

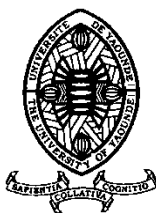
REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

CENTRE DE RECHERCHE ET DE
FORMATION DOCTORALE EN SCIENCES
TECHNOLOGIES ET GEOSCIENCES

UNITE DE RECHERCHE DE FORMATION
DOCTORALE EN CHIMIE ET
APPLICATIONS



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

POSTGRADUATE SCHOOL OF SCIENCE,
TECHNOLOGY AND GEOSCIENCES

DOCTORAL RESEARCH UNIT IN CHEMISTRY
AND APPLICATIONS

DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE

DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

**ACTIVITE ANTI-PROLIFERATIVE ET DOCKING
MOLECULAIRE DES DERIVES
NAPHTHOQUINONIQUES ET ACIDES
CARBOXYLIQUES INDANIQUES DU LAPACHOL
ISSU DE SOURCE NATURELLE**

Rédigé par :

Ketsemen Hervé Landry
Matricule : 10T1109
Master en Chimie Organique



Sous la direction de :

EYONG Kenneth Oben
Maître de conférences
Université de Yaoundé I

Et la supervision de :

FOLEFOC Ngosong Gabriel
Maître de conférences
Université de Yaoundé I

Année académique : 2020-2021



DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE MEMOIRE DE THESE DE DOCTORAT/*Ph.D* DE
MONSIEUR KETSEMEN HERVE LANDRY-

+++++

Titre de thèse : **ACTIVITE ANTI-PROLIFERATIVE ET DOCKING MOLECULAIRE
DES DERIVES NAPHTHOQUINONIQUES ET ACIDES CARBOXYLIQUES
INDANIQUES DU LAPACHOL CONTRE UN PANEL DE CELLULES
CANCEREUSES HUMAINES**

Nous soussignés, enseignants ci-dessous nommés, membres du jury de soutenance de thèse de Doctorat/*Ph.D* de Monsieur KETSEMEN Hervé Landry, Matricule 10T1109, attestons que ce candidat a bel et bien pris en compte dans la mouture finale de sa thèse, toutes corrections et recommandations qui lui ont été faites au cours de sa soutenance en date du 30 Avril 2021.

En foi de quoi, la présente attestation de correction lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le 19/05/2021

Le Jury :

Président : GHOGOMU TIH Raphael, Pr., 

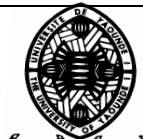
Rapporteurs : FOLEFOC Gabriel NGOSSONG, MC., 

EYONG Kenneth OBEN, MC., 

Membres : NKENGFACK Augustin Ephrem, Pr., 

MBAZE MEVA'A Luc Leonard, Pr., 

KUETE Victor, Pr., 

UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF		

ANNÉE ACADEMIQUE 2020/2021
 (Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION : 28 Mars 2021

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU JEAN CLAUDE, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ACHADE Alex, *Maitre de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche : MBAZE MEVA' A Luc
 Léonard, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOU Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur Serv MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
22	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
25	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste

37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistante	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste
2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (43)			
1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UIYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
26	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
27	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
28	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
29	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
30	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	CD/UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste
3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (34)			
1	AMBANG Zachée	Professeur	<i>Chef Division/UIYI</i>
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste

5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	En poste
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18	DJEUANI Astride Carole	Chargée de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
23	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargée de Cours	<i>Expert national /UNESCO</i>
24	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
25	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargée de Cours	En poste
26	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargée de Cours	En poste
27	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargée de Cours	En poste
28	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
29	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-R.	Assistant	En poste
30	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
31	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
32	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
33	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
34	TEMEGNE NONO Carine	Assistante	En poste

4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (35)

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	Chef de Département
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>RECTEUR Univ.Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
8	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ Bamenda</i>
9	NENWA Justin	Professeur	En poste
10	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
11	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
12	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
13	KAMGANG YUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
14	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	<i>CS/ ENS Bertoua</i>
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste

23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOSIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	<i>I.P de Service MINFEM</i>
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste
	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En poste
5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)			
1			
	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
2	GHOLOMU TIH Robert Ralph	Professeur	<i>Dir. IBAF/UDS</i>
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGFAK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur/UN</i>
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	DONGO Etienne	Professeur	<i>Vice-Doyen / DPSAA</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	<i>Chef Service/Minesup</i>
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINRESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
20	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
21	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
22	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
23	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
24	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
25	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
26	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
27	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
28	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
29	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
30	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
31	SIELINOU TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
32	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
33	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste
34	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste
6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (26)			
1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	Chef de Département <i>ENS/ChefIGA.MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH-KIMBI	Chargé de Cours	En poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
12	TSOPZE NoEBRrt	Chargé de Cours	En poste
13	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
14	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
15	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
16	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
17	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	<i>C/D Enset. Ebolowa</i>
18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	MAKEMBE S. Oswald	Assistant	En poste
24	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
25	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
26	NKONDOCK MI BAHANACK N.	Assistant	En poste
7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)			
1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur/ MINESUP</i>
2	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	<i>Directeur/AIMS Rwanda</i>
7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINPLAMAT</i>
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
20	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
21	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
22	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
23	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
24	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
25	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
27	BITYEMVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste

30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste
8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)			
1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	Chef de Département
2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistant	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAI Richard	Assistant	En poste
9- DEPARTEMENT DE PYSIQUE (PHY) (40)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
3	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
4	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
5	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
6	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen Univ/Bda</i>
7	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
8	WOAFO Paul	Professeur	En poste
9	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
10	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous-Directeur/ MINRESI</i>
11	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	<i>Director/Students/Affairs.UB</i>
12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bernard	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	VREICI
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	<i>Sous-Directeur/Minresi</i>
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU DeEBRtini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Directeur/ ENS</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste

34	MELPI Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
36	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>DA/Univ Inter Etat/Sangmélima</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
38	AYISSI EYEBE Guy François Valerie	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)			
1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
3	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
4	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
6	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
7	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
8	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	<i>CD/UMa</i>
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINIMDT</i>
12	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
13	ONANA Vincent	Maître de Conférences	En poste
14	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
15	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
16	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
17	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
18	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
19	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
20	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
21	NGUETCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	<i>CEA/MINRESI</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	FUH Calistus Gentry	Chargé de cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
28	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
29	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de cours	En poste
30	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
31	METANG Victor	Chargé de cours	En poste
32	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
33	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
34	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
35	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de cours	En poste
36	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de cours	En poste
37	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de cours	En poste
41	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de cours	En poste
42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (9)	14 (5)	3 (1)	39 (16)
BPA	13 (1)	9 (6)	19 (5)	5 (0)	46 (13)
BPV	6 (0)	10 (2)	9 (4)	7 (0)	31 (9)
CI	10 (1)	9 (2)	13 (2)	2 (0)	35 (5)
CO	7 (0)	17 (4)	9 (3)	3 (0)	35 (7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (1)	10 (3)	26 (3)
MA	1 (0)	5 (0)	19 (1)	5 (0)	30 (2)
MB	1 (0)	5 (2)	6 (1)	6 (0)	17 (5)
PH	11 (0)	16 (1)	10 (3)	3 (0)	40 (4)
ST	8 (1)	14 (1)	19 (4)	2 (0)	43 (6)
Total	68 (4)	99 (27)	132 (29)	45 (10)	344 (70)

Soit un total de

344 (70) dont :

- Professeurs 68 (4)
- Maîtres de Conférences 99 (27)
- Chargés de Cours 132 (29)
- Assistants 46 (10)
- () = Nombre de Femmes

DEDICACE

Je dédie très affectueusement ce travail

À mon père feu NJAMEN Daniel.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et l'apport de plusieurs personnes et Instituts. Je tiens à témoigner ma gratitude :

Au Professeur Gabriel NGOSONG FOLEFOC pour l'encadrement que j'ai bénéficié au sein de son équipe de recherche et à qui je souhaite un bon rétablissement.

Au Professeur Augustin Ephrem NKENGFACK, Chef de Département de Chimie Organique, pour ses multiples encouragements et ses précieux conseils.

Au Pr. Daniel Romo et au Dr. Kenneth G. Hull de 'CPRIT Synthesis and Drug-Lead Discovery Laboratory, Baylor University, Texas' au USA pour la disponibilité de leur spectromètre à 600 Mega Hertz et pour avoir accueilli le Pr. Eyong Kenneth pour le compte de la bourse Fulbright qui a grandement contribué à la réalisation de ce travail. Leur expérience de très haute qualité m'a été très bénéfique.

Au Pr. Najam Us Saqib de la 'COMSATS University of Information and Technology' à Abbotabad au Pakistan pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour le compte de la bourse TWAS.

Au programme TWAS pour m'avoir octroyé une bourse d'étude au Pakistan.

Au Pr. Sundarababu Baskaran du 'Department of Chemistry, Indian Institute of Technology, Madras, Chennai 600 036 India' pour avoir disposé son laboratoire et les réactifs nécessaire initialement à la réalisation des hémisynthèses effectuées dans ce travail.

Au Professeur Kenneth OBEN EYONG qui a dirigé ce travail avec une attention particulière. Sa rigueur, son esprit critique et l'importance accordée aux détails sont des attitudes qu'il m'a été donné d'apprécier durant ma thèse et que je compte pérenniser.

Au Pr. Mbañ James du Département de Chimie à l'Université de Buéa pour les analyses de résonance magnétique nucléaire qu'il a bien voulu effectuer pour nous au cours de son dernier séjour aux USA.

Au Dr. Alexander Kornienko de la 'North Caucasus Federal University' en Russie, au Dr. Zhenze Zhao et au Dr. Liqin Du du 'Texas State University, San Marcos' au USA qui ont effectué les tests d'activité antiprolifératives présentés dans ce travail.

Au Dr. Aude Ingels et au Dr. Veronique Mathieu du Laboratoire de Cancérologie et de Toxicologie Expérimentale de la Faculté de Pharmacie de l'Université Libre de Bruxelles, en Belgique qui ont repris les tests d'activité antiprolifératives pour la confirmation des résultats obtenus.

A tout le corps enseignant de l'Université de Yaoundé I pour leur assistance et leurs encouragements.

Au Dr. Lazare SIDJUI et Salomé GHANSENYUY, mes aînés de laboratoire avec qui j'ai travaillé dans une bonne ambiance.

A ma mère, Mme Njamen née Yateu Bénédicte, pour son amour et son engagement à toujours me soutenir.

A Madrid NJAMEN, Orléant NJAMEN, Christelle NJAMEN, Aristide NJAMEN et Boris NJAMEN, mes frères et sœurs pour leurs encouragements.

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont toujours assisté et soutenu.

TABLE DE MATIERES

DEDICACE	I
REMERCIEMENTS	II
LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES	VIII
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SCHEMAS	XII
LISTE DES TABLEAUX	XIII
RESUME	XIV
ABSTRACT	XVI
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	7
I.1 APERCU BOTANIQUE	8
I.1.1 Généralités sur la famille des Bignoniaceae	8
I.1.1.1 Classification systématique	8
I.1.1.2 Description botanique de la famille des Bignoniaceae	8
I.1.1.3 Répartition de la famille des Bignoniaceae	9
I.1.2 Genre <i>Kigelia</i>	10
I.1.3 Espèce <i>Kigelia africana</i>	10
I.1.3.1 Description botanique	10
I.1.3.2 Répartition géographique	11
I.1.3.3 Usages de l'espèce <i>Kigelia africana</i>	12
I.2 ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES	15
I.2.1 Chimiotaxonomie de la famille des Bignoniaceae	15
I.2.2 Espèce <i>Kigelia africana</i>	15
I.2.3 Lapachol	21
I.2.3.1 Origine et occurrence	21
I.2.3.2 Structure du lapachol	22
I.2.3.3 Synthèse du lapachol	22
I.2.3.1 Dérivés du lapachol	24
I.2.3.2 Synthèse des analogues des dérivés du lapachol	30
I.3 DOCKING MOLECULAIRE	32
I.3.1 Technique	32
I.3.2 Processus de docking	32
I.3.3 Algorithmes de recherche	35
I.3.3.1 Algorithmes de recherche systématique ou combinatoire	35
I.3.3.2 Algorithmes de recherche aléatoire ou stochastique	35
I.3.3.3 Algorithmes de recherche déterministe ou de simulation	37
I.3.4 Scoring	37
I.3.4.1 Fonctions de score	38
I.4 LE CANCER	40

I.5	DOCKING MOLECULAIRE APPLIQUE AU SCREENING ANTITUMORAL	42
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION		45
II.1	- ISOLEMENT ET CARACTERISATION	47
II.1.1	ISOLEMENT	47
II.1.1.1	Isolement des constituants des fruits de <i>Kigelia africana</i> .	47
II.1.1.2	Isolement des constituants des racines de <i>Kigelia africana</i> .	48
II.1.2	CARACTERISATION	48
II.1.2.1	Caractérisation des composés isolés des fruits	48
II.1.2.2	Caractérisation des composés isolés des racines	59
II.2	TRANSFORMATIONS CHIMIQUES DU LAPACHOL	66
II.2.1	Hémisynthèse des dérivés du lapachol structurellement apparentés à l' α -lapachone, au β -lapachone (pyranonaphtoquinones) et au 2-acétylfuronaphtoquinone (furanonaphtoquinones).	67
II.2.1.1	Dérivés de type α et β lapachone (pyranonaphtoquinone)	68
II.2.1.2	Dérivés de type 2-acétylfuronaphtoquinone (furanonaphtoquinone)	70
II.2.2	Hémisynthèse stéréosélective des dérivés du lapachol structurellement apparentés à l' α -lapachone, au β -lapachone (pyranonaphtoquinones) et au 2-acétylfuronaphtoquinone (furanonaphtoquinones).	72
II.2.2.1	Dérivés intermédiaires synthétiques : Oxydation allylique du lapachol et de l'acétate de lapachol	73
II.2.2.2	Dérivés de type pyranonaphtoquinone	74
II.2.2.3	Dérivés de type furanonaphtoquinone	75
II.2.3	Hémisynthèse des dérivés indaniques et phenazines à partir du lapachol.	82
II.2.3.1	Dérivés indaniques	83
II.2.3.2	Dérivés phenazines	91
II.3	ACTIVITES BIOLOGIQUES	93
II.3.1	Activité cytotoxique	93
II.3.2	Activité antitumorale	97
II.3.3	Analyses des relations structure-activités (SAR)	99
II.4	DOCKING MOLECULAIRE	100
II.4.1	Introduction	100
II.4.2	Paramétrage du docking	100
II.4.3	Docking des composés	102
II.4.4	Analyse des résultats du docking	103
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		106
CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE		109
III.1	APPAREILLAGE	110
III.1.1	Chromatographie sur couche mince (CCM)	110
III.1.2	Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)	110
III.1.3	Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	110
III.1.4	Chromatographie Liquide couplé à la Spectrométrie de Masse (LCMS)	111
III.1.5	Masse	111
III.1.6	Point de fusion (P.F.)	111
III.1.7	Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)	111
III.2	MATERIEL VEGETAL	111
III.3	EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSES	112
III.3.1	Fruits de <i>kigelia africana</i>	112
III.3.1.1	Chromatographie de la fraction à l'hexane	112

III.3.1.2	Chromatographie de la fraction à l'Hexane/AcOEt 50%	113
III.3.1.3	Chromatographie de la fraction AcOEt	114
III.3.1.4	Chromatographie de la fraction AcOEt/MeOH 50%	115
III.3.2	Racines de <i>kigelia africana</i>	117
III.3.2.1	Chromatographie de la fraction à l'Hexane	117
III.3.2.2	Chromatographie de la fraction à l'Hexane/AcOEt 10%	118
III.3.2.3	Chromatographie de la fraction AcOEt	118
III.4	REACTIONS DE SYNTHÈSE	120
III.4.1	Conditions générales	120
III.4.2	Hémisynthèse du composé 8	121
III.4.3	Hémisynthèse du composé 9	121
III.4.4	Hémisynthèse du composé 10	121
III.4.5	Hémisynthèse du composé 48	121
III.4.6	Hémisynthèse du composé 51	122
III.4.7	Hémisynthèse du composé 55	122
III.4.8	Hémisynthèse du composé 56	122
III.4.9	Hémisynthèse du composé 57	123
III.4.10	Hémisynthèse du composé 58	123
III.4.11	Hémisynthèse du composé 59	124
III.4.12	Hémisynthèse du composé 60	124
III.4.13	Hémisynthèse du composé 61	124
III.4.14	Hémisynthèse du composé 62	125
III.4.15	Hémisynthèse du composé 63	125
III.4.16	Hémisynthèse du composé 64	125
III.4.17	Hémisynthèse du composé 68	125
III.4.18	Hémisynthèse du composé 65	126
III.4.19	Hémisynthèse du composé 66	126
III.4.20	Hémisynthèse du composé 67	126
III.4.21	Hémisynthèse du composé 68	127
III.4.22	Hémisynthèse du composé 69	127
III.4.23	Hémisynthèse du composé 70	127
III.4.24	Hémisynthèse du composé 71	128
III.4.25	Hémisynthèse du composé 72	128
III.4.26	Hémisynthèse du composé 73	128
III.4.27	Hémisynthèse du composé 74	129
III.4.28	Hémisynthèse du composé 75	129
III.4.29	Hémisynthèse du composé 53	130
III.4.30	Hémisynthèse du composé 76	130
III.4.31	Hémisynthèse du composé 77	130
III.4.32	Hémisynthèse du composé 78	131
III.4.33	Hémisynthèse du composé 79	131
III.4.34	Hémisynthèse du composé 80	131
III.4.35	Hémisynthèse du composé 81	132
III.4.36	Hémisynthèse du composé 82	133
III.4.37	Hémisynthèse du composé 83	133
III.5	ACTIVITE BIOLOGIQUE	133
III.5.1	Lignées cellulaires	133
III.5.2	Test de prolifération cellulaire	134
III.6	DOCKING MOLÉCULAIRE	135

III.6.1	Base de données des composés	135
III.6.2	Structure tridimensionnelle des protéines	135
III.6.3	Docking moléculaire sur Autodock4	135
III.7	CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLES	136
III.7.1	Triterpènes	136
III.7.2	Coumarine	137
III.7.3	Quinones	137
REFERENCES		138
ANNEXE		147
PUBLICATIONS		182

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

δ (ppm)	Echelle de déplacement chimique en partie par million
[M] ^{•+}	Ion moléculaire
Ac ₂ O	Anhydride acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACPI	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃	Chloroforme Deutééré
CH ₂ Cl ₂	Chlorure de méthylène
CHCl ₃	Chloroforme
CIF	<i>Crystallographic Information File</i> (Fichier d'Information Cristallographique)
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> (Spectroscopie de corrélation)
d	Doublet
DCM	Dichlorométhane
dd	Doublet dédoublé
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (Amélioration sans Distorsion par Transfert de Polarisation)
DMS	dimethylsulfide
dt	Doublet de triplet
eq	équivalent
ES	<i>Electrospray</i> (Electrospray)
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
Hex	Hexane
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Corrélation Hétéronucléaires à Liaisons Multiples)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (Cohérence Hétéronucléaire Quantum Simple)
MeOD	Méthanol deutéré.
MeOH	Méthanol
MHz	Mégahertz
MIC	<i>Minimum Inhibited Concentration</i> (Concentration Minimale Inhibitrice)
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium
m	multiplet
mn	minute
NT	Non testé
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORTEP	<i>Oak Ridge Thermal Elipsoid Program</i> (Programme d'Elipsoïdes Thermiques Oak Ridge)
P.F	Point de Fusion
RMN ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton

RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i> (Déviation Quadratique Moyenne)
RT	Temps de Rétention
s	Singulet
t	Triplet
λ	Longueur d'onde en nm
ϵ_{\max}	Coefficient d'absorption maximale

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Fleur de <i>Tecoma stans</i>	9
Figure 2 : Fleur de <i>Tourrettia lappacea</i>	9
Figure 3 : Fleur de <i>Eccremocarpus scaber</i>	9
Figure 4 : Fleur de <i>Campsis radicans</i>	9
Figure 5 : Fleur de <i>Catalpa speciosa</i>	9
Figure 6 : Fleur de <i>Macfadyena unguis-cati</i>	9
Figure 7 : Fruit de <i>Crescentia cujete</i>	9
Figure 8 : Fruit de <i>Parmentiera cereifera</i>	9
Figure 9 : Fruit de <i>Colea delphinensis</i>	9
Figure 10 : Fruit de <i>Catalpa bignonioides</i>	9
Figure 11 : Fruit de <i>Campsis radicans</i>	9
Figure 12 : Fruit de <i>Kigelia africana</i>	9
Figure 13 : Fruits et inflorescence de <i>Kigelia africana</i>	11
Figure 14 : Répartition de l'espèce <i>Kigelia africana</i> en Afrique	11
Figure 15 : Représentation schématisée du docking de deux molécules.	33
Figure 16 : Docking ligand protéine	34
Figure 17 : Docking protéine- protéine.....	34
Figure 18 : Pharmacophore 3D antihistaminiques.....	40
Figure 19 : Cycle cellulaire	43
Figure 20 : Cycles cellulaires :A (Signaux positifs) et B (Signaux négatifs).....	43
Figure 21 : Vue d'ensemble des voies enzymatiques impliquées dans l'apoptose.	44
Figure 22 : Spectre RMN ¹ H du mélange des composés 23 et 24 (KAH2)	49
Figure 23 : Spectre RMN ¹ H du composé 25 (KAF4)	51
Figure 24 : Spectre RMN ¹ H élargi du composé 25 (KAF4)	51
Figure 25 : Spectre RMN ¹ H du composé 49 (KAF7).....	53
Figure 26 : Spectre RMN ¹ H élargi du composé 49 (KAF7)	54
Figure 27 : Spectre ¹³ C du composé 49 (KAF7).....	54
Figure 28 : Spectre RMN ¹ H CDCl ₃ , 600 MHz du composé 19 (KAF5)	56
Figure 29 : Spectre HSQC CDCl ₃ , 600 MHz du composé 19 (KAF5).	56
Figure 30 : Spectre COSY CDCl ₃ , 600 MHz du composé 19 (KAF5).....	57
Figure 31 : Spectre RMN ¹ H MeOD, 600 MHz du composé 20 (KAF10)	58
Figure 32 : Spectre HSQC MeOD, 600 MHz du composé 20 (KAF10).....	58
Figure 33 : Spectre HSQC élargi MeOD, 600 MHz du composé 20 (KAF10).....	59
Figure 34 : Spectre de masse du composé 4 (KAH10b).	60
Figure 35 : Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) du composé 4 (KAH10b).	61
Figure 36 : Détails du spectre RMN ¹ H du composé 4 (KAH10b).....	61
Figure 37 : Spectre RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 500 MHz) du composé 4 (KAH10b)	61
Figure 38 : Chromatogramme du composé 8 (KAH20).....	63
Figure 39 : Spectre de masse (ACPI) du composé 8 (KAH20)	63
Figure 40 : Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) du composé 8 (KAH20).	63
Figure 41 : Chromatogramme du composé 10 (KAH21).....	65
Figure 42 : Spectre de masse (ACPI) du composé 10 (KAH21)	65
Figure 43 : Spectre RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) du composé 10 (KAH21)	65
Figure 44 : Diagramme ORTEP du composé 10	71
Figure 45 : Chromatogramme HPLC du racémique de la furonaphtoquinone 55	76
Figure 46 : Chromatogramme HPLC du racémique de la furoorthoquinone 56	76

Figure 47 : Chromatogramme HPLC du mélange 57	78
Figure 48 : Chromatogramme HPLC du mélange 61	78
Figure 49 : Diagramme ORTEP des l'énantiomères majeurs des composés 57 et 61.....	79
Figure 50 : Chromatogramme du composé 64	80
Figure 51 : Chromatogramme HPLC du composé 67.....	81
Figure 52 : LC-MS des diastéréoisomères 81a et 81b	88
Figure 53 : Courbe CD expérimentale et calculée de 81a-1 et 81b-1	89
Figure 54 : Conformations les plus stables : les diastéréoisomères (a) et (c).....	89
Figure 55 : courbes d'inhibition de croissance <i>in-vitro</i> de quinze composés les plus actifs	98
Figure 56 : Superposition des rayons-X et des conformations du docking	101
Figure 57 : Résultats 3D et 2D du docking du composé 76 dans la protéine cible VGFR2	103
Figure 58 : Résultats 3D et 2D du docking du composé 87 dans les protéines cible CDK-2 et CDK6....	105

LISTE DES SCHEMAS

Schéma 1 : Hémisynthèse du composé 8	68
Schéma 2 : Hémisynthèse du composé 9	68
Schéma 3 : Hémisynthèse du composé 48	69
Schéma 4 : Hémisynthèse du composé 53	70
Schéma 5 : Hémisynthèse des composés 10 et 50	71
Schéma 6 : Hémisynthèse des composés 51, 52 et 54	71
Schéma 7 : Hémisynthèse des composés 67	73
Schéma 8 : Hémisynthèse des composés 65	73
Schéma 9 : Hémisynthèse des composés 58, 59, 62 et 63.....	74
Schéma 10 : Hémisynthèse des composés 55 et 56	76
Schéma 11 : Hémisynthèse des composés 57 et 61	78
Schéma 12 : Hémisynthèse du composé 64	80
Schéma 13 : Hémisynthèse du composé 67	81
Schéma 14 : Hémisynthèse du composé 69	83
Schéma 15 : Hémisynthèse des composés 72 et 71.	84
Schéma 16 : Hémisynthèse du composé 75	86
Schéma 17 : Hémisynthèse des composés 76 et 77	87
Schéma 18 : Hémisynthèse des composés 80 et 81	88
Schéma 19 : Hémisynthèse du composé 79	91
Schéma 20 : Hémisynthèse du composé 82	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Site de récolte de <i>Kigelia africana</i> au Cameroun et noms vernaculaire de la plante	12
Tableau 2 : Usage socio-culturel	12
Tableau 3 : Usages médicaux de <i>Kigelia africana</i>	13
Tableau 4 : Monoterpènes aromatiques isolés de <i>Kigelia africana</i>	15
Tableau 5 : Triterpènes isolés de <i>Kigelia africana</i>	16
Tableau 6 : Iridoïdes isolés de <i>Kigelia africana</i>	18
Tableau 7 : Lignanes isolés de <i>Kigelia africana</i>	19
Tableau 8 : Isocoumarines isolés de <i>Kigelia africana</i>	19
Tableau 9 : Flavonoïdes isolés de <i>Kigelia africana</i>	19
Tableau 10 : Composés quinoniques isolés de <i>Kigelia africana</i>	20
Tableau 11 : RMN ¹ H comparatif du mélange des composés 23 et 24	49
Tableau 12 : RMN ¹ H comparatif du composé 25	51
Tableau 13 : RMN ¹ H et ¹³ C comparatif du composé 49	53
Tableau 14 : RMN ¹ H et ¹³ C comparatif du composé 19	55
Tableau 15 : RMN ¹ H et ¹³ C comparatif du composé 20	58
Tableau 16 : RMN ¹ H comparatif du composé 8	62
Tableau 17 : RMN ¹ H comparatif du composé 10	64
Tableau 18 : Valeurs ¹ H, ¹³ C, corrélations HSQC et HMBC du composé 72	85
Tableau 19 : Composés soumis aux tests d'activité biologique	94
Tableau 20 : Pourcentage de croissance résiduelle des lignées de cellules cancéreuses	96
Tableau 21 : Inhibition moyenne de croissance <i>in-vitro</i> (IC ₅₀)	98
Tableau 22 : RMSD des ligands naturels dans leur conformation issue du docking	101
Tableau 23 : Représentation des résultats de l'affinité de liaison.	102
Tableau 24 : Représentation de la constante d'inhibition.	102
Tableau 25 : Justification de l'activité antitumorale par l'inhibition des enzymes ciblées	105

RESUME

La β -lapachone **9**, l' α -lapachone **8** et la 2-acétylfuronaphtoquinone **10** sont des exemples d'analogues dérivés du lapachol, un produit naturel, qui présentent des activités antitumorales supérieures à celle du lapachol (Hussain & Green, 2017). Le présent travail a pour but la synthèse de nouveaux dérivés du lapachol à fort potentiel antitumoral. De l'étude phytochimique de plantes de la famille des Bignoniaceae, ont été isolés dix-sept composés dont le lapachol. Le lapachol obtenu a été l'objet des transformations chimiques menées suivant les trois objectifs suivants :

Premièrement, les transformations chimiques du lapachol ont eu pour but l'obtention des dérivés structurellement apparentée à la β -lapachone, à l' α -lapachone et au 2-acétylfuronaphtoquinone avec des activités biologiques potentiellement renforcées. Cette approche a abouti à l'hémisynthèse de neuf dérivés.

Deuxièmement les transformations chimiques du lapachol visaient l'introduction de la stéréoelectivité et l'influence sur la bioactivité des dérivés. Ces dérivés ont été obtenus de façon racémique et de façon stéréosélective notamment à travers la réaction d'époxidation stéréosélective de Sharpless. Cette approche a abouti à l'hémisynthèse de treize dérivés.

Troisièmement dans une approche de pharmacomodulation visant la suppression des groupements quinoniques associés à la cytotoxicité aiguë, l'immunotoxicité et la carcinogénèse des quinones (Bolton et al., 2000), les orthoquinones ont été converties en acides indane carboxyliques par réarrangement benzilique et en phénazines par réaction avec des bases de Schiff. Cette approche a abouti à l'hémisynthèse de seize dérivés.

Au total trente dérivés obtenus à partir de ces transformations chimiques en plus de treize autres composés quinoniques disponibles ont été évalués sur un panel de cellules cancéreuses humaines incluant les modèles *in-vitro* de BE(2)-C, Kelly, SKNSH, CHLA-90 (tous les neuroblastomes), A549 (Cancer du poumon non à petites cellules) SKMEL-28 (Melanome), U373 (Glioblastome multiforme). L'activité antiproliférative a été évaluée par le test colorimétrique au MTT (bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, un tétrazole).

De ces quarante trois dérivés, quatorze ont été les plus actifs et la détermination de leur concentration moyenne inhibitrice donne des activités antiprolifératives micromolaires à un ou plusieurs chiffres. Les dérivés les plus actifs étaient ceux incorporant les squelettes de β -naphtoquinone et α -naphtoquinone [2,3-b] furane. Cependant, l'analogue évalué le plus intéressant était le composé **76** avec un squelette d'indène [1,2-b] pyrane obtenu par réarrangement benzilique. Il a démontré une bonne activité cytotoxique et a éliminé pratiquement toutes les cellules en culture sans produire de populations résistantes (viabilité cellulaire proche de 0%) à des concentrations légèrement supérieures à sa valeur de CI₅₀. Compte tenu de la bonne activité associée à ce di-one

(composé **76**) et du fait que cette structure n'ait fait l'objet d'aucune étude sur le cancer, une approche *in-silicio* par docking moléculaire a été réalisée pour déterminer quelle cible et quel site actif peuvent être impliqués dans son activité et dans celui des autres dérivés les plus actifs. Il ressort que l'activité biologique *in-vitro* associée au composé **76** ne serait pas due à l'inhibition de l'une des protéines sélectionnées dans le cadre de ce screening virtuel. Cependant cette étude permet de justifier l'activité apoptotique de cinq des quinze composés testés sur les cellules cancéreuses par l'inhibition des protéines VEGFR2, CDK2, CDK6 et Topoisomérase 1.

Ce travail a permis d'identifier plusieurs nouveaux leads qui pourraient être utilisés comme points de départ pour la découverte de médicaments anticancéreux.

Mots clés: Lapachol, Naphthoquinone, Acide carboxylique indanique, Cancer, Réarrangement benzilique.

ABSTRACT

β -lapachone **9**, α -lapachone **8** and 2-acetylfuronaphthoquinone **10** are examples of analogs derived from lapachol **4**, a natural product, that show superior antitumor activity compared to lapachol (Hussain & Green, 2017). The present work aims at the synthesis of new lapachol derivatives with high antitumoral potential. We present in this work the phytochemical study of plants from the Bignoniaceae family from which seventeen compounds were isolated, including lapachol. Subsequently, the semisynthesis of the lapachol derivatives was carried out, according to the following three objectives:

Firstly, the chemical transformations of lapachol were aimed at obtaining derivatives which are structurally related to β -lapachone, α -lapachone and 2-acetylfuronaphthoquinone with potentially enhanced biological activities. This approach resulted in the synthesis of nine derivatives.

Secondly, the chemical transformations of lapachol were aimed at finding out how changes in the stereochemistry and electronics of the core structures influence bioactivity. These derivatives were obtained as racemic and stereoselectively, through the Sharpless stereoselective epoxidation reaction. This approach resulted in the synthesis of thirteen derivatives.

Thirdly, in a pharmacomodulation approach aimed at removing the quinone groups which are usually associated with acute cytotoxicity, immunotoxicity and carcinogenesis of quinones (Bolton *et al.*, 2000), orthoquinones were converted to indan carboxylic acids via benzylic acid rearrangement and phenazines via Schiff base reaction. This approach resulted in the synthesis of sixteen derivatives.

The anti-proliferative activity of forty three derivatives of lapachol were evaluated on a panel of human cancer cells including *in vitro* models for cancers typically associated with dismal prognosis, such as BE(2)-C, Kelly, SKNSH, CHLA-90 (all neuroblastoma), A549 (non-small cell lung cancer), SKMEL-28 (melanoma), and U373 (glioblastoma). Of these derivatives, fifteen were the most active and had one- or multiple-digit micromolar antiproliferative activity. The most potent derivatives were those incorporating β -naphthoquinone and α -naphthoquino[2,3-b]furan skeletons. However, the most interesting analog evaluated was 1,3 di-one **76** with an indeno[1,2-b]pyran skeleton obtained via benzylic acid rearrangement with decarboxylation. It demonstrated potent cytotoxic activity and eliminated virtually all cells in culture without producing resistant populations (close to 0% cell viability) at concentrations just slightly exceeding its IC₅₀ value.

Considering the good activity associated to this 1,3 di-one (**76**) and the fact that this scaffold has not been the object of any cancer studies, we performed in this study an *in-silicio* approach by molecular docking to find out which targets and active sites might be involved in its activity.

Some proteins were selected for this docking but it appears that the biological activity associated with the compound **76** is not from the inhibition of one of the proteins selected in the context of this virtual screening. However, this study makes it possible to justify the apoptotic activity of five of the fifteen compounds tested on cancer cells by the inhibition of the VEGFR2, CDK2, CDK6 and Topoisomerase 1 proteins.

The current investigation identified several new lead compounds that could be used as starting points for anti-cancer drug discovery.

Keywords: Lapachol, Naphthoquinone, Indane carboxylic acid, Cancer cell lines, Benzilic acid rearrangement.

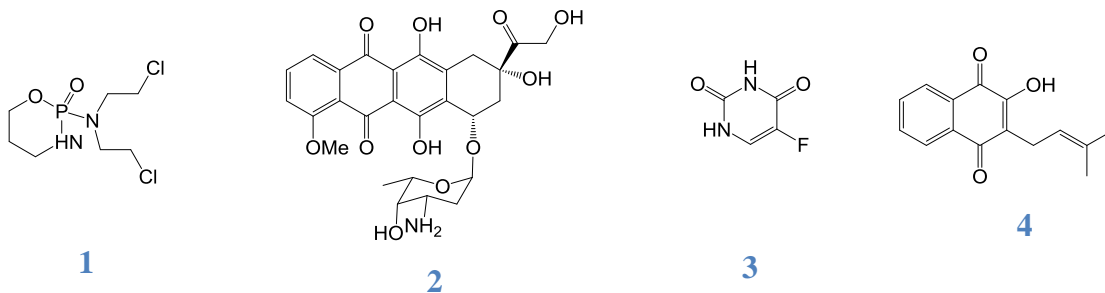
INTRODUCTION GENERALE

Les cancers désignent des maladies pour lesquelles certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée et échappent à la mort programmée (apoptose) de manière à ce que la survie de l'organisme soit menacée. Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (*un néoplasme*) ou se propager à travers le corps et former des métastases. Le mot cancer tire son origine du mot latin homonyme qui signifie crabe. C'est Hippocrate (460-377 avant J-C) qui, le premier, compare le cancer à un crabe par analogie à l'aspect des tumeurs du sein avec cet animal lorsqu'elles s'étendent à la peau (Sudhakar, 2009). C'est l'une des maladies les plus difficiles à soigner à cause du fait que les cellules cancéreuses sont très similaires aux cellules saines et prolifèrent de manière incontrôlée.

Les cancers constituent la deuxième cause de décès dans le monde. Près d'un décès sur 6 dans le monde est dû aux cancers et ces maladies ont fait 8,8 millions de morts en 2015. On estime qu'environ 70% des décès par cancers surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire (WHO, 2016).

Environ un tiers des décès par cancers sont dus aux 5 principaux facteurs de risque comportementaux et alimentaires qui sont : un indice élevé de masse corporelle, une faible consommation de fruits et légumes, le manque d'exercice physique, le tabagisme et la consommation d'alcool (WHO, 2016). La détection du cancer à un stade avancé et l'impossibilité d'avoir accès à un diagnostic et à un traitement sont des problèmes fréquents. En 2017, 26% seulement des pays à faible revenu déclaraient disposer de services de pathologie généralement offerts par le secteur public. Moins de 30% des pays à faible revenu déclaraient disposer de services de traitement, alors que la proportion pour les pays à revenu élevé dépassait 90%. (OMS 2018). Au Cameroun par exemple, il a été dénombré 8 000 décès et 14 000 nouveaux cas détectés en 2015 (OMS, 2016).

Il existe plusieurs types de traitement du cancer. Les principaux traitements du cancer sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. On peut aussi avoir recours à d'autres types de traitements, comme l'hormonothérapie, le traitement ciblé, l'immunothérapie et la greffe de cellules souches (Akulapalli, 2009)(Douay, 2001). Les traitements médicamenteux ou chimiothérapie agissent de différentes façons dans le but de détruire les cellules cancéreuses, de les empêcher de se propager ou de ralentir leur croissance. Cette diversité de mécanismes d'action est dépendante de la diversité structurale des substances naturelles. Jusqu'à nos jours, les végétaux ont constitué la source la plus prolifique en médicaments anticancéreux et un grand nombre de principes actifs ou dérivés aux structures chimiques variées ont été obtenus à base des plantes. C'est le cas de la cyclophosphamide **1**, la doxorubicine **2** une anthraquinone, le fluoro-uracile **3** et le paclitaxel **5**.



Cependant, l'usage des anticancéreux déjà commercialisés se heurte parfois à un phénomène de résistance rendant inefficace le traitement (Ferreira et *al.*, 2014). De ce fait la recherche de nouveaux agents anticancéreux à partir des plantes médicinales est toujours d'actualité dans de nombreux centres de recherches. Ainsi un grand éventail de composés nouveaux isolés des plantes et potentiellement anticancéreux sont fréquemment reportés dans la littérature. Malheureusement, une grande majorité de ces composés qui pourtant présentent de bonnes activités antitumorales *in-vitro* ne parviennent pas à traverser le stade des tests précliniques en raison notamment de problèmes de toxicité ou de perte d'activité *in-vivo*.

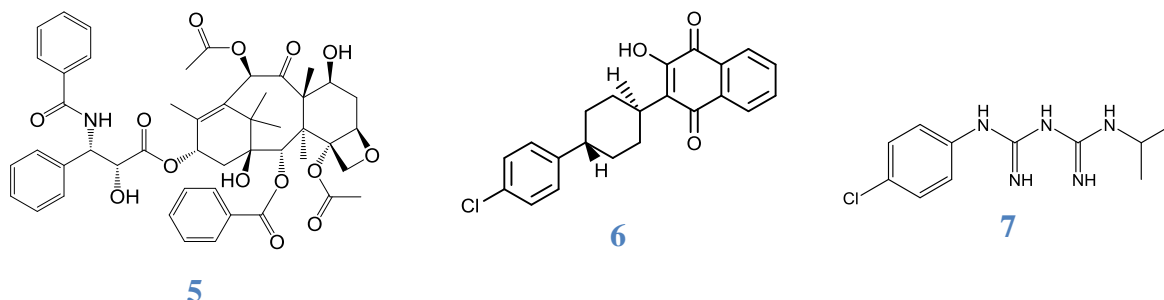
Dans le cas de la perte d'activité *in-vivo*, une des solutions en cours de développement est l'optimisation de la sélectivité des médicaments par des nanosondes « sense-of-logic dual-channel » (Yan et *al.*, 2018). Ces nanosondes opèrent à travers une porte logique 'ET' activée par séquence en réagissant à un pH ultra-sensible caractérisant l'environnement des cellules cancéreuses et ensuite avec le biothiol pour libérer de façon contrôlable un médicament anticancéreux. Ce procédé pourra permettre d'augmenter la sélectivité et d'éviter la métabolisation précoce d'un médicament administré *in-vivo*.

D'autre part les méthodes *in-silicio* que sont la modélisation moléculaire ou le Docking moléculaire permettent de nos jours au moyen de l'outil informatique de faire rapidement des corrélations entre l'activité et la structure d'un composé, voire son mécanisme d'action (Torrens, 2003)(Thomsen & Christensen, 2006). Cela permet le développement d'une grande diversité de mécanismes d'action et l'optimisation de l'activité des composés par des modifications structurales judicieuses. Il est même possible de construire fragment par fragment une molécule destinée à inhiber ou à annihiler le fonctionnement d'une cible protéique particulière douée d'une fonction nécessaire à la survie d'un anticorps (Hajduk & Greer, 2007).

Dans une moindre mesure, ces travaux sont susceptibles de permettre aux molécules initialement délaissées au niveau des tests *in-vitro* de traverser les phases cliniques après de légères et judicieuses modifications structurales, et ainsi fournir de nouvelles possibilités de médication

en chimiothérapie. La poursuite de ces travaux devrait dans un proche avenir aboutir à la diversification du potentiel thérapeutique anticancéreux avec plus d'efficacité et de spécificité.

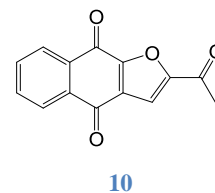
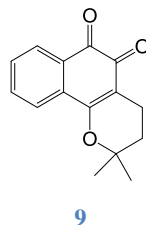
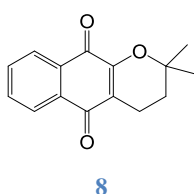
Le lapachol est un métabolite secondaire de la classe des naphtoquinones qui est biosynthétisé par plusieurs familles de plantes tels que les Verbenaceae, les Proteaceae, les Leguminosae, les Sapotaceae, les Scrophulariaceae et les Malvaceae, mais beaucoup plus les plantes de la famille des Bignoniaceae (Hussain *et al.*, 2007). Le lapachol est l'une des plus polyvalentes des naphtoquinones qui ont une activité biologique significative. A cause de cette activité, le lapachol a fait l'objet de nombreuses transformations chimiques qui ont abouties à ce jour à de nombreux dérivés. Parmi ces différents dérivés, ceux incorporant les squelettes de l' α -lapachone, du β -lapachone et 2-acéthylfuronaphtoquinone présente les activités les plus intéressantes notamment en ce qui concerne l'activité antiproliférative. Cependant le lapachol **4** est l'une de ces molécules dont le potentiel anticancéreux *in-vitro* prometteur s'est heurté à l'expérimentation du milieu biologique humain. En effet, l'activité anticancéreuse de cette quinone sur des rats a été découverte en 1968 (Hussain *et al.*, 2007). Mais en 1974, cette molécule fut rejetée en phase clinique 1.



Le National Cancer Institute (NCI) concluait que les fortes concentrations requises pour une chimiothérapie efficace dans le traitement du cancer chez l'homme entraînaient malheureusement aussi des effets secondaires extrêmement toxiques. Pourtant plus tard dans un traitement expérimental dans la ville de Nice en 1980, le lapachol administré à neuf patients souffrants de différents types de cancers incluant le cancer du foie, de la prostate, du rein, du sein et du col utérin, a permis le rétrécissement des tumeurs et la réduction de la douleur. Trois des patients sont même arrivés à une complète rémission sans effets secondaires négatifs (Santana *et al.*, 1980).

Cette découverte et le fait que d'autres activités antitumorales du lapachol ont été découvertes (Nepomuceno, 2014) font qu'il a été considéré comme un bon candidat pour une optimisation par transformations chimiques pouvant aboutir à la formulation d'un *lead*. Ainsi,

divers analogues du lapachol ont été synthétisés et étudiés pour le traitement des cancers du poumon, du sein, de la peau, de l'ovaire, du sang, du colon, de la prostate et du rein (Hussain et *al.*, 2007; Fiorito et *al.*, 2014). Certains de ces analogues tel que l' α -lapachone **8**, le β -lapachone **9** ou le 2-acetylfuronaphthoquinone **10** présentent des activités anticancéreuses dix fois plus importantes que celui du lapachol (Eyong et *al.*, 2008; Epifano et *al.*, 2014).



Le β -lapachone par exemple fait l'objet d'un test clinique en phase 1 en combinaison avec le paclitaxel pour le traitement du cancer du pancréas (Gerber et *al.*, 2017). Et l'un des dérivés du lapachol l'atovaqone **6** en association avec le progranil **7** est utilisé dans les cas de paludisme en Amérique latine. D'autre part, la grande diversité de ces dérivés synthétiques permet en plus d'émettre des conjectures sur les relations pouvant exister entre les motifs structuraux et les activités observées (SAR). Il ressort de ce fait que l'activité antitumorale du lapachol pourrait être liée à son interaction avec les acides nucléiques et certains dérivés du lapachol montrent une activité inhibante des enzymes topoisomères (Nepomuceno, 2014).

Tout cela démontre à suffisance le grand potentiel pharmacologique du lapachol qu'il est judicieux d'explorer à travers des études relationnelles structure activités des dérivés pour dégager de solutions thérapeutiques plus efficaces. C'est dans cette logique de recherche de nouvelles structures dérivées du lapachol à fort potentiel anticancéreux et de la détermination de leur mécanisme d'action que s'inscrit ce travail de thèse de Doctorat. Il s'intéresse particulièrement aux analogues synthétiques du β -lapachone, α -lapachone et 2-acetylfuronaphthoquinone

Les plantes *Newbouldia laevis* et *Kigelia africana* de la famille des Bignoniaceae ont été sélectionnées comme sources en lapachol pour les besoins des réactions d'hémisynthèse. En effet le lapachol a été isolé la première fois en 1882 de *Tabebuia avellanae* de la famille des Bignoniaceae (Paternó, 1882). C'est la famille de plantes la plus prolifique en lapachol, notamment en ce qui concerne les espèces *Kigelia africana* et *Newbouldia laevis* que l'on retrouve dans les régions du centre et de l'Ouest du Cameroun.

Objectif général

La présente étude vise principalement la synthèse des dérivés du lapachol, l'évaluation de l'activité anticancéreuse des produits de synthèse et la détermination *in-silicio* des mécanismes d'action des composés les plus actifs.

