacité de prolifération illimitée et constitue un mécanisme suppresseur des tumeurs en inhibant la prolifération des cellules qui ont des lésions sur l'ADN.¹⁴

- **La seconde barrière est la crise**

La crise implique la mort des cellules qui ont pu franchir la sénescence. Les cellules qui ne sont pas détruites après la crise développent un potentiel de réplication illimité.

Les télomères sont des séquences d'ADN simple (TTAGGG) répétées à la fin des chromosomes. Ces télomères raccourcissent progressivement dans les cellules normales en division. Ainsi la longueur de ce fragment d'ADN dans une cellule dicte le nombre de divisions cellulaires possibles pour une cellule avant son entrée en crise.¹⁵

Dans les cellules normales mortelles, la télomérase, enzyme qui augmente le segment télomère à la fin de l'ADN télomérique, est absente, mais cette enzyme exprime un niveau de fonctionnalité significatif chez les cellules immortelles et cancéreuses.

e Processus d'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus cellulaire complexe conduisant à la formation d'un nouveau réseau microvasculaire à partir d'un vaisseau préexistant. C'est un processus physiologique normal que l'on retrouve lors du développement embryonnaire. Mais il constitue également un processus pathologique primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases. Tout comme les cellules normales de l'organisme, les tumeurs ont besoin d'un apport en nutriment et oxygène pour leur croissance et aussi d'une voie d'élimination des déchets métaboliques et du CO₂. Elles assurent ces besoins en développant leur propre réseau de vaisseaux.

Les tumeurs envoient des signaux aux vaisseaux sanguins environnants, en libérant un facteur VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial). Le VEGF et d'autres molécules s'organisent pour que les vaisseaux sanguins environnants croissent en direction de la tumeur. Les facteurs de croissance fibroblastes (FGF) sont également impliqués dans le processus de l'angiogénèse.¹⁶

f Capacité d'invasion et de métastase

L'invasion par les métastases constitue la dernière étape du processus de développement du cancer. Cette dernière représente la capacité des cellules malignes à s'échapper de la tumeur primaire pour aller envahir de nouveaux tissus de l'organisme et y former de nouvelles tumeurs. Ces nouveaux foyers de tumeurs sont appelés métastases.

Le processus d'invasion et de métastase se fait en plusieurs étapes :

- il commence par une invasion locale;
- ensuite les cellules cancéreuses entrent dans les vaisseaux lymphatiques et sanguins voisins;
- les cellules cancéreuses transitent par le système lymphatique et sanguin;
- les cellules cancéreuses sont transférées dans le parenchyme des tissus distants;
- de petites tumeurs et micro métastases se forment;
- des lésions micro métastatiques croissent pour donner des tumeurs : c'est l'étape de colonisation.

Cette invasion est due à la sous expression ou à la désactivation occasionnelle de la cadherin-E dans les cellules cancéreuses humaines ¹⁷. Le cadherin-E est une glycoprotéine transmembranaire qui permet d'assurer l'adhésion des cellules entre elles.

1.1.2 Les types de cancers

Il existe plus de 100 types de cancer et sous-types de tumeurs que l'on peut retrouver dans des organes spécifiques. On peut les nommer selon la source (tissus ou cellules). Le **tableau 1.1** nous donne les principaux types de cancer en fonction de la source.

Tableau 1.1 Quelques types de cancer.

Cancer des tissus épithéliaux : CARCINOMES		Cancer du sang	
Sources	Nom	Source	Nom
Glandes (poumon, intestin, utérus, ...)	adénocarcinome	lymphocytes	lymphome
Revêtement	- carcinome basocellulaire - carcinome épidermoïde - carcinome transitionnel	cellules souches hématopoétiques	leucémie

Cancer des tissus conjonctifs : SARCOMES		Cancer des tissus d'origine nerveuse	
Sources	Nom	Source	Nom
Fibroblaste	fibrosarcome	cellules nerveuses	neuroblastome, rétinoblastome
Lipocyte	liposarcome	astrocyte	astrocytome
Vaisseaux	hémangiosarcome		
Os	ostéosarcome		

1.1.3 Les principales causes du cancer

Les causes du cancer sont diverses et très variées (**figure 1.4**)². La majorité des cancers humains proviennent de l'exposition aux agents cancérogènes environnementaux qui incluent des produits chimiques naturels ou non, les radiations et les virus. La mauvaise alimentation représente la plus importante cause de cancer dans le monde. En y associant la contribution due à l'usage du tabac et d'alcool, on atteint plus de 60 %.^{1,18} Les prédispositions génétiques constituent également une cause potentielle de cancer pour environ 20 %. Les facteurs environnementaux tels que la pollution de l'air et des eaux, les radiations et les médicaments jouent aussi un rôle non négligeable dans l'origine du cancer. Les rayons UV, les radiations ionisantes, les solvants organiques tels que le benzène, les métaux lourds tels

que l'uranium et le nickel, ainsi que certains virus comme le virus de l'hépatite B sont des exemples d'agents cancérogènes.^{1,2}

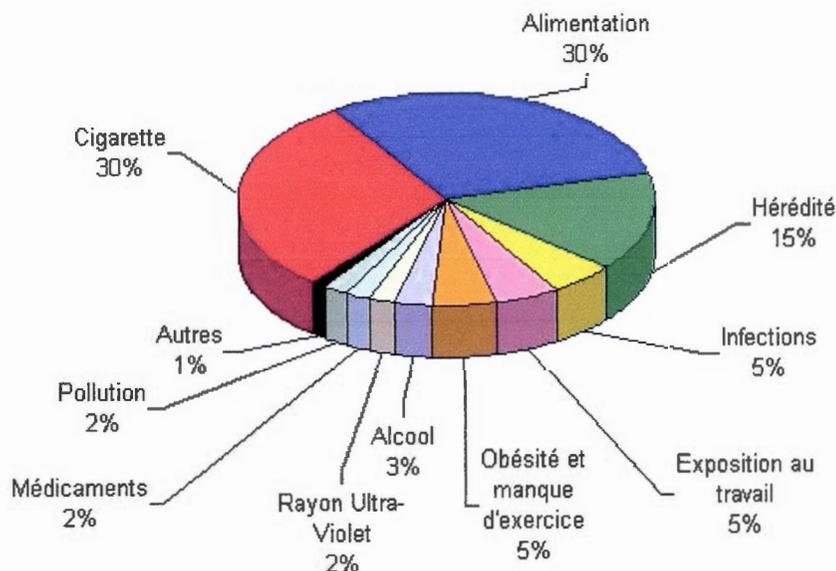


Figure 1.4 Les principaux facteurs de risques de cancer.

1.1.4 Prévention du cancer

Comme mentionné précédemment, la mauvaise alimentation représente l'une des principales causes du cancer. Ainsi, une bonne alimentation permettrait d'en réduire les risques de développer un cancer. De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de légumes et fruits permettait de diminuer l'incidence du cancer. Les analyses phytochimiques et biologiques ont révélé que les plantes comportent de nombreux phytonutriments tels que des anti-oxydants (vitamines C et E, lycopène et carotènes) et les composés phénoliques (flavonoïdes) qui aident à prévenir le cancer. De nombreux composés isolés des plantes ont démontré une activité anticancéreuse potentielle.^{1,18}

1.1.5 Modes de traitement du cancer

L'évolution considérable connue ces trois dernières décennies dans la connaissance des mécanismes de développement du cancer a permis à ce jour l'émergence de nombreuses méthodes de traitement efficace contre le cancer.

a La chirurgie

La chirurgie représente l'un des plus anciens et tout premier moyen de traitement du cancer. C'est une méthode généralement employée en présence d'une petite tumeur qui ne s'est pas encore répandue à d'autres organes (bien avant la métastase). La chirurgie consiste à enlever la tumeur originale et à en évaluer sa gravité, ainsi que son étendue. C'est une technique qui reste une arme anticancéreuse par excellence, environ 80 % des cancers pouvant être guéris par la chirurgie. Le plus souvent on y associe la chimio ou radiothérapie afin de prévenir la récurrence et l'apparition ou le développement des métastases.¹⁹

b La radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser certain types d'énergie provenant de rayons X, de rayon Gamma ou d'électrons pour détruire les cellules cancéreuses. La radiothérapie est aussi appelée irradiation et représente une méthode couramment employée pour traiter le cancer.²⁰ C'est une technique qui consiste à administrer de fortes doses de rayonnement qui détruisent les cellules dans la zone ciblée en endommageant l'ADN, ce qui rend ces cellules incapables de développer et de se diviser. Les cellules saines également atteintes par les radiations vont être capables de se réparer par elles-mêmes.

On distingue trois types de radiothérapie²⁰ :

- La radiothérapie externe ou thérapie transcutanée.
- La curiethérapie. Encore appelée radiothérapie interne consiste à administrer le rayonnement dans une zone bien ciblée du corps à l'intérieur ou près de la tumeur pendant une courte période.
- La radiothérapie systémique ou métabolique. La source de rayonnement est administrée sous forme liquide (boisson ou capsule à avaler) ou introduite par injection intraveineuse. Les substances radioactives se fixent préférentiellement sur les cellules cancéreuses pour les détruire et ces substances sont éliminées après quelques jours par les liquides corporels (sueur, salive ou urine).

La radiothérapie peut être employée en combinaison avec d'autres méthodes de traitement telles que la chimiothérapie ou la chirurgie.

Ce traitement présente également des effets secondaires tels que la dépression, les pertes de cheveux sur la partie traitée et la fatigue. Il peut aussi entraîner une modification des habitudes du sommeil et de l'appétit.

c La thérapie génique

Le développement du cancer est fortement lié à des modifications ou altérations génétiques au sein d'une cellule. La thérapie génique est un mode de traitement spécifique et associé aux changements génétiques. Cette approche tire profit des connaissances de mécanismes de transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse et consiste à utiliser du matériel génétique pour obtenir un effet thérapeutique.²¹ Dans certains cas, le but est d'obtenir des cellules génétiquement modifiées possédant des fonctions nouvelles ou restaurées et, dans d'autres cas, le matériel génétique est utilisé pour interférer temporairement avec les fonctions des cellules.

Les molécules et matériels génétiques utilisés en thérapie génique sont très nombreux et diversifiés. Ils interagissent à différents niveaux du développement du cancer et sur des cibles spécifiques. Ces gènes peuvent être dirigés contre des cellules saines ou cancéreuses.

Dans cette thérapie on distingue plusieurs types dont voici quelques-uns :

✚ **La thérapie utilisant des gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes**

Tel qu'il a déjà été mentionné dans ce mémoire, les gènes suppresseurs de tumeur comme le gène p53 sont inactivés dans les cellules cancéreuses, ce qui favorise la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que la résistance aux traitements en chimio et radiothérapie.^{22,23}

L'apport en gène p53 permet aux cellules de contrôler leur croissance et leur cycle de division cellulaire, et par la suite d'augmenter la sensibilité aux traitements en chimiothérapie. De même, l'administration intra-tumorale de vecteurs adénovirus permet également l'expression du gène p53.^{21,24}

✚ **L'immunothérapie**

L'introduction de l'immunothérapie dans le traitement du cancer date des années 1980 grâce aux travaux de William Coley qui a utilisé une préparation à base de deux souches de bactéries (*Streptococcal* et *Staphylococcal*) comme vaccin pour le traitement du cancer.^{25,26} L'immunothérapie consiste à s'inspirer des mécanismes de défense du système immunitaire de l'organisme. Le système immunitaire d'un individu est en général orienté contre des agressions d'agents externes (germes et virus), mais il peut également développer des mécanismes de défense contre des cellules anormales ou cancéreuses. La stimulation du système immunitaire dépend de la présence d'antigènes produits par les agents pathogènes externes. Il est connu que les cellules cancéreuses contournent ou inhibent certaines fonctions du système immunitaire. Avec la découverte ces dernières décennies d'antigènes associés ou spécifiques aux tumeurs, des méthodes de traitement utilisant le système immunitaire de l'organisme pour inhiber la croissance des tumeurs ont été développées.

Parmi les stratégies existantes, la stratégie utilisant les cellules dendritiques permet de fixer les antigènes provenant des tumeurs et de les transférer aux cellules T, méthode qui permet de stimuler la réponse des cellules T de l'organe lymphoïde par la production des cellules T CD8+ ayant un fort potentiel cytotoxique.^{27,28}

D'autres stratégies utilisent les cytokines pour stimuler la réponse du système immunitaire. Les cytokines stimulent la maturation et la différenciation ou peuvent induire l'apoptose.²¹

La thérapie génique utilisant les gènes anti-angiogéniques

L'angiogenèse est une étape clé du développement du cancer au cours de laquelle les cellules cancéreuses développent leur propre réseau de vaisseaux sanguins pour l'apport en nutriment et dioxygène et aussi l'élimination des déchets et du CO₂. L'utilisation des gènes anti-angiogéniques permettant de bloquer l'angiogenèse constitue un moyen essentiel pour limiter la croissance des tumeurs et le développement des métastases. Ces agents thérapeutiques pourraient interagir avec les facteurs angiogéniques tels que les facteurs de croissances vasculaires endothéliales (VEGF) ou les facteurs de croissance Fibroblaste (FGF), introduits dans les années 1970, les traitements anti-angiogéniques ont connu un grand développement ces dernières décennies notamment avec l'utilisation clinique du bevacizumab contre différents types de cancer dont le cancer du sein²⁹. Le bevacizumab, du nom commercial Avastin[®], est un anticorps monoclonal qui agit comme inhibiteur de l'angiogenèse en se liant aux molécules de VEGF. Ces dernières ne peuvent donc plus se fixer sur le récepteur du VEGF et les vaisseaux sanguins ne peuvent plus se tourner vers la tumeur. Ceci a pour effet de diminuer son apport en oxygène et en nutriments, ce qui limite la croissance de la tumeur.

La thérapie utilisant les gènes de résistance aux drogues

L'un des problèmes généralement rencontrés dans les traitements classiques contre le cancer est l'attaque des cellules saines par les agents anticancéreux utilisés

notamment en chimiothérapie. L'un de moyen pour réduire cette toxicité contre les cellules saines est d'utiliser des gènes pour rendre les cellules saines situées près des tumeurs résistantes aux médicaments utilisés contre le cancer. L'un des gènes utilisé, le MDR-1 code pour une glycoprotéine transmembranaire qui agit comme une pompe énergie-dépendante qui expulse les composés lipophiles de la cellule³⁰. Ainsi, l'introduction de ces gènes dans les cellules saines leur confère une certaine protection contre les agents anticancéreux en les éliminant de la cellule via une pompe transmembranaire³¹.

L'utilisation d'une thérapie génique nécessite l'emploi d'un vecteur de thérapie par lequel le gène sera transmis aux cellules ciblées. Il existe différents types de vecteurs pouvant être utilisés, les principaux sont l'ADN nu, les liposomes et les virus à ADN ou à ARN. Un vecteur idéal devrait pouvoir contenir une grande quantité d'ADN, avoir une grande efficacité de transduction, être sécuritaire pour le patient et pour l'environnement et être produit en grande quantité. Le choix du vecteur dépend également du but visé par la thérapie génique.²¹

d La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer aux patients des médicaments qui détruisent les cellules cancéreuses ou qui réduisent les tumeurs.³² Ces médicaments, encore appelés anticancéreux, sont administrés le plus souvent par voie intraveineuse ou sous forme de comprimés. Le traitement peut comporter un ou plusieurs médicaments. C'est une technique utilisée lorsque le cancer est au stade de dissémination ou pour la prévenir. Elle peut être combinée à d'autres modes de traitement tel que la chirurgie ou la radiothérapie.

Mais la chimiothérapie présente de nombreux effets secondaires tels que les nausées, la diarrhée, la perte des cheveux, les vomissements, la baisse des globules rouges, blancs et celle des plaquettes, les modifications de la peau, la sensation de sécheresse et parfois des démangeaisons. Un autre problème lié à la chimiothérapie est le phénomène de résistance aux médicaments développé par certaines cellules cancéreuses. Ce phénomène est en partie associé à l'action de la «pompe» P-glycoprotéine (ou pompe P-gp), une protéine

membranaire d'efflux, ayant pour fonction l'expulsion de certaines substances toxiques pour les cellules, y compris les agents anticancéreux. Elle est principalement exprimée dans les organes et tissus qui font barrière avec le monde externe notamment le pancréas, l'intestin, le foie ou le rein. Elle est codée chez l'homme par le gène MDR1 et limite l'absorption intestinale des médicaments. La P-gp s'oppose à la pénétration des médicaments dans le système nerveux central, diminuant ainsi leur distribution. Cette protéine transmembranaire de 170 kDa est composée de 1280 acides aminés. Elle possède une structure caractéristique des systèmes de transport ATP-dépendants, et possède deux régions comportant chacune 6 domaines transmembranaires et un site de liaison pour l'Adénosine Triphosphate orienté vers l'intérieur de la cellule. Elle possède également un site de glycosylation extra-cellulaire.^{33,34,35}

La P-gp influence divers processus pharmacocinétiques tels que :

- l'absorption du principe actif;
- la distribution du principe actif dans les organes ou les tissus;
- l'excrétion hépatique et rénale de la substance active.

La P-gp est surexprimée en présence de tumeurs malignes, ce qui peut entraîner une résistance à de nombreux agents chimio-thérapeutiques. La P-gp influe sur la biodisponibilité des médicaments ainsi que leur répartition dans les organes. Elle peut constituer une source importante d'interactions médicamenteuses. Une nouvelle approche thérapeutique consiste à développer des inhibiteurs de la P-gp. Ceux-ci doivent empêcher que les substances cytotoxiques soient expulsées de la cellule tumorale par la P-gp, entraînant ainsi une baisse de la concentration du médicament sur son site d'action.

Le valsopodar est un analogue de la cyclosporine-A sans effet immunosuppresseur. Il est en phase de développement clinique pour inhiber l'action de la P-gp. Les autres inhibiteurs de P-gp connus sont énoncés à la suite:³³

- la vérapamil (un anticalcique);
- les antiarythmiques : quinidine et amiodarone;

- les macrolides antibiotiques : érythromycine et clarithromycine;
- les antifongiques imidazoles tels que le kétoconazole.

D'après la littérature, les vinca-alcaloïdes, les anthracyclines, le taxol et les épipodophyllotoxines sont des substrats connus de la P-gp. Ces substances, en général cycliques et planaires, vont se lier à la P-gp, ce qui réduit leur concentration plasmatique. Par contre la vinblastine et la doxorubicine sont des inducteurs de P-gp.^{33,34}

En effet, certains médicaments utilisés en chimiothérapie anticancéreuse peuvent se lier directement à la P-gp et seront par conséquent expulsés à l'extérieur de la cellule. D'où la nécessité de découvrir de nouveaux agents capables de bloquer cette activité de transport de la P-gp.

Depuis quelques années, la recherche de nouveaux médicaments anticancéreux en chimiothérapie vise à développer des médicaments capables d'atteindre les mécanismes de l'oncogenèse : on parle de chimiothérapie ciblée.⁸

Le rythme et la durée du traitement en chimiothérapie varient en fonction du type de cancer et de la réponse du patient au traitement. On distinguera⁸ :

- ✚ les cancers chimiocurables que l'on peut guérir par la chimiothérapie seule, tels que les leucémies aiguës et certains lymphomes;
- ✚ les cancers chimiosensibles tels que les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon, du poumon, pour lesquels la chimiothérapie apporte une rémission complète ou partielle dans un pourcentage élevé des cas;
- ✚ les cancers chimiorésistants tels que les cancers du sein et du pancréas, des mélanomes malins, pour lesquels la chimiothérapie reste d'une efficacité faible.

Les médicaments utilisés en chimiothérapie sont très variés et peuvent être groupés en quatre grandes classes ⁸ :

- ✓ Les agents formant des adduits covalents avec l'ADN (**figure 1.5**). Dans cette classe on retrouve :
 - Les agents alkylants classiques possédant 2 groupes chloroéthyle tels que le chlorméthine (1), le melphalan (2), le cyclophosphamide (3) et l'ifosfamide (4).
 - Les nitroso-urée : tels que la carmustine (5) et la lomustine (6).
 - Les autres agents alkylants sans groupement chloroéthyle tels que le procarbazine (7), le dacarbazine (8), le thiotepa (9) et la mitomycine (10).
 - Les dérivés de platine tels que la cisplatine (11), la carboplatine (12) et l'oxaliplatine (13).

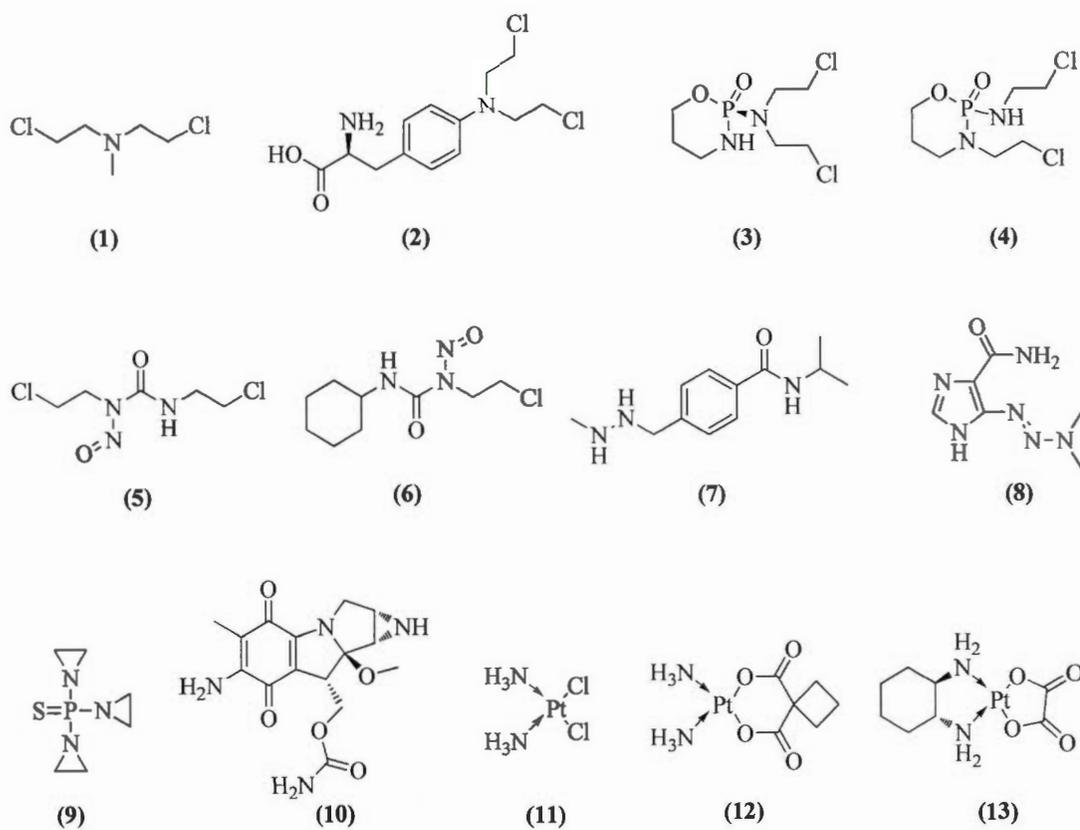


Figure 1.5 Quelques agents anticancéreux formant des adduits covalents avec l'ADN.

- ✓ Les antimétabolites qui inhibent la synthèse des constituants de l'ADN :
- Les analogues puriques : 6-mercaptopurine (14) et 6-thioguanine (15).
 - Les analogues pyrimidiques : 5-fluoro-uracile (16) et cytarabine (17).
 - Les analogues foliques : méthotrexate (18), raltitrexed (19) et pemetrexed (20).

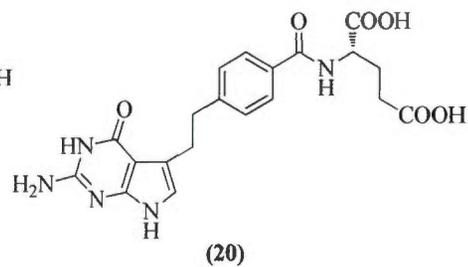
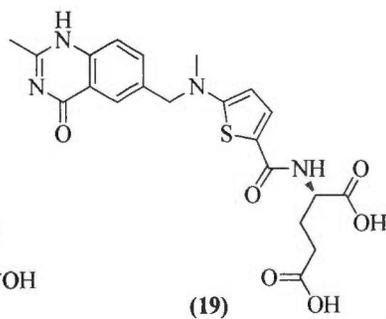
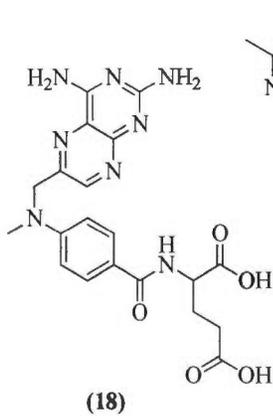
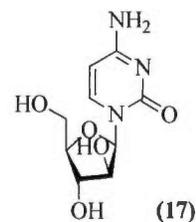
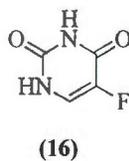
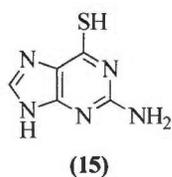
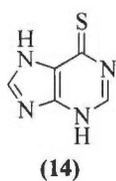


Figure 1.6 Quelques agents anticancéreux anti-métabolites.

✓ Les poisons du fuseau mitotique :

- Les vinca-alcaloïdes : vinblastine (21), vincristine (22), vindesine (23) et vinorelbine (24).
- Les taxanes : paclitaxel (25) et docetaxel (26).

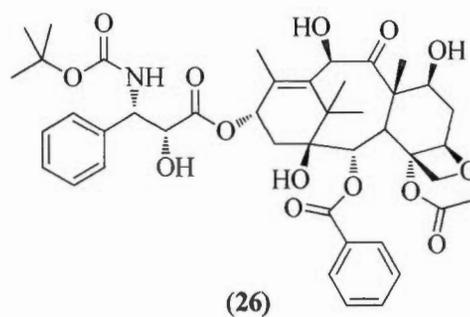
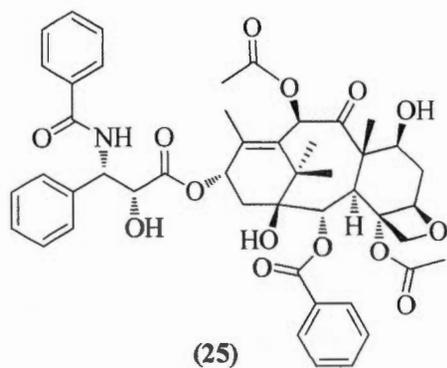
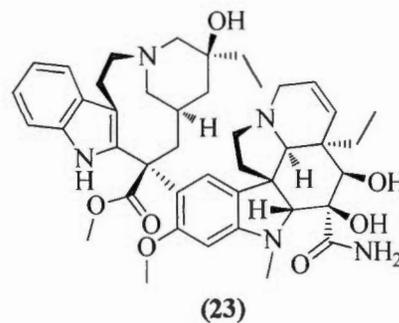
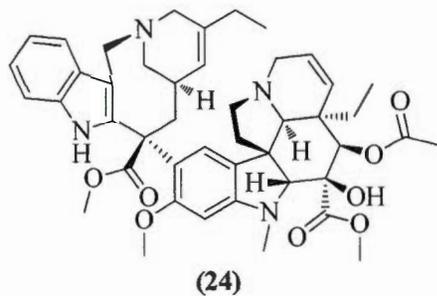
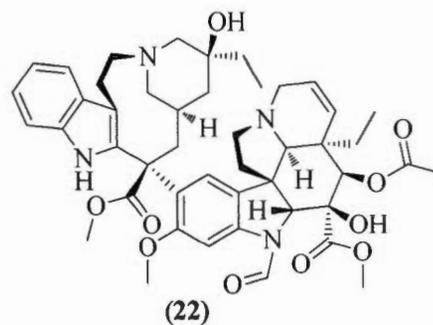
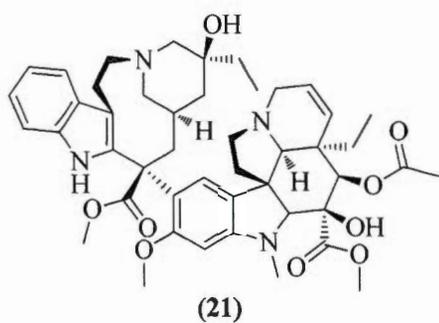


Figure 1.7 Quelques agents anticancéreux antimitotiques.

✓ Les inhibiteurs de la topoisomérase :

- Les topo-isomérase I : l'irinotecan (27) et le topotécan (28).
- Les topo-isomérase II : anthracyclines (la doxorubicine (29), l'épirubicine (30) et l'idarubicine (31)), acridines (l'amsacrine (32)), épipodophylotoxines (l'étoposide (33)) et anthracène diones (la mitoxantrone (34)).

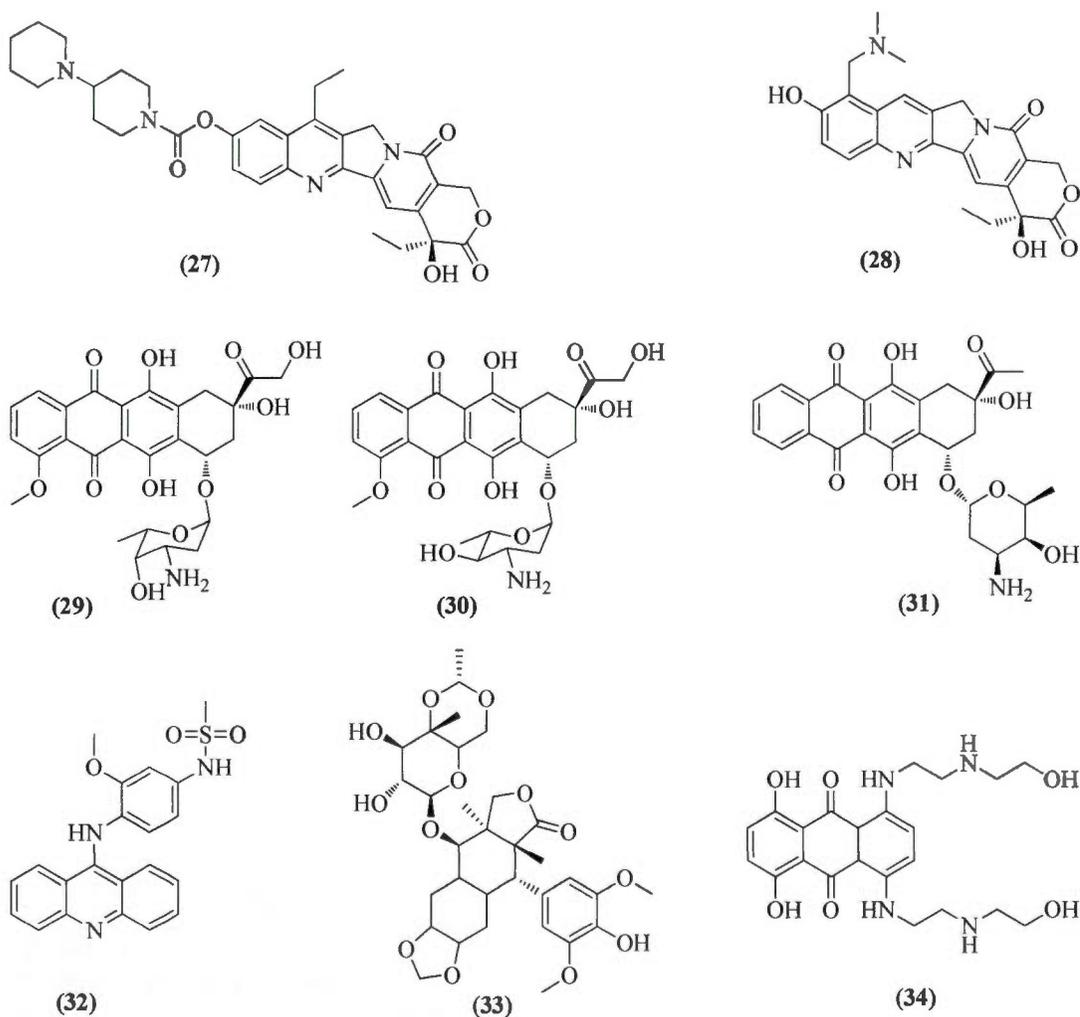


Figure 1.8 Quelques agents anticancéreux inhibiteurs de topoisomérase.

