



HAL
open science

Pharmacochimie des auronnes pour la modulation d'enzymes

Romain Haudecoeur

► **To cite this version:**

Romain Haudecoeur. Pharmacochimie des auronnes pour la modulation d'enzymes. Autre. Université de Grenoble; Université de Genève (Genève, Suisse). Faculté des sciences, 2011. Français. NNT : 2011GREN063 . tel-00828395

HAL Id: tel-00828395

<https://theses.hal.science/tel-00828395>

Submitted on 31 May 2013

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

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

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

Pour obtenir les grades de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE et
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GENÈVE

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Romain HAUDECOEUR

Thèse dirigée par **Ahcène BOUMENDJEL**,
co-encadrée par **Catherine BELLE** et
co-dirigée par **Pierre-Alain CARRUPT**

préparée au sein du **DPM** (Grenoble) et du **LCT** (Genève)
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

**Pharmacochimie des auronés
pour la modulation d'enzymes**

Thèse soutenue publiquement le **30 novembre 2011**,
devant le jury composé de :

Dr. Marius RÉGLIER

Directeur de recherche, Université Paul Cézanne, *Président du jury*

Pr. Hervé GALONS

Professeur, Université Paris-Descartes, *Rapporteur*

Pr. Patrick DALLEMAGNE

Professeur, Université de Caen Basse-Normandie, *Rapporteur*

Dr. Emerson FERREIRA-QUEIROZ

Maître d'enseignement et de recherche, Université de Genève, *Examineur*

Pr. Ahcène BOUMENDJEL

Professeur, Université Joseph Fourier, *Directeur de thèse*

Pr. Pierre-Alain CARRUPT

Professeur, Université de Genève, *Co-directeur de thèse*

Dr. Catherine BELLE

Directeur de recherche, Université Joseph Fourier, *Co-encadrante*



In memoriam *Jacky Schmid*.

J'aimerais via ces quelques lignes remercier les personnes qui ont contribué au déroulement, à l'élaboration et à l'évaluation de cette thèse.

Je remercie donc en premier lieu le Pr. Ahcène Boumendjel, pour sa bonne humeur, sa disponibilité, pour avoir été présent en me laissant souvent l'initiative, pour m'avoir permis d'apprendre en jouant son rôle d'encadrant à merveille. Je remercie également le Pr. Pierre-Alain Carrupt pour son accueil au sein du LCT à Genève, et le Dr. Catherine Belle pour avoir participé à mon encadrement, ainsi que pour son pilotage avisé du projet ANR.

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail (Dr. Marius Réglier, Dr. Emerson Ferreira-Queiroz) et tout particulièrement les rapporteurs (Pr. Hervé Galons et Pr. Patrick Dallemagne).

Je remercie les partenaires des projets auxquels j'ai été associé, notamment les biologistes de l'INSERM à Paris (Pr. Jean-Michel Pawlotsky et Dr. Abdelhakim Ahmed-Belkacem), du laboratoire ISM2 à Marseille (Pr. Marius Réglier et Carole Dubois), ou de l'Université de Padoue (Pr. Luigi Bubacco), ainsi que les chimistes théoriciens et inorganiciens du DCM (Drs. Catherine Belle, Hélène Jamet, Maylis Orio, Constance Bochot).

Je remercie les membres du laboratoire, en particulier ceux avec qui j'ai travaillé directement (Wei Yi, Antoine Fortuné, Madeleine Blanc, Chantal Beney, Samir Yahiaoui). Je remercie également les personnes qui m'ont conseillé et aidé au DPM (Yung-Sing Wong, Florence Souard, Marine Peuchmaur, Basile Peres) et au LCT (Elisabeth Favre, Antoine Daina). Je remercie le clan des « joueurs » du DPM, dont plusieurs membres sont partis au fil de ces trois ans, pour tous les bons moments passés en leur compagnie (Jean-Baptiste Véron, Antoine Bussière, Antoine Fortuné, Bruno Maurin), ainsi que les autres doctorants et post-docs du laboratoire, en mercato permanent (Estelle Genoux, Olivier Jackowski, Benjamin Boucherle, Sophie Plé, Stéphane Pautus, Louis Zimmermann, Mariam Traoré, Brice-Loïc Renard, Simon Bonte, Mourad Bouhedja).

Je remercie mes parents et mes beaux-parents, sans le soutien affectif, moral et financier desquels il ne m'aurait pas été possible d'entreprendre et de mener à bien ce projet.

Je souhaite leur dédier la réalisation de ce travail.

Je remercie enfin Gaëlle et Antoine pour leur soutien constant, leur réconfort, leur affection, et tellement plus.

GLOSSAIRE

ABC	ATP-binding cassette
AChE	Acétylcholinestérase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Advanced glycation end-products
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ALR2	Aldol réductase 2
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Breast cancer resistance protein
BHA	Hydroxyanisole butylé
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDK	Cyclin-dependant kinase
CoA	Coenzyme A
COSY	Correlation spectroscopy
DME	Diméthoxyéthane
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Diamine oxydase
DOPA	3,4-Dihydroxyphénylalanine
DPPH	Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DTTA	Acide <i>O,O'</i> -di- <i>p</i> -toluoyltartrique
ER	Estrogen receptor
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique
HOPNO	Motif 2-hydroxypyridine- <i>N</i> -oxyde
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum correlation spectroscopy
HMTA	Hexaméthylènetétramine
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IFN- α	Interféron α

I.T.	Index thérapeutique
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
<i>m</i> -CPBA	Acide <i>meta</i> -chloroperbenzoïque
MDR	Multi-drug resistance
MSH	Melanocyte-stimulating hormone
NBD2	Nucleotide binding domain 2
NMO	<i>N</i> -méthylmorpholine <i>N</i> -oxyde
NQO1	NAD(P)H deshydrogénase (quinone) 1
NS5B	Non-structural protein 5B
OF	Oleoyl formononetin
PCC	Pyridinium chlorochromate
PEG	Polyéthylène glycol
Pgp	Glycoprotéine P
PTT	Tribromure de triméthylphénylammonium
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
RMN (ou NMR)	Résonance magnétique nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RX	Rayons X
SphK	Sphingosine kinase
TBATB	Tribromure de tétrabutylammonium
TFA	Acide trifluoroacétique
TFAA	Anhydride trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TMBC	2,4,2',4'-Tétrahydroxy-3-(3-méthyl-2-butényl)-chalcone
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRP1	Tyrosinase-related protein 1
TRP2	Tyrosinase-related protein 2
UHP	Adduit urée – peroxyde d'hydrogène
UV	Ultraviolet
VHA	Virus de l'hépatite A
VHB	Virus de l'hépatite B
VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XRE	Xenobiotic response element

SOMMAIRE

Partie 1. Introduction générale	27
Partie 2. Introduction bibliographique	31
CHAPITRE 1. Les aurones dans le règne végétal.....	33
1.1 Les aurones parmi les flavonoïdes.....	33
1.2 Occurrences naturelles et fonctions des aurones	34
1.2.1 Distribution générale	34
1.2.2 Chez les Astéracées, Plantaginacées, Gesnériacées et d'autres Dicotylédones (notamment comme pigments des fleurs).....	34
1.2.3 Chez les Légumineuses, Anacardiées et Rhamnacées (notamment comme protecteurs contre le pourrissement du duramen).....	35
1.2.4 Chez les Légumineuses et Cactacées (notamment comme phytoalexines)	37
1.2.5 Chez les Cypéracées (notamment comme anti-appétants contre les insectes)	38
1.2.6 Chez les Bryophytes et Ptéridophytes	38
1.2.7 Chez d'autres familles	39
1.3 Biosynthèse des aurones.....	41
1.3.1 Voie de biosynthèse « PPO » de l'auréusidine et dérivés	41
1.3.2 Voie de biosynthèse « PRX » de l'hispidol.....	42
1.4 Synthèses chimiques des aurones.....	43
1.4.1 Introduction	43
1.4.2 Synthèse <i>via</i> une cyclisation oxydante de 2'-hydroxychalcones.....	43
1.4.3 Synthèse <i>via</i> une cyclisation de dérivés de 1,3-diphénylprop-2-yn-1-ol catalysée par l'or(I)	44
1.4.4 Synthèse <i>via</i> la condensation d'un benzaldéhyde sur un dérivé de benzofuran-3(2 <i>H</i>)- one	46
1.4.5 Synthèse <i>via</i> la réaction de Suzuki d'un acide phénylboronique sur un dérivé de 2- (bromométhylène)-benzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	47

CHAPITRE 2. Les aurones en chimie médicinale	49
2.1 Modulation de l'efflux de drogues	49
2.1.1 Les transporteurs ABC et la résistance multidrogues.....	49
2.1.2 Inhibition de la glycoprotéine P (ABCB1).....	49
2.1.3 Inhibition de BCPR (ABCG2).....	50
2.2 Activités anti-tumorales.....	51
2.2.1 Inhibition de kinases CDK et SphK	51
2.2.2 Cytotoxicité pour les cellules cancéreuses	52
2.2.3 Inhibition de l'angiogénèse	53
2.3 Activités anti-oxydantes et chimioprévention du cancer.....	54
2.3.1 Induction de la quinone réductase	54
2.3.2 Capture de radicaux oxygénés.....	55
2.4 Activités antimicrobiennes	56
2.4.1 Activités antiparasitaires	56
2.4.2 Activités antibactériennes et antifongiques	57
2.5 Activités antihormonales	58
2.6 Activités anti-inflammatoires	59
2.7 Diagnostic et traitement de la maladie d'Alzheimer	60
2.8 Activités antidiabétiques et anti-obésité.....	62
2.9 Eléments structuraux déterminants, un « couteau suisse » thérapeutique ?	63
Partie 3. Inhibition de la polymérase du VHC par la famille des aurones	65
CHAPITRE 1. L'hépatite C et son virus	67
1.1 L'hépatite C.....	67
1.1.1 Découverte.....	67
1.1.2 Epidémiologie générale	68
1.1.3 Symptômes et évolutions de la maladie	70
1.1.4 Co-infections et facteurs aggravants	70
1.2 Le virus et les cibles thérapeutiques associées	71
1.2.1 Description génomique et cycle de vie.....	71
1.2.2 Cibles thérapeutiques : des inhibiteurs aux traitements.....	73

1.3	La polymérase NS5B et ses inhibiteurs.....	75
1.3.1	Structure de l'enzyme et inhibiteurs nucléosidiques.....	75
1.3.2	Inhibiteurs du site allostérique « Palm I ».....	77
1.3.3	Inhibiteurs du site allostérique « Palm II/III ».....	79
1.3.4	Inhibiteurs du site allostérique « Thumb I ».....	79
1.3.5	Inhibiteurs du site allostérique « Thumb II ».....	81
CHAPITRE 2. Synthèse des aurones inhibitrices		84
2.1	Conception.....	84
2.2	Synthèse des précurseurs d'aurone.....	84
2.2.1	Synthèse de la 6-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (2a) et de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (2b).....	85
2.2.2	Synthèse de la 4-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (5a) et de la 5-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (5b)	86
2.2.3	Synthèse de la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (7a) et de la 4,6-dibenzyloxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (7b).....	87
2.2.4	Synthèse de la 4,6-difluorobenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (9) et de la 4-fluorobenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one (11).....	87
2.2.5	Synthèse du 4-cyclohexylbenzaldéhyde (13), du 4- <i>N</i> -méthyl-pipérazinylbenzaldéhyde (14) et du benzimidazole-5-carboxaldéhyde (16).....	88
2.3	Synthèse des aurones.....	89
2.3.1	Synthèse des aurones hydroxylées portant au maximum un groupement phénol par cycle.....	89
2.3.2	Synthèse des aurones polyméthoxylées.....	90
2.3.3	Synthèse des aurones polyhydroxylées	91
2.3.4	Synthèse des aurones hydrophobes et fluorées.....	93
2.3.5	Synthèse des aurones B-hétérocycliques.....	93
CHAPITRE 3. Évaluations biologiques et éléments de relation structure-activité		95
3.1	Procédé d'évaluation biologique des aurones	95
3.2	Résultats <i>in vitro</i> et relations structure-activité	95
3.2.1	Première génération d'inhibiteurs : relation structure-activité préliminaire à partir de l'auréusidine	95
3.2.2	Deuxième génération d'inhibiteurs : affinement et introduction de motifs méthoxylés et fluorés	96
3.2.3	Troisième génération d'inhibiteurs : exploration de la piste hydrophobe en position 4'	98

3.2.4	Quatrième génération d'inhibiteurs : optimisation du cycle B et dérivés hétérocycliques	99
3.3	Résultats préliminaires sur cellules et cytotoxicité.....	100
CHAPITRE 4. Étude des interactions aurones – NS5B		101
4.1	Étude par mutagenèse dirigée.....	101
4.2	Étude par docking moléculaire.....	102
4.2.1	Introduction et principe général.....	102
4.2.2	Étude de la géométrie générale des aurones dans le site « Thumb I » et de l'ancrage des cycles A et C	103
4.2.3	Étude des interactions particulières du cycle B des aurones avec le site « Thumb I »	105
4.2.4	Étude de l'apport d'un noyau B alternatif hétérocyclique.....	107
4.2.5	Prédiction de l'activité d'aurones B-hétérocycliques.....	109
4.3	Éléments pharmacophoriques importants.....	111
CHAPITRE 5. Conclusion et perspectives.....		113
Partie 4. Modulation de la tyrosinase par les aurones et dérivés hybrides.....		115
CHAPITRE 1. La tyrosinase et les pathologies associées		117
1.1	Processus biologiques impliquant la tyrosinase	117
1.1.1	Mélanogénèse.....	117
1.1.2	Biosynthèse de la neuromélanine	120
1.2	Désordres associés et ciblage de la tyrosinase.....	121
1.2.1	Hyperpigmentation.....	121
1.2.2	Maladie de Parkinson et mélanome malin.....	122
1.3	Structure et mécanisme de l'activité de la tyrosinase.....	123
1.3.1	Considérations structurales.....	123
1.3.2	Mécanisme des activités de l'enzyme et complexes modèles	125
1.4	Inhibition de la tyrosinase	128
1.4.1	Inhibiteurs historiques et de référence.....	128
1.4.2	Lipides et stéroïdes	129
1.4.3	Phénylthiourées, oxadiazoles et petites molécules synthétiques	130

1.4.4	Stilbènes, benzaldéhydes, acides cinnamiques et autres polyphénols non flavonoïdes	131
1.4.5	Flavonoïdes et dérivés	133
CHAPITRE 2. Conception et synthèse des dérivés d'aurones modulateurs.....		137
2.1	Travaux précédents et conception de nouveaux inhibiteurs	137
2.1.1	Étude d'aurones sur tyrosinase isolée et mélanocytes.....	137
2.1.2	Étude du motif 2-hydroxypyridine- <i>N</i> -oxyde	138
2.1.3	Conception des inhibiteurs de la tyrosinase	138
2.2	Synthèse des aurones.....	139
2.2.1	Synthèse des aurones polyhydroxylées	139
2.2.2	Synthèse d'une azaaurone	139
2.2.3	Structure des aurones retenues pour cette étude.....	141
2.3	Synthèse des dérivés hybrides	142
2.3.1	Stratégie de synthèse	142
2.3.2	Condensation aldolique	143
2.3.3	Protection et oxydation de la pyridine.....	144
2.3.4	Déprotection et purification.....	145
CHAPITRE 3. Évaluations biologiques et discussion.....		147
3.1	Procédé d'évaluation biologique des aurones	147
3.2	Activités <i>in vitro</i> des aurones et études cinétiques	147
3.2.1	Criblage rapide de l'activité des aurones méthoxylées.....	147
3.2.2	Aurones polyhydroxylées et activité de type substrat alternatif.....	148
3.2.3	Aurones polyhydroxylées et activation de la tyrosinase.....	151
3.2.4	Aurones inhibitrices : du motif réSORCINOL aux dérivés hybrides.....	152
3.3	Cohérence générale et hypothèse d'interaction	154
CHAPITRE 4. Études d'interaction avec les atomes de cuivre sur complexe modèle		156
4.1	Introduction	156
4.2	Étude expérimentale par techniques spectroscopiques.....	156
4.3	Étude par calculs théoriques	158
CHAPITRE 5. Conclusion et perspectives.....		159

Partie 5. Synthèse biomimétique du tramadol et séparation des énantiomères.. 161

CHAPITRE 1. Avant-propos	163
CHAPITRE 2. Le tramadol et <i>Nauclea latifolia</i>	164
2.1 Activités biologiques et constituants de <i>Nauclea latifolia</i>	164
2.1.1 L'arbuste <i>Nauclea latifolia</i> en médecine traditionnelle.....	164
2.1.2 Activités antiparasitaires et antibactériennes.....	164
2.1.3 Activités neuropharmacologiques	166
2.1.4 Activités hypoglycémiques et hypocholestérolémiques	167
2.1.5 Composés extraits de <i>Nauclea latifolia</i>	167
2.2 Utilisation et activité biologique du tramadol	169
2.3 Découverte et extraction du tramadol.....	170
CHAPITRE 3. Séparation des énantiomères du tramadol	173
3.1 Objectif et méthodes.....	173
3.2 Utilisation de l'acide mandélique	173
3.3 Utilisation de l'acide di- <i>O-p</i> -toluoyltartrique.....	174
CHAPITRE 4. Synthèse biomimétique du tramadol	176
4.1 Voies de biosynthèse des alcaloïdes et stratégie employée.....	176
4.2 Synthèse de l'intermédiaire clé	177
4.2.1 Stratégie de synthèse	177
4.2.2 Addition du lithien sur la cycloheptanone et déshydratation.....	178
4.2.3 Coupure oxydante.....	179
4.3 Synthèse de l'intermédiaire modèle simplifié	179
4.3.1 Stratégie de synthèse	179
4.3.2 Réduction des groupements carbonyles	180
4.3.3 Oxydation ménagée	180
4.4 Essais de cyclisation organocatalysée par la L-proline.....	181
4.4.1 Réaction de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert et sélectivités	181
4.4.2 Aldolisation sur l'intermédiaire 37	182
4.4.3 Essais d'aldolisation sur l'intermédiaire 33	183

4.5	Essais de cyclisation avec la diméthylamine	184
4.5.1	Du catalytique au stœchiométrique	184
4.5.2	Essais d'aldolisation sur l'intermédiaire 33	184
4.5.3	Caractérisation du tramadol au sein du brut réactionnel	186
CHAPITRE 5. Conclusion et perspectives.....		188
Partie 6. Conclusion générale.....		189
Partie 7. Partie expérimentale.....		193
CHAPITRE 1. Material and methods		195
CHAPITRE 2. Synthesis protocoles		197
2.1	Synthesis of benzofuran-3(2 <i>H</i>)-one derivatives.....	197
2.1.1	Synthesis of 6-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one.....	197
2.1.2	Synthesis of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one.....	198
2.1.3	Synthesis of 6-methoxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	198
2.1.4	Synthesis of 4,6-dimethoxy and 4,6-dibenzyloxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	199
2.1.5	Synthesis of 4-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one.....	200
2.1.6	Synthesis of 5-hydroxybenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one.....	201
2.1.7	Synthesis of 4,6-difluorobenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	203
2.1.8	Synthesis of 4-fluorobenzofuran-3(2 <i>H</i>)-one	204
2.2	Synthesis of benzaldehyde derivatives.....	205
2.3	Synthesis of aurone derivatives	206
2.3.1	Synthesis of derivatives <i>via</i> basic-mediated aldolic condensation (in methanol, 65 °C)	206
2.3.2	Synthesis of derivatives <i>via</i> basic-mediated aldolic condensation (in methanol, 25 °C)	216
2.3.3	Synthesis of derivatives <i>via</i> basic-mediated aldolic condensation (in ethanol, 80 °C)	223
2.3.4	Synthesis of derivatives <i>via</i> neutral alumina-mediated aldolic condensation	228
2.3.5	Synthesis of derivatives <i>via</i> acid-mediated aldolic condensation.....	231
2.3.6	Synthesis of derivatives <i>via</i> deprotection of methoxy analogues.....	232

2.4	Synthesis of (<i>Z</i>)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)benzofuran-3(<i>2H</i>)-one derivatives	236
2.4.1	Synthesis of (<i>Z</i>)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-6-hydroxybenzofuran-3(<i>2H</i>)-one	236
2.4.2	Synthesis of (<i>Z</i>)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4-hydroxybenzofuran-3(<i>2H</i>)-one	238
2.4.3	Synthesis of (<i>Z</i>)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(<i>2H</i>)-one.....	241
2.5	Resolution of (+/-)-tramadol using (+)-DTTA	244
2.5.1	Preparation of the free base starting from hydrochloride or DTTA salt.....	244
2.5.2	Resolution <i>via</i> the formation of diastereomers.....	244
2.5.3	Preparation of hydrochloride salt of tramadol.....	245
2.6	Synthesis of 7-oxoheptanal derivatives	245
2.6.1	Synthesis of 7-(3-methoxyphenyl)-7-oxoheptanal	245
2.6.2	Synthesis of 7-oxooctanal.....	248
2.7	Standard procedures for aldolisation/reduction trials.....	249
2.7.1	Procedure for L-proline-catalyzed intramolecular aldolisation	249
2.7.2	Synthesis of (+/-)-tramadol by dimethylamine-catalyzed intramolecular aldolisation and reduction	249
CHAPITRE 3. Molecular docking procedure.....		250
Partie 8. Bibliographie.....		251
CHAPITRE 1. Production scientifique associée à ces travaux		253
CHAPITRE 2. Données de cartographie		255
CHAPITRE 3. Notes et références.....		258

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Structure, numérotation des positions et nomenclature des cycles des aurones, flavones et chalcones.	33
Figure 2. Fleurs des espèces <i>Antirrhinum majus</i> (a), <i>Cosmos sulfureus</i> (b), <i>Coreopsis maritima</i> (c), dont la coloration jaune ou orange est due à des dérivés d'aurone, et <i>Nesocodon mauritianus</i> (d), dont le nectar rouge est coloré par une aurone en milieu basique.	36
Figure 3. Quelques exemples de dérivés naturels d'aurone et leurs familles végétales associées.	40
Figure 4. Affinité de liaison pour le site de liaison à l'ATP de la glycoprotéine P (K_D est la constante de dissociation) de flavonoïdes ; accumulation du paclitaxel (Pctx) au sein de cellules résistantes NCI-ADR-RES exprimant la glycoprotéine P (Pgp), en présence de 10 μ M de flavonoïde, pendant 60 minutes ; et IC_{50} de la mitoxantrone (Mx) contre des cellules résistantes MDA-MV-231/R exprimant BRCP, en présence de 0,5 μ M d'une chalcone et d'une aurone (l' IC_{50} sans ajout d'un flavonoïde est de 3,45 μ M).	50
Figure 5. Inhibition des kinases cycline-dépendantes CDK1, CDK2 et CDK4 par des aurones et par le flavopiridol (utilisé comme référence).	52
Figure 6. Activité de cytotoxicité sur des lignées cellulaires K562 (leucémie myéloïde), SGC-7901 (adénocarcinome gastrique) et HUVEC (impliquées dans l'angiogénèse tumorale) par des flavonoïdes et la fumagilline (utilisée comme référence).	53
Figure 7. Activités d'induction de NQO1 et de capture du radical anion superoxyde par des aurones et la lutéoline. ^a CD est la concentration d'aurone nécessaire pour doubler l'activité de l'enzyme NQO1.	55
Figure 8. Inhibition de l'activité de la NADH fumarate réductase de <i>Leishmania</i> (en pourcentage d'inhibition à 12,5 μ M), et inhibition de la croissance de la souche K1 de <i>Plasmodium falciparum</i> par des flavonoïdes.	57
Figure 9. Inhibition de l'activité de la chorismate synthase de <i>Streptococcus pneumoniae</i> par des aurones ; et inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus epidermidis</i> par des aurones et l'amoxicilline (utilisé comme référence). ^a MIC représente la concentration d'inhibiteur minimale requise pour observer une inhibition de croissance d'un micro-organisme après une nuit d'incubation.	58

Figure 10. Inhibition de l'activité de la T4-5'-iodothyronine monoiododeiodinase (T ₄ -5'-ITHD) par des aurones ; inhibition de l'interaction estradiol-récepteurs d'œstrogène (ER) après incubation pendant 2 heures avec 10 µM d'aurones.	60
Figure 11. Constantes d'inhibition des peptides de plaques amyloïdes Aβ(1-42) pour des flavonoïdes radiomarqués ; inhibition de l'acétylcholinestérase par des dérivés d'aurone.	61
Figure 12. Trois particularités structurales apportées par le squelette des aurones, exemple de la 4,6,4'-trihydroxyaurone : (a) mime de la structure de l'adénine et donc de l'ATP ; (b) caractère d'accepteur de Michael et d'électrophile ; (c) stabilisation particulière du radical-aurone en position 4'. "Les nombres indiqués représentent les densités de spin aux positions correspondantes du radical.....	64
Figure 13. Carte représentant la prévalence de l'infection au virus de l'hépatite C (en pourcentage de la population de chaque pays), basée sur des données globales de l'Organisation Mondiale de la Santé et de nombreuses études indépendantes ou locales, toutes réalisées sur une période de dix ans, entre 1999 et 2009.....	69
Figure 14. Cycle de vie du VHC dans la cellule infectée (en haut) et traitement de la polyprotéine associée avec découpage en plusieurs protéines fonctionnelles structurales et non-structurales (en bas) [193].	72
Figure 15. Structure de la ribavirine et de quatre inhibiteurs de la protéase NS3/4A : le Telaprevir et le Boceprevir qui ont été très récemment mis sur le marché, et deux inhibiteurs en cours de tests cliniques, et activités associées sur modèle cellulaire réplicon.	74
Figure 16. Evolution du taux de réponse virale de la thérapie contre l'hépatite C dans le temps (IFN : interféron ; RBV : ribavirine ; PI : inhibiteur de la protéase NS3/4A ; PolI : inhibiteur de la polymérase NS5B [197].	75
Figure 17. Structure d'inhibiteurs nucléosidiques de la polymérase NS5B et activités associés sur modèle cellulaire réplicon.	75
Figure 18. Structure RX tridimensionnelle de la protéine NS5B avec ses trois sous-domaines (« Fingers » en rouge, « Palm » en bleu et « Thumb » en vert) et ses quatre sites allostériques principaux, occupés ici par des ligands co-cristallisés ; les mutations clés associées à chaque site pour la mutagenèse sont indiquées en gras.....	76
Figure 19. Structures de dérivés de type benzothiadiazine utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Palm I ».	77
Figure 20. Structures de dérivés provenant de diverses familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Palm I ».	78
Figure 21. Structures de dérivés provenant de deux familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Palm II ».	80
Figure 22. Structures de dérivés de type benzimidazoles et dérivés utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Thumb I ».	80

Figure 23. Structures de dérivés provenant de diverses familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Thumb I ».....	81
Figure 24. Structures de dérivés provenant de diverses familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Thumb II ».....	82
Figure 25. Modification de l'IC ₅₀ par rapport à la protéine NS5B sauvage obtenue avec l'aurone 18c et les mutants P495L, H95Q, C316Y et M423T. Ces mutations sont connues pour réduire la susceptibilité des inhibiteurs des sites « Thumb I », « Palm II », « Palm I » et « Thumb II », respectivement.....	102
Figure 26. Pose obtenue par docking moléculaire du composé 21j (en rose) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert). Trois liaisons hydrogène sont visibles en pointillés rouges entre le carbonyle de 21j et l'arginine 503, entre le groupement 4-hydroxyle et l'arginine 503, et entre le groupement 6-hydroxyle et la glycine 493.	104
Figure 27. Poses obtenues par docking moléculaire des composés 21a (en bordeaux), 21c (en violet), 21d (en orange) et 21e (en magenta) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert). Outre les liaisons hydrogène précédemment décrites, deux autres sont visibles en pointillés rouges entre différents groupements phénols présents sur les auronos et les résidus histidine 428 et leucine 392.....	105
Figure 28. Poses obtenues par docking moléculaire des composés 21i (en turquoise), 21g (en vert), et de deux composés méthoxylés et méthylés (en bleu clair et bleu foncé) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert).....	106
Figure 29. Poses obtenues par docking moléculaire des composés 26e (en jaune), 26b (en noir), et de deux composés B-hétérocycliques de type quinoline et <i>N</i> -butylindole (en gris et en doré) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert).	108
Figure 30. Pose obtenue par docking moléculaire du (<i>Z</i>)-2-((1-butyl-1 <i>H</i> -indol-3-yl)méthylène)-4,6-dihydroxy-benzofuran-3(2 <i>H</i>)-one, visualisée avec la protéine NS5B en mode surface.....	108
Figure 31. Représentation schématique des éléments pharmacophoriques importants et des interactions des auronos avec la protéine NS5B.	112
Figure 32. Coupe de la peau humaine et zoom sur la partie basale de l'épiderme ; emplacement des mélanocytes et répartition de la mélanine produite.	117
Figure 33. Spectre d'absorption UV-visible d'eumélanine synthétique à quatre concentrations différentes (0,0005% ; 0,0015% ; 0,0025% et 0,005% en masse) [252].	118
Figure 34. Structure cristallographique des sites catalytiques de type binucléaire de cuivre de deux tyrosinases, respectivement isolées de <i>Bacillus megaterium</i> (bactérie, oxydée, A) et d' <i>Agaricus bisporus</i> (champignon, réduite, B). Les enzymes sont co-cristallisées avec des inhibiteurs connus : l'acide kojique (A) et la tropolone (B).	124
Figure 35. Exemples de complexes biomimétiques modélisant la structure et l'une des activités de la tyrosinase, et présentant des centres binucléaires de cuivre sous différentes formes.....	127

Figure 36. Structure des inhibiteurs historiques de la tyrosinase utilisés comme références dans les travaux plus récents.	129
Figure 37. Structures de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type lipide à longue chaîne ou stéroïde. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.	129
Figure 38. Structures de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type phénylthiourée, hétérocyclique, polycarbonylé, et dérivés. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions. I_{Tr} / IC_{50} représente le même rapport avec la tropolone pour référence. Enfin, K_{AK} / K_i représente le rapport entre le K_i de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.	131
Figure 39. Structures de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type stilbène, coumarine, benzaldéhyde, acide benzoïque, acide cinnamique, benzophénone et dérivés. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.	132
Figure 40. Structure de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type flavonoïde. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.	135
Figure 41. Liste des dérivés méthoxylés, de la 5,4'-dihydroxyaurone et de l'azaaurone retenus pour être testés en tant qu'inhibiteurs de la tyrosinase.	142
Figure 42. Graphique représentant le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase de champignon obtenu en présence de 200 μ M d'inhibiteurs méthoxylés de type 20 et 28	148
Figure 43. Spectres d'absorption UV-visible d'un mélange d'aurone 17c (4,37 μ M) et de tyrosinase de champignon (3,3 μ g) dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7), enregistrés toutes les minutes jusqu'à 5 minutes et superposés.	149
Figure 44. Courbes de vitesse initiale de l'oxydation de 17c (a) et 17e (b) catalysées par la tyrosinase en fonction de la concentration en substrat. Les courbes de Hill sont présentées en insert.	150
Figure 45. Courbes de $1/V^{app}$ en fonction de l'inverse de la concentration en activateurs hyperboliques pour les composés 17a et 17b	151
Figure 46. Courbes de $1/V^{app}$ et de K_m^{app}/V^{app} en fonction de la concentration en inhibiteur 29a , et constantes d'inhibitions associées.	153
Figure 47. Modes d'action des aurones selon trois mécanismes différents.	155
Figure 48. Spectre RPE du complexe I seul dans un mélange 1/1 d'HEPES (50 mM, pH 7) / DMSO en solution gelée (vert), et après ajout d'un équivalent du composé hybride 29a (rose). Conditions RPE : 100 K, 9,33 GHz, fréquence de modulation 100 kHz, amplitude de modulation 0,2 mT.	157
Figure 49. Représentation graphique des modes de fixation envisagés du composé 29a sur le complexe I , et énergies calculées pour chacun de ces modes.	158

Figure 50. Photographie de l'arbuste <i>Nauclea latifolia</i> , dont différentes parties sont utilisées en médecine traditionnelle d'Afrique subsaharienne.	165
Figure 51. Quelques dérivés d'alcaloïdes et de triterpénoïdes identifiés dans différents organes de l'arbuste <i>Nauclea latifolia</i>	168
Figure 52. Structure des deux énantiomères de la base libre du <i>cis</i> -tramadol, dont la forme racémique est utilisée comme analgésique.	169
Figure 53. Spectres RMN ¹ H : (a) d'un extrait dans le chloroforme purifié provenant d'écorces de <i>Nauclea latifolia</i> ; (b) de la base libre du tramadol commercial.	170
Figure 54. Image ORTEP de la structure cristallographique obtenue par réfraction des rayons X du chlorhydrate de <i>cis</i> -tramadol, accompagné d'une molécule d'acétonitrile (solvant de cristallisation).	171
Figure 55. Profils HPLC : (a) du tramadol racémique provenant de source commerciale ; (b) du (-)-tramadol issu de la séparation des énantiomères ; (c) du (+)-tramadol issu de la séparation des énantiomères.....	174
Figure 56. Spectre RMN ¹ H de brut réactionnel issu de la réaction entre le composé 37 et la L-proline et d'une réduction par NaBH ₄ . Structure des produits 39a , 39b , 40a et 40b	182
Figure 57. Spectre RMN ¹ H de brut réactionnel issu de la réaction entre le composé 33 et la L-proline et d'une réduction par NaBH ₄ . Structure des produits 41 et 42	183
Figure 58. Spectres RMN ¹ H (zone des protons aromatiques) : (a) de l'intermédiaire 33 ; (b) d'un brut réactionnel issu de la réaction entre le composé 33 et la diméthylamine, suivie d'une réduction par NaBH ₃ CN ; (c) du tramadol.	185
Figure 59. Profil HPLC du brut issu de la réaction entre le composé 33 et la diméthylamine, suivie d'une réduction par NaBH ₃ CN.....	186
Figure 60. Spectre de masse du composé présentant en HPLC un temps de rétention comparable au tramadol.....	187
Figure 61. Profil HPLC, avec extraction des ions de masse <i>m/z</i> = 264, du brut issu de la réaction entre le composé 33 et la diméthylamine, suivie d'une réduction par NaBH ₃ CN.....	187

TABLE DES SCHÉMAS

- Schéma 1. Eléments de mécanisme pour les deux voies de biosynthèse des aurones. La voie de biosynthèse « PPO », catalysée par l'auréusidine synthase, mène à des dérivés polyhydroxylés sur le cycle B (ici, l'exemple de l'auréusidine) ; la voie de biosynthèse « PRX », catalysée par des peroxydases, mène à des dérivés monohydroxylés sur le cycle A (ici, l'exemple de l'hispidol)..... 41
- Schéma 2. Voies de synthèse des aurones *via* une cyclisation oxydante de chalcones : avec l'acétate de mercure(II) dans l'acide acétique ; avec l'acétate de mercure(II) dans la pyridine ; avec le bromure de cuivre(II) dans le DMSO ; et avec une voie en deux étapes faisant intervenir une bromation par TBATB avant cyclisation..... 45
- Schéma 3. Voie de synthèse des aurones *via* la formation d'un alcool propargylique, une cyclisation catalysée par l'or(I) et une oxydation de l'alcool allylique formé..... 45
- Schéma 4. Voies de synthèse des aurones *via* une condensation aldolique entre un benzofuran-3(2*H*)-one et un benzaldéhyde : avec l'acide chlorhydrique 37% dans l'acide acétique ; avec l'alumine dans le dichlorométhane ; avec l'alumine-KF sans solvants, sous micro-ondes ; et avec la potasse à 50% dans l'eau, à reflux. 46
- Schéma 5. Voie de synthèse des aurones *via* une réaction de Suzuki entre un 2-(bromométhylène)-benzofuran-3(2*H*)-one et un dérivé d'acide phénylboronique. Il est à noter que l'introduction d'un groupement *gem*-dichloro à la place du *gem*-dibromo mène exclusivement à une cyclisation en flavone..... 47
- Schéma 6. Voie de synthèse des synthons **2a** et **2b** *via* une réaction de Houben-Hoesch suivie d'une hydrolyse et d'une cyclisation en milieu basique..... 85
- Schéma 7. Voie de synthèse alternative du synthon **2b** *via* une réaction de Houben-Hoesch immédiatement suivie d'un traitement aqueux à reflux..... 85
- Schéma 8. Voie de synthèse des synthons **5a** et **5b** *via* une protection de l'acétophénone de départ, une bromation en α du carbonyle puis une déprotection-cyclisation en milieu basique. Obtention du composé **6** par bromation directe avec le bromure de cuivre(II)..... 86
- Schéma 9. Voie de synthèse des synthons **7a** et **7b** à partir de **2a** *via* une alkylation en milieu basique..... 87

Schéma 10. Voie de synthèse du synthon 9 <i>via</i> une substitution nucléophile permettant l'introduction d'un acide, la formation d'un chlorure d'acyle, et une réaction de Friedel-Crafts ; voie de synthèse du synthon 11 <i>via</i> une bromation en α du carbonyle et une cyclisation en milieu basique.....	88
Schéma 11. Voie de synthèse des aldéhydes 13 , 14 et 16 , respectivement par formylation (réaction de Duff), substitution d'un fluor par une <i>N</i> -méthylpipérazine, et réduction suivie d'une oxydation ménagée.....	89
Schéma 12. Méthode de préparation des dérivés d'aurone 4-, 5- ou 6-hydroxylés par condensation aldolique en présence de KOH aqueux et de méthanol, à reflux.....	90
Schéma 13. Méthode de préparation des dérivés d'aurone 4,6-diméthoxylés par condensation aldolique en présence de KOH aqueux et de méthanol, à 25 °C ou à reflux.....	91
Schéma 14. Méthode de préparation des dérivés d'aurone polyhydroxylés par déprotection des analogues méthoxylés avec le tribromure de bore (méthode A) ; condensation aldolique en présence de KOH aqueux concentré et d'éthanol à reflux (méthode B) ; condensation aldolique en présence de H ₂ SO ₄ concentré et de méthanol à reflux (méthode C).....	92
Schéma 15. Méthode de préparation des dérivés d'aurone fluorés et hydrophobes 22 , 23 , 24 et 25 par condensation aldolique supportée sur alumine neutre dans le dichlorométhane.....	93
Schéma 16. Méthode de préparation des dérivés d'aurone B-hétérocycliques 26 par condensation aldolique en présence de KOH aqueux concentré et d'éthanol à reflux.....	94
Schéma 17. Biosynthèse des eumélanines et des phaéomélanines à partir de la tyrosine et catalysée par la tyrosinase et les enzymes associées TRP1 et TRP2 [256].....	119
Schéma 18. Cycles mécanistiques de l'oxydation d'un phénol (activité monophénolase, autour du cercle) et d'un catéchol (activité diphénolase, demi-cercle de gauche) par la tyrosinase, et formes différemment oxydées de l'enzyme.....	126
Schéma 19. Méthode de préparation des dérivés d'aurone polyhydroxylés par condensation aldolique en présence de KOH aqueux concentré et d'éthanol à reflux (méthode B).....	139
Schéma 20. Méthodes de préparation du précurseur 27 , des composés polyméthoxylés 20k et 28 . Conditions réactionnelles testées pour la déprotection des groupements méthoxyles de 28 , sans succès.....	140
Schéma 21. Structure des trois molécules cibles 29a , 29b et 29c . Stratégie de synthèse envisagée pour parvenir aux composés 29 : condensation des deux fragments benzofuran-3(2 <i>H</i>)-one et 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde, oxydation de la pyridine puis déprotection du phénol en position 4'.....	142
Schéma 22. Méthodes de condensation aldolique des précurseurs 2a , 2b , 5a et 7a avec le 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde.....	143

Schéma 23. Méthode d'oxydation des composés 30a , 30b et 30c par protection des groupements phénols et réaction avec un adduit urée – H ₂ O ₂ . Conditions réactionnelles testées pour l'oxydation de 30d , sans succès.	145
Schéma 24. Méthode de déprotection des composés 32a , 32b et 32c dans un mélange de HCl 1 N et de méthanol à reflux.	146
Schéma 25. Modes de fixation envisagés du composé 29a sur le complexe modèle I qui mime la structure et l'activité de la tyrosinase.	157
Schéma 26. Voie de biosynthèse de la (-)-lupinine, un alcaloïde quinolizidinique connu ; et voie de biosynthèse proposée du tramadol recourant à un intermédiaire similaire.	176
Schéma 27. Structure de l'intermédiaire clé 33 . Stratégie de synthèse envisagée pour parvenir à ce composé : addition d'un lithien sur la cycloheptanone, déshydratation de l'alcool puis coupure oxydante.	178
Schéma 28. Méthode de formation de l'organolithien à partir de la 3-bromoaniline et du <i>n</i> -BuLi, et méthode de déshydratation du composé 34 en présence de TFA.	178
Schéma 29. Méthode de dihydroxylation du composé 35 en présence d'OsO ₄ et de NMO, et de coupure oxydante du composé 36 en présence de NaIO ₄	179
Schéma 30. Structure de l'intermédiaire clé 37 . Stratégie de synthèse envisagée pour parvenir à ce composé : réduction de l'acide 7-oxooctanoïque suivie d'une oxydation ménagée.	180
Schéma 31. Méthode de réduction des groupements carbonyles de l'acide 7-oxooctanoïque en présence de LiAlH ₄ dans le THF, puis de soude.	180
Schéma 32. Méthode d'oxydation ménagée des carbonyles du composé 38 en présence de PCC dans le dichlorométhane.	180
Schéma 33. Trois produits issus de la réaction du cétoaldéhyde 37 avec la proline : après formation de l'énamine sur la cétone et cyclisation de type 8-énolendo ou 6-énolexo ; ou après formation de l'énamine sur l'aldéhyde et cyclisation 6-énolexo.	181

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des dérivés d'aurone 4-, 5- ou 6-hydroxylés préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.	90
Tableau 2. Liste des dérivés d'aurone 4,6-diméthoxylés préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.	91
Tableau 3. Liste des dérivés d'aurone polyhydroxylés préparés suivant l'une des méthodes présentées ci-dessus, et rendements associés (lettre indiquant la méthode employée entre parenthèses).	92
Tableau 4. Liste des dérivés d'aurone fluorés et hydrophobes préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.	93
Tableau 5. Liste des dérivés d'aurone B-hétérocycliques préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.	94
Tableau 6. Résultats initiaux pour l'inhibition de NS5B et relation structure-activité des analogues 6-hydroxylés, 4-hydroxylés, 4,6-dihydroxylés ou 4,6-diméthoxylés de l'auréusidine.	96
Tableau 7. Valeurs d'inhibition de NS5B des analogues d'aurone polyhydroxylés, méthoxylés et fluorés.	97
Tableau 8. Valeurs d'inhibition de NS5B des analogues d'aurone portant un groupement hydrophobe.	98
Tableau 9. Valeurs de cytotoxicité et index thérapeutiques des composés 18c , 18o , 21d et 21e	100
Tableau 10. Données issues du docking des composés sur une structure cristallographique de NS5B (2dxs), avec le logiciel GOLD (docking réalisé dans une sphère de 10 Å autour du ligand cristallisé, avec 20 poses générées).	111
Tableau 11. Liste des dérivés d'aurone polyhydroxylés, de l'azaurone et de l'aurone méthoxylée correspondante, préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.	141
Tableau 12. Liste des dérivés d'aurone polyhydroxylés et 4,6-diméthoxylés retenus pour être testés en tant qu'inhibiteurs de la tyrosinase.	141

Tableau 13. Valeurs des K_m (constante de Michaelis) déterminées pour les 4'-hydroxyaurones et 3',4'-dihydro-xyaurones et longueur d'onde de travail pour chaque composé. 151

Tableau 14. Valeurs des activités hyperboliques (AH) déterminées pour les 2'-hydroxy- et 3'-hydroxyaurones en présence de 700 μM d'activateur. 152

Tableau 15. Valeurs des constantes d'inhibition compétitive (K_{ic}) et anti-compétitive (K_{iu}) pour les aurones de type résorcinol, hybride et B-désoxy. La mention *n.a.* signifie qu'aucune activité n'a été observée. 154

Partie 1.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans l'entreprise d'exploitation du vivant par l'Homme, les plantes ont toujours joué un rôle à part. Cueillies ou cultivées, elles ont constitué une richesse inépuisable pour le développement de l'alimentation, des matériaux, de l'ornement ou encore de la santé. Dans ce dernier domaine, un très large panel de plantes a été employé très tôt en médecine traditionnelle. Le premier indice de l'utilisation de plantes médicinales date en effet de 60 000 ans avant Jésus-Christ : une tombe Néanderthaliennne découverte sur un site archéologique en Irak contenait de nombreux pollens issus de plantes médicinales toujours utilisées de nos jours, comme *Centaurea solstitialis* (la Centaurée du solstice), *Ephedra altissima*, ou différentes espèces d'*Althea* [1]. Notre rapport à ces plantes médicinales a profondément évolué depuis, passant de la cueillette et de l'utilisation directe de la plante à l'extraction du principe actif, réalisée pour la première fois il y a 200 ans par Friedrich Sertümer, un pharmacien de 21 ans. Il s'agissait de la morphine, isolée de *Papaver somniferum*, le pavot à opium [2]. Grâce à l'apport des méthodes modernes d'extraction, de synthèse, de formulation et de dosage des principes actifs, l'impact des plantes médicinales dans la recherche thérapeutique est aujourd'hui encore considérable. En effet, si 49% des médicaments approuvés par la FDA entre 1981 et 2002 sont d'origine naturelle, semi-synthétisés, ou basés sur un squelette de produit naturel [3], la proportion des composés issus de plantes médicinales atteint 25% parmi les médicaments actuellement sur le marché [1]. Ce taux est d'autant plus impressionnant que seules 5 à 10% des plantes ont été explorées et analysées dans un cadre thérapeutique à ce jour.

Parmi les métabolites secondaires d'origine végétale, plusieurs classes ont été intensivement étudiées depuis un siècle pour leurs activités biologiques. C'est ainsi le cas des dérivés de sucres, d'acides gras, de stéroïdes, de polycétides, de peptides, de terpénoïdes, de flavonoïdes et d'alcaloïdes [4]. Ces deux dernières classes ont en particulier fait l'objet d'une attention soutenue, dans des optiques différentes. Les flavonoïdes constituent des composants importants de l'alimentation quotidienne, et il est estimé qu'un humain absorbe en moyenne environ 1 gramme de flavonoïdes par jour. Des activités biologiques très variées associées à cette classe de métabolites ont été découvertes, notamment antioxydantes, anticancéreuses, antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires ou anti-allergènes. Si les bienfaits de ces

composés restent essentiellement associés à la diète, quelques dérivés sont actuellement présents sur le marché, comme la troxérutine, un flavonol veinotonique isolé de *Sophora japonica*, ou la silibinine, un flavonolignane aglycone extrait de *Silybum marianum* qui est employé pour la prévention de troubles hépatiques [5]. D'autres flavonoïdes semblent très prometteurs, comme le flavopiridol, un analogue synthétique de flavone inhibiteur des kinases cycline-dépendantes, ou encore la catéchine et la génistéine, des antioxydants [6]. Les alcaloïdes sont beaucoup moins présents dans l'alimentation, et montrent au contraire un potentiel tourné essentiellement vers le marché du médicament. Ainsi, des composés comme la vinblastine, la réserpine, l'atropine, la codéine, la morphine ou l'ergométrine sont des drogues très connues et utilisées à travers le monde pour différentes indications comme le cancer, l'anxiété, la tension, la douleur ou encore les malaises vagues. Représentant une grande partie des produits naturels connus (26 900 alcaloïdes naturels sont répertoriés sur 150 000 produits naturels connus), cette classe se distingue par une extraordinaire diversité structurale [7].

Ce travail, entrepris dans le cadre de l'intérêt de l'Équipe de Pharmacochimie de Substances d'Origine Naturelle (EPSON) pour les composés bioactifs d'origine végétale, comprend deux volets, associés aux deux classes de molécules décrites plus haut : les auronnes, une sous-classe de flavonoïdes ; et le tramadol, un alcaloïde conçu et produit par synthèse, extrait d'une plante pour la première fois au laboratoire. Le premier volet, qui forme la part la plus importante et le cadre initial de ce travail, consiste en une étude de deux activités distinctes des auronnes : l'activité d'inhibition de la tyrosinase, qui constitue déjà une thématique de l'équipe de recherche et a fait l'objet d'une publication en 2006 ; et l'activité d'inhibition de la polymérase du VHC, identifiée pour la première fois en 2008 au laboratoire, et dont sont présentés ici les premiers développements. Le second volet de cette thèse, plus minoritaire et absent du cadre initial de cette thèse, concerne l'étude biomimétique d'un autre composé d'origine végétale, l'alcaloïde tramadol, ainsi que la séparation de ses deux énantiomères.

Après une large introduction sur les auronnes, leurs occurrences naturelles et leurs activités biologiques, les travaux réalisés sur cette classe de molécules sont présentés. Chacune des deux cibles thérapeutiques visées constitue une partie indépendante de ce manuscrit (Parties 3 et 4) et s'appuie sur la collaboration de partenaires différents. La Partie 5 résume les travaux réalisés sur le tramadol. Enfin, la partie expérimentale puis la bibliographie constituent les éléments finaux du manuscrit.

Partie 2.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1. Les aurones dans le règne végétal

1.1 LES AURONES PARMIS LES FLAVONOÏDES

Isomères structuraux des flavones, les aurones sont des flavonoïdes mineurs tricycliques composés d'un noyau benzofurane et d'un groupement phényle lié par une double liaison exocyclique. Dans la grande famille des flavonoïdes, ces composés occupent une place restreinte dans la nature et ont donc fait l'objet de peu d'études à ce jour. Ainsi, une recherche effectuée avec le logiciel SciFinder Scholar portant sur le mot-clé « *aurone* » renvoie moins de 500 résultats, alors qu'une requête concernant le mot-clé « *flavone* » en renvoie presque 18.000. Néanmoins, leur place dans le règne végétale est cruciale pour certaines espèces, et leur potentiel thérapeutique s'est révélé prometteur [8].

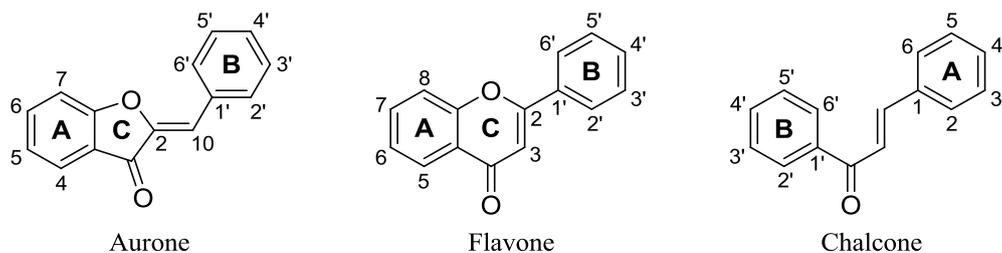


Figure 1. Structure, numérotation des positions et nomenclature des cycles des aurones, flavones et chalcones.

Comme pour les autres classes de flavonoïdes, notamment les flavones, les chalcones et leurs dérivés, les aurones naturelles sont très souvent hydroxylées, méthoxylées ou glycosylées, et les dérivés sélectionnés pour leurs activités thérapeutiques partagent souvent des substitutions similaires. En particulier, les positions 4, 6, 3' et 4' sont les plus fréquemment hydroxylées dans la nature. En revanche, la substitution des positions 5 et 2' est particulièrement rare (Figure 1).

1.2 OCCURRENCES NATURELLES ET FONCTIONS DES AURONES

1.2.1 Distribution générale

Les aurones sont parmi les flavonoïdes les moins présents dans la nature. Exclusives au règne végétal, elles sont essentiellement présentes dans les plantes de sous-règne Tracheobionta. La recherche des occurrences naturelles de ces composés est continue depuis les années 1950 où elle s'inscrivait dans le cadre de l'élucidation structurale des pigments dits « *anthochlor* » (en réalité les aurones et les chalcones). Une revue d'Iwashina *et al.* de 2000 indique qu'il existe dix-huit types d'aurones, auronols et dérivés aglycones diversement substitués, ainsi que vingt-sept analogues glycosylés connus. Si ces composés se retrouvent principalement dans les dicotylédones, notamment les familles Anacardiaceae, Astéracées, Gesnériacées, Légumineuses, Oxalidacées, Plumbaginacées, Rubiacées, Rhamnaceae et Plantaginacées, quelques dérivés ont été identifiés dans des monocotylédones. De rares analogues sont également des constituants de bryophytes et de ptéridophytes [9].

1.2.2 Chez les Astéracées, Plantaginacées, Gesnériacées et d'autres Dicotylédones (notamment comme pigments des fleurs)

Une grande proportion des variétés d'aurones naturelles se retrouve dans les familles de plantes à fleurs ornementales Astéracées, Plantaginacées et Gesnériacées. Ainsi, les genres *Bidens* [10,11,12,13], *Cosmos* [14,15], *Coreopsis* [16,17], *Baeria* [18], *Dahlia* [19], *Helianthus* [20,21], *Helichrysum* [22,23], *Zinnia* [24], *Clibadium* [25], *Lasthenia* [26], *Pyrrhopyrum* [27], *Picris* [28], *Viguiera* [18], *Antirrhinum* [29,30], *Linaria* [31], *Chirita*, *Didymocarpus*, *Petrocosmea* ou *Cyrtandra* [32,33] contiennent de nombreux dérivés d'aurone qui jouent un rôle crucial dans la pigmentation d'espèces à fleurs jaunes ou orange (Figure 2). Ces molécules sont également impliquées dans la coloration des organes floraux de genres appartenant à d'autres familles de Dicotylédones, comme *Oxalis* (Oxalidacées) [34], *Limonium* (Plumbaginacées) [34,35], *Pharbitis* (Convolvulacées) [36], *Mussaenda* (Rubiacées) [24] ou *Passiflora* (Passifloracées) [37,38]. Elles agissent comme guide à nectar pour les insectes pollinisateurs. Leur biosynthèse représente une évolution importante au niveau des interactions entre ces plantes et les pollinisateurs [39], notamment par rapport aux chalcones préexistantes, de coloration beaucoup moins intense. En effet, les chalcones sont considérées comme des flavonoïdes primitifs à partir desquels les aurones sont biosynthétisées. Ceci est supporté par la

présence quasi-exclusive des aurones dans les fleurs de plantes évoluées, et par la coexistence systématique de dérivés analogues chalconiques dans ces fleurs [40].

Découverte dans les années 1950 dans les fleurs d'*Antirrhinum majus* (muflier) où elle est responsable d'une coloration jaune [41], l'auréusidine a été l'une des aurones les plus étudiées, notamment pour sa voie de biosynthèse, mise au jour en 2000 par Nakayama *et al.* [42]. Ses analogues glucosides, l'auréusine et le cernuoside, sont également d'importants pigments de fleurs [43]. Des dérivés différemment hydroxylés partagent la même fonction : la bractéatine (identifiée pour la première fois dans *Helichrysum bracteatum*, l'immortelle à bractées) [22], la maritiméine (identifiée pour la première fois dans *Coreopsis maritima*) [16,44], et la sulfuréine (identifiée pour la première fois dans *Cosmos sulfureus*) [14]. Les glucosides correspondants, notamment la bractéine, la maritiméine et la sulfuréine, sont eux aussi distribués dans ces fleurs. Il est à noter que les aurones florales décrites ci-dessus sont toujours di- voire trihydroxylées sur le cycle B, ce qui permet d'induire une coloration jaune ou orange très intense. Une coloration rouge sang provenant d'une aurone 4'-méthoxylée et 3',5'-dihydroxylée a même été observée dans le nectar de *Nesocodon mauritanus*. Cette couleur, due au pH particulièrement basique (pH 9,2) du nectar, semble améliorer l'attractivité de la plante pour certains oiseaux pollinisateurs, comme le bulbul orphée ou le bulbul de Maurice [45]. En outre, l'aurone permettant la coloration a été rapportée comme toxique sélectivement pour les mammifères, avec l'hypothèse d'un double rôle de défense et d'attractivité dans la plante [46], ce qui est réfuté par Hansen *et al.* sur la base de l'absence de mammifères pouvant atteindre cette plante qui vit sur des falaises à Maurice [47].

1.2.3 Chez les Légumineuses, Anacardiacees et Rhamnacees (notamment comme protecteurs contre le pourrissement du duramen)

Les flavonoïdes sont des constituants importants du duramen de certains arbres. Outre la pigmentation qu'ils occasionnent, il a été montré sur différentes espèces d'*Acacia* que la présence en grand nombre de flavonoïdes favorisait la résistance du bois de cœur aux agents de pourrissement, champignons et bactéries [48]. La famille des aurones est par ailleurs connue pour ses activités antifongique et antibactérienne [49]. De plus, certains dérivés de furanoaurone et de furanoauronol extraits du duramen de *Lonchocarpus castilloi*, de la famille des Légumineuses, ont montré des activités antifongique et anti-termite, et participent à la résistance particulière de cette espèce contre le pourrissement et les termites [50,51]. L'espèce *Lonchocarpus obtusus* contient également ce type de structures, alors que *L. speciosus* ren-



Figure 2. Fleurs des espèces *Antirrhinum majus* (a), *Cosmos sulfureus* (b), *Coreopsis maritima* (c), dont la coloration jaune ou orange est due à des dérivés d'aurone, et *Nesocodon mauritanus* (d), dont le nectar rouge est coloré par une aurone en milieu basique.

ferme un dérivé B-désoxy, la 5,7-dihydroxyaurone [52]. Un dérivé d'aurone a été identifié dans le duramen d'*Acacia nigrescens* : il s'agit de la nigrescine, l'auronol correspondant à la maritimétine [53]. Il a été montré que ce genre *Acacia* peut également contenir des dérivés d'aurones dans ses fleurs [54]. Un autre genre d'arbres de la famille des Légumineuses, le genre *Pterocarpus*, contient des aurones particulières portant des groupements rhamnosides, initialement découvertes dans les fleurs de l'arbre *Pterocarpus marsupium*, puis dans son bois de cœur et celui de *P. santalinus* [55,56,57].

Chez les Anacardiées, les duramens de nombreuses espèces de sumacs du genre *Rhus* renferment des aurones comme la 4-*O*-méthylauréusidine, également appelée rengasine (*Rhus tripartita*, *R. natalensis* et *R. vulgaris*), ou la sulfurétine (*R. verniciflua*) [58,59]. Ces composés se retrouvent également au sein de différents autres genres d'arbres d'Anacardiées, comme *Melanorrhoea* [60], *Pseudosindora* [61], *Amphipterygium* [62], parmi d'autres [63]. La sulfurétine a en outre été découverte dans des textiles anciens dans lesquels elle jouait le rôle de colorant jaune. Sa résistance à la dégradation dans le temps a

notamment permis de découvrir l'origine végétale des pigments utilisés pour ces textiles : le duramen de *Cotinus coggygria* (Anacardiaceae) [64,65]. Cette espèce contient également de la sulfuréine ainsi que plusieurs autres dérivés de la sulfurétine, notamment l'homodimère de sulfurétine lié par le carbone 10, ainsi que des dérivés méthoxylés de ce dimère. Ces composés ont montré une activité antioxydante importante [66].

Les Rhamnaceae produisent également des aurones. Ferreira *et al.* ont notamment rapporté de nombreux dimères et hétérodimères d'auronols présents dans le duramen rouge de l'espèce *Berchemia zeyheri*. Parmi ceux-ci, la maesopsine, l'auronol correspondant à la 4,6,4'-trihydroxyaurone, est omniprésente. Elle constitue des homodimères ou s'associe avec des flavanones ou isoflavanones pour produire au final une dizaine de dérivés de configurations et d'embranchements divers [67,68,69,70]. De nombreux dérivés de la maesopsine, notamment des glycosides et des rhamnosides, existent également dans l'écorce des Rhamnaceae *Hovenia trichocarea* [71] et *Ceanothus americanus* [72]. Le dérivé 6-glucoside de la maesopsine, issu de cette dernière espèce, a montré une activité antimicrobienne modérée lors de tests *in vitro*.

1.2.4 Chez les Légumineuses et Cactacées (notamment comme phytoalexines)

Si certains arbres Légumineuses contiennent des aurones dans leur duramen, voire leurs fleurs, d'autres genres et espèces de cette famille en synthétisent dans leurs graines. C'est le cas du semis de soja (*Glycine max*, originellement *Soja hispida*) qui contient deux analogues d'aurone, l'hispidol (qui trouve ici son nom) et sa version 6-glucoside [73]. L'hispidol, ainsi que l'analogue 4'-glucoside, ont également été identifiés dans les racines de la luzerne tronquée (*Medicago truncatula*, Légumineuses), où ils jouent le rôle de phytoalexine. Il a en effet été montré que ces dérivés étaient accumulés dans des cellules de *Medicago truncatula* en réponse à un stress induit par le pathogène *Phoma medicaginis*. De plus, l'hispidol a montré une forte activité antifongique *in vitro* [74]. La sulfurétine est également présente dans les graines de nombreuses Légumineuses. Elle a par exemple été identifiée récemment dans celles de la plante arborescente *Sophora alopecuroides*, utilisées en médecine traditionnelle chinoise [75], ainsi que dans les fèves tonka (contenues dans le fruit du teck brésilien, *Dipteryx odorata*) [76], les noyaux de *Dipteryx lacunifera* [77], ou les graines d'*Ammopiptanthus mongolicus* [78]. Un dérivé 7-prénylé de cette même sulfurétine (la licoagroaurone) a également été isolé des racines de *Glycyrrhiza glabra* (régliasse) [79]. Les au-

rones sont beaucoup moins présentes dans les feuilles des Légumineuses. Néanmoins quelques cas ont été décrits, notamment la présence de leptosine, l'analogue 6-glucoside de la leptosidine, dans les feuilles de *Flemingia strobilifera* [80]. Enfin, le cactus *Cephalocereus senilis* (représentant des Cactacées, une autre famille de dicotylédones) renferme un dérivé caractérisé par la formation d'un pont acétal entre deux fonctions phénol. Cette aurone a été identifiée comme une phytoalexine et a présenté une forte activité antibactérienne [81].

1.2.5 Chez les Cypéracées (notamment comme anti-appétants contre les insectes)

Si d'une manière générale, la famille des Cyperacées ne contient pas d'anthocyanes ni de flavonoïdes classiques (flavones, flavonols, flavanones, isoflavonoïdes), l'auréusidine aglycone a été extraite des feuilles, inflorescences et graines d'un nombre important d'espèces de cette famille : *Lepironia articulata*, *Eleocharis acuta*, *Scirpus nodosus*, *Schoenus apogon*, *Gahnia clarkei*, *Ptilantherium deustum*, *Remirea maritima* ou encore *Cyperus rotundus* [82]. Le genre *Cyperus* est d'ailleurs particulièrement riche en aurones. Une étude impliquant 92 espèces australiennes de *Cyperus* a en effet permis de confirmer la forte présence d'auréusidine dans les inflorescences et, dans une moindre mesure, dans les feuilles [83]. L'espèce *Cyperus capitatus* contient en outre de nombreux dérivés méthylés et/ou méthoxylés originaux de l'auréusidine (5-méthylauréusidine, 4-*O*-méthyl-5-méthylauréusidine, 4,4'-di-*O*-méthyl-5-méthylauréusidine, 7-méthylauréusidine, 4-*O*-méthyl-7-méthylauréusidine et 4,6,3',4'-tétra-méthoxyaurone) extraits des organes souterrains de la plante [84,85,86], et les feuilles de *C. scariosus* renferment un dérivé glycosylé de la leptosidine (7-*O*-méthylmaritimétine) [87]. Il a par ailleurs été montré que la méthylation et la méthoxylation des aurones conduit à une augmentation importante de leur activité anti-appétante pour les insectes. Les dérivés présents dans les Cypéracées, et en particulier la 4,6,3',4'-tétraméthoxyaurone, ont en particulier été identifiés dans cette étude, ce qui suggère fortement un rôle des aurones dans la défense chimique de ces plantes contre les insectes [88].

1.2.6 Chez les Bryophytes et Ptéridophytes

Malgré la présence quasi-exclusive des aurones dans les plantes vasculaires décrites dans ce chapitre, le dérivé 6-*O*-glucuronide de l'auréusidine a été identifié dans les organes reproducteurs mâles de quatre bryophytes (*Marchantia berteroana*, *M. polymorpha*, *Conocephalum supradecompositum* et *Monocarpus sphaerocarpus*) [9,89]. C'est le cas également

de la bractéatine, présente dans les sporophytes de *Funaria hygrometrica* [90]. Des dimères et hétérodimères d'aurones font également partie des constituants de mousses, notamment un dimère d'auréusidine, prélevé sur *Aulacomnium palustre* [91], ainsi qu'un hétérodimère d'auréusidine et de flavanone qui se trouve dans les espèces *Campylopus clavatus* et *C. holomitrium* [92]. Ces exemples de flavonoïdes avancés présents dans des plantes primitives telles que les bryophytes suggèrent une évolution biochimique parallèle de ces végétaux avec les angiospermes, jusqu'à atteindre un niveau de sophistication similaire dans certains cas [89]. Il est enfin à noter qu'*Asplenium kaulfussii* renferme de la bractéatine, ce qui est le seul cas rapporté de la présence d'une aurone dans une espèce de Ptéridophytes [9].

1.2.7 Chez d'autres familles

Quelques aurones isolées ont été extraites d'espèces d'autres familles de végétaux ne présentant pas de liens chimiotaxonomiques entre eux. Ainsi, des aurones ont été identifiés dans des espèces variées : *Amomum subulatum* (une épice orientale) [93], *Veratrum schindleri* [94], *Diospyros melanoxylon* [95], *Uvaria hamiltonii* [96], *Ribes nigrum* (cassissier) [97], *Vaccinium oxycoccus* (canneberge) [98], *Smilax myosotifolia* [99], *Asarum caulescens*, *A. leptophyllum* [100], et *A. longerhizomatosum* [101]. Des dérivés plus inhabituels existent également dans la nature. La prénylation d'aurones conduit à quelques analogues naturels originaux : les antiarones A et B ont notamment été extraits de *Antiaris toxicaria* (upas) [102] et la broussourone A du cortex de *Broussonetia papyrifera* (mûrier à papier) [103]. Les racines de *Polygala dalmaisiana* contiennent de la dalmaisione D, un composé A-désoxy comportant un groupement *O*-glucoside dans une position originale, en 2' [104]. Isolée de *Gomphrena agrestis*, une aurone (*E*) heptasubstituée constitue l'une des seules descriptions de cette configuration dans la nature [105]. Enfin, une aurone chlorée et son analogue auronol ont été rapportés en 2001 comme constituants de l'algue brune marine *Spatoglossum variable* [106], mais leur présence a été remise en cause six ans plus tard par une révision structurale. Il s'agirait en réalité de dérivés d'isocoumarine [107,108].

Quelques exemples de structure de dérivés naturels d'aurone hydroxylés, méthylés, méthoxylés, prénylés, glycosylés, ainsi que des molécules plus originales sont regroupés en Figure 3.

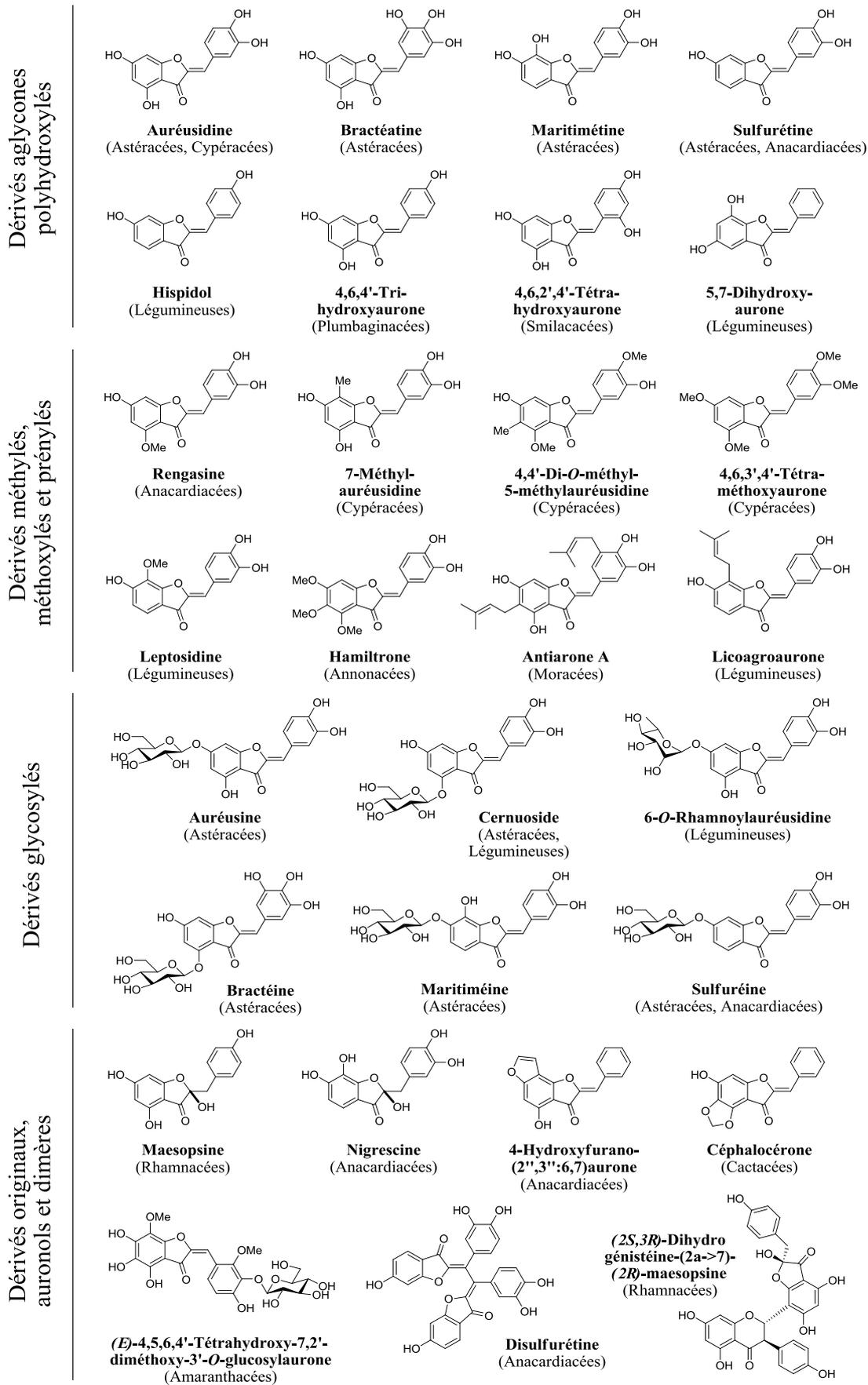


Figure 3. Quelques exemples de dérivés naturels d'aurone et leurs familles végétales associées.

1.3 BIOSYNTÈSE DES AURONES

1.3.1 Voie de biosynthèse « PPO » de l'auréusidine et dérivés

La question de la biosynthèse des dérivés d'aurone a accompagné la recherche d'analogues naturels depuis ses débuts. Ainsi, dès 1953, la proximité structurale et la présence dans les mêmes espèces de fleurs de glycosides d'aurones et de chalcones conduisent Shimokoriyama à juger probable l'interconversion de ces espèces catalysée par une enzyme, qu'il nomme alors « *chalconase* » [109]. Presque cinquante ans plus tard, Nakayama *et al.* reportent l'identification d'une enzyme, l'auréusidine synthase, responsable de la production

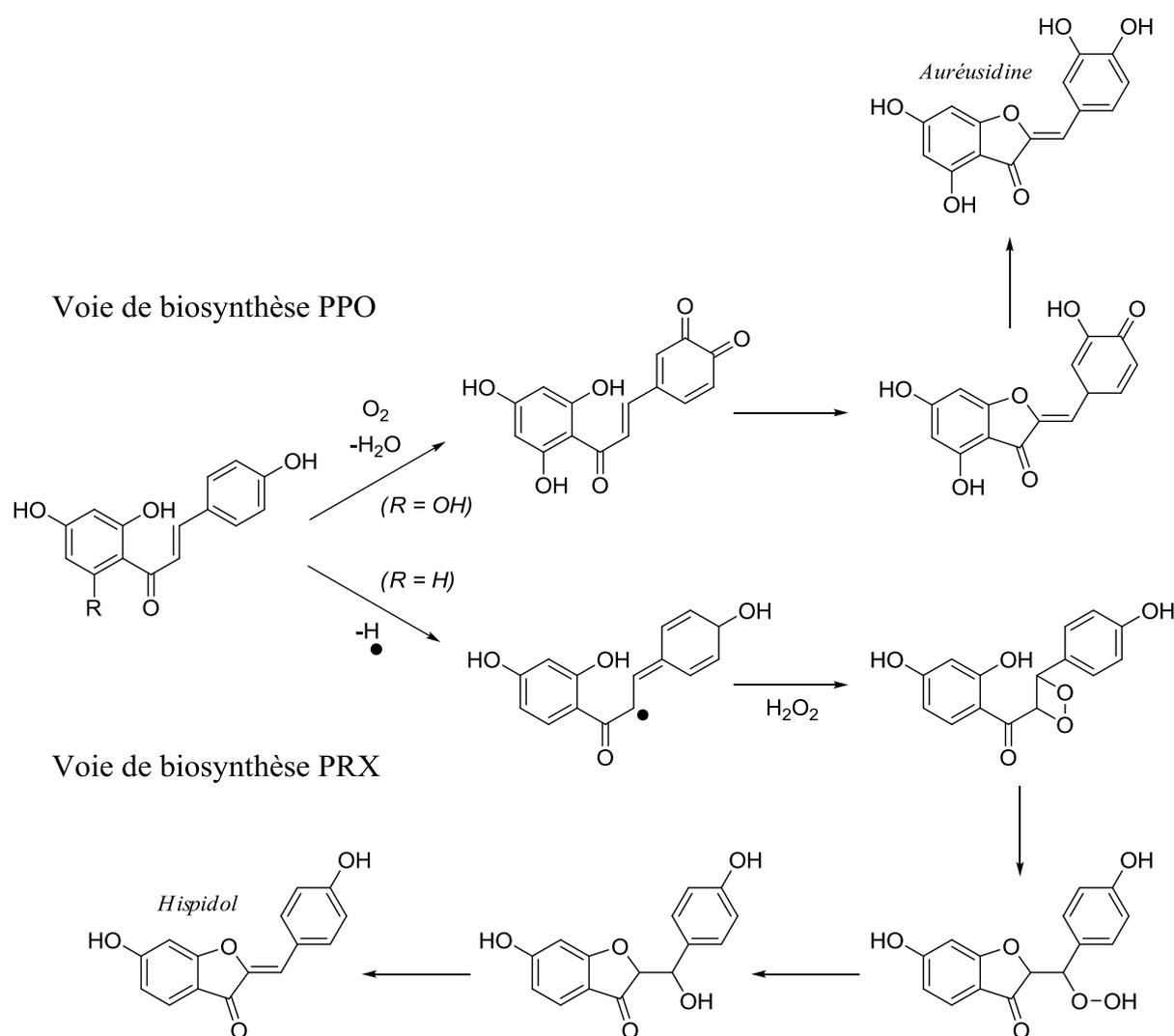


Schéma 1. Eléments de mécanisme pour les deux voies de biosynthèse des aurones. La voie de biosynthèse « PPO », catalysée par l'auréusidine synthase, mène à des dérivés polyhydroxylés sur le cycle B (ici, l'exemple de l'auréusidine) ; la voie de biosynthèse « PRX », catalysée par des peroxydases, mène à des dérivés monohydroxylés sur le cycle A (ici, l'exemple de l'hispidol).

d'auréusidine dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs de l'espèce d'Astéracées *Antirrhinum majus* [42]. Cette glycoprotéine homologue des phénol-oxydases de plantes (PPO), qui contient un centre binucléaire de cuivre, permet l'oxydation de la 2',4',6',4-tétrahydroxychalcone (THC) et de la 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone (PHC) en auréusidine, ainsi que l'oxydation de la PHC en bractéatine (Schéma 1).

Une étude ultérieure montre que l'introduction du gène de l'auréusidine synthase dans une fleur transgénique ne mène pas à la production d'aurones. En réalité, une autre enzyme est nécessaire pour la biosynthèse dans cette plante, la chalcone 4'-*O*-glucosyltransférase. Cette dernière enzyme permet de glucosyler la chalcone, ce qui se produit dans le cytosol. La chalcone 4'-*O*-glucosylée produite est ensuite adressée dans les vacuoles des cellules, où l'auréusidine synthase se charge de la cyclisation oxydante et permet la synthèse de dérivés 6-*O*-glucosylés comme l'auréusine. Ceci constitue l'un des rares exemples connus de modification du squelette carboné des flavonoïdes après transfert dans la vacuole, où s'effectuent en général des modifications plus mineures [39]. Néanmoins cette voie de biosynthèse apparaît limitée puisqu'il a été montré que l'auréusidine synthase est spécifique aux chalcones hydroxylées en positions 2' et 4, et ne mène qu'à des aurones hydroxylées dans les positions 3',4' ou 3',4',5'. Bien que ces positions soient effectivement fréquemment hydroxylées dans la nature (notamment pour l'auréusidine, la bractéatine, la sulfurétine, la maritimétine et leurs dérivés), il existe des analogues naturels non hydroxylés ou monohydroxylés sur le cycle B (notamment pour l'hispidol et la 4,6,4'-trihydroxyaurone). Ces dérivés proviennent donc d'une voie de biosynthèse différente [110].

1.3.2 Voie de biosynthèse « PRX » de l'hispidol

Dès 1967, Wong propose un mécanisme de biosynthèse de l'hispidol, une aurone B-monohydroxylée, dans les semis de soja. Cette hypothèse de mécanisme en deux étapes fait intervenir l'oxydation d'une chalcone par H₂O₂, catalysée par une peroxydase, ainsi qu'une déshydratation permettant de transformer l'hydrate obtenu en aurone. Néanmoins cette étude n'identifie pas clairement les enzymes responsables : aucune peroxydase impliquée dans la biosynthèse d'aurones n'est caractérisée [73,111].

En 2009, de nouveaux développements concernant la biosynthèse de l'hispidol, cette fois dans la luzerne (*Medicago truncatula*), permettent d'approfondir cette étude. En présence d'une élévation par des levures, l'hispidol s'accumule en effet dans la luzerne et joue ainsi le rôle de phytoalexine (augmentation d'un facteur 45 pour l'hispidol-4'-*O*-glucoside et d'un

facteur 15 pour l'hispidol en réponse à l'élicitation). Comme noté ci-dessus, l'action de l'auréusidine synthase ne peut pas mener à la biosynthèse de ce dérivé B-monohydroxylé, et un autre type d'enzyme est donc responsable de sa formation. Il s'avère sur des lignées cellulaires de luzerne que les peroxydases MtPRX1 et MtPRX2 sont des hispidol synthases fonctionnelles admettant une 2',4'-dihydroxychalcone comme substrat, ce qui confirme l'hypothèse de Wong sur l'intervention d'une peroxydase. En outre, ces enzymes vacuolaires ne sont pas capables de synthétiser une aurone à partir de 2',4',6'-trihydroxychalcones. Comme supposé par Wong, la biosynthèse fait intervenir une molécule de peroxyde d'hydrogène (Schéma 1). L'accumulation de cette espèce au sein de la plante est une conséquence du stress oxydant, notamment généré lors d'une invasion microbienne ou fongique. Les peroxydases MtPRX1 et MtPRX2 permettraient alors de piéger les molécules de H₂O₂ formées par ce stress tout en produisant grâce à elles un dérivé antifongique pour traiter l'infection, l'hispidol [74].

1.4 SYNTHÈSES CHIMIQUES DES AURONES

1.4.1 Introduction

L'extraction des aurones identifiées dans la nature ne peut représenter une solution viable pour l'utilisation ultérieure de ces molécules, pour deux raisons. Premièrement, les aurones naturelles n'offrent qu'une faible diversité structurale, avec une omniprésence des fonctions phénol libres, glycosylées ou méthoxylées, et une répartition des substituants sur quelques positions clés. De plus, les aurones sont présentes en très faibles quantités dans la nature, et l'extraction d'une quantité suffisante de produit constituerait une entreprise longue et coûteuse. Pour ces raisons, les chimistes ont développé des méthodes de synthèse du squelette des aurones compatibles avec un large panel de substitutions.

1.4.2 Synthèse *via* une cyclisation oxydante de 2'-hydroxychalcones

Le mécanisme de biosynthèse des aurones à partir de chalcones a inspiré les chimistes, qui ont tenté à plusieurs reprises de l'adapter à la synthèse en laboratoire. La cyclisation de chalcones a donc été réalisée dans différentes conditions. La réaction de 2'-hydroxychalcones avec de l'acétate de mercure(II) dans l'acide acétique à reflux permet d'obtenir les aurones correspondantes avec des rendements moyens (28 – 62% sur des dérivés benzylés et méthoxylés variés) dus à la formation dans le milieu de la flavanone correspondante [112]. Mal-

gré les améliorations de rendements apportées par l'utilisation de pyridine comme solvant (77 – 87% sur des dérivés halogénés, méthylés et méthoxylés variés), l'emploi d'acétate de mercure(II) pose des problèmes de toxicité, notamment pour l'environnement [113]. L'utilisation d'un autre dérivé métallique, le nitrate de thallium(III), dans le méthanol en milieu acide constitue une méthode alternative de cyclisation de 2'-hydroxychalcones présentant des rendements modérés. Cependant, la nécessité de la présence d'un groupement électroattracteur en position 5' de la chalcone (en *para* du groupe 2'-hydroxyle), ainsi que l'introduction au cours de la réaction d'un groupe méthoxyle provenant du solvant en position 4 sur l'aurone obtenue contribuent à limiter fortement les possibilités synthétiques liées à cette méthode [114,115]. Des conditions plus adaptées ont été décrites par Bose *et al.* en 2001. En utilisant le tribromure de *n*-tétrabutylammonium (TBATB) sur une chalcone 2'-acétoxyllée, un groupement méthoxyle provenant du solvant (un mélange méthanol / dichlorométhane) attaque l'énone en 1,4 tandis qu'un atome de brome est introduit en α du carbonyle. Un traitement basique par la potasse permet ensuite à la fois de saponifier le groupement 2'-acétoxyllé, de réaliser la substitution du brome par le phénolate formé, et d'éliminer une molécule de méthanol afin de former la double liaison et de récupérer l'aurone correspondante. Testée essentiellement avec des dérivés méthoxylés, cette méthode a fourni de très bons rendements de 75 – 85% pour la première étape, et de 85 – 95% pour la seconde étape [116]. Enfin, l'utilisation de bromure de cuivre(II) dans le DMSO a également été rapportée, menant à des rendements de 70 – 80% (Schéma 2) [113].

1.4.3 Synthèse *via* une cyclisation de dérivés de 1,3-diphénylprop-2-yn-1-ol catalysée par l'or(I)

Après une première tentative en 1986 à partir d'une ynone menant à de mauvais rendements (7 – 79%) et à une compétition entre formations de flavone et d'aurone [117], une variante récente de la cyclisation oxydante de chalcone faisant cette fois intervenir un dérivé d'alcool propargylique a été rapportée en 2008. Après une réaction d'alcynylation entre un 2-hydroxybenzaldéhyde et un dérivé d'éthynylbenzène, le 1,3-diphénylprop-2-yn-1-ol obtenu est mis en réaction avec un sel d'or(I), notamment AuCl, pour réaliser la cyclisation. Les aures réduites sont obtenues avec de bons rendements (65 – 86% pour des substitutions variées, mais pas de dérivés hydroxylés) lors de cette étape. Une simple oxydation de la position 3 de l'aurone réduite avec MnO₂ permet de récupérer l'aurone avec d'excellents rendements (64 – 99%). Outre les bons rendements obtenus et la relative simplicité de la synthèse, cette

voie permet d'introduire des substituants variés dans toutes les positions possibles, la seule limite étant la disponibilité du benzaldéhyde et de l'éthynylbenzène de départ (Schéma 3) [108].

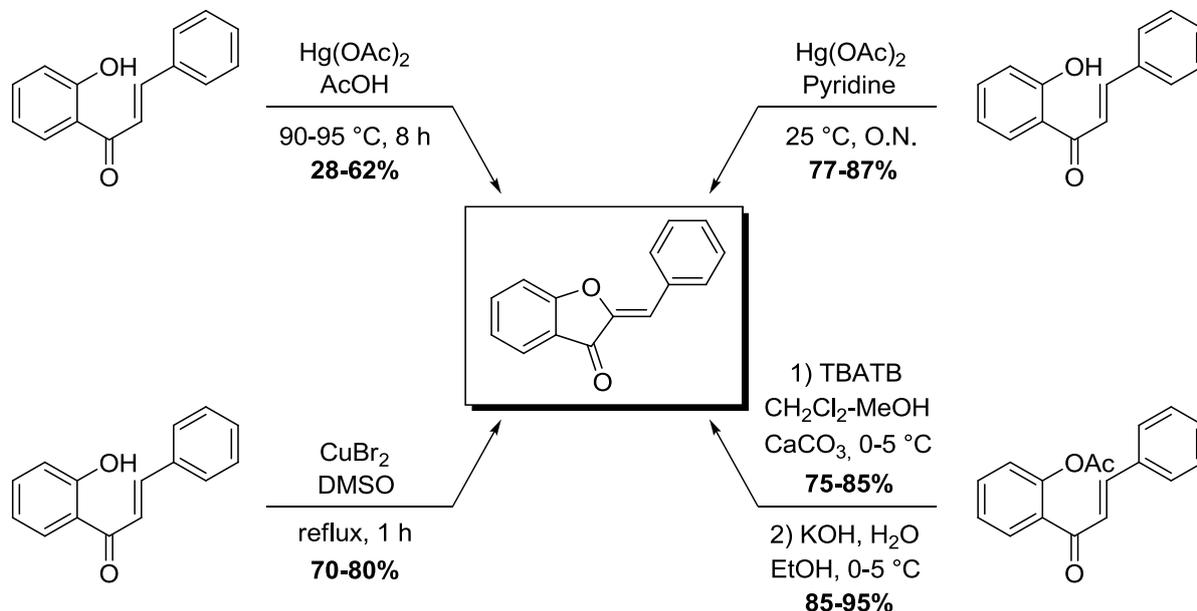


Schéma 2. Voies de synthèse des aurones *via* une cyclisation oxydante de chalcones : avec l'acétate de mercure(II) dans l'acide acétique ; avec l'acétate de mercure(II) dans la pyridine ; avec le bromure de cuivre(II) dans le DMSO ; et avec une voie en deux étapes faisant intervenir une bromation par TBATB avant cyclisation.

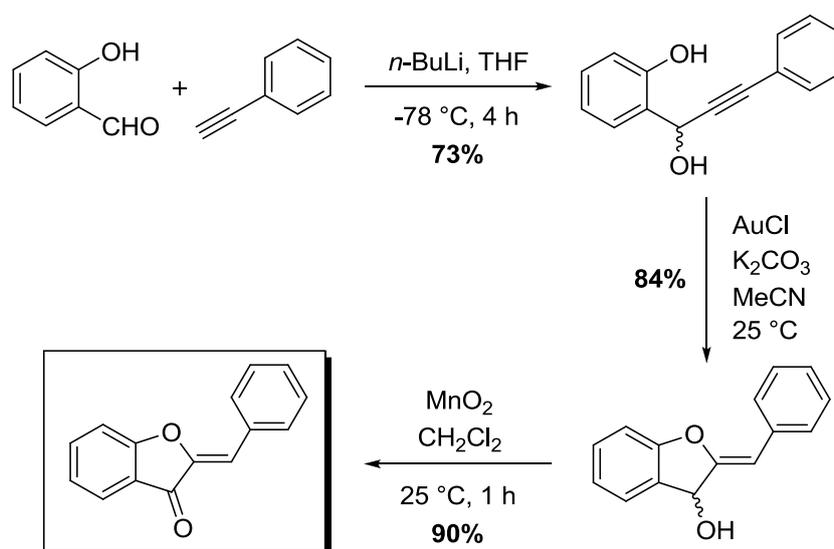


Schéma 3. Voie de synthèse des aurones *via* la formation d'un alcool propargylique, une cyclisation catalysée par l'or(I) et une oxydation de l'alcool allylique formé

1.4.4 Synthèse *via* la condensation d'un benzaldéhyde sur un dérivé de benzofuran-3(2H)-one

La voie de synthèse passant par un intermédiaire benzofuran-3(2H)-one est sans conteste la plus utilisée pour préparer les dérivés d'aures depuis les années 1950. La réaction de ce synthon avec un benzaldéhyde peut être réalisée en milieu acide, basique ou supporté sur alumine, en utilisant des conditions variées. Dès 1955, Geissman et Harborne utilisent cette réaction dans un mélange d'acide acétique glacial et d'acide chlorhydrique concentré, à température ambiante [43]. Ces conditions seront souvent reprises par la suite, bien qu'elles ne procurent souvent que des rendements médiocres. Plus récemment, de nouvelles conditions ont permis d'améliorer les rendements et la versatilité de la méthode de synthèse. Ainsi, Varma *et al.* réalisent la réaction sur alumine neutre dans le dichlorométhane et parviennent à améliorer nettement les rendements (86 – 93% pour des substitutions diverses) tout en utilisant des conditions très douces, compatibles avec l'utilisation de molécules fragiles. Si la méthode semble limitée aux composés relativement apolaires (solubles dans le dichlorométhane), la réaction permet néanmoins la déprotection de groupements acétoxyles et la récupération de produits hydroxylés [118]. L'utilisation des micro-ondes en combinaison avec un support sur alumine sans solvants donne également de bons résultats (57 – 96% de rendement

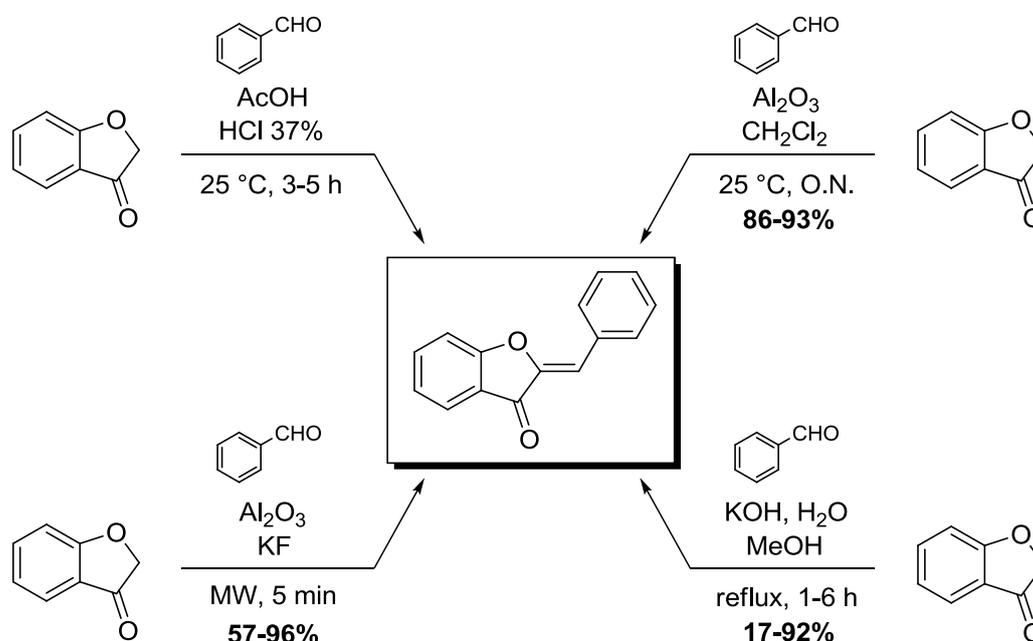


Schéma 4. Voies de synthèse des aures *via* une condensation aldolique entre un benzofuran-3(2H)-one et un benzaldéhyde : avec l'acide chlorhydrique 37% dans l'acide acétique ; avec l'alumine dans le dichlorométhane ; avec l'alumine-KF sans solvants, sous micro-ondes ; et avec la potasse à 50% dans l'eau, à reflux.

après 5 minutes de réaction pour des dérivés méthoxylés ou hétérocycliques) [119]. Enfin, perfectionnée au laboratoire, la méthode en conditions basiques KOH / MeOH permet également d'obtenir des rendements fortement dépendants des substituants. Ainsi, si la méthode s'accommode très bien de dérivés méthoxylés ou hydroxylés, elle supporte moins la polyhydroxylation, notamment au-delà d'un groupement phénol par cycle (Schéma 4) [120,121].

1.4.5 Synthèse *via* la réaction de Suzuki d'un acide phénylboronique sur un dérivé de 2-(bromométhylène)-benzofuran-3(2H)-one

Une dernière voie de synthèse très récente consiste en une réaction de Suzuki entre un dérivé de 2-(bromométhylène)-benzofuran-3(2H)-one et un acide phénylboronique. Trois exemples de synthèse d'aurones méthoxylées ont montré un rendement autour de 80 – 85%. Le 2-(bromométhylène)-benzofuran-3(2H)-one est préparé par cyclisation en présence de

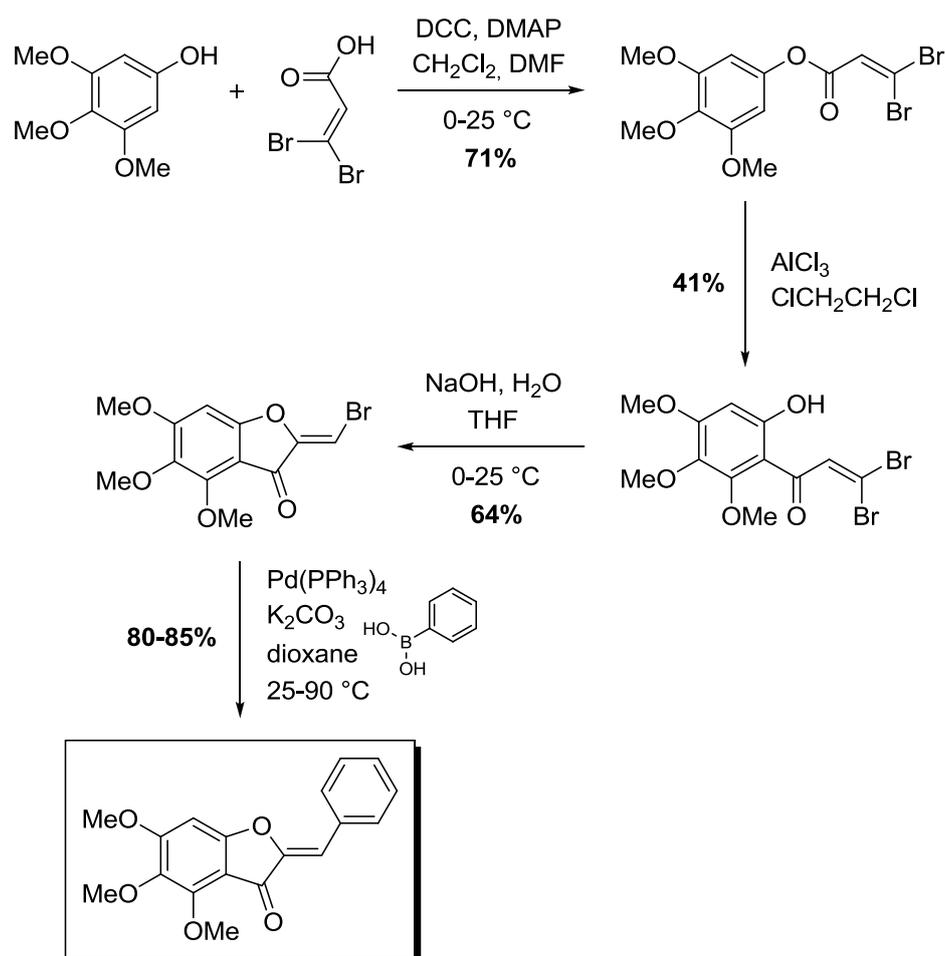


Schéma 5. Voie de synthèse des aurones *via* une réaction de Suzuki entre un 2-(bromométhylène)-benzofuran-3(2H)-one et un dérivé d'acide phénylboronique. Il est à noter que l'introduction d'un groupement *gem*-dichloro à la place du *gem*-dibromo mène exclusivement à une cyclisation en flavone.