Objectifs Spécifiques

Il s'agira plus spécifiquement :

- de préparer les extraits à partir des différentes parties de la plante *Kigelia africana* (racine et fruits);
- d'isoler le lapachol des extraits et de le caractériser ;
- d'effectuer des réactions d'hémisynthèse à partir du lapachol ;
- d'évaluer les activités anticancéreuses des composés quinoniques isolés et des dérivés du lapachol ;
- effectuer le docking moléculaire des composés les plus actifs sur des protéines cibles intervenant dans l'activité anticancéreuse, principalement celles intervenant dans l'induction de l'apoptose ;
- d'interpréter les résultats obtenus pour donner des pistes de réflexion sur des études de Relation-Structure-Activité (RSA) dans la perspective de préparer des analogues hémisynthétiques pour développer des candidats-médicaments.

Les parties suivantes sont présentées dans cette thèse :

- L'introduction générale qui met en relief la problématique, l'état de l'art et la justification du projet de thèse ;
- Le chapitre 1 qui a trait à la Revue de la littérature ;
- Le chapitre 2 qui présente les Résultats obtenus ainsi qu'une discussion de ces résultats ;
- Le chapitre 3 relatif à la Partie expérimentale ;
- Et enfin la liste des références bibliographiques exploitées dans ce travail.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1 APERCU BOTANIQUE

I.1.1 Généralités sur la famille des Bignoniaceae

I.1.1.1 Classification systématique

La famille des Bignoniaceae est une famille de plantes tropicales dicotylédones positionnée selon la classification phylogénétique dans l'ordre des Lamiales (Olmstead et *al.*, 1993). L'histoire taxonomique de cette famille a été décrite en détail par Gentry (Gentry, 1980). Le rapprochement du genre *Paulownia* à la famille des Bignoniaceae (Armstrong, 1985) est contredit par les études phylogénétiques disponibles (Olmstead et *al.*, 2001 ; Spangler et Olmstead, 1999 ; Bremer et *al.*, 2002). De ce fait, le genre *Paulownia* a été classé dans la petite famille des Paulowniaceae (Nakai, 1949).

Cette famille contient au total environ 800 espèces réparties en près de 120 genres reconnus et tient son nom du genre *Bignonia*. C'est une famille relativement petite du fait que la plupart des genres ne contiennent qu'une seule espèce. Les genres les plus communes en Afrique tropicale sont les genres *Kigelia*, *Tecoma*, *Catalpa*, *Jacaranda*, et *Spathodea* (Houghton et Akunyili, 1993).

I.1.1.2 Description botanique de la famille des Bignoniaceae

Les membres de cette famille sont pour la plupart des arbres ou des lianes, parfois des arbustes et rarement des herbes.

Leurs feuilles sont pétiolées, simples ou composées et presque toujours opposées. Elles sont le plus généralement opposées et symétriques, parfois alternées ou en verticilles et n'ont pas de stipules. Elles sont généralement composées, bifoliées, trifoliées, pennées ou palmées et rarement simples.

Plusieurs espèces de cette famille sont d'usage ornemental car elles disposent de fleurs larges et attrayantes. Ces fleurs sont habituellement alignées, solitaires ou en inflorescences dans une grappe ou une cyme hélicoïdale. La corolle est à cinq pétales et souvent bilabiées. Les lobes de la corolle sont imbriqués en bouton. L'ovaire est supérieur, généralement entouré d'un disque nectaire, composé de deux carpelles, biloculaire et avec un septum, sauf uniloculaire chez *Tourrettia* (Figure 2) et quadriloculaire chez *Eccremocarpus* (Figure 3). Les ovules sont nombreux (Figure 1 à Figure 6).



Figure 1 : Fleur de *Tecoma stans*
(Ciesla, 2018)



Figure 2 : Fleur de *Tourrettia lappacea*
(Kay, 2012)



Figure 3 : Fleur de *Eccremocarpus scaber*
(Grosfeld, 2009)



Figure 4 : Fleur de *Campsis radicans*
(Harlan, 1967)



Figure 5 : Fleur de *Catalpa speciosa*
(Routledge, 2001)



Figure 6 : Fleur de *Macfadyena unguis-cati*
(Forest & Kim, 1986)



Figure 7 : Fruit de *Crescentia cujete*
(Buchan, 2006)



Figure 8 : Fruit de *Parmentiera cereifera*
(Dennis, 2002)



Figure 9 : Fruit de *Colea delphinensis*
(Porter, 2008)



Figure 10 : Fruit de *Catalpa bignonioides*
(Bonner, 2010)



Figure 11 : Fruit de *Campsis radicans*
(Baskauf, 2002)



Figure 12 : Fruit de *Kigelia africana*
(Dupont, 2013)

I.1.1.3 Répartition de la famille des Bignoniaceae

La famille des Bignoniaceae est une famille très répandue qui s'étend des zones tempérées aux zones tropicales du globe avec cependant une forte concentration en région tropicale, notamment en Afrique (Stevens, 2001).

I.1.2 Genre *Kigelia*

Le genre *Kigelia* est originaire de l'Afrique tropicale, plus précisément dans les régions les plus sèches. La seule espèce constituant ce genre nommée *Kigelia africana* a été introduite à des fins ornementales dans de nombreuses régions tropicales.

I.1.2.1 Espèce *Kigelia africana*

L'espèce *Kigelia africana* est familièrement connue sous les appellations d'arbres à saucisse ou à concombre et possède quelques noms scientifiques synonymes (Des horticulturistes distinguent plusieurs espèces différentes par ces synonymes, mais les études botaniques montrent que le genre ne contient qu'une seule espèce). Ces synonymes sont : *Bignonia africana*, *Crescentia pinnata*, *Kigelia abyssinnica*, *Kigelia aethiopica*, *Kigelia aethiopium*, *Kigelia aeutifolia*, *Kigelia elfonii*, *Kigelia pinnata*, *Kigelia spragueana* et *Kigelia talbota*.

I.1.2.1.1 Description botanique

Kigelia africana est un arbre de 15 mètres en moyenne de hauteur qui peut facilement être identifié par les caractéristiques suivants :

- Les fruits matures sont gris-marron, pulpeux et fibreux et ressemblent à des saucisses géantes d'environ 0,5 m de long (Saini *et al.*, 2009).
- Les fleurs sont rouges, sous forme de trompes, d'environ 90 Cm de long et contiennent beaucoup de nectar (Houghton & Akunyili, 1993 ; EL- Sayyad, 1982).
- le tronc brun clair, supporte une dense cime, arrondie à étalée (EL- Sayyad, 1982).
- le bois est blanchâtre ou jaunâtre (EL- Sayyad, 1982).

La figure suivante (Figure 13) présente la partie aérienne de *Kigelia africana* où l'on distingue le tronc, les fruits et une inflorescence.



Figure 13 : Fruits et inflorescence de *Kigelia africana*
Ketsemen, 2018

I.1.2.1.2 Répartition géographique

Kigelia africana est présent partout en Afrique tropicale, particulièrement dans les régions sèches. On le trouve aussi en Afrique du Sud (Province du Nord, Kwazulu-Natal) et au Swaziland, mais pas en Mauritanie, São Tomé-et-Principe, ni dans les îles de l'océan Indien. Il a été introduit à des fins ornementales au Cap-Vert et à Madagascar, ainsi qu'en Iraq, au Pakistan, en Inde, en Chine, en Asie du Sud-Est, en Australie, à Hawaii et en Amérique centrale et du Sud (Grace et Davis, 2002).





- | | |
|---|--|
|  | Zone ou pays de distribution de la plante <i>Kigelia africana</i> en Afrique |
|  | Zone ou pays où la plante <i>Kigelia africana</i> est non répertoriée en Afrique |

Figure 14 : Répartition de l'espèce *Kigelia africana* en Afrique (Chauvet, 2015)

Au Cameroun, *Kigelia africana* pousse dans les régions du Centre, du Nord, de l'Extrême nord, de l'Est et de l'Ouest. Le Tableau 1 suivant résume les localités où cet arbre a déjà été récolté d'après les archives de l'Herbier national de Yaoundé.

Tableau 1 : Site de récolte de *Kigelia africana* au Cameroun et noms vernaculaire de la plante

REGION	NOM VERNACULAIRE
72 Km de Bertoua, Route de Ndemba I	Ebounglound (Bobili)
Bertoua à coté de Deng-Deng	Eboung-Lound
Membine, Nanga Eboko	---
Yaoundé, Mvog Betsi, Route Yaoundé-Kribi	Nsotzog
Garoua-Maroua	Jurlahi
Houra après de Guirvidig (70 Km au Nord-Est de Maroua)	---

(Herbier National Yaoundé-Cameroun (Personnal Communication))(Inoue *et al.*, 1981)

I.1.2.1.3 Usages de l'espèce *Kigelia africana*

L'espèce *Kigelia africana* est utilisée en Afrique principalement sous les plans socio-économique, commercial et médicinal.

I.1.2.1.4 Usage socio-culturel

Les communautés rurales africaines exploitent depuis très longtemps l'espèce *Kigelia africana* pour des usages socio-économiques très diversifiés. Ces usages sont résumés dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : Usage socio-culturel (Grace et Davis, 2002)

Extrait ou partie	Usage
Graines	Les graines grillées servent de nourriture pendant les périodes de grandes famines
La pulpe des fruits	Colorant
Fruits	<ul style="list-style-type: none"> - produits pharmaceutiques - utilisés pour des jeux - Charme garantissant la santé et la prospérité, la fécondité, l'abondance des récoltes.

Fruits et racines	- Aide à la fermentation et améliore le goût des boissons traditionnelles
Racine	- Construction, bois et ustensiles
Arbre entier	- Arbre religieux et traditionnel, marqueur de limites.
Extrait aqueux	- Control biologique des poissons pisciculture

I.1.2.1.5 Usage commercial

Les fruits et écorces de *Kigelia africana* sont récoltés et vendus dans les marchés locaux. Leur valeur commerciale est attribuable à la production des applications commerciales pour le traitement des infections de la peau au sud du continent africain, notamment au Zimbabwe (Grace et Davis, 2002). Un grand nombre de crèmes antimicrobiennes très efficaces contre les infections microbiennes usuelles sont produites à partir des écorces de tronc de *Kigelia africana* (Grace et Davis, 2002).

I.1.2.1.6 Usage médicinal

Les fruits et les autres parties de la plante sont aussi très utilisés en médecine vétérinaire traditionnelle pour traiter les troubles du système digestif, les œdèmes des pieds, les irritations et infections dermiques et mastite (Govindachari et *al.*, 1971). Les usages médicaux de *Kigelia africana* dans certains pays africains sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Usages médicaux de *Kigelia africana*

Pays	Champ d'application
Senegal	Fruits utilisés contre la dysenterie (Potel, 2002)
Cameroun	<ul style="list-style-type: none"> - Les écorces sont utilisées pour traiter les abcès (Inoue et <i>al.</i>, 1981). - Les décoctions d'écorces du tronc et de racines sont utilisées pour soigner la pneumonie, les blessures, la filariose et la faiblesse sexuelle (Gouda et <i>al.</i>, 2003). - Les fleurs préparées avec du haricot redonnent des forces (Malzy, 1954).
Ghana	Les décoctions d'écorces du tronc et de racines sont utilisées pour soigner la dysenterie, le rhumatisme et les plaies (Agyare et <i>al.</i> , 2009).

Nigeria	<ul style="list-style-type: none"> - Les décoctions d'écorces du tronc et de racines sont utilisées pour traiter la diarrhée et la dysenterie (EL- Sayyad, 1982). - Le macerat de la poudre des écorces de tronc est utilisé contre les maladies vénériennes (Gouda et <i>al.</i>, 2003). - Dans le nord du Nigeria l'extrait est bu par les femmes qui allaitent lorsque le lait sèche dans les seins (Grace & Davis, 2002).
Zimbabwe	<ul style="list-style-type: none"> - L'infusion de la plante est utilisée à des fins contraceptives (Sewani-Rusike, 2010).
Togo	<ul style="list-style-type: none"> - L'écorce de tronc est un ingrédient d'une formulation dans le cas des troubles circulatoires (Hodouto, 1990)
Afrique du Sud	<ul style="list-style-type: none"> - Le jus de fruit est frotté sur le pénis pour l'élargir (Arnold & Gulumian, 1984).
Kenya	<ul style="list-style-type: none"> - La décoction d'écorces de tronc, de racines ou des feuilles est consommée contre le rhume et la toux (Kenji et <i>al.</i>, 2004).
Cote d'Ivoire	<ul style="list-style-type: none"> - Les préparations de <i>Kigelia africana</i> sont utilisées contre les œdèmes et douleurs abdominales (Koné et <i>al.</i>, 2004).
Zaire	<ul style="list-style-type: none"> - Le jus de fleurs est utilisé contre la conjonctivite et les infusions d'écorces contre les maux de ventre (Terashima, 1988).
Tanzania	<ul style="list-style-type: none"> - Les écorces et les fruits sont utilisés dans le traitement de l'herpès (Kisangau et <i>al.</i>, 2007).

	- La décoction des tiges est utilisée pour soigner la dysenterie, la toux, la pneumonie, la bilharziose et la gonorrhée (Maregesi <i>et al.</i> , 2007).
--	--

I.2 ETUDES CHIMIQUES ANTERIEURES

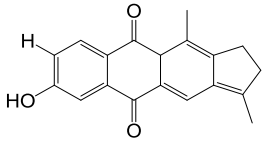
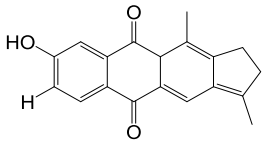
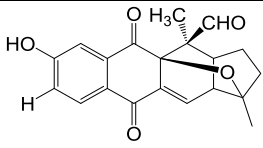
I.2.1 Chimiotaxonomie de la famille des Bignoniaceae

Un grand nombre d'études phytochimiques des extraits de plantes de la famille des Bignoniaceae révèle qu'elles contiennent des classes de métabolites secondaires tels que les saponines, les tannins, les flavonoïdes, les quinones, les alcaloïdes, les dérivés des anthracènes, des sucres réducteurs, des glycosides, des hydrates de carbone, des stérols, des terpènes, des stéroïdes et des coumarines.

I.2.2 Espèce *Kigelia africana*

Kigelia africana a été l'objet d'un grand nombre d'études phytochimiques qui ont aboutis à l'isolement de plusieurs métabolites secondaires appartenant aux classes de : Monoterpènes aromatiques (Tableau 4), Triterpènes (Tableau 5), Iridoides (Tableau 6), Lignanes (Tableau 7), Isocoumarines (Tableau 8), Flavonoides (Tableau 9) et Quinones (Tableau 10).

Tableau 4 : Monoterpènes aromatiques isolés de *Kigelia africana*

Nom	Structure	Référence
Isokigelinol	 <p style="text-align: center;">11</p>	(Akunyili & Houghton, 1993)
Kigelinol	 <p style="text-align: center;">12</p>	(Akunyili & Houghton, 1993)
Pinnatal	 <p style="text-align: center;">13</p>	(Joshi <i>et al.</i> , 1982)

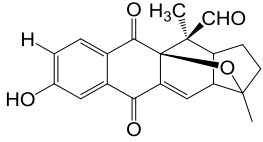
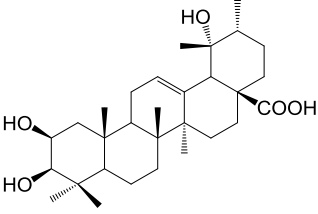
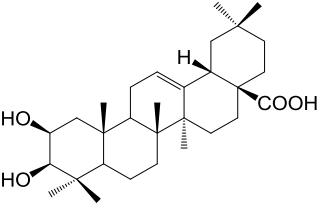
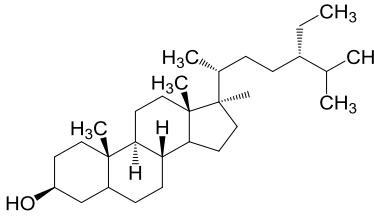
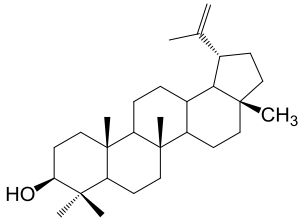
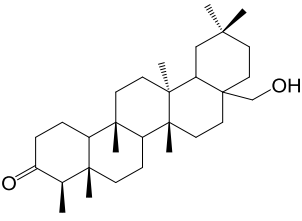
Isopinnatal	 <p style="text-align: center;">14</p>	(Akunyili & Houghton, 1993)
-------------	---	-----------------------------

Tableau 5 : Triterpènes isolés de *Kigelia africana*

Nom	Structure	Référence
acide 2b, 3b, 19 α -trihydroxy-urs-12-en-28-oïque	 <p style="text-align: center;">15</p>	(Hattori et al., 1988)
acide 2b, hydroxyoleanolique	 <p style="text-align: center;">16</p>	(Parkhurst et al., 1990)
γ -Sitostérol	 <p style="text-align: center;">17</p>	(Khan MR, 1998)
Lupéol	 <p style="text-align: center;">18</p>	(Hattori et al., 1988)
Canophyllol	 <p style="text-align: center;">19</p>	(Hattori et al., 1988)

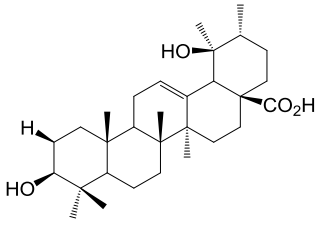
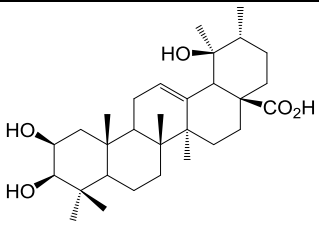
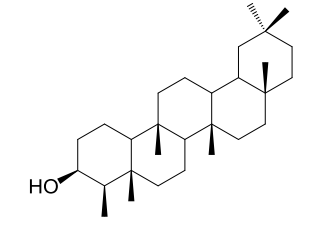
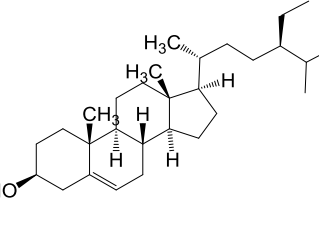
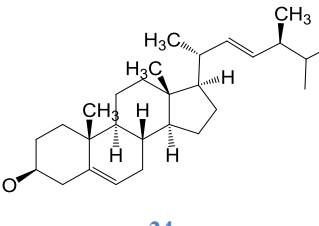
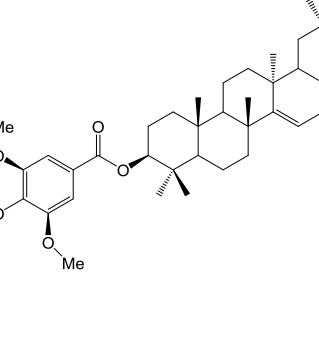
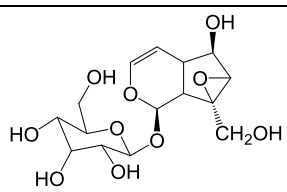
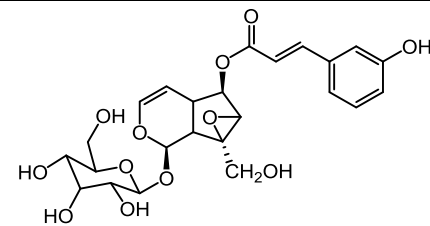
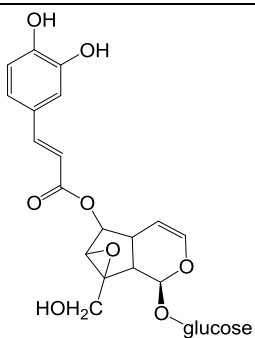
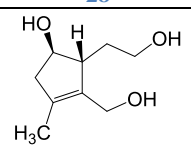
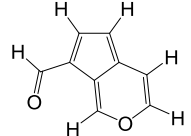
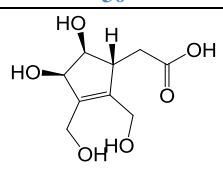
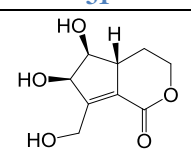
Acide Pomolique	 <p style="text-align: center;">20</p>	(Hattori et al., 1988)
Acide 4-hydroxy-pomolique	 <p style="text-align: center;">21</p>	(Hattori et al., 1988)
β -friedelinol	 <p style="text-align: center;">22</p>	(Sidjui et al., 2015)
β -sitosterol	 <p style="text-align: center;">23</p>	(Saini et al., 2008)
Stigmasterol	 <p style="text-align: center;">24</p>	(Saini et al., 2008)
Fibrarecisine	 <p style="text-align: center;">25</p>	(Sidjui et al., 2015, Fu et al., 2007)

Tableau 6 : Iridoïdes isolés de *Kigelia africana*

Nom	Structure	Référence
Catapol	 <p style="text-align: center;">26</p>	(Inoue <i>et al.</i> , 1981)
Specioside	 <p style="text-align: center;">27</p>	(Inoue <i>et al.</i> , 1981, Houghton et Akunyili, 1993)
Verminoside	 <p style="text-align: center;">28</p>	(Inoue <i>et al.</i> , 1981, Houghton et Akunyili, 1993)
10-Deoxyeucommiol	 <p style="text-align: center;">29</p>	(Gouda <i>et al.</i> , 2003)
Norviburtinal	 <p style="text-align: center;">30</p>	(Joshi <i>et al.</i> , 1982)
Acide 7-Hydroxy eucommique	 <p style="text-align: center;">31</p>	(Gouda <i>et al.</i> , 2003)
7- Hydroxy viteoid II	 <p style="text-align: center;">32</p>	(Gouda <i>et al.</i> , 2003)

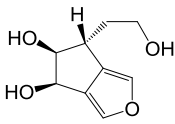
Jiofurane	 <p style="text-align: center;">33</p>	(Gouda <i>et al.</i> , 2003)
-----------	---	------------------------------

Tableau 7 : Lignanes isolés de *Kigelia africana*

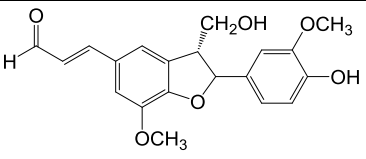
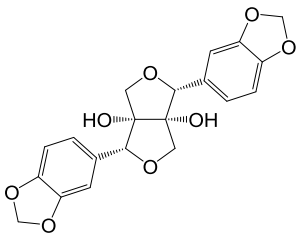
Nom	Structure	Référence
Balanophonin	 <p style="text-align: center;">34</p>	(Joshi <i>et al.</i> , 1982)
Kigeliol	 <p style="text-align: center;">35</p>	(Inoue <i>et al.</i> , 1981)

Tableau 8 : Isocoumarines isolés de *Kigelia africana*.

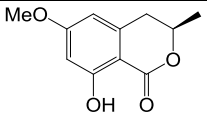
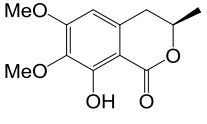
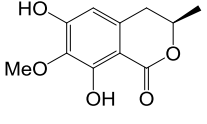
Nom	Structure	Référence
6-oxyméthylemelleine	 <p style="text-align: center;">36</p>	(Govindachari <i>et al.</i> , 1971)
Kigeline	 <p style="text-align: center;">37</p>	(Govindachari <i>et al.</i> , 1971)
6- Demethylkigeline	 <p style="text-align: center;">38</p>	(Govindachari <i>et al.</i> , 1971)

Tableau 9 : Flavonoïdes isolés de *Kigelia africana*

Nom	Structure	Référence
-----	-----------	-----------

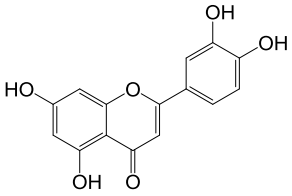
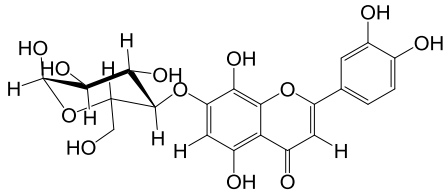
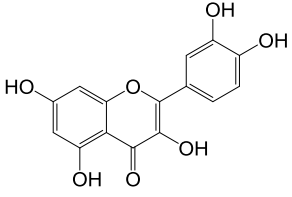
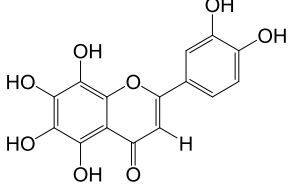
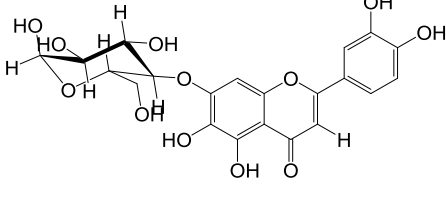
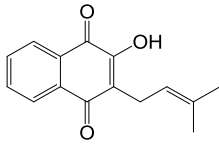
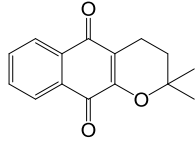
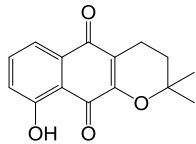
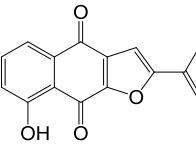
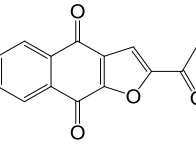
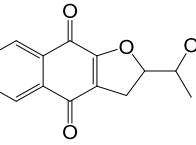
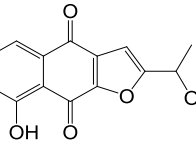
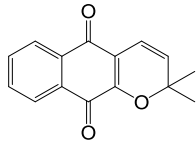
Luteoline	 <p style="text-align: center;">39</p>	(EL- Sayyad, 1982)
Luteoline-7-glucoside	 <p style="text-align: center;">40</p>	(EL- Sayyad, 1982)
Quercetine	 <p style="text-align: center;">41</p>	(EL- Sayyad, 1982)
6-OH luteolin	 <p style="text-align: center;">42</p>	(EL- Sayyad, 1982)
6-OH Luteoline-7-glucoside	 <p style="text-align: center;">43</p>	(EL- Sayyad, 1982)

Tableau 10 : Composés quinoniques isolés de *Kigelia africana*

Nom	Structure	Référence
Lapachol	 <p style="text-align: center;">4</p>	(Binutu <i>et al.</i> , 1996)
α -lapachone	 <p style="text-align: center;">8</p>	(Duarte <i>et al.</i> , 2000)

9- hydroxy- α - lapachone	 44	(Duarte <i>et al.</i> , 2000)
Isopropenyl-8- hydroxyfuran-1,4-naphthoquinone	 45	(Duarte <i>et al.</i> , 2000)
2- Acetyl- naphtho [2,3-b]furan-4,9- dione	 10	(Akunyili & Houghton, 1993)
2,3-dihydro-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione	 46	(Duarte <i>et al.</i> , 2000)
Kigelinone	 47	(Binutu <i>et al.</i> , 1996)
Dehydro α -lapachone	 48	(Binutu <i>et al.</i> , 1996)

I.2.3 Lapachol

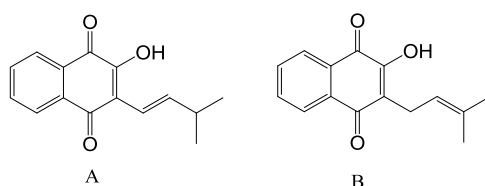
I.2.3.1 Origine et occurrence

Le lapachol **4** a été isolé pour la première fois par Paterno de *Tabebuia avellanedae* en 1882 (Paternó, 1882). *Tabebuia avellanedae* est un arbre de la famille des Bignoniaceae. Communément appelé "pau d'arco" au Brésil. Son écorce interne est utilisée comme analgésique, anti-inflammatoire, antinéoplasique et diurétique par la population locale du nord-est du Brésil (Miranda *et al.*, 2001). Ses activités anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antinéoplasiques sont citées dans la littérature et s'appuient sur la présence des saponines, des flavonoïdes, des coumarines et d'autres antibiotiques naturels tels que les dérivés du lapachol, souvent inclus parmi les constituants du matériel végétal extrait (Miranda *et al.*, 2001) ainsi que plusieurs naphthoquinones liées biogénétiquement. Le lapachol **4** a également été isolé d'autres familles telles que Verbenaceae, Proteaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae et Malvaceae. Le

lapachol **4** est l'un des plus polyvalents parmi les naphthoquinones dotées d'activités biologiques significatives. L'étude des effets biologiques du lapachol lancée dans les années 1960 a été stoppée quatorze années plus tard. En effet, en 1974, le *National Cancer Institute* (NCI) a mis fin aux études pharmacologiques en raison de ses effets secondaires toxiques (Block et al, 1974). Cependant, ces études n'incluaient pas le screening du lapachol au niveau moléculaire et il est de ce fait recommandé de préparer de nouveaux dérivés du lapachol en utilisant des protocoles synthétiques bien établis et nouvellement développés afin de générer de grandes bibliothèques d'analogues ayant leurs propriétés chimiques diversifiées basées sur le lapachol, dans la mesure où elle mènera sans aucun doute à de nouvelles et intéressantes découvertes d'activités biologiques.

I.2.3.2 Structure du lapachol

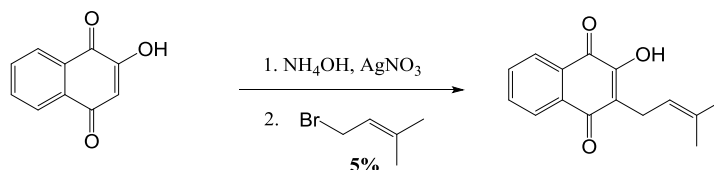
Lapachol **4** est une matière de couleur jaune qui apparaît dans les graines de plusieurs arbres. Paterno fut le premier à suggérer en 1882 que sa structure devrait être celle d'un amylène hydroxynaphtoquinone avec les deux groupes substituants dans le cycle quinone (Paternó, 1882). Après que Hooker eut présenté des raisons convaincantes de considérer le lapachol comme un dérivé d'une α -naphtoquinone (Hooker, 1892), la structure de Paterno est restée incertaine pour ce qui est de la position de la double liaison dans le prényle côté chaîne.



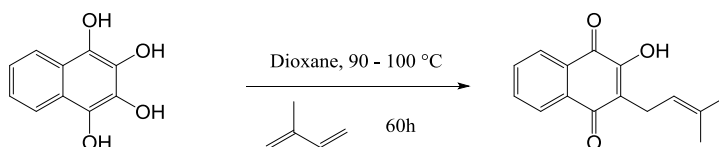
Hooker a ensuite réalisé une synthèse du composé correspondant à A par la condensation de l'isovéraldéhyde avec l'hydroxynaphtoquinone et a permis d'obtenir un isomère de lapachol (iso- β -lapachol) identifiable à sa couleur rouge (Hooker, 1896) différente de la couleur jaune du lapachol.

I.2.3.3 Synthèse du lapachol

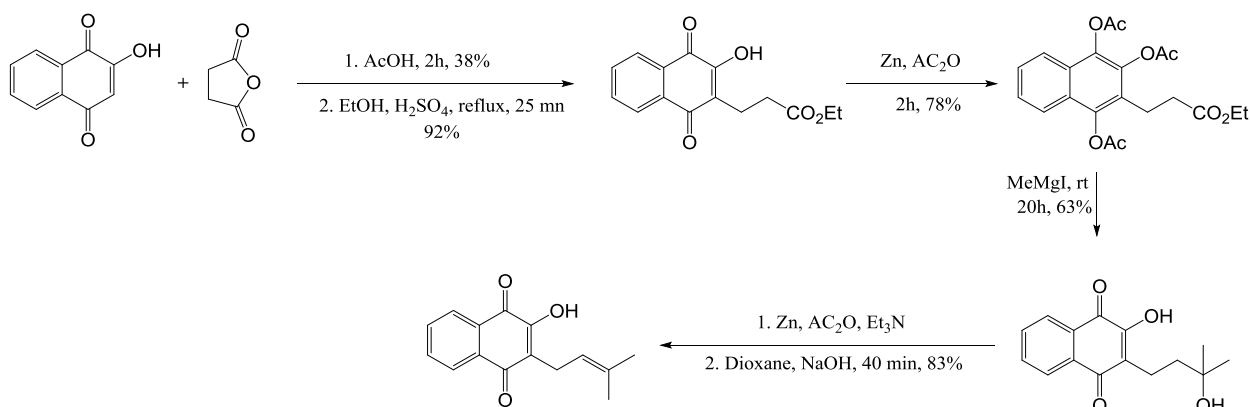
La synthèse du lapachol par Fieser a été la première qui a permis de confirmer sa structure. La première approche utilisée (rendement de 5%) était une alkylation du sel d'argent de la 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone avec la 1-bromo-3-méthylbut-2-ène. (Fieser, 1927)



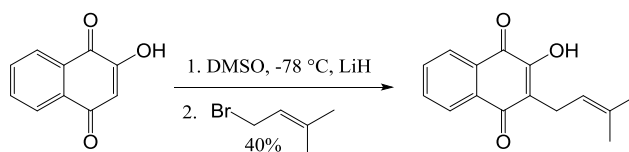
En 1948, Gates et Moesta ont rapporté une synthèse du lapachol par condensation de leucoisonaphtalazarine avec isoprène (Gates & Moesta, 1948).



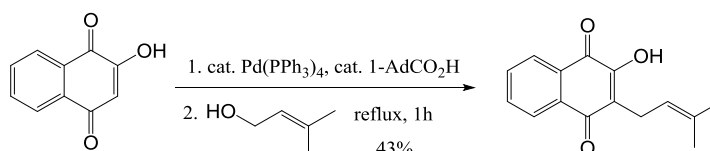
Dix ans plus tard, Petti et Houghton ont signalé la première synthèse totale pratique de lapachol avec un rendement global de 35% (Pettit & Houghton, 1968 ; Pettit & Houghton, 1971).



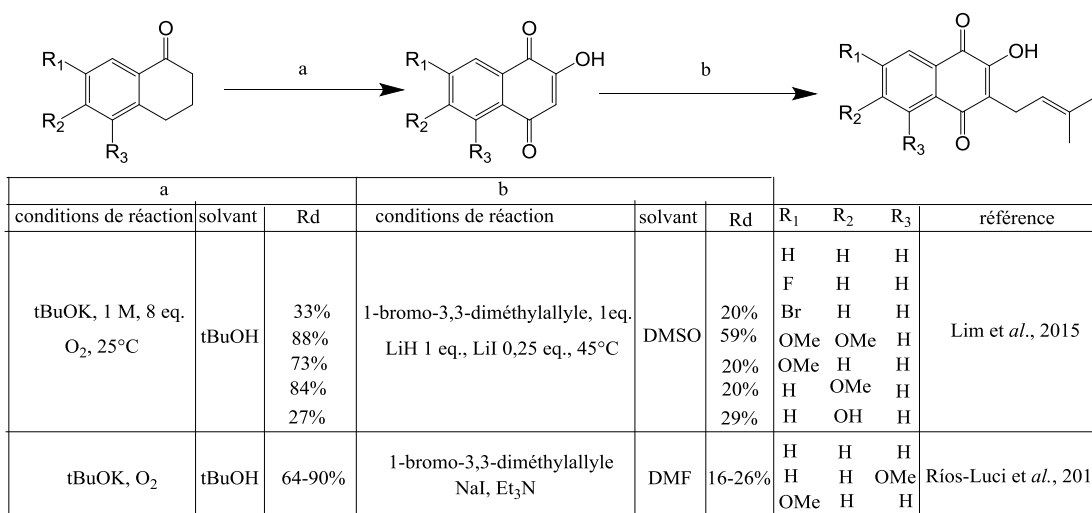
Une méthode d'alkylation intéressante de la lawsone (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone) à travers une synthèse préparative à grande échelle de lapachol a également été rapportée (Sun et *al.*, 1998). Le sel de lithium de Lawsone a été préparé *in-situ* par l'addition d'hydruire de lithium à une solution congelée de la quinone dans le diméthylsulfoxyde. Lorsque la solution a décongelé, le sel de lithium s'est lentement formé et a ensuite été alkylé avec du bromure de 3,3-diméthylallyle, pour donner le lapachol souhaité avec un rendement de 40%.



En 2007 dans une tentative d'amélioration du rendement de la synthèse du lapachol, Kazantzi a rapporté une nouvelle synthèse avec un rendement global de 43 % (Kazantzi et *al.*, 2007). Dans ce cas, le lapachol a été préparé par réaction entre la lawsone et le 3-méthylbut-2-èn-1-ol en présence d'un catalyseur tel que Pd(PPh₃)₄ et l'acide 1-admantanecarboxylique.



Par la suite, Lim et Ríos-Luci expérimentent la synthèse du lapachol et des dérivés du lapachol présentant un bilan de substitution sur le cycle A suivant un protocole synthétique faisant réagir le 7-fluoro-2-hydroxynaphthalène-1,4-dione sur le bromure de 3,3-diméthylallyle (Lim et *al.*, 2015, Ríos-Luci et *al.*, 2012).



En conclusion, la synthèse du lapachol a été importante pour la vérification de la structure mais possède peu de valeur pratique compte tenu de l'abondance de ce produit naturel en tant que métabolite dans plusieurs arbres tropicaux.

1.2.3.1 Dérivés du lapachol

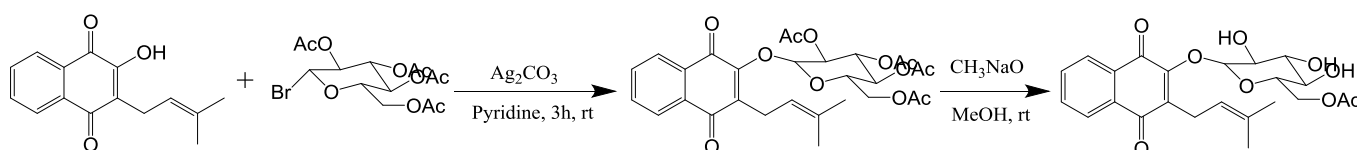
Les deux premiers analogues naturels du lapachol à isoler étaient la β -lapachone **9** et l' α -lapachone **8** présents dans *Tabebuia avellanedae* en même temps que le lapachol (Nagata et *al.*, 1998). Les lapachones α et β ont été synthétisés à partir du lapachol (Sacau et *al.*, 2003 ; Salas et

al., 2008). Par la suite un grand éventail de dérivés hémisynthétiques du lapachol ont été rapportés et une liste non exhaustive est présentée ci-après.

1.2.3.1.1 Dérivés de substitution sur le groupement hydroxyle

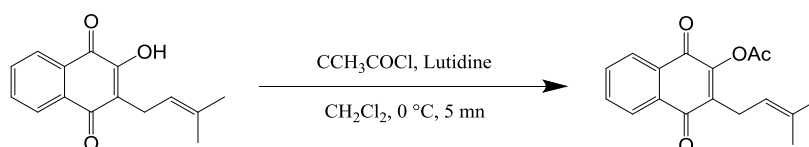
1.2.3.1.1.1 Glucosylation

Le glucopyranoside du lapachol a été synthétisé par Da Consolacao en 1975 (Consolacao *et al.*, 1975) à partir du lapachol isolé de *Tabebuia avellanadae* traité avec le α -bromotetraacetylglucose en présence du carbonate d'argent pour donner le tetraacetylglucopyranoside de lapachol qui est ensuite de-acéthylé.



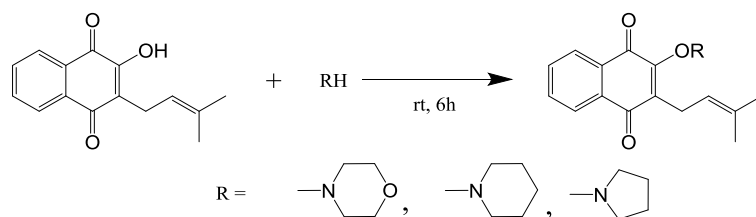
1.2.3.1.1.2 Acetylation

Pour réaliser l'acétylation du lapachol, Sacau en 2003 (Sacau *et al.*, 2003) traite le lapachol avec le chlorure d'acétyle et la lutidine en solution dans le dichlorométhane à 0 °C pendant 5 minutes. Le produit brut est traité avec du HCl dilué. La phase organique est lavée à l'eau distillée, extraite avec du dichlorométhane et séchée sous MgSO_4 anhydre. Une purification chromatographique sous gel de silice et au système Hexane/acétate 10% permet d'obtenir les cristaux d'acétate de lapachol.



1.2.3.1.1.3 Amination

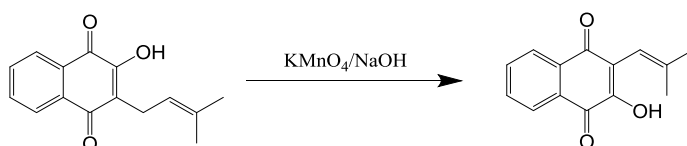
Le groupement hydroxyle du lapachol peut être substitué par une amine secondaire comme cela a été fait par Oliveira en 2002 (Oliveira *et al.*, 2002). La solution de lapachol dans l'amine secondaire liquide fraîchement distillée est homogénéisée pendant six heures à température ambiante et l'exédant d'amine est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu après recristallisation dans le système de solvant Hexane/Acétate 10%.



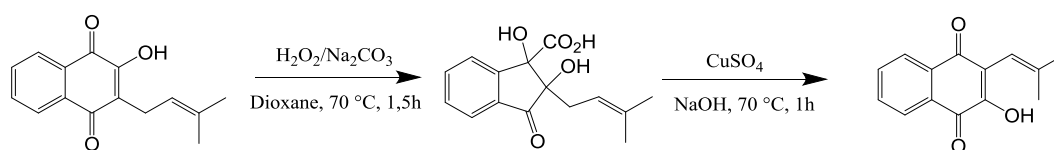
1.2.3.1.2 Dérivés de modification du groupement isoprényle latéral

1.2.3.1.2.1 Oxydation de Hooker

La réaction de Hooker est l'une des réactions les plus intrigantes en chimie organique. Un exemple historique est la réaction 'one pot' de conversion du lapachol en norlapachol. Cette réaction fait intervenir la dégradation de la chaîne isoprényle latérale du lapachol d'une unité de carbone accompagné d'une permutation de position entre la chaîne alkyle et le groupement hydroxyle. Il est présumé que le mécanisme est beaucoup plus complexe que ne laisse transparaître les conditions de réaction (1 % KMnO_4 , NaOH , 0°C).

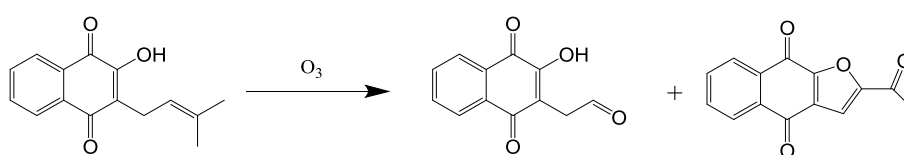


Cette réaction qui n'est pas commune a suscité de l'intérêt auprès des chimistes organiciens à explorer son mécanisme depuis les travaux de Hooker (Hooker, 1936a). Plus tard Fieser proposa une modification de la réaction dans un protocole à deux étapes faisant intervenir un intermédiaire réactionnel de type acide carboxylique indanique (Fieser & Fieser, 1948).



1.2.3.1.2.2 Coupure oxydative

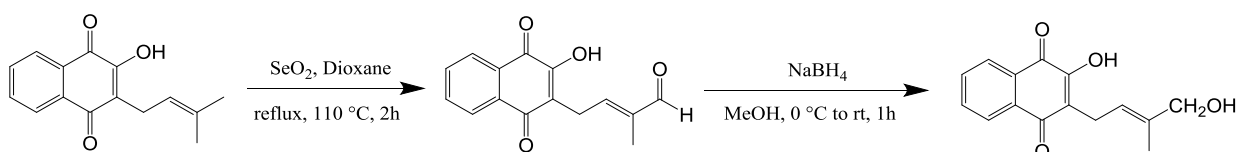
La double liaison du groupement isoprényle latéral est un site propice aux réactions d'oxydations. Eyong met à profit cette réactivité en 2008 en faisant barboter une solution de lapachol dans de l'ozone (Eyong et al., 2008).



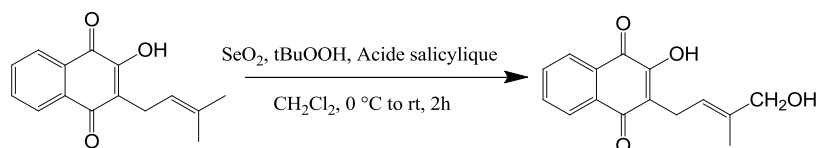
On assiste dans ces conditions à la coupure oxydative de la double liaison avec formation d'un aldehyde produit de réaction, mais aussi un produit secondaire de type acethylfuronaphtoquinone.

1.2.3.1.2.3 Oxydation allylique

Le groupement isoprényle latéral peut également subir une oxydation de type allylique. Eyong (Eyong et *al.*, 2015) applique les conditions d'oxydation allylique (Nakamura & Nakada, 2013) au lapachol. Le lapachol est oxydé au SeO_2 et le produit de la réaction est un aldehyde qui peut être réduit au NaBH_4 pour donner le lamatiol.

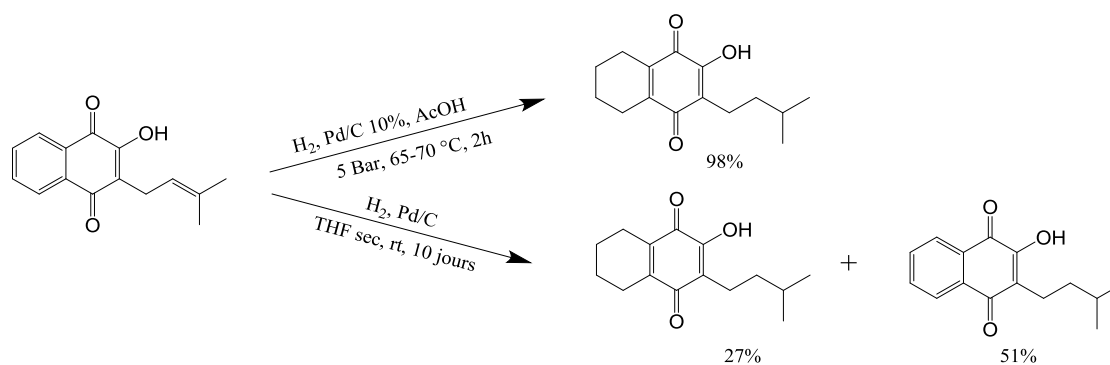


D'autre part, en se servant des conditions d'oxydation allyliques reportées par Tanis (Tanis et *al.*, 1988), Eyong obtient une oxydation plus douce qui produit directement le lomatiol avec un meilleur rendement. 0.08 eq. de SeO_2 sont utilisés en lieu de 0,02 dans le cas précédent.



1.2.3.1.2.4 Hydrogénation

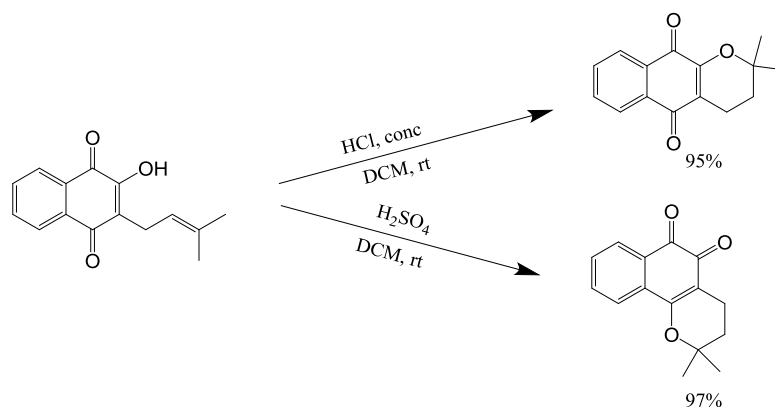
L'hydrogénation du lapachol pose un problème de sélectivité entre la double liaison du groupement isoprényle et le cycle A. Tania (Tania et *al.*, 2005) obtient l'hydrogénation partielle du cycle A et de la double liaison du groupement isoprényle à plus de 98% avec une hydrogénation menée à 5 bar en présence de 10 % de palladium fixé au charbon actif dans l'acide acétique. Un suivi de l'hydrogénation sélective de la chaîne prényle latérale est réalisé par spectroscopie RMN ^1H et révèle que les signaux attribués aux protons des quinones hydrogénés commencent à apparaître à 2 atm.