1.1.6 Substances Naturelles en chimiothérapie du Cancer

Malgré les traitements existants, le cancer est une maladie qui prend de plus en plus d'ampleur et continue à décimer des populations. Ceci est dû au phénomène de résistance aux médicaments observé avec les méthodes classiques de traitement, notamment en chimiothérapie. De plus, la chimiothérapie présente de nombreux effets secondaires tels que la nausée, le vomissement, la perte des cheveux et une fatigue extrême. La recherche de nouveaux agents thérapeutiques efficaces contre le cancer et ayant des effets secondaires négligeables constitue encore de nos jours un défi majeur. C'est dans cette optique que l'homme continue d'exploiter les ressources végétales terrestres et maritimes, ainsi que les micro-organismes pour découvrir de nouveaux agents thérapeutiques contre le cancer et bien d'autres maladies. En effet, les plantes sont utilisées depuis longtemps par certaines populations pour soigner diverses maladies dont les maladies cancéreuses.

L'histoire de l'étude des produits naturels dans la recherche des médicaments anticancéreux date de 1940 avec la découverte de la podophyllotoxine (35) de *Podophyllum peltatum*. Ensuite, dans les années 1960, l'institut National de Cancer (NCI) a lancé un vaste programme de recherche d'anticancéreux de plus de 35 000 espèces végétales. Ces travaux ont conduit à l'isolation de substances anticancéreuses telles que le paclitaxel (25) et la camptothécine (36)^{32,36}. De nos jours, les plantes et autres microorganismes continuent d'être étudiés et constituent de très importantes sources de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs. Diverses classes de composés isolés et caractérisés de nos jours ont démontré d'importantes activités antibiotiques, anti-inflammatoires, anti-hypertensives ou anticancéreuses. De 1940 à 2006, plus de 73 % des molécules ayant une activité anticancéreuse étaient des dérivés non synthétiques, dont 47 % sont des produits naturels ou des dérivés de produits naturels³⁷. De plus, près de la moitié des produits pharmaceutiques commercialisés sont des produits naturels ou des dérivés de produits naturels. En 2008, 225 médicaments issus de produits naturels étaient en phase de développement : soit en phase préclinique, en phase clinique I, II ou III, ou préenregistré pour être commercialisés³⁸.

a Anticancéreux issus des plantes

Les plantes constituent une importante source de molécules anticancéreuses. Depuis 1961, neufs composés issus de plantes ont été approuvés pour leur utilisation comme médicaments anticancéreux aux USA.

Les principales classes de métabolites secondaires anticancéreux sont :

✚ Les alcaloïdes

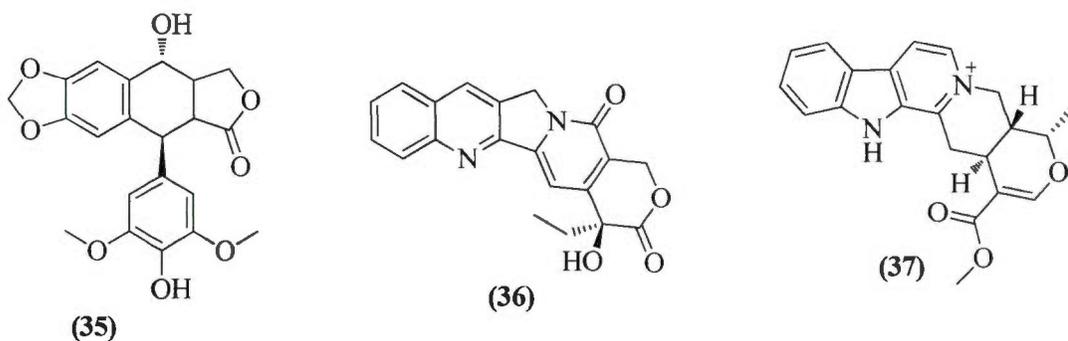
Ce sont des composés comportant au moins un atome d'azote dans leur structure. La vinblastine (Velbe®) (21) et la vincristine (Oncavin®) (22) sont deux vinca-alcaloïdes utilisés dans le traitement des lymphomes et des leucémies. Elles ont été isolées de *Catharanthus roseus* ou pervenche de Madagascar (**figure 1.9**), une plante originaire de Madagascar. Elles peuvent aussi être préparées par héli-synthèse de substances plus accessibles comme la catharanthine et la vindoline, isolées en grande quantité de la même plante.^{36,38}

La vinorelbine (Navelbine®) (24) est un analogue héli-synthétique de la vinblastine utilisée pour traiter les cancers du sein et du poumon. Elle est également obtenue de la catharanthine et la vindoline.^{36,39} La serpentine (37) est un autre agent anticancéreux prometteur issu *Catharanthus roseus*.

Ces composés inhibent l'assemblage des tubulines en microtubules, deux éléments essentiels lors de la division cellulaire. Une perturbation de l'équilibre entre ces deux éléments inhibe la division cellulaire.³⁶



Figure 1.9 Feuilles et fleurs de *Catharanthus roseus* ou pervenche de Madagascar.

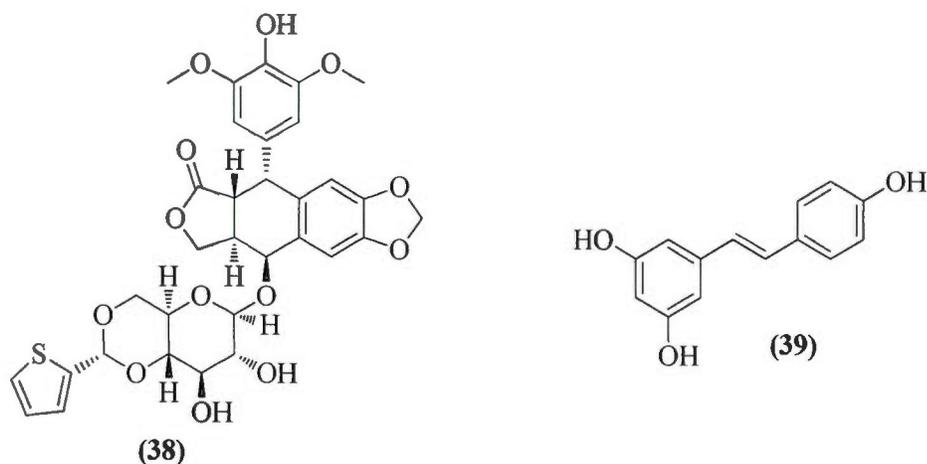


Le paclitaxel (taxol[®]) (25) est un diterpène alcaloïdique ayant une bonne activité anticancéreuse contre le cancer des ovaires et des poumons, il a été isolé pour la première fois en 1961 du *Taxus brevifolia* (encore appelé if du Pacifique). Son analogue hémi-synthétique, le docétaxel (Taxotère[®]), est aussi utilisé pour traiter différents types de cancer.

La camptothécine (36) est un autre alcaloïde indolique utilisé pour traiter le cancer du côlon. Il est aussi efficace contre les cancers de l'utérus, des ovaires et des poumons. La camptothécine a été isolée pour la première fois de *Camptotheca acuminata* Decne.^{40,41,42} Certains dérivés solubles comme l'irinotecan (Campro[®]) (27) et le topotecan (Hycamptin[®]) (28) sont aussi utilisés en clinique.³⁶

✚ La podophyllotoxine

La podophyllotoxine (35) a été isolée de *Podophyllum peltatum*, une plante médicinale utilisée en médecine traditionnelle pour soigner des verrues et excroissances.^{36,43} L'étoposide (VP-16®, Vépéside®) (33) est un dérivé semi-synthétique de podophyllotoxine; c'est un inhibiteur de la topoisomérase II. Il est utilisé contre le cancer des poumons, des ovaires et des testicules.



Le teniposide (Vehem®) (38) est un autre dérivé semi-synthétique de podophyllotoxine utilisé pour traiter le cancer du système nerveux central, le cancer de la vessie et du lymphome malin. Il agit comme inhibiteur de la topoisomérase II.

✚ Autres composés

D'autres composés issus de plantes possédant des propriétés anticancéreuses ont été isolés : il s'agit des naphtoquinones, des isoflavones genistine, des 3-carbinol indoles, des 3,3'-diindolemethanes, du curcumin, du (-)- épigallocatechin-3-gallate, du resveratrol (39) et le lycopène. Ces composés induisent l'apoptose sans affecter négativement les cellules normales.⁴⁴

b Anticancéreux issus d'organismes marins

La biodiversité marine constitue également une source non négligeable de molécules anticancéreuses, car 68 % des produits pharmaceutiques d'origine marine sont utilisés pour traiter le cancer. Par exemple, la cytarabine (Ara-C®) a été identifiée des éponges marines et inhibe les ADN-polymérase. Cette molécule est utilisée pour traiter les leucémies et divers adénocarcinomes.^{36,44} La trabectedin est un alcaloïde marin approuvé depuis 2007.⁴⁵ D'autres agents anticancéreux comme l'aplidine est en phase clinique II aux USA. L'éleutherobin discordermolide, la bryostatine-1, les dolastatines et les cephalostatines sont des exemples d'autres agents anticancéreux d'origine marine.

La curacin A, obtenue des cyanobactéries marines *Lyngbya majuscula*, possède également des propriétés anticancéreuses.

c Anticancéreux issus des micro-organismes

Les micro-organismes jouent également un rôle important dans la découverte de nouveaux agents thérapeutiques contre le cancer. En effet, certains composés utilisés en chimiothérapie sont des antibiotiques ou des dérivés provenant des microbes tels que le *Streptomyces* ou *Myxobacteria*.

Les anthracyclines tels que la daunomycine et la doxorubicine isolés d'actinomycètes du genre *Streptomyces* sont des agents intercalants et interfèrent avec la topo-isomérase II. D'autres agents anticancéreux comme les épothilones isolés d'une myxobactérie (*Sorangium cellulosum*), les bléomycines, les actinomycines et les mitomycines ont également été obtenus de souches microbiennes.^{36,44}

1.2 Les taxoïdes : le paclitaxel (Taxol[®], Yewtaxan[®])

Le paclitaxel (25) est le premier composé ayant un squelette de type taxane à posséder des activités anti-leucémique et inhibitrice de tumeurs. Le paclitaxel a été isolé pour la première fois des écorces du tronc du *Taxus brevifolia* par Wani et ses collaborateurs.⁴⁶ La découverte de l'activité cytotoxique de *Taxus brevifolia* a été faite en 1964 au cours d'un vaste programme de recherche de composés susceptibles de posséder des intérêts pharmacologiques lancé par l'institut National du Cancer (NCI) et le Département Américain de l'Agriculture USDA.

Dans leurs travaux publiés en 1971, Wani et ses collaborateurs ont décrit le protocole d'extraction du taxol ainsi que sa structure complète. Le taxol a également été isolé d'autres espèces du genre *Taxus* dont *T. cuspidata*, *T. floridana* et *T. baccata* (tableau 1.2)⁴⁷. Il se retrouve également présent dans certains champignons isolés des arbres du genre *Taxus*.⁴⁸

Les plantes du genre *Taxus* ont été répertoriées principalement dans l'hémisphère Nord : en Asie, en Amérique du Nord et du Centre et également en Europe.

Tableau 1.2 Composition en paclitaxel, baccatin III, 10-deacetylbaccatin III et brevifoliol de quelques plantes du genre *Taxus*.

Espèces du genre <i>Taxus</i>	concentration en µg/g d'épines séchées			
	Paclitaxel (25)	Baccatin III (40)	10-deacetylbaccatin III (41)	brevifoliol (42)
<i>T. baccata</i> cv.	63	10	468	6
<i>T. brevifolia</i>	130	296	41	9132
<i>T. canadensis</i>	285	224	2665	77
<i>T. cuspidata</i>	105	15	120	6
<i>T. floridana</i>	516	0	1689	0
<i>T. globosa</i>	433	168	1395	0
<i>T. x media</i> cv.	211	36	230	6
<i>T. wallichiana</i>	272	0	1092	0

Le taxol a démontré des activités anticancéreuses contre diverses lignées de cellules cancéreuses dont le mélanome B16, les leucémies L-1210, P-388 et P-1534, ainsi que le carcino-sarcome Walker 256.⁴⁹ C'est un composé hautement fonctionnalisé approuvé par le FDA en 1992 pour traiter le cancer des ovaires, puis en 1994 pour traiter le cancer du sein. Il est aussi utilisé pour traiter le cancer du poumon, les sarcinomes de la tête et du cou.^{50,51}

Le mode d'action du taxol est unique et bien connu à ce jour. Il agit en promouvant l'assemblage des microtubules lors de la division cellulaire, ce qui permet de bloquer le cycle de division cellulaire.⁵² En effet, les microtubules constituent une partie importante de la cellule, essentiellement pour la division cellulaire. Les microtubules se forment lorsque la cellule commence à se diviser et sont par la suite détruites ou détériorés quand la division s'arrête. Le taxol intervient en stabilisant les microtubules, empêchant ainsi leur détérioration : il en résulte des cellules qui ne peuvent plus croître, ni se diviser.

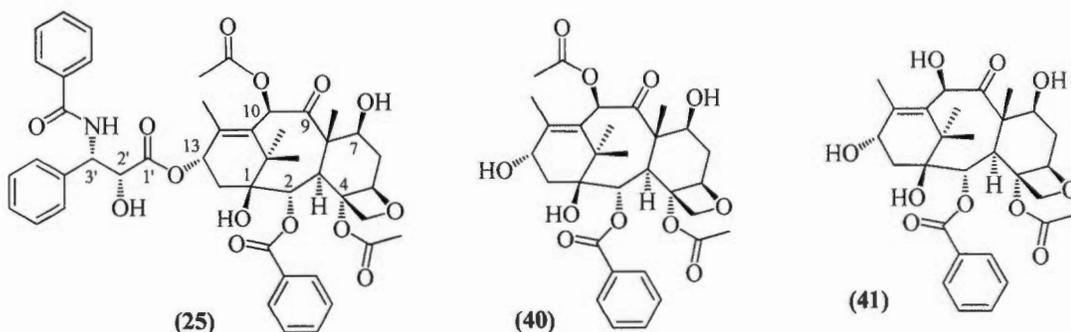
Le taxol (**25**) et son dérivé semi-synthétique le taxotère[®] (**26**) sont les médicaments anticancéreux les plus utilisés de nos jours.⁴⁸

Malgré ses importantes activités anticancéreuses, la production du taxol pour combler la demande a toujours été un grand défi, notamment pour l'environnement. En effet, la production de 1 Kg de taxol à partir du *Taxus brevifolia* nécessite d'abattre 2000 à 3000 arbres.⁴⁸

De plus, la synthèse totale de taxol est complexe et a permis d'obtenir du taxol avec un rendement maximum de 2 %.⁵³⁻⁵⁶

La production de taxol et de taxotère de nos jours se fait en bonne partie par hémisynthèse du baccatin III (**40**) ou du 10-deacetylaccatin III (**41**) comme précurseur.^{48,57-63} Ces deux précurseurs sont obtenus en quantité importante d'aiguilles de plantes du genre *Taxus* sans abattre l'arbre (source renouvelable). Le taxotère est un agent chimiothérapeutique utilisé pour traiter le cancer des ovaires, du sein et des poumons. Le taxol peut aussi être obtenu par culture cellulaire.⁴⁸

Des études de relation structure-activité ont démontré que le cycle oxétane, ainsi que la chaîne latérale en C-13 du taxol et la présence du groupe hydroxyle en C-2' étaient importantes pour l'activité cytotoxique.⁴⁶ La fonctionnalisation en C-7, C-9 et C-10 affecte moins l'activité cytotoxique du taxol. De plus, les groupes fonctionnels benzoate en C-2 et acétate en C-4 sont nécessaires pour l'activité.⁶⁴ La substitution de l'atome d'oxygène du cycle oxétane par l'azote, le soufre ou le sélénium entraîne une grande réduction de l'activité.⁶⁵



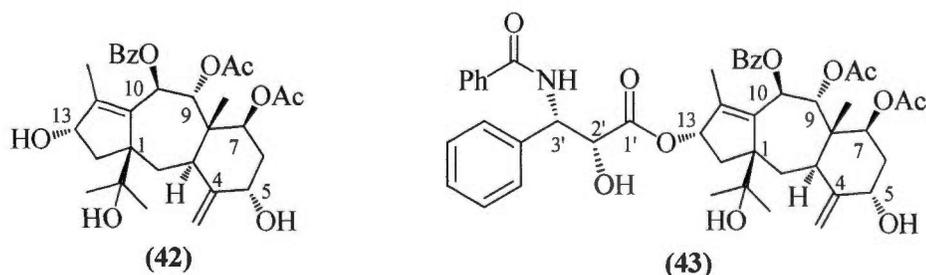
1.3 Le brevifoliol

Du fait de la faible disponibilité du taxol et surtout de son activité biologique unique, la recherche de nouveaux agents cytotoxiques des plantes de la famille des taxanes a connu un grand développement à la suite de la découverte du taxol. En effet, plus de 350 taxoïdes ont été isolés et caractérisés de diverses espèces du genre *Taxus*. Aucun des composés isolés n'a malheureusement démontré une activité anticancéreuse comparable ou supérieure à celle du taxol. Le brevifoliol (42) est un abeotaxane isolé de *Taxus brevifolia*. C'est un composé peu cytotoxique et possédant un bon potentiel d'inhibition de l'activité de transport de la P-gp. La P-gp est une protéine membranaire responsable du phénomène de multi-résistance aux médicaments observé en chimiothérapie dans le traitement du cancer.

De plus le brevifoliol est une molécule assez disponible et que l'on peut isoler en grande quantité des aiguilles du *Taxus brevifolia*.⁴⁷

1.3.1 Isolation et Caractérisation

Le brevifoliol est un diterpène naturel qui se retrouve dans diverse espèces du genre *Taxus*. Le composé a été isolé pour la première fois des aiguilles du *Taxus brevifolia* par Balza et ses collaborateurs en 1991.⁶⁶ A ce jour, le *Taxus brevifolia* représente la source la plus intéressante de brevifoliol (**tableau 1.2**).⁴⁷ Sa structure exacte a été établie grâce aux travaux de CHU et ses collaborateurs en 1994.⁶⁷



1.3.2 Activités biologiques du brevifoliol

Des études de cytotoxicité menées en 2004 par l'équipe de Khanuja et ses collaborateurs ont montré que le brevifoliol possède une activité anticancéreuse *in-vitro* significative contre diverses lignées de cellules cancéreuses (**Tableau 1.3**).⁶⁸

Tableau 1.3 Propriétés cytotoxiques (IC 90 en $\mu\text{g/mL}$) de divers taxanes isolés de *Taxus wallichiana*.

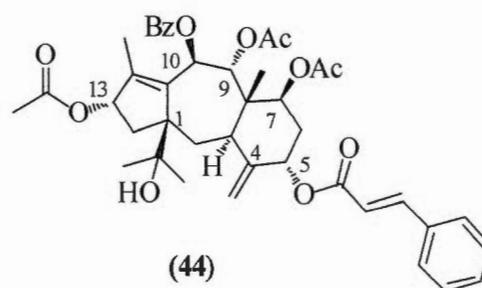
Composé	PA-1	Caco-2	MCF-7	KB-403	COLO-320 DM	WRL-68
Taxol (Std)	0.9	0.065	0.85	0.047	0.01	2.5
Doxorubicine (Std)	0.5	0.052	0.01	0.06	0.08	1.0
Brevifoliol	6.0	0.85	0.004	0.035	0.1	>10.0
Acétoxy brevifoliol	-	-	-	10.0	-	5.0

1.3.3 Activités biologiques des dérivés de brevifoliol

De nombreux travaux d'hémisynthèse de dérivés de brevifoliol ont été réalisés par différents groupes de recherche. Une étude structure-activité a été faite sur ces dérivées dans certains cas.

Georg et ses collaborateurs ont synthétisé le dérivé 13-[N-benzoyl-(2'R,3'S)-3'-phénylisoserinate] brevifoliol (**43**). Leur recherche a consisté à synthétiser un dérivé de brevifoliol possédant une chaîne latérale en C13 similaire à celle du taxol puisque cette chaîne est essentielle pour l'activité biologique du taxol. Le dérivé synthétisé a démontré une faible activité cytotoxique contre les cellules du mélanome B-16. Aucune activité n'a été observée sur l'aptitude à promouvoir l'assemblage des microtubules à une concentration de 10 μM .⁶⁹

Dans ses travaux de 1994, Kobayashi et ses collaborateurs ont isolé de *Taxus cuspidata* 3 taxoides nouveaux taxuspine A – C accompagné de 9 taxoides connus. L'activité cytotoxique des composés ainsi que le potentiel d'inhibition de l'activité de transport de la P-gp a aussi été évalué sur ces composés. Parmi les composés isolés, la taxuspine A (**44**) est un analogue du brevifoliol possédant une fonction acétyle en position 13 et un groupe cinnamoyle en position 5 et a démontré une activité cytotoxique contre les lymphomes L-1210 et les carcinomes KB avec des valeurs d'IC₅₀ de 4,2 et 5,8 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Ce composé ne présente pas d'effet important sur la stabilisation des microtubules. Par contre, le composé permet une accumulation modérée de Vincristine dans les cellules cancéreuses comparée à la verapamil utilisée comme référence. La vincristine est un agent anticancéreux utilisé en chimiothérapie, mais l'accumulation intracellulaire de vincristine est réduite chez les cellules cancéreuses multi-résistantes aux drogues.⁷⁰



En 2004 dans le laboratoire du Professeur Breau, des dérivés de brevifolol possédant des substituants en position C5 et C13 ont été synthétisés et caractérisés.⁷¹ Aucune évaluation biologique des composés synthétisés n'a été faite.

Chattopadhyay et ses collaborateurs ont synthétisé en 2008 différents dérivés mono et disubstitués possédant des chaînes latérales du type taxol en C5 et C13 (**figure 1.10**).⁷² L'activité cytotoxique des dérivés a été évaluée contre les lignées de cellule cancéreuses de la bouche (KB), des seins (MCF-7), du colon (CaCO2) et du foie (HepG-2).

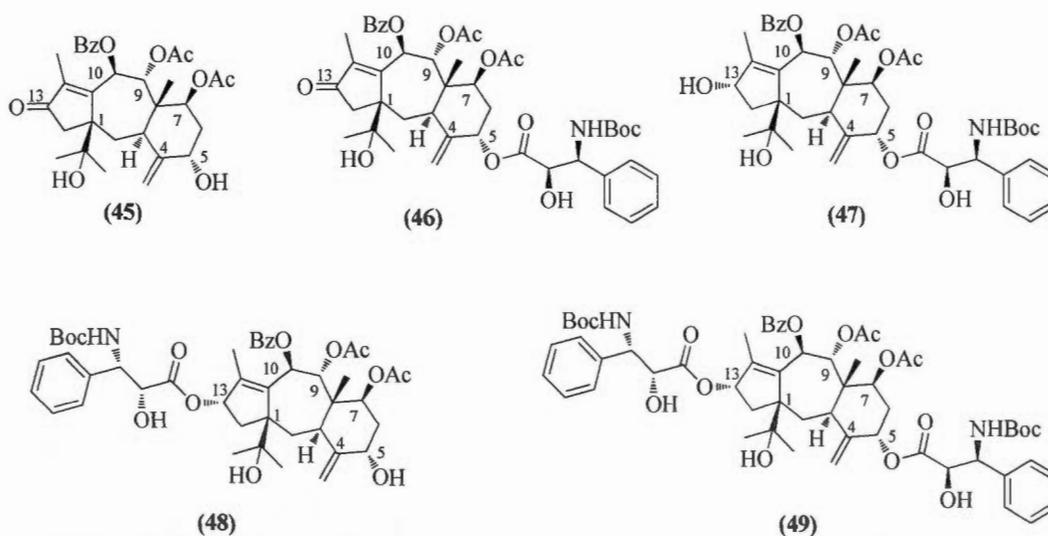


Figure 1.10 Dérivés de brevifolol synthétisés par Chattopadhyay et ses collaborateurs.

Les tests de cytotoxicité montrent que les dérivés (45), (47), (48) et (49) sont moins actifs que le brevifoliol. Le dérivé (46) possède une activité cytotoxique sélective contre la lignée de cellules cancéreuses du foie.

Zhao et ses collaborateurs ont synthétisé en 2008 différents dérivés de brevifoliol possédant des fonctions α,β -insaturés sur les cycles A et C (**figure 1.11**). En effet les accepteurs de Michael sont considérés comme une classe de molécules bioactives directement ou indirectement impliqués dans divers processus de la vie. Ce sont des régulateurs de divers signaux cellulaires et ont joué un rôle important dans des études en biologie chimique.⁷³ Les tests de cytotoxicité montrent une faible activité cytotoxique des composés synthétisés contre les cellules cancéreuses du poumon A-549. Le brevifoliol ne démontre pas d'activité cytotoxique contre cette lignée cellulaire. L'agent anticancéreux cisplatine a été utilisé comme composé de référence.

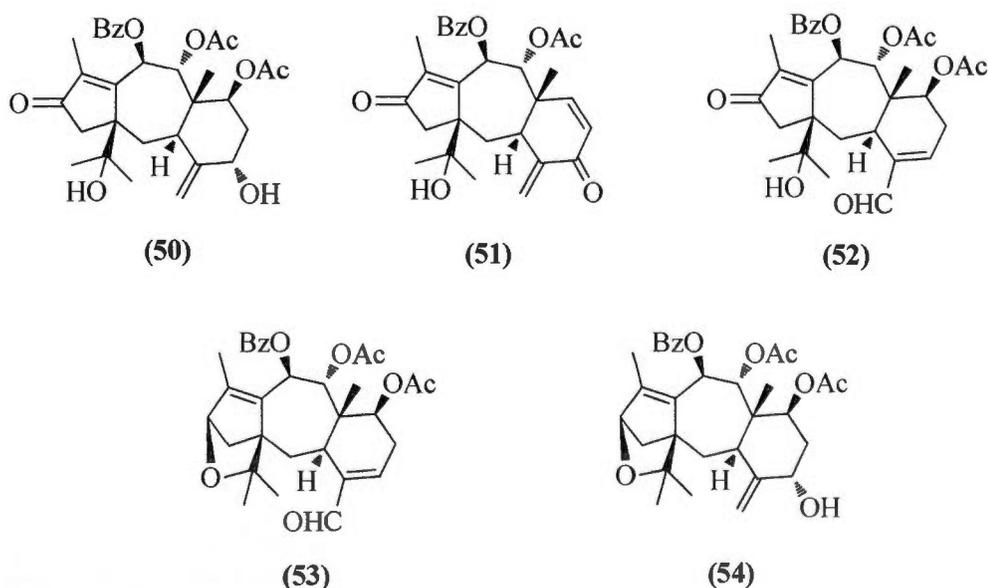


Figure 1.11 Dérivés de brevifoliol synthétisés par Yu Zhao et ses collaborateurs.

De leur étude, il ressort que les dérivés ayant une cétone exo-cyclique α,β -insaturée sur le cycle C présentent une bonne activité cytotoxique. Par contre, la présence de cétone α,β -insaturée sur le cycle A ne semble pas avoir d'impact sur l'activité biologique.

1.4 Hypothèse de travail

Malgré les avancées importantes connues ces dernières décennies dans l'étude du cancer et de ses modes de traitements, le cancer continue de nos jours à décimer les populations aussi bien en occident que dans les pays en voie de développement. Ceci peut être dû à :

- La détection parfois à un stade très avancé de la maladie, ce qui limite le contrôle de la maladie et réduit considérablement les chances de guérison.
- Le phénomène de résistance aux médicaments anticancéreux observé en chimiothérapie, ce qui rend le médicament moins disponible pour l'effet désiré. La P-gp est une protéine membranaire en partie responsable de ce phénomène. Elle est surexprimée chez les cellules cancéreuses multi résistantes et agit comme une pompe en expulsant de la cellule toutes molécules étrangères à celle-ci.
- La capacité de réapparition du cancer.

Tous ces facteurs justifient la nécessité d'une recherche continue de nouveaux agents anticancéreux ou contribuant efficacement au traitement du cancer. Ces agents doivent être bio-disponibles ou obtenus de composés bio-disponibles. Ils doivent aussi présenter peu ou pas d'effets secondaires pour l'humain.

Notre principale source d'agent anticancéreux reste la biodiversité végétale dont une infime partie seulement a été étudiée à ce jour. C'est une source de molécules complexes et de structures très variées. Le brevifoliol est une molécule naturelle très abondante dans la plante *Taxus brevifolia*. Ce composé a démontré une faible activité cytotoxique et est capable

d'empêcher la P-gp d'expulser de la cellule les médicaments utilisés en chimiothérapie. Ce qui permettrait d'accroître la concentration cellulaire d'agents anticancéreux, et par conséquent d'avoir une meilleure activité.

À ce jour, de nombreux agents dont la verapamil sont utilisés pour moduler ou bloquer l'activité de transport des médicaments de la P-gp. Dans l'optique de découvrir de nouveaux agents anti P-gp, des hémi-synthèses ont été effectuées sur le brevifoliol afin d'accroître son potentiel d'inhibition de la P-gp pour une application potentielle en chimiothérapie en association avec des agents anticancéreux.

1.5 But de la recherche

Notre objectif général dans le cadre de cette recherche est d'accroître le potentiel inhibiteur de P-gp du brevifoliol par la synthèse d'analogues de brevifoliol par des réactions chimiques simples, en courtes étapes, puis d'évaluer le potentiel d'inhibition de P-gp des dérivés obtenus sur des cellules cancéreuses multi-résistantes d'Hamster Chinois CH^RC5.

La réalisation de ce travail s'effectue en différents points en commençant par :

- ✚ Isoler et caractériser le brevifoliol d'un extrait au méthanol des épines d'arbre de *Taxus brevifolia* suivant le protocole d'extraction développé par Balza et ses collaborateurs en 1991.⁶⁶
- ✚ Synthétiser une série de dérivés d'acide cinnamique mono et bis-estérifiés par couplage du brevifoliol avec différents dérivés d'acide cinnamique activés avec le DCC en présence de DMAP.
- ✚ Évaluer le potentiel cytotoxique et inhibiteur de P-gp des dérivés obtenus dans le but d'établir une première relation structure-activité.
- ✚ Poursuivre éventuellement les études structure-activité par la synthèse et l'évaluation biologique d'autres dérivés de brevifoliol. Ceci dans l'optique de

faire une bibliothèque de nouvelles molécules, candidates pour aider à moduler ou à résoudre le problème de multi-résistance aux médicaments anticancéreux en chimiothérapie.