NaOH à 0 °C d'un dérivé de 3,3-dibromo-1-phénylprop-2-én-1-one, lui-même synthétisé par un réarrangement de Fries d'un dérivé de 3,3-dibromoacrylate de phényle. Ce dernier provient d'une estérification entre un phénol et l'acide 3,3-dibromoacrylique. Néanmoins, étant donné la faible variété de composés réalisés à l'aide de cette méthode, il est difficile d'évaluer sa versatilité et sa compatibilité avec des groupements fragiles (Schéma 5). [122].

Chapitre 2. Les aurones en chimie médicinale

2.1 MODULATION DE L'EFFLUX DE DROGUES

2.1.1 Les transporteurs ABC et la résistance multidrogues

La capacité de cellules ou d'organismes à résister à un traitement composé de plusieurs drogues structurellement indépendantes est un problème clinique récurrent dans les thérapies du cancer et des maladies infectieuses. Ce phénomène, appelé MDR (*Multidrug Resistance*), implique très souvent des transporteurs membranaires à ATP, les transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*), qui permettent l'efflux des principes actifs présents dans la cellule. L'inhibition de ces transporteurs représente donc un enjeu thérapeutique majeur [123]. Si les flavonoïdes ont souvent montré des interactions avec des transporteurs ABC [124], la sous-famille des aurones n'a été étudiée dans ce domaine que récemment, notamment au niveau des interactions prometteuses avec les protéines ABCB1 et ABCG2. Leur structure benzofuranone permettrait de mimer le squelette de l'adénine présente dans l'ATP de manière plus efficace que les flavones correspondantes [8].

2.1.2 Inhibition de la glycoprotéine P (ABCB1)

La glycoprotéine P est un transporteur ABC (ABCB1) et constitue à ce titre l'une des cibles thérapeutiques envisagées pour le traitement du phénotype MDR. Certaines 4-hydroxy-6-méthoxyaurones et 4,6-diméthoxyaurones se sont révélées particulièrement affines pour le domaine de liaison nucléotidique NBD2 de cette protéine, notamment des dérivés 4'-halogénés [125]. Il est à noter qu'au sein de la famille des flavonoïdes, les aurones apportent ici une réelle valeur ajoutée puisque des dérivés analogues de chalcone et de flavone, dans les mêmes conditions de test, ont montré des valeurs d'affinité 3,5 à 5 fois moins élevées [8,126].

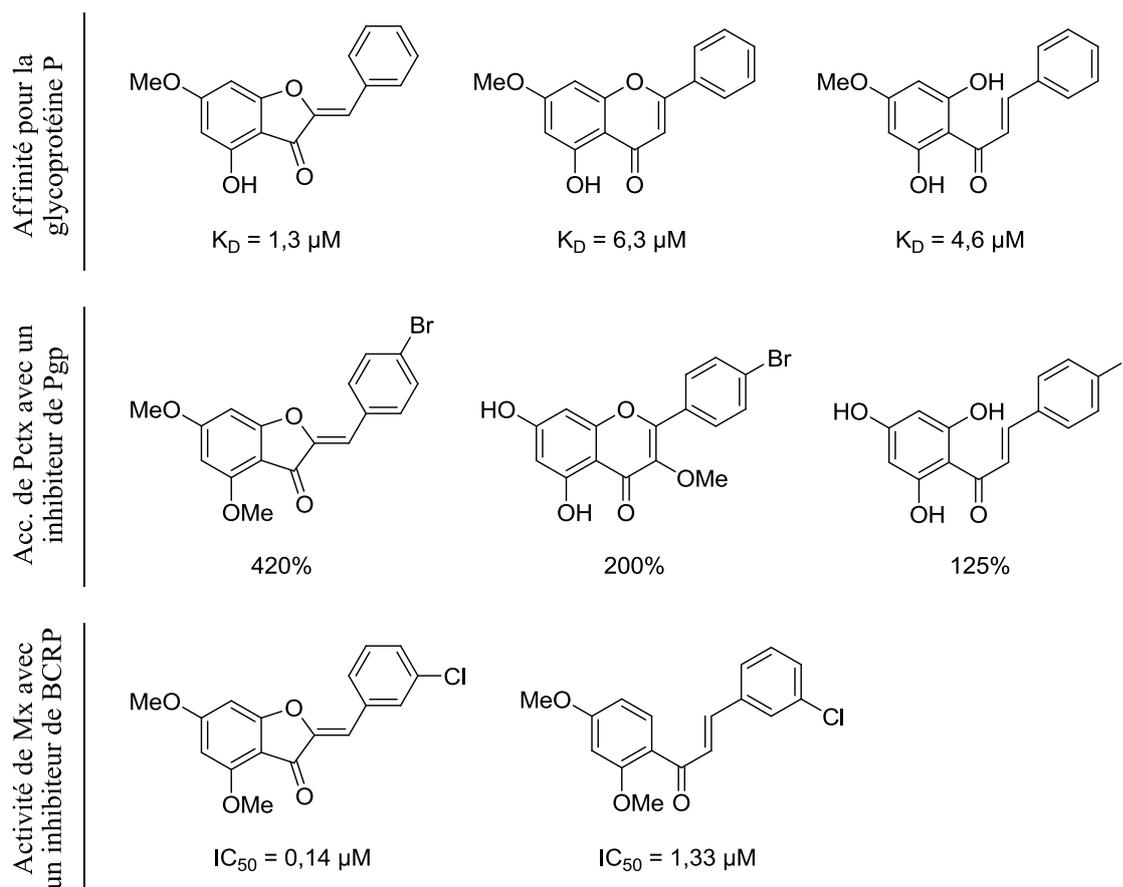


Figure 4. Affinité de liaison pour le site de liaison à l'ATP de la glycoprotéine P (K_D est la constante de dissociation) de flavonoïdes ; accumulation du paclitaxel (Pctx) au sein de cellules résistantes NCI-ADR-RES exprimant la glycoprotéine P (Pgp), en présence de $10 \mu\text{M}$ de flavonoïde, pendant 60 minutes ; et IC_{50} de la mitoxantrone (Mx) contre des cellules résistantes MDA-MV-231/R exprimant BCRP, en présence de $0,5 \mu\text{M}$ d'une chalcone et d'une aurone (l' IC_{50} sans ajout d'un flavonoïde est de $3,45 \mu\text{M}$).

De plus, ces dérivés d'aurone sont à même de stimuler l'accumulation de paclitaxel (un principe actif anticancéreux connu comme substrat d'ABCB1) dans des cellules cancéreuses résistantes, et ce plus efficacement que les chalcones, flavones et chromones testées. Il a également été montré que ces mêmes composés permettent une inhibition de l'efflux de paclitaxel dans les cellules cancéreuses sensibles, la 4,6,3',4',6'-pentaméthoxyaurone menant même à une diminution d'un facteur 10 de l'efflux dans des cellules résistantes. Les autres flavonoïdes testés dans les mêmes conditions se sont révélés presque inactifs (Figure 4) [127].

2.1.3 Inhibition de BCRP (ABCG2)

Des 4,6-diméthoxyaurones ont également été identifiées comme inhibiteurs de BCRP (*breast cancer resistance protein*), un autre transporteur ABC (ABCG2) impliqué dans le cancer du sein. En présence de quantités submicromolaires de ces composés, l'accumulation

de mitoxantrone (un composé utilisé pour le traitement du cancer du sein et substrat d'ABCG2) dans des cellules cancéreuses résistantes atteint entre 200 et 230% de la valeur obtenue pour les cellules contrôle. La valeur de l' IC_{50} de la mitoxantrone dans des cellules résistantes peut ainsi être diminuée d'un facteur 20 en présence de certains dérivés d'aurone, et rejoindre une valeur proche de celles observées dans les cellules sensibles (l'index de résistance tombe à 1,5 – 3, au lieu de 38 sans aurone, Figure 4). En outre, les aurones actives contre ABCG2 peuvent présenter des caractéristiques structurales différentes de celles employées pour inhiber ABCB1, notamment au niveau du cycle B. Il est donc possible de développer des molécules de cette famille spécifique à l'un ou l'autre de ces transporteurs [128]. Il est également possible de fonctionnaliser le squelette des aurones afin qu'elles inhibent les deux transporteurs à la fois dans le cadre d'une stratégie thérapeutique multi-ciblée. Des aurones 4,6,3',4'- ou 4,6,3',5'-tétraméthoxylées semblent en particulier réunir des éléments communs de relation structure-activité et permettre le ciblage des deux transporteurs [129].

2.2 ACTIVITÉS ANTI-TUMORALES

2.2.1 Inhibition de kinases CDK et SphK

Les kinases cycline-dépendantes (CDK) sont des enzymes essentielles pour la régulation du cycle cellulaire. Leur activité est altérée dans les cellules cancéreuses, ce qui provoque une prolifération cellulaire anarchique, ainsi qu'une instabilité génomique et chromosomique. Cependant, étant donné le rôle vital des CDK dans les cellules saines, il est difficile d'atteindre ces dernières dans les cellules tumorales sans réaliser d'importants dommages collatéraux. Le développement d'inhibiteurs sélectifs de certaines CDK permettrait de cibler de manière plus sélective les cellules cancéreuses et constitue donc un domaine d'exploration thérapeutique important [130]. Le flavopiridol est une flavone inhibitrice des CDK actuellement en phase II de développement clinique [131]. Malgré son potentiel, l'un des principaux axes d'amélioration possibles est sa sélectivité, relativement peu discriminatoire entre les CDKs 1, 2 et 4. Dans cette optique, des analogues ont été synthétisés et étudiés, notamment des aurones. Certaines de ces aurones ont montré des activités similaires au flavopiridol, ainsi qu'une sélectivité plus importante en faveur de CDK 1 par rapport à CDK 2 et CDK 4 (rapport IC_{50} CDK 4 / IC_{50} CDK 1 atteignant 200, contre 4 pour le flavopiridol, Figure 5) [132].

La sphingosine kinase (SphK) est une enzyme qui contrôle le taux cellulaire de lipides bioactifs. De nombreux éléments laissent à penser qu'elle joue un rôle important dans la

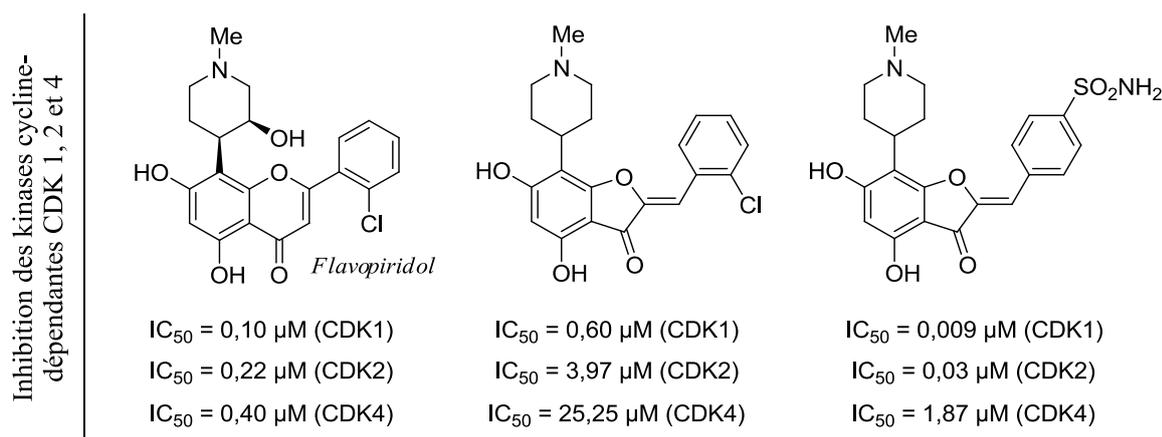


Figure 5. Inhibition des kinases cycline-dépendantes CDK1, CDK2 et CDK4 par des aurones et par le flavopiridol (utilisé comme référence).

croissance de tumeurs, mais le nombre restreint d'inhibiteurs n'a pour le moment pas permis d'utiliser cette cible pour des essais de traitement. Une étude parue en 2003 s'intéresse à plusieurs classes de composés permettant l'inhibition de cette enzyme. Parmi ceux-ci, la 3',4'-dihydroxyaurone présente une activité modérée sur l'enzyme *in vitro*, mais parvient à freiner sensiblement la croissance tumorale lors de tests *in vivo* (diminution de 50% à 18 jours). Cette étude préliminaire n'a néanmoins pas été suivie de travaux approfondis concernant la famille des aurones [133].

2.2.2 Cytotoxicité pour les cellules cancéreuses

D'autres dérivés d'aurone ont été identifiés comme de potentiels agents antitumoraux lors de tests de cytotoxicité sur cellules cancéreuses. Bien que l'hamiltrone (4,5,6-triméthoxy-3',4'-dihydroxyaurone), extraite d'*Uvaria hamiltonii*, présente une activité lors de tests de scission du double brin d'ADN [96], cette molécule ne s'est pas révélée cytotoxique pour des lignées cellulaires cancéreuses K562 (leucémie myéloïde). En revanche, des analogues ont montré des IC_{50} intéressants à l'échelle nanomolaire (50 – 150 nM), avec un arrêt du cycle cellulaire à la phase G_2/M , ce qui est cohérent avec un effet de liaison à la tubuline. L'efficacité des aurones est néanmoins réduite par rapport à celle d'un dérivé de chalcone (0,2 nM) [134]. Des tests de cytotoxicité sur une lignée cellulaire SGC-7901 (adénocarcinome gastrique) ont également montré une bonne activité des aurones parmi d'autres flavonoïdes. La 6-allyloxy-4'-trifluorométhylaurone présente notamment un IC_{50} de 3,05 μM , ce qui en fait l'un des meilleurs inhibiteurs de cette étude (Figure 6) [135]. Plus récemment, des dérivés d'aurone dans lesquels le cycle B a été remplacé par une pipérazine ont été évalués sur plu-

sieurs types de cellules tumorales, notamment HCCLM-7 (carcinome hépatocellulaire), Hep-2 (laryngocarcinome), MDA-MB-435S (adénocarcinome mammaire) et SW-480 (carcinome du colon). Deux composés se sont révélés cytotoxiques pour les quatre types de cellules, à une concentration plus faible que le fluorouracile, le médicament de référence. Ces molécules semblent conduire à l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G_0/G_1 . En outre, l'accumulation de cellules en phase sub- G_0 pourrait provenir d'un effet d'induction apoptotique de ces dérivés d'aurone [136].

2.2.3 Inhibition de l'angiogénèse

Le blocage de l'angiogénèse, le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux existants, est l'une des deux principales stratégies utilisées en chimiothérapie. C'est en particulier l'inhibition de la croissance des cellules endothéliales qui

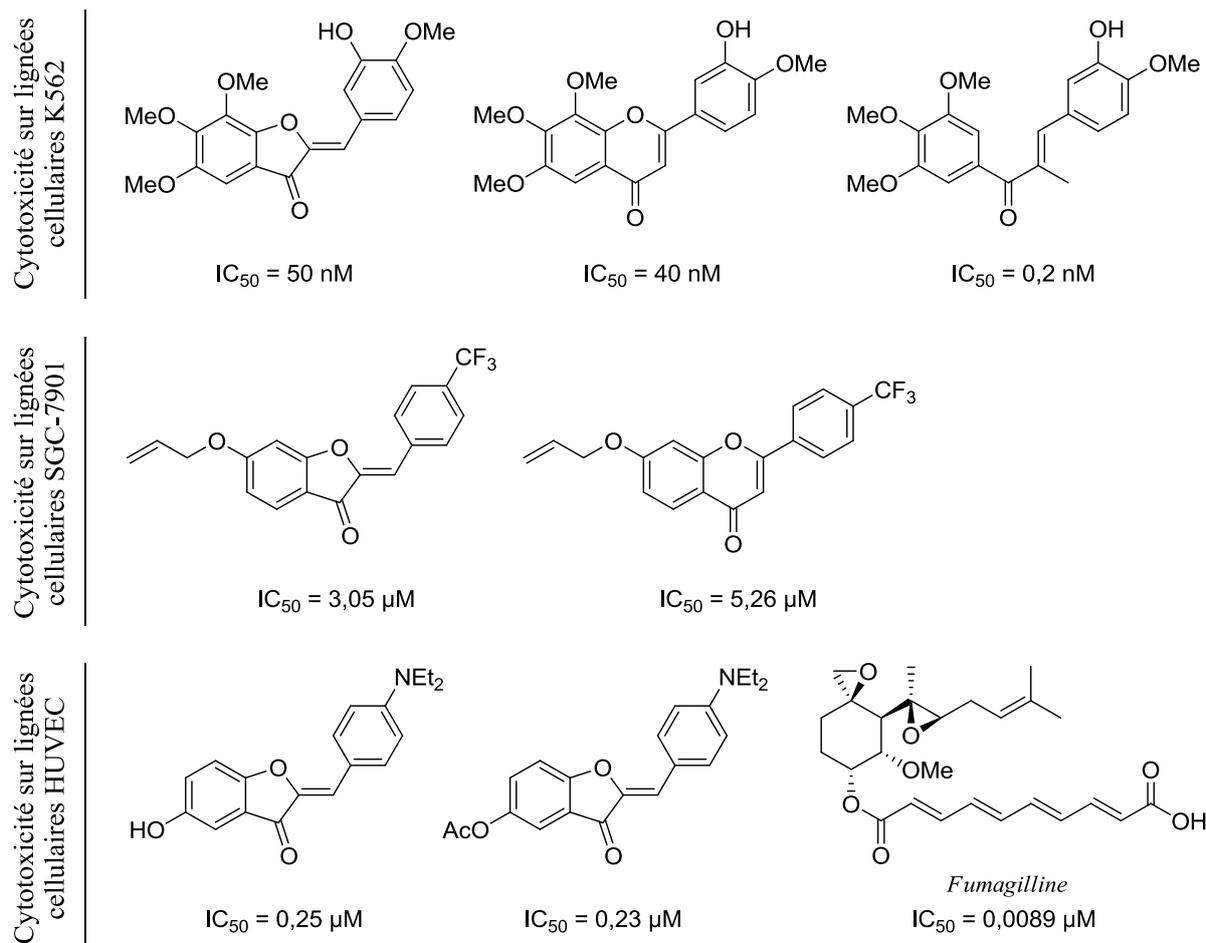


Figure 6. Activité de cytotoxicité sur des lignées cellulaires K562 (leucémie myéloïde), SGC-7901 (adénocarcinome gastrique) et HUVEC (impliquées dans l'angiogénèse tumorale) par des flavonoïdes et la fumagilline (utilisée comme référence).

permet de contenir la progression de la tumeur en la privant d'oxygène. Les aures ont été découvertes très récemment comme de potentiels inhibiteurs de la prolifération de cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Des dérivés de 5-hydroxy, 5-méthoxy et 5-acétoxyaures ont ainsi été testés, portant des groupements variés en position 4'. La présence d'un substituant diéthylamino en 4' semble constituer un élément déterminant, puisque les deux meilleurs inhibiteurs identifiés sont les analogues 5-hydroxyle et 5-acétoxyle portant ce groupement ($IC_{50} = 0,25$ et $0,23 \mu\text{M}$, Figure 6). Les effets inhibiteurs de ces deux composés sur la migration des cellules endothéliales et sur la formation d'une structure tubulaire ont également été mis au jour. Enfin, ces molécules permettent une inhibition importante de l'invasion des lignées cellulaires A549 (cancer du poumon) et MCF-7 (cancer du sein), ce qui révèle une multiplicité de modes d'actions très intéressante de ces aures pour le traitement potentiel de tumeurs [137].

2.3 ACTIVITÉS ANTIOXYDANTES ET CHIMIOPRÉVENTION DU CANCER

2.3.1 Induction de la quinone réductase

Les cellules des mammifères ont développé au cours de l'évolution des systèmes de défense contre la toxicité induite par des agents réactifs électrophiles et des espèces oxygénées radicalaires, qui constituent des causes majeures du développement de malignité dans l'organisme. Il est possible de stimuler ces défenses *via* la modulation de différentes cibles biologiques, afin de diminuer les risques d'apparition d'une tumeur. La flavoprotéine NAD(P)H:quinone oxydoréductase 1 (NQO1) est l'une de ces cibles. Sa surexpression est systématiquement observée en réponse au stress oxydant, et elle assure le traitement des quinones toxiques, le maintien sous forme réduite des composés antioxydants endogènes, et la stabilité de la protéine de suppression tumorale p53 [138]. Malgré une première étude peu concluante de l'induction de NQO1 par la sulfurétine et un dérivé méthoxylé [76], une large série d'aures a été synthétisée dans le but d'étudier cette induction plus avant. Les composés les plus actifs, des 4,6-diméthoxyaures, ont permis de doubler l'activité de NQO1 à une concentration de 150 – 200 nM (contre 20,7 μM pour la sulfurétine, Figure 7). De plus, ces travaux ont montré que les aures affectent majoritairement la voie de signalisation cellulaire AhR/XRE, l'un des deux mécanismes menant à l'induction de NQO1 [139]. Il est à noter que la propriété d'accepteur de Michael, ainsi que la présence d'une double liaison exocyclique et l'absence de proton acide en α du carbonyle, sont connues comme des éléments

structuraux favorisant l'induction de NQO1. À cet égard, et contrairement aux autres flavonoïdes, les aurones apportent donc un squelette parfaitement adapté [140,141].

2.3.2 Capture de radicaux oxygénés

Les aurones présentent également des activités antioxydantes permettant notamment la capture directe d'espèces réactives comme des radicaux libres oxygénés. Ainsi, lors d'un test de capture du radical stabilisé DPPH, certaines aurones naturelles issues de *Cotinus coggygria* ont présenté des activités intéressantes. Un dimère de sulfurétine a par exemple montré un IC_{50} de 9,7 $\mu\text{g/mL}$, une valeur inférieure à celles obtenues pour des antioxydants de référence (22 $\mu\text{g/mL}$ pour l'acide ascorbique, 21 $\mu\text{g/mL}$ pour le BHA) [66]. De même, des essais réalisés sur DPPH et sur le radical-anion superoxyde ont conduits à l'identification d'aurones plus actives que les deux molécules références décrites ci-dessus. Si les ordres de grandeur des IC_{50} restent proches pour le test de capture de DPPH ($IC_{50} = 8 - 23 \mu\text{M}$ pour tous les composés), certaines aurones présentent une activité 100 à 150 fois supérieure à celle de l'acide ascorbique lors du test au radical superoxyde (Figure 7) [12]. Ces dérivés particulièrement actifs portent des motifs catéchols et pyrogallols, ce qui confirme l'hypothèse émise par ailleurs que ces groupements contribuent à une activité antioxydante supérieure [142,143]. Une étude calculatoire de 2008 permet d'aller encore plus loin dans l'explication de l'activité antioxydante importante des aurones. Ainsi, la forte conjugaison et la structure particulière du cycle C des aurones participent à une délocalisation importante des radicaux phénoxy formés sur le cycle

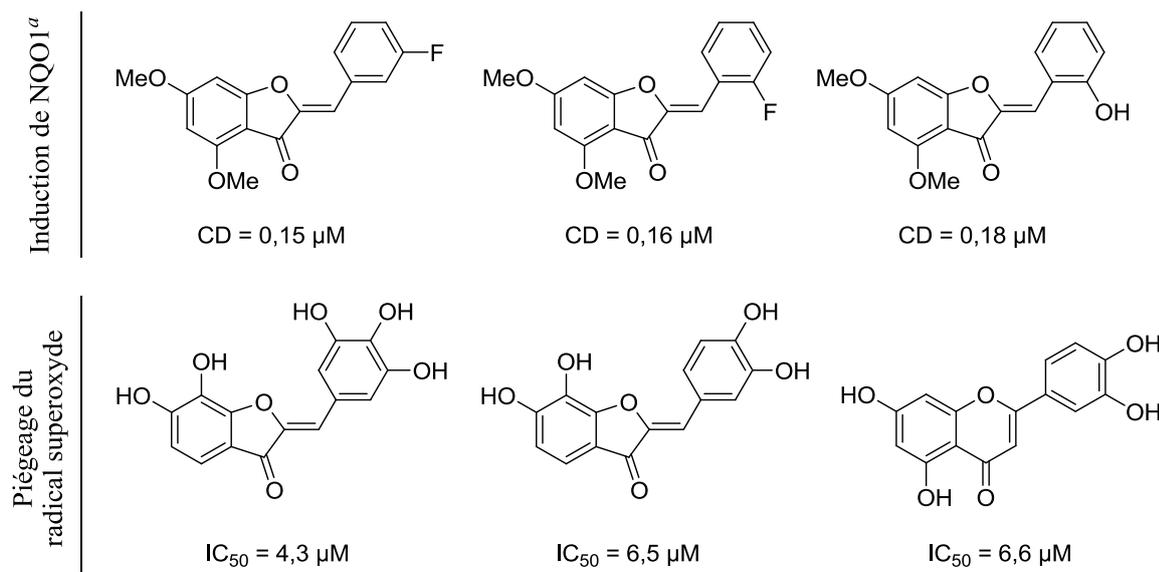


Figure 7. Activités d'induction de NQO1 et de capture du radical anion superoxyde par des aurones et la lutéoline. ^aCD est la concentration d'aurone nécessaire pour doubler l'activité de l'enzyme NQO1.

B sur certaines positions du squelette carboné. En particulier, les carbones 1' et 2 possèdent une densité de spin comparable à l'atome d'oxygène portant le radical, ce qui stabilise fortement ce dernier, évitant par ailleurs une trop grande réactivité du radical aurone formé [144]. Des développements plus récents incluant l'évaluation de dérivés d'aurones méthoxylés, notamment sur le capture d'H₂O₂, et de nouveaux calculs théoriques concernant des substitutions plus restreintes ont également été publiés [145,146].

2.4 ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES

2.4.1 Activités antiparasitaires

Les parasites et bactéries sont la cause de nombreuses pathologies humaines, et l'élimination de ces agents revêt un intérêt thérapeutique de premier ordre, par exemple pour le traitement du paludisme, de la leishmaniose (parasites), de la maladie de Lyme, ou d'infections nosocomiales (bactéries). Dans ce domaine quelques travaux portant sur l'activité des aurones ont été réalisés. Des études de Kayser *et al.* réalisées à la fin des années 1990 ont mis en évidence une activité antiparasitaires des aurones sur des espèces de *Leishmania* (responsables de la leishmaniose) et sur *Plasmodium falciparum* (responsable du paludisme). Une première étude portant sur le genre *Leishmania* a jeté les bases d'une relation structure-activité sommaire : les aurones les plus cytotoxiques pour ces parasites sont des dérivés peu substitués et particulièrement hydrophobes. En effet, l'ajout de groupements phénols sur les cycles A et B conduit à une forte diminution de l'activité [147]. Des investigations plus poussées ont montré que cette activité pouvait être imputée à l'inhibition de la fumarate réductase du parasite. L'activité de cette enzyme mitochondriale impliquée dans la respiration cellulaire est en effet réduite de 60 à 94% en présence des meilleures aurones à une concentration de 12,5 nM. En comparaison, la licoagrochalcone A, un dérivé de chalcone connu pour cette activité, inhibe l'enzyme à 46,6% dans les mêmes conditions (Figure 8) [148].

Les aurones permettent également l'inhibition du cycle érythrocytique du parasite *Plasmodium falciparum*, responsable du paludisme, à une échelle nanomolaire. Pour cette cible, les aurones les plus actives présentent de nombreux substituants oxygénés et hydrophobes, notamment des groupements méthoxyles et des acétoxyles. La 4,6,4'-triacétoxy-3',5'-diméthoxyaurone a en particulier montré des valeurs d'IC₅₀ de 7 et 180 nM contre les souches chloroquine-résistante (K1) et chloroquine-sensible (NF54) du parasite [149], alors que les meilleurs dérivés de flavone ont un IC₅₀ de l'ordre du micromolaire (Figure 8) [150,151]. Une

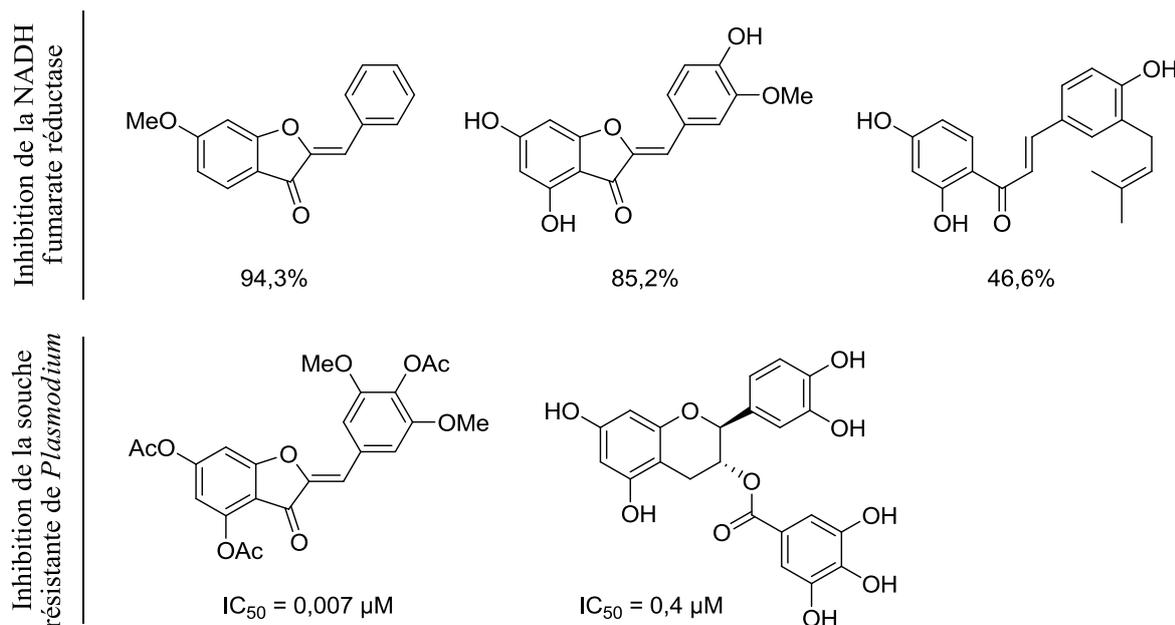


Figure 8. Inhibition de l'activité de la NADH fumarate réductase de *Leishmania* (en pourcentage d'inhibition à 12,5 μM), et inhibition de la croissance de la souche K1 de *Plasmodium falciparum* par des flavonoïdes.

autre étude menée au laboratoire a permis de déterminer les éléments structuraux avantageux pour l'activité anti-plasmodique. Il apparaît par exemple que le remplacement de l'oxygène intracyclique des aurones par un groupement NH mène à de meilleures activités. Le profil 4,6-diméthoxy ainsi que la présence d'un groupement hydrophobe en position 4' semblent également conduire à l'amélioration de l'efficacité des composés [152]. Enfin, l'inhibition de la croissance cellulaire du parasite *Cryptosporidium parvum*, responsable de diarrhées, a été réalisée *via* un test *in vitro* ELISA, et a mené à l'identification de plusieurs aurones actives à 25 – 100 μM , dont la sulfurétine [8].

2.4.2 Activités antibactériennes et antifongiques

Responsables des infections contractées en milieu hospitalier, les bactéries staphylocoques et streptocoques peuvent elles aussi être inhibées par des dérivés d'aurone. Des analogues 6,7-dihydroxylés ont par exemple permis de cibler la chorismate synthase, une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse bactérienne de l'acide shikimique, chez *Streptococcus pneumoniae*. Les composés les plus actifs comportent en outre un groupement phénol en position 2', ainsi qu'un éther en 4', et présentent des valeurs d' IC_{50} entre 200 et 700 nM (Figure 9) [153]. Des aurones modifiées au niveau du cycle B (remplacé par un cycle imidazole ou furane) ont permis de manière plus générale l'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, et d'autres bactéries à Gram positif comme *Bacillus subtilis*. Il a été

montré que le noyau benzofuranone constitue l'élément crucial pour l'activité de ces molécules, alors que ses substituants jouent un rôle secondaire (Figure 9) [154,155]. Des modifications plus profondes du squelette des aurones, et notamment le remplacement du groupement benzyldène par des motifs 2,2-bisaminométhyles, ont mené à des composés dont les activités antibactérienne et antifongique sont conservées, ce qui conforte le cycle benzofuranone comme pharmacophore [156]. Plus globalement, des travaux brevetés par Phytera Inc. ont évalué la capacité de plusieurs aurones synthétiques et de dimères d'origine naturelle à enrayer de nombreux types d'infections fongiques et bactériennes. Des tests *in vivo* effectués sur des souris infectées par *Candida albicans* ont conduit à un prolongement significatif de la survie des individus traités par des aurones (40% de mort à 16 jours) par rapport aux individus de contrôle (100%) ou traités par le fluconazole, un fongicide connu (70%) [49].

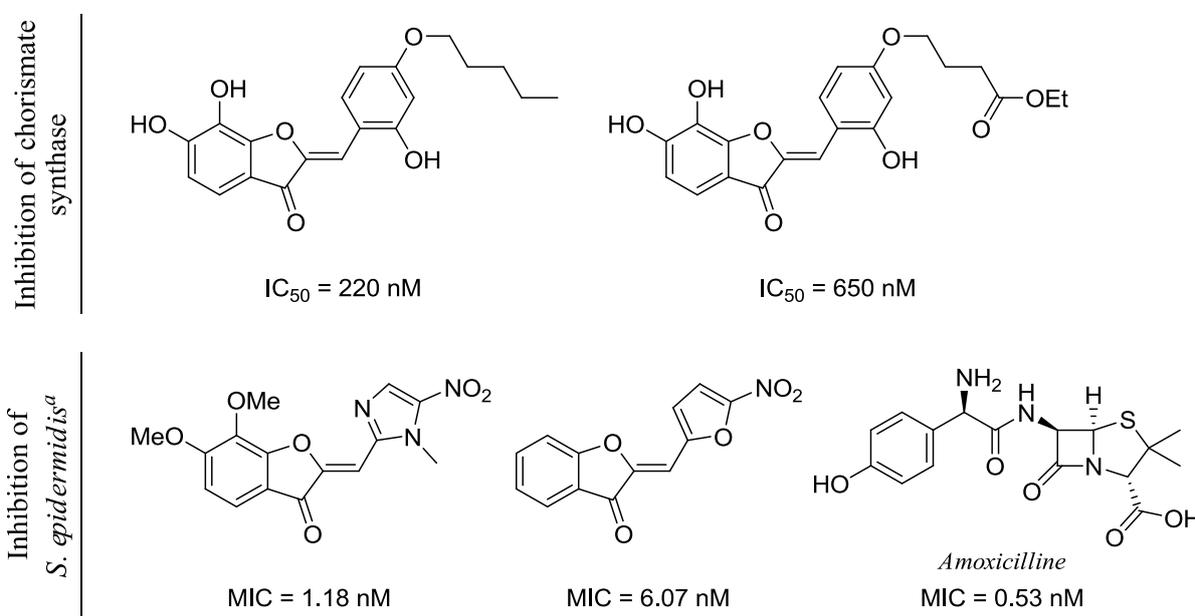


Figure 9. Inhibition de l'activité de la chorismate synthase de *Streptococcus pneumoniae* par des aurones ; et inhibition de la croissance de *Staphylococcus epidermidis* par des aurones et l'amoxicilline (utilisé comme référence). ^aMIC représente la concentration d'inhibiteur minimale requise pour observer une inhibition de croissance d'un micro-organisme après une nuit d'incubation.

2.5 ACTIVITÉS ANTIHORMONALES

L'iodothyronine déiodinase est une enzyme qui catalyse l'élimination d'un atome d'iode sur la thyroxine, une hormone thyroïdienne, menant à la formation de différents métabolites. Cette enzyme est surexprimée chez les patients atteints d'hyperthyroïdie, ce qui conduit à l'accumulation du métabolite T3 triiodothyronine [157]. Son inhibition a notamment été

étudiée *via* des extraits de plantes dont les propriétés antihormonales ont longtemps été utilisées en médecine traditionnelle. Parmi ces extraits, des aurones isolées, notamment l'auréusidine, la sulfurétine ou la 4,6,4'-trihydroxyaurone, ont été évaluées et font partie des meilleurs inhibiteurs non-halogénés de l'iodothyronine deiodinase, avec un K_i proche du K_m du substrat naturel. L'introduction d'un atome d'iode en position 3' de la 4,6,4'-trihydroxyaurone permet en outre de faire émerger une compétition avec le substrat (Figure 10). Des études conformationnelles de superposition entre ce dérivé et la thyroxine ont révélé que les cycles B et C de l'aurone, ainsi que la double liaison extracyclique, constituent un mime d'une partie de la structure de l'hormone et de sa version triiodée. D'autres éléments structuraux favorables ont été identifiés, notamment la présence de phénols dans les positions 4 et 4' [158,159].

Dans un autre domaine, des aurones extraites d'espèces de plantes du genre *Smilax* ont très récemment montré des activités de modulation des récepteurs d'œstrogène (ER). L'œstrogène est une hormone sexuelle qui influence de nombreux processus physiologiques chez les mammifères. Elle est notamment impliquée dans le développement de plusieurs pathologies, comme certains cancers. Cette influence hormonale est principalement due à l'activité des récepteurs d'œstrogènes, qui constituent donc une cible biologique [160]. Parmi les aurones ciblant ces protéines, la 4,6,4'-trihydroxyaurone et la 4,6,2',4'-tétrahydroxyaurone ont présenté des valeurs intéressantes d'inhibition de la liaison estradiol-ER lors de tests *in vitro* (Figure 10) [99].

2.6 ACTIVITÉS ANTI-INFLAMMATOIRES

L'inflammation est le résultat de la réaction des défenses immunitaires contre l'invasion de l'organisme par des agents pathogènes. Lors de ce processus, les cellules immunitaires sécrètent des cytokines, de l'oxyde nitrique ainsi que des prostaglandines, dont l'accumulation peut mener à des états pathologiques. L'inhibition de la production de ces éléments présente donc un intérêt médicinal pour lutter contre l'inflammation et contre certaines maladies auto-immunes. Le remplacement du groupement benzylidène des aurones par des motifs 2,2-bisaminométhyles a mené à la synthèse de composés capables d'inhiber la production de deux cytokines impliquées dans des processus inflammatoires : le TNF- α et l'interleukine-6. Le meilleur inhibiteur identifié est le dérivé 2,2-bispyrrolidinométhyle, qui bloque totalement la formation des deux cytokines à 10 μM [156].

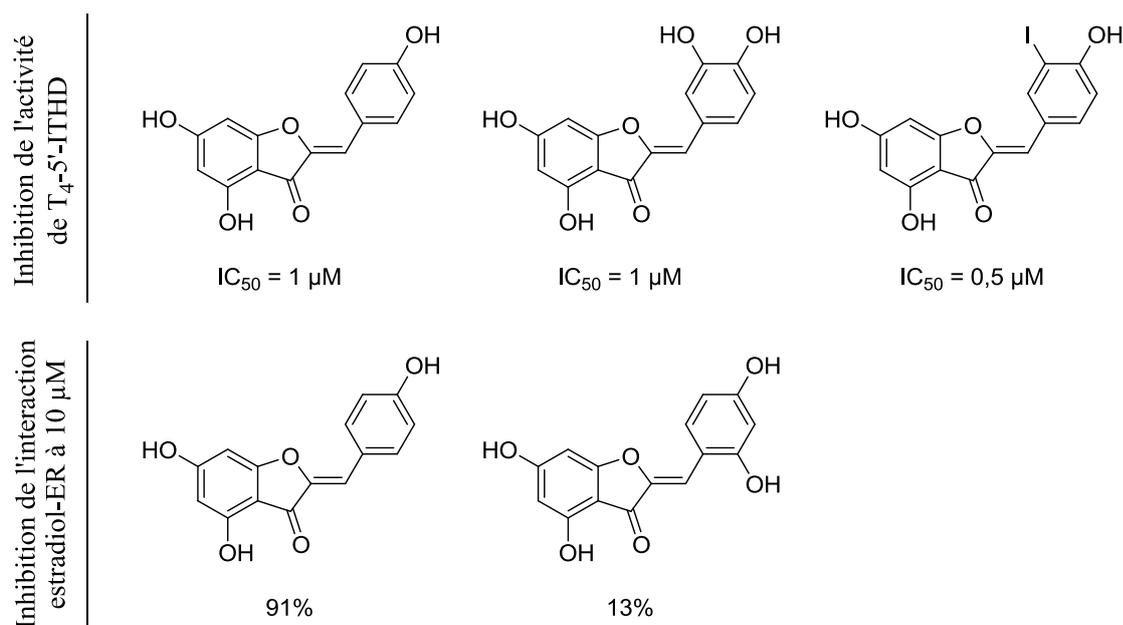


Figure 10. Inhibition de l'activité de la T₄-5'-iodothyronine monoiododéiodinase (T₄-5'-ITHD) par des aurones ; inhibition de l'interaction estradiol-récepteurs d'œstrogène (ER) après incubation pendant 2 heures avec 10 μM d'aurones.

Des analogues d'aurone plus classiques ont très récemment été identifiés comme inhibiteurs de la production d'oxyde nitrique et de prostaglandine E₂. À partir de la découverte de l'activité de la sulfurétine, l'influence de la substitution au niveau du cycle B a été explorée. Au final, peu de dérivés se sont réellement révélés actifs contre la production d'oxyde nitrique. En revanche, la modulation de la sulfurétine a permis de découvrir sept composés dont l' IC_{50} varie entre 1,06 et 2,50 μM . Néanmoins, la distribution des positions hydroxylées ou méthoxylées parmi ces composés actifs varie fortement et ne permet pas de dégager une relation structure-activité claire [161].

2.7 DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte progressive de fonctions mentales, notamment liées à la mémoire. La formation de plaques β -amyloïdes dans le cerveau est l'une des premières conséquences de ce processus. Le développement de molécules pouvant interagir spécifiquement avec ces plaques constitue donc un domaine d'une grande importance pour le diagnostic précoce de la maladie. Néanmoins, si de nombreuses sondes d'imagerie radiomarquées ont été rapportées, elles se reposent sur un nombre restreint de structures chimiques de base. L'utilisation de flavones radiomarquées à

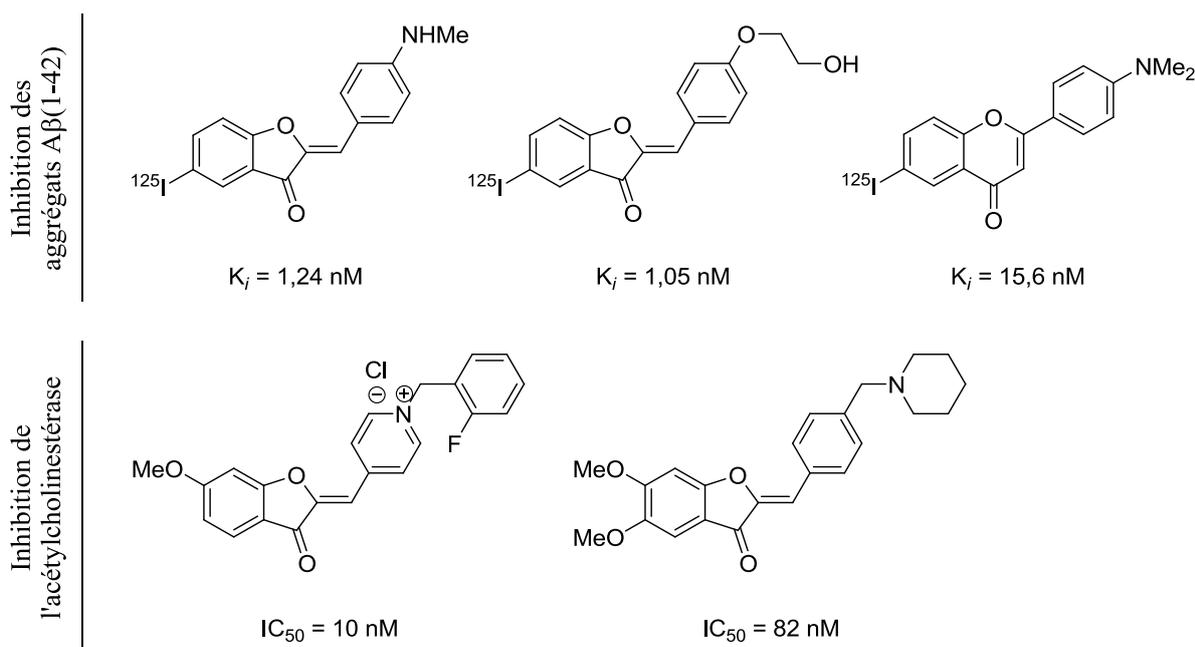


Figure 11. Constantes d'inhibition des peptides de plaques amyloïdes A β (1-42) pour des flavonoïdes radiomarqués ; inhibition de l'acétylcholinestérase par des dérivés d'aurone.

l'iode 125 comme nouveau squelette a été étudiée en 2005 [162], mais il s'est rapidement avéré que les aurones correspondantes 5-¹²⁵i-4'-aminées présentent à la fois une meilleure affinité ($K_i = 1,24 - 6,82 \text{ nM}$ contre $15,6 - 77,2 \text{ nM}$ pour les flavones, $1,2 - 2,8 \text{ nM}$ pour des agents d'imagerie connus, Figure 11) et une détection plus efficace des plaques diffuses, qui apparaissent à un stade très précoce de la maladie. En outre, elles permettraient une disparition plus rapide de la radioactivité due à un plus faible taux de liaison non spécifique au cerveau [163]. La modulation de ces molécules en position 4' a mis en évidence une grande tolérance pour de nombreux groupements à cette position, notamment hydroxyle, méthoxyle ou hydroxyalkoxy, qui présentent une affinité voisine des analogues aminés ($K_i = 1,05 - 3,36 \text{ nM}$) [164]. L'introduction de technétium ^{99m}Tc, un élément très fréquemment utilisé en médecine nucléaire, sur des flavones et aurones a plus récemment confirmé la meilleure affinité du noyau aurone pour les plaques β -amyloïdes [165].

Enfin, des aminométhylaurones et leurs analogues indanones ont été identifiés comme inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), et par ce biais peuvent constituer des outils thérapeutiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (au même titre que d'autres inhibiteurs comme le donépézil, un indanone, ou la rivastigmine). Les activités observées *in vitro* pour les aurones, qui sont du même ordre que celles observées pour les indanones correspondantes, sont presque toujours supérieures à celle de la rivastigmine ($IC_{50} = 0,082 - 1,54 \mu\text{M}$

contre 2,07 μM) [166]. Le remplacement du cycle B des aurones par un groupement *N*-benzylpyridinium permet d'améliorer fortement ces activités. En présence d'un substituant 6-méthoxy, d'un atome de fluor sur le cycle benzyle et d'un contre-ion adapté, deux composés révèlent même un IC_{50} plus faible que le donépézil, un médicament de référence (10 et 22 nM, contre 28 nM, Figure 11) [167].

2.8 ACTIVITÉS ANTIDIABÉTIQUES ET ANTI-OBÉSITÉ

L'aldose réductase (ALR2) est une enzyme qui catalyse notamment la réduction du glucose en sorbitol, ce qui constitue la première étape de la voie des polyols. Son activité est ainsi impliquée dans l'apparition du diabète. De même, la formation de produits de glycation avancés (AGE) est une conséquence de l'hyperglycémie prolongée et peut conduire au développement de complications comme la cataracte ou la neuropathie. Quelques flavonoïdes ont été identifiés comme inhibiteurs de l'activité d'ALR2 et de la formation des AGE. Parmi eux, la sulfurétine a révélé une valeur d' IC_{50} contre ALR2 similaire à celle du médicament epalrestat (1,3 μM). Néanmoins, si les flavonols se sont montrés moins actifs, un dérivé de chalcone a permis d'obtenir une valeur d'inhibition submicromolaire ($\text{IC}_{50} = 0,7 \mu\text{M}$). La sulfurétine s'est en revanche distinguée par son activité d'inhibition de la formation des AGE. Elle a en effet montré la meilleure valeur d' IC_{50} de l'étude, environ dix fois plus faible que celle de la référence aminoguanidine [168]. La sulfurétine a montré d'autres activités antidiabétiques intéressantes, notamment au niveau de la protection des cellules β du pancréas contre des dommages induits par les cytokines *in vitro*, et comme frein au développement général du diabète chez la souris [169].

La flavone OF (pour « *oleoyl formononetin* ») permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et possède également des propriétés contre l'obésité. Cette pathologie, caractérisée par la formation de nouveaux adipocytes pour stocker les lipides entraîne une forte augmentation de la masse corporelle qui peut mener à différentes pathologies parfois graves. Des analogues aurones substitués par des acides gras ont également montré des activités anti-obésité. L'adipogénèse est ainsi inhibée à 29% en présence du meilleur dérivé d'aurone à 100 μM (contre 2,5% pour OF), et la prolifération des adipocytes est ralentie de 57% par cette même molécule à 100 μM (contre 11% pour OF). Les aurones peuvent enfin permettre la stimulation de la consommation du glucose des adipocytes. Dans un milieu riche en glucose, la présence de 100 $\mu\text{g/mL}$ d'une aurone conduit en effet à la consommation de 4 – 6 mmol/L de glucose

après 24 heures d'incubation, ce qui est cependant moins qu'en présence d'OF (7,49 mmol/L) [170].

2.9 ÉLÉMENTS STRUCTURAUX DÉTERMINANTS, UN « COUTEAU SUISSE » THÉRAPEUTIQUE ?

À la lumière des activités biologiques décrites précédemment et des relations structure-activité entreprises par certaines études, le squelette des aurones semble pouvoir à la fois mener à une famille de molécules viables pour le développement de médicaments, mais également apporter une originalité structurale et fonctionnelle par rapport aux autres flavonoïdes. Ainsi, on peut identifier quelques relations entre éléments structuraux originaux et activités biologiques :

(a) les aurones sont des modulateurs de transporteurs ABC et des inhibiteurs de kinases souvent plus efficaces que les analogues flavones ou chalcones. Déjà énoncée par ailleurs [8], l'hypothèse d'un meilleur mime de l'adénine de l'ATP par la structure de base des aurones que par celle des flavones trouve dans ces activités observées un écho intéressant. En outre, la structure benzofuranone semble simplement mieux correspondre à la géométrie d'une purine, et la présence très courante d'un groupement phénol en position 4 pourrait également être à même de mimer le groupement amine porté par l'adénine.

(b) les aurones sont des inducteurs de NQO1. Il a par ailleurs été montré que le caractère particulièrement électrophile (accepteur de Michael) d'une double liaison extracyclique, par rapport à la double liaison intracyclique d'une flavone par exemple, permettait d'induire plus efficacement l'activité de NQO1 [141]. Or, les aurones sont les seuls flavonoïdes à présenter ce caractère structural qui semble déterminant pour l'activité de ces composés.

(c) les aurones sont des antioxydants efficaces, notamment au niveau de la capture de radicaux libres. Des études théoriques ont montré que les radicaux portés par le cycle B (notamment en position 4') des aurones et des flavones pouvaient être délocalisés [144,171]. Cela a pour effet de les stabiliser et ainsi permet une capture plus facile des radicaux. Mais, alors que la densité de spin observée pour une flavone reste presque uniquement concentrée sur le cycle B, la répartition pour une aurone est très différente : la position 2 possède une densité de spin particulièrement élevée qui stabilise fortement le radical. Cela est sans doute dû au caractère à la fois appauvri (par le carbonyle adjacent) et enrichi (par l'éther adjacent) en électrons

de cette position. Là encore, cette particularité ne se retrouve que chez les aurones parmi les flavonoïdes.

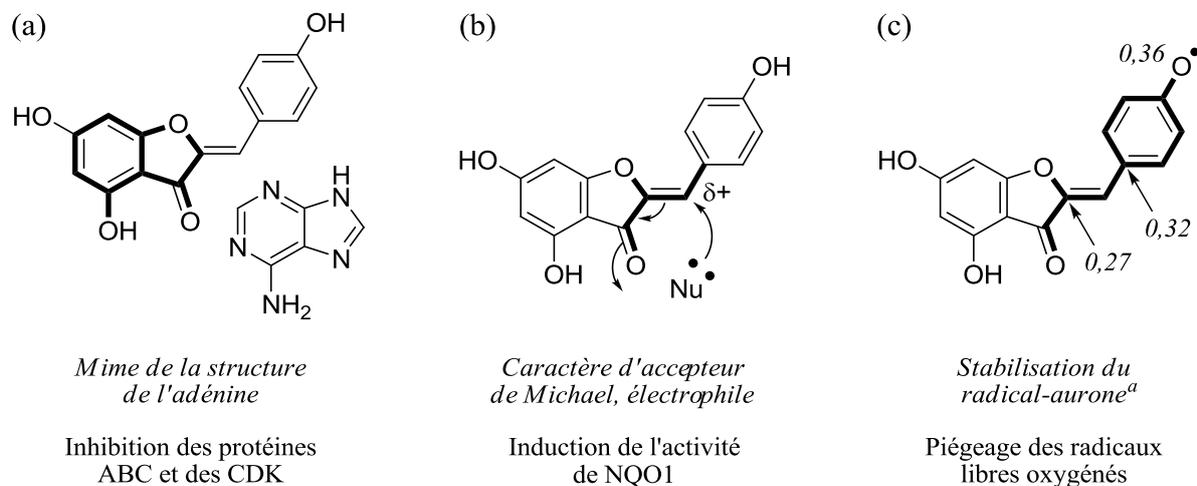


Figure 12. Trois particularités structurales apportées par le squelette des aurones, exemple de la 4,6,4'-trihydroxyaurone : (a) mime de la structure de l'adénine et donc de l'ATP ; (b) caractère d'accepteur de Michael et d'électrophile ; (c) stabilisation particulière du radical-aurone en position 4'. ^aLes nombres indiqués représentent les densités de spin aux positions correspondantes du radical.

Afin d'étudier de nouvelles activités biologiques associées à la famille des aurones, nous avons mené deux projets distincts portant sur l'inhibition de la tyrosinase, précédemment découverte au laboratoire, et sur l'inhibition de la polymérase du VHC, révélée par l'auréusidine, un représentant de la famille des aurones, préalablement à ce travail. Les deux parties suivantes seront donc consacrées à chacun de ces projets. Après une introduction décrivant le contexte et la pertinence de la cible thérapeutique choisie, nous présentons la synthèse des inhibiteurs, les tests biologiques, les relations structure-activité, ainsi que des études d'interactions menées au laboratoire ou en partenariat avec des équipes de biologistes et de chimistes théoriciens et inorganiciens.

Partie 3.

**INHIBITION DE LA POLYMÉRASE DU VHC
PAR LA FAMILLE DES AURONES**

Chapitre 1. L'hépatite C et son virus

1.1 L'HÉPATITE C

1.1.1 Découverte

Le terme « hépatite », provenant du grec « *hépar* » qui signifie « foie », désigne une inflammation de cet organe, qui peut être imputée à différents mécanismes. Responsable de très nombreuses fonctions vitales d'ordre nutritionnel, sanguin ou détoxiquant, le foie est l'un des organes humains les plus volumineux et l'un des plus complexes. De très nombreuses transformations chimiques s'effectuent en son sein : il prend en charge les substances que nous absorbons, les stocke, les transforme, et élimine les productions nocives de notre organisme. Si des pathologies du foie ont été observées depuis l'antiquité, notamment des épidémies d'ictère rapportées par Hippocrate [172], la possibilité d'une transmission virale de ces pathologies n'a été découverte que plus récemment. Dès la fin du XIX^e siècle, Lurman soupçonne l'existence de deux virus distincts, qui seront plus tard identifiés et nommés virus de l'hépatite A (VHA) et virus de l'hépatite B (VHB).

Cependant, en 1974 et 1975, des groupes de patients du New York Blood Center et du National Institut of Health contractent une hépatite après une transfusion sanguine, consécutive à une intervention chirurgicale. Il se révèle que cette hépatite n'est ni de type A, ni de type B. Le groupe de Prince *et al.* conclut son rapport par cette phrase : « *that a large proportion of long-incubation post-transfusion hepatitis is unrelated to hepatitis B, and that control of post-transfusion hepatitis will require identification of a hepatitis virus(es) type C* ». En 1989, après quinze ans de recherche, l'agent principal de la pathologie appelée hépatite non-A non-B est toujours inconnu, même si de nombreux indices laissent à penser qu'il s'agit d'un virus à enveloppe. Des études menées par clonage moléculaire mènent alors à l'identification

du virus de l'hépatite C [173]. Dans la foulée, un test de détection des anticorps au virus de l'hépatite C est développé, ce qui freine considérablement la transmission du virus [174]. Ce test manque cependant de sensibilité et de spécificité, et est remplacé par un test de seconde génération en 1992. Depuis, de nombreux progrès ont été accomplis dans la connaissance de l'hépatite C et du virus associé, ainsi que dans le diagnostic et le traitement de la maladie.

1.1.2 Épidémiologie générale

Reconnue d'importance globale et de répartition mondiale, l'hépatite C touche aujourd'hui entre 2,2 et 3,0% de la population du globe, soit approximativement de 130 à 170 millions de personnes [175]. La répartition de cette population infectée est inégale, et montre une prévalence très importante de la maladie dans certains pays comme l'Égypte, la Mongolie ou la Bolivie (plus de 10% de la population atteinte). À l'inverse, une prévalence très faible est observée dans les pays du nord de l'Europe et de l'Amérique. L'Afrique est clairement le continent le plus touché, et il est possible de corrélérer d'une manière plus générale la prévalence de la maladie avec le niveau de développement économique des différentes régions du monde. Le virus de l'hépatite C pouvant présenter de nombreux génotypes, ces derniers sont eux aussi inégalement représentés. Le génotype 1 est principalement présent en Amérique du nord et en Europe. En Asie, le génotype 1 est également présent et coexiste avec le génotype 2 en Chine, en Corée et au Japon, avec le génotype 3 en Inde et en Indonésie, et avec des génotypes plus rares, notamment le génotype 6, en Asie du sud-est [176]. L'Afrique est touchée par le génotype 2, notamment à l'ouest du continent, par le génotype 4, présent à l'est, au Moyen-Orient et surtout en Égypte où il concerne 90% des infections [177,178], et par le génotype 5, spécifique à l'Afrique du sud [179].

Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé une carte du monde représentant la prévalence de l'infection au VHC dans les différents pays. Cette carte est basée sur des données globales de l'Organisation Mondiale de la Santé et de nombreuses études indépendantes ou locales, toutes réalisées sur une période de dix ans, entre 1999 et 2009. Ces études, parfois réalisées sur une cohorte de quelques dizaines de personnes, peuvent être sujettes à caution pour certains pays où elles représentent néanmoins les seules données accessibles. La liste des références utilisées pour la construction de cette carte est disponible dans la section Bibliographie.

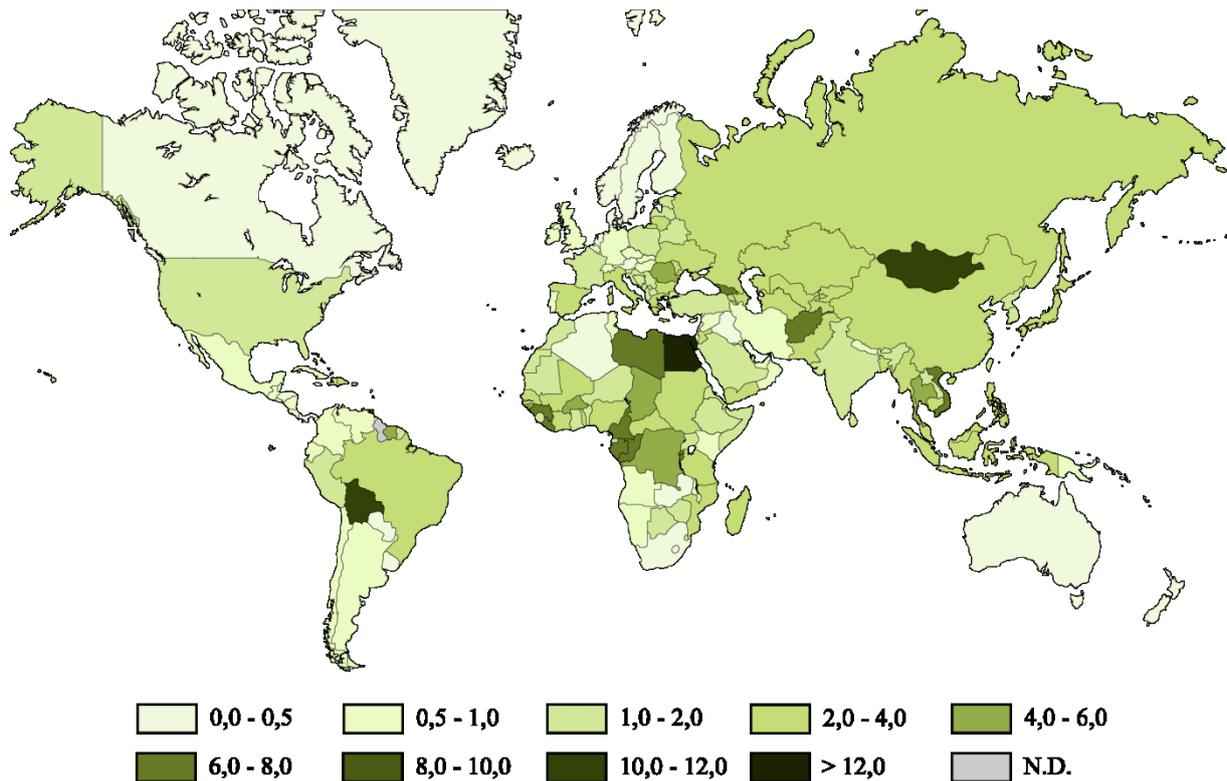


Figure 13. Carte représentant la prévalence de l'infection au virus de l'hépatite C (en pourcentage de la population de chaque pays), basée sur des données globales de l'Organisation Mondiale de la Santé et de nombreuses études indépendantes ou locales, toutes réalisées sur une période de dix ans, entre 1999 et 2009.

Le virus de l'hépatite C ne se transmet pas par un simple contact, un éternuement ou un échange de salive. S'il est possible de contracter le virus suite à un rapport sexuel non protégé ou par une transmission périnatale de la mère à l'enfant, ces deux types d'infection restent rares (respectivement jusqu'à 1% de risque par an [180], et 4 à 7% des cas [181]) et le virus est principalement transmis par le sang. Dans les pays développés, l'injection de drogues et l'échange de seringues est ainsi la première cause de transmission du virus. En effet, les injections thérapeutiques sont la plupart du temps assurées dans des conditions aseptisées et stériles, sous le contrôle de bonnes pratiques concernant les risques infectieux. De même, les transfusions sanguines sont réalisées uniquement avec du sang donné volontairement et bénévolement, et après de multiples précautions, incluant des analyses poussées en laboratoire. En revanche, dans les pays en voie de développement, l'utilisation de seringues usagées ou de techniques inadéquates pour les injections thérapeutiques facilite la transmission du virus. Le manque de moyens conduit également fréquemment les autorités locales à faire transfuser du sang à risque [182]. C'est l'une des principales causes de la prévalence particulièrement élevée de l'hépatite C dans ces régions du monde.

1.1.3 Symptômes et évolutions de la maladie

La forte prévalence de l'infection au virus de l'hépatite C dans le monde est conjuguée avec des symptômes parfois sévères et l'apparition fréquente d'hépatites aiguës ou chroniques. Aux États-Unis, l'hépatite C est la cause de 20% des cas d'hépatite aiguë. Après une période d'incubation oscillant entre 3 et 20 semaines, les symptômes cliniques apparaissent avec une sévérité variable chez environ un tiers des patients séropositifs. Ces manifestations durent de 2 à 12 semaines, avant un fréquent retour à la normale. Dans de rares cas, une hépatite fulminante au pronostic extrêmement sévère peut néanmoins survenir [183].

Malheureusement, environ 85% des patients atteints d'hépatite aiguë développent ensuite une hépatite chronique. Ce taux très élevé est une caractéristique de l'infection au virus de l'hépatite C. Les symptômes accompagnant la maladie chronique consistent souvent en une grande fatigue, des malaises ou un manque d'énergie chronique. L'apparition de nausées, de myalgies, d'arthralgies, la perte d'appétit ou de poids constituent des symptômes moins fréquents. Bien que rarement incapacitants, ces symptômes dégradent fortement la qualité de vie des patients [183]. Chez 20 à 30% des patients, la maladie évolue ensuite vers une cirrhose : des cellules endommagées du foie sont remplacées par du tissu cicatriciel qui entrave la circulation sanguine et mène à la destruction de nouvelles cellules, ce qui peut entraîner la perte de fonctions hépatiques. La santé du patient ne peut alors être restaurée qu'après une transplantation du foie. En 2002, 783.000 décès ont eu pour cause la cirrhose du foie, l'hépatite C étant en cause dans 17% des cas [184]. Le stade final de l'infection est atteint avec l'apparition d'un carcinome hépatocellulaire, le cancer primitif du foie. Ce dernier représente la troisième cause de mortalité liée au cancer dans le monde, avec 662.000 décès chaque année, et provient dans 80% des cas d'une hépatite virale chronique [185]. À ce stade, malgré les progrès effectués en matière de chirurgie, de transplantation du foie et d'ablation par radiofréquence, le taux de survie à cinq ans est estimé de 50 à 70% [186].

1.1.4 Co-infections et facteurs aggravants

Les symptômes observés lors des différents stades de la maladie peuvent être aggravés par d'autres facteurs. Pour l'hépatite C, il s'agit essentiellement des co-infections VHC-VHB et VHC-VIH. Dans le premier cas, la surinfection au VHC de patients déjà atteints par l'hépatite B mène plus facilement à une hépatite fulminante, et aggrave les symptômes de la phase aiguë de la maladie. Lors de la phase chronique, elle conduit également à une augmentation de 48% sur 10 ans du risque d'apparition d'une cirrhose, et de 32% sur 20 ans du risque

de carcinome hépatocellulaire. La surinfection au VHB de patients atteints par l'hépatite C est en revanche plus rare et ses effets sont moins connus. Par ailleurs, s'il a été prouvé que la combinaison des deux virus affecte de manière plus sévère les défenses immunitaires, la présence du VHC semble exercer une inhibition de la réplication du VHB jusqu'à atteindre de très faibles concentrations d'ADN viral. Le VHC prendrait ainsi le dessus lors de co-infections VHC-VHB [187].

La co-infection VHC-VIH représente un problème plus grave de santé publique. Dans le monde, environ 10 millions de personnes sont infectés par les deux virus. Dans les pays développés, la co-infection VHC-VIH concerne 25% des personnes séropositives au VIH, et 8% des personnes infectées par le VHC. La présence du virus du sida est responsable d'une augmentation du niveau d'ARN du VHC dans le plasma des patients co-infectés. Ces patients présentent également des risques de cirrhose et d'insuffisance hépatocellulaire plus importants. Pour cette dernière pathologie en particulier, le risque est six fois plus élevé pour les patients co-infectés que pour les patients infectés uniquement par le VHC. De même, entre 2000 et 2005, l'infection au VIH seule a conduit au décès de 19 patients sur 1000 par an, alors que la co-infection VHC-VIH a tué 57 personnes sur 1000 par an, soit trois fois plus [188].

Au-delà de ces co-infections, plusieurs facteurs entraînent l'accélération ou l'aggravation de la maladie. La consommation d'alcool par exemple, déjà responsable seule de la majorité des cirrhoses dans les pays occidentaux, conduit à une multiplication des risques lorsqu'elle est liée à une infection au VHC [189]. L'obésité est également un facteur aggravant, puisque les patients infectés qui présentent un indice de masse corporelle élevé ont un risque accru de développer une stéatose hépatique. Les patients atteints de diabète présentent également une augmentation de l'incidence de stéatoses, mais dans une moindre mesure [190]. Enfin, l'hépatite C progresserait plus rapidement chez les individus plus âgés et de sexe masculin.

1.2 LE VIRUS ET LES CIBLES THÉRAPEUTIQUES ASSOCIÉES

1.2.1 Description génomique et cycle de vie

Le VHC est un virus à enveloppe à brin d'ARN positif appartenant à la famille des Flaviviridae, dans laquelle se côtoient également les virus de la fièvre jaune ou de la dengue. Composé de 9000 à 9300 nucléotides, son génome code pour une polyprotéine d'environ

3000 acides aminés qui est ensuite clivée par des protéines virales pour délivrer les protéines structurales (protéine noyau C, glycoprotéines E1, E2 et peptide membranaire p7) et non-structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) indispensables pour la réplication, la traduction et le découpage de la polyprotéine. La polyprotéine et le découpage opéré en protéines fonctionnelles, qui a lieu au niveau du réticulum endoplasmique (ER), sont représentés en Figure 14 [191,192].

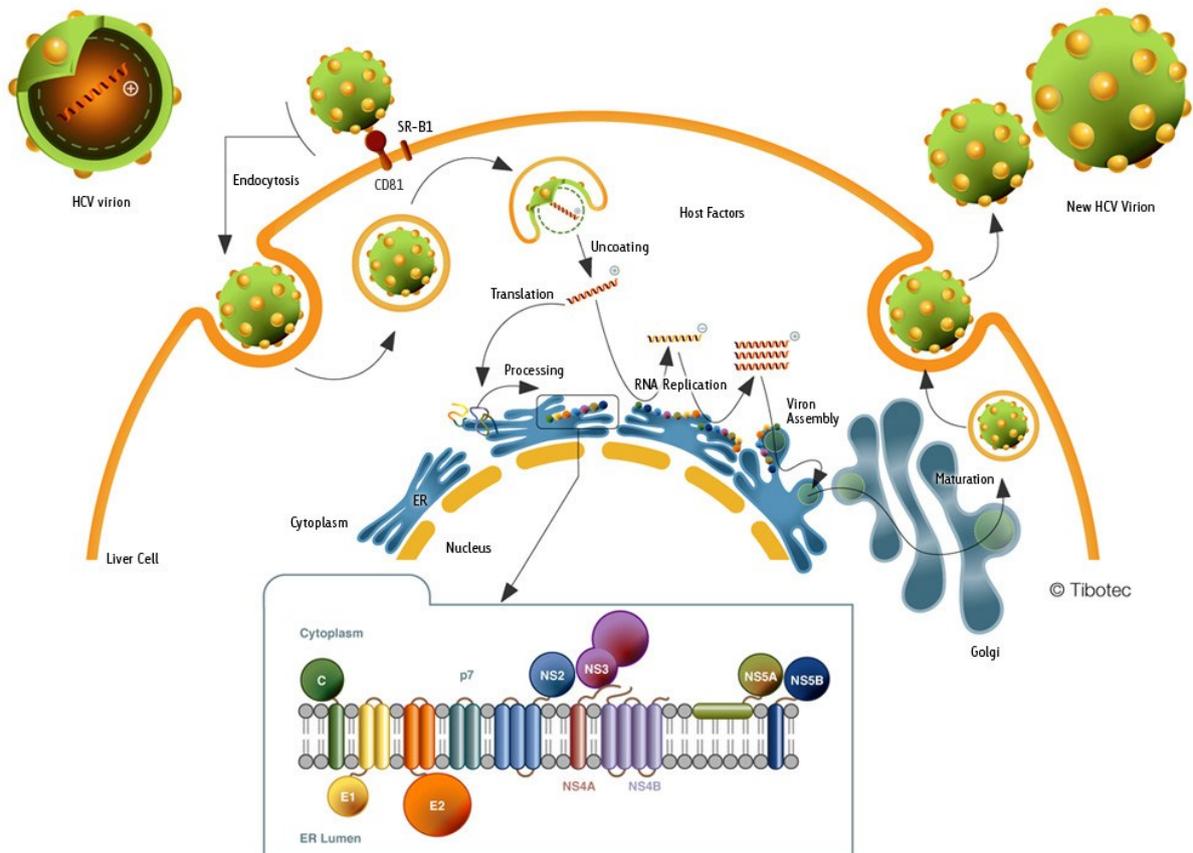


Figure 14. Cycle de vie du VHC dans la cellule infectée (en haut) et traitement de la polyprotéine associée avec découpage en plusieurs protéines fonctionnelles structurales et non-structurales (en bas) [193].

Commun à de nombreux virus, le cycle de reproduction du VHC dans la cellule présente plusieurs étapes : attachement à un récepteur à la surface de la cellule, pénétration, décapsidation, traduction de l'ARN viral en une polyprotéine, traitement de cette polyprotéine, réplication de l'ARN, assemblage de nouveaux virions et relargage à l'extérieur de la cellule infectée (Figure 14) [194]. Si ces étapes peuvent représenter autant de cibles potentielles pour le traitement de l'infection, les recherches se sont focalisées sur l'inhibition des protéines virales, notamment celles impliquées dans la réplication de l'ARN viral et dans le traitement de la polyprotéine.

1.2.2 Cibles thérapeutiques : des inhibiteurs aux traitements

Nous l'avons vu, le VHC présente une variété de génotypes très importante, ce qui rend la recherche de vaccins très difficile. En conséquence, à ce jour, aucun vaccin n'est disponible, et la recherche d'inhibiteurs de différentes cibles protéiques du virus constitue l'axe majeur de développement d'un traitement efficace. L'interféron- α (IFN- α), un médiateur de la réponse immunitaire antivirale, a été le premier traitement proposé dès 1986. Malheureusement le succès de la thérapie faisant intervenir IFN- α seul a rapidement montré des limites (6 à 12% de réponse à un traitement de 6 mois). L'ajout de ribavirine, un agent ciblant de nombreux virus à ADN et à ARN, a permis d'augmenter ce taux de réponse à 35-40% (Figure 15). En outre, le développement d'un interféron pégylé (PEG) a permis de prolonger la persistance du composé dans l'organisme et d'améliorer nettement son profil pharmacocinétique. La combinaison d'interféron pégylé et de ribavirine a conduit à une augmentation du taux de réponse au traitement jusqu'à 55% sur 6 mois [195]. Cependant, les patients atteints par le génotype 1 du virus, majoritaires dans le monde (notamment en Europe, en Amérique du Nord, en Amérique latine ou en Asie), présentent des taux de réponse au traitement qui restent particulièrement bas. En outre, malgré ces avancées, la découverte d'agents ciblant spécifiquement le VHC en combinaison avec les antiviraux non-spécifiques décrits précédemment semble nécessaire pour dépasser le seuil des 50% de réponse au traitement.

Dans cet esprit, de nombreux inhibiteurs ciblant des protéines clés du virus, principalement la protéase NS3/4A et la polymérase NS5B, ont été développés ces dernières années. En ce qui concerne la protéase, de nombreux inhibiteurs ont été découverts à ce jour. Les composés présentés en Figure 15 subissent actuellement des tests cliniques en Phase II, et permettent une inhibition de la protéase dans un système réplicon *in vitro* de l'ordre du nanomolaire [196]. Très récemment, deux dérivés développés par Merck et par Vertex ont été mis sur le marché : il s'agit du Boceprevir et du Telaprevir (Figure 15). Ces molécules permettent d'élever le niveau de réponse virologique vers 70%, ce qui constitue une étape cruciale dans l'optimisation des thérapies non-spécifiques actuelles. Le ciblage de la polymérase, qui est utilisée avec succès pour les virus du sida, de l'herpès et de l'hépatite B, est également intensivement étudié. Malgré de très nombreuses structures d'inhibiteurs développées, aucun composé n'a pour le moment passé les tests cliniques avec succès, essentiellement pour des raisons de toxicité. La recherche de nouveaux inhibiteurs de NS5B est maintenant un domaine d'intérêt primordial puisque la découverte d'un médicament ciblant cette enzyme, attendue par Melnikova pour l'horizon 2015, permettrait de mettre en place une polythérapie compre-

nant, outre le nouveau médicament en question, l'interféron pégylé, la ribavirine et l'un des deux inhibiteurs de NS3/4A sur le marché. Le taux de réponse d'une telle thérapie est aujourd'hui estimé à 90% (Figure 16) [197].

Ce projet s'inscrit dans ce processus de recherche de nouvelles structures pour le développement d'inhibiteurs de NS5B efficaces et présentant non seulement un profil pharmacologique intéressant, mais aussi une toxicité moindre.

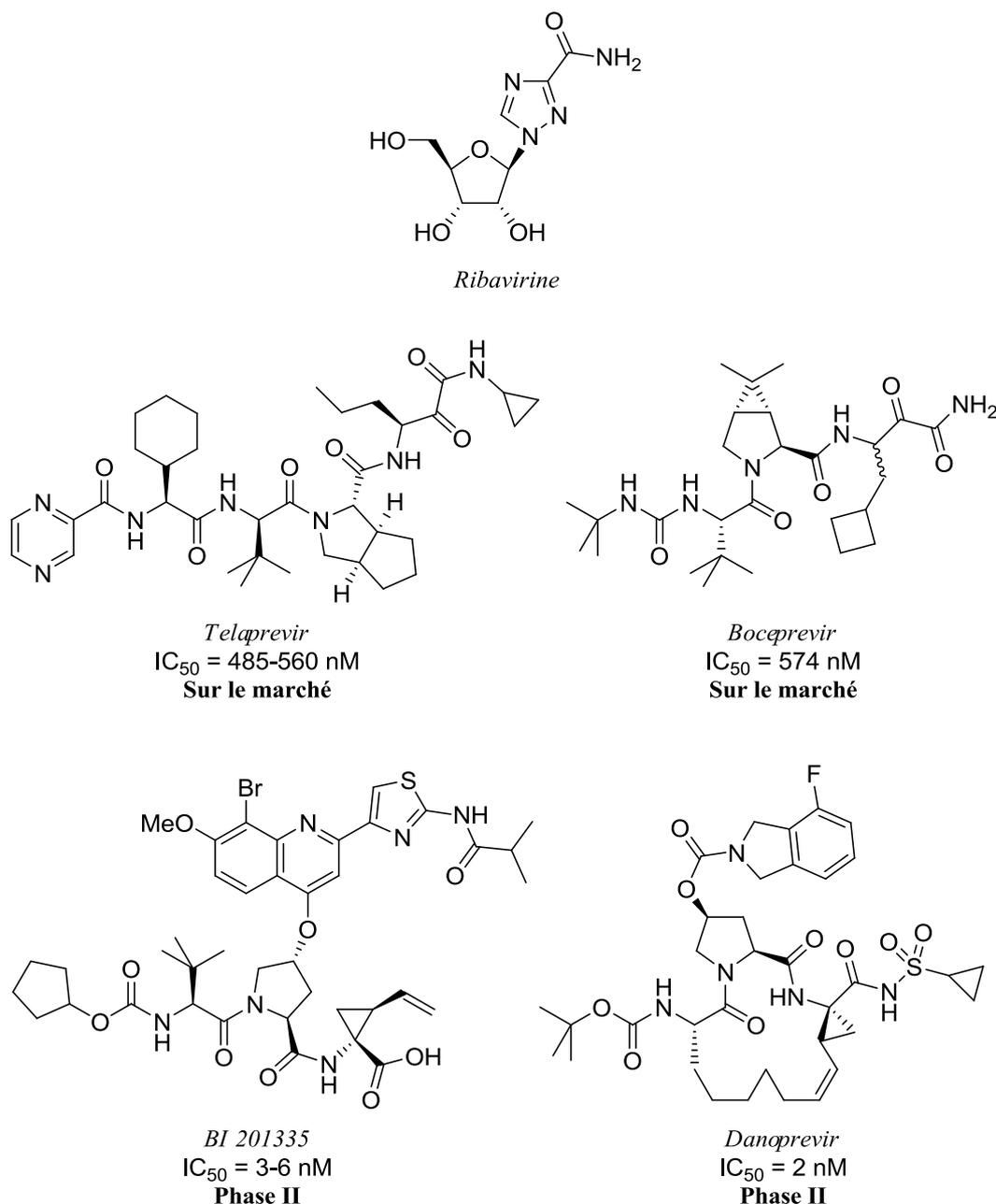


Figure 15. Structure de la ribavirine et de quatre inhibiteurs de la protéase NS3/4A : le Telaprevir et le Bocoprevir qui ont été très récemment mis sur le marché, et deux inhibiteurs en cours de tests cliniques, et activités associées sur modèle cellulaire réplicon.

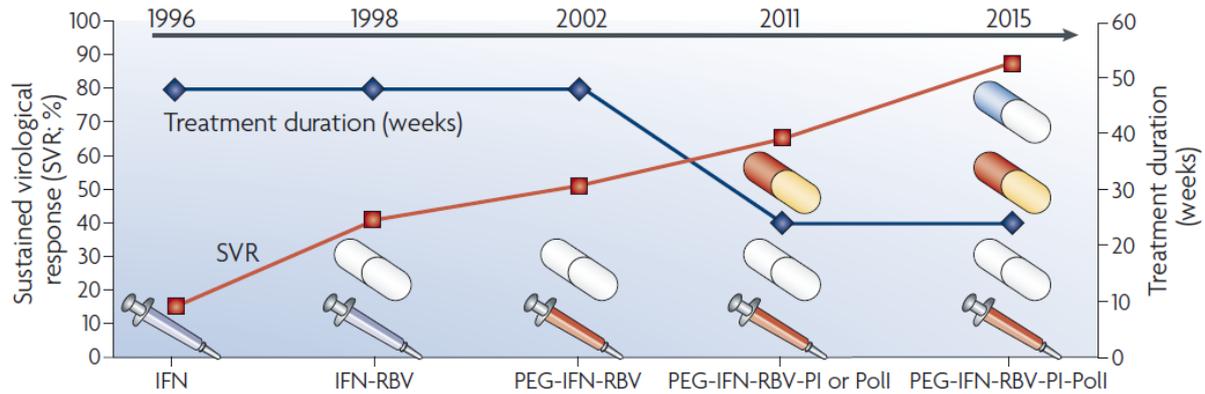


Figure 16. Évolution du taux de réponse virale de la thérapie contre l'hépatite C dans le temps (IFN : interféron ; RBV : ribavirine ; PI : inhibiteur de la protéase NS3/4A ; PolI : inhibiteur de la polymérase NS5B [197]).

1.3 LA POLYMÉRASE NS5B ET SES INHIBITEURS

1.3.1 Structure de l'enzyme et inhibiteurs nucléosidiques

La polymérase NS5B fait l'objet de recherches intensives, en particulier depuis une dizaine d'années, afin de découvrir des inhibiteurs susceptibles d'atteindre la mise sur le marché. L'enzyme possède une structure tridimensionnelle qui ressemble à une main droite, et des domaines distincts de sa séquence ont été nommés en conséquence. Ainsi, trois domaines principaux ont été identifiés : les domaines « Thumb » (pouce), « Palm » (paume) et « Fingers » (doigts). À l'intersection de ces domaines se trouve une cavité qui joue le rôle de site actif. C'est à ce niveau que l'ARN viral est lu et que les nucléotides sont polymérisés en vue de la réplication. De nombreux inhibiteurs de type nucléosidique ont ainsi été développés afin de contrecarrer cette réplication au niveau du site actif, dans une stratégie de mime des substrats naturels de l'enzyme. Quelques exemples d'inhibiteurs de ce type sont présentés en Figure 17 [198].

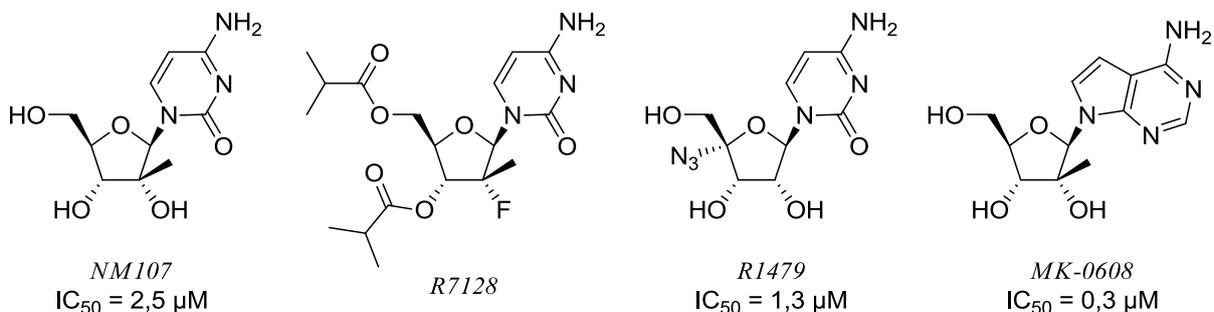


Figure 17. Structure d'inhibiteurs nucléosidiques de la polymérase NS5B et activités associés sur modèle cellulaire réplicon.

Cependant il existe également des sites allostériques où se fixent des structures non-nucléosidiques très variées. Les principaux sites sont au nombre de quatre et sont nommés en fonction du domaine où ils apparaissent : « Thumb I », « Thumb II », « Palm I » et « Palm II » (Figure 18). Constitués de cavités ou de crevasses présentes à la surface de la protéine, ces sites permettent d'entraîner la déformation du site actif de l'enzyme lorsqu'un inhibiteur est fixé. Ceci conduit à une perte de l'affinité pour les nucléotides, et donc de l'activité de réplication de NS5B. De plus, les sites allostériques étant spécifiques de cette enzyme particulière, le développement de molécules pouvant s'y fixer permet d'espérer une meilleure sélectivité que pour des analogues nucléosidiques. De nombreux inhibiteurs allostériques de NS5B sont ou ont été évalués en tests cliniques, sans toutefois parvenir à les franchir avec succès [199].

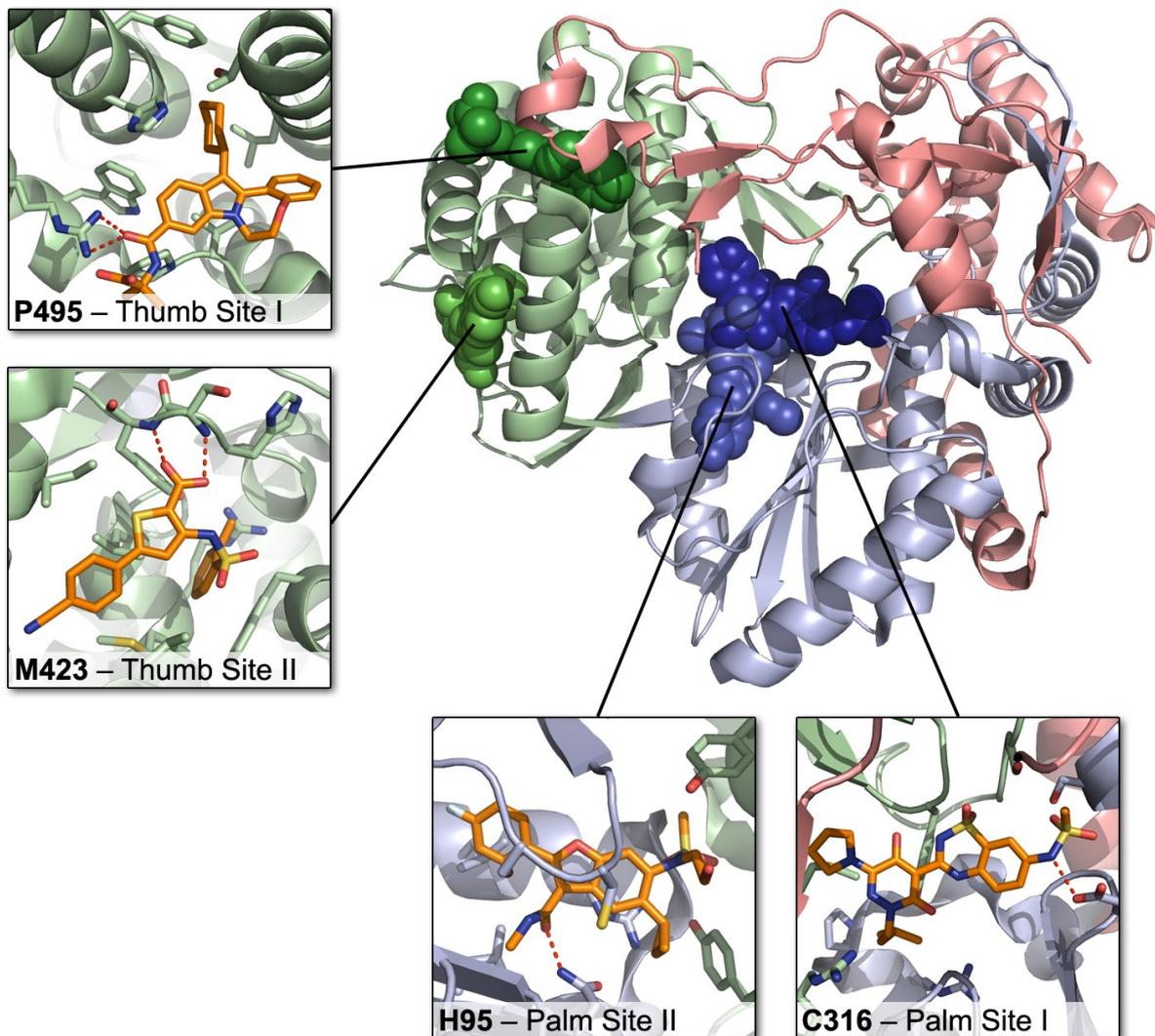


Figure 18. Structure RX tridimensionnelle de la protéine NS5B avec ses trois sous-domaines (« Fingers » en rouge, « Palm » en bleu et « Thumb » en vert) et ses quatre sites allostériques principaux, occupés ici par des ligands co-cristallisés ; les mutations clés associées à chaque site pour la mutagenèse sont indiquées en gras.

1.3.2 Inhibiteurs du site allostérique « Palm I »

Situé à proximité du site actif, le site « Palm I » a été exploité initialement avec la famille des benzothiadiazines. Reportée en 2001, la découverte par la société GlaxoSmithKline de la première structure de benzothiadiazine *via* le screening d'une collection de composés a permis le lancement de plusieurs projets d'optimisation du « *hit* » initial [200]. L'étude des substitutions sur les deux cycles a permis d'identifier notamment l'importance de la présence de groupements sulfonamide ou amidoalkoxy en position 7' [201], ainsi que des effets bénéfiques provenant de la présence de substituants, notamment fluoro, sur la partie quinolinone de la molécule [202]. Le remplacement du noyau quinolinone par un cycle unique azoté, puis par divers hétérocycles a permis, tout en conservant l'activité, d'améliorer le profil pharmacocinétique de la famille [203,204]. Récemment, le développement d'analogues à motif dialkylnaphtyridone a conduit à l'obtention des meilleures activités observées parmi les benzothiadiazines, atteignant des valeurs sub-nanomolaires (l'un des dérivés les plus actifs *in vitro*

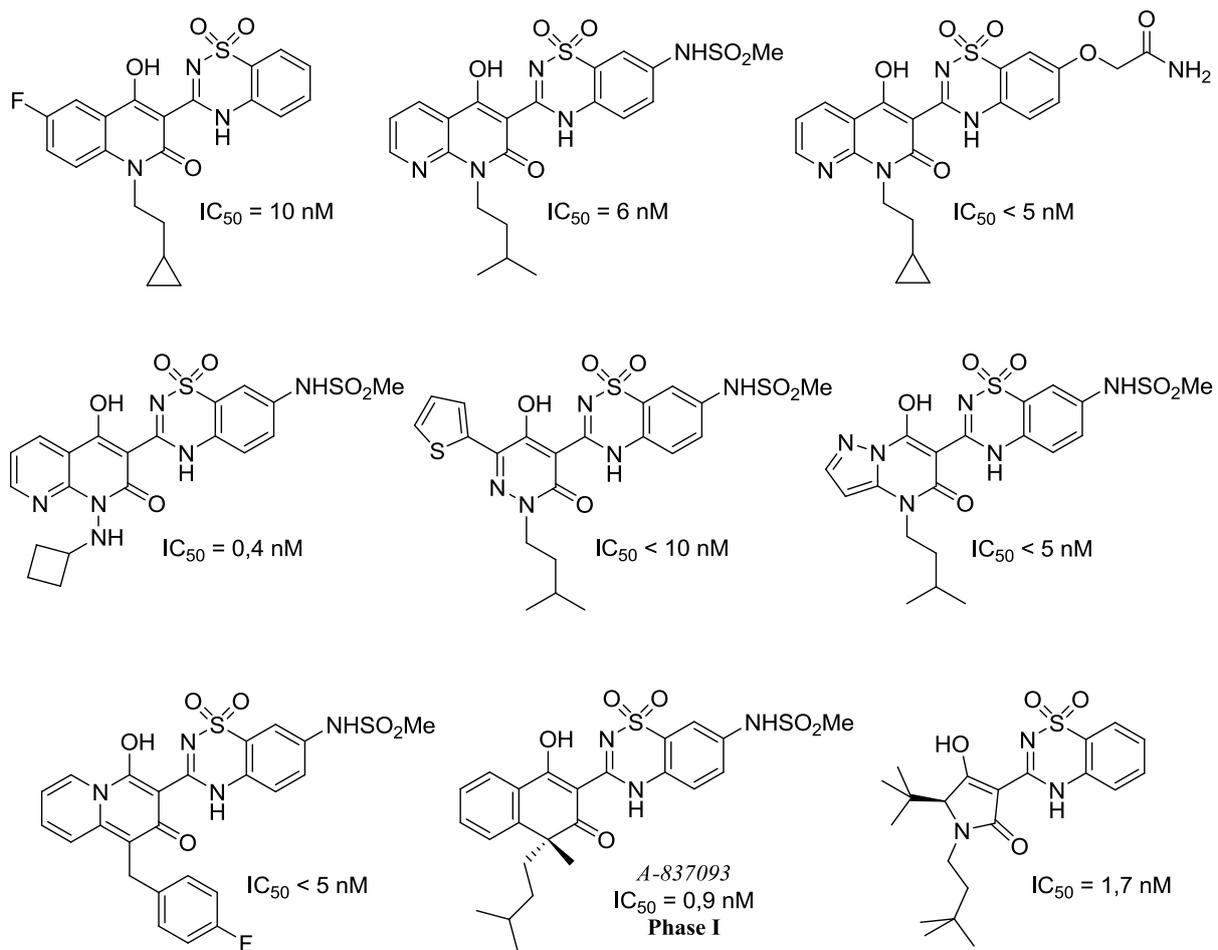


Figure 19. Structures de dérivés de type benzothiadiazine utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Palm I ».

possède un IC_{50} de 0,6 nM [205]. La présence d'un centre chiral à l'emplacement de l'azote de la quinoline originale permettrait en effet de mieux occuper l'espace disponible dans une petite poche hydrophobe annexe au site « Palm I ». D'autres analogues, notamment d'acide tétramique, ont été développés, sans produire néanmoins de réelles améliorations [206]. Au total, les investigations menées autour de cette famille d'inhibiteurs ont conduit à une cinquantaine de publications et à un grand nombre de brevets, synthétisés dans une revue très récente [207]. Quelques dérivés de benzothiadiazine sont aujourd'hui en phase préclinique, comme ABT072 (Abbott), en phase I de test clinique, comme A-837093 (Abbott, Figure 19), ou en phase II, comme ANA598 (Anadys Pharmaceuticals) et ABT333 (Abbott). La plupart de ces structures n'ont pas été révélées à ce jour.