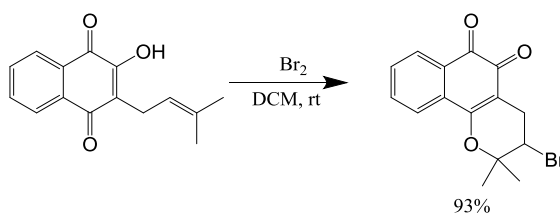
Un peu plus tard, Sacau (Sacau et *al.*, 2007) reproduit la réaction en faisant barboter du H₂ dans une solution de lapachol dissout dans le tétrahydrofurane contenant une quantité catalytique de Palladium fixé sur du charbon actif pendant dix jours. Il obtient un mélange de produits contenant le produit d'hydrogénation sélective de la chaîne latérale isoprényle et celui présentant en plus l'hydrogénation partielle du cycle A.

1.2.3.1.3 Dérivés de type α -lapachone et β -lapachone

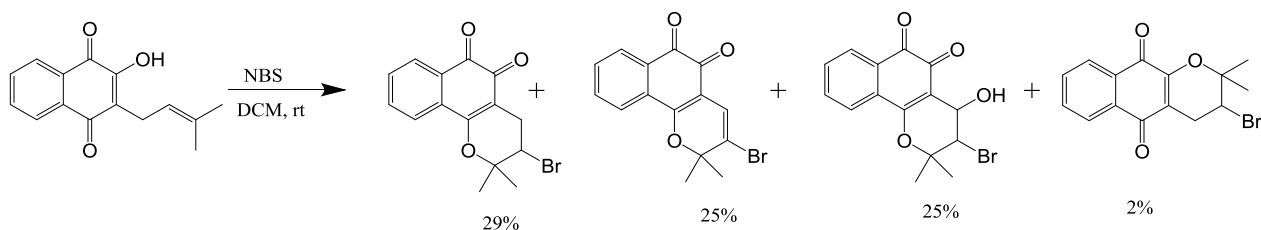
Un certain nombre de travaux effectués sur le lapachol font intervenir la cyclisation du groupement isoprène latéral avec les oxygènes en position 2 et 4. Les dérivés α -lapachone et β -lapachone du lapachol peuvent être obtenus par réaction du lapachol en milieu acide (Hooker, 1936b).



Un analogue bromé du β -lapachone est obtenu par réaction du lapachol avec du dibrome (Eyong et *al.*, 2013).

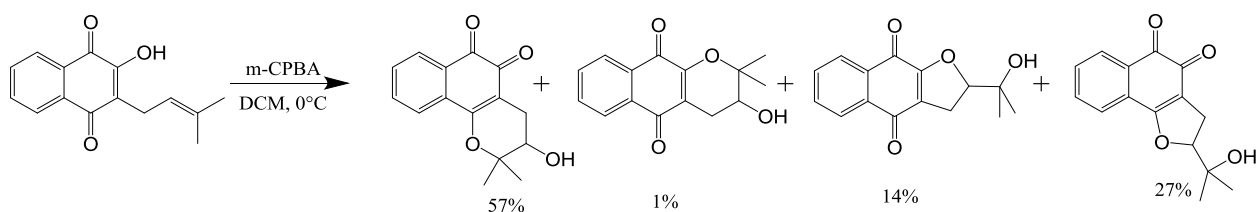


La réaction du lapachol dissout dans le dichlorométhane avec le N-Bromosuccinimide donne les dérivés de type α -lapachone et β -lapachone avec des rendements faibles (Sacau et *al.*, 2007).

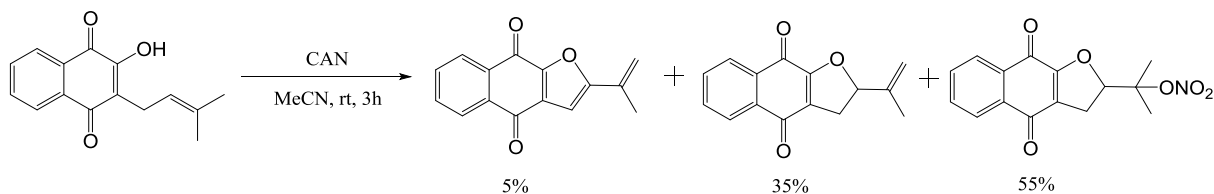


1.2.3.1.4 Dérivés de type acethylfuroquinone

Rappelons que la 2-acethylfuronaphtoquinone a été obtenu comme décrit précédemment dans la réaction d'ozonolyse du lapachol. Les dérivés de type acethylfuroquinone en plus des dérivés de type α -lapachone et β -lapachone sont obtenus autrement par oxydation du lapachol au *m*-CPBA (Sacau et *al.*, 2007).

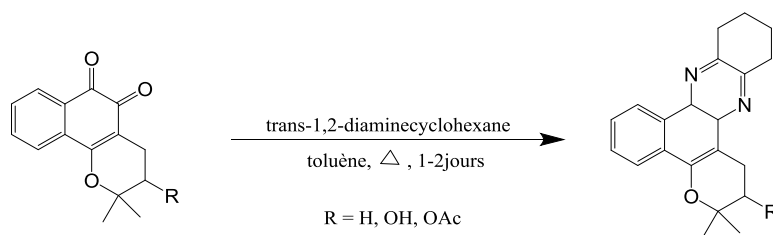


La réaction du lapachol avec du nitrate de cérium et d'ammonium dans l'acetonitrile sec après une cyclisation de type 5-exo-trig (Kenneth O. Eyong et al., 2008) conduit à des dérivés de type acethylfuronaphtoquinones.

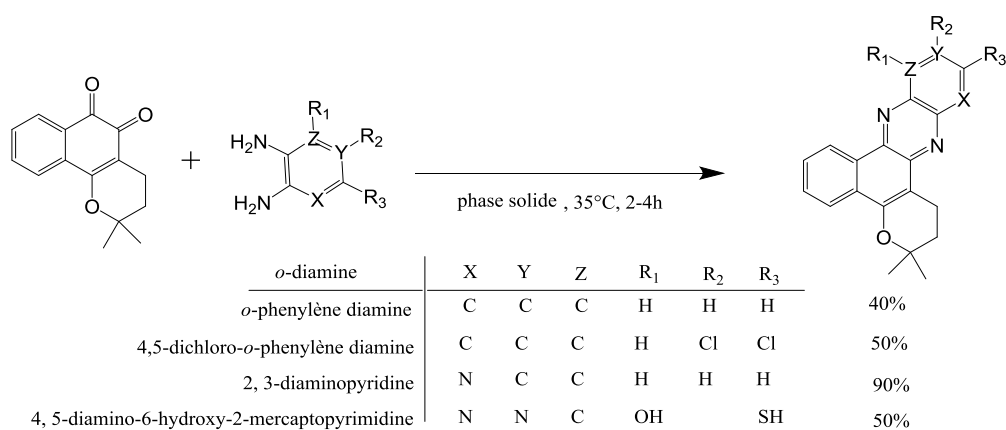


1.2.3.1.5 Dérivés de Type phenazine

Les dérivés du lapachol de type β -naphtoquinones sont propices aux réactions de condensation avec des structures chimiques présentant deux carbones aminés adjacents. Il se forme un nouveau cycle renfermant deux fonctions imines. Sacau (Sacau et *al.*, 2007) obtient une série de dérivés suivant cette voie synthétique.



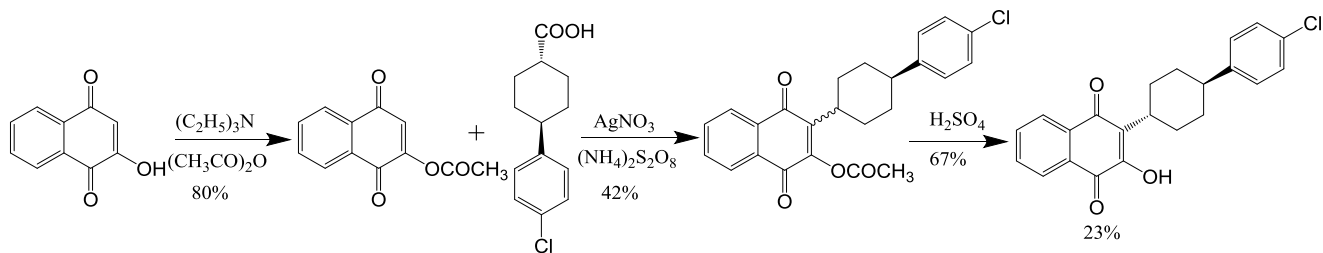
Une méthode de synthèse à l'état solide a été employée par Eyong (Kenneth O Eyong et al., 2011) pour obtenir ce type de dérivés. La méthode à l'état solide utilisée consiste à chauffer un mélange de fines poudres d'ortho-diamines et d'ortho-quinones (ici le β -lapachone obtenu à partir du lapachol en milieu H_2SO_4) dans la proportion 2 : 1, dans un tube à essai fermé à 35°C et dans des conditions inertes (en utilisant de l'argon ou de l'azote) pendant environ 2 à 4 heures.



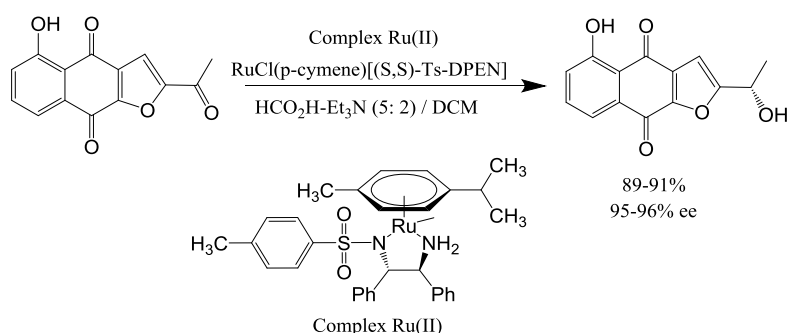
I.2.3.2 Synthèse des analogues des dérivés du lapachol

I.2.3.2.1 Dérivés chiraux

La synthèse des composés énantiomériquement pur est très importante dans la recherche des principes actifs. En effet les sites actifs des récepteurs biologiques présentent une configuration spatiale tridimensionnelle bien définie et asymétrique, si bien que dans le cas de médicaments chiraux, les interactions entre le médicament et le récepteur sont favorables pour l'un des deux énantiomères et non pour les deux (Kirkiacharian, 2005). Un exemple de médicament chiral dérivé du lapachol est l'atovaquone utilisé en Amérique latine pour soigner la malaria. Nardi (Antonio et al., 2010) fait breveter la synthèse suivante de l'atovaquone à partir du 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone et dans laquelle deux énantiomères de l'atovaquone sont convertis en atovaquone en milieu acide.



Un autre dérivé du lapachol obtenu par synthèse stéréosélective est celle effectuée par Yamashita (Yamashita et *al.*, 2007) lui permettant d'obtenir le (S)-5-hydroxy-2-(1-hydroxyéthyl)-acétylfuronaphthoquinone à partir du 5-hydroxy-2-acétylfuronaphthoquinone utilisant la réduction de Noyori catalysée au ruthénium.



Les tests biologiques montrent que l'isomère (S) ainsi obtenu possède une activité cytotoxique significative contre des cellules cancéreuses telles que PC-3 et A549 tandis que l'isomère (R) est beaucoup moins cytotoxique (Yamashita et *al.*, 2007).

En somme, le grand nombre de travaux intéressants publiés sur le potentiel thérapeutique du lapachol, de l' α -lapachol et du β -lapachol ainsi que leurs dérivés synthétiques atteste de l'importance de ces molécules. De plus, ces quinones ont démontré de puissants effets anticancéreux vis-à-vis de différentes lignées de cellules cancéreuses et leur modification chimique a conduit à des produits présentant des effets anticancéreux renforcés (Hussain & Green, 2017). Il convient de noter que la majorité des travaux publiés portent sur les effets anticancéreux de ces quinones et de leurs dérivés synthétiques, mais aussi sur un nombre limité d'effets biologiques additionnels. Ce potentiel peut être exploité avantageusement dans la recherche de principes tête de liste. Pour cela un intérêt doit davantage être accordé à l'élucidation du mécanisme d'action précis de ces composés, y compris les études Relationnelles Structure-Activité (SAR) et *in-vivo* (Hussain & Green, 2017).

I.3 DOCKING MOLECULAIRE

I.3.1 Technique

La bioinformatique est un domaine à forte interdisciplinarité qui utilise des techniques et des concepts de l'informatique, de la génétique, de la biochimie, de la chimie, des mathématiques, des statistiques, etc. Les recherches dans cette discipline consistent à développer des méthodes pour la collection, le stockage, l'organisation, la visualisation et l'analyse des données biologiques. Il s'en suit le développement de méthodes de prédiction propres à chaque problématique. La bioinformatique structurale est une des composantes de la bioinformatique qui se réfère principalement à l'étude des macromolécules et plus particulièrement à celle des protéines.

Les interactions entre protéines sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire, sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, ces techniques ne permettent pas de détailler la totalité de ces interactions étant donné le nombre incalculable de molécules différentes au sein d'une seule cellule.

Le docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales mentionnées ci-dessus. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, en pharmacie et en médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée (Kitchen et *al.*, 2004).

I.3.2 Processus de docking

L'action d'une molécule dans une protéine est gouvernée par des principes de reconnaissance mutuelle entre la molécule et sa cible. Les caractéristiques générales des interactions ligands protéines résident en une complémentarité stérique, hydrophobe et polaire entre les deux structures et une conformation d'énergie favorable du ligand qui privilégie une bonne affinité de liaison (Sotriffer et *al.*, 2003). Les méthodes du docking cherchent à assembler les protéines afin de construire un complexe (Bastard, 2005). Le processus de docking consiste à faire interagir une petite molécule organique avec le récepteur, généralement de nature protéique (May et *al.*, 2003). L'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres. Le problème posé est donc celui de savoir quelle sera la structure du complexe moléculaire résultant de l'association de deux molécules de structure connue (Dréo et *al.*, 2003). Les méthodes *In-silicio* de docking moléculaire ont pour but de prédire

la conformation et l'orientation d'une molécule lors de sa liaison à son récepteur (Kitchen et *al.*, 2004). Elles permettent de réaliser une analyse détaillée des modes de liaison supposés, nommés « poses », adoptés par le ligand dans le site actif de la protéine. Ainsi, l'objectif de cet outil est non seulement de discriminer les « vrais » ligands des molécules qui ne sont pas capables de se lier au récepteur, mais aussi de révéler leur mode de liaison avec la protéine cible (Sotriffer et *al.*, 2003).

Les structures 3D des protéines sont définies par cristallographie aux rayons X. La diversité des ligands cristallisés dans la protéine est une information précieuse qui permet d'observer d'une part les résidus clés de l'interaction mais également les variabilités structurales 3D de la protéine d'une molécule à l'autre. Le docking est capable de confronter deux entités telles que le ligand et le récepteur. L'avantage est de pouvoir prendre en compte un environnement complexe d'acides aminés dans lequel va évoluer le ligand. Toutefois, un point faible du docking est d'omettre la variabilité structurale de la protéine lors de la fixation du ligand. Cette approximation peut parfois être la cause d'erreurs de prédiction (Arrault, 2007).

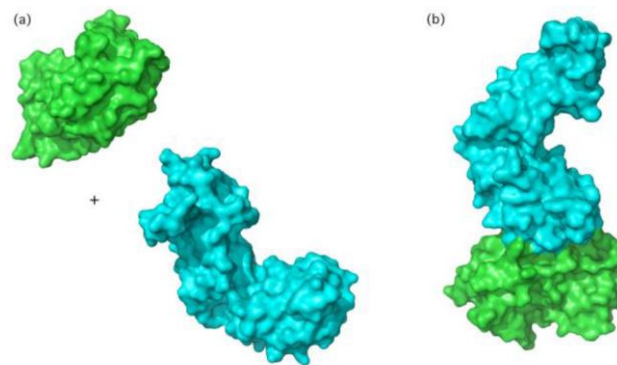


Figure 15 : Représentation schématique du docking de deux molécules.
(a) Molécules de départ. (b) Complexe moléculaire.

Dans la biologie moléculaire, il y a deux problèmes principaux dans le docking: le docking ligand- protéine et le docking protéine- protéine.

- **Le docking ligand- protéine**

Cette technique nécessite une grande molécule (la protéine est aussi appelée « le récepteur ») et une petite molécule (le ligand) et est très utile dans le développement de médicaments. Le problème à résoudre ressemble à la situation de « la clé dans la serrure », quand le ligand est amarré dans la cavité de la protéine.

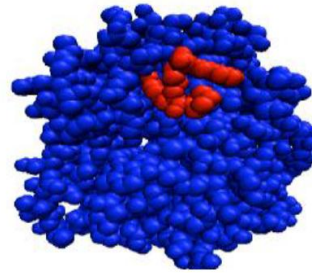


Figure 16 : Docking ligand protéine

- **Le docking protéine- protéine**

Ce problème nécessite deux protéines approximativement de même taille. Donc, souvent le site de fixation est une surface plus plane que dans le docking ligand- protéine et les cas où le docking se produit quand une des molécules est située à l'intérieur d'une cavité de l'autre molécule sont très rare.

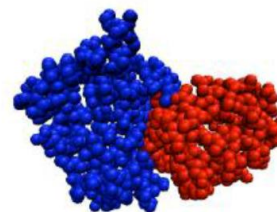
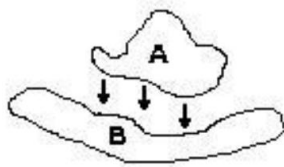


Figure 17 : Docking protéine- protéine

Suivant la manière dont la flexibilité est prise en compte, on distingue :

- Le docking rigide où les molécules sont représentées comme des objets rigides qu'ils ne peuvent changer leurs formes spatiales durant le processus du docking.
- Le docking semi- flexible, où une seule molécule est considérée comme flexible.
- Le docking flexible, où les deux molécules sont considérées comme flexibles.

Les méthodes les plus courantes sont basées sur un ajustement géométrique des deux molécules et supposent qu'il n'existe pas de changement conformationnel lors de la formation du complexe. Bien que ce soit le cas dans la majorité des complexes, il existe quand même de petits changements conformationnels lors du phénomène de reconnaissance moléculaire. Une méthode récente propose de tenir compte des flexibilités conformationnelles des chaînes latérales des résidus de surface (Arrault, 2007).

Les algorithmes de calcul génèrent de manière aléatoire un grand nombre d'orientations possibles pour trouver « la meilleure façon d'insérer » la molécule dans une protéine (au niveau du récepteur ou du site actif). Le programme prend en compte tous les degrés de liberté de la molécule (translation et rotation). Pour chaque possibilité l'énergie est calculée en Mécanique

Moléculaire, prenant ainsi en compte toutes les interactions ligand-récepteur (liaisons de Van der Waals, liaisons Hydrogènes, hydrophobie...).

I.3.3 Algorithmes de recherche

Les algorithmes de recherche étudiant la flexibilité conformationnelle des ligands sont généralement classés en trois catégories : les algorithmes de recherche systématique ou combinatoire, les algorithmes de recherche aléatoire ou stochastique et les algorithmes de recherche déterministe ou de simulation (Sotriffer et *al.*, 2003), (Brooijmans & Kuntz, 2003).

I.3.3.1 Algorithmes de recherche systématique ou combinatoire

Ces algorithmes prennent en compte tous les degrés de liberté d'une molécule en explorant toutes les liaisons rotatives possibles. Ainsi, en fonction du degré de flexibilité de la molécule, le nombre de conformations générées peut rapidement s'élever et entraîner le phénomène d'explosion combinatoire (Kitchen et *al.*, 2004).

Pour éviter l'explosion combinatoire, deux méthodes ont été développées : la méthode de recherche exhaustive et la méthode de fragmentation reconstruction.

La méthode de recherche exhaustive passe par une définition de limites imposées soit par le site de liaison, soit par des contraintes géométriques et/ou chimiques imposées aux conformations initiales des ligands à docker. Dans le premier cas, les mouvements de translation et de rotation systématiques des ligands sont générés dans un site de liaison putatif et prédéfini, limitant ainsi l'espace de recherche conformationnelle du ligand.

Les méthodes de fragmentation-reconstruction consistent à diviser la molécule en fragments qui sont soit rigides soit représentés par un petit ensemble conformationnel (Spyrakis et *al.*, 2010). L'objectif est ensuite de les lier dans une orientation favorable. Ces méthodes permettent de limiter le nombre de conformations à générer. En effet, en considérant une molécule avec 7 liaisons rotatives, si chaque liaison à six rotamères, le nombre de conformations à générer s'élève à 6^7 (> 250000) conformations. Alors qu'en rompant une liaison rotative pour obtenir deux fragments, cela élimine la recherche conformationnelle pour une liaison rotative et les conformations des deux fragments sont indépendantes ce qui réduit le nombre de conformations à $6^3 + 6^3 = 432$ conformations (Jain†, 2003).

I.3.3.2 Algorithmes de recherche aléatoire ou stochastique

Ces algorithmes prennent en compte les mouvements de translation, rotations et torsions réalisés de manière aléatoire (Kitchen et *al.*, 2004). Les changements sont acceptés ou rejetés selon une fonction de probabilité. Les approches les plus connues sont les méthodes de Monte-Carlo, les algorithmes génétiques et la recherche tabou (Kitchen et *al.*, 2004).

Les méthodes de Monte-Carlo consistent à chercher les différentes poses des ligands en explorant de manière séquentielle les mouvements de translation, rotations et torsions. Ainsi, chaque degré de liberté est déterminé un à un et de manière aléatoire (Spyrakis et *al.*, 2010). Après chaque changement, la nouvelle conformation est retenue si elle présente une énergie plus basse que la conformation précédente, sinon elle est soumise au critère de Métropolis (Sotriffer et *al.*, 2003), (Kitchen et *al.*, 2004), (Spyrakis et *al.*, 2010). Ce critère est basé sur la fonction de probabilité de Boltzmann (Equation 1).

$$P = e^{\frac{E_{new}-E_{old}}{KT}}$$

Equation 1 : Probabilité P d'acceptation d'une nouvelle conformation (avec E_{new} : énergie de la nouvelle conformation, E_{old} : énergie de l'ancienne conformation, k : constante de Boltzmann, T : température de simulation) (Sotriffer et *al.*, 2003)

Le processus est répété un certain nombre de fois, nombre qui définit le pas de Monte-Carlo, jusqu'à ce que le nombre de conformations désiré soit atteint (Kitchen et *al.*, 2004).

Les algorithmes génétiques ont pour but de mimer les principes de l'évolution naturelle afin de réduire le problème d'explosion combinatoire. Pour cela, ils utilisent des opérateurs génétiques tels que la mutation, la recombinaison et la sélection et une fonction de survie (ou « fitness function ») (Lameijer et *al.*, 2005).

Les algorithmes de recherche tabou s'inspirent de l'idée d'éviter de ré-évaluer un espace conformationnel déjà exploré par l'algorithme de recherche (Spyrakis et *al.*, 2010). Pour cela des espaces de restrictions sont organisés sous forme de « liste tabou » constituant les conformations déjà obtenues (Spyrakis et *al.*, 2010), (Westhead et *al.*, 1997). La recherche commence à partir d'une seule conformation d'un ligand puis différentes conformations sont générées grâce à une procédure similaire à la mutation qui réalise des changements de manière aléatoire. Ces conformations sont scorées et ordonnées selon une fonction d'énergie (Westhead et *al.*, 1997) : les conformations d'énergies plus basses qui ne sont pas encore contenues dans la liste tabou (« non-tabou ») sont ajoutées à cette liste, celles qui sont très similaires à la liste ne sont intégrées dans la liste que si et seulement si elles présentent une énergie plus basse (Westhead et *al.*, 1997). Enfin, les autres conformations ne répondant pas à ces critères, sont rejetées (Kitchen et *al.*, 2004), (Spyrakis et *al.*, 2010). Le processus continue en commençant par la dernière conformation retenue et s'arrête jusqu'à atteindre la limite d'itérations ou jusqu'à ce qu'aucun changement acceptable ne soit obtenu (Westhead et *al.*, 1997).

I.3.3.3 Algorithmes de recherche déterministe ou de simulation

Deux méthodes principales les caractérisent : les méthodes de dynamique moléculaire et les méthodes de minimisation d'énergie.

Les méthodes de dynamique moléculaire se basent sur les équations de mouvements de Newton (Equation 2) (Kitchen et *al.*, 2004), (Spyrakis et *al.*, 2010) :

$$F_i = m_i a_i$$

Equation 2 : Equation du mouvement de Newton pour un système atomique (F : force, m : masse, a : accélération)

La force de chaque atome est déterminée à partir d'un changement dans l'énergie potentielle entre la position actuelle et une nouvelle position (Equation 3) (Kitchen et *al.*, 2004) :

$$F_i = - \frac{dE}{r_i}$$

Equation 3 : Calcul de la force (F) de chaque atome (E : énergie potentiel, r : distance entre les deux positions)

Les positions atomiques sont ensuite déterminées à des intervalles de temps très courts permettant d'obtenir la trajectoire des changements des positions atomiques au cours du temps (Equation 4) (Kitchen et *al.*, 2004).

$$\frac{d^2 r_i}{dt^2} = \frac{F_i}{m_i}$$

Equation 4 : Calcul des positions atomiques à chaque intervalle de temps ($d^2 r_i / dt^2$), avec F : force et m : masse atomique)

Les méthodes de dynamique moléculaire présentent des temps de calculs trop longs et arrivent difficilement à franchir les barrières de hautes énergies (Spyrakis et *al.*, 2010). En conséquence, l'identification du minimum global d'énergie se révèle être très difficile voire quasi-impossible avec ces méthodes et les conformations des ligands obtenues sont généralement piégées dans des minimaux locaux d'énergie (Kitchen et *al.*, 2004), (Spyrakis et *al.*, 2010), (Brooijmans et *al.*, 2003). De plus, les résultats finaux dépendent grandement de la conformation initiale.

Les méthodes de minimisation d'énergie recherchent uniquement si des minimaux locaux d'énergie peuvent être atteints. Elles sont en général utilisées en complément d'autres méthodes (Kitchen et *al.*, 2004).

I.3.4 Scoring

Les fonctions de score ont pour but de prédire l'affinité de liaison entre la protéine et chaque pose générée lors du docking (Sotriffer et *al.*, 2003), (Lameijer et *al.*, 2005). En effet, même si les conformations sont correctement prédites, il est primordial de pouvoir différencier les

poses correctes des poses incorrectes (Kitchen et *al.*, 2004). Le rôle principal des fonctions de score est donc d'évaluer et de classer les poses (Sotriffer et *al.*, 2003) pour identifier le « vrai » mode de liaison des composés (Sousa et *al.*, 2006) et les ligands les plus prometteurs (Kitchen et *al.*, 2004).

I.3.4.1 Fonctions de score

Les fonctions de score sont divisées en trois catégories : les fonctions de scores basées sur les champs de force, les fonctions de score empiriques et les fonctions de score basées sur les connaissances (Kitchen et *al.*, 2004).

Les fonctions de score basées sur les champs de force caractérisent l'énergie d'une pose par la somme de deux termes énergétiques (Kitchen et *al.*, 2004) : l'une représentant l'énergie d'interaction ligand/récepteur et l'autre, l'énergie interne du ligand. En général, ces fonctions de score se basent sur les champs de force de mécanique moléculaire qui permettent de calculer l'énergie potentielle du système (E_{MM}). E_{MM} est calculée par une somme de quatre termes: les trois premiers termes estiment l'énergie interne du ligand en pénalisant les déviations de longueurs et d'angles de liaisons du ligand par rapport aux valeurs de références. Le quatrième terme reflète la contribution enthalpique estimée par les potentiels de Lennard- Jones et de Coulomb. Le potentiel de Lennard-Jones évalue les interactions de Van der Waals et le potentiel de Coulomb détermine les interactions électrostatiques (Brooijmans et *al.*, 2003).

$$E_{MM} = \sum_{\text{bond}} K_r (r - r_{\text{ref}})^2 + \sum_{\text{angles}} K_{\theta} (\theta - \theta_{\text{ref}})^2 + \sum_{\text{dihedrals}} K_{\phi} [1 + \cos(n\Phi - \Phi_0)]^2 + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

Avec K_r , K_{θ} et K_{ϕ} : facteurs de pénalité pour les liaisons, les angles et les angles dièdres ; r et r_{ref} : longueurs des liaisons mesurées et de référence θ et θ_{ref} : valeurs des angles mesurées et de référence ; ϕ et ϕ_{ref} : valeurs des angles dièdres mesurées et de référence ; A_{ij} et B_{ij} : constantes attractives et répulsives mesurées expérimentalement ; R_{ij} : distance entre les atomes i et j ; q_i et q_j : charges des atomes i et j ; ϵ : constante diélectrique (Brooijmans et *al.*, 2003)

Ainsi plusieurs champs de force de mécanique moléculaire tels que AMBER, CHARMM... ont été développés et introduits dans de nombreux logiciels tel Autodock (Spyrakis et *al.*, 2010). L'avantage de l'utilisation des fonctions de score basées sur les champs de force réside en leur rapidité de calcul mais leur grand inconvénient est qu'elles ne prennent pas en compte les effets entropiques et de solvation (Kitchen et *al.*, 2004 ; Brooijmans et *al.*, 2003 ; Sousa et *al.*, 2006) ce qui a été amélioré dans différents logiciels (GOLD, AutoDock (Kitchen et

al., 2004 ; Sousa *et al.*, 2006), HINT(Spyrakis *et al.*, 2010), et les versions de DOCK récentes (5 et 6) (Spyrakis *et al.*, 2010).

Les fonctions de score empiriques ont pour but de reproduire les données expérimentales d'énergie de liaison et utilisent une somme de plusieurs termes individuels non corrélés pondérés par des coefficients (Kitchen *et al.*, 2004 ; Spyrakis *et al.*, 2010 ; Sousa *et al.*, 2006). Les coefficients des différents termes sont calculés par des analyses de régression utilisant les données expérimentales d'affinité et les données structurales de cristallographie (Sousa *et al.*, 2006).

$$\Delta G_{\text{binding}} \approx \sum \Delta G_i f_i$$

(Avec $\Delta G_{\text{binding}}$: l'affinité de liaison, f_i correspond à un terme d'une interaction i entre le ligand et la protéine et ΔG_i le coefficient associé) (Sotriffer *et al.*, 2003)

L'avantage d'utiliser les fonctions de score empiriques est que leur forme est plus simple que celles basées sur les champs de force, leurs termes sont facilement déterminés (Kitchen *et al.*, 2004) et les temps de calculs sont relativement rapides (Sousa *et al.*, 2006). Cependant, cette méthode reste dépendante des données expérimentales (Sotriffer *et al.*, 2003 ; Kitchen *et al.*, 2004)

Les fonctions de scores basées sur les connaissances ou « knowledge-based » ont pour but de reproduire les données expérimentales en utilisant des structures de complexes ligand-récepteur (Kitchen *et al.*, 2004 ; Sousa *et al.*, 2006). L'idée provient du fait que dans un complexe obtenu par cristallographie, les atomes du ligand sont placés de manière optimale par rapport aux atomes de la protéine. Des analyses statistiques permettent de déterminer la fréquence et la distribution des paires d'atomes entre le ligand et la protéine et ainsi de définir des potentiels d'interaction (Kitchen *et al.*, 2004 ; Sousa *et al.*, 2006). En effet, il a été postulé que les interactions les plus fréquemment observées contribuent positivement au processus général de mode de liaison tandis que les interactions les moins communes sont considérées comme globalement répulsives (Sotriffer *et al.*, 2003).

Les avantages de ces fonctions « knowledge-based » résident sur leur simplicité et leur rapidité en temps de calcul. Cependant, leurs inconvénients, similaires aux méthodes empiriques, sont leur dépendance sur la qualité et la variété des données expérimentales (Sotriffer *et al.*, 2003).

Le « score » permet donc une meilleure estimation de l'interaction ligand/récepteur (binding) et l'objectif du programme est de la minimiser.

D'autre part, les paramètres de liaison tel que les distances, les angles, et les orientations sont caractéristiques d'une action biologique, parce que caractéristiques de l'interaction ligand/récepteur correspondante. Une fois le complexe formé, on peut identifier tous les centres liants sur un composé connu comme sur le site actif d'une protéine :

- Fournisseurs ou accepteurs de liaisons hydrogène
- Centres hydrophobes (fragments hydrocarbonés, notamment)
- Cycles aromatiques, etc...

La comparaison et la superposition en 3D des modes de cohésion entre une protéine donnée et des variantes structurales de ligands actifs fait ressortir les paramètres de liaison nécessaires et/ou suffisantes à l'expression de l'activité. On définit un pharmacophore en 3D comme étant l'ensemble des positions relatives, dans l'espace, des groupes liants, au niveau d'un site actif. C'est une « configuration spatiale idéale » établie à l'aide de quelques points-clef. Un exemple bien connu est celui des antihistaminiques pour lesquels le pharmacophore 3D contient 2 cycles aromatiques + 1 azote ternaire, configuré de la manière suivante :

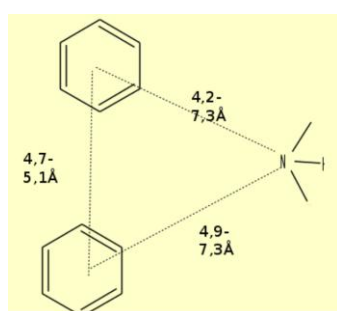


Figure 18 : Pharmacophore 3D antihistaminiques

Le logiciel peut alors vérifier si une nouvelle molécule respecte ce pharmacophore 3D pour prédire son activité.

Les méthodes de docking, tout comme les modèles pharmacophoriques, sont très utilisées pour guider les scientifiques dans le développement de nouveaux médicaments. Le docking tente de distinguer « les vrais » ligands des ligands alternatifs grâce à une prédiction du mode de liaison. Cette prédiction se veut être la plus précise possible en reflétant au maximum les données expérimentales. Ainsi les algorithmes de recherche et les fonctions de score qui constituent les programmes de docking ne cessent d'être améliorés : introduction des molécules d'eau, qualité des modèles cristallographiques, prise en compte de la flexibilité de la protéine, fonction de score consensus, faisant de ces méthodes un outil remarquable, capable d'identifier des molécules intéressantes, notamment en thérapie cancéreuse.

I.4 LE CANCER

L'individu est constitué "d'unités cellulaires" morphologiquement individualisées, mais intégrées dans un ensemble "pluricellulaire" dynamique : l'organisme. Ce dernier, résultat de l'agencement de cellules en tissus, de tissus en organes, d'organes en systèmes, présente de nombreuses relations avec son environnement. L'organisme est un système ouvert qui réagit via

des réactions complexes mais coordonnées, afin de se maintenir dans un "état stationnaire" normal : l'état homéostatique. Toute cellule de l'organisme est à même de maintenir, adapter, renouveler, supprimer, de manière programmée, tout ou partie de ses constituants tant structuraux que fonctionnels, ceci dans le but de réguler et de coordonner ses métabolismes et métabolites, en les adaptant à ses besoins comme à ceux de l'individu. La capacité de se diviser, de se spécialiser mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chacune des cellules qui composent l'organisme humain. Le déclenchement et l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'entrée dans un processus de différenciation ou dans un programme de mort cellulaire (apoptose) résultent de l'intégration au niveau cellulaire de multiples signaux, les uns positifs, les autres négatifs (Figure 20). Au niveau tissulaire, l'équilibre entre ces diverses destinées cellulaires est sous le contrôle de multiples boucles de régulations enchevêtrées (Figure 19). Mais ces systèmes de régulation permettant un maintien de l'homéostasie sont parfois, comme c'est le cas pour les cancers, déficients. En effet, suite à l'agression de facteurs de l'environnement tels que le tabac, les rayons ionisants (Hall & Angèle, 1999), certains agents chimiques (Miller & Miller, 1975) ou physiques, certains virus, ou spontanément (Lindahl & Nyberg, 1972), le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées (Frosina, 2000) ou non. En effet, les systèmes de réparation sont parfois défectueux ou "débordés", la cellule conserve alors certaines altérations qui touchent parfois les systèmes de régulation de la prolifération. Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. La cellule s'engage alors dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement d'une cellule cancéreuse. La biologie moléculaire et la génétique ont permis d'établir que les altérations génétiques surviennent précisément sur les éléments de régulation de la différenciation, de la division et de la mort cellulaire.

L'apparition d'un cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes au cours desquelles l'accumulation d'anomalies sur différents gènes, au fil des divisions cellulaires, confère un avantage sélectif au clone malin. Les cellules, toutes issues d'une première cellule mutée (clone), forment une tumeur. Celle-ci devient de plus en plus agressive pour son environnement et échappe progressivement à tout contrôle.

Il est désormais acquis que le cancer est dû à une grave perturbation de la communication cellulaire. Il se caractérise par une prolifération cellulaire anarchique et indéfinie d'un clone cellulaire, une perte de la différenciation et une absence de mort cellulaire. Cette prolifération conduit à la destruction du tissu originel, ainsi que des tissus environnants. Sans traitement, l'envahissement conduit à la mort de l'individu.

I.5 DOCKING MOLECULAIRE APPLIQUE AU SCREENING ANTITUMORAL

Au cours des dernières années, la meilleure connaissance des mécanismes à l'origine de la transformation maligne ou de la progression tumorale (rôle des facteurs de croissance, leurs récepteurs et voies de signalisation, rôle des d'enzymes kinases, rôle de la néovascularisation tumorale, rôle des modifications épigénétiques...) a ouvert de nouvelles voies pour le développement de médicaments anti-cancéreux, habituellement regroupés sous le terme de « thérapies ciblées ». Ils se distinguent en théorie de la chimiothérapie classique par un effet ciblant une anomalie portée par les seules cellules tumorales, avec comme espoir l'obtention d'une meilleure efficacité associée à une toxicité plus limitée (sans effets ou avec un effet théoriquement négligeable sur les cellules normales).

En raison de ces considérations, on comprend que l'arsenal thérapeutique médicamenteux contre le cancer, concerne de plus en plus le ciblage d'une ou plusieurs étapes du cycle cellulaire à travers des approches plus ou moins cible-spécifique.

En effet, un être humain est constitué par environ 10^{14} (cent trillions) cellules et chaque seconde, presque un million de cellules 'se suicident' (mécanisme d'apoptose) dans le corps d'un être humain adulte. Ainsi en un jour nous produisons (et en parallèle supprimons) 60×10^9 cellules dans les tissus autorenovelants du corps : peau, intestin, moelle et organes sexuels (ce qui représente une masse des cellules équivalentes à un poids corporel entier sur une base annuelle). A la base de la prolifération et la mort cellulaire se trouve le cycle cellulaire (Figure 19) constitué d'une série ordonnée et finement régulée d'évènements menant à la réplication des cellules. Ce cycle se subdivise en quatre phases qui se succèdent dans un ordre immuable : G1, S, G2 et M. Les trois premières phases constituent l'interphase, durant laquelle le noyau de la cellule est limité par une enveloppe nucléaire, alors que la mitose est caractérisée par la disparition de cette enveloppe et par l'apparition des chromosomes. Après la mitose, les cellules peuvent soit passer en G1, soit entrer en G0, stade quiescent de non division. La synthèse et phosphorylation (par des protéines kinases) de certaines protéines ainsi que leur successive déphosphorylation et dégradation (par la voie du protéasome), contrôlent la progression au cours du cycle cellulaire.

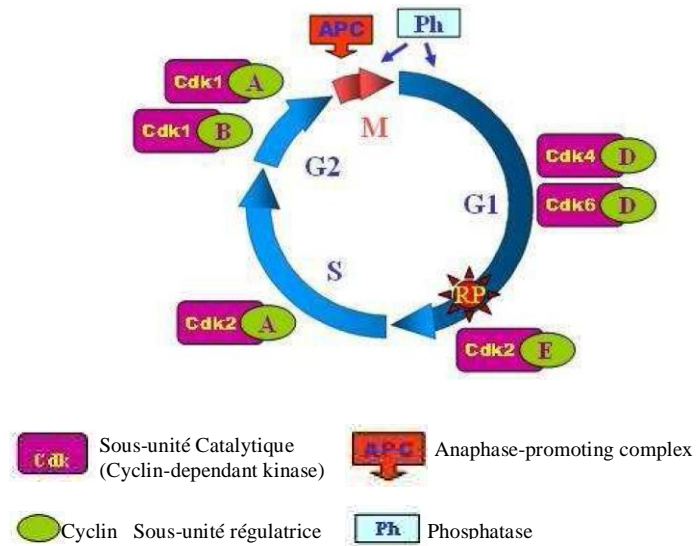


Figure 19 : Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est à son tour régulé par des signaux positifs (facteurs de croissance) et négatifs (protéines « supresseurs de tumeurs») Figure 20.

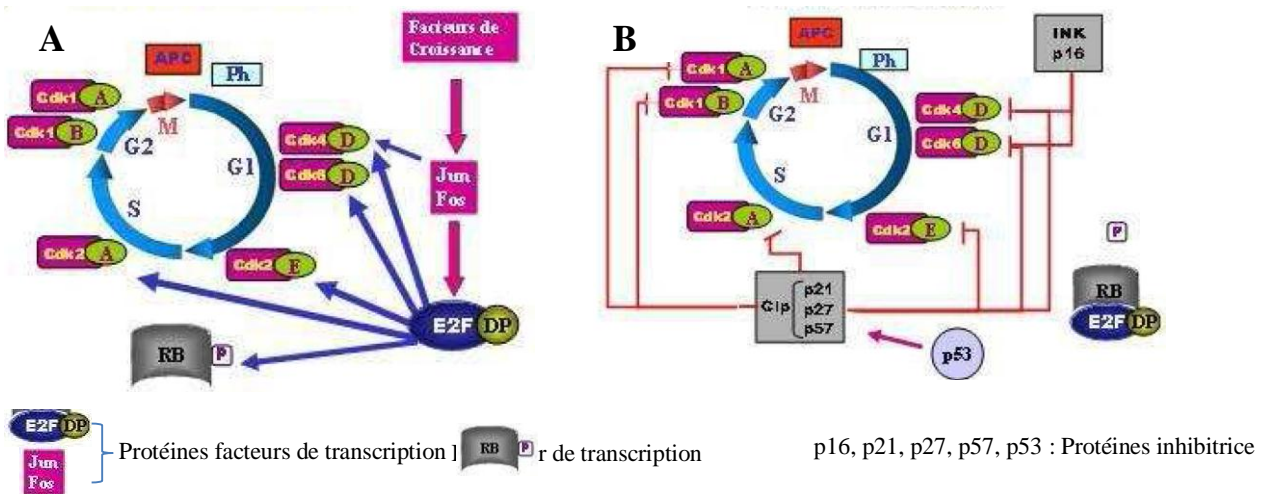


Figure 20 : Cycles cellulaires :A (Signaux positifs) et B (Signaux négatifs)

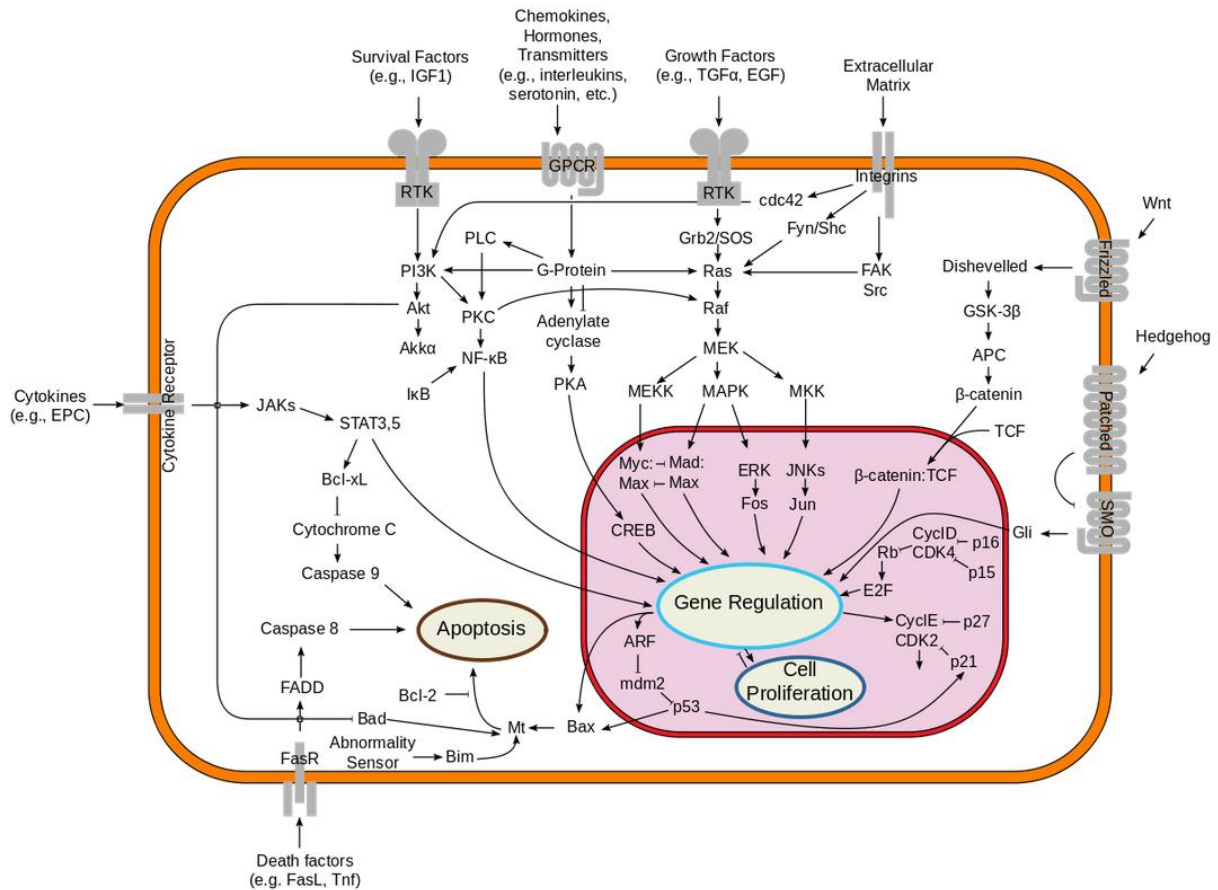


Figure 21 : Vue d'ensemble des voies enzymatiques impliquées dans l'apoptose (Lodish et al., 2003).