CHAPITRE II

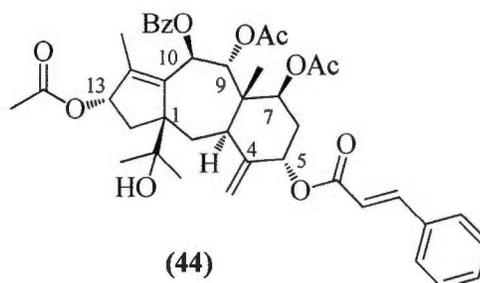
RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 Introduction

La chimiothérapie est l'un des modes de traitement couramment utilisé à ce jour pour soigner le cancer. La chimiothérapie est une technique qui consiste à administrer au patient, souvent par voie intraveineuse, un agent qui va induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Malgré l'efficacité des traitements observée avec des agents utilisés tels que le taxol, le taxotère, la vinblastine ou l'adryamycine, le traitement en chimiothérapie comporte de nombreux effets secondaires dont la multi-résistance aux médicaments développés par certaines cellules cancéreuses. Ce phénomène est le plus souvent associé à l'action de la glycoprotéine-P (P-gp). (Voir section 1.1.5.d)

Plusieurs composés naturels dont des curcuminoïdes ont été évalués pour leur capacité à inhiber l'activité de transport de la P-gp.^{34,74-77} Les composés isolés des plantes du genre *Taxus* sont très diversifiés de par leur structure chimique et présentent des activités biologiques différentes. Certains composés ont démontré une activité cytotoxique très intéressante contre diverses lignées de cellule cancéreuse. C'est le cas du taxol, très longtemps utilisé pour traiter différents cancers chez l'humain. Dans la recherche de nouveaux agents chimio-thérapeutiques des plantes du genre *Taxus*, d'autres taxoïdes peu cytotoxiques et présentant d'autres activités biologiques ont été isolés à ce jour. Le brevifoliol, un abeo-taxane issu de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) isolé pour la première fois en 1991⁶⁶, est un composé qui a démontré de faible activité cytotoxique contre différentes lignées de cellules cancéreuse. Les travaux menés en 1994 par l'équipe de Kobayashi et ses collaborateurs ont permis d'isoler de *Taxus cuspidata* la taxuspine A (**44**), un dérivé naturel de brevifoliol qui permettait d'accroître la concentration cellulaire de vincristine. La vincristine est un agent anticancéreux utilisé en chimiothérapie dans le traitement du cancer et dont l'activité est réduite chez des cellules multi-résistantes du fait de l'activité de la P-gp

surexprimée dans ces cellules. Ainsi la taxuspine A (44) permettrait au médicament de jouer efficacement son rôle anticancéreux. En se basant sur ces résultats fort intéressants et sur des travaux préliminaires réalisés sur le brevifoliol par le laboratoire Breau en collaboration avec l'équipe du laboratoire Averill, travaux montrant un faible potentiel inhibiteur de P-gp du brevifoliol, nous avons envisagé dans le cadre de ce projet de synthétiser des dérivés d'acide cinnamique du brevifoliol dans le but de vérifier l'influence de la nature des groupements greffés en C-5 et/ou C-13 du brevifoliol, aussi la nature du groupe cinnamoyle des dérivés, ainsi que l'influence que peut présenter la position de ces groupes cinnamoyles sur l'activité biologique cytotoxique et inhibitrice de l'activité de la P-gp des dérivés obtenus.



2.2 Isolation et caractérisation du brevifoliol

La matière première a été extraite en suivant le protocole décrit par Balza et ses collaborateurs en 1991⁶⁶. Brièvement, 20 g d'extrait au CHCl_3 d'aiguilles fraîches de *Taxus brevifolia* a été solubilisé dans un minimum de CH_2Cl_2 puis chromatographiés sur colonne en utilisant les systèmes d'élution CH_2Cl_2 puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:05). Les fractions contenant le brevifoliol ont été regroupées ensuite sur la base des CCM faites avec le système $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:05). Cette série a été dissoute dans un minimum de CH_2Cl_2 puis purifiée par chromatographie radiale avec comme éluant le mélange EP/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ (75:20:05). Des fractions pures de brevifoliol ont été obtenues. La recristallisation dans le mélange acétone/pentane (5:1) nous a permis d'obtenir le composé (42) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 6,2 % (1,24 g) à partir de 20 g d'extrait au CHCl_3 .

Le composé a été identifié par CCM et RMN ^1H par rapport à un échantillon de référence disponible au laboratoire. Le spectre de RMN ^1H (**figure 2.1**) montre les signaux d'hydroxyméthine en position 5 et 13 respectivement à δ 4,46 (s l., 1H) et 4,40 (t, $J=7,1$ Hz, 1H). Les signaux des protons de l'exo méthylène en position 20 apparaissent quant à eux à δ 4,84 et 5,19 sous forme de singulet. Les trois hydroxyméthine H-7, H-9 et H-10 estérifiés apparaissent respectivement à δ 5,56 (dd, $J=11,5$ et 5,0 Hz, 1H), 6,06 (s l., 1H) et 6,54 (d, $J=10,4$ Hz, 1H). Sur le spectre proton, on note également la présence de 6 signaux singulets correspondant aux signaux de méthyle. Parmi ces signaux on a deux méthyles esters à δ 2,09 (s, 3H, 7-OCOCH₃) et 1,76 (s, 3H, 9-OCOCH₃). Le méthyle 18 lié à un carbone sp^2 apparaît comme un singulet à 2,04 ppm. Les trois autres signaux de méthyle apparaissent à 1,05 (s, 3H), 1,36 (s; 3H) et 0,92 (s; 3H) attribuables respectivement aux méthyles en position 16, 17 et 19. Les attributions des autres signaux ont été faites en accord avec les données de la littérature (**tableau 2.1**).⁷¹

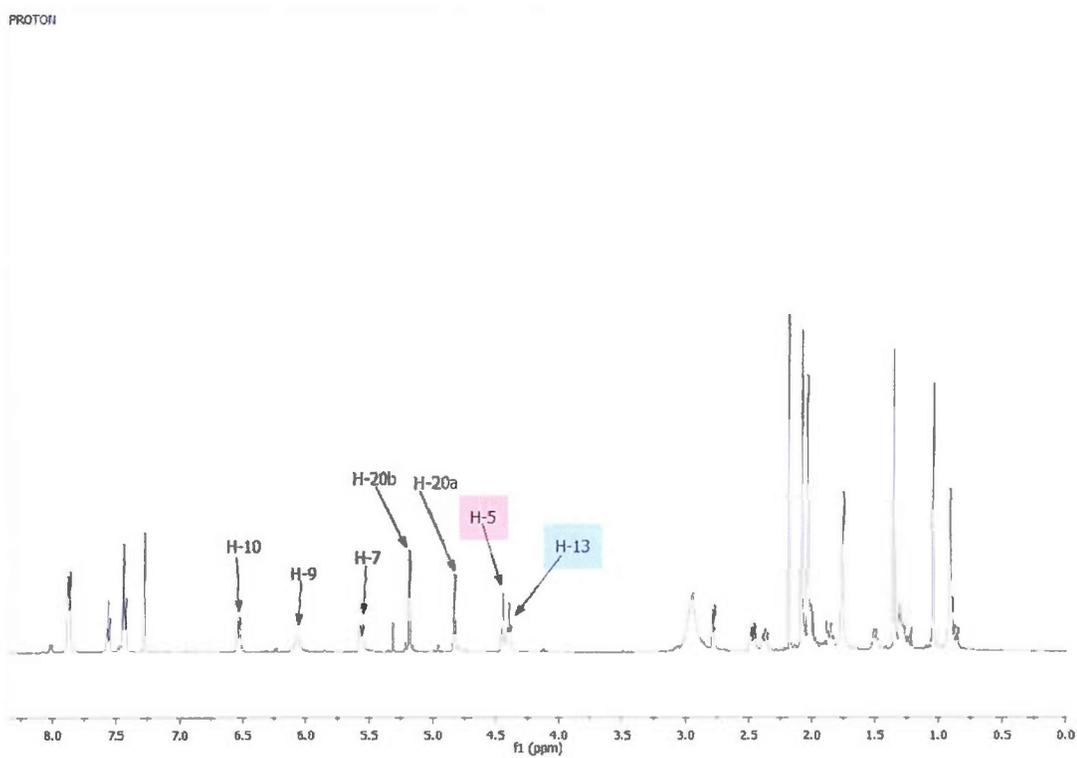
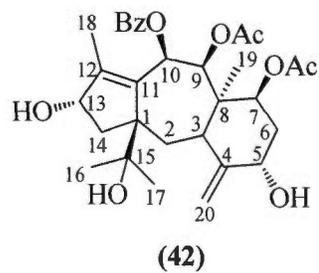


Figure 2.1 Spectre de RMN ^1H du brevifoliol (42) dans le CDCl_3 .

2.3 Hémisynthèse de dérivés de brevifoliol

Dans le but de synthétiser les dérivés d'acide cinnamique du brevifoliol, une méthode de couplage utilisant le DCC en présence de DMAP a été utilisée puisque des dérivés d'acide cinnamique sont commercialement disponibles pour le couplage avec l'hydroxyle en position C-5 ou C-13 du brevifoliol. D'une façon générale, pour la synthèse des dérivés mono-estérifiés, le brevifoliol (1 éq) a été mis en réaction avec le dérivé d'acide cinnamique (entre 1,0 et 1,1 éq) correspondant en présence de DCC (entre 1,5 et 2,0 éq) et de DMAP (0,5 éq) dans le CH_2Cl_2 ou le toluène anhydre. Ces proportions ont été utilisées pour favoriser la formation des dérivés mono-estérifiés (C-5 et C-13) et aussi minimiser le taux du dérivé bis-estérifiés qui pourrait se former. Le mélange a ensuite été agité à la température de la pièce pendant 3 jours en moyenne. L'évolution de la réaction est suivie par CCM dans le système hexanes/ CH_2Cl_2 /EtOH (75:20:05), hexanes/toluène/AcOEt (30:30:40) ou CH_2Cl_2 /MeOH (95:05), suivie d'une révélation des plaques à l'UV ou d'une pulvérisation à l'aide d'une solution de phosphomolybdate et du chauffage. Après un temps d'agitation correspondant, la solution est filtrée pour éliminer une partie de la DCU formée. Ensuite, le filtrat est concentré et la DCU restante est recristallisée dans l'éther. Après la filtration et la concentration du second filtrat, on obtient une huile contenant les produits de couplage et le brevifoliol restant. Le concentré obtenu est purifié par chromatographie sur colonne sur gel de silice avec le système hexane/ CH_2Cl_2 /EtOH (75:20:05), suivi d'une autre série de purification par chromatographie radiale avec l'un des systèmes CH_2Cl_2 /Et₂O (95:05) ou CH_2Cl_2 /tBuOMe (90:10 ou 95:05). Le processus de détermination du choix de système de solvant approprié pour séparer les dérivés mono-estérifiés a été plus complexe et plus long que le dérivé de bis-couplage. En effet, les deux produits issus du mono-couplage sont des isomères de position qui ne diffèrent que par la position du groupe cinnamoyle greffé en C-5 ou en C-13 du brevifoliol. Pour ces dérivés, la reprise de la réaction a été nécessaire pour avoir plus de produit et isoler ainsi le dérivé substitué en position C-13 qui se forme minoritairement (environ 15%). Dans l'ensemble, les dérivés ont été obtenus avec des rendements globaux de 30 à 76 %.

Pour l'obtention du dérivé issu d'un bis-couplage, la réaction s'est faite avec 3,0 éq d'acide *p,m*-diméthoxycinnamique en présence de DCC (3,0 éq) et de DMAP (0,5 éq) dans le CH_2Cl_2 anhydre comme solvant et laissé en agitation pendant 4 jours jusqu'à l'obtention du produit. L'élimination de la DCU est faite comme précédemment et la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice (10 g) avec comme système d'éluant le mélange hexane/ CH_2Cl_2 /AcOEt (50:05:45). Les fractions contenant le produit de bis-couplage ont été regroupées, concentrées, puis recristallisées dans le mélange acétone/pentane (5:1). Le produit est obtenu avec un rendement de 75 %.

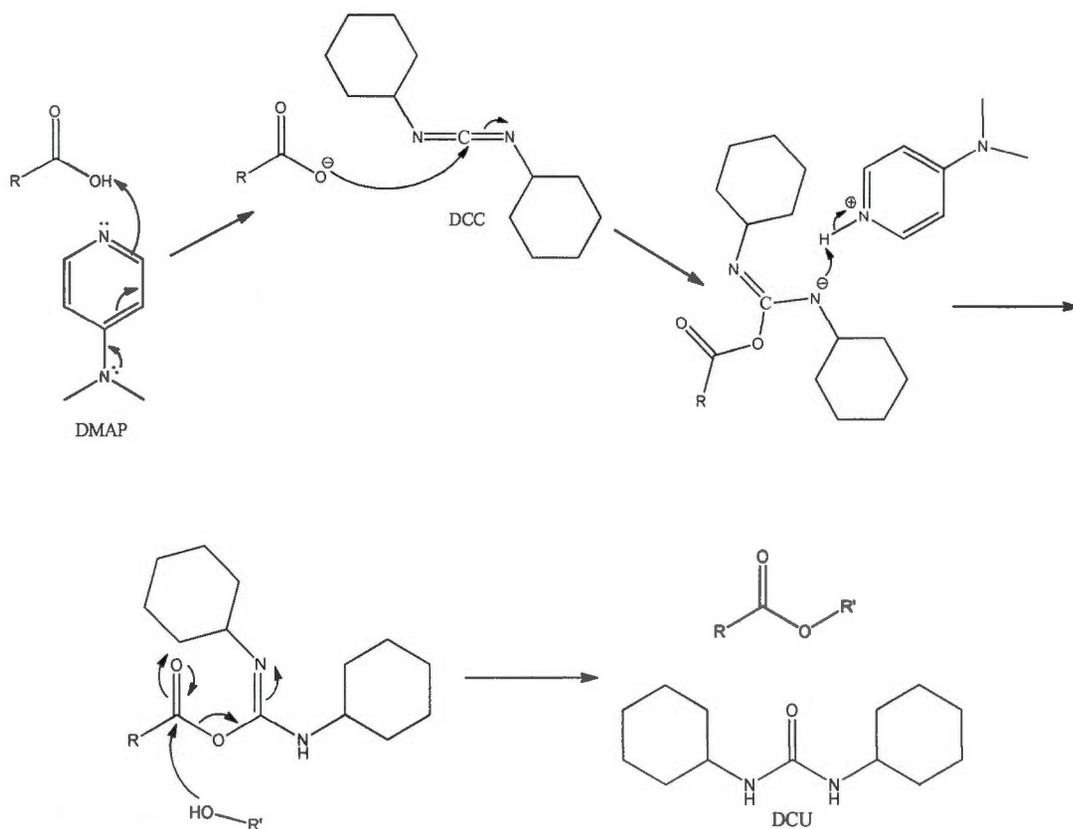
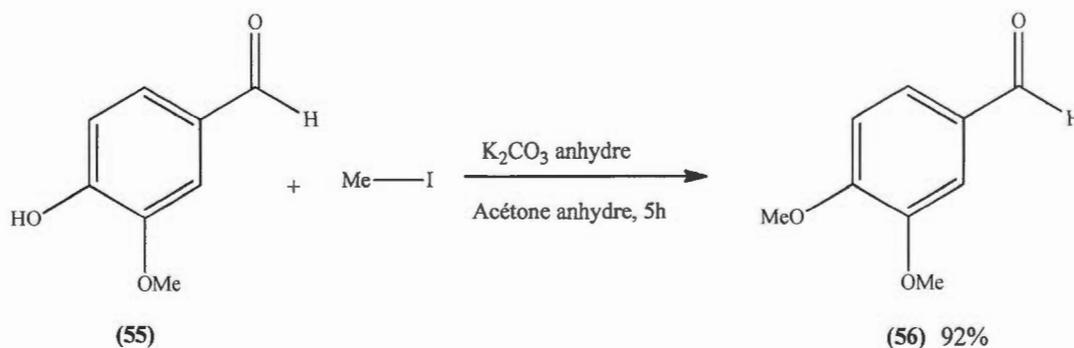


Figure 2.2 Mécanisme de la réaction de couplage au DCC.

2.3.1 Synthèse des dérivés 5- et 13-*p,m*-diméthylcinnamoyl brevifoliol

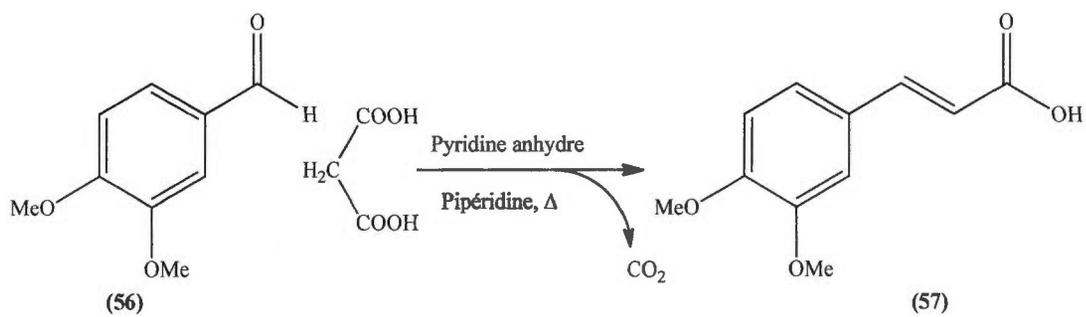
a Synthèse de l'acide *p,m*-diméthoxycinnamique

L'acide *p,m*-diméthoxycinnamique (**57**) utilisé a été synthétisé au laboratoire à partir de la vanilline (**55**). Dans une première étape, nous avons fait une méthylation du phénol pour former l'*o*-méthoxyvanilline (**56**) avec un rendement de 92%.



Le spectre proton du produit obtenu montre bien un pic d'aldéhyde qui résonne à 9,70 ppm sous forme de singulet. Sur ce spectre, on observe des singulets de méthoxy phénoliques à δ 3,90 et 3,92. Les signaux aromatiques sortent entre 7,18 et 7,35 ppm.

Le produit obtenu a ensuite été transformé en une seule étape en acide *p,m*-diméthoxycinnamique par la réaction de condensation de Knoevenagel modifiée par Doebner. La décarboxylation de l'intermédiaire dicarboxylique (**58**) est induite par la pyridine (**Figure 2.3**).



Le mécanisme de la condensation de Knoevenagel est représenté dans la **figure 2.3**.

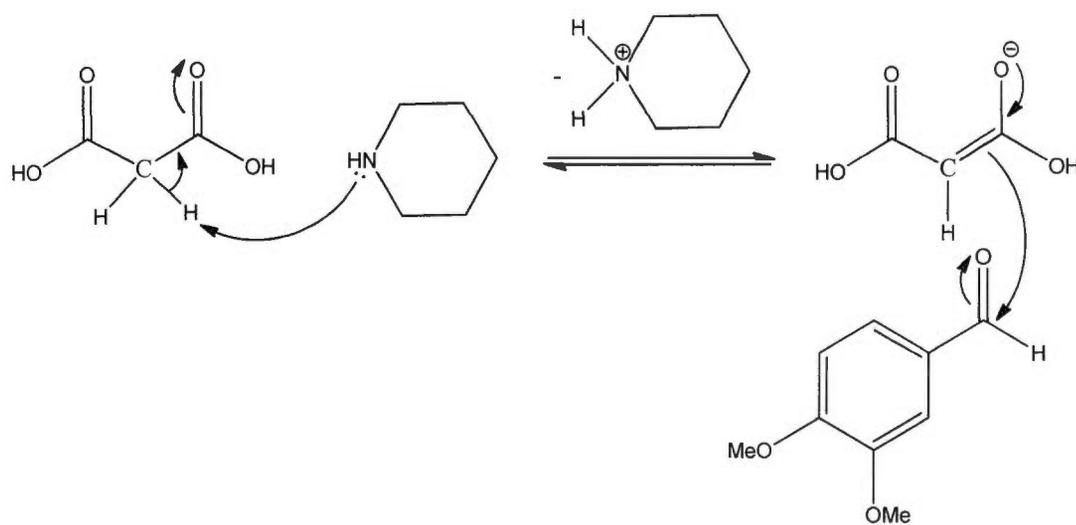


Figure 2.3 Mécanisme de la réaction de condensation de Knoevenagel modifiée par Doebner.

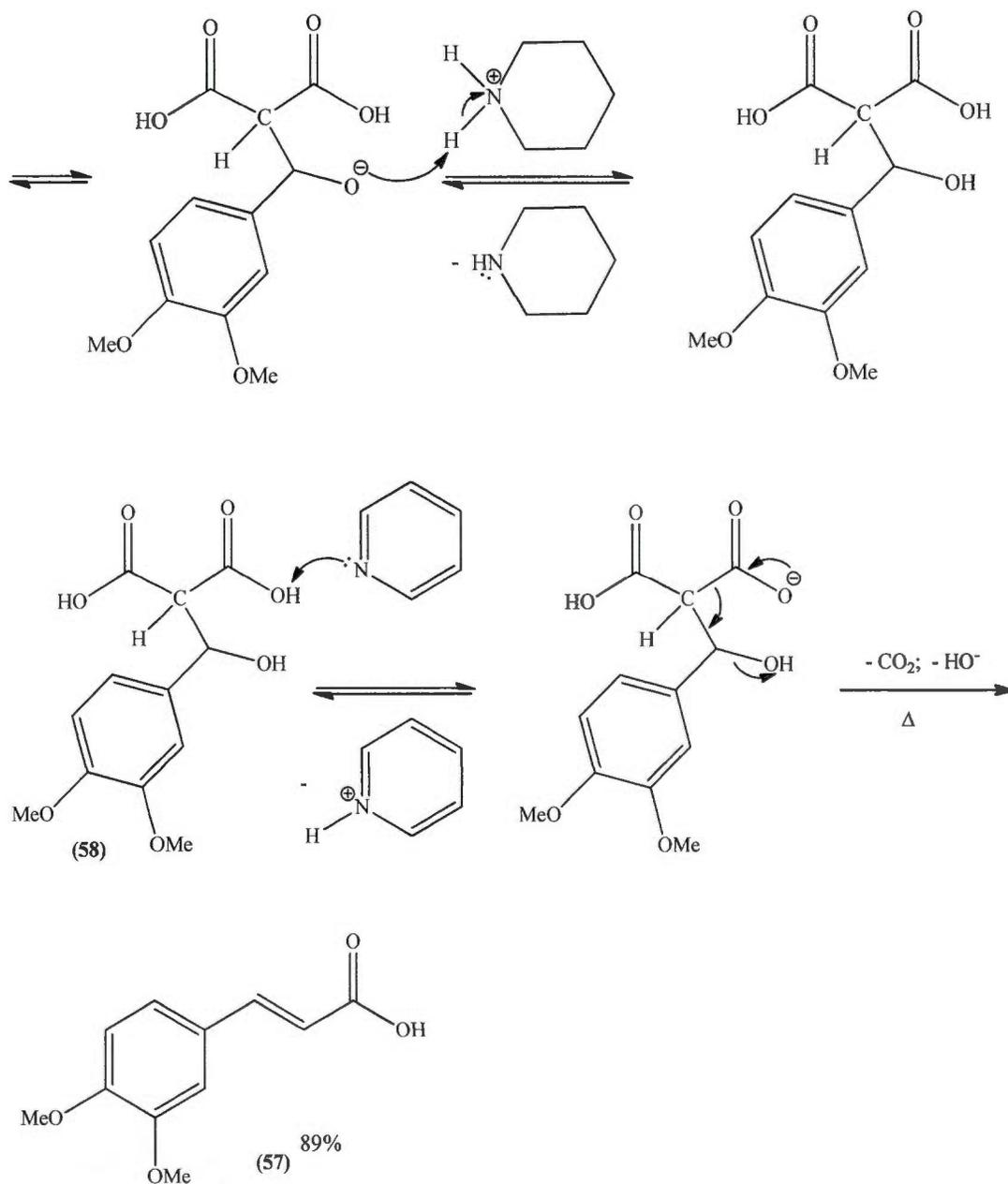


Figure 2.3 Mécanisme de la réaction de condensation de Knoevenagel modifiée par Doebner. (Suite)

Le composé (**57**) est obtenu avec un rendement de 89 %. Sur son spectre RMN ^1H , on observe un système AB à δ 6,35 (d, $J=16,0$ Hz, 1H) et 7,46 (d, $J=16,0$ Hz, 1H). La valeur de la constante de couplage $J=16,0$ Hz montre que ces deux protons sont *trans*. On observe également sur le spectre proton les signaux singulets des deux méthoxys phénoliques à δ 3,90 et 3,92. Les signaux aromatiques sortent entre 7,18 et 7,35 ppm.

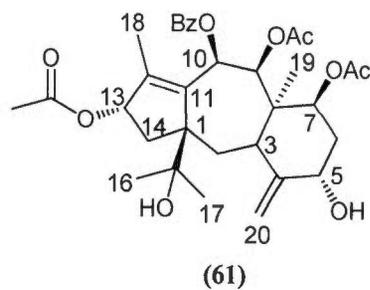
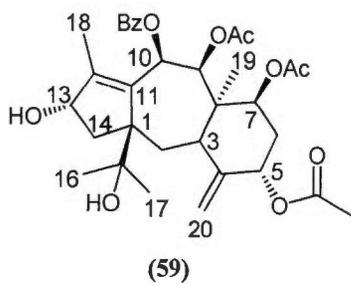
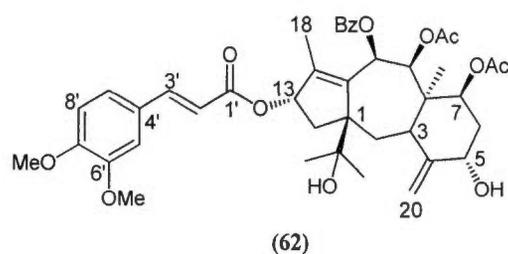
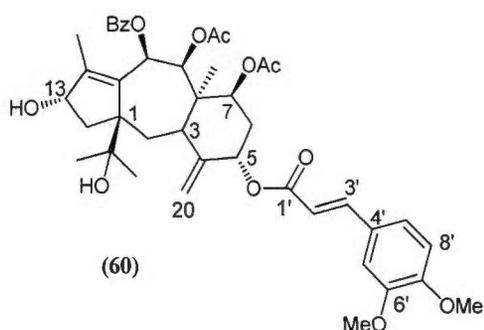
b Synthèse et caractérisation des dérivés 5- et 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol

La synthèse des dérivés 5- et 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**, **62**) a été réalisée selon la méthode générale décrite à la section 3.4.3 et obtenue avec un rendement de 32 % et 13 % respectivement.

Le composé 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**) a été recristallisé dans l'hexane. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS en mode positif montre le pic de l'adduit sodique à m/z 769,31 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ceci laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{O}_{12}$. Sur ce même spectre, on observe à m/z 626,05 le pic correspondant à la perte du groupe $-\text{OBz}$ $[\text{M}-\text{OBz}+\text{H}]^+$.

Sur son spectre de RMN ^1H (**figure 2.4**), on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-5 à 5,53 ppm. Ceci suggère que le couplage a été effectué à cette position (le signal H-5 du brevifoliol est à 4,5 ppm). Par comparaison au spectre du brevifoliol initial, on observe la présence de pics additionnels correspondant aux pics du groupe cinnamoyl greffé en C-5. En effet, on note la présence des signaux du système AB à δ 6,38 (d, $J=16$ Hz, 1H) et 7,61 (d, $J=16$ Hz, 1H). De plus, on observe à δ 3,92 et 3,94 les signaux des deux méthoxys du groupe cinnamoyl sous forme de singulet de 3 protons chacun. Les protons du cycle aromatique du cinnamoyl apparaissent à δ 7,13 (s, 1H, H-5'), 7,12 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-9') et 6,87 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-8'). Les autres signaux sont très similaires aux signaux du brevifoliol de départ (**Tableau 2.1**).

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 à δ 77,07. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 165,86 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent respectivement à δ 115,92 et 145,04 (tableau 2.1).



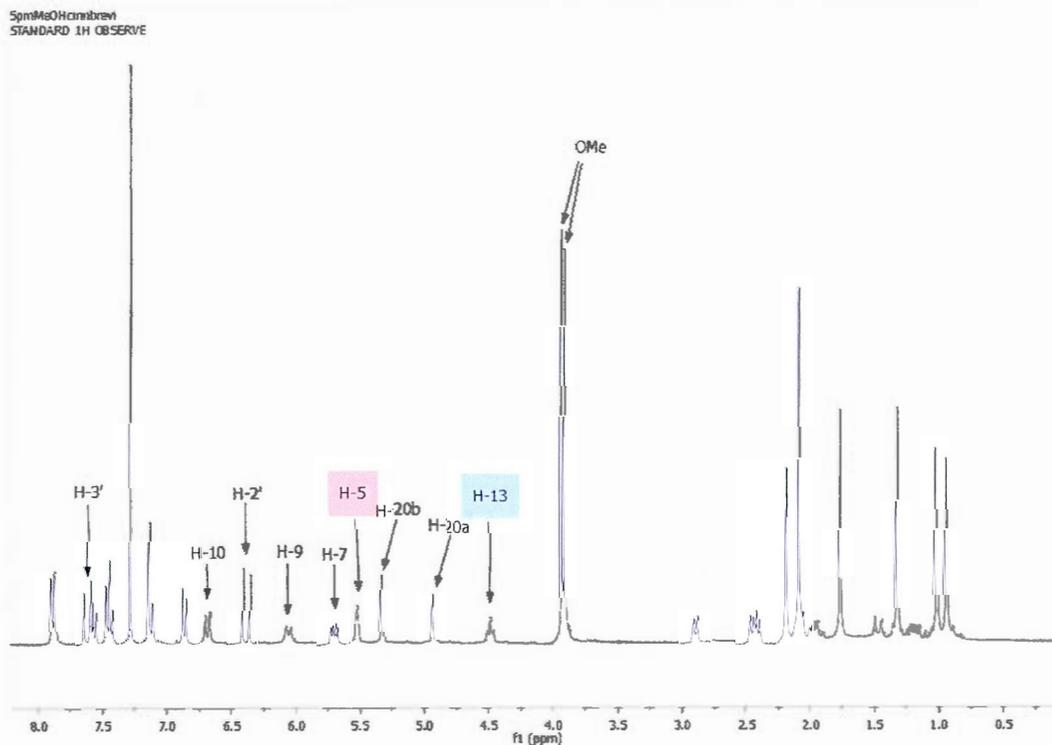


Figure 2.4 Spectre proton du composé 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brévioliol (**60**) dans le CDCl_3 .

Tableau 2.1 Attribution des protons et carbones du composé 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brévioliol (**60**) en comparaison avec ceux du 5-acétylbrévioliol (**59**) et du brévioliol (**42**).