D'autres familles de molécules ont été identifiées comme inhibiteurs de NS5B par le biais d'une fixation au site « Palm I ». Ainsi, des dérivés d'acylpyrrolidine [208], de proline sulfonamides [209], d'acide acrylique [210,211], d'acide anthranilique [212], de rhodanine [213], de benzodiazépine [214], et d'isothiazole [215], ont été développés ces dix dernières années (Figure 20). Ces composés montrent des activités qui restent inférieures à celles des benzothiadiazines : plus petites que ces dernières, ces molécules interagissent seulement avec une partie de la poche, ce qui limite probablement leur affinité pour la protéine. Il en résulte

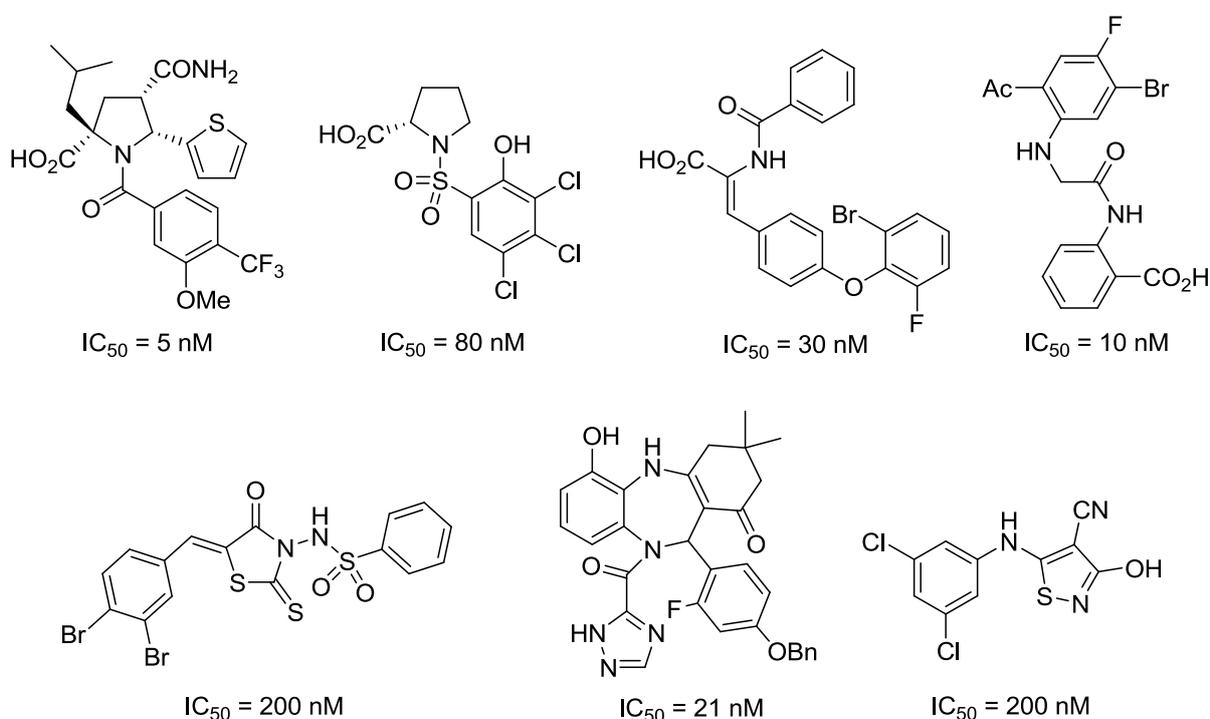


Figure 20. Structures de dérivés provenant de diverses familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Palm I ».

des valeurs d' IC_{50} souvent de l'ordre de la dizaine de nanomolaires, pour les meilleurs inhibiteurs. Les dérivés d'isothiazole présentent un mode de fixation original puisqu'une liaison covalente (pont disulfure) est créée entre l'atome de soufre d'une forme ouverte de l'isothiazole et la cystéine 366 [215]. Outre les benzothiadiazines mentionnées ci-dessus, un inhibiteur se fixant sur le site « Palm I » et dont la structure n'est pas révélée à ce jour est actuellement en cours de tests précliniques : il s'agit d'IDX375 (Idenix Pharmaceuticals).

1.3.3 Inhibiteurs du site allostérique « Palm II/III »

En partie superposé au site « Palm I », le site « Palm II » n'admet que très peu de molécules comme ligands. Des dérivés de benzofurane constituent les principaux substrats, dont un représentant découvert par ViroPharma, HCV-796 ($IC_{50} = 40$ nM), est entré en phase II de tests cliniques, avant d'être retiré pour des problèmes de toxicité [216,217]. Si des analogues tricycliques ont été synthétisés et brevetés récemment [218], très peu de composés de cette classe ont été rapportés au final. Plus récemment, une autre famille de substrats a été découverte : il s'agit de dérivés d'oxyfluorobenzamides. Ces composés se fixent au niveau du site « Palm II », mais une partie de la molécule atteint une autre poche jusqu'ici inexplorée que les auteurs nomment « Palm III », bien qu'elle soit à proximité directe des deux sites allostériques associés [219]. Cette dernière famille n'a pas mené à plus de développements pour le moment et reste peu efficace, comparée à d'autres classes d'inhibiteurs (Figure 21).

1.3.4 Inhibiteurs du site allostérique « Thumb I »

Le site « Thumb I », formant une poche hydrophobe relativement éloignée du site actif de la protéine, a été exploité dès le début des années 2000. À partir de composés identifiés par des screenings à grande échelle, notamment réalisés par les sociétés Boehringer et Japan Tobacco, la famille des benzimidazoles a été étudiée de manière intensive depuis lors. Les premiers éléments de relation structure-activité ont permis de dessiner un profil de substitution minimal : la présence d'un acide carboxylique en position 5, l'alkylation de l'un des atomes d'azote par un groupement cyclohexyle, ou encore l'introduction de différents cycles aromatiques, notamment phényle et furyle, en position 2, ont montré des effets bénéfiques pour l'activité [220]. Des études plus poussées ont ensuite cherché à optimiser les groupements présents en positions 2 et 5. Ceci a conduit à l'apparition de dérivés plus travaillés, comportant soit un motif polycyclique en position 2 [221], soit une chaîne alkyle complétée par un groupement aromatique et liée par une liaison amide en position 5 [222,223].

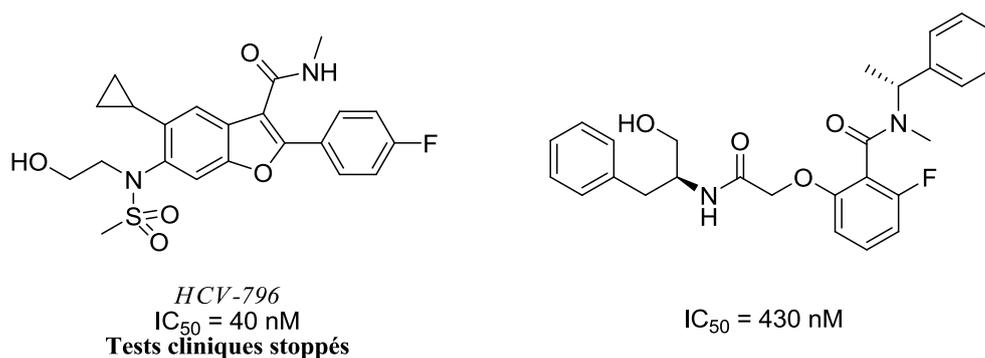


Figure 21. Structures de dérivés provenant de deux familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Palm II ».

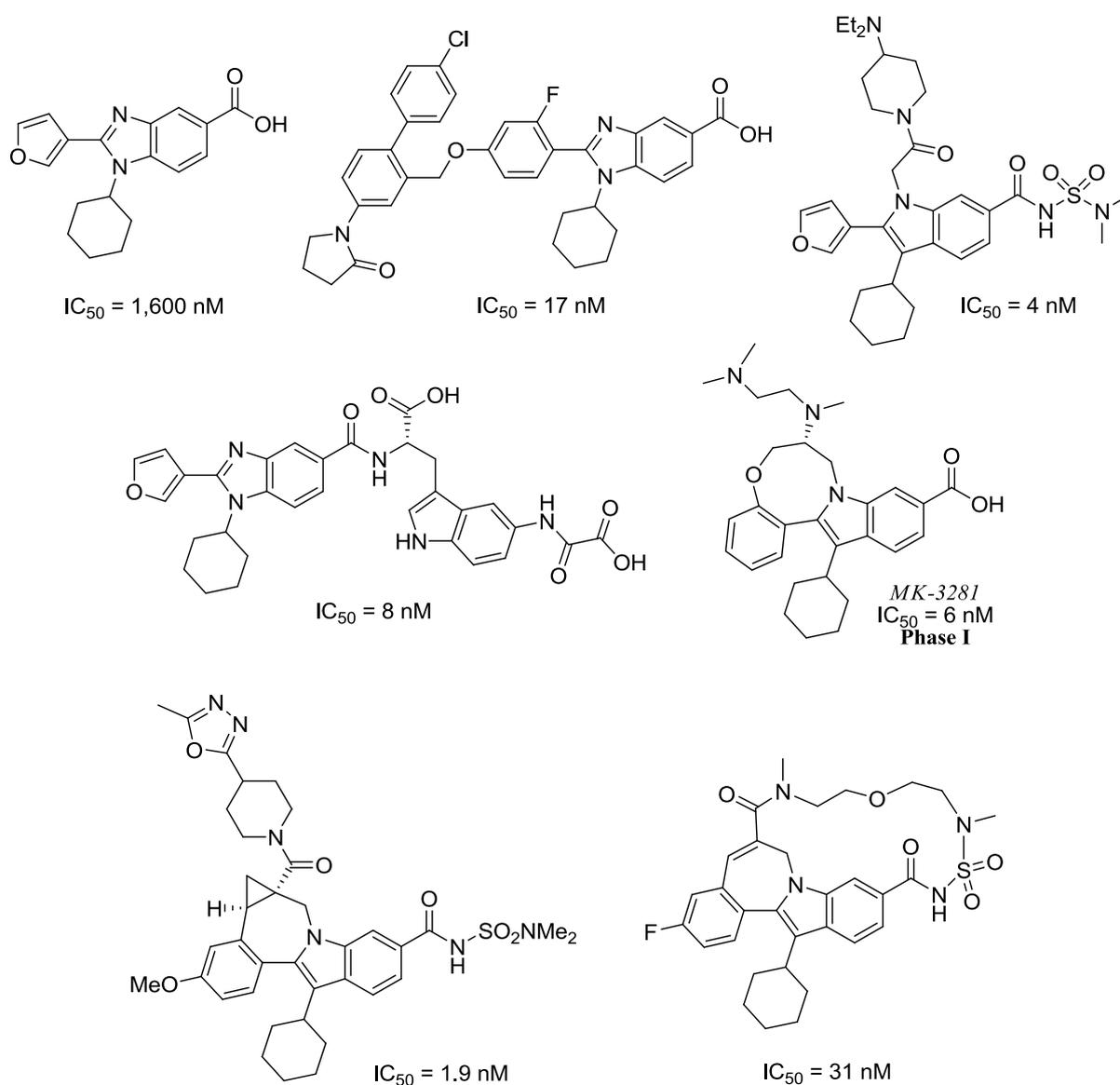


Figure 22. Structures de dérivés de type benzimidazoles et dérivés utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Thumb I ».

La transposition du squelette benzimidazole à un squelette indole a permis de déplacer le cyclohexyle en position 3 et de greffer de nouveaux substituants dérivés de type acétamide sur l'atome d'azote [224,225]. Ces modifications ont mené à l'identification du premier dérivé à activité nanomolaire *in vitro* ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$) [226]. Enfin, des composés plus complexes tétra- ou pentacycliques ont plus récemment vu le jour, et ont mené à l'amélioration simultanée de l'activité des composés et des paramètres pharmacocinétiques associés [227,228]. La phase I de tests cliniques du composé tétracyclique MK-3281 a d'ailleurs récemment été achevée [229] (Figure 22). Il est à noter qu'un autre dérivé de benzimidazole de structure inconnue se trouve actuellement en phase II de tests cliniques : il s'agit de BI207127, développé par Boehringer Ingelheim. Des dérivés de la famille des benzimidazoles ont également été développés, notamment des pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidines [230], des quinoxalines [231], et des acides pyrazolyméthylacryliques [232]. Ces composés tentent de mimer le profil de substitution des benzimidazoles tout en proposant un noyau hétérocyclique alternatif. Peu d'exemples ont été rapportés, mais des valeurs d' IC_{50} intéressantes ont été atteintes par certains représentants de ces familles (Figure 23).

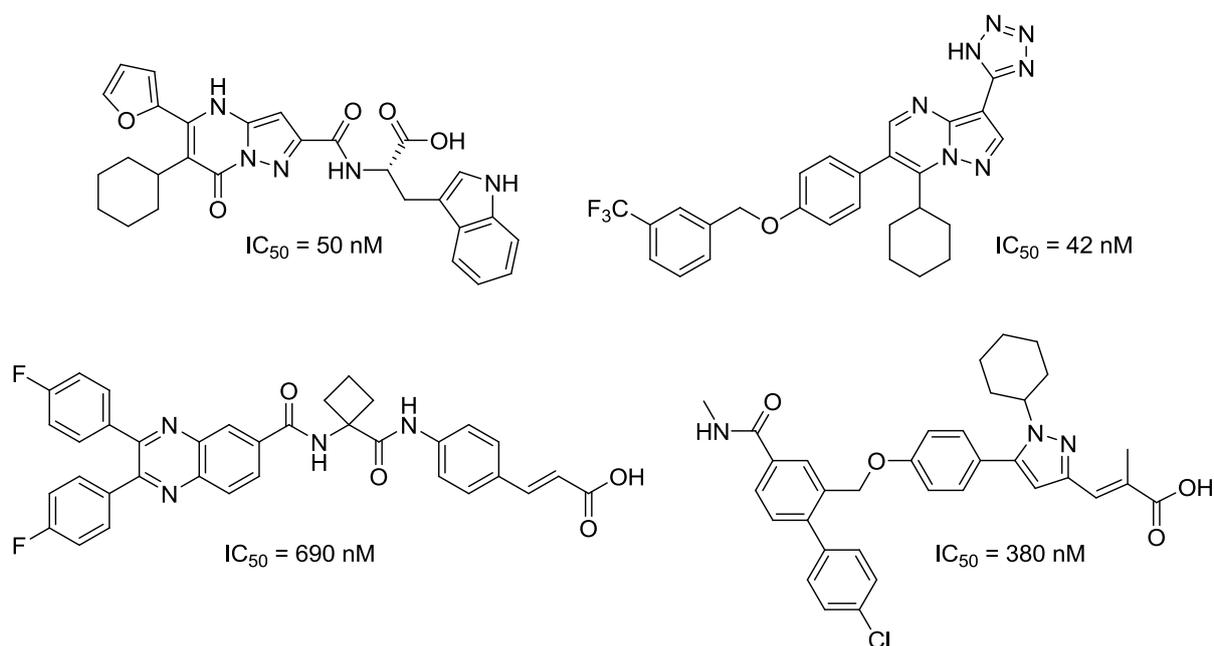


Figure 23. Structures de dérivés provenant de diverses familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Thumb I ».

1.3.5 Inhibiteurs du site allostérique « Thumb II »

Le site allostérique « Thumb II » est une fissure étroite mais longue à la surface de la protéine qui admet de nombreuses classes de ligands. Identifiés par Shire Biochem *via* un

screening, des dérivés de thiophène comportant un acide carboxylique en position 2 et un groupement aromatique en position 5 ont été générés afin d'optimiser leurs activités [233]. Si les premières études ont mené à la découverte du potentiel de groupements 3-sulfonyle ou 3-amido, le dérivé le plus actif possède en position 3 un groupement 2-cyclohexylpyridin-3-yle, et affiche un IC_{50} d'une vingtaine de nanomolaires [234]. Le VCH-916 (Vertex Pharmaceuticals) fait partie de cette famille de thiophènes et se trouve actuellement en phase I de tests

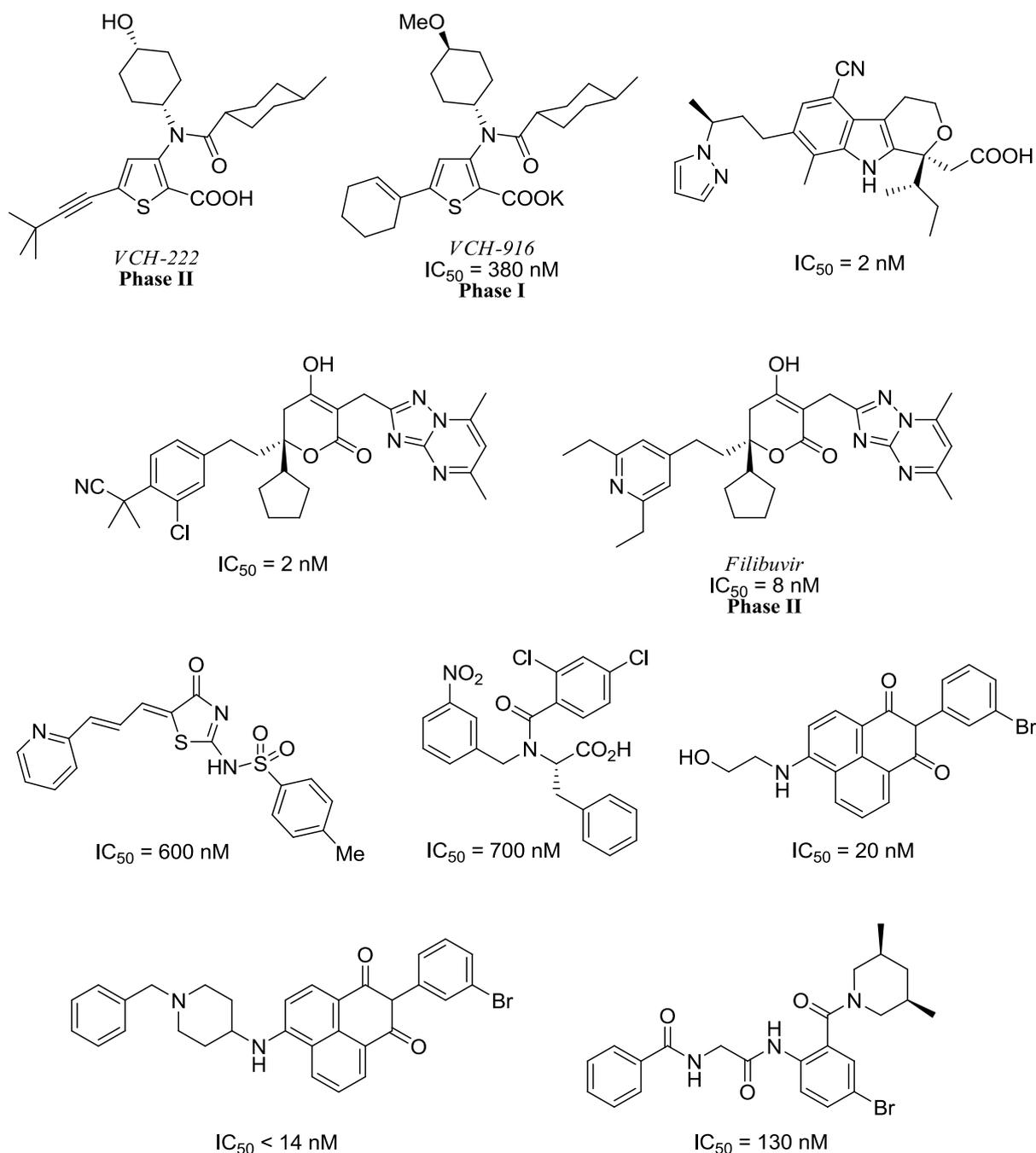


Figure 24. Structures de dérivés provenant de diverses familles chimiques utilisés comme inhibiteurs de la polymérase NS5B et se fixant sur le site allostérique « Thumb II ».

cliniques, tout comme le dérivé VCH-759 dont la structure n'est pas connue. Un autre analogue, le VCH-222, est maintenant entré en phase II. Une famille de pyranoindoles a également été étudiée [235]. L'influence de la nature de l'hétéroatome sur l'indole de départ et de la taille du cycle accolé ont fait l'objet d'investigations, mais c'est la substitution du noyau indole, notamment par des groupements halogéno ou cyano, qui a particulièrement concentré l'attention des chimistes, et mené aux dérivés les plus actifs ($IC_{50} = 2$ nM) [236,237]. Des dérivés de dihydropyranones ont montré des activités similaires, notamment par l'introduction d'un groupement triazolo[1,5-*a*]pyrimidine et d'un centre chiral portant un cyclopentyle et une chaîne carbonée [238]. Des groupements *meta*-éthyle ou *para*-hydroxyméthyle sur le cycle aromatique ont en outre présenté des activités intéressantes de l'ordre du nanomolaire [239]. Un analogue pyridinique, le Filibuvir, développé par Pfizer, est actuellement en phase II d'essais cliniques.

D'autres familles d'inhibiteurs moins prometteuses ont été identifiées, avec souvent peu de structures testées et/ou des activités médiocres. C'est le cas des benzo[*de*]isoquinolines qui, si elles atteignent des IC_{50} inférieurs à 20 nM, n'ont pas fait l'objet de développements ultérieurs [240]. La famille des thiazolones a été plus approfondie, mais n'a pas révélé un potentiel d'inhibition suffisant pour le lancement de tests précliniques ($IC_{50} = 600$ nM pour le composé le plus actif) [241]. C'est également le cas pour les dérivés de phénylalanine synthétisés dans le cadre de l'inhibition de NS5B. Identifiés par Shire Biochem en 2003, ces composés ont été optimisés au fil de différents travaux publiés la même année, mais aucune molécule de la famille n'a atteint un IC_{50} inférieur à 700 nM [242]. Enfin, des dérivés d'acide bromoanthranilique ont montré des activités autour de 100 – 300 nM au cours d'une étude publiée en 2008 (Figure 24) [243].

Les aures, et plus généralement les flavonoïdes, n'ont en revanche jamais été identifiés comme de potentiels inhibiteurs de la polymérase NS5B du VHC. Sur la base d'un « *hit* », l'aure naturelle auréusidine, nous avons donc entrepris la synthèse de plusieurs générations de dérivés d'aure ainsi que leur évaluation biologique et l'étude de leurs interactions avec l'enzyme.

Chapitre 2. Synthèse des aurones inhibitrices

2.1 CONCEPTION

La méthode de synthèse des dérivés d'aurones présentée au point 1.4.4 de la Partie 1 est utilisée depuis plusieurs années au laboratoire où s'est développée une réelle expertise. En outre, si cette voie de synthèse n'est pas forcément celle qui conduit aux meilleurs rendements, elle a été éprouvée avec des substitutions extrêmement différentes et permet un ajustement facile des conditions de réaction (en milieu acide, basique, supporté, sous micro-ondes) suivant la fragilité et la solubilité des réactifs mis en jeu. Elle peut donc mener à une diversité structurale importante. Au cours de ce travail nous avons par conséquent opté pour l'utilisation de cette condensation d'un benzaldéhyde sur des dérivés de benzofuran-3(2*H*)-one pour la synthèse des inhibiteurs. Les structures synthétisées ont été choisies en premier lieu en fonction de la structure du « *hit* » de départ, et ensuite par relations structure-activité successives. Dans un souci de simplicité, les molécules préparées comportent dans la mesure du possible des substituants provenant de benzaldéhydes commerciaux. Enfin, le docking moléculaire a constitué une aide continue à la décision et nous a permis d'éliminer directement certaines structures identifiées par modélisation comme inadaptées (quelques résultats obtenus par docking sont par ailleurs présentés au point 4.2 de cette partie).

2.2 SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS D'AURONE

La voie synthétique choisie pour la synthèse des dérivés d'aurone nécessite deux partenaires mis en réaction lors de l'étape finale de condensation : il s'agit d'un benzofuran-3(2*H*)-one et d'un benzaldéhyde. Si les benzaldéhydes substitués commerciaux sont disponibles en grand nombre, ce n'est pas le cas des dérivés de benzofuran-3(2*H*)-one que nous

avons préparé au laboratoire. Suivant les substitutions envisagées, les voies de synthèse de ces composés diffèrent.

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

Développée au laboratoire, la méthode de préparation des composés **2a** et **2b** consiste en premier lieu en une réaction de Houben-Hoesch sur le phloroglucinol ou le résorcinol, à l'aide de chloroacétonitrile en présence de chlorure de zinc(II) dans l'éther saturé par l'acide chlorhydrique [244]. L'iminium ainsi formé est ensuite hydrolysé dans une solution d'acide chlorhydrique 1 N à reflux, et le produit est cyclisé en milieu basique à l'aide de méthanolate de sodium dans le méthanol à reflux. Cette voie de synthèse ne mène pas à d'excellents rendements mais permet d'éviter toute purification puisque les composés **1a**, **1b**, **2a** et **2b** cristallisent tous en fin de réaction et se révèlent suffisamment purs pour une utilisation directe.

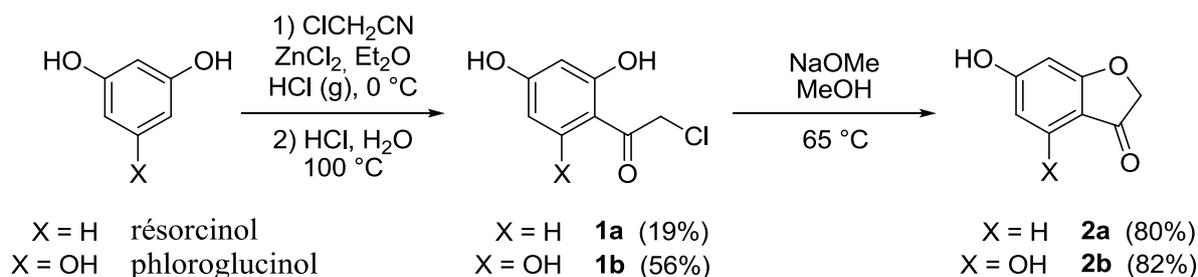


Schéma 6. Voie de synthèse des synthons **2a** et **2b** via une réaction de Houben-Hoesch suivie d'une hydrolyse et d'une cyclisation en milieu basique.

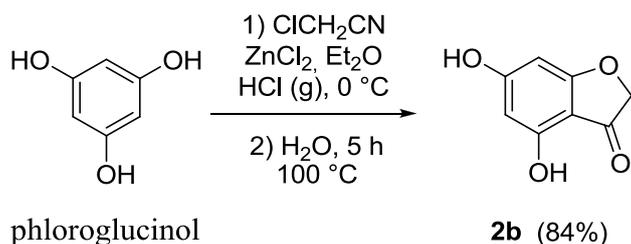


Schéma 7. Voie de synthèse alternative du synthon **2b** via une réaction de Houben-Hoesch immédiatement suivie d'un traitement aqueux à reflux.

Le composé **2b** a également été obtenu par traitement direct de l'iminium dans l'eau à reflux pendant 5 heures. Sans ajout d'acide ou de base, l'iminium est alors hydrolysé et cyclisé en « *one pot* » et le produit **2b** cristallise après retour à température ambiante. Cette méthode alternative simplifie la voie de synthèse et conduit à des rendements plus élevés (84% à

partir du phloroglucinol). Elle n'a toutefois pas été expérimentée sur d'autres substrats comme le résorcinol.

2.2.2 Synthèse de la 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (**5a**) et de la 5-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (**5b**)

La régiosélectivité de la réaction de Houben-Hoesch dans la synthèse précédente ne permet pas d'accéder facilement au composé **5a**. En revanche, elle paraît compatible *a priori* avec la préparation du composé **5b**, mais la réaction de l'hydroquinone avec le chloroacétonitrile dans les conditions décrites précédemment n'a pas mené au produit attendu. Pour ces deux composés **5a** et **5b**, nous avons donc eu recours à une autre voie de synthèse. Celle-ci implique la protection préalable d'un dérivé de 2'-hydroxyacétophénone par des groupements acétyles, sa bromation en α du carbonyle par le tribromure de triméthylphénylammonium (PTT, un réactif qui permet l'introduction d'un atome de brome sélectivement dans cette position) et sa cyclisation en milieu basique. Ce schéma réactionnel mène à la formation de nombreux sous-produits à chaque étape. Néanmoins, les bruts de réaction sont à chaque fois mis en jeu directement, et seule l'étape finale donne lieu à une purification par chromatographie sur colonne. Si la bromation directe de dihydroxyacétophénone (notamment 2',4'- et 2',5'-dihydroxylées) a été rapportée en utilisant le bromure de cuivre(II) [139], des essais sur la 2',6'-dihydroxyacétophénone avec ce réactif ont irrémédiablement conduit à une bromation

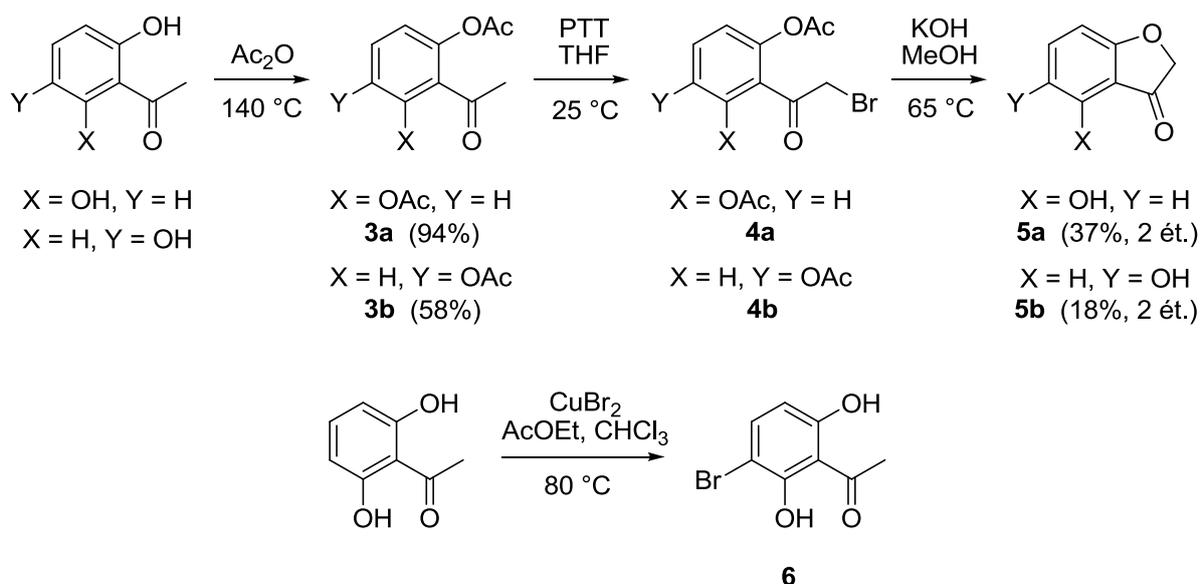


Schéma 8. Voie de synthèse des synthons **5a** et **5b** via une protection de l'acétophénone de départ, une bromation en α du carbonyle puis une déprotection-cyclisation en milieu basique. Obtention du composé **6** par bromation directe avec le bromure de cuivre(II).

en position 3' de l'acétophénone (composé **6**). Ceci peut sans doute être imputé à l'activation de cette position 3' par les deux groupements phénols en *ortho* et *para*.

2.2.3 Synthèse de la 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one (**7a**) et de la 4,6-dibenzyloxybenzofuran-3(2H)-one (**7b**)

La méthylation et la benzylation de la 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one **2b** ont été réalisées en utilisant des conditions décrites dans la littérature [245]. Le composé **7a** a été préparé par l'action de sulfate de diméthyle sur le composé **2b**, dans le diméthoxyéthane et en présence de carbonate de potassium. Ces conditions ont mené à un meilleur rendement que l'utilisation préalable d'iodure de méthyle dans le DMF (67% contre 56%) [120]. Le composé **7b** a été synthétisé *via* une réaction de **2b** dans les mêmes conditions avec le bromure de benzyloxy. La formation d'une fraction de sous-produits C-benzylés a conduit à un rendement nettement plus faible pour cette réaction (31%).

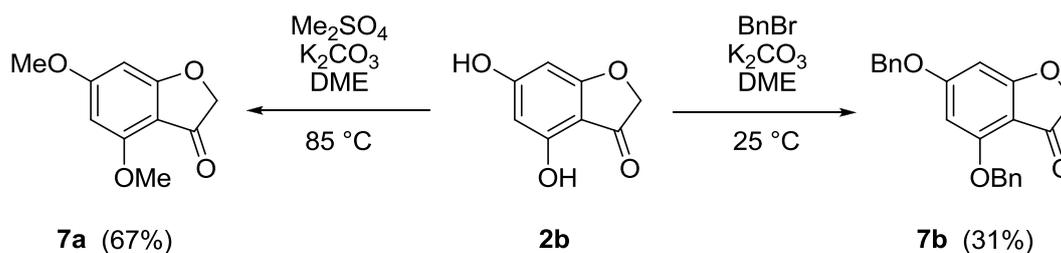


Schéma 9. Voie de synthèse des synthons **7a** et **7b** à partir de **2a** *via* une alkylation en milieu basique.

2.2.4 Synthèse de la 4,6-difluorobenzofuran-3(2H)-one (**9**) et de la 4-fluorobenzofuran-3(2H)-one (**11**)

Les synthons fluorés **9** et **11** ont été préparés suivant les méthodes proposées par Brehm *et al.* en plusieurs étapes [246]. En ce qui concerne le composé **9**, la synthèse débute par la réaction du 3,5-difluorophénol avec l'acide chloroacétique en présence de soude. Le chlorure d'acyle formé *in situ* par l'action du chlorure de thionyle sur l'acide **8** obtenu est ensuite cyclisé par une réaction de Friedel-Crafts avec du chlorure d'aluminium, pour donner le composé **9** avec des rendements moyens. Le synthon **11** est préparé par une voie différente, proche de celle utilisée pour synthétiser les composés **5a** et **5b**. En effet, à partir de la 6'-fluoro-2'-hydroxyacétophénone, un atome de brome est introduit en α du carbonyle par l'utilisation du bromure de cuivre(II) dans un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle à reflux. Le composé **10** ainsi obtenu est alors cyclisé en milieu basique. L'utilisation de carbo-

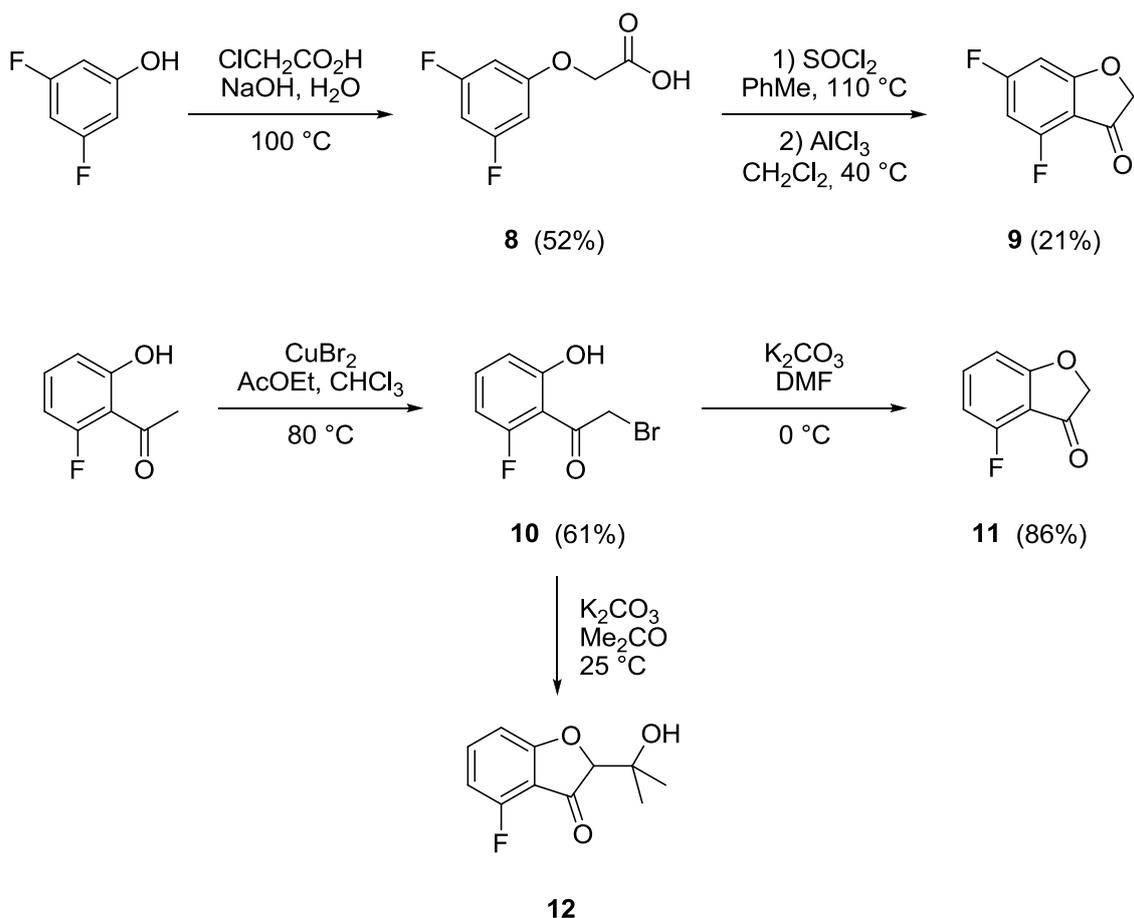


Schéma 10. Voie de synthèse du synthon **9** *via* une substitution nucléophile permettant l'introduction d'un acide, la formation d'un chlorure d'acyle, et une réaction de Friedel-Crafts ; voie de synthèse du synthon **11** *via* une bromation en α du carbonyle et une cyclisation en milieu basique.

nate de potassium dans l'acétone, pourtant décrite par Brehm, mène cependant à une condensation inopportune du composé **11** formé avec l'acétone, pour donner le composé **12**. Le remplacement de l'acétone par le DMF conduit à la formation du dérivé **11** désiré.

2.2.5 Synthèse du 4-cyclohexylbenzaldéhyde (**13**), du 4-*N*-méthyl-pipérazinylbenzaldéhyde (**14**) et du benzimidazole-5-carboxaldéhyde (**16**)

Si la plupart des dérivés de benzaldéhyde utilisés dans cette étude sont disponibles commercialement, trois d'entre eux ont du être synthétisés avant leur mise en réaction avec un benzofuran-3(2*H*)-one. Le composé **13** a été préparé par une réaction de Duff sur le cyclohexylbenzène en présence d'héxaméthylènetétramine (HMTA) dans le TFA à reflux, avec un rendement faible. Le composé **14** a été synthétisé par le biais d'une substitution nucléophile

de *N*-méthylpipérazine sur le 4-fluorobenzaldéhyde en milieu basique dans le DMF à reflux. Il a été obtenu avec un rendement de 46%. Enfin, la préparation du composé **16** a été réalisée en deux étapes : en premier lieu une réduction de l'acide carboxylique correspondant en alcool **15** par l'action de LiAlH_4 dans le THF à température ambiante ; puis une réoxydation partielle en aldéhyde **16** en présence de dioxyde de manganèse(II) dans le dichlorométhane à température ambiante.

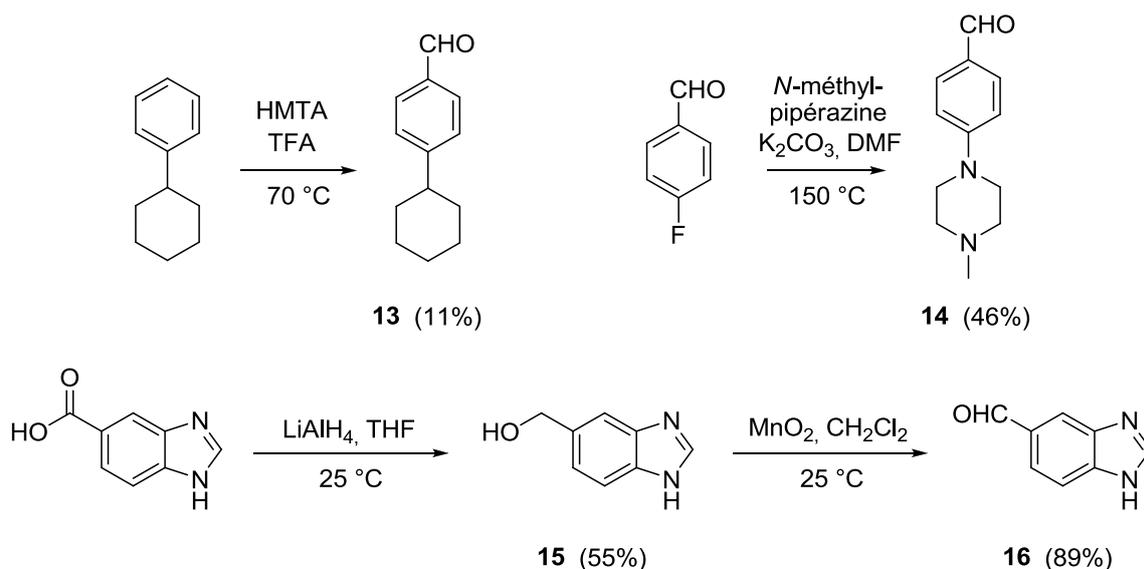


Schéma 11. Voie de synthèse des aldéhydes **13**, **14** et **16**, respectivement par formylation (réaction de Duff), substitution d'un fluor par une *N*-méthylpipérazine, et réduction suivie d'une oxydation ménagée.

2.3 SYNTHÈSE DES AURONES

2.3.1 Synthèse des aurones hydroxylées portant au maximum un groupement phénol par cycle

La condensation directe en milieu basique de dérivés monohydroxylés de benzofuran-3(2*H*)-one (comme les synthons **2a**, **5a** et **5b**) et de benzaldéhyde est possible. Dans un mélange de potasse aqueuse (50%) et de méthanol, la réaction est menée à reflux pendant un temps très variable, de 2 heures à une nuit. Après une extraction à l'acétate d'éthyle, le produit est purifié par recristallisation dans l'acétonitrile (identifié comme meilleur solvant de recristallisation après plusieurs tentatives) ou par chromatographie sur colonne de gel de silice. La présence de plusieurs groupements phénols sur un même cycle mène en revanche au noircissement du milieu réactionnel et à la récupération d'un mélange de dégradation. Il est alors nécessaire d'utiliser d'autres méthodes, présentées au point 2.3.3.

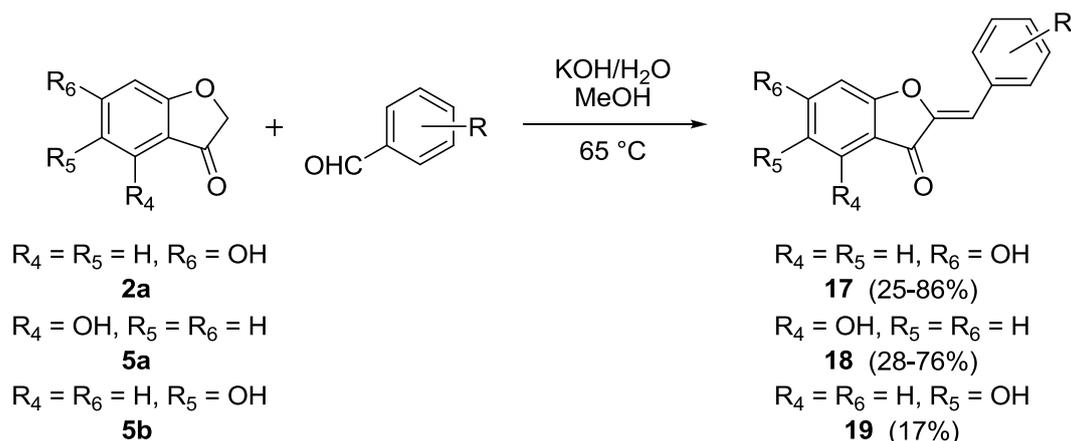


Schéma 12. Méthode de préparation des dérivés d'aurone 4-, 5- ou 6-hydroxylés par condensation aldolique en présence de KOH aqueux et de méthanol, à reflux.

Composé	R	Rendement	Composé	R	Rendement
17a	2'-OH	25%	18g	2',4',6'-triOMe	78%
17b	3'-OH	86%	18h	4'-Et	50%
17c	4'-OH	77%	18i	4'- <i>i</i> -Pr	44%
18a	2'-OH	28%	18j	4'- <i>n</i> -Bu	56%
18b	3'-OH	55%	18k	4'- <i>t</i> -Bu	61%
18c	4'-OH	37%	18l	4'- <i>N</i> -MePpz	71%
18d	2',4'-diMe	76%	18m	2'-F	30%
18e	2',4'-diOMe	76%	18n	H	72%
18f	2',6'-diOMe	34%	19	4'-OH	17%

Tableau 1. Liste des dérivés d'aurone 4-, 5- ou 6-hydroxylés préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.

2.3.2 Synthèse des aurones polyméthoxylés

La préparation des dérivés d'aurone portant des groupements méthoxyles ou benzyloxyles, notamment en positions 4 et 6, est réalisée à partir des synthons **7a** et **7b** respectivement. Dans ce cas la réaction est menée à température ambiante pendant environ une heure, en présence d'un équivalent de benzaldéhyde et d'un mélange d'une solution de potasse aqueuse (50%) et de méthanol. En général après quelques minutes le produit commence à cristalliser : ce dernier est récupéré par filtration à la fin de la réaction. Il est ensuite le plus souvent recristallisé dans le méthanol. Dans le cas de la synthèse de dérivés A-méthoxylés et B-hydroxylés, le chauffage du milieu à reflux s'avère nécessaire pour compléter la réaction. Une extraction par l'acétate d'éthyle doit alors précéder la recristallisation dans le méthanol. Les composés 4,6-diméthoxylés préparés *via* cette méthode sont numérotés **20**, et sont présenté dans le Tableau 2.

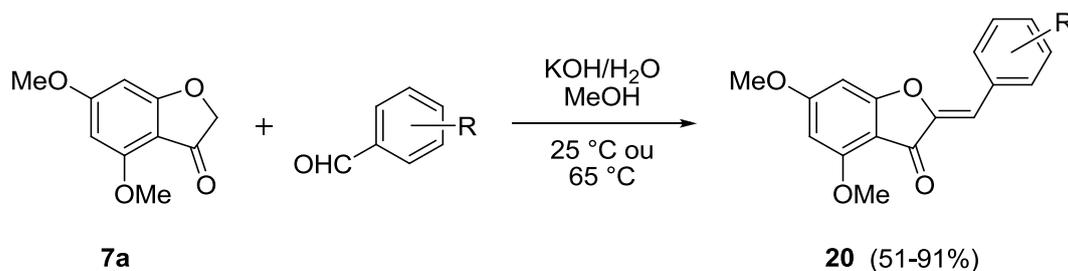


Schéma 13. Méthode de préparation des dérivés d'aurone 4,6-diméthoxylés par condensation aldolique en présence de KOH aqueux et de méthanol, à 25 °C ou à reflux.

Composé	R	Rendement	Composé	R	Rendement
20a	2'-OH	51%	20f	4'- <i>c</i> -Hx	78%
20b	3'-OH	76%	20g	2',4'-diOMe	91%
20c	4'-OH	63%	20h	3',4'-diOMe	83%
20d	2',4'-diMe	86%	20i	4'-F	64%
20e	4'- <i>n</i> -Bu	75%	20j	H	61%

Tableau 2. Liste des dérivés d'aurone 4,6-diméthoxylés préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.

2.3.3 Synthèse des aurones polyhydroxylées

Comme indiqué au point 2.3.1, il n'est pas possible d'appliquer les conditions réactionnelles menant à la synthèse des composés **17**, **18** et **19** à des dérivés comportant plusieurs groupements phénols par cycle. Plusieurs stratégies ont donc été mises en place afin d'obtenir ces composés dans des conditions différentes. Trois méthodes ont été développées : la réaction du composé polyméthoxylé correspondant avec du tribromure de bore (méthode A) ; une condensation dans l'éthanol en présence de potasse concentrée (méthode B) ; et une condensation dans le méthanol en présence d'acide sulfurique concentré (méthode C). L'utilisation de tribromure de bore dans le dichlorométhane a constitué la méthode la plus employée et qui a fourni les meilleurs rendements, malgré des temps de réaction parfois assez longs. Si la condensation en milieu de potasse aqueuse (50%) et d'éthanol dans un rapport 2/1 à reflux a permis d'obtenir directement le composé polyhydroxylé, sans passer par l'intermédiaire méthoxylé, elle mène à des rendements souvent bien plus faibles (voir également le point 2.3.5). C'est également le cas de la troisième voie de synthèse qui n'a été utilisée que pour la préparation de la 4,6,4'-trihydroxyaurone, dans un mélange d'acide sulfurique concentré (1 équivalent) et de méthanol à reflux. Les différents composés polyhydroxylés **21** synthétisés durant cette étude, ainsi que le composé **18o**, sont résumés dans le Tableau 3. Ils sont accompagnés d'une lettre indiquant la méthode employée pour leur préparation.

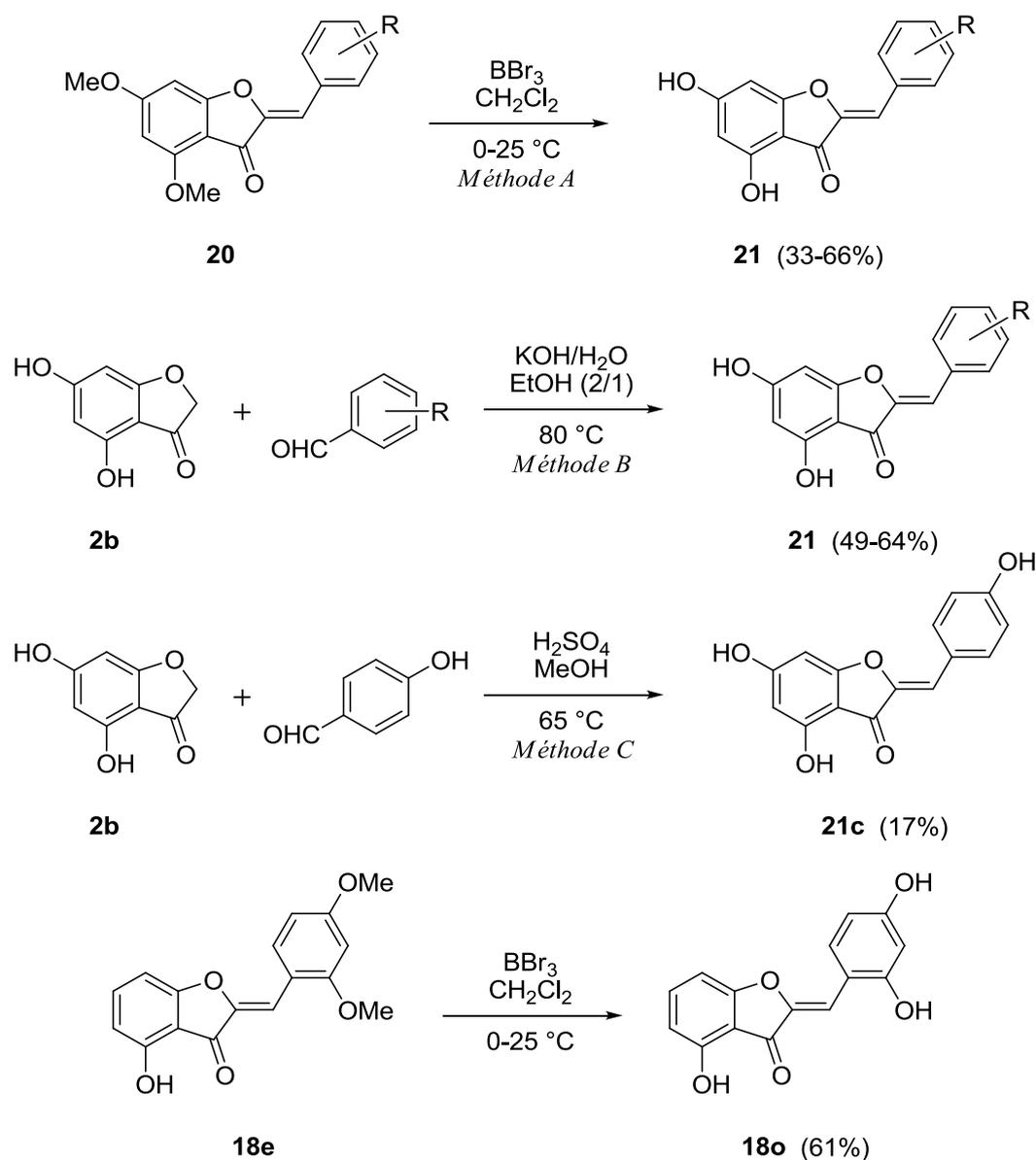


Schéma 14. Méthode de préparation des dérivés d'aurone polyhydroxylés par déprotection des analogues méthoxylés avec le tribromure de bore (méthode A) ; condensation aldolique en présence de KOH aqueux concentré et d'éthanol à reflux (méthode B) ; condensation aldolique en présence de H₂SO₄ concentré et de méthanol à reflux (méthode C).

Composé	R	Rendement	Composé	R	Rendement
18o	2',4'-diOH	61% (A)	21f	3'-OMe, 4'-OBn	64% (B)
21a	2'-OH	66% (A)	21g	4'- <i>n</i> -Bu	52% (A)
21b	3'-OH	49% (B)	21h	4'- <i>c</i> -Hx	64% (A)
21c	4'-OH	17% (C)	21i	4'-F	50% (A)
21d	2',4'-diOH	58% (A)	21j	H	33% (A)
21e	3',4'-diOH	61% (A)			

Tableau 3. Liste des dérivés d'aurone polyhydroxylés préparés suivant l'une des méthodes présentées ci-dessus, et rendements associés (lettre indiquant la méthode employée entre parenthèses).

2.3.4 Synthèse des aurones hydrophobes et fluorés.

La synthèse des composés polyfluorés à partir des synthons **9** et **11**, sensibles en milieu basique fort, n'a pas pu être effectuée avec l'une des méthodes présentées ci-dessus. En effet, en présence d'un mélange de potasse et de méthanol, le méthanolate de potassium formé *in situ* conduit à l'attaque des positions fluorées et à la substitution par des groupements méthoxyles. Nous avons donc utilisé la méthode réactionnelle décrite par Varma *et al.*, supportée sur alumine neutre dans le dichlorométhane à température ambiante [118]. Cette méthode très douce a permis d'obtenir les dérivés **22** et **23**. Deux composés particulièrement hydrophobes et donc difficilement solubles dans le méthanol ont également été préparés via cette méthode. Il s'agit des dérivés **24** et **25**.

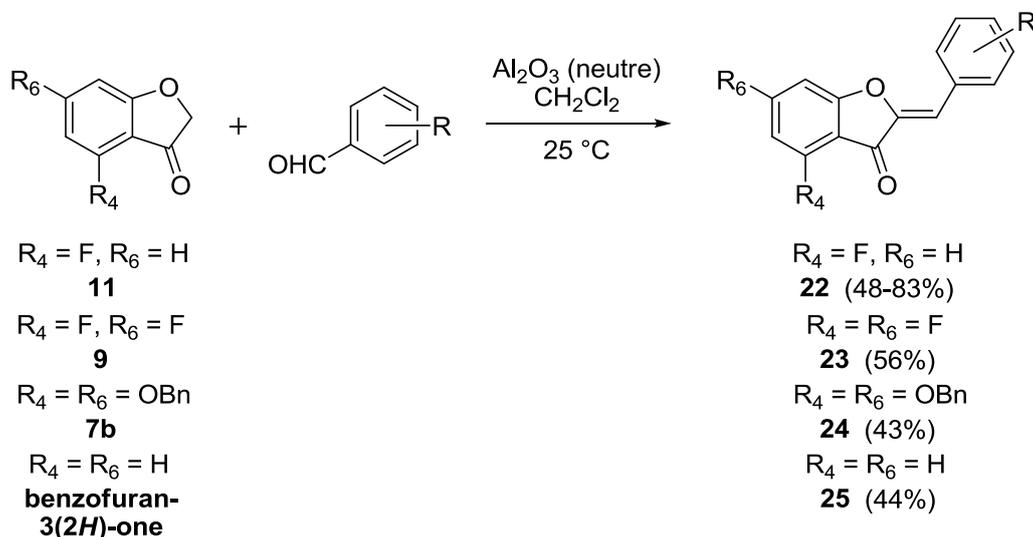


Schéma 15. Méthode de préparation des dérivés d'aurone fluorés et hydrophobes **22**, **23**, **24** et **25** par condensation aldolique supportée sur alumine neutre dans le dichlorométhane.

Composé	R	Rendement	Composé	R	Rendement
22a	2',4'-diF	83%	23	4'- <i>n</i> -Bu	56%
22b	2',4'-diOMe	53%	24	4'- <i>c</i> -Hx	43%
22c	4'- <i>n</i> -Bu	48%	25	4'- <i>n</i> -Bu	44%

Tableau 4. Liste des dérivés d'aurone fluorés et hydrophobes préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.

2.3.5 Synthèse des aurones B-hétérocycliques

Enfin, la méthode B présentée au point 2.3.3 a été mise à profit pour la synthèse d'analogues originaux dont le cycle B a été remplacé par un hétérocycle à cinq chaînons. Ain-

si, les composés **26**, regroupant des dérivés de furane, de pyrrole, d'imidazole et de benzimidazole, ont été obtenus dans des conditions basiques fortes en présence de potasse et d'éthanol à reflux, à partir des aldéhydes hétérocycliques correspondants (notamment l'aldéhyde **16**).

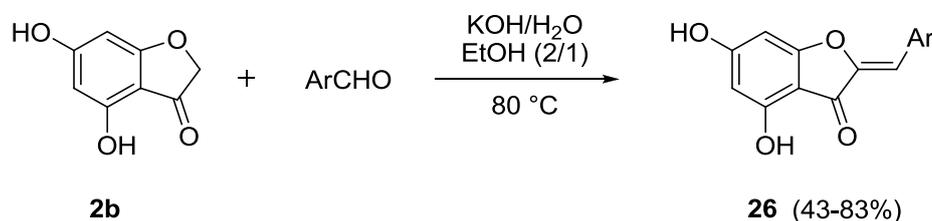


Schéma 16. Méthode de préparation des dérivés d'aurone B-hétérocycliques **26** par condensation aldolique en présence de KOH aqueux concentré et d'éthanol à reflux.

Composé	Ar	Rendement	Composé	Ar	Rendement
26a		83%	26d		43%
26b		53%	26e		75%
26c		56%			

Tableau 5. Liste des dérivés d'aurone B-hétérocycliques préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.

Ces dérivés ont constitué plusieurs générations possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes (composés polyhydroxylés, fluorés et méthoxylés, hydrophobes, hétérocycliques, etc.), et leur évaluation biologique a été entreprise au fur et mesure, pour chaque génération, afin de permettre l'établissement de relations structure-activité successives. Les résultats et analyses de ces tests, ainsi que des travaux supplémentaires de mutagenèse et de modélisation moléculaire sont décrits dans les chapitres suivants.

Chapitre 3. Évaluations biologiques et éléments de relation structure-activité

3.1 PROCÉDÉ D'ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES AURONES

Les mesures de l'activité d'inhibition de NS5B des composés ont été réalisées à l'Hôpital Henri Mondor (INSERM) à Créteil par le Dr. Abdelhakim Ahmed-Belkacem, dans l'équipe du Pr. Jean-Michel Pawlotsky. Les essais ont été menés sur une enzyme purifiée exprimée chez *Escherichia coli*, amputée des 21 derniers acides aminés de la séquence afin de garantir sa solubilité (NS5B21). Le test d'activité des composés consiste en la mesure de la quantité d'ARN double brin synthétisé *in vitro* par l'enzyme en présence des inhibiteurs.

3.2 RÉSULTATS *IN VITRO* ET RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ

3.2.1 Première génération d'inhibiteurs : relation structure-activité préliminaire à partir de l'auréusidine

L'auréusidine (4,6,3',4'-tétrahydroxyaurone, **21e**) a constitué le premier « *hit* » dans cette étude, permettant l'identification du squelette des aurones comme potentiel inhibiteur de la polymérase NS5B et ouvrant la voie à un nouveau sujet de recherche. Cette molécule permet l'inhibition de NS5B avec un IC_{50} de 5,4 μ M. Des analogues hydroxylés dans les mêmes positions (qui sont les positions naturellement hydroxylées le plus fréquemment) ont alors été préparés afin de déterminer les positions clés pour l'activité. Des analogues 4,6-diméthoxylés, utilisés comme intermédiaires de synthèse, ont également fait l'objet d'évaluations pour mesurer l'impact des groupements méthoxyles par rapport aux phénols. Les résultats obtenus pour ces composés préliminaires sont regroupés dans un tableau à double entrée, le Tableau 6.

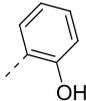
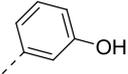
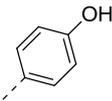
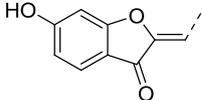
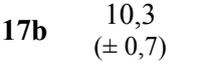
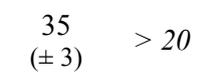
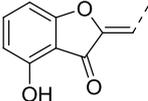
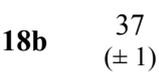
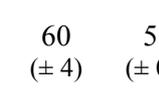
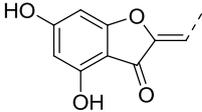
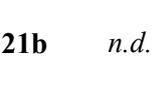
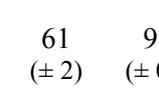
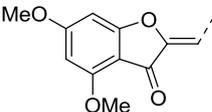
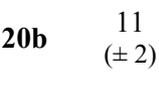
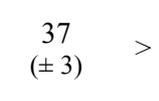
											
Comp.	Inh. (20 μ M, %)	IC ₅₀ (μ M)	Comp.	Inh. (20 μ M, %)	IC ₅₀ (μ M)	Comp.	Inh. (20 μ M, %)	IC ₅₀ (μ M)			
	17a	18 (\pm 3)	> 20		17b	10,3 (\pm 0,7)	> 20		17c	35 (\pm 3)	> 20
	18a	56 (\pm 1)	11,1 (\pm 0,4)		18b	37 (\pm 1)	> 20		18c	60 (\pm 4)	5,9 (\pm 0,3)
	21a	33 (\pm 2)	> 20		21b	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>		21c	61 (\pm 2)	9,7 (\pm 0,1)
	20a	0,7 (\pm 1)	> 20		20b	11 (\pm 2)	> 20		20c	37 (\pm 3)	> 20

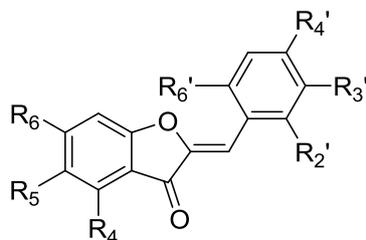
Tableau 6. Résultats initiaux pour l'inhibition de NS5B et relation structure-activité des analogues 6-hydroxylés, 4-hydroxylés, 4,6-dihydroxylés ou 4,6-diméthoxylés de l'auréusidine.

Les données rassemblées dans le Tableau 6 permettent de dégager une première version de relation structure-activité. Il semble tout d'abord que l'élimination du phénol en position 4 mène à des dérivés bien moins actifs (33,6% d'inhibition à 20 μ M pour **21a** contre 18,4% pour **17a** ; IC₅₀ = 9,7 μ M pour **21c** contre supérieur à 20 μ M pour **17c**). En revanche, la position 6 peut être hydroxylée ou non, même si l'absence de phénol dans cette position conduit à de meilleures activités (IC₅₀ = 11,1 μ M pour **18a** contre plus de 20 μ M pour **21a** ; IC₅₀ = 5,9 μ M pour **18c** contre 9,7 μ M pour **21c**). La méthylation des groupements phénols en 4 et 6 mène à des composés pratiquement inactifs (0,7% d'inhibition à 20 μ M pour **20a** contre 33,6% pour **21a** ; IC₅₀ > 20 μ M pour **20c** contre 9,7 μ M pour **21c**). Au niveau du cycle B, la position 4' est la plus favorable pour positionner un phénol. L'hydroxylation de la position 2' conduit à des activités moindres, alors que la position 3' s'avère être très défavorable pour l'activité (IC₅₀ = 5,9 μ M pour **18c** contre 11,1 μ M pour **18a** et > 20 μ M pour **18b**).

3.2.2 Deuxième génération d'inhibiteurs : affinement et introduction de motifs méthoxylés et fluorés

Dans l'optique d'une meilleure compréhension des éléments structuraux déterminants pour l'activité, une série de composés polyhydroxylés, méthoxylés et fluorés a été évaluée.

Nous avons vu l'importance cruciale du phénol en position 4 et l'amélioration de l'activité induite par l'introduction de groupements OH en 2' et 4'. Nous avons constaté également la perte de l'activité lors de l'introduction de groupements méthoxyles en positions 4 et 6. Les composés réunis dans le Tableau 7 nous ont permis d'affiner cette relation structure-activité préliminaire.



Composé	R ₄	R ₅	R ₆	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	R _{6'}	Inh. (20 μM, %)	IC ₅₀ (μM)
18e	OH	H	H	OMe	H	OMe	H	75 (± 3)	9,7 (± 0,2)
18f	OH	H	H	OMe	H	H	OMe	47 (± 2)	> 20
18g	OH	H	H	OMe	H	OMe	OMe	52 (± 1)	<i>n.d.</i>
18m	OH	H	H	F	H	H	H	58 (± 5)	<i>n.d.</i>
18n	OH	H	H	H	H	H	H	57 (± 3)	14,6 (± 0,6)
18o	OH	H	H	OH	H	OH	H	94 (± 2)	2,6 (± 0,1)
19	H	OH	H	H	H	OH	H	46 (± 2)	> 20
21d	OH	H	OH	OH	H	OH	H	81 (± 6)	5,8 (± 0,3)
21e	OH	H	OH	H	OH	OH	H	85 (± 3)	5,4 (± 0,3)
21i	OH	H	OH	H	H	F	H	80 (± 2)	11,2 (± 0,2)
21j	OH	H	OH	H	H	H	H	59 (± 4)	15,1 (± 0,7)
22a	F	H	H	F	H	F	H	10 (± 2)	> 20
23	F	H	F	H	H	<i>n</i> -Bu	H	-33 (± 4)	> 20

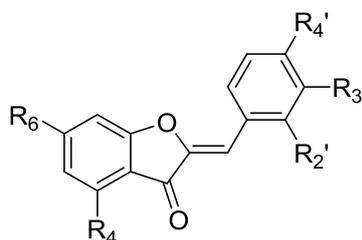
Tableau 7. Valeurs d'inhibition de NS5B des analogues d'aurone polyhydroxylés, méthoxylés et fluorés.

À partir de ces résultats, il est possible de déduire plusieurs points importants. La combinaison des hydroxylations en position 2' et 4' mène à deux dérivés plus actifs que les analogues monohydroxylés (IC₅₀ = 2,6 μM pour **18o** contre 5,9 et 11,1 μM pour **18c** et **18a** respectivement ; IC₅₀ = 5,8 pour **21d** contre 9,7 et > 20 μM pour **21c** et **21a** respectivement), ce qui confirme le potentiel de ces deux groupements pour l'activité. Plus surprenant, l'activité de **21d** est légèrement inférieure à celle trouvée initialement pour l'auréusidine **21e** (IC₅₀ = 5,8 contre 5,4 μM), ce qui suggère un effet positif du motif catéchol sur l'inhibition de NS5B. Sur le cycle A, comme pour les dérivés méthoxylés **20a**, **20b** et **20c**, l'introduction d'atomes de fluor semble nuire à l'activité, comme le montrent les valeurs d'inhibition obtenues pour les dérivés **22a** et **23** (IC₅₀ de plus de 20 μM pour **22a** contre 2,6 μM pour **18o**). En revanche, les groupements fluoro sur le cycle B laissent supposer qu'il est possible

d'introduire également des substituants hydrophobes, notamment en position 4' (IC₅₀ très proches de 11,2 µM pour **21i** et de 9,7 µM pour **21c**). C'est également le cas pour des dérivés B-méthoxylés, notamment pour **18e** qui conserve de bonnes valeurs d'inhibition (IC₅₀ = 9,7 µM contre 2,6 µM pour **18a**). L'activité résiduelle de composés non substitués sur le cycle B confirme que les groupements phénols ne représentent pas une nécessité sur ce cycle (IC₅₀ = 14,6 µM pour **18n**, 15,1 µM pour **21j**). Enfin, il est à noter que l'hydroxylation de la position 5 ne conduit pas à une amélioration de l'activité (IC₅₀ > 20 µM pour **19**).

3.2.3 Troisième génération d'inhibiteurs : exploration de la piste hydrophobe en position 4'

Les éléments structuraux identifiés précédemment nous ont amené à envisager l'introduction de nouveaux groupements hydrophobes en position 4'. En effet, les groupements fluoro et méthoxyles ont montré des effets intéressants sur l'activité dans cette position. De nouveaux analogues ont donc été synthétisés dans cette optique et afin de mesurer la tolérance stérique sur cette position et son impact sur l'activité. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 8.



Composé	R ₄	R ₆	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	Inh. (20 µM, %)	IC ₅₀ (µM)
18d	OH	H	Me	H	Me	64 (± 1)	5,8 (± 0,2)
18h	OH	H	H	H	Et	46 (± 2)	> 20
18i	OH	H	H	H	<i>i</i> -Pr	30 (± 2)	> 20
18j	OH	H	H	H	<i>n</i> -Bu	42 (± 1)	> 20
18k	OH	H	H	H	<i>t</i> -Bu	61 (± 2)	<i>n.d.</i>
18l	OH	H	H	H	<i>N</i> -Me-Ppz	94 (± 3)	3,8
20d	OMe	OMe	Me	H	Me	14 (± 3)	> 20
20e	OMe	OMe	H	H	<i>n</i> -Bu	3 (± 2)	> 20
20f	OMe	OMe	H	H	<i>c</i> -Hx	2 (± 1)	> 20
21f	OH	OH	H	OMe	OBn	89	<i>n.d.</i>
21g	OH	OH	H	H	<i>n</i> -Bu	93 (± 4)	2,5 (± 0,1)
21h	OH	OH	H	H	<i>c</i> -Hx	92 (± 2)	2,3 (± 0,2)
25	H	H	H	H	<i>n</i> -Bu	-34 (± 3)	> 20

Tableau 8. Valeurs d'inhibition de NS5B des analogues d'aurone portant un groupement hydrophobe.

La très faible activité des dérivés **20d**, **20e** et **20f** confirme les mauvais résultats obtenus avec la présence d'un noyau A 4,6-diméthoxylé ($IC_{50} > 20 \mu M$ pour les trois composés). En revanche, les composés hydroxylés sur le cycle A présentent des activités intéressantes. Si les inhibiteurs **18h-k** se révèlent malgré tout peu actifs, les analogues 4,6-dihydroxylés conduisent à de bien meilleures valeurs d'inhibition, en particulier **21g** et **21h** qui permettent de mettre au jour le potentiel de substituants hydrophobes volumineux comme le *n*-butyle ou le cyclohexyle en position 4' ($IC_{50} = 2,5 \mu M$ et $2,3 \mu M$ respectivement pour **21g** et **21h**, les meilleures valeurs trouvées dans cette étude). Ces observations indiquent également que la substitution 4,6-dihydroxyle peut se révéler finalement plus favorable que la substitution 4-hydroxyle ($IC_{50} = 2,5 \mu M$ pour **21g** contre $> 20 \mu M$ pour **18j**). L'activité observée pour **18l** ($IC_{50} = 3,8 \mu M$) indique en outre une bonne tolérance pour des substituants volumineux contenant des hétéroatomes. La modification du cycle A, et notamment l'absence totale de substituants, mène en revanche à une perte irrémédiable de l'activité ($IC_{50} > 20 \mu M$ pour **25**).

3.2.4 Quatrième génération d'inhibiteurs : optimisation du cycle B et dérivés hétérocycliques

L'exploration des possibilités de substitution des aures en 4' a permis de révéler la grande tolérance stérique sur cette position au niveau de l'activité. Avec l'aide du docking moléculaire (décrit au point 4.2 de cette partie), nous avons donc entrepris une optimisation du cycle B des aures en le remplaçant notamment par des motifs hétérocycliques : indole, benzimidazole, imidazole, pyrrole, furane. Parmi ces structures, la modélisation moléculaire a permis d'identifier le motif indole comme ayant le plus gros potentiel pour améliorer l'affinité des aures. Un branchement sur le noyau benzofuran-3(2*H*)-one par les positions 2 et 3 de l'indole mène aux meilleures affinités observées *in silico*.

Le Dr. Wei Yi a donc réalisé au laboratoire la synthèse de nombreux analogues indoliques ; pour ma part, j'ai mené les études par docking moléculaire, identifié les structures potentiellement intéressantes, et réalisé la synthèse de quelques dérivés de type benzimidazole, imidazole, pyrrole et furane afin de vérifier leur potentiel *in vitro*. Ces composés n'étant pour le moment pas encore testés sur NS5B, aucune relation structure-activité n'a pu être dégagée. Cependant, le (*Z*)-2-((1-butyl-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-4,6-dihydroxybenzofuran-3-(2*H*)-one a déjà montré une activité intéressante, légèrement supérieure aux composés testés précédemment ($IC_{50} = 2,2 \mu M$), ce qui laisse à penser que des inhibiteurs submicromolaires vont apparaître parmi les aures hétérocycliques synthétisées au laboratoire.

3.3 RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES SUR CELLULES ET CYTOTOXICITÉ

Quelques études réalisées sur un modèle de réplication cellulaire du VHC, le modèle réplicon, ont permis de cerner le potentiel d'activité *in cellulo* de deux aurones par ailleurs identifiées comme actives *in vitro* sur l'enzyme isolée. Les activités des composés **18c** et **21c** ont donc été déterminées et ces molécules ont montré des IC₅₀ respectifs de 18 et 40 μM.

Par ailleurs, afin de vérifier si les aurones peuvent constituer une classe de molécules exploitable pour le traitement de l'hépatite C, des mesures de cytotoxicité ont été réalisées sur quelques dérivés, parmi les plus actifs. Ainsi, les composés **18c**, **18o**, **21d** et **21e** ont notamment été évalués. Les résultats de ces tests de cytotoxicité sont présentés dans le Tableau 9, accompagnés d'un index thérapeutique (I.T.) représentant le rapport entre les valeurs de CC₅₀ (cytotoxicité) et d'IC₅₀ (mesuré sur enzyme isolée). Cet index atteint 100 pour le composé le plus actif de l'étude (**18o**), ce qui traduit une bonne sélectivité du composé. Par ailleurs, des dérivés d'aurones présents dans cette étude ont déjà été soumis à des tests de cytotoxicité et de toxicité clinique lors de travaux précédents : ils n'ont pratiquement jamais fait preuve de toxicité, sauf à des concentrations très fortes [121].

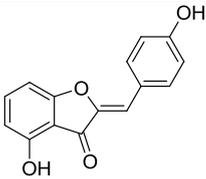
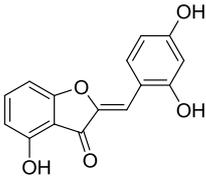
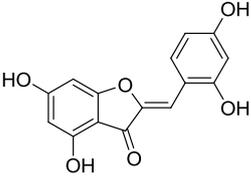
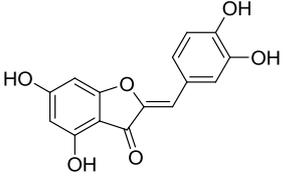
Composé	Structure	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	I.T.
18c		213 (± 9)	5,9 (± 0,3)	36
18o		261 (± 48)	2,6 (± 0,1)	100
21d		292 (± 89)	5,8 (± 0,3)	50
21e		478 (± 2)	5,4 (± 0,3)	89

Tableau 9. Valeurs de cytotoxicité et index thérapeutiques des composés **18c**, **18o**, **21d** et **21e**.

Chapitre 4. Étude des interactions aurones – NS5B

4.1 ÉTUDE PAR MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE

La protéine NS5B comporte un site actif ainsi que quatre sites allostériques, identifiés par le biais de structures cristallographiques de complexes NS5B – inhibiteur. La découverte du site de fixation des aurones revêt pour nous un intérêt majeur en l'absence de telles structures : elle permet l'utilisation du docking moléculaire à la fois comme outil d'aide à la décision tout au long du processus de synthèse des générations successives d'inhibiteurs, et comme modélisateur des interactions protéine – inhibiteurs comme les liaisons hydrogène ou les interactions de Van der Waals. Une étude de mutagenèse dirigée a donc été entreprise à l'Hôpital Henri Mondor à Créteil (INSERM) dans l'équipe du Pr. Jean-Michel Pawlotsky, afin d'établir le site de fixation des aurones.

L'aurone **18c** a été utilisée pour réaliser ces tests. Des mutants de l'enzyme, portant des substitutions référencées au niveau des sites allostériques connus, ont été produits. L'évaluation de l'IC₅₀ de **18c** contre les mutants M423T, C316Y, H95Q et P495L a permis de déterminer l'influence de la modification des sites respectifs « Thumb II », « Palm I », « Palm II » et « Thumb I » sur l'activité de **18c** (IC₅₀ = 5,9 µM avec NS5B sauvage) [247]. Si l'IC₅₀ n'augmente pratiquement pas pour les mutants H95Q (facteur 1,5), C316Y (facteur 0,8) et M423T (facteur 0,7), il subit une augmentation importante d'un facteur 6,3 pour le mutant P495L. Ce résultat, qui indique une fixation des aurones au site « Thumb I », doit être considéré comme une bonne indication, mais n'est cependant pas une preuve formelle. En l'absence de structures cristallographiques, il représente néanmoins pour nous une hypothèse de travail acceptable pour les études de docking moléculaire. Les modifications d'IC₅₀ mesurées sont réunies en Figure 25.

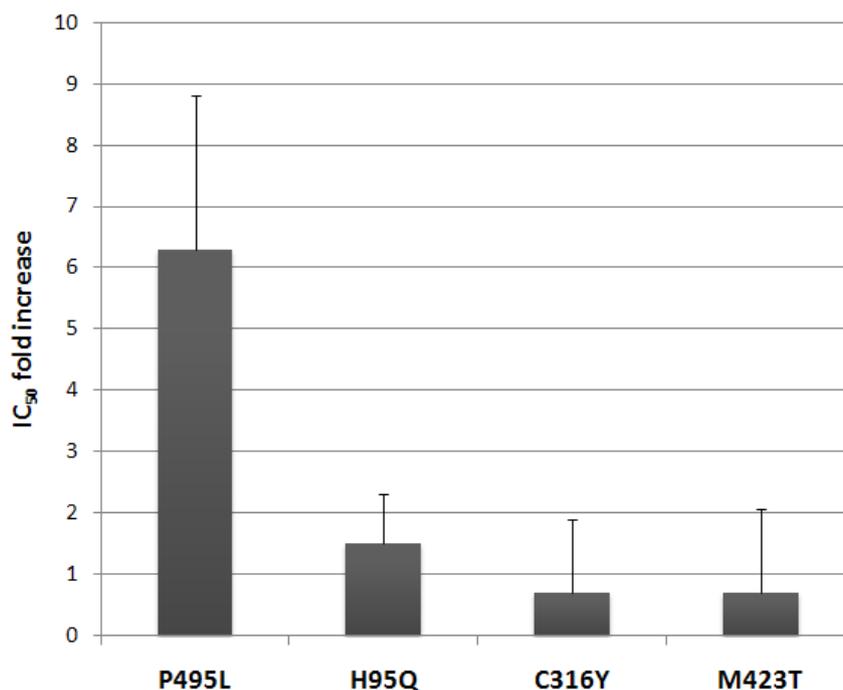


Figure 25. Modification de l'IC₅₀ par rapport à la protéine NS5B sauvage obtenue avec l'aurone **18c** et les mutants P495L, H95Q, C316Y et M423T. Ces mutations sont connues pour réduire la susceptibilité des inhibiteurs des sites « Thumb I », « Palm II », « Palm I » et « Thumb II », respectivement.

4.2 ÉTUDE PAR DOCKING MOLÉCULAIRE

4.2.1 Introduction et principe général

Des études de docking moléculaire ont été réalisées durant ce travail, afin d'atteindre un double objectif : à la fois la compréhension des interactions ligand – récepteur qui gouvernent l'activité, et la prédiction du potentiel de nouvelles structures intéressantes par criblage *in silico*. Avec les résultats de la mutagenèse dirigée en main, nous nous sommes concentrés sur l'interaction des aurones avec le site « Thumb I », constitué d'une double poche hydrophobe. Nous avons utilisé pour cela la structure cristallographique d'un complexe réunissant NS5B et un inhibiteur de type indole se fixant sur le site « Thumb I », et provenant de la littérature [221]. Deux logiciels de docking moléculaire ont été utilisés : Autodock 4 et GOLD. Ces logiciels permettent de rechercher les positions et orientations les plus favorables des ligands en interaction avec le récepteur cible, et d'évaluer l'énergie d'interaction de chaque complexe. Selon un algorithme génétique de type lamarckien, qui comprend une optimisation locale des populations obtenues par les cycles de génération darwiniens classiques, des poses successives sont générées par rotations, translations ou torsions de liaisons de la pose précé-

dente. Après un certain nombre de cycles d'évolutions de la pose initiale, une pose finale est générée, qui est celle dont l'énergie d'interaction avec le récepteur est la plus faible. Le processus est répété plusieurs fois et mène à la création d'un nombre défini de poses optimisées, réunies ensuite en clusters d'énergie et de conformation (pour Autodock) ou simplement affublées d'un score calculé à partir de différents paramètres (pour GOLD). Ces poses obtenues au final reflètent les conformations les plus probables qui peuvent être rencontrées pour un ligand, sur un récepteur donné. Des informations relatives aux liaisons hydrogène formées viennent compléter les valeurs d'énergie et les géométries obtenues [248].

L'utilisation du docking moléculaire a été constante durant la production des générations successives de composés. Cet outil a joué le rôle d'appui à la relation structure-activité classique en permettant de trier les propositions structurales prometteuses ou non. Néanmoins, les géométries de poses obtenues pour de nombreux inhibiteurs dans cette étude ont manqué de pertinence et d'homogénéité. Cela provient sans doute pour une grande partie de la petite taille des composés, qui ne se sont pas révélés suffisamment affins pour le récepteur. Il est donc difficile de tirer une corrélation claire entre la plupart des résultats de docking et les valeurs d'inhibition obtenues lors des tests biologiques. Cependant, parmi les composés les plus actifs, se dessine une cohérence intéressante. Nous avons donc tout de même mis à profit cet élément pour utiliser le docking moléculaire sous deux angles différents : pour étudier les géométries et interactions ligand – récepteur des composés les plus actifs d'une part ; et pour tenter de prédire l'activité d'une petite banque de donnée de dérivés B-hétérocycliques que nous avons imaginé d'après les résultats antérieurs d'autre part.

4.2.2 Étude de la géométrie générale des aures dans le site « Thumb I » et de l'ancrage des cycles A et C

L'étude de la géométrie de fixation des aures dans le site « Thumb I » s'est révélée difficile pour les raisons citées ci-dessus. L'affinité relativement faible des composés étudiés conduit à l'apparition de géométries hétéroclites en docking. Par exemple, des calculs sur le composé **21h**, qui est l'un des plus actifs, mènent à des configurations très différentes de celles rencontrées pour d'autres composés voisins, comme **21g**. De même, les aures ne comportant qu'un groupement phénol sur le cycle A ont tendance à se fixer à plusieurs endroits différents de la poche hydrophobe pour former de nombreux petits clusters, qui ne reflètent probablement pas l'interaction réelle qui a lieu avec le récepteur. Cependant, une conformation privilégiée semble se détacher des calculs réalisés, et toucher une part importante

des composés testés. Pour étudier la géométrie de fixation des aurones dans le site « Thumb I », nous avons donc sélectionné les composés qui présentent cette conformation au sein de leurs meilleurs clusters de poses. Ces molécules sont de diverses natures : polyhydroxylées, méthoxylées, B-hydrophobes ou B-hétérocycliques, et incluent des composés testés ou non. Dans cette étude, le logiciel Autodock 4 a été principalement utilisé.

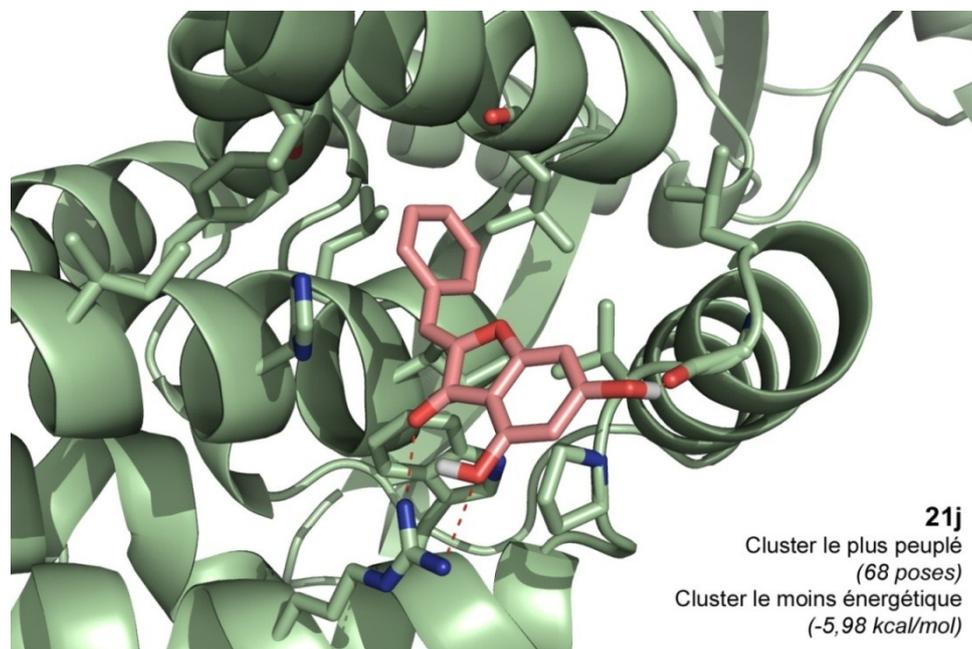


Figure 26. Pose obtenue par docking moléculaire du composé **21j** (en rose) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert). Trois liaisons hydrogène sont visibles en pointillés rouges entre le carbonyle de **21j** et l'arginine 503, entre le groupement 4-hydroxyle et l'arginine 503, et entre le groupement 6-hydroxyle et la glycine 493.

Les résultats des calculs d'amarrage moléculaire du composé **21j**, dont le cycle B est nu, ont en particulier permis de jeter les bases d'une hypothèse de fixation probable des aurones dans le site « Thumb I ». Ce dernier, constitué d'une double poche hydrophobe, présente à son entrée un résidu arginine 503 qui revêt un rôle important dans l'ancrage des ligands de type indole ou benzimidazole, qui se fixent par des liaisons hydrogène entre cette arginine et le carbonyle en position 5 des inhibiteurs. Selon la géométrie la plus favorable en docking, les aurones sont également ancrées sur cette arginine 503 par le biais de liaisons hydrogène avec le carbonyle et le phénol en position 4. Cet élément est tout à fait cohérent avec la présence nécessaire pour l'activité d'un groupement hydroxyle dans cette position. Dans cette configuration, le phénol en position 6 joue également un rôle important : il permet la formation d'une troisième liaison hydrogène aux abords de l'entrée du site, avec la glycine 493. Le cycle benzofuran-3(2*H*)-one est ainsi maintenu par trois interactions fortes à l'entrée

du site. Cela permet d'orienter favorablement le cycle B des aurones, qui se trouve à l'intérieur du site « Thumb I ». Dans cette cavité peuvent se nouer des interactions de plusieurs types, qui dépendent de la nature des substituants présents sur le ligand et ne paraissent pas particulièrement fortes dans le cas de **21j**, qui est par ailleurs un composé assez peu actif.

4.2.3 Étude des interactions particulières du cycle B des aurones avec le site « Thumb I »

Dans le cas de substituants de type phénol sur le cycle B de l'aurone, les interactions formées sont illustrées sur la Figure 27, qui regroupe des visualisations de poses pour les composés **21a**, **21c**, **21d** et **21e**. Outre les interactions décrites ci-dessus, ces poses révèlent l'importance cruciale des groupements phénol sur les positions 2' et 4'. En effet, le composé **21c**, par exemple, donne lieu à la création d'une liaison hydrogène supplémentaire au fond de la cavité entre le phénol en position 4' et le carbonyle de la leucine 392. La présence d'un

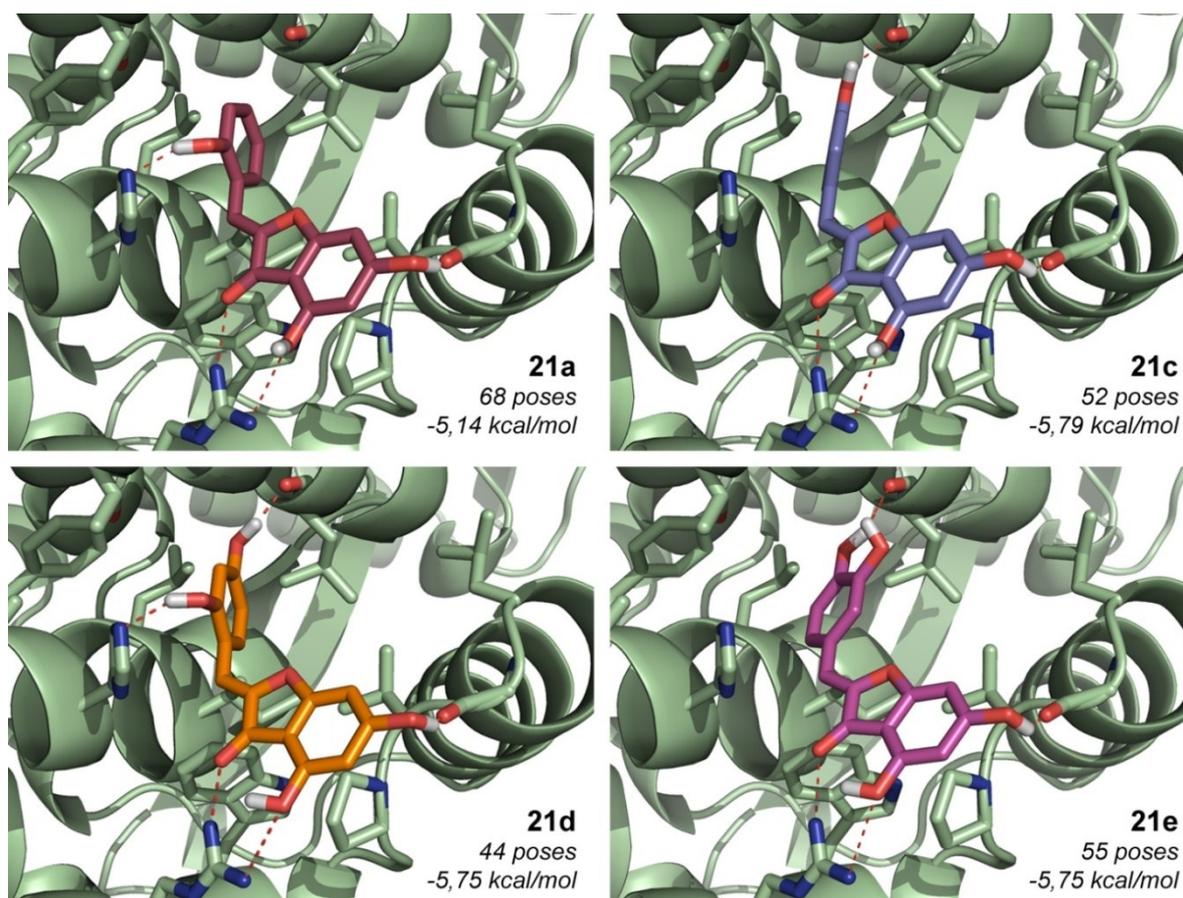


Figure 27. Poses obtenues par docking moléculaire des composés **21a** (en bordeaux), **21c** (en violet), **21d** (en orange) et **21e** (en magenta) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert). Outre les liaisons hydrogène précédemment décrites, deux autres sont visibles en pointillés rouges entre différents groupements phénols présents sur les aurones et les résidus histidine 428 et leucine 392.

3',4'-catéchol sur le composé **21e** enrichit encore cette interaction *via* une chélation de la leucine 392 par les deux groupements hydroxyles. Une autre liaison hydrogène peut également se former dans le cas d'un substituant 2'-hydroxyle, avec un atome d'azote de l'histidine 428, comme observé lors des calculs sur le composé **21a**. La combinaison de phénols en positions 2' et 4', comme sur le composé **21d**, conduit en outre à la formation simultanée de ces deux interactions. Enfin, l'orientation du cycle B de ces molécules varie considérablement selon sa substitution, ce qui semble indiquer l'absence, ou une contribution mineure d'effets électroniques de type π -stacking.

L'introduction de substituants hydrophobes sur le cycle B des aurones permet paradoxalement de conserver voire d'améliorer l'activité des composés. Pourtant, les liaisons hydrogène décrites ci-dessus n'existent plus dans ce cas, et ce sont d'autres types d'interactions qui prennent le pas. Les poses illustrées par la Figure 28 permettent de visualiser ces différentes interactions dans le cas des composés **21g** et **21i**, ainsi que pour la 4,6-dihydroxy-3',4',5'-triméthoxyaurone et la 4,6-dihydroxy-2',4'-diméthylaurone (deux composés synthéti-

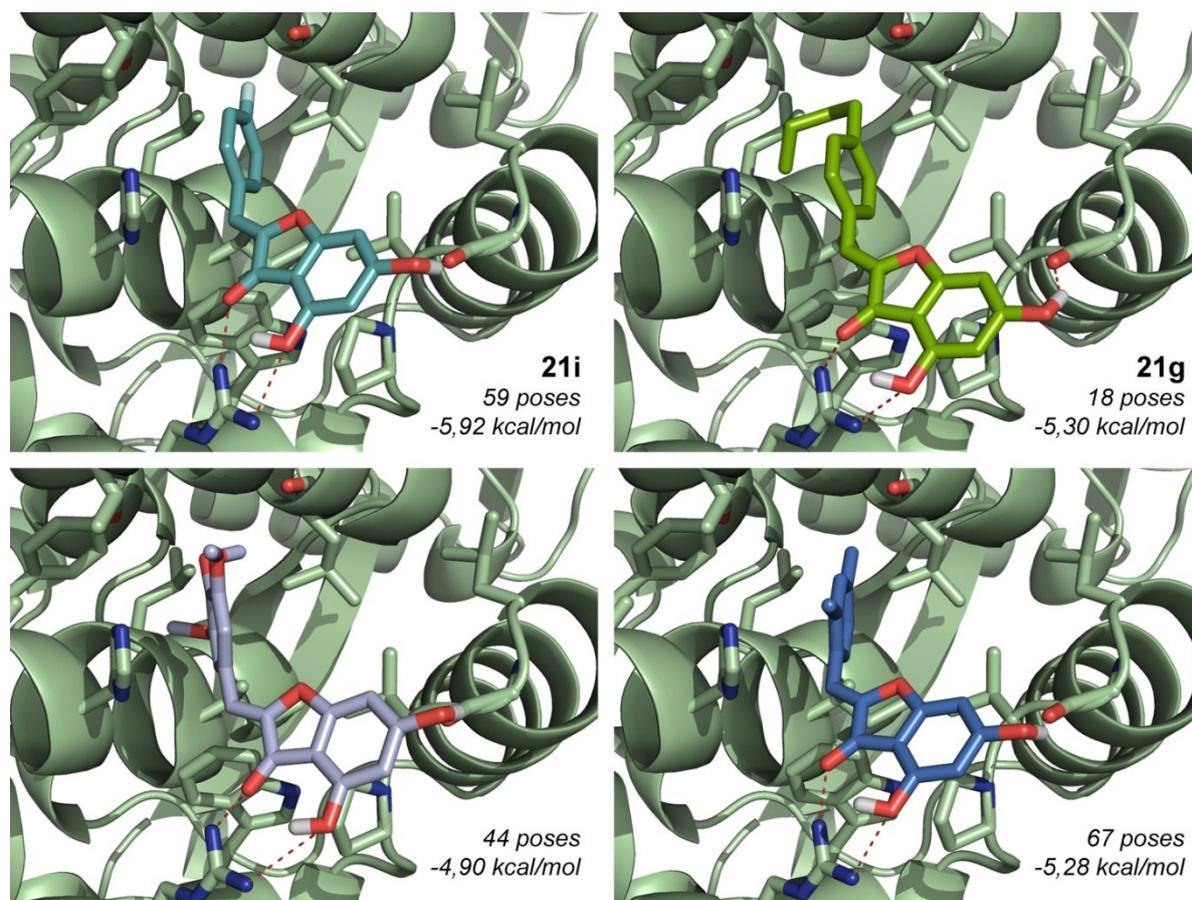


Figure 28. Poses obtenues par docking moléculaire des composés **21i** (en turquoise), **21g** (en vert), et de deux composés méthoxylés et méthylés (en bleu clair et bleu foncé) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert).

sés par le Dr. Wei Yi au laboratoire). La cavité du site « Thumb I » est particulièrement riche en résidus hydrophobes. Les substituants de type fluoro, alkyle ou alkoxy présents sur le cycle B des aurones interagissent donc fortement avec ces derniers *via* des forces de van der Waals. Les acides aminés leucine 392, alanine 396, isoleucine 424, leucine 425, histidine 428, phénylalanine 429, valine 494 et tryptophane 500 sont particulièrement impliqués dans ces interactions hydrophobes avec le noyau B des aurones. De plus, dans certains cas, et notamment avec la 4,6-dihydroxy-3',4',5'-triméthoxyaurone, on observe un effet de π -stacking entre le cycle B et l'histidine 428 qui implique une stabilisation du complexe. Sur les poses concernées, le contrecoup de ce π -stacking est subi par la liaison hydrogène entre l'arginine 503 et le groupement phénol en position 4, qui s'allonge considérablement. On peut néanmoins imaginer que dans un système flexible, cette arginine peut changer d'orientation de manière à rétablir une distance plus favorable avec ce groupement.