En thérapie cancéreuse, un principe actif d'origine naturelle ou synthétique pourra donc en formant un complexe avec une protéine soit inhiber son activité s'il s'agit d'un facteur de croissance, soit enclencher son activité s'il s'agit d'une protéine suppresseur de tumeur. La molécule active doit cependant être capable de distinguer l'environnement des cellules cancéreuses de l'environnement des cellules normales dans le but de minimiser la cytotoxicité. La technique de screening *In-silicio* du docking moléculaire avec les algorithmes de plus en plus perfectionnés de nos jours, constitue donc un outil capable de modéliser avec une précision remarquable les interactions protéines-ligands et se révèle ainsi être un puissant atout dans la recherche de nouvelles molécules actives.

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Le but de cette étude était de préparer de nouveaux dérivés du lapachol structuralement apparentés au β -lapachone, à l' α -lapachone et au 2-acetylfuronaphtoquinone avec potentiellement des activités biologiques optimisées. De plus, nous avons cherché à déterminer comment les modifications de la stéréochimie des composés influenceraient leur bioactivité. Enfin, d'après la revue de littérature, les quinones représentent une classe de groupements généralement cytotoxiques, qui conduisent à une variété d'effets *in vivo* généralement indésirables, y compris une cytotoxicité aiguë, une immunotoxicité et une cancérogenèse. Les quinones sont souvent considérées comme sont des accepteurs de Michael, et peuvent induire sur des protéines cruciales comme l'ADN des dommages importants par alkylation. Les quinones sont également des molécules hautement oxydoreductrices qui peuvent s'engager dans des cycles redox avec leur radical semi-quinone conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans une tentative de pharmacomodulation visant l'élimination de ces groupes quinones, les orthoquinones ont été converties en acides carboxyliques indaniques via des réarrangements benziliques et en phénazines par des réactions de formation des bases de Schiff pour éviter les nuisances de cytotoxicité attribuées aux fonctions quinoniques.

Tous les dérivés synthétiques du lapachol ont été soumis à un test anticancéreux sur des cellules humaines incluant les modèles *in-vitro* de cancers typiquement associés à un pronostic sombre, tels que des neuroblastes ou des glioblastome multiformes. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature et attribuent les meilleures activités aux composés possédant les squelettes β -naphthoquinone et α -naphthoquinone[2,3-b]furane à l'exception d'un composé qui possède un squelette indane[1,2-b]pyrane. L'activité anticancéreuse associée à ce type de squelette est sans précédent et est rapporté ici pour la première fois. Enfin, la particularité de ces molécules à induire une activité antiproliférative de type apoptotique a suscité de l'intérêt pour l'élucidation de leur mécanisme d'action au moyen de la technique du docking moléculaire sur des cibles enzymatiques sélectionnées en fonction de leurs rôles clés dans la progression du cancer.

L'ensemble de tous ces résultats sont présentés dans cette section en quatre parties à savoir :

- Isolement et caractérisation ;
- Transformation chimiques ;
- Tests biologiques ;
- Docking moléculaire.

II.1 - ISOLEMENT ET CARACTERISATION

L'objectif de cette partie est l'isolement du lapachol, principal substrat des réactions à effectuer, à partir de deux plantes de la famille des Bignoniaceae que sont *Newbouldia laevis* et *Kigelia africana*.

L'étude phytochimique de 7 Kg d'écorces de racines de *Newbouldia laevis* (1754/SRFK, HNC) récoltées à Nkolbisson en février 2013 dans la localité de Yaoundé 7^{ième}, région du centre du Cameroun, a abouti à la purification de 2g de lapachol (Eyong et *al.*, 2015).

La deuxième plante *Kigelia africana* a été récoltée à Bamena dans la région de l'Ouest du Cameroun le 12 Janvier 2015 et identifiée par comparaison au spécimen enregistré au numero 159/HNC à l'Herbier National du Cameroun. Les fruits et les racines de *Kigelia africana* ont été découpés, séchés à l'ombre et broyés. Les poudres obtenues ont été extraites à température ambiante au sonicateur avec le système de solvants CH₂Cl₂/ MeOH (1:1). Les extraits bruts ont été ensuite partitionnés par chromatographie flash à l'aide de systèmes de solvants de polarités croissantes. La chromatographie sur colonne des fractions suivie des différentes techniques de purification a permis d'obtenir dix-sept composés. Huit de ces composés ont été analysés et caractérisés à l'aide des paramètres physiques, des techniques de RMN à une et deux dimension et par comparaison avec les données décrites dans la littérature.

II.1.1 ISOLEMENT

II.1.1.1 Isolement des constituants des fruits de *Kigelia africana*.

Recoltés à Bamena dans la région de l'Ouest du Cameroun le 12 Janvier 2015, les fruits de *Kigelia africana* ont été découpés, séchés à l'ombre et broyés pour donner 1,2 Kg de poudre. L'extraction de cette poudre a été effectuée à température ambiante au sonicateur avec le système de solvants CH₂Cl₂/ MeOH (1:1) et a donné 198 g d'extrait brut. Cet extrait brut a été partitionné par chromatographie flash à l'aide de systèmes de solvant de polarités croissantes pour donner 13 g de fraction à l'hexane, 14 g de fraction à l'hexane/acétate 50%, 11 g de fraction à l'acétate, 42 g de fraction à l'acétate/méthanol 50% et 82 g de fraction au méthanol. Les fractions à l'hexane, à l'hexane/AcOEt 50%, à l'AcOEt et à l'AcOEt/MeOH 50% ont été chromatographiées sur colonne suivie des différentes techniques de purification pour donner onze composés indexés : KAH1 à KAH7, KAH10, KAF4, KAF5, et KAF10. Cinq de ces composés ont été analysés et caractérisés à l'aide des paramètres physiques, des techniques de RMN à une et à deux dimensions. Les masses des composés KAH1 et KAH4 et KAH6 étaient très faibles pour être analysés. De même, la

faiblesse des masses des composés KAH3 et KAH5 n'ont pour l'instant pas permis l'obtention de leur spectre RMN du carbone.

II.1.1.2 Isolement des constituants des racines de *Kigelia africana*.

Recoltés à Bamena dans la région de l'Ouest du Cameroun le 12 Janvier 2015, les racines de *Kigelia africana* ont été découpées, séchées à l'ombre et écrasées pour donner 1050 g de poudre. L'extraction de cette poudre a été effectuée à température ambiante au sonificateur avec le système de solvants CH₂Cl₂/ MeOH (1:1) pour donner respectivement 122 g d'extrait brut. Cet extrait brut a été partitionné par chromatographie flash à l'aide de systèmes de solvant de polarité croissante pour donner 5,23 g de fraction à l'hexane, 2,23 g de fraction à l'hexane/acetate 10%, 31,70 g de fraction à l'acétate et 64,28 g de fraction au méthanol. Les fractions à l'hexane, à l'hexane/AcOEt 10% et à l'AcOEt ont été chromatographiées sur colonne suivi des différentes techniques de purification pour donner six composés indexés KAH10b, KAH12 à KAH14, KAH20 et KAH21. Trois de ces composés ont été analysés et caractérisés à l'aide des paramètres physiques et des techniques de RMN à une et à deux dimensions. Les masses des composés KAH12 et KAH13 étaient très faibles pour être analysés. De même la faiblesse de masse du composés KAH14 n'a pour l'instant pas permit l'obtention de son spectre RMN du carbone et/ou à deux dimensions.

II.1.2 CARACTERISATION

II.1.2.1 Caractérisation des composés isolés des fruits

Onze composés ont été isolés des fruits de *Kigelia africana*. Les masses de KAH1 et KAH4 et KAH6 étaient très faibles pour permettre leur analyse en RMN et certains spectres nécessaires à l'élucidation formelle des composés KAH3 et KAH5 n'ont pour l'instant pas pu être obtenus en raison de la faiblesse de leur masse. Les composés KAH2, KAH7, KAF4, KAF5 et KAF10 ont été identifiés au moyen des techniques usuelles de RMN à une et à deux dimensions et par comparaison avec les données de la littérature.

II.1.2.1.1 Identification du composé **23**, le β -sistostérol (KAH2) (traces du composé **24**, le stigmastérol)

KAH2 a été obtenu sous forme de cristaux blancs dans le système hexane/acétate 6%. Il est soluble dans le CHCl₃ et donne un test positif avec le réactif de Liebermann Buchard.

Le spectre RMN ¹H CDCl₃, 600 MHz (Figure 22) révèle la présence de trois méthyles apparaissant sous forme de doublets à δ 0,85, 0,86 et 0,950, deux signaux de méthyle sous forme de singulet résonant à δ 0,70 et 1,03 et le signal d'un méthyle terminal à δ 0,86 apparait sous forme de triplet, un méthine portant un atome d'oxygène à δ 3,54 et un proton oléfinique δ 5,37 (*dd*, *J* =

4,1 Hz) suggère la présence d'une double liaison sur un squelette stigmastane ou poriférastane (Gupta *et al.*, 1981) qui sont des stéréoisomères en C-24. Deux signaux de protons oléfiniques de faible intensité à δ 5,03 et 5,17 indiquent la présence de traces de stigmastérol.

La comparaison des valeurs du point de fusion et des déplacements chimiques de ^1H des pics de forte intensité de KAH2 est identique à celle du β -sistostérol **23**, composé connu, précédemment isolé de *Kigelia africana* par Gouda (Gouda *et al.*, 2006). KAH2 est donc un mélange de β -sistostérol et de traces de stigmastérol.

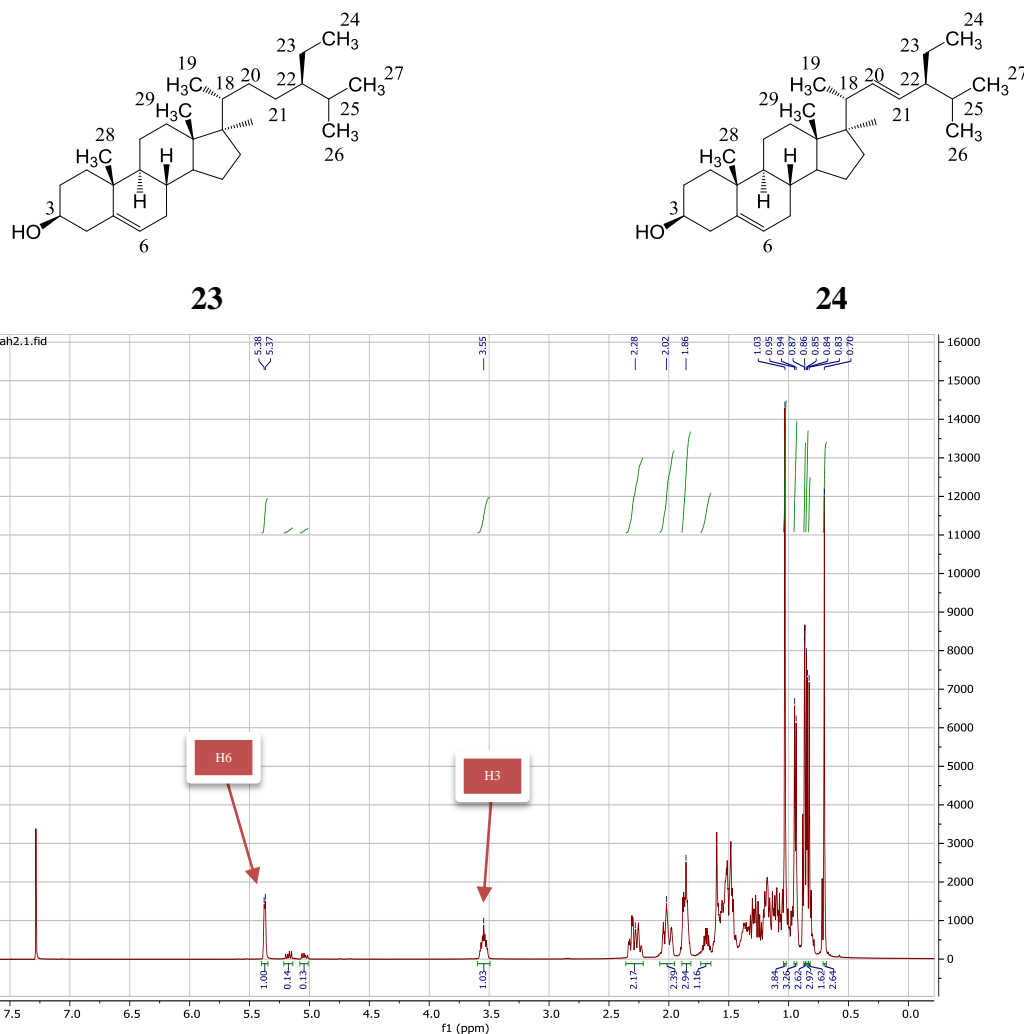


Figure 22 : Spectre RMN ^1H du mélange des composés **23** et **24** (KAH2)

Tableau 11 : RMN ^1H comparatif du mélange des composés **23** et **24** (KAH2) avec les données issues de la littérature

Position	RMN ^1H Experimental	RMN ^1H Littérature (Chaturvedula et Prakash, 2012)
3	3,54 (tdd, 1H)	3.53 (tdd, 1H)
6	5,37 (dd, 1H)	5.36 (t, 1H) 5.35
18	1,03 (s, 3H)	1.01 (s, 3H)
19	0,70 (s, 3H)	0.68 (s, 3H)

21	0,95 (d, 3H)	0.93 (d, 3H)
26	0,85 (d, 3H)	0.81 (d, 3H)
27	0,86 (d, 3H)	0.83 (d, 3H)
29	0,86 (t, 3H)	0.84 (t, 3H)

II.1.2.1.2 Identification du composé **25**, la fibrarecisine (KAF4)

KAF4 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le système acétate/méthanol 3%. Il est soluble dans le CHCl_3 et donne un test positif avec le réactif de Liebermann Buchard.

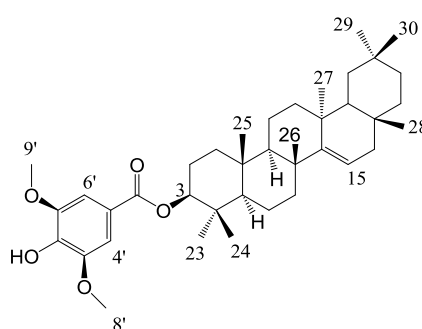
Son spectre RMN ^1H Pyridine, 600 MHz (Figure 23 et Figure 24) présente les caractéristiques suivantes :

- huit signaux singulets intégrant chacun trois protons indiquant la présence de huit méthyles terminaux à δ 0,94; 0,97; 1,02; 1,05; 1,05; 1,06 ; 1,14 et 1,16.
- Le signal d'un méthine déblindé par un oxygène à (δ 4,98, dd, $J = 11,3, 3,1$ Hz, 1H) caractéristique d'un triterpène pentacyclique hydroxylé en C_3 .
- Le signal d'un proton oléfinique à (δ 5,64, dd, $J = 3,9, 1,7$ Hz, 1H)

Ces signaux de RMN ^1H sont en accord avec une structure de type taraxerane olifimique en C_{14} et hydroxylé en C_3 (Fu et *al.*, 2007).

On observe également le signal des protons d'un système aromatique tétrasubstitué et symétrique à (δ 7,21, s, 2H) et un signal intégrant six protons déblindés attribuable à deux méthoxy à (δ 3,90, s, 6H).

Les valeurs des déplacements chimiques des ^1H de KAH4 sont identiques à celle de la fibrarecisine, composé connu, précédemment isolé de *Fibraurea recisa* par Fu (Fu et *al.*, 2007).



25

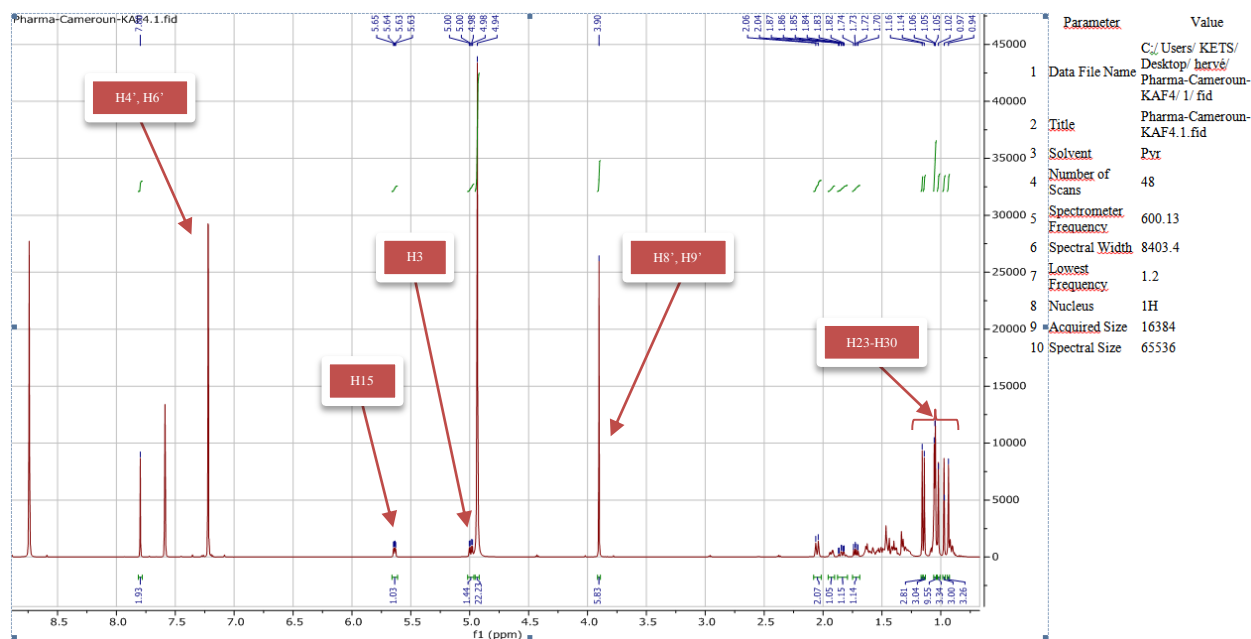


Figure 23 : Spectre RMN ^1H du composé 25 (KAF4)

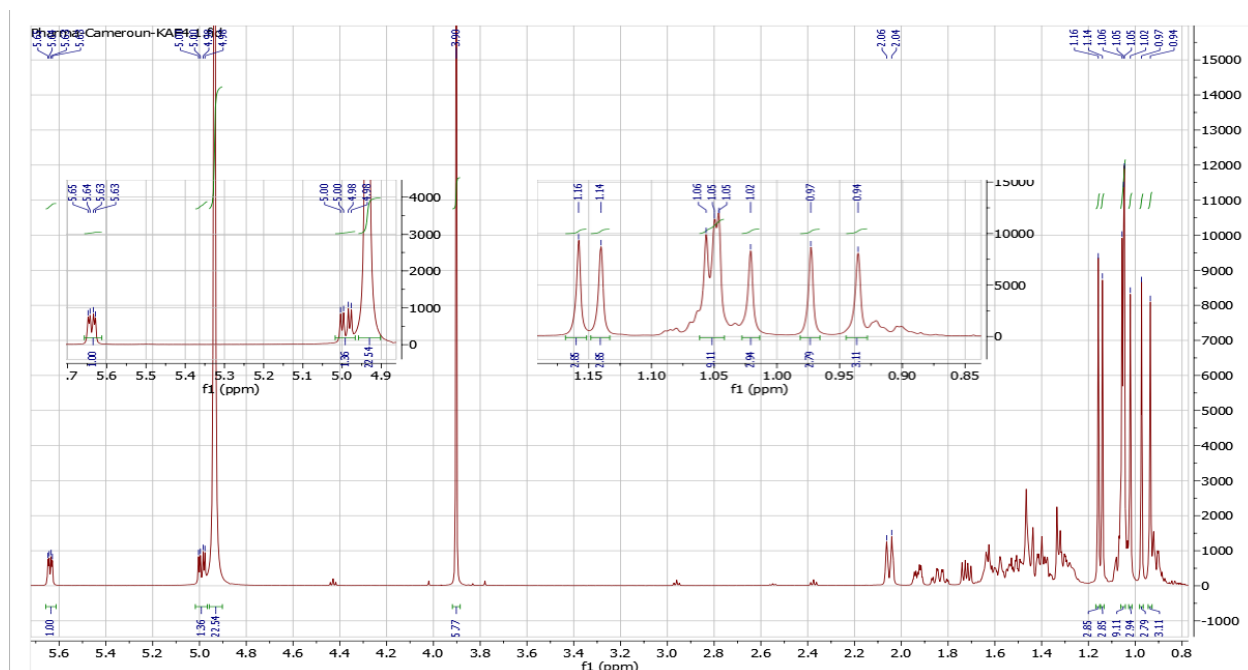


Figure 24 : Spectre RMN ^1H élargi du composé 25 (KAF4)

Tableau 12 : RMN ^1H comparatif du composé 25 (KAF4) avec les données issues de la littérature

Position	RMN ^1H (Pyridine) Experimental	RMN ^1H Littérature (CDCl ₃) (Fu <i>et al.</i> , 2007)
3	4.98 (dd, 1H)	4.69 (dd, 1H)
15	5.53 (dd, 1H)	5.55 (dd, 1H)
23	1,06 (s, 3H)	1,00 (s, 3H)

24	0,94 (s, 3H)	0,83 (s, 3H)
25	1,05 (s, 3H)	0,93 (s, 3H)
26	1,16 (s, 3H)	1,11 (s, 3H)
27	1,02 (s, 3H)	0,92 (s, 3H)
28	0,97 (s, 3H)	0,91 (s, 3H)
29	1,14 (s, 3H)	1,03 (s, 3H)
30	1,05 (s, 3H)	0,95 (s, 3H)
4'	7,21 (s, 1H)	7,32 (s, 1H)
6'	7,21 (s, 1H)	7,32 (s, 1H)
8'	3,90 (s, 3H)	3,94 (s, 3H)
9'	3,90 (s, 3H)	3,94 (s, 3H)

II.1.2.1.3 Identification du composé **49** (KAH7)

Le composé KAH7 a été obtenu sous forme de cristaux de couleur beige dans le système hexane/acétate 50% et est soluble dans l'acétone. Son point de fusion est de 229-230 °C.

Son spectre RMN ¹H MeOD, 500 MHz (Figure 25) intègre au total cinq protons dont trois aromatiques et deux oléfiniques répartis selon les pics suivants :

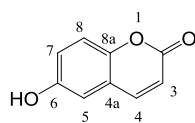
Les deux protons oléfiniques se présentent sous forme de deux signaux doublets à δ 7,55 (1H, d, 15,0 Hz) et 6,23 (1H, d, 15,0 Hz) attribuables aux protons en position H₃ et H₄.

Les trois protons aromatiques sont représentés par trois pics à δ 7,05 (1H, d, 2,0 Hz), 6,95 (1H, dd, 8,0 et 2,0 Hz), 6,79 (1H, d, 8,0 Hz) attribuables respectivement aux protons en position H₅, H₇ et H₈. Il s'agit donc d'un noyau aromatique trisubstitué et hydroxylé en position 6.

Le spectre RMN ¹³C (MeOD, 125 MHz, Figure 27) de KAH7 montre neuf pics qui sont :

- Le pic d'un carbonyle des esters à δ 169,6
- Les pics de deux carbones aromatiques déblindés par l'oxygène à δ 148,0 et δ 145,4
- Le pic d'un carbone méthine sp² déblindés par conjugaison avec un carbonyle vinylique à δ 145,6
- Le pic d'un carbone aromatique quaternaire à δ 126,4
- Les pics de trois méthines aromatiques à δ 121,4, 115,1 et 114,1
- Et le pic d'un méthine oléfinique à δ 113,6

Sur la base de toutes ces données spectroscopiques, la structure **49** de la 6-hydroxycoumarine a été attribuée au composé KAH7. C'est une coumarine connue dont la structure a été confirmée par comparaison de ses données spectrales (Tableau 13) à celle décrites dans la littérature (Khalil et al., 2003) et isolée ici pour la première fois des racines de *Kigelia africana*.



49

Tableau 13 : RMN ^1H et ^{13}C comparatif du composé 49 (KAF7) avec les données de la littérature

Position	RMN ^1H (MeOH) Exprérimental	RMN ^1H (CDCl_3) Littérature (Khalil et <i>al.</i> , 2003)	RMN ^{13}C (MeOH) Exprérimental	RMN ^{13}C (CDCl_3) Littérature (Khalil et <i>al.</i> , 2003)
2			169,6	160,6
3	6,23	6,38	113,6	115,4
4	7,55	7,68	145,6	144,2
4a			126,4	120,2
5	7,05	7,13	114,1	112,3
6			148,0	154,5
7	6,95	7,07	121,4	119,8
8	6,79	7,47	115,1	117,2
8a			145,4	147,8

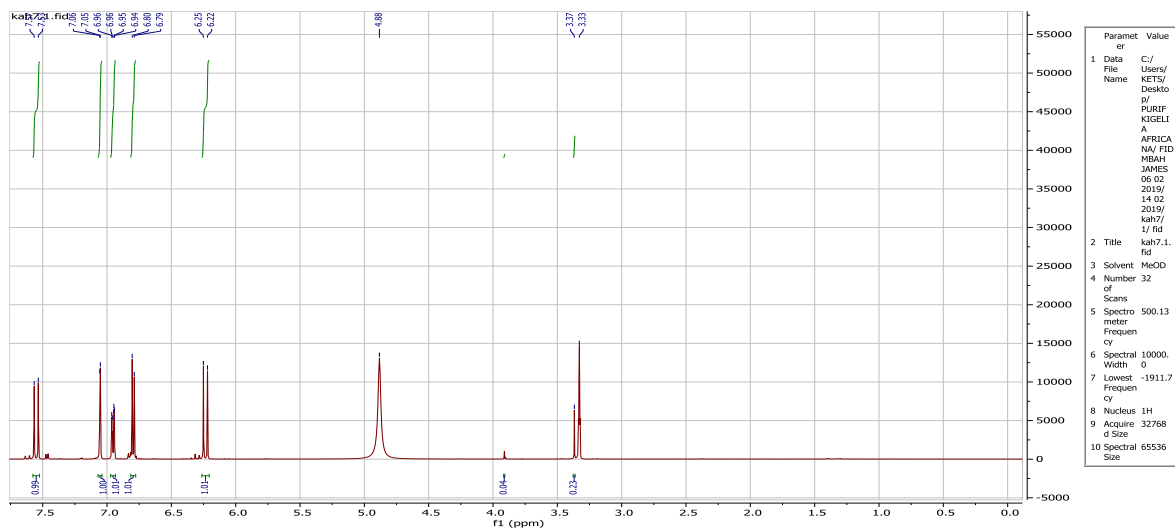


Figure 25 : Spectre RMN ^1H du composé 49 (KAF7)

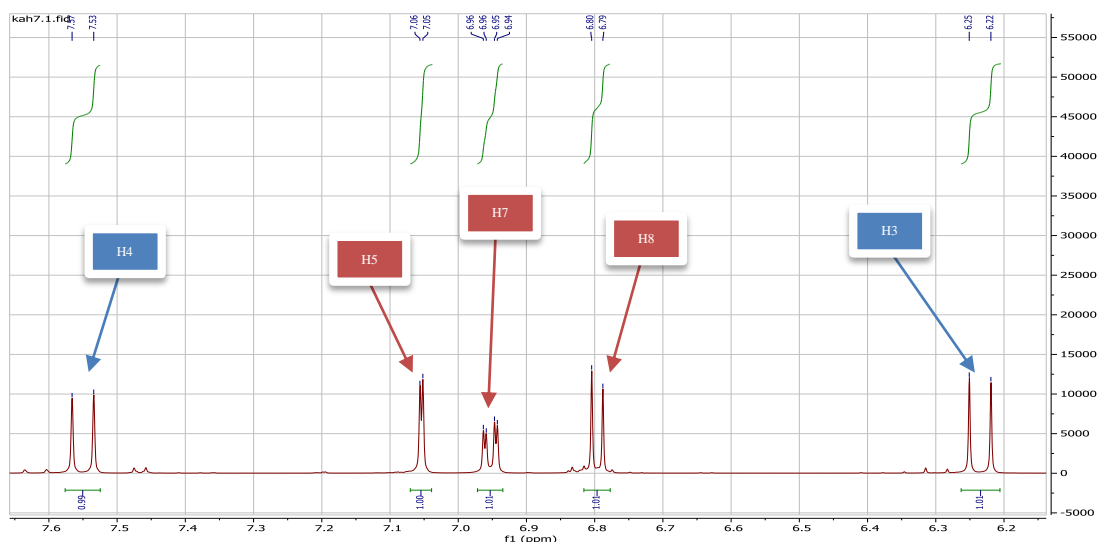


Figure 26 : Spectre RMN ^1H élargi du composé 49 (KAF7)

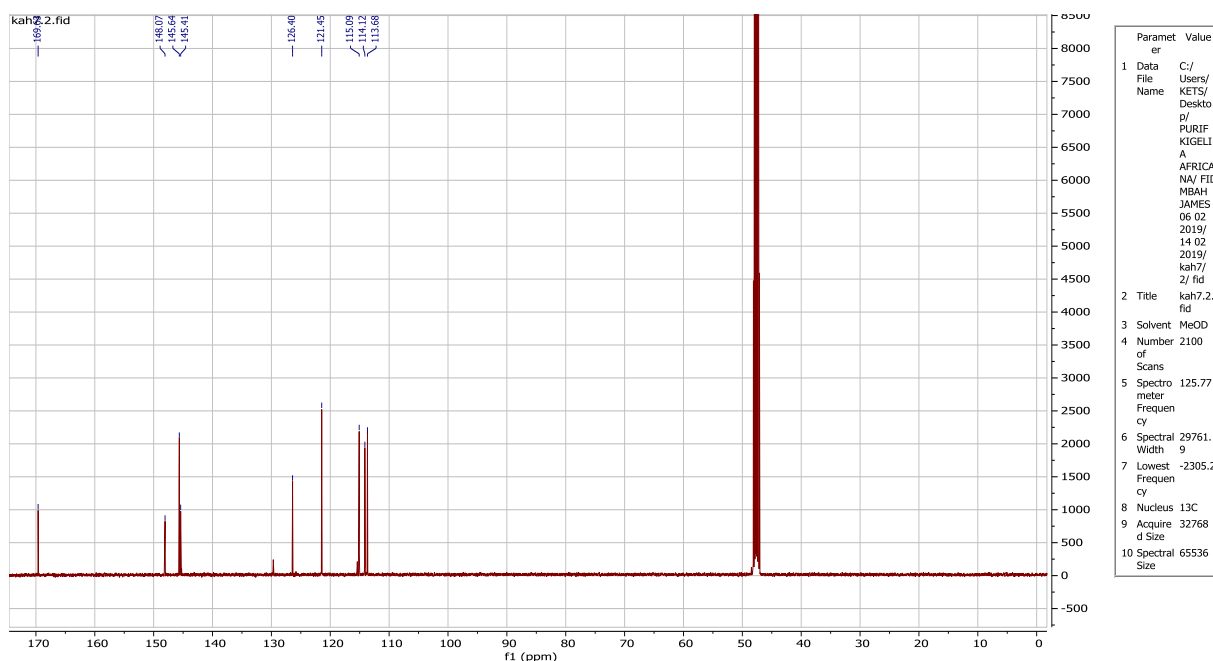


Figure 27 : Spectre ^{13}C du composé 49 (KAF7)

II.1.2.1.4 Identification de KAF5, le canophyllol.

KAF5 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le système hexane/acétate 30% et son point de fusion est compris dans l'intervalle 282-283°C. Il est soluble dans le CH_2Cl_2 et donne un test positif avec le réactif de Liebermann Buchard.

Son spectre RMN ^1H CDCl_3 , 600 MHz (Figure 28) présente les caractéristiques suivantes :

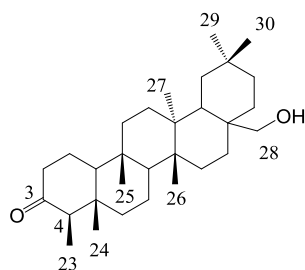
- Sept signaux singulets intégrant chacun trois protons à δ 0,72; 0,87; 0,91; 0,98; 0,99; 1,13 indiquant la présence de Sept méthyles terminaux et un signal doublet δ 0,88.
- Le signal des protons d'un méthylène déblindé par un oxygène à δ 3,63.

Ces signaux de RMN ^1H sont en accord avec une structure de type fridelane carbonylée en C₃ et hydroxylé en C₂₈.

Le couplage du méthyle à δ 0.88 est confirmé sur le spectre RMN ^1H COSY CDCl_3 , 600 MHz (Figure 30) avec le proton d'un méthine déblindé à δ 2.24. Cette valeur de déplacement chimique est en accord avec le déplacement chimique d'un méthine situé dans un environnement subissant le champ d'anisotropie d'un carbonyle.

Le spectre RMN HSQC, CDCl_3 , 600 MHz (Figure 29) permet d'attribuer les familles de protons aux carbones correspondants comme consignés dans le Tableau 14.

Les valeurs du point de fusion et des déplacements chimiques des ^1H et ^{13}C de KAH5 sont comparables à ceux du canophyllol, composé connu, précédemment isolé de *Maytenus diversifolia* par Nozaki *et al.* (1986).



19

Tableau 14 : RMN ^1H et ^{13}C comparatif du composé 19 (KAF5) avec les données issues de la littérature

Position	δ ^1H	δ ^1H ref (Nozaki <i>et al.</i> , 1986)	δ ^{13}C	δ ^{13}C ref (Nozaki <i>et al.</i> , 1986)
3	---	---	212.6	212.93
4	2.24	2.24	57.81	58.28
23	0.88	0,88	6.26	6.79
24	0,72	0,72	14.15	14.67
25	0.91	0,91	18.60	18.25
26	0.87	0,87	17.59	18.08
27	1.13	1,14	18.72	19.07
28	3.63	3.62	67.68	68.11
29	0.98	0,98	32.41	32.84
30	0.99	0,99	33.83	33.41

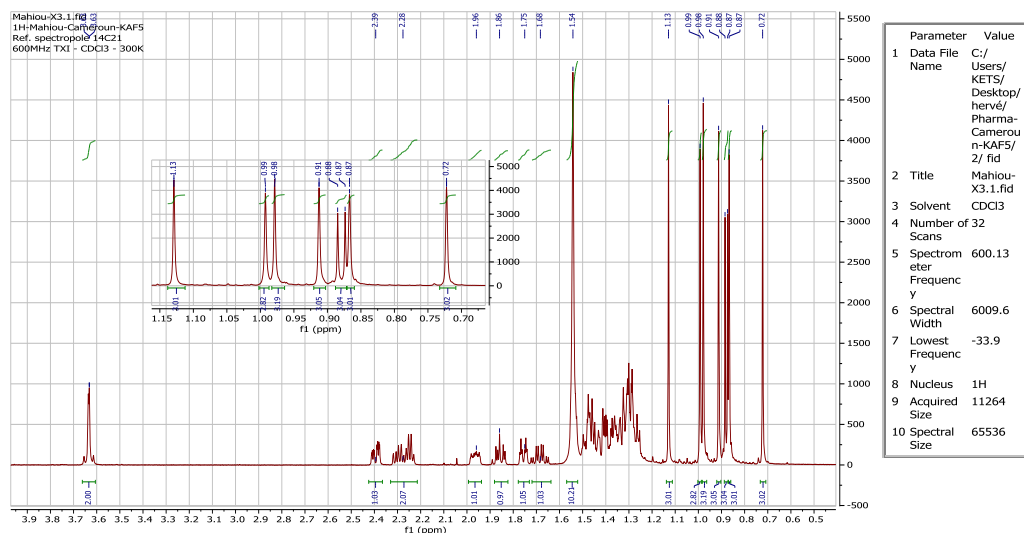


Figure 28 : Spectre RMN ¹H CDCl₃, 600 MHz du composé 19 (KAF5)

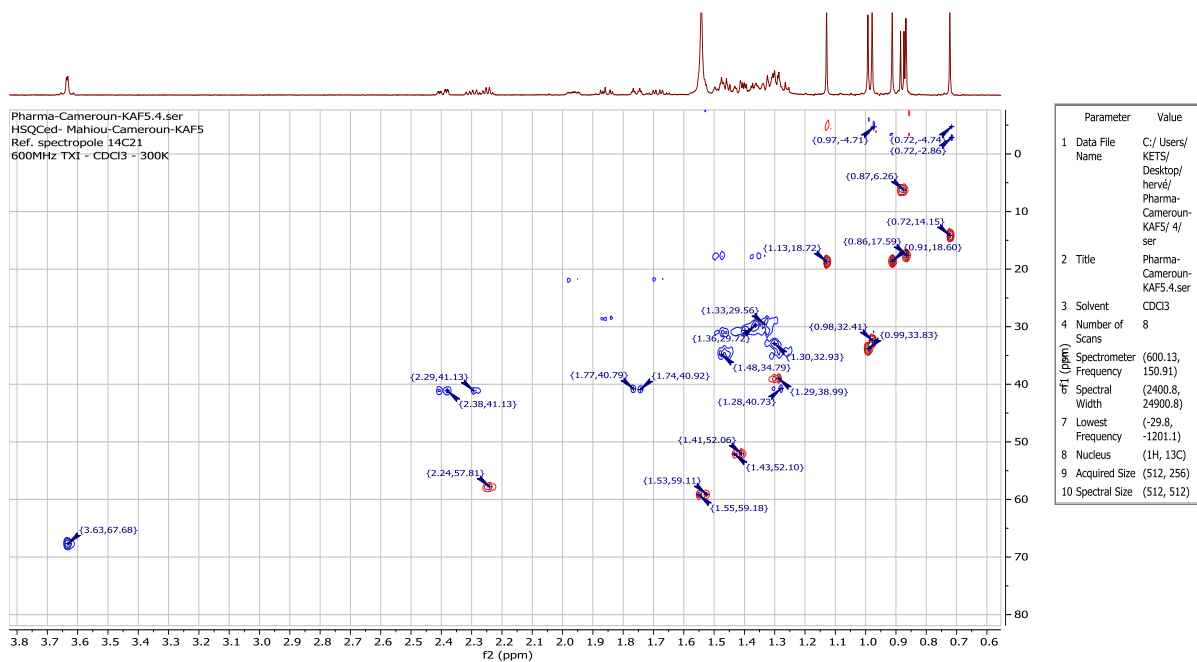


Figure 29 : Spectre HSQC CDCl₃, 600 MHz du composé 19 (KAF5).

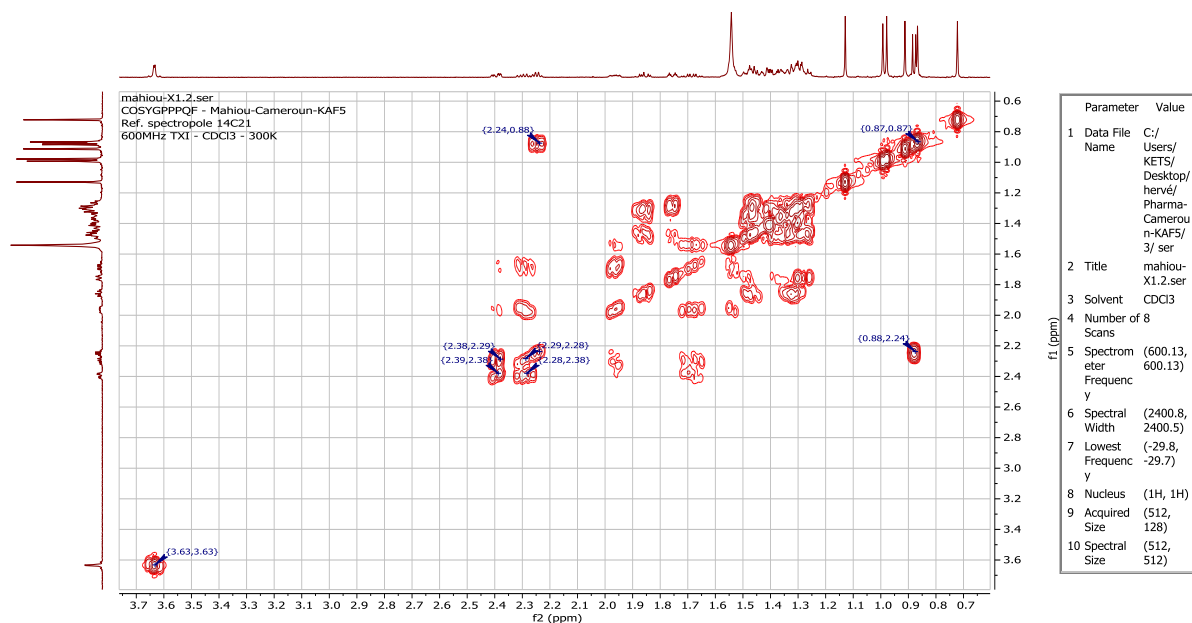


Figure 30 : Spectre COSY CDCl₃, 600 MHz du composé 19 (KAF5)

II.1.2.1.5 Identification du composé 20, l'acide pomolique (KAF10)

KAF10 a été obtenu sous forme de poudre blanche dans le système acétate/méthanol 22% et son point de fusion est de 298-300°C. Il est soluble dans le CHCl₃ et donne un test positif avec le réactif de Liebermann Buchard.

Son spectre RMN ¹H MeOD, 600 MHz (Figure 31) présente les caractéristiques suivantes :

- Six signaux singulets intégrant chacun trois protons à δ 0,80; 1,00; 1,01; 1,19; 1,25; 1,32 et un signal doublet δ 0,93 indiquant la présence de Sept méthyles terminaux.
- Le signal d'un proton d'un méthine déblindé par un oxygène à δ 3,14.
- Le signal d'un proton oléfinique à δ 5,29.

Ces signaux de RMN ¹H sont en accord avec une structure de type ursane olifimique en C₁₂ et hydroxylé en C₁₉ (Rahman & Ahmad, 1994).

Le spectre HSQC MeOD, 600 MHz (Figure 32 et Figure 33) permet d'attribuer les familles de protons aux carbones correspondant comme consignés dans le Tableau 15.

Les valeurs du point de fusion et des déplacements chimiques des ¹H et ¹³C de KAH10 sont identiques par comparaison à ceux de l'acide pomolique, composé connu, précédemment isolé de *Ilex crenata* par Kakuno (Kakuno et al., 1992).

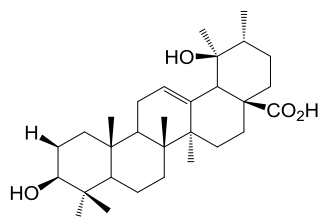


Tableau 15 : RMN ^1H et ^{13}C comparatif du composé 20 (KAF10) avec les données issues de la littérature

Position	δ ^1H	δ ^1H ref (Kakuno et al., 1992)	δ ^{13}C	δ ^{13}C ref (Kakuno et al., 1992)
3	3,14	3,45	78,54	78,2
12	5.29	5,62	128,45	128,1
23	1,01	0,92	28,99	28,7
24	0,80	1,04	16,17	16,7
25	1,25	1,11	15,52	15,5
26	1,00	1,24	16,51	17,1
27	1,32	1,47	23,51	24,6
29	1,19	1,73	25,76	26,8
30	0,93	1,13	15,18	16,4

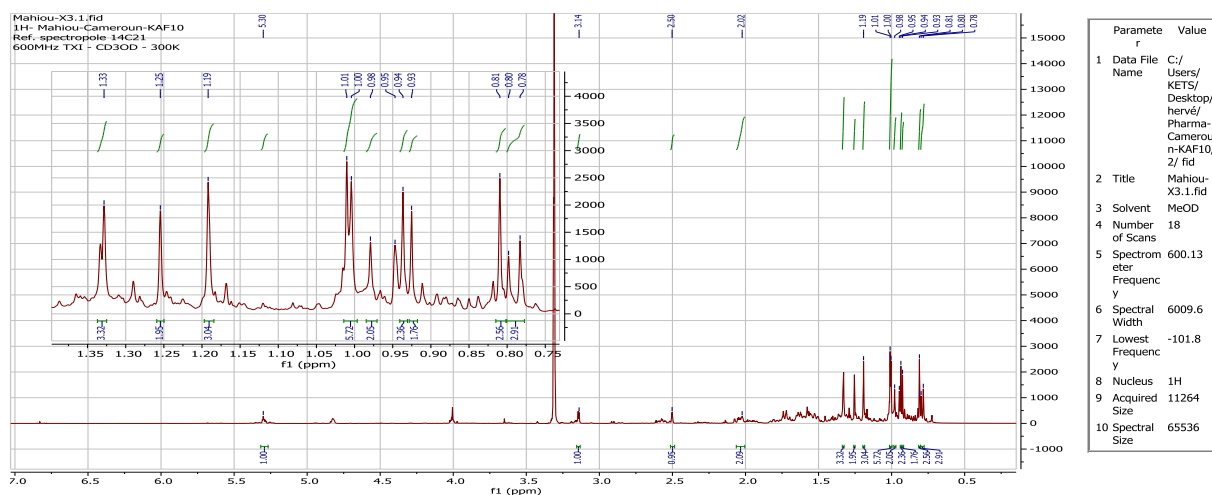


Figure 31 : Spectre RMN ^1H MeOD, 600 MHz du composé 20 (KAF10)

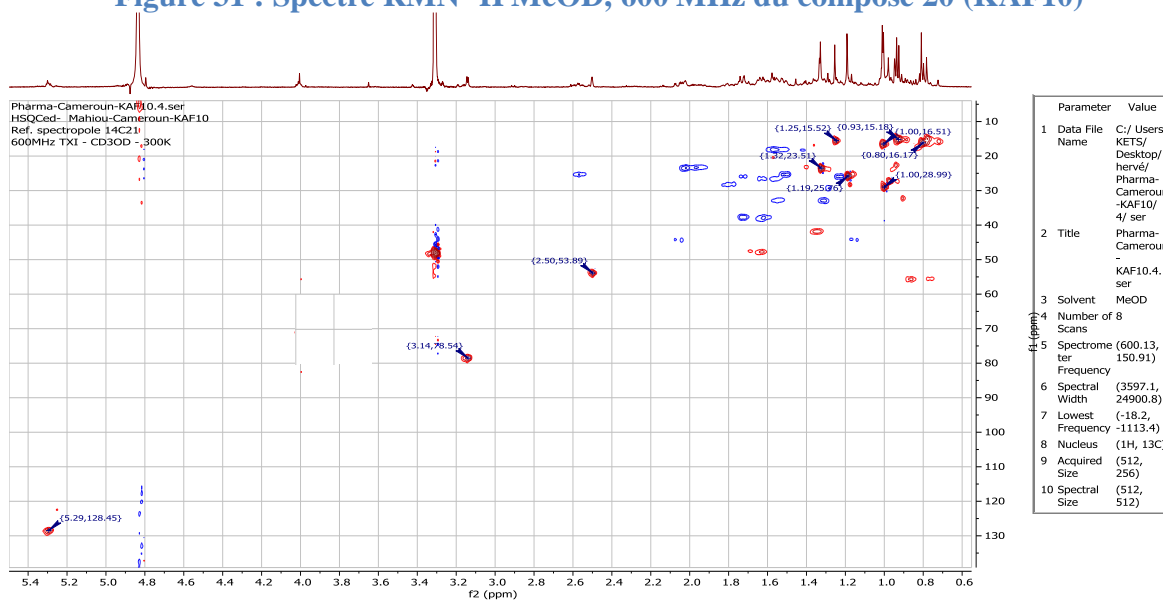


Figure 32 : Spectre HSQC MeOD, 600 MHz du composé 20 (KAF10)

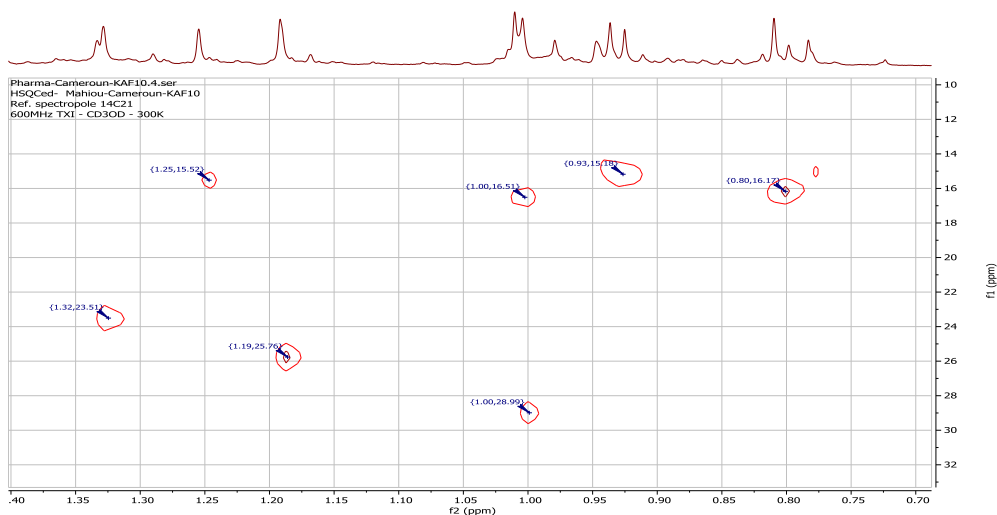


Figure 33 : Spectre HSQC élargi MeOD, 600 MHz du composé 20 (KAF10)

II.1.2.2 Caractérisation des composés isolés des racines

Des six composés isolés des racines, trois ont été identifiés au moyen des techniques usuelles de RMN à une et à deux dimensions et par comparaison avec la littérature.