C	$\delta^1\text{H}$ (42) ⁷¹	$\delta^{13}\text{C}$ (42) ⁷¹	$\delta^1\text{H}$ (59) ⁷¹	$\delta^{13}\text{C}$ (59) ⁷¹	$\delta^1\text{H}$ (60)	$\delta^{13}\text{C}$ (60)
1	/	62,9	/	62,8	/	63,16
2	1,51; d 2,39; dd	29,1	1,51; d 2,36; m	29,2	1,48, d, J=14,5, H2 α 2,42, dd, J=13,8 et 7,3, H2 β	29,18
3	2,79; d	37,9	2,77; d	38,6	2,88, d, J=8,8	38,96
4	/	149,0	/	151,2	/	151,10
5	4,46; s l.	72,4	5,34; t	77,1	5,53, s l.	77,07**
6	1,84; dd 2,0; m	36,0	1,88; td 1,98; ddd	33,0	1,96; td; J=11,2 et 4,1; H6 α 2,02-2,06; m; 1H; H6 β	34,04
7	5,56; dd	70,1	5,58; dd	69,6	5,69; dd; J=11,2 et 5,1; 1H	69,73
8	/	45,0	/	44,7	/	44,83
9	6,06; d	77,1	6,01; d	76,7	6,07; d; J=10,4	77,07**
10	6,54; d	70,2	6,61; d	70,7	6,69; d; J=10,4	70,66
11	/	133,9	/	133,8	/	134,31
12	/	151,2	/	146,4	/	145,54

13	4,40; dd	76,7	4,51; dd l.	74,0	4,49; t; J=7,3	73,92
14	1,28; dd	47,3	1,22; dd	47,0	1,19; dd; J=13,8 et 7,3; H14 α	47,77
	2,48; dd		2,36; m		2,42; dd; J=13,8 et 7,3; H14 β	
15	/	76,1	/	75,4	/	75,46
16	1,05; s	26,9	1,00; s	26,9	1,02; s; 3H	27,02
17	1,36; s	24,8	1,30; s	24,7	1,33; s; 3H	24,78
18	2,04; s	12,0	2,04; s	11,7	2,18; s; 3H	11,91
19	0,92; s	12,9	0,88; s	12,8	0,94; s; 3H	12,92
20	4,84; s	112,1	4,88; s	113,9	4,93; s; 1H; H20a	114,03
	5,19; s		5,30; s		5,34; s; 1H; H20b	
5-OCin; 1'	/	/	/	/	/	165,86
2'	/	/	/	/	6,38; d; J=15,9; 1H	115,92
3'	/	/	/	/	7,61; d; J=15,9; 1H	145,04
4'	/	/	/	/	/	127,32
5'	/	/	/	/	7,13; s; 1H	109,48
6'	/	/	/	/	/	150,90
7'	/	/	/	/	/	149,12
8'	/	/	/	/	6,87; d; J=8,0; 1H	110,89
9'	/	/	/	/	7,12; d; J=8,0; 1H	122,83
7' ou 8' OMe	/	/	/	/	3,92; s; 3H *	55,81 *
8' ou 7' OMe	/	/	/	/	3,94; s; 3H *	55,91 *
7-OCOCH ₃	/	169,9	/	170,1	/	169,90
7-OCOCH ₃	2,09; s	21,0	2,04; s	20,6	2,08; s; 3H	20,76
9-OCOCH ₃	/	170,5	/	170,9	/	169,94
9-OCOCH ₃	1,76; s	20,4	1,73; s	21,1	1,77; s; 3H	21,41
10-OBz; C=O	/	164,3	/	164,1	/	164,16
o-Ph	7,88; d	129,4	7,84; d	129,2	7,88; d; J=8,0; 2H	129,17
m-Ph	7,45; t	128,7	7,40; t	129,3	7,44; t; J=8,0; 2H	129,44
p-Ph	7,57; t	133,2	7,53; t	128,6	7,56; t; J=8,0; 1H	128,76
i-Ph	/	129,3	/	133,2	/	133,29

* et ** = signaux de proton ou de carbone interchangeables

Le composé 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brévifoliol (**62**) se présente sous forme d'une huile soluble dans le CHCl₃. Son spectre de masse LC-MS en mode positif montre le pic de l'adduit sodique à m/z 768,07 [M+Na]⁺, ceci laisse suggérer la formule brute C₄₂H₅₀O₁₂ pour ce composé.

Sur son spectre de RMN ¹H (**figure 2.5**), on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-13 à 5,55 ppm. Ceci suggère que le groupe cinnamoyl est attaché en position C-13. L'hydroxyméthine C-5 reste inchangé par comparaison au brévifoliol et apparaît à 4,37 ppm. On observe la présence des pics additionnels correspondant aux signaux du groupe cinnamoyl greffé en C-13. En effet, on note la présence des signaux du système

AB à δ 6,28 (d, $J=16,0$ Hz, 1H) et 7,62 (d, $J=16,0$ Hz, 1H). De plus, on observe à δ 3,92 et 3,94 les signaux des deux méthoxys du groupe cinnamoyle sous forme de singulet de 3 protons chacun. Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,07 (s, 1H, H-5'), 7,12 (dd, 1H, $J=8,5$ et 1,8 Hz, H-9') et 6,88 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, H-8'). Les signaux des autres protons sont pratiquement inchangés et correspondent aux signaux des protons du brevifoliol de départ (**tableau 2.2**).

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-13 à δ 79,81. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 166,94 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 115,50 et 145,17 (**tableau 2.2**).

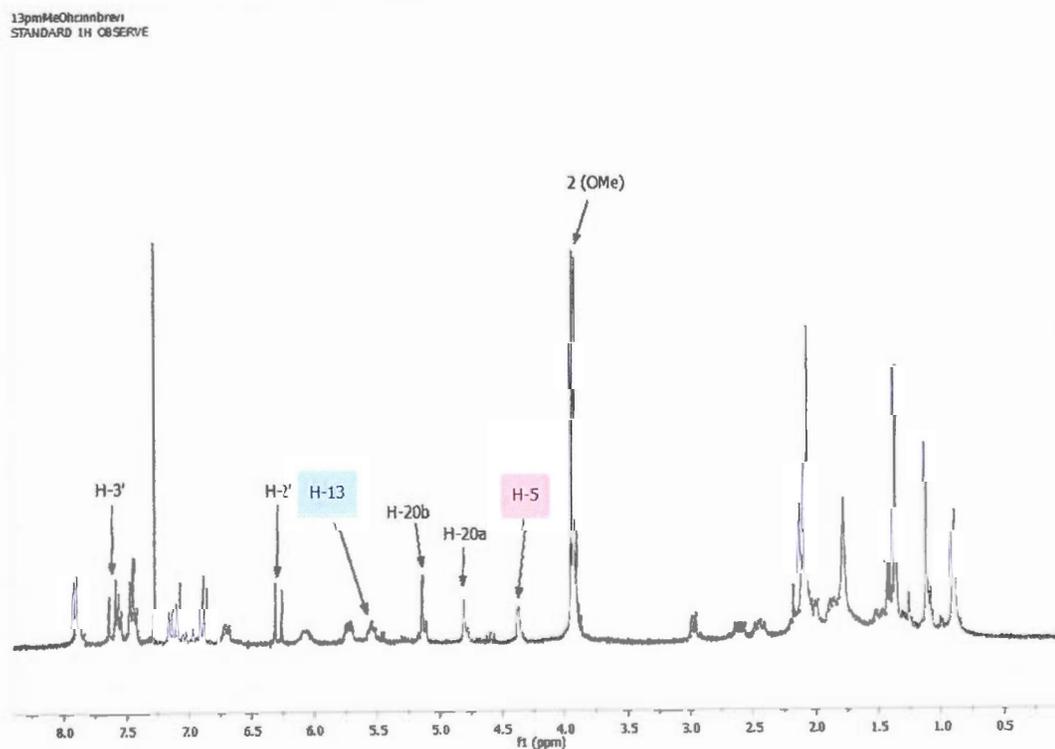


Figure 2.5 Spectre proton du composé 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyle brevifoliol (**62**) dans le CDCl_3 .

Tableau 2.2 Attribution des protons et carbones du composé 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**62**) en comparaison avec celui du 13-acétyl brevifoliol (**61**).

C	$\delta^1\text{H}$ (61) ⁷¹	$\delta^{13}\text{C}$ (61) ⁷¹	$\delta^1\text{H}$ (62)	$\delta^{13}\text{C}$ (62)
1	/	63,3	/	63,53
2	1,48; d	29,2	1,50; d; J=12,6; 1H; H2 α	29,22
	2,43; dd		2,45; dd; J=14,0 et 9,6; 1H; H2 β	
3	2,91; d	37,5	2,98; d; J=9,6; 1H	37,63
4	/	150,3	/	150,41
5	4,37; s l.	72,6	4,37; s l., 1H	72,61
6	2,00; ddd	36,0	2,02; ddd; J=14,3; 5,4 et 2,0; 1H; H6 α	35,80
	1,85; td		1,86; td; J=12,7 et 3,7; 1H; H6 β	
7	5,67; dd	69,6	5,72; dd; J=11,1 et 5,3; 1H	69,71
8	/	45,1	/	45,11
9	6,05; d l.	77,2	6,08; s l.; 1H	77,2
10	6,64; d	70,2	6,70; d l.; J=8,8; 1H	70,25
11	/	136,4	/	136,27
12	/	147,5	/	147,71
13	5,46; t	79,7	5,55; s l.; 1H	79,81
14	1,28; m	44,1	1,4; m; 1H; H14 α	44,40
	2,52; dd		2,61; dd; J=14,1 et 7,6; 1H; H14 β	
15	/	75,6	/	75,59
16	1,08; s	27,0	1,12; s; 3H	26,96
17	1,35; s	24,9	1,37; s; 3H	24,78
18	2,03; s	12,0	2,08; s; 3H	12,17
19	0,89; s	12,8	0,90; s; 3H	12,87
20	4,81; s	111,5	4,81; s; 1H	111,58
	5,15; s		5,14; s; 1H	
7-OCOCH ₃	/	169,9 *	/	169,94
7-OCOCH ₃	2,04; s	21,4	2,11; s; 3H	21,41
9-OCOCH ₃	/	169,8 *	/	169,94
9-OCOCH ₃	1,76; s	20,7	1,77; s; 3H	20,77
10-OBz; C=O	/	164,1	/	164,15
o-Ph	7,87; d	129,2	7,89; d; J=7,6; 2H	129,19
m-Ph	7,43; t	129,4	7,45; t; J=7,6; 2H	129,46
p-Ph	7,56; t	128,7	7,57; t; J=7,6; 1H	128,76
i-Ph	/	133,2	/	133,30
13-OCin; 1'	/	/	/	166,94
2'	/	/	6,28; d; J=16,0; 1H	115,50
3'	/	/	7,62; d; J=16,0; 1H	145,17
4'	/	/	/	127,21
5'	/	/	7,07; d; J=1,8; 1H	109,61
6'	/	/	/	151,17
7'	/	/	/	149,16
8'	/	/	6,88; d; J=8,5; 1H	110,95
9'	/	/	7,12; dd; J=8,5 et 1,8; 1H	122,76
7' ou 8' OMe	/	/	3,92; s; 3H *	55,94 *
8' ou 7' OMe	/	/	3,94; s; 3H *	55,91 *

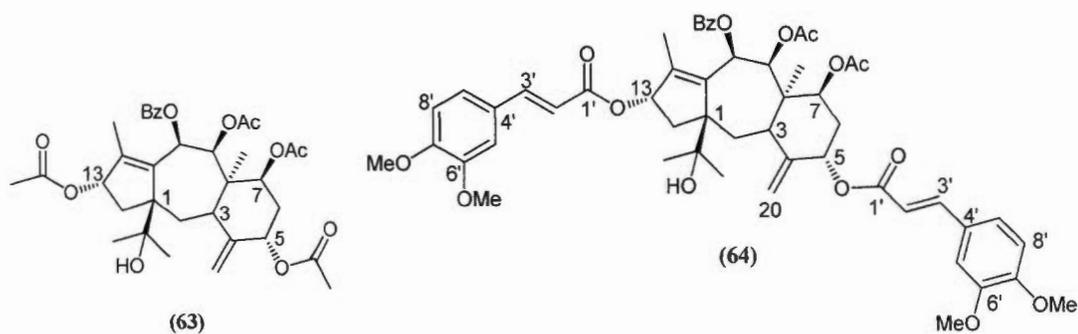
* = signaux de proton ou de carbone interchangeables

2.3.2 Synthèse et caractérisation du dérivé 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol

Le composé 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**64**) a été préparé selon la procédure générale décrite à la section 3.4.4 avec un rendement de 75 %. Le composé se présente sous forme de poudre blanche dans le mélange acétone/pentane, il est soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS indique le pic de l'adduit sodique à m/z 959,38 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{53}\text{H}_{50}\text{O}_{15}$ pour ce composé. Sur ce même spectre on observe à m/z 816,74 le pic correspondant à la perte du groupe $-\text{OBz}$ $[\text{M}-\text{OBz}+\text{H}]^+$.

Sur son spectre de RMN ^1H (**figure 2.6**), on observe les signaux des protons H-5 et H-13 respectivement à δ 5,61 (s l., 1H) et 5,77 (t, $J=7,4$ Hz, 1H). Ceci suggère que deux groupes cinnamoyle sont attachés en position C-5 et C-13. Sur ce spectre on note la présence des pics additionnels correspondant aux signaux des groupes cinnamoyle greffés en C-5 et C-13. On a deux systèmes AB, l'un à δ 6,35 (d, $J=15,9$ Hz, 1H) et 7,65 (d, $J=15,9$ Hz, 1H) du groupe cinnamoyle en C-5. Le second système AB apparaît à δ 5,96 (d, $J=15,8$ Hz, 1H) et 7,49 (d, $J=15,8$ Hz, 1H). De plus, on observe à δ 3,78, 3,88, 3,72 et 3,73 les signaux des quatre méthoxys des groupes cinnamoyle sous forme de singulet de 3 protons chacun. Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent entre δ 6,50 et 7,07. Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ (**tableau 2.3**).

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 et C-13 à δ 74,08 et 79,22 respectivement. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont deux carbonyles d'ester qui résonnent à δ 165,95 et 167,21 (**tableau 2.3**).



K-1-78-6-1-5-13dimethoxycinnamoylbrev.

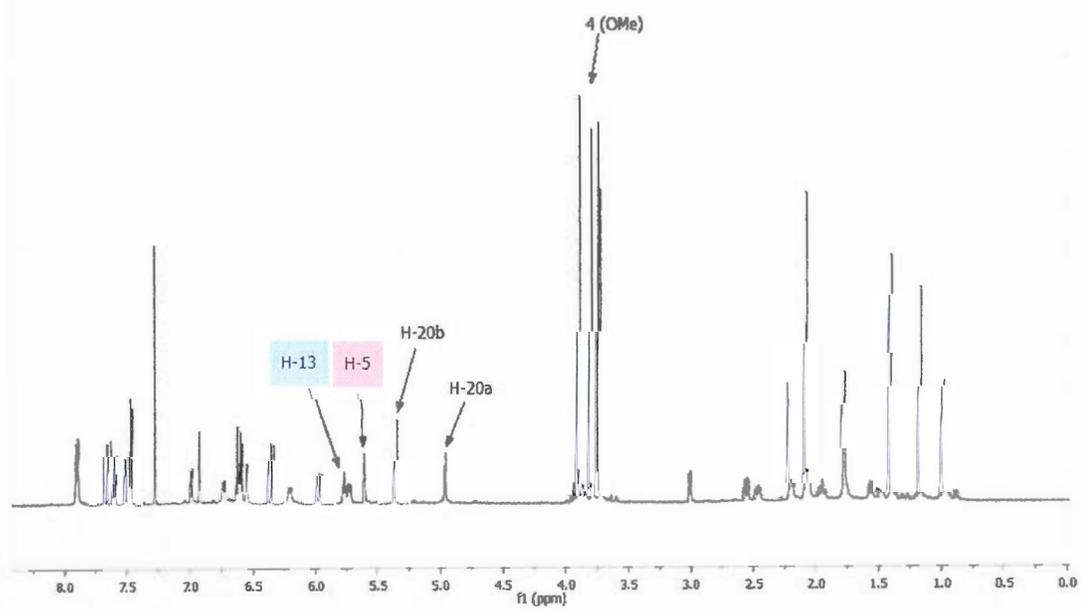


Figure 2.6 Spectre proton du composé 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**64**) dans le CDCl_3 .

Tableau 2.3 Attribution des protons et carbones du composé 5,13-bis-*p,m*-diméthoxyl-cinnamoyl brevifoliol (**64**) en comparaison avec celui du 5,13-bisacétyl brevifoliol (**63**).

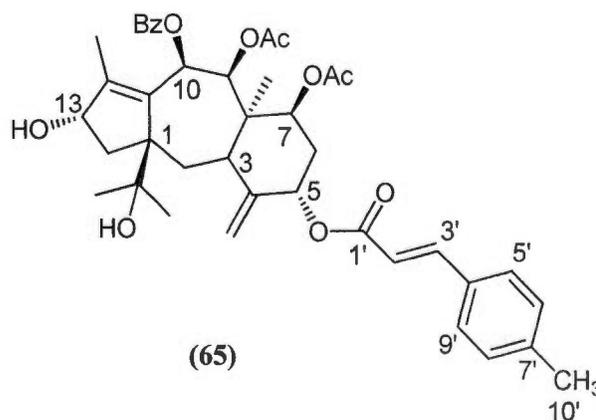
C	$\delta^1\text{H}$ (63) ⁷¹	$\delta^{13}\text{C}$ (63) ⁷¹	$\delta^1\text{H}$ (64)	$\delta^{13}\text{C}$ (64)
1	/	62,9	/	63,00
2	1,44; d	29,2	1,56; d; J=14,2; 1H; H2 α	29,45
	2,38; t l.		2,47; dd; J=14,2 et 9,1; 1H; H2 β	
3	2,71; d	38,7	3,01; d; J=8,5; 1H	39,07
4	/	145,2	/	139,00
5	5,53; s l.	74,0	5,61; s l.; 1H	74,08
6	1,93; ddd	33,8	2,02-2,06; m; 1H; H6 α	34,42
	1,82; td		1,96; td; J=11,4 et 3,9; 1H; H6 β	
7	5,60; dd	69,6	5,73; dd; J=11,4 et 5,0; 1H	69,53
8	/	44,1	/	44,29
9	6,07; d l.	76,8	6,20; d; J=10,4; 1H	79,22
10	6,64; d	69,8	6,74; d; J=10,4; 1H	69,91
11	/	136,4	/	136,98
12	/	147,2	/	147,03
13	5,53; t	79,2	5,77; t; J=7,4; 1H	79,22
14	1,26; m	44,7	1,48; dd; J=14,0 et 8,0; 1H; H14 α	44,89
	2,49; dd		2,56; dd; J=14,0 et 7,4; 1H; H14 β	
15	/	75,5	/	75,56
16	1,09; s	27,0	1,16; s; 3H	27,10
17	1,34; s	24,8	1,40; s; 3H	24,89
18	2,01; s	11,8	2,06; s; 3H	12,18
19	0,90; s	12,8	0,98; s; 3H	12,75
20	4,89; s	114,2	4,96; s; 1H	114,75
	5,27; s		5,35; s; 1H	
5-OCin; 1'	/	/	/	165,95
2'	/	/	6,35; d; J=15,9; 1H	115,40
3'	/	/	7,65; d; J=15,9; 1H	145,20
4'	/	/	/	126,78
5'	/	/	6,93; s; 1H	109,06
6'	/	/	/	148,58
7'	/	/	/	145,20
8'	/	/	6,60; d; J=8,2; 1H	113,78
9'	/	/	6,99; d; J=8,2; 1H	122,62
OMe	/	/	3,78; s; 3H*	55,63*
OMe	/	/	3,88; s; 3H*	55,85*
13-OCin; 1'	/	/	/	167,21
2'	/	/	5,96; d; J=15,8; 1H	114,75
3'	/	/	7,49; d; J=15,8; 1H	145,72
4'	/	/	/	126,68
5'	/	/	6,55; s; 1H	109,79
6'	/	/	/	150,86
7'	/	/	/	147,03
8'	/	/	6,62; d; J=7,6; 1H	110,57
9'	/	/	6,63; d; J=7,6; 1H	122,02
7' ou 8'OMe	/	/	3,72; s; 3H*	55,47*
8' ou 7'OMe	/	/	3,73; s; 3H*	55,60*
7-OCOCH ₃	/	169,94	/	169,90
7-OCOCH ₃	2,07; s	21,41	2,18; s; 3H	21,41

9-OCOCH ₃	/	169,90	/	169,88
9-OCOCH ₃	1,73; s	20,76	1,77; s; 3H	20,76
10-OBz;C=O	/	164,1	/	164,14
o-Ph	7,86; d	129,1	7,90; d; J=7,5; 2H	129,09
m-Ph	7,43; t	129,4	7,46; t; J=7,5; 2H	129,46
p-Ph	7,65; t	128,7	7,58; t; J=7,5; 1H	128,78
i-Ph	/	133,3	/	133,37

* = signaux de proton ou de carbone interchangeables

2.3.3 Synthèse et caractérisation des dérivés 5- et 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol

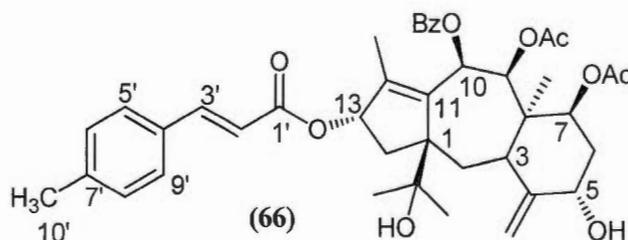
Les dérivés 5- et 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**65**, **66**) ont été préparés selon la procédure générale décrite à la section 3.4.5 et obtenus avec un rendement de 35 % et 13 % respectivement.



Le composé 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**65**) a été recristallisé dans l'hexane. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl₃. Son spectre de masse à haute résolution montre le pic de l'adduit sodique à m/z 723,3134 [M+Na]⁺, ce qui laisse suggérer la formule brute C₄₁H₄₈O₁₀ pour ce composé. Sur ce même spectre, on observe également un pic à m/z 701,3349 [M+H]⁺.

Son spectre de RMN ^1H , montre un signal du proton d'hydroxyméthine H-5 à δ 5,53 (s l., 1H, H-5). Ceci suggère que le couplage est bien fait à cette position. Par comparaison au spectre du brevifoliol initial, on observe la présence des pics additionnels correspondant aux pics du groupe cinnamoyle attaché en C-5. En effet, on note la présence des signaux du système AB à δ 6,45 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-2') et 7,66 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-3'). De plus, on observe à δ 2,37 le signal du méthyle lié au groupe cinnamoyle sous forme de singulet de 3 protons. Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,45 (d, $J=7,7$ Hz, 2H, H-ortho) et 7,20 (d, $J=7,7$ Hz, 2H, H-méta). Les autres signaux des protons restent pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.⁷¹

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 à δ 77,06. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 165,93 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 117,11 et 145,24.



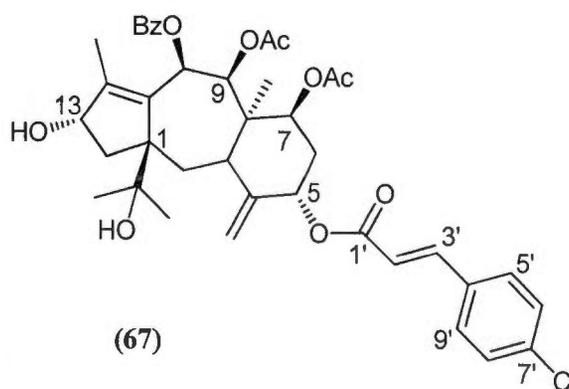
Le composé 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**66**) se présente sous forme d'une huile soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS en mode positif avec l'électronébulisation ESI comme mode d'ionisation montre le pic de l'adduit sodique à m/z 724,10 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{41}\text{H}_{48}\text{O}_{10}$.

Sur son spectre de RMN ^1H , on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-13 à 5,56 ppm. Ceci suggère que le groupe cinnamoyle est attaché en position C-13. L'hydroxyméthine C-5 reste inchangé par comparaison au brevifoliol et apparaît à 4,37 ppm.

On observe la présence des pics additionnels correspondant aux signaux du groupe cinnamoyle greffé en C-13. En effet, on note la présence des signaux du système AB à δ 6,37 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-2') et 7,66 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-3'). De plus, on observe à δ 2,38 le signal du méthyle du groupe cinnamoyle sous forme de singulet de 3 protons. Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,43 (d, $J=7,8$ Hz, 2H, H-ortho) et 7,20 (d, $J=7,8$ Hz, 2H, H-méta). Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-13 à δ 79,85. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 166,91 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 116,75 et 145,28.

2.3.4 Synthèse et caractérisation des dérivés 5- et 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol

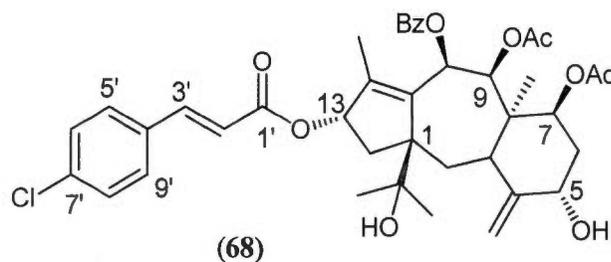


Les dérivés mono estérifiés (67) et (68) ont été obtenus selon la méthode décrite à la section 3.4.6 avec un rendement de 36 % et 12 % respectivement.

Le composé 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**67**) a été recristallisé dans l'hexane. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS en mode positif montre le pic de l'adduit sodique à m/z 743,94 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{ClO}_{10}$.

Sur son spectre de RMN ^1H , on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-5 à 5,54 ppm (s l., 1H, H-5). Ceci suggère que le dérivé cinnamoyle est bien attaché à cette position. On note également la présence des signaux du système AB du groupe cinnamoyle à δ 6,48 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-2') et 7,62 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-3'). Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,48 (d, $J=8,3$ Hz, 2H, H-ortho) et 7,36 (d, $J=8,3$ Hz, 2H, H-méta). Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 à δ 77,09. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 165,54 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 118,92 et 143,66.

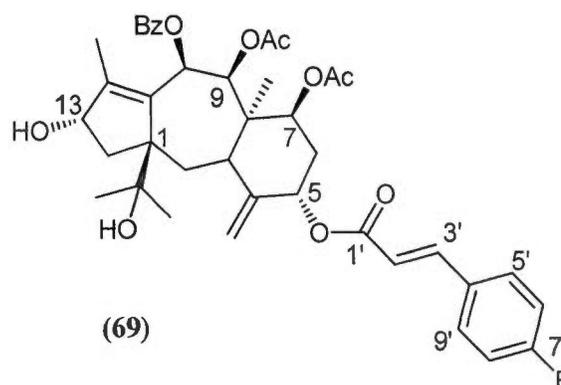


Le composé 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**68**) se présente sous forme d'une huile soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS en mode positif avec l'électronébulisation ESI montre le pic de l'adduit sodique à m/z 743,86 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{ClO}_{10}$ pour ce composé.

Sur son spectre de RMN ^1H , on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-13 déblindé à 5,57 ppm. Ceci suggère que le groupe cinnamoyle est attaché en position C-13. L'hydroxyméthine C-5 reste inchangé par comparaison au brevifoliol et apparaît à 4,38 ppm. On observe la présence de pics additionnels correspondant aux signaux du groupe cinnamoyle greffé en C-13. En effet, on note la présence des signaux du système AB à δ 6,38 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-2') et 7,62 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-3'). Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,47 (d, $J=6,9$ Hz, 2H, H-ortho) et 7,37 (d, $J=6,9$ Hz, 2H, H-méta). Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-13 à δ 80,05. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 166,45 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 118,47 et 143,78.

2.3.5 Synthèse et caractérisation du dérivé 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol



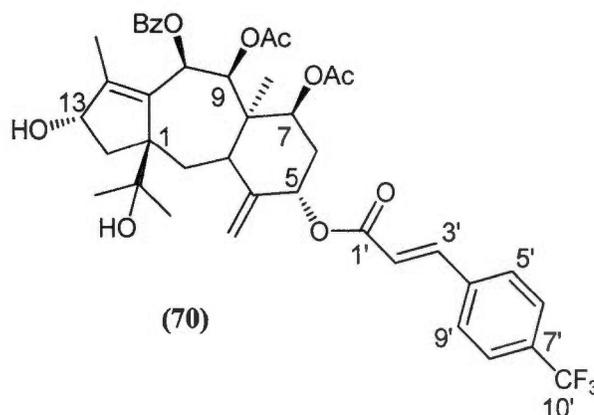
Le dérivé (69) a été obtenu suivant la procédure générale décrite à la section 3.4.7 avec un rendement de 67 %.

Le composé 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol (**69**) a été recristallisé dans l'hexane. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS en mode positif montre le pic de l'adduit sodique à m/z 726,10 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{40}\text{H}_{45}\text{FO}_{10}$ pour ce composé.

Sur son spectre de RMN ^1H , on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-5 à 5,54 ppm (s l., 1H, H-5). Ceci suggère que le couplage est bien fait à cette position. Par comparaison au spectre du brevifoliol initial, on observe la présence de pics additionnels correspondant aux pics du groupe cinnamoyle greffé en C-5. En effet, on note la présence des signaux du système AB à δ 6,43 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-2') et 7,63 (d, $J=16$ Hz, 1H, H-3'). Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,52 – 7,58 (m, 3H, H ortho) et 7,08 (t, $J=8,5$ Hz, 2H, H méta). Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 à δ 77,05. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 165,66 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 118,03 et 143,86. Sur ce spectre, on observe également les signaux des carbones (C-7'), (C-6' et C-8') et (C-5' et C-9') respectivement à δ 163,87 (d, $J=250$ Hz, 5-Ocinnamoyle, C-7'), 116,02 (2C, d, $J=21,9$ Hz, 5-Ocinnamoyle, C-6' et C-8') et 130,02 (2C, d, $J=8,5$ Hz, 5-Ocinnamoyle, C-5' et C-9') caractéristiques des couplages de ces carbones avec le fluore.

2.3.6 Synthèse et caractérisation du dérivé 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol



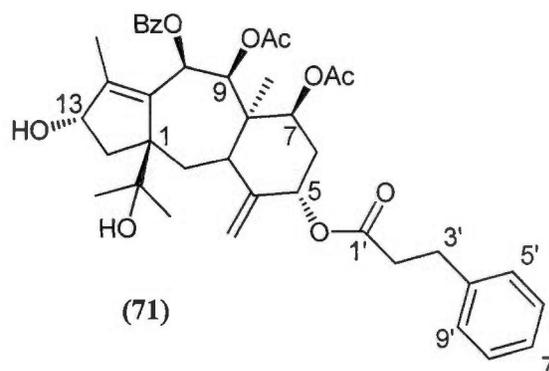
Le composé (70) a été préparé selon la procédure générale décrite à la section 3.4.8 et obtenu avec un rendement de 30 %.

Le composé (70) a été recristallisé dans l'hexane. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS montre le pic de l'adduit sodique à m/z 778,03 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{41}\text{H}_{45}\text{FO}_{10}$. Sur ce même spectre on observe à m/z 772.80 le pic correspondant à $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$.

Sur son spectre de RMN ^1H , on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-5 à 5,55 ppm (s l., 1H, H-5). Ceci suggère que le groupe cinnamoyle est bien attaché à cette position. Par comparaison au spectre du brevifoliol initial, on observe la présence de pics additionnels correspondant aux pics du groupe cinnamoyle greffé en C-5. En effet, on note la présence des signaux du système AB à δ 6,59 (d, $J=16,1$ Hz, 1H, H-2') et 7,68 (d, $J=16,1$ Hz, 1H, H-3'). Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent entre δ 7,65 – 7,61 (m, 4H, H-ortho et méta). Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 à δ 77,08. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe cinnamoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 165,26 (C-1'). Les signaux de carbone C-2' et C-3' résonnent à δ 120,97 et 143,16. Sur ce spectre, on observe également les signaux des carbones (C-10'), (C-7') et (C-6' et C-8') respectivement à δ 123,80 (q, $J=272$ Hz, 5-Ocinnamoyle, C-10'), 131,62 (q, $J=33$ Hz, 5-Ocinnamoyle, C-7') et 128,22 (2C, q, $J=3,7$ Hz, 5-Ocinnamoyle, C-6' et C-8') caractéristiques des couplages de ces carbones avec le fluore.

2.3.7 Synthèse et caractérisation du dérivé 5-(3'-phénylpropanoyle) brevifoliol



Le composé (71) a été préparé selon la procédure décrite à la section 3.4.9 et obtenu avec un rendement de 57 %.