4.2.4 Étude de l'apport d'un noyau B alternatif hétérocyclique

Les cycles A et C des aurones étant largement impliqués dans l'ancrage des composés aux abords du site « Thumb I », nous avons tenté d'affiner l'interaction du cycle B avec l'intérieur de la poche hydrophobe. Après l'introduction de substituants de type phénol, méthoxy ou alkyle, nous avons entrepris une recherche des hétérocycles qui seraient les mieux à même de créer des interactions bénéfiques pour l'activité biologique. Dans un premier temps, la géométrie des poses obtenues avec des cycles B de type indole, quinoline, pyrrole, furane, benzimidazole et imidazole a été étudiée. Il s'avère que pour les hétérocycles à cinq chaînons, les poses obtenues sont hétéroclites et difficilement exploitables, ce qui peut s'expliquer par une faible interaction avec la poche de l'enzyme. Les motifs bicycliques ont en revanche présenté des poses plus intéressantes. La Figure 29 permet de visualiser les poses obtenues pour les composés **26b** et **26e**, ainsi que pour deux composés synthétisés par le Dr. Wei Yi au laboratoire : le (*Z*)-4,6-dihydroxy-2-((quinolin-2-yl)méthylène)benzofuran-3(*2H*)-one et le (*Z*)-2-((1-butyl-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(*2H*)-one. Le dérivé benzimidazole **26e**, ainsi que le dérivé quinoline, présentent une stabilisation par π -stacking avec l'histidine 428. L'aurone **26e** révèle en plus une particularité due à la présence d'une amine secondaire au fond du site « Thumb I » : elle permet la formation d'une liaison hydrogène avec la leucine 392. Quant au dérivé *N*-butylindole, son noyau hétérocyclique et son groupement butyle forment une « pince » qui interagit avec les deux sous-poches hydrophobes qui constituent le site. La Figure 30 illustre cette adéquation entre le motif *N*-butylindole et la cavité « Thumb I ».

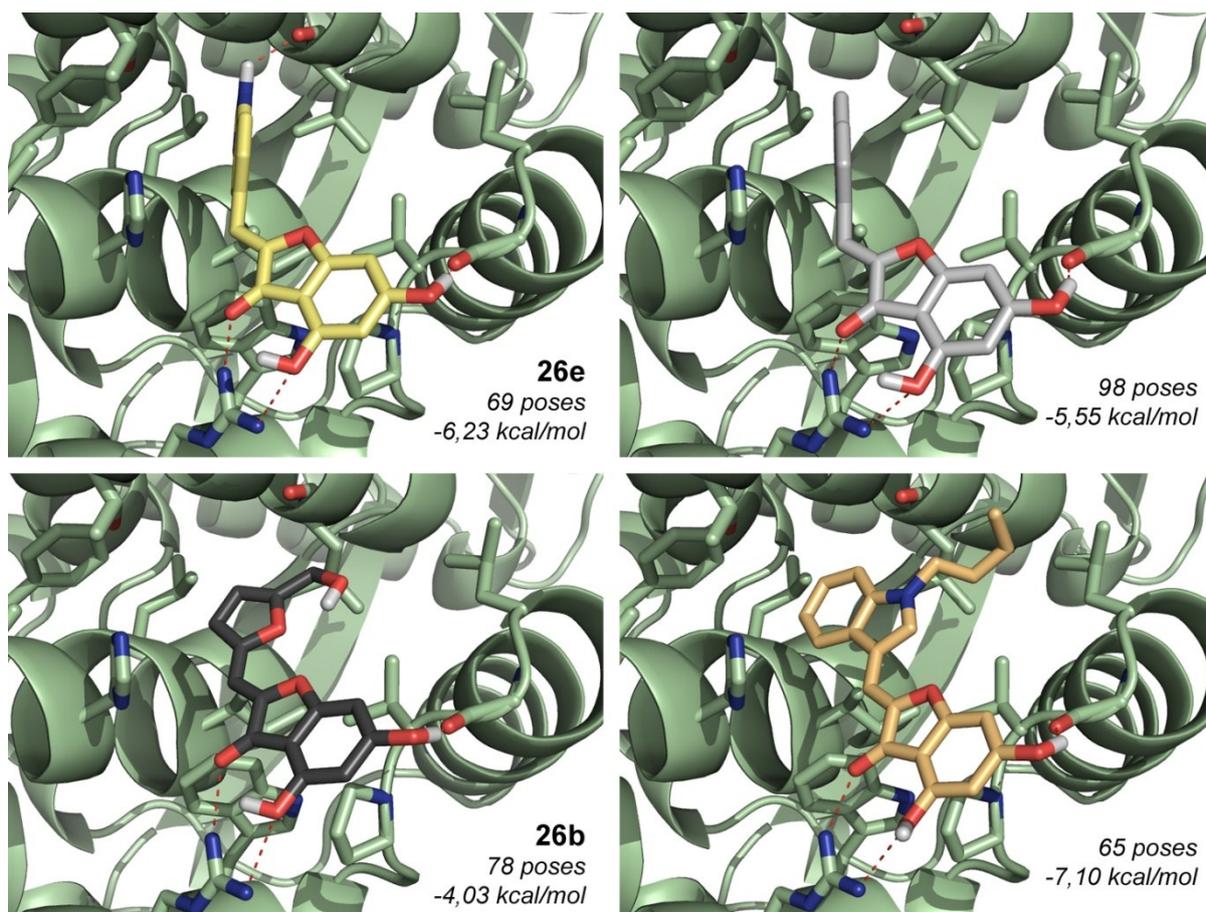


Figure 29. Poses obtenues par docking moléculaire des composés **26e** (en jaune), **26b** (en noir), et de deux composés B-hétérocycliques de type quinoline et *N*-butylindole (en gris et en doré) sur le site « Thumb I » de NS5B (en vert).

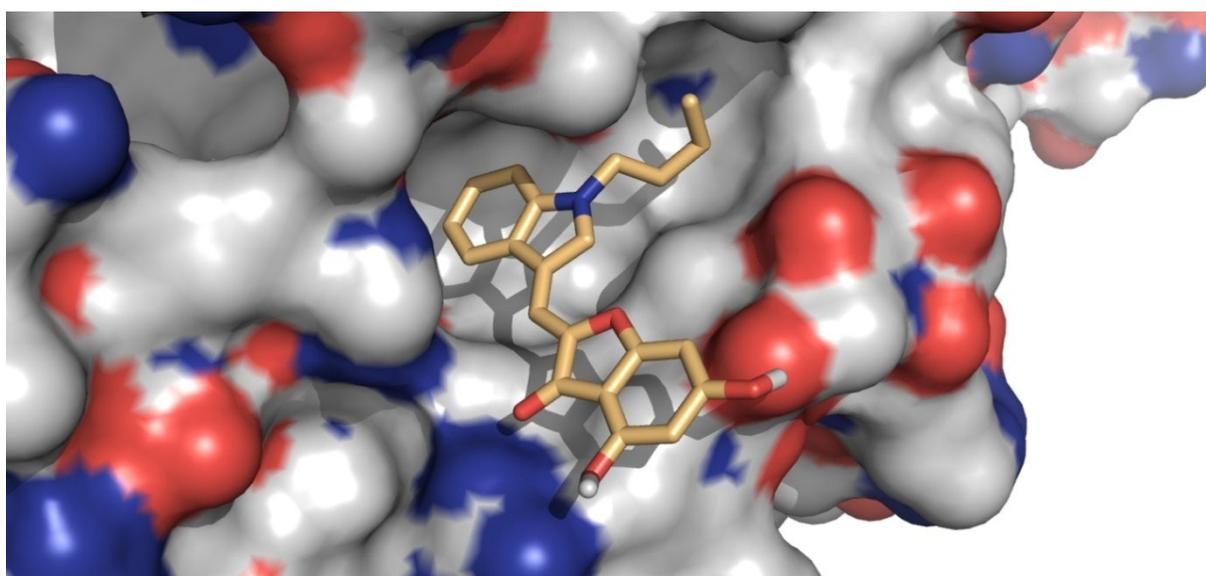
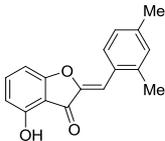
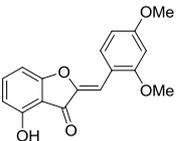
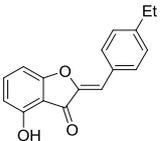
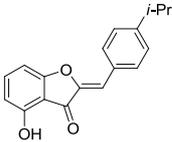
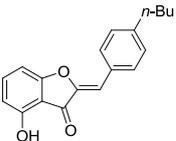
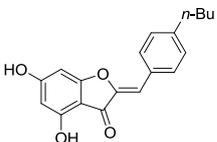
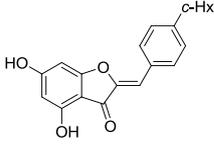
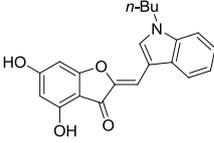
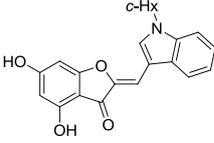
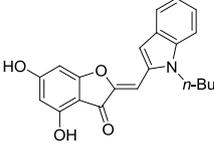
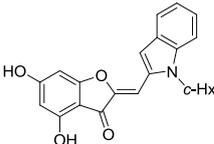
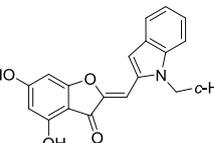
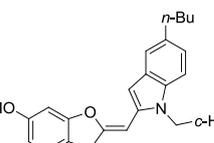
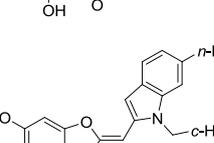
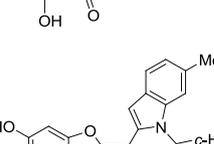
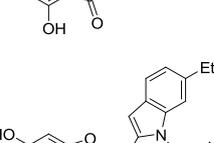


Figure 30. Pose obtenue par docking moléculaire du (*Z*)-2-((1-butyl-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-4,6-dihydroxy-benzofuran-3(2*H*)-one, visualisée avec la protéine NS5B en mode surface.

4.2.5 Prédiction de l'activité d'aurones B-hétérocycliques

Parmi les dérivés d'aurones B-hétérocycliques envisagés, la classe des indoles comprend un représentant déjà testé sur la polymérase NS5B isolée. Il s'agit du (*Z*)-2-((1-butyl-1*H*-indol-3-yl)méthylène)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one, qui constitue le dérivé d'aurone le plus actif identifié à ce jour ($IC_{50} = 2,2 \mu M$). C'est pourquoi nous avons entrepris d'évaluer le potentiel d'inhibition de NS5B de divers dérivés de type indole, diversement substitués et branchés sur le squelette benzofuranone. Le logiciel GOLD a été utilisé pour cette étude, et le Goldscore a été relevé pour chaque composé virtuel. Ce score constitue la somme pondérée de différentes contributions énergétiques, issues par exemple des forces de van der Waals ou des liaisons hydrogène. Plus le Goldscore obtenu est élevé, plus le potentiel du composé testé est considéré comme intéressant. Les résultats obtenus pour les structures hétérocycliques les plus prometteuses, ainsi que pour des structures classiques déjà testées, sont présentés dans le Tableau 10.

Comp.	Structure	Goldscore (meilleure pose)	Fourchette de Goldscores	IC_{50} (μM)
18d		38,6	33,5 – 38,6	5,8
18e		44,4	34,0 – 44,4	9,7
18h		36,3	33,9 – 36,3	> 20
18i		38,4	34,8 – 38,4	> 20
18j		40,5	36,6 – 40,5	> 20
21g		41,3	35,3 – 41,3	2,5

Comp.	Structure	Goldscore (meilleure pose)	Fourchette de Goldscores	IC ₅₀ (μM)
21h		45,5	35,0 – 45,5	2,3
V1		52,4	42,8 – 52,4	2,2
V2		49,4	43,6 – 49,4	<i>n.d.</i>
V3		50,7	43,1 – 50,7	<i>n.d.</i>
V4		47,4	42,6 – 47,4	<i>n.d.</i>
V5		59,3	57,4 – 59,3	<i>n.d.</i>
V6		62,2	53,9 – 62,2	<i>n.d.</i>
V7		52,0	43,0 – 52,0	<i>n.d.</i>
V8		45,9	39,9 – 45,9	<i>n.d.</i>
V9		43,0	40,3 – 43,0	<i>n.d.</i>

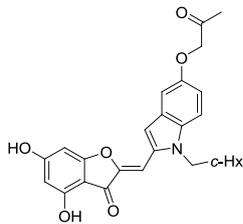
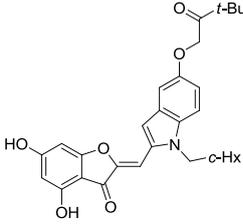
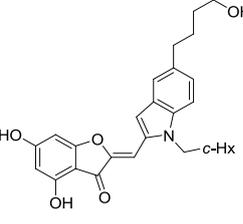
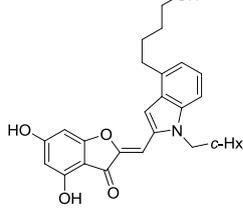
Comp.	Structure	Goldscore (meilleure pose)	Fourchette de Goldscores	IC ₅₀ (μM)
V10		62,3	53,9 – 62,3	<i>n.d.</i>
V11		66,4	48,3 – 66,4	<i>n.d.</i>
V12		46,7	41,0 – 46,7	<i>n.d.</i>
V13		44,9	40,7 – 44,9	<i>n.d.</i>

Tableau 10. Données issues du docking des composés sur une structure cristallographique de NS5B (2dxs), avec le logiciel GOLD (docking réalisé dans une sphère de 10 Å autour du ligand cristallisé, avec 20 poses générées).

Si les Goldscores obtenus pour les composés **18** et **21** ne reflètent pas toujours précisément leur activité biologique, ils sont tous situés entre 35 et 45. Les composés virtuels de type indole obtiennent pour la plupart un meilleur score. Les dérivés **V5**, **V6**, **V10** et **V11** présente un profil *in silico* particulièrement bon, avec des Goldscores autour de 60 – 65 et un potentiel identique au ligand nanomolaire co-cristallisé (Gs = 62 – 64). Ces composés n'ont pas été synthétisés pour le moment, mais constituent des axes de recherche importants pour continuer ce travail.

4.3 ÉLÉMENTS PHARMACOPHORIQUES IMPORTANTS

Avec les résultats présentés précédemment en main, notamment les tests biologiques, la mutagenèse dirigée et le docking moléculaire, il est possible de dresser une carte de la

structure générale des aurones en mettant en lumière l'influence des propriétés stériques, électroniques ou électrostatiques de différentes positions substituables sur l'activité anti-NS5B. Ces éléments, ainsi que les interactions clé avec la protéine NS5B, sont représentés schématiquement sur la Figure 31.

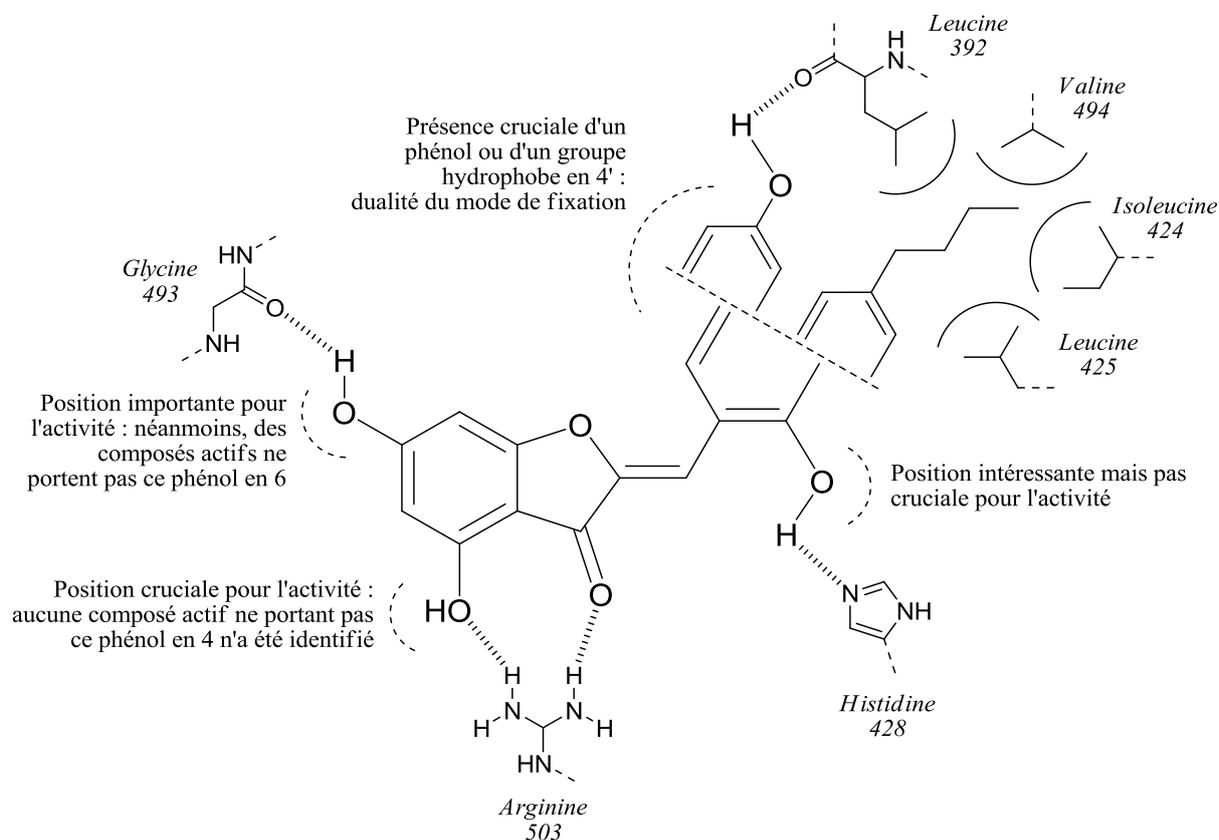


Figure 31. Représentation schématique des éléments pharmacophoriques importants et des interactions des aurones avec la protéine NS5B.

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Ce travail a fait l'objet d'un brevet et d'un article paru dans le *Journal of Medicinal Chemistry* [249]. Il a consisté en la synthèse de plusieurs générations d'inhibiteurs de la polymérase du VHC, ainsi que leur évaluation biologique et l'établissement des premières relations structure-activité. Grâce à l'apport de la mutagenèse dirigée et du docking moléculaire, nous avons étudié les interactions entre les aurones et la protéine, et proposé de nouvelles structures prometteuses à développer. Ces études doivent être complétées par la synthèse de nouveaux analogues, notamment B-hétérocycliques, afin d'atteindre un potentiel d'inhibition submicromolaire. De plus, les paramètres pharmacocinétiques (biodisponibilité, clairance, demi-vie dans l'organisme, solubilité, liaison aux protéines plasmatiques, etc.) et de toxicité doivent être évalués sur les composés les plus actifs, afin de déterminer les forces et faiblesses des représentants de cette famille comme candidats médicaments.

De nouveaux essais de co-cristallisation aurone – NS5B doivent être entrepris, afin de confirmer le mode de fixation des inhibiteurs et de disposer d'une structure cristallographique de l'enzyme mieux adaptée pour de futures études de docking. Un travail de QSAR 3D (relation structure-activité quantitative 3D) pourrait également être mené sur la base des composés déjà testés, qui présentent une gamme d'activités relativement large. Enfin, des tests cellulaires plus poussés sur modèle réplicon pourraient nous fournir des indications précieuses sur le potentiel des composés *in cello*.

Partie 4.

**MODULATION DE LA TYROSINASE PAR
LES AURONES ET DÉRIVÉS HYBRIDES**

Chapitre 1. La tyrosinase et les pathologies associées

1.1 PROCESSUS BIOLOGIQUES IMPLIQUANT LA TYROSINASE

1.1.1 Mélanogénèse

La couleur de la peau humaine est le résultat d'une combinaison de nombreux pigments, comme l'hémoglobine et les caroténoïdes. Néanmoins, les pigments prédominants sont les mélanines, qui peuvent être distinguées en deux types : les eumélanines et phaéoméla-

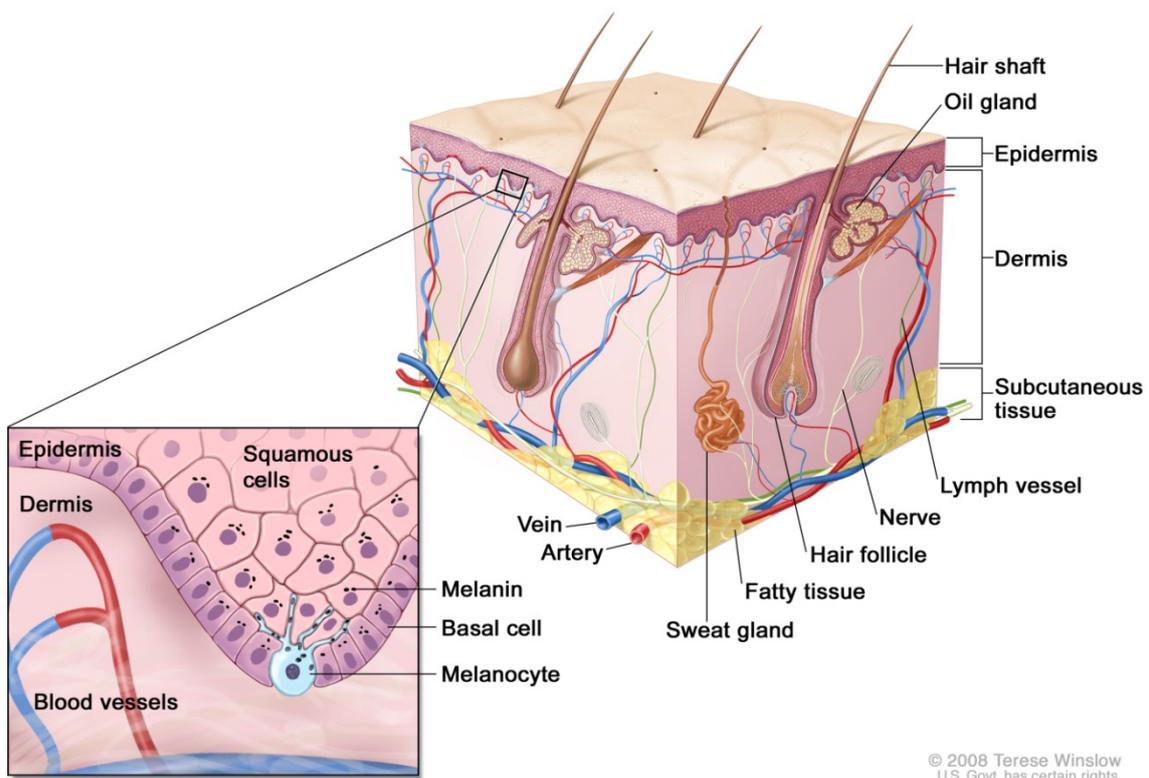


Figure 32. Coupe de la peau humaine et zoom sur la partie basale de l'épiderme ; emplacement des mélanocytes et répartition de la mélanine produite.

nines. C'est une distribution de ces deux familles en différentes proportions qui confère à la peau humaine un large spectre de couleurs, du brun très foncé au jaune orangé. La synthèse de ces pigments s'effectue au niveau des mélanocytes, des cellules de grande taille situées dans la couche basale de l'épiderme ou dans la partie inférieure des follicules pileux (Figure 32) [250]. Au sein de ces cellules se trouvent les mélanosomes, des organites spécialisés bourgeonnant à partir de l'appareil de Golgi. Ces vésicules dont la maturation s'accompagne d'un déplacement vers les kératinocytes voisins, prennent en charge la biosynthèse des mélanines. Cette synthèse constitue un risque important pour l'organisme, notamment dû à la formation de quinones réactives durant le processus, qui peuvent réagir facilement avec les protéines et acides nucléiques des cellules [251]. Le cloisonnement de la mélanogénèse dans des organites très compartimentés constitue donc une sécurité essentielle avant la libération des mélanines formées dans l'épiderme. Le fort degré de conjugaison de ces pigments et une absorption photonique quasiment continue de l'ultraviolet à l'infrarouge jouent alors un rôle primordial de préservation des organismes contre la propagation des radicaux libres et les effets des rayonnements UV (Figure 33) [252].

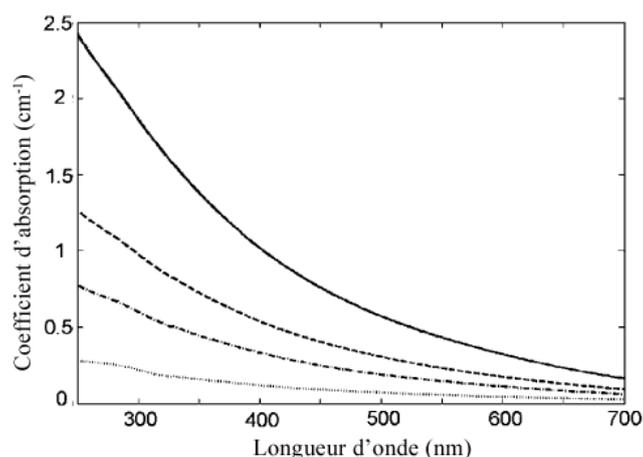


Figure 33. Spectre d'absorption UV-visible d'eumélanine synthétique à quatre concentrations différentes (0,0005% ; 0,0015% ; 0,0025% et 0,005% en masse) [252].

La mélanogénèse est un processus qui comprend à la fois le développement et la maturation des mélanosomes, et la biosynthèse des mélanines en leur sein. Au cours de ce phénomène, les eumélanines et les phaéomélanines sont synthétisées *via* deux voies biochimiques bien distinctes (Schéma 17). Cependant, les deux familles sont issues au départ de fonctionnalisations de la DOPAquinone, elle-même produite par deux oxydations successives de la tyrosine puis du L-DOPA. Ces deux réactions sont catalysées par une même enzyme : la tyrosinase, qui est l'enzyme-clef de la mélanogénèse. Deux autres enzymes, la TRP1 et la TRP2

(« *Tyrosinase Related Protein 1 et 2* »), dont la première possède environ 70% d'homologie dans sa séquence d'acides aminés avec la tyrosinase, permettent le maintien de la stabilité de cette dernière dans la membrane du mélanosome [253,254]. Les trois enzymes sont par ailleurs impliquées dans des étapes tardives de la synthèse des eumélanines. La voie de synthèse des eumélanines est constituée en premier lieu d'une cyclisation de la DOPAquinone en DOPAchrome, puis plusieurs oxydations menant à des dérivés de type indole peuvent avoir lieu, suivies par des polymérisations qui forment les eumélanines. Cette voie est empruntée spontanément par la DOPAquinone dans un environnement dépourvu de thiols [255]. Lorsque des thiols sont présents (principalement la cystéine, mais également le glutathion), la voie des phaéomélanines est privilégiée. Elle débute par une condensation de la DOPAquinone avec une cystéine pour donner l'alanyl-hydroxybenzothiazine. Ce composé est ensuite transformé

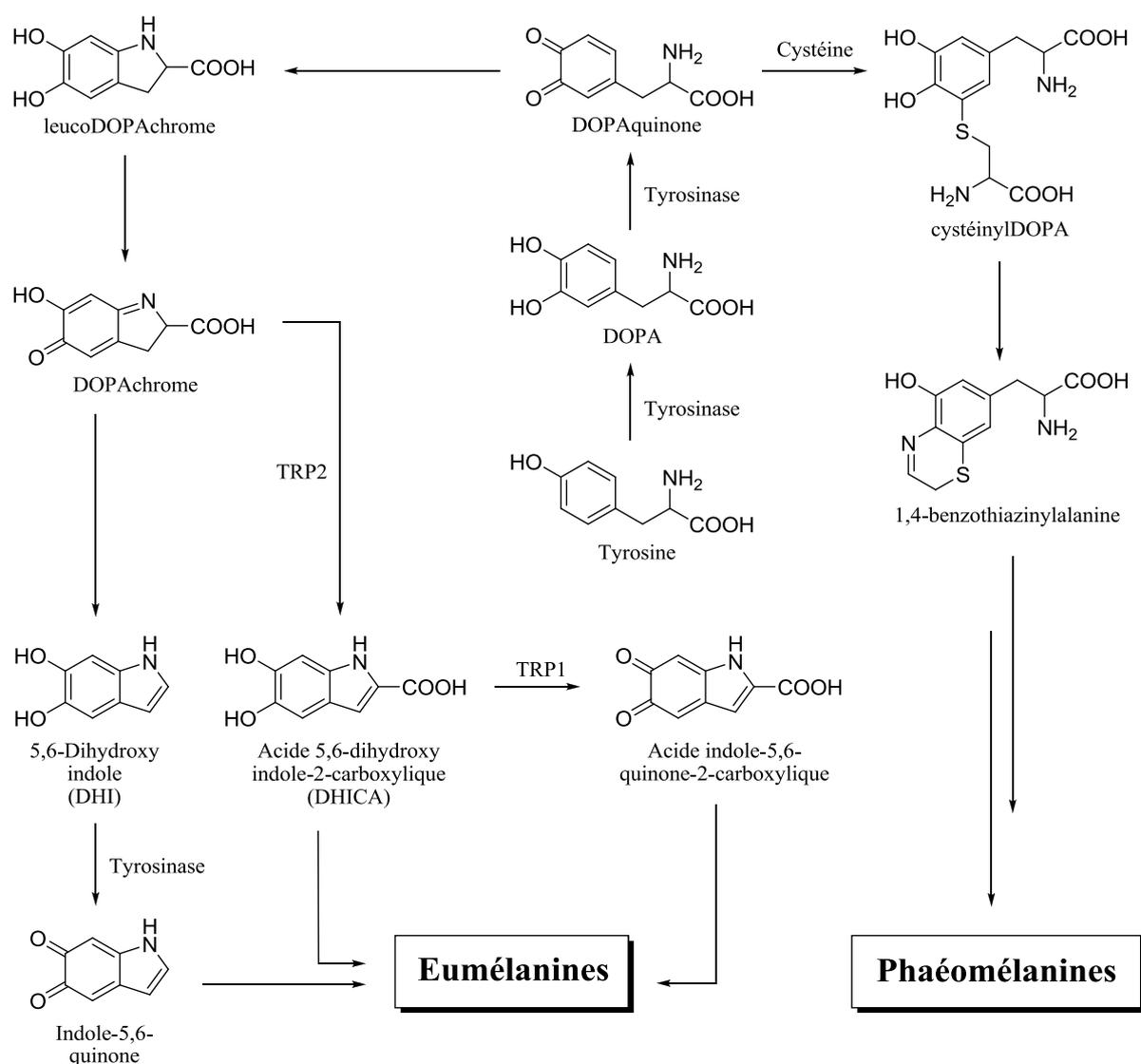


Schéma 17. Biosynthèse des eumélanines et des phaéomélanines à partir de la tyrosine et catalysée par la tyrosinase et les enzymes associées TRP1 et TRP2 [256].

en phaeomelanines. La biosynthèse des mélanines est régulée par de nombreux facteurs, internes et environnementaux, comme les interleukines, certaines vitamines et prostaglandines, ainsi que des hormones de stimulation des mélanocytes (MSH) [256]. L'exposition prolongée d'un organisme aux rayonnements ultraviolets ou l'apparition de conditions pathologiques diverses peuvent notamment induire des dérèglements importants du fonctionnement de la mélanogénèse.

1.1.2 Biosynthèse de la neuromélanine

La présence d'un biopolymère analogue à la mélanine, la neuromélanine, dans les pé-caryons (granules comparables à des lysosomes) de la substantia nigra, est responsable de la coloration très sombre de ce noyau du système nerveux, composé de neurones dopaminergiques. En revanche, le rôle de cette neuromélanine est actuellement assez flou. En effet, de nombreuses études suggèrent que la structure chimique de ce polymère pourrait permettre de piéger des espèces toxiques pour le système nerveux, comme des métaux, des intermédiaires nocifs, des quinones réactives et des espèces oxydantes [257]. Cependant, la saturation de ce système de défense conduirait à la libération des neuromélanines dans le cytoplasme et dans le milieu extracellulaire, qui s'accompagne d'une activation des microglies (les défenses immunitaires de système nerveux), entraînant à leur tour la libération de substances toxiques par les neuromélanines, comme de l'oxyde nitrique, des interleukines 6 ou des facteurs de nécrose tumorale (TNF- α). Ces espèces vont alors accélérer la dégénérescence des neurones dopaminergiques, menant à la libération d'une quantité plus grande de neuromélanine et activant ainsi un cercle vicieux caractéristique de la maladie de Parkinson [258]. La neuromélanine jouerait ainsi un double rôle de protection des neurones, dans un premier temps, puis de substance toxique accompagnant la progression de conditions pathologiques dans un second temps. Les conditions de la formation de la neuromélanine sont également très controversées. En effet, si la possibilité d'une auto-oxydation de catéchols, provenant par exemple de la dopamine, en quinones a été démontrée, de nombreuses autres voies de synthèse suggérées font intervenir des enzymes diverses comme la tyrosine hydroxylase, des peroxydases, des lipoxygénases, la monoamine oxydase ou encore la prostaglandine H synthase. La tyrosinase a également été citée comme partie prenante dans la biosynthèse, mais plusieurs études réfutent cette hypothèse sur la base de l'absence de tyrosinase dans le cerveau humain [259]. Pourtant, des travaux supportent l'existence d'une petite quantité de cette enzyme, notamment dans la substantia nigra, la région riche en dopamine, où elle exerce une activité 100.000 fois plus faible que dans les mélanocytes de l'épiderme [260,261].

1.2 DÉSORDRES ASSOCIÉS ET CIBLAGE DE LA TYROSINASE

1.2.1 Hyperpigmentation

L'hyperpigmentation est le résultat d'une activation mélanocytaire caractérisée par une prolifération anarchique des mélanocytes, par une augmentation de la quantité de mélanine biosynthétisée, ou par une intensification du transport des mélanosomes des mélanocytes vers les kératinocytes. Ces phénomènes peuvent prendre plusieurs formes : les lentigos, des lésions mélanocytiques brunes, en général uniformes et maculaires, ovales ou circulaires [262], et pouvant être de naissance (lentigo simplex) ou acquises avec l'âge (lentigo senilis, couramment taches de vieillesse) ; le chloasma, d'aspect plus irrégulier et dû à un dérèglement hormonal (associé notamment à la grossesse) ; ou encore le naevus, macule plate ou surélevée de forme variable (aussi appelé grain de beauté). Une réponse post-inflammatoire à des dommages causés à la peau par des rayonnements UV peut également fréquemment mener à une hyperpigmentation locale. En général bénignes, ces marques induites par l'hyperpigmentation peuvent se révéler particulièrement inesthétiques et motiver chez certaines personnes l'emploi de composés à activité dépigmentante [120]. D'autre part, l'utilisation de produits dépigmentants est une pratique répandue en Asie ou en Afrique où elle est soutenue par des phénomènes de société ou des éléments de culture liés au désir de blanchiment de la peau, notamment chez les femmes [263]. Or, la plupart des produits utilisés, comme l'hydroquinone, comportent des risques dus à leur toxicité [264]. La découverte de nouveaux agents dépigmentants plus sûrs permettrait un blanchiment de la peau moins nocif, même si les problèmes éthiques et socioculturels inhérents à ces pratiques ne peuvent trouver de réponses dans la dermocosmétique.

Parmi les stratégies de dépigmentation pouvant être envisagées, on peut noter l'inhibition de la glycosylation de la tyrosinase, du transfert des mélanosomes, et plus généralement l'utilisation d'agents antioxydants et anti-inflammatoires. Cependant, l'inhibition de la tyrosinase reste de loin le moyen le plus étudié pour contrecarrer l'effet des hyperpigmentations, étant donné le rôle clé joué par l'enzyme dans le processus de mélanogénèse. Pourtant, étant donné que les produits utilisés présentent généralement plusieurs effets, il est parfois difficile de connecter leur activité sur une cible donnée avec un effet observé sur la pigmentation [265]. Les composés portant un motif thiol ou les polyphénols, par exemple, ont souvent été identifiés comme de bons inhibiteurs de la tyrosinase, mais sont aussi généralement des antioxydants efficaces [266,267]. Ces considérations ne compromettent néanmoins en aucun

cas la légitimité de la stratégie de ciblage de la tyrosinase dans le cadre d'un traitement contre l'hyperpigmentation.

1.2.2 Maladie de Parkinson et mélanome malin

L' α -synucléine est une protéine fortement impliquée dans la maladie de Parkinson comme neurotoxique, mais dont le rôle est encore peu connu [268]. Largement exprimée au niveau des corps de Lewy, cette protéine serait en mesure de stocker de la dopamine et de la libérer dans les terminaisons nerveuses. Cependant, dans des conditions pathologiques, l'augmentation de la production d' α -synucléine combinée à la libération du contenu des lysosomes dans le cytoplasme, et notamment de la tyrosinase qui s'y trouve, permet une réaction entre les deux enzymes. Ce sont en réalité les acides aminés de type tyrosine de l' α -synucléine qui sont oxydés par la tyrosinase et mènent à la formation de quinones, et à la dimérisation de l'enzyme ou à sa liaison à des liposomes unilamellaires. Ces phénomènes compromettent fortement ses fonctions relatives au métabolisme et au stockage de la dopamine, conduisant à une forte augmentation du niveau de dopamine cytosolique et à des dommages neuronaux importants [269]. De plus, la tyrosinase est capable d'oxyder le noyau catéchol de la dopamine en dopamine-quinone. Il existe de nombreuses cibles pour ces espèces très réactives dans les neurones, comme les groupements thiols des cystéines de protéines cytosoliques, la tyrosine hydroxylase, les transporteurs de dopamine et la respiration mitochondriale. Les quinones peuvent également pénétrer le noyau des cellules et provoquer des modifications covalentes avec l'ADN. Enfin, cette dopamine-quinone peut elle-même réagir avec l' α -synucléine et stabiliser un intermédiaire toxique dans la formation de fibrilles. Par ces deux mécanismes, la tyrosinase pourrait ainsi favoriser indirectement la progression de la maladie de Parkinson [261].

De manière surprenante, plusieurs éléments communs ont permis très récemment de rapprocher la maladie de Parkinson du mélanome malin. En effet, outre l'implication dans les deux cas de la biochimie de la tyrosine et du L-DOPA, ainsi que la présence de la tyrosinase, il a été montré que les mélanomes malins expriment également l' α -synucléine, qui n'est en revanche pas présente dans la peau humaine normale [270]. Ces observations, combinées à des études indiquant une forte proportion de cas de mélanome chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, suggèrent une cause commune à ces pathologies impliquant le métabolisme de la tyrosine et l' α -synucléine [271,272]. La tyrosinase pourrait donc jouer un rôle essentiel. Néanmoins, aucune étude n'a pu identifier clairement son rôle pour le moment et la

possibilité d'un ciblage de la tyrosinase dans le cadre d'une thérapie pour la maladie de Parkinson ou du mélanome reste de ce fait largement hypothétique.

1.3 STRUCTURE ET MÉCANISME DE L'ACTIVITÉ DE LA TYROSINASE

1.3.1 Considérations structurales

La tyrosinase (E.C. 1.14.18.1), une enzyme comptant parmi les polyphénol oxydases (PPO), est largement présente dans les bactéries, champignons, plantes, invertébrés et vertébrés, et constitue un important objet de recherche depuis les premières études biochimiques sur le champignon *Russula nigricans* en 1895. Comme décrit plus haut, la fonction principale de la tyrosinase est l'oxydation de phénols en catéchols, et de catéchols en *ortho*-quinones. Chez les animaux, et plus particulièrement les mammifères, la tyrosinase permet ainsi de catalyser les deux premières étapes de la mélanogénèse, l'oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA, puis de ce dernier composé en DOPA-quinone. D'un point de vue structural, la tyrosinase est une métalloenzyme à centre binucléaire de cuivre appartenant à la famille des protéines transmembranaires de type I. Sa structure exacte est restée longtemps inconnue avant une première résolution en 2006 par le groupe de Sugiyama qui a confirmé la présence d'un site catalytique de type binucléaire de cuivre, ainsi que l'existence de plusieurs formes (notamment *oxy* : $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2^{2-}\text{-Cu}^{\text{II}}$, *deoxy* : $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$, et *met* : $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OH-Cu}^{\text{II}}$), sur une tyrosinase recombinante provenant de la bactérie *Streptomyces castaneoglobisporus* accompagnée d'une protéine caddie [273]. Une telle structure du site actif avait déjà été proposée grâce à des données spectroscopiques comme étant un analogue structural de celui des autres enzymes à cuivre de type 3 et notamment des catéchol oxydases et des hémocyanines [274]. Néanmoins, la cristallisation de la tyrosinase était rendue particulièrement difficile par la présence d'une région transmembranaire et d'une extrémité glycosylée.

Le centre catalytique de la tyrosinase contient deux atomes de cuivre, nommés CuA et CuB. Les deux sphères de coordination associées comprennent au total six acides aminés de type histidine, qui sont directement engagés dans des liaisons azote – cuivre. Strictement nécessaires à l'activité de la tyrosinase, ces histidines sont conservées dans les hémocyanines et les catéchol oxydases au niveau de la région CuB. Il semble en revanche que la région CuA soit sensiblement différente aux niveaux stérique et électronique dans certaines hémocyanines et catéchol oxydases, expliquant notamment les différences d'accessibilité et de nature des substrats naturels de ces enzymes. Une concentration importante de résidus hydrophobes à

proximité du centre catalytique forme une poche qui permet de fixer le substrat de la tyrosinase. Les interactions entre cette cavité et la tyrosine, par exemple, semblent orienter cette dernière de manière à réagir avec le centre CuA. En particulier, une interaction π - π entre les groupements phényle de la tyrosine et imidazole de l'histidine 194 pourrait revêtir une importance cruciale dans le positionnement de la liaison C-OH du substrat vers le centre CuA [273,275]. Une deuxième structure cristallographique provenant de la bactérie *Bacillus megaterium* a confirmé le rôle central du site CuA dans l'activité monophénolase de la tyrosinase. En revanche, l'activité diphénolase serait réalisée au niveau du site CuB, ce qui est consistant avec l'activité similaire observée sur le même site pour les catéchol oxydases. Cristallisée sous forme de dimère, cette deuxième tyrosinase bactérienne, qui n'est cette fois pas accompagnée d'une protéine caddie, s'est révélée capable sous forme cristalline d'oxyder la L-tyrosine. Elle a également permis de mettre en évidence une certaine plasticité des centres de cuivre, capables de bouger au sein du site actif. Enfin, une structure de la même source a été co-cristallisée en présence d'acide kojique, l'inhibiteur de référence de la tyrosinase. Contre toute attente, l'acide kojique se fixerait d'après cette structure dans une poche relativement éloignée des centres de cuivre (environ 7 Å), et le motif hydroxyméthyle de l'inhibiteur est orienté vers le site CuB, alors que de nombreuses études envisagent une fixation aux cuivres par la face hydroxycarbone de la molécule (Figure 34) [276]. Seule une étude de docking récente avait prévu ce type de configuration [277].

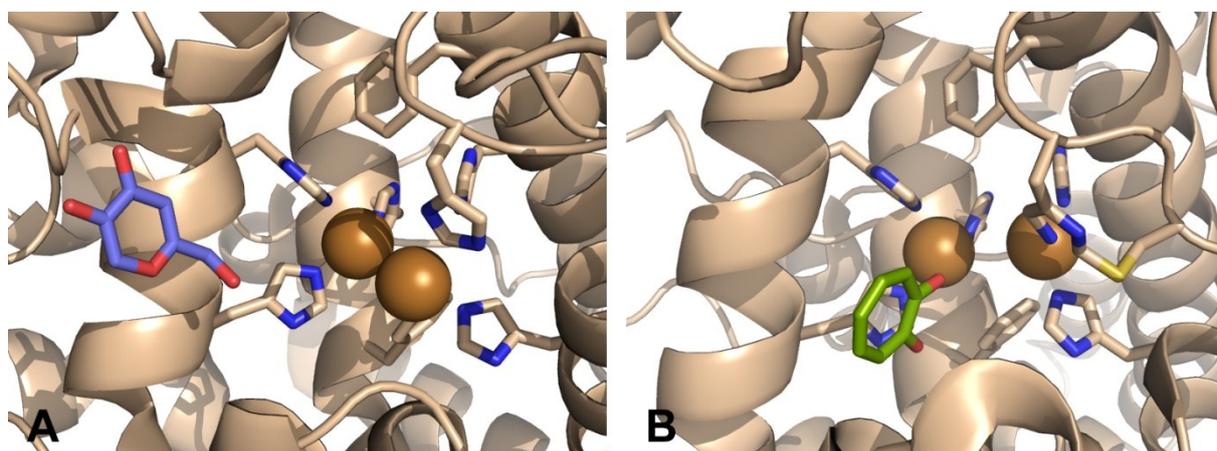


Figure 34. Structure cristallographique des sites catalytiques de type binucléaire de cuivre de deux tyrosinases, respectivement isolées de *Bacillus megaterium* (bactérie, oxydée, A) et d'*Agaricus bisporus* (champignon, réduite, B). Les enzymes sont co-cristallisées avec des inhibiteurs connus : l'acide kojique (A) et la tropolone (B).

Enfin, une troisième structure cristallographique de tyrosinase, provenant cette fois d'un champignon, *Agaricus bisporus*, a été résolue très récemment. Si sa structure est proche

des tyrosinases bactériennes, quelques éléments varient sensiblement. En premier lieu, l'enzyme est constituée d'un tétramère regroupant deux unités « H », la tyrosinase proprement dite, ainsi que deux unités « L », une unité annexe dont les interactions avec l'unité H sont éloignées du site actif. Ces unités L ne jouent donc probablement pas de rôles directs sur l'activité de l'enzyme. En revanche, elles peuvent influencer le repliement de la protéine, la liaison aux atomes de cuivre ou la stabilité *in vivo* de la tyrosinase. Ensuite, la présence de liaisons covalentes de type thioéther entre des cystéines et des histidines de la protéine connectées par des séquences de type Cys-X-His est observée chez le champignon, alors que ces liaisons sont totalement absentes des tyrosinases bactériennes. Ce phénomène a une influence directe sur le site actif puisque l'une des histidines liées au site CuA est impliquée dans une liaison thioéther de ce type, menant ainsi à une poche hydrophobe modifiée chez le champignon. Si un rôle direct de cette liaison dans la catalyse est exclu, elle pourrait permettre un transfert d'électrons plus rapide et un potentiel rédox optimisé. Enfin, une structure cristallographique de la tyrosinase contenant une molécule de tropolone, un inhibiteur connu de l'enzyme, permet de solidifier l'hypothèse émise plus haut d'une orientation des substrats phénoliques par le biais d'une interaction avec une histidine du site CuB. La tropolone semble de plus se lier à l'enzyme directement aux cuivres, contrairement à l'acide kojique précédemment décrit sur une tyrosinase bactérienne (Figure 34) [278].

1.3.2 Mécanisme des activités de l'enzyme et complexes modèles

La tyrosinase peut catalyser à la fois l'oxydation d'un phénol en catéchol (activité monophénolase) et d'un catéchol en *ortho*-quinone (activité diphénolase, Schéma 17). C'est l'activité monophénolase qui permet d'obtenir la DOPAquinone à partir de la L-tyrosine dans la nature, et qui distingue au niveau mécanistique la tyrosinase d'autres enzymes comme les catéchol oxydases, qui ne possèdent qu'une activité diphénolase. Le mécanisme de cette activité monophénolase débute par l'approche du substrat sur la forme *oxy* du site actif de l'enzyme, guidée par la poche hydrophobe et les interactions π - π au voisinage des atomes de cuivre, puis par la formation d'une liaison entre le phénol et, vraisemblablement, le centre CuA. Le pont péroxo subit alors une rotation qui va lui permettre de pointer vers l'atome de carbone en *ortho* du phénol, et ainsi générer un catéchol lié aux centres métalliques. Après rupture du pont, la forme *D-met* réagit avec un proton et libère l'*ortho*-quinone et une molécule d'eau, en parallèle à une réduction du cuivre(II) en cuivre(I). La fixation d'une molécule de dioxygène peut alors régénérer la forme active oxydée de l'enzyme. L'activité diphénolase partage une partie du mécanisme réactionnel. En revanche, elle permet l'oxydation de deux

catéchols en *ortho*-quinone correspondante pour chaque cycle. Après la formation de liaisons entre le catéchol et les deux centres à cuivre de la forme *oxy*, une molécule de quinone est libérée et permet la formation de la forme *met*, laquelle réagit de nouveau avec un équivalent de catéchol. La forme *D-met* est alors obtenue, qui emprunte alors une voie similaire au mécanisme de l'activité monophénolase (Schéma 18) [279].

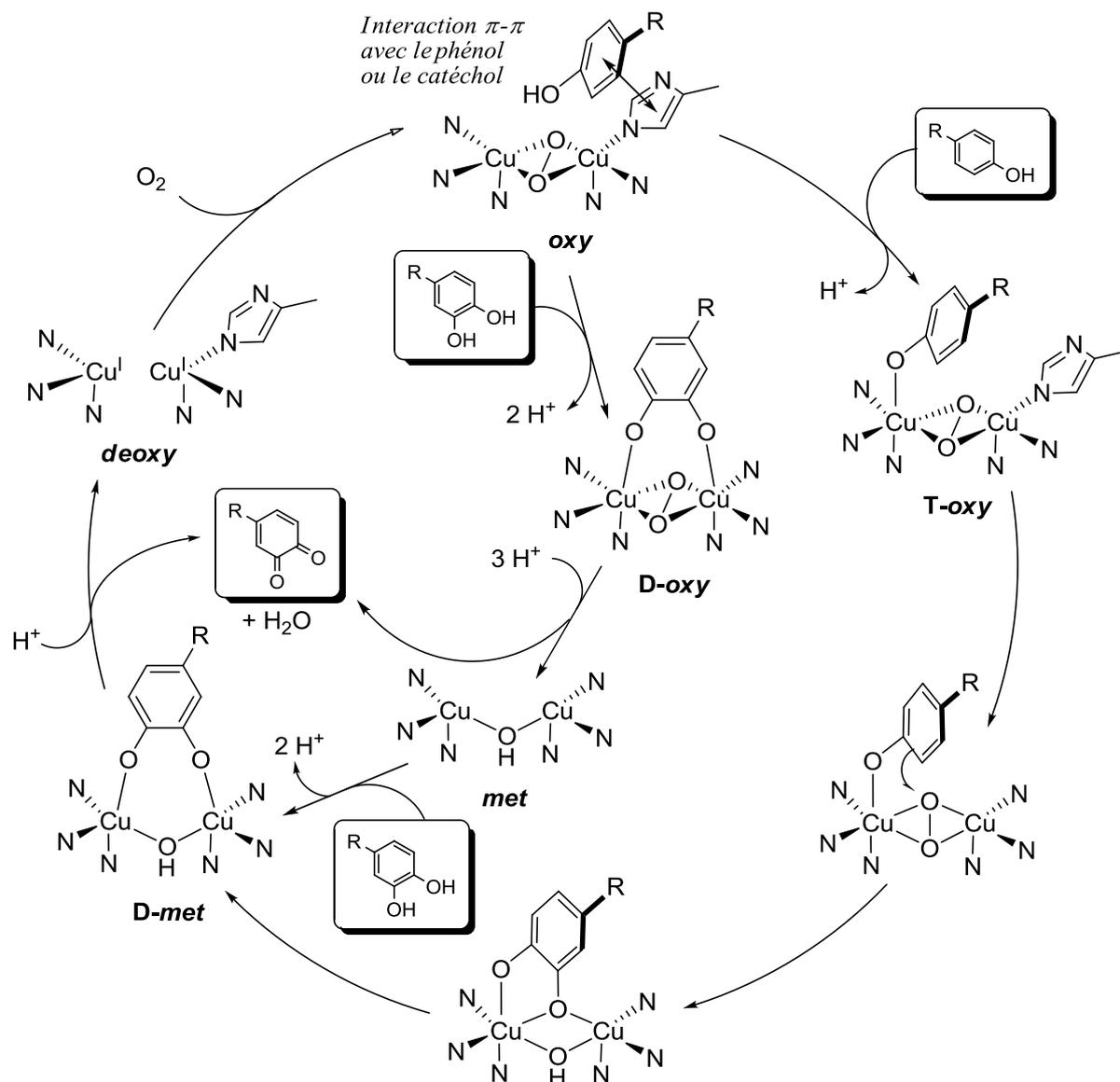


Schéma 18. Cycles mécanistiques de l'oxydation d'un phénol (activité monophénolase, autour du cercle) et d'un catéchol (activité diphénolase, demi-cercle de gauche) par la tyrosinase, et formes différemment oxydées de l'enzyme.

De nombreux complexes biomimétiques ont été développés pour mimer à la fois la structure du site actif de la tyrosinase et l'une de ses activités, monophénolase ou diphénolase [280,281,282]. Ces composés apportent notamment aux chimistes une aide précieuse pour

étudier les interactions entre l'enzyme et d'éventuels substrats ou inhibiteurs, difficiles à analyser directement sur l'objet biologique. L'un des premiers exemples de tels complexes a été rapporté en 1984 par Karlin *et al.* avec un système $\text{Cu}_2(\text{XYL})$ [283]. L'espaceur entre les deux centres à cuivre, aromatique, portait un groupement phénol qui permettait la formation d'une structure μ -phénoxo- μ -hydroxo. L'observation d'une réactivité provenant d'un autre type de système, avec un pont bis- μ -oxo, a également participé à jeter les bases de la compréhension du mécanisme d'action de la tyrosinase [284]. De nombreux complexes ont depuis été développés, mimant notamment l'activité monophénolase de la tyrosinase. Ils présentent des structures possédant un pont μ - $\eta^2:\eta^2$ -péroxo [285], bis- μ -oxo [286], ou plus récemment μ - $\eta^1:\eta^1$ -péroxo [287]. D'autres complexes, présentant cette fois une activité diphénolase, ont été rapportés comme des mimes communs de la tyrosinase et des catéchol oxydases. Ainsi, des structures de type μ -hydroxo pouvant oxyder des phénols en *ortho*-quinones ont été développées, notamment au laboratoire, au cours des dix dernières années [288,289]. Quelques exemples de complexes biomimétiques de la tyrosinase sont présentés en Figure 35.

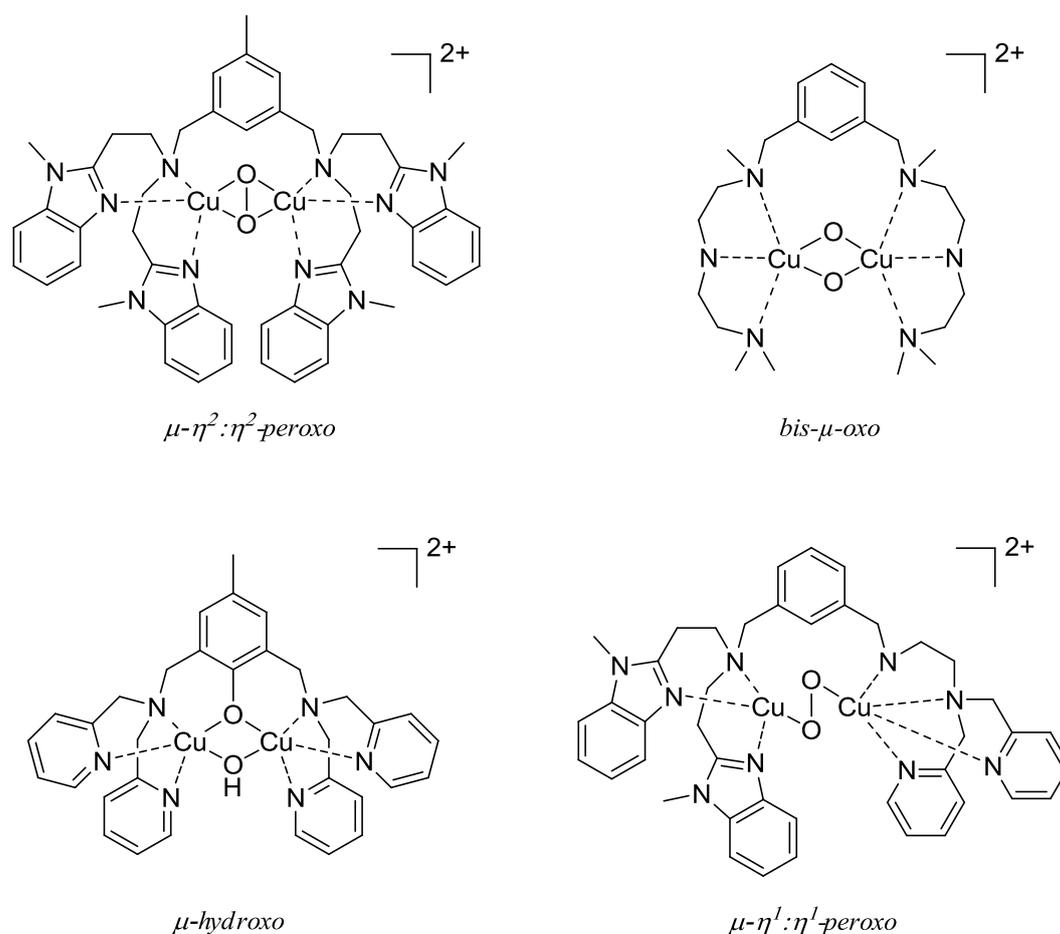


Figure 35. Exemples de complexes biomimétiques modélisant la structure et l'une des activités de la tyrosinase, et présentant des centres binucléaires de cuivre sous différentes formes.

1.4 INHIBITION DE LA TYROSINASE

1.4.1 Inhibiteurs historiques et de référence

De nombreux inhibiteurs « primitifs » de la tyrosinase sont actuellement toujours utilisés comme références. Ces molécules, souvent de petite taille et nocives, sont pour certaines utilisées en tant qu'agents dépigmentants. C'est le cas de l'hydroquinone, qui est l'un des premiers dépigmentants introduits en clinique, utilisé depuis plus de cinquante ans. L'hydroquinone n'est pas un inhibiteur au sens strict mais un substrat alternatif pour la tyrosinase qui l'oxyde en quinones réactives, qui elles-mêmes induisent une toxicité pour le mélanocyte. Néanmoins, l'hydroquinone s'accompagnerait d'un effet cancérigène, et son utilisation est proscrite au sein de l'Union Européenne depuis 2001. L'effet réel de ce produit sur la santé humaine reste cependant controversé [290,291]. L'arbutine est une prodrogue glycosylée naturelle plus stable de l'hydroquinone. En présence d'une glycosidase, elle se décompose en glucose et en hydroquinone, qui peut alors exercer son action anti-tyrosinase à des concentrations non cytotoxiques [292]. L'acide kojique est un métabolite produit par des champignons des genres *Aspergillus*, *Agaricus* et *Penicillium*. Cet inhibiteur de la tyrosinase est également très répandu en dermocosmétique comme agent dépigmentant. Ce composé, supposément lié aux cuivres par son motif α -hydroxycétone, a récemment été co-cristallisé avec l'enzyme dans une configuration totalement différente, mais le caractère unique de la co-structure obtenue incite à la prudence. Bien que l'utilisation d'acide kojique en cosmétique soit de plus en plus compromise à cause de ses propriétés allergènes et mutagènes suspectées, cette molécule est très couramment utilisée en tant que référence dans les études présentant de nouveaux inhibiteurs de la tyrosinase [293]. Un autre inhibiteur connu, la L-mimosine, est un acide aminé végétal rencontré dans les graines et les feuilles de *Mimosa pudica*. Sa structure conjugue une partie analogue au substrat naturel de la tyrosinase, la L-tyrosine, et une partie quasiment identique au cycle de l'acide kojique, portant le motif α -hydroxycétone [294]. Enfin, la tropolone est une molécule synthétique connue pour complexer des métaux, qui partage également des similitudes structurales avec l'acide kojique. Elle a été identifiée comme un inhibiteur de la tyrosinase puissant, avec un IC_{50} d'environ 0,5 μ M, et une efficacité 200 fois supérieure à celle de la L-mimosine (Figure 36) [295].

Étant donnée la forte variabilité d'activités mesurées pour l'acide kojique, suivant les conditions de test (sur enzyme, cellules, et avec différents modes de détection du DO-PACHrome) et l'activité de la tyrosinase considérée (mono- ou diphénolase), il paraît judicieux

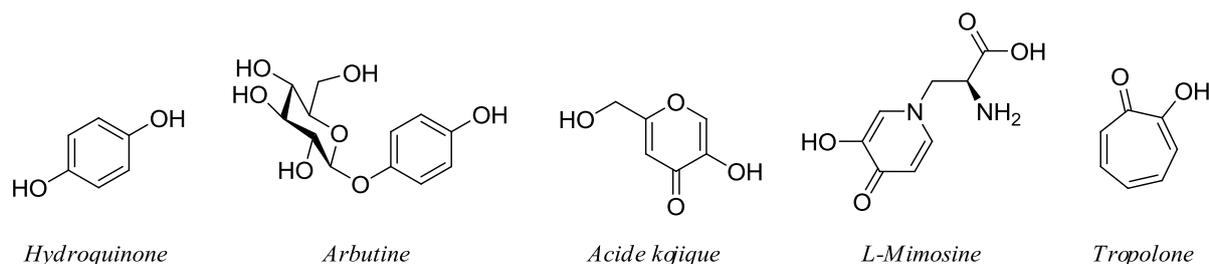


Figure 36. Structure des inhibiteurs historiques de la tyrosinase utilisés comme références dans les travaux plus récents.

de moins s'intéresser aux IC_{50} obtenues dans la littérature pour les inhibiteurs présentés ici qu'au rapport entre cet IC_{50} et celui de l'acide kojique enregistré dans les mêmes conditions, et fourni dans la même publication. Nous présenterons donc ce rapport, ou une indication équivalente, à chaque fois qu'il sera possible de le calculer.

1.4.2 Lipides et stéroïdes

Des composés naturels comportant une chaîne grasse ont été identifiés comme inhibiteurs de la tyrosinase de champignon. La trilinoléine, un triacylglycérol, a par exemple été extraite de la lie du saké, et présente une valeur d'inhibition de la tyrosinase proche de celle de l'acide kojique [296]. Cependant, ce dérivé ne possède aucune propriété de chélation de métaux, et son mécanisme d'action est non-compétitif. Étant donnée sa taille, il est probable que ce dérivé interagisse avec un site allostérique de l'enzyme. Un ester à longue chaîne

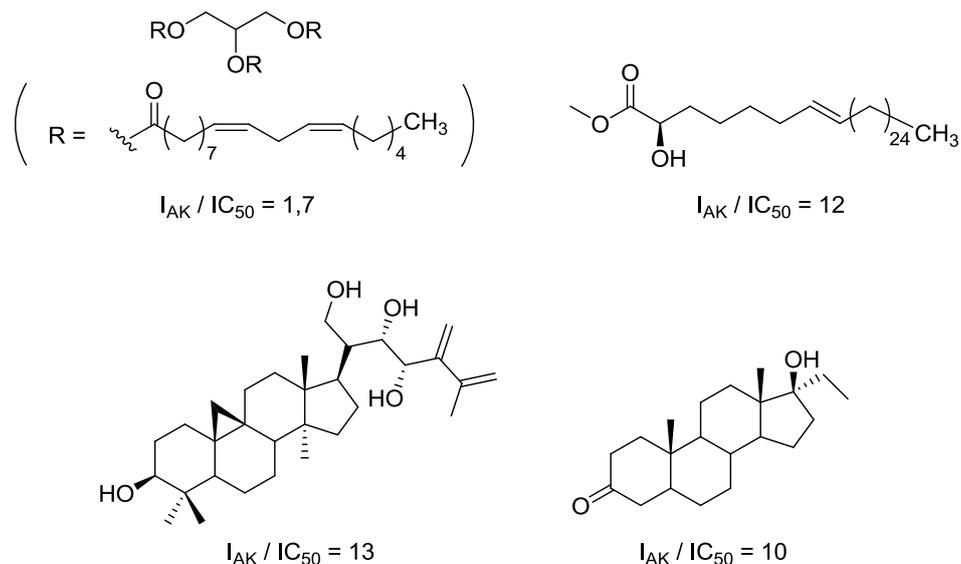


Figure 37. Structures de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type lipide à longue chaîne ou stéroïde. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.

carbonée, identifié dans l'espèce de fleurs *Amberboa ramosa*, s'est également révélé comme un inhibiteur puissant, présentant un IC_{50} de 1,36 μM sur l'activité diphénolase de la tyrosinase [297]. Des représentants naturels de la famille des stéroïdes ont eux aussi montré un potentiel anti-tyrosinase. Ainsi, isolés respectivement d'*Amberboa ramosa* et du champignon *Cunninghamella elegans*, un triterpénoïde et un 17α -éthylstéroïde ont par exemple été rapportés par Khan *et al.* et ont montré des activités intéressantes, meilleures d'un ordre de grandeur par rapport à l'acide kojique ($IC_{50} = 1,32 \mu\text{M}$ et $1,53 \mu\text{M}$ respectivement, sur l'activité diphénolase de l'enzyme, Figure 37) [298,299].

1.4.3 Phénylthiourées, oxadiazoles et petites molécules synthétiques

Si de nombreux produits naturels et dérivés ont été au fil du temps identifiés comme inhibiteurs de la tyrosinase, plusieurs classes de composés purement synthétiques ont également été développées sur la base de relations structure-activités et, souvent, de leur possible affinité avec le centre binucléaire de cuivre de l'enzyme (Figure 38). Le soufre, particulièrement, est à l'origine de bons ligands du cuivre. Il a mené à la découverte de la *N*-phénylthiourée comme inhibiteur de la tyrosinase ($IC_{50} = 1,8 \mu\text{M}$), alors que son analogue *N*-phénylurée est totalement inactif. Le mode d'action de la *N*-phénylthiourée est compétitif et cohérent avec une liaison de l'atome de soufre aux deux cuivres du site actif. La formation d'une hydroxylamine sur ce composé a en outre mené à une inhibition submicromolaire ($IC_{50} = 0,29 \mu\text{M}$) [300]. Des dérivés de phénylthiourées, les phénylméthyléthiosemicarbazones, présentent également un potentiel intéressant [301]. Très récemment, de nombreux analogues comportant un groupement phényle substitué ont atteint des valeurs d'inhibition de l'ordre de 0,2 à 0,4 μM sur l'activité diphénolase de la tyrosinase, ce qui en fait de meilleurs inhibiteurs que la tropolone utilisée comme référence [302,303]. Des molécules synthétiques hétérocycliques variées ont également fait l'objet d'investigations quant à leur potentiel d'inhibition de la tyrosinase. Elles comportent comme noyaux des hétérocycles de type oxazolone [304], oxadiazole [305], thiadiazole, triazole [306], ou encore triazolothiadiazole [307], avec des IC_{50} parfois submicromolaires. Le 5-(4-hydroxyphényl)-1,3,4-thiadiazole-2(3*H*)-thione se situe parmi les molécules les plus actives de cette série, avec un K_i de 0,19 μM . Les atomes d'azote et de soufre contenus dans ces dérivés permettraient une liaison au centre binucléaire de cuivre. Enfin, quelques classes de molécules polycarboxylées ont été découvertes, comme des tétracétones [308], ou des hydroxybenzylidénylpyrrolidine-2,5-diones [309]. Si ces inhibiteurs micromolaires partagent des analogies structurales, leur mode d'action respectif sur la tyrosinase semble cependant varier considérablement.

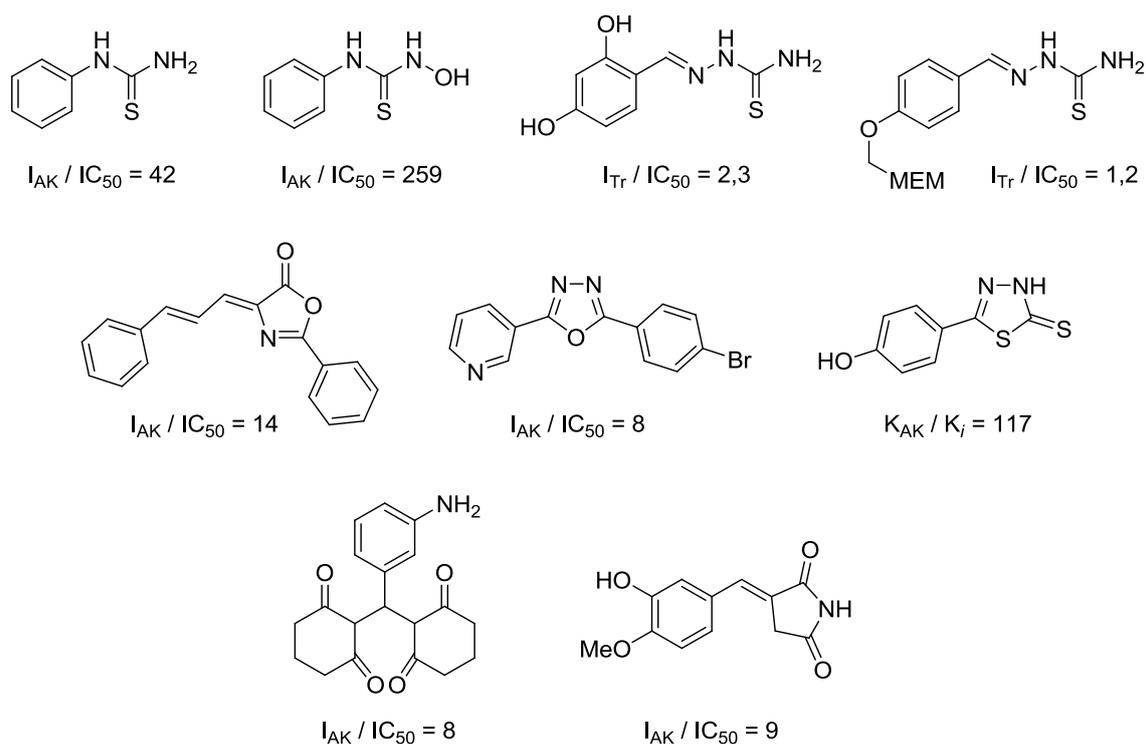


Figure 38. Structures de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type phénylthiourée, hétérocyclique, polycarbonylé, et dérivés. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions. I_{Tr} / IC_{50} représente le même rapport avec la tropolone pour référence. Enfin, K_{AK} / K_i représente le rapport entre le K_i de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.

1.4.4 Stilbènes, benzaldéhydes, acides cinnamiques et autres polyphénols non flavonoïdes

Les stilbènes sont des diphenyléthènes. Cette classe de molécule se trouve à l'état naturel sous forme polyhydroxylée, comme le resvératrol et ses dérivés, qui sont des inhibiteurs connus de la tyrosinase. L'oxyresvératrol est un analogue portant deux motifs résorcinol : il possède une activité anti-tyrosinase 32 fois plus forte que l'acide kojique et 50 fois plus forte que le resvératrol sur l'activité monophénolase. Il s'agit d'un inhibiteur non-compétitif qui a également fait ses preuves sur cellules en réduisant la pigmentation induite dans le mélanome [310]. D'autres dérivés issus d'espèces végétales ont montré un potentiel intéressant pour l'inhibition de la tyrosinase, notamment la chloroporine, un oxyresvératrol géranylé provenant de *Chlorophora excelsa* [311], ainsi que le gnétol et le piceatannol, des stilbènes tétrahydroxylés analogues de l'oxyresvératrol et isolés respectivement de *Gnetum gnemon* et d'espèces de raisin [312,313]. Ces composés possèdent des valeurs d' IC_{50} de 15 à 30 fois meilleures que l'acide kojique. En outre, la double liaison des stilbènes ne semblent pas être indispensable à l'activité anti-tyrosinase : une étude récente révèle en effet que le dihy-

drooxyresvératrol est environ 8 fois plus efficace que l'oxyresvératrol ($IC_{50} = 1,6 \mu M$ contre $12,7 \mu M$ sur l'activité diphenolase) [314]. Le remplacement du lien éthène par un troisième cycle aromatique pour former un phénylnaphtalène a également porté ses fruits, puisque le HNB, un représentant de cette nouvelle classe, est le meilleur inhibiteur de la tyrosinase existant à ce jour. Il possède une activité 546 fois plus forte que l'acide kojique (activité monophénolase), et possède un K_i d'environ $5 nM$ [315]. L'inhibition de la tyrosinase par la famille des stilbènes a par ailleurs récemment fait l'objet d'une revue bibliographique [316].

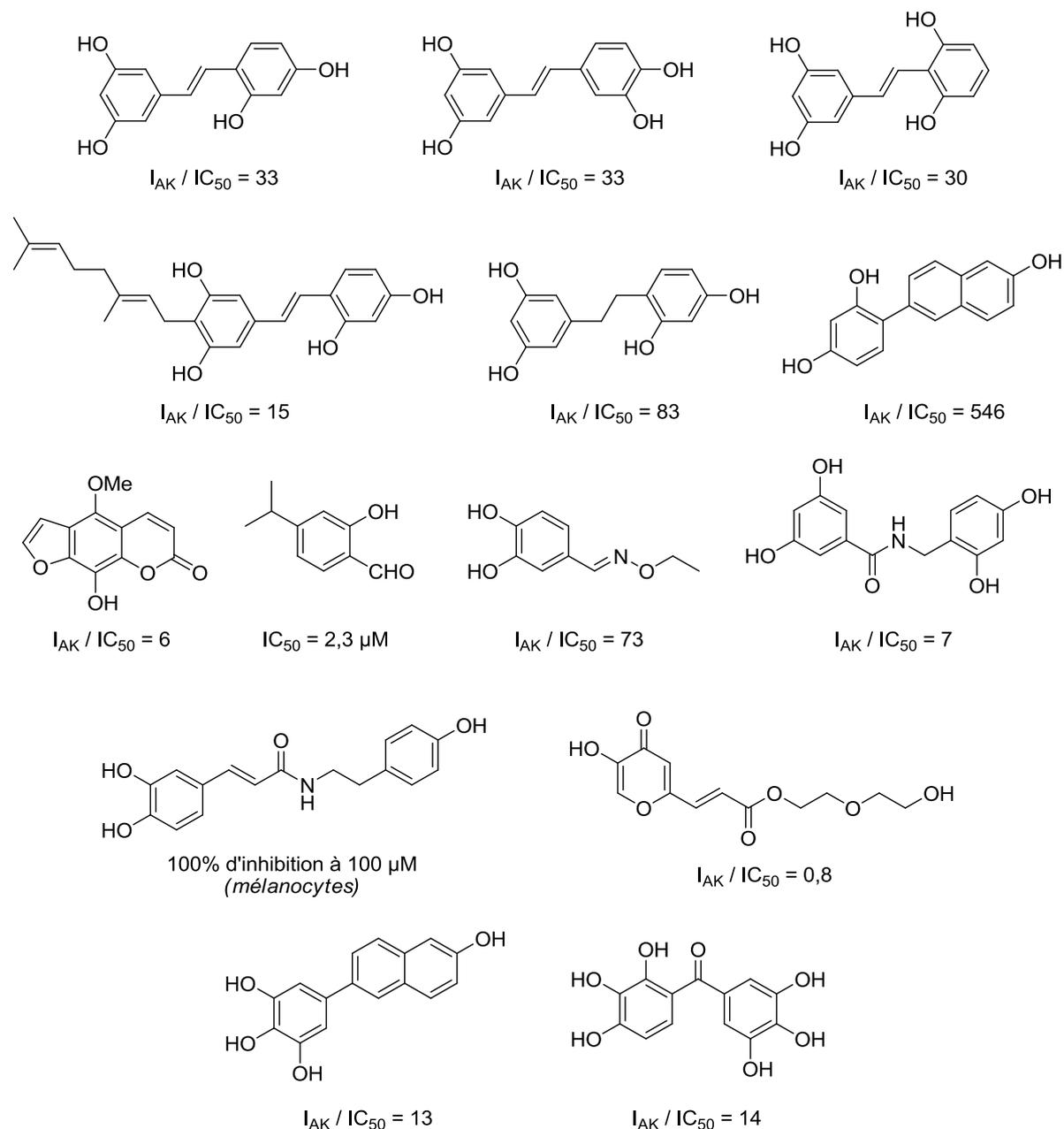


Figure 39. Structures de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type stilbène, coumarine, benzaldéhyde, acide benzoïque, acide cinnamique, benzophénone et dérivés. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.

D'autres composés aromatiques de type polyphénol possèdent également la propriété d'inhiber la tyrosinase. C'est le cas pour des dérivés de coumarine, de nombreux benzaldéhydes, dérivés d'acide benzoïque et de *N*-benzylbenzamides, qui atteignent néanmoins souvent des valeurs d'inhibition médiocres [317]. En effet, une étude introduisant des substituants variés mais simples (phénols, méthoxyles, alkyles) sur les squelettes benzaldéhyde et acide benzoïque, a mené à l'obtention d'un meilleur IC₅₀ de 720 μM (pour le 4-*tert*-butylbenzaldéhyde) [318]. Cependant, quelques rares dérivés sont plus efficaces, notamment le 2-hydroxy-4-isopropylbenzaldehyde qui présente un IC₅₀ de 2,3 μM sur l'activité diphénolase et un mode d'inhibition mixte [319], ou le 3,4-dihydroxy-*O*-éthylximebenzaldehyde qui atteint un IC₅₀ de 0,3 μM sur l'activité diphénolase [320]. Des composés de type acide cinnamique, notamment des amides dérivés d'acide caféique et férulique, ont également montré des activités anti-tyrosinase sur mélanocytes humains [321]. Le remplacement du cycle aromatique de l'acide cinnamique par un motif de type acide kojique a en outre mené à quelques molécules d'intérêt, même si les IC₅₀ de ces inhibiteurs restent très hauts [322]. Le 5-(6-hydroxy-2-naphthyl)-1,2,3-benzène-triol a été rapporté comme un inhibiteur efficace de la tyrosinase, selon un mécanisme non-compétitif [323]. Enfin, des benzophénones polyhydroxylées ont très récemment été évaluées pour leur potentiel anti-tyrosinase, et certains dérivés s'avèrent efficaces à l'échelle micromolaire, notamment un composé hexahydroxylé présentant un IC₅₀ de 1,4 μM [324]. De nombreuses autres classes d'inhibiteurs polyhydroxylés ont été rapportées, trop nombreuses pour être énumérées ici cependant (Figure 39).

1.4.5 Flavonoïdes et dérivés

Les flavonoïdes représentent l'une des familles d'inhibiteurs de la tyrosinase les plus étudiées. Ils sont très souvent extraits de plantes, parfois utilisées pour le blanchiment de la peau dans certaines médecines traditionnelles asiatiques, comme certaines espèces de *Glycyrrhiza*. La plupart des sous-classes de flavonoïdes comprennent des représentants polyhydroxylés identifiés comme potentiels inhibiteurs de la tyrosinase, notamment les flavonols, les flavanols, les flavones, les flavanones, les isoflavanes, les isoflavones, les chalcones et les aurones. Les flavonols, en particulier, semblent avoir retenu l'attention des chimistes par la présence d'un motif α -hydroxycétone qui serait capable de chélater les centres à cuivre dans le site actif de la tyrosinase et de mener à l'inactivation de l'enzyme. Ainsi, si la quercétine ou le kaempferol ont été identifiés comme bons chélateurs d'ions Cu²⁺ et comme inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase, une flavone correspondante ne possédant pas de motif α -hydroxycétone, la lutéoline, a révélé une inhibition non-compétitive, avec un IC₅₀ proche

néanmoins [325]. Cependant, l'explication proposée d'un mode d'action de l' α -hydroxycétone similaire à celui de l'acide kojique serait remise en cause par la structure cristallographique du complexe tyrosinase – acide kojique décrit plus haut. L'activité de ces composés reste par ailleurs assez faible (20% de l'activité de l'acide kojique pour la quercétine, le meilleur flavonol). D'autres flavones inhibent efficacement la tyrosinase, comme la norartocarpétine et son analogue flavanone, la streppogénine, qui partagent des valeurs d' IC_{50} d'environ 0,5 μ M et des K_i d'environ 0,6 μ M [326]. Une étude par fluorescence de l'activité de nombreux dérivés de flavones et flavonols polyhydroxylés a en outre conduit à l'identification de la 7,8,3',4'-tétrahydroxyflavone comme l'un des flavonoïdes les plus actifs ($IC_{50} = 70$ nM). Par ailleurs, cette étude a montré que les dérivés de flavones étaient d'une manière générale plus actifs que les flavonols correspondants [327].

Quelques isoflavonoïdes permettent également une inhibition efficace de la tyrosinase. La glabridine, un dérivé d'isoflavane, s'est révélé quinze fois plus actif que l'acide kojique sur l'activité monophénolase de la tyrosinase, selon un mécanisme non-compétitif [328]. Un analogue prénylé découvert plus récemment, la glyaspérine C, est encore plus actif ($IC_{50} = 0,38$ μ M) [329]. Des représentants de la sous-classe des isoflavones ont également été rapportés, menant cependant à des activités plus faibles. Les chalcones ont également été intensivement étudiées. Quelques composés issus de plantes, portant souvent un groupement prényle, ont révélé des activités intéressantes, comme la kuraridine ($IC_{50} = 0,6$ μ M sur l'activité monophénolase, une activité dix fois meilleure que pour la flavone et la flavanone correspondantes) ou la TMBC ($IC_{50} = 0,95$ μ M sur l'activité diphenolase) [330,331]. Plusieurs études se sont également attachées à élucider l'influence des positions hydroxylées des chalcones sur leur activité anti-tyrosinase. La présence d'un phénol en position 4 de la chalcone semble en premier lieu constituer un élément crucial. Nerya *et al.* l'expliquent par la proximité structurale entre une 4-hydroxychalcone et la L-tyrosine, et rapportent notamment des pourcentages d'inhibition plus importants à 50 μ M pour la 4-hydroxychalcone et la 4,2',4'-trihydroxychalcone par rapport à d'autres analogues mono- ou dihydroxylés [332]. L'évaluation biologique de dérivés tétrahydroxylés ont ensuite mené les auteurs à proposer le motif résorcinol comme élément clé pour l'inhibition de la tyrosinase par les chalcones. La 2,4,3',4'- et la 2,4,2',4'-tétrahydroxychalcone ont en particulier montré des valeurs basses d' IC_{50} (respectivement 0,2 et 0,02 μ M) [333]. Une étude plus récente a par ailleurs confirmé le potentiel supérieur de ces dérivés de chalcone substitués par un motif résorcinol [334]. Il est cependant à noter que la plupart des flavonoïdes décrits ici comme les plus actifs contre la tyrosinase pos-

sèdent ce type de substitution, indiquant que cet élément structural est crucial au-delà de la sous-classe des chalcones. Enfin, les auronnes ont elles aussi été découvertes récemment au laboratoire comme potentiels inhibiteur de la tyrosinase. Réalisés sur une culture de mélanocytes humains, les tests biologiques ont permis l'identification de trois auronnes comme représentants les plus prometteurs (Figure 40) [121].

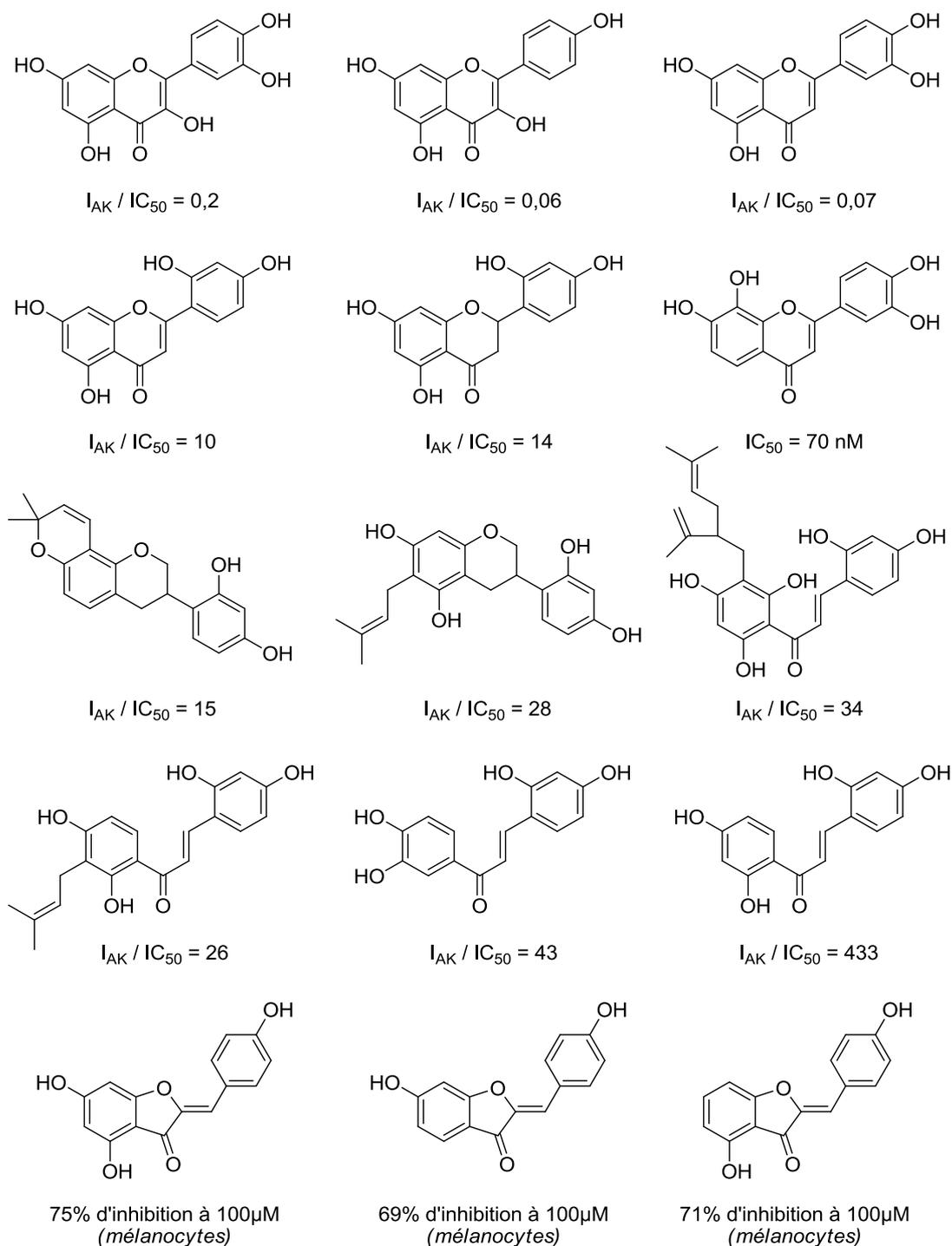


Figure 40. Structure de quelques inhibiteurs de la tyrosinase de type flavonoïde. I_{AK} / IC_{50} représente le rapport entre l' IC_{50} de l'acide kojique et celui du composé testé dans les mêmes conditions.

Le potentiel de ces aurones, prometteur lors des tests sur mélanocytes, doit être confirmé sur enzyme isolée, et leur structure doit être diversifiée. Nous avons donc décidé de synthétiser une série d'analogues polyhydroxylés et/ou méthoxylés, ainsi que des dérivés hybrides judicieusement choisis, afin d'explorer plus avant la capacité des aurones à inhiber la tyrosinase, et de déterminer les mécanismes de fixation et d'interaction ligand / récepteur mis en œuvre.

Chapitre 2. Conception et synthèse des dérivés d'aurones modulateurs

2.1 TRAVAUX PRÉCÉDENTS ET CONCEPTION DE NOUVEAUX INHIBITEURS

2.1.1 Étude d'aurones sur tyrosinase isolée et mélanocytes

De précédents travaux menés au laboratoire dans le cadre du doctorat du Dr. Sabrina Okombi ont porté sur l'étude du potentiel d'inhibition de la tyrosinase par quelques représentants de la famille des aurones [120]. Les tests ont aussi bien porté sur la tyrosinase de champignon isolée que sur des cultures de mélanocytes. Tous les composés évalués ont montré une inhibition très faible de la tyrosinase de champignon ($< 50\%$ à $100\ \mu\text{M}$), alors que quelques dérivés se sont révélés efficaces pour l'inhibition de la tyrosinase dans des cultures de mélanocytes en monocouche (environ 70% à $100\ \mu\text{M}$ pour les meilleurs composés) [120,121]. Néanmoins, il a par la suite été montré que l'utilisation de MBTH lors des tests mène à une réaction avec les aurones, sous-estimant ainsi le potentiel d'inhibition réel des composés. De plus, la variété de positions hydroxylées est restée peu importante lors de ces travaux, qui se sont intéressés à des aurones alkylées *a priori* non actives. Enfin, des résultats préliminaires obtenus durant mon stage de Master 2 ont révélé un potentiel important d'inhibition de la tyrosinase *in vitro* pour quelques aurones polyhydroxylées, conjugué avec un mode d'inhibition mixte ou compétitif (avec une probable liaison aux cuivres). Nous avons donc décidé d'élargir le nombre de composés polyhydroxylés afin de pouvoir mieux comprendre les relations structure-activité ainsi que le mécanisme d'interaction avec la tyrosinase. Il sera également possible d'évaluer la capacité de ces produits à inhiber différentes tyrosinases (bactérienne, humaine ou de champignon) *via* des collaborations avec le Dr. Marius Réglier à l'université Paul Cézanne de Marseille et le Pr. Luigi Bubacco à l'université de Padoue (Italie).

2.1.2 Étude du motif 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde

Récemment, des travaux réalisés par les Drs. Marius Réglie et Catherine Belle ont permis d'identifier le motif 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde (HOPNO) comme un excellent chélateur de centres binucléaires de cuivre. Une structure cristallographique d'un complexe HOPNO – complexe modèle a été résolue et a permis de déterminer le mode de fixation du motif sur le centre à cuivres. Le composé 2-hydroxypyridine-*N*-oxyde est en outre un bon inhibiteur de la tyrosinase de champignon ($IC_{50} = 1,16 \mu M$ et $K_i = 1,8 \mu M$), selon un mécanisme compétitif [335]. Cependant, son utilisation telle quelle pourrait poser des problèmes : la petite taille du composé et sa capacité à se lier aux centres de cuivre ne permet pas de garantir une quelconque sélectivité pour la tyrosinase. La synthèse et l'évaluation de composés hybrides possédant un squelette d'aurone et comportant un motif HOPNO bien positionné pourrait mener au développement d'inhibiteurs à la fois plus efficaces et plus sélectifs, tout en constituant un outil supplémentaire pour la compréhension du mécanisme d'action des aurones. De plus, ce motif n'étant pas oxydable, il permettrait de mener à des inhibiteurs réels et non à des substrats alternatifs de l'enzyme. Étant donnée l'importance de la position 4' des aurones pour l'inhibition de la tyrosinase, suggérée par les études décrites ci-dessus, le positionnement du motif HOPNO en 3' et 4' semble constituer le choix le plus judicieux. Le cycle A de ces aurones hybrides serait substitué de la même manière que les aurones les plus actives sur mélanocytes : avec des groupements 4-hydroxyle, 6-hydroxyle ou 4,6-dihydroxyle.

2.1.3 Conception des inhibiteurs de la tyrosinase

Les aurones de cette étude ont été synthétisées par condensation d'un benzaldéhyde sur des dérivés de benzofuran-3(2*H*)-one, comme décrit dans le Chapitre 2 de la Partie 3. La synthèse des précurseurs d'aurones ne sera donc pas réexpliquée ici. Certains composés ont en outre été utilisés à la fois pour des tests sur la polymérase du VHC et pour des tests sur la tyrosinase. Néanmoins, dans cette étude, nous avons préparé des aurones substituées de manière plus systématique, en essayant de couvrir le maximum de combinaisons de substituants du cycle A et du cycle B afin de découvrir les éléments structuraux importants qui régissent l'inhibition de la tyrosinase. En particulier, les aurones polyhydroxylées ont retenu notre attention puisqu'elles ont révélé une activité intéressante sur mélanocytes. Nous avons également sélectionné des dérivés méthoxylés et fluorés afin d'étudier l'importance du caractère donneur de liaisons hydrogènes des substituants ainsi que l'influence sur l'activité de l'introduction de groupements bioisostères du phénol. La synthèse d'une azaaurone a été en-

visagée afin de déterminer si la fonction éther des aurones constitue un élément crucial pour l'activité anti-tyrosinase. Enfin, la synthèse de trois analogues hybrides a été effectuée selon une voie originale. Ces aurones hybrides possèdent sur le cycle A des éléments connus pour favoriser l'inhibition de la tyrosinase, et sur le cycle B un motif HOPNO.

2.2 SYNTHÈSE DES AURONES

2.2.1 Synthèse des aurones polyhydroxylées

La plupart des aurones polyhydroxylées utilisées dans cette étude ont également été étudiées dans le cadre de l'inhibition de la polymérase NS5B du VHC (dans le Chapitre 2 de la Partie 3). Néanmoins, quelques dérivés originaux ont été préparés afin de compléter judicieusement la liste des dérivés étudiés. Ceci concerne trois aurones trihydroxylées : **17d**, **17e** et **18p**. Ces dérivés ont été synthétisés à partir des synthons précurseurs correspondants (**2a** et **5a**) et de benzaldéhydes en présence de potasse concentrée dans l'éthanol à reflux, selon la méthode B décrite précédemment.

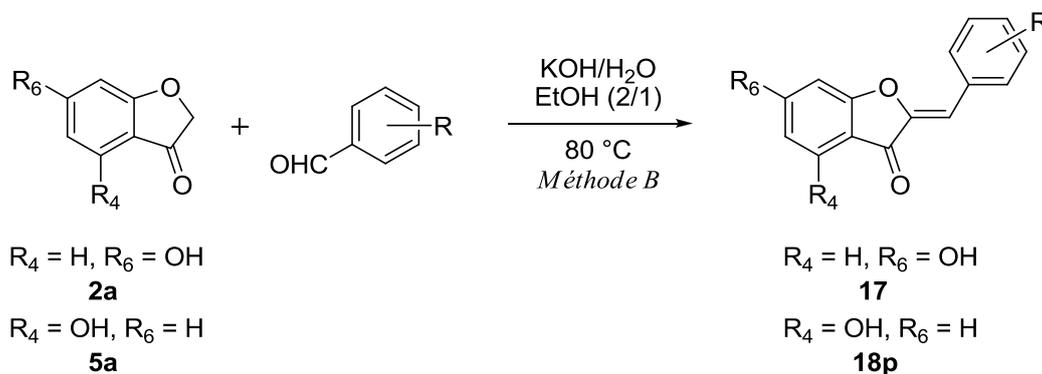


Schéma 19. Méthode de préparation des dérivés d'aurone polyhydroxylés par condensation aldolique en présence de KOH aqueux concentré et d'éthanol à reflux (méthode B).