II.1.2.2.1 Identification du composé 4, le lapachol (KAH10b)

KAH10b est obtenu sous forme de cristaux jaunes dans le système Hex / AcOEt 5% et se révèle à l'UV et à l'iode ; il est soluble dans le CHCl_3 et fond à 138 °C. Il donne un test positif avec le réactif de Bornträger caractéristique des quinones. Son spectre de masse (ACPI) haute résolution (Figure 34) donne l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 243,10157 correspondant à la formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ avec 9 degrés d'insaturations.

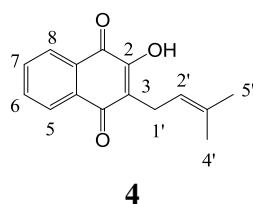
Son spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz, Figure 35 et Figure 36) intègre au total 14 protons à travers les signaux suivants :

- deux doublets de doublets d'un proton à δ 8,12 et 8,07 (8,2 et 1,5 Hz) caractéristique des protons péri du carbonyle et deux triplets de doublet d'un proton à δ 7,74 et 7,67, (8,2 et 1,5 Hz) caractéristique d'un système AA'BB'.
- un triplet d'un proton à δ 5,20 correspondant à un proton oléfinique relié à un CH_2 .
- un doublet de deux protons à δ 3,31 correspondant à un méthylène déblindé.
- deux singulets de trois protons chacun à δ 1,78 et δ 1,68 correspondant à deux groupements méthyles. Le fait que ces protons résonnent à champ faible est caractéristique des groupements méthyles déblindés.

Le spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz, Figure 37) de KAH10b montre quinze pics :

- Deux pics à δ 184,2 et 181,4 ppm attribués à deux groupements carbonyles.
- Un signal à δ 152,4 attribuable à un carbone hybridé sp^2 portant un groupement hydroxyle.
- neuf carbones sp^2 entre δ 134,5-119,3 parmi lesquels cinq groupements méthynes et quatre carbones quaternaires.
- Trois carbones sp^3 dont un pic à δ 25,4 correspondant à un méthylène déblindé et deux pics à δ 22,3 et 17,6 attribuables à deux méthyles déblindés.

L'ensemble de toutes ces données spectrales a permis d'identifier le composé KAH10b comme étant le lapachol **4** isolé pour la première fois par Paterno de *Tabebuia avellaneda* (Bignoniaceae) (Paterno *et al.*, 1882).



T: FTMS + c APCI corona Full ms [220,00-60]

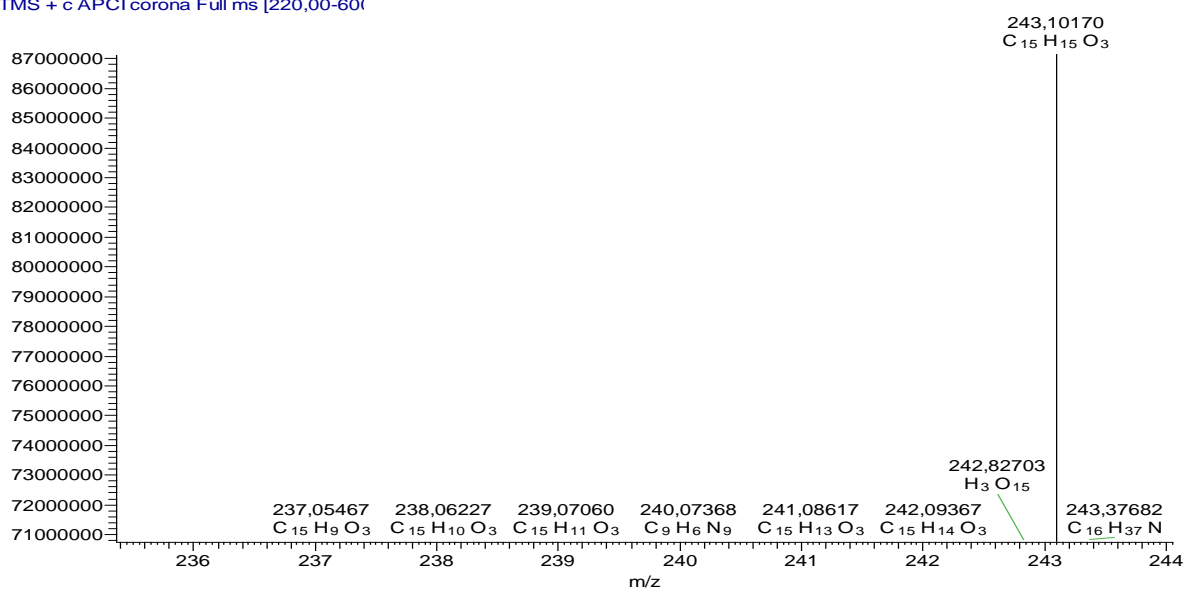


Figure 34 : Spectre de masse du composé **4** (KHA10b).

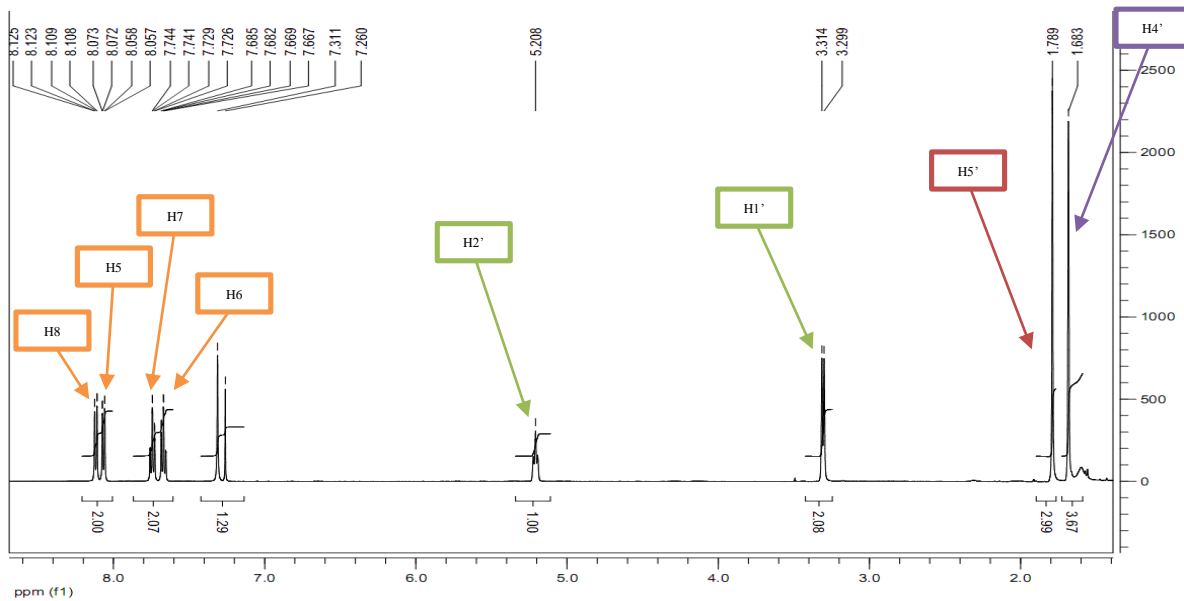


Figure 35 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) du composé 4 (KAH10b).

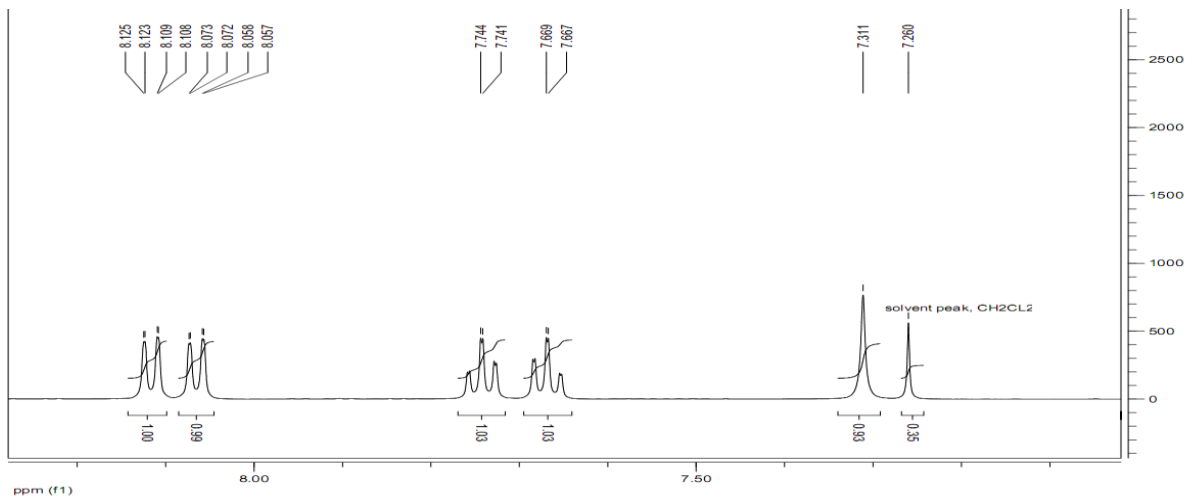


Figure 36 : Détails du spectre RMN ^1H du composé 4 (KAH10b).

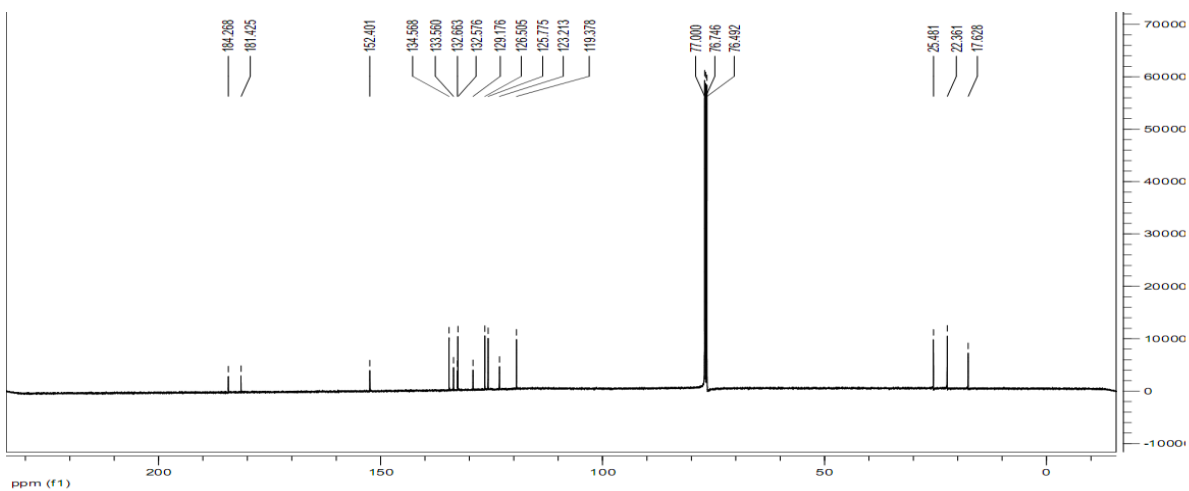


Figure 37 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 500 MHz) du composé 4 (KAH10b)

II.1.2.2.2 Identification du composé **48** (KAH20)

KAH20 est obtenu sous forme de cristaux rougeâtres dans le système Hex / AcOEt 2% et se révèle à l'UV et à l'iode ; il est soluble dans le CHCl₃ et fond à 142 °C. Il donne un test positif avec le réactif de Bornträger caractéristique des quinones. Son spectre de masse (ACPI) haute résolution (Figure 39) donne l'ion pseudo moléculaire [M-H]⁺ à *m/z* 239,87 correspondant à la formule brute C₁₅H₁₂O₃ avec 10 degrés d'insaturations.

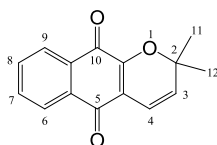
Son spectre RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz, Figure 35 et Figure 36) intègre au total 12 protons à travers les signaux suivants :

- Un système de spins aromatiques constitué d'un doublet de deux protons à δ 8,09 (8,4 Hz) caractéristique des protons aromatiques en péri d'un carbonyle et attribuables aux protons en H₉ et H₆ et un multiplet de deux protons à δ 7,63 attribuables aux protons en H₇ et H₈.
- Un système de spins oléfiniques constitué de deux doublets d'un proton chacun à δ 6,52 (7,8 Hz) et δ 5,53 (7,8 Hz) correspondant à un système de deux protons oléfinique de configuration cis et attribuables aux protons en H₄ et H₃.
- un singulet de six protons à δ 1,51 correspondant à deux méthyles.

Ces paramètres physiques et la RMN ¹H comparée à la littérature (Tableau 16) nous ont permis d'identifier le composé KAH20 comme étant le dehydro-α-lapachone **48** déjà isolé des racines de *Kigelia africana* par Inoue (Inoue *et al.*, 1981).

Tableau 16 : RMN ¹H comparatif du composé **8 (KAH20) avec les données issues de la littérature**

Position	δ ¹ H	δ ¹ H ref (Inoue <i>et al.</i> , 1981)
3	5.53	5,72
4	6.52	6,65
6, 9	8,09	8,18
7, 8	7,63	7,58
11, 12	1,51	1,55



48

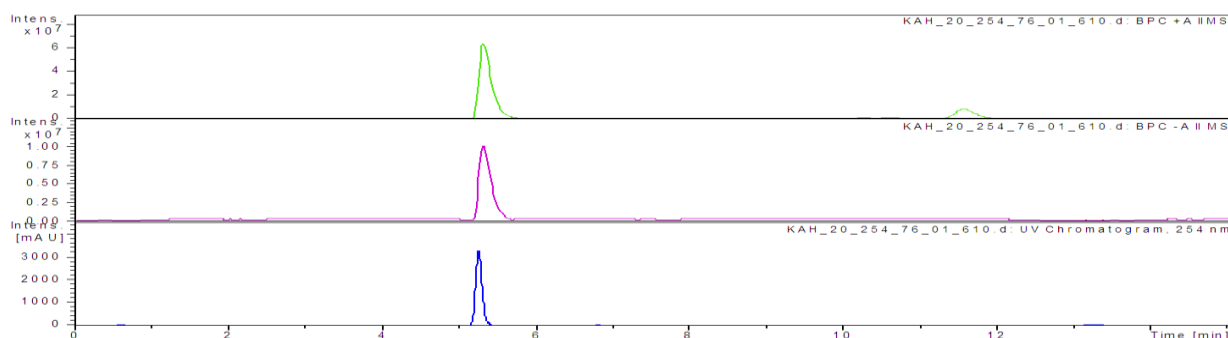


Figure 38 : Chromatogramme du composé 8 (KAH20)

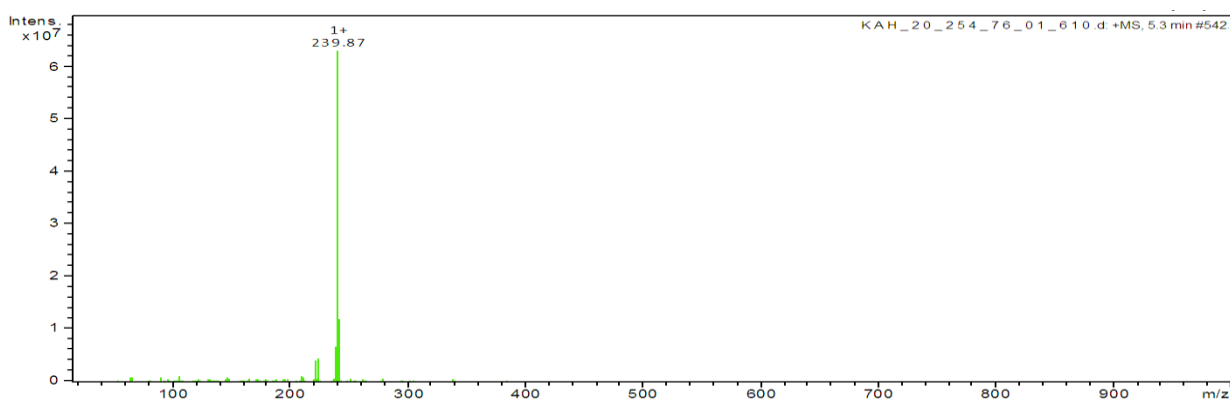


Figure 39 : Spectre de masse (ACPI) du composé 8 (KAH20)

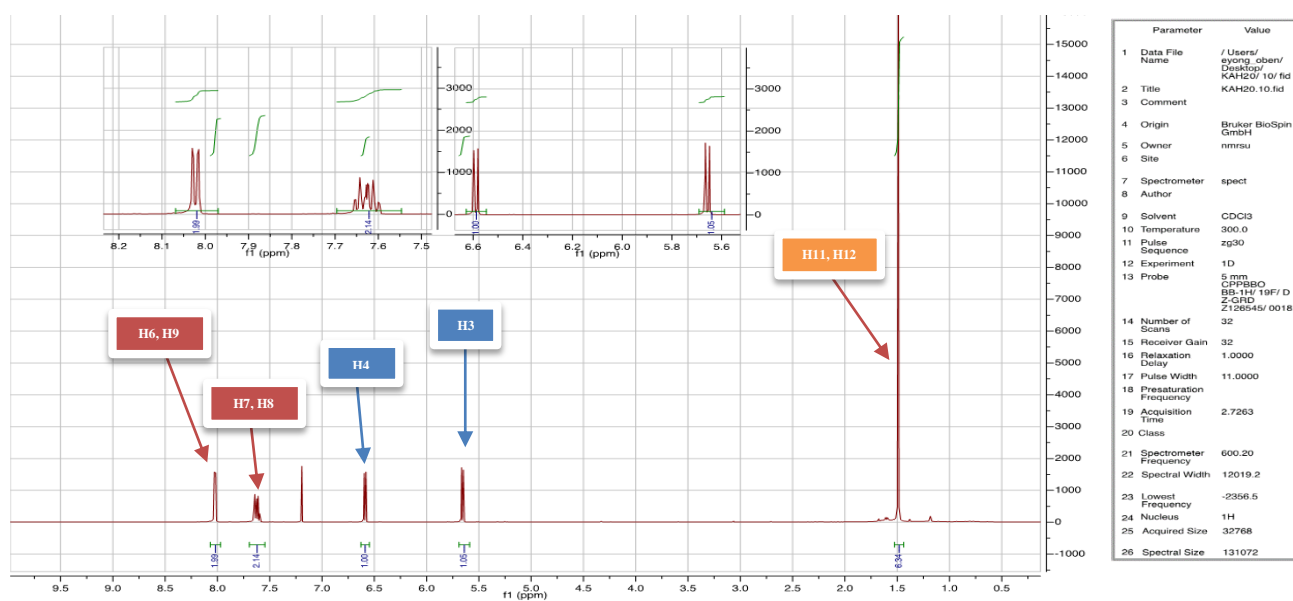


Figure 40 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) du composé 8 (KAH20).

II.1.2.2.3 Identification du composé 10, le 2- Acetyl- naphtho [2,3-b]furan-4,9 dione KAH(21)

KAH₂₁ cristallise sous forme de cristaux jaunes dans le système Hex / AcOEt 10% et se révèle à l'UV et à l'iode ; il est soluble dans le CH_2Cl_2 et fond à 222-224 °C. Il donne un test positif avec le réactif de Borntträger caractéristique des quinones. Son spectre de masse (ACPI) haute

résolution (Figure 42) donne l'ion pseudo moléculaire $[M-H]^+$ à m/z 239,83 correspondant à la formule brute $C_{14}H_8O_4$ avec 11 degrés d'insaturations.

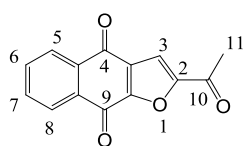
Son spectre RMN 1H ($CDCl_3$, 500 MHz, Figure 43) intègre au total 12 protons à travers les signaux suivants :

- Deux signaux d'un système AA'BB' de quatre protons aromatiques
- Deux multiplets de deux protons chacun à δ 8,27 et à δ 7,82 caractéristique des protons aromatiques d'un système AA'BB' dont les deux premiers sont en péri d'un carbonyle.
- Un singulet d'un proton à δ 7,61 attribué au proton oléfinique d'un cycle furanique.
- Et un singulet de trois protons à δ 2,67 caractéristique d'un méthyl déblindé par un carbonyle en α .

Ces paramètres physiques et la RMN 1H comparée à la littérature (Tableau 17) nous ont permis d'identifier le composé KAH21 comme étant 2- Acetyl- naphtho [2,3-b]furan-4,9- dione or 2-acetylfuro-1,4-naphthoquinone **10** déjà isolé des racines de *Kigelia africana* par (Eyong et al., 2013) et (Akunyili & Houghton, 1993).

Tableau 17 : RMN 1H comparatif du composé 10 (KAH21) avec les données issues de la littérature

Position	δ 1H	δ 1H ref (Akunyili & Houghton, 1993)
3	7.61	7,60
5 , 8	8,27	8,19
6 , 7	7,82	7,79
11	2,67	2,65



10

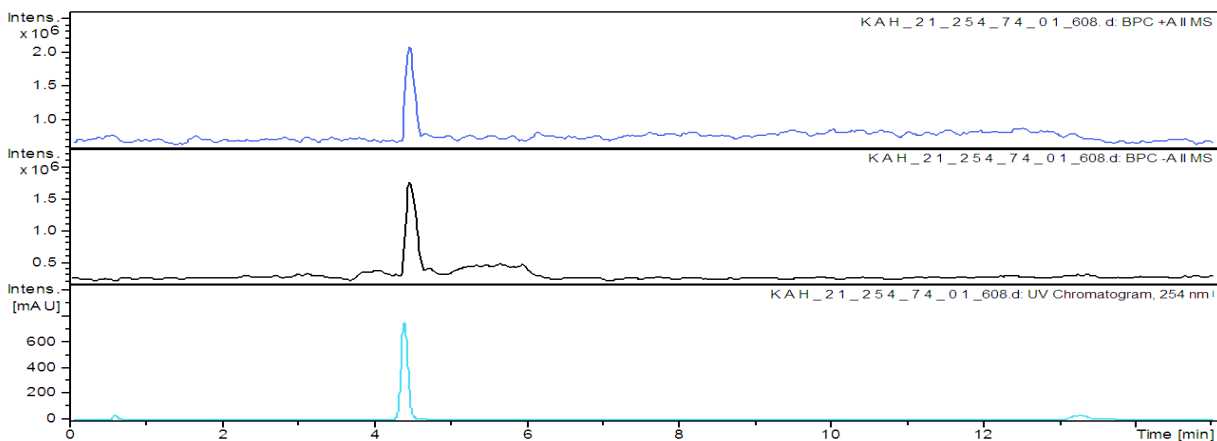


Figure 41 : Chromatogramme du composé 10 (KAH21)

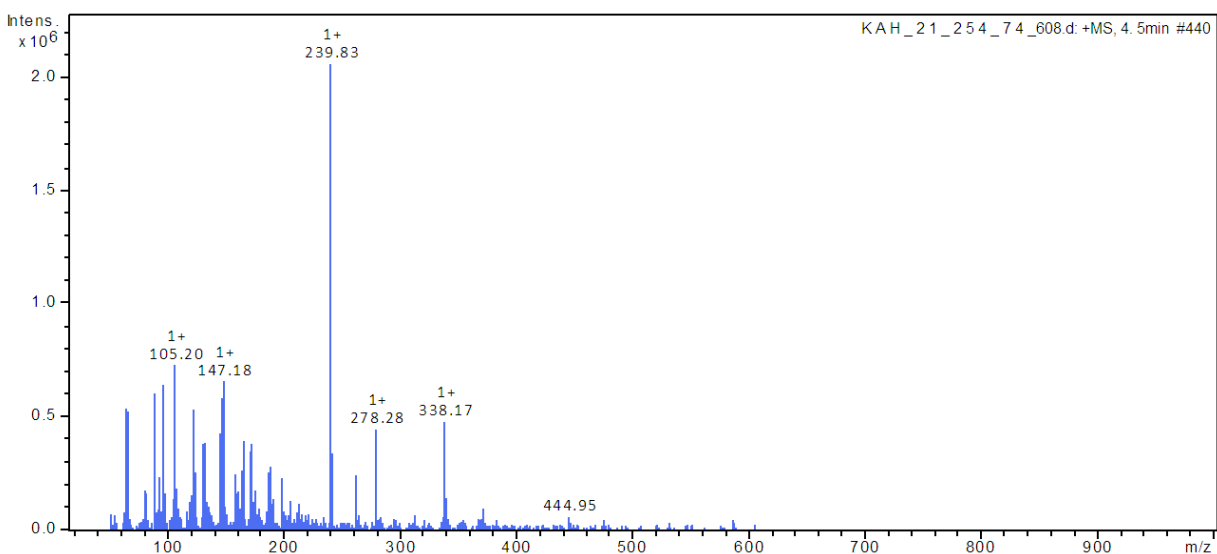


Figure 42 : Spectre de masse (ACPI) du composé 10 (KAH21)

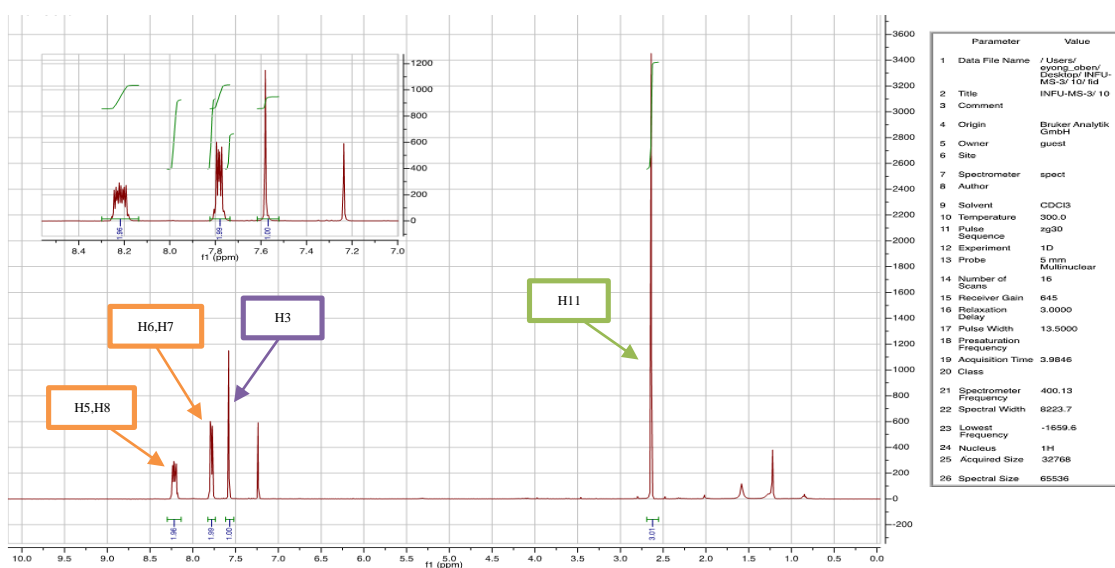


Figure 43 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) du composé 10 (KAH21)

En somme, du lapachol a été obtenu de l'étude phytochimique des deux espèces de plantes *Newbouldia laevis* et *Kigelia africana*. De *Newbouldia laevis*, 2 g de lapachol ont été obtenus à partir de 291 g d'extrait brut d'écorces de racines, soit un rendement de 0,690 %. De *Kigelia africana*, 11 mg de lapachol ont été obtenus à partir de 122 g d'extrait brut de racines, soit un rendement de 0,009 %.

II.2 TRANSFORMATIONS CHIMIQUES DU LAPACHOL

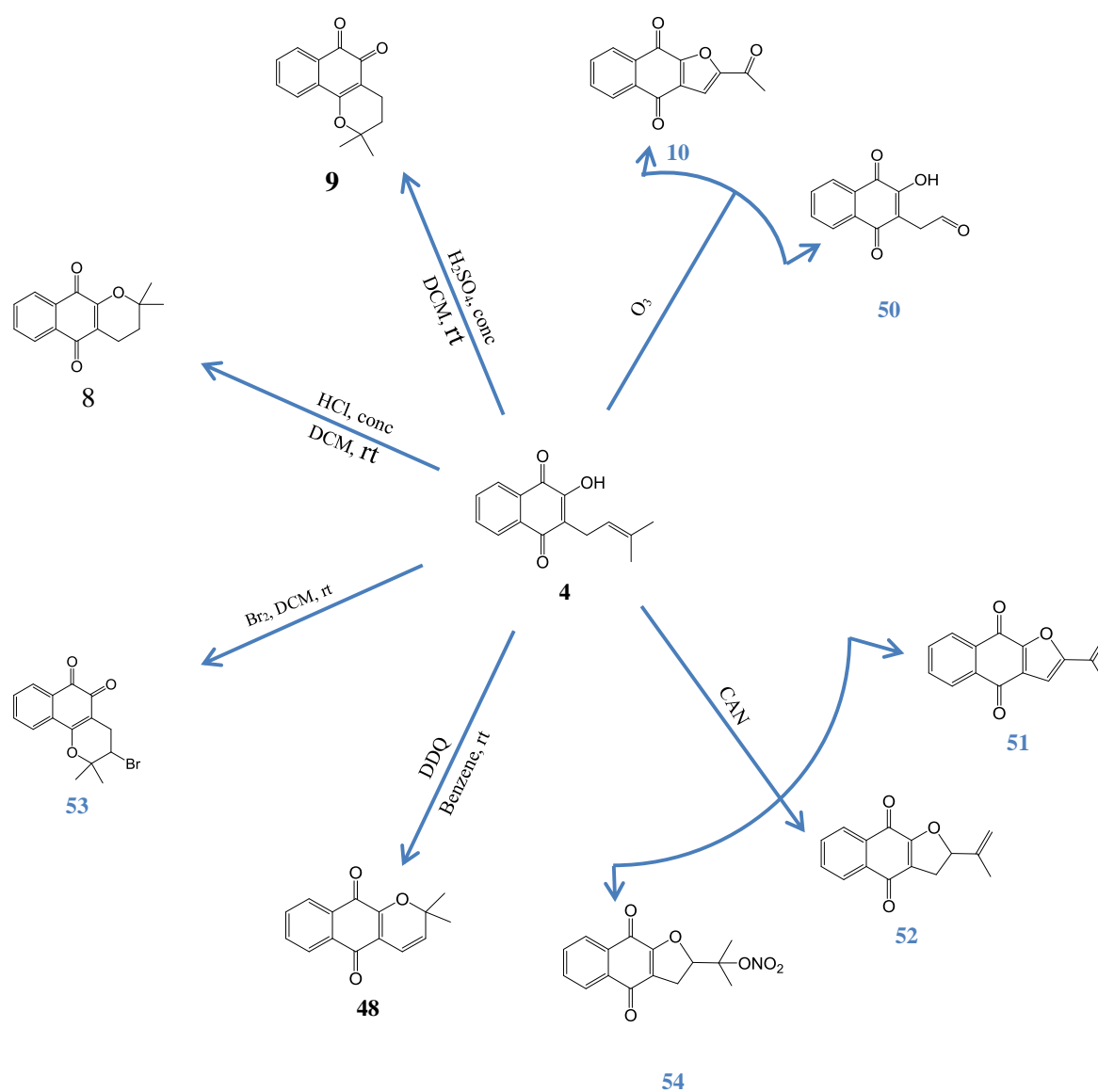
L'activité anticancéreuse manifeste du lapachol découverte au cours d'un test expérimental mené à Nice en 1980 sur neuf patients atteints des cancers du foie, des reins, du sein, de la prostate et bien d'autres activités antitumorales découvertes par la suite, ont fait du lapachol un excellent candidat aux transformations chimiques avec pour but l'identification des nouvelles têtes de série à travers des études relationnelles structure/activité. Ainsi, divers analogues de lapachol ont été préparés et étudiés pour le traitement du cancer du poumon, du sein, de la prostate, du mélanome, du sang, des ovaires, du glioblastome, de la prostate, du côlon et du rein (Hussain et al., 2007, Fiorito et al., 2014). Parmi ces analogues structuraux, trois présentent des activités anticancéreuses particulièrement intéressantes. La β -lapachone est capable d'induire sélectivement la mort cellulaire dans diverses cellules cancéreuses humaines sans tuer les cellules saines. En association avec le taxol, elle présente des effets anticancéreux puissants contre de nombreuses cellules cancéreuses en culture, y compris les ovaires, prostate, poumon, sein, colon, mélanome et lignées cellulaires pancréatiques (Hussain et al., 2007). Egalement, l' α -lapachone est un inhibiteur irréversible de la cible d'une grande variété de molécules anticancéreuses, la topoisomérase II (Krishnan et Bastow, 2000) tandis que le 2-acetylfuronaphthoquinone est un chimiopréventeur potentiel du cancer (Ueda, 2005).

Cependant, il est important de considérer le fait qu'en général, les quinones représentent une classe d'intermédiaires toxiques pouvant générer une variété d'effets dangereux *in-vivo*, notamment une cytotoxicité aiguë, une immunotoxicité et une carcinogénèse. Les quinones sont des accepteurs de Michael et des dommages cellulaires peuvent survenir par alkylation de protéines cellulaires cruciales et / ou de l'ADN. Alternativement, les quinones sont des molécules actives hautement rédox qui peuvent s'engager dans un cycle rédox avec leurs radicaux semiquinone, conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et finalement le radical hydroxyle. La production de ROS peut provoquer un stress oxydatif grave dans les cellules par la formation de macromolécules cellulaires oxydées, notamment des lipides, des protéines et de l'ADN. (Bolton et al., 2000)(Monks et al., 1992).

Dans cette partie, il sera question :

- de réaliser l'hémisynthèse des dérivés du lapachol qui possèdent des activités anticancéreuses reconnues que sont la β -lapachone, l' α -lapachone et la 2-acétylfuronaphtoquinone.
- Ensuite, d'obtenir des dérivés de la β -lapachone, de l' α -lapachone et de la 2-acétylfuronaphtoquinone de manière stéréosélective.
- Enfin, Dans une tentative de pharmacomodulation visant l'élimination des groupes quinones à grand potentiel cytotoxique, les orthoquinones seront converties en acides caboxyques indaniques via un réarrangement benzilique et en phénazines.

II.2.1 Hémisynthèse des dérivés du lapachol structuralement apparentés à l' α -lapachone, au β -lapachone (pyranonaphtoquinones) et au 2-acétylfuronaphtoquinone (furononaphtoquinones).



II.2.1.1 Dérivés de type α et β lapachone (pyranonaphtoquinone)

II.2.1.1.1 Réaction avec l'acide chlorhydrique

L'hémisynthèse des dérivés du lapachol de type pyranonaphtoquinones commence avec la conversion du lapachol **4** en α -lapachone (Schéma 1). Pour cela, un mélange de 50 mg (0,2 mmol) de lapachol, 1,4 mL d'eau distillée et 0,03 mL de HCl conc. (0,3 mmol) dans un ballon rond de 50 mL est homogénéisé à l'agitateur magnétique et à température ambiante pendant 30 minutes. A l'issue de cette conversion du lapachol par action de l'acide chloridrique, une purification chromatographique du produit de réaction permet d'obtenir le composé **8** pur (47 mg, 95%, P.F 114-115 °C), sous forme de poudre jaune. Ce composé **8** obtenu a été comparé par CCM à un échantillon authentique du α -lapachone disponible dans la chimiothèque du laboratoire et confirmé par la valeur de son point de fusion d'après la littérature (Yong & Won, 2004).

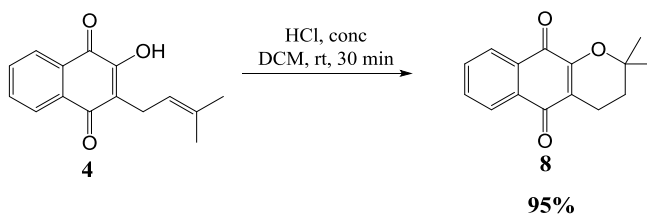


Schéma 1 : Hémisynthèse du composé 8

II.2.1.1.2 Réaction avec l'acide sulfurique

Pour réaliser la synthèse du β -lapachone **9**, 0,8 mL (1,5 mmol) d' H_2SO_4 conc. a été ajouté à un mélange de 242 mg (1,0 mmol) de lapachol et de 7 mL d'eau distillée contenu dans un ballon rond de 50 mL. L'homogénéisation du milieu réactionnel pendant 3 h à température ambiante et une ultime purification chromatographique du produit de réaction permet d'obtenir 237 mg (97%) de β -lapachone **9**, sous forme de cristaux orange (P.F 134 °C).

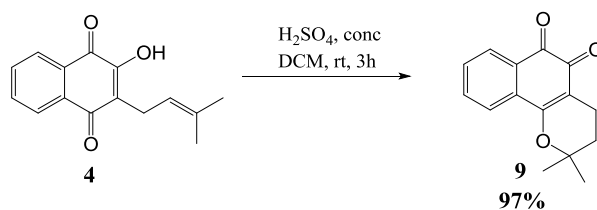


Schéma 2 : Hémisynthèse du composé 9

Son spectre de masse (APCI⁺) haute résolution (Annexe 2) donne l'ion pseudo moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^+$ à m/z 241,90 correspondant à la formule brute $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$ avec 9 degrés d'insaturations. Son spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Annexe 3) intègre au total 14 protons dont deux doublets d'un proton chacun à δ 8,03 et δ 7,79 caractéristiques des protons aromatiques en péri d'un carbonyle, deux autres multiplets d'un proton aromatique chacun à δ 7,63 et δ 7,49, deux doublets de deux protons chacun d'un système AB à δ 2,56 et δ 2,54 et un singulet de six protons à δ 1,46 correspondant à deux méthyles. Son spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, Annexe 4) intègre au

total 15 carbones dont les signaux de deux carbonyles à δ 179,9 et δ 178,7, le signal d'un carbone sp^2 déblindé à δ 162,2, les signaux de six carbones aromatiques dont deux quaternaires à δ 132,7 et δ 130,2 et quatre méthines à δ 134,9, 130,8, 128,7 et δ 124,2, le signal d'un carbone quaternaire sp^2 à δ 112,82, le signal d'un carbone quaternaire sp^3 déblindé à δ 79,4 et trois signaux dû aux carbones sp^3 dont le signal à δ 26,9 intègre deux méthyles et les signaux à δ 31,7 et δ 16,3 sont à attribuer à deux méthylènes. Son spectre DEPT135 ($CDCl_3$, 100 MHz, Annexe 5) permet de distinguer les deux méthylènes à δ 31,7 et δ 16,3, les deux méthyles à δ 26,9 et quatre méthines aromatiques à δ 134,9, 130,8, 128,7 et δ 124,2.

II.2.1.1.3 Réaction avec le DDQ

D'autre part sous l'action de 150 mg (0,66 mmol) de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), un oxydant doux, 50 mg (0.21 mmol) de lapachol dissoud dans 15 mL de benzène est converti après homogénéisation à l'agitateur magnétique à température ambiante et pendant 27 h en deshydro- α -lapachone **48** avec un faible rendement (Schéma 3). Le temps de réaction prolongé de quelques heures n'a pas aidé à faire évoluer d'avantage la réaction. Ce composé obtenu sous forme de cristaux rougeâtres a été comparé par CCM à la fois au deshydro- α -lapachone isolé précédemment des racines de *Kigelia africana* et à un échantillon authentique de la chimiothèque du laboratoire. Cette identification est également confirmée par la comparaison du point de fusion du composé (P.F 143 °C) aux données trouvées dans la littérature (P.F 143 °C, Inoue et *al.*, 1981)

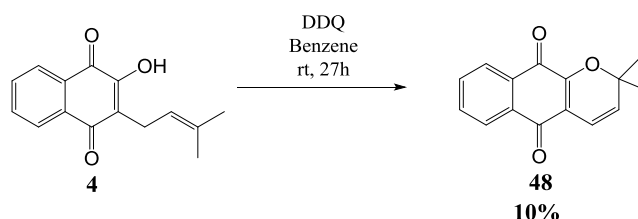


Schéma 3 : Hémisynthèse du composé 48

II.2.1.1.4 Réaction avec le dibrome

Enfin, dans un ballon de 50 mL et en présence de 11,4 μ L (1,44 mmol) de dibrome, 100 mg (0.41 mmol) de lapachol dissout dans 2,3 mL de chlorure de méthylène est converti à température ambiante en 3-bromo-2,2-diméthyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromène-5,10-dione **53** dans une réaction rapide d'environ 10 mn (Schéma 4). Ce composé est obtenu sous forme de cristaux jaunes après une purification chromatographique.

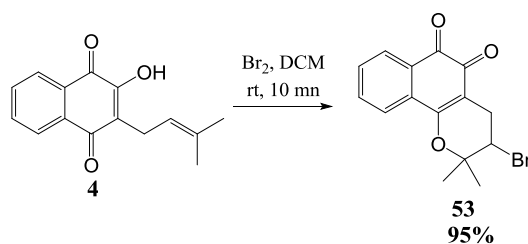


Schéma 4 : Hémisynthèse du composé 53

Son spectre de masse (ACPI⁺) (Annexe 7) donne l'ion pseudo moléculaire [M+H]⁺ à m/z= 320,65 avec un pic isotopique presque d'égale intensité à [M+H+2]⁺ suggérant la présence de l'élément brome. L'analyse à haute résolution de l'ion pseudo moléculaire fait correspondre la formule brute C₁₅H₁₃O₃Br avec 9 degrés d'insaturations. Son spectre RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz, Annexe 8) intègre au total 13 protons dont quatre sous forme de multiplets aromatiques à δ 8,06, 7,83, 7,70 et 7,57, d'un proton (dd) déblindé par l'atome de brome à δ 4,26, deux protons diastériotopiques (dd) d'un méthylène à δ 3,21 et δ 3,00 et deux méthyles (s) à δ 1,65 et δ 1,59. Son spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz, Annexe 9) intègre au total 15 carbones dont les signaux de deux carbonyles à δ 179,1 et δ 177,9, le signal d'un carbone sp² déblindé à δ 161,1, les signaux de six carbones aromatiques dont deux quaternaires à δ 131,6 et δ 130,0 et quatre méthines à δ 135,0, 131,2, 128,8 et δ 124,3, le signal d'un carbone quaternaire sp² à δ 111,0, le signal d'un carbone quaternaire sp³ déblindé à δ 81,1 et quatre signaux dû aux carbones sp³ dont le signal à δ 49,9 d'un carbone tertiaire déblindé, les signaux à δ 27,9 et 26,1 de deux méthyles et le signal à δ 23,7 à attribuer à un méthylène. Son spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz, Annexe 10) permet de distinguer le méthylène à δ 23,7, les deux méthyles à δ 27,9 et 26,1 et les quatre méthines aromatiques à δ 135,0, 131,2, 128,8 et δ 124,3.

II.2.1.2 Dérivés de type 2-acéthylfuronaphtoquinone (furanonaphtoquinone)

II.2.1.2.1 Réaction avec l'ozone

L'obtention des dérivés de type furanonaphtoquinones débute avec une réaction d'ozonolyse du lapachol (Schéma 5). Un mélange de 65 mg (0,27 mmol) de lapachol et de 2,5 mL de chlorure de méthylène est introduit dans un ballon rond tricol de 50 mL muni d'un barboteur et refroidit par un bain de glace carbonique et d'acetone à -78 °C. Le barboteur est alimenté par un générateur d'ozone lui-même relié à un réservoir d'oxygène. Le mélange réactionnel est laissé ainsi à l'homogénéisation pendant 30 mn puis le générateur d'ozone est désactivé pendant 5 mn afin de permettre au dioxygène de purger l'ozone résiduel du milieu réactionnel. 0,1 mL de dimethylsulfure (DMS) est ensuite ajouté au milieu réactionnel que l'on homogénéise tout en chauffant jusqu'à la température ambiante pendant 1 h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau distillée, séché avec du Na₂SO₄ et concentré à l'évaporateur rotatif. Le produit brut est purifié sur

une colonne chromatographique pour donner 40 mg d'un composé **50** et 19 mg d'un autre composé **10**. Le composé **50** a été comparé par CCM à un échantillon authentique du 2-(3-hydroxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl)acétaldéhyde disponible dans la chimiothèque du laboratoire tandis que le composé **10** obtenu sous forme de cristaux jaunes a été comparé par CCM au 2-acetylnaphtho [2,3-b]furan-4,9 dione isolé des racines de *Kigelia africana*. La structure de ce composé a été confirmée par une analyse au rayons-X (Figure 44).