Le composé (71) a été recristallisé dans l'hexane. Il se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le CHCl_3 . Son spectre de masse LC-MS en mode positif avec l'électronébulisation ESI comme technique d'ionisation montre le pic de l'adduit sodique à m/z 712,06 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ce qui laisse suggérer la formule brute $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{O}_{10}$ pour ce composé.

Sur son spectre de RMN ^1H , on observe le signal du proton d'hydroxyméthine H-5 à 5,41 ppm (t; $J=3,0$ Hz; 1H; H-5). Ceci suggère que le couplage est bien fait à cette position. Par comparaison au spectre du brevifoliol initial, on observe la présence de pics additionnels correspondant aux pics du groupe cinnamoyle greffé en C-5. À δ 2,94 on a un triplet de 2H

($J=8,0$ Hz) attribuable aux protons en position 3'. À δ 2,66 et 2,70 il y a deux quintuplets apparents de 1H chacun ($J=8,0$ Hz) attribuables aux protons en position 2'. Les protons du cycle aromatique du cinnamoyle apparaissent à δ 7,21 (d; $J=6,9$ Hz; 2H; H-ortho), 7,29 (t; $J=7,2$ Hz; 2H; H-méta) et 7,20 (t, $J=7,6$ Hz; 1H; H-para). Les autres signaux des protons résiduels sont pratiquement identiques à ceux du brevifoliol de départ.

Sur le spectre RMN ^{13}C , on observe le signal du carbone C-5 à δ 77,11. On observe d'autres signaux additionnels correspondant aux signaux de carbone du groupe 3-phénylpropanoyle dont un carbonyle d'ester qui résonne à δ 171,99 (C-1').

L'attribution de tous les signaux des composés 5-mono-estérifié du brevifoliol a été faite par comparaison avec le composé 5-acétyl brevifoliol (**59**). L'attribution des dérivés 13-mono-estérifié du brevifoliol a été faite par comparaison avec le composé 13-acétyl brevifoliol (**61**) et finalement le composé bis-ester avec le dérivé 5,13-bis acétyl (**63**).

De manière générale, les rotations optiques sont consistantes à l'intérieur d'une série de composés estérifiés avec différents acides cinnamiques. Ainsi, les dérivés C5 mono-estérifiés avec un acide cinnamique ont une rotation spécifique négative moyenne de (- 45). Alors que les dérivés C13 mono-estérifiés ont une rotation positive plus faible (+ 14). Enfin les dérivés 5,13-bis estérifiés ont une rotation positive plus prononcée (+ 89) (**Tableau 2.4**).

Tableau 2.4 Récapitulatif des rotations optiques des composés synthétisés.

Acide	5-mono estérifié (N°) / Rot	13-mono estérifié (N°) / Rot	5,13-bis estérifié (N°) / Rot
<i>p,m</i> -diméthoxycinnamique	(60) / -54	(62) / +21,7	(64) / + 89,4
<i>p</i> -méthylcinnamique	(65) / -41,9	(66) / +11,7	
<i>p</i> -chlorocinnamique	(67) / -50,9	(68) / +8,8	
<i>p</i> -fluorocinnamique	(69) / -37,6		
<i>p</i> -trifluorométhylcinnamique	(70) / -47,7		
3-phénylpropanoïque	(71) / -40,8		

2.4 Tests de cytotoxicité et de cytométrie à flux

Dans le but d'évaluer leur cytotoxicité ainsi que leur potentiel inhibiteur de la P-gp, qui est la protéine cible, les différents dérivés de brevifoliol synthétisés et caractérisés ont été soumis à des tests de cytotoxicité et de cytométrie à flux par le Dr. Ahmed Bettaieb grâce à une collaboration avec la professeure Diana Averill des Sciences Biologiques de l'UQAM.

Dans ces expériences, l'adriamycine (29) a été utilisée comme agent anticancéreux de référence. L'adriamycine est un composé particulièrement efficace contre les leucémies et les tumeurs solides : il agit en causant des dommages sur l'ADN et aussi en altérant la membrane cellulaire.⁷⁸ Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur des cellules cancéreuses multirésistantes CH^RC5. Ces cellules sont connues comme étant résistantes à l'adriamycine, à travers la surexpression de la P-gp, ce qui limiterait l'activité anticancéreuse de l'adriamycine. Le but de ces tests a été de vérifier si les dérivés obtenus conservaient la faible cytotoxicité du brevifoliol tout en favorisant l'accumulation cellulaire de l'agent anticancéreux utilisé : l'adriamycine.

Les protocoles de culture cellulaire, de test de prolifération cellulaire et d'accumulation d'adriamycine analysée par cytométrie en flux sont décrits dans la section 3.3. Pour les tests de cytotoxicité, les cellules CH^RC5 ont été exposées pendant 30 minutes à différentes concentrations d'adriamycine avec ou sans 10 et 50 μ M de dérivé de brevifoliol correspondant. Les résultats des tests de cytotoxicité ont été obtenus par spectrophotométrie à 540 nm. Certains ont été répétés et les données qui semblent les plus représentatives ont été rapportées. Certaines données ne sont pas rapportées car elles nécessitent un autre essai pour confirmer les résultats obtenus.

Des travaux antérieurs, réalisés au laboratoire de la professeure Averill, ont montré que l'adriamycine ne possède pas une grande activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses CH^RC5, comparé aux cellules non-résistantes. En effet, à une concentration d'adriamycine inférieure à 2 μ g/mL, il n'y a aucune cytotoxicité et le taux de survie cellulaire est de 100%. Cette concentration est déjà plus élevée que celle atteinte en clinique. À une concentration plus élevée de 50 μ g/mL d'adriamycine, aucune forte cytotoxicité n'a été

observée et le taux de survie cellulaire est d'environ 62%. Par contre, lorsque la cyclosporine A est utilisée à une concentration de 5 μM en présence d'adriamycine, la cytotoxicité de l'adriamycine augmente et on obtient des taux de survie cellulaire d'environ 35% à 10 $\mu\text{g/mL}$ et 15% à 50 $\mu\text{g/mL}$ d'adriamycine. La cyclosporine utilisée seule à cette concentration n'entraîne aucune toxicité aux cellules $\text{CH}^{\text{R}}\text{C5}$.^{78,79}

D'autres travaux non publiés réalisés dans le laboratoire du professeur Averill ont montré que le 13-acétyl brevifoliol (**61**) ne présente aucune toxicité contre les cellules cancéreuses étudiées ($\text{CH}^{\text{R}}\text{C5}$). Lorsqu'il est administré seul, la viabilité cellulaire reste aux alentours de 100 %. La **figure 2.7** montre que le 13-acétyl brevifoliol n'a pas une grande efficacité pour augmenter la cytotoxicité contre l'adriamycine et renverser la résistance. On ne constate aucune mortalité cellulaire notable à aucune des concentrations d'adriamycine utilisées.

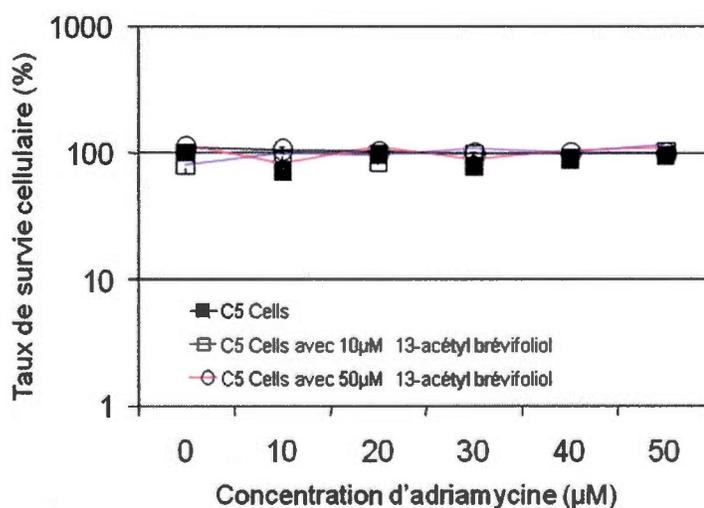


Figure 2.7 Sommaire des tests de cytotoxicité du dérivé 13-acétyl brevifoliol (**61**).⁸⁰

Le dérivé 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**) (figure 2.8) à 10 μM n'affecte pas la toxicité de l'adriamycine, mais les deux dérivés 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**62**) (figure 2.9) et 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**64**) (figure 2.10) démontrent une faible augmentation de la toxicité de l'adriamycine. Ces trois dérivés utilisés seuls sont peu toxiques (viabilité cellulaire d'environ 100 %). À 50 μM , le dérivé 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol est moins actif (figure 2.8) et le taux de survie cellulaire reste élevé. Par contre, les deux autres dérivés démontrent une bonne activité pour augmenter la cytotoxicité de l'adriamycine avec un taux de viabilité cellulaire de près de 10 % (figure 2.9 et 2.10). Tout ceci suggère que l'activité cytotoxique observée avec les dérivés (**62**) et (**64**) est liée à une augmentation de la concentration cellulaire d'adriamycine, le médicament est donc plus disponible pour agir dans la cellule.

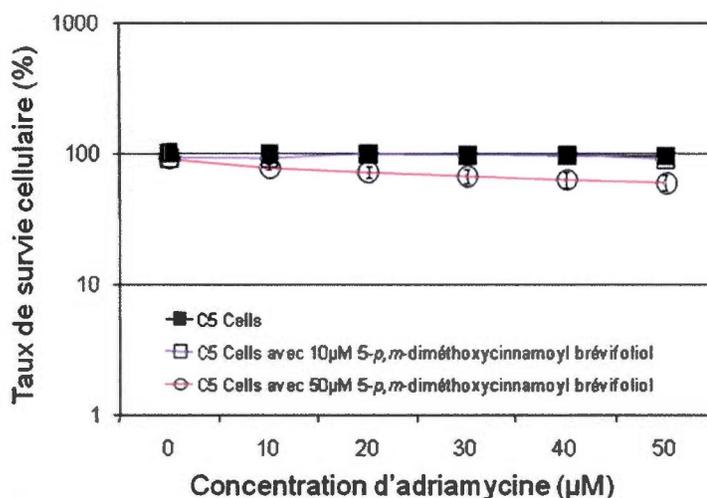


Figure 2.8 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**).⁸⁰

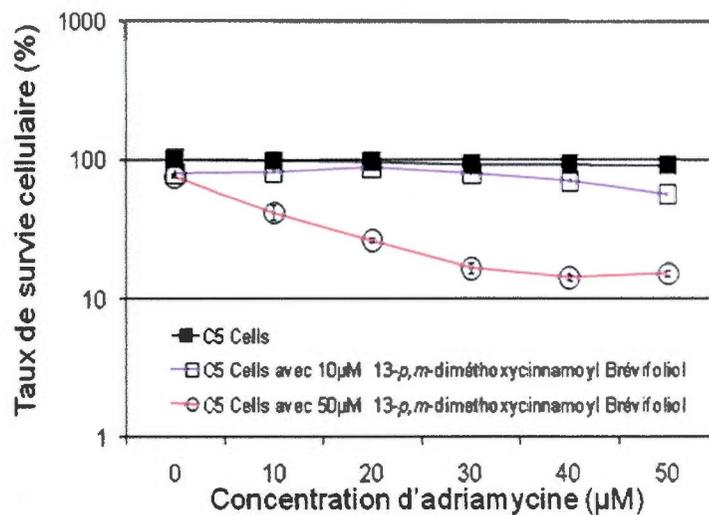


Figure 2.9 Sommaire des tests de cytotoxicité du 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brévifoliol (62).⁸⁰

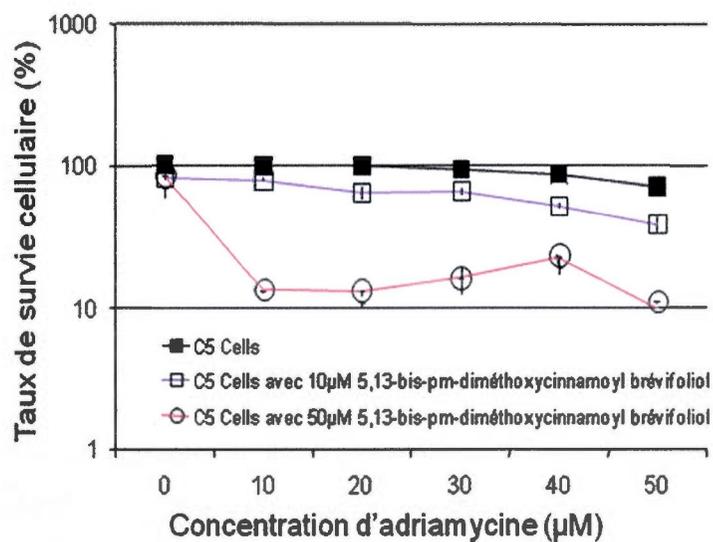


Figure 2.10 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brévifoliol (64).⁸⁰

Le dérivé 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**65**) (**figure 2.11**) est assez efficace; en présence de 50 μM de dérivé et à 30 μM d'adriamycine le taux de viabilité est de 30 %. Le dérivé utilisé seul ne présente pas de toxicité notable. Par contre, avec le dérivé 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**66**) (**figure 2.12**) à 50 μM , le taux de viabilité cellulaire décroît jusqu'à 10 % avec 30 μM d'adriamycine, mais avec 10 μM du même composé la toxicité de l'adriamycine est moins importante.

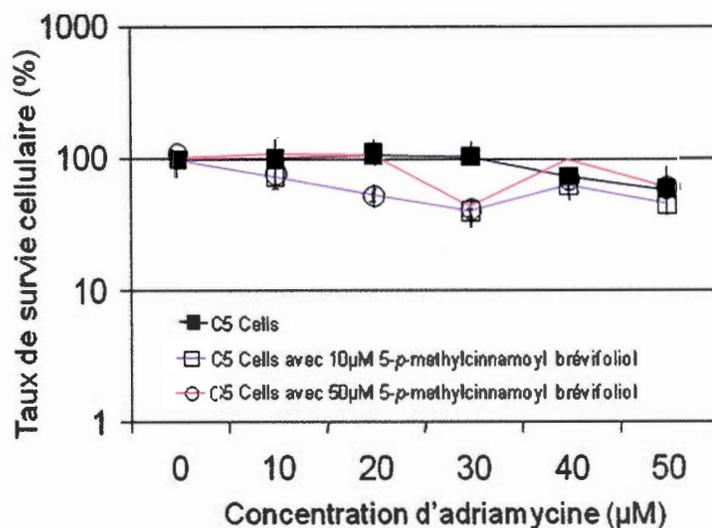


Figure 2.11 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**65**).⁸⁰

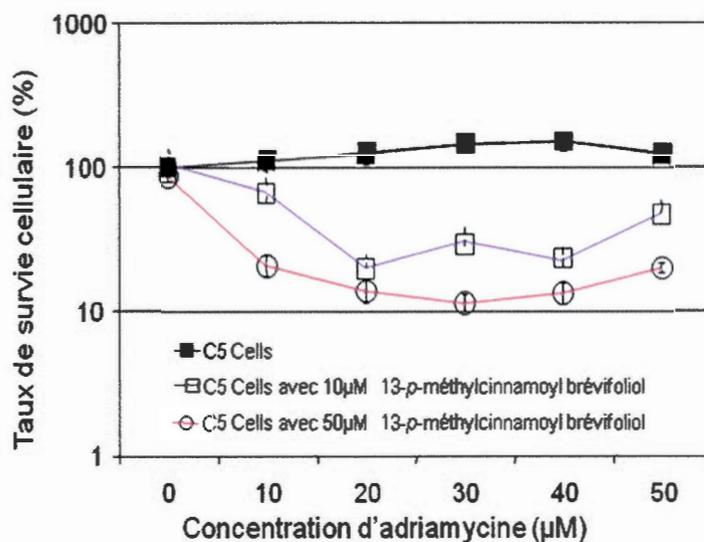


Figure 2.12 Sommaire des tests de cytotoxicité du 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**66**).⁸⁰

D'après la **figure 2.13**, le dérivé 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**67**) démontre une efficacité notable à 50 µM et l'effet augmente avec la concentration d'adriamycine, le taux de viabilité cellulaire diminue progressivement avec la concentration d'adriamycine jusqu'à atteindre 25% à 50 µM d'adriamycine. Avec 10 µM du dérivé (**67**), la viabilité cellulaire est d'environ 100 %.

Dans le cas du dérivé 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**68**) (**figure 2.14**), l'effet à la concentration de 50 µM de dérivé apparaît à 20 µM d'adriamycine et il est maximal à partir de 30 µM (viabilité de 40% en moyenne). L'effet est faible avec une concentration de 10 µM d'adriamycine. Le composé ne semble pas non plus toxique car on observe une viabilité de 100% s'il est administré seul.

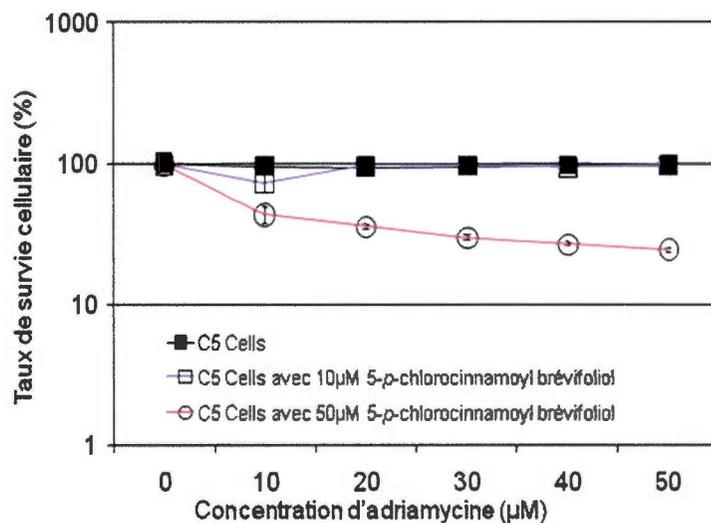


Figure 2.13 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (67).⁸⁰

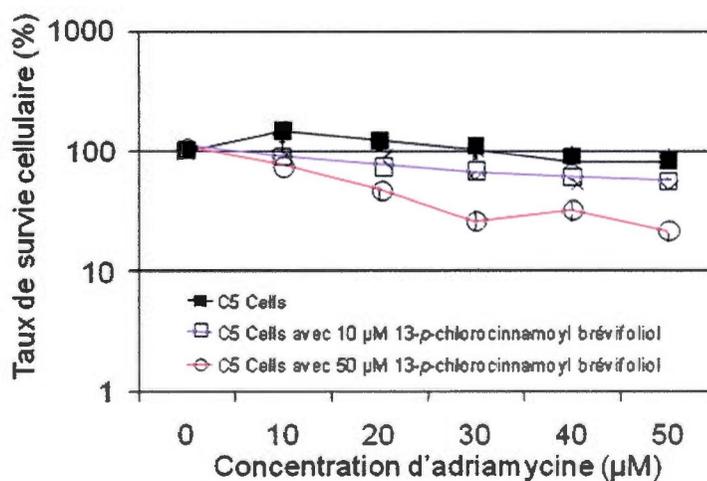


Figure 2.14 Sommaire des tests de cytotoxicité du 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (68).⁸⁰

Le dérivé 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol (69) (figure 2.15) démontre une très grande efficacité à 50 µM (viabilité 5 à 7 %, à partir de 10 µM d'adriamycine). Avec 10 µM du dérivé (69), l'effet augmente avec la concentration d'adriamycine jusqu'à 50 µM d'adriamycine (viabilité 25 %). Le composé (69) étudié seul ne démontre pas de toxicité cellulaire.

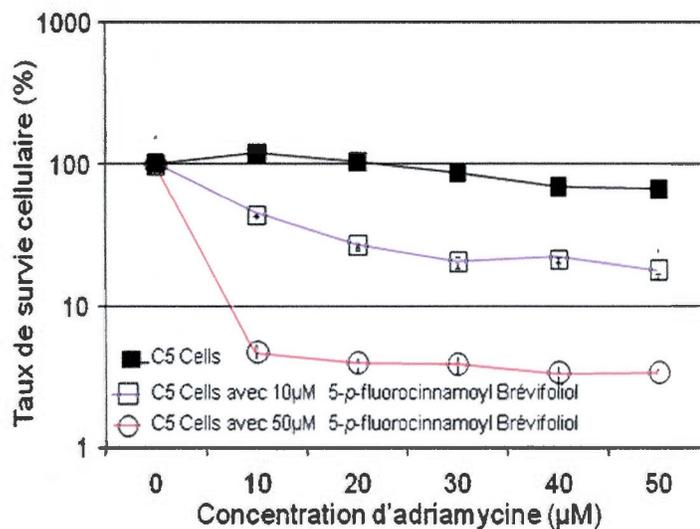


Figure 2.15 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol (69).⁸⁰

Le dérivé 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol (70) (figure 2.16) lorsqu'il est utilisé seul n'est pas toxique ; il est extrêmement efficace à 50 μM et en présence de 10 μM jusqu'à 50 μM d'adriamycine (viabilité cellulaire atteint 10 %).

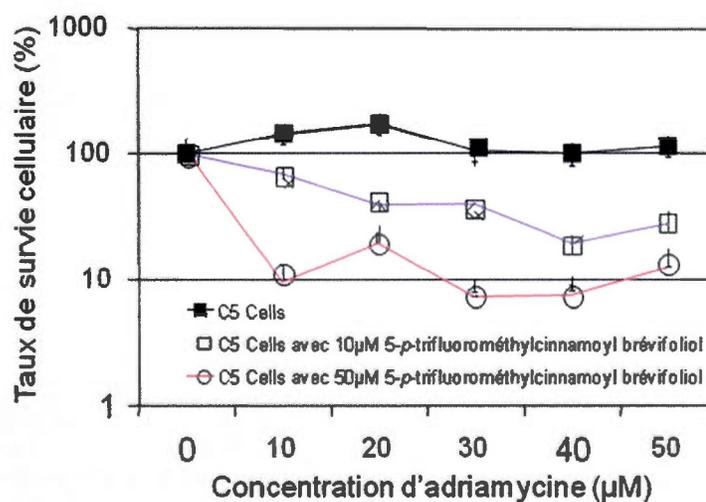


Figure 2.16 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol (70).⁸⁰

Dans la série des dérivés non halogénés, le 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol (**71**) (**figure 2.17**) a démontré un effet intéressant à 50 μM et un petit effet à 10 μM de 20 à 50 μM d'adriamycine dans les deux cas (viabilité de 20 à 30% pour 50 μM du dérivé). Le composé ne semble pas toxique lorsqu'il est utilisé seul.

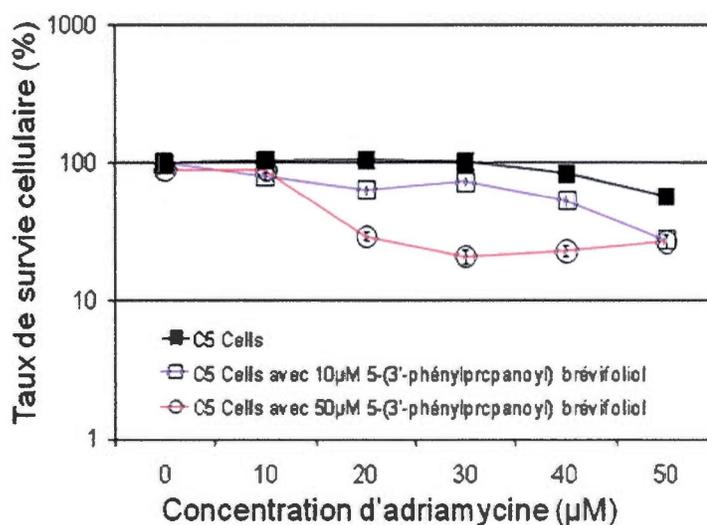


Figure 2.17 Sommaire des tests de cytotoxicité du 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol (**71**).⁸⁰

Le but essentiel des expériences menées sur les différents dérivés du brevifoliol était de trouver un produit possédant un puissant pouvoir répresseur de la glycoprotéine-P (P-gp). Bien que les résultats de cytotoxicité soient encourageants, aucun d'eux ne démontre que les dérivés synthétisés aient une interaction directe avec la P-gp, ni leur mode d'action. Cette hypothèse d'interaction directe entre les dérivés utilisés et la P-gp reste donc le sujet d'autres investigations.

Les résultats obtenus montrent l'effet toxique de l'adriamycine sur les cellules CH^RC5 lorsqu'on l'utilise avec les dérivés synthétisés. Pour vérifier que la mort des cellules n'était pas due à un effet toxique des dérivés, chaque test était pourvu d'un témoin : cellules

sans adriamycine mais avec le dérivé de brevifoliol, un pour chacune des concentrations testées. Dans tous les cas testés, aucun de ces témoins n'a montré un effet cytotoxique, signifiant que la concentration utilisée n'induit aucune mort cellulaire. Il est également bien connu que l'adriamycine a très peu d'effet sur les cellules CH^RC5, du fait de la capacité de celles-ci d'expulser les médicaments à l'extérieur de la cellule grâce à la P-gp qu'elle surexprime ⁸¹. Le fait qu'aucun des deux ne s'avère réellement toxique pour les cellules CH^RC5 lorsqu'il est utilisé seul prouve que la cytotoxicité observée n'est due qu'à la combinaison des deux et non à l'un d'eux uniquement. La fonction de pompe de la P-gp étant la raison de l'inefficacité de l'adriamycine seule, l'effet des dérivés de brevifoliol utilisés serait d'empêcher cette fonction.

Le dérivé 13-acétyl brevifoliol (**61**) employé comme référence n'induit aucune cytotoxicité en présence de l'adriamycine. Les dérivés 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**) et 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**65**) ont démontré une faible toxicité lorsqu'ils sont utilisés avec l'adriamycine. Le taux de survie cellulaire est élevé quelle que soit la concentration utilisée (environ 60% de viabilité cellulaire). Les dérivés 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol (**71**) (viabilité de 20% à partir de 20 µM d'adriamycine en présence de 50 µM du composé) et 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**62**) sont moyennement actifs avec une viabilité cellulaire légèrement supérieure à 15 % avec 50 µM d'adriamycine. De même, les dérivés 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**67**) et 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**68**) induisent une viabilité similaire de 15 % à 50 µM d'adriamycine et 50 µM de composé. D'autres dérivés para halogénés ont été également testés, notamment le 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol (**69**) qui a démontré un puissant effet inhibiteur (viabilité d'environ 8 % dès 10 µM d'adriamycine et avec 10 µM du dérivé). Les dérivés 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**64**) et 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol (**70**) ont démontré un effet important de l'inhibiteur (viabilité de 10 % dès 10 µM d'adriamycine et 50 µM du composé). Des essais sur des dérivés ont été effectués de par leur ressemblance avec le curcumin, un inhibiteur connu de la P-gp ⁸². Cependant, les résultats n'ont été positifs que pour un effet maximal vers 30 µM (environ 15-20 % de viabilité à partir de 30 µM d'adriamycine et 50 µM du composé).

Les résultats sont donc encourageants. Il faudrait continuer à investiguer avec d'autres dérivés ressemblant aux 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol et le 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol afin d'identifier un pharmacophore et le rôle de ces fluors à cette position.

Les tests de cytotoxicité précédents ont permis de vérifier le potentiel cytotoxique des différents dérivés synthétisés, et il ressort de ces études que les dérivés de brevifoliol sont peu toxiques pour les cellules CH^RC5. Par contre, en présence d'adriamycine on observe une toxicité (baisse du taux de viabilité cellulaire), ce qui suggère que ces dérivés de brevifoliol permettraient d'accroître l'activité de l'adriamycine. Dans le but de vérifier l'effet des dérivés synthétisés sur l'activité cytotoxique observée, des tests de cytométrie à flux ont été effectués sans ou avec 10 μ M ou 50 μ M de dérivés de brevifoliol et en présence de 50 μ M d'adriamycine. Cette expérience réalisée par le Dr. Ahmed Bettaieb a consisté à pré-incuber les cellules CH^RC5 avec un des dérivés de brevifoliol à une concentration donnée (10 ou 50 μ M), par la suite 50 μ M de doxorubicine (adriamycine) a été ajouté aux suspensions cellulaires incluant le contrôle (0 μ M du dérivé). Puis, après le lavage des cultures cellulaires au PBS, l'intensité de la doxorubicine accumulée dans la cellule a été mesurée avec FACScan en utilisant FL-2 comme détecteur de la fluorescence rouge de l'adriamycine. Les résultats sont représentés sous forme de graphe avec en abscisse la fluorescence de l'adriamycine mesurée (échelle logarithmique). Plus la fluorescence sera grande (pic déplacé vers la droite) plus il y aura de l'adriamycine accumulée dans les cellules.

Ainsi, les résultats de la figure **figure 2.18** montrent que le 13-acétyl brevifoliol (**61**) ne permet pas d'accroître la concentration cellulaire d'adriamycine, ceci quelle que soit la concentration de 13-acétyl brevifoliol utilisé (0, 10 ou 50 μ M). Ce résultat est en accord avec le test de cytotoxicité (**figure 2.7**) qui montre une très faible toxicité en présence du dérivé 13-acétyl brevifoliol.

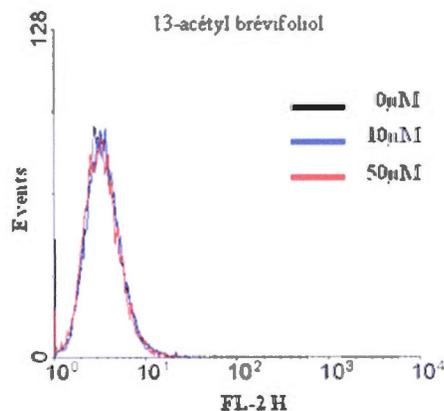


Figure 2.18 Sommaire des tests de cytométrie à flux du 13-acétyl brevifoliol (**61**).⁸⁰

La **figure 2.19 (a) et (b)** présente les résultats des tests de cytométrie à flux des dérivés 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**) et 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**67**). Il ressort de l'analyse de ces graphes que les deux dérivés ne permettent pas d'augmenter la concentration cellulaire d'adriamycine lorsqu'on utilise 10 μM de dérivé. Par contre à 50 μM de dérivé, la quantité d'adriamycine cellulaire augmente dans les deux cas : le pic se déplace vers la droite sur l'axe des abscisses, et cet effet est plus marqué avec le dérivé (**67**) (**figure 2.19 (b)**). Ceci est parfaitement en accord avec les observations des tests de cytotoxicité des **figures 2.8 et 2.13**. En effet, avec 10 μM de dérivé (**60**) ou (**67**) le taux de survie cellulaire reste élevé à environ 100 %. Mais avec 50 μM de ces dérivés la viabilité cellulaire décroît progressivement et de façon plus marquée avec le composé (**67**).