2.2.2 Synthèse d'une azaaurone

Les azaaurones sont des dérivés d'aurones qui comportent une fonction amine secondaire intracyclique qui vient remplacer l'éther de la structure classique. La synthèse de ces composés peut être réalisée par condensation aldolique, de la même manière que pour les dérivés d'aurones. Cependant, le synthon précurseur doit être protégé par un groupement acétyle sur l'atome d'azote. Lors de la condensation, l'amine est alors déprotégée *in situ* en conditions basiques. Nous avons entrepris la synthèse d'une azaaurone 4,6,4'-tétrahydroxylée. Pour

cela, il est nécessaire de passer par la forme protégée triméthoxylée. Le précurseur **27** est préparé à partir de la diméthoxyaniline par une réaction de Houben-Hoesch (en présence de BCl_3 et d' AlCl_3 dans le benzène, puis de HCl aqueux à reflux), suivie d'une cyclisation en milieu basique et de la protection de l'atome d'azote par un groupement acétylé (en présence d'anhydride acétique) [336]. L'indolinone 4,6-diméthoxylé précurseur est alors mis en réaction avec le 4'-méthoxybenzaldéhyde dans les conditions mises en œuvre pour la synthèse des polyméthoxyaurones. Après traitement de la réaction, le composé est recristallisé dans le méthanol pour donner **28**. Néanmoins, l'étape de déprotection des groupements méthoxyles n'a pas pu être menée à bien. Si le composé **28** semble ne pas réagir dans des conditions douces (en présence de chlorure d'aluminium dans le dichlorométhane), il mène à un mélange de produits différents du composé envisagé dans des conditions plus dures (en présence de tribromure de bore dans le dichlorométhane). L'aurone analogue à **28**, le composé **20k**, a également été préparée, dans les conditions décrites pour la synthèse de polyméthoxyaurones.

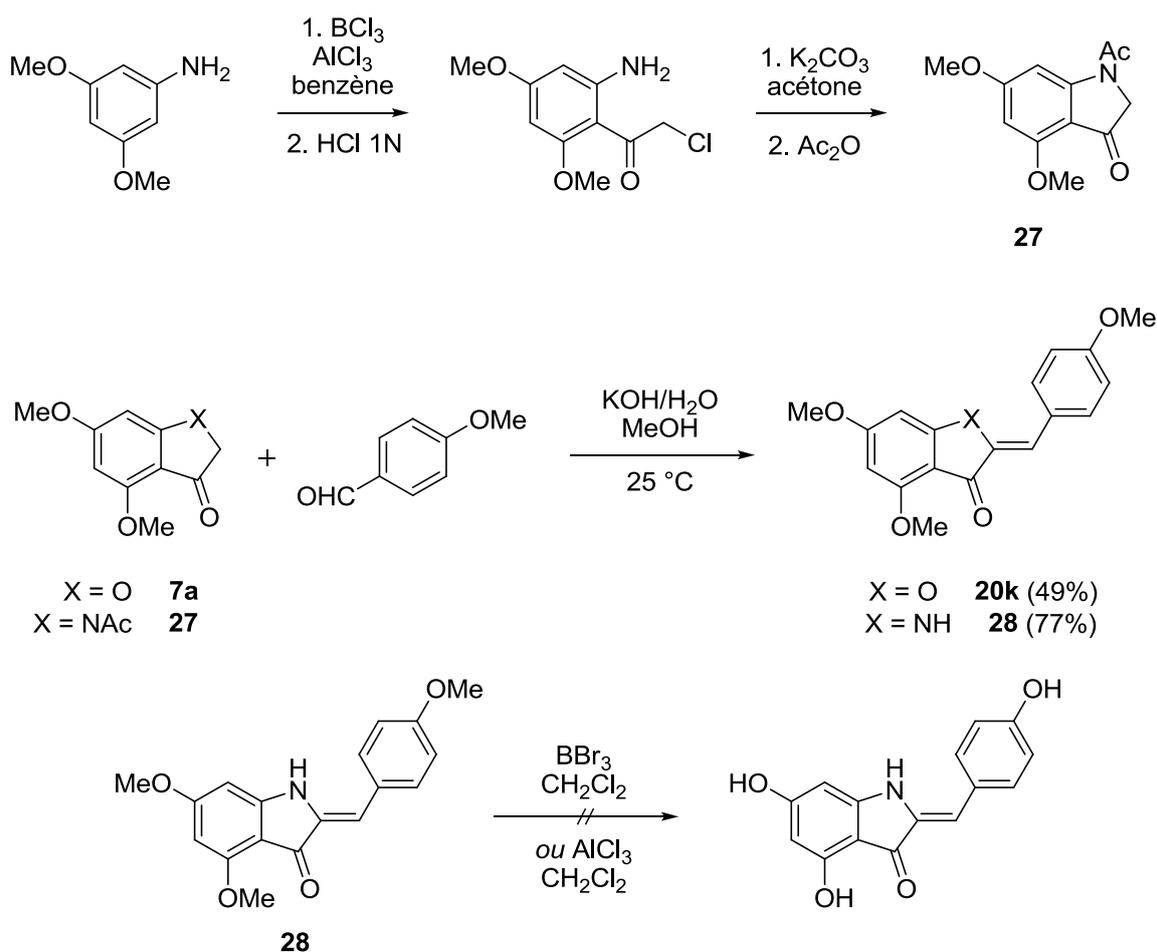


Schéma 20. Méthodes de préparation du précurseur **27**, des composés polyméthoxylés **20k** et **28**. Conditions réactionnelles testées pour la déprotection des groupements méthoxyles de **28**, sans succès.

Composé	R	Rendement	Composé	R	Rendement
17d	2',4'-diOH	72%	20k	4'-OMe	49%
17e	3',4'-diOH	26%	28	4'-OMe	77%
18p	3',4'-diOH	43%			

Tableau 11. Liste des dérivés d'aurone polyhydroxylés, de l'azaurone et de l'aurone méthoxylée correspondante, préparés suivant la méthode présentée ci-dessus, et rendements associés.

2.2.3 Structure des aurones retenues pour cette étude

Le Tableau 12 et la Figure 41 ci-dessous résument les structures retenues pour être testées en tant qu'inhibiteurs de la tyrosinase. Ils comprennent les dérivés issus de l'étude concernant l'inhibition de la polymérase du VHC, ainsi que les composés nouvellement préparés pour ce travail. Au total, vingt-six dérivés d'aurone et d'azaurone ont été préparés dans le cadre de cette étude.

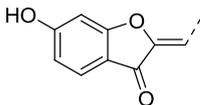
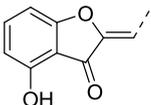
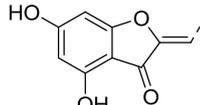
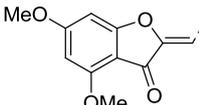
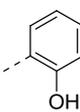
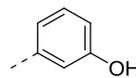
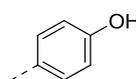
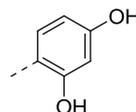
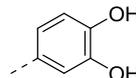
				
		18n	21j	20j
	17a	18a	21a	20a
	17b	18b	21b	20b
	17c	18c	21c	20c
	17d	18o	21d	
	17e	18p	21e	

Tableau 12. Liste des dérivés d'aurone polyhydroxylés et 4,6-diméthoxylés retenus pour être testés en tant qu'inhibiteurs de la tyrosinase.

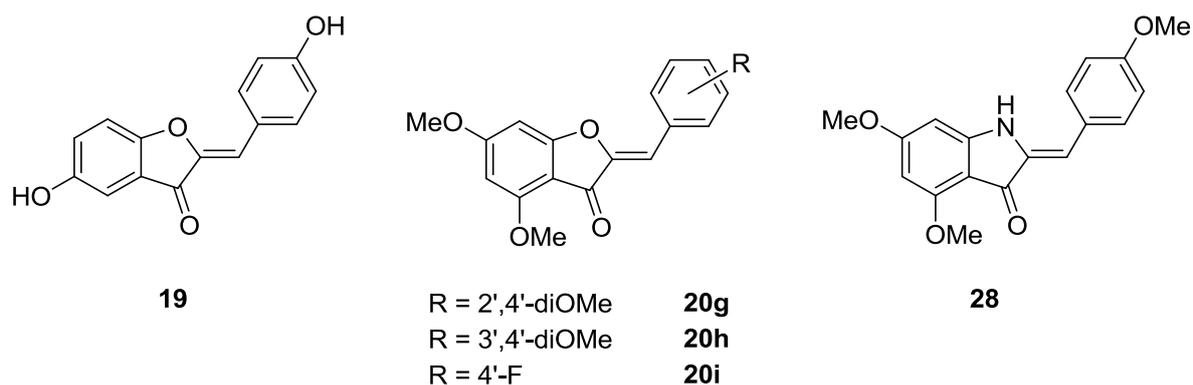


Figure 41. Liste des dérivés méthoxylés, de la 5,4'-dihydroxyaurone et de l'azaaurone retenus pour être testés en tant qu'inhibiteurs de la tyrosinase.

2.3 SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS HYBRIDES

2.3.1 Stratégie de synthèse

Les structures cibles de ce travail (**29a**, **29b** et **29c**) sont présentées sur le Schéma 21. Elles consistent en un motif HOPNO greffé sur le cycle B du squelette aurone, par ailleurs diversement substitué sur le cycle A. Étant donnée la disponibilité commerciale du 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde, nous avons entrepris de partir de ce fragment ainsi que des synthons précurseurs **2a**, **2b** et **5a**. L'aldéhyde étant un groupement facilement oxydable,

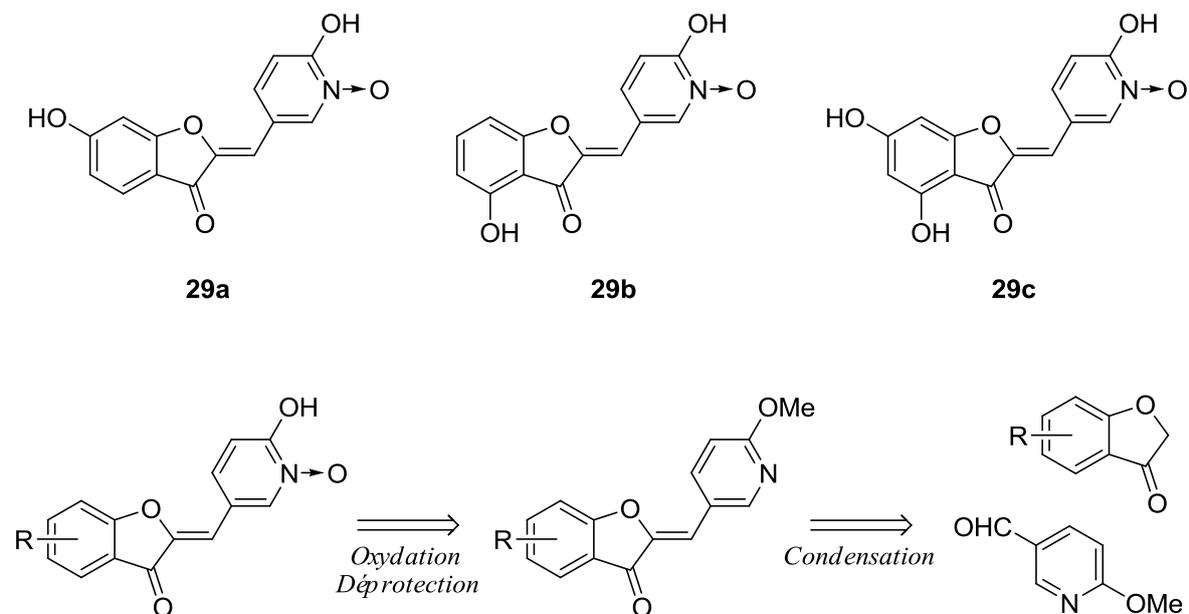


Schéma 21. Structure des trois molécules cibles **29a**, **29b** et **29c**. Stratégie de synthèse envisagée pour parvenir aux composés **29** : condensation des deux fragments benzofuran-3(2H)-one et 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde, oxydation de la pyridine puis déprotection du phénol en position 4'.

et les conditions de condensation aldolique utilisées classiquement semblent difficilement compatibles avec la présence d'un motif *N*-oxyde. Nous avons donc opté pour une condensation préalable des deux fragments évoqués ci-dessus, suivie de l'oxydation de la pyridine et enfin de la déprotection du groupement méthoxy.

2.3.2 Condensation aldolique

La condensation aldolique a été menée en présence de potasse dans le méthanol à reflux pour la préparation des dérivés **30a** et **30b** à partir des précurseurs **2a** et **5a** et du 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde. Le traitement par HCl aqueux après évaporation du méthanol en fin de réaction mène à la précipitation d'un chlorhydrate qui reste insoluble dans l'eau et peut donc être collecté par simple filtration. Les composés obtenus sont d'une pureté suffisante pour les mettre en jeu dans la suite de la synthèse sans purification supplémentaire.

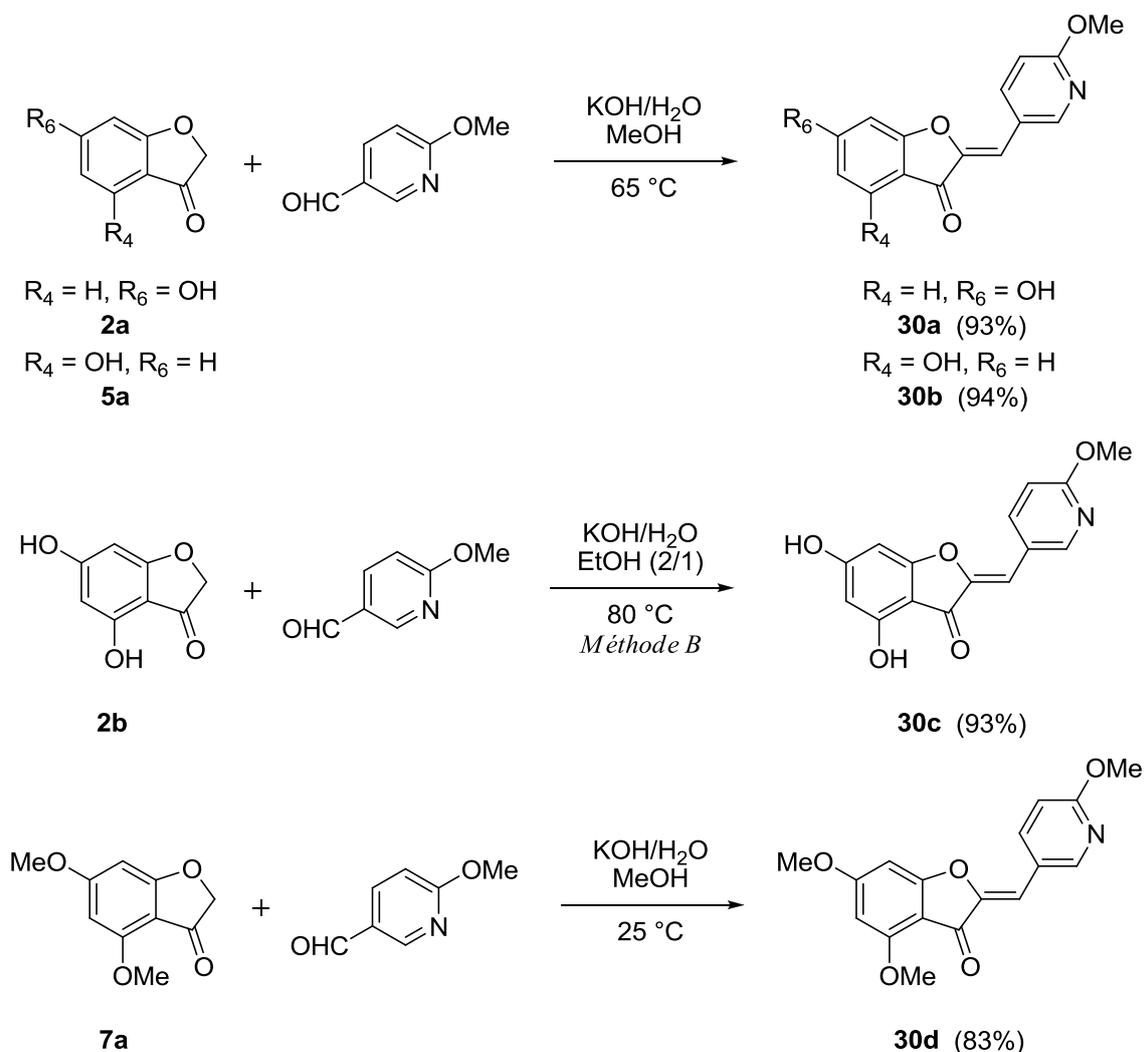


Schéma 22. Méthodes de condensation aldolique des précurseurs **2a**, **2b**, **5a** et **7a** avec le 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde.

Le dérivé **30c** est quant à lui préparé selon la méthode B à partir de **2b** et du 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde, en présence d'un mélange de potasse à 50% et d'éthanol dans une proportion 2/1. De la même manière, le chlorhydrate formé par le traitement acide à la fin de la réaction est insoluble dans l'eau : il est récupéré par filtration et utilisé tel quel. Étant donnée la nécessité de protéger les groupements phénols lors des étapes suivantes de la synthèse, nous avons également réalisé une condensation entre le précurseur diméthoxylé **7a** et le 6-méthoxypyridine-3-carboxaldéhyde, afin d'obtenir un composé directement protégé par deux groupements méthoxyles. Ce dérivé **30d** a été préparé à température ambiante en présence de potasse dans le méthanol. Il forme des cristaux en fin de réaction, qui sont ensuite recristallisés dans le méthanol pour donner le produit pur. Avec ces quatre composés en main, nous avons entrepris de déterminer les conditions et réactifs favorables pour l'oxydation de la pyridine.

2.3.3 Protection et oxydation de la pyridine

Des essais d'oxydation directe du motif pyridine présent dans les bases libres des composés **30a** et **30b** se sont heurtés à des problèmes de solubilité, notamment dans le dichlorométhane. Ainsi, la réaction de **30a** avec du *m*-CPBA dans le dichlorométhane est vouée à l'échec. Nous avons donc décidé de protéger les groupements phénols présents sur le cycle A des aures afin de garantir leur solubilité. Le groupement acétoxyyle est particulièrement adapté dans ce cas de figure : il supporte bien les conditions d'oxydation et peut être déprotégé dans des conditions compatibles avec la présence d'un groupement pyridine-*N*-oxyde. Les composés **30a** et **30b** ont donc été protégés par réaction avec l'anhydride acétique à reflux pendant une nuit. Après ajout d'eau, l'extraction au dichlorométhane mène à la récupération des produits purs **31a** et **31b**, utilisables tels quels, avec des rendements quasiment quantitatifs. Ces composés ont été mis en réaction avec un adduit urée – eau oxygénée (UHP) en présence d'anhydride trifluoroacétique (TFAA), qui a permis l'oxydation de l'atome d'azote de la pyridine avec des rendements relativement bons (60 – 65% pour **32a** et **32b**), comme décrit par Caron *et al.* en 2000 [337]. Les produits **32a** et **32b** ont été purifiés sur colonne de gel de silice. Le composé 4,6-diméthoxylé **30d** a été mis en réaction avec l'adduit UHP et avec *m*-CPBA, mais dans les deux cas aucune oxydation significative n'a été observée. Nous avons donc protégé l'analogue 4,6-dihydroxylé **30c** par des groupements acétoxyyles, de la même manière que précédemment. Le produit **31c** formé a ensuite réagi avec l'adduit UHP pour donner le dérivé oxydé **32c**, avec un rendement plus faible cependant (25%).

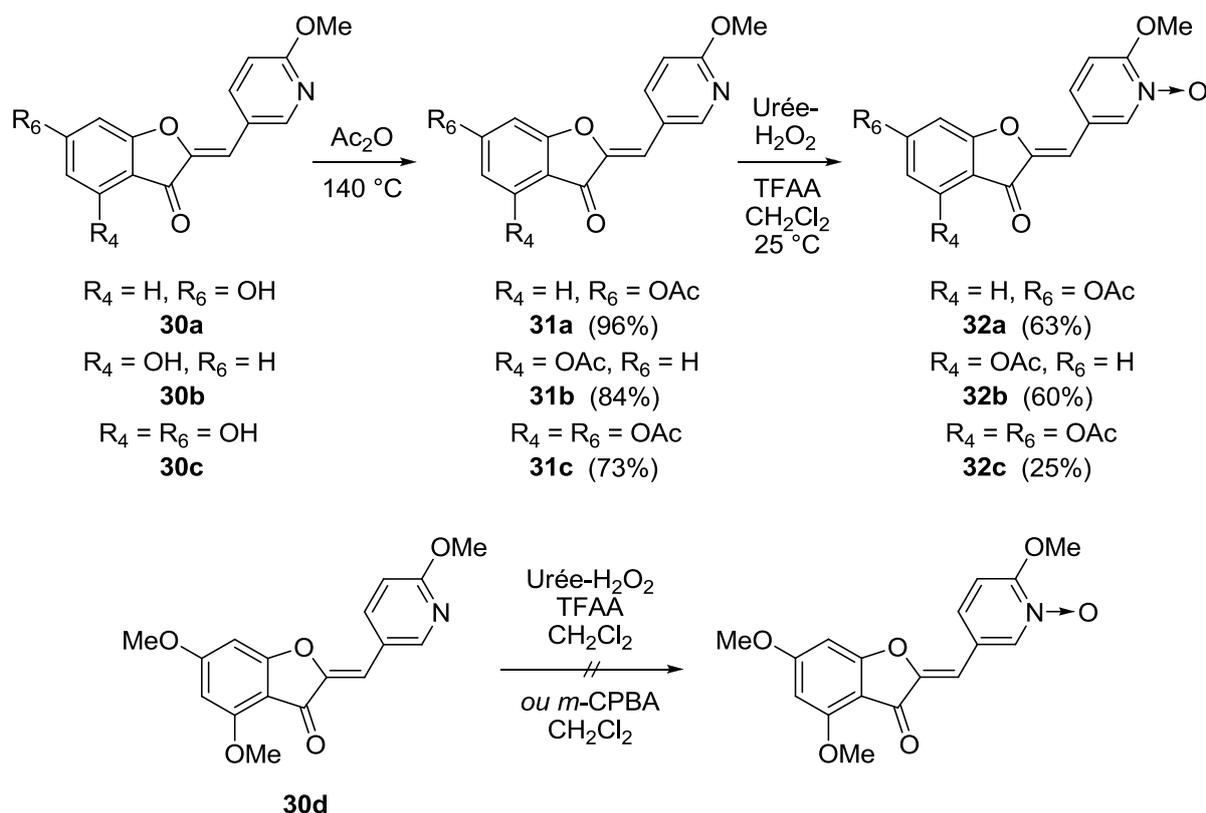


Schéma 23. Méthode d'oxydation des composés **30a**, **30b** et **30c** par protection des groupements phénols et réaction avec un adduit urée – H₂O₂. Conditions réactionnelles testées pour l'oxydation de **30d**, sans succès.

2.3.4 Déprotection et purification

Les composés **32a**, **32b** et **32c** nécessitent une étape de déprotection, à la fois des phénols présents sur le cycle A, mais également du groupement 2-hydroxypyridine sur le cycle B. Une méthode proposée par Zhang *et al.* consiste à porter à reflux le composé dans un mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique dilué (1 N) [338]. Ces conditions, appliquées pendant une nuit, sont à même d'éliminer les groupements acétoxyles, ainsi que le groupement méthoxyle, rendu plus labile par la présence du motif pyridine-*N*-oxyde à proximité. Après une nuit de réaction, un précipité se forme dans le milieu, qui est collecté. Les trois produits obtenus de cette manière, **29a**, **29b** et **29c**, se sont révélés hautement insolubles dans presque tous les solvants, à l'exception du DMSO et de l'eau basique. Ils ont donc été lavés successivement à l'eau, au méthanol (ou à l'acétonitrile), puis à l'éther diéthylique, une purification classique sur colonne ou par recristallisation se révélant très difficilement compatible avec le profil de solubilité des composés. Néanmoins les trois dérivés ont montré une pureté suffisante en RMN ¹H et en microanalyse pour être engagés sur des tests enzymatiques. Les rendements obtenus sont quant à eux plutôt élevés (72 – 83%).

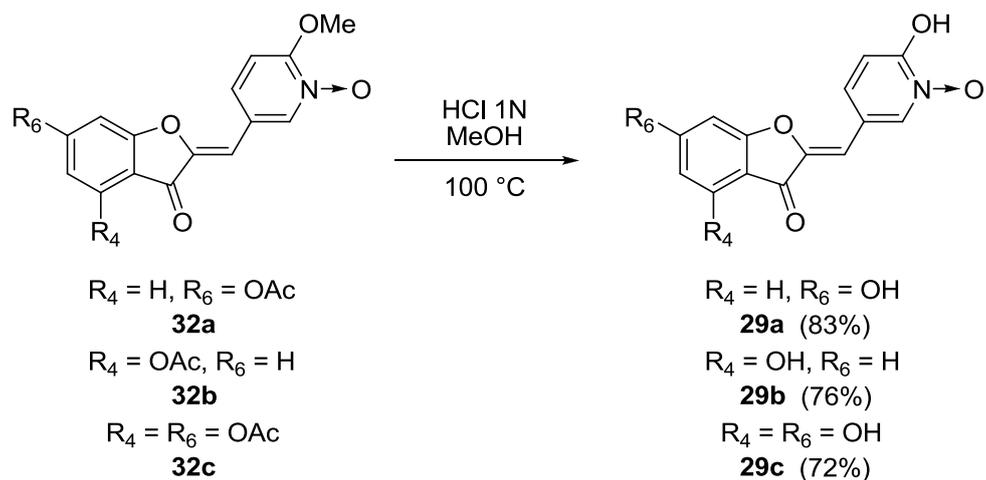


Schéma 24. Méthode de déprotection des composés **32a**, **32b** et **32c** dans un mélange de HCl 1 N et de méthanol à reflux.

Avec tous ces dérivés en main, des tests biologiques *in vitro* ont été entrepris. Ils ont servi un double objectif : atteindre de meilleures performances d'inhibition au sein de la famille des aurones ; et explorer les interactions aurones / tyrosinase afin de révéler leur nature et de comprendre plus précisément les mécanismes sous-jacents derrière les valeurs et les courbes. Des calculs théoriques et des études d'interaction avec un complexe modèle ont également été réalisés. Tous ces travaux font l'objet des chapitres suivants.

Chapitre 3. Évaluations biologiques et discussion

3.1 PROCÉDÉ D'ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES AURONES

Les mesures d'activité et les études cinétiques sur la tyrosinase de champignon, ainsi que la caractérisation des produits d'oxydation, ont été réalisées par Carole Dubois à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, dans l'équipe Biosciences du Dr. Marius Réglier (Université Paul Cézanne). Les tests ont consisté à mettre en présence la tyrosinase de champignon, l'inhibiteur, ainsi que le substrat naturel de la tyrosinase, le L-DOPA, puis à observer la modification d'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (la longueur d'onde en question est 475 nm pour les inhibiteurs et activateurs, et dépend du composé pour les substrats). Après 5 minutes d'incubation, la vitesse initiale de modification d'absorbance est relevée. La combinaison de plusieurs expériences utilisant des concentrations différentes d'inhibiteurs et de L-DOPA permet de construire des courbes conduisant à la détermination des valeurs d' IC_{50} , de K_i , de K_m et d'AH présentées ci-après.

3.2 ACTIVITÉS *IN VITRO* DES AURONES ET ÉTUDES CINÉTIQUES

3.2.1 Criblage rapide de l'activité des aurones méthoxylées

Les aurones méthoxylées réunies au point 2.2.3 de cette partie ont été testées avec une concentration d'aurone de 200 μ M lors d'un premier criblage, afin de déterminer si des motifs prometteurs apparaissent et d'établir une première relation structure-activité. Le motif HOP-NO, identifié précédemment au laboratoire comme un bon inhibiteur de la tyrosinase, est également testé à titre de comparaison. Ces résultats préliminaires sont résumés sur la Figure 42.

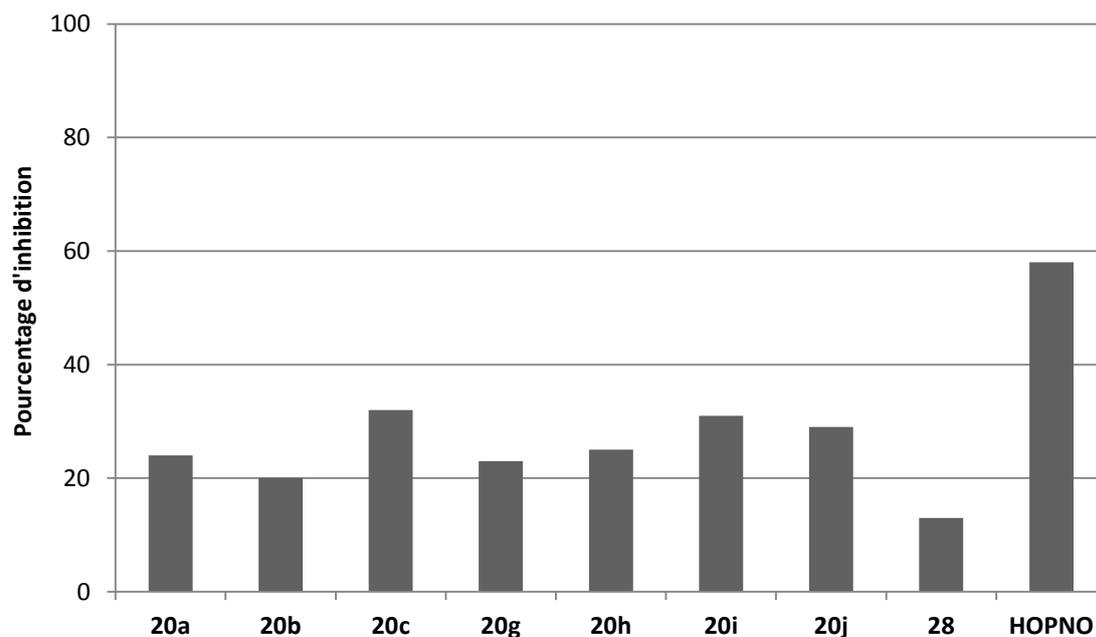


Figure 42. Graphique représentant le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase de champignon obtenu en présence de 200 μM d'inhibiteurs méthoxylés de type **20** et **28**.

Les dérivés d'aurone et d'azaaurone méthoxylés étudiés au cours de ce travail ont révélé un pouvoir d'inhibition très faible, inférieur ou égale à 30% lors de tests sur une concentration de 200 μM de composé. Ces résultats sont concordants avec les valeurs d'inhibition observées précédemment sur mélanocytes, où la présence de groupements hydroxyles sur le cycle B était nécessaire à l'activité. Cependant, la présence d'une substitution de type 4,6-diméthoxyle était relativement tolérée sur mélanocytes, et le composé **20c** menait à une inhibition résiduelle de 14,5% à 100 μM (contre 69 – 75% pour les dérivés les plus actifs) [120]. En revanche, sur la tyrosinase de champignon isolée, le composé **20c** ne se détache pratiquement pas des dérivés non hydroxylés comme **20i** ou **20j**. Le remplacement du squelette benzofuran-3(2*H*)-one des aurones par un cycle indanone (composé **28**) mène à une activité similaire, voire plus faible encore.

3.2.2 Aurones polyhydroxylées et activité de type substrat alternatif

Les aurones possédant un groupement phénol en position 4' sont celles qui ont précédemment été identifiées comme étant les plus actives contre la tyrosinase, lors des tests sur mélanocytes. Avec des IC_{50} de 38,4, 31,7 et 38,0 μM respectivement, les composés **17c**, **18c** et **21c** partagent en effet un cycle A identique, comprenant un phénol dans cette position hautement favorable pour l'activité. Au cours des investigations entreprises durant cette étude, il

s'est avéré que les aurones 4'-hydroxylées n'étaient pas réellement des inhibiteurs, mais des substrats alternatifs de l'enzyme. En effet, lors des tests d'évaluation biologique de ces composés, la mise en présence de l'aurone avec la tyrosinase mène à une modification visible du spectre UV-visible du mélange avec le temps. La Figure 43 illustre cette modification d'absorbance pour le composé **17c**, et notamment une décroissance de la bande d'absorption à 400 nm (caractéristique d'une aurone) et une croissance de la bande d'absorption à 499 nm (caractéristique d'une quinone). La présence de deux points isobestiques à 348 et 446 nm indique en outre que cette modification de la structure de l'aurone s'accompagne de la formation d'un unique produit.

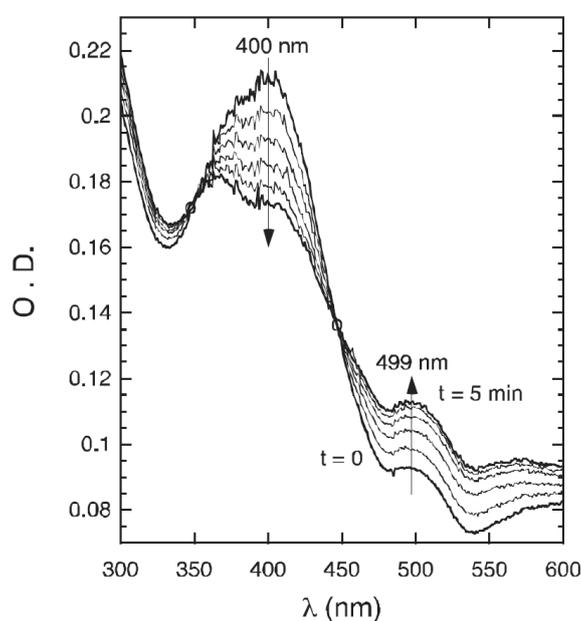


Figure 43. Spectres d'absorption UV-visible d'un mélange d'aurone **17c** (4,37 μM) et de tyrosinase de champignon (3,3 μg) dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7), enregistrés toutes les minutes jusqu'à 5 minutes et superposés.

Les catéchols **17e**, **18p** et **21e** (correspondant à **17c**, **18c** et **21c** respectivement) ont été testés et sont eux aussi des substrats alternatifs de la tyrosinase. Ce phénomène n'est pas réellement une surprise, étant donnée la propension de la tyrosinase à effectuer l'oxydation des phénols et catéchols en quinone (activités monophénolase et diphénolase), un élément conduisant à l'hypothèse de la formation de quinones à partir des aurones. Cette hypothèse est renforcée par le signal croissant à 500 nm en spectrophotométrie UV-visible, mais doit être vérifiée, notamment pour déterminer sur quel cycle se déroule l'oxydation. Cependant, les produits de réaction avec la tyrosinase sont trop instables pour permettre leur caractérisation complète, ce qui constitue d'ailleurs un indice supplémentaire, les quinones étant connues

pour leur instabilité. Ce problème a été contourné par l'ajout de NaBH_3CN en fin de réaction, qui a permis la réduction des quinones formées en catéchols stables. Une analyse HPLC a par exemple révélé la formation de 30% de catéchol **17e** lors de la réaction de la tyrosinase avec **17c**, suivie d'un traitement par NaBH_3CN . Une analyse cinétique a conduit à la détermination d'un comportement non Michaelis-Menten de **17c** et **17e**, avec une forme sigmoïde caractéristique d'un mécanisme coopératif (la liaison d'un substrat augmente l'affinité de l'enzyme pour un autre substrat, Figure 44) qui indique la présence d'au moins deux sites de fixation.

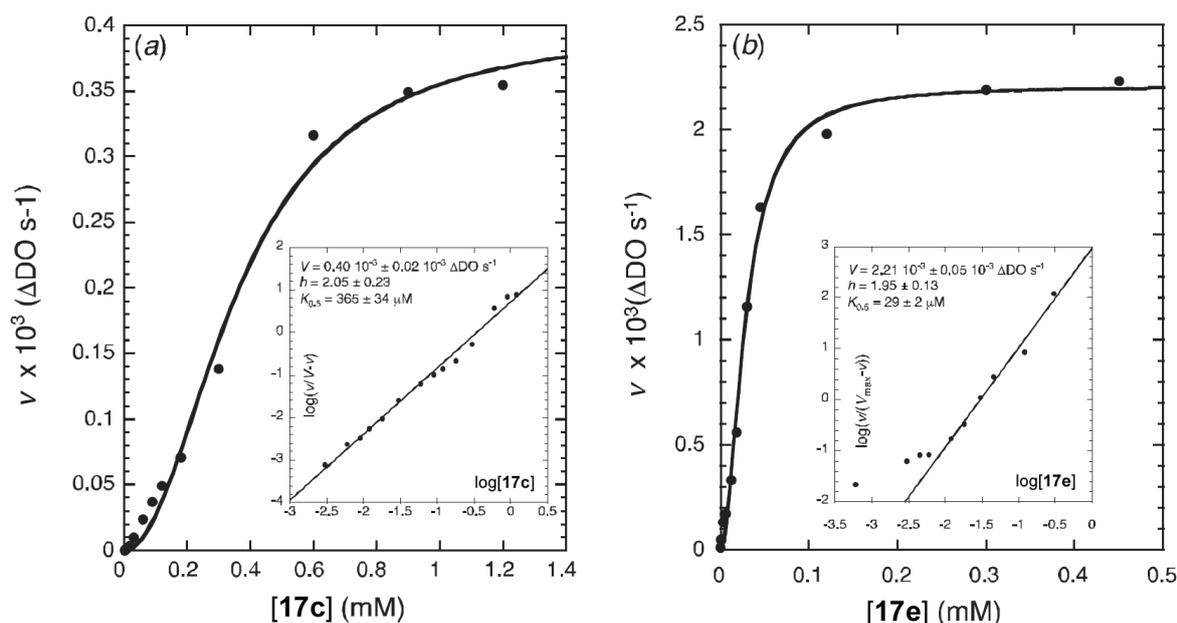
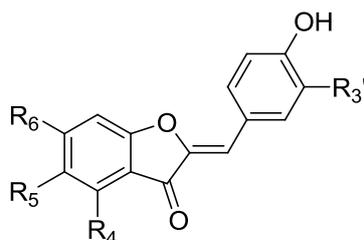


Figure 44. Courbes de vitesse initiale de l'oxydation de **17c** (a) et **17e** (b) catalysées par la tyrosinase en fonction de la concentration en substrat. Les courbes de Hill sont présentées en insert.

Ces expériences révèlent donc une oxydation par la tyrosinase localisée sur le cycle B. Cet élément est par ailleurs cohérent avec la stricte limitation structurale gouvernant la propriété de substrat alternatif sur ce cycle : seules les aurones portant un phénol en position 4' ou un catéchol en 3' et 4' sont oxydées par l'enzyme, et seulement si aucun autre groupement n'est présent sur le cycle B. Le cycle A en revanche peut être diversement substitué : outre **17c** et **17e**, les composés **18c**, **18p**, **19**, **21c** et **21e** constituent également des substrats alternatifs oxydés par l'enzyme. La constante de Michaelis a été calculée pour chacun de ces substrats, et ces valeurs sont réunies dans le Tableau 13. D'une manière générale, on observe que les constantes associées aux phénols sont plus basses que celles des catéchols correspondants ($K_m = 4,8 \mu\text{M}$ pour **17c** contre $288 \mu\text{M}$ pour **17e**; $K_m = 18,2 \mu\text{M}$ pour **21c** contre $52,9 \mu\text{M}$ pour **21e**), ce qui est cohérent avec les K_m reportés dans la littérature (en particulier, $K_m = 210 \mu\text{M}$ pour la L-tyrosine et $800 \mu\text{M}$ pour le L-DOPA) [339].



Composé	R ₄	R ₅	R ₆	R _{3'}	λ _{max} (nm)	K _m (μM)
17c	H	H	OH	H	387	4,8 ± 0,1
17e	H	H	OH	OH	406	288 ± 10
18c	OH	H	H	H	422	<i>n.d.</i>
18p	OH	H	H	OH	420	51 ± 10
19	H	OH	H	H	422	<i>n.d.</i>
21c	OH	H	OH	H	475	18,2 ± 0,1
21e	OH	H	OH	OH	475	52,9 ± 0,3

Tableau 13. Valeurs des K_m (constante de Michaelis) déterminées pour les 4'-hydroxyaurones et 3',4'-dihydroxyaurones et longueur d'onde de travail pour chaque composé.

3.2.3 Aurones polyhydroxylées et activation de la tyrosinase

Si l'oxydation des 4'-hydroxy- et 3',4'-dihydroxyaurones par la tyrosinase n'est pas réellement une surprise, d'autres aurones diversement hydroxylées ont révélé un potentiel d'activation de l'enzyme, ce qui est plus surprenant. Ainsi, les dérivés d'aurones 2'- ou 3'-hydroxylés testés n'ont pas réagi avec la tyrosinase (le spectre UV-visible du mélange aurone – tyrosinase est resté constant), mais ont mené à une augmentation de la vitesse d'oxydation

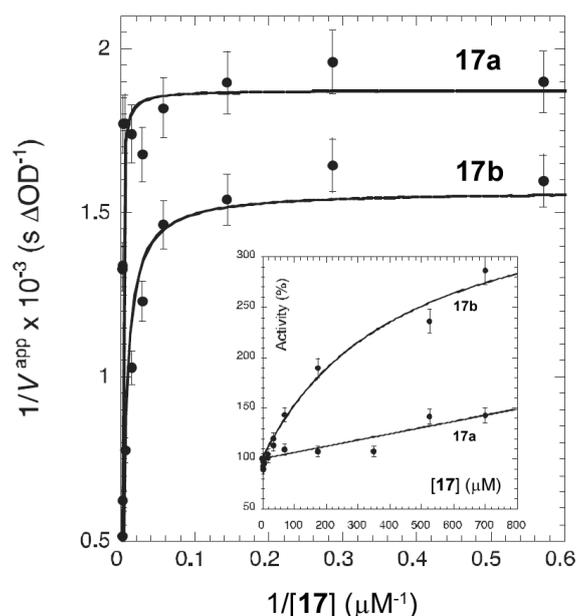
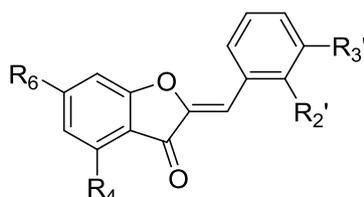


Figure 45. Courbes de $1/V^{\text{app}}$ en fonction de l'inverse de la concentration en activateurs hyperboliques pour les composés 17a et 17b.

du L-DOPA par l'enzyme. Les composés **17a** et **17b** ont en particulier montré sur un graphique en double réciproque un comportement d'activateur hyperbolique (Figure 45). Ces aurones **17a** et **17b**, ainsi que les autres dérivés 2'- et 3'-hydroxylés **18a**, **18b** et **21b**, ont également été testées à 700 μM en présence de tyrosinase de champignon et de L-DOPA, afin de mesurer leur activité hyperbolique (AH) qui correspond au pourcentage d'augmentation de la vitesse maximale d'oxydation du L-DOPA. Ces activités sont reportées dans le Tableau 14.



Composé	R ₄	R ₆	R _{2'}	R _{3'}	AH (%)
17a	H	OH	OH	H	240
17b	H	OH	H	OH	120
18a	OH	H	OH	H	200
18b	OH	H	H	OH	170
21b	OH	OH	H	OH	150

Tableau 14. Valeurs des activités hyperboliques (AH) déterminées pour les 2'-hydroxy- et 3'-hydroxyaurones en présence de 700 μM d'activateur.

Ces activateurs se fixent probablement sur au moins un site allostérique de la tyrosinase, permettant par ce biais une modification de l'enzyme et entraînant son activation. Ce mécanisme se rapproche du comportement coopératif des substrats présentés précédemment. En effet, ces classes d'aurone polyhydroxylées se lient l'une comme l'autre probablement à un site allostérique. La classe des substrats pouvant être oxydée par l'enzyme, elle revêt un caractère coopératif qui peut être interprété comme une activation de la tyrosinase par un substrat se fixant sur le site allostérique, qui favorise l'oxydation d'un deuxième substrat au niveau du site actif. Le mécanisme d'action des activateurs présentés ici est sans doute très similaire, à ceci près qu'ils ne sont pas oxydables par l'enzyme (la présence du phénol en position 2' ou 3' menant probablement à des contraintes stériques) et permettent donc uniquement l'activation de la tyrosinase pour un autre substrat connu.

3.2.4 Aurones inhibitrices : du motif résorcinol aux dérivés hybrides

Le motif résorcinol est un élément structural connu pour conférer un potentiel d'inhibition de la tyrosinase accru à de nombreuses classes de molécules, notamment les flavonoïdes. Dans cette étude, la présence d'un groupement phénol en position 2' semble préve-

nir l'oxydation du phénol en position 4' par la tyrosinase. Ce motif mène donc à des aurones montrant une véritable inhibition de l'enzyme, de type mixte. Parmi les aurones portant un motif résorcinol sur le cycle B, les composés **18o** et **21d** présentent une inhibition mixte, avec des composantes majoritaires respectivement compétitive et anti-compétitive. Le composé **17d**, en revanche, ne montre aucune activité notable sur la tyrosinase, ce qui constitue une surprise. L'absence de groupements phénols sur le cycle B peut également permettre de prévenir l'oxydation de ce cycle par la tyrosinase. Cependant, les composés **18n** et **21j** n'ont montré aucune activité lors des tests sur l'enzyme isolée.

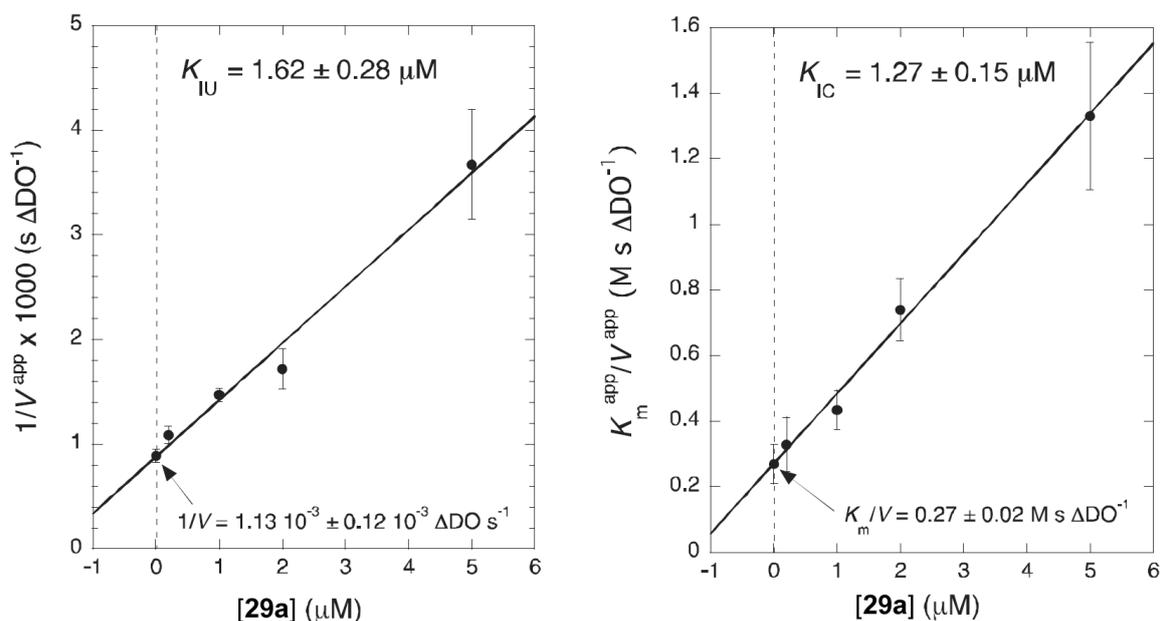


Figure 46. Courbes de $1/V^{app}$ et de K_m^{app}/V^{app} en fonction de la concentration en inhibiteur **29a**, et constantes d'inhibitions associées.

Le motif HOPNO, précédemment décrit comme un bon chélateur du cuivre et inhibiteur de la tyrosinase, est également connu comme un mime du motif catéchol. Cependant, contrairement au catéchol, le HOPNO n'est pas oxydable par la tyrosinase et permet donc une inhibition réelle de l'enzyme. Les trois composés « hybrides » **29a**, **29b** et **29c**, possédant un squelette aurone sur lequel est branché le motif HOPNO, présentent une forte inhibition de la tyrosinase, de type mixte, avec des valeurs de K_{ic} et de K_{iu} assez proches (la détermination de ces valeurs *via* les courbes de Michaelis-Menten pour **29a** est présentée en Figure 46). Ces valeurs sont par ailleurs similaires au K_i observé pour la molécule HOPNO ($K_i = 1,8 \mu\text{M}$), qui est un inhibiteur purement compétitif. Néanmoins le dérivé **29c** est un inhibiteur plus puissant de la tyrosinase, avec un K_{ic} sub-micromolaire de $0,34 \mu\text{M}$. Le caractère mixte de l'inhibition par les dérivés de type résorcinol et hybride signifie qu'il existe très probablement un site de

fixation allostérique pour ces composés, qui interagissent par ailleurs directement avec le site actif. Ces éléments confirment une fois de plus la probable existence d'un site de fixation pour les aurones, distinct du site actif de l'enzyme.

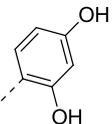
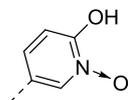
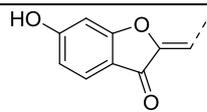
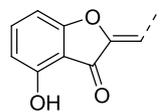
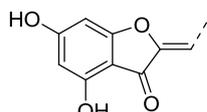
									
	Comp.	K_{ic} (μM)	K_{iu} (μM)	Comp.	K_{ic} (μM)	K_{iu} (μM)	Comp.	K_{ic} (μM)	K_{iu} (μM)
	17d	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>	29a	1,3	1,6			
	18o	7,3	64	29b	2,9	2,5	18n	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
	21d	30	9,15	29c	0,34	0,9	21j	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>

Tableau 15. Valeurs des constantes d'inhibition compétitive (K_{ic}) et anti-compétitive (K_{iu}) pour les aurones de type résorcinol, hybride et B-désoxy. La mention *n.a.* signifie qu'aucune activité n'a été observée.

3.3 COHÉRENCE GÉNÉRALE ET HYPOTHÈSE D'INTERACTION

Les comportements observés pour les aurones diversement substituées peuvent au premier abord sembler curieux. En effet, en modulant la position des groupements phénols sur le cycle B, on parvient à des aurones de type substrat, inhibiteur, activateur ou même sans activité. Cependant, en prenant en compte les mécanismes d'action de ces différents composés, il est possible d'émettre une hypothèse cohérente selon laquelle il existe deux sites de fixation des aurones : le site actif, où se forme une interaction avec les cuivres ; et un site allostérique inconnu. Étant donnée la structure en tétramère (H_2L_2) de la tyrosinase de champignon publiée très récemment [278], il est en outre possible que la fixation des aurones sur un deuxième site perturbe cet assemblage supramoléculaire et conduise à l'activation de la tyrosinase. Ainsi, cette hypothèse peut expliquer les activités hétéroclites des aurones :

(a) les composés de type substrat opèrent selon un mécanisme coopératif, indiquant qu'il existe un site alternatif où peut se fixer un ligand, ce qui permet d'augmenter l'affinité de l'enzyme pour le substrat au niveau du site actif.

(b) les composés de type activateur se fixent également sur le site alternatif, mais ils possèdent une affinité faible pour le site actif, due à l'absence de groupements phénols ou catéchols orientés vers les atomes de cuivre. Le changement de géométrie au sein du site actif se traduit donc par une augmentation de l'activité de la tyrosinase pour le substrat naturel.

(c) les composés de type inhibiteur montrent un mode d'inhibition mixte, ce qui signifie qu'ils interagissent avec le site actif et un site allostérique en même temps. Ce phénomène est reflété par les constantes d'inhibition compétitive et anti-compétitive, très proches.

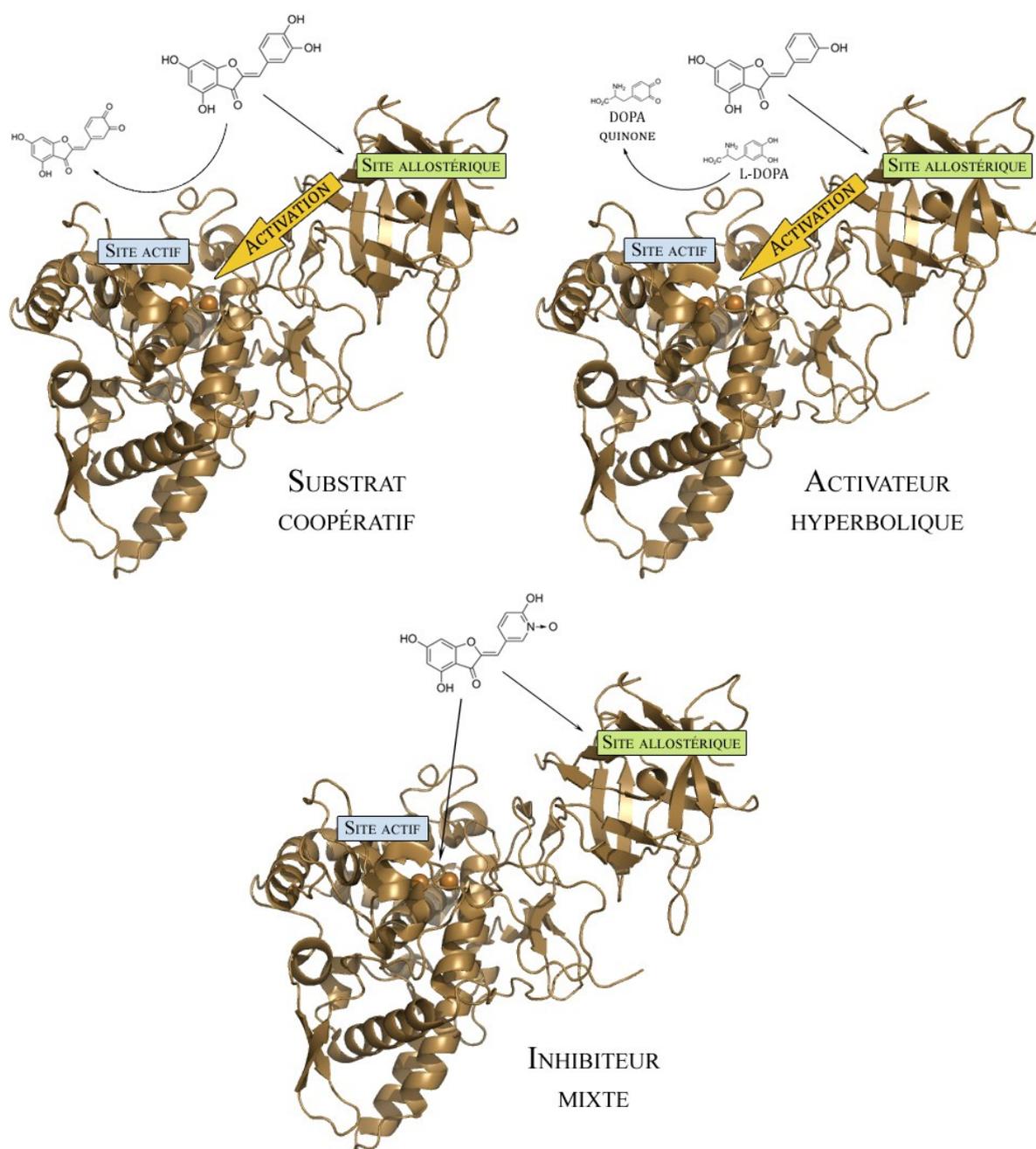


Figure 47. Modes d'action des aurones selon trois mécanismes différents.

Chapitre 4. Études d'interaction avec les atomes de cuivre sur complexe modèle

4.1 INTRODUCTION

Les études d'interaction par spectroscopie, ainsi que les calculs théoriques, ont été réalisées respectivement par les Drs. Constance Bochot et Maylis Orio au Département de Chimie Moléculaire de Grenoble, dans les équipes CIRE et CT et sous la direction des Drs. Catherine Belle et Hélène Jamet (Université Joseph Fourier). Ces travaux sont présentés ici de manière succincte car ils permettent une compréhension globale du mécanisme d'action des aurones et font partie intégrante du projet pluridisciplinaire concernant les aurones comme outils pour l'élucidation de mécanismes liés à la tyrosinase (projet supporté par l'ANR).

4.2 ÉTUDE EXPÉRIMENTALE PAR TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

La difficulté de cristallisation de la tyrosinase est telle qu'il a fallu attendre 2006 avant d'assister au premier succès dans une telle entreprise. Une étude d'interactions ne peut donc pas raisonnablement se baser sur des structures cristallographiques de complexes ligand – tyrosinase. L'étude spectroscopique des interactions entre des inhibiteurs et la tyrosinase est également difficile : les aurones présentent de très grands coefficients d'extinction molaire et une éventuelle interaction avec la tyrosinase n'est pas observable sur un spectre UV-visible de l'enzyme. De plus, les techniques de RMN sont compliquées à mettre en œuvre dans le cas d'enzymes paramagnétiques. Pour ces raisons, l'utilisation d'un complexe modèle (le complexe **I**) mimant à la fois la structure et l'activité de la tyrosinase semble constituer la méthode de choix pour les premières études du mode de fixation des aurones sur le centre binucléaire

de cuivre. La co-cristallisation de **I** avec le chélatant HOPNO a précédemment permis d'identifier les modes de fixation de ce motif, qui chélate un seul atome de cuivre, ou forme un pont entre les deux centres. Malheureusement, les essais de co-cristallisations entrepris avec le dérivé hybride **29a** ont pour le moment échoué. Cependant, le spectre RPE d'un mélange **I** – **29a** indique une interaction entre les deux molécules : d'un spectre silencieux caractéristique de **I** et d'un couplage antiferromagnétique fort, on parvient avec l'ajout de **29a** à l'apparition d'un signal caractéristique d'ions cuivre(II) et d'un couplage magnétique, ce qui révèle une modification de la géométrie et des propriétés magnétiques du complexe **I** après addition de l'aurone.

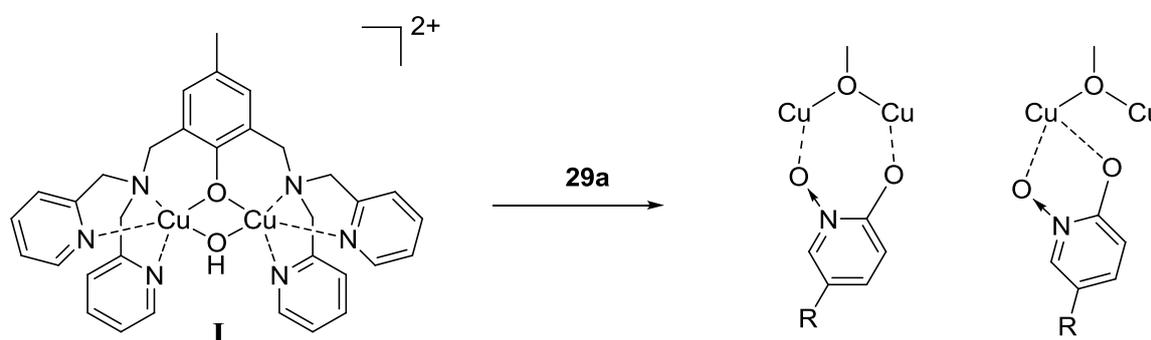


Schéma 25. Modes de fixation envisagés du composé **29a** sur le complexe modèle **I** qui mime la structure et l'activité de la tyrosinase.

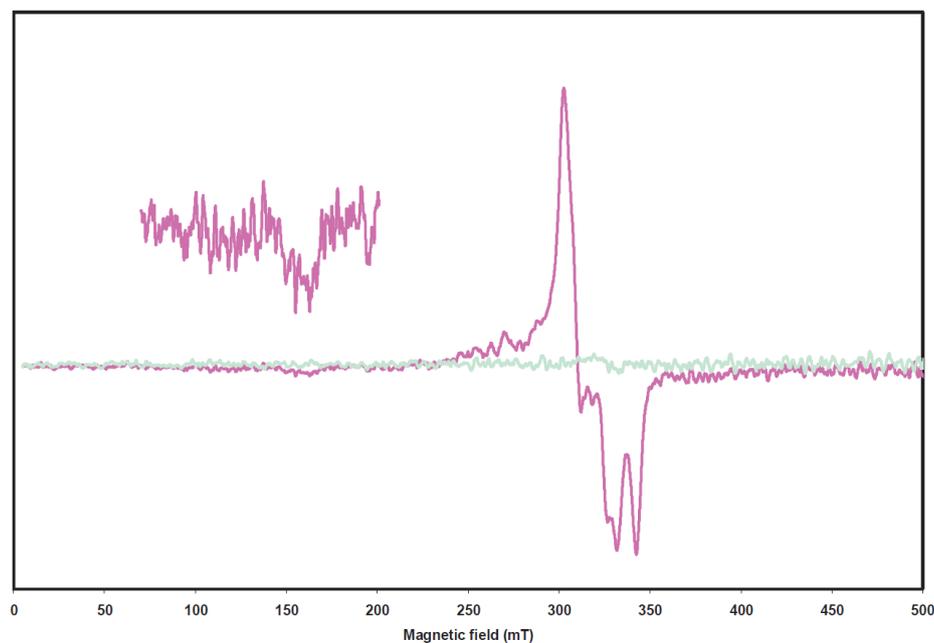


Figure 48. Spectre RPE du complexe **I** seul dans un mélange 1/1 d'HEPES (50 mM, pH 7) / DMSO en solution gelée (vert), et après ajout d'un équivalent du composé hybride **29a** (rose). Conditions RPE : 100 K, 9,33 GHz, fréquence de modulation 100 kHz, amplitude de modulation 0,2 mT.

4.3 ÉTUDE PAR CALCULS THÉORIQUES

L'utilisation de techniques de calculs théoriques nous ont permis d'en savoir un peu plus sur le mode de fixation des aurones, notamment de l'hybride **29a**. D'après les études précédentes sur le motif HOPNO, deux types de fixation sont envisagés : un mode « **29a-ch** », où un seul des deux cuivres se trouve chélaté par le motif HOPNO, et un mode « **29a-bg** », où le motif HOPNO forme un pont entre les deux centres de cuivre. Le mode **29a-ch** présente une distance Cu-Cu plus importante, ce qui diminue les interactions entre les deux atomes de cuivre et mène à un couplage ferromagnétique faible ($J = 12 \text{ cm}^{-1}$). Ces observations concordent avec le spectre RPE obtenu pour le mélange **I** – **29a**. En revanche, le mode **29a-bg** présente un fort couplage antiferromagnétique ($J = -255 \text{ cm}^{-1}$), ce qui est contraire aux observations en RPE. Cela suggère fortement que le composé **29a** interagit avec **I** selon un mode de fixation chélatant, tout comme le petit motif HOPNO testé précédemment. En outre, la stabilité relative des deux modes de fixation a été évaluée par une approche théorique, et conforte **29a-ch** comme mode privilégié avec un gain de stabilité de $16,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ comparé au mode **29a-bg**.

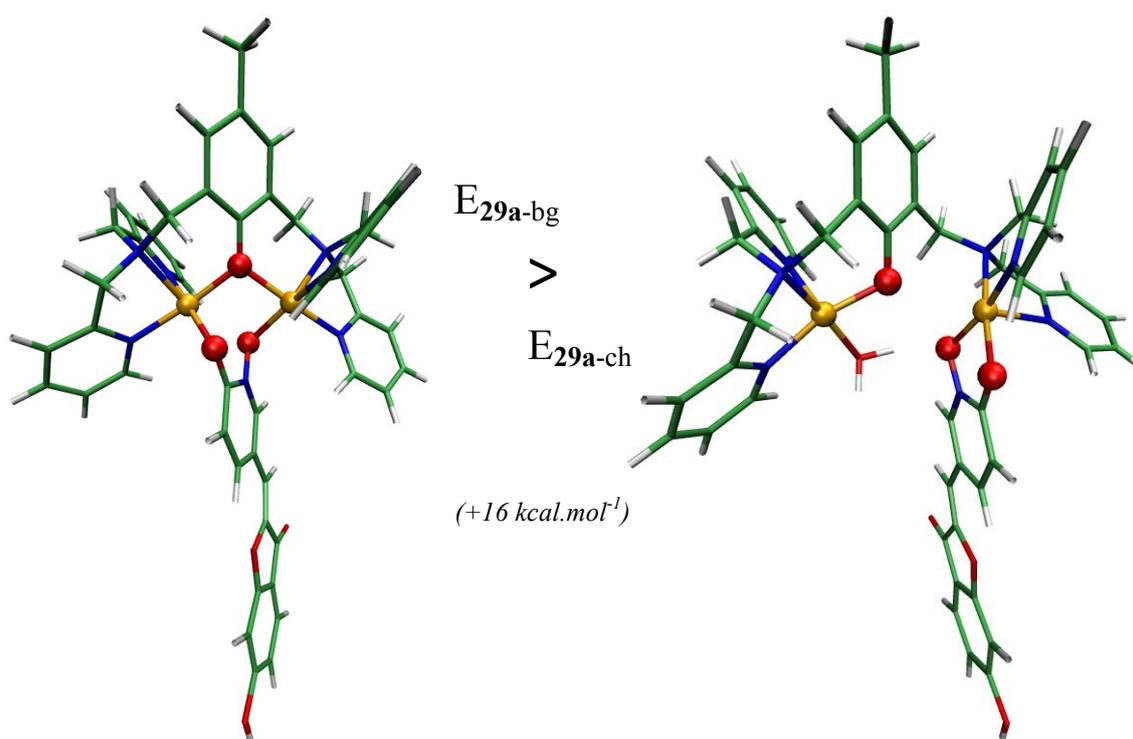


Figure 49. Représentation graphique des modes de fixation envisagés du composé **29a** sur le complexe **I**, et énergies calculées pour chacun de ces modes.

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Ce travail fait l'objet d'un article actuellement soumis à *Chemistry: A European Journal*. Il a consisté en la synthèse d'analogues d'aurone diversement hydroxylés, ainsi que de trois auronnes hybrides. L'évaluation biologique de ces composés a mené à l'identification de comportements différents et originaux vis à vis de la tyrosinase. Les composés portant un phénol en position 4', ou un catéchol en 3',4' sont des substrats alternatifs et sont oxydés par l'enzyme. Les composés portant un phénol en position 2' ou 3' sont des activateurs hyperboliques. Enfin, les dérivés portant un motif réSORCINOL ou HOPNO sont des inhibiteurs de type mixte. Ces trois comportements trouvent une place logique dans l'hypothèse de la présence d'un site allostérique influençant le site actif. Des études théoriques et d'interaction avec un complexe modèle ont en outre conduit à une meilleure compréhension de la fixation au niveau des atomes de cuivre.

Quelques perspectives s'ouvrent également avec ce travail. L'exploration systématique des positions hydroxylées des auronnes peut ainsi être poursuivie, notamment avec la synthèse des dérivés 5- et 7-hydroxylés (cycle A), 2',3'-dihydroxylés, 3',5'-dihydroxylés et 3',4',5'-trihydroxylés (cycle B). La co-cristallisation d'une aurone avec le complexe modèle permettrait d'améliorer notre compréhension du mode réel de fixation, notamment pour le motif HOPNO. Enfin, les dérivés les plus actifs doivent être testés sur les enzymes bactérienne et humaine, ainsi que sur mélanocytes, afin d'évaluer leur potentiel pour une future utilisation thérapeutique.

Partie 5.

**SYNTHÈSE BIOMIMÉTIQUE DU TRAMADOL
ET SÉPARATION DES ÉNANTIOMÈRES**

Chapitre 1. Avant-propos

Ce travail de thèse s'est essentiellement articulé autour de la famille des aures, de la synthèse chimique, et des outils de chimie médicinale, comme l'établissement de relations structure-activité et l'utilisation de la modélisation moléculaire. Néanmoins, afin de pouvoir diversifier tout à la fois la chimie de synthèse employée, le domaine d'exploration, ainsi que les structures des composés étudiés, j'ai consacré une partie de ma troisième année de thèse à un projet non prévu dans son cadre initial. Ce travail s'inscrit dans la découverte au laboratoire de l'existence du tramadol au sein d'une plante africaine, *Nauclea latifolia*, et m'a permis de travailler des aspects différents de la chimie-biologie : la séparation d'énantiomères et la synthèse biomimétique d'un alcaloïde.

Ce projet a été mené en collaboration avec le Dr. Michel De Waard de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, et le Dr. Thierry Lomberget du laboratoire Biomolécules, Cancer et Chimiorésistances dirigé par Marc Le Borgne (Université Claude Bernard, Lyon).

Chapitre 2. Le tramadol et *Nauclea latifolia*

2.1 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET CONSTITUANTS DE *NAUCLEA LATIFOLIA*

2.1.1 L'arbuste *Nauclea latifolia* en médecine traditionnelle

Nauclea latifolia est un arbuste appartenant à la famille des Rubiacées, largement présent dans les forêts humides des savanes d'Afrique continentale. Il pousse jusqu'à 200 mètres d'altitude et peut atteindre 4 à 6 mètres de hauteur. Il est également connu sous le nom scientifique de *Nauclea esculentus* et sous le nom usuel de pêcher africain. Utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle d'Afrique de l'est et de l'ouest, cette plante permet de traiter différentes pathologies. Son écorce, ses feuilles, ses racines et ses fruits (Figure 50) sont en effet employées dans des cas de fièvre, de fièvre jaune, de paludisme et de dysfonctionnements du système nerveux central comme l'épilepsie. Des guérisseurs traditionnels camerounais utiliseraient également des extraits de cet arbre pour lutter contre la douleur, l'anxiété et l'agitation. Responsables de ces activités, plusieurs alcaloïdes et triterpénoïdes ont été identifiés et extraits de différentes parties de la plante. Certains d'entre eux n'ont été extraits que de *Nauclea latifolia*.

2.1.2 Activités antiparasitaires et antibactériennes

Nauclea latifolia a révélé de nombreuses activités biologiques. Parmi celles-ci, son action antipaludique et, d'une manière plus générale, antiparasitaire, a été largement décrite dans la littérature. Des décoctions et des infusions provenant des racines et du tronc de la plante ont montré une inhibition importante de la croissance de cultures de *Plasmodium falciparum*, sur des souches résistantes et sensibles à la chloroquine. Les IC₅₀ obtenus sont de l'ordre de 1 µg/mL, voire moins, et semblent meilleurs pour les extraits de racine. Ces valeurs



Figure 50. Photographie de l'arbuste *Nauclea latifolia*, dont différentes parties sont utilisées en médecine traditionnelle d'Afrique subsaharienne.

sont inférieures à celles trouvées pour des plantes antipaludiques de référence, comme *Artemisia annua* ou *Azadirachta indica* ($IC_{50} = 3,9 \mu\text{g/mL}$ et $2,35 - 12,5 \mu\text{g/mL}$ respectivement) [340]. Ces éléments ont conduit le *National Institute for Pharmaceutical Research and Development* (NIPRD) nigérian à développer un remède réalisé à partir des racines de *Nauclea latifolia*, le Niprd-AM1[®], qui permet de traiter une population n'ayant pratiquement pas accès aux médicaments antipaludiques sur le marché [341]. Cependant, une fraction des alcaloïdes présents dans l'arbuste induirait des activités génotoxique et mutagène, ce qui n'a pas été observé lors de la pratique de la médecine traditionnelle locale [342]. La plante a également prouvé son efficacité comme anthelminthique. En effet, des extraits aqueux de l'écorce de tronc de *N. latifolia* ont permis de supprimer la production d'œufs chez les nématodes, sans doute par le biais d'une inhibition de la synthèse protéique des parasites. Après cinq jours de traitement par une dose de $1,6 \text{ g/kg}$ d'extrait, le nombre d'œufs générés par les nématodes diminue de 94% [343]. L'extrait éthanolique de la plante serait en outre légèrement plus actif que l'extrait aqueux ($LC_{50} = 0,650 \text{ mg/mL}$ contre $0,704 \text{ mg/mL}$ respectivement) [344]. C'est

également le cas en ce qui concerne l'activité antibactérienne des extraits de feuilles, tronc et racines de *N. latifolia*. L'extrait alcoolique des feuilles permet une zone d'inhibition de prolifération bactérienne de 10 – 20 mm pour *Staphylococcus aureus* et de 16 – 24 mm pour *Pseudomonas aeruginosa* (contre 10 – 18 mm et 20 – 23 mm respectivement pour l'extrait aqueux) [345]. Il semble être encore plus actif contre les bactéries *Klebsiella pneumonia* et *Shigella dysenteriae* [346].

2.1.3 Activités neuropharmacologiques

De nombreuses activités neuropharmacologiques ont également été identifiées sur différents extraits de *N. latifolia*. Un extrait aqueux de racine a par exemple montré à haute dose des propriétés sédatives, menant à une réduction de l'activité locomotrice et du comportement exploratoire de souris. Une souris soumise à une dose de 50 mg/kg perd ainsi cinq sixièmes de son activité motrice spontanée au bout d'une demi-heure. Cet extrait serait en réalité à l'origine d'une interférence avec la transmission dopaminergique centrale, provoquée par les saponines, une classe d'hétérosides contenue dans l'arbuste [347]. Par ailleurs, il a été montré que l'extrait aqueux pouvait augmenter la durée de sommeil induite par une administration de diazépam sur souris. L'administration de la décoction (80 mg/kg) permet en effet une augmentation de la durée de sommeil d'un facteur cinq. En outre, des propriétés anti-convulsantes, et notamment antiépileptiques, ont également été découvertes, et la décoction semble présenter une activité anxiolytique proche du diazépam à forte dose. Contrairement au diazépam, l'extrait permettrait une activité antipyrétique, pouvant expliquer partiellement l'emploi de cette plante en médecine traditionnelle dans le but de traiter la fièvre [348]. Cette activité semble être également caractéristique des feuilles de la plante, où elle s'accompagne d'une action anti-inflammatoire menant par exemple à la diminution sensible du volume d'un œdème de pied induit chez le rat (diminution de moitié au bout de cinq heures pour un rat traité avec 1500 mg/kg d'extrait, par rapport à un rat témoin) [349]. Un extrait aqueux des racines a enfin conduit à l'identification d'activités antidépressive et myorelaxante. Dans cette étude, le test de nage forcée de souris est révélateur : traitées avec 160 mg/kg d'extrait, les souris adoptent massivement un comportement de nage et délaissent leur comportement habituel d'immobilité. Le même phénomène est observé avec la fluoxétine, un antidépresseur connu [350]. Enfin, des propriétés analgésiques ont été identifiées très récemment, qui vont nous intéresser dans la suite de ce travail [351]. L'arbuste présente donc un panel extrêmement large d'activités neuropharmacologiques permettant de rationaliser son utilisation en médecine traditionnelle d'Afrique de l'ouest.

2.1.4 Activités hypoglycémiques et hypocholestérolémiques

Le traitement du diabète est l'une des nombreuses indications de *N. latifolia* en médecine traditionnelle africaine. Ainsi, le traitement de rats diabétiques par un extrait aqueux de feuilles de l'arbuste à une concentration de 200 mg/kg permet de réduire la glycémie initiale de 44% au bout de trois heures. En revanche, soumis à la même concentration d'extrait, des rats non diabétiques n'ont pas montré de modification significative de leur glycémie après la même période. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par traitement avec un médicament antidiabétique connu, le glibenclamide : dans ce cas le composé mène à une diminution du taux de glycémie chez les deux types de rats [352]. Des extraits d'éthanol et d'hexane ont présenté des propriétés différentes. En effet, si l'extrait d'hexane se révèle totalement inactif dans tous les cas, l'extrait alcoolique mène à une diminution de la glycémie d'environ 20% après quatre heures à une concentration de 400 mg/kg d'extrait, que ce soit chez le rat diabétique ou le rat normal [353]. Le fruit de *N. latifolia* a quant à lui montré une activité hypocholestérolémique. Certains de ses constituants de type saponine et glycosides cyanogénétiques, connus par ailleurs pour leur rôle hypoglycémique dans de nombreuses plantes, seraient en effet responsables d'une diminution du cholestérol chez le rat. Nourri avec un supplément constitué des fruits de *N. latifolia*, le rat passe d'une concentration de 136 mg/dL de cholestérol à une concentration de moins de 90 mg/dL, soit une diminution d'un tiers [354]. Cette activité a également été identifiée dans les feuilles : le traitement d'un rat diabétique avec 400 mg/kg d'extrait permet un retour à la normale des taux de cholestérol (159,6 mg/dL pour un rat diabétique contre 129,9 mg/dL pour un rat normal et 128,1 mg/dL pour un rat diabétique traité) et de triacylglycérols [355].

2.1.5 Composés extraits de *Nauclea latifolia*

Nauclea latifolia tire son potentiel pharmacologique d'un grand nombre d'espèces chimiques contenues en son sein, et réparties en plusieurs classes : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les saponines, les glycosides, les tannins, les anthraquinones ou encore les phénols, dont certains représentants ont été identifiés structuralement. Dès 1975, quatre alcaloïdes ont été isolés et identifiés comme des dérivés de l'angustine, un composé de type indoloquinolizidine préalablement extrait de *Strychnos angustiflora*. Deux de ces molécules, la nauléfine et la nauléline, constituaient des structures originales [356]. Dans les années 2000, de nombreux autres alcaloïdes appartenant à la même famille ont été découverts dans l'écorce et le bois de *Nauclea latifolia*. Les nauléamides A à E, ainsi que les composés

connus strictosamide, 10-hydroxystriectosamide et tétrahydrodésoxycordifoline sont en effet des dérivés de l'angustine présentant parfois de fortes modifications structurales comme des ouvertures de cycles, des remplacements d'hétéroatomes, ou l'introduction de groupements

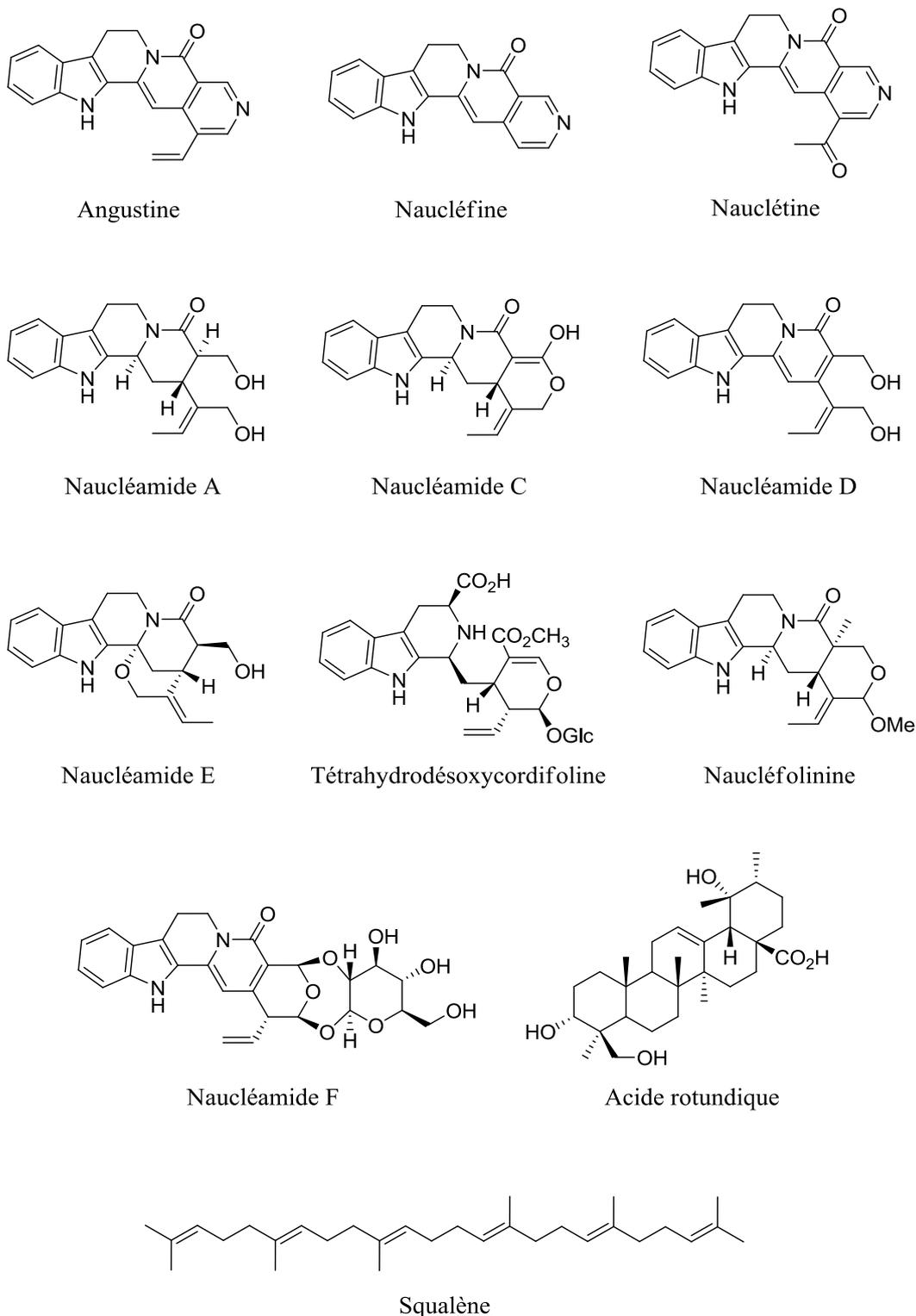


Figure 51. Quelques dérivés d'alcoïdes et de triterpénoïdes identifiés dans différents organes de l'arbuste *Nauclea latifolia*.

glucosides [357]. Le naucléamide F est un dérivé particulier dont la structure comprend un cycle 1,3,5-trioxepane fusionné avec un dihydropyrane et une unité de glucose [358]. Un autre alcaloïde extrait, la naucléfolinine, possède également une forte analogie structurale avec l'angustine. Cinq triterpènes connus par ailleurs ont en outre été identifiés : il s'agit de l'acide rotundique, de l'acide α -L-rhamnoquinovique, du 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol, du squalène et du sitostérol-3-O-6'-stéaroyl- β -D-glucopyranoside [359]. Quelques composés caractéristiques sont présentés en Figure 51.

2.2 UTILISATION ET ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DU TRAMADOL

Le tramadol, dont la structure est présentée en Figure 52, est un médicament opioïde analgésique actuellement sur le marché, et commercialisé notamment sous les marques Zualgic, Monoalgic, Monocrioxo ou encore Ixprim (en conjugaison avec du paracétamol dans ce dernier cas). Antalgique de classe 2, son mode d'action n'est pas totalement connu même s'il se fixe probablement sur les récepteurs opioïde et empêche la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline. Il est classiquement utilisé en tant que mélange racémique du diastéréoisomère nommé *cis* en nomenclature IUPAC, mais bien souvent *trans* dans l'appellation courante (nous le nommerons *cis* dans cette étude), avec des doses de 50 à 100 mg. Les deux énantiomères de ce mélange possèdent une activité analgésique, mais selon des mécanismes différents. Le composé présente également d'autres effets, notamment gastro-intestinaux ou immunitaires. En revanche il n'influence pas la respiration comme le font la plupart des autres opioïdes. Il est particulièrement indiqué pour les douleurs aiguës modérées à sévères, et se révèle très utile chez les patients dont les fonctions cardio-pulmonaires sont pauvres, comme les personnes âgées, les obèses, les fumeurs, ainsi que les patients venant de subir une opération du thorax par exemple. Il peut également convenir pour le traitement d'une douleur chro-

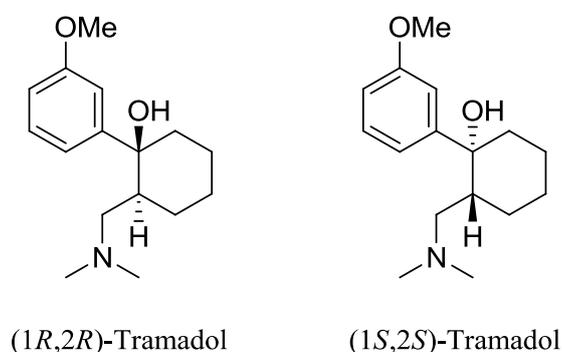


Figure 52. Structure des deux énantiomères de la base libre du *cis*-tramadol, dont la forme racémique est utilisée comme analgésique.

nique [360]. Cependant, la pharmacodépendance associée à une prise de longue durée du tramadol peut mener à une utilisation détournée de type toxicomaniaque de ce composé.

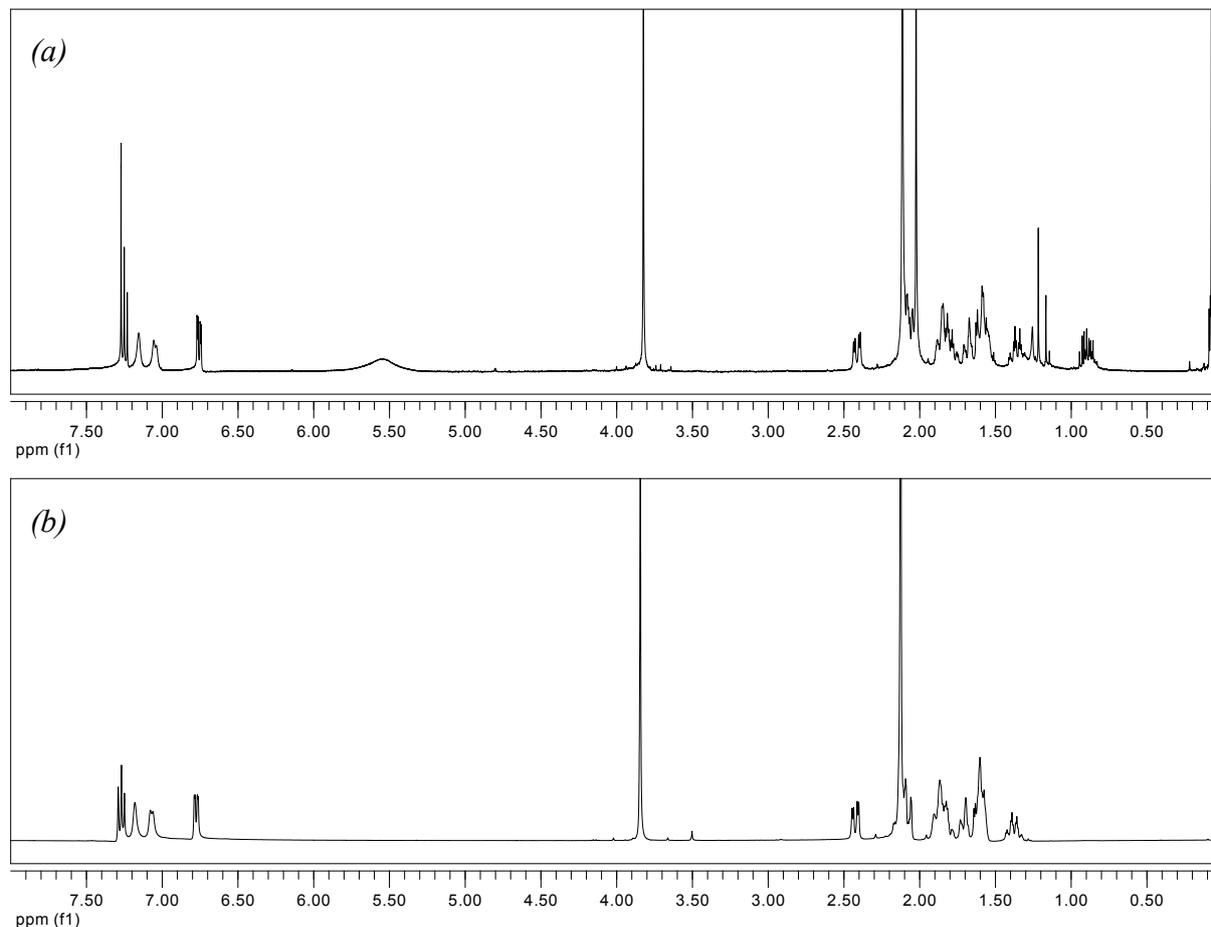


Figure 53. Spectres RMN ^1H : (a) d'un extrait dans le chloroforme purifié provenant d'écorces de *Nauclea latifolia* ; (b) de la base libre du tramadol commercial.

2.3 DÉCOUVERTE ET EXTRACTION DU TRAMADOL

Un extrait d'écorce de *Nauclea latifolia* a permis en 2011 d'identifier au laboratoire un dérivé d'alcaloïde, qui s'est révélé être le tramadol en version racémique. Il s'agit ici de la première découverte d'une occurrence naturelle pour ce composé développé originellement par la compagnie Grünenthal GmbH dans les années 1970, de manière purement synthétique. Si des exemples d'identification au sein d'une plante d'une classe de composés préalablement synthétisés existent dans la littérature (le cas des tacamonines, ou pseudovincamones, des alcaloïdes identifiés pour la première fois chez *Tabernaemontana eglandulosa* en 1984 après avoir été synthétisés par Massiot *et al.* deux ans plus tôt) [361,362], la découverte du caractère naturel d'un produit synthétique présent sur le marché est un cas unique. Provenant d'un ex-

trait éthanolique de l'arbuste, le tramadol a été précipité par l'ajout de diéthyléther saturé en acide chlorhydrique sur le résidu sec. La collecte du solide blanc a permis l'analyse et la caractérisation de l'échantillon. Les spectres RMN du proton et du carbone 13 obtenus sur le composé extrait sont en tous points similaires à ceux d'un échantillon de tramadol obtenu de source commerciale (les spectres RMN ^1H sont présentés en Figure 53). De plus, la cristallisation du composé a permis l'obtention d'une structure cristallographique ne laissant aucune place au doute quant à la nature du composé extrait. L'image ORTEP de cette structure est présentée en Figure 54, et correspond parfaitement au chlorhydrate de *cis*-tramadol.

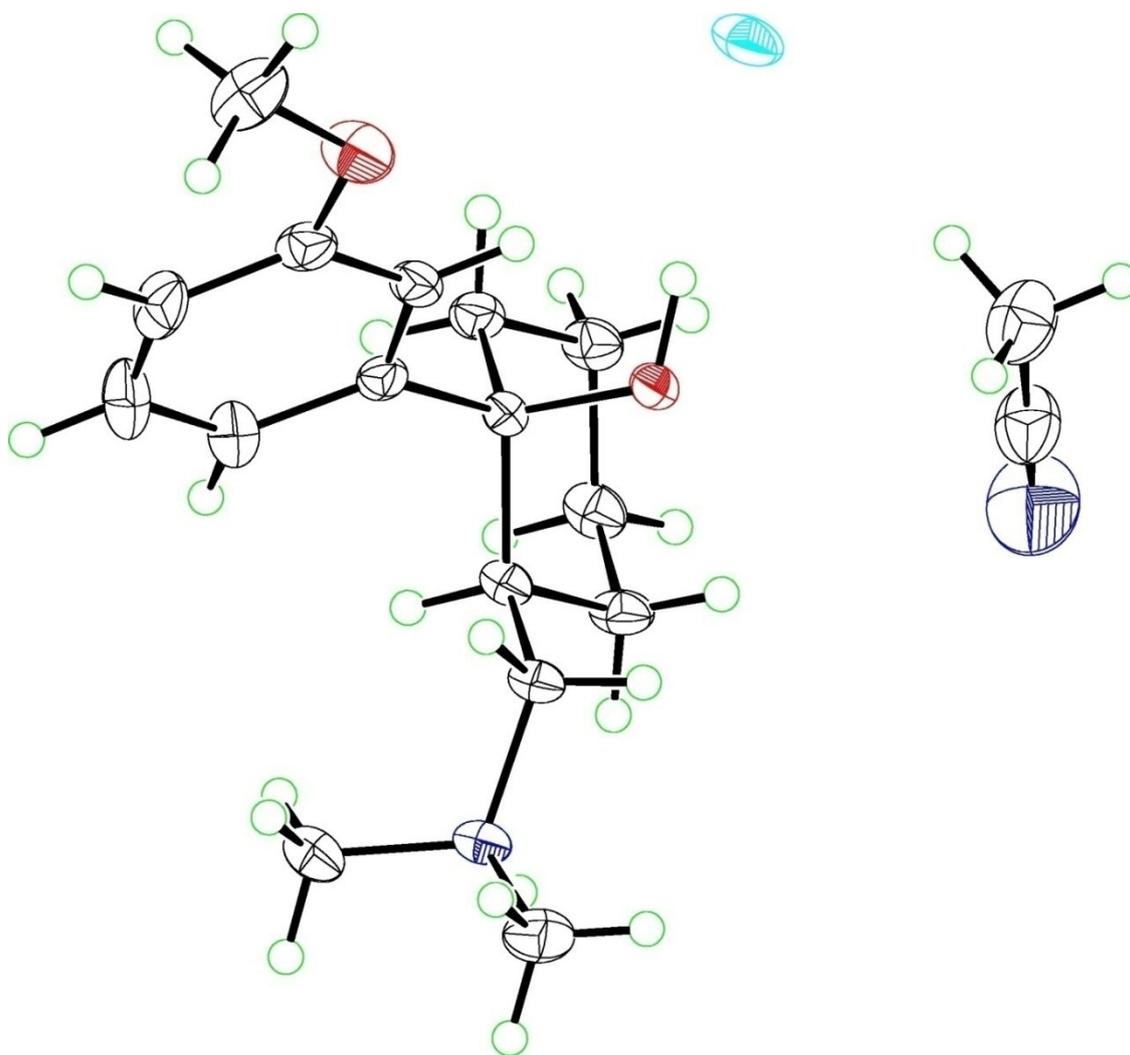


Figure 54. ORTEP de la structure cristallographique obtenue par diffraction des rayons X du chlorhydrate de *cis*-tramadol, accompagné d'une molécule d'acétonitrile (solvant de cristallisation).

Dans le cadre de cette découverte, nous avons entrepris deux travaux : (a) l'isolement des deux énantiomères du tramadol racémique afin d'obtenir des références à la fois pour comparer ces énantiomères à la substance extraite, et pour les évaluer lors de différents tests

biologiques ; et *(b)* l'étude d'une voie de synthèse du tramadol dont la dernière étape permettrait de mimer un possible mécanisme de biosynthèse du composé dans l'arbuste. Ces études constituent l'objet des deux chapitres suivants.

Chapitre 3. Séparation des énantiomères du tramadol

3.1 OBJECTIF ET MÉTHODES

La séparation des énantiomères du tramadol à partir du mélange racémique commercial recouvre deux applications dans le cadre du projet mené au laboratoire. En premier lieu, il s'agit d'obtenir deux références énantiopures, ou très énantiioenrichies, des énantiomères (+) et (-) du tramadol, afin de comparer leur profil HPLC respectif avec les différents échantillons extraits de *Nauclea latifolia*. Ces énantiomères purs ne sont en effet pas disponibles commercialement, et sont nécessaires afin d'évaluer les quantités relatives de chacun d'eux dans la plante. Ensuite, cette séparation permet de réaliser des tests biologiques sur les deux isomères séparés pour évaluer leur potentiel respectif, notamment dans le cadre du traitement de l'épilepsie où le tramadol a récemment montré un profil intéressant.

3.2 UTILISATION DE L'ACIDE MANDÉLIQUE

La résolution des énantiomères du *cis*-tramadol *via* la formation de diastéréoisomères avec l'acide mandélique a été décrite en 2000 par Itov *et al.*, ainsi qu'en 2002 par Evans *et al.* [363,364]. Cependant, les protocoles proposés concernent une échelle semi-industrielle, à destination du développement. Nous avons donc tenté de les adapter à une résolution de laboratoire, à l'échelle du gramme. Ainsi, la base libre du *cis*-tramadol commercial, préparée par traitement du chlorhydrate par un mélange $\text{NaHCO}_3 / \text{Na}_2\text{CO}_3$, a été diluée dans l'acétate d'éthyle et le mélange a été chauffé à 70 °C. Une solution d'acide (+)-mandélique dans l'acétate d'éthyle à 40 °C a ensuite été ajoutée à hauteur de 0,75 équivalent, puis la solution résultante a été laissée à refroidir une nuit à température ambiante. Aucune cristallisation n'est

apparue, même après plusieurs jours à 4 °C puis à -18 °C. L'évaporation d'une partie du milieu réactionnel n'a pas plus conduit à l'apparition d'un solide.