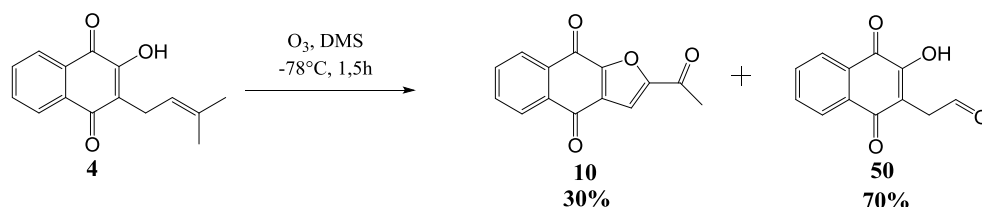


Schéma 5 : Hémisynthèse des composés **10** et **50**

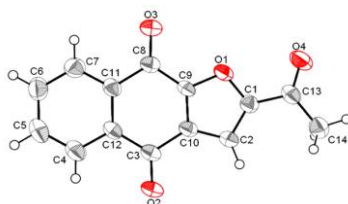


Figure 44 : Diagramme ORTEP du composé **10**

II.2.1.2.2 Réaction avec le nitrate de cérium et d'ammonium

Par la suite, la réaction dans un ballon rond de 50 mL de 50 mg (0,2 mmol) de lapachol avec 2,27 g (2 eq) de nitrate de cérium et d'ammonium (CAN) dans le système de solvant acétonitrile/eau 3/1 à température ambiante pendant 3 h, induit la formation des composés **51**, **52** et **54** structurellement apparentés à la 2-acetylfuronaphthoquinone avec respectivement 5%, 35% et 55% de rendement (Schéma 6). Les composés **51**, **52** et **54** ont été comparés par CCM à des échantillons authentiques respectivement de 2-(prop-1-én-2-yl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione, 2-(prop-1-én-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione et de 2-(2-(nitrooxy)propan-2-yl)-4,9-dioxo-2,3,4,9-tétrahydronaphtho[2,3-b]furane disponibles dans la chimiothèque du laboratoire.

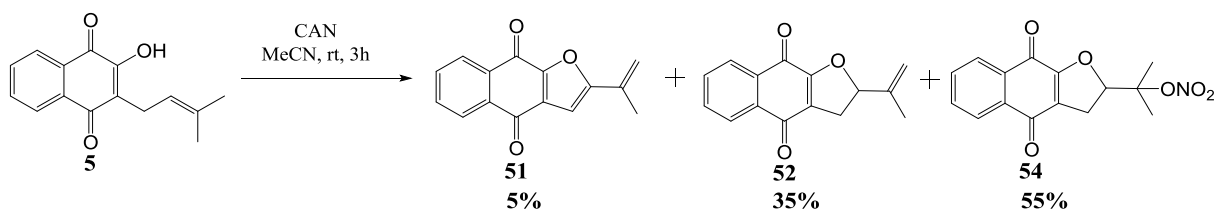
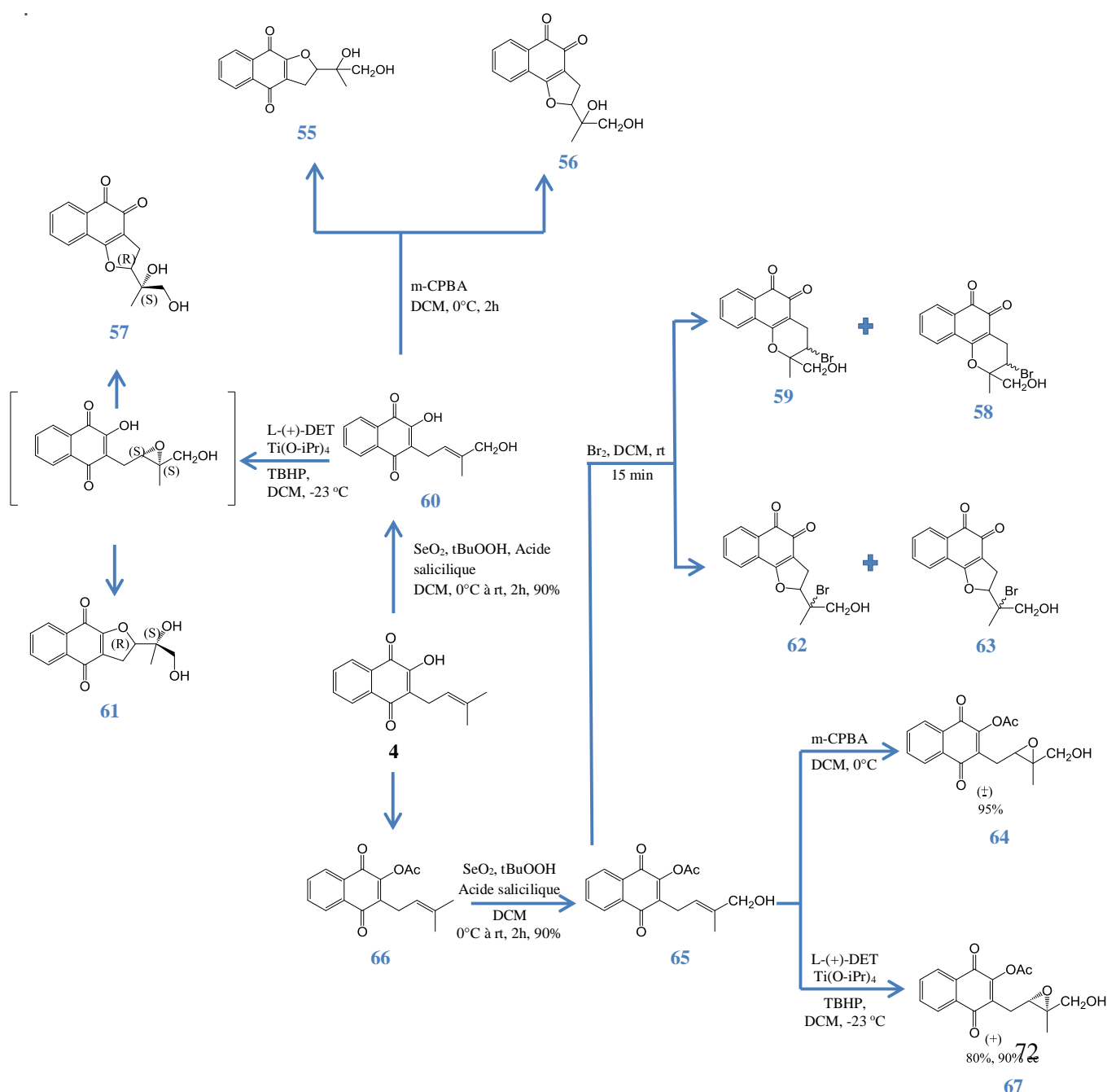


Schéma 6 : Hémisynthèse des composés **51**, **52** et **54**

II.2.2 Hémisynthèse stéréosélective des dérivés du lapachol structuralement apparentés à l' α -lapachone, au β -lapachone (pyranonaphtoquinones) et au 2-acétylfuronaphtoquinone (furanonaphtoquinones).

La notion de récepteur chimique lors de l'étude de l'activité d'une molécule implique l'existence d'une corrélation entre l'activité observée et la structure de cette molécule. En effet, une substance ne peut agir que s'il lui est possible de se fixer sur sa cible à la manière d'une clef et de sa serrure. Cette spécification prend en compte la stéréoisomérisie si bien qu'en pharmacologie on admet que lorsque l'activité est présente chez un seul énantiomère, l'autre antipode peut être dépourvu d'activité voire donner lieu à des effets indésirables et représenter ainsi par sa présence 50 % d'impureté dans un médicament racémique. Les transformations chimiques suivantes effectuées sur le lapachol permettent d'obtenir des dérivés chiraux de façon stéréosélective.



II.2.2.1 Dérivés intermédiaires synthétiques : Oxydation allylique du lapachol et de l'acétate de lapachol

Globalement, les transformations chimiques effectuées pour l'obtention stéréosélective des dérivés du lapachol passent par un intermédiaire réactionnel, le lomatiol, obtenu par oxydation allylique de l'isoprène latéral du lapachol au dioxyde de sélénium.

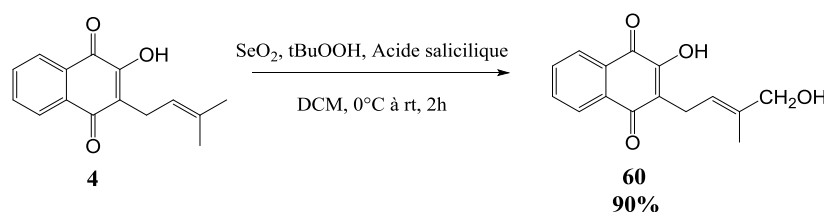


Schéma 7 : Hémisynthèse des composés 60

Pour obtenir le lomatiol, 4,6 mg (0,04 mmol) de SeO_2 , 6,9 mg (0,049 mmol) d'acide salicylique et 4 mL de DCM sec ont été introduits dans un ballon de 50 mL maintenu à 0°C par un bain de glace. A cette solution sont ajoutées 130 mg de lapachol et une solution de 312 μL (6 M) d'hydroperoxyde de tertiobutyle (TBHP) dans 4 mL de DCM sec. La solution résultante est homogénéisée à l'agitateur magnétique à température ambiante pendant 2 h et le produit de la réaction est purifié sur colonne chromatographique pour donner 117 mg (90%) de lomatiol **60** sous forme de cristaux jaunes. Le spectre RMN ^1H du lomatiol **60** (Annexe 27) ne diffère de celui du lapachol (Figure 35) que par la disparition d'un des méthyles terminaux du groupement isoprène et l'apparition d'un oxyméthylène à δ 3,93.

De la même façon, le lapachol acétylé est soumis aux conditions d'oxydation allylique comme illustré par le Schéma 8.

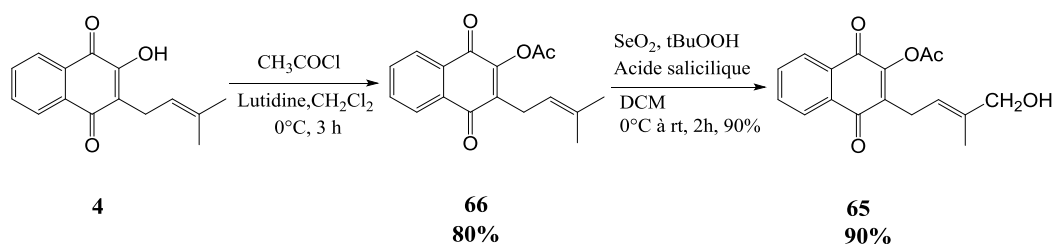


Schéma 8 : Hémisynthèse des composés 65

Pour obtenir l'acétate de lomatiol, 350 mg de lapachol (1,44 mmol) contenu dans un ballon rond de 50 mL est refroidi à 0°C , on y introduit 8 mL de DCM, 0,33 mL (2,9 mmol) de 2,6-lutidine et 0,2 mL (2,9 mmol) de chlorure d'éthanoyle. Le mélange réactionnel résultant est homogénéisé à l'agitateur magnétique pendant 3 h. Le produit est purifié sur colonne chromatographique pour donner l'acétate de lapachol pur **66** (328 mg, 80%) sous forme de cristaux

jaune (P.F 78-79 °C). Comparativement au spectre RMN ¹H du lapachol (Figure 35), le spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de l'acétate de lapachol **66** (Annexe 41) présente en plus le méthyle d'un groupe acetoxy à δ 2,42. Ensuite, 250 mg (0,88 mmol) de l'acétate de lapachol **66** est soumise aux conditions d'oxydation allylique telle que décrites précédemment lors de la synthèse du lomatiol. 238 mg (90%) d'acétate de lomatiol **65** sous forme de cristaux jaunes sont ainsi obtenus. Comparativement au spectre RMN ¹H de l'acétate de lapachol **66** (Annexe 41), le spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du composé **65** (Annexe 38) ne présente plus qu'un seul des deux méthyles terminaux du groupement isoprényle avec l'apparition d'un méthylène déblindé par l'oxygène à δ 3,31.

II.2.2.2 Dérivés de type pyranonaphtoquinone

II.2.2.2.1 Réaction avec le dibrome

La première transformation des dérivés du lapachol effectuée dans cette rubrique est celle conduisant à la formation des pyranonaphtoquinones énantiomères **58** et **59** mais aussi furanonaphtoquinones **62** et **63** à partir de l'acétate de lomatiol dans le dibrome comme illustré dans le Schéma 9.

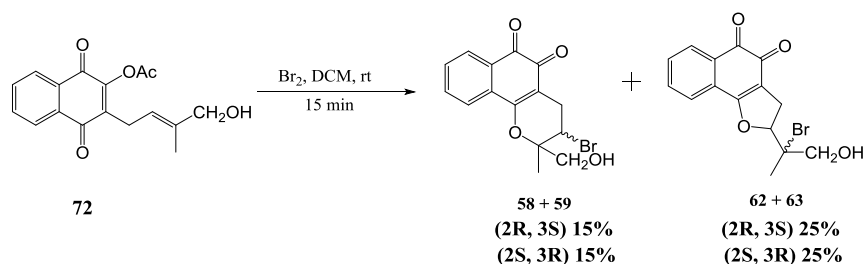


Schéma 9 : Hémisynthèse des composés **58**, **59**, **62** et **63**

Pour obtenir les pyranonaphtoquinones énantiomères **58** et **59** mais aussi furanonaphtoquinones **62** et **63**, 60 mg (0,2 mmol) du composé **65**, 4 mL de DCM sec et 12 mL (4,8 mmol) de dibrome sont introduits dans un ballon rond de 50 mL maintenu à 0°C par un bain de glace. Le mélange réactionnel ainsi constitué est homogénéisé à l'agitateur magnétique à température ambiante pendant 15 mn. La bromation de l'acétate de lomatiol **65** ainsi effectuée passe par un intermédiaire ponté et bromé dont l'ouverture par l'attaque nucléophile de l'oxygène acétylé sur les deux faces formées avec les deux carbones de la double liaison initiale permet d'obtenir les dérivés bromés énantiomères pyranonaphtoquinoniques d'une part, et furanonaphtoquinoniques d'autre part. Une purification chromatographique permet d'obtenir les mélanges racémiques d'énantiomères **58** et **59** puis **62** et **63**.

Le composé **59** cristallise sous forme de cristaux jaunes et se révèle à l'UV et à l'iode ; il est soluble dans le CH₂Cl₂. Son spectre de masse (ACPI) (Annexe 23) donne l'ion moléculaire

$[M]^+$ à m/z 336,79. L'analyse à haute résolution de l'ion moléculaire fait correspondre au composé **59** la formule brute $C_{15}H_{13}O_4Br$ avec 9 degrés d'insaturations. Son spectre RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Annexe 24) intègre au total 12 protons dont quatre multiplets de protons aromatiques à δ 8,10, 7,79, 7,68 et 7,57, un doublet de doublet du proton d'un bromométhine à δ 4,60, un multiplet de deux protons diastéréotopiques d'un oxyméthylène à δ 4,05, deux doublets de doublets des protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 3,34 et δ 2,93 et le singulet des protons d'un méthyle à δ 1,49. Son spectre RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, Annexe 25) intègre au total 15 carbones dont deux carbonyles à δ 179,0 et 177,8, un carbone oléfinique déblindé à δ 161,4, quatre méthines aromatiques à δ 135,2, 131,6, 129,3 et 124,3, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 131,5 et 130,2, un oléfine quaternaire à δ 112,3, un carbone quaternaire déblindé à δ 84,0, le carbone d'un oxyméthylène à δ 66,8, le carbone d'un bromométhine à δ 43,6, un méthylène à δ 27,3 et un méthyle à δ 16,9. Le composé **58**, énantiomère du composé **59** présente des spectres de masse (Annexe 21) et proton (Annexe 22) quasiment identiques à ceux du composé **59**. Le composé **62** cristallise sous forme de cristaux jaunes et se révèle à l'UV et à l'iode ; il est soluble dans le CH_2Cl_2 . Son spectre de masse (ACPI, Annexe 30) donne l'ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 336,80 avec un pic isotopique presque d'égale intensité à $[M+2]^+$ suggérant la présence de l'élément brome. L'analyse à haute résolution de l'ion moléculaire fait correspondre au composé **62** la formule brute $C_{15}H_{13}O_4Br$ avec 9 degrés d'insaturations. Son spectre RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Annexe 31) intègre au total 12 protons dont un doublet d'un proton aromatique à δ 8,10, un multiplet intégrant trois protons aromatiques à δ 7,64, un doublet de doublet du proton d'un oxyméthine fortement déblindé à δ 5,40, le multiplet des protons d'un oxyméthylène à δ 3,93, le multiplet des protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 3,29 et δ 3,27 et le singulet des protons d'un méthyle à δ 1,76. Son spectre RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) intègre quinze carbones dont deux carbonyles à δ 181,0 et 175,5, un carbone oléfinique déblindé à δ 150,2, quatre méthines aromatiques à δ 134,8, 132,3, 129,8 et 124,5, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 130,0 et 126,0, un oléfine quaternaire à δ 115,4, un carbone quaternaire déblindé à δ 88,2, un carbone quaternaire déblindé à δ 70,5, le carbone d'un oxyméthylène à δ 69,1, un méthylène à δ 29,9 et un méthyle à δ 21,8. Le composé **63**, énantiomère du composé **62** présente un spectre proton (Annexe 34) quasiment identique à celui du composé **62**.

II.2.2.3 Dérivés de type furanonaphtoquinone

La synthèse des dérivés bromés pyranonaphtoquinoniques **58** et **59** d'après le paragraphe précédant donne également lieu à la formation racémique du mélange des énantiomères furanonaphtoquinoniques **62** et **63**.

II.2.2.3.1 Réaction du lomatiol avec m-CPBA

Lorsque la fonction hydroxyle du lomatiol n'est pas protégé par le groupe acétyle, une époxydation peut donner lieu à des cyclisations de types α et β après l'ouverture de l'époxyde par attaque nucléophile de l'oxygène en position 2 ou 4 (Schéma 10). L'époxydation peut se faire sur les deux faces de la double liaison de la chaîne latérale du lomatiol et la réaction conduit ainsi aux produits **55** et **56** obtenus sous forme de racémiques.

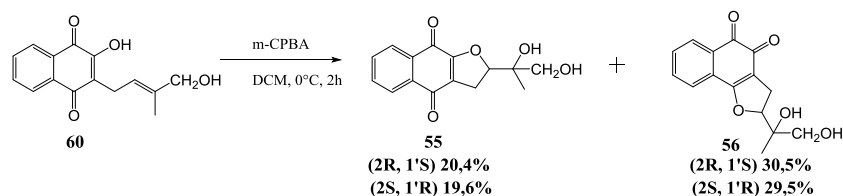


Schéma 10 : Hémisynthèse des composés **55** et **56**

Ces mélanges de racémiques ont été caractérisés par les analyses HPLC représentées par les Figure 45 (proportion 48,9 : 51,1) et Figure 46 (proportion 50,8 : 49,2) suivantes.

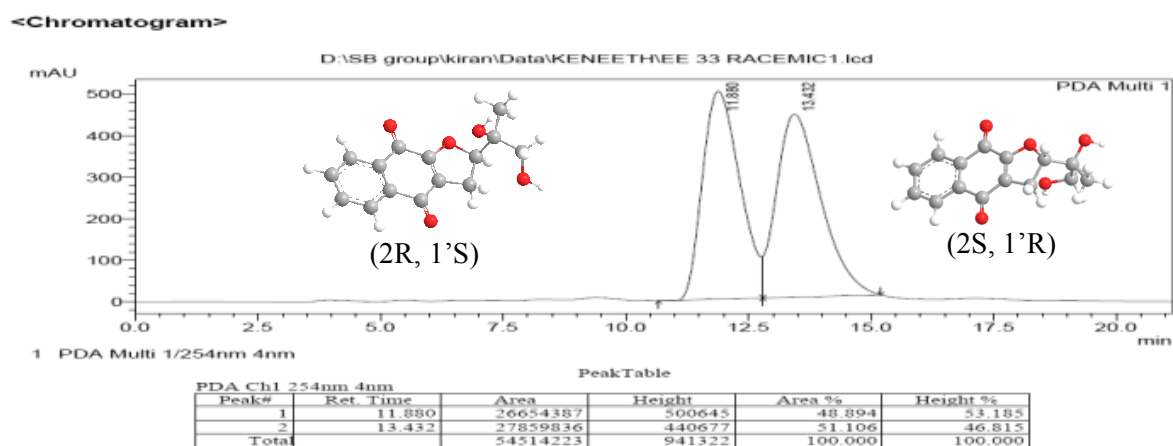


Figure 45 : Chromatogramme HPLC du racémique de la furonaphtoquinone **55**

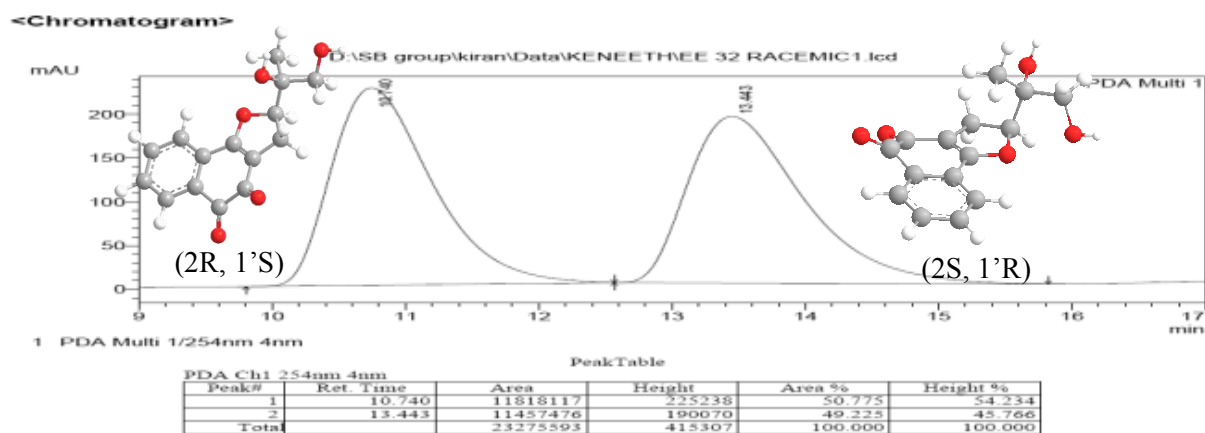


Figure 46 : Chromatogramme HPLC du racémique de la furoorthoquinone **56**

Pour obtenir la furonaphtoquinone **55** et de la furoorhoquinone **56**, une masse de 90 mg de lomatiol **60**, obtenu par conversion du lapachol sous les conditions d'oxydation allylique telles que décrites précédemment (Schéma 7), est dissoute dans 3,6 mL de DCM sec contenu dans un ballon rond de 50 mL refroidi à 3°C. 2 eq d'acide métachloroperbenzoïque (MCPBA) est ajouté au milieu réactionnel et l'ensemble est homogénéisé à l'agitateur magnétique pendant 2h. Une purification chromatographique du produit de réaction permet d'obtenir les racémiques de la furonaphtoquinone **55** et de la furoorhoquinone **56**. Les spectres RMN du proton et du carbone du composé **56** (Annexe 18 et Annexe 19) sont comparables à ceux du composé **62** (Annexe 31 et Annexe 32) décrit précédemment. Le brome présent dans la structure du composé **62** est remplacé par un groupement hydroxyle dans la structure du composé **56** comme le montre son spectre de masse (ACPI) (Annexe 17) qui donne l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 275,23 correspondant à haute résolution à la formule brute $C_{15}H_{14}O_5$ avec 9 degrés d'insaturations. Le composé **55** cristallise sous forme de cristaux jaunes, est soluble dans le CH_2Cl_2 et se révèle à l'UV et à l'iode. Son spectre de masse (APCI) (Annexe 12) donne l'ion moléculaire $[M]^+$ à m/z 274,23. L'analyse de cet ion moléculaire à haute résolution permet d'attribuer au composé **55** la formule brute $C_{15}H_{14}O_5$ avec 9 degrés d'insaturations. Son spectre RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz, Annexe 13) intègre au total 14 protons dont deux doublets de deux protons à δ 8,08 (caractéristique des protons aromatiques en péri d'un carbonyle) et à δ 7,70. Un doublet de doublet du proton d'un oxyméthine fortement déblindé à δ 5,05, deux doublets des protons diastéréotopiques d'un oxyméthylène déblindé à δ 3,81 et δ 3,58, deux doublets de doublets des protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 3,30 et δ 3,23, deux singulets des protons de deux groupes hydroxyles à δ 2,46 et δ 2,01 et le singulet des protons d'un méthyle à δ 1,27. Son spectre RMN ^{13}C (125MHz, $CDCl_3$, Annexe 14) intègre pour quinze carbones dont deux carbonyles à δ 182,3 et 177,8, un oléfine quaternaire déblindé à δ 159,9, quatre méthines aromatiques à δ 134,4, 133,1, 126,4 et 126,2, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 133,2 et 131,6, un oléfine quaternaire à δ 125,2, un méthine déblindé à δ 87,5, un carbone quaternaire déblindé à δ 73,4, un oxyméthylène à δ 66,8, un méthylène à δ 28,0 et un méthyle à δ 19,0.

II.2.2.3.2 Réaction d'époxidation de Sharpless du lomatiol

Pour induire une diastéréoselectivité dans la formation des furonaphtoquinones précédents à partir du lomatiol, une époxidation de Sharpless est utilisée en lieu et place de l'époxidation au m-CPBA (Schéma 11). En théorie, le lomatiol donne sélectivement dans l'étape intermédiaire un seul des deux époxydes possibles (Schéma 11). Mais l'ouverture ultérieure de cet époxyde par attaque nucléophile des oxygènes en position 2 et 4 se fait indifféremment sur les

deux faces de l'époxyde et conduira après purification à l'obtention de mélanges de diastéréoisomères **57** et **61**.

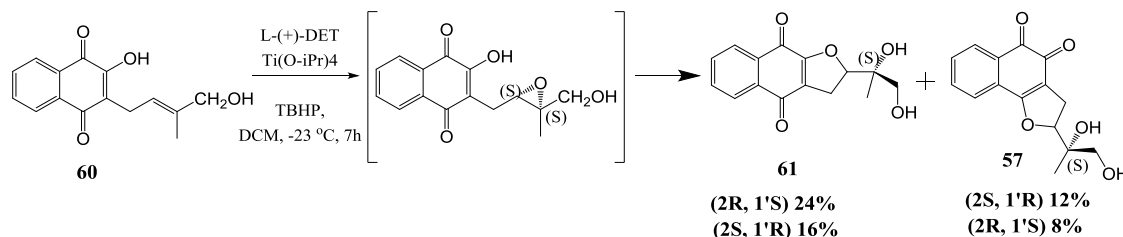


Schéma 11 : Hémisynthèse des composés **57** et **61**

Ces mélanges de diastéréoisomères **57** et **61** ont été analysés par HPLC et les résultats des rapports diastéréoisomériques sont de 2 : 3 comme le montrent les chromatogrammes (Figure 47 et Figure 48).

<Chromatogram>

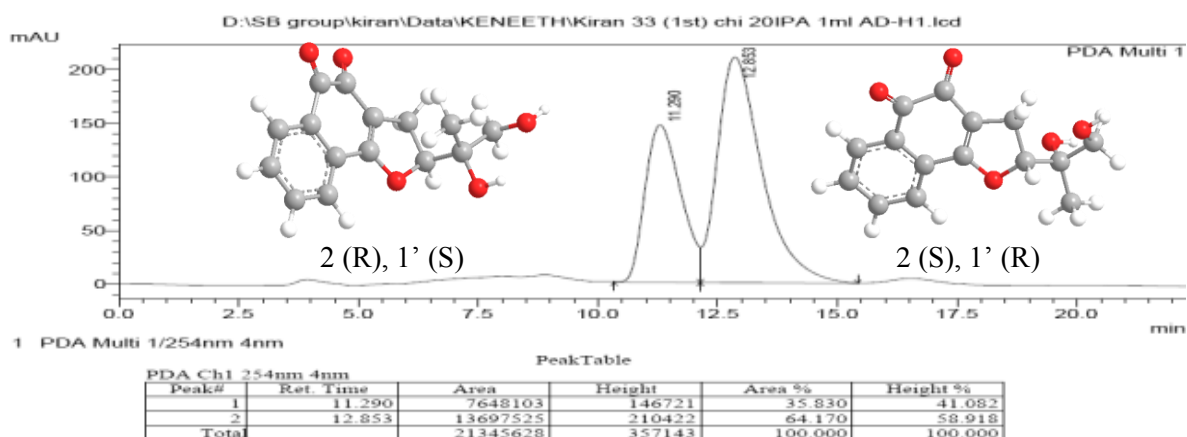


Figure 47 : Chromatogramme HPLC du mélange **57**

<Chromatogram>

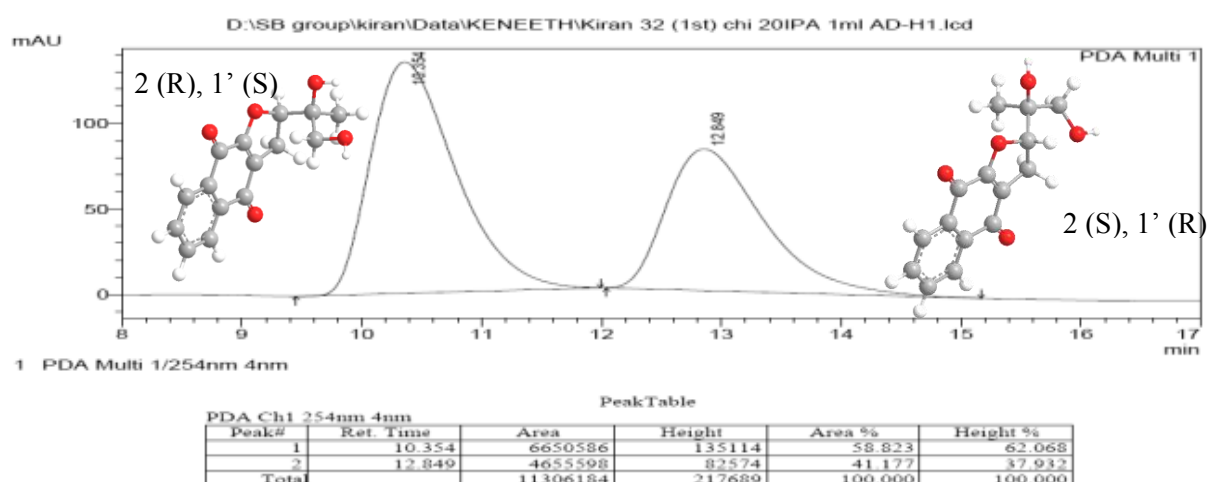


Figure 48 : Chromatogramme HPLC du mélange **61**

L'analyse aux rayons-X de l'énantiomère majeur du mélange **57** purifié par chromatographie HPLC préparative utilisant une colonne chirale complète son identification en

lui attribuant la structure absolue du 2(S)-1'(R), 2-dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (Figure 49). De même que l'énantiomère majeur du mélange **61** est identifié au 2(R)-1'(S), 2-dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione.

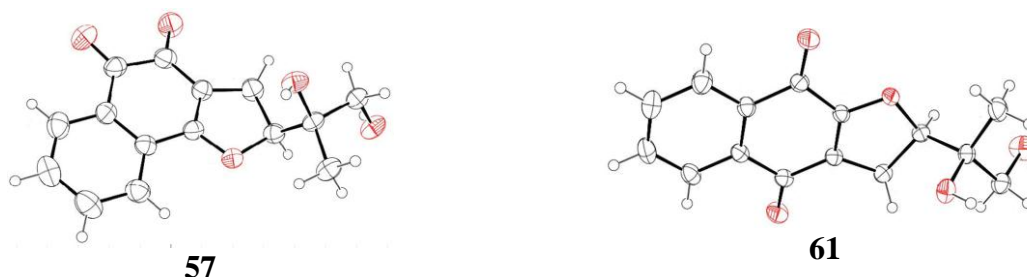


Figure 49 : Diagramme ORTEP des l'énantiomères majeurs des composés **57** et **61**

Pour obtenir la furonaphthoquinone **61** et de la furoorhoquinone **57**, l'époxydation de sharpless du lomatiol s'est déroulée de la manière suivante. Premièrement 120 mg de 'dried molecular sieves' et 2 mL de DCM ont été introduits dans un ballon de 100 mL placé sous agitation magnétique. Ensuite il a fallu refroidir le milieu réactionnel à -23°C et y introduire en homogénéisant 24 mL (0,14 mmol) de L-(+)-diethyl tartrate et 34 mL (0,12 mmol) d'isopropoxide de titanium (IV). 10 min après, 1,2 mL (6 M en solution dans du decane) de TBHP a été ajouté. A ce mélange réactionnel 60 mg (0,232 mmol) de lomatiol **60** dissoud dans 2 mL de DCM est ajouté goutte à goutte et le mélange est homogénéisé pendant encore 7 h à -23°C sous atmosphère d'azote. Le produit brut formé est purifié sur colonne chromatographique.

II.2.2.3.3 Réaction de l'acétate de lomatiol avec m-CPBA

Comme nous l'avons constaté plus haut, deux étapes gouvernent la formation de ces différents diastéréoisomères : la formation de l'époxyde et l'ouverture de cet époxyde par attaque nucléophile d'un des oxygènes en position 2 et 4. Il est intéressant d'expérimenter si l'époxyde pourrait être préservé en protégeant au préalable la fonction hydroxyle en position 2 par acétylation, contrairement à l'ouverture du pont bromé observée lors de la synthèse des mélanges de diastéréoisomères **58**, **59**, **62** et **63**. L'expérimentation montre que l'époxydation de 90 mg d'acétate de lomatiol en présence de m-CPBA dans les conditions décrites précédemment (Schéma 10) conduit à la formation racémique du mélange des énantiomères oxiranes **64** avec 95% de rendement.

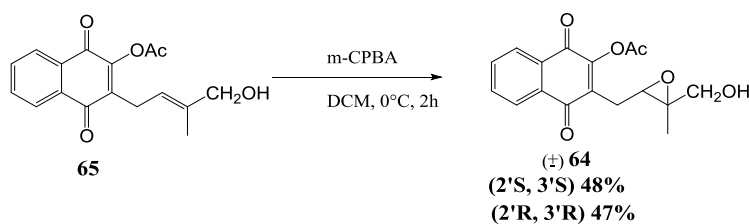


Schéma 12 : Hémissynthèse du composé 64

La chromatographie HPLC de ce produit (Figure 50) permet de mettre en évidence le mélange racémique **64**.

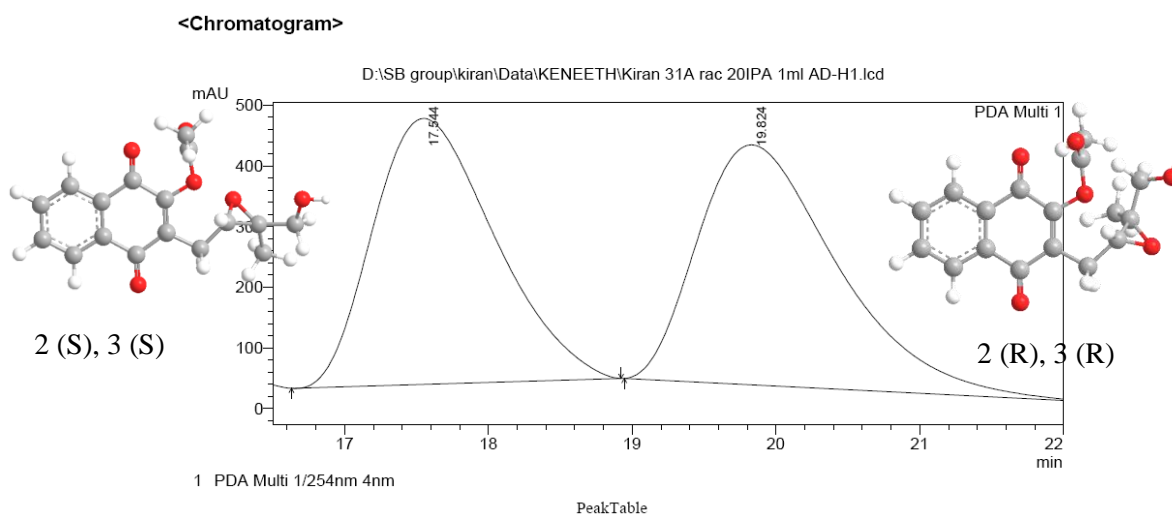


Figure 50 : Chromatogramme du composé 64

Le spectre **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, Annexe 35)** du composé **64** intègre au total quinze protons dont deux protons aromatiques à δ 8,13–8,08 (m, 2H), deux protons aromatiques à δ 7,77–7,72 (m, 2H), les protons diastéréotopiques d'un oxyméthylène à δ 3,65 (d, J = 12 Hz, 1H) et 3,55 (d, J = 12,4 Hz, 1H), le proton d'un oxyméthine à δ 3,23 (t, J = Hz, 1H), les protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 2,94 (dd, J = 5,2, 13,6 Hz, 1H) et 2,80 (dd, J = 6,8, 3,6 Hz, 1H), les protons du méthyle d'un groupement acétyl à δ 2,40 (s, 3H), et le méthyle à δ 1,40 (s, 3H). Son spectre **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, Annexe 36)** intègre au total seize carbones dont deux carbonyles à δ 184,3 et 177,9, le carbonyle du groupement acétyl à δ 168,0, un oléfine quaternaire déblindé à δ 152,5, quatre méthines aromatiques à δ 134,4, 134,1, 126,9 et 126,8, un oléfine quaternaire à δ 135,5, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 131,9 et 130,9, le carbone d'un oxyméthylène à δ 65,1, un carbone quaternaire déblindé à δ 61,7, le carbone d'un oxyméthine à δ 58,0, un méthylène à δ 23,8, le méthyle du groupe acétyl à δ 20,6, et un méthyle à δ 14,4.

II.2.2.3.4 Réaction d'époxidation de Sharpless de l'acétate de lomatiol

Pour tirer un plus grand profit de la régiosélectivité induite par l'époxydation de Sharpless appliquée précédemment au lomatiol (Schéma 11), 60 mg (0,2 mmol) d'acétate de lomatiol ont été époxydé dans les mêmes conditions avec 80% de rendement (Schéma 13).

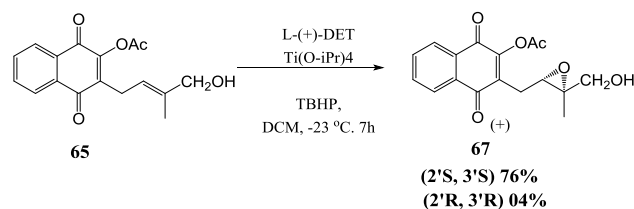


Schéma 13 : Hémisynthèse du composé 67

L'époxyde de Sharpless **67** est obtenu sous forme d'huile jaune clair et dans un rapport d'excès énantiomérique de 90% comme le montre la chromatographie HPLC du produit (Figure 51).

<Chromatogram>

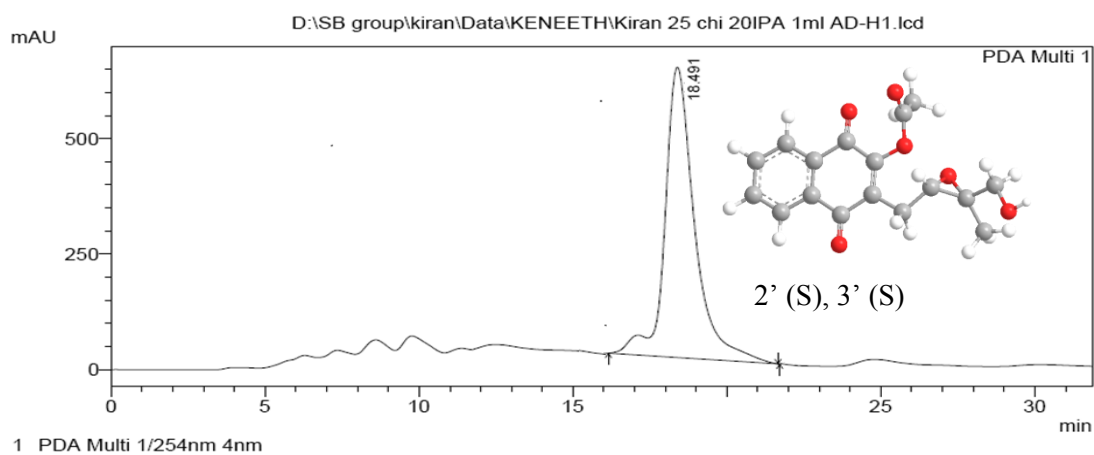
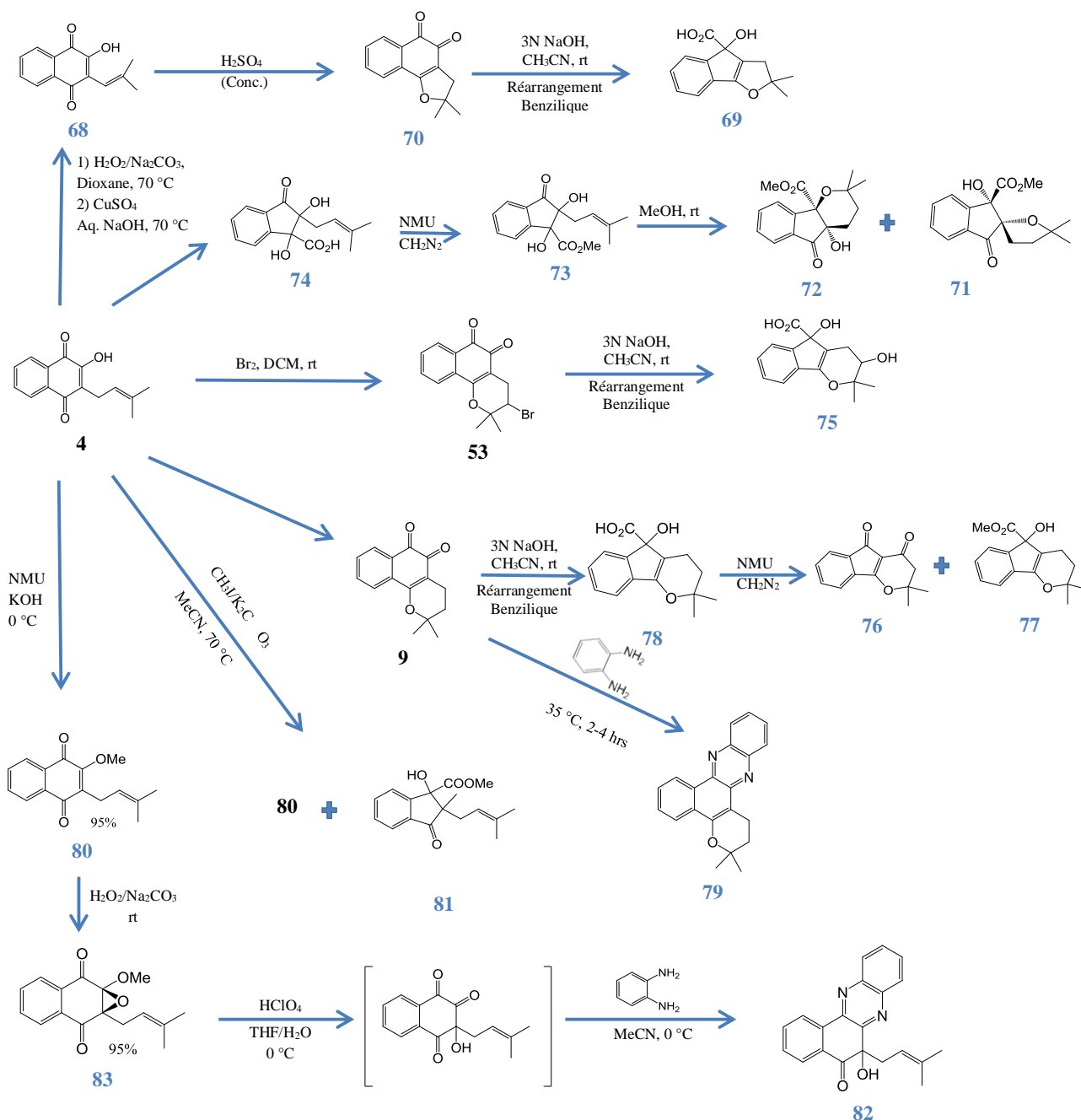


Figure 51 : Chromatogramme HPLC du composé 67

II.2.3 Hémisynthèse des dérivés indaniques et phenazines à partir du lapachol.

Les transformations chimiques effectuées sur le lapachol dans cette partie constituent une pharmacomodulation des dérivés quinoniques du lapachol dont les fonctions quinones sont reconnues dans la littérature comme des fonctions possédant une cytotoxicité aigue. Cette pharmacomodulation est faite dans les suites réactionnelles suivantes par transformation des dérivés du lapachol en acides indaniques ou en phénazines.



II.2.3.1 Dérivés indaniques

II.2.3.1.1 Réarrangement benzilique du nor- β -lapachone

La première méthode exploitée pour neutraliser la cytotoxicité reconnue aux groupements quinoniques est la dégradation en milieu basique par réarrangement benzilique de ces groupements quinoniques. Le nor-lapachol obtenu à partir du lapachol dans les conditions d'oxydation de Hooker comme décrites dans la revue de la littérature est converti en nor- β -lapachone, une orthoquinone. Cette orthoquinone soumise aux conditions de réarrangement benzilique conduit à l'acide indanique **69** (Schéma 14).

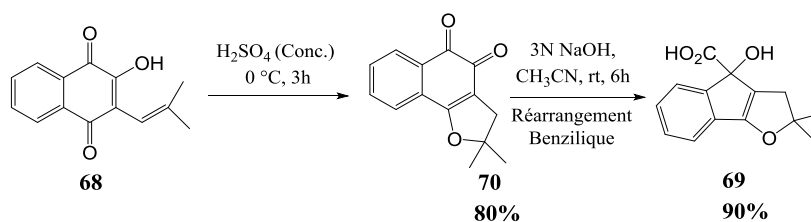


Schéma 14 : Hémisynthèse du composé **69**

Pour obtenir l'acide indanique **69**, 200 mg (0,84 mmol) de lapachol a été converti en 194 mg (90%) de norlapachol **68**. Le traitement 100 mg (0,42 mmol) du composé **68** par l'acide sulfurique concentré (H₂SO₄ conc) dans un ballon de 50 mL refroidit à 0 °C par un bain de glace homogénéisé pendant 3h conduit au composé **70**. Ensuite une masse de 50 mg (0.21 mmol) de nor- β -lapachone **70** est soumise aux conditions d'un réarrangement benzylique. Le nor- β -lapachone dissout dans 2 mL d'acetonitrile est traité avec 1 mL d'une solution de NaOH (3 N) et le mélange est homogénéisé pendant 6 h à température ambiante. Le produit de la réaction est purifié sur colonne chromatographique pour donner le composé pur **69** (49 mg, 90%) sous forme de cristaux jaunes. Son spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, Annexe 48) intègre au total 14 protons à travers des signaux dont deux multiplets de deux protons aromatiques à δ 8,08 et 7,70, le singulet d'un méthylène à δ 2,87, et le singulet de deux méthyles à δ 1,30. Son spectre RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, Annexe 49) intègre au total 14 carbones dont le carbonyle d'un acide à δ 181,2, un oléfine déblindé à δ 155,3, quatre méthines aromatiques à δ 134,8, 133,5, 127,0 et 126,3, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 132,5 et 129,8, un carbone oléfinique quaternaire à δ 121,0, deux carbones quaternaires déblindés à δ 72,8, un méthylène à δ 36,8 et deux méthyles à δ 29,7. Le norlapachol **68** cristallise sous forme de cristaux jaunes, est soluble dans le CH₂Cl₂ et se révèle à l'UV et à l'iode. Son spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz, Annexe 45) intègre au total 12 protons dont quatre sous forme de doublets de deux protons chacun dont un à δ 7,86 caractéristique des protons aromatiques en péri d'un carbonyle et l'autre à δ 7,45, un singulet d'un proton oléfinique à δ 5,73 et les signaux de deux méthyles singulets à δ 1,71 et δ 1,41. Son spectre RMN

^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, Annexe 46) intègre au total 14 carbones dont deux carbonyles à δ 184,8 et 181,6, un oléfine déblindé à δ 151,2, un oléfine quaternaire à δ 143,7, quatre méthines aromatiques à δ 134,9, 133,0, 126,9 et 126,1, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 132,9 et 129,5, un oléfine quaternaire à δ 120,9, un méthine oléfinique à δ 113,6 et deux méthyles à δ 26,6 et 21,8. Le spectre RMN ^1H du composé **70** (Annexe 51) est comparable à celui du β -lapachone (Annexe 3) à la différence de la présence dans le spectre de ce composé du signal d'un seul méthylène isolé à δ 2,94 au lieu d'un système de spins à deux méthylènes visciniaux dans le cas du β -lapachone.