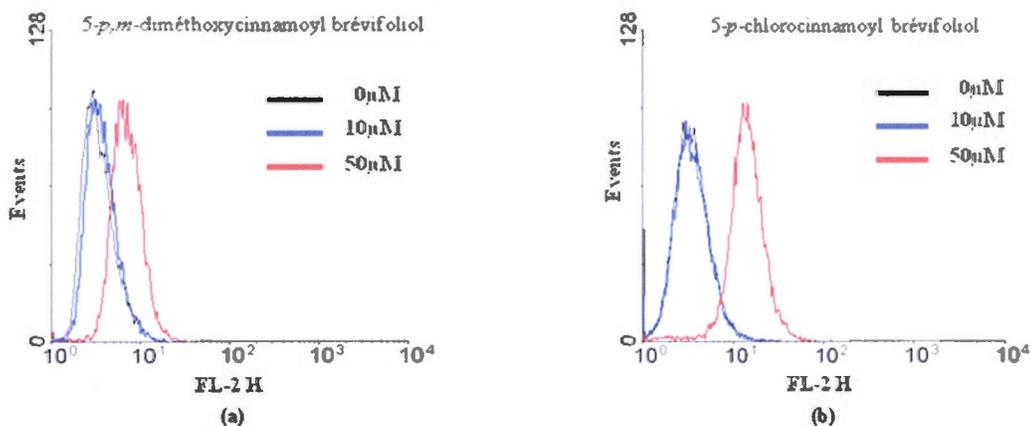


Figure 2.19 Sommaire des tests de cytométrie à flux du : (a) 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (60) et (b) 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (67).⁸⁰

La **figure 2.20** ((a), (b), (c) et (d)) présente les résultats des tests de cytométrie à flux des dérivés 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (62), 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (65), 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (68) et 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol (71). Il ressort de l'analyse de ces graphes que les quatre dérivés permettent une légère accumulation cellulaire d'adriamycine lorsqu'on utilise 10 μM de dérivé. À 50 μM de dérivé, la quantité d'adriamycine cellulaire augmente avec trois dérivés à l'exception du 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol qui montre une accumulation similaire à celle observée à la concentration de 10 μM . Ceci est parfaitement en accord avec les observations des tests de cytotoxicité des **figures 2.9, 2.11, 2.14 et 2.17**. Ces dérivés démontrent donc un effet moyen. Ceci permettrait d'expliquer l'activité cytotoxique observée en présence de ces composés.

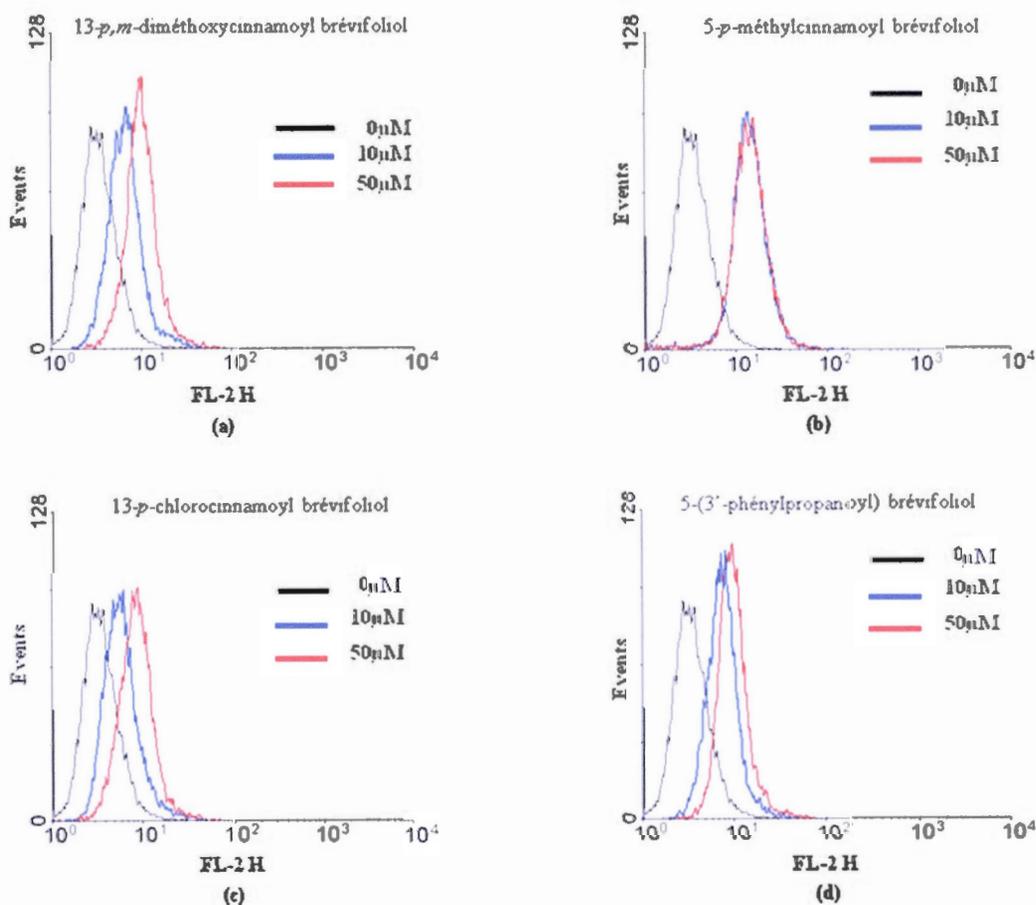


Figure 2.20 Sommaire des tests de cytométrie à flux du : (a) 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl bréviolol (62), (b) 5-*p*-méthylcinnamoyl bréviolol (65), (c) 13-*p*-chlorocinnamoyl bréviolol (68) et (d) 5-(3'-phénylpropanoyl) bréviolol (71).⁸⁰

La **figure 2.21** ((a), (b), (c) et (d)) présente les résultats des tests de cytométrie à flux des dérivés 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl bréviolol (64), 13-*p*-méthylcinnamoyl bréviolol (66), 5-*p*-fluorocinnamoyl bréviolol (69) et 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl bréviolol (70). L'analyse de ces graphes montre que les quatre dérivés permettent une accumulation cellulaire notable d'adriamycine lorsqu'on utilise 10 μ M de dérivé. À 50 μ M de dérivé, la quantité d'adriamycine cellulaire est plus importante surtout avec le 5-*p*-fluorocinnamoyl bréviolol (69) ou 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl bréviolol (70). Ceci est

parfaitement en accord avec les observations des tests de cytotoxicité des **figures 2.10, 2.12, 2.14 et 2.16**. Ces dérivés favorisent donc une augmentation de la concentration cellulaire d'adriamycine, avec un effet très important à 50 μM . Ceci laisse suggérer que l'activité cytotoxique observée est due à une augmentation de la concentration cellulaire d'adriamycine, ce qui permettrait d'expliquer l'activité cytotoxique observée en présence de ces composés.

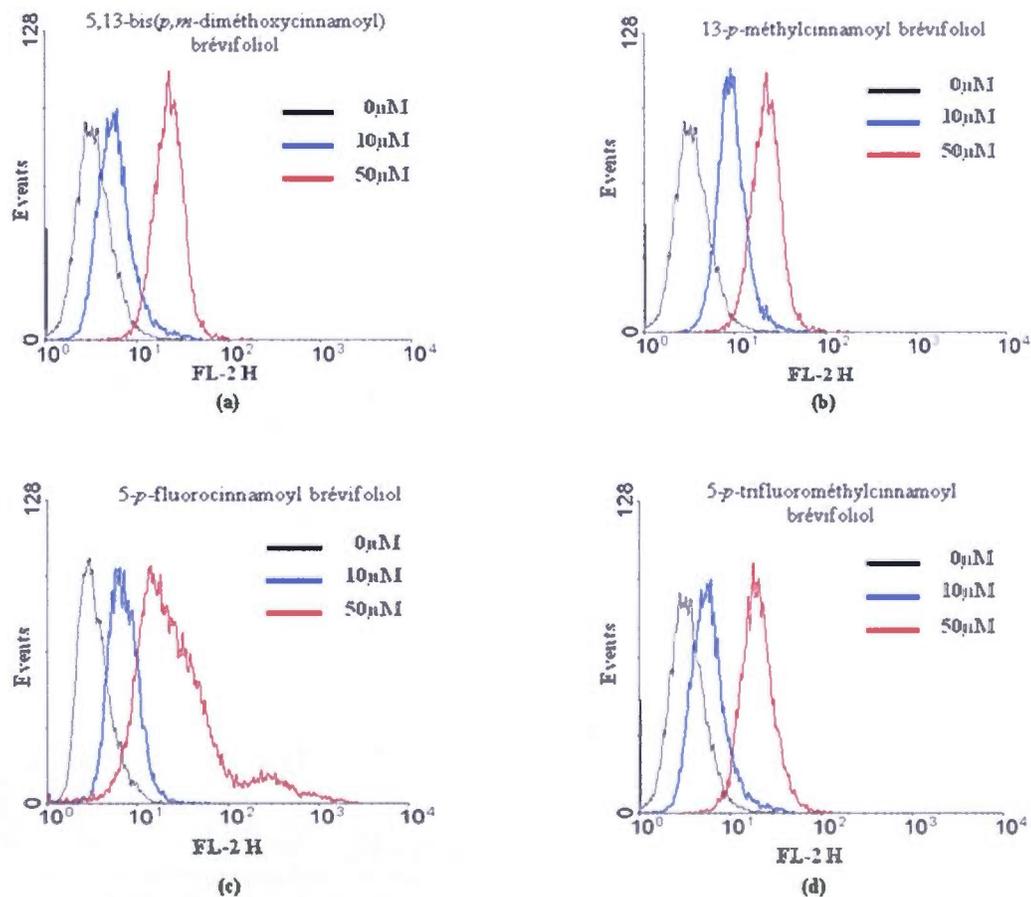


Figure 2.21 Sommaire des tests de cytométrie à flux du : (a) 5,13-bis-*p,m*-diméthoxy-cinnamoyl brévilfoliol (64), (b) 13-*p*-méthylcinnamoyl brévilfoliol (66), (c) 5-*p*-fluorocinnamoyl brévilfoliol (69), et (d) 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brévilfoliol (70).⁸⁰

Néanmoins, même si aucun dérivé ne s'est avéré toxique seul, cette étude ne permet pas de savoir si ses effets seront maintenus *in vivo*. Ces informations ne pourraient être obtenues que par un test plus poussé sur un organisme vivant atteint du cancer. Cependant, les réactions métaboliques d'un organisme sont autrement plus complexes, une multitude de variables étant à considérer, il n'est pas possible de vérifier le véritable potentiel des dérivés du brevifoliol que dans un test *in vivo*. Les dérivés pourraient être dégradés ou bien présenter des effets secondaires. De même, il faudrait comprendre le mécanisme d'action et les interactions (par des ponts hydrogènes ou interactions dipolaires) des dérivés de brevifoliol avec la P-gp.

CONCLUSION

Différents dérivés de brevifoliol, un abéo-taxane isolé en grande quantité (6,2 % à partir de 20 g d'extrait alcoolique) d'aiguilles et tiges fraîches renouvelables de *Taxus brevifolia*, ont ainsi été synthétisés, isolés et caractérisés à l'aide de plusieurs analyses spectroscopique et IR-ATR.

Les tests d'activités biologiques de cytotoxicité et de cytométrie à flux ont permis de vérifier le potentiel d'inhibition de la P-gp de ces dérivés hémi-synthétiques. En effet, certains dérivés ont démontré un très bon potentiel d'inhibition de la P-gp. Il s'agit en particulier des dérivés 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**64**), 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**62**), 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**66**), 5-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**67**), 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol (**69**), et 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol (**70**) qui permettent d'accroître la concentration cellulaire d'adriamycine et par conséquent d'augmenter le pouvoir cytotoxique de l'agent anticancéreux (taux de survie cellulaire de 8%, 15%, 15%, 24%, 24%, 15% respectivement). Quatre de ces dérivés (**64**, **66**, **69** et **70**) possèdent une activité équivalente à celle de la cyclosporine A, un agent inhibiteur connu de la P-gp et déjà utilisé en clinique. Les dérivés 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol (**71**) et 5-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol (**65**) possèdent une activité moyenne (taux de survie cellulaire de 27%, 31% respectivement). Par contre, les dérivés 5-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol (**60**) et 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol (**68**) ont une activité moindre (taux de survie cellulaire de 60%, 88% respectivement).

Ces résultats préliminaires suggèrent qu'en présence d'un groupement électro-attracteur sur le cycle aromatique du cinnamoyle greffé en position C-5 du brevifoliol, l'activité cytotoxique de l'adriamycine semble être favorisée. De plus, avec un atome ou un groupe d'atomes électro-donneurs sur l'anneau aromatique du groupe attaché en position C-13 du brevifoliol, on observe également cette tendance.

PERSPECTIVES

Les résultats très intéressants obtenus à ce stade de la recherche permettent d'envisager la synthèse d'autres dérivés de brevifoliol dans le but de poursuivre et de compléter l'étude structure-activité, ce qui pourrait permettre de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la P-gp.

Les perspectives envisageables peuvent être résumées en quelques points :

- évaluer la stabilité des dérivés dans les tests cellulaires en quantifiant la présence des dérivés de brevifoliol dans le milieu par HPLC et comme contrôle utiliser le dérivé p-trifluorométhylecinnamate de cyclohexyle;
- synthétiser des dérivés fluorés bis-estérifiés, C-5 et C-13 mono-estérifiés pour voir si la position de ce groupement est importante pour l'activité;
- corréler les résultats obtenus avec le calcul du TPSA ou du logD;
- fonctionnaliser la chaîne latérale greffée au brevifoliol par des groupes alkyles, carbonates ou carbamates d'ester dans le but de fonctionnaliser et allonger la chaîne greffée en C-5 ou C-13;
- évaluer le potentiel cytotoxique et anti P-gp de ces dérivés;
- continuer la recherche d'autres agents thérapeutiques des plantes médicinales pour le traitement du cancer.

CHAPITRE III

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Généralités

D'une façon générale, la verrerie utilisée a été préalablement lavée à l'eau et avec du savon, rincée à l'eau distillée, puis à l'acétone et ensuite séchée à l'étuve (à 65 °C) pour une période de 24 heures. Les aiguilles et les canules ont été lavées à l'eau, à l'acétone et séchées à l'étuve (à 65 °C) pendant 24 heures. Les solvants utilisés lors des réactions ont été séchés en utilisant le desséchant approprié. Les solvants ont été transférés en utilisant des seringues jetables à usage unique (B-D^R 21G 1½ Precision Glide^R Becton Dickinson & Co.) munies d'aiguilles métalliques (Aldrich). Les montages réactionnels ainsi que les ballons contenant les réactifs ont été fermés avec des septa en caoutchouc (Aldrich). Ils ont été purgés sous une atmosphère d'azote (Liquide Carbonic). Les mélanges réactionnels ont été agités à l'aide des barreaux magnétiques recouvert de Teflon^{md}. Les solvants utilisés pour les extractions étaient de qualité ACS et n'ont pas été purifiés avant leur utilisation. Pour permettre l'isolation des produits, les phases organiques ont été séchées avec du sulfate de magnésium anhydre (MgSO₄) et filtrées sous vide sur un entonnoir de Hirsch ou sur Büchner avec du papier filtre Whatman^{md} #1 ou #40.

Les produits bruts ont été obtenus en évaporant le solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Modèle RE-47, lot no. A08031, Yamato scientific co. Ltd, Tokyo, Japan) sous pression réduite (produite par une trompe à eau). Certains ont été purifiés par chromatographie radiale à l'aide d'un Chromatotron^{md} (modèle 7924T, Harrison Research S.No.Y03). Les fractions recueillies ont également été concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Des plaques chromatographiques commerciales ont été utilisées pour la chromatographie sur couche mince (CCM ; Silica Gel 60 F₂₅₄, 250 nm, EM Separation Technology, Merck KGaA). Les solvants utilisés pour la chromatographie étaient de qualité ACS et n'ont pas été purifiés avant leur utilisation. La révélation des plaques

chromatographiques a été exécutée de trois façons : les plaques chromatographiques ont d'abord été exposées à une lumière ultraviolette de 254 nm, puis exposées aux vapeurs d'iode et enfin trempées dans une solution oxydante d'acide cérium ammonium sulfate (préparée à partir de 1 g de sulfate de cérium, 2,5 g de molybdate d'ammonium et 100 mL H₂SO₄ 10%) et séchées sur une plaque chauffante.

Les points de fusion ont été enregistrés avec un appareil Fisher-Johns. Ils n'ont pas été corrigés.

Les valeurs d'activité optique ont été mesurées sur un polarimètre JASCO P1010.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un appareil ATR Thermo Scientific Smart ITR, modèle NICOLET 6700.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés avec un appareil Varian-Inova à une fréquence de 600 MHz pour le proton et de 150 MHz pour le carbone 13. Le chloroforme deutéré (CDCl₃) a été utilisé comme solvant et son pic à 7,27 ppm (RMN ¹H) et celui à 77,0 ppm (RMN ¹³C) ont servi de pics de référence.

Les spectres de masse ont été enregistrés avec un appareil LC-MS muni d'un détecteur Micromass Quattro LC. Le système d'acquisition a été MassLynx v4.0 et le mode d'ionisation est l'électronébulisation en mode positif. Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés sur un appareil Agilent Technologies 6210 Time of flight LC-MS avec électronébulisateur en mode positif comme source d'ionisation, une colonne Zorbax SB-C18 2,1 X 300 mm et des particules de 3,5 µm.

Pour les données spectrales, les codes suivants ont été utilisés :

En IR-ATR : bande d'absorption de (fo) = forte intensité, (m) = moyenne intensité et (fa) = faible intensité, (l) = bande large.

En RMN ¹H : s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, Q = quintuplet, m = multiplet, dd = doublet de doublets, dt = doublet de triplets, ddd = doublet de doublet de

doublets, dtd = doublet de triplet de doublets, dq = doublet de quadruplets, td = triplet dédoublé, qd = quadruplet dédoublé, l = large, app. = apparent, J = constante de couplage, δ = déplacement chimique (en ppm).

En RMN ^{13}C : CH = groupement méthyne, CH_2 = groupement méthylène, CH_3 = groupement méthyle, C_q = carbone quaternaire.

3.2 Matériel

Le *p*-hydroxy-*m*-methoxy benzaldéhyde (Aldrich), l'iodure de méthyle (Aldrich), le carbonate de calcium anhydre, l'acide malonique, la pipéridine, la dicyclohexyl carbodiimide DCC (Aldrich), le *N,N*-diméthyl amino pyridine DMAP (Aldrich), l'acide *p*-méthylcinnamique (Aldrich), l'acide *p*-chlorocinnamique (Aldrich), l'acide *p*-fluorocinnamique (Aldrich), d'acide *p*-trifluorométhylcinnamique (Aldrich) et l'acide hydrocinnamique (Aldrich) ont été utilisés directement sans purification préalable.

Les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau distillée. Le papier pH (pH Hydrion paper, Micro Essential Laboratory) a été utilisé pour déterminer le pH des différentes solutions.

Les solutions nécessaires à la prise des valeurs d'activité optique ont été préparées avec du chloroforme de grade HPLC (CHCl_3 , 99,9 %, UV cutoff 244 nm, Fisher Scientific).

Le chloroforme deutéré (CDCl_3 , MSD isotopes, 99,8 % atome D) a été utilisé pour les analyses de RMN.

Le matériel végétal a été récolté en Novembre 1989 près de Nelson en Colombie Britannique, au Canada. 50 g d'aiguilles et tiges fraîches ont été broyées, puis extraits avec de l'éthanol (2 x 250 mL). L'extrait brut a ensuite été concentré sous pression réduite pour obtenir 50 mL. Le résidu obtenu a été dissout dans 300 ml d'eau et partitionné avec de l'hexane (2 x 200 mL), puis du CHCl_3 (2 x 200 mL), de l'éther (2 x 200 mL), de l'AcOEt

(2x200 mL) et du n-BuOH (2 x 200 mL) successivement. L'extrait au CHCl_3 a été concentré pour donner 840 mg de pâte sombre. ⁶⁶

3.3 Essais in vitro

3.3.1 Culture cellulaire

Les cellules $\text{CH}^{\text{R}}\text{C5}$ (Ling et Thompson, 1974) sont cultivées en monocouche dans un milieu de culture α -MEM (Aldrich) contenant 10% de sérum de bœuf fœtal (SBF) (Gibco Canada, Burlington) et 1% de pénicilline (50 U/ml)/streptomycins (5 $\mu\text{g/ml}$) (Flow Laboratories, Mississauga, ON)⁸³. La culture cellulaire est maintenue dans des flacons de culture de 50 cm^2 (Sarstedt, Saint-Laurent, QC) dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO_2 . L'ajout de colchicine (1mg/ml) permet la sélection des cellules exprimant la P-gp. Le milieu de culture est changé 24 h avant les expériences. Les cellules sont par la suite détachées en utilisant du (PBS)-citrate, lavées par centrifugation et ré-suspendues dans un milieu PBS contenant 1% albumine du sérum bovin et 10 mM de glucose.

3.3.2 Test de prolifération cellulaire

Les cellules ($4 \times 10^5/\text{mL}$) ont été exposées pendant 30 minutes à différentes concentrations d'adriamycine (0, 20, 40, 60, 80 et 100 μM) (Aldrich) dans un milieu PBS contenant 1% d'albumine du sérum bovin et 10 mM de glucose avec ou sans dérivé de brévioliol. Les dérivés de brévioliol ont été testés à différentes concentrations : 10 et 50 μM . Les cellules ayant survécues au stress ont été diluées, puis incubées dans des plaques 96 puits contenant 200 μl de milieu α -MEM avec 10% SBF. La culture cellulaire a été maintenue pendant 96 heures à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO_2 . Les cellules ont été par la suite fixées avec de l'acide trichloracétique (Aldrich), puis colorées avec la sulforhodamine B (Aldrich). L'intensité de coloration est proportionnelle au nombre des cellules et a été mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Le pourcentage de la survie

cellulaire a été exprimé par rapport aux cellules non exposées, ni à l'adriamycine et ni à l'inhibiteur.

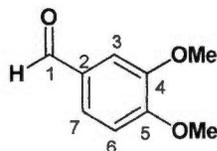
3.3.3 Analyse d'accumulation intracellulaire d'adriamycine par cytométrie en flux

Les cellules (4×10^5 /mL) ont été exposées pendant 30 minutes à différentes concentrations d'adriamycine (0, 20, 40, 60, 80 et $100 \mu\text{M}$) (Aldrich) dans un milieu PBS contenant 1% d'albumine du sérum bovin et 10 mM de glucose avec ou sans dérivé de brevifoliol. Les cellules ont été lavées pour éliminer l'adriamycine. Par la suite, 10 000 cellules ont été analysées avec un cytomètre en flux (Becton Dickinson, San José, CA) et la fluorescence d'adriamycine a été détectée sur le canal FL-2 et quantifiée avec le logiciel CellQuest.

3.4 Description des protocoles et des produits

3.4.1 Synthèse de l'*o*-méthoxyvanilline

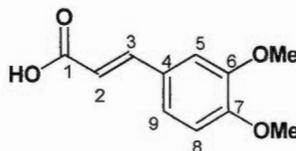
Dans un ballon de 50 mL à fond rond, sec et purgé à l'azote, muni d'un agitateur magnétique, 1 g de vanilline (6,57 mmol, 1,0 éq) a été dissout dans 10 mL d'acétone. Environ 1 g de K_2CO_3 anhydre puis 1,23 mL d'iodure de méthyle (19,71 mmol, 3 éq) ont été ajoutés au mélange. Le mélange réactionnel a été ensuite porté à reflux pendant 5 h, puis refroidi à la température de la pièce, après 20 mL d'eau et 20 mL d'éther de pétrole ont été ajoutés. Le mélange a été ensuite transféré dans une ampoule à décanter pour extraire la phase organique. La phase aqueuse obtenue a été extraite avec de l'éther de pétrole (20 mL X 2). Les phases organiques ont été regroupées et extraites avec 8 mL d'une solution de NaOH 2 M. La phase organique résultante a été récupérée, séchée sur du sulfate de magnésium (MgSO_4), puis concentrée au rotavapeur. Le résidu obtenu a été recristallisé dans l'hexane. Un solide blanc a été recueilli avec un rendement de 92 % (1,00 g).



RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): $^{\delta}$ 3,96 (s, 3H, -OMe), 3,98 (s, 3H, -OMe), 6,98 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, **H-6**), 7,48 (s, 1H, **H-3**), 7,51 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, **H-7**), 9,80 (s, 1H, **H-1**).

3.4.2 Synthèse de l'acide *p,m*-diméthoxycinnamique

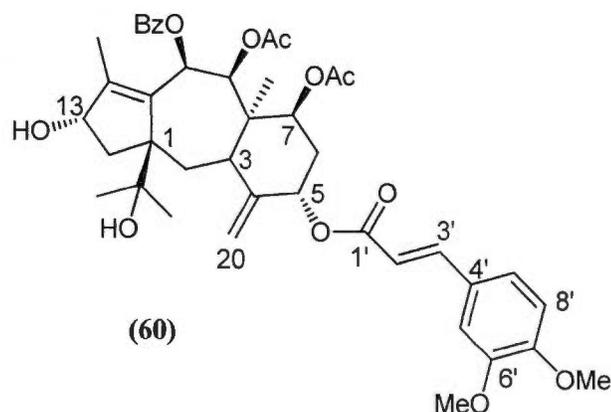
Dans un ballon de 50 mL sec et purgé à l'azote 0,75 g d'acide malonique (7,21 mmol, 1,1 éq) a été introduit, puis 6 mL de pyridine anhydre, l'*o*-méthoxyvanilline (1,09 g, 6,55 mmol, 1,0 éq) et la pipéridine (20 μL , 1,47 mmol, 0,22 éq) ont été ajoutés. Le mélange a été porté à reflux pendant 2h jusqu'au dégagement complet de CO_2 . Le mélange a été ensuite refroidi à la température de la pièce. 10-15 g de glace, 10 mL de HCl concentré et 20 mL d'eau ont été ajoutés (pH d'environ 1). Le produit de réaction précipite sous forme de cristaux jaunâtres. Le solide formé a été filtré puis lavé avec de l'eau glacée, puis avec environ 5 mL d'éthanol froid. Le solide a été recristallisé dans le mélange EtOH/MeOH (5:1). 1,21 g de solide jaunâtre a été obtenu pour un rendement de 89 %.



RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): $^{\delta}$ 3,98 (s, 6H, 2 -OMe), 6,32 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **H-2**), 6,91 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, **H-8**), 7,08 (d, $J=2,0$ Hz, 1H, **H-5**), 7,15 (dd, $J=8,0$ et 2,0 Hz, 1H, **H-9**), 7,76 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **H-3**).

3.4.3 Synthèse des dérivés 5- et 13-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brevifoliol

Dans un ballon de 50 mL sec et purgé à l'azote, 37,5 mg d'acide *p,m*-diméthoxycinnamique (0,18 mmol, 1,0 éq) et 100,0 mg de brevifoliol (0,18 mmol, 1,0 éq) ont été dissouts dans 10,0 mL de CH_2Cl_2 . Ensuite 55,7 mg de DCC (0,27 mmol, 1,5 éq) et 11,0 mg de DMAP (0,09 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. Le mélange a été agité à la température de la pièce pendant 72 h. Le précipité blanc de DCU formé a été suspendu à l'aide d'un bain ultrason puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé après évaporation, a été recristallisé dans l'éther. Le solide obtenu a été filtré sous vide, rincé avec de l'éther froid. Ensuite le filtrat contenant les produits de réaction a été concentré au rotavapeur puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (20 g) avec comme système d'éluant le mélange hexanes/ CH_2Cl_2 /EtOH (75:20:05). Les fractions contenant les produits monosubstitués ont été regroupées et le brevifoliol récupéré (35 mg) est conservé pour d'autres réactions. Après une recherche minutieuse de système de solvant, le mélange CH_2Cl_2 /tBuOMe (90:10) a été utilisé pour la compléter la purification. Cette étape a permis d'obtenir les deux dérivés mono-estérifiés avec un rendement global de 45 %. Le composé estérifié en position C-5 (**60**) a été obtenu avec un rendement de 32 % (42,3 mg) et le dérivé estérifié en position C-13 (**62**) avec un rendement de 13 % (17,5 mg).



F.M.: $C_{42}H_{50}O_{12}$

M: 746,84 g/mol

État: solide poudreux blanc, $pf=126-134\text{ }^{\circ}C$

R_f : 0,15 (plaque de silice en verre, CH_2Cl_2/Et_2O 90:10)

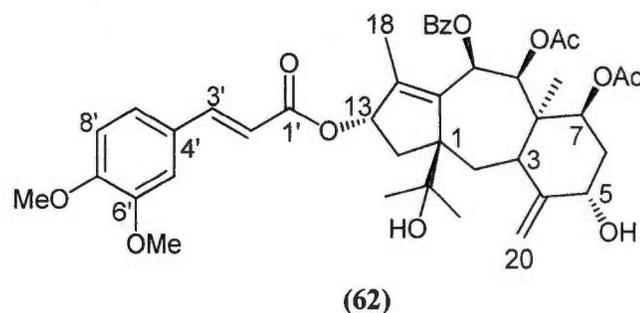
$[\alpha]_D$: $-54,0$ ($c=0,26$; $CHCl_3$) à $22\text{ }^{\circ}C$

IR-ATR: Poudre; 3568 (O–H), 2964 (Csp^3-H), 1711 (C=O), 1633, 1600, 1514, 1450 (C=C), 1374, 1263, 1229, 1172, 1155, 1140, 1090, 1025, 907, 711 et 606 cm^{-1} .

RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 0,94 (s, 3H, **Me-19**), 1,02 (s, 3H, **Me-16**), 1,19 (dd, $J=13,8$ et $7,3$ Hz, 1H, **H-14 α**), 1,33 (s, 3H, **Me-17**), 1,48 (d, $J=14,5$ Hz, 1H, **H-2 α**), 1,77 (s, 3H, 9-OCO**CH $_3$**), 1,96 (td, $J=11,2$ et $4,1$ Hz, 1H, **H6 α**), 2,02-2,06 (m, 1H, **H6 β**), 2,08 (s, 3H, 7-OCO**CH $_3$**), 2,18 (s, 3H, **Me-18**),

2,42 (dd, $J=13,8$ et $7,3$ Hz, 2H, **H-2 β** et **H14 β**), 2,88 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, **H-3**), 3,92 (s, 1H, **7'-** ou **8'-OMe**), 3,94 (s, 1H, **8'-** ou **7'-OMe**), 4,49 (t, $J=7,3$ Hz, 1H, **H-13**), 4,93 (s, 1H, **H-20a**), 5,34 (s, 1H, **H-20b**), 5,53 (s l., 1H, **H-5**), 5,69 (dd, $J=11,2$ et $5,1$ Hz, 1H, **H-7**), 6,07 (d l., $J=10,4$ Hz, 1H, **H-9**), 6,38 (d, $J=15,9$ Hz, 1H, **H-2'**), 6,69 (d, $J=10,4$ Hz, 1H, **H-10**), 6,87 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, **H-8'**), 7,12 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, **H-9'**), 7,13 (s, 1H, **H-5'**), 7,44 (t, $J=8,0$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,61 (d, $J=15,9$ Hz, 1H, **H-3'**), 7,56 (t, $J=8,0$ Hz, 1H, **10-OBz, p-Ph**), 7,88 (d, $J=8,0$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 11,91 (**C18**), 12,92 (**C19**), 20,76 (**7-OCOCH $_3$**), 21,41 (**9-OCOCH $_3$**), 24,78 (**C17**), 27,02 (**C16**), 29,18 (**C2**), 34,04 (**C6**), 38,96 (**C3**), 44,83 (**C8**), 47,77 (**C14**), 55,81 (**5-OCinnamoyle, 7'-** ou **8'-OMe**), 55,91 (**5-OCinnamoyle, 8'-** ou **7'-OMe**), 63,16 (**C1**), 69,73 (**C7**), 70,66 (**C10**), 73,92 (**C13**), 75,46 (**C15**), 77,07 (**2C, C5** et **C9**), 109,48 (**5-OCinnamoyle, C5'**), 110,89 (**5-OCinnamoyle, C8'**), 114,03 (**C20**), 115,92 (**5-OCinnamoyle, C2'**), 122,83 (**5-OCinnamoyle, C9'**), 127,32 (**5-OCinnamoyle, C4'**), 128,76 (**10-OBz, p-Ph**), 129,17 (**2C, 10-OBz, o-Ph**), 129,44 (**2C, 10-OBz, m-Ph**), 133,29 (**10-OBz, i-Ph**), 134,31 (**C11**), 145,04 (**5-OCinnamoyle, C3'**), 145,54 (**C12**), 149,12 (**5-OCinnamoyle, C7'**), 150,90 (**5-OCinnamoyle, C6'**), 151,10 (**C4**), 164,16 (**10-OBz, C=O**), 165,86 (**5-OCinnamoyle, C1'**), 169,90* (**7- ou 9-OCOCH $_3$**), 169,94* (**9- ou 7-OCOCH $_3$**).