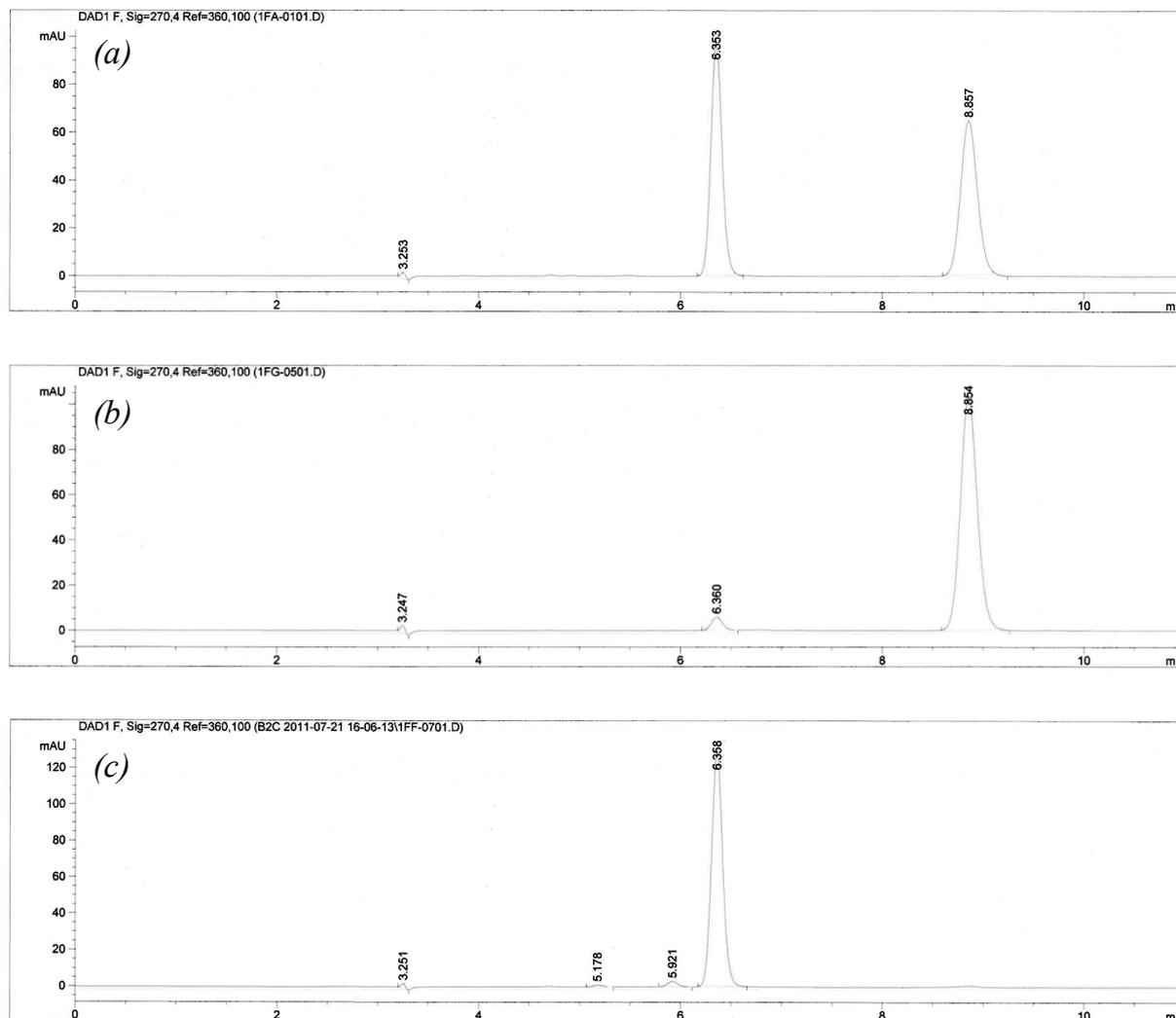


Figure 55. Profils HPLC : (a) du tramadol racémique provenant de source commerciale ; (b) du (-)-tramadol issu de la séparation des énantiomères ; (c) du (+)-tramadol issu de la séparation des énantiomères.

3.3 UTILISATION DE L'ACIDE DI-*O*-*P*-TOLUOYLTRARIQUE

Une autre publication mentionne la plus grande efficacité d'un autre acide chiral pour la résolution du tramadol : il s'agit de l'acide di-*O*-*p*-toluoyltartrique (DTTA) [365]. Néanmoins, là encore, les quantités utilisées sont d'échelle industrielle (la résolution est menée sur 69 kg de tramadol racémique) et il est nécessaire d'adapter le protocole pour des quantités réduites de l'ordre du gramme. La base libre du *cis*-tramadol, préparée selon la même méthode que précédemment, a été diluée dans l'éthanol, puis la solution a été chauffée à 70 °C. Une solution de D-(+)-DTTA dans l'éthanol, préalablement chauffée à 70 °C, a ensuite été

ajoutée. Après agitation à 70 °C pendant 30 minutes, puis refroidissement progressif de la solution jusqu'à température ambiante pendant 15 heures, la solution est triturée jusqu'à précipitation d'un solide blanc, qui est filtré. Ce solide, chimiquement pur, est retransformé en base libre par un traitement basique, puis le chlorhydrate est formé par ajout d'éther saturé en HCl, et différentes phases de filtration / lavage à l'éther.

Le filtrat est récupéré et évaporé à sec. Il est soumis aux mêmes traitements que précédemment, ce qui permet de récupérer deux solides correspondants à deux chlorhydrates de tramadol. Après une rapide analyse, le pouvoir rotatoire du solide issu de la cristallisation est de +35,5° (méthanol, $C = 3,75$ g/L) et celui du solide issu du filtrat est de -37,3° (méthanol, $C = 3,08$ g/L). Ces valeurs sont très similaires à celles obtenues dans la littérature (respectivement de +34,3° et de -34,3°), ce qui suggère la présence respective de (+)-tramadol et de (-)-tramadol [365]. Afin de vérifier ces attributions et d'évaluer l'énantiopureté des chlorhydrates formés, nous avons analysé les solides par HPLC. Les excès énantiomériques obtenus sont de 97,8% pour le (+)-tramadol et de 92,7% pour le (-)-tramadol (Figure 55).

Chapitre 4. Synthèse biomimétique du tramadol

4.1 VOIES DE BIOSYNTHÈSE DES ALCALOÏDES ET STRATÉGIE EMPLOYÉE

Les alcaloïdes proviennent pour la plupart du métabolisme d'acides aminés comme la L-lysine, la L-arginine, la L-tyrosine ou le L-tryptophane. Dans le cas des alcaloïdes quinolizidiniques, c'est la L-lysine qui est classiquement décarboxylée en cadavérine lors d'une première étape, suivie de la formation d'imines qui conduisent à une réaction entre une molécule de cadavérine sous forme iminium, et une molécule de cadavérine sous forme énamine. Une cascade de réaction (hydrolyse de l'imine, désamination oxydante catalysée par la diamine

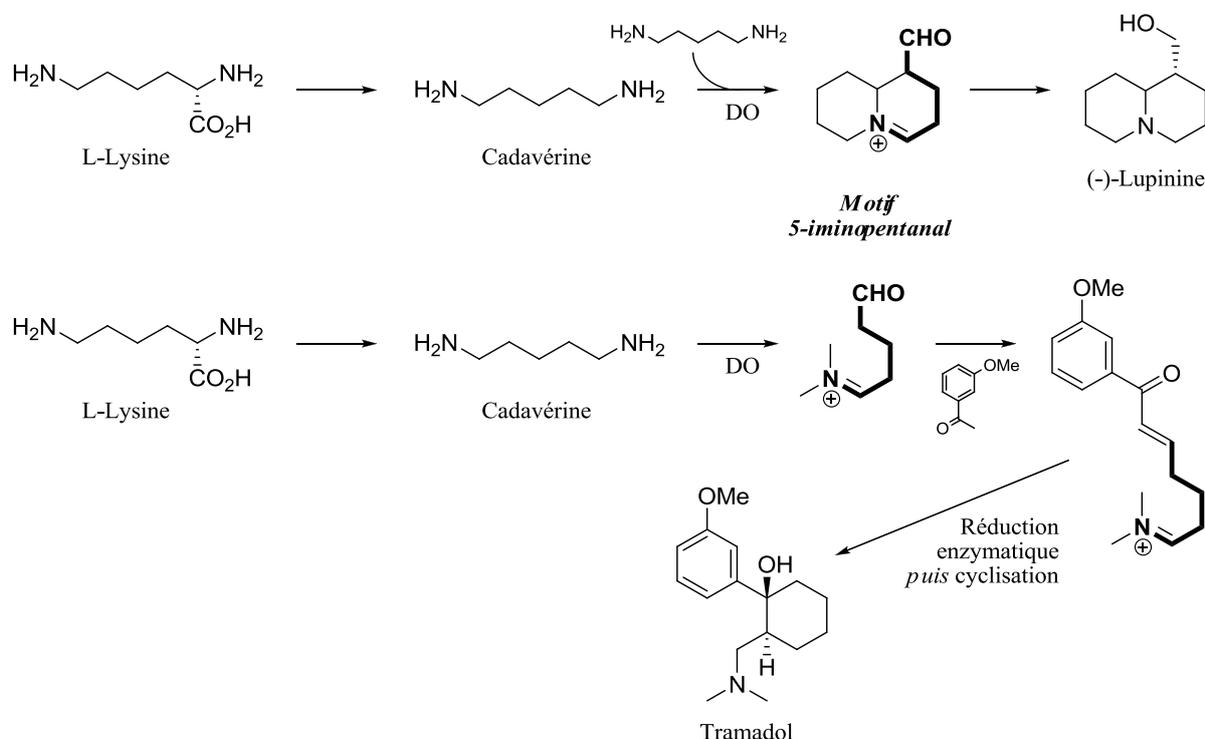


Schéma 26. Voie de biosynthèse de la (-)-lupinine, un alcaloïde quinolizidinique connu ; et voie de biosynthèse proposée du tramadol recourant à un intermédiaire similaire.

oxydase et de nouvelle formation d'imines) mène alors à la double cyclisation et à la formation du noyau quinolizidine [366]. Cette voie de biosynthèse fait intervenir un intermédiaire iminium dont la structure comprend un motif 5-iminopentanal, directement hérité de la L-lysine. On peut imaginer une biosynthèse du tramadol faisant intervenir ce même motif, selon une voie réactionnelle similaire, ce qui semble d'autant plus probable que *Nauclea latifolia* comprend un grand nombre d'alcaloïdes quinolizidiniques, présentés précédemment. Le tramadol partagerait ainsi avec ces composés un certain nombre d'enzymes clés impliquées dans leur biosynthèse. Dans ce cas, la formation du tramadol résulterait de la réaction entre le dérivé de 5-iminopentanal, présenté en Schéma 26, et un autre partenaire dérivé de l'acétophénone. Les acétophénones sont en effet fréquemment rencontrés dans le vivant (notamment chez les bactéries et les plantes) où ils proviennent du métabolisme de la L-phénylalanine [367], ou d'une combinaison d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA [368].

Après une première aldolisation-crotonisation de l'énol de l'acétophénone sur l'aldéhyde du dérivé 5-iminopentanal, une réduction de la double liaison formée interviendrait par une voie enzymatique. La dernière étape de ce mécanisme hypothétique consisterait en une aldolisation entre une énamine issue de l'iminium formé et le carbonyle en α du groupement phényle. Ce travail a pour objectif de modéliser cette dernière réaction en apportant des éléments de réponse purement chimiques, susceptibles de conforter cette hypothèse de biosynthèse et de dégager des pistes pour la compréhension des mécanismes supposés mis en jeu. Cette cyclisation biomimétique semble tout à fait se prêter à l'organocatalyse. Nous allons donc dans cette étude tenter de la réaliser par le biais d'une imine formée avec la diméthylamine, qui sera ensuite réduite pour donner le tramadol. Auparavant, une telle cyclisation sera entreprise avec un organocatalyseur très classique, la L-proline, sur deux intermédiaires dicarbonylés : le 7-(3-méthoxyphényl)-7-oxoheptanal, précurseur supposé du tramadol, et le 7-oxooctanal, un composé simplifié qui porte une fonction cétone moins désactivée. Ce dernier composé nous servira de modèle puisque sa réaction avec la L-proline, qui mène à une structure proche du tramadol, a été décrite par ailleurs.

4.2 SYNTHÈSE DE L'INTERMÉDIAIRE CLÉ

4.2.1 Stratégie de synthèse

Le composé dicarbonylé **33** n'est pas disponible dans le commerce, pas plus que d'éventuels précurseurs comme l'acide ou l'alcool correspondants, dont la transformation en

aldéhyde aurait été aisée. Nous avons donc préparé ce composé au laboratoire. Sa structure dicarboxylée pouvant provenir de la coupure oxydante d'une double liaison intracyclique, nous avons décidé de synthétiser l'espèce cyclique par le biais de l'addition d'un organolithien, formé par échange halogène-métal, sur la cycloheptanone. L'alcool formé peut alors être facilement déshydraté et mener à la double liaison intracyclique. La stratégie de synthèse envisagée est indiquée sur le Schéma 27.

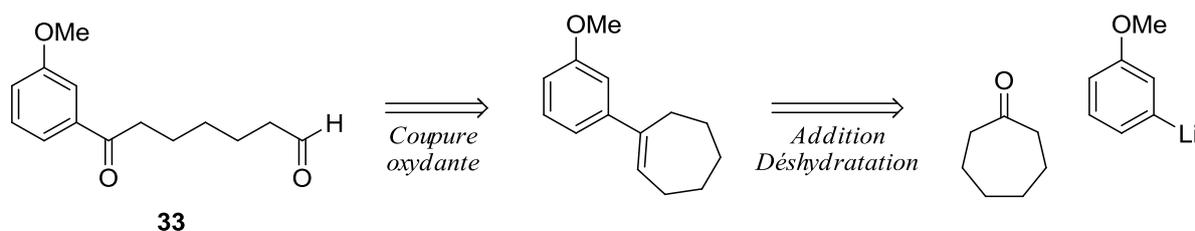


Schéma 27. Structure de l'intermédiaire clé **33**. Stratégie de synthèse envisagée pour parvenir à ce composé : addition d'un lithien sur la cycloheptanone, déshydratation de l'alcool puis coupure oxydante.

4.2.2 Addition du lithien sur la cycloheptanone et déshydratation

L'organolithien présenté sur le Schéma 27 peut être formé par échange halogène-métal sur la 3-bromoaniline. Pour cela, nous avons adapté le protocole proposé par Alvarado *et al.* dans le cadre de leur propre synthèse du tramadol [369]. Une solution de butyllithium dans l'hexane a ainsi été mise en présence de la 3-bromoaniline dans le THF, à -78°C pendant 45 minutes. Le lithien formé *in situ* est alors mis à réagir avec la cycloheptanone, introduite goutte à goutte à -78°C . Après deux heures de réaction, le mélange est traité et purifié. L'alcool **34** est récupéré avec un rendement de 92% et engagé dans l'étape de déshydratation. Cette dernière est réalisée dans le dichlorométhane en présence d'acide trifluoroacétique. Après une heure à température ambiante, le mélange est lavé à l'eau et mène à l'obtention de l'alcène **35** avec un rendement quantitatif.

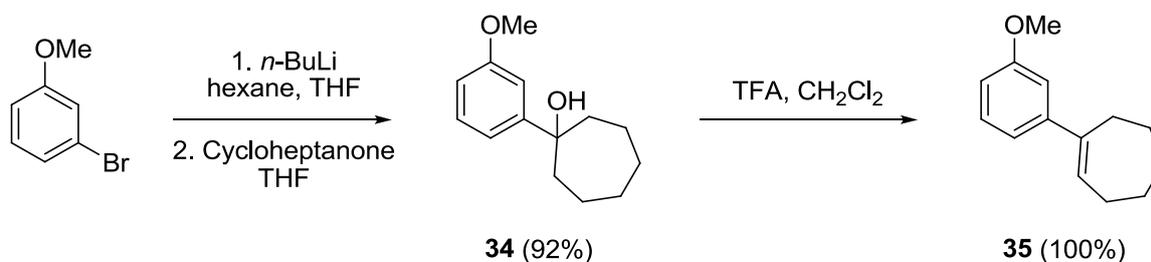


Schéma 28. Méthode de formation de l'organolithien à partir de la 3-bromoaniline et du *n*-BuLi, et méthode de déshydratation du composé **34** en présence de TFA.

4.2.3 Coupure oxydante

À partir du composé **35**, une coupure oxydante peut être envisagée pour récupérer l'intermédiaire clé **33**. Ne disposant pas d'un générateur d'ozone fonctionnel, nous n'avons pas pu évaluer l'efficacité de la coupure par ozonolyse. Nous avons donc opté pour une dihydroxylation suivie d'une coupure de diol. La dihydroxylation de l'alcène **35** a été réalisée en présence d'une quantité catalytique de tétraoxyde d'osmium et de plusieurs équivalents de *N*-méthylmorpholine *N*-oxyde (NMO). Ce dernier réactif permet la réoxydation d'OsO₄ après une première réaction, et évite ainsi l'emploi d'une grande quantité de ce réactif cher et toxique. Menée dans un mélange d'eau et de THF, la réaction est très lente et n'apparaît comme totale par contrôle sur CCM qu'après environ 48 heures. Une solution saturée de bisulfite de sodium est alors ajoutée et le mélange est extrait. Le diol **36** est alors récupéré avec un très bon rendement (94%). La coupure oxydante du diol est ensuite réalisée par le périodate de sodium dans un mélange d'eau et de THF. Après 48 heures à température ambiante, le précipité formé est éliminé, puis la solution obtenue est extraite et le produit brut est purifié. L'intermédiaire clé **33** est ainsi obtenu avec un rendement de 84%.

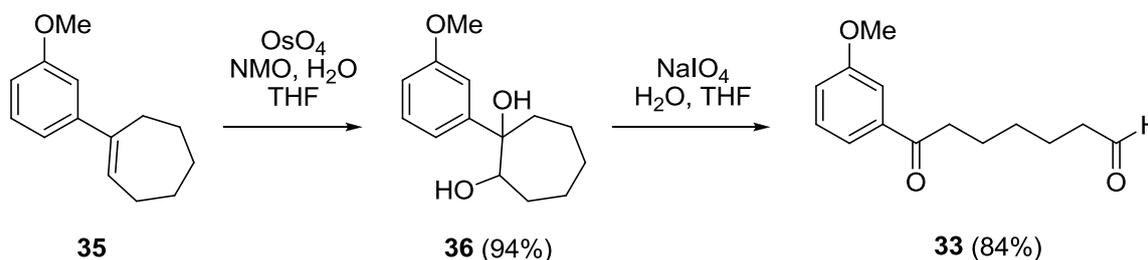


Schéma 29. Méthode de dihydroxylation du composé **35** en présence d'OsO₄ et de NMO, et de coupure oxydante du composé **36** en présence de NaIO₄.

4.3 SYNTHÈSE DE L'INTERMÉDIAIRE MODÈLE SIMPLIFIÉ

4.3.1 Stratégie de synthèse

Dans le cas de la synthèse de l'intermédiaire modèle, et de la même manière que pour **33**, le composé **37** n'a pas pu être obtenu dans le commerce. Cependant, l'acide 7-oxooctanoïque s'est révélé disponible en quantités suffisantes pour être utilisé. Nous avons donc décidé de préparer l'intermédiaire à partir de l'acide 7-oxooctanoïque, par le biais d'une réduction des deux groupements carbonyles suivie d'une oxydation ménagée pouvant conduire au cétoaldéhyde **37**. La stratégie de synthèse envisagée est indiquée sur le Schéma 30.

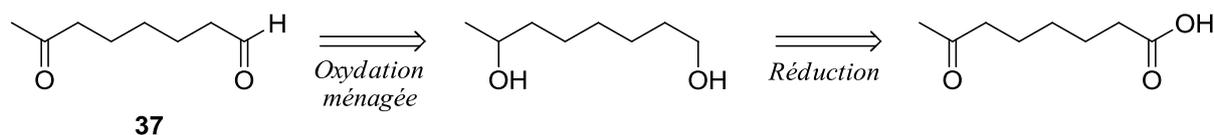


Schéma 30. Structure de l'intermédiaire clé **37**. Stratégie de synthèse envisagée pour parvenir à ce composé : réduction de l'acide 7-oxooctanoïque suivie d'une oxydation ménagée.

4.3.2 Réduction des groupements carbonyles

La réduction des groupements carbonyles de l'acide 7-oxooctanoïque a été menée en présence de LiAlH_4 dans le THF, à température ambiante. Après quatre heures de réaction, 1 mL d'eau, 1 mL de soude à 15%, puis 3 mL d'eau ont été ajoutés pour chaque gramme de réducteur, afin de provoquer la précipitation des espèces inorganiques du milieu réactionnel, puis la solution a été agitée pendant 30 minutes. Après filtration, séchage sur MgSO_4 puis évaporation, le composé **38** est obtenu sous la forme d'une huile incolore, avec un rendement quasiment quantitatif (99%).

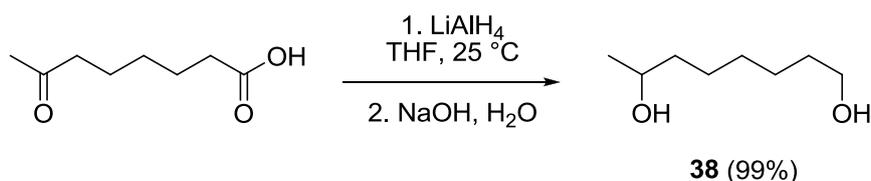


Schéma 31. Méthode de réduction des groupements carbonyles de l'acide 7-oxooctanoïque en présence de LiAlH_4 dans le THF, puis de soude.

4.3.3 Oxydation ménagée

L'oxydation ménagée du composé **38** peut être réalisée dans différentes conditions, notamment à l'aide de la réaction de Swern ou du réactif de Dess-Martin. Nous avons décidé d'effectuer la réaction en présence de PCC dans le dichlorométhane. Après une agitation des réactifs pendant trois heures, le milieu réactionnel est concentré sous vide et purifié directement sur colonne de gel de silice, avec un éluant acétate d'éthyle / cyclohexane 1/1. Le com-

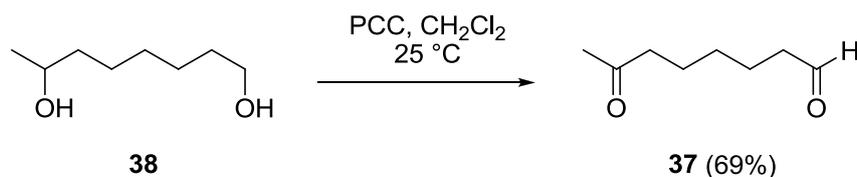


Schéma 32. Méthode d'oxydation ménagée des carbonyles du composé **38** en présence de PCC dans le dichlorométhane.

posé **37** est obtenu avec un rendement de 69% sous la forme d'une huile incolore qui cristallise.

4.4 ESSAIS DE CYCLISATION ORGANOCATALYSÉE PAR LA L-PROLINE

4.4.1 Réaction de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert et sélectivités

La L-proline est un organocatalyseur largement utilisé en synthèse organique, et qui permet la formation d'une énamine nucléophile sur un carbonyle initialement électrophile. Employée sur des dérivés dicarboxylés, la proline mène en général à la formation sélective d'une énamine sur un carbonyle, suivie d'une attaque nucléophile intramoléculaire sur le second groupement et de l'élimination de l'organocatalyseur par hydrolyse, qui libère l'aldol ou le cétoal. Il s'agit de la réaction de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert, initialement découverte en 1971 [370]. De nombreux paramètres gouvernent les régio-, stéréo- et chimiosélectivité de cette réaction. En outre, de telles aldolisations peuvent conduire à une régiosélectivité de type *énolendo*, le cas très majoritaire, ou *énolexo* dans certains cas, décrits par exemple récemment par Pidathala *et al.* (voir Schéma 33) [371]. Au sein même de l'aldolisation de type *énolexo*, une chimiosélectivité peut apparaître lors de la réaction de la proline avec un cétoaldéhyde. Ainsi, la sélectivité obtenue dans le cas présenté sur le Schéma 33 peut provenir

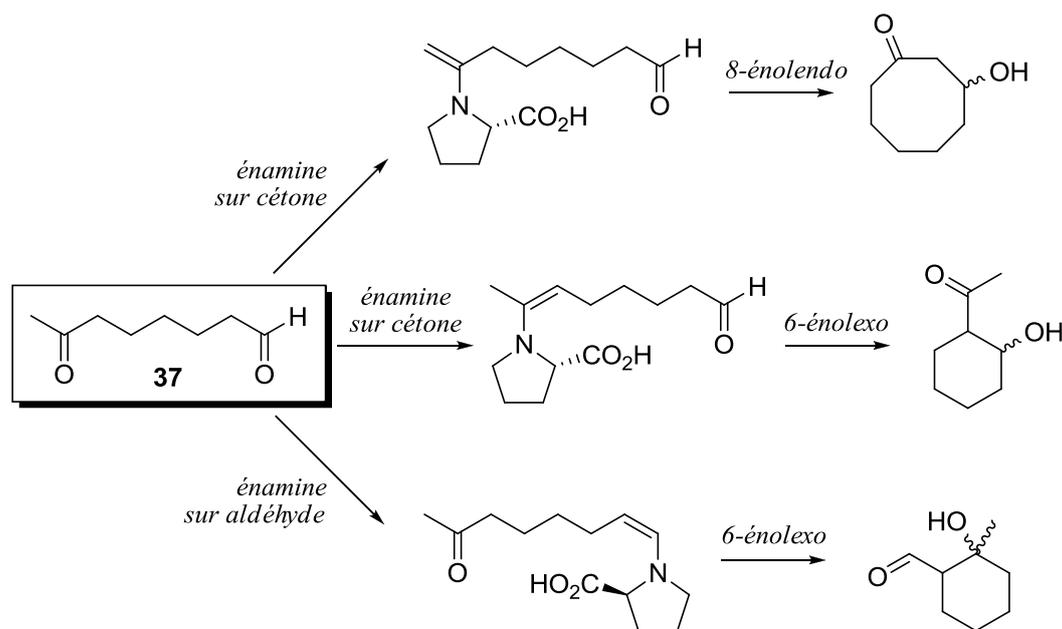


Schéma 33. Trois produits issus de la réaction du cétoaldéhyde **37** avec la proline : après formation de l'énamine sur la cétone et cyclisation de type 8-énolendo ou 6-énolexo ; ou après formation de l'énamine sur l'aldéhyde et cyclisation 6-énolexo.

soit de la formation de l'énamine sur l'aldéhyde suivie d'une attaque sur la cétone (contrôle cinétique), soit au contraire de la formation de l'énamine sur la cétone suivie d'une attaque sur l'aldéhyde (contrôle thermodynamique). Une étude récente de Ghobril *et al.* illustre la compétition entre les deux mécanismes, puisque le 6-oxoheptanal conduit en présence de proline à un mélange quasiment 1/1 des deux produits de type 5-énolexo correspondants [372].

4.4.2 Aldolisation sur l'intermédiaire 37

Tous les essais d'aldolisation avec la L-proline ont été suivis par une réduction des composants du milieu réactionnel en présence de NaBH_4 , afin de générer des espèces plus stables en vue de leur caractérisation. La réaction du composé **37** avec la L-proline dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 24 heures, suivie d'une réduction par NaBH_4 pendant 24 heures, d'un traitement aqueux et d'une extraction par le dichlorométhane, mène à la récupération d'un brut réactionnel. Les travaux de Pelter *et al.* et de Kanai *et al.* nous permettent de disposer de trois spectres RMN ^1H de référence correspondant à différents diastéréoisomères pouvant être obtenus par voie de cyclisation 6-énolexo (la cyclisation 8-énolendo est ici considérée comme improbable, étant donnée la taille du cycle formé) [373,374]. Le spectre RMN ^1H du brut réactionnel nous informe que l'énamine se forme majoritairement sur le carbonyle de l'aldéhyde, et réagit ensuite avec le groupement cétone pour

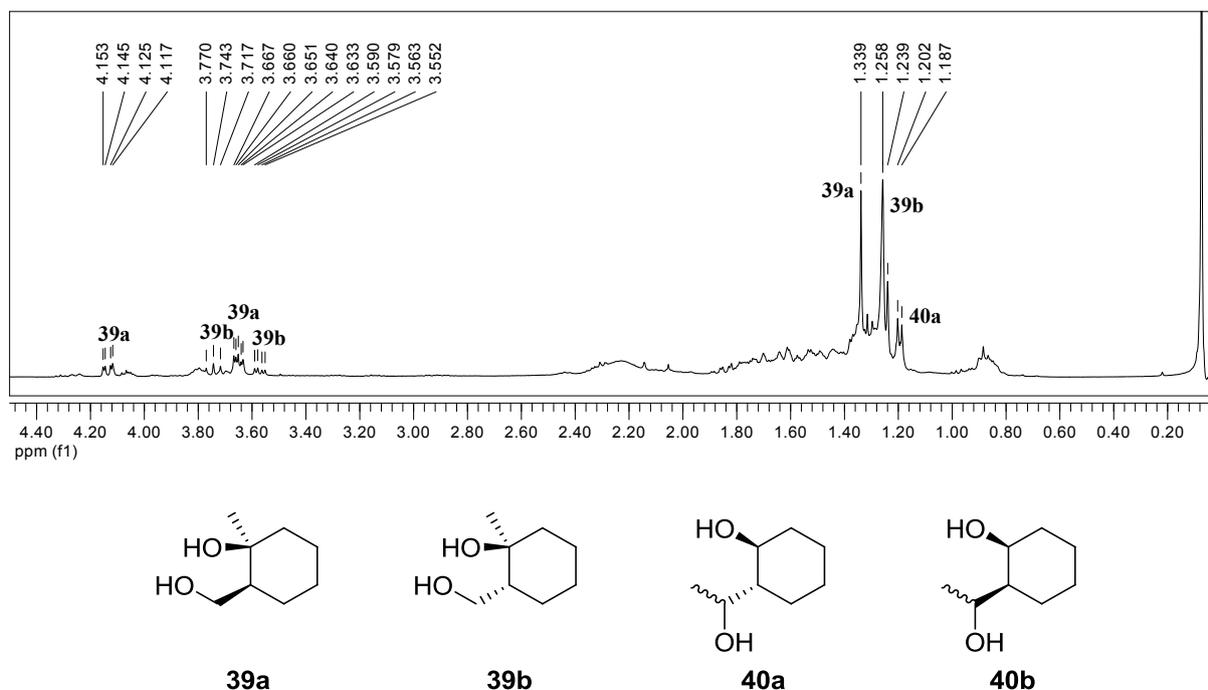


Figure 56. Spectre RMN ^1H de brut réactionnel issu de la réaction entre le composé **37** et la L-proline et d'une réduction par NaBH_4 . Structure des produits **39a**, **39b**, **40a** et **40b**.

former deux diastéréoisomères du composé **39**. Les singlets à 1,34 et 1,26 ppm, ainsi que les doublets dédoublés et les triplets présents entre 3,50 et 4,20 ppm correspondent tout à fait aux signaux attendus pour un mélange de **39a** et **39b** en proportions 1,2/1 (Figure 56).

En particulier, le singlet à 1,34 ppm (méthyle) et les doublets dédoublés à 3,64 et 4,14 ppm sont caractéristiques du diastéréoisomère *cis* **39a**, légèrement majoritaire. Le singlet à 1,26 ppm, le doublet dédoublé à 3,57 ppm ainsi que le triplet visible à 3,74 ppm sont eux caractéristique de l'isomère *trans* **39b**. Il existe également des signes de la présence de produits issus de la formation de l'énamine sur la cétone, et d'une attaque sur l'aldéhyde, mais en quantité plus faible cependant. En particulier, le doublet à 1,19 ppm est caractéristique du groupement méthyle du composé *trans* **40a**. On peut supposer que **40b** est également présent dans le mélange en faible quantité. Cependant, aucun spectre RMN de référence ne permet de l'affirmer avec certitude.

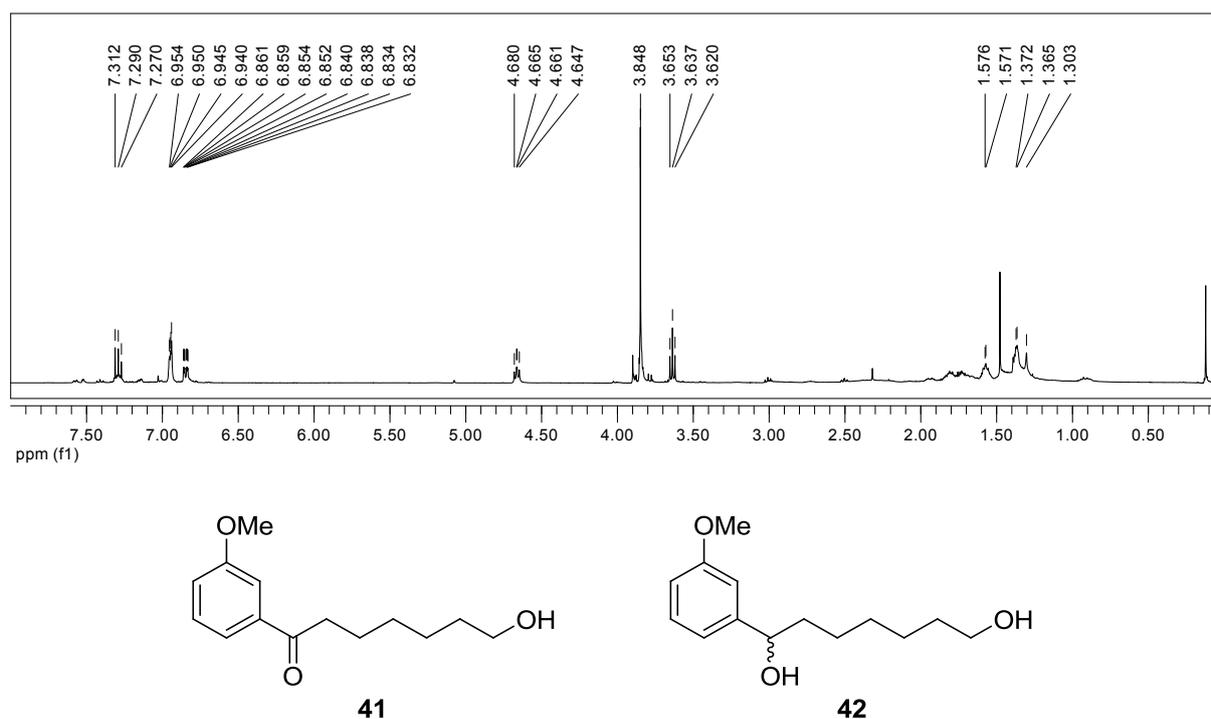


Figure 57. Spectre RMN ^1H de brut réactionnel issu de la réaction entre le composé **33** et la L-proline et d'une réduction par NaBH_4 . Structure des produits **41** et **42**.

4.4.3 Essais d'aldolisation sur l'intermédiaire **33**

La réaction observée avec l'intermédiaire modèle **37** nous a permis d'envisager des essais avec l'intermédiaire **33**. Dans les mêmes conditions, la réaction entre **33** et la L-proline, suivie d'un traitement par NaBH_4 , n'est malheureusement pas concluante. Même après 24

heures de réaction, aucun produit de cyclisation n'est observé sur le brut réactionnel. Ce dernier contient de faibles quantités du composé partiellement réduit **41**, et une grande majorité de composé linéaire **42** entièrement réduit par NaBH₄. La présence d'un groupement méthyle portant des protons magnétiquement non équivalents et apparaissant sous la forme de doublets dédoublés n'est pas détectée sur le spectre RMN (Figure 57). Cela indique que la cétone de l'intermédiaire **33** est sans doute rendue particulièrement peu électrophile par le cycle aromatique électrodonneur adjacent.

4.5 ESSAIS DE CYCLISATION AVEC LA DIMÉTHYLAMINE

4.5.1 Du catalytique au stœchiométrique

Les dérivés de proline sont de loin les plus utilisés pour la formation d'énamines réactives en organocatalyse. Néanmoins, des dérivés acycliques, provenant pour la plupart d'acides aminés chiraux, sont également parfois employés, ce qui laisse entrevoir la possibilité d'avoir recours à des amines plus simples [375]. En effet, étant donnée la structure du tramadol, il serait intéressant d'introduire le groupement diméthylamino lors de la cyclisation organocatalysée. Pour cela, la diméthylamine pourrait être utilisée comme organocatalyseur, mais en quantité stœchiométrique, afin de pouvoir ensuite réduire l'iminium formé *in situ* par un traitement classique avec NaBH₃CN. Formellement, l'aldolisation organocatalysée serait ainsi réalisée en même temps qu'une amination réductrice de l'aldéhyde. Ce type de réaction a déjà été décrit dans une version tandem, avec l'utilisation de trichlorosilane et d'une base de Lewis permettant, à partir d'une énamine générée *in situ*, de réaliser une aldolisation directement suivie d'une réduction de l'iminium formé [376]. L'intermédiaire crucial de type chaise formé lors de cette réaction n'est cependant pas applicable ici, où nous étudions donc des conditions plus classiques.

4.5.2 Essais d'aldolisation sur l'intermédiaire **33**

Lors des essais de cyclisation / réduction de l'intermédiaire **33** en présence de plusieurs équivalents de diméthylamine puis de NaBH₃CN dans le méthanol, le brut réactionnel obtenu comprend une part très importante de produit linéaire dont le spectre RMN reste presque inchangé par rapport au produit de départ. Cependant, l'absence de signal pour le proton de l'aldéhyde et pour les six protons du motif diméthylamino indiquent que l'aldéhyde a réagi mais que l'amination réductrice n'a pas eu lieu. Il peut éventuellement s'agir du com-

posé **41**. Le spectre de masse du mélange révèle un pic important à 264, qui peut correspondre soit au composé linéaire ayant subi l'amination réductrice, soit au tramadol lui-même (dans les deux cas, il s'agit du pic $[M+H]^+$).

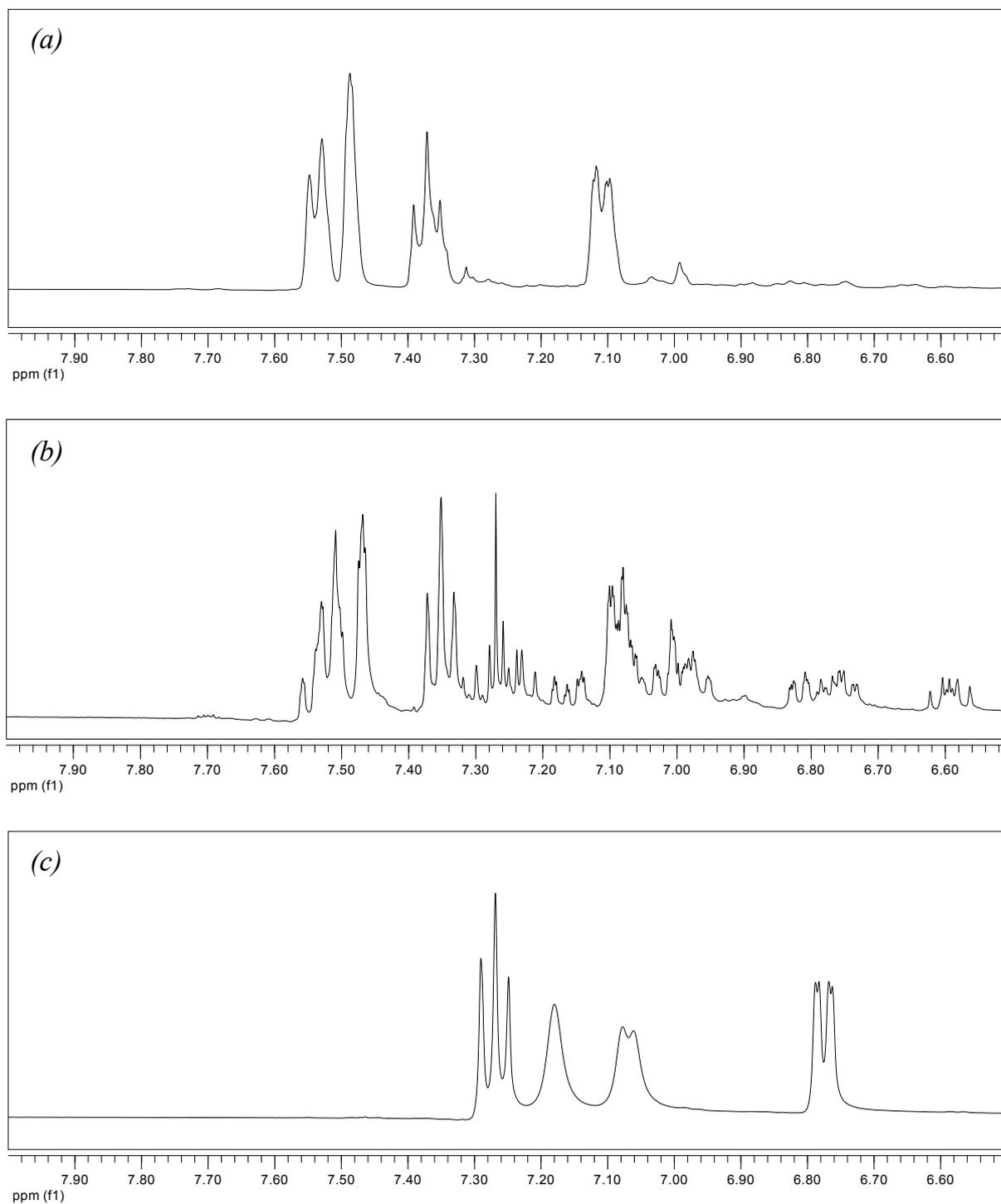


Figure 58. Spectres RMN ^1H (zone des protons aromatiques) : (a) de l'intermédiaire **33** ; (b) d'un brut réactionnel issu de la réaction entre le composé **33** et la diméthylamine, suivie d'une réduction par NaBH_3CN ; (c) du tramadol.

Le spectre RMN du brut réactionnel présenté en Figure 58 montre que le mélange est constitué d'un grand nombre de produits comportant des protons aromatiques. En outre, des singulets situés entre 2,10 et 2,20 ppm peuvent tout à fait correspondre à un motif diméthylamino. Enfin, le spectre révèle la présence de pics entre 2,40 et 2,50 ppm, une zone peu peuplée pour les sous-produits habituellement observés et caractéristique de la structure cyclique du tramadol (un doublet dédoublé correspondant au proton au pied du groupement CH_2NMe_2).

4.5.3 Caractérisation du tramadol au sein du brut réactionnel

Les tests de cyclisation du composé **33** en présence de diméthylamine puis de NaBH_3CN ont mené à la production d'un mélange comprenant un grand nombre de composés proches. Les essais de caractérisation du brut réactionnel par RMN ^1H et ^{13}C ont permis de relever des indices mais n'ont pas conduit à l'identification formelle du tramadol. En outre, s'il est présent dans le milieu, le tramadol s'y trouve en faible quantité, voire à l'état de traces, ce qui compromet sa purification par chromatographie sur colonne de gel de silice. Nous avons donc tenté de le déceler par HPLC. La Figure 59 présente le profil HPLC du brut réactionnel sur colonne C_{18} , avec un éluant isocratique eau / acétonitrile (80 / 20). Le pic à 0,68 minutes correspond au tramadol de référence testé dans les mêmes conditions. L'intégration de ce pic indique qu'il constitue environ 8% du mélange. Le pic à 1,24 minute intègre quant à lui pour 53% du mélange, et correspond à une masse de 262,2. Ce n'est donc pas le composé **41**. D'autres produits minoritaires sont présents, avec des masses de 126,0, 167,0 et 319,3.

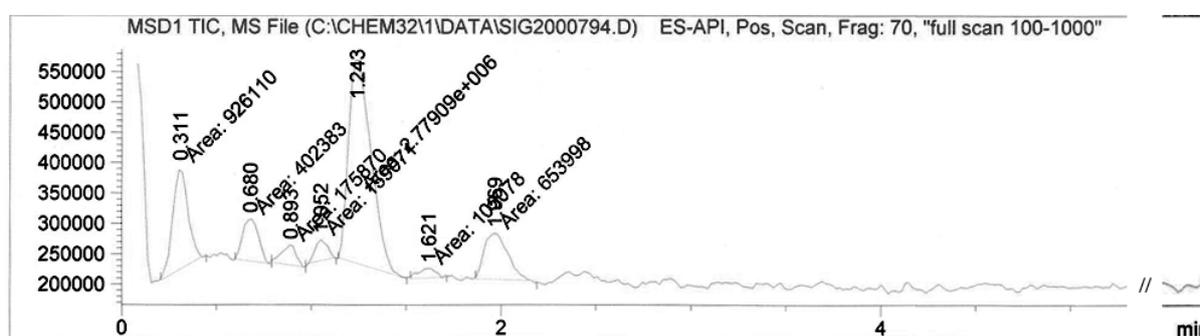


Figure 59. Profil HPLC du brut issu de la réaction entre le composé **33** et la diméthylamine, suivie d'une réduction par NaBH_3CN .

Le spectre de masse du produit sortant à 0,68 minutes est représenté en Figure 60. Il comprend un pic majoritaire à 264,2, ce qui confirme qu'il s'agit bien du tramadol (pic $[\text{M}+\text{H}]^+$). Le produit sortant à 1,96 minute sur le profil HPLC possède la même masse. Il

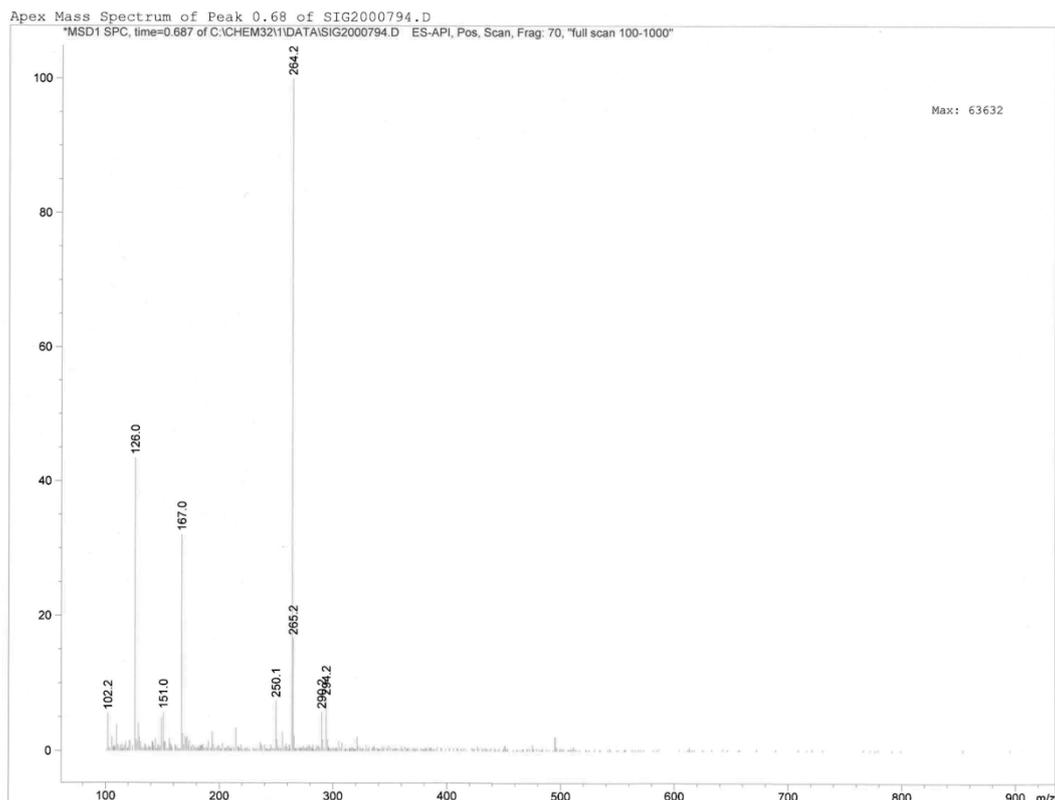


Figure 60. Spectre de masse du composé présentant en HPLC un temps de rétention comparable au tramadol.

s'agit vraisemblablement du composé linéaire ayant subi l'amination réductrice sans cyclisation préalable. Une expérience permettant l'extraction des ions de masse $m/z = 264,2$ du chromatogramme confirme la présence de deux produits majoritaires partageant cette même masse, dont l'un possède le même temps de rétention que le tramadol (0,68 minutes). Le profil HPLC correspondant est présenté en Figure 61. Le brut réactionnel renferme donc bel et bien une petite quantité de tramadol synthétisé selon une méthode biomimétique (environ 8% du mélange). Même si cette réaction doit être améliorée, ces résultats constituent une indication sérieuse et encourageante de la manière dont le tramadol peut être biosynthétisé *in vivo*.

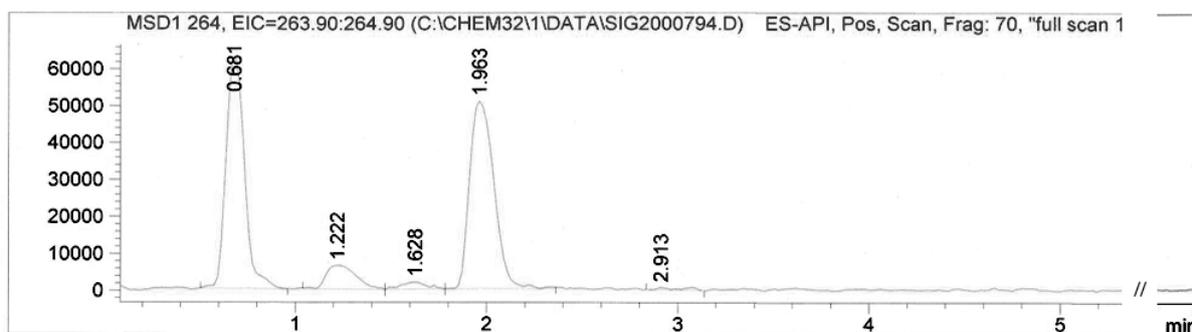


Figure 61. Profil HPLC, avec extraction des ions de masse $m/z = 264$, du brut issu de la réaction entre le composé **33** et la diméthylamine, suivie d'une réduction par NaBH_3CN .

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de la découverte de l'existence de tramadol naturel dans une plante africaine. Ils ont permis une séparation efficace des énantiomères du tramadol, qui ont pu servir de références pour l'attribution des signaux du tramadol extrait de *Nauclea latifolia*, et pour leur quantification respective. Ces deux énantiomères sont actuellement en cours d'évaluation sur des cibles biologiques, liées notamment à l'épilepsie. Afin de poursuivre ce projet, la synthèse d'analogues du tramadol peut être envisagée, afin d'améliorer certaines de ses activités biologiques.

En outre, une synthèse biomimétique du tramadol a été proposée. Se basant sur des intermédiaires similaires à ceux formés lors de la biosynthèse des alcaloïdes quinolizidiniques, l'étape clé a conduit à la formation de tramadol à partir d'un dérivé linéaire. Néanmoins, ce tramadol, présent en faibles quantités, a été identifié par HPLC et n'a pas pu être purifié par colonne de chromatographie. Ce dernier point constitue donc une perspective majeure à ce travail.

Partie 6.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Malgré les avancées majeures réalisées en médecine aux cours du XX^e siècle, de nombreuses pathologies restent aujourd'hui encore difficilement traitées. L'hépatite C est un exemple flagrant : si la découverte récente de deux médicaments inhibiteurs de la protéase permet d'espérer une meilleure efficacité à l'avenir, les taux de réussite au traitement restent bas, aux alentours de 50%. Nous l'avons vu, l'administration d'un inhibiteur de la polymérase permettrait d'augmenter sensiblement les chances de guérisons.

De même, si le ciblage de la tyrosinase dans le cadre d'une thérapie est actuellement hypothétique, l'exploitation d'inhibiteurs de cette enzyme pourrait un jour permettre de freiner l'avancée d'autres pathologies difficilement traitées aujourd'hui, comme le cancer de la peau ou la maladie de Parkinson. Depuis leur découverte au sein de différentes espèces végétales, les aurones ont montré des activités biologiques très prometteuses, ainsi qu'un squelette versatile, véritable « couteau suisse » thérapeutique. Le potentiel important de cette classe de molécules dans le cadre de l'inhibition des cibles mentionnées précédemment, mis au jour avec cette thèse, contribue à renforcer le spectre de ses applications thérapeutiques.

Au cours de ce travail, nous avons en effet identifié les premiers éléments structuraux déterminants pour l'activité anti-NS5B des aurones, et émis une hypothèse d'interaction avec l'enzyme basée sur les résultats de mutagenèse dirigée et de modélisation moléculaire. Parmi les composés les plus actifs, des dérivés naturels sont présents (comme l'auréusidine, la 4,6,2',4'-tétrahydroxyaurone ou la 4,6,4'-trihydroxyaurone) aux côtés de dérivés purement synthétiques (comme la 4'-cyclohexyl-4,6-dihydroxyaurone ou la 4'-butyl-4,6-dihydroxyaurone). Le composé présentant la meilleure activité est un dérivé B-hétérocyclique de type *N-n*-butylindole, avec un IC₅₀ de 2,2 µM. Les études d'interactions ont mené à l'identification du site d'interaction probable. Il s'agit du site « Thumb I », où se fixent également des dérivés d'indole et de benzimidazole. Les premiers résultats sur cellules infectées semblent en outre prometteurs, et ouvrent la voie à de nombreuses perspectives. Parmi celles-ci, l'évaluation des paramètres pharmacocinétiques des composés, ainsi que la synthèse de nouveaux analogues de manière rationnelle, en utilisant des outils informatiques comme le docking moléculaire ou le QSAR 3D, constituent des axes de recherche importants.

Nous avons également découvert durant ce projet une multiplicité de comportements intéressante des aurones face à la tyrosinase. En effet, en modulant les positions hydroxylées sur le cycle B des composés, il est possible d'obtenir des substrats alternatifs coopératifs, des activateurs hyperboliques, et des inhibiteurs mixtes. À cet égard, la synthèse des dérivés hybrides portant un motif HOPNO a contribué à améliorer nettement le pouvoir inhibiteur des aurones. L'aurone **29c**, l'inhibiteur le plus actif, permet ainsi d'atteindre une valeur d'IC₅₀ de 340 nM, sans oxydation du composé. La prise en compte des différents comportements des aurones face à l'enzyme, il a été possible de dresser un modèle cohérent comprenant un site allostérique influençant le site actif. Des études d'interactions *in silico*, ainsi qu'avec un complexe modèle, ont été réalisées, sans mener toutefois à une preuve formelle. La co-cristallisation d'un adduit aurone – complexe modèle reste donc une perspective majeure à ce travail. D'autres analogues restent à synthétiser afin de compléter l'étude des positions hydroxylées des aurones. En outre, l'évaluation des aurones sur d'autres types de tyrosinases, notamment bactérienne et humaine, peut permettre de déterminer leur potentiel thérapeutique sur l'Homme.

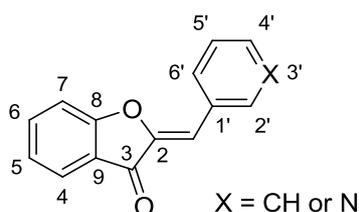
Si le premier volet de cette thèse a concerné la découverte d'activités biologiques associées à une famille de molécules issue du règne végétal, les aurones, le second volet a suivi un raisonnement inverse : il a mis en lumière l'existence au sein du règne végétal d'un composé synthétique bioactif. En effet, le tramadol, un produit très connu issu d'un laboratoire de synthèse allemand, est présent sur le marché du médicament depuis la fin des années 1970. Au cours de ce travail, nous avons démontré l'existence de tramadol au sein d'une espèce végétale, *Nauclea latifolia*. Dans le cadre de cette découverte, nous avons réalisé la résolution des deux énantiomères du tramadol. Ceci a été réalisé dans le double but de les utiliser comme références pour comparer leurs propriétés avec celles des produits extraits, et de les tester sur des cibles biologiques impliquées dans l'épilepsie, afin de déterminer l'énantiomère actif. En outre, nous avons développé une synthèse biomimétique du tramadol, dont la dernière étape s'appuie sur un intermédiaire proche des iminiums impliqués dans la biosynthèse des alcaloïdes quinolizidiniques. Nous avons ainsi réussi à former environ 8% de tramadol dans le milieu réactionnel, que nous avons caractérisé. Néanmoins nous ne sommes pas parvenus à isoler l'alcaloïde, ce qui reste donc une perspective à ce travail. Des analogues du tramadol pourraient également être préparés afin de comparer leurs activités antiépileptiques.

Partie 7.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Chapitre 1. Material and methods

Thin-layer chromatography (TLC) used Merck silica gel 60 F₂₅₄ aluminum sheets with a thickness of 0.25 mm. Flash chromatography used Merck silica gel 60, 200 – 400 mesh. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Brüker AC-400 instrument (400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C). Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to Me₄Si as an internal standard, or to the solvent in which the spectrum was recorded. Following standard abbreviations were used to interpret NMR spectra: s, singlet; br s, broad singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; ddd, doublet of doublets of doublets; t, triplet; dt, doublet of triplets; q, quartet; p, pentet; sext., sextet; sept., septet. Interpretation of ¹H and ¹³C NMR spectra often needed the support of ¹³C DEPT experiments and/or 2D COSY and HMQC records. Otherwise stated, protons and carbons of aurones and derivatives were numbered as below when associated with ¹H and ¹³C NMR signals.



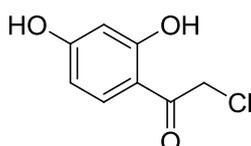
Electrospray ionization ESI mass spectra were acquired by the analytical service of Département de Chimie Moléculaire, Joseph Fourier University, Grenoble, on an Esquire 300 Plus Brüker Daltonis instrument with a nanospray inlet. Combustion analyses were performed at the analytical service of Département de Chimie Moléculaire, Joseph Fourier University, Grenoble. Chemicals and reagents were purchased either from Aldrich, Acros or Fluka companies and used as obtained. Optical activities were determined on a Perkin-Elmer 341 polarimeter with a yellow sodium D line (589 nm).

The HPLC system consisted of a Agilent 1290 Infinity system with a binary pump, degasser, autosampler, thermostatted column compartment and a Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector (Agilent Technologies). The entire system was controlled by ChemStation (Agilent Technologies, Rev B.04.02 SP1). The columns were a Chiralpak[®] AD-H (Daicel Chemical industries), 4.6 mm × 250 mm, 5 μm, and a Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (Agilent Technologies), 2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm.

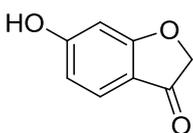
Chapitre 2. Synthesis protocols

2.1 SYNTHESIS OF BENZOFURAN-3(2H)-ONE DERIVATIVES

2.1.1 Synthesis of 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one



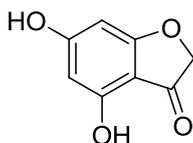
2-Chloro-2',4'-dihydroxyacetophenone (1a). To a solution of resorcinol (4.36 g, 39.6 mmol) in diethyl ether (150 mL) at 0 °C were added chloroacetonitrile (2.5 mL, 39.6 mmol) and dried zinc chloride (0.54 g, 3.96 mmol). The mixture was allowed to react with gaseous hydrochloric acid at 0 °C for 1 hour. The resulting suspension was stirred at 0 °C for 1.5 hour, and was allowed to react again with gaseous hydrochloric acid for 30 minutes. The precipitate was filtered, washed with diethyl ether, dried, and dissolved in aqueous hydrochloric acid (100 mL). The solution was refluxed for 1.5 hour. After cooling, the crystals were filtered, washed with cold water and dried to afford **1a** (1.41 g, 19%) as yellow crystals, which were analytically pure and used without further purification. C₈H₇ClO₃. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.63 (s, 1H, OH), 10.65 (s, 1H, OH), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz, H_{6'}), 6.36 (dd, 1H, *J*₁ = 8.9 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, H_{5'}), 6.29 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H_{3'}), 4.99 (s, 1H, CH₂).



6-Hydroxybenzofuran-3(2H)-one (2a). To a solution of **1a** (1.28 g, 6.88 mmol) in methanol (25 mL) was added sodium methoxide (1.36 g, 25.2 mmol), and the solution was refluxed for

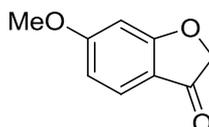
1.5 hour. After cooling at 0 °C, crystals were filtered, washed with water and dried to afford **2a** (0.82 g, 80%) as yellow crystals, which were analytically pure and used without further purification. C₈H₆O₃. **m.p.** 248-250 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.91 (s, 1H, OH), 7.46 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, H₄), 6.58 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz, H₅), 6.50 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 4.70 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 196.9 (C₃), 175.6 (C₈), 166.7 (C₆), 125.0 (C₄), 112.9 (C₉), 111.7 (C₅), 98.3 (C₇), 75.2 (CH₂).

2.1.2 Synthesis of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one



4,6-Dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (2b). To a solution of phloroglucinol (15.0 g, 119 mmol) in diethyl ether (250 mL) at 0 °C were added chloroacetonitrile (7.5 mL, 119 mmol) and dried zinc chloride (1.62 g, 11.9 mmol). The mixture was allowed to react with gaseous hydrochloric acid at 0 °C for 1 hour. The resulting suspension was stirred at 0 °C for 1.5 hour, and was allowed to react again with gaseous hydrochloric acid for 30 minutes. The precipitate was filtered, washed with diethyl ether, dried, and suspended in water (200 mL). The solution was refluxed for 5 hours. After cooling, the crystals were filtered, washed with cold water and dried to afford **2b** (16.6 g, 84%) as orange crystals, which were analytically pure and used without further purification. C₈H₆O₄. **m.p.** 257-259 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.61 (s, 1H, OH), 10.58 (s, 1H, OH), 5.91 (s, 2H, H_{5,7}), 4.55 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 193.9 (C₃), 175.6, 167.5 (C₄, C₆), 157.4 (C₈), 102.6 (C₉), 96.1 (C₅), 90.1 (C₇), 74.8 (CH₂).

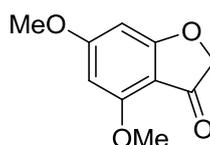
2.1.3 Synthesis of 6-methoxybenzofuran-3(2H)-one



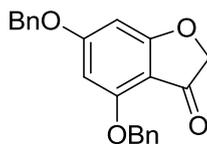
6-Methoxybenzofuran-3(2H)-one. To a solution of 1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)ethanone (3.00 g, 18.1 mmol) in chloroform (20 mL) was added a solution of copper(II) bromide (6.05 g, 27.1 mmol) in ethyl acetate (30 mL) and the mixture was refluxed for 48 hours. After cooling, the mixture was filtered on celite, and the filtrate was washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated

under reduced pressure to afford the crude brominated intermediate used without purification. To a solution of the crude intermediate in DMF (150 mL) was added dry potassium carbonate (3.00 g, 21.6 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred at 0 °C for 3 hours. Water (200 mL) was added and the resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a pale yellow solid, which was recrystallized from methanol to afford the title compound (1.08 g, 36%) as a pure pale yellow solid. C₉H₈O₃. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H₄), 6.57 (d, *J* = 8.5 Hz, H₅), 6.47 (s, 1H, H₇), 4.55 (s, 2H, CH₂), 3.81 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 197.5 (C₃), 176.5 (C₈), 168.2 (C₆), 125.0 (C₄), 114.3 (C₉), 111.7 (C₅), 96.3 (C₇), 75.5 (CH₂), 55.9 (OCH₃).

2.1.4 Synthesis of 4,6-dimethoxy and 4,6-dibenzyloxybenzofuran-3(2*H*)-one

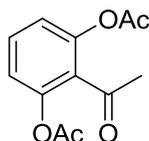


4,6-Dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one (7a). To a solution of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (4.00 g, 24.10 mmol, **2b**) in dimethoxyethane (50 mL) were added potassium carbonate (7.30 g, 53.01 mmol) and dimethyl sulfate (5.02 mL, 53.01 mmol), and the mixture was refluxed for 3 hours. After cooling, solvents were removed under reduced pressure, water (40 mL) was added, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/cyclohexane 60/40) to afford **7a** (3.13 g, 67%) as an orange solid. An analytical sample was recrystallized from methanol to afford pure orange crystals. C₁₀H₁₀O₄. **m.p.** 135-137 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.16 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.01 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₅), 4.60 (s, 2H, CH₂), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 195.0 (C₃), 177.1 (C₆), 169.8 (C₄), 158.8 (C₈), 104.8 (C₉), 93.0 (C₅), 88.9 (C₇), 75.5 (CH₂), 56.0 (OCH₃), 56.0 (OCH₃).



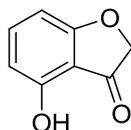
4,6-Dibenzyloxybenzofuran-3(2H)-one (7b). To a solution of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (184 mg, 1.11 mmol, **2b**) in a mixture of 1,2-dimethoxyethane (6 mL) and dimethylformamide (1 mL) were added dry potassium carbonate (338 mg, 2.45 mmol) and benzyl bromide (279 μ L, 2.33 mmol), and the mixture was refluxed at room temperature for 96 hours. Solvents were then removed under reduced pressure, water (10 mL) was added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH_2Cl_2) to afford **7b** (119 g, 31%) as a yellow solid. $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_4$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.20-7.45 (m, 10H, OCH_2Ph), 6.18 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_7), 6.08 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_5), 5.16 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.99 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.53 (s, 2H, CH_2). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 194.7 (C_3), 177.0 (C_6), 168.5 (C_4), 157.7 (C_8), 136.0 (OCH_2Ph), 135.5 (OCH_2Ph), 128.8 (OCH_2Ph), 128.7 (OCH_2Ph), 128.5 (OCH_2Ph), 128.0 (OCH_2Ph), 127.7 (OCH_2Ph), 126.8 (OCH_2Ph), 105.4 (C_9), 95.1 (C_5), 90.3 (C_7), 75.6 (CH_2), 70.7 (OCH_2Ph), 70.4 (OCH_2Ph).

2.1.5 Synthesis of 4-hydroxyacetophenone-3(2H)-one



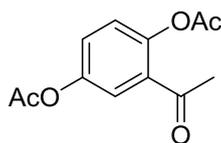
2',6'-Diacetoxyacetophenone (3a). A solution of 2',6'-dihydroxyacetophenone (10.0 g, 65.8 mmol) in acetic anhydride (100 mL) was refluxed overnight. Iced water was then added and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. The mixture was then extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed three times with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **3a** (14.5 g, 94%) as a brown oil, which was analytically pure and used without further purification. An analytical sample was crystallized in ethanol to afford white crystals. $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_4), 7.06 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, $\text{H}_{3,5}$), 2.47 (s, 3H, PhCOCH_3), 2.28 (s, 6H, PhOCOCH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100

MHz, CDCl₃) δ 198.6 (PhCOCH₃), 168.9 (PhOCOCH₃), 148.0 (C_{2',6'}), 131.0 (C_{1',4'}), 120.6 (C_{3',5'}), 31.4 (PhCOCH₃), 21.2 (PhOCOCH₃).



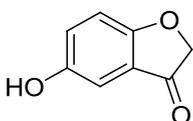
4-Hydroxybenzofuran-3(2H)-one (5a). To a solution of 2',6'-diacetoxyacetophenone (8.94 g, 42.0 mmol, **3a**) in anhydrous THF (80 mL) was added trimethylphenylammonium tribromide (15.7 g, 42.0 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 6 hours. Water (150 mL) was then added and the mixture was extracted three times with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the crude intermediate 2',6'-diacetoxy-2-bromoacetophenone (**4a**) as a brown oil used without purification. To a solution of crude 2',6'-diacetoxy-2-bromoacetophenone in methanol (100 mL) was added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 7 mL), and the solution was refluxed for 3 hours. After cooling, solvents were removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water (150 mL) and an aqueous solution of hydrochloric acid (1 N) was added to adjust the pH to 2 – 3. The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford an orange oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford **5a** (2.32 g, 37% over two steps) as a pure orange solid. C₈H₆BrO₃. **m.p.** 119-121 °C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (br s, 1H, OH), 7.49 (t, 1H, J = 8.2 Hz, H₆), 6.62 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₇), 6.49 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₅), 4.65 (s, 2H, CH₂). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 201.2 (C₃), 173.2 (C₄), 156.5 (C₈), 140.8 (C₆), 109.5 (C₉), 108.2 (C₅), 104.4 (C₇), 74.7 (CH₂).

2.1.6 Synthesis of 5-hydroxybenzofuran-3(2H)-one



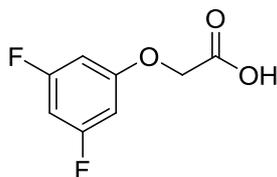
2',5'-Diacetoxyacetophenone (3b). A solution of 2',5'-dihydroxyacetophenone (10.0 g, 65.8 mmol) in acetic anhydride (100 mL) was refluxed overnight. Iced water was then added and the solution was stirred at room temperature for 1 hour. The mixture was then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed three times with water, washed with

brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a brown oil. After crystallization, the solid is filtered, washed with ethanol and dried to afford **3b** (8.96 g, 58%) as a brown oil, which was analytically pure and used without further purification. An analytical sample was crystallized in ethanol to afford white crystals. $C_8H_8O_3$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, H_6), 7.27 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, H_4), 7.12 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_3), 2.53 (s, 3H, $PhCOCH_3$), 2.33 (s, 3H, $PhOCOCH_3$), 2.31 (s, 3H, $PhOCOCH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 196.3 ($PhCOCH_3$), 169.2 ($PhOCOCH_3$), 169.0 ($PhOCOCH_3$), 147.9 (C_2), 146.3 (C_5), 131.3 (C_1), 126.4 (C_4), 124.7 (C_3), 123.1 (C_6), 29.3 ($PhCOCH_3$), 21.0 ($PhOCOCH_3$), 20.9 ($PhOCOCH_3$).

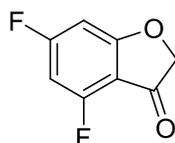


5-Hydroxybenzofuran-3(2H)-one (5b). To a solution of 2',5'-diacetoxyacetophenone (3.47 g, 14.7 mmol, **3b**) in anhydrous THF (15 mL) was added trimethylphenylammonium tribromide (6.53 g, 17.6 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 6 hours. Water (40 mL) was then added and the mixture was extracted three times with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the crude intermediate 2',5'-diacetoxy-2-bromoacetophenone (**4b**) as a brown oil used without purification. To a solution of crude 2',5'-diacetoxy-2-bromoacetophenone in methanol (30 mL) was added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 2 mL), and the solution was refluxed for 3 hours. After cooling, solvents were removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water (50 mL) and an aqueous solution of hydrochloric acid (1 N) was added to adjust the pH to 2 – 3. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford an orange oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/cyclohexane 34/66) to afford **5b** (366 mg, 18% over two steps) as a pure orange solid. $C_8H_6BrO_3$. **m.p.** 152-154 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 9.58 (s, 1H, OH), 7.18 (dd, 1H, $J_1 = 8.9$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, H_6), 7.12 (d, 1H, $J = 8.9$ Hz, H_7), 6.86 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz, H_4), 4.73 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 199.9 (C_3), 167.1 (C_8), 152.3 (C_5), 126.7 (C_6), 121.0 (C_9), 114.1 (C_7), 106.3 (C_4), 75.1 (CH_2).

2.1.7 Synthesis of 4,6-difluorobenzofuran-3(2H)-one

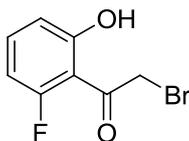


2-(3,5-Difluorophenoxy)acetic acid (8). To a solution of 3,5-difluorophenol (2.00 g, 15.4 mmol) in water (15 mL) were added chloroacetic acid (1.75 g, 18.5 mmol) and an aqueous solution of sodium hydroxide (50%, 4 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 hour, then refluxed overnight. An aqueous solution of hydrochloric acid was added to adjust the pH to 2 – 3. The precipitate was filtered, washed with water and dried to afford **8** (1.50 g, 52%) as a pure white solid. $C_8H_6F_2O_3$. 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.51-6.61 (m, 3H, $H_{2,4}$), 4.69 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 170.5 (CO_2H), 163.8 (dd, $J_1 = 245.0$ Hz, $J_2 = 15.8$ Hz, $C_{3,5}$), 160.4 (C_1), 98.4 (dd, $J_1 = 20.8$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz, $C_{2,6}$), 96.3 (t, $J = 26.4$ Hz, C_4) 64.9 (CH_2).

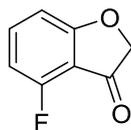


4,6-Difluorobenzofuran-3(2H)-one (9). To a solution of 2-(3,5-difluorophenoxy)acetic acid (1.00 g, 5.32 mmol, **8**) in toluene (10 mL) was added thionyl chloride (1.92 mL, 26.3 mmol) and the mixture was refluxed for 2 hours. After cooling, solvents were removed under reduced pressure then the residue was diluted into CH_2Cl_2 (10 mL) and aluminium chloride (709 mg, 5.32 mmol) was added. The mixture was refluxed overnight. After cooling, iced water was added, and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH_2Cl_2) to afford **9** (186 mg, 21%) as a pure white solid. $C_8H_4F_2O_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.65 (m, 1H, H_7), 6.49 (m, 1H, H_5), 4.69 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 193.9 (C_3), 175.2 (C_8), 170.0 (dd, $J_1 = 259.0$ Hz, $J_2 = 13.2$ Hz, C_6), 159.0 (dd, $J_1 = 266.0$ Hz, $J_2 = 16.8$ Hz, C_4), 107.6 (C_9), 98.7 (dd, $J_1 = 27.7$ Hz, $J_2 = 22.9$ Hz, C_5), 97.7 (dd, $J_1 = 26.3$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, C_7), 76.0 (CH_2).

2.1.8 Synthesis of 4-fluorobenzofuran-3(2H)-one

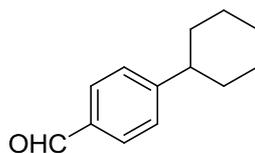


2-Bromo-1-(2-fluoro-6-hydroxyphenyl)ethanone (10). To a solution of 1-(2-fluoro-6-hydroxyphenyl)ethanone (500 mg, 3.25 mmol) in chloroform (2.5 mL) was added a solution of copper(II) bromide (1.09 g, 4.88 mmol) in ethyl acetate (2.5 mL) and the mixture was refluxed overnight. After cooling, the mixture was filtered on celite, and the filtrate was washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **10** (460 mg, 61%) as a pale yellow solid, which was used without purification. $C_8H_6BrFO_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 12.17 (s, 1H, OH), 7.46 (td, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, H_4), 6.85 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, H_5), 6.67 (ddd, 1H, $J_1 = 11.8$ Hz, $J_2 = 8.3$ Hz, $J_3 = 0.8$ Hz, H_3), 4.59 (d, 2H, $J = 3.6$ Hz, CH_2).

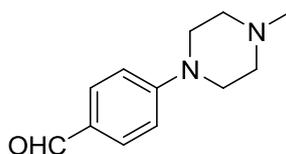


4-Fluorobenzofuran-3(2H)-one (11). To a solution of 2-bromo-1-(2-fluoro-6-hydroxyphenyl)ethanone (179 mg, 768 μ mol, **10**) in DMF (8 mL) was added dry potassium carbonate (127 mg, 922 μ mol) at 0 °C and the mixture was stirred at 0 °C for 1 hour. Water (8 mL) was added and the resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a pale yellow solid, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH_2Cl_2) to afford **11** (100 mg, 86%) as a pure pale yellow solid. $C_8H_5FO_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53 (td, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, H_6), 6.87 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 0.3$ Hz, H_7), 6.65 (td, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 0.3$ Hz, H_5), 4.59 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 195.8 (C_3), 174.4 (d, $J = 5.7$ Hz, C_8), 158.1 (d, $J = 264.1$ Hz, C_4), 139.5 (d, $J = 9.7$ Hz, C_6), 110.5 (d, $J = 18.7$ Hz, C_9), 109.6 (d, $J = 4.2$ Hz, C_7), 108.4 (d, $J = 18.8$ Hz, C_5), 75.0 (CH_2).

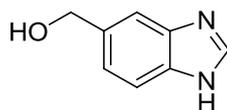
2.2 SYNTHESIS OF BENZALDEHYDE DERIVATIVES



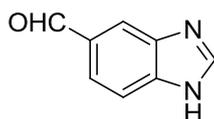
4-Cyclohexylbenzaldehyde (13). To a solution of cyclohexylbenzene (5.00 g, 31.3 mmol) in trifluoroacetic acid (15 mL) was added hexamethylenetetramine (4.38 g, 31.3 mmol) and the solution was refluxed for 72 hours. After cooling, iced water (100 mL) was added and the mixture was extracted with dichloromethane and washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the crude compound which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/cyclohexane 1/1) to afford **13** as a colorless oil (619 mg, 11%). C₁₃H₁₆O. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.95 (s, 1H, CHO), 7.79 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H_{2,6}), 7.35 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, H_{3,5}), 2.57 (m, 1H, *c*-Hex), 1.86 (m, 4H, *c*-Hex), 1.76 (m, 1H, *c*-Hex), 1.41 (m, 4H, *c*-Hex), 1.27 (m, 1H, *c*-Hex).



4-(*N*-methylpiperazin-1-yl)benzaldehyde (14). To a solution of 4-fluorobenzaldehyde (432 μL, 4.03 mmol) in DMF (8 mL) were added *N*-methylpiperazine (673 μL, 6.04 mmol) and potassium carbonate (669 mg, 4.84 mmol), and the solution was refluxed for 5 hours. After cooling, water (100 mL) was added and the mixture was extracted with ethyl acetate and washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the crude compound which was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **14** as a yellow solid (377 mg, 46%). C₁₂H₁₆N₂O. **m.p.** 59-61 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.78 (s, 1H, CHO), 7.75 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, H_{2,6}), 6.92 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz, H_{3,5}), 3.41 (d, 4H, *J* = 3.8 Hz, *Ppz*CH₃), 2.55 (d, 4H, *J* = 3.8 Hz, *Ppz*CH₃), 2.36 (s, 3H, *Ppz*CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 190.6 (CHO), 155.2 (C₄), 132.0 (C_{2,6}), 127.3 (C₁), 113.7 (C_{3,5}), 54.8 (*Ppz*CH₃), 47.2 (*Ppz*CH₃), 46.3 (*Ppz*CH₃).



(1*H*-Benzo[*d*]imidazol-5-yl)methanol (15). To a solution of 1*H*-benzo[*d*]imidazole-5-carboxylic acid (1.00 g, 6.16 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added a 1 M solution of LiAlH₄ in THF (20.0 mL, 20.0 mmol) at 0 °C, and the solution was stirred at room temperature for 24 hours. The mixture was filtered over celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the crude compound which was purified by column chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/methanol 9/1) to afford **15** as a colorless oil (500 mg, 55%). C₈H₈N₂O. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.05 (s, 1H, H₂), 7.57 (s, 1H, H₄), 7.50 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₇), 7.19 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 4.66 (s, 2H, CH₂OH). ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 142.9 (C₂), 138.8, 138.4 (C₈, C₉), 137.7 (C₅), 123.6 (C₆), 116.3 (C₇), 114.7 (C₄), 65.7 (CH₂OH).



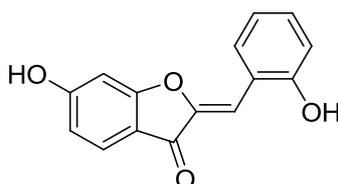
1*H*-Benzo[*d*]imidazole-5-carboxaldehyde (16). To a solution of (1*H*-benzo[*d*]imidazol-5-yl)methanol **15** (500 mg, 3.33 mmol) in a mixture of CH₂Cl₂ (20 mL) and methanol (1.5 mL) was added manganese dioxide (3.40 g, 39.1 mmol), and the solution was stirred at room temperature for 2 hours. The mixture was filtered over celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the crude compound which was purified by column chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/methanol 9/1) to afford **16** as a white solid (433 mg, 89%). C₈H₆N₂O. **m.p.** 157-159 °C. ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 10.02 (s, 1H, CHO), 8.36 (s, 1H, H₂), 8.17 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H₄), 7.83 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, H₆), 7.72 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇). ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 194.1 (CHO), 145.9 (C₂), 143.0, 139.8 (C₈, C₉), 133.6 (C₅), 124.8 (C₆), 120.6 (C₄), 116.5 (C₇).

2.3 SYNTHESIS OF AURONE DERIVATIVES

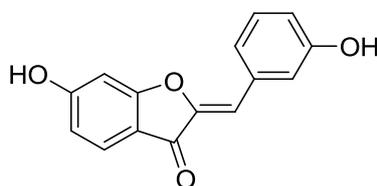
2.3.1 Synthesis of derivatives *via* basic-mediated aldolic condensation (in methanol, 65 °C)

General procedure. To a solution of 4-hydroxy, 5-hydroxy or 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one in methanol (15 mL/mmol) were added an aqueous solution of potassium hydroxide

(50%, 1.5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1.5 equiv.). The solution was refluxed until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 18 hours). After cooling, methanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water (50 mL/mmol) and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust the pH to 2 – 3. The mixture was then extracted with ethyl acetate or CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(*2H*)-one derivative.

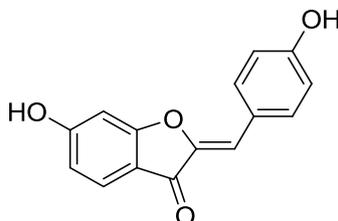


(*Z*)-2-(2-Hydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (17a). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one and 2-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **17a** as pure yellow crystals (25%). C₁₅H₁₀O₄. m.p. > 250 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.21 (br s, 1H, OH), 10.35 (br s, 1H, OH), 8.09 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, H₆), 7.62 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.26 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz, H_{4'}), 7.09 (s, 1H, -CH=), 6.94 (m, 2H, H_{3,5'}), 6.79 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, H₇), 6.72 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.4 (C₃), 167.7 (C₆), 166.3 (C₈), 157.0 (C₂), 146.8 (C₂), 131.3 (C_{6'}), 130.9 (C_{4'}), 125.8 (C₄), 119.6 (-CH=), 118.8 (C_{1'}), 115.6 (C_{5'}), 112.9 (C_{7,9}), 104.6 (C_{3'}), 110.7 (-CH=), 98.5 (C₅). **MS (ESI)** *m/z* 255 (M+H)⁺, 277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄·0.25H₂O: C, 69.63, H, 4.06. Found: C, 69.81, H, 4.05.

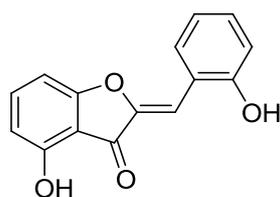


(*Z*)-2-(3-Hydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one (17b). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 6-hydroxybenzofuran-3(*2H*)-one and 3-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **17b** as pure yellow crystals (86%). C₁₅H₁₀O₄. m.p. 272-274 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.27 (br s, 1H, OH), 9.69 (br s, 1H, OH), 7.63 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.36 (m, 2H, H_{2,6'}), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, H_{5'}), 6.84 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H_{4'}), 6.78 (s, 1H,

H₇), 6.72 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H₅), 6.69 (s, 1H, -CH=). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.5 (C₃), 167.9 (C₆), 166.6 (C₈), 157.6 (C_{3'}), 147.3 (C₂), 133.1 (C_{1'}), 129.9 (C_{5'}), 126.1 (C₄), 122.4 (C_{2'}), 117.3, 117.1 (C_{4'}, C_{6'}), 113.1 (C₉), 112.8 (C₇), 110.7 (-CH=), 98.5 (C₅). **MS (ESI)** m/z 255 (M+H)⁺, 277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄·0.25H₂O: C, 69.63, H, 4.06. Found: C, 69.47, H, 3.94.

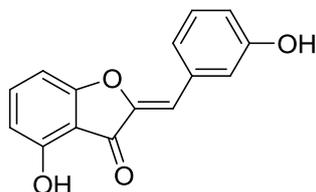


(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (17c). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **17c** as pure bright yellow crystals (77%). C₁₅H₁₀O₄. m.p. 294-296 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.14 (br s, 1H, OH), 10.14 (br s, 1H, OH), 7.82 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{2',6'}), 7.60 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H₄), 6.88 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{3',5'}), 6.78 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H₇), 6.73 (s, 1H, -CH=), 6.70 (dd, 1H, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.2 (C₃), 167.4 (C₆), 166.0 (C₈), 159.2 (C_{4'}), 145.6 (C₂), 133.2 (C_{2',6'}), 125.6 (C₄), 123.0 (C_{1'}), 116.0 (C_{3',5'}), 113.1 (C₉), 112.8 (C₇), 111.3 (-CH=), 98.4 (C₅). **MS (ESI)** m/z 255 (M+H)⁺, 277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄·0.75H₂O: C, 68.44, H, 4.18. Found: C, 68.28, H, 4.11.

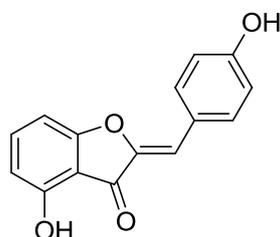


(Z)-2-(2-Hydroxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18a). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 2-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **18a** as pure yellow crystals (28%). C₁₅H₁₀O₄. m.p. > 250 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.10 (br s, 1H, OH), 10.35 (br s, 1H, OH), 8.08 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, H_{6'}), 7.52 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, H₆), 7.24 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H_{4'}), 7.06 (s, 1H, -CH=), 6.94 (m, 2H, H_{3',5'}), 6.86 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H₇), 6.62 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.2 (C₃), 165.8 (C₄), 157.0 (C₂), 157.0 (C₈), 146.0 (C₂), 138.4 (C₆), 131.2

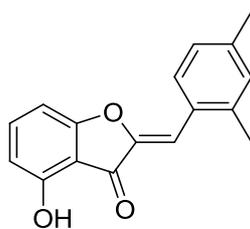
(C₆), 130.8 (C₄), 119.6 (-CH=), 118.9 (C_{1'}), 115.6 (C_{5'}), 110.4 (C₅), 109.1 (C₉), 104.1 (C₃), 102.4 (C₇). **MS (ESI)** m/z 255 (M+H)⁺, 277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄·0.25H₂O: C, 69.63, H, 4.06. Found: C, 69.19, H, 3.89.



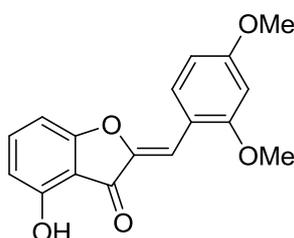
(Z)-2-(3-Hydroxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18b). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 3-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **18b** as pure yellow crystals (55%). C₁₅H₁₀O₄. **m.p.** 207-209 °C. **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.21 (br s, 1H, OH), 9.69 (br s, 1H, OH), 7.54 (t, 1H, J = 8.2 Hz, H₆), 7.36 (m, 2H, H_{2',6'}), 7.28 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H_{5'}), 6.84 (m, 2H, H_{4',7'}), 6.66 (s, 1H, -CH=), 6.64 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₅). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.4 (C₃), 166.0 (C₄), 157.6 (C_{3'}), 157.2 (C₈), 146.5 (C₂), 138.7 (C₆), 133.2 (C_{1'}), 129.9 (C_{5'}), 122.3 (C_{2'}), 117.2, 117.0 (C₄, C_{6'}), 110.7 (-CH=), 110.2 (C₅), 109.0 (C₉), 102.3 (C₇). **MS (ESI)** m/z 255 (M+H)⁺, 277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄: C, 70.87, H, 3.97. Found: C, 70.84, H, 4.74.



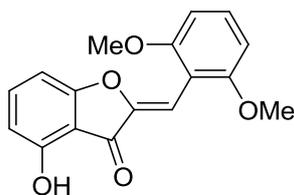
(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18c). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **18c** as pure yellow crystals (37%). C₁₅H₁₀O₄. **m.p.** 245-247 °C. **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.05 (br s, 1H, OH), 10.13 (br s, 1H, OH), 7.81 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H_{2',6'}), 7.51 (t, 1H, J = 8.1 Hz, H₆), 6.88 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H_{3',5'}), 6.84 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₇), 6.70 (s, 1H, -CH=), 6.61 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H₅). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.1 (C₃), 165.7 (C₄), 159.2 (C_{4'}), 156.9 (C₈), 144.9 (C₂), 138.2 (C₆), 133.2 (C_{2',6'}), 123.1 (C_{1'}), 116.0 (C_{3',5'}), 110.9 (-CH=), 110.3 (C₅), 109.4 (C₉), 102.4 (C₇). **MS (ESI)** m/z 255 (M+H)⁺, 277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄·0.1H₂O: C, 70.37, H, 3.99. Found: C, 70.10, H, 3.96.



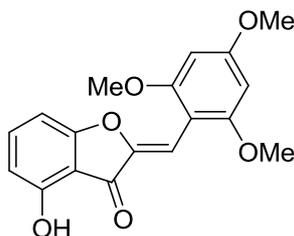
(Z)-2-(2,4-Dimethylbenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18d). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 2,4-dimethylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18d** as pure yellow crystals (76%). $C_{17}H_{14}O_3$. **m.p.** 193-194 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.14 (s, 1H, OH), 8.02 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6'), 7.52 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6), 7.13 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_5'), 7.11 (s, 1H, H_3'), 6.84 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 6.78 (s, 1H, -CH=), 6.63 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5), 2.40 (s, 3H, CH_3), 2.29 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 181.2 (C_3), 166.0 (C_4), 157.1 (C_8), 146.2 (C_2), 139.4, 138.5 (C_2 , C_4), 138.4 (C_6), 131.3 (C_3'), 130.3 (C_6'), 127.6 (C_1'), 127.1 (C_5'), 110.6 (C_5), 109.1 (C_9), 106.5 (-CH=), 102.4 (C_7), 21.0 (CH_3), 19.6 (CH_3). **MS (ESI)** m/z 267 ($M+H$) $^+$, 289 ($M+Na$) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{17}H_{14}O_3 \cdot 0.33H_2O$: C, 75.00, H, 5.39. Found: C, 74.96, H, 5.35.



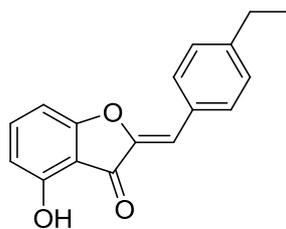
(Z)-2-(2,4-Dimethoxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18e). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 2,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18e** as pure bright yellow crystals (76%). $C_{17}H_{14}O_5$. **m.p.** 234-235 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.05 (s, 1H, OH), 8.11 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H_6'), 7.51 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6), 6.99 (s, 1H, -CH=), 6.84 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_7), 6.70 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H_5'), 6.66 (s, 1H, H_3'), 6.61 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_5), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 181.2 (C_3), 165.8 (C_4), 162.4, 159.8 (C_2' , C_4'), 157.0 (C_8), 145.3 (C_2), 138.3 (C_6), 132.2 (C_6'), 113.2 (-CH=), 110.5 (C_5), 109.4 (C_9), 106.7 (C_1'), 103.9 (C_5'), 102.6 (C_7), 98.3 (C_3'), 56.0 (OCH_3), 55.6 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 299 ($M+H$) $^+$, 321 ($M+Na$) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{17}H_{14}O_5 \cdot 0.5H_2O$: C, 66.44, H, 4.92. Found: C, 66.60, H, 4.88.



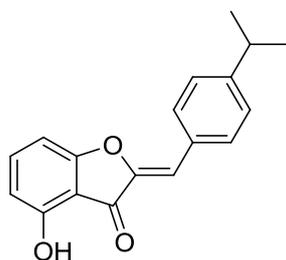
(Z)-2-(2,6-Dimethoxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18f). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 2,6-dimethoxybenzaldehyde, and was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford **18f** as a pure yellow solid (34%). C₁₇H₁₄O₅. **m.p.** 152-153 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95 (br s, 1H, OH), 7.45 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₆), 7.34 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.09 (s, 1H, -CH=), 6.66 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₇), 6.61 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, H_{3',5'}), 6.58 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₅), 3.88 (s, 6H, OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 185.5 (C₃), 165.1 (C₄), 159.1 (C_{2',6'}), 156.7 (C₈), 147.5 (C₂), 139.2 (C₆), 131.5 (C_{4'}), 110.1, 109.9 (C₁, C₉), 109.3 (C₅), 106.5 (-CH=), 104.0 (C_{3',5'}), 103.5 (C₇), 56.0 (OCH₃). **MS (ESI)** *m/z* 299 (M+H)⁺, 321 (M+Na)⁺, 619 (2M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₇H₁₄O₅·0.5H₂O: C, 66.44, H, 4.92. Found: C, 66.45, H, 4.78.



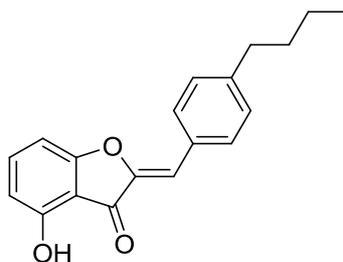
(Z)-2-(2,4,6-Trimethoxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18g). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18g** as pure yellow crystals (71%). C₁₈H₁₆O₆. **m.p.** 139-140 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.00 (s, 1H, OH), 7.46 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₆), 6.68 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₇), 6.66 (s, 1H, -CH=), 6.57 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, H₅), 6.31 (s, 2H, H_{3',5'}), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.83 (s, 6H, OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.1 (C₃), 165.9 (C₄), 162.8 (C_{4'}), 159.5 (C_{2',6'}), 156.9 (C₈), 146.1 (C₂), 138.4 (C₆), 109.9 (C₅), 109.5 (C₉), 103.4 (C₁), 102.2 (C₇), 91.1 (C_{3',5'}), 55.9 (OCH₃), 55.5 (OCH₃). **MS (ESI)** *m/z* 329 (M+H)⁺, 351 (M+Na)⁺, 679 (2M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₈H₁₆O₆·0.33H₂O: C, 64.67, H, 4.99. Found: C, 64.58, H, 5.03.



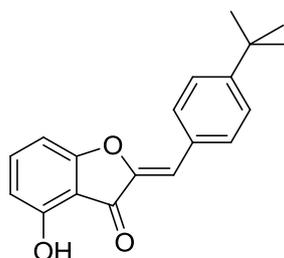
(Z)-2-(4-Ethylbenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18h). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-ethylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18h** as pure yellow crystals (50%). $C_{17}H_{14}O_3$. **m.p.** 141-142 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.16 (s, 1H, OH), 7.86 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.53 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6), 7.32 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.86 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 6.74 (s, 1H, -CH=), 6.64 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5), 2.64 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_3$), 1.19 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 181.3 (C_3), 166.0 (C_4), 157.1 (C_8), 146.2 (C_2), 145.8 (C_4'), 138.6 (C_6), 131.1 ($C_{2',6'}$), 129.6 ($C_{1'}$), 128.4 ($C_{3',5'}$), 110.6 (-CH=), 110.1 (C_5), 109.1 (C_9), 102.4 (C_7), 28.2 ($PhCH_2CH_3$), 15.3 ($PhCH_2CH_3$). **MS (ESI)** m/z 267 ($M+H$) $^+$, 289 ($M+Na$) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{17}H_{14}O_3 \cdot 0.125H_2O$: C, 76.04, H, 5.31. Found: C, 75.93, H, 5.26.



(Z)-2-(4-Isopropylbenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18i). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-isopropylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18i** as pure yellow crystals (44%). $C_{18}H_{16}O_3$. **m.p.** 126-127 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.16 (s, 1H, OH), 7.86 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.54 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6), 7.36 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.86 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 6.74 (s, 1H, -CH=), 6.64 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5), 2.92 (sept., 1H, $J = 6.8$ Hz, $PhCH(CH_3)_2$), 1.21 (d, 6H, $J = 6.8$ Hz, $PhCH(CH_3)_2$). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 181.3 (C_3), 166.0 (C_4), 157.1 (C_8), 150.4 (C_4'), 146.2 (C_2), 138.6 (C_6), 131.2 ($C_{2',6'}$), 129.8 ($C_{1'}$), 127.0 ($C_{3',5'}$), 110.6 (-CH=), 110.1 (C_5), 109.1 (C_9), 102.4 (C_7), 33.5 ($PhCH(CH_3)_2$), 23.6 ($PhCH(CH_3)_2$). **MS (ESI)** m/z 281 ($M+H$) $^+$, 303 ($M+Na$) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{18}H_{16}O_3 \cdot 0.25H_2O$: C, 75.92, H, 5.79. Found: C, 75.55, H, 5.62.