II.2.3.1.2 Réaction d'estérification de l'intermédiaire de Hooker

La fonction quinonique du lapachol peut également être convertie par la modification de fieser de la réaction de Hooker conduisant à l'intermédiaire de Hooker de type acide indanique comme décrite dans la partie revue de littérature. L'intermédiaire de Hooker est estérifié sous l'action du N-nitrosométhylurée en milieu basique et le produit de la réaction subit une cyclisation catalysée par la solubilisation dans le méthanol. Deux produits de cyclisations différents sont obtenus, les composés **72** et **71** (Schéma 15).

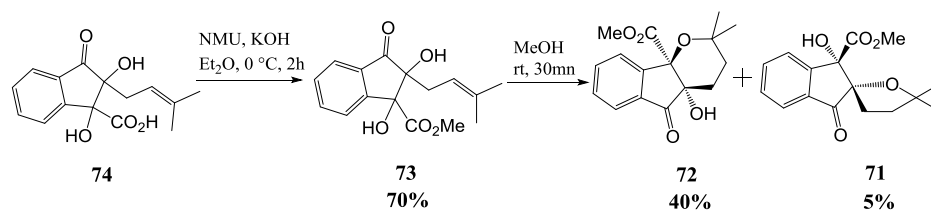


Schéma 15 : Hémisynthèse des composés **72** et **71**.

Pour obtenir les composés **72** et **71**, 300 mg de lapachol est converti en 270 mg de l'intermédiaire de Hooker **74**. Une solution de 30 mL de KOH 50% dans 10 mL d'éther éthylique est homogénéisée dans un ballon rond de 100 mL maintenu à 0 °C. Puis 130 mg (1,2 mmol) de N-nitroso-N-méthyluré est ajouté. La phase organique jaune obtenue est séparée, séchée avec des pastilles de KOH et est ajoutée à 250 mg (0,9 mmol) du composé **74** dissout dans 25 mL d'éther. Le mélange réactionnel est homogénéisé pendant 2 h et la purification chromatographique du produit donne 183 mg du méthylester **73**. Enfin les dérivés éthers cyclisés **72** et **71** sont obtenus après solubilisation de 150 mg du composé **73** dans du méthanol. Le spectre RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz, Annexe 66) du composé **74** intègre au total 13 protons dont quatre aromatiques à δ 7,71–7,63 (m, 3 H) et δ 7,50–7,46 (m, 1 H), un proton oléfinique à δ 5,08 (m, 1 H), deux protons méthyléniques diastéréotopiques à δ 2,62 (dd, $J = 14,4, 6,8$ Hz, 1 H) et δ 2,16 (dd, $J = 14,4, 6,8$ Hz, 1 H) et deux méthyles à δ 1,53 (s, 3 H) et δ 1,37 (s, 3 H). Son spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , Annexe 67) intègre pour 15 carbones dont un carbonyle à δ 207,3, un autre carbonyle des acides à δ 184,5, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 154,2 et 137,5, quatre méthines aromatiques à δ 137,7, 131,5, 126,0 et 125,2, un carbone oléfinique quaternaire à δ 137,4, un

méthine oléfinique à δ 120,5, deux carbones quaternaires déblindés à δ 90,2 et 87,5, la carbone d'un méthylène à δ 36,5 et deux méthyles à δ 28,0 et 19,8. Le spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz, Annexe 66) du composé **73** (P.F 148-150 °C) comparativement à celui du composé **74** présente en plus le signal singulet d'un méthyle des esters à δ 3,55 tandis que sur son spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , Annexe 67) le carbone acide transformé en ester apparaît à δ 172,9 et le nouveau pic du méthyle des ester à δ 53,8. Le composé **72** est obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le CH_2Cl_2 et possède un point de fusion compris entre 90-92 °C. Son spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Annexe 55) intègre dix-sept protons dont quatre aromatiques à δ 7,81 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H), 7,63 (dt, $J = 7,6, 1,2$ Hz, 1 H), 7,57 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H) et 7,52 (dt, $J = 7,6, 0,8$ Hz, 1 H), le méthyle des esters à δ 3,64 (s, 3 H), les protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 2,44 (m, 1 H) et 1,93 (m, 1 H), les protons d'un autre méthylène à δ 1,93 (m, 2 H), et deux méthyles terminaux à δ 1,43 (s, 3 H) et 1,30 (s, 3 H). Son spectre RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 , Annexe 57) intègre seize carbones dont un carbonyle à δ 201,8, le carbonyle d'un ester à δ 173,5, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 148,2 et 135,6, quatres méthines aromatiques à δ 135,3, 129,9, 124,2 et 123,5, trois carbones quaternaires déblindés à δ 95,8, 85,0 et 82,4, l'oxyméthylène des esters à δ 53,9, deux méthylènes à δ 38,3 et 33,0, et deux méthyles à δ 28,4 et 28,1. L'exploitation des spectres COSY (Annexe 56), HSQC (Annexe 58) et HMBC (Annexe 59) dont les résultats sont consignés dans le tableau ci-après ont permis de faire l'attribution complète des valeurs de déplacement chimiques des noyaux de protons et carbones du composé **72**.

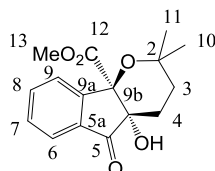


Tableau 18 : Valeurs ^1H , ^{13}C , correlations HSQC et HMBC du composé **72**

Position	^{13}C	^1H (HSQC)	HMBC
2	85	-	-
3	38,2	1,93	-
4	33	1,93; 2,44	4, 3, 4a
4a	82,4	-	-
5	201,8	-	-
5a	135,5	-	-
6	123,55	7,82	6
7	135,3	7,69	6, 7
8	129,8	7,52	8, 9
9	124,2	7,56	8, 9, 7, 9a
9a	148,1	-	-
9b	95,5	-	-
10	28,3	1,43	10, 11, 3, 2
11	28,1	1,3	11, 10, 3, 2

12	173,5	-	-
13	53,8	3,64	13, 12

Enfin, Le composé **71** est également obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le CH₂Cl₂ et possède un point de fusion compris entre 160-162 °C. Son spectre RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃, Annexe 54) intègre dix-sept protons dont quatre aromatiques à δ 7,82 (td, J = 6,8, 1,2 Hz, 1 H), 7,74 (td, J = 6,4, 0,8 Hz, 1 H), 7,67 (dt, J = 6,0, 4,0 Hz, 1 H) et 7,53 (dt, J = 6,0, 0,8 Hz, 1 H), les protons d'un méthyle des esters à δ 3,66 (s, 3 H), les protons de deux méthylènes à 1,91 (m, 2 H) et 1,75 (m, 2 H) et deux méthyles terminaux à δ 1,46 (s, 3 H) et 1,0 (s, 3 H).

II.2.3.1.3 Réarrangement benzilique du 3-bromo-β-lapachone

Le 3-bromo-β-lapachone **53** est une orthoquinone précédemment obtenu à partir du lapachol **4**. L'application des conditions de réarrangement benzylique à 75 mg du 3-bromo-β-lapachone **53** permet d'obtenir 45 mg du composé **75** (Schéma 16) sous forme de cristaux jaunes (P.F 118-120 °C).

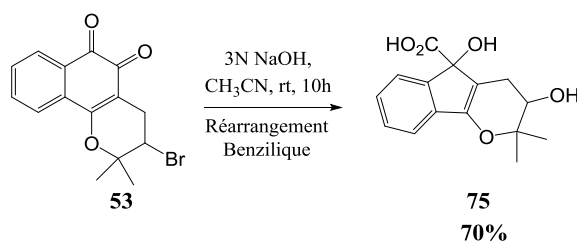


Schéma 16 : Hémisynthèse du composé **75**

Ce composé se révèle à l'UV et à l'iode et il est soluble dans le CH₂Cl₂. Son spectre de masse (ACPI, Annexe 69) donne l'ion pseudo moléculaire [M- H₂O]⁺ à m/z 258,06. L'analyse de cet ion pseudo moléculaire à haute résolution permet d'attribuer au composé **75** la formule brute C₁₅H₁₆O₅ avec 8 degrés d'insaturations. Son spectre RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz, Annexe 70) intègre au total 13 protons à travers des signaux dont deux multiplets de deux protons aromatiques à δ 7,95 et δ 7,64, le doublet de doublets d'un oxyméthine à δ 3,56, les deux doublets de doublets des protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 2,73 et δ 2,71, et deux singulet de méthyles à δ 1,18 et δ 1,16. Son spectre RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz, Annexe 71) intègre quinze carbones dont le carbonyle des acides à δ 186,9, un oléfine déblindé à δ 156,2, quatre méthines aromatiques à δ 135,4, 134,0, 127,2 et 126,8, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 135,3 et 131,7, un oléfine quaternaire à δ 123,5, deux carbones quaternaires déblindés à δ 78,3 et 74,0, un méthine déblindé à δ 78,3, un méthylène à δ 26,8, et deux méthyles à δ 25,6 et 25,4.

II.2.3.1.4 Réarrangement benzilique du β -lapachone

Le β -lapachone **9**, précédemment obtenu par action de l'acide sulfurique (H_2SO_4) sur le lapachol est également une orthoquinone. 150 mg de β -lapachone **9** est soumis aux conditions de réarrangement benzylique pour donner 120 mg du composé **78**. Le traitement de 100 mg du composé **78** avec du diazométhane généré *in-situ* à partir du nitrosométhyluré (NMU) donne le méthyl ester **77** et un autre dérivé non attendu **76** (Schéma 17). Nous conjecturons qu'une décarboxylation suivie d'une oxydation benzylique se produit dans les conditions de réaction ou pendant le traitement pour former le dione **76**.

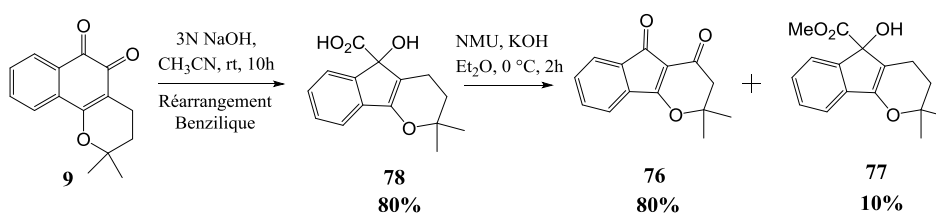


Schéma 17 : Hémisynthèse des composés **76** et **77**

Le dione **76** a été obtenu sous forme d'un solide rouge (P.F 178-180 °C) à partir d'une purification au gel de silice par élution au gradient (20-30%, hexane/acétate d'éthyle). La formule moléculaire a été déterminée comme étant $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_3$ sur la base d'une analyse LCMS (APCI⁺, Annexe 76) m/z 229,08606 calculé pour $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Le spectre RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , Annexe 77) du composé **76** présente des signaux indiquant quatre protons aromatiques à δ 8,15 (m, 1H), 7,65 (m, 2H) et 7,60 (m, 1H), un groupe méthylène à δ 2,95 (s, 2H) et deux groupes méthyles à δ 1,61 (s, 6H). Le spectre RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3 , Annexe 78) présente 14 signaux de carbones qui ont été attribués comme quatre méthines aromatiques à δ 134,6, 132,0, 129,5 et 124,7, un méthylène à δ 39,5, deux méthyle à δ 28,6 et sept signaux de carbone quaternaire dont six atomes de carbone sp^2 à δ 181,5 (C = O), 175,9 (C = O), 168,9 (= CO), 131,1 (C = C), 128,1 (C = C) et 115,1 (C = C) et un atome de carbone sp^3 à δ 93,8 (CO). L'attribution complète des déplacements chimiques a été faite sur la base des spectres COSY ^1H - ^1H , HSQC et HMBC (Annexe 79 Annexe 80 et Annexe 81). Dans le COSY ^1H - ^1H , des corrélations ont été observées entre H-6 (8,15, 1H, m) et H-7 (7,60, 1H, m), entre H-7 (7,60, 1H, m) et H-8 (7,65, 1H, m) et entre H-8 (7,65, 1H, m) et H-9 (7,65, 1H, m) indiquant le système de spin AA'BB' de quatre protons aromatiques. Le spectre HMBC a montré des corrélations de H-3 (2,95, 2H, s) avec C-4 (175,9), C-9b (168,9), C-4a (115,1), C-2 (93,8) et C-10, C-11 (28,6) prenant en charge la connectivité H-3 en ^2J ou ^3J et ^4J .

Le composé **77** a été obtenu sous la forme d'un solide blanc issu d'une purification sur gel de silice par élution au gradient (2,5-5%, hexane/acétate d'éthyle). La formule moléculaire a été déterminée comme étant $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ sur la base d'une analyse HRMS (ESI-TOF, Annexe 82) m/z

275,1295 calculé pour $C_{16}H_{19}O_4$ $[M+H]^+$. Le spectre RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, Annexe 83) du composé **77** présente des signaux indicatifs de quatre protons aromatiques à δ 8,05 (m, 2H) et 7,70 (m, 2H), attribués à un système de spin AA'BB'. Un singulet à 4,14 (s, 3H) attribué à un groupe méthoxy. Deux jeux de triplets à δ 2,69 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H) et à 1,63 (t, $J = 8,4$ Hz, 2H) correspondant à deux groupes méthylène adjacents. Un singulet à δ 1,29 (s, 6H) pour deux groupes méthyle. Le composé **77** est l'ester attendu de l'acide carboxylique **78** précédemment rapporté. Le spectre RMN 1H du composé **77** est comparable avec celui du composé **78** (Annexe 73) avec juste l'apparition du nouveau pic du méthyle d'un ester dans le composé **77**.

II.2.3.1.5 Réaction d'éthérisation du lapachol

La *O*-méthylation du lapachol par l'iodure de méthyle conduit à l'obtention d'un produit secondaire indanique **81** sous forme de mélange diastéréoisomérique racémique avec un pouvoir rotatoire nul (Schéma 18).

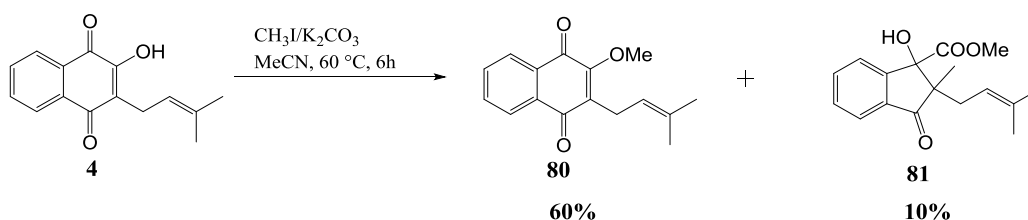


Schéma 18 : Hémisynthèse des composés **80** et **81**

Le mélange de diastéréoisomères **81** a été purifié par une chromatographie HPLC préparative pour donner **81a** et **81b**.

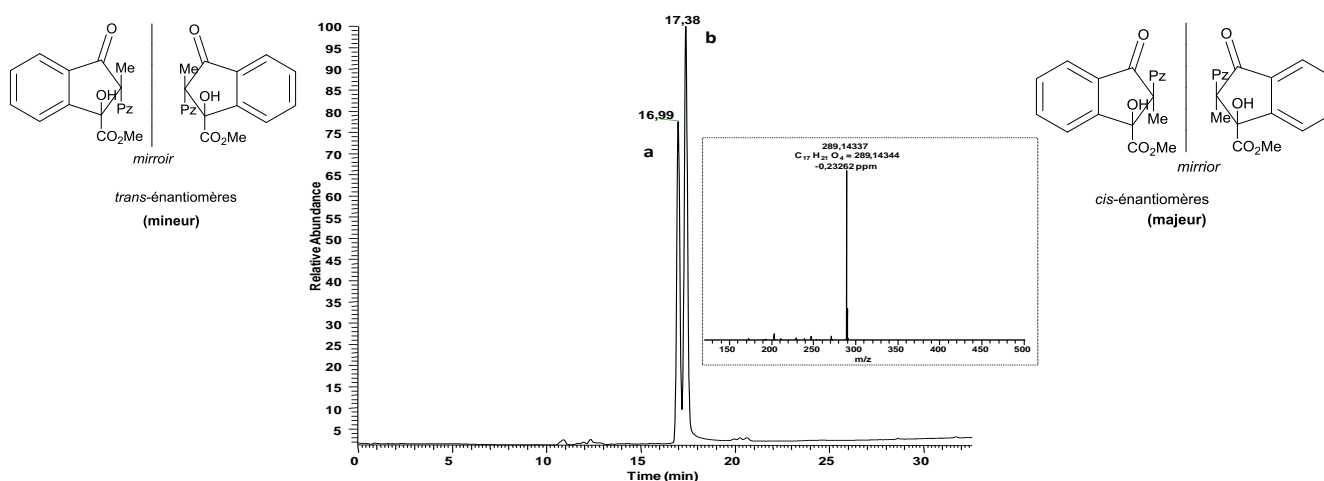


Figure 52 : LC-MS des diastéréoisomères **81a** et **81b**

Ce chromatogramme présente les deux groupes de diastéréoisomères dans un rapport 2 : 3 avec l'isomère *cis* présumée majoritaire sur la base des facteurs stériques. Chacun des diastéréoisomères **81a** et **81b** a ensuite été séparé par une nouvelle chromatographie HPLC préparative utilisant une colonne chirale pour donner les composés **81a-1**, **81a-2** et **81b-1**, **81b-2**

respectivement. L'élucidation de la configuration absolue de ces composés a nécessité l'enregistrement des spectres de dichroïsme circulaire (CD) des composés **81a-1** et **81b-1** et le calcul quantique *in-Silicio* des quatre possibles stéréoisomères (a)-(d) du composé **81**.

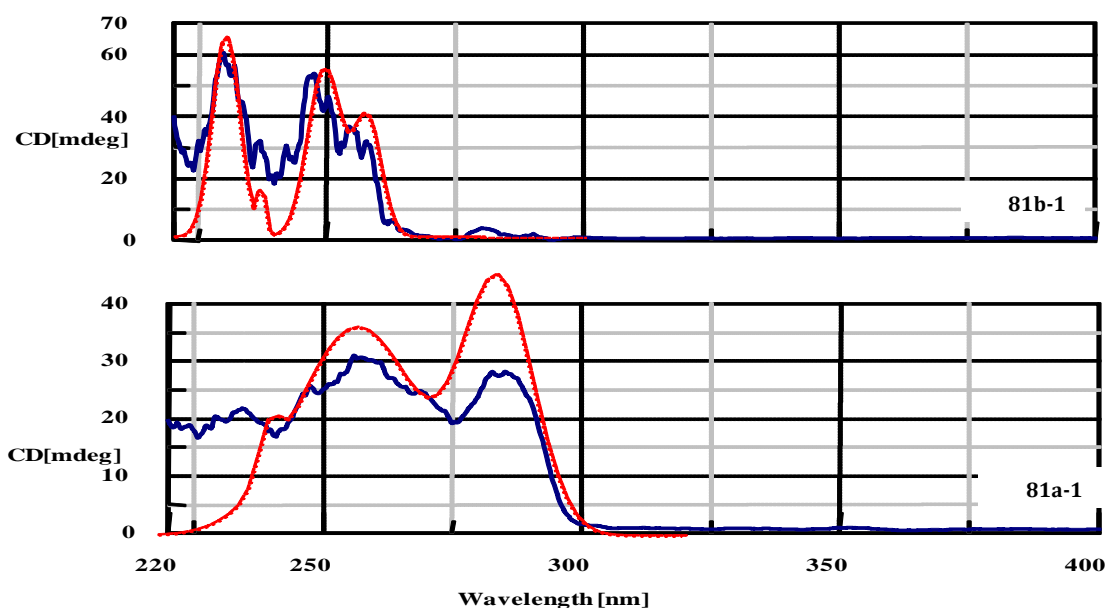


Figure 53 : Courbe CD expérimentale (courbe, bleue) et calculée (points, rouge) de 81a-1 et 81b-1

Le calcul quantique attribue aux quatre diastéréoisomères les conformations suivantes parmi lesquelles les conformères de plus basse énergie sont (a) et (c).

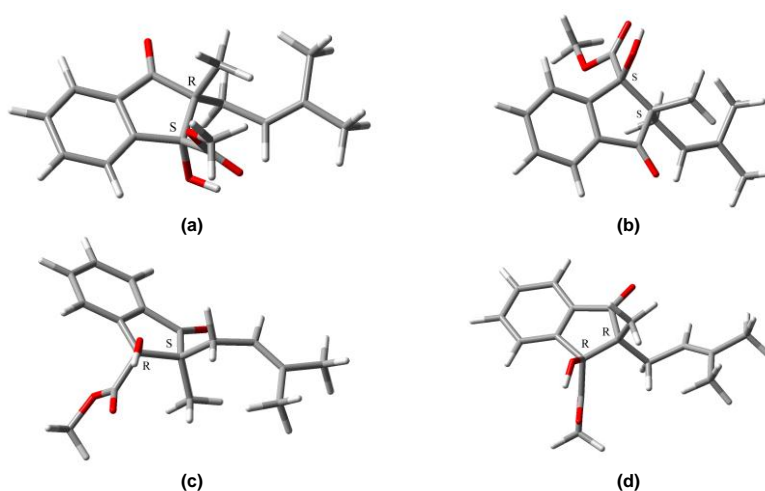
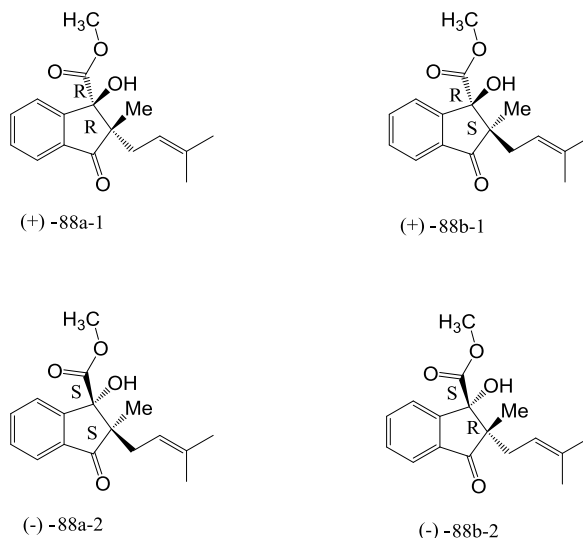


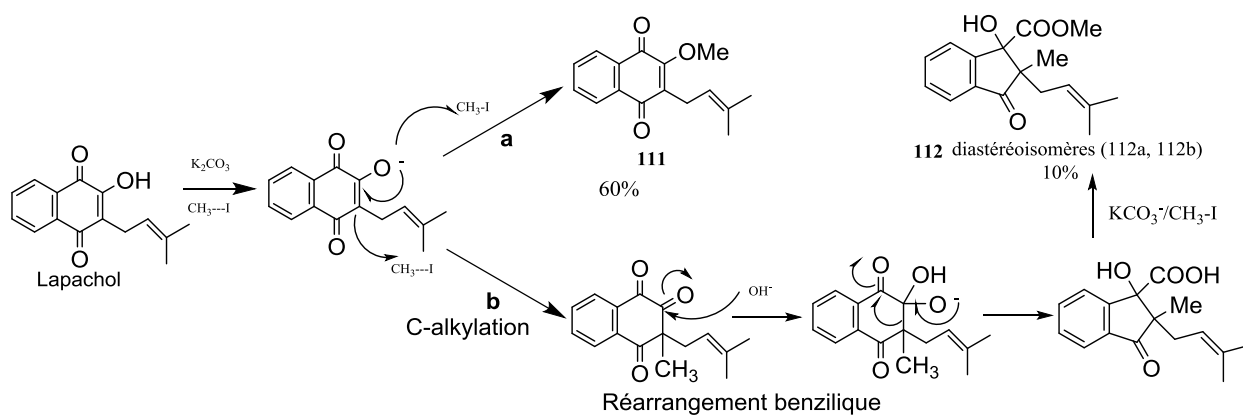
Figure 54 : Conformations les plus stables : les diastéréoisomères (a) et (c)

Parmi ces conformères, ceux les plus stables sont donc (a) et (c) (les isomères cis), avec (c) l'isomère le plus stable de tous. La comparaison du spectre CD de **81b-1** et du spectre calculé de

(c) montre qu'ils s'agencent parfaitement et confirme les deux centres chiraux comme étant 1-(*R*)-2-(*S*) tandis que **81a-1** est le trans-isomère ou l'isomère 1-(*R*)-2-(*R*).



Le mécanisme de formation des diastéréoisomères **81a** et **81b** passe par une C-méthylation (voie b) suivi d'un réarrangement benzylique de l'orthoquinone intermédiaire dans les conditions de la réaction.



Pour obtenir les coposés **80** et **81**, 200 mg (0,84 mmol) de lapachol est chauffé à reflux dans 4 mL d'acétone sec jusqu'à dissolution. La solution résultante est refroidie à température ambiante et 120.4 mg (0,88 mmol) de carbonate de potassium anhydre est ajoutée suivi par 181 mg (1,28mmol) d'iodure de méthyle. Le mélange est chauffé sous reflux dans un bain d'huile à 55-60 °C pendant 6 h. La phase organique est purifiée par une chromatographie sur colonne pour donner 80 mg du composé **80** et 25 mg du composé **81**. Le spectre RMN ^1H du composé **80** (Annexe 89) est comparable à celui du lapachol **4** (Figure 35) avec en plus le signal singulet d'un méthoxy à δ 4,13. Le spectre RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , Annexe 91) du composé **81** intègre au

total dix-neuf protons dont quatre aromatiques à δ 7,77 (d, $J=7,5$ Hz, 1H), 7,65 (td, $J=7,5$, 1 Hz, 1H), 7,58 (d, $J=7,5$ Hz, 1H) et 7,51 (td, $J=7,5$, 1 Hz, 1H), un méthine oléfinique à δ 4,99 (td, $J=8,5$, 8 Hz, 1H), l'oxyméthyle d'un ester à δ 3,61 (s, 3H), les protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 2,47 (dd, $J= 8,5$, 14,5 Hz, 1H) et 2,05 (dd, $J= 8,0$, 14,5 Hz, 1H) et trois méthyles terminaux à δ 1,58 (s, 3H), 1,45 (s, 3H), et 1,11 (s, 3H). Son spectre **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , Annexe 92)** intègre dix-sept carbones dont un carbonyle à δ 204,6, un carbonyle des esters à δ 174,6, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 150,3 et 123,8, quatre méthines aromatiques à δ 136,5, 134,8, 134,4 et 129,6, un oléfine quaternaire à δ 123,2, un méthine oléfinique à δ 118,9, un carbone quaternaire déblindé à δ 83,5, un carbone oxyméthylène des esters à δ 59,9, un carbone quaternaire à δ 53,4, un méthylène à δ 35,2, et trois méthyles terminaux à δ 25,9, 17,7 et 14,9.

II.2.3.2 Dérivés phenazines

La deuxième méthode exploitée pour neutraliser la cytotoxicité reconnue aux groupements quinoniques concerne toujours la sous classe des orthoquinones. En effet, les orthoquinones peuvent être facilement convertis en phénazines par réaction avec un composé orthodiaminé.

II.2.3.2.1 Réaction de condensation du β -lapachone en base de Schiff

La β -lapachone est convertie en 1,2-dihydro-3,3-diméthyl-3H-benzo[a]pyrano[2,3-c]phénazine **79** dans une réaction avec l'orthophénylènediamine (Schéma 19).

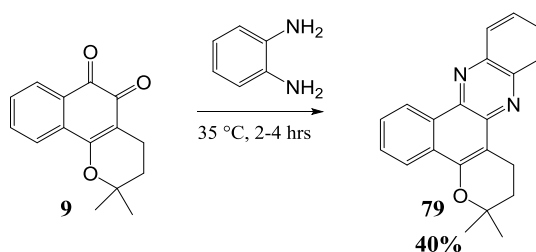


Schéma 19 : Hémisynthèse du composé 79

Pour obtenir la phenazine **79**, un mélange de 198 mg (0,82 mmol) du composé **9**, 6,34 mmol d'acétate de sodium cristallin, 1,78 mmol d'hydrochloride de phenylenediamine et 3,6 mL d'acide acétique glacial est chauffé 4 h dans un bain marie à 35 °C et suivi par CCM. Après la réaction, le milieu est dilué avec de l'eau et est conservé toute une nuit. L'huile obtenue est extraite avec du diéthyléther et la purification chromatographique de cette huile produit 102 mg de la phenazine amorphe **79**. La structure du composé **79** est confirmée par son spectre RMN ^{13}C (Annexe 87) où l'on note la disparition des deux carbonyles du β -lapachone (Annexe 4) qui ont été condensés.

II.2.3.2.2 Réaction de conversion de l'époxyquinone **83** en base de Schiff.

La séquence réactionnelle suivante aboutit également à une phénazine **82** mais structuralement différenciée de la précédente par la non-cyclisation de l'isopentenyl latéral en pyranne. L'époxyquinone **83** obtenu de l'oxydation de l'éther méthylique du lapachol à l'eau oxygéné est à nouveau oxygéné à l'acide perchlorique (HClO₄) pour donner un intermédiaire réactionnel de type orthoquinone qui peut être piégé et converti en base de Schiff.

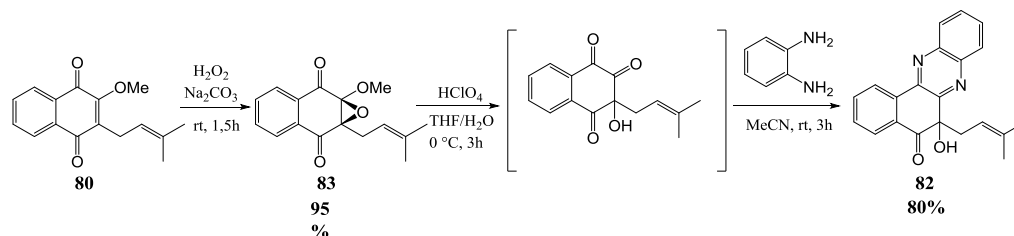


Schéma 20 : Hémisynthèse du composé **82**

Pour obtenir la phénazine **82**, 120 mg (0,46 mmol) de l'éther de lapachol et de méthyl **80** obtenu de la réaction de 142 mg de lapachol avec le N-nitrosométhylurée (NMU) en milieu basique est oxydé par réaction avec le peroxyde d'hydrogène pour donner 120 mg du composé **83**. 100 mg (0,36 mmol) de l'éther d'époxyquinone **83** est ensuite oxydé sous l'action de l'acide perchlorique (HClO₄) en un orthoquinone intermédiaire que l'on fixe par condensation avec l'orthophénylènediamine pour obtenir 97 mg de la phénazine **82**.

Le spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du composé **83** (Annexe 97) intègre au total seize protons dont quatre aromatiques à δ 8,06–7,99 (m, 2 H) et 7,76–7,72 (m, 2 H), un méthine oléfinique à δ 5,24–5,20 (m, 1 H), les protons d'un méthoxy à δ 3,85 (s, 3 H), les protons diastéréotopiques d'un méthylène à δ 3,0 (dd, J = 14,5, 7,5 Hz, 1 H) et 2,64 (dd, J = 14,5, 6,5 Hz, 1 H), et deux méthyles à δ 1,75 (s, 3 H) et 1,71 (s, 3 H). Son spectre **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, Annexe 98)** intègre seize carbones dont deux carbonyles à δ 190,1 et 189,7, deux carbones aromatiques quaternaires à δ 136,0 et 134,2, quatre méthines aromatiques à δ 134,5, 132,4, 131,6 et 127,5, un oléfine quaternaire à δ 127,2, un méthine oléfinique à δ 116,8, deux carbones quaternaires déblindés à δ 85,9 et 70,0, un oxyméthyle à δ 56,9, un méthylène à δ 25,9, et deux méthyles à δ 24,5 et 18,1.

La structure du composé **82** quand à elle est confirmée par son spectre RMN ¹³C (Annexe 95) où l'on note la disparition des deux carbonyles du composé **83** (Annexe 98) qui ont été condensés.

II.3 ACTIVITES BIOLOGIQUES

Ces naphthoquinones et quelques dérivés quinoniques précédemment isolés et synthétisés et disponibles dans la chimiothèque du laboratoire (Tableau 19), à savoir 7-oxyméthyle-2-acetyl-furonaphthoquinone **84**, 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-(prop-1-en-2-yl)naphtha[2,3-b]furan-4,9-dione **85**, Knipholone **86**, Knipholone anthrone **87**, 3-hydroxydehydroiso- α -lapachone **88**, acétate de 3-(3-méthyl-4-oxobut-2-en-1-yl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl **89**, tithoniamarin **91** Newbouldiaquinone **92**, 4-(1,4-dihydro-2-hydroxy-1,4-dioxonaphthalen-3-yl)-2-méthylbut-2-enal **94**, 2-hydroxy-3-(4,4-dioxyméthyle-3-méthylbutyl)naphthalene-1,4-dione **93**, Oxyméthyle lomatiol **95**, 3-bromo-5-hydroxy-2,2-diméthyl-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromene-6 carbaldehyde **90** et la Junglone **96** ont été soumis à un test de cytotoxicité et les composés plus actifs ont été utilisés pour le test antitumoral.

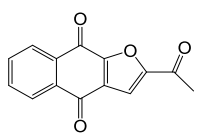
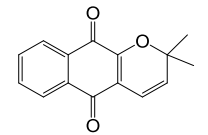
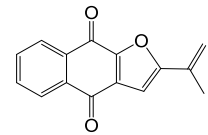
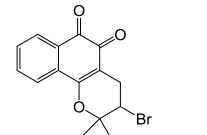
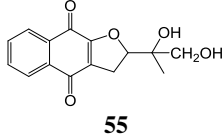
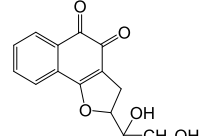
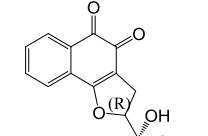
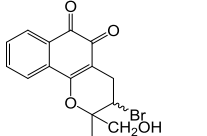
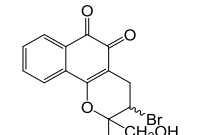
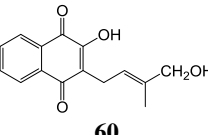
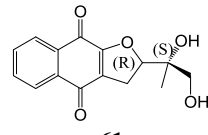
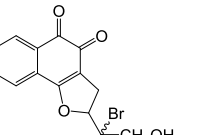
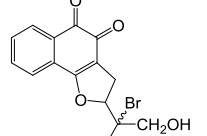
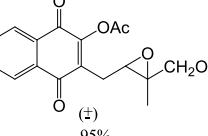
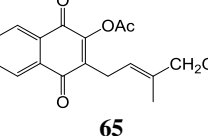
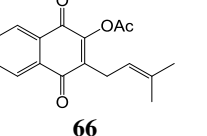
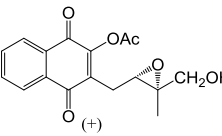
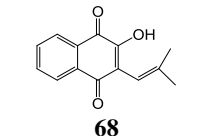
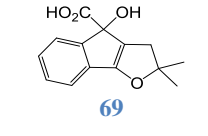
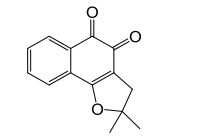
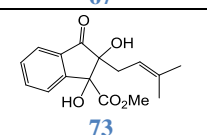
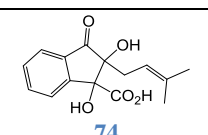
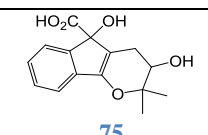
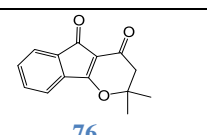
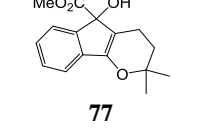
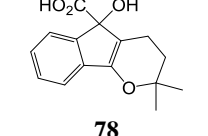
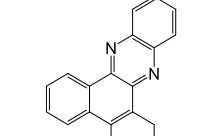
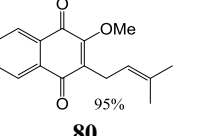
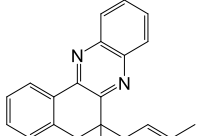
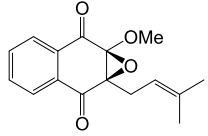
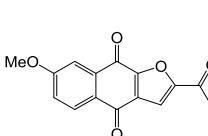
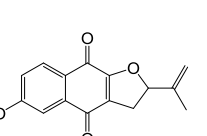
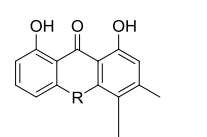
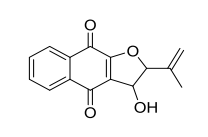
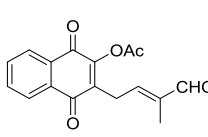
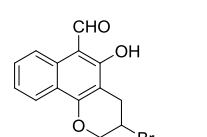
II.3.1 Activité cytotoxique

La cytotoxicité de ces composés a été évaluée sur un panel (Dasari et *al.*, 2015 ; Zhao et *al.*, 2015) de sept lignées de cellules humaines contenant des modèles *in-vitro* de cancers typiquement associés à un pronostic sombre, tels que BE(2)-C, Kelly, SKNSH, CHLA-90 (tous les neuroblastomes ; Esposito et *al.*, 2017 ; Zhao et *al.*, 2016), A549 (Cancer du poumon non à petites cellules ; Rossi et *al.*, 2017) SKMEL-28 (Melanome ; Amann et *al.*, 2017), U373 (Glioblastome multiforme, Osuka et Meir, 2017). L'usage de cette grande variété de cellules cancéreuses offre une plus grande variété de possibilités d'activité antiprolifératives des dérivés testés ainsi que l'éventualité des cas de spécificité d'activité.

Les composés ont été testés à une concentration unique de 10 μ M et le pourcentage de croissance résiduelle des cellules cancéreuses a été enregistré après un traitement de 72 heures (Tableau 20) par comparaison aux cellules du groupe témoin négatif.

Dans la plupart des cas, les composés actifs n'établissent pas de distinction entre les lignées cellulaires utilisées, à l'exception de quelque-unes, comme le dérivé **59** structuralement apparenté à la β -lapachone, essentiellement inactive dans trois lignées cellulaires de neuroblastome, tout en présentant une activité intéressante (avec un pourcentage d'inhibition supérieur à 74%) contre les autres cellules du groupe. Étant donné le large spectre d'activités biologiques et, éventuellement, de modes d'action, de la β -lapachone, une telle différence de sensibilité cellulaire n'est pas surprenante. D'autre part, le composé **86** ne présente pas d'activité contrairement à son proche homologue **87** qui a inhibé 95% des cellules SKNSH.

Tableau 19 : Composés soumis aux tests d'activité biologique

 10	 48	 51	 53
 55	 56	 57	 58
 59	 60	 61	 62
 63	 64 (±) 95%	 65	 66
 67 (+) 80%, 90% ee	 68	 69	 70
 73	 74	 75	 76
 77	 78	 79	 80 95%
 82	 83	 84	 85
 86 R = C(O)	 88	 89	 90 R = CH ₂

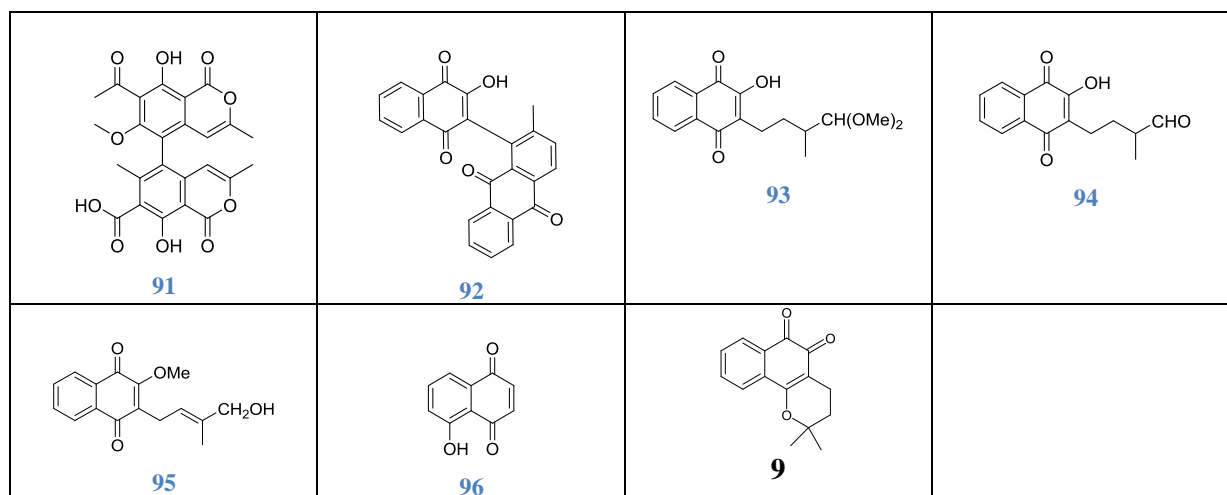


Tableau 20 : Pourcentage de croissance résiduelle des lignées de cellules cancéreuses après 72 heures de traitement avec 10 μ M de chaque composé, déterminé par le test colorimétrique au MTT

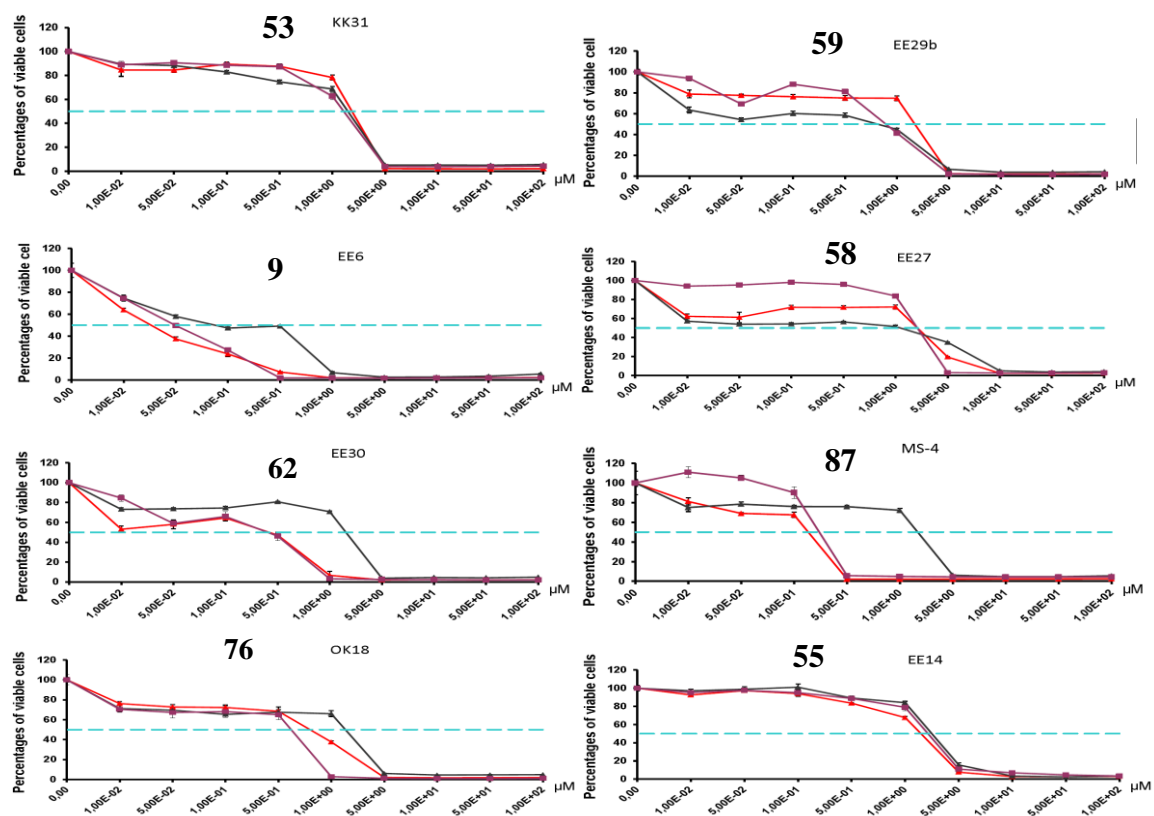
Composé	croissance résiduelle (%)							moyenne
	BE(2)-C	Kelly	SKNSH	CHLA-90	A549	SKMEL-28	U373	
4	77	89	81	95	83	75	73	82
9	1	6	1	2	2	3	4	3
10	2	1	28	5	2	2	4	6
48	68	79	88	96	88	63	86	81
51	1	44	58	34	1	2	31	25
53	2	2	1	1	1	1	4	2
55	1	1	1	3	2	3	6	2
56	83	66	89	96	NT	NT	NT	83
57	38	76	74	85	78	87	74	73
58	4	4	2	2	1	2	6	3
59	2	97	74	87	1	2	4	38
60	91	76	99	98	69	94	63	84
61	1	2	2	3	NT	NT	NT	2
62	28	95	79	86	13	7	65	53
63	1	2	2	32	1	3	5	7
64	78	89	87	98	51	64	78	78
65	9	84	91	97	58	80	58	68
66	24	84	81	97	66	76	48	68
67	2	35	54	29	3	3	41	24
68	81	68	82	88	72	83	61	76
69	95	82	93	94	102	94	82	92
70	2	1	1	2	2	1	5	2
73	90	59	92	86	74	75	63	77
74	101	48	80	86	101	110	99	89
75	95	82	93	94	85	78	71	85
76	3	3	2	3	2	3	6	3
77	13	88	88	89	NT*	NT	NT	69
78	93	81	96	98	67	88	70	85
79	94	75	89	88	77	68	78	81
80	58	91	85	94	93	77	84	83

82	92	64	90	89	67	84	73	80
83	4	88	87	101	78	98	78	76
84	3	4	4	5	2	2	5	4
87	2	5	95	7	3	4	14	19
86	93	65	101	96	64	68	74	80
85	37	69	76	66	29	18	39	47
88	6	69	57	65	2	3	37	34
89	87	61	89	93	56	67	56	73
90	72	90	66	85	NT	NT	NT	78
91	82	65	93	85	78	76	94	82
92	76	79	88	95	40	48	77	72
93	85	73	92	94	67	66	65	78
94	36	99	80	91	17	77	72	67
95	16	77	62	74	59	20	64	53

* = Non Testé

II.3.2 Activité antitumorale

Quatorze des composés présentant le plus de potentiel ont été ensuite sélectionnés et testés sur les cellules cancéreuses A549, SKMEL-28 et U373 avec la détermination de leur IC₅₀ (Figure 55, Tableau 21) Dans le tableau 23, on retrouve les composés **9** et **10** qui présentent des IC₅₀ inférieur à 1 µM sur toutes les cellules testées. Par ailleurs d'autres composés (**63**, **76**, **84** et **87**) présentent des IC₅₀ inférieur à 1 µM sur au moins une cellule.