F.M.: C₄₂H₅₀O₁₂

M: 746,84 g/mol

État: huile incolore

R_f: 0,15 (plaque de silice en verre, CH₂Cl₂/Et₂O 90:10)

[α]_D: + 21,7 (c=0,132; CHCl₃) à 22 °C

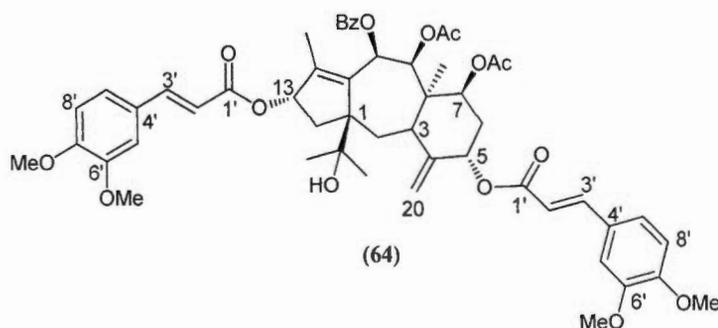
RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 0,90 (s, 3H, **Me-19**), 1,12 (s, 3H, **Me-16**), 1,37 (s, 3H, **Me-17**), 1,36–1,42 (m, 1H, **H-14α**), 1,50 (d, *J*=12,6 Hz, 1H, **H-2α**), 1,77 (s, 3H, 9-OCOCH₃), 1,86 (td, *J*=12,7 et 3,7 Hz, 1H, **H-6β**), 2,02 (ddd, *J*=14,3; 5,4 et 2,0 Hz, 1H, **H-6α**), 2,08 (s, 3H, **Me-18**), 2,11 (s, 3H, 7-OCOCH₃), 2,45 (dd, *J*=14,0 et 9,6 Hz, 1H, **H-2β**), 2,61 (dd, *J*=14,1 et 7,6 Hz, 1H, **H-14β**), 2,98 (d, *J*=9,6 Hz, 1H, **H-3**), 3,92 (s, 1H, 7'- ou 8'-OMe), 3,94 (s, 1H, 8'- ou 7'-OMe), 5,55 (s l., 1H, **H-13**), 4,81 (s, 1H, **H-20a**), 5,14 (s, 1H, **H-20b**), 4,37 (s l., 1H, **H-5**), 5,72 (dd, *J*=11,1 et 5,3 Hz, 1H, **H-7**), 6,08 (s l., 1H, **H-9**), 6,28 (d, *J*=16,0 Hz, 1H, **H-2'**), 6,70 (d l., *J*=8,8 Hz, 1H, **H-10**), 6,88 (d,

$J=8,5$ Hz, 1H, **H-8'**), 7,07 (d, $J=1,8$ Hz, 1H, **H-5'**), 7,12 (dd, $J=8,5$ et 1,8 Hz, 1H, **H-9'**), 7,45 (t, $J=7,6$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,57 (t, $J=7,6$ Hz, 1H, **10-OBz, p-Ph**), 7,62 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **H-3'**), 7,89 (d, $J=7,6$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 12,17 (**C18**), 12,87 (**C19**), 20,77 (**9-OCOCH₃**), 21,41 (**7-OCOCH₃**), 24,78 (**C17**), 26,96 (**C16**), 29,22 (**C2**), 35,80 (**C6**), 37,63 (**C3**), 45,11 (**C8**), 44,40 (**C14**), 55,91 (**13-OCinnamoyle, 7'- ou 8'-OMe**), 55,94 (**13-OCinnamoyle, 8'- ou 7'-OMe**), 63,53 (**C1**), 69,71 (**C7**), 70,25 (**C10**), 72,61 (**C5**), 77,20 (**C9**), 75,59 (**C15**), 79,81 (**C13**), 109,61 (**13-OCinnamoyle, C5'**), 110,95 (**13-OCinnamoyle, C8'**), 111,58 (**C20**), 115,50 (**13-OCinnamoyle, C2'**), 122,76 (**13-OCinnamoyle, C9'**), 127,21 (**13-OCinnamoyle, C4'**), 128,76 (**10-OBz, p-Ph**), 129,19 (**2C, 10-OBz, o-Ph**), 129,46 (**10-OBz, 2C, m-Ph**), 133,30 (**10-OBz, i-Ph**), 136,27 (**C11**), 145,17 (**13-OCinnamoyle, C3'**), 147,71 (**C12**), 149,16 (**13-OCinnamoyle, C7'**), 151,17 (**13-OCinnamoyle, C6'**), 150,41 (**C4**), 164,15 (**10-OBz, C=O**), 166,94 (**13-OCinnamoyle, C1'**), 169,94 (**2C, 7-OCOCH₃ et 9-OCOCH₃**).

3.4.4 Synthèse du dérivé 5,13-bis-*p,m*-diméthoxycinnamoyl brévioliol

Dans un ballon de 10 mL sec et purgé à l'azote, 11,2 mg d'acide *p,m*-diméthoxycinnamique (0,054 mmol, 2,0 éq) et 15,0 mg de brévioliol (0,027 mmol, 1,0 éq) ont été dissouts dans 10,0 mL de toluène. Ensuite 13,9 mg de DCC (0,068 mmol, 2,5 éq) et 1,65 mg de DMAP (0,014 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. L'ensemble est agité à la température de la pièce pendant 72 h. La CCM faite dans le système hexanes/toluène/AcOEt (30:30:40) indique qu'il reste encore du brévioliol et une formation de produit bis-estérifié. L'acide cinnamique (1,0 éq) et le DCC (0,5 éq) ont alors été ajoutés. Le suivi de la réaction a été fait par CCM dans le système hexanes/toluène/AcOEt (30:30:40). Le mélange a été agité à la température de la pièce pendant 24 h additionnelles jusqu'à la disparition complète de la tache de produits monosubstitués observée par CCM. Ensuite, le précipité blanc de DCU formé a été suspendu à l'aide d'un bain ultrason puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé recristallisé dans l'éther. Le solide obtenu a été filtré sous vide, rincé avec de l'éther froid. Ensuite le filtrat contenant le produit de réaction a été concentré au rotavapeur puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (10 g) avec comme système d'éluant le mélange hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (50:05:45). Les fractions contenant le produit bis-estérifié ont été regroupées, puis recristallisées dans le mélange acétone/pentane (5:1). Le composé (**64**) a été obtenu avec en rendement global de 75% (19,0 mg, 0,02 mmol).



F.M.: $C_{53}H_{60}O_{15}$

M: 937,03 g/mol

État: solide poudreux blanc, pf=160–163 °C

R_f: 0,15 (plaque de silice en verre, CH₂Cl₂/Et₂O 90:10)

[α]_D: + 89,4 (c=0,400, CHCl₃) à 22 °C

IR-ATR: Poudre; 3514 (O–H), 2955 (Csp³–H), 1745 (C=O), 1717, 1699, 1633 (C=C), 1600, 1514, 1452, 1378, 1263, 1230, 1155, 1145, 1101, 1026, 954 et 714 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 0,98 (s, 3H, Me-19), 1,16 (s, 3H, Me-16), 1,40 (s, 3H, Me-17), 1,48 (dd, $J=14,0$ et $8,0$ Hz, 1H, H-14 α), 1,56 (d, $J=14,2$ Hz, 1H, H-2 α), 1,77 (s, 3H, 9-OCOCH₃), 1,96 (td, $J=11,4$ et $3,9$ Hz, 1H, H6 β), 2,02-2,06 (m, 1H, H6 α), 2,18 (s, 3H, 7-OCOCH₃), 2,06 (s, 3H, Me-18), 2,47

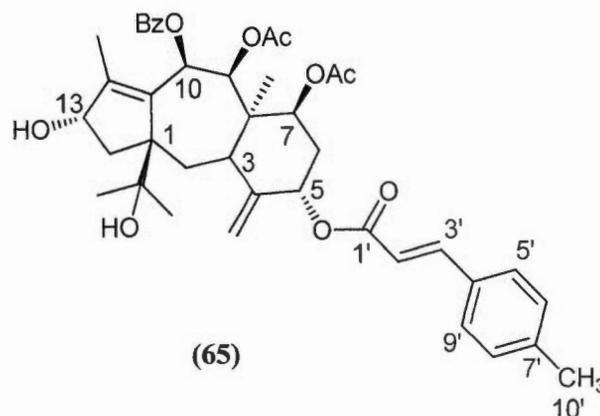
(dd, $J=14,2$ et $9,1$ Hz, 1H, **H-2 β**), 2,56 (dd, $J=14,0$ et $7,4$ Hz, 1H, **H14 β**), 3,01 (d, $J=8,5$ Hz, 1H, **H-3**), 3,72 (s, 3H, **7'- ou 8'-OMe**), 3,73 (s, 3H, **7'- ou 8'-OMe**), 3,78 (s, 3H, **7'- ou 8'-OMe**), 3,88 (s, 3H, **8'- ou 7'-OMe**), 5,77 (t, $J=7,4$ Hz, 1H, **H-13**), 4,96 (s, 1H, **H-20a**), 5,35 (s, 1H, **H-20b**), 5,61 (s l., 1H, **H-5**), 5,73 (dd, $J=11,4$ et $5,0$ Hz, 1H, **H-7**), 5,96 (d, $J=15,8$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-2'**), 6,20 (d, $J=10,4$ Hz, 1H, **H-9**), 6,35 (d, $J=15,9$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-2'**), 6,55 (s, 1H, **13-OCinnamoyle, H-5'**), 6,60 (d, $J=8,2$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-8'**), 6,62 (d, $J=7,6$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-8'**), 6,63 (d, $J=7,6$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-9'**), 6,74 (d, $J=10,4$ Hz, 1H, **H-10**), 6,93 (s, 1H, **5-OCinnamoyle, H-5'**), 6,99 (d, $J=8,2$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-9'**), 7,46 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,49 (d, $J=15,8$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-3'**), 7,65 (d, $J=15,9$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-3'**), 7,58 (t, $J=7,5$ Hz, 1H, **10-OBz, p-Ph**), 7,90 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 12,18 (**C18**), 12,75 (**C19**), 20,76 (**9-OCOCH $_3$**), 21,41 (**7-OCOCH $_3$**), 24,89 (**C17**), 27,10 (**C16**), 29,45 (**C2**), 34,42 (**C6**), 39,07 (**C3**), 44,29 (**C8**), 44,89 (**C14**), 55,47 (**-OCinnamoyle, 7'- ou 8'-OMe**), 55,60 (**-OCinnamoyle, 8'- ou 7'-OMe**), 55,63 (**-OCinnamoyle, 7'- ou 8'-OMe**), 55,85 (**-OCinnamoyle, 8'- ou 7'-OMe**), 63,00 (**C1**), 69,53 (**C7**), 69,91 (**C10**), 74,08 (**C5**), 75,56 (**C15**), 79,22 (**2C, C9 et C13**), 109,06 (**5-OCinnamoyle, C5'**), 109,79 (**13-OCinnamoyle, C5'**), 110,57 (**13-OCinnamoyle, C8'**), 113,78 (**5-OCinnamoyle, C8'**), 114,75 (**2C, C20 et 13-OCinnamoyle, C2'**), 115,40 (**5-OCinnamoyle, C2'**), 122,02 (**13-**

OCinnamoyle, C9'), 122,62 (5-OCinnamoyle, C9'), 126,68 (13-OCinnamoyle, C4'), 126,78 (5-OCinnamoyle, C4'), 128,78 (10-OBz, *p*-Ph), 129,09 (2C, 10-OBz, *o*-Ph), 129,46 (2C, 10-OBz, *m*-Ph), 133,37 (10-OBz, *i*-Ph), 136,98 (C11), 139,00 (C4), 145,20 (2C, 5-OCinnamoyle, C3' et C7'), 145,72 (13-OCinnamoyle, C3'), 147,03 (2C, C12 et 13-OCinnamoyle, C7'), 148,58 (5-OCinnamoyle, C6'), 150,86 (13-OCinnamoyle, C6'), 164,14 (10-OBz, C=O), 165,95 (5-OCinnamoyle, C1'), 167,21 (13-OCinnamoyle, C1'), 169,88* (9- ou 7-OCOCH₃), 169,90* (7- ou 9-OCOCH₃).

3.4.5 Synthèse des dérivés 5- et 13-*p*-méthylcinnamoyl brevifoliol

Dans un ballon de 50 mL sec et purgé à l'azote, 16,0 mg d'acide *p*-méthylcinnamique (0,1 mmol, 1,1 éq) et 50,0 mg de brevifoliol (0,09 mmol, 1 éq) ont été dissouts dans 10,0 mL de CH₂Cl₂. Ensuite 29,7 mg de DCC (0,14 mmol, 1,6 éq) et 5,5 mg de DMAP (0,045 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. Le mélange a été agité à la température de la pièce pendant 72 h. Après agitation, le précipité blanc de DCU formé a été suspendu à l'aide d'un bain ultrason puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé est recristallisé dans l'éther. Le solide obtenu a été filtré sous vide, rincé avec de l'éther froid. Ensuite le filtrat contenant les produits de réaction a été concentré au rotavapeur puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (20 g) avec comme système d'éluant le mélange hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (75:20:05). Les fractions contenant les produits mono-estérifiés ont été regroupées et le brevifoliol récupéré (20,3 mg) conservé pour d'autres réactions. Après une recherche minutieuse de système de solvant, le mélange CH₂Cl₂/tBuOMe (95:05) a été utilisé pour compléter la purification. Les deux dérivés mono-estérifiés ont été obtenus avec un rendement global de 48 %. Le composé estérifié en position C-5 (**65**) a été obtenu avec un rendement de 35 % (22,3 mg) et le dérivé estérifié en position C-13 (**66**) a été obtenu avec un rendement de 13 % (7,9 mg).



F.M.: C₄₁H₄₈O₁₀

M: 700,81 g/mol

État: solide poudreux blanc, pf=133–140 °C

R_f: 0,36 (plaque de silice en verre, CH₂Cl₂/Et₂O 90:10)

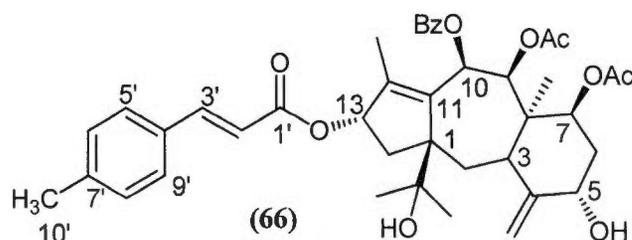
[α]_D: – 41,9 (c=1,00; CHCl₃) à 22 °C

IR-ATR: Poudre; 3561 (O–H), 2974 (Csp³–H), 1737 (C=O), 1636, 1373, 1260, 1171, 1089, 1030, 907, 787 et 711 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 0,94 (s, 3H, **Me-19**), 1,02 (s, 3H, **Me-16**), 1,20 (dd, *J*=14,7 et 7,6 Hz, 1H, **H-14α**), 1,33 (s, 3H, **Me-17**), 1,48 (d, *J*=14,2 Hz, 1H, **H-2α**), 1,77 (s, 3H, 9-OCOCH₃), 1,96 (td, *J*=14,5 et 2,0 Hz, 1H, **H6α**), 2,07-2,10 (m, 1H, **H6β**), 2,08 (s, 3H, 7-OCOCH₃), 2,17 (s, 3H, **Me-18**),

2,37 (s, 3H, **H-10'**), 2,39 (dd, $J=14,2$ et $7,3$ Hz, 2H, **H-2 β** et **H14 β**), 2,86 (d, $J=8,9$ Hz, 1H, **H-3**), 4,49 (t, $J=7,1$ Hz, 1H, **H-13**), 4,94 (s, 1H, **H-20a**), 5,34 (s, 1H, **H-20b**), 5,53 (s l., 1H, **H-5**), 5,68 (dd, $J=11,2$ et $5,2$ Hz, 1H, **H-7**), 6,07 (d, $J=10,0$ Hz, 1H, **H-9**), 6,45 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-2'**), 6,69 (d, $J=10,0$ Hz, 1H, **H-10**), 7,20 (d, $J=7,7$ Hz, 2H, **5-OCinnamoyle, H-6' et H-8'**), 7,44 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,45 (d, $J=7,7$ Hz, 2H, **5-OCinnamoyle, H-5' et H-9'**), 7,56 (t, $J=7,5$ Hz, 1H, **10-OBz, p-Ph**), 7,66 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-3'**), 7,89 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 11,88 (**C18**), 12,96 (**C19**), 20,77 (**7-OCOCH $_3$**), 21,40 (**9-OCOCH $_3$**), 21,47 (**5-OCinnamoyle, C10'**), 24,79 (**C17**), 27,03 (**C16**), 29,19 (**C2**), 34,00 (**C6**), 39,03 (**C3**), 44,82 (**C8**), 47,55 (**C14**), 63,06 (**C1**), 69,75 (**C7**), 70,72 (**C10**), 74,07 (**C13**), 75,49 (**C15**), 77,06 (**2C, C5 et C9**), 114,12 (**C20**), 117,11 (**5-OCinnamoyle, C2'**), 128,14 (**2C, 5-OCinnamoyle, C5' et C9'**), 128,75 (**10-OBz, p-Ph**), 129,23 (**2C, 10-OBz, o-Ph**), 129,47 (**2C, 10-OBz, m-Ph**), 129,62 (**2C, 5-OCinnamoyle, C6' et C8'**), 131,64 (**5-OCinnamoyle, C4'**), 133,27 (**10-OBz, i-Ph**), 134,21 (**C11**), 140,73 (**5-OCinnamoyle, C7'**), 145,24 (**5-OCinnamoyle, C3'**), 145,56 (**C12**), 151,14 (**C4**), 164,16 (**10-OBz, C=O**), 165,93 (**5-OCinnamoyle, C1'**), 169,90 (**2C, 7-OCOCH $_3$ et 9-OCOCH $_3$**).



F.M.: $C_{41}H_{48}O_{10}$

M: 700,81 g/mol

État: huile incolore

R_f : 0,38 (plaque de silice en verre, CH_2Cl_2/Et_2O 90:10)

$[\alpha]_D$: + 11,7 ($c=0,270$; $CHCl_3$) à 22 °C

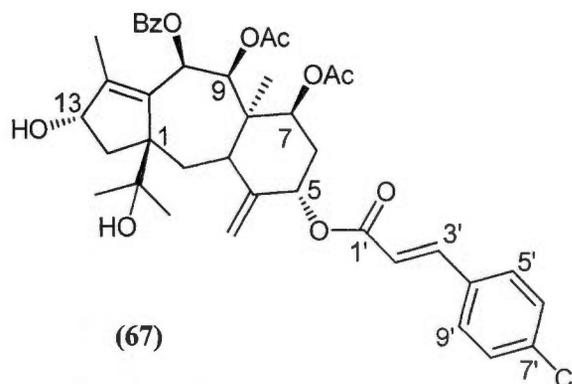
RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 0,90 (s, 3H, **Me-19**), 1,11 (s, 3H, **Me-16**), 1,26–1,34 (m, 1H, **H-14 α**), 1,37 (s, 3H, **Me-17**), 1,50 (d, $J=13,5$ Hz, 1H, **H-2 α**), 1,78 (s, 3H, 9-OCOCH₃), 1,86 (t l., $J=14,1$ Hz, 1H, **H-6 β**), 2,03 (dd, $J=14,1$ et 5,0 Hz, 1H, **H-6 α**), 2,08 (s, 3H, **Me-18**), 2,11 (s, 3H, 7-OCOCH₃), 2,38 (s, 3H, **13-OCinnamoyl, H-10'**), 2,45 (dd, $J=13,5$ et 9,8 Hz, 1H, **H-2 β**), 2,61 (dd, $J=14,3$ et 7,5 Hz, 1H, **H-14 β**), 2,98 (d, $J=8,9$ Hz, 1H, **H-3**), 4,37 (s l., 1H, **H-5**), 4,80 (s, 1H, **H-20a**), 5,14 (s, 1H, **H-20b**), 5,56 (s l., 1H, **H-13**), 5,72 (dd, $J=11,2$ et 5,0 Hz, 1H, **H-7**), 6,08 (s l., 1H, **H-9**), 6,37 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyl, H-2'**), 6,69 (d l., $J=9,0$ Hz, 1H, **H-10**), 7,20 (d, $J=7,9$ Hz, 2H, **13-OCinnamoyl, H-6'** et **H-8'**), 7,43 (dd, $J=7,8$ Hz, 2H, **13-OCinnamoyl, H5'** et **H-9'**), 7,45 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,57 (t,

$J=7,5$ Hz, 1H, **10-OBz, *p*-Ph**), 7,65 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-3'**), 7,89 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, *o*-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 12,18 (C18), 12,88 (C19), 20,79 (9-OCOCH₃), 21,43 (7-OCOCH₃), 21,48 (13-OCinnamoyle, C-10'), 24,80 (C17), 26,98 (C16), 29,27 (C2), 35,84 (C6), 37,61 (C3), 44,39 (C14), 45,15 (C8), 63,57 (C1), 69,72 (C7), 70,31 (C10), 72,62 (C5), 75,59 (C9), 75,60 (C15), 79,85 (C13), 111,54 (C20), 116,75 (13-OCinnamoyle, C2'), 128,18 (2C, 13-OCinnamoyle, C5' et C9'), 128,77 (10-OBz, *p*-Ph), 129,22 (2C, 10-OBz, *o*-Ph), 129,48 (2C, 10-OBz, *m*-Ph), 129,62 (2C, 13-OCinnamoyle, C6' et C8'), 131,51 (13-OCinnamoyle, C4'), 133,30 (10-OBz, *i*-Ph), 136,30 (C11), 140,86 (13-OCinnamoyle, C7'), 145,28 (13-OCinnamoyle, C3'), 147,40 (C12), 150,43 (C4), 164,16 (10-OBz, C=O), 166,91 (13-OCinnamoyle, C1'), 169,90* (9- ou 7-OCOCH₃), 169,96* (7- ou 9-OCOCH₃).

3.4.6 Synthèse des dérivés 5- et 13-*p*-chlorocinnamoyl brevifoliol

Dans un ballon de 50 mL sec et purgé à l'azote, 14,5 mg d'acide *p*-chlorocinnamique (0,08 mmol, 1,1 éq) et 40,0 mg de brevifoliol (0,07 mmol, 1,0 éq) ont été dissouts dans 10,0 mL de CH₂Cl₂. Ensuite 23,8 mg de DCC (0,12 mmol, 1,6 éq) et 4,4 mg de DMAP (0,04 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. Le mélange a été agité à la température de la pièce pendant 72 h. Après agitation, le précipité blanc de DCU formé a été suspendu à l'aide d'un bain ultrason puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé, après évaporation, a été recristallisé dans l'éther. Ensuite, le solide obtenu a été filtré sous vide et rincé avec de l'éther froid. Le filtrat contenant les produits de réaction a été concentré au rotavapeur puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (20 g) avec comme système d'éluant le mélange hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (75:20:05). Les fractions contenant les produits mono-estérifiés ont été regroupées et le brevifoliol récupéré (12 mg) est conservé pour d'autres réactions. Après une recherche minutieuse du système de solvant, le mélange CH₂Cl₂/tBuOMe (95:05) a été utilisé pour finaliser la purification de l'extrait. Cette dernière étape a permis d'obtenir les deux dérivés mono-estérifiés avec un rendement global de 48 %. Le composé estérifié en position C-5 (**67**) a été obtenu avec un rendement de 35 % (18,5 mg) et le dérivé estérifié en position C-13 (**68**) avec un rendement de 13 % (6,1 mg).



F.M.: $C_{40}H_{45}ClO_{10}$

M: 721,23 g/mol

État: solide poudreux blanc, $pf=125-130\text{ }^{\circ}C$

R_f : 0,39 (plaque de silice en verre, CH_2Cl_2/Et_2O 90:10)

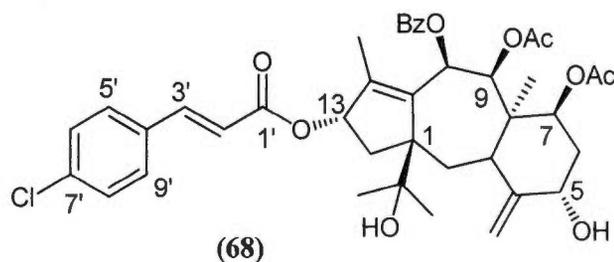
$[\alpha]_D$: $-50,9$ ($c=1,30$; $CHCl_3$) à $22\text{ }^{\circ}C$

IR-ATR: Poudre; 3556 (O-H), 2928 (Csp^3-H), 1717 (C=O), 1638, 1591, 1492, 1373, 1260, 1171, 1089, 1030, 982, 905, 823 et 711 cm^{-1} .

RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 0,94 (s, 3H, **Me-19**), 1,02 (s, 3H, **Me-16**), 1,22 (dd, $J=14,0$ et $7,2$ Hz, 1H, **H-14 α**), 1,33 (s, 3H, **Me-17**), 1,48 (d, $J=14,0$ Hz, 1H, **H-2 α**), 1,77 (s, 3H, **9-OCOCH $_3$**), 1,96 (td, $J=14,6$ et $3,8$ Hz, 1H, **H6 α**), 2,02-2,05 (m, 4H, **H6 β**), 2,08 (s, 3H, **7-OCOCH $_3$**), 2,17 (s, 3H, **Me-18**),

2,43 (dd, $J=14,0$ et $7,5$ Hz, 2H, **H-2 β** et **H14 β**), 2,86 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, **H-3**), 4,51 (t, $J=7,2$ Hz, 1H, **H-13**), 4,94 (s, 1H, **H-20a**), 5,33 (s, 1H, **H-20b**), 5,54 (s l., 1H, **H-5**), 5,67 (dd, $J=11,1$ et $5,2$ Hz, 1H, **H-7**), 6,06 (d l., $J=10,0$ Hz, 1H, **H-9**), 6,48 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-2'**), 6,68 (d, $J=10,0$ Hz, 1H, **H-10**), 7,36 (d, $J=8,3$ Hz, 2H, **5-OCinnamoyle, H-6' et H-8'**), 7,44 (t, $J=7,6$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,48 (d, $J=8,3$ Hz, 2H, **5-OCinnamoyle, H-5' et H-9'**), 7,56 (t, $J=7,6$ Hz, 1H, **10-OBz, p-Ph**), 7,62 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-3'**), 7,88 (d, $J=7,6$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 11,92 (**C18**), 12,97 (**C19**), 20,77 (**7-OCOCH $_3$**), 21,40 (**9-OCOCH $_3$**), 24,79 (**C17**), 27,03 (**C16**), 29,18 (**C2**), 33,94 (**C6**), 39,10 (**C3**), 44,79 (**C8**), 47,41 (**C14**), 63,10 (**C1**), 69,70 (**C7**), 70,67 (**C10**), 74,29 (**C13**), 75,47 (**C15**), 77,09 (**2C, C5 et C9**), 114,19 (**C20**), 118,92 (**5-OCinnamoyle, C2'**), 128,77 (**10-OBz, p-Ph**), 129,18 (**2C, 10-OBz, o-Ph**), 129,14 (**2C, 5-OCinnamoyle, C6' et C8'**), 129,29 (**2C, 5-OCinnamoyle, C5' et C9'**), 129,46 (**2C, 10-OBz, m-Ph**), 131,23 (**5-OCinnamoyle, C4'**), 132,95 (**5-OCinnamoyle, C7'**), 133,30 (**10-OBz, i-Ph**), 134,25 (**C11**), 143,66 (**5-OCinnamoyle, C3'**), 145,47 (**C12**), 151,02 (**C4**), 164,16 (**10-OBz, C=O**), 165,54 (**5-OCinnamoyle, C1'**), 169,90* (**7- ou 9-OCOCH $_3$**), 169,94* (**9- ou 7-OCOCH $_3$**).



F.M.: C₄₀H₄₅ClO₁₀

M: 746,84 g/mol

État: huile incolore

R_f: 0,40 (plaque de silice en verre, CH₂Cl₂/Et₂O 90:10)

[α]_D: + 8,8 (c=0,23 ; CHCl₃) à 22 °C

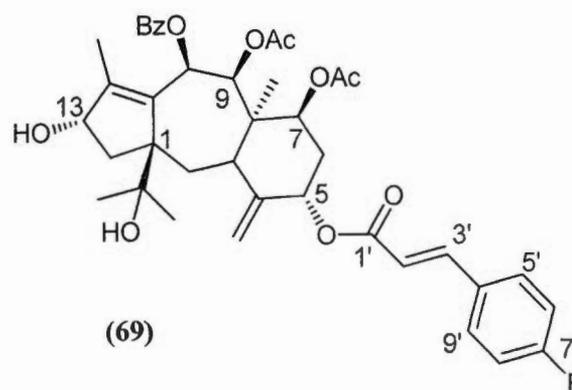
RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 0,90 (s, 3H, **Me-19**), 1,11 (s, 3H, **Me-16**), 1,26-1,34 (m, 1H, **H-14α**), 1,37 (s, 3H, **Me-17**), 1,50 (d, *J*=14,1 Hz, 1H, **H-2α**), 1,78 (s, 3H, 9-OCO**CH₃**), 1,86 (t l., *J*=14,2 Hz, 1H, **H-6β**), 2,02 (dd, *J*=14,2 et 3,5 Hz, 1H, **H-6α**), 2,11 (s, 3H, 7-OCO**CH₃**), 2,08 (s, 3H, **Me-18**), 2,46 (dd, *J*=14,1 et 9,7 Hz, 1H, **H-2β**), 2,61 (dd, *J*=14,8 et 7,7 Hz, 1H, **H-14β**), 2,97 (d, *J*=9,1 Hz, 1H, **H-3**), 5,57 (s l., 1H, **H-13**), 4,81 (s, 1H, **H-20a**), 5,14 (s, 1H, **H-20b**), 4,38 (s l., 1H, **H-5**), 5,71 (dd, *J*=11,0 et 5,0 Hz, 1H, **H-7**), 6,08 (s l., 1H, **H-9**), 6,38 (d, *J*=16,0 Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-2'**), 6,69 (d l., *J*=9,1 Hz, 1H, **H-10**), 7,37 (d, *J*=6,9 Hz, 2H, **13-OCinnamoyle, H-6'** et **H-8'**), 7,47 (d, *J*=6,9 Hz, 2H, **13-OCinnamoyle, H-5'** et **H-9'**), 7,45 (t, *J*=7,5 Hz, 2H,

10-OBz, *m*-Ph), 7,62 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **13-OCinnamoyle, H-3'**), 7,57 (t, $J=7,5$ Hz, 1H, **10-OBz, *p*-Ph**), 7,89 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, *o*-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 12,17 (C18), 12,90 (C19), 20,78 (9-OCOCH₃), 21,42 (7-OCOCH₃), 24,85 (C17), 26,97 (C16), 29,25 (C2), 35,84 (C6), 37,66 (C3), 45,15 (C8), 44,32 (C14), 63,57 (C1), 69,70 (C7), 70,25 (C10), 72,65 (C5), 75,57 (2C, C9 et C15), 80,05 (C13), 132,75 (2C, 13-OCinnamoyle, C5' et C9'), 111,63 (C20), 118,47 (13-OCinnamoyle, C2'), 129,33 (2C, 13-OCinnamoyle, C6' et C8'), 136,34 (13-OCinnamoyle, C4'), 128,78 (10-OBz, *p*-Ph), 129,18 (2C, 10-OBz, *o*-Ph), 129,48 (2C, 10-OBz, *m*-Ph), 133,32 (10-OBz, *i*-Ph), 136,34 (C11), 143,78 (13-OCinnamoyle, C3'), 147,40 (C12), 136,54 (13-OCinnamoyle, C7'), 150,38 (C4), 164,29 (10-OBz, C=O), 166,45 (13-OCinnamoyle, C1'), 169,96 (2C, 7- et 9-OCOCH₃).