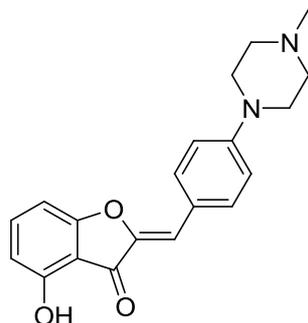


(Z)-2-(4-Butylbenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18j). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-butylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18j** as pure yellow crystals (56%). $C_{19}H_{18}O_3$. **m.p.** 121-122 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.15 (s, 1H, OH), 7.85 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.53 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6), 7.30 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.86 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 6.74 (s, 1H, -CH=), 6.63 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5), 2.61 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.56 (p, 2H, $J = 7.3$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.30 (sext., 2H, $J = 7.3$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 0.89 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 181.3 (C_3), 166.0 (C_4), 157.1 (C_8), 146.2 (C_2), 144.5 (C_4'), 138.6 (C_6), 131.1 ($C_{2',6'}$), 129.6 ($C_{1'}$), 129.0 ($C_{3',5'}$), 110.6 (-CH=), 110.2 (C_5), 109.1 (C_9), 102.4 (C_7), 34.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 32.9 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 21.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 13.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). **MS (ESI)** m/z 295 ($M+H$)⁺, 317 ($M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{18}O_3$: C, 77.53, H, 6.17. Found: C, 77.32, H, 6.33.



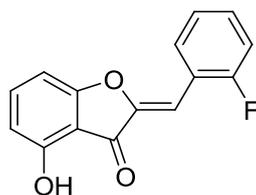
(Z)-2-(4-Tertibutylbenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18k). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-tert-butylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18k** as pure yellow crystals (61%). $C_{19}H_{18}O_3$. **m.p.** 167-168 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.16 (s, 1H, OH), 7.86 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.54 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6), 7.49 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.85 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 6.74 (s, 1H, -CH=), 6.64 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5), 1.28 (s, 9H, $PhC(CH_3)_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 181.3 (C_3), 166.0 (C_4), 157.2 (C_8), 152.6 (C_4'), 146.3 (C_2), 138.6 (C_6), 130.9 ($C_{2',6'}$), 129.4 ($C_{1'}$), 125.8 ($C_{3',5'}$), 110.6 (-CH=), 110.0 (C_5), 109.2 (C_9), 102.4 (C_7), 34.6 ($PhC(CH_3)_3$), 30.9

(PhC(CH₃)₃). **MS (ESI)** m/z 295 (M+H)⁺, 317 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₉H₁₈O₃: C, 77.53, H, 6.17. Found: C, 77.22, H, 6.24.



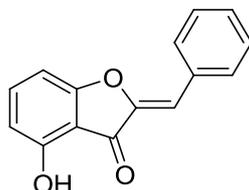
(Z)-2-(4-(4-Methylpiperazin-1-yl)benzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18l).

The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-(4-methylpiperazin-1-yl)benzaldehyde, and was washed three times with distilled water to afford **18l** as an orange solid, which was the analytically pure hydrochloride salt, used without further purification (71%). **m.p.** > 260 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.14 (s, 1H, OH), 11.14 (br s, 1H, NH⁺) 7.85 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_{2',6'}), 7.51 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₆), 7.10 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_{3',5'}), 6.84 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₇), 6.72 (s, 1H, -CH=), 6.66 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₅), 4.02 (m, 2H, CH₂), 3.48 (m, 2H, CH₂), 3.24 (m, 2H, CH₂), 3.13 (m, 2H, CH₂), 2.80 (s, 3H, NCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 180.8 (C₃), 165.5 (C₄), 156.9 (C₈), 149.9 (C_{4'}), 145.0 (C₂), 137.9 (C₆), 132.4 (C_{2',6'}), 122.8 (C_{1'}), 115.1 (C_{3',5'}), 110.6 (-CH=), 110.3 (C₅), 109.3 (C₉), 102.2 (C₇), 51.7 (CH₂), 44.2 (CH₂), 41.8 (NCH₃). **MS (ESI)** m/z 337 (M+H)⁺. **Anal.** Calcd for C₂₀H₂₀N₂O₃·HCl·1.75H₂O: C, 57.14, H, 5.83, N, 6.67. Found: C, 57.22, H, 5.95, N, 6.76.

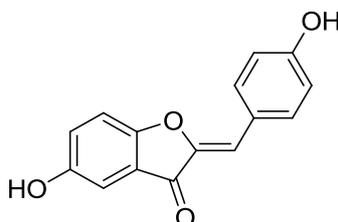


(Z)-2-(2-Fluorobenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18m). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 2-fluorobenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **18m** as pure yellow crystals (30%). C₁₅H₉FO₃. **m.p.** 162-163 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.29 (s, 1H, OH), 8.21 (m, 1H, H_{6'}), 7.56 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₆), 7.50 (m, 1H, H_{3'}), 7.35 (m, 2H, H_{4',5'}), 6.87 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₇), 6.75 (s, 1H, -CH=), 6.66 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.1 (C₃), 166.1 (C₄), 160.6 ($J =$

251.6 Hz, C_{2'}), 157.4 (C₈), 147.6 (C₂), 139.1 (C₆), 131.7 ($J = 8.0$ Hz, C_{4'}), 131.1 (C_{6'}), 125.2 (C_{5'}), 119.9 ($J = 11.5$ Hz, C_{1'}), 115.8 ($J = 21.5$ Hz, C_{3'}), 111.0 (C₅), 108.8 (C₉), 102.5 (C₇), 99.8 (d, $J = 7.3$ Hz, -CH=). **MS (ESI)** m/z 257 (M+H)⁺, 279 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₉FO₃·0.66H₂O: C, 67.16, H, 3.85. Found: C, 66.80, H, 3.58.



(Z)-2-Benzylidene-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18n). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and benzaldehyde, and was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford **18n** as a pure yellow solid (72%). C₁₅H₁₀O₃. **m.p.** 148 °C. **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.19 (br s, 1H, OH), 7.95 (d, 2H, $J = 7.2$ Hz, H_{2',6'}), 7.54 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₆), 7.46 (m, 3H, H_{3',4',5'}), 6.87 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₇), 6.77 (s, 1H, -CH=), 6.64 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H₅). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.4 (C₃), 166.1 (C₄), 157.2 (C₈), 146.6 (C₂), 138.8 (C₆), 132.2 (C_{4'}), 131.0 (C_{2',6'}), 129.6 (C_{1'}), 129.0 (C_{3',5'}), 110.7 (C₅), 109.9 (-CH=), 109.0 (C₉), 102.5 (C₇). **MS (ESI)** m/z 239 (M+H)⁺, 261 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₃·0.66H₂O: C, 72.00, H, 4.53. Found: C, 71.99, H, 4.15.

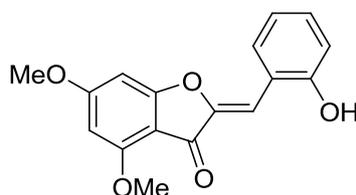


(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-5-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (19). The crude product was prepared according to the previous general procedure starting from 5-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from acetonitrile to afford **19** as pure yellow crystals (17%). C₁₅H₁₀O₄. **m.p.** > 300 °C (decomposition). **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.21 (br s, 1H, OH), 9.76 (br s, 1H, OH), 7.85 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{2',6'}), 7.38 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H₆), 7.20 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H₇), 7.01 (s, 1H, H₄), 6.89 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{3',5'}), 6.83 (s, 1H, -CH=). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 183.4 (C₃), 159.5, 158.8 (C_{4'}, C₈), 153.6 (C₅), 145.5 (C₂), 133.5 (C_{2',6'}), 125.2 (C₉), 122.9 (C_{1'}), 121.5 (C₆), 116.0 (C_{3',5'}), 113.7 (C₇), 112.8 (C₄), 107.4 (-CH=). **MS (ESI)** m/z 255 (M+H)⁺,

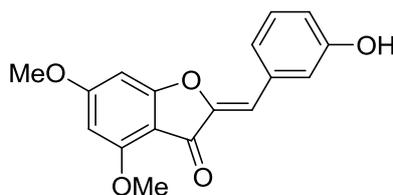
277 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₄·0.66H₂O: C, 67.67, H, 4.29. Found: C, 67.56, H, 4.10.

2.3.2 Synthesis of derivatives *via* basic-mediated aldolic condensation (in methanol, 25 °C)

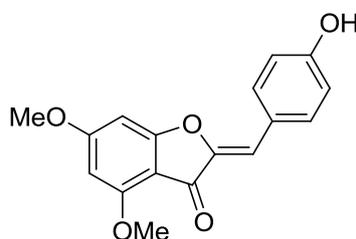
General procedure. To a solution of 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one in methanol (15 mL/mmol) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 1.5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1 equiv.). The solution was stirred at 25 °C until the crude product crystallized in solution (5 minutes to 2 hours). The solid was filtered and washed with a small amount of cold methanol to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one derivative.



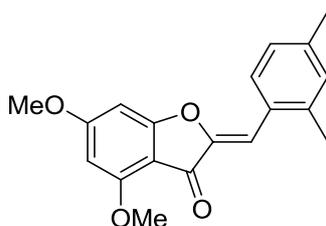
(*Z*)-2-(2-Hydroxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one (20a). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one and 2-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20a** as pure yellow crystals (51%). C₁₇H₁₄O₄. **m.p.** > 250 °C (decomposition). **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.31 (s, 1H, OH), 8.06 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_{6'}), 7.24 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_{4'}), 7.01 (s, 1H, -CH=), 6.94 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_{3'}), 6.92 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, H_{5'}), 6.71 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H₇), 6.34 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H₅), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.89 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 179.0 (C₃), 168.7, 168.0 (C₄, C₆), 158.8 (C₈), 156.9 (C_{2'}), 146.7 (C₂), 131.1 (C_{6'}), 130.6 (C_{4'}), 119.4 (-CH=), 118.8 (C_{1'}), 115.6 (C_{5'}), 104.0 (C₉), 103.6 (=CH-), 94.3 (C₅), 89.8 (C₇), 56.4 (OCH₃), 56.0 (OCH₃). **MS (ESI)** *m/z* 299 (M+H)⁺, 321 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₇H₁₄O₅: C, 68.46, H, 4.74. Found: C, 68.39, H, 4.77.



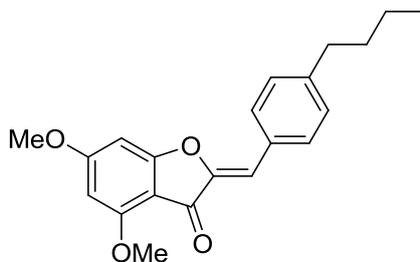
(Z)-2-(3-Hydroxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20b). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 3-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20b** as pure yellow crystals (76%). $C_{17}H_{14}O_5$. **m.p.** > 250 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 9.65 (s, 1H, OH), 7.34 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 7.27 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_5), 6.83 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $H_{4'}$), 6.67 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, H_7), 6.61 (s, 1H, -CH=), 6.35 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, H_5), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 179.0 (C_3), 169.0, 168.3 (C_4 , C_6), 159.0 (C_8), 157.6 ($C_{3'}$), 147.2 (C_2), 133.2 ($C_{1'}$), 129.9 ($C_{5'}$), 122.1 ($C_{2'}$), 117.3, 116.9 ($C_{4'}$, $C_{6'}$), 109.8 (=CH-), 104.0 (C_9), 94.4 (C_5), 89.8 (C_7), 56.5 (OCH_3), 56.2 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 299 ($M+H$)⁺, 321 ($M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{17}H_{14}O_5 \cdot H_2O$: C, 64.56, H, 5.06. Found: C, 64.31, H, 5.06.



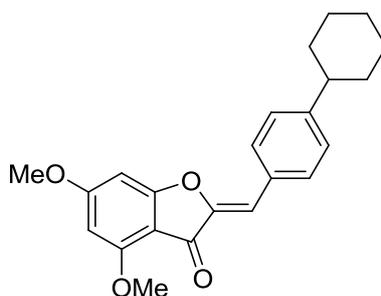
(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20c). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 4-hydroxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20c** as pure yellow crystals (63%). $C_{17}H_{14}O_5$. **m.p.** > 275 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.11 (s, 1H, OH), 7.79 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $H_{2',6'}$), 6.87 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.68 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz, H_7), 6.65 (s, 1H, -CH=), 6.33 (d, 1H, $J = 1.1$ Hz, H_5), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 178.9 (C_3), 168.6, 167.9 (C_4 , C_6), 159.1 ($C_{4'}$), 158.8 (C_8), 145.6 (C_2), 133.0 ($C_{2',6'}$), 123.1 ($C_{1'}$), 116.0 ($C_{3',5'}$), 110.4 (=CH-), 104.3 (C_9), 94.3 (C_5), 89.7 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.1 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 299 ($M+H$)⁺, 321 ($M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{17}H_{14}O_5$: C, 68.46, H, 4.74. Found: C, 68.13, H, 4.78.



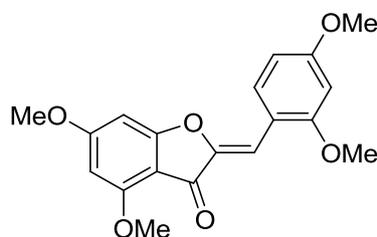
(Z)-2-(2,4-Dimethylbenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20d). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 2,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20d** as pure pale yellow crystals (86%). $C_{19}H_{18}O_4$. **m.p.** 216 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $H_{6'}$), 7.10 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $H_{5'}$), 7.06 (s, 1H, $H_{3'}$), 6.97 (s, 1H, -CH=), 6.37 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_7), 6.12 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_5), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 2.46 (s, 3H, CH_3), 2.35 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 180.9 (C_3), 169.2, 169.0 (C_4 , C_6), 159.6 (C_8), 147.8 (C_2), 139.8, 139.0 ($C_{2'}$, $C_{4'}$), 131.6 ($C_{3'}$), 131.0 ($C_{6'}$), 128.4 ($C_{1'}$), 127.2 ($C_{5'}$), 108.1 (-CH=), 105.6 (C_9), 94.2 (C_5), 89.4 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 21.6 (CH_3), 20.4 (CH_3). **MS (ESI)** m/z 311 ($M+H$)⁺, 333 ($M+Na$)⁺, 643 ($2M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{18}O_4$: C, 73.54, H, 5.85. Found: C, 73.04, H, 5.92.



(Z)-2-(4-Butylbenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20e). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 4-butylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20e** as pure white crystals (75%). $C_{21}H_{22}O_4$. **m.p.** 153 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.78 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.24 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.77 (s, 1H, -CH=), 6.38 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_7), 6.12 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_5), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 2.65 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.61 (quint., 2H, $J = 7.6$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.37 (sext., 2H, $J = 7.6$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 0.96 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 181.0 (C_3), 169.2, 169.1 (C_4 , C_6), 159.6 (C_8), 147.7 (C_2), 145.0 ($C_{4'}$), 131.3 ($C_{2',6'}$), 130.2 ($C_{1'}$), 129.1 ($C_{3',5'}$), 111.3 (-CH=), 105.5 (C_9), 94.2 (C_5), 89.4 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 35.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 33.6 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 22.5 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 14.1 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). **MS (ESI)** m/z 339 ($M+H$)⁺, 361 ($M+Na$)⁺, 699 ($2M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{21}H_{22}O_4$: C, 74.54, H, 6.56. Found: C, 74.46, H, 6.33.

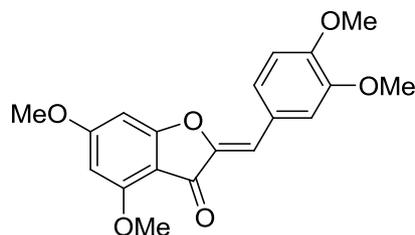


(Z)-2-(4-Cyclohexylbenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20f). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 4-cyclohexylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20f** as pure white crystals (78%). $C_{23}H_{24}O_4$. m.p. 174 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.78 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.27 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.76 (s, 1H, -CH=), 6.37 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_7), 6.11 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_5), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 2.53 (m, 1H, *c*-Hex), 1.86 (m, 4H, *c*-Hex), 1.76 (m, 1H, *c*-Hex), 1.42 (m, 4H, *c*-Hex), 1.35 (m, 1H, *c*-Hex). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 180.9 (C_3), 169.1, 169.0 (C_4 , C_6), 159.5 (C_8), 150.0 ($C_{4'}$), 147.7 (C_2), 131.4 ($C_{2',6'}$), 130.3 ($C_{1'}$), 127.5 ($C_{3',5'}$), 111.2 (-CH=), 105.5 (C_9), 94.1 (C_5), 89.4 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 44.7 (*c*-Hex), 34.4 (*c*-Hex), 27.0 (*c*-Hex), 26.2 (*c*-Hex). MS (ESI) m/z 365 ($M+H$)⁺, 751 ($2M+Na$)⁺. Anal. Calcd for $C_{23}H_{24}O_4$: C, 75.81, H, 6.64. Found: C, 75.40, H, 6.78.

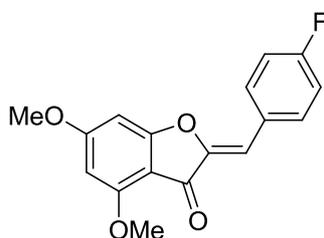


(Z)-2-(2,4-Dimethoxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20g). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 2,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20g** as pure pale yellow crystals (91%). $C_{19}H_{18}O_6$. m.p. 213-214 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.19 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, $H_{6'}$), 7.27 (s, 1H, -CH=), 6.57 (dd, 1H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.3$ Hz, $H_{5'}$), 6.45 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, $H_{3'}$), 6.36 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_7), 6.11 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_5), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 180.6 (C_3), 168.5, 168.4 (C_4 , C_6), 162.2, 160.1 ($C_{2'}$, $C_{4'}$), 159.2 (C_8), 146.8 (C_2), 132.8 ($C_{6'}$), 114.6 (-CH=), 105.6, 105.5, 105.3 (C_9 ,

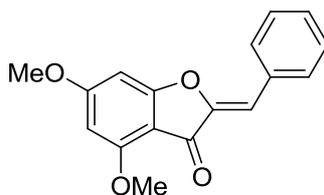
$C_{1'}$, $C_{5'}$), 97.9 ($C_{3'}$), 93.7 (C_5), 89.0 (C_7), 56.1 (OCH_3), 56.0 (OCH_3), 55.5 (OCH_3), 55.4 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 343 ($M+H$)⁺, 707 ($2M+Na$)⁺.



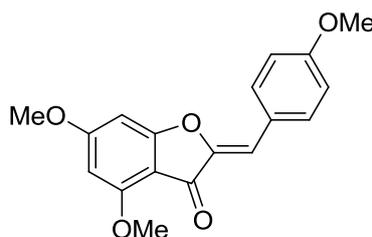
(Z)-2-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20h). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 3,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20h** as pure pale yellow crystals (83%). $C_{19}H_{18}O_6$. **m.p.** 173-174 °C. **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 6.91 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, $H_{5'}$), 6.73 (s, 1H, -CH=), 6.34 (s, 1H, H_7), 6.12 (s, 1H, H_5), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 180.5 (C_3), 168.7 (C_4 , C_6), 159.3 (C_8), 150.3, 148.9 ($C_{3'}$, $C_{4'}$), 146.8 (C_2), 125.5, 125.3 ($C_{6'}$, $C_{1'}$), 113.5 ($C_{2'}$), 111.3, 111.1 ($C_{5'}$, -CH=), 105.4 (C_9), 93.9 (C_5), 89.1 (C_7), 56.2 (OCH_3), 56.1 (OCH_3), 55.9 (OCH_3), 56.0 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 343 ($M+H$)⁺, 707 ($2M+Na$)⁺.



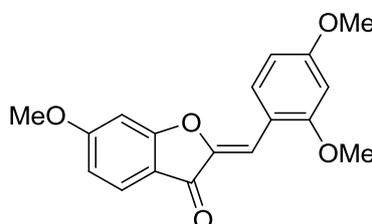
(Z)-2-(4-Fluorobenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20i). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 4-fluorobenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20i** as pure pale yellow crystals (64%). **m.p.** 186-187 °C. **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.87 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 7.12 (m, 2H, $H_{3',5'}$), 6.74 (s, 1H, -CH=), 6.40 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_7), 6.15 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_5), 3.97 (s, 3H, OCH_3), 3.93 (s, 3H, OCH_3). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 180.8 (C_3), 168.2 (C_4 , C_6), 163.2 (d, $J = 251.4$ Hz, $C_{4'}$), 159.6 (C_8), 147.7 (C_2), 133.2 (d, $J = 8.2$ Hz, $C_{2',6'}$), 129.1 ($C_{1'}$), 116.2 (d, $J = 21.7$ Hz, $C_{3',5'}$), 109.8 (-CH=), 105.4 (C_9), 94.3 (C_5), 89.4 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.4 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 301 ($M+H$)⁺, 623 ($2M+Na$)⁺.



(Z)-2-Benzylidene-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20j). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and benzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **20j** as pure pale yellow crystals (61%). $C_{17}H_{14}O_4$. **m.p.** 156-157 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.91 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.39-7.48 (m, 3H, $H_{3',4',5'}$), 6.68 (s, 1H, $-CH=$), 6.66 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H_7), 6.31 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz, H_5), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 179.0 (C_3), 168.9, 168.3 (C_4 , C_6), 158.9 (C_8), 147.3 (C_2), 132.1 ($C_{4'}$), 130.8 ($C_{2',6'}$), 129.3 ($C_{1'}$), 128.8 ($C_{3',5'}$), 109.3 ($=CH-$), 104.0 (C_9), 94.3 (C_5), 89.8 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.1 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 283 ($M+H$) $^+$, 587 ($2M+H$) $^+$.

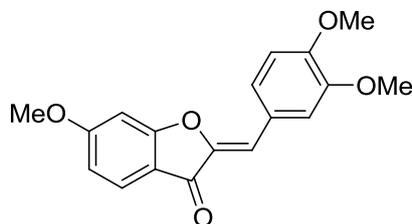


(Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (20k). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one and 4-methoxybenzaldehyde, and was recrystallized from ethanol to afford **20k** as pure yellow crystals (49%). $C_{18}H_{16}O_5$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.84 (m, 1H, $H_{2',6'}$), 6.96 (m, 1H, $H_{3',5'}$), 6.76 (s, 1H, $-CH=$), 6.38 (m, 1H, H_7), 6.13 (m, 1H, H_7), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.86 (s, 3H, OCH_3).

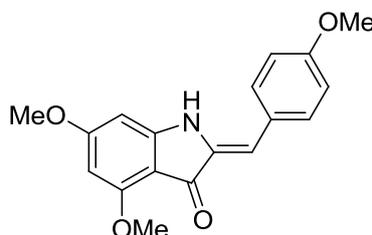


(Z)-2-(2,4-Dimethoxybenzylidene)-6-methoxybenzofuran-3(2H)-one. The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 6-methoxybenzofuran-3(2H)-one and 2,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford the title compound as pure yellow crystals (50%). $C_{18}H_{16}O_5$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ

8.25 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_{6'}), 7.71 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H₄), 7.36 (s, 1H, -CH=), 6.76 (s, 1H, H₇), 6.75 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, H₅), 6.61 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, H_{5'}), 6.47 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_{3'}), 3.92 (OCH₃), 3.89 (OCH₃), 3.88 (OCH₃).



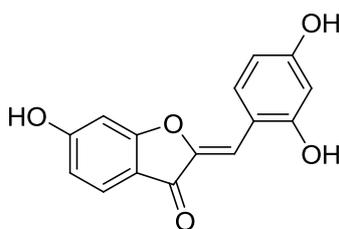
(Z)-2-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-6-methoxybenzofuran-3(2H)-one. The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 6-methoxybenzofuran-3(2H)-one and 3,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford the title compound as pure yellow crystals (23%). C₁₈H₁₆O₅. **m.p.** 195-196 °C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H₄), 7.51 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H_{2'}), 7.48 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, H_{6'}), 6.94 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_{5'}), 6.80 (s, 1H, H₇), 6.77 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, H₅), 6.76 (s, 1H, -CH=), 3.99 (OCH₃), 3.95 (OCH₃), 3.94 (OCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 183.0 (C₃), 168.4, 167.4 (C₆, C₈), 150.8, 149.2 (C_{3'}, C_{4'}), 147.0 (C₂), 126.0, 125.9 (C₄, C_{6'}), 125.6 (C_{1'}), 115.3 (C₉), 113.9 (C_{2'}), 112.6 (C₇), 112.2 (C₅), 111.4 (C_{5'}), 96.8 (-CH=), 56.3 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 56.2 (OCH₃).



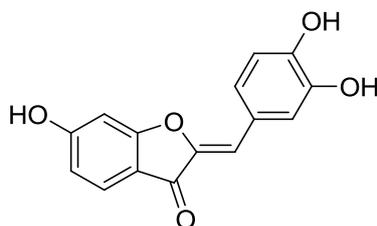
(Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)-4,6-dimethoxyindolin-3(2H)-one (28). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 1-acetyl-4,6-dimethoxyindolin-3(2H)-one and 4-methoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **28** as pure dark yellow crystals (77%). C₁₈H₁₇NO₄. **m.p.** 121-123 °C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{2',6'}), 6.94 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{3',5'}), 6.93 (br s, 1H, NH), 6.73 (s, 1H, -CH=), 6.08 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H₇), 5.91 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H₅), 3.90 (OCH₃), 3.85 (OCH₃), 3.84 (OCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 182.5 (C₃), 168.5 (C₆), 160.5, 159.7 (C_{4,8}), 156.5 (C_{4'}), 135.3 (C₂), 131.0 (C_{2',6'}), 127.8 (C_{1'}), 114.9 (C_{3',5'}), 110.2 (-CH=), 105.5 (C₉), 91.4 (C₅), 88.5 (C₇), 56.1 (OCH₃), 56.0 (OCH₃), 55.6 (OCH₃). **MS (ESI)** m/z 312 (M+H)⁺, 334 (M+Na)⁺.

2.3.3 Synthesis of derivatives *via* basic-mediated aldolic condensation (in ethanol, 80 °C)

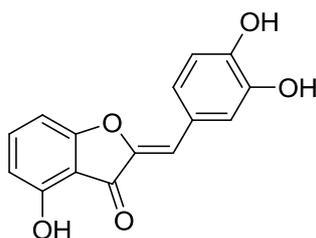
General procedure. To a solution of 4-hydroxy-, 6-hydroxy- or 4,6-dihydroxyfuran-3(2*H*)-one in ethanol (3 mL/mmol) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 5 mL/mmol) and a benzaldehyde derivative (1 to 2 equiv.). The solution was refluxed until TLC showed complete disappearance of the starting material (2 to 5 hours). After cooling, ethanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water (50 mL/mmol) and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust the pH to 2 – 3. The mixture was then extracted with ethyl acetate or CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one derivative.



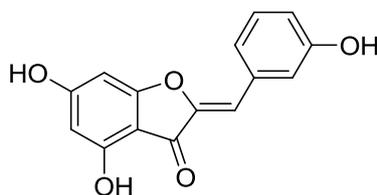
(*Z*)-2-(2,4-Dihydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (17d). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 6-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one and 2,4-dihydroxybenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **17d** as a pure red solid (72%). C₁₅H₁₀O₅. **m.p.** > 230 °C (decomposition). **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.24 (br s, 3H, OH), 7.97 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, H_{6'}), 7.57 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.05 (s, 1H, -CH=), 6.74 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.68 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.7 Hz, H₅), 6.38-6.42 (m, 2H, H_{3',5'}). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.0 (C₃), 167.2 (C₆), 166.3 (C₈), 160.8, 159.1 (C_{2'}, C_{4'}), 145.1 (C₂), 132.4 (C_{6'}), 125.5 (C₄), 113.2 (C₉), 112.8 (C₇), 110.5 (C_{1'}), 108.3 (C_{5'}), 105.8 (-CH=), 102.2 (C_{3'}), 98.4 (C₅). **MS (ESI)** *m/z* 269 (M-H)⁻. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₅·H₂O: C, 62.50, H, 4.17. Found: C, 62.23, H, 4.33.



(Z)-2-(3,4-Dihydroxybenzylidene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (17e). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 3,4-dihydroxybenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **17e** as a pure yellow solid (26%). C₁₅H₁₀O₅. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 9.69 (br s, 3H, OH), 7.58 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₄), 7.44 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₂), 7.24 (dd, 1H, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.9 Hz, H₆), 6.83 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 6.72 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.68 (dd, 1H, *J*₁ = 8.4 Hz, *J*₂ = 1.7 Hz, H₅), 6.62 (s, 1H, -CH=).

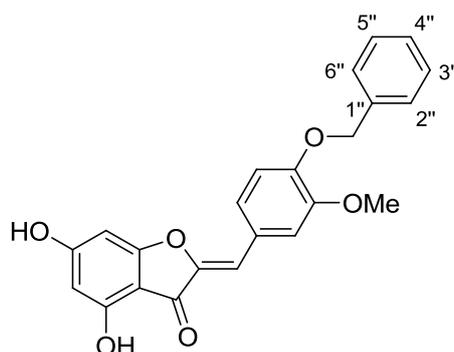


(Z)-2-(3,4-Dihydroxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (18p). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one and 3,4-dihydroxybenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **18p** as a pure yellow solid (43%). C₁₅H₁₀O₅. **m.p.** > 260 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.04 (br s, 1H, OH), 9.68 (br s, 1H, OH), 9.30 (br s, 1H, OH), 7.53 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 7.46 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz, H₂), 7.26 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.9 Hz, H₆), 6.84 (m, 2H, H_{7,5}), 6.63 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 6.63 (s, 1H, -CH=). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.0 (C₃), 165.7 (C₄), 156.9 (C₈), 147.9, 145.5 (C_{3'}, C_{4'}), 144.8 (C₂), 138.1 (C₆), 124.5 (C₁), 123.4 (C_{6'}), 117.8 (C_{5'}), 116.0 (C_{2'}), 111.5 (-CH=), 110.3 (C₅), 109.4 (C₉), 102.3 (C₇). **MS (ESI)** *m/z* 269 (M-H)⁻. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₅·0.5H₂O: C, 64.52, H, 3.94. Found: C, 64.27, H, 3.92.



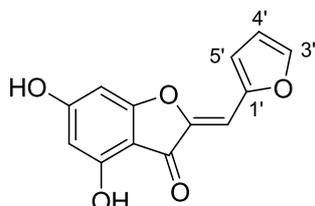
(Z)-2-(3-Hydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21b). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and 3-hydroxybenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **21b** as a pure yellow solid (49%). C₁₅H₁₀O₅. **m.p.** > 230 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ

11.03 (br s, 2H, OH), 9.63 (br s, 1H, OH), 7.28 (m, 3H, H_{2',5',6'}), 6.80 (ddd, 1H, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 2.1$ Hz, $J_3 = 1.5$ Hz, H_{4'}), 6.49 (s, 1H, -CH=), 6.19 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H₇), 6.07 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 179.0 (C₃), 167.8, 167.6 (C₄, C₆), 158.5 (C₈), 157.5 (C_{3'}), 147.7 (C₂), 133.4 (C_{1'}), 129.8 (C_{5'}), 121.9 (C_{2'}), 116.9, 116.5 (C_{4'}, C_{6'}), 108.3 (-CH=), 102.5 (C₉), 97.8 (C₅), 90.5 (C₇). **MS (ESI)** m/z 269 (M-H)⁻. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₅·2.2H₂O: C, 58.14, H, 4.65. Found: C, 58.12, H, 4.62.



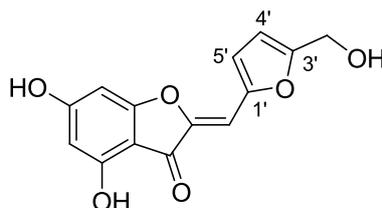
(Z)-2-(4-Benzyloxy-3-methoxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21f).

The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and 4-benzyloxy-3-methoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **21f** as pure yellow crystals (64%). C₂₃H₁₈O₆. **m.p.** > 230 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.92 (s, 1H, OH), 10.85 (s, 1H, OH), 7.32-7.54 (m, 7H, OCH₂Ph, H_{2',6'}), 7.14 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_{5'}), 6.59 (s, 1H, -CH=), 6.23 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H₇), 6.08 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H₅), 5.15 (s, 2H, OCH₂Ph), 3.83 (s, 3H, OCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 179.0 (C₃), 167.6, 167.1 (C₄, C₆), 158.2 (C₈), 149.0, 148.8 (C_{3'}, C_{4'}), 146.6 (C₂), 136.7 (C_{1''}), 128.4 (C_{3'',5''}), 128.0 (C_{1'}), 127.9 (C_{2'',6''}), 125.3 (C_{4''}), 124.3 (C_{6'}), 114.2 (C_{6'}), 113.5 (C_{2'}), 108.8 (-CH=), 102.7 (C₉), 97.7 (C₅), 90.6 (C₇), 69.8 (OCH₂Ph), 55.5 (OCH₃). **MS (ESI)** m/z 389 (M-H)⁻. **Anal.** Calcd for C₂₃H₁₈O₆·2.5H₂O: C, 63.44, H, 5.29. Found: C, 62.79, H, 5.29.

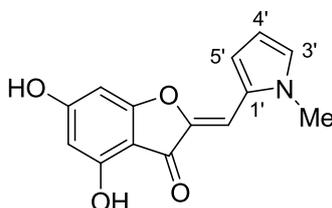


(Z)-2-((Furan-2-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (26a). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and furan-2-carboxaldehyde, and was purified by column

chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 19/1) to afford **26a** as a pure yellow solid (83%). C₁₃H₈O₅. **m.p.** > 230 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.97 (br s, 2H, OH), 7.90 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, H_{5'}), 7.04 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H_{3'}), 6.70 (dd, 1H, *J*₁ = 3.4 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, H_{4'}), 6.54 (s, 1H, -CH=), 6.19 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.06 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 178.5 (C₃), 167.6, 167.4 (C₄, C₆), 158.3 (C₈), 148.2 (C₂), 145.8, 145.5 (C_{1'}, C_{3'}), 115.7 (C_{5'}), 113.0 (C_{4'}), 102.8 (C₉), 97.8 (C₅), 97.1 (-CH=), 90.6 (C₇). **MS (ESI)** *m/z* 243 (M-H)⁻.

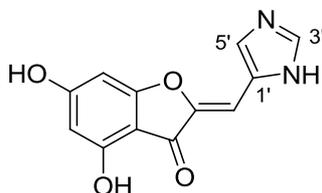


(Z)-2-((5-Hydroxymethyl)furan-2-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (26b). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and 5-hydroxymethylfuran-2-carboxaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **26b** as a pure yellow solid (53%). C₁₄H₁₀O₆. **m.p.** > 240 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 7.00 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, H_{5'}), 6.52 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, H_{4'}), 6.48 (s, 1H, -CH=), 6.16 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz, H₇), 6.05 (d, 1H, *J* = 1.1 Hz, H₅), 4.46 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 178.3 (C₃), 167.6, 167.4 (C₄, C₆), 158.0 (C₈), 147.5 (C₂), 145.7 (C_{1'}, C_{3'}), 116.5 (C_{5'}), 110.3 (C_{4'}), 102.8 (C₉), 97.8 (C₅), 97.1 (-CH=), 90.5 (C₇), 55.8 (CH₂OH). **MS (ESI)** *m/z* 273 (M-H)⁻. **Anal.** Calcd for C₁₄H₁₀O₆·0.25H₂O: C, 60.32, H, 3.77. Found: C, 59.68, H, 3.74.

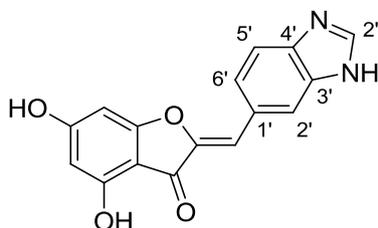


(Z)-2-((1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (26c). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and 1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 19/1) to afford **26c** as a pure brown solid (56%). C₁₄H₁₁NO₄. **m.p.** > 240 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.78 (br s, 2H, OH), 7.03 (m, 1H, H_{5'}), 6.92 (m, 1H, H_{3'}), 6.58 (s, 1H, -CH=),

6.21 (m, 1H, H_{4'}), 6.18 (d, 1H, $J = 1.3$ Hz, H₇), 6.05 (d, 1H, $J = 1.3$ Hz, H₅), 3.74 (s, 3H, NCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 178.4 (C₃), 167.0, 166.7 (C₄, C₆), 157.9 (C₈), 144.7 (C₂), 127.2 (C_{1'}), 125.7 (C_{3'}), 115.6 (C_{5'}), 109.5 (C_{4'}), 103.3 (C₉), 98.3 (-CH=), 97.5 (C₅), 90.4 (C₇), 33.7 (NCH₃). **MS (ESI)** m/z 256 (M-H)⁻.



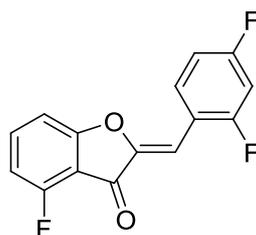
(Z)-2-((1H-imidazol-5-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (26d). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and 1H-imidazole-5-carboxaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/methanol 9/1) to afford **26d** as a pure yellow solid (43%). C₁₂H₈N₂O₄. **m.p.** > 260 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.87 (br s, 2H, OH), 7.86 (s, 1H, H_{3'}), 7.67 (s, 1H, H_{5'}), 6.55 (s, 1H, -CH=), 6.21 (s, 1H, H₇), 6.07 (s, 1H, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 178.5 (C₃), 167.3, 167.0 (C₄, C₆), 158.1 (C₈), 145.9 (C₂), 137.3 (C_{3'}), 130.1 (C_{1'}), 125.0 (C_{5'}), 103.1 (C₉), 101.3 (-CH=), 97.6 (C₅), 90.5 (C₇). **MS (ESI)** m/z 243 (M-H)⁻.



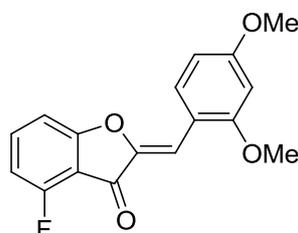
(Z)-2-((1H-benzo[d]imidazol-5-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (26e). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one and 1H-benzo[d]imidazole-5-carboxaldehyde, and was washed three times with distilled water to afford **26e** as a yellow solid, which was analytically pure and used without further purification (75%). C₁₆H₁₀N₂O₄. **m.p.** > 260 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.17 (br s, 2H, OH), 9.49 (s, 1H, H_{2'}), 8.37 (s, 1H, H_{2''}), 8.06 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_{6'}), 7.91 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₇), 6.84 (s, 1H, -CH=), 6.30 (s, 1H, H₇), 6.18 (s, 1H, H₅). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 178.8 (C₃), 167.7 (C₄, C₆), 158.6 (C₈), 147.9 (C₂), 141.9 (C_{2''}), 132.1, 131.7 (C_{3'}, C_{4'}), 129.9, 128.1 (C_{1'}, C_{6'}), 116.3, 115.0 (C_{2'}, C_{5'}), 107.5 (-CH=), 102.4 (C₉), 98.0 (C₅), 90.6 (C₇). **MS (ESI)** m/z 293 (M-H)⁻.

2.3.4 Synthesis of derivatives *via* neutral alumina-mediated aldolic condensation

General procedure. To a solution of a benzofuran-3(2*H*)-one derivative in anhydrous CH₂Cl₂ (20 mL/mmol) were added a benzaldehyde derivative (1.5 equivalents) and aluminum oxide (4000 mg/mmol). The suspension was stirred under argon at 25 °C overnight, and the solid was removed by filtration. The filtrate was distilled under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one derivative.

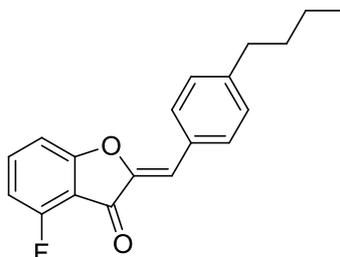


(*Z*)-2-(2,4-Difluorobenzylidene)-4-fluorobenzofuran-3(2*H*)-one (22a). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4-fluorobenzofuran-3(2*H*)-one and 2,4-difluorobenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/cyclohexane 1/1) to afford **22a** as a pure white solid (83%). C₁₅H₇F₃O₂. **m.p.** 164-165 °C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (dt, 1H, *J*₁ = 8.6 Hz, *J*₂ = 6.5 Hz, H_{6'}), 7.65 (dt, 1H, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 5.5 Hz, H₆), 7.13 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₇), 7.11 (s, 1H, -CH=), 7.01 (m, 1H, H_{5'}), 6.90 (dt, 1H, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, H_{3'}), 6.88 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 180.6, 166.3 (*J* = 6.0 Hz), 164.4 (*J*₁ = 171.8 Hz, *J*₂ = 12.3 Hz), 161.9 (*J*₁ = 174.6 Hz, *J*₂ = 12.2 Hz), 160.1, 157.5, 146.9, 138.7 (*J* = 9.4 Hz), 133.2 (*J* = 9.5 Hz), 117.0 (*J*₁ = 12.0 Hz, *J*₂ = 4.1 Hz), 112.4 (*J*₁ = 21.2 Hz, *J*₂ = 2.9 Hz), 110.7 (*J* = 19.0 Hz), 109.0 (*J* = 4.1 Hz), 104.5 (*J* = 25.6 Hz), 103.9 (*J* = 5.7 Hz). **MS (ESI)** *m/z* 277 (M+H)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₇F₃O₂: C, 65.23, H, 2.56. Found: C, 65.36, H, 2.57.

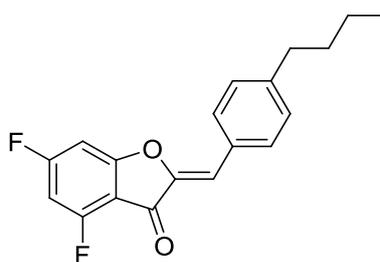


(*Z*)-2-(2,4-Dimethoxybenzylidene)-4-fluorobenzofuran-3(2*H*)-one (22b). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4-fluorobenzofuran-3(2*H*)-one and 2,4-dimethoxybenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford

22b as pure white crystals (53%). $C_{17}H_{13}FO_4$. **m.p.** 208-210 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.25 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, $H_{6'}$), 7.57 (m, 1H, H_6), 7.46 (s, 1H, -CH=), 7.11 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 6.83 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_5), 6.63 (dd, 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, $H_{5'}$), 6.48 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, $H_{3'}$), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3). **MS (ESI)** m/z 301 ($M+H$)⁺, 323 ($M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{17}H_{13}FO_4 \cdot 0.33H_2O$: C, 66.67, H, 4.47. Found: C, 66.63, H, 4.66.

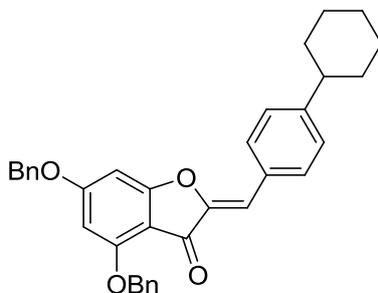


(Z)-2-(4-Butylbenzylidene)-4-fluorobenzofuran-3(2H)-one (22c). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4-fluorobenzofuran-3(2H)-one and 4-butylbenzaldehyde, and was recrystallized from methanol to afford **22c** as pure white crystals (48%). $C_{19}H_{17}FO_2$. **m.p.** 125-127 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.83 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.63 (dt, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, H_6), 7.29 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, $H_{3',5'}$), 7.14 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 6.92 (s, 1H, -CH=), 6.86 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_5), 2.67 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.63 (p, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.38 (sext., 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 0.95 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). **MS (ESI)** m/z 297 ($M+H$)⁺, 319 ($M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{17}FO_2$: C, 77.01, H, 5.78. Found: C, 76.62, H, 5.62.

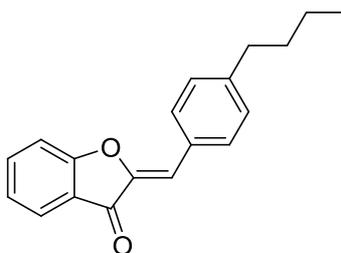


(Z)-2-(4-Butylbenzylidene)-4,6-difluorobenzofuran-3(2H)-one (23). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-difluorobenzofuran-3(2H)-one and 4-butylbenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH_2Cl_2 /cyclohexane 1/1) to afford **23** as a pure white solid (56%). $C_{19}H_{16}F_2O_2$. **m.p.** 93-94 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.80 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.29 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.91 (s, 1H, -CH=), 6.88 (m, 1H, H_7), 6.63 (m, 1H, H_5), 2.68 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.65 (p, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.39 (sext., 2H, $J = 7.5$

Hz, PhCH₂CH₂CH₂CH₃), 0.96 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, PhCH₂CH₂CH₂CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 179.5, 170.1 ($J = 13.0$ Hz), 167.5 ($J = 13.0$ Hz), 160.8 ($J = 16.2$ Hz), 158.2 ($J = 16.2$ Hz), 146.4, 131.9, 129.4, 129.2, 114.5, 108.2 ($J = 19.0$ Hz), 100.0 ($J_1 = 27.0$ Hz, $J_2 = 23.4$ Hz), 97.5 ($J_1 = 27.0$ Hz, $J_2 = 4.5$ Hz). **MS (ESI)** m/z 315 (M+H)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₉H₁₆F₂O₂: C, 72.61, H, 5.14. Found: C, 72.86, H, 5.47.



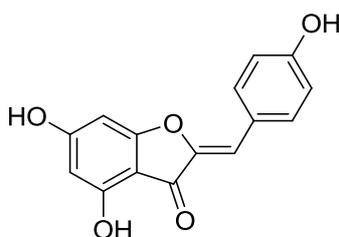
(Z)-2-(4-Cyclohexylbenzylidene)-4,6-dibenzoyloxybenzofuran-3(2H)-one (24). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from 4,6-dibenzoyloxybenzofuran-3(2H)-one and 4-cyclohexylbenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/cyclohexane 2/1) to afford **24** as a pure pale yellow solid (43%). C₃₅H₃₂O₄. **m.p.** 155-157 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H_{2',6'}), 7.32-7.50 (m, 10H, OCH₂Ph), 7.29 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz, H_{3',5'}), 6.78 (s, 1H, -CH=), 6.46 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H₇), 6.24 (d, $J = 1.6$ Hz, H₅), 5.28 (s, 2H, OCH₂Ph), 5.11 (s, 2H, OCH₂Ph), 2.53 (m, 1H, *c*-Hex), 1.89 (m, 4H, *c*-Hex), 1.78 (m, 1H, *c*-Hex), 1.43 (m, 4H, *c*-Hex), 1.30 (m, 1H, *c*-Hex). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 180.8 (C₃), 169.0, 167.8 (C₄, C₆), 158.5 (C₈), 150.0 (C_{4'}), 147.7 (C₂), 136.2, 135.7 (C_{1''}, OCH₂Ph), 131.4 (C_{2',6'}), 130.3 (C_{1'}), 129.0 (OCH₂Ph), 128.9 (OCH₂Ph), 128.7 (OCH₂Ph), 128.1 (OCH₂Ph), 127.8 (OCH₂Ph), 127.5 (C_{3',5'}), 127.0 (OCH₂Ph), 111.2 (-CH=), 106.1 (C₉), 96.6 (C₅), 90.7 (C₇), 71.0 (OCH₂Ph), 70.9 (OCH₂Ph), 44.8 (*c*-Hx), 34.4 (*c*-Hx), 27.1 (*c*-Hx), 26.3 (*c*-Hx). **MS (ESI)** m/z 517 (M+H)⁺. **Anal.** Calcd for C₃₅H₃₂O₄·0.33H₂O: C, 80.46, H, 6.26. Found: C, 80.30, H, 6.67.



(Z)-2-(4-Butylbenzylidene)-benzofuran-3(2H)-one (25). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from benzofuran-3(2H)-one and 4-

butylbenzaldehyde, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{cyclohexane}$ 1/1) to afford **25** as a pure pale yellow solid (44%). $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_2$. **m.p.** 77-78 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{2',6'}$), 7.83 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_4), 7.67 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_6), 7.35 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 7.30 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $\text{H}_{3',5'}$), 7.24 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_5), 6.92 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 2.68 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.65 (p, 2H, $J = 7.5$ Hz, $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.40 (sext., 2H, $J = 7.5$ Hz, $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.96 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 185.0 (C_3), 166.2 (C_8), 146.7 (C_2), 145.7 (C_4'), 136.9 (C_6), 131.8 ($\text{C}_{2',6'}$), 129.9 ($\text{C}_{1'}$), 129.3 ($\text{C}_{3',5'}$), 124.8 (C_4), 123.6 (C_5), 122.0 (C_9), 113.7, 113.1 (C_7 , $-\text{CH}=\text{}$), 35.9 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 33.6 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.6 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 14.2 ($\text{PhCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$). **MS (ESI)** m/z 279 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C, 80.71, H, 6.55. Found: C, 80.96, H, 6.77.

2.3.5 Synthesis of derivatives *via* acid-mediated aldolic condensation

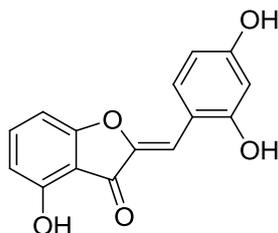


(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21c). To a solution of 4-hydroxybenzaldehyde (147 mg, 1.21 mmol) in methanol (10 mL) was added concentrated sulfuric acid (64.2 μL , 1.21 mmol) and the solution was stirred at room temperature for 30 minutes. 4,6-Dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (200 mg, 1.21 mmol) was then added, and the solution was refluxed for 4 hours. After cooling, the mixture was concentrated under reduced pressure then the residue was diluted into water (100 mL), extracted with ethyl acetate and washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the crude compound which was purified by column chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/cyclohexane 3/2) to afford **21c** as a pure yellow solid (54 mg, 17%). $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$. **m.p.** > 295 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.84 (br s, 1H, OH), 10.03 (br s, 1H, OH), 7.75 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{2',6'}$), 6.86 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $\text{H}_{3',5'}$), 6.54 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 6.20 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_7), 6.06 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_5). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 179.1 (C_3), 167.6, 167.1 (C_4 , C_6), 158.8 (C_4'), 158.2 (C_8), 146.0 (C_2), 132.8 ($\text{C}_{2',6'}$), 123.4 ($\text{C}_{1'}$), 116.0 ($\text{C}_{3',5'}$), 109.1 ($-\text{CH}=\text{}$), 102.9 (C_9), 97.7 (C_5), 90.5 (C_7). **MS (ESI)** m/z 271

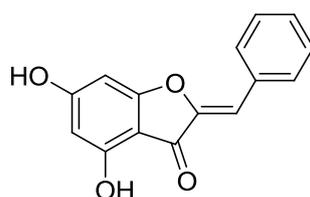
(M+H)⁺, 293 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₅: C, 66.67, H, 3.73. Found: C, 66.43, H, 3.83.

2.3.6 Synthesis of derivatives *via* deprotection of methoxy analogues

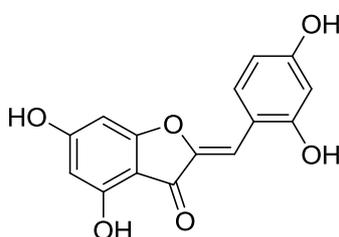
General procedure. To a solution of a (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one derivative in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL/mmol) was added pure boron tribromide (20 equivalents) at 0 °C. The solution was then stirred at room temperature until TLC showed complete disappearance of the starting materials (24 to 72 hours). Cold water was then added and the suspension was extracted three times with ethyl acetate, washed with water and brine. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the corresponding crude (*Z*)-2-benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one derivative.



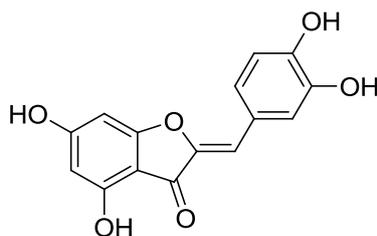
(*Z*)-2-(2,4-Dihydroxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one (18o). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (*Z*)-2-(2,4-dimethoxybenzylidene)-4-hydroxybenzofuran-3(2*H*)-one, and was washed three times with distilled water to afford **18o** as a yellow solid, which was analytically pure and used without further purification (61%). C₁₅H₁₀O₅. **m.p.** > 230 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 10.94 (s, 1H, OH), 10.29 (s, 1H, OH), 10.02 (s, 1H, OH), 7.96 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H_{6'}), 7.48 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₆), 7.03 (s, 1H, -CH=), 6.83 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₇), 6.59 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₅), 6.40 (m, 2H, H_{3',5'}). ¹³C NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.0 (C₃), 165.6 (C₄), 160.9, 159.1 (C_{2'}, C_{4'}), 156.8 (C₈), 144.3 (C₂), 137.8 (C₆), 132.4 (C_{6'}), 110.7 (C_{1'}), 110.1 (C₅), 109.7 (C₉), 108.3 (C_{5'}), 105.6 (-CH=), 102.5 (C_{3'}), 102.3 (C₇). **MS (ESI)** *m/z* 271 (M+H)⁺, 293 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₀O₅·H₂O: C, 62.50, H, 4.17. Found: C, 62.64, H, 3.70.



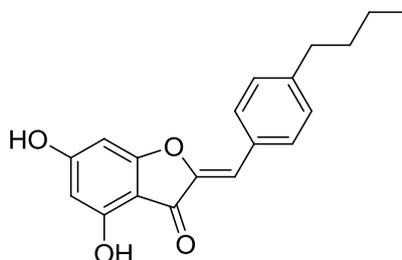
(Z)-2-Benzylidene-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21j). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (Z)-2-benzylidene-4,6-dimethoxy-benzofuran-3(2H)-one, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent toluene/methanol 9/1) to afford **21j** as a pure yellow solid (33%). $C_{15}H_{10}O_4$. **m.p.** > 225 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.99 (br s, 2H, OH), 7.89 (d, 2H, $J = 7.4$ Hz, $H_{3',5'}$), 7.47 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 7.39 (m, 1H, $H_{4'}$), 6.61 (s, 1H, -CH=), 6.23 (s, 1H, H_7), 6.08 (s, 1H, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 180.0 (C_3), 167.8 (C_4 , C_6), 158.4 (C_8), 147.7 (C_2), 132.3 ($C_{1'}$), 130.6 ($C_{3',5'}$), 129.1 ($C_{4'}$), 128.9 ($C_{2',6'}$), 108.0 (-CH=), 102.4 (C_9), 97.7 (C_5), 90.6 (C_7). **MS (ESI)** m/z 255 ($M+H$) $^+$, 277 ($M+Na$) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{15}H_{10}O_4 \cdot 0.67H_2O$: C, 67.67, H, 4.26. Found: C, 67.67, H, 4.15.



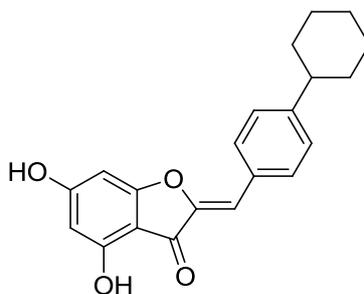
(Z)-2-(2,4-Dihydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21d). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (Z)-2-(2,4-dimethoxy-benzylidene)-4,6-dimethoxybenzo-furan-3(2H)-one, and was washed three times with distilled water to afford **21d** as an orange solid, which was analytically pure and used without further purification (58%). $C_{15}H_{10}O_6$. **m.p.** > 270 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.77 (s, 1H, OH), 10.74 (s, 1H, OH), 10.16 (s, 1H, OH), 9.90 (s, 1H, OH), 7.89 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, $H_{6'}$), 6.88 (s, 1H, -CH=), 6.37 (m, 2H, $H_{3',5'}$), 6.18 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_7), 6.05 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 179.1 (C_3), 167.4, 166.7 (C_4 , C_6), 160.3, 158.6 ($C_{2'}$, $C_{4'}$), 158.0 (C_8), 145.4 (C_2), 132.0 ($C_{6'}$), 110.8 ($C_{1'}$), 108.1 ($C_{5'}$), 103.6 (-CH=), 103.1 ($C_{3'}$), 102.3 (C_9), 97.5 (C_5), 90.4 (C_7). **MS (ESI)** m/z 287 ($M+H$) $^+$, 309 ($M+Na$) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{15}H_{10}O_6 \cdot 1.1H_2O$: C, 58.86, H, 3.99. Found: C, 58.78, H, 3.98.



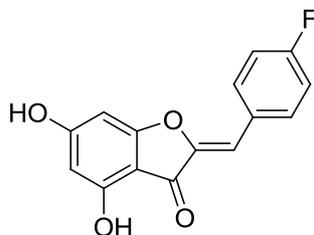
(Z)-2-(3,4-Dihydroxybenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21e). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (Z)-2-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one, and was washed three times with distilled water to afford **21e** as a yellow solid, which was analytically pure and used without further purification (61%). $C_{15}H_{10}O_6$. **m.p.** > 260 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.47 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, $H_{2'}$), 7.18 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.4$ Hz, $H_{6'}$), 6.82 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, $H_{5'}$), 6.56 (s, 1H, -CH=), 6.19 (s, 1H, H_7), 6.01 (s, 1H, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 178.9 (C_3), 167.4, 166.9 (C_4 , C_6), 158.1 (C_8), 147.4, 145.8, 145.4 (C_2 , C_3' , C_4'), 123.9 ($C_{1'}$), 123.6 ($C_{6'}$), 117.5 ($C_{5'}$), 115.9 ($C_{2'}$), 109.5 (-CH=), 102.8 (C_9), 97.5 (C_5), 90.2 (C_7). **MS (ESI)** m/z 287 ($M+H$)⁺, 309 ($M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{15}H_{10}O_6 \cdot 1.3H_2O$: C, 57.57, H, 4.05. Found: C, 57.12, H, 3.81.



(Z)-2-(4-Butylbenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21g). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (Z)-2-(4-butylbenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/cyclohexane 1/1) to afford **21g** a pure yellow solid (52%). $C_{19}H_{18}O_4$. **m.p.** 221-222 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.95 (br s, 2H, OH), 7.79 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H_{2',6'}$), 7.29 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, $H_{3',5'}$), 6.57 (s, 1H, -CH=), 6.21 (s, 1H, H_7), 6.07 (s, 1H, H_5), 2.61 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.56 (p, 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.31 (sext., 2H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 0.89 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz, $PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 179.0 (C_3), 167.8, 167.6 (C_4 , C_6), 158.5 (C_8), 147.4 (C_2), 143.9 (C_4'), 130.7 ($C_{2',6'}$), 129.9 ($C_{1'}$), 128.9 ($C_{3',5'}$), 108.3 (-CH=), 102.6 (C_9), 97.8 (C_5), 90.5 (C_7), 34.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 32.9 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 21.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$), 13.8 ($PhCH_2CH_2CH_2CH_3$). **MS (ESI)** m/z 311 ($M+H$)⁺, 333 ($M+Na$)⁺, 643 ($2M+Na$)⁺. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{18}O_4 \cdot 0.33H_2O$: C, 72.15, H, 5.91. Found: C, 72.00, H, 5.83.



(Z)-2-(4-Cyclohexylbenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21h). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (Z)-2-(4-cyclohexylbenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/cyclohexane 1/1) to afford **21h** as a pure yellow solid (64%). $C_{21}H_{20}O_4$. **m.p.** > 215 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 10.98 (br s, 2H, OH), 7.79 (d, 2H, J = 8.3 Hz, $H_{2',6'}$), 7.31 (d, 2H, J = 8.3 Hz, $H_{3',5'}$), 6.56 (s, 1H, -CH=), 6.20 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H_7), 6.07 (d, 1H, J = 1.5 Hz, H_5), 2.54 (m, 1H, c -Hex), 1.79 (m, 4H, c -Hex), 1.70 (m, 1H, c -Hex), 1.39 (m, 4H, c -Hex), 1.31 (m, 1H, c -Hex). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 179.0 (C_3), 167.8, 167.5 (C_4 , C_6), 158.5 (C_8), 149.0 (C_4'), 147.4 (C_2), 130.7 ($C_{2',6'}$), 130.0 ($C_{1'}$), 127.3 ($C_{3',5'}$), 108.2 (-CH=), 102.5 (C_9), 97.7 (C_5), 90.5 (C_7), 43.7 (c -Hex), 33.7 (c -Hex), 26.3 (c -Hex), 25.5 (c -Hex). **MS (ESI)** m/z 337 (M+H) $^+$, 359 (M+Na) $^+$, 695 (2M+Na) $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{21}H_{20}O_4 \cdot 0.5H_2O$: C, 73.03, H, 6.13. Found: C, 72.95, H, 6.01.

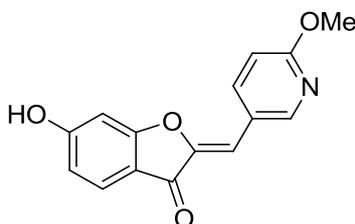


(Z)-2-(4-Fluorobenzylidene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (21i). The crude product was prepared according to previous general procedure starting from (Z)-2-(4-fluorobenzylidene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one, and was purified by column chromatography on silica gel (eluent CH_2Cl_2 /methanol 9/1) to afford **21i** as a pure yellow solid (50%). $C_{15}H_9FO_4$. **m.p.** > 270 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.00 (br s, 1H, OH), 10.97 (br s, 1H, OH), 7.96 (m, 2H, $H_{2',6'}$), 7.31 (m, 2H, $H_{3',5'}$), 6.64 (s, 1H, -CH=), 6.22 (d, 1H, J = 1.6 Hz, H_7), 6.08 (d, 1H, J = 1.6 Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 179.0 (C_3), 167.9, 167.5 (C_4 , C_6), 162.3 (d, J = 248.4 Hz, C_4'), 158.5 (C_8), 147.5 (C_2), 132.9 (d, J = 8.2 Hz, $C_{2',6'}$), 129.1 ($C_{1'}$), 116.0 (d, J = 21.7 Hz, $C_{3',5'}$), 107.1 (-CH=),

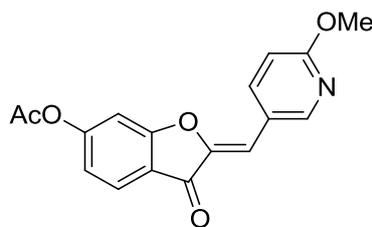
102.5 (C₉), 97.8 (C₅), 90.7 (C₇). **MS (ESI)** m/z 273 (M+H)⁺, 295 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₉FO₄·0.33H₂O: C, 64.74, H, 3.48. Found: C, 64.58, H, 3.67.

2.4 SYNTHESIS OF (Z)-2-((6-HYDROXY-1-OXYPYRIDIN-3-YL)METHYLENE)BENZOFURAN-3(2H)-ONE DERIVATIVES

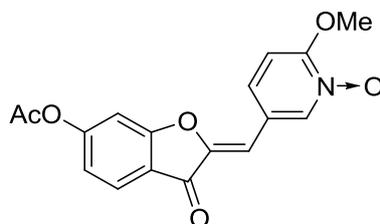
2.4.1 Synthesis of (Z)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one



(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (30a). To a solution of 6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (963 mg, 6.42 mmol) in methanol (100 mL) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 7 mL), followed by the addition of 6-methoxy-3-pyridinecarboxaldehyde (880 mg, 6.42 mmol) and the mixture was reflux for 2 hours. After cooling, methanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust the pH to 2 – 3. The resulting precipitate was filtered and washed successively with water, acetonitrile, and diethyl ether to afford the hydrochloride salt of **30a** (1,820 mg, 93%) as a pale yellow solid. C₁₅H₁₁NO₄. **m.p.** 260-262 °C (decomposition). **¹H NMR** (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 11.25 (s, 1H, OH), 8.66 (s, 1H, H_{2'}), 8.28 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{6'}), 7.60 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₄), 6.93 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{5'}), 6.79 (s, 1H, -CH=), 6.79 (s, 1H, H₇), 6.71 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₅), 3.89 (s, 3H, OCH₃). **¹³C NMR** (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 181.1 (C₃), 167.8 (C₆), 166.6 (C₈), 163.8 (C_{4'}), 150.4 (C_{2'}), 147.2 (C₂), 140.4 (C_{6'}), 126.0 (C₄), 122.1 (C_{1'}), 113.1 (C₉), 112.9 (C₇), 111.2 (-CH=), 107.4 (C_{5'}), 98.7 (C₅), 53.6 (OCH₃). **MS (ESI)** m/z 270 (M+H)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₁NO₄·0.75HCl: C, 60.73, H, 3.96, N, 4.72. Found: C, 60.54, H, 4.30, N, 4.80.

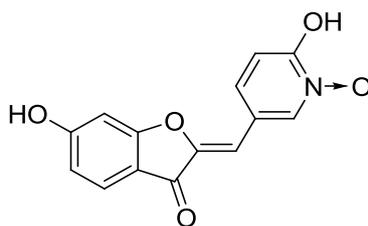


(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-6-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (31a). A solution of (Z)-2-((6-methoxypyridin-3-yl)methylene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (378 mg, 1.41 mmol) in acetic anhydride (8 mL) was refluxed for 5 hours. After cooling, the mixture was poured into water (60 mL) and then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **31a** (419 mg, 96%) as a pale yellow solid. C₁₇H₁₃NO₅. **m.p.** 190-192 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.60 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H_{2'}), 8.23 (dd, 1H, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, H_{6'}), 7.82 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₄), 7.14 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H₇), 6.97 (dd, 1H, *J*₁ = 8.3 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz, H₅), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_{5'}), 6.85 (s, 1H, -CH=), 4.01 (s, 3H, OCH₃), 2.37 (s, 3H, OCOCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.9 (C₃), 168.4 (C₆), 166.5 (C₈), 164.7 (C_{4'}), 157.3 (OCOCH₃), 150.9 (C_{2'}), 147.0 (C₂), 140.3 (C_{6'}), 125.6 (C₄), 121.9 (C_{1'}), 119.3 (C₉), 117.6 (C₅), 111.6 (-CH=), 110.1 (C_{5'}), 106.7 (C₇), 53.8 (OCH₃), 21.2 (OCOCH₃). **MS (ESI)** *m/z* 312 (M+H)⁺, 334 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₇H₁₃NO₅·0.25H₂O: C, 64.66, H, 4.28, N, 4.44. Found: C, 64.18, H, 4.02, N, 4.49.



(Z)-2-((6-Methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-6-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (32a). To a solution of (Z)-2-((6-methoxypyridin-3-yl)methylene)-6-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (1,000 mg, 3.22 mmol) in CH₂Cl₂ (40 mL) at 0 °C was added urea hydrogen peroxide adduct (1,280 mg, 12.88 mmol), followed by the addition of trifluoroacetic anhydride (1,790 μL, 12.88 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 16 hours. The mixture was then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with sodium thiosulfate, water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid, which was purified by flash chromatography on silica gel (gradient eluent CH₂Cl₂/methanol 98/2 to 90/10) to afford **32a** (658 mg, 63%) as a pure yellow solid. C₁₇H₁₃NO₆. **m.p.** 155-157 °C. ¹H NMR (400 MHz,

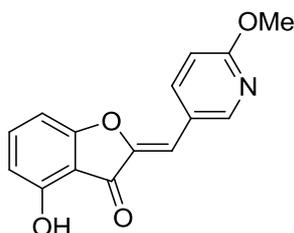
CDCl₃) δ 8.95 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H_{2'}), 7.77 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H₄), 7.65 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, H_{6'}), 7.13 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H₇), 6.97 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, H₅), 6.96 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_{5'}), 6.60 (s, 1H, -CH=), 4.13 (s, 3H, OCH₃), 2.35 (s, 3H, OCOCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 182.8 (C₃), 168.4 (C₆), 166.8 (C₈), 158.9, 157.9 (C₄, OCOCH₃), 148.0 (C₂), 141.5 (C_{2'}), 130.4 (C_{6'}), 125.9 (C₄), 123.5 (C_{1'}), 118.8 (C₉), 118.4 (C₅), 107.7 (C_{5'}), 107.0 (C₇), 106.6 (-CH=), 57.7 (OCH₃), 21.4 (OCOCH₃). MS (ESI) m/z 328 (M+H)⁺, 350 (M+Na)⁺. Anal. Calcd for C₁₇H₁₃NO₆·0.5H₂O: C, 60.71, H, 4.16, N, 4.16. Found: C, 60.74, H, 4.08, N, 4.41.



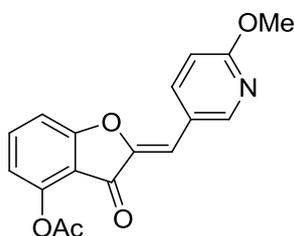
(Z)-2-((6-Hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-6-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (29a).

To a solution of (Z)-2-((6-methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-6-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (400 mg, 1.22 mmol) in methanol (6 mL) was added an aqueous solution of hydrochloric acid (10%, 4 mL) and the mixture was refluxed for 16 hours. After cooling, the precipitate was filtered and washed successively with water, methanol and diethyl ether to afford **29a** (274 mg, 83%) as a white solid. C₁₄H₉NO₅. m.p. > 280 °C. ¹H NMR (400 MHz, *d*₆-DMSO) δ 12.19 (br s, 1H, OH), 11.17 (s, 1H, OH), 8.56 (s, 1H, H_{2'}), 8.08 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, H_{6'}), 7.59 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H₄), 6.78 (s, 1H, H₇), 6.72 (s, 1H, -CH=), 6.65-6.70 (m, 2H, H_{5,5'}). ¹³C NMR (100 MHz, *d*₆-DMSO) δ 180.7 (C₃), 167.3 (C₆), 166.3 (C₈), 157.0 (C₄), 146.1 (C₂), 139.5 (C_{2'}), 138.6 (C_{6'}), 125.8 (C₄), 119.4 (C_{5'}), 113.0 (C_{7,9}), 110.6 (C_{1'}), 107.2 (-CH=), 98.6 (C₅). MS (ESI) m/z 270 (M-H)⁻. Anal. Calcd for C₁₄H₉NO₅·0.25H₂O: C, 60.98; H, 3.45; N, 5.08. Found: C, 60.73; H, 3.19; N, 5.22.

2.4.2 Synthesis of (Z)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one

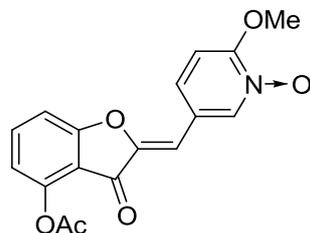


(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (30b). To a solution of 4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (200 mg, 1.33 mmol) in methanol (10 mL) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 1 mL), followed by the addition of 6-methoxy-3-pyridinecarboxaldehyde (183 mg, 1.33 mmol) and the mixture was reflux for 4 hours. After cooling, methanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust the pH to 2 – 3. The resulting precipitate was filtered and washed successively with water, acetonitrile, and diethyl ether to afford the hydrochloride salt of **30b** (337 mg, 94%) as a pale yellow solid. $C_{15}H_{11}NO_4$. **m.p.** > 260 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.24 (s, 1H, OH), 8.70 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, $H_{2'}$), 8.32 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, $H_{6'}$), 7.55 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6), 6.98 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, $H_{5'}$), 6.87 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_7), 6.81 (s, 1H, -CH=), 6.68 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_5), 3.92 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 180.9 (C_3), 165.8 (C_8), 163.7 ($C_{4'}$), 157.2 (C_4), 150.3 ($C_{2'}$), 146.3 (C_2), 140.2 ($C_{6'}$), 138.6 (C_6), 122.2 ($C_{1'}$), 111.1 (-CH=), 110.7 (C_5), 109.1 (C_9), 106.9 ($C_{5'}$), 102.4 (C_7), 53.6 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 268 (M-H) $^-$. **Anal.** Calcd for $C_{15}H_{11}NO_4 \cdot HCl \cdot 0.125H_2O$: C, 58.49, H, 3.98, N, 4.55. Found: C, 58.21, H, 4.26, N, 4.67.



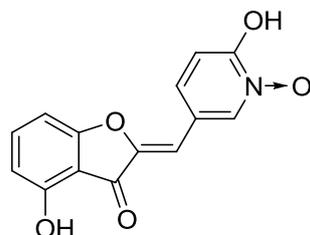
(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-4-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (31b). A solution of (Z)-2-((6-methoxypyridin-3-yl)methylene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (100 mg, 0.375 mmol) in acetic anhydride (2 mL) was refluxed for 5 hours. After cooling, the mixture was poured into water (15 mL) and then extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **31b** (97 mg, 84%) as a pale yellow solid. $C_{17}H_{13}NO_5$. **m.p.** 210-211 °C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.60 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, $H_{2'}$), 8.22 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz, $H_{6'}$), 7.65 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6), 7.18 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_7), 6.88 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_5), 6.85 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, $H_{5'}$), 6.78 (s, 1H, -CH=), 4.00 (s, 3H, OCH_3), 2.44 (s, 3H, $OCOCH_3$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 181.4 (C_3), 168.7 (C_4), 166.2 (C_8), 164.8 ($C_{4'}$), 151.1 ($C_{2'}$), 148.0 ($OCOCH_3$), 146.5 (C_2), 140.6 ($C_{6'}$), 137.8

(C₆), 122.1 (C_{1'}), 116.7 (C₅), 114.9 (C₇), 111.8 (-CH=), 110.6 (C_{5'}), 110.3 (C₉), 54.1 (OCH₃), 20.9 (OCOCH₃). **MS (ESI)** m/z 312 (M+H)⁺, 334 (M+Na)⁺.



(Z)-2-((6-Methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (32b).

To a solution of (Z)-2-((6-methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (385 mg, 1.24 mmol) in CH₂Cl₂ (20 mL) at 0 °C was added urea hydrogen peroxide adduct (507 mg, 4.96 mmol), followed by the addition of trifluoroacetic anhydride (710 μL, 4.96 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 5 hours. The mixture was then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with sodium thiosulfate, water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid, which was purified by flash chromatography on silica gel (gradient eluent CH₂Cl₂/methanol 98/2 to 90/10) to afford **32b** (242 mg, 60%) as a pure yellow solid. C₁₇H₁₃NO₆. **m.p.** > 190 °C (decomposition). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.05 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{2'}), 7.69 (t, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 7.64 (dd, 1H, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.0 Hz, H_{6'}), 7.24 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₇), 6.98 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, H_{5'}), 6.91 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 6.58 (s, 1H, -CH=), 4.16 (s, 3H, OCH₃), 2.43 (s, 3H, OCOCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 181.2 (C₃), 168.6 (C₄), 166.3 (C₈), 159.0 (C_{4'}), 148.0 (OCOCH₃), 147.4 (C₂), 141.6 (C_{2'}), 138.6 (C₆), 130.5 (C_{6'}), 123.6 (C_{1'}), 117.3 (C₅), 114.5 (C₇), 110.8 (C₉), 107.7 (C_{5'}), 106.6 (-CH=), 57.8 (OCH₃), 20.9 (OCOCH₃). **MS (ESI)** m/z 328 (M+H)⁺, 350 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₇H₁₃NO₆·0.25H₂O: C, 61.54, H, 4.07, N, 4.22. Found: C, 60.96, H, 3.91, N, 3.93.

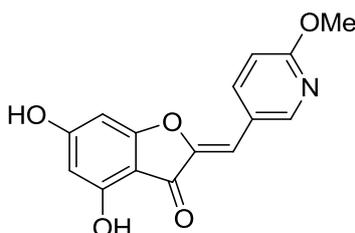


(Z)-2-((6-Hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4-hydroxybenzofuran-3(2H)-one (29b).

To a solution of (Z)-2-((6-methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4-acetoxybenzofuran-3(2H)-one (220 mg, 0.672 mmol) in methanol (3 mL) was added an aqueous solution of hy-

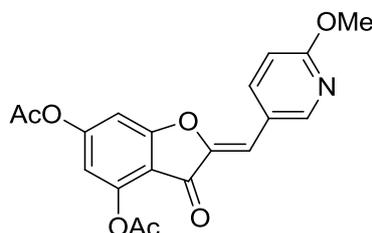
drochloric acid (10%, 3 mL) and the mixture was refluxed for 40 hours. After cooling, the precipitate was filtered and washed successively with water, methanol and diethyl ether to afford **29b** (138 mg, 76%) as a pale yellow solid. $C_{14}H_9NO_5$. **m.p.** 272-274 °C. 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 12.16 (br s, 1H, OH), 11.09 (s, 1H, OH), 8.56 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_2'), 8.06 (dd, 1H, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 2.2$ Hz, H_6'), 7.51 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6), 6.84 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_7), 6.70 (s, 1H, -CH=), 6.66 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H_5'), 6.61 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 180.6 (C_3), 165.5, 157.0 (C_4'), 145.3 (C_2), 139.4 (C_2'), 138.6 (C_6'), 138.4 (C_6), 119.4 (C_5'), 110.8 (C_5), 110.5 (C_1'), 109.3 (C_9), 106.8 (-CH=), 102.5 (C_7). **MS (ESI)** m/z 270 (M-H) $^-$. **Anal.** Calcd for $C_{14}H_9NO_5 \cdot 0.33H_2O$: C, 60.64, H, 3.49, N, 5.05. Found: C, 60.63, H, 3.36, N, 4.83.

2.4.3 Synthesis of (Z)-2-((6-hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one

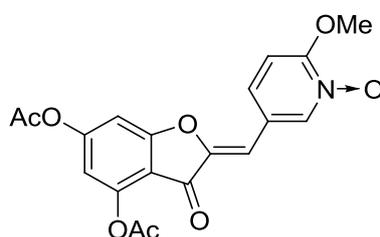


(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (30c). To a solution of 4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (364 mg, 2.19 mmol) in ethanol (7 mL) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 9 mL), followed by the addition of 6-methoxy-3-pyridinecarboxaldehyde (300 mg, 2.19 mmol) and the mixture was reflux for 6 hours. After cooling, ethanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water and an aqueous solution of hydrochloric acid (10%) was added to adjust the pH to 2 – 3. The resulting precipitate was filtered and washed successively with water, acetonitrile, and diethyl ether to afford the hydrochloride salt of **30c** (656 mg, 93%) as a pale yellow solid. $C_{15}H_{11}NO_5$. **m.p.** > 210 °C (decomposition). 1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 11.02 (br s, 2H, OH), 8.64 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_2'), 8.26 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.2$ Hz, H_6'), 6.95 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_5'), 6.64 (s, 1H, -CH=), 6.24 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_7), 6.12 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz, H_5), 3.90 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 178.7 (C_3), 167.6, 167.4 (C_4 , C_6), 163.4 (C_4'), 158.4 (C_8), 149.7 (C_2'), 147.5 (C_2), 140.1 (C_6'), 122.4 (C_1'), 111.0 (-CH=), 105.0 (C_5'), 102.5 (C_9), 97.8 (C_5), 90.6 (C_7), 53.5 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z

284 (M-H)⁻. **Anal.** Calcd for C₁₅H₁₁NO₅·HCl·3H₂O: C, 48.06, H, 4.54, N, 3.74. Found: C, 48.16, H, 4.70, N, 3.81.

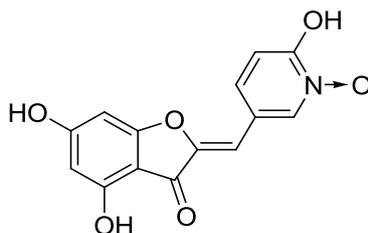


(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-diacetoxybenzofuran-3(2H)-one (31c). A solution of (Z)-2-((6-methoxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (400 mg, 1.40 mmol) in acetic anhydride (8 mL) was refluxed for 16 hours. After cooling, the mixture was poured into water (60 mL) and then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **31c** (378 mg, 73%) as a pale yellow solid. C₁₉H₁₅NO₇. **m.p.** 212-214 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, H₂'), 8.19 (dd, 1H, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, H₆'), 7.04 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 6.85 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H₅'), 6.78 (s, 1H, -CH=), 6.70 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₅), 4.00 (s, 3H, OCH₃), 2.43 (s, 3H, OCOCH₃), 2.36 (s, 3H, OCOCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 180.2 (C₃), 168.1, 168.0 (C₄, C₆), 166.3 (C₈), 164.7 (C₄'), 157.8 (6-OCOCH₃), 150.9 (C₂'), 148.3 (4-OCOCH₃), 146.8 (C₂), 140.4 (C₆'), 121.8 (C₁'), 112.4 (C₉), 111.7 (-CH=), 110.9 (C₅), 110.3 (C₅'), 104.2 (C₇), 54.0 (OCH₃), 21.3 (6-OCOCH₃), 20.7 (4-OCOCH₃). **MS (ESI)** *m/z* 370 (M+H)⁺, 392 (M+Na)⁺. **Anal.** Calcd for C₁₉H₁₅NO₇·0.33H₂O: C, 60.80, H, 4.18, N, 3.73. Found: C, 60.66, H, 3.86, N, 3.76.

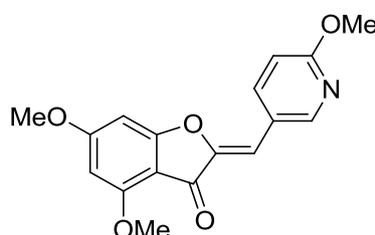


(Z)-2-((6-Methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-diacetoxybenzofuran-3(2H)-one (32c). To a solution of (Z)-2-((6-methoxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-diacetoxybenzofuran-3(2H)-one (309 mg, 0.837 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) at 0 °C was added urea hydrogen peroxide adduct (317 mg, 3.35 mmol), followed by the addition of trifluoroacetic anhydride (470 μL, 3.35 mmol), and the mixture was stirred at room temperature for 16 hours. The mixture was then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with sodium thio-

sulfate, water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid, which was purified by flash chromatography on silica gel (gradient eluent CH_2Cl_2) to afford **32c** (81 mg, 25%) as a pure yellow solid. $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_8$. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.02 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_2'), 7.70 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, H_6'), 7.08 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_7), 7.01 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_5'), 6.75 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_5), 6.58 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 4.17 (s, 3H, OCH_3), 2.42 (s, 3H, OCOCH_3), 2.37 (s, 3H, OCOCH_3).



(Z)-2-((6-Hydroxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-dihydroxybenzofuran-3(2H)-one (29c). To a solution of (Z)-2-((6-methoxy-1-oxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-diacetoxybenzofuran-3(2H)-one (50 mg, 0.130 mmol) in methanol (1.5 mL) was added an aqueous solution of hydrochloric acid (10%, 1 mL) and the mixture was refluxed for 16 hours. After cooling, the precipitate was filtered and washed successively with water, methanol and diethyl ether to afford **29c** (27 mg, 72%) as a pale yellow solid. $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_6$. **m.p.** > 250 °C (decomposition). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 12.12 (br s, 1H, OH), 10.92 (s, 1H, OH), 10.87 (s, 1H, OH), 8.50 (s, 1H, H_2'), 8.02 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, H_6'), 6.54 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 6.20 (s, 1H, H_7), 6.06 (s, 1H, H_5). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 178.4 (C_3), 167.3, 167.1 (C_4 , C_6), 158.1 (C_8), 156.8 (C_4'), 146.3 (C_2), 138.6, 138.4 (C_2' , C_6'), 119.2 (C_5'), 110.8 (C_1'), 104.7 ($-\text{CH}=\text{}$), 102.6 (C_9), 97.6 (C_5), 90.5 (C_7). **MS (ESI)** m/z 286 (M-H) $^-$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{NO}_6 \cdot 0.125\text{H}_2\text{O}$: C, 58.08, H, 3.20, N, 4.84. Found: C, 57.67, H, 3.15, N, 4.80.



(Z)-2-((6-Methoxypyridin-3-yl)methylene)-4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (30d). To a solution of 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2H)-one (1.00 g, 5.15 mmol) in methanol (100 mL) were added an aqueous solution of potassium hydroxide (50%, 7 mL), followed by the addition of 6-methoxy-3-pyridinecarboxaldehyde (706 mg, 5.15 mmol) and the mixture was

stirred at room temperature for 3 hours. Methanol was removed under reduced pressure, then the residue was diluted into distilled water. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow solid, which was recrystallized from methanol to afford **30d** (1.33 mg, 83%) as pure yellow crystals. $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$. **m.p.** 196-197 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (s, 1H, H_2), 8.14 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_6), 6.78 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_5), 6.67 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{}$), 6.31 (s, 1H, H_7), 6.09 (s, 1H, H_5), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 180.4 (C_3), 169.1, 168.9 (C_4 , C_6), 164.4 (C_4), 159.6 (C_8), 150.4 (C_2), 147.8 (C_2), 140.2 (C_6), 122.5 (C_1), 111.4 ($-\text{CH}=\text{}$), 107.6 (C_5), 105.4 (C_9), 94.2 (C_5), 89.4 (C_7), 56.4 (OCH_3), 56.3 (OCH_3), 53.9 (OCH_3). **MS (ESI)** m/z 314 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 336 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

2.5 RESOLUTION OF (+/-)-TRAMADOL USING (+)-DTTA

2.5.1 Preparation of the free base starting from hydrochloride or DTTA salt

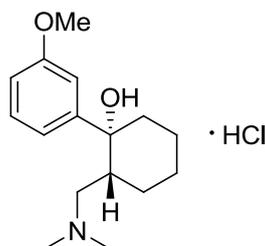
General procedure. To a mixture of a saturated solution of NaHCO_3 in water (16 mL) and solid Na_2CO_3 (400 mg) was added portionwise a hydrochloric or DTTA salt of (+/-)-tramadol (7 mmol). Once the solids had dissolved, the solution was extracted with CH_2Cl_2 . The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford the free base as a colorless oil (1.77 g, 96%).

2.5.2 Resolution via the formation of diastereomers

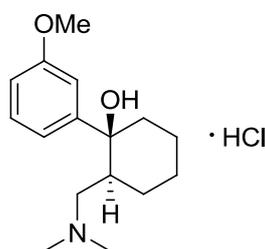
General procedure. To a solution of (+/-)-tramadol free base (704 mg, 2.83 mmol) in ethanol (2.5 mL) at 70 °C was added a solution of D-(+)-DTTA (1.03 g, 2.67 mmol) in ethanol (10 mL) at 70 °C. The mixture was stirred at 70 °C for 30 minutes then slowly cooled to 25 °C. After triturating the solution, the white precipitate was recovered by filtration, washed with cold ethanol and dried to afford a DTTA–tramadol salt as a colorless oil (650 mg, 1.00 mmol). The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford another DTTA–tramadol salt as a colorless oil (1.09 g, 1.67 mmol).

2.5.3 Preparation of hydrochloride salt of tramadol

General procedure. The tramadol free base was diluted in a saturated solution of HCl in diethyl ether then the solid was filtered and poured in fresh diethyl ether. This procedure was repeated three times, and the solid was filtered, washed with diethyl ether then dried to afford the hydrochloride salt of tramadol as a white solid.



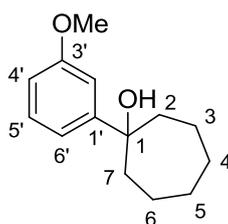
(1*R*,2*R*)-(+)-Tramadol hydrochloride. HPLC analysis. The injection volume was 5 μ L. Analytes were eluted with an isocratic mobile phase (hept/IPA/DEA = 97/3/0.1, v/v/v) at a flow rate of 1 mL/min for 11 min. Column temperature was set at 30 °C. Detection wavelength was set at 270 nm. E.e. 97.8%. $[\alpha]_D = +35.5$ ($c = 0.375$, MeOH), lit.³⁶⁵ $[\alpha]_D = +34.3$ ($c = 1.22$, MeOH).



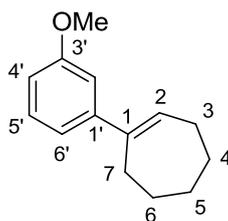
(1*S*,2*S*)-(-)-Tramadol hydrochloride. HPLC analysis. The procedure was similar as above. E.e. 92.7%. $[\alpha]_D = -37.3$ ($c = 0.308$, MeOH), lit.³⁶⁵ $[\alpha]_D = -34.3$ ($c = 1.27$, MeOH).

2.6 SYNTHESIS OF 7-OXOHEPTANAL DERIVATIVES

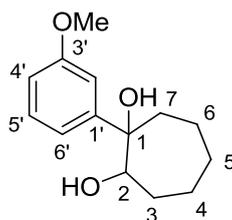
2.6.1 Synthesis of 7-(3-methoxyphenyl)-7-oxoheptanal



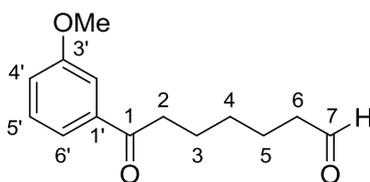
1-(3-Methoxyphenyl)cycloheptanol (34). To a solution of bromoanisole (1,000 mg, 5.35 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was added a 2.5 M solution of *n*-BuLi in hexanes (2.15 mL, 5.35 mmol) at -78 °C, and the mixture was stirred at -78 °C for 45 minutes. A solution of cycloheptanone (545 mg, 4.86 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was then added and the mixture was stirred at -78 °C for 2 hours. The solvents were removed under reduced pressure then the residue was diluted into distilled water and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a yellow oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂) to afford **34** (984 mg, 92%) as a pure colorless oil. C₁₄H₂₀O₂. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.27 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{5'}), 7.07-7.13 (m, 2H, H_{2',6'}), 6.80 (dd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, H_{4'}), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 1.55-2.10 (m, 12H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.7 (C_{3'}), 152.9 (C_{1'}), 129.4 (C_{5'}), 117.1 (C_{6'}), 111.7, 110.9 (C_{2', 4'}), 77.2 (C₁), 55.4 (OCH₃), 43.4 (C_{2,7}), 29.3 (C_{4,5}), 22.8 (C_{3,6}). MS (ESI) *m/z* 219 (M-H)⁻.



1-(3-Methoxyphenyl)cyclohept-1-ene (35). To a solution of 1-(3-methoxyphenyl)cycloheptanol (964 mg, 4.38 mmol, **34**) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added trifluoroacetic acid (336 μL, 4.38 mmol) and the mixture was stirred at 25 °C for 1 hour. Water was added and the mixture was extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **35** (750 mg, 100%) as a yellow oil which was analytically pure and used without purification. C₁₄H₁₈O. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{5'}), 7.00 (ddd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, *J*₃ = 1.0 Hz, H_{6'}), 6.95 (dd, 1H, *J*₁ = 2.5 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, H_{2'}), 6.83 (ddd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, *J*₃ = 1.0 Hz, H_{4'}), 6.19 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, H₂), 3.87 (s, 3H, OCH₃), 2.68 (m, 2H, CH₂), 2.36 (m, 2H, CH₂), 1.91 (m, 2H, CH₂), 1.60-1.75 (m, 4H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.6 (C_{3'}), 146.6 (C₁), 145.0 (C_{1'}), 130.6, 129.1 (C_{2, 5'}), 118.3 (C_{6'}), 111.6, 111.6 (C_{2', 4'}), 55.2 (OCH₃), 32.9 (CH₂), 32.8 (CH₂), 28.9 (CH₂), 27.0 (CH₂), 26.9 (CH₂).



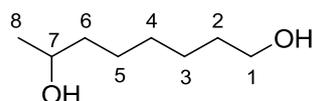
1-(3-Methoxyphenyl)cycloheptane-1,2-diol (36). To a solution of 1-(3-methoxyphenyl)cyclohept-1-ene (7.28 g, 36.0 mmol, **35**) in a mixture of THF (150 mL) and water (50 mL) were added a 4% aqueous solution of OsO₄ (11.5 mL) and a 50% aqueous solution of NMO (14 mL) and the mixture was stirred at 25 °C for 96 hours. A saturated aqueous solution of NaHSO₃ (50 mL) was added and the mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes then extracted with CH₂Cl₂. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **36** (8.00 g, 94%) as a brown oil which was analytically pure and used without purification. C₁₄H₂₀O₃. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{5'}), 7.10 (dd, 1H, *J*₁ = 2.5 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, H_{2'}), 7.04 (ddd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz, *J*₃ = 0.8 Hz, H_{6'}), 6.79 (ddd, 1H, *J*₁ = 8.0 Hz, *J*₂ = 2.5 Hz, *J*₃ = 0.8 Hz, H_{4'}), 3.96 (dd, 1H, *J*₁ = 10.5 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, H₂), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 1.45-2.05 (m, 10H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.8 (C_{3'}), 150.3 (C_{1'}), 129.5 (C_{5'}), 117.0 (C_{6'}), 112.0, 111.1 (C_{2'}, C_{4'}), 78.9 (C₁), 55.3 (OCH₃), 39.0 (CH₂), 29.8 (CH₂), 26.7 (CH₂), 22.8 (CH₂), 20.1 (CH₂).



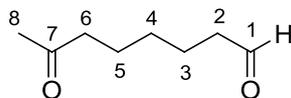
7-(3-Methoxyphenyl)-7-oxoheptanal (33). To a solution of 1-(3-methoxyphenyl)cycloheptane-1,2-diol (8.00 g, 33.9 mmol, **36**) in a mixture of THF (200 mL) and water (50 mL) was added NaIO₄ (9.90 g, 46.3 mmol) and the mixture was stirred at 25 °C for 48 hours. The suspension was filtered and the solid was washed three times with ethyl acetate. The filtrate was then extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a black oil which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent CH₂Cl₂/MeOH 99/1) to afford **33** (6.64 g, 84%) as a pure brown oil. C₁₄H₁₈O₃. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.78 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz, H₇), 7.53 (ddd, 1H, *J*₁ = 7.9 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, *J*₃ = 0.9 Hz, H_{6'}), 7.48 (dd, 1H, *J*₁ = 2.6 Hz, *J*₂ = 1.5 Hz, H_{2'}), 7.37 (t, 1H, *J* =

7.9 Hz, H_{5'}), 7.10 (ddd, 1H, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, $J_3 = 0.9$ Hz, H_{4'}), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 2.97 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, H₂), 2.47 (td, 2H, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, H₆), 1.76 (p, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 1.69 (p, 2H, $J = 7.3$ Hz, CH₂), 1.40-1.47 (m, 2H, CH₂). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 202.8 (C₇), 200.1 (C₁), 160.0 (C_{3'}), 138.5 (C_{1'}), 129.8 (C_{5'}), 120.9 (C_{6'}), 119.6 (C_{4'}), 112.5 (C_{2'}), 55.6 (OCH₃), 43.9 (C₆), 38.5 (C₂), 29.0 (C₄), 24.2 (C₃), 22.1 (C₅). MS (ESI) m/z 215 (M-H₃O)⁻, 233 (M-H)⁻.

2.6.2 Synthesis of 7-oxooctanal



Octane-1,7-diol (38). To a 1 M solution of LiAlH₄ in THF (12.0 mL, 12.0 mmol) was added dropwise a solution of 7-oxooctanoic acid (500 mg, 3.16 mmol) and the mixture was stirred at 25 °C for 4 hours. The solution was cooled to 0 °C and water (0.5 mL), a 15% solution of sodium hydroxide (0.5 mL) and water (1.5 mL) were sequentially added. The resulting mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes then the solid was filtered and washed with ethyl acetate. The filtrate was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford **38** (458 mg, 99%) as a colorless oil, which was analytically pure and used without purification. C₈H₁₈O₂. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.79 (br s, 2H, OH), 3.60 (m, 1H, H₇), 3.43 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, H₁), 1.10-1.45 (m, 10H, CH₂), 1.02 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz, H₈). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 67.6 (C₇), 62.2 (C₁), 39.0 (C₆), 32.5 (C₂), 29.4 (C₄), 25.7, 25.7 (C₃, C₈), 23.2 (C₅). MS (ESI) m/z 145 (M-H)⁻.



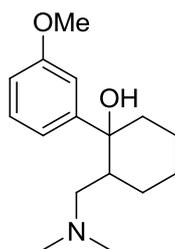
7-Oxooctanal (37). To a solution of octane-1,7-diol (400 mg, 2.74 mmol, **38**) in anhydrous CH₂Cl₂ (15 mL) was added PCC (1.77 g, 8.22 mmol) and the mixture was stirred at 25 °C for 3 hours. The solvents were then evaporated to afford a black oil, which was purified by flash chromatography on silica gel (eluent ethyl acetate/cyclohexane 1/1) to afford **37** (268 mg, 69%) as a pure colorless oil. C₈H₁₄O₂. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.65 (t, 1H, $J = 1.5$ Hz, H₁), 2.34 (m, 4H, H_{2,6}), 1.93 (s, 3H, H₈), 1.51 (m, 4H, H_{3,5}), 1.23 (m, 2H, H₄). MS (ESI) m/z 141 (M-H)⁻.

2.7 STANDARD PROCEDURES FOR ALDOLISATION/REDUCTION TRIALS

2.7.1 Procedure for L-proline-catalyzed intramolecular aldolisation

General procedure. To a solution of dicarbonyl compound (**33** or **37**) in anhydrous dichloromethane (20 mL/mmol) was added L-proline (0.1 equiv.), and the mixture was stirred at 25 °C for 24 hours. NaBH₄ (2 to 4 equiv.) was then added and the resulting mixture was stirred at 25 °C for another 24 hours. Water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a crude oil.

2.7.2 Synthesis of (+/-)-tramadol by dimethylamine-catalyzed intramolecular aldolisation and reduction



(+/-)-Tramadol. To a solution of **33** (200 mg, 0.855 mmol) in methanol (65 mL) was added a 2.0 M solution of dimethylamine in methanol (2.14 mL, 4.27 mmol), and the mixture was stirred at 25 °C for 24 hours. NaBH₃CN (108 mg, 1.71 mmol) was then added and the resulting mixture was stirred at 25 °C for another 24 hours. Water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water and brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure to afford a crude oil. The crude product of the reaction (0.6 mg) was dissolved in acetonitrile (1 mL), then filtered through a 25 mm diameter PTFE filter, porosity 0.2 μm, and analyzed by HPLC. The mobile phases were 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). The injection volume was 1.0 μL. An isocratic elution (80% A and 20% B) was done, at a flow rate of 0.5 mL/min. Column temperature was set at 30 °C and the total run time was 10 min. Detection wavelength was set at 254 nm. (+/-)-Tramadol was detected at 0.68 min (comparable to the reference), with a molecular mass of 264. The amount of (+/-)-tramadol is approximately 8% of the crude mixture.

Chapitre 3. Molecular docking procedure

Docking studies used the reported X-ray crystallographic structure of HCV genotype 1b RdRp complexed with a known inhibitor binding to Thumb pocket I of the enzyme (PDB code: 2dxs) [221]. The protein structure was extracted, and water molecules were deleted. The complexed ligand was used to define the binding site for docking and was successfully docked in a similar conformation in the pocket, using the same protocol as for auronones. The genetic algorithms of GOLD and Autodock4 docking software performed flexible docking with small molecules while keeping the protein structure rigid. All compounds were built and their energies minimized with Sybyl, using a conjugate gradient method and MMFF94 force field and charges. For each compound, 20 poses were generated by GOLD and ranked according to the Goldscore scoring function, while 100 poses were generated by Autodock4 and clustered according to their spatial proximity and calculated free energy of binding. Molecular surfaces were generated with MOLCAD, and the docking solutions were analyzed with Sybyl. The pictures presented in this report were built with Pymol (DeLano Scientific). Hydrogen bonds are represented with dotted red lines directly between the involved heteroatoms.

Partie 8.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1. Production scientifique associée à ces travaux

Articles scientifiques

Carole Dubois, Romain Haudecoeur, Maylis Orio, Catherine Belle, Constance Bochot, Ahcène Boumendjel, Renaud Hardré, Hélène Jamet, Marius Réglie. Aurone as versatile structure for modulation of the mushroom tyrosinase activity. *ChemBioChem*, accepté.

Romain Haudecoeur, Abdelhakim Ahmed-Belkacem, Wei Yi, Antoine Fortuné, Rozenn Brilllet, Catherine Belle, Edwige Nicolle, Coralie Pallier, Jean-Michel Pawlotsky, Ahcène Boumendjel. Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5395-5402.

Wei Yi, Carole Dubois, Samir Yahiaoui, Romain Haudecoeur, Catherine Belle, Huacan Song, Renaud Hardré, Marius Réglie, Ahcène Boumendjel. Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4330-4335.

Sélection de posters

Romain Haudecoeur, Abdelhakim Ahmed-Belkacem, Wei Yi, Antoine Fortuné, Jean-Michel Pawlotsky, Ahcène Boumendjel. Aurones as new, potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase. Présenté aux 25^{èmes} Journées Franco-belges de Pharmacochimie, 19-20 Mai 2011, Liège (Belgique) et aux 47^{èmes} Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, 6-8 Juillet 2011, Lyon (France).

Romain Haudecoeur, Carole Dubois, Ahcène Boumendjel, Catherine Belle, Marius Réglie. *N*-oxide aurones as new, potent and non-toxic tyrosinase inhibitors. Présenté au 240th *American Chemical Society National Meeting & Exposition, 22-26 Août 2010, Boston (États-Unis)*.

Sélection de conférences

Romain Haudecoeur. Aurones *N*-oxydées : de nouveaux inhibiteurs efficaces et non toxiques de la tyrosinase. Présentée à la *Journée de l'Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant, 21 Juin 2010, Grenoble (France)*.

Romain Haudecoeur, Stéphane Pautus, Antoine Fortuné. Le docking : outil d'aide à la conception de molécules bioactives. Présentée à la *Journée Scientifique du CECIC, 27 Novembre 2009, Grenoble (France)*.

Brevet

Ahcène Boumendjel, Romain Haudecoeur, Abdelhakim Ahmed-Belkacem, Jean-Michel Pawlowsky, Rozenn Brillet, Catherine Belle. Nouveaux dérivés hétérocycliques, pour leur activité antivirale, en particulier pour le traitement du VHC. FR 1056035, déposé le 23 Juillet 2010.

Chapitre 2. Données de cartographie

Principales références utilisées pour la construction de la carte en Figure 13

World Health Organization. Weekly epidemiological record **2000**, 75, 17-28.

World Health Organization. Weekly epidemiological record **2002**, 77, 41-48.

C. W. Shepard, L. Finelli, M. J. Alter. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* **2005**, 5, 558-567.

M. J. Alter. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* **2007**, 13, 2436-2441.

A. A. Modi, J. J. Feld. Viral hepatitis and HIV in Africa. *AIDS Rev.* **2007**, 9, 25-39.

J. J. Feld, P. Ocama, A. Ronald. The liver in HIV in Africa. *Antivir. Ther.* **2005**, 10, 953-965.

V. Madhava, C. Burgess, E. Drucker. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, 2, 293-302.

J. Seka-Seka, A. C. Yapo-Crezoit, R. Dasse Sery, P. Akre Dagra, F. Sohro, F. Sombo Mambo. Étude de la séroprévalence de l'hépatite virale C dans la population drépanocytaire en Côte d'Ivoire. *Médecine d'Afrique Noire* **1998**, 45, 35-38.

J. Simporé, A. Savadogo, D. Ilboudo, M.-C. Nadambega, M. Esposito, J. Yara, S. Pignatelli, V. Pietra, S. Musumeci. *Toxoplasma gondii*, HCV, and HBV seroprevalence and co-infection among HIV-positive and -negative pregnant women in Burkina Faso. *J. Med. Virol.* **2006**, 78, 730-733.

W. A. Alashek, M. Altagdi. Risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection in Libyan patients. *Libyan J. Med.* **2008**, *3*, 162-165.

S. Sutcliffe, T. E. Taha, N. I. Kumwenda, E. Taylor, G. N. Liomba. HIV-1 prevalence and herpes simplex virus 2, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections among male workers at a sugar estate in Malawi. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2002**, *31*, 90-97.

A. Benouda, Z. Boujdiya, S. Ahid, R. Abouqal, M. Adnaoui. Prévalence de l'infection par le virus de l'hépatite-C au Maroc et évaluation des tests sérologiques de dépistage pour la prédiction de la virémie. *Pathol. Biol.* **2009**, *57*, 368-372.

E. Vardas, F. Sitas, K. Seidel, A. Casteling, J. Sim. Prévalence des anticorps antiviral de l'hépatite C et des génotypes chez les nouveaux donneurs de sang asymptomatiques en Namibie. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé* **2000**, *2*, 146-153.

M. Plamondon, A.-C. Labbé, E. Frost, S. Deslandes, A. C. Alves, N. Bastien, J. Pepin. Hepatitis C virus infection in Guinea-Bissau: A sexually transmitted genotype 2 with parenteral amplification? *PLoS One*, **2007**, *2*, e372.

A. Konate, M. Diarra, D. Minta, M. Dembele, I. Maiga, D. Sangare, S. Maiga, H. A. Traoré, M. Y. Maiga, C. Payan, F. Lunel, B. Carbonnelle, P. Cales. Place de l'infection par le virus de l'hépatite C au cours des hépatopathies chroniques au Mali. *Mali Médical* **2005**, *3*, 11-14.

J. I. Esteban, S. Saudela, J. Quer. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* **2008**, *48*, 148-162.

N. V. Naoumov. Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J. Hepatol.* **1999**, *31*, 84-87.

S. Merkinaite, J. V. Lazarus, C. Gore. Addressing HCV infection in Europe: Reported, estimated and undiagnosed cases. *Cent. Eur. J. Public Health* **2008**, *16*, 106-110.

N. Antaki, M. Haddad, K. Kebbewar, J. Abdelwahab, O. Hamed, R. Aaraj, N. Alhaj, S. Haffar, M. Assil, M. Ftayeh, F. Assaad, D. Doghman, T. Ali, M. Nassereldine, A. Ali, F. Antaki. The unexpected discovery of a focus of hepatitis C virus genotype 5 in a Syrian province. *Epidemiol. Infect.* **2009**, *137*, 79-84.

A. I. Sharara, S. Ramia, F. Ramlawi, J. Eid Fares, S. Klayme, R. Naman. Genotypes of hepatitis C virus (HCV) among Lebanese patients: Comparison of data with that from other Middle Eastern countries. *Epidemiol. Infect.* **2007**, *135*, 427-432.

- S.-M. Alavian, P. Adibi, M.-R. Zali. Hepatitis C virus in Iran: Epidemiology of an emerging infection. *Arch. Iranian Med.* **2005**, *8*, 84-90.
- K. Stvilia, T. Tsertsvadze, L. Sharvadze, M. Aladashvili, C. del Rio, M. H. Kuniholm, K. E. Nelson. Prevalence of hepatitis C, HIV, and risk behaviors for blood-borne infections: A population-based survey of the adult population of T'bilisi, Republic of Georgia. *J. Urban Health* **2006**, *83*, 289-298.
- Z. Z. Nurgalieva, F. B. Hollinger, D. Y. Graham, S. Zhangabylova, A. Zhangabylov. Epidemiology and transmission of hepatitis B and C viruses in Kazakhstan. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 1204-1207.
- O. Baatarkhuu, D. Y. Kim, S. H. Ahn, P. Nymadawa, Y. Dahgwahdorj, M. Shagdarsuren, J. Y. Park, J. W. Choi, J. Oyunbileg, T. Oyunsuren, K. H. Han. Prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus among apparently healthy individuals in Mongolia: A population-based nationwide study. *Liver Int.* **2008**, *28*, 1389-1395.
- P. Jutavijittum, A. Yousukh, B. Samounry, A. Ounavong, T. Thammavong, J. Keokhamphue, K. Toriyama. Seroprevalence of hepatitis B and C virus infections among Lao blood donors. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2007**, *38*, 674-679.
- A. Tulisov, B. J. McMahon, A. Koch, G. Minuk, V. Chulanov, M. G. Bruce, J. Uhanova, M. Borresen, J. Williams, C. Osiowy, A. Gelvan, M. Alexeeva, B. Larke, K. Watt. Viral hepatitis in the Arctic. A review from a circumpolar workshop on viral hepatitis, ICCH13. *Alaska Med.* **2007**, *49*, 193-203.

Chapitre 3. Notes et références

- [1] A. Gurib-Fakim. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **2006**, *27*, 1-93.
- [2] J. W.-H. Li, J. C. Vederas. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* **2009**, *325*, 161-165.
- [3] F. E. Koehn, G. T. Carter. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206-220.
- [4] A. M. Boldi. Libraries from natural product-like scaffolds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 281-286.
- [5] D. Vital Durand, C. Le Jeune. *Guide pratique des médicaments Dorosz*, 29^e édition, Maloine, Paris, **2010**, pp 608-609.
- [6] H.-K. Wang. The therapeutic potential of flavonoids. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2103-2119.
- [7] G. A. Cordell, M. L. Quinn-Beattie, N. R. Farnsworth. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 183-205.
- [8] A. Boumendjel. Aurones: A subclass of flavones with promising biological potential. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 2621-2630.
- [9] T. Iwashina. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant. Res.* **2000**, *113*, 287-299.
- [10] A. G. Serbin, M. I. Borisov, V. T. Chernobai, I. P. Kovalev, V. G. Gordienko. Flavonoids of *Bidens tripartite*. III. *Chem. Nat. Comp.* **1975**, *11*, 160-162.
- [11] M. I. Borisov, T. I. Isakova, A. G. Serbin. Flavonoids of *Bidens cernua*. *Chem. Nat. Comp.* **1979**, *15*, 197-198.

- [12] S. Venkateswarlu, G. K. Panchagnula, G. V. Subbaraju. Synthesis and antioxidative activity of 3',4',6,7-tetrahydroxyaurone, a metabolite of *Bidens frondosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 2183-2185.
- [13] Y.-L. Li, J. Li, N.-L. Wang, X.-S. Yao. Flavonoids and a new polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. *Molecules* **2008**, *13*, 1931-1941.
- [14] M. Shimokoriyama, S. Hattori. Anthochlor pigments of *Cosmos sulphureus*, *Coreopsis lanceolata* and *C. saxicola*. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1900-1904.
- [15] T. A. Geissman, L. Jurd. Anthochlor pigments. IX. The structure of the aurone pigment of *Cosmos sulphureus*, "Orange flare" and "Yellow flare". *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4475-4476.
- [16] T. A. Geissman, J. B. Harborne, M. K. Seikel. Anthochlor pigments. XI. The constituents of *Coreopsis maritima*. Reinvestigation of *Coreopsis gigantea*. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 825-829.
- [17] E. A. Julian, D. J. Crawford. Sulphuretin glycosides of *Coreopsis mutica*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1841-1843.
- [18] M. Shimokoriyama, T. A. Geissman. Anthochlor pigments. XIV. The pigments of *Viguiera multiflora* (Nutt.) and *Baeria chrysostoma* (F. and M.). *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1956-1959.
- [19] C. G. Nordström, T. Swain. The flavonoid glycosides of *Dahlia variabilis*. II. Glycosides of yellow varieties "Pius IX" and "Coton". *Arch. Biochem. Biophys.* **1956**, *60*, 329-344.
- [20] E. E. Schilling. Flavonoids of *Helianthus* series *Angustifolii*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1983**, *11*, 341-344.
- [21] A. A. Alfatafta, C. A. Mullin. Epicticular terpenoids and an aurone from flowers of *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4109-4113.
- [22] R. Hänsel, L. Langhammer. *Helichrysum bracteatum*: über die Identität von natürlichem Bracteatin mit synthetischem 4,6,3',4',5'-Pentahydroxy-auron. *Archiv der Pharmazie* **1963**, *296*, 619-622.
- [23] T. Morikawa, L.-B. Wang, S. Nakamura, K. Ninomiya, E. Yokoyama, H. Matsuda, O. Muraoka, L.-J. Wu, M. Yoshikawa. Medicinal flowers. XXVII. New flavanone and chalcone glycosides, arenariumosides I, II, III, and IV, and tumor necrosis factor- α in-

- hibitors from everlasting, flowers of *Helichrysum arenarium*. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 361-367.
- [24] J. B. Harborne, A. R. Girija, H. M. Devi, N. K. M. Lakshmi. Anthochlor pigments from the petals of *Mussaenda hirsutissima* and *Zinnia linearis*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2741-2742.
- [25] B. A. Bohm, S. Berlow, T. F. Stuessy. Flavonoid variation in *Clibadium trianae* and *C. surinamense*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2743-2744.
- [26] B. A. Bohm, N. A. M. Saleh, R. Ornduff. The flavonoids of *Lasthenia* (Compositae). *Amer. J. Bot.* **1974**, *61*, 551-561.
- [27] J. B. Harborne. Variations in pigment patterns in *Pyrrhopappus* and related taxa of the Cichorieae. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 927-928.
- [28] M. Milovanovic, K. Picuric-Jovanovic, V. Djermanovic, M. Stefanovic. Antioxidant activities of the constituents of *Picris echioides*. *J. Serb. Chem. Soc.* **2002**, *66*, 7-15.
- [29] S. Asen, K. H. Norris, R. N. Stewart. Copigmentation of aurone and flavone from petals of *Antirrhinum majus*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2739-2741.
- [30] J. B. Harborne. Plant polyphenols. X. Flavone and aurone glycosides of *Antirrhinum*. *Phytochemistry* **1963**, *2*, 327-334.
- [31] B. Valdés. Flavonoid pigments in flower and leaf of the genus *Linaria* (Scrophulariaceae). *Phytochemistry* **1970**, *9*, 1253-1260.
- [32] J. B. Harborne. Comparative biochemistry of flavonoids—II. 3-Desoxyanthocyanins and their systematic distribution in ferns and gesnerads. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 589-600.
- [33] J. B. Harborne. Comparative biochemistry of the flavonoids—VI. Flavonoid patterns in the Bignoniaceae and the Gesneriaceae. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 1643-1651.
- [34] J. B. Harborne. Comparative biochemistry of flavonoids—I. Distribution of chalcone and aurone pigments in plants. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 111-115.
- [35] S. Asen, J. R. Plimmer. 4,6,4'-Trihydroxyaurone and other flavonoids from *Limonium*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2601-2603.
- [36] N. Saito, J. Cheng, M. Ichimura, M. Yokoi, Y. Abe, T. Honda. Flavonoids in the acyanic flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 687-691.

- [37] I. G. Varassin, J. R. Trigo, M. Sazima. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Bot. J. Linnean Soc.* **2001**, *136*, 139-152.
- [38] S. McCormick, T. J. Mabry. The flavonoids of *Passiflora sexflora*. *J. Nat. Prod.* **1982**, *45*, 782.
- [39] E. Ono, M. Fukuchi-Mizutani, N. Nakamura, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, M. Yamaguchi, T. Nakayama, T. Tanaka, T. Kusumi, Y. Tanaka. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *PNAS* **2006**, *29*, 11075-11080.
- [40] J. B. Harborne. Flavonoids and the evolution of the Angiosperms. *Biochem. Syst. Ecol.* **1977**, *5*, 7-22.
- [41] M. K. Seikel, T. A. Geissman. Anthochlor pigments. VII. The pigments of yellow *Antirrhinum majus*. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 5725-5730.
- [42] T. Nakayama, K. Yonekura-Sakakibara, T. Sato, S. Kikuchi, Y. Fukui, M. Fukuchi-Mizutani, T. Uead, M. Nakao, Y. Tanaka, T. Kusumi, T. Nishino. Aureusidin synthase: a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *Science* **2000**, *290*, 1163-1166.
- [43] T. A. Geissman, J. B. Harborne. Anthochlor pigments. X. Aureusin and cernuoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4622-4624.
- [44] J. B. Harborne, T. A. Geissman. Anthochlor pigments. XII. Maritimetin and marein. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 829-832.
- [45] J. M. Olesen, N. Ronsted, U. Tolderlund, C. Cornett, P. Molgaard, J. Madsen, C. G. Jones, C. E. Olsen. Mauritian red nectar remains a mystery. *Nature* **1998**, *393*, 529.
- [46] H. S. Rosenkranz, G. Klopman. The mysterious Mauritian red nectar: A selective toxicant? *Naturwissenschaften* **1999**, *86*, 404-405.
- [47] D. M. Hansen, J. M. Olesen, T. Mione, S. D. Johnson, C. B. Müller. Coloured nectar: Distribution, ecology, and evolution of an enigmatic floral trait. *Biol. Rev.* **2007**, *82*, 83-111.
- [48] K. M. Barry, R. Mihara, N. W. Davies, T. Mitsunaga, C. L. Mohammed. Polyphenols in *Acacia mangium* and *Acacia auriculiformis* heartwood with reference to heart rot susceptibility. *J. Wood Sci.* **2005**, 615-621.

- [49] W.-L. A. Chu, F. R. Jensen, T. B. Jensen, J. B. McAlpine, B. Sokilde, A. M. Santana-Sorensen, S. Ratnayake, J. B. Jiang, C. Noble, A. M. Stafford. Substituted aurone derivatives. Patent U.S. US 6307070, **2001**.
- [50] F. Gomez-Garibay, R. Reyes-Chilpa, L. Quijano, J. S. C. Pardo, T. R. Castillo. Methoxy furan auranols with fungistatic activity from *Lonchocarpus castilloi*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 459-463.
- [51] R. Reyes-Chilpa, N. Viveros-Rodriguez, F. Gomez-Garibay, D. Alavez-Solano. Antitermitic activity of *Lonchocarpus castilloi* flavonoids and heartwood extracts. *J. Chem. Ecol.* **1995**, *21*, 455-463.
- [52] A. M. Lawson. Étude phytochimique d'une Fabacée tropicale, *Lonchocarpus nicou*. Évaluation biologique préliminaire. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, **2006**.
- [53] T. G. Fourie, I. C. du Preez, D. G. Roux. 3',4',7,8-Tetrahydroxyflavonoids from the heartwood of *Acacia nigrescens* and their conversion products. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1763-1770.
- [54] F. Imperato. A new chalcone glucoside and cernuoside from the flowers of *Acacia dealbata*. *Cell Life Mol. Sci.* **1982**, *38*, 67-68.
- [55] P. Mohan, T. Joshi. Two aurone glycosides from the flowers of *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1287-1288.
- [56] P. Mohan, T. Joshi. Two anthochlor pigments from heartwood of *Pterocarpus marsupium*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2529-2530.
- [57] A. N. Kesari, R. K. Gupta, G. Watal. Two aurone glycosides from heartwood of *Pterocarpus santalinus*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3125-3129.
- [58] D. G. Furth, D. A. Young. Relationships of herbivore feeding and plant flavonoids (Coleoptera: Chrysomelidae and Anacardiaceae: *Rhus*). *Oecologia* **1988**, *74*, 496-500.
- [59] K.-Y. Park, G.-O. Jung, K.-T. Lee, J. Choi, M.-Y. Choi, G.-T. Kim, H.-J. Jung, H.-J. Park. Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J. Ethnopharm.* **2004**, *90*, 73-79.
- [60] F. E. King, T. J. King, D. W. Rustidge. 227. The chemistry of extractives from hardwoods. Part XXXIII. Extractives from *Melanorrhæa* spp. (rengas). *J. Chem. Soc.* **1962**, 1192-1194.

- [61] S. Tachibana, M. Sumimoto. Studies on pitch troubles caused by pulping and bleaching of tropical woods. Pt. VI. Phenolic wood extractives responsible for the yellow specks. *Holzforschung* **1980**, *34*, 131-138.
- [62] D. A. Young. Flavonoid chemistry and the phylogenetic relationships of the Julianiaceae. *Systematic Botany* **1976**, *1*, 149-162.
- [63] B. S. Wannan. Analysis of generic relationships in Anacardiaceae. *Blumea* **2006**, *51*, 165-195.
- [64] L. Valianou, K. Stathopoulou, I. Karapanagiotis, P. Magiatis, E. Pavlidou, A.-L. Skaltsounis, Y. Chryssoulakis. Phytochemical analysis of young fustic (*Cotinus coggygria* heartwood) and identification of isolated colourants in historical textiles. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 871-882.
- [65] D. Mantzouris, I. Karapanagiotis, L. Valianou, C. Panayiotou. HPLC-DAD-MS analysis of dyes identified in textiles from Mount Athos. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 3065-3079.
- [66] H. E. Westenburg, K.-J. Lee, S. K. Lee, H. H. S. Fong, R. B. van Breemen, J. M. Pezuto, A. D. Kinghorn. Activity-guided isolation of antioxidative constituents of *Cotinus coggygria*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1696-1698.
- [67] R. Bekker, E. V. Brandt, D. Ferreira. Structure and stereochemistry of the first isoflavanone-benzofuranone biflavonoids. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6407-6410.
- [68] R. Bekker, E. V. Brandt, D. Ferreira. Biflavonoids. Part 4. Structure and stereochemistry of novel flavanone- and the first isoflavanone-benzofuranone biflavonoids. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 10005-10012.
- [69] R. Bekker, D. Ferreira, J. J. Swart, E. V. Brandt. Biflavonoids. Part 5: Structure and stereochemistry of the first bibenzofuranoids. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 5297-5302.
- [70] N. C. Veitch, R. J. Grayer. Chalcones, dihydrochalcones and aurones, in *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*, O. M. Andersen, K. R. Markham, Eds., Taylor & Francis/CRC, Boca Raton, **2006**, pp 1003-1100.
- [71] K. Yoshikawa, K. Eiko, N. Mimura, Y. Kondo, S. Arihara. Hovetrichosides C–G, five new glycosides of two auronols, two neolignans, and a phenylpropanoid from the bark of *Hovenia trichocarea*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 786-790.
- [72] X.-C. Li, L. Cai, C. D. Wu. Antimicrobial compounds from *Ceanothus americanus* against oral pathogens. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 97-102.

- [73] E. Wong. Occurrence and biosynthesis of 4',6-dihydroxyaurone in soybean. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 463-467.
- [74] M. A. Farag, B. E. Deavours, A. de Fatima, M. Naoumkina, R. A. Dixon, L. W. Sumner. Integrated metabolite and transcript profiling identify a biosynthetic mechanism for hispidol in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* **2009**, *151*, 1096-1113.
- [75] G. Ye, C.-H. Ma, X.-Y. Huang, Z.-X. Li, C.-G. Huang. Components of *Sophora alopecuroides* seeds. *Chem. Nat. Comp.* **2009**, *45*, 545-546.
- [76] S. D. Jang, E. J. Park, M. E. Hawthorne, J. S. Vigo, J. G. Graham, F. Cabieses, B. D. Santarsiero, A. D. Mesecar, H. H. S. Fong, R. G. Mehta, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn. Potential cancer chemopreventive constituents of the seeds of *Dipteryx odorata* (tonka bean). *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 583-587.
- [77] G. Magela V. J., C. M. de M. Sousa, A. J. Cavalheiro, J. H. G. Lago, M. H. Chaves. Phenolic derivatives from fruits of *Dipteryx lacunifera* Ducke and evaluation of their antiradical activities. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 2159-2167.
- [78] H. Wei, P. Wu, X. Ge, M. Liu, X. Wei. Chemical constituents of the seeds of *Ammopiptanthus* (Leguminosae) and their systematic and ecological significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 274-280.
- [79] W. Li, Y. Asada, T. Yoshikawa. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 447-456.
- [80] S. S. Nigam, V. K. Saxena. Isolation and study of the aurone glycoside leptosin from the leaves of *Flemingia strobilifera*. *Planta Med.* **1975**, *27*, 98-100.
- [81] P. W. Pare, N. Dmitrieva, T. J. Mabry. Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspension culture. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1133-1135.
- [82] H. T. Clifford, J. B. Harborne. Flavonoid pigmentation in the sedges (Cyperaceae). *Phytochemistry* **1969**, *8*, 123-126.
- [83] J. B. Harborne, C. A. Williams, K. L. Wilson. Flavonoids in leaves and inflorescences of Australian *Cyperus* species. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2491-2507.
- [84] R. M. Seabra, M. M. Moreira, M. A. Cruz Costa, M. I. Paul. 6,3',4'-trihydroxy-4-methoxy-5-methylaurone from *Cyperus capitatus*. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1579-1580.

- [85] R. M. Seabra, P. B. Andrade, F. Ferreres, M. M. Moreira. Methoxylated aurones from *Cyperus capitatus*. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 839-840.
- [86] R. M. Seabra, A. M. S. Silva, P. B. Andrade, M. M. Moreira. Methylaurones from *Cyperus capitatus*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1429-1432.
- [87] S. K. Bhatt, V. K. Saxena, K. V. Singh. A leptosidin glycoside from leaves of *Cyperus scariosus*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2605.
- [88] M. Morimoto, H. Fukumoto, T. Nozoe, A. Hagiwara, K. Komai. Synthesis and insect antifeedant activity of aurones against *Spodoptera litura* larvae. *J. Agric. Food. Chem.* **2007**, *55*, 700-705.
- [89] K. R. Markham, L. J. Porter. Production of an aurone by bryophytes in the reproductive phase. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 159-160.
- [90] S. Weitz, R. Ikan. Bracteatin from the moss *Funaria hygrometrica*. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1108-1109.
- [91] H. Hahn, T. Seeger, H. Geiger, H. D. Zinsmeister, K. R. Markham, H. Wong. The first baurone, a triflavone and biflavonoids from two *Aulacomnium* species. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 573-576.
- [92] H. Geiger, K. R. Markham. Campylopusaurone, an auronoflavanone biflavonoid from the mosses *Campylopus clavatus* and *Campylopus holomitrium*. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4325-4328.
- [93] S. Agnihotri, S. Wakode. Antimicrobial activity of essential oil and various extracts of fruits of greater cardamom. *Indian J. Pharm. Sci.* **2010**, *72*, 657-659.
- [94] H.-Q. Huang, H.-L. Li, J. Tang, Y.-F. Lv, W.-D. Zhang. A new aurone and other phenolic constituents from *Veratrum schindleri* Loes. f. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 590-592.
- [95] U. V. Mallavadhani, A. Mahapatra. A new aurone and two rare metabolites from the leaves of *Diospyros melanoxylon*. *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 91-97.
- [96] L. Huang, M. E. Wall, M. C. Wani, H. Navarro, T. Santisuk, V. Reutreakul, E.-K. Seo, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn. New compounds with DNA strand-scission activity from the combined leaf and stem of *Uvaria hamiltonii*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 446-450.
- [97] Y. Lu, L. Y. Foo. Polyphenolic constituents of blackcurrant seed residue. *Food Chem.* **2003**, *80*, 71-76.

- [98] K. Jankowski, J. R. J. Paré. Trace glycoside from cranberries (*Vaccinium oxycoccus*). *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 190-193.
- [99] B. Köpcke, E. Roemer, J. Bitzer, J. Hans, J. Gruenwald, M. Gehling, P. Wabnitz, T. S. bin Tengku Adnan, T. Grothe. Aurones as estrogen receptor modulators and their use in sex hormone dependent diseases. Patent U.S. US 0267822, **2010**.
- [100] T. Iwashina, J. Kitajima, T. Shiuchi, Y. Itou. Chalcones and other flavonoids from *Asarum sensu lato* (Aristolochiaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2005**, *33*, 571-584.
- [101] S.-X. Zhang, T. Tani, S. Yamaji, C.-M. Ma, M.-C. Wang, S.-Q. Cai, Y.-Y. Zhao. Glycosyl flavonoids from the roots and rhizomes of *Asarum longerhizomatosum*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2003**, *5*, 25-30.
- [102] Y. Hano, P. Mitsui, T. Nomura. Two new prenylaurones, antiarones A and B, from the root bark of *Antiaris toxicaria* lesch. *Heterocycles* **1990**, *30*, 1023-1030.
- [103] S.-C. Fang, B.-J. Shieh, C.-N. Lin. Phenolic constituents of Formosan *Broussonetia papyrifera*. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 851-853.
- [104] S. Kobayashi, T. Miyase, H. Noguchi. Polyphenolic glycosides and oligosaccharide multiesters from the roots of *Polygala dalmaisiana*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 319-328.
- [105] E. O. Ferreira, M. J. Salvador, E. M. F. Pral, S. C. Alfieri, I. Y. Ito, D. A. Dias. A new heptasubstituted (*E*)-aurone glucoside and other aromatic compounds of *Gomphrena agrestis* with biological activity. *Z. Naturforsch.* **2004**, *59*, 499-505.
- [106] A. Rahman, M. I. Choudhary, S. Hayat, A. M. Khan, A. Ahmed. Two new aurones from marine brown alga *Spatoglossum variable*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 105-107.
- [107] S. Venkateswarlu, G. K. Panchagnula, A. L. Gottumukkala, G. V. Subbaraju. Synthesis, structural revision, and biological activities of 4'-chloroaurone, a metabolite of marine brown alga *Spatoglossum variable*. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6909-6914.
- [108] H. Harkat, A. Blanc, J.-M. Weibel, P. Pale. Versatile and expeditious synthesis of aurones via Au^I-catalyzed cyclization. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1620-1623.
- [109] M. Shomokoriyama, S. Hattori. On a probable enzymatic conversion of hydroxychalcone glycoside into hydroxybenzylcoumaranone glycoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 2277.
- [110] T. Nakayama, T. Sato, Y. Fukui, K. Yonekura-Sakakibara, H. Hayashi, Y. Tanaka, T. Kusumi, T. Nishino. Specificity analysis and mechanism of aurone synthesis catalyzed

- by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration. *FEBS Lett.* **2001**, *499*, 107-111.
- [111] E. Wong. Aurone biosynthesis—II. Formation of 4',6-dihydroxy-2-(α -hydroxybenzyl)-coumaranone from 2',4,4'-trihydroxychalcone by cell-free extracts of soybean. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 1227-1233.
- [112] H. Sekizaki. Synthesis of 2-benzylidene-3(2*H*)-benzofuran-3-ones (aurones) by oxidation of 2'-hydroxychalcones with mercury(II) acetate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 1407-1409.
- [113] N. N. Agrawal, P. A. Soni. A new process for the synthesis of aurones by using mercury (II) acetate in pyridine and cupric bromide in dimethyl sulfoxide. *Indian J. Chem.* **2006**, *45B*, 1301-1303.
- [114] K. Thakkar, M. Cushman. A novel oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones to 4-methoxyaurones by thallium (III) nitrate. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6441-6444.
- [115] K. Thakkar, M. Cushman. A novel oxidative cyclization of 2'-hydroxychalcones to 4,5-dialkoxyaurones by thallium(III) nitrate. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6499-6510.
- [116] G. Bose, E. Mondal, A. T. Khan, M. J. Bordoloi. An environmentally benign synthesis of aurones and flavones from 2'-acetoxychalcones using *n*-tetrabutylammonium tribromide. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8907-8909.
- [117] H. Garcia, S. Iborra, J. Primo. 6-Endo-dig vs. 5-exo-dig ring closure in *o*-hydroxyaryl phenylethynyl ketones. A new approach to the synthesis of flavones and aurones. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4432-4436.
- [118] R. S. Varma, M. Varma. Alumina-mediated condensation. A simple synthesis of aurones. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5937-5940.
- [119] D. Villemin, B. Martin, N. Bar. Application of microwave in organic synthesis. Dry synthesis of 2-arylmethylene-3(2)-naphthofuranones. *Molecules* **1998**, *3*, 88-93.
- [120] S. Okombi. Recherche et étude de molécules à activité antityrosinase et leur utilisation comme agents dépigmentants en dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble, **2005**.
- [121] S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, A.-M. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2*H*)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 329-333.

- [122] G. A. Kraus, V. Gupta. Divergent approach to flavones and aurones via dihaloacrylic acids. Unexpected dependence on the halogen atom. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5278-5280.
- [123] J. A. Sheps, V. Ling. Introduction: What is multidrug resistance?, in *ABC transporters and multidrug resistance*, A. Boumendjel, J. Boutonnat, J. Robert, Eds., Wiley, Hoboken, **2009**, pp 1-13.
- [124] M. E. Morris, S. Zhang. Flavonoid–drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2116-2130.
- [125] A. Boumendjel, C. Beney, N. Deka, A.-M. Mariotte, M. A. Lawson, D. Trompier, H. Baubichon-Coray, A. Di Pietro. 4-Hydroxy-6-methoxyaurones with high-affinity binding to cytosolic domain of P-glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 854-856.
- [126] G. Comte, J.-B. Daskiewicz, C. Bayet, G. Conseil, A. Viornerly-Vanier, C. Dumontet, A. Di Pietro, D. Barron. C-Isoprenylation of flavonoids enhances binding affinity toward P-glycoprotein and modulation of cancer cell chemoresistance. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 763-768.
- [127] R. Vaclavikova, A. Boumendjel, M. Ehrlichova, J. Kovar, I. Gut. Modulation of paclitaxel transport by flavonoid derivatives in human breast cancer cells. Is there a correlation between binding affinity to NBD of P-gp and modulation of transport? *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4519-4525.
- [128] H.-M. Sim, C.-Y. Lee, P. L. R. Ee, M.-L. Go. Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *35*, 293-306.
- [129] S. H. May. Investigations on aurones as modulators of ABCG2. Thèse de Doctorat, National University of Singapor, **2010**.
- [130] M. Malumbres, M. Barbacid. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Rev. Cancer* **2009**, *9*, 153-166.
- [131] W. Ni, J. Ji, Z. Dai, A. Papp, A. J. Johnson, S. Ahn, K. L. Farley, T. S. Lin, J. T. Dalton, X. Li, D. Jarjoura, J. C. Byrd, W. Sadee, M. R. Grever, M. A. Phelps. Flavopiridol pharmacogenetics: Clinical and functional evidence for the role of SLCO1B1/OATP1B1 in flavopiridol disposition. *PLoS One* **2010**, *5*, e13792.
- [132] J. Schoepfer, H. Fretz, B. Chaudhuri, L. Muller, E. Seeber, L. Meijer, O. Lozach, E. Vangrevelinghe, P. Furet. Structure-based design and synthesis of 2-benzylidene-benzofuran-3-ones as flavopiridol mimics. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1741-1747.

- [133] K. J. French, R. S. Schrecengost, B. D. Lee, Y. Zhuang, S. N. Smith, J. L. Eberly, J. K. Yun, C. D. Smith. Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5962-5969.
- [134] N. J. Lawrence, D. Rennison, A. T. McGown, J. A. Hadfield. The total synthesis of an aurone isolated from *Uvaria hamiltonii*: Aurones and flavones as anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3759-3763.
- [135] X. Zheng, J.-G. Cao, W.-D. Meng, F.-L. Qing. Synthesis and anticancer effect of B-ring trifluoromethylated flavonoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3423-3427.
- [136] W. Huang, M.-Z. Liu, Y. Li, Y. Tan, G.-F. Yang. Design, syntheses, and antitumor activity of novel chromone and aurone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5191-5197.
- [137] H. Cheng, L. Zheng, Y. Liu, S. Chen, H. Cheng, X. Lu, Z. Zheng, G.-C. Zhou. Design, synthesis and discovery of 5-hydroxyaurone derivatives as growth inhibitors against HUVEC and some cancer cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5950-5957.
- [138] P. Nioi, J. D. Hayes. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. *Mutation Res.* **2004**, *555*, 149-171.
- [139] C.-Y. Lee, E.-H. Chew, M.-L. Go. Functionalized aurones as inducers of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 that activate AhR/XRE and Nrf2/ARE signaling pathways: Synthesis, evaluation and SAR. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2957-2971.
- [140] A. T. Dinkova-Kostova, M. A. Massiah, R. E. Bozak, R. J. Hicks, P. Talalay. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *PNAS* **2001**, *98*, 3404-3409.
- [141] C.-Y. Lee. Investigations on aurones as chemopreventive agents. Thèse de Doctorat, National University of Singapor, **2009**.
- [142] K. Furuno, T. Akasako, N. Sugihara. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 19-23.
- [143] H.-Y. Zhang, D.-P. Yang, G.-Y. Tang. Multipotent antioxidants: From screening to design. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 749-754.

- [144] N. Nenadis, M. P. Sigalas. A DFT study on the radical scavenging activity of maritimetin and related aurones. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12196-12202.
- [145] A. Detsi, M. Majdalani, C. A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, P. Kefalas. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8073-8085.
- [146] N. Nenadis, M. P. Sigalas. A DFT study on the radical scavenging potential of selected natural 3',4'-dihydroxy aurones. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 114-120.
- [147] O. Kayser, A. F. Kiderlen. Leishmanicidal activity of aurones. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1999**, *23*, 423-426.
- [148] O. Kayser, M. Chen, A. Kharazmi, A. F. Kiderlen. Aurones interfere with *Leishmania major* mitochondrial fumarate reductase. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57c*, 717-720.
- [149] O. Kayser, A. F. Kiderlen, R. Brun. *In vitro* activity of aurones against *Plasmodium falciparum* strains K1 and NF54. *Planta Med.* **2001**, *67*, 718-721.
- [150] S. Saxena, N. Pant, D. C. Jain, R. S. Bhakuni. Antimalarial agents from plant sources. *Curr. Sci.* **2003**, *85*, 1314-1329.
- [151] S. Tasdemir, G. Lack, R. Brun, P. Rüedi, L. Scapozza, R. Perozzo. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: Evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3345-3353.
- [152] F. Souard, S. Okombi, C. Beney, S. Chevalley, A. Valentin, A. Boumendjel. 1-Azaaurones derived from the naturally occurring aurones as potential antimalarial drugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5724-5731.
- [153] M. G. Thomas, C. Lawson, N. M. Allanson, B. W. Leslie, J. R. Bottomley, A. McBride, O. A. Olusanya. A series of 2(Z)-2-benzylidene-6,7-dihydroxybenzofuran-3[2H]-ones as inhibitors of chorismate synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 423-426.
- [154] J. R. Pires, C. Saito, S. L. Gomes, A. M. Giesbrecht, A. T. Amaral. Investigation of 5-nitrofuran derivatives: Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3673-3681.
- [155] N. Hadj-esfandiari, L. Navidpour, H. Shadnia, M. Amini, N. Samadi, M. A. Faramarzi, A. Shafiee. Synthesis, antibacterial activity, and quantitative structure-activity rela-

- tionships of new (*Z*)-2-(nitroimidazolylmethylene)-3(2*H*)-benzofuranone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6354-6363.
- [156] B. P. Bandgar, S. A. Patil, B. L. Korbadi, S. C. Biradar, S. N. Nile, C. N. Khobragade. Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated auronone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3223-3227.
- [157] A. L. Maia, I. M. Goemann, E. L. S. Meyer, S. M. Wajner. Type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J. Endocrinol.* **2011**, *209*, 283-297.
- [158] M. Auf'mkolk, J. Koehrle, R.-D. Hesch, V. Cody. Inhibition of rat liver iodothyronine deiodinase. Interaction of auronones with the iodothyronine ligand-binding site. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11623-11630.
- [159] J. Koehrle, M. Auf'mkolk, H. Rokos, R.-D. Hesch, V. Cody. Rat liver iodothyronine monodeiodinase. Evaluation of the iodothyronine ligand-binding site. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11613-11622.
- [160] B. J. Deroo, K. S. Korach. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 561-570.
- [161] S. Y. Shin, M. C. Shin, J.-S. Shin, K.-T. Lee, Y. S. Lee. Synthesis of auronones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE₂ productions in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4520-4523.
- [162] M. Ono, N. Yoshida, K. Ishibashi, M. Haratake, Y. Arano, H. Mori, M. Nakayama. Radioiodinated flavones for in vivo imaging of β -amyloid plaques in the brain. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7253-7260.
- [163] M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, K. Ito, H. Mori, M. Nakayama. Auronones serve as probes of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, *361*, 116-121.
- [164] Y. Maya, M. Ono, H. Watanabe, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama. Novel radioiodinated auronones as probes for SPECT imaging of β -amyloid plaques in brain *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 95-101.
- [165] M. Ono, R. Ikeoka, H. Watanabe, H. Kimura, T. Fuchigami, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama. ^{99m}Tc/Re complexes based on flavones and auronone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5743-5748.

- [166] R. Sheng, Y. Xu, C. Hu, J. Zhang, X. Lin, J. Li, B. Yang, Q. He, Y. Hu. Design, synthesis and AChE inhibitory activity of indanone and aurone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 7-17.
- [167] H. Nadri, M. Pirali-Hamedani, M. Shekarchi, M. Abdollahi, V. Sheibani, M. Amanlou, A. Shafiee, A. Foroumadi. Design, synthesis and anticholinesterase activity of a novel series of 1-benzyl-4-((6-alkoxy-3-oxobenzofuran-2(3H)-ylidene) methyl) pyridinium derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 6360-6366.
- [168] E. H. Lee, D.-G. Song, J. Y. Lee, C.-H. Pan, B. H. Um, S. H. Jung. Inhibitory effect of the compounds isolated from *Rhus verniciflua* on aldose reductase and advanced glycation endproducts. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1626-1630.
- [169] M.-Y. Song, G.-S. Jeong, K.-B. Kwon, S.-O. Ka, H.-Y. Jang, J.-W. Park, Y.-C. Kim, B.-H. Park. Sulfuretin protects against cytokine-induced β -cell damage and prevents streptozotocin-induced diabetes. *Exp. Mol. Med.* **2010**, *42*, 628-638.
- [170] W. Zhao, J. Sun, H. Xiang, Y.-Y. Zeng, X.-B. Li, H. Xiao, D.-Y. Chen, R.-L. Ma. Synthesis and biological evaluation of new flavonoid fatty acid esters with anti-adipogenic and enhancing glucose consumption activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3192-3203.
- [171] K. Sadasivam, R. Kumaresan. Antioxidant behavior of mearnsetin and myricetin flavonoid compounds – A DFT study. *Spectrochimica Acta Part A* **2011**, *79*, 282-293.
- [172] L. Johnston. Hepatitis A and B – A brief overview: Review. *SA Pharm. J.* **2010**, *77*, 40-44.
- [173] Q.-L. Choo, G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **1989**, *244*, 359-362.
- [174] G. Kuo, Q.-L. Choo, H. J. Alter, G. L. Gitnick, A. G. Redeker, R. H. Purcell, T. Miyamura, J. L. Dienstag, M. J. Alter, C. E. Stevens, G. E. Tegtmeier, F. Bonino, M. Colombo, W.-S. Lee, C. Kuo, K. Berger, J. R. Shuster, L. R. Overby, D. W. Bradley, M. Houghton. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* **1989**, *244*, 362-364.
- [175] D. Lavanchy. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* **2009**, *29*, 74-81.
- [176] M.-L. Yu, W.-L. Chuang. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: When East meets West. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24*, 336-345.

- [177] P. V. Markov, J. Pepin, E. Frost, S. Deslandes, A.-C. Labbé, O. G. Pybus. Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 2086-2096.
- [178] S. M. Kamal, I. A. Nasser. Hepatitis C genotype 4: What we know and what we don't yet know. *Hepatology* **2008**, *47*, 1371-1383.
- [179] N. Antaki, A. Craxi, S. Kamal, R. Moucari, S. Van der Merwe, S. Haffar, A. Gadano, N. Zein, C. L. Lai, J.-M. Pawlotsky, E. J. Heathcote, G. Dusheiko, P. Marcellin. *Liver Int.* **2009**, *30*, 342-355.
- [180] N. A. Terrault. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* **2002**, *36*, S99-S105.
- [181] E. A. Roberts, L. Yeung. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **2002**, *36*, S106-S113.
- [182] C. W. Shepard, L. Finelli, M. J. Alter. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* **2005**, *5*, 558-567.
- [183] J. H. Hoofnagle. Hepatitis C: The clinical spectrum of disease. NIH Consensus Development Conference on Management of Hepatitis C, March 24–26, 1997, Bethesda (United-States of America).
- [184] J. F. Perz, G. L. Armstrong, L. A. Farrington, Y. J. F. Hutin, B. P. Bell. The contributions of hepatitis C virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatology* **2006**, *45*, 529-538.
- [185] A.-C. Cardoso, R. Moucari, C. Figueiredo-Mendes, M.-P. Ripault, N. Giuily, C. Castelnau, N. Boyer, T. Asselah, M. Martinot-Peignoux, S. Maylin, R. J. Carvalho-Filho, D. Valla, P. Bedossa, P. Marcellin. Impact of peginterferon and ribavirin therapy on hepatocellular carcinoma: Incidence and survival in hepatitis C patients with advanced fibrosis. *J. Hepatology* **2010**, *52*, 652-657.
- [186] J. Bruix, J. M. Llovet. Major achievements in hepatocellular carcinoma. *Lancet* **2009**, *37*, 614-616.
- [187] C.-J. Chu, S.-D. Lee. Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection: Epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2008**, *23*, 512-520.
- [188] D. L. Thomas. The challenge of hepatitis C in the HIV-infected person. *Annu. Rev. Med.* **2008**, *59*, 473-485.

- [189] G. Corrao, S. Arico. Independent and combined action of hepatitis C virus infection and alcohol consumption on the risk of symptomatic liver cirrhosis. *Hepatology* **1998**, *27*, 914-919.
- [190] A. Monto, J. Alonzo, J. J. Watson, C. Grunfeld, T. L. Wright. Steatosis on chronic hepatitis C: Relative contributions of obesity, diabetes mellitus and alcohol. *Hepatology* **2002**, *36*, 729-736.
- [191] N. Joubert. Synthèse et évaluation de nouveaux nucléosides ciblant l'hépatite C dans un système réplicon. Thèse de Doctorat, Université d'Orléans, **2005**.
- [192] F. Penin, J. Dubuisson, F. A. Rey, D. Moradpour, J.-M. Pawlotsky. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **2004**, *39*, 5-19.
- [193] http://www.tibotec.com/content/backgrounders/www.tibotec.com/hcv_lifecycle.html
- [194] T. Suzuki, K. Ishii, H. Aizaki, T. Wakita. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1200-1212.
- [195] J. J. Feld, J. H. Hoofnagle. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* **2005**, *436*, 967-972.
- [196] L. Chatel-Chaix, M. Baril, D. Lamarre. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors: A light at the end of the tunnel. *Viruses* **2010**, *2*, 1752-1765.
- [197] I. Melnikova. Hepatitis C therapies. *Nature Rev. Drug. Discov.* **2008**, *7*, 799-800.
- [198] P. L. Beaulieu. Recent advances in the development of NS5B polymerase inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection. *Expert Opin. Ther. Patents* **2009**, *19*, 145-164.
- [199] F. Legrand-Abrevanel, F. Nicot, J. Izopet. New NS5B polymerase inhibitors for hepatitis C. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2010**, *19*, 963-975.
- [200] D. Dhanak, K. J. Duffy, V. K. Johnston, J. Lin-Goerke, M. Darcy, A. N. Shaw, B. Gu, C. Silverman, A. T. Gates, M. R. Nonnemacher, D. L. Earnshaw, D. J. Casper, A. Kaura, A. Baker, C. Greenwood, L. L. Gutshall, D. Maley, A. Del Vecchio, R. Macaron, G. A. Hofmann, Z. Alnoah, H.-Y. Cheng, G. Chan, S. Khandekar, R. M. Keenan, R. T. Sarisky. Identification and biological characterization of heterocyclic inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38322-38327.
- [201] T. W. Rockway, R. Zhang, D. Liu, D. A. Betebenner, K. F. McDaniel, J. K. Pratt, D. Beno, D. Montgomery, W. W. Jiang, S. Masse, W. M. Kati, T. Middleton, A. Molla,

- C. J. Maring, D. J. Kempf. Inhibitors of HCV NS5B polymerase: Synthesis and structure-activity relationship of *N*-1-benzyl and *N*-1-[3-methylbutyl]-4-hydroxy-1,8-naphthyridon-3-yl benzothiadiazine analogs containing substituents on the aromatic ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3833-3838.
- [202] R. Tedesco, A. N. Shaw, R. Bambal, D. Chai, N. O. Concha, M. G. Darcy, D. Dhanak, D. M. Fitch, A. Gates, W. G. Gerhardt, D. L. Haleboua, C. Han, G. A. Hofmann, V. K. Johnston, A. C. Kaura, N. Liu, R. M. Keenan, J. Lin-Goerke, R. T. Sarisky, K. J. Wiggall, M. N. Zimmerman, K. J. Duffy. 3-(1,1-Dioxo-2*H*-(1,2,4)-benzothiadiazin-3-yl)-4-hydroxy-2(1*H*)-quinolinones, potent inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 971-983.
- [203] D. A. Ellis, J. K. Blazel, C. V. Tran, F. Ruebsam, D. E. Murphy, L.-S. Li, J. Zhao, Y. Zhou, H. M. McGuire, A. X. Xiang, S. E. Webber, Q. Zhao, Q. Han, C. R. Kissinger, M. Lardy, A. Gobbi, R. E. Showalter, A. M. Shah, M. Tsan, R. A. Patel, L. A. LeBrun, R. Kamran, D. M. Bartkowski, T. G. Nolan, D. A. Norris, M. V. Sergeeva, L. Kirkovsky. 5,5'- and 6,6'-Dialkyl-5,6-dihydro-1*H*-pyridin-2-ones as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6047-6052.
- [204] F. Ruebsam, D. E. Murphy, C. V. Tran, L.-S. Li, J. Zhao, P. S. Dragovich, H. M. McGuire, A. X. Xiang, Z. Sun, B. K. Ayida, J. K. Blazel, S. H. Kim, Y. Zhou, Q. Han, C. R. Kissinger, S. E. Webber, R. E. Showalter, A. M. Shah, M. Tsan, R. A. Patel, P. A. Thompson, L. A. LeBrun, H. J. Hou, R. Kamran, M. V. Sergeeva, D. M. Bartkowski, T. G. Nolan, D. A. Norris, J. Khandurina, J. Brooks, E. Okamoto, L. Kirkovsky. Discovery of tricyclic 5,6-dihydro-1*H*-pyridin-2-ones as novel, potent, and orally bioavailable inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6404-6412.
- [205] R. Wagner, D. P. Larson, D. W. A. Beno, T. D. Bosse, J. F. Darbyshire, Y. Gao, B. D. Gates, W. He, R. F. Henry, L. E. Hernandez, D. K. Hutchinson, W. W. Jiang, W. M. Kati, L. L. Klein, G. Koev, W. Kohlbrenner, A. C. Krueger, J. Liu, M. A. Long, C. J. Maring, S. V. Masse, T. Middleton, D. A. Montgomery, J. K. Pratt, P. Stuart, A. Molla, D. J. Kempf. Inhibitors of hepatitis C virus polymerase: Synthesis and biological characterization of unsymmetrical dialkyl-hydroxynaphthalenoyl-benzothiadiazines. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1659-1669.

- [206] J. de Vicente, R. T. Hendricks, D. B. Smith, J. B. Fell, J. Fisher, S. R. Spencer, P. J. Stengel, P. Mohr, J. E. Robinson, J. F. Blake, R. K. Hilgenkamp, C. Yee, J. Zhao, T. R. Elworthy, J. Tracy, E. Chin, A. Lui, B. Wang, C. Oshiro, S. F. Harris, M. Ghate, V. J. P. Leveque, I. Najera, S. Le Pogam, S. Rajyaguru, G. Ao-Ieong, L. Alexandrova, B. Fitch, M. Brandl, M. Masjedizadeh, S.-Y. Wu, S. de Keczer, T. Voronin. Non-nucleoside inhibitors of HCV polymerase NS5B. Part 3: Synthesis and optimization studies of benzothiazine-substituted tetramic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5648-5651.
- [207] D. Das, J. Hong, S.-H. Chen, G. Wang, L. Beigelman, S. D. Seiwert, B. O. Buckman. Recent advances in drug discovery of benzothiadiazine and related analogs as HCV NS5B polymerase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4690-4703.
- [208] M. J. Slater, E. M. Amphlett, D. M. Andrews, G. Bravi, G. Burton, A. G. Cheasty, J. A. Corfield, M. R. Ellis, R. H. Fenwick, S. Fernandes, R. Guidetti, D. Haigh, C. D. Hartley, P. D. Howes, D. L. Jackson, R. L. Jarvest, V. L. H. Lovegrove, K. J. Medhurst, N. R. Parry, H. Price, P. Shah, O. M. P. Singh, R. Stocker, P. Thommes, C. Wilkinson, A. Wonacott. Optimization of novel acyl pyrrolidine inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase leading to a development candidate. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 897-900.
- [209] A. Gopalsamy, R. Chopra, K. Lim, G. Ciszewski, M. Shi, K. J. Curran, S. F. Sukits, K. Svenson, J. Bard, J. W. Ellingboe, A. Agarwal, G. Krishnamurthy, A. Y. M. Howe, M. Orłowski, B. Feld, J. O'Connell, T. S. Mansour. Discovery of proline sulfonamides as potent and selective hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors. Evidence for a new NS5B polymerase binding site. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3052-3055.
- [210] J. A. Pfefferkorn, M. L. Greene, R. A. Nugent, R. J. Gross, M. A. Mitchell, B. C. Finzel, M. S. Harris, P. A. Wells, J. A. Shelly, R. A. Anstadt, R. E. Kilkuskie, L. A. Kopta, F. J. Schwende. Inhibitors of HCV NS5B polymerase. Part 1: Evaluation of the southern region of (2Z)-2-(benzoylamino)-3-(5-phenyl-2-furyl)acrylic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2481-2486.
- [211] J. A. Pfefferkorn, R. Nugent, R. J. Gross, M. Greene, M. A. Mitchell, M. T. Reding, L. A. Funk, R. Anderson, P. A. Wells, J. A. Shelly, R. Anstadt, B. C. Finzel, M. S. Harris, R. E. Kilkuskie, L. A. Kopta, F. J. Schwende. Inhibitors of HCV NS5B polymer-

- ase. Part 2: Evaluation of the northern region of (2Z)-2-benzoylamino-3-(5-phenoxyphenyl)-acrylic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2812-2818.
- [212] T. Nittoli, K. Curran, S. Insaf, M. DiGrandi, M. Orłowski, R. Chopra, A. Agarwal, A. Y. M. Howe, A. Prashad, M. B. Floyd, B. Johnson, A. Sutherland, K. Wheless, B. Feld, J. O'Connell, T. S. Mansour, J. Bloom. Identification of anthranilic acid derivatives as a novel class of allosteric inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2108-2116.
- [213] J. P. Powers, D. E. Piper, Y. Li, V. Mayorga, J. Anzola, J. M. Chen, J. C. Jaen, G. Lee, J. Liu, M. G. Peterson, G. R. Tonn, Q. Ye, N. P. C. Walker, Z. Wang. SAR and mode of action of novel non-nucleoside inhibitors of hepatitis C NS5B RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1034-1046.
- [214] K. Vandyck, M. D. Cummings, O. Nyanguile, C. W. Boutton, S. Vendeville, D. McGowan, B. Devogelaere, K. Amsoms, S. Last, K. Rombauts, A. Tahri, P. Lory, L. Hu, D. A. Beauchamp, K. Simmen, P. Raboisson. Structure-based design of a benzodiazepine scaffold yields a potent inhibitor of hepatitis C NS5B RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4099-4102.
- [215] S. Yan, T. Appleby, E. Gunic, J. H. Shim, T. Tasu, H. Kim, F. Rong, H. Chen, R. Hamatake, J. Z. Wu, Z. Hong, N. Yao. Isothiazoles as active-site inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 28-33.
- [216] S. Villano, A. Howe, D. Raible, D. Harper, J. Speth, G. Bichier. Analysis of HCV NS5B genetic variants following monotherapy with HCV-796, a non-nucleoside polymerase inhibitor, in treatment-naive HCV-infected patients. *Hepatology* **2006**, *44*, 607A-608A.
- [217] A. Y. M. Howe, H. Cheng, S. Johann, S. Mullen, S. K. Chunduru, D. C. Young, J. Bard, R. Chopra, G. Krishnamurthy, T. Mansour, J. O'Connell. Molecular mechanism of hepatitis C virus replicon variants reduced susceptibility to a benzofuran inhibitor, HCV-796. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3327-3338.
- [218] U. Koch, A. C. Mackay, F. Narjes, I. Stansfield. Benzofuran-carboxamide derivatives as antiviral agents. PCT Int. Appl. WO 2008125874, **2008**.
- [219] C. C. Cheng, G. W. Shipps Jr, Z. Yang, N. Kawahata, C. A. Lesburg, J. S. Duca, J. Bandouveres, J. D. Bracken, C.-K. Jiang, S. Agarwal, E. Ferrari, H.-C. Huang. Inhibitors of hepatitis C virus polymerase: Synthesis and characterization of novel 2-oxy-6-

- fluoro-*N*-((*S*)-1-hydroxy-3-phenylpropan-2-yl)-benzamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2119-2124.
- [220] P. L. Beaulieu, M. Bös, Y. Bousquet, G. Fazal, J. Gauthier, J. Gillard, S. Goulet, S. LaPlante, M.-A. Poupart, S. Lefebvre, G. McKercher, C. Pellerin, V. Austel, G. Kukolj. Non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: Discovery and preliminary SAR of benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 119-124.
- [221] S. Hirashima, T. Suzuki, T. Ishida, S. Noji, S. Yata, I. Ando, M. Komatsu, S. Ikeda, H. Hashimoto. Benzimidazole derivatives bearing substituted biphenyls as hepatitis C virus NS5B RNA-dependant RNA polymerase inhibitors: Structure-activity relationship studies and indentification of a potent and highly selective inhibitor JTK-109. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4721-4736.
- [222] P. L. Beaulieu, Y. Bousquet, J. Gauthier, J. Gillard, M. Marquis, G. McKercher, C. Pellerin, S. Valois, G. Kukolj. Non-nucleoside benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase: Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA replicons in Huh-7 cells. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6884-6892.
- [223] S. R. LaPlante, J. R. Gillard, A. Jakalian, N. Aubry, R. Coulombe, C. Brochu, Y. S. Tsantrizos, M. Poirier, G. Kukolj, P. L. Beaulieu. Importance of ligand bioactive conformation in the discovery of potent indole-diamide inhibitors of the hepatitis C virus NS5B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15204-15212.
- [224] S. Harper, S. Avolio, B. Pacini, M. Di Filippo, S. Altamura, L. Tomei, G. Paonessa, S. Di Marco, A. Carfi, C. Giuliano, J. Padron, F. Bonelli, G. Migliaccio, R. Di Francesco, R. Laufer, M. Rowley, F. Narjes. Potent inhibitors of subgenomic hepatitis C virus RNA replication through optimization of indole-*N*-acetamide allosteric inhibitors of the viral NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4547-4557.
- [225] P. L. Beaulieu, J. Gillard, E. Jolicoeur, J. Duan, M. Garneau, G. Kukolj, M.-A. Poupart. From benzimidazole to indole-5-carboxamide thumb pocket I inhibitors of HCV NS5B polymerase. Part 1: Indole C-2 SAR and discovery of diamide derivatives with nanomolar potency in cell-based subgenomic replicons. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3658-3663.
- [226] I. Stansfield, M. Pompei, I. Conte, C. Ercolani, G. Migliaccio, M. Jairaj, C. Giuliano, M. Rowley, F. Narjes. Development of carboxylic acid replacement in indole-*N*-

- acetamide inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5143-5149.
- [227] K. Ikegashira, T. Oka, S. Hirashima, S. Noji, H. Yamanaka, Y. Hara, T. Adachi, J.-I. Tsuruha, S. Doi, Y. Hase, T. Noguchi, I. Ando, N. Ogura, S. Ikeda, H. Hashimoto. Discovery of conformationally constrained tetracyclic compounds as potent hepatitis C virus NS5B RNA polymerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6950-6953.
- [228] F. Narjes, B. Crescenzi, M. Ferrara, J. Habermann, S. Colarusso, M. del Rosario Rico Ferreira, I. Stansfield, A. C. Mackay, I. Conte, C. Ercolani, S. Zaramella, M.-C. Palumbi, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, C. Giuliano, F. Fiore, S. Di Marco, P. Baiocco, U. Koch, G. Migliaccio, S. Altamura, R. Laufer, R. De Francesco, M. Rowley. Discovery of (7*R*)-14-cyclohexyl-7-{{2-(dimethylamino)ethyl}(methyl)-amino}-7,8-dihydro-6*H*-indolo[1,2-*e*][1,5]-benzoxazocine-11-carboxylic acid (MK-3281), a potent and orally bioavailable finger-loop inhibitor of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 289-301.
- [229] *Study To Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MK-3281 in Healthy and Hepatitis C Infected Male Patients*. Trial NCT00635804. National Institutes of Health, Bethesda, U.S., **2008**. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00635804>.
- [230] Y. Deng, G. W. Shipps Jr, T. Wang, J. Popovici-Muller, K. E. Rosner, M. Arshad Siddiqui, J. Duca, A. B. Cooper, M. Cable. Discovery of 4*H*-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-7-ones as potent inhibitors of hepatitis C virus polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5363-5367.
- [231] F. Rong, S. Chow, S. Yan, G. Larson, Z. Hong, J. Wu. Structure-activity relationship (SAR) studies of quinoxalines as novel HCV NS5B RNA-dependant RNA polymerase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1663-1666.
- [232] S. W. Martin, P. Glunz, B. R. Beno, C. Bergstrom, J. L. Romine, E. S. Priestley, M. Newman, M. Gao, S. Roberts, K. Rigat, R. Fridell, D. Qiu, G. Knobloch, Y.-K. Wang. The synthesis and evaluation of a novel class of (*E*)-3-(1-cyclohexyl-1*H*-pyrazol-3-yl)-2-methyl-acrylic acid hepatitis C virus polymerase NS5B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2869-2872.
- [233] L. Chan, S. K. Das, T. J. Reddy, C. Poisson, M. Proulx, O. Pereira, M. Courchesne, C. Roy, W. Wang, A. Siddiqui, C. G. Yannopoulos, N. Nguyen-Ba, D. Labrecque, R. Bethell, M. Hamel, P. Courtemanche-Asselin, L. L'Heureux, M. David, O. Nicolas, S.

- Brunette, D. Bilimoria, J. Bédard. Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 1: Sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 793-796.
- [234] H. Yang, R. T. Hendricks, N. Arora, D. Nitzan, C. Yee, M. C. Lucas, Y. Yang, A. Fung, S. Rajyaguru, S. F. Harris, V. J. P. Leveque, J. Q. Hang, S. Le Pogam, D. Reuter, G. A. Tavares. Cyclic amide bioisosterism: Strategic application to the design and synthesis of HCV NS5B polymerase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4614-4619.
- [235] A. Gopalsamy, K. Lim, G. Ciszewski, K. Park, J. W. Ellingboe, J. Bloom, S. Insaf, J. Upešlaciš, T. S. Mansour, G. Krishnamurthy, M. Damarla, Y. Pyatski, D. Ho, A. Y. M. Howe, M. Orłowski, B. Feld, J. O'Connell. Discovery of pyrano[3,4-*b*]indoles as potent and selective HCV NS5B polymerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6603-6608.
- [236] M. G. LaPorte, R. W. Jackson, T. L. Draper, J. A. Gaboury, K. Galie, T. Herbertz, A. R. Hussey, S. R. Rippin, C. A. Benetatos, S. K. Chunduru, J. S. Christensen, G. A. Coburn, C. J. Rizzo, G. Rhodes, J. O'Connell, A. Y. M. Howe, T. S. Mansour, M. S. Collett, D. C. Pevear, D. C. Young, T. Gao, D. L. J. Tyrrell, N. M. Kneteman, C. J. Burns, S. M. Condon. The discovery of pyrano[3,4-*b*]indole based allosteric inhibitors of HCV NS5B polymerase with in vivo activity. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1508-1515.
- [237] R. W. Jackson, M. G. LaPorte, T. Herbertz, T. L. Draper, J. A. Gaboury, S. R. Rippin, R. Patel, S. K. Chunduru, C. A. Benetatos, D. C. Young, C. J. Burns, S. M. Condon. The discovery and structure-activity relationships of pyrano[3,4-*b*]indole-based inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3227-3231.
- [238] H. Li, A. Linton, J. Tatlock, J. Gonzalez, A. Borchardt, M. Abreo, T. Jewell, L. Patel, M. Drowns, S. Ludlum, M. Goble, M. Yang, J. Blazel, R. Rahavendran, H. Skor, S. Shi, C. Lewis, S. Fuhrman. Allosteric inhibitors of hepatitis C polymerase: Discovery of potent and orally bioavailable carbon-linked dihydropyrones. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3969-3972.
- [239] H. Li, J. Tatlock, A. Linton, J. Gonzalez, T. Jewell, L. Patel, S. Ludlum, M. Drowns, S. V. Rahavendran, H. Skor, R. Hunter, S. T. Shi, K. J. Herlihy, H. Parge, M. Hickey, X. Yu, F. Chau, J. Nonomiya, C. Lewis. Discovery of (*R*)-6-cyclopentyl-6-(2-(2,6-

- diethylpyridin-4-yl)ethyl)-3-((5,7-dimethyl-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*]pyrimidine-2-yl)methyl)-4-hydroxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (PF-00868554) as a potent and orally bioavailable hepatitis C virus polymerase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1255-1258.
- [240] J. M. Ontoria, E. H. Rydberg, S. Di Marco, L. Tomei, B. Attenni, S. Malancona, J. I. M. Hernando, N. Gennari, U. Koch, F. Narjes, M. Rowley, V. Summa, S. S. Carroll, D. B. Olsen, R. De Francesco, S. Altamura, G. Migliaccio, A. Carfi. Identification and biological evaluation of a series of 1*H*-benzo[*de*]isoquinoline-1,3(2*H*)-diones as hepatitis C virus NS5B polymerase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5217-5227.
- [241] Y. Ding, K. L. Smith, C. V. N. S. Varaprasad, E. Chang, J. Alexander, N. Yao. Synthesis of thiazolone-based sulfonamides as inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 841-845.
- [242] L. Chan, T. J. Teddy, M. Proulx, S. K. Das, O. Pereira, W. Wang, A. Siddiqui, C. G. Yannopoulos, C. Poisson, N. Turcotte, A. Drouin, M. H. Alaoui-Ismaili, R. Bethell, M. Hamel, L. L'Heureux, D. Bilimoria, N. Nguyen-Ba. Identification of *N,N*-disubstituted phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1283-1285.
- [243] S. S. Antonysamy, B. Aubol, J. Blaney, M. F. Browner, A. M. Giannetti, S. F. Harris, N. Hébert, J. Hendle, S. Hopkins, E. Jefferson, C. Kissinger, V. Leveque, D. Marciano, E. McGee, I. Najera, B. Nolan, M. Tomimoto, E. Torres, T. Wright. Fragment-based discovery of hepatitis C virus NS5B RNA-polymerase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2990-2995.
- [244] C. Beney, A.-M. Mariotte, A. Boumendjel. An efficient synthesis of 4,6-dimethoxy aurones. *Heterocycles* **2001**, *55*, 967-972.
- [245] G. Büchi, M. Weinreb. Total syntheses of aflatoxins M₁ and G₁ and an improved synthesis of aflatoxin B₁. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 746-752.
- [246] C. Brehm, P. J. Zimmermann, S. Zemolka, A. Palmer, W. Buhr, S. Postius, W.-A. Simon, M. Herrmann. Pharmaceutically active dihydrobenzofurane-substituted benzimidazole derivatives. PCT Int. Appl. WO 2008/084067, **2008**.
- [247] A. D. Kwong, L. McNair, I. Jacobson, S. George. Recent progress in the development of selected hepatitis C virus NS3-4A protease and NS5B polymerase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 522-531.

- [248] A. Fortuné. Techniques de modélisation moléculaire appliquées à l'étude et à l'optimisation de molécules immunogènes et de modulateurs de la chimiorésistance. Thèse de Doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble, **2006**.
- [249] R. Haudecoeur, A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, A. Fortuné, R. Brillet, C. Belle, E. Nicolle, C. Pallier, J.-M. Pawlotsky, A. Boumendjel. Discovery of naturally occurring aurones that are allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependant RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5395-5402.
- [250] T. Passeron, R. Ballotti, J.-P. Ortonne. Melanogenesis. *EMC-Dermatologie Cosmétique* **2005**, *2*, 204-216.
- [251] P. Hochstein, G. Cohen. The cytotoxicity of melanin precursors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1963**, *100*, 876-886.
- [252] S. P. Nighswander-Rempel, J. Riesz, J. Gilmore, J. P. Bothma, P. Meredith. Quantitative fluorescence excitation spectra of synthetic eumelanin. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 20629-20635.
- [253] C. Olivares, C. Jimenez-Cervantes, J. A. Lozano, F. Solano, J. C. Garcia-Borron. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 131-139.
- [254] D. J. Tobin. Biochemistry of human skin – Our brain on the outside. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 52-67.
- [255] V. J. Hearing, K. Tsukamoto. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* **1991**, *5*, 2902-2909.
- [256] P. Aroca, K. Urabe, T. Kobayashi, K. Tsukamoto, V. J. Hearing. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25650-25655.
- [257] V. J. Hearing. The expanding role and presence of neuromelanin in the human brain – Why gray matter is gray. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2009**, *22*, 10-11.
- [258] L. Zecca, F. A. Zucca, A. Albertini, E. Rizzio, R. G. Fariello. A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* **2006**, *67*, S8-S11.
- [259] E. Gimenez, A. Lavado, P. Giraldo, L. Montoliu. Tyrosinase gene expression is not detected in mouse brain outside the retinal pigment epithelium cells. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *18*, 2673-2676.

- [260] Y. Xu, A. H. Stokes, W. M. Freeman, S. C. Kumer, B. A. Vogt, K. E. Vrana. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra. *Mol. Brain Res.* **1997**, *45*, 159-162.
- [261] E. Greggio, E. Bergantino, D. Carter, R. Ahmad, G.-E. Costin, V. J. Hearing, J. Clarimon, A. Singleton, J. Eerola, O. Hellström, P. J. Tienari, S. W. Miller, A. Beilina, L. Bubacco, M. R. Cookson. Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 246-256.
- [262] P. Carli, C. Salvini. Lentigines including lentigo simplex, reticulated lentigo and actinic lentigo, in *Color atlas of melanocytic lesions of the skin*, H. P. Soyer, G. Argenziano, R. Hofmann-Wellenhof, R. Jorh, Eds., Springer, Berlin, **2007**, pp 290-294.
- [263] E. P. H. Li, H. J. Min, R. W. Belk, J. Kimura, S. Bahl. Skin lightening and beauty in four Asian cultures. *Adv. Consumer Res.* **2008**, *35*, 444-449.
- [264] A. Petit, C. Cohen-Ludmann, P. Clevenbergh, J.-F. Bergmann, L. Dubertret. Skin lightening and its complications among African people living in Paris. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *55*, 873-878.
- [265] J.-P. Ortonne, D. L. Bissett. Latest insights into skin hyperpigmentation. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **2008**, *13*, 10-14.
- [266] W. Yi, X. Wu, R. Cao, H. Song, L. Ma. Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants. *Food Chem.* **2009**, *117*, 381-386.
- [267] B.-S. Wang, L.-W. Chang, H.-C. Wu, S.-L. Huang, H.-L. Chu, M.-H. Huang. Antioxidant and antityrosinase activity of aqueous extracts of green asparagus. *Food. Chem.* **2011**, *127*, 141-146.
- [268] J. Xu, S.-Y. Kao, F. J. S. Lee, W. Song, L.-W. Jin, B. A. Yankner. Dopamine-dependant neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 600-606.
- [269] I. Tessari, M. Bisaglia, F. Valle, B. Samori, E. Bergantino, S. Mammi, L. Bubacco. The reaction of α -synuclein with tyrosinase. Possible implications for Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 16808-16817.
- [270] Y. Matsuo, T. Kamitani. Parkinson's disease-related protein, α -synuclein, in malignant melanoma. *PLoS One* **2010**, *5*, e10481.

- [271] C. Paisan-Ruiz, H. Houlden. Common pathogenic pathways in melanoma and Parkinson disease. *Neurology* **2010**, *75*, 1653-1655.
- [272] R. Liu, X. Gao, Y. Lu, H. Chen. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology* **2011**, *76*, 2002-2009.
- [273] Y. Matoba, T. Kumagai, A. Yamamoto, H. Yoshitu, M. Sugiyama. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8981-8990.
- [274] T. Klabunde, C. Eicken, J. C. Sacchettini, B. Krebs. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084-1090.
- [275] H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuczek. The first crystal structure of tyrosinase: All questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4546-4550.
- [276] M. Sendovski, M. Kanteev, V. S. Ben-Yosef, N. Adir, A. Fishman. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 227-237.
- [277] S. Nithitanakool, P. Pithayanukul, R. Bavovada, P. Saparpakorn. Molecular docking studies and anti-tyrosinase activity of Thai mango seed kernel extract. *Molecules* **2009**, *14*, 257-265.
- [278] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wicher, B. W. Dijkstra. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477-5486.
- [279] A. Sanchez-Ferrer, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, F. Garcia-Carmona. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1247*, 1-11.
- [280] M. Rolff, J. Schottenheim, H. Decker, F. Tuczek. Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: Molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4077-4098.
- [281] L. M. Mirica, X. Ottenwaelder, D. P. Stack. Structure and spectroscopy of copper-dioxygen complexes. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1013-1045.
- [282] E. A. Lewis, W. B. Tolman. Reactivity of dioxygen-copper systems. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1047-1076.
- [283] K. D. Karlin, J. C. Hayes, Y. Gultneh, R. W. Cruse, J. W. McKown, J. P. Hutchinson, J. Zubieta. Copper-mediated hydroxylation of an arene: Model system for the action of

- copper monooxygenases. Structures of a binuclear copper(I) complex and its oxygenated product. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2121-2128.
- [284] P. L. Holland, K. R. Rodgers, W. B. Tolman. Is the bis(μ -oxo)dicopper core capable of hydroxylating an arene? *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1139-1142.
- [285] S. Palavicini, A. Granata, E. Monzani, L. Casella. Hydroxylation of phenolic compounds by a peroxodicopper(II) complex: Further insight into the mechanism of tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18031-18036.
- [286] S. Herres-Pawlis, P. Verma, R. Haase, P. Kang, C. T. Lyons, E. C. Wasinger, U. Flörke, G. Henkel, T. D. P. Stack. Phenolate hydroxylation in a bis(μ -oxo)dicopper(III) complex: Lessons from the guanidine/amine series. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1154-1169.
- [287] I. Garcia-Bosch, A. Company, J. R. Frisch, M. Torrent-Sucarrat, M. Cardellach, I. Gamba, M. Güell, L. Casella, L. Que Jr., W. Ribas, J. M. Luis, M. Costas. O₂ activation and selective phenolate ortho hydroxylation by an unsymmetric dicopper μ - η^1 : η^1 -peroxido complex. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2406-2409.
- [288] S. Torelli, C. Belle, S. Hamman, J.-L. Pierre. Substrate binding in catechol oxidase activity: Biomimetic approach. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3983-3989.
- [289] I. A. Koval, K. Selmezi, C. Belle, C. Philouze, E. Saint-Aman, I. Gautier-Luneau, A. M. Schuitema, M. van Vliet, P. Gamez, O. Roubeau, M. Lüken, B. Krebs, M. Lutz, A. L. Spek, J.-L. Pierre, J. Reedijk. Catecholase activity of a copper(II) complex with a macrocyclic ligand: Unraveling catalytic mechanisms. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6138-6150.
- [290] W. Westerhof, T. J. Kooyers. Hydroquinone and its analogues in dermatology – a potential health risk. *J. Cos. Dermatol.* **2005**, *4*, 55-59.
- [291] J. Levitt. The safety of hydroquinone: A dermatologist's response to the 2006 *Federal Register*. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *57*, 854-872.
- [292] S. Briganti, E. Camera, M. Picardo. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res.* **2003**, *16*, 101-110.
- [293] J. Garcia-Gavin, D. Gonzalez-Vilas, V. Fernandez-Redondo, J. Toribio. Pigmented contact dermatitis due to kojic acid. A paradoxal side effect of a skin lightener. *Contact Dermatitis* **2010**, *62*, 63-64.

- [294] J. Cabanes, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, J. A. Lozano, F. Garcia-Carmona. L-Mimosine, a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 917-919.
- [295] V. Kahn, A. Andrawis. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 905-908.
- [296] H. J. Jeon, M. Noda, M. Maruyama, Y. Matoba, T. Kumagai, M. Sugiyama. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9827-9833.
- [297] S. B. Khan, Azhar-ul-Haq, N. Afza, A. Malik, M. T. H. Khan, M. R. Shah, M. I. Choudhary. Tyrosinase-inhibitory long-chain esters from *Amberboa ramosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 86-89.
- [298] M. I. Choudhary, S. Sultan, M. T. H. Khan, Atta-ur-Rahman. Microbial transformation of 17 α -ethynyl- and 17 α -ethylsteroids, and tyrosinase inhibitory activity of transformed products. *Steroids* **2005**, *70*, 798-802.
- [299] M. T. H. Khan, S. B. Khan, A. Ather. Tyrosinase inhibitory cycloartane type triterpenoids from the methanol extract of the whole plant of *Amberboa ramosa* Jafri and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 938-943.
- [300] M. Criton, V. Le Mellay-Hamon. Analogues of N-hydroxy-N'-phenylthiourea and N-hydroxy-N'-phenylurea as inhibitors of tyrosinase and melanin formation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3607-3610.
- [301] W. Yi, C. Dubois, S. Yahiaoui, R. Haudecoeur, C. Belle, H. Song, R. Hardré, M. Réglie, A. Boumendjel. Refinement of arylthiosemicarbazone pharmacophore in inhibition of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4330-4335.
- [302] W. Yi, R.-H. Cao, Z.-Y. Chen, L. Yu, L. Ma, H.-C. Song. Design, synthesis and biological evaluation of hydroxy- or methoxy-substituted phenylmethylenethiosemicarbazones as tyrosinase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 1273-1277.
- [303] W. Yi, R. Cao, Z. Chen, L. Yu, H. Wen, Q. Yan, L. Ma, H. Song. Rational design and synthesis of 4-O-substituted phenylmethylenethiosemicarbazones as novel tyrosinase inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 752-754.
- [304] K. M. Khan, U. R. Mughal, M. T. H. Khan, Zia-Ullah, S. Perveen, M. I. Choudhary. Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6027-6033.

- [305] M. T. H. Khan, M. I. Choudhary, K. M. Khan, M. Rani, Atta-ur-Rahman. Structure-activity relationships of tyrosinase inhibitory combinatorial library of 2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazole analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3385-3395.
- [306] U. Ghani, N. Ullah. New potent inhibitors of tyrosinase: Novel clues to binding of 1,3,4-thiadiazole-2(3*H*)-thiones, 1,3,4-oxadiazole-2(3*H*)-thiones, 4-amino-1,2,4-triazole-5(4*H*)-thiones, and substituted hydrazides to the dicopper active site. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4042-4048.
- [307] K. W. Lam, A. Syahida, Z. Ul-Haq, M. B. A. Rahman, N. H. Lajis. Synthesis and biological activity of oxadiazole and triazolothiadiazole derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3755-3759.
- [308] K. M. Khan, G. M. Maharvi, M. T. H. Khan, A. J. Shaikh, S. Perveen, S. Begum, M. I. Choudhary. Tetraketones: A class of tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 344-351.
- [309] Y. M. Ha, J.-A. Kim, Y. J. Park, D. Park, Y. J. Choi, J. M. Kim, K. W. Chung, Y. K. Han, J. Y. Park, J. Y. Lee, H. R. Moon, H. Y. Chung. Synthesis and biological activity of hydroxybenzylidenyl pyrrolidine-2,5-dione derivatives as new potent inhibitors of tyrosinase. *Med. Chem. Commun.* **2011**, *2*, 542-549.
- [310] Y. M. Kim, J. Yun, C.-M. Lee, H. Lee, K. R. Min, Y. Kim. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 16340-16344.
- [311] K. Shimizu, S. Yasutake, R. Kondo. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excels*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 318-319.
- [312] K. Ohguchi, T. Tanaka, I. Iliya, T. Ito, M. Iinuma, K. Matsumoto, Y. Akao, Y. Nozawa. Gnetol as a potent tyrosinase inhibitor from genus *Gnetum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 663-665.
- [313] T. Yokozawa, Y. J. Kim. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 2007-2011.
- [314] K. Likhitwitayawuid, A. Sornsute, B. Sritularak, P. Ploypradith. Chemical transformations of oxyresveratrol (trans-2,4,3',5'-tetrahydroxystilbene) into a potent tyrosinase inhibitor and a strong cytotoxic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5650-5653.

- [315] Y. M. Ha, S. W. Chung, S. Song, H. Lee, H. Suh, H. Y. Chung. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,3-benzenediol: A potent, new tyrosinase inhibitor. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1711-1715.
- [316] K. Likhitwitayawuid. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci.* **2008**, *94*, 44-52.
- [317] T.-S. Chang. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2441-2475.
- [318] C.-B. Xue, L. Zhang, W.-C. Luo, X.-Y. Xie, L. Jiang, T. Xiao. 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2006-2015.
- [319] N.-I. Nihei, Y. Yamagiwa, T. Kamikawa, I. Kubo. 2-Hydroxy-4-isopropylbenzaldehyde, a potent partial tyrosinase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 681-683.
- [320] J. P. Ley, H.-J. Bertram. Hydroxy- or methoxy-substituted benzaldoximes and benzaldehyde-*O*-alkyloximes as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1879-1885.
- [321] S. Okombi, D. Rival, S. Bonnet, A.-M. Mariotte, E. Perrier, A. Boumendjel. Analogues of *N*-hydroxycinnamoylphenalkylamides as inhibitors of human melanocyte-tyrosinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2252-2255.
- [322] S. S. Kang, H. J. Kim, C. Jin, Y. S. Lee. Synthesis of tyrosinase inhibitory (4-oxo-4*H*-pyran-2-yl)acrylic acid ester derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 188-191.
- [323] J. Choi, S. J. Bae, Y. M. Ha, J. K. No, E. K. Lee, J. S. Lee, S. Song, H. Lee, H. Suh, B. P. Yu, H. Y. Chung. A newly synthesized, potent tyrosinase inhibitor: 5-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,2,3-benzenetriol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4882-4884.
- [324] J. Wu, X. Hu, L. Ma. Synthesis and biological evaluation of polyhydroxy benzophenone as mushroom tyrosinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 449-452.
- [325] I. Kubo, I. Kinst-Hori, S. K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sanchez, T. Ogura. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1749-1755.

- [326] S. H. Jeong, Y. B. Ryu, M. J. Curtis-Long, H. W. Ryu, Y. S. Baek, J. E. Kang, W. S. Lee, K. H. Park. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1195-1203.
- [327] D. Kim, J. Park, J. Kim, C. Han, J. Yoon, N. Kim, J. Seo, C. Lee. Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: A fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 935-941.
- [328] O. Nerya, J. Vaya, R. Musa, S. Izrael, R. Ben-Arie, S. Tamir. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1201-1207.
- [329] H. J. Kim, S. H. Seo, B.-G. Lee, Y. S. Lee. Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta Med.* **2005**, *71*, 785-787.
- [330] S. J. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, H. P. Kim. Tyrosinase inhibitory prenylated flavonoids from *Sophora flavescens*. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1348-1350.
- [331] X. Zhang, X. Hu, A. Hou, H. Wang. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 86-90.
- [332] O. Nerya, R. Musa, S. Khatib, S. Tamir, J. Vaya. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1389-1395.
- [333] S. Khatib, O. Nerya, R. Musa, M. Shmuel, S. Tamir, J. Vaya. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The importance of a 2,4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 433-441.
- [334] N. Jun, G. Hong, K. Jun. Synthesis and evaluation of 2',4',6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2396-2402.
- [335] E. Peyroux, W. Ghattas, R. Hardré, M. Giorgi, B. Faure, A. J. Simaan, C. Belle, M. Réglie. Binding of 2-hydroxypyridine-*N*-oxide on dicopper(II) centers: Insights into tyrosinase inhibition mechanism by transition-state analogs. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 10874-10876.
- [336] M. A. Lawson, A.-M. Mariotte, A. Boumendjel. A short method for the synthesis of 4,6-dimethoxy-1-azaaurones. *Heterocycl. Commun.* **2003**, *9*, 149-152.

- [337] S. Caron, N. M. Do, J. E. Sieser. A practical, efficient, and rapid method for the oxidation of electron deficient using trifluoroacetic anhydride and hydrogen peroxide–urea complex. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2299-2302.
- [338] Y.-M. Zhang, X. Fan, D. Chakaravarty, B. Xiang, R. H. Scannevin, Z. Huang, J. Ma, S. L. Burke, P. Karnachi, K. J. Rhodes, P. F. Jackson. 1-Hydroxy-2-pyridinone-based MMP inhibitors: Synthesis and biological evaluation for the treatment of ischemic stroke. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 409-413.
- [339] J. C. Espin, R. Varon, L. G. Fenoll, M. A. Gilabert, P. A. Garcia-Ruiz, J. Tudela, F. Garcia-Canovas. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1270-1279.
- [340] F. Benoit-Vical, A. Valentin, V. Cournac, Y. Pélissier, M. Mallié, J.-M. Bastide. In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 173-178.
- [341] S. Ameh, O. Obodozie, S. Gamaniel, M. Abubakar, M. Garba. Physicochemical variables and real time stability of the herbal substance of Niprd-AM1[®] – an antimalarial developed from the roots of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). *Int. J. Phytomed.* **2010**, *2*, 332-340.
- [342] F. Traore, M. Gasquet, M. Laget, H. Guiraud, C. Di Giorgio, N. Azas, O. Doumbo, P. Timon-David. Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 608-611.
- [343] P. A. Onyeyili, C. O. Nwosu, J. D. Amin, J. L. Jibike. Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 12-21.
- [344] I. O. Ademola, B. O. Fagbemi, S. O. Idowu. Anthelmintic efficacy of *Nauclea latifolia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *In vitro* and *in vivo* studies. *Afr. J. Trad. CAM* **2007**, *4*, 148-156.
- [345] A. E. J. Okwori, C. I. Okeke, A. Uzoechina, N. S. Etukudoh, M. N. Amali, J. A. Adetunji, A. O. Olabode. The antibacterial potentials of *Nauclea latifolia*. *Afr. J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 1394-1399.

- [346] A. M. El-Mahmood, J. H. Doughari, F. J. Chanji. In vitro antibacterial activities of crude extracts of *Nauclea latifolia* and *Daniella oliveri*. *Sci. Res. Essays* **2008**, *3*, 102-105.
- [347] S. Amos, J. Abbah, B. Chindo, I. Edmond, L. Binda, B. Adzu, S. Buhari, A. A. Odutola, C. Wambebe, K. Gamaniel. Neuropharmacological effects of the aqueous extract of *Nauclea latifolia* root bark in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 53-57.
- [348] E. Ngo Bum, G. S. Taiwe, F. C. O. Moto, G. T. Ngoupaye, G. C. N. Nkantchoua, M. M. Pelanken, S. V. Rakotonirina, A. Rakotonirina. Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice. *Epilepsy Behav.* **2009**, *15*, 434-440.
- [349] L. A.-L. Amouzoun, A. Agbonon, K. Eklugadegbeku, K. Aklikokou, M. Gbéassor. Activités antipyrétique et anti-inflammatoire d'extraits hydro-alcooliques des racines et feuilles de *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) chez le rat Wistar. *Phytothérapie* **2008**, *6*, 228-231.
- [350] G. S. Taiwe, E. Ngo Bum, T. Dimo, E. Talla, N. Weiss, A. Dawe, F. C. O. Moto, N. Sidiki, P. D. Dzeufiet, M. De Waard. Antidepressant, myorelaxant and anti-anxiety-like effects of *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) roots extract in murine models. *Int. J. Pharmacol.* **2010**, *6*, 364-371.
- [351] J. Abbah, S. Amos, B. Chindo, I. Ngazal, H. O. Vongtau, B. Adzu, T. Farida, A. A. Odutola, C. Wambebe, K. S. Gamaniel. Pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy: Effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 85-90.
- [352] A. Gidado, D. A. Ameh, S. E. Atawodi. Effect of *Nauclea latifolia* leaves aqueous extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, *4*, 91-93.
- [353] A. Gidado, D. A. Ameh, S. E. Atawodi, S. Ibrahim. Hypoglycaemic activity of *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae) in experimental animals. *Afr. J. Trad. CAM* **2008**, *5*, 201-208.
- [354] O. James, H. H. Ugbede. Hypocholesterolemic effects of *Nauclea latifolia* (Smith) fruit studied in albino rats. *Am. J. Trop. Med. Public Health* **2011**, *1*, 11-21.

- [355] G. Abubakar, D. A. Ameh, E. S. Atawodi, S. Ibrahim. Antidiabetic effect of *Nauclea latifolia* leaf ethanolic extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res.* **2009**, *1*, 392-395.
- [356] F. Hotellier, P. Delaveau, J.-L. Pousset. Naucéléfine et naucléline deux nouveaux alcaloïdes de type indoloquinolizidine idolés de *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1407-1409.
- [357] H. Shigemori, T. Kagata, H. Ishiyama, F. Morah, A. Ohsaki, J. Kobayashi. Naucleamides A–E, new monoterpene indole alkaloids from *Nauclea latifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 58-61.
- [358] Y. Kakuguchi, H. Ishiyama, T. Kubota, J. Kobayashi. Naucleamide F, a new monoterpene indole alkaloid from *Nauclea latifolia*. *Heterocycles* **2009**, *79*, 765-771.
- [359] D. Ngnokam, J. F. Ayafor, J. D. Connolly, J.-M. Nuzillard. Nauclefolinine: A new alkaloid from the roots of *Nauclea latifolia*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2003**, *17*, 173-176.
- [360] S. Grond, A. Sablotzki. Clinical pharmacology of tramadol. *Clin. Pharmacokinet.* **2004**, *43*, 879-923.
- [361] G. Massiot, F. S. Oliveira, J. Lévy. Synthèses en série indolique. IX. Synthèse totale des pseudovincamones. *Bull. Soc. Chim. Fr. II* **1982**, 185-190.
- [362] T. A. van Beek, R. Verpoorte, A. B. Svendsen. Alkaloids of *Tabernaemontana eglan-dulosa*. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 737-748.
- [363] Z. Itov, H. Meckler. A practical procedure for the resolution of (+)- and (–)-tramadol. *Org. Process Res. Devel.* **2000**, *4*, 291-294.
- [364] G. R. Evans, P. D. Fernandez, J. A. Henshilwood, S. Lloyd, C. Nicklin. Development of highly efficient resolutions of racemic tramadol using mandelic acid. *Org. Process Res. Devel.* **2002**, *6*, 729-737.
- [365] G. R. Evans, J. A. Henshilwood, J. O'Rourke. Highly efficient resolution of (±)-tramadol with di-p-toluoyl-tartaric acid (DTTA). *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1663-1670.
- [366] T. Aniszewski. *Alkaloids – Secrets of life: Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*, Elsevier, Amsterdam, **2007**, pp 98-101.
- [367] S. Schultz, J. S. Dickschat. Bacterial volatiles: The smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 814-842.

- [368] J. B. Harborne. Phenolics, in *Natural products, their chemistry and biological significance*, J. Mann, R. S. Davidson, J. B. Hobbs, D. V. Banthorpe, J. B. Harborne, Eds., Longman, London, **1994**, pp 361-388.
- [369] C. Alvarado, A. Guzman, E. Diaz, R. Patiño. Synthesis of tramadol and analogous. *J. Mex. Chem. Soc.* **2005**, *49*, 324-327.
- [370] U. Eder, G. Sauer, R. Wiechert. New type of asymmetric cyclization to optically active steroid CD partial structures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 496-497.
- [371] C. Pidathala, L. Hoang, N. Vignola, B. List. Direct catalytic asymmetric *enolexo* aldolizations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2785-2788.
- [372] C. Ghobril, C. Sabot, C. Mioskowski, R. Baati. TBD-catalyzed direct 5- and 6-*enolexo* aldolization of ketoaldehydes. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4104-4108.
- [373] A. Pelter, G. F. Vaughan-Williams, R. M. Rosser. Hindered organoboron groups in organic chemistry. 21. The reactions of dimesitylboron stabilised carbanions with oxiranes. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3007-3034.
- [374] K. Kanai, H. Wakabayashi, T. Honda. Rhodium-catalyzed Reformatsky-type reaction. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2549-2551.
- [375] H. Pellissier. Asymmetric organocatalysis. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9267-9331.
- [376] T. Kashiwagi, S. Kotani, M. Sugiura, M. Nakajima. Synthesis of γ -amino alcohols from aldehydes, enamines, and trichlorosilane using Lewis base catalysts. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 531-539.