3.4.7 Synthèse du dérivé 5-*p*-fluorocinnamoyl brevifoliol

Dans un ballon de 10 mL sec et purgé à l'azote, 6,0 mg d'acide *p*-fluorocinnamique (0,04 mmol, 1 éq) et 20,0 mg de brevifoliol (0,04 mmol, 1 éq) ont été dissouts dans 4,0 mL de CH₂Cl₂. Ensuite 12,0 mg de DCC (0,06 mmol, 1,6 éq) et 2,2 mg de DMAP (0,02 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. L'ensemble a été agité à la température de la pièce pendant 72 h. Le suivi de la réaction a été fait par CCM dans le système hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (50:05:45). Après 72 h d'agitation, le précipité blanc de DCU formé a été suspendu à l'aide d'un bain ultrason puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé recristallisé dans l'éther. Le solide obtenu a été filtré sous vide, rincé avec de l'éther froid. Ensuite, le filtrat contenant le produit de réaction a été concentré au rotavapor, puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (10 g) avec comme système d'éluant le mélange hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (50:05:45). Les fractions contenant les produits mono-estérifiés ont été regroupées. Après une recherche minutieuse de système de solvant, le mélange CH₂Cl₂/Et₂O (95:05) a été utilisé pour finaliser la purification par chromatographie radiale (disque 2 mm). Les deux dérivés mono-estérifiés ont été obtenus avec un rendement global de 76 %. Le composé mono-estérifié en position C-13 a été obtenu avec un rendement de 9 % (2,20 mg) et le dérivé mono-estérifié en position C-5 (**69**) a été obtenu avec un rendement de 67 % (17,0 mg). Le dérivé C-13 obtenu en faible quantité n'a pu être caractérisé.



F.M.: $C_{40}H_{45}FO_{10}$

M: 704,78 g/mol

État: solide poudreux blanc, $pf=106-108\text{ }^{\circ}C$

R_f : 0,30 (plaque de silice en verre, CH_2Cl_2/Et_2O , 90:10)

$[\alpha]_D$: $-37,6$ ($c=0,44$; $CHCl_3$) à $22\text{ }^{\circ}C$

IR-ATR: Poudre; 3554 (O–H), 2925 (Csp^3-H), 1717 (C=O), 1639, 1600, 1509, 1451, 1372, 1341, 1229, 1175, 1159, 1090, 1070, 1027, 904, 833, 755 et 711 cm^{-1} .

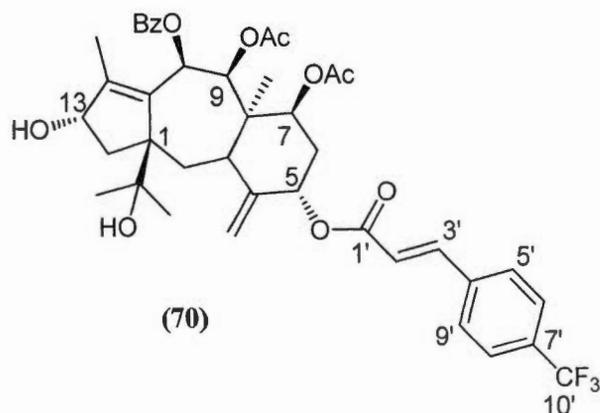
RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 0,94 (s, 3H, **Me-19**), 1,02 (s, 3H, **Me-16**) 1,22 (dd, $J=13,7$ et $7,4$ Hz, 1H, **H-14 α**), 1,33 (s, 3H, **Me-17**), 1,48 (d, $J=14,0$ Hz, 1H, **H-2 α**), 1,77 (s, 3H, 9-OCO**CH₃**), 1,96 (td, $J=11,5$ et $4,1$ Hz, 1H, **H-6 α**), 2,02-2,06 (m, 4H, **H-6 β**), 2,08 (s, 3H, 7-OCO**CH₃**), 2,17 (s, 3H, **Me-18**), 2,42 (dd, $J=14,0$ et $7,0$ Hz, 2H, **H-2 β** et **H-14 β**), 2,86 (d, $J=9,0$ Hz, 1H, **H-3**), 4,51

(t, $J=6,8$ Hz, 1H, **H-13**), 4,94 (s, 1H, **H-20a**), 5,33 (s, 1H, **H-20b**), 5,54 (s l., 1H, **H-5**), 5,67 (dd, $J=11,2$ et $5,2$ Hz, 1H, **H-7**), 6,07 (d, $J=10,4$ Hz, 1H, **H-9**), 6,43 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-2'**), 6,68 (d, $J=10,4$ Hz, 1H, **H-10**), 7,08 (t, $J=8,5$ Hz, 2H, **5-OCinnamoyle, H-6'** et **H-8'**), 7,44 (t, $J=7,8$ Hz, 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,52–7,58 (m, 3H, **5-OCinnamoyle, H-5'** et **H-9'** et **10-OBz, p-Ph**), 7,63 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, **5-OCinnamoyle, H-3'**), 7,88 (d, $J=7,8$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): δ 11,92 (**C18**), 12,97 (**C19**), 20,77 (**7-OCOCH₃**), 21,41 (**9-OCOCH₃**), 24,78 (**C17**), 27,03 (**C16**), 29,18 (**C2**), 33,96 (**C6**), 39,09 (**C3**), 44,79 (**C8**), 47,46 (**C14**), 63,11 (**C1**), 69,71 (**C7**), 70,67 (**C10**), 74,21 (**C13**), 75,48 (**C15**), 77,05 (**2C, C5** et **C9**), 114,17 (**C20**), 116,02 (d, $J=21,9$ Hz, **2C, 5-OCinnamoyle, C5'** et **C9'**), 118,03 (**5-OCinnamoyle, C2'**), 128,77 (**10-OBz, p-Ph**), 129,17 (**2C, 10-OBz, o-Ph**), 129,46 (**2C, 10-OBz, m-Ph**), 130,02 (d, $J=8,5$ Hz, **2C, 5-OCinnamoyle, C5'** et **C9'**), 130,66 (**5-OCinnamoyle, C4'**), 133,31 (**10-OBz, i-Ph**), 134,25 (**C11**), 143,86 (**5-OCinnamoyle, C3'**), 145,48 (**C12**), 151,01 (**C4**), 163,87 (d, $J=250$ Hz, **5-OCinnamoyle, C7'**), 164,16 (**10-OBz, C=O**), 165,66 (**5-OCinnamoyle, C1'**), 169,90* (**7- ou 9-OCOCH₃**), 169,96 (**9- ou 7-OCOCH₃**).

3.4.8 Synthèse du dérivé 5-*p*-trifluorométhylcinnamoyl brevifoliol

Dans un ballon de 50 mL sec et purgé à l'azote, 19,4 mg d'acide *p*-trifluorométhylcinnamique (0,09 mmol, 1,0 éq) et 50,0 mg de brevifoliol (0,09 mmol, 1,0 éq) ont été dissouts dans 10,0 mL de CH₂Cl₂. Ensuite 26,8 mg de DCC (0,13 mmol, 1,5 éq) et 6,1 mg de DMAP (0,05 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. L'ensemble a été agité à la température de la pièce pendant 52 h. Le suivi de la réaction a été fait par CCM dans le système hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (75:20:05). Après 52 h d'agitation, le précipité blanc de DCU formé a été suspendu, à l'aide d'un bain ultrason, puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé, après évaporation, recristallisé dans l'éther. Le solide obtenu a été filtré sous vide, rincé avec de l'éther froid. Ensuite, le filtrat contenant le produit de réaction a été concentré au rotavapor, puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (10 g) avec, comme système d'éluant, le mélange hexanes/CH₂Cl₂/AcOEt (75:20:05). Les fractions contenant les produits mono-estérifiés et le brevifoliol restant ont été regroupées. Après une recherche minutieuse du système de solvant, le mélange CH₂Cl₂/Et₂O (95:05) a été utilisé pour finaliser cette purification. Le composé (70) a été obtenu avec un rendement global de 30 % (19,9 mg, 0,03 mmol) et 20 mg de brevifoliol a été récupéré. Le dérivé C-13 obtenu en faible quantité n'a pu être caractérisé.



F.M. : $C_{41}H_{45}F_3O_{10}$

M : 754,79 g/mol

État : solide poudreux blanc, pf = 117 – 120 °C

R_f : 0,40 (plaque de silice en verre, CH_2Cl_2/Et_2O 90:10)

$[\alpha]_D$: - 47,7 (c = 1,07 ; $CHCl_3$) à 22 °C

IR-ATR: Poudre; 3556 (O–H), 2965 (Csp^3-H), 1717 (C=O), 1642, 1451, 1372, 1322, 1248, 1167, 1124, 1089, 1066, 1027, 904, 833, 755 et 711 cm^{-1} .

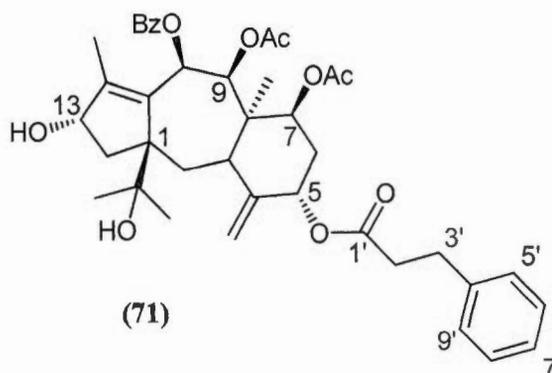
RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 0,94 (s, 3H, Me-19), 1,02 (s, 3H, Me-16), 1,22 (dd, $J=13,7$ et 7,4 Hz, 1H, H-14 α), 1,33 (s, 3H, Me-17), 1,49 (d, $J=13,8$ Hz, 1H, H-2 α), 1,77 (s, 3H, 9-OCOCH $_3$), 1,96 (td, $J=11,5$ et 4,1 Hz, 1H, H-

6 α), 2,02-2,06 (m, 1H, H-6 β), 2,08 (s, 3H, 7-OCOCH₃), 2,17 (s, 3H, Me-18), 2,41 (dd, $J=13,8$ et $7,3$ Hz, 2H, H-2 β), 2,43 (dd, $J=13,7$ et $9,5$ Hz, 2H, H-14 β), 2,88 (d, $J=8,8$ Hz, 1H, H-3), 4,53 (t, $J=6,9$ Hz, 1H, H-13), 4,95 (s, 1H, H-20a), 5,34 (s, 1H, H-20b), 5,55 (s l., 1H, H-5), 5,67 (dd, $J=11,2$ et $5,2$ Hz, 1H, H-7), 6,07 (d l., $J=10,0$ Hz, 1H, H-9), 6,59 (d, $J=16,1$ Hz, 1H, 5-OCinnamoyle, H-2'), 6,68 (d l., $J=10,0$ Hz, 1H, H-10), 7,44 (t, $J=7,5$ Hz, 2H, 10-OBz, *m*-Ph), 7,61-7,65 (m, 4H, 5-OCinnamoyle, H-5', H-9', H-6' et H-8'), 7,60 (t, $J=7,5$ Hz, 1H, 10-OBz, *p*-Ph), 7,68 (d, $J=16,1$ Hz, 1H, 5-OCinnamoyle, H-3'), 7,88 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, 10-OBz, *o*-Ph).

RMN ¹³C (CDCl₃, 600 MHz): 11,92 (C18), 12,96 (C19), 20,76 (7-OCOCH₃), 21,39 (9-OCOCH₃), 24,77 (C17), 27,01 (C16), 29,18 (C2), 33,90 (C6), 39,11 (C3), 44,77 (C8), 47,31 (C14), 63,12 (C1), 69,67 (C7), 70,65 (C10), 74,47 (C13), 75,47 (C15), 77,08 (2C, C5 et C9), 114,25 (C20), 125,80 (q, $J=3,7$ Hz, 2C, 5-OCinnamoyle, C6' et C8'), 120,97 (5-OCinnamoyle, C2'), 123,80 (q, $J=272$ Hz, 5-OCinnamoyle, C10'), 128,76 (10-OBz, *p*-Ph), 129,15 (2C, 10-OBz, *o*-Ph), 129,44 (2C, 10-OBz, *m*-Ph), 128,22 (2C, 5-OCinnamoyle, C5' et C9'), 137,89 (5-OCinnamoyle, C4'), 133,31 (10-OBz, *i*-Ph), 134,23 (C11), 143,16 (5-OCinnamoyle, C3'), 145,40 (C12), 150,99 (C4), 131,62 (q, $J=33$ Hz, 5-OCinnamoyle, C7'), 164,16 (10-OBz, C=O), 165,26 (5-OCinnamoyle, C1'), 169,90* (7- ou 9-OCOCH₃), 169,96* (9- ou 7-OCOCH₃).

3.4.9 Synthèse du dérivé 5-(3'-phénylpropanoyl) brevifoliol

Dans un ballon de 10 mL sec et purgé à l'azote, 7,0 mg d'acide hydrocinnamique (0,05 mmol, 1,1 éq) et 20,0 mg de brevifoliol (0,04 mmol, 1,0 éq) ont été dissouts dans 5,0 mL de toluène. Ensuite 12,0 mg de DCC (0,06 mmol, 1,6 éq) et 2,2 mg de DMAP (0,02 mmol, 0,5 éq) ont été ajoutés au mélange. Le mélange a été agité à la température de la pièce pendant 72 h. Le précipité blanc de DCU formé a été suspendu à l'aide d'un bain ultrason, puis filtré sous vide. Le filtrat obtenu a été concentré au rotavapeur et le solide formé recristallisé dans l'éther. Le solide obtenu a été filtré sous vide, rincé avec de l'éther froid. Ensuite, le filtrat contenant les produits de réaction a été concentré au rotavapeur, puis purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (20 g) avec, comme système d'éluant, le mélange hexanes/CH₂Cl₂/EtOH (75:20:05). Les fractions contenant les produits mono-estérifiés ont été regroupées. Après une recherche minutieuse de système de solvant, le mélange hexanes/toluène/AcOEt (35:35:30) a été utilisé pour compléter la purification par chromatographie radiale. Après la purification, 14,0 mg de dérivé mono-estérifié en position C-5 (**71**) a été obtenu avec un rendement de 57 %, également 11,5 mg du dérivé bis-estérifié et 3 mg de dérivé C-13 mono-estérifié ont été isolés. Ce dernier obtenu en faible quantité n'a pas été caractérisé.



F.M. : C₄₀H₄₈O₁₀

M : 688,80 g/mol

État : solide poudreux blanc, pf = 98 – 100 °C

R_f : 0,20 (plaque de silice en verre, CH₂Cl₂/Et₂O 90:10)

[α]_D : - 40,8 (c = 0,250 ; CHCl₃) à 22 °C

IR-ATR: Poudre; 3598 (O–H), 2927 (Csp³–H), 1729 (C=O), 1603, 1451, 1372, 1240, 1094, 1070, 1027, 904 et 711 cm⁻¹.

RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 0,91 (s, 3H, Me-19), 1,02 (s, 3H, Me-16), 1,19 (dd, J=14,2 et 7,2 Hz, 1H, H-14α), 1,34 (s, 3H, Me-17), 1,46 (d, J=14,0 Hz, 1H, H-2α), 1,76 (s, 3H, 9-OCOCH₃), 1,88 (td, J=14,4 et 4,4 Hz, 1H, H-6α), 1,92 (ddd, J=14,4; 4,4 et 2,0 Hz, 1H, H-6β), 2,07 (s, 3H, 7-OCOCH₃),

2,10 (s, 3H, **Me-18**), 2,40 (d, $J=14,0$ Hz, 1H, **H-2 β**), 2,38 (dd, $J=14,2$ et 7,2 Hz, 1H, **H-14 β**), 2,66 (Q app., $J=8,0$ Hz, 1H, **5-O-Ph-propanoyle, H-2'a**), 2,70 (Q app., $J=8,0$ Hz, 1H, **5-O-Ph-propanoyle, H-2'b**), 2,76 (d, $J=9,1$ Hz, 1H, **H-3**), 2,94 (t, $J=8,0$ Hz, 2H, **H-3'**), 4,50 (t, $J=7,1$ Hz, 1H, **H-13**), 4,92 (s, 1H, **H-20a**), 5,29 (s, 1H, **H-20b**), 5,41 (t, $J=3,0$ Hz, 1H, **H-5**), 5,60 (dd, $J=10,7$ et 5,9 Hz, 1H, **H-7**), 6,06 (d l., $J=10,5$ Hz, 1H, **H-9**), 6,65 (d, $J=10,5$ Hz, 1H, **H-10**), 7,20 (t, $J=7,6$ Hz, 1H, **5-O-Ph-propanoyle, p-H**), 7,21 (d, $J=6,9$ Hz, 2H, **5-O-Ph-propanoyle, o-H**), 7,29 (t, $J=7,2$ Hz, 2H, **5-O-Ph-propanoyle, m-H**), 7,44 (t, $J=7,5$ Hz; 2H, **10-OBz, m-Ph**), 7,56 (t, $J=7,5$; 1H, **10-OBz, p-Ph**), 7,88 (d, $J=7,5$ Hz, 2H, **10-OBz, o-Ph**).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 600 MHz): 11,84 (**C18**), 12,93 (**C19**), 20,77 (**7-OCOCH $_3$**), 21,39 (**9-OCOCH $_3$**), 24,78 (**C17**), 27,02 (**C16**), 29,20 (**C2**), 33,95 (**C6**), 35,69 (**5-O-Ph-propanoyle, C2'**), 20,69 (**5-O-Ph-propanoyle, C3'**), 38,96 (**C3**), 44,74 (**C8**), 47,03 (**C14**), 62,90 (**C1**), 69,66 (**C7**), 70,64 (**C10**), 74,08 (**C13**), 75,50 (**C15**), 76,87 (**C9**), 77,11 (**C5**), 114,20 (**C20**), 126,12 (**5-O-Ph-propanoyle, C7'**), 126,36 (**2C, 5-O-Ph-propanoyle, C5' et C9'**), 128,33 (**2C, 5-O-Ph-propanoyle, C6' et C8'**), 128,45 (**10-OBz, p-Ph**), 128,99 (**5-O-Ph-propanoyle, C6'**), 129,20 (**2C, 10-OBz, o-Ph**), 129,45 (**2C, 10-OBz, m-Ph**), 133,28 (**10-OBz, i-Ph**), 134,11 (**C11**), 140,64 (**5-O-Ph-propanoyle, C4'**), 145,37 (**C12**), 150,97 (**C4**), 164,13 (**10-OBz, C=O**), 171,99 (**5-O-Ph-propanoyle, C1'**), 169,84* (**7- ou 9-OCOCH $_3$**), 169,90* (**9- ou 7-OCOCH $_3$**).

RÉFÉRENCES ET NOTES

1. L. Reddy, B. Odhav, and K. D. Bhoola, *Pharmacol. Ther.*, 99, **2003**, 1-13.
2. LE CANCER, http://www.er.uqam.ca/nobel/d13451/cancer_a_z.htm, consulté le 18/06/2012.
3. CELLULE (BIOLOGIE), http://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_%28biologie%29, consulté le 10/06/2012.
4. Membrane Plasmique, http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_plasmique, consulté le **10/06/2012**.
5. D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell.*, 100, **2000**, 57-70.
6. J. M. Bishop, *The FASEB Journal*, 10, **1996**, 362-364.
7. D. Hanahan and R. A. Weinberg, *Cell.*, 144, **2011**, 646-674.
8. J. Robert, *Bull. Cancer*, hors série, **2006**, 5-16.
9. N. Cheng, A. Chytil, Y. Shyr, A. Joly and H. L. Moses, *Mol. Cancer Res.*, 6, **2008**, 1521-1533.
10. A. Deshpande, P. Sicinsky and P. W. Hinds, *Oncogene*, 24, **2005**, 2909-2915.
11. J. M. Adams and S. Cory, *Oncogene*, 26, **2007**, 1324-1334.
12. S. C. Lowe, E. Cepero and G. Evan, *Nature*, 432, **2004**, 307-315.

13. C. J. Sherr and F. McCormick, *Cancer Cell*, 2, **2002**, 103-112.
14. Varna Mariana et Artenie Vlad, La senescence cellulaire, TOM VIII, **2007**, 81-86.
15. P. F. Halloran et A. Melk, SÉNESCENCE RÉNALE, SÉNESCENCE CELLULAIRE ET LEUR RÔLE EN NÉPHROLOGIE ET TRANSPLANTATION, *Flammarion médecine-sciences*, **2001**, 249-258.
16. V. Baeriswyl and G. Christofori, *Semin. Cancer Biol.*, 19, **2009**, 329-337.
17. G. Berx and F. van Roy, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1, **2009**, a003129.
18. G. Pandey, *J. Pharm. Res.*, 2, **2009**, 1799-1803.
19. Dr Meunier, La Place de la chirurgie dans le traitement du cancer, <http://facmed.univ-rennes1.fr/resped//s/cancero/...> Mise à jour 25/02/2002, consulté le 19/06/2012.
20. www.cancer.ca/canada-wide/treat-ment/radiation.aspx, Radiothérapie, consulté le 20/06/2012
21. B. Sangro, M. Herraiz and J. Prieto, *Intl. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, **2003**, 135-148.
22. C. G. Ferreira, C. Tolis and G. giaccone, *Ann. Oncol.*, 10, **1999**, 1011-1021.
23. R. G. Bristow, S. Benchimol and R. P. Hill, *Radiother. Oncol.*, 40, **1996**, 197-223.
24. G. W. Xu, Z. T. Sun, K. Forrester, X. W. Wang, J. Coursen and C. C. Harris, *Hepatology*, 24, **1996**, 1264-1268.

25. H. Y. Lam, S. K. Yeap, M. Rasoli, A. R. Omar, K. Yusoff, A. A. Suraini and N. B. Alitheen, *J. Biomed. Biotech.*, 2011, **2011**, 1-13.
26. R. Singh and A. Wallecha, *Human Vaccines*, 7, **2011**, 497-505.
27. I. Mellman, G. Coukos and G. Dranoff, *Nature*, 480, **2011**, 480-489.
28. J. Gray and A. Chiapponi, *Therapeutic delivery*, 2, **2011**, 133-136.
29. M. M. Seavey, P. C. Maciag, N. Al-Rawi, D. Sewell and Y. Paterson, *J. Immunol.*, 182, **2009**, 5537-5546.
30. T. Hegedus, L. Orfi, A. Saprodi, A. Varadi, B. Sarkadi and G. Keri, *Biochim. Biophys. Acta*, 1587, **2002**, 318-25.
31. M. M. Gottesman, *Cancer Gene Ther.*, 10, **2003**, 501-508.
32. V. T. DeVita, Jr. and E. Chu, *Cancer Res.*, 68, **2008**, 8643-8653.
33. H. Gutmann and J. Drewe, *Journal Suisse de pharmacie*, **2002**, 666-668
34. V. B. Junyaprasert, N. Soonthornchareonnon, S. Thongpraditchote, T. Murakami and M. Takamo, *Phytother. Res.*, 20, **2006**, 79-81
35. T. Terao, E. Hisanaga, Y. Sai, I. Tamai, A. Tsuji, *J. Pharm. Pharmacol.*, 48, **1996**, 1083-1089
36. F. Guéritte et T. Sévenet, *Biofutur*, 276, **2007**, 35-38.
37. D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 70, **2007**, 461-477.

38. A. L. Harvey, *Drug Discov. Today*, 13, **2008**, 894-901.
39. P. Mangeney, R. Z. Andriamialisoa, J. Y. Lallemand, N. Langlois, Y. Langlois and P. Potier, *Tetrahedron*, 35, **1979**, 2175-2179.
40. T. Amna, S. C. Puri, V. Verma, J. P. Sharma, R. K. Khajuria, J. Musarrat, M. Spitteller and G. N. Qazi, *Can. J. Microbiol.*, 52, **2006**, 189-196.
41. M. E. Wall and M. C. Wani, *J. Ethnopharmacol.*, 51, **1996**, 239-254
42. M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook and Keith H. Palmer, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, **1966**, 3888-3890.
43. S. Nobili, D. Lippi, E. Witort, M. Donnini, L. Bausi, E. Mini and S. Capaccioli, *Pharmacol. Res.*, 59, **2009**, 365-378.
44. A. L. Demain and P. Vaishnav, *Microbial Biotechnol.*, 4, **2011**, 687-699
45. C. Bailly, *Biochem. Pharmacol.*, 77, **2009**, 1447-1457
46. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon and A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, **1971**, 2325-2327.
47. E. L. M. van Rozendaal, G. P. Lelyveld, T. A. van Beek, *Phytochemistry*, 53, **2000**, 383-389
48. U. Heinig and S. Jennewein, *African Journal of Biotechnology*, 8, **2009**, 1370-1385.
49. J. Douros and M. Suffness, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1, **1978**, 91-100.

50. G. M. Cragg, S. A. Schepartz, M. Suffness and M. R. Graver, *J. Nat. Prod.*, **56**, **1993**, 1657-1668
51. N. H. Oberlies and D. J. Kroll, *J. Nat. Prod.*, **67**, **2004**, 129-135
52. P. Schiff, J. Fant and S. B. Horwitz, *Nature*, **277**, **1979**, 665-667
53. S. J. Danishefsky, J. J. Masters, W. B. Young, J. T. Link, L. B. Snyder, T. V. Magee, D. K. Jung, R. C. A. Isaacs, W. G. Bornmann, C.C.A. Alaimo, C.A. Coburn and M. J. Di Grandi, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, **1996**, 2843-2859
54. R. A. Holton, H. B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. L. Tao, P. Vu, S. H. Tang, P. S. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile and J. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, **1994a**, 1599-1600
55. R. A. Holton, C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. L. Tao, P. Vu, S. H. Tang, P. S. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gentile and J. H. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, **1994b**, 1597-1598
56. K. C. Nicolaou, Z. Yang, J. J. Liu, H. Ueno, P. G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Claiborne, J. Renaud, E. A. Couladouros, K. Paulvannan and E. J. Sorensen, *Nature*, **367**, **1994**, 630-634
57. S. Prévost, S. Gauthier, M. C. C. de Andrade, C. Mordant, A. R. Touati, P. Lesot, P. Savignac, T. Ayad, P. Phasavath, V. Ratovelomanana-Vidal and J-P Genêt, *Tet. Asymm.*, **21**, **2010**, 1436-1446

58. T. Mandai, A. Kuroda, H. Okumoto, K. Nakanishi, K. Mikuni, K-I Hara and K-Z Hara, *Tet. Lett.*, 41, **2000**, 243-246
59. Seok-Chan Kim and Hyon-Kyong Kim, *Bull. Korean Chem., Soc.*, 21, **2000**, 1047-1048
60. E. Baloglu and D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.*, 62, **1999**, 1068-1071
61. R. N. Saicic, R. Matovic and Z. Cekovic, *J. Serb. Chem. Soc.*, 64, **1999**, 497-503
62. C. Gennari, M. Carcano, M. Donghi, N. Mongelli, E. Vanotti and A. Vulpetti, *J. Org. Chem.*, 62, **1997**, 4746-4755
63. A. Commerçon, D. Bézard, F. Bernard and J. D. Bourzat, *Tet. Lett.*, 33, **1992**, 5185-5188
64. P. H. G. Wiegerinck, L. Fluks, J. B. Hammink, S. J. E. Mulders, F. M. H. de Groot, H. L. M. van Rozendaal and H. W. Scheeren, *J. Org. Chem.*, 61, **1996**, 7092-7100
65. L. Barboni, A. Datta, D. Dutta, G. I. Georg, D. G. Vander Velde, R. H. Himes, M. Wang and J. P. Snyder, *J. Org. Chem.*, 66, **2001**, 3321-3329
66. F. Balza, S. Tachibana, H. Barrios and G. H. Neil Towers, *Phytochemistry*, 30, **1991**, 1613-1614
67. A. CHU, M. FURLAN, L. B. DAVIN, J. Zajicek, G. H. Niel Towers, C. M. Soucy Breau, S. J. Rettig, R. Croteau and N. G. Lewis, *phytochemistry*, 36, **1994**, 975-985
68. S. P. A. Khanuja, T. R. A. Santha, Kumar Garg A., Misra, R. K., Chattopadhyay, S. K., Srivatra, S., Negi A. S. U.S. Patent 20040127561 A1, **2002**

69. G. I. Georg, Z. S. Cheruvallath, D. V. Velde, Q-M. Ye and L. A. Mitscher, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3, **1993**, 1349-1350
70. J-I. Kobayashi, A. Ogiwara, H. Hosoyame, H. Shigemori, N. Yoshida, T. Sasaki, Y. Li, S. Iwasaki, M. Naito and T. Tsuruo, *Tet.*, 50, **1994**, 7401-7416
71. S. Tremblay, C. Soucy, N. Towers, P. J. Gumnig and L. Breau, *J. Nat. Prod.*, 67, **2004**, 838-845
72. S. K. Chattopadhyay, S. Tripathi, M. P. Darokar, U. Faridi, B. Sisodia, S. Negi, J. K. Kumar, S. P. S. Khanuja, *Eur. J. Med. Chem.*, 43, **2008**, 1499-1505
73. Yu Zhao, Na Guo, Li-Guang Lou, Yu-Wen Cong, Li-Yan Peng and Qin-Shi Zhao, *Bioorg. Med. Chem.*, 16, **2008**, 4860-4871
74. C. A. Plouzek, R. Ciolino, R. Clarke, G. C. Yeh, *Eur. J. Cancer*, 35, **1999**, 1541-1545
75. S. Deferme, A. Kamuhabwa, C. Nshimo, P. de Witte, P. Augustijns, *Phytother. Res.*, 17, **2003**, 459-464
76. S. Kitagawa, T. Nabekura, S. Kamiyama, *J. Pharm. Pharmacol.*, 56, **2004**, 1001-1005
77. T. Konishi, H. Hatsugai, K. Aizawa, T. Inakuma, S. Sakuda, H. Nagasawa, M. Shimizu, *Brit. J. Pharmacol.*, 143, **2004**, 379-387
78. B. Larrivé and D. A. Averill, *Cancer Chemther. Pharmacol.*, 45, **2000**, 219-230
79. D. A. Bates and W. J. Mackillop, *Cancer res.*, 46, **1986**, 5477-5481

80. Tests réalisés par Ahmed Bettaieb au laboratoire du Professeur Diana Averill, UQAM, Département des Sciences-Biologiques
81. V. ling and L. H. Thompson, *J. Cell. Physiol.*, 83, 1974, 103-116
82. Limtrakul P, Anuchapreeda S, Buddhasukh D., *BMC Cancer*, 4, 2004, 13.
83. S. Lord-Fontaine, D.A. Averill-Bates., *Free Radic Biol Med.*, 32, 2002, 752-65.
84. J. Pouchert, *The Aldrich Library of NMR Spectra*, Edition II, Volume 2, 1983, pp 116, 180. Aldrich Chemical Company INC.