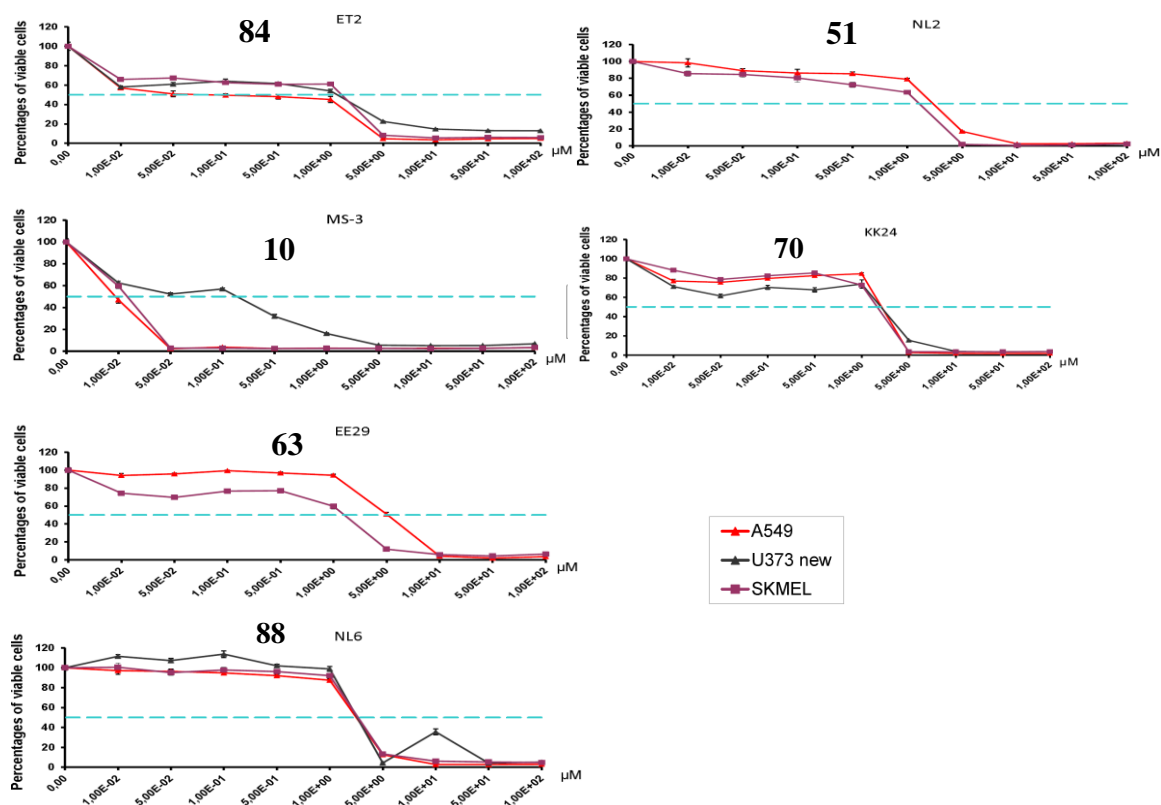


Figure 55 : courbes d'inhibition de croissance *in-vitro* déterminée par le test colorimétrique au MTT en 72h (en μM) de quinze composés les plus actifs

Les résultats de ces tests ont été résumés dans le Tableau 21 ci-après.

Tableau 21 : Inhibition moyenne de croissance *in-vitro* (IC_{50}) déterminée par le test colorimétrique au MTT en 72h (en μM) de quinze composés les plus actifs

composé	Squelette structural	IC_{50} (μM)				
		A549	SKMEL28	U373	$\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$	
9	β -naphthoquinone	0,03	0,05	0,24	0,1	0,07
10	α -naphthoquinono[2,3-b]furan	0,01	0,02	0,22	0,09	0,07
55	α -naphthoquinono[2,3-b]furan	2	3	3	2,6	0,2
58	β -naphthoquinone	3	3	2	2	0,4
59	β -naphthoquinone	2	1	1	1,4	0,5
62	β -naphthoquinone	5	2	NT	3,5	1,3
63	β -naphthoquinone	0,3	0,4	2,2	1,0	0,6
70	β -naphthoquinone	3	2	3	2,5	0,1
53	β -naphthoquinone	3	2	2	2,2	0,2
76	indeno[1,2-b]pyran	0,8	0,6	2,0	1,1	0,5
84	α -naphthoquinono[2,3-b]furan	0,2	0,3	2	0,9	0,7
87	anthrone	0,1	2	2	1,1	0,5
88	α -naphthoquinono[2,3-b]furan	3	3	3	3,0	0,0
51	α -naphthoquinono[2,3-b]furan	3	2	NT	2,4	0,4

II.3.3 Analyses des relations structure-activités (SAR)

La plupart de ces composés possèdent une structure de base de β -naphthoquinone ou α -naphthoquinone[2,3-b]furane. En effet, la littérature révèle un grand nombre de travaux décrivant les propriétés anticancéreuses des composés de cette classe (Ríos-Luci *et al.*, 2012) (Yamashita *et al.*, 2007). Nos résultats montrent que des IC₅₀ allant des valeurs submicromolaires au micromolaires sont associées aux composés dans lesquelles un cycle pyranne saturé (**9**, **53**, **58**, **59**) ou un cycle furanne (**70**, **62**, **63**) est accolé aux squelettes β -naphthoquinone.

Dans le cas des structures au squelette β -naphthoquinone [2,3-b] pyranne, la bromination du cycle pyranique ou l'oxydation d'un méthyle aurait conduit à une diminution d'activité anticancéreuse.

Dans le cas des dérivés possédant le squelette α -naphthoquinone [2,3-b] furanne, le cycle furannique qui peut être aromatique (**10**, **84**, **51**) ou saturé (**55**, **85**, **88**) conserve l'activité anticancéreuse. Parmi ces composés, le composé **10** possède la meilleure activité anticancéreuse indiquant que le carbonyle du groupement acétoxy sur le cycle furanne pourrait jouer un rôle important dans l'activité anticancéreuse observée.

Le composé **87**, Knipholone anthrone présente une IC₅₀ de 1,1 μ M, valeur qui est en accord avec la littérature (Habtemariam, 2010). Il convient de noter qu'il a été récemment révélé que ce composé induit la mort nécrotique des cellules chez les cellules cancéreuses, l'identifiant comme agent anticancéreux prometteur pour lutter contre les cancers intrinsèquement résistants à l'apoptose (Kornienko *et al.*, 2013 ; Aksenov *et al.*, 2015).

Il se révèle ici une bonne activité sur le squelette indène [1,2-b] pyranne, représenté par le produit du réarrangement benzylique, le composé **76**, montrant des IC₅₀ allant des valeurs submicromolaire à des valeurs à un chiffre en fonction de la lignée cellulaire testée. L'analyse de la courbe de croissance expérimentale indique qu'à des concentrations légèrement excédant la valeur de l'IC₅₀, le composé **76** élimine toutes les cellules de la culture sans générer des populations résistantes (Viabilité cellulaire Proche de 0 %).

II.4 DOCKING MOLECULAIRE

II.4.1 Introduction

Le résultat des tests anticancéreux des quinze analogues structuraux les plus prometteurs a non seulement confirmé leur potentiel, mais aussi mis en relief la capacité de ces composés à des doses pas très éloignées de la valeur de leur IC_{50} , à éliminer toutes les cellules en culture sans générer de population résistante. D'un point de vue mécanistique, ce constat est en faveur de l'activation des enzymes inductrices de l'apoptose (mort programmée des cellules). Dans le but d'identifier les cibles biologiques et donc les mécanismes d'actions intervenants dans l'activité à connotation apoptotique des quinze composés testés, nous avons effectué des dockings moléculaires des composés testés sur les enzymes 3EQM, CDK-2, CDK-6, topoisomérase I, BCL-2 et VEGFR-2. Ces enzymes ont été sélectionnées en fonction de leur rôle clés dans la régulation du cycle cellulaire et la progression du cancer (Figure 21). Les enzymes topoisomérase I par exemple sont responsables de la ressoudure des deux extrémités de l'ADN pendant la réplication. L'inhibition de cette enzyme induit un arrêt de la division cellulaire en phase G2. Les logiciels utilisés à cet effet sont Autodock4 et Discovery Studio.

II.4.2 Paramétrage du docking

La première étape de cette tâche consiste à vérifier si le calibrage des paramètres d'Autodock4 et le protocole suivi lors du docking sont adéquats pour l'étude. Il s'agit concrètement d'effectuer le docking des ligands naturels (Tableau 22) des enzymes sélectionnées et de comparer les poses obtenues aux poses expérimentales des complexes protéines-ligands déterminées par rayons-X et disponible dans la base de données du site www.pdb.org. Cette comparaison conformationnelle se fait au moyen du RMSD (Root Mean Square Deviation). Ce paramètre de sortie évalue les divergences de position et de conformation entre le conformère du docking et le conformère expérimental du complexe cristallisé.

Le docking effectué suivant les paramètres et le protocole décrit dans le chapitre méthodologie de ce travail montre que les modes de cohésion des six ligands naturels dans les six protéines correspondent bien aux modes de cohésion expérimentaux observés dans les complexes cristallisés avec de faibles valeurs de RMSD (Tableau 22, Figure 56). Ces faibles valeurs montrent que le docking des ligands naturels dans les différentes protéines correspondantes est similaire aux modes de cohésion expérimentaux observés dans les complexes cristallisés. En particulier, on observe qu'Autodock4 prédit avec une bonne précision la position des atomes qui forment des liaisons hydrogènes avec les résidus du site catalytique. Ce test nous permet donc de valider le

protocole et les paramètres du docking utilisés pour le docking des dérivés héli synthétiques du lapachol.

Tableau 22 : RMSD des ligands naturels dans leur conformation issue du docking

Protéine	Code Protéine	Nom du Ligand	Affinité de liaison (kcal/mol)	Code Ligand	RMSD
3EQM	3eqm	4-androstene-3-17-dione	-9.74	ASD	0.45
BCL-2	2o2f	4-(4-benzyl-4-oxyméthylepiperidin-1-yl)-N-[(4-[[1,1-diméthyl-2-(phénylthio)éthyl]amino]-3-nitrophényl)sulfonyl]benzamide	-10.72	LIO	0.39
CDK-2	1di8	4-[3-hydroxyanilino]-6,7-dioxyméthylequinazoline	-7.26	DTQ	0.18
CDK-6	1xo2	3,7,3',4'-tetrahydroxyflavoneFisetin, 2-(3,4-dihydroxyphényl)-3,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one	-9.54	FSE	0.28
Topoisomerase I	1t8i	4-éthyl-4-hydroxy-1,12-dihydro-4H-2-oxa-6,12A-diazadibenzo[b,h]fluorene-3,13-dionecamptothecin	-10.37	EHD	0.11
VEGFR2	2oh4	méthyl(5-{4-[[2-fluoro-5-(trifluorométhyl)phényl]amino]carbonyl)amino]phénoxy}-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate	-12.14	GIG	0.35

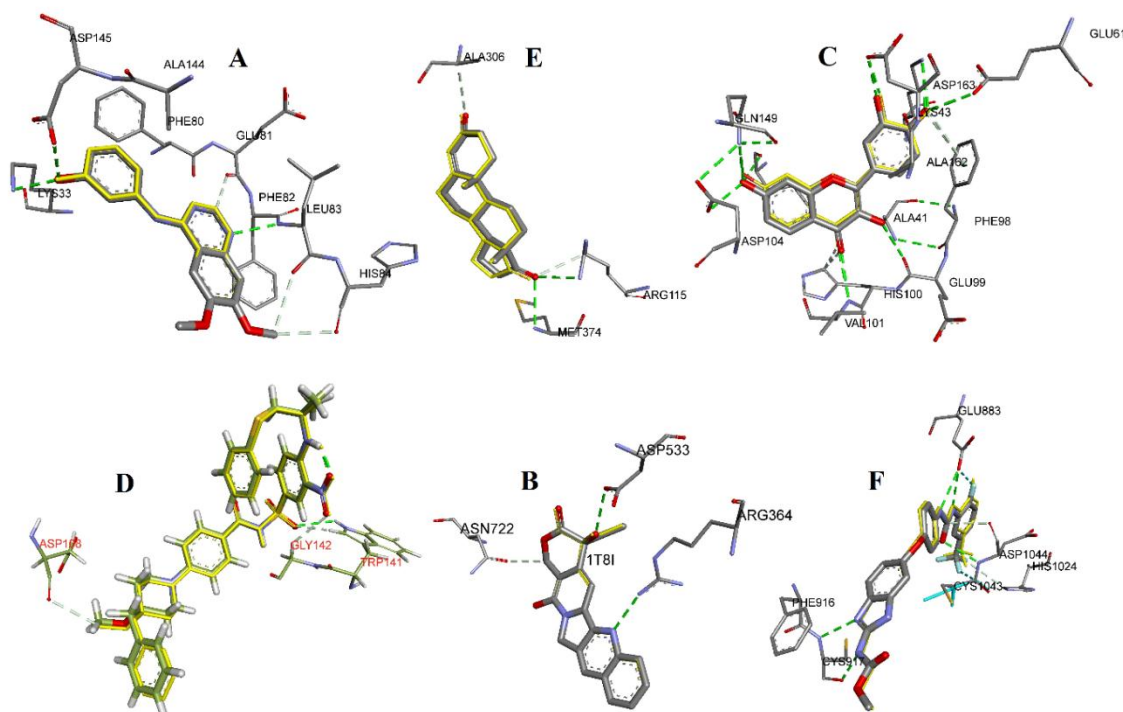


Figure 56 : Superposition des rayons-X (représentation en bâtons et balles) et des conformations du docking (bâtonnets jaunes) pour les différents ligands à l'intérieur des protéines. Les résidus catalytiques qui forment des liaisons hydrogène (lignes tracées) avec les ligands sont représentés. Liaisons hydrogène conventionnelles en vert et non conventionnelles en gris. A: 1di8-DTQ, B: 1t8i-EHD, C: 1xo2-FSE, D: 2o2f-LIO, E: 3eqm-ASD, F: VEGFR2-GIG

II.4.3 Docking des composés

Le docking moléculaire des composés d'hémisynthèse a ensuite été effectué en utilisant AutoDock4 sur les six protéines cibles. Pour évaluer et classer les forces d'ordre des interactions bimoléculaires, l'affinité de liaison de chaque complexe formé est calculée par le programme. L'affinité de liaison prédite (Tableau 23) peut être comparée à l'affinité de liaison prédite formée avec le ligand naturel de chaque protéine. Ensuite, les valeurs estimées de la constante d'inhibition (Ki) pour tous les composés ont été calculées par AutoDock4 et les résultats chiffrés sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 23 : Représentation codée en couleur des résultats de l'affinité de liaison (kcal / mol) obtenue par docking moléculaire de l'ensemble de données des composés avec les six cibles protéiques. La couleur utilisée est le gris pour la meilleure (faible) affinité de liaison avec une tolérance de 0,1 kcal / mol.

	<i>3EQM</i>	<i>BCL2</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK6</i>	<i>TOP 1</i>	<i>VEGFR2</i>
9	-7,36	-7,04	0	-8,18	-7,68	-8,31
10	-8,23	-7,49	-7,7	-7,69	-8,23	-8,17
70	-7,28	-6,97	-7,08	-7,62	-7,27	-7,77
76	-7,39	-7,17	-7,72	-6,92	-7,54	-7,86
53	-8,13	-6,88	-7,94	-8,61	-8,15	-8,98
55	-7,73	-6,12	-7,41	-7,52	-7,81	-8,18
58	-7,43	-5,78	-8,06	-8,69	-8,85	-7,94
59	-6,66	-6,88	-7,25	-8,06	-8,93	-8,38
62	-7,73	-6,77	-8,2	-8,7	-8,71	-8,78
63	-7,71	-6,66	-7,99	-8,63	-7,85	-8,52
84	-8,58	-6,11	-7,7	-8	-8,5	-8,29
85	-7,73	-7,91	-7,64	-8,52	-7,31	-7,98
87	-7,79	-6,33	-9,85	-10,21	-9,13	-7,97
88	-7,6	-5,68	-7,95	-8,18	-7,39	-7,45
94	-8,03	-7,64	-7,36	-7,99	-8,21	-8,22

Tableau 24 : Représentation codée en couleur de la constante d'inhibition (Ki, nM) obtenue par docking moléculaire des dérivés d'hémisynthèse avec les six cibles protéiques. Les couleurs utilisées sont le vert pour une bonne activité d'inhibition (<100 nM), le jaune pour une activité d'inhibition modérée (100 nM <Ki <500 nM) et le blanc pour une activité d'inhibition faible ou inexistante (Ki > 500 nM).

	<i>3EQM</i>	<i>BCL2</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK6</i>	<i>Top1</i>	<i>VEGFR2</i>
9	4000	6870	997800000	1010	2350	815,58
10	924,47	3250	2290	2290	924,25	1030
70	4610	7770	6480	2580	4660	2030
76	3800	5560	2200	3160	2950	1720
53	1090	9010	1520	485,18	1060	259,91
55	2150	32880	3720	3060	1880	1010
58	3570	57590	1240	427,01	327,01	1500
59	13140	9030	4850	1250	282,76	719,59
62	2150	10890	978,41	421,71	409,55	363,86
63	2240	13090	1390	470,46	1750	567,13
84	509,96	33140	2270	1370	592,99	831,72
85	2160	1590	2520	569,97	4390	1420
87	1940	23010	86,52	32,88	203,05	1450
88	2670	69690	1480	1020	3800	850
94	1290	2510	4010	1380	962,3	936,55

Le complexe du composé **76** avec CDK2 est légèrement plus stable (-7,72 kcal / mol) que celui de la même protéine avec son ligand naturel (-7,26 kcal / mol). Les complexes du composé **87** et les protéines CDK2 et CDK6 sont les plus stable comparé aux complexes naturels (-9,85 et -10,21 kcal / mol).

II.4.4 Analyse des résultats du docking

Selon le Tableau 24, deux composés parmi la diversité structurale utilisée (**53**, **62**) ont une activité d'inhibition moyenne avec la protéine VEGFR2. Cependant le composé **76** en particulier ne montre la meilleure activité d'inhibition qu'avec la protéine VEGFR2 (1720 nM). Ce qui traduit une bonne sélectivité de ce composé sur la protéine VEGFR2. Le composé **76** inhiberait donc l'angiogénèse (vascularisation) indispensable à tout tissu en cours de développement. Ainsi, sans nutriments, la réplication cellulaire est stoppée.

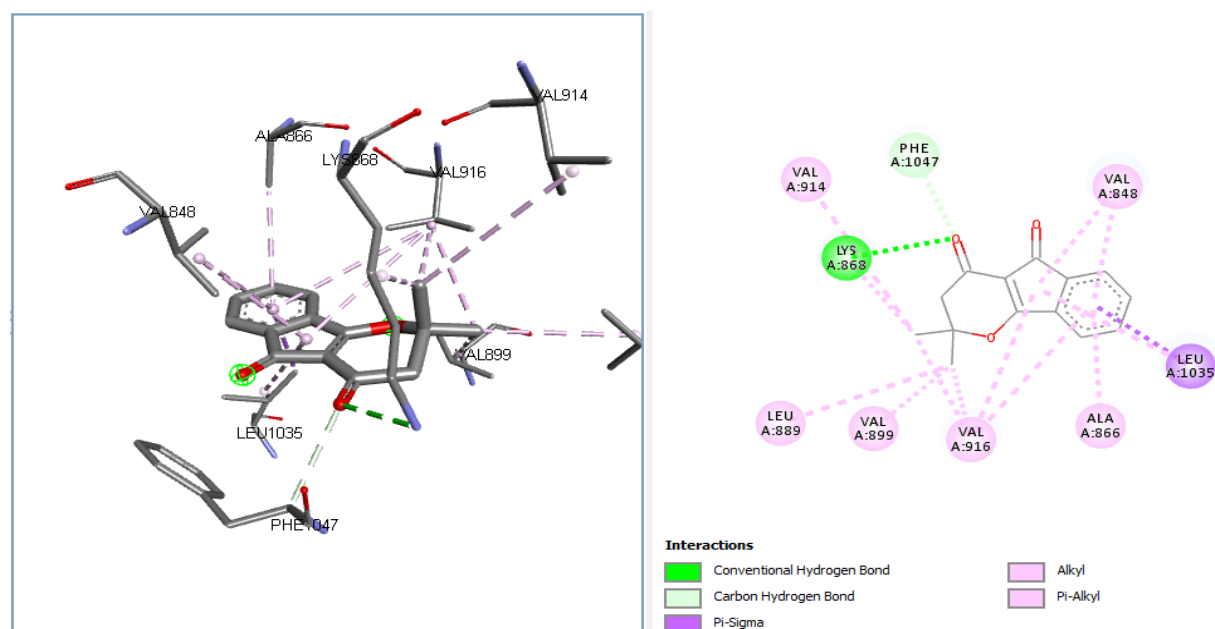


Figure 57 : Résultats 3D et 2D du docking du composé 76 dans la protéine cible VEGFR2. Les interactions pertinentes sont indiquées (lignes tracées)

L'activité inhibitrice de l'angiogénèse du composé **76** peut être corrélée à l'action d'une liaison hydrogène de type donneur avec le résidu LYS A: 868, une interaction pi-sigma du cycle aromatique avec le résidu LEU A: 1035, des interactions alkyle et pi-alkyle avec les résidus VAL A: 848, ALA A: 866, VAL A: 916, VAL A: 899 et LEU A: 889 (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

Le composé **87** montre les meilleures activités d'inhibition avec les protéines CDK-2 (60,52 nM) et CDK-6 (32,85 nM). En plus du fait que son affinité de liaison avec ces protéines est supérieure à celles prédites pour leurs ligands naturels, CDK-2 et CDK-6 apparaissent comme des cibles potentielles du composé **87**. En effet, même si Habtemariam en 2010 (Habtemariam, 2010)

concluait que l'activité anticancéreuse du composé **87**, la Knipholone anthrone, s'accompagne de la destruction de la membrane cellulaire, il envisageait également l'implication de plusieurs cibles dans cette activité. Au vu de nos résultats, la Knipholone anthrone inhibe également l'activité des cyclines CDK2 et CDK6 et bloque donc ainsi l'évolution du cycle cellulaire au niveau des phases G1 et S par défaut de phosphorylation. La très bonne activité d'inhibition du composé **87** sur les cyclines CDK-2 et CDK-6 est due à une conformation présentant deux systèmes aromatiques perpendiculaires. Ces systèmes aromatiques entretiennent des interactions de type pi-alkyle ou pi-sigma, entourées de manière alternée par des carbonyles accepteurs de liaisons hydrogène et des hydroxyles donneurs de liaisons hydrogènes (Figure 58). Il s'agit plus concrètement pour la cycline CDK-2, de trois interactions donneurs de liaison hydrogène avec les résidus GLU A: 81, LEU A: 83 et GLN A: 131, trois interactions accepteurs de liaison hydrogène avec LYS A: 33 doublé avec LEU A: 83, une interaction Pi-anion avec ASP A: 145, trois interactions Pi-sigma avec ALA A: 144, LEU A: 134, ILE A: 10 et des interactions alkyle et Pi-alkyle avec ALA A: 31, VAL A: 64 et VAL A : 18. Avec la cycline CDK-6, on observe trois interactions donneurs de liaisons hydrogène avec les résidus GLN B: 149, ILE B: 19 et VAL B: 101, deux interactions accepteurs de liaison hydrogène avec VAL B: 101 et HIST B: 100, une interaction Pi-sigma avec LEU B: 152 et des interactions alkyle et Pi-alkyle avec VAL B: 27, ALA B: 162 et ALA B: 41.

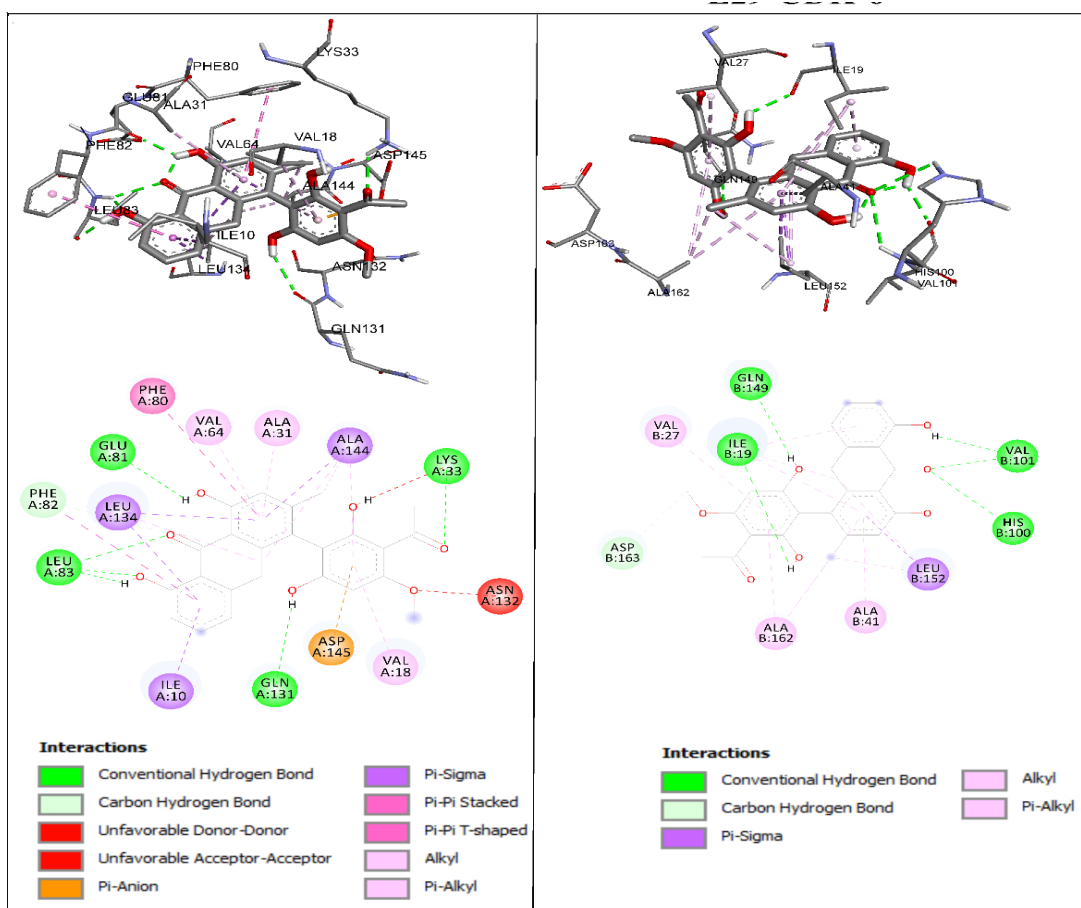


Figure 58 : Résultats 3D et 2D du docking du composé 87 dans les protéines cible CDK-2 et CDK6. Les interactions pertinentes sont indiquées (lignes tracées).

En fin de compte et sous la réserve des actions synergiques, nous pouvons justifier l'activité apoptotique de cinq des quinze composés testés sur les cellules cancéreuses A549, SKMEL28 et U373 par leur potentiel à l'inhibition des enzymes indiquées dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Justification de l'activité antitumorale par l'inhibition des enzymes ciblées

	Composés						
	53	58	59	62	87		
Enzyme	<i>VEGFR2</i>	<i>Top1</i>	<i>Top1</i>	<i>VEGFR2</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK6</i>	<i>Top1</i>
Ki	259,91	327,01	282,76	363,86	60,52	32,85	203,05

Le composé **76**, quoique ayant une activité modérée avec la protéine VEGFR2, présente tout de même une bonne sélectivité sur cet enzyme. Les composés **9**, **10**, **70**, **55**, **84**, **85**, **88**, et **51** ne présentent pas d'affinité considérable avec les cibles enzymatiques sélectionnées pour le docking moléculaire. Ces cibles enzymatiques ne sont donc pas impliquées dans la manifestation de l'activité observée sur les cellules humaines par ces composés.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Il était question dans ce travail de rechercher de nouvelles structures dérivées du lapachol à fort potentiel anticancéreux et de déterminer leur mécanisme d'action.

Le lapachol est un métabolite secondaire très abondant dans la famille des Bignoniaceae et l'étude phytochimique de l'espèce *Kigelia africana* a conduit à l'isolement de dix-sept composés dont le Lapachol. Huit des composés isolés ont été analysés et caractérisés à l'aide des paramètres physiques, des techniques de RMN à une et deux dimension et par comparaison avec la littérature. Il s'agit du mélange β -sitosterol-stigmasterol, de trois triterpènes, de trois quinones et une coumarine.

Par la suite il a été réalisé l'hémisynthèse des dérivés du lapachol qui possèdent des activités anticancéreuses reconnues que sont la β -lapachone, l' α -lapachone et la 2-acétylfuronaphtoquinone. Les conditions d'époxydation stéréosélectives de Sharpless ont permis l'obtention des diastéréoisomères (R)-2-((S)-1,2-Dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]-furan-4,9-dione, **57** ; (R)-2-((S)-1,2-dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione, **61** et acétate de 3-(((2S,3S)-3-(Hydroxyméthyl)-3-méthylloxiran-2-yl)méthyl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl, **67** avec de bon rapports diastéréoisomériques. D'autre part, une pharmacomodulation visant l'élimination des groupes quinones à grand potentiel cytotoxique a été effectuée par réarrangement benzylique des dérivés orthoquinoniques et par leur conversion en base de Shiff. Ainsi le réarrangement benzylique des dérivés orthoquinoniques a conduit à l'hémisynthèse de neuf dérivés. De même, la conversion des orthoquinones en base de Shiff a abouti à l'hémisynthèse de deux phénazines : le 1,2-dihydro-3,3-diméthyl-3H-benzo[a]pyrano [2,3-c]phenazine **79** et le 6-hydroxy-6-(3-méthylbut-2-enyl) benzo[a]-phenazin-5(6H)-one **82**. Au total, trente-huit dérivés du lapachol ont été hémisynthétisés.

Trente des dérivés d'hémisynthèse en plus de treize autres dérivés du lapachol disponibles dans la chimiothèque du laboratoire ont été soumis à un screening anticancéreux sur un large panel de cellules cancéreuses humaines contenant des modèles *in-vitro* de cancers typiquement associés à un pronostic sombre, tels que BE(2)-C, Kelly, SKNSH, CHLA-90, A549, SKMEL-28 et U373. Parmi ces composés testés, quatorze se sont révélés être les plus actifs avec des valeurs de IC₅₀ allant du submicromolaire au micromolaire. Parmi ces composés, sept possèdent un squelette β -naphthoquinone et six autres un squelette α -naphthoquinone [2,3-b] furane. Ces résultats sont compatibles avec les valeurs décrits dans la littérature pour ces classes de composés (Ríos-Luci *et al.*, 2012 ; Yamashita *et al.*, 2007). Parmi les neuf composés indanniques, le composé **76** ou le 5-hydroxy-2,2-diméthyl-4-oxo-2,3,4,5-tetrahydroindeno [1,2-b] pyran-5-carboxylate de méthyle, possède l'activité anticancéreuse la plus intéressante. L'activité anticancéreuse associée à ce type

de squelette est décrite ici pour la première fois. Etant donné son potentiel d'activité et la facilité avec laquelle il est synthétisé, le composé **76** représente une nouvelle piste d'investigation dans le programme de recherche et de développement des médicaments anticancéreux.

Afin d'identifier les mécanismes d'actions intervenants dans l'activité associée à cette nouvelle typologie structurale anticancéreuse et à celle des quatorze autres composés testés, des dockings moléculaires de ces composés ont été effectués sur les enzymes 3EQM, CDK-2, CDK-6, topoisomerase I, BCL-2 et VEGFR-2 avec le logiciel autodock4. Ces enzymes ont été sélectionnées en fonction de leur rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et la progression du cancer. Sous réserve des actions synergiques, ce procédé *in-silicio* de docking permet d'attribuer aux composés **62** et **53** un potentiel d'activité apoptotique par inhibition de la protéine VEGFR2 et donc l'angiogenèse. En outre les composés **58**, **59** et **87** présentent un potentiel à l'inhibition de l'enzyme Topoisomérase I responsables de la ressoudure des deux extrémités de l'ADN pendant la réplication tandis que le composé **87** est un inhibiteur des cyclines kinases CDK2 et CDK6 et bloque par ce fait l'évolution du cycle cellulaire au niveau des phases G1 et S par défaut de phosphorylation.

Dans les prochaines investigations relatives à ce travail, il sera question

- D'achever l'étude phytochimique des fractions restantes de la plante *Kigelia africana*.
- D'effectuer les test de toxicité des dérivés les plus actifs.
- D'effectuer la validation des résultats obtenus *in-silicio* dans ce travail par des tests biologique des composés d'hémisynthèses sur les enzymes cibles utilisées.
- D'entreprendre la synthèse des dérivés du squelette indeno [1,2-b] pyranne pour explorer davantage la piste de l'activité anticancéreuse associée à cette typologie structurale

CHAPITRE III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1 APPAREILLAGE

III.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées à l'aide de plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ sur feuilles d'aluminium (*Merck*) qui constituent la phase stationnaire. Ces plaques sont ensuite plongées dans des cuves chromatographiques contenant une phase mobile qui est généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants selon le type de séparation recherchée.

Par la suite, la révélation est effectuée sur chaque plaque développée selon le même ordre, à savoir :

- Observation de l'extinction de la fluorescence à 254 nm
- Observation de la fluorescence à 366 nm
- Observation après exposition aux vapeurs d'iode

III.1.2 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

Deux types de séparation ont été réalisés avec des colonnes ouvertes lors des différents processus d'isolement :

Colonne ouverte sur gel de silice

Les premiers fractionnements des différents extraits bruts ont été réalisés par chromatographie d'adsorption sur une phase stationnaire de gel de silice 60 (63-200 µm, *Merck*). La taille de la colonne a été choisie en fonction de la quantité de l'extrait. Les systèmes d'élution utilisés étaient composés de gradients Hex/AcOEt/MeOH dans des proportions déterminées au préalable sur couche mince avant la séparation. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 1-3 fois sa masse et l'introduction de l'extrait a donc eu lieu sous forme solide.

Filtration sur gel

Dans tous les cas où cette technique a été utilisée (séparations, purifications), la phase stationnaire était le gel Sephadex LH 20 (*Pharmacia*) et la phase mobile était le MeOH. Les échantillons étaient introduits sous forme liquide. Le débit, généralement lent, n'excédait pas 1mL/min. La taille des colonnes utilisées était sélectionnée selon la quantité d'échantillon à séparer.

III.1.3 Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

Le spectromètre est équipé d'un '*surveyor HPLC*', système composé d'une pompe LC, d'un détecteur PDA et d'un échantillonneur automatique (volume d'injection 10 µL). L'azote était utilisé à la fois à la gaine (40 unités arbitraires) et comme gaz auxiliaire (10 unités arbitraires). La

température capillaire a été réglée à 190 ° C. La température du vaporisateur a été réglée à 400 ° C. Les séparations ont été effectuées à l'aide d'une colonne Phenomenex synergi Fusion RP (4 µm, 3 x 150 mm).

III.1.4 Chromatographie Liquide couplé à la Spectrométrie de Masse (LCMS)

Les spectres de masse haute résolution (HR-MS) ont été enregistrés à la suite du système HPLC à l'aide d'un spectromètre LTQ Orbitrap équipé d'une source d'ions APCI (Ion Max) fonctionnant en mode positif.

III.1.5 Masse

Les échantillons et composés ont été pesés à l'aide d'une balance électronique de marque Sartorius et de type 1265001.

III.1.6 Point de fusion (P.F.)

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide de l'appareil ELECTROTHERMAL 9100 (max 400°C).

III.1.7 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ¹H et RMN ¹³C ont été enregistrés à 25 °C au moyen soit d'un spectromètre 600 équipé avec une sonde froide 'Prodigy' (RMN ¹H à 600 MHz, RMN ¹³C à 150 MHz), ou d'un spectromètre 500 (RMN ¹H à 500 MHz, RMN ¹³C à 125 MHz), ou 400 (RMN ¹H à 400 MHz, RMN ¹³C à 100 MHz). Les déplacements chimiques sont reportés en ppm utilisant l'un des solvants de résonance comme standard interne (RMN ¹H CDCl₃: δ 7,26 ppm, RMN ¹³C CDCl₃: δ 77,16 ppm, RMN ¹H CD₃OD: δ 3,31 ppm ou RMN ¹³C CD₃OD: δ 49,0 ppm).

III.2 MATERIEL VEGETAL

Les écorces de racines de *Newbouldia leavis* (Bignoniaceae) ont été récoltées à Nkolbisson en février 2013 dans la localité de Yaoundé 7^{ième}, région du centre du Cameroun et un échantillon a été déposé et enregistré sous le numéro 1754/SRFK à l'herbier national du Cameroun.

La plante *Kigelia africana* a été récoltée à Bamena dans la région de l'Ouest du Cameroun le 12 Janvier 2015. Des échantillons des écorces, des feuilles et des fruits de cette plante ont permis son identification par comparaison au spécimen enregistré au N° 159/HNC à l'herbier national du Cameroun par l'herboriste Mr. Victor NANA.

III.3 EXTRACTION ET ISOLEMENT DES COMPOSES

III.3.1 Ecorces de racines de *Newbouldia laevis*.

7 Kg de poudre de d'écorces de racines séchées ont été extraits à température ambiante utilisant le système de solvant CH₂Cl₂/MeOH 1 : 1 pour donner 291 g d'extrait brut. Cet extrait brut a été soumis à une chromatographie flash utilisant les systèmes de polarité croissantes Hex, Hex/AcOEt 10 %, Hex/AcOEt 25 % et AcOEt et a ainsi conduit à l'obtention respective des fractions de 20, 20, 25 et 40 g. Du lapachol ayant précipité de la fraction à l'hexane est récupéré et purifié par chromatographie sur colonne. La chromatographie sur colonne à polarité croissante de la fraction à l'hexane restante permet d'obtenir le lapachol dans le système d'élution Hex/AcOEt 3 %. Au total 2 g de lapachol ont été ainsi purifiés des écorces de racines de *Newbouldia laevis*.

III.3.2 Fruits de *Kigelia africana*

Cinq fruits de *Kigelia africana* ont été découpés, séchés à l'ombre et écrasés pour donner 1,2 Kg de poudre. L'extraction de cette poudre séchée a été effectuée à température ambiante au sonicateur avec le système de solvants CH₂Cl₂/ MeOH (1:1) pour donner 198 g d'extrait brut. Cet extrait brut a été partitionné par chromatographie flash à l'aide de systèmes de solvants de polarité croissante pour donner 13 g de fraction à l'hexane, 14 g de fraction à l'hexane/acétate 50%, 11 g de fraction à l'acétate, 42 g de fraction à l'acétate/méthanol 50% et 82 g de fraction au méthanol. Chacune de ces fractions a été chromatographiée sur colonne suivi des différentes techniques de purification.

III.3.2.1 Chromatographie de la fraction à l'hexane

L'extrait à l'hexane d'une masse de 13 g a été fixé à 15 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 2 cm de diamètre et de 150 cm de long. 120 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluee avec le système hexane/acétate d'éthyle de polarité croissante. Au total 49 fractions de 100 mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 8 fractions majeures indexées de A à I.

- La fraction A (Hex) analysé par CCM est un mélange huileux.
- La fraction B (Hex) analysé par CCM est constituée en majorité d'une huile indexé KAH1 que nous purifions par chromatographie préparative. Nous en obtenons une masse de 3 mg.
- La fraction C (Hex) analysé par CCM contient un composé indexé KAH2 qui est filtré et se présente sous forme de cristaux blancs. La somme des échantillons de KAH2 regroupés par CCM possède une masse de 83 mg.

- De la fraction D (Hex/AcOEt 6%) se dépose un mélange contenant le composé KAH2. Une Chromatographie de purification conduit à l'isolement du composé KAH3 en plus du composé KAH2. KAH3 se présente sous forme de cristaux blancs et possède une masse de 4 mg.
- De la fraction E (Hex/AcOEt 6%) se dépose un mélange contenant le composé KAH2. Une Chromatographie de purification conduit à l'isolement du composé KAH4 en plus du composé KAH2. KAH4 se présente sous forme de cristaux blancs et possède une masse de 2 mg.

polarité	Fractions	ID	TLC	Observations	Composés
Hex	F1-F2	A	1%	3 taches + trainée	-
Hex	F3	B	10%	3taches	Huile KAH1
Hex	F4-F6	C	10%	3 T + saletés	KAH2
Hex /AcOET 2%	F7-F13	D	10%	3 T + saletés	KAH2, KAH3
Hex /AcOET 6%	F14-F29	E	20%	5 taches	KAH2, KAH4
10-20%	F30-F39	F	20%	4 taches	-
20-40%	F40-F45	G	30%	2 taches + trainée	-
EtOAc	F46-F49	H	40%	2 taches + trainée	-

III.3.2.2 Chromatographie de la fraction à l'Hexane/AcOEt 50%

L'extrait à l'hexane/AcOEt d'une masse de 14g a été fixé à 17 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 2 Cm de diamètre et de 150 Cm de long. 120 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluée avec le système hexane/Acétate d'éthyle de polarité croissante. Au total 136 fractions de 100mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 7 fractions majeures indexées de A à G.

- La fraction C (Hex/AcOEt 25%) est purifiée par préparative et permet d'obtenir 3 mg d'une huile jaune indexé KAH5.
- La fraction D (Hex/AcOEt 25%) est purifiée par préparative et permet d'obtenir 2 mg d'une huile jaune indexé KAH6.
- De la fraction F (Hex/AcOEt 50%) est filtré 18 mg du composé KAH7 sous forme de cristaux blancs.
- De la fraction G (Hex/AcOEt 55%) est filtré 12 mg du composé KAH10a ayant l'aspect de cristaux blancs

polarité	Fractions	ID	CCM	Observations	Composés
Hex /AcOET F4-5%	F1-F4	A		-	-
Hex /AcOET 5%	F5-F8			3 taches	-
Hex /AcOET f13-10%	F9-F19		7%	3 taches	-

Hex /AcOET f20-15% f27-20%	F20-F28	B	7%	1tache+trainée	-
Hex /AcOET 20%	F29,F30			1tache+trainée	-
Hex /AcOET f36-25%	F31-F38		22%	trainée	-
Hex /AcOET 25%	F39,F40	C	22%	2taches+trainée	-
Hex /AcOET 25%	F41-F47		22%	1tache+trainée	KAH5
Hex /AcOET 25%	F48,F49,F50		22%	trainée	-
Hex /AcOET 25%	F51-F58	D	22%	1T+trainée	KAH6
Hex /AcOET 25%	F59,F60	E	30%	trainée	-
Hex /AcOET f63-30%	F61-F65		30%	1tache+trainée	-
Hex /AcOET f63-30% F71-35%	F66-F76		40%	1tache+trainée	-
40%	F77			1 tache +trainée	-
F84-50%	F78-F93			3 tache +trainée	-
50%	F94-F108	F		3 tache +trainée	KAH7
F109-55%	F109	G		2 tache +trainée	-
55%	F110,113,114,115		AcOEt	2 tache +trainée	KAH10a
F116-60% F121-75% F125-80%	F116-F128			1 tache +trainée	-
F131- AcOEt	F129-F135			-	-
F136-A/M 50%	F136			-	-

III.3.2.3 Chromatographie de la fraction AcOEt

L'extrait à l'AcOEt d'une masse de 11g a été fixé à 15 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 2 Cm de diamètre et de 150 Cm de long. 110 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluee avec le système hexane/Acétate d'éthyle/MeOH de polarité croissante. Au total 95 fractions de 100mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 5 fractions majeures indexées de A à E.

- De la fraction C (Hex/AcOEt 30%) se dépose et est filtré 9 mg d'un composé KAF5 ayant l'aspect de poudre blanche.
- De la fraction E (AcOEt/MeOH 3%) se dépose et est filtré 12 mg d'un composé indexé KAF4 ayant l'aspect de poudre blanche.

polarité	Fractions	ID	TLC	Observations	Composés
Hex	F1-F2	A	1%	3 taches + trainée	-
Hex /AcOET 5%	F3		10%	3taches	-
Hex /AcOET 10%	F4-F6	B	10%	3 T + saletés	-
Hex /AcOET 20%	F7-F25		10%	3 T + saletés	-
Hex /AcOET 30%	F26-F29	C	20%	5 taches	KAF5
10-20%	F30-F38		20%	4 taches	-
EtOAc	F39-F45	D	30%	2 taches + trainée	-
EtOAc/MeOH	F46-F53	E	40%	2 taches + trainée	-
EtOAc/MeOH 3%	F54-F59		50%	3 taches + trainée	KAF4
EtOAc/MeOH 6%	F60-F68		50%	2 taches + trainée	-
EtOAc/MeOH 10%	F69-F76		55%	trainée	-
EtOAc/MeOH 20%	F77-F88		60%	trainée	-
MeOH	F89-F95		40%	trainée	-

III.3.2.4 Chromatographie de la fraction AcOEt/MeOH 50%

L'extrait à l'AcOEt/MeOH 50% d'une masse de 42g est essentiellement huileux. Il a été fixé à 60 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 5 Cm de diamètre et de 150 Cm de long. 300 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluée avec le système hexane/Acetate d'éthyle/MeOH de polarité croissante. Au total 107 fractions de 100mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 7 fractions majeures indexées de A à E. Le composé KAF10 d'une masse de 16 mg se dépose de la fraction E (AcOEt/MeOH 22%) sous forme de poudre blanche.

polarité	Fractions	ID	TLC	Observations	Composés
AcOET	F1-F4	A	1%	3 taches + trainée	-
AcOET/MeOH 1%	F5-F9	B	10%	4 taches	-
AcOET/MeOH 3%	F10-F25		10%	4 taches	-
AcOET/MeOH 6%	F26-F29	C	20%	5 taches	-
AcOET/MeOH 10%	F30-F37		20%	4 taches	-
AcOET/MeOH 13%	F38-F47	D	30%	2 taches + trainée	-
AcOET/MeOH 15%	F48-F53	E	40%	2 taches + trainée	-
AcOET/MeOH 20%	F54-F59		50%	3 taches + trainée	-
AcOET/MeOH 22%	F60-F63		50%	2 taches + trainée	KAF10
AcOET/MeOH 25%	F64-F72	F	55%	trainée	-
AcOET/MeOH 28%	F73-F85		60%	trainée	-

AcOET/MeOH 30%	F86-F91	G	65%	trainée	-
AcOET/MeOH 40%	F92-F96		75%	trainée	-
AcOET/MeOH 50%	F97-F102		AcOET	trainée	-
AcOET/MeOH 75%	F103-F106		AcOET	trainée	-
MeOH	F107		AcOET	trainée	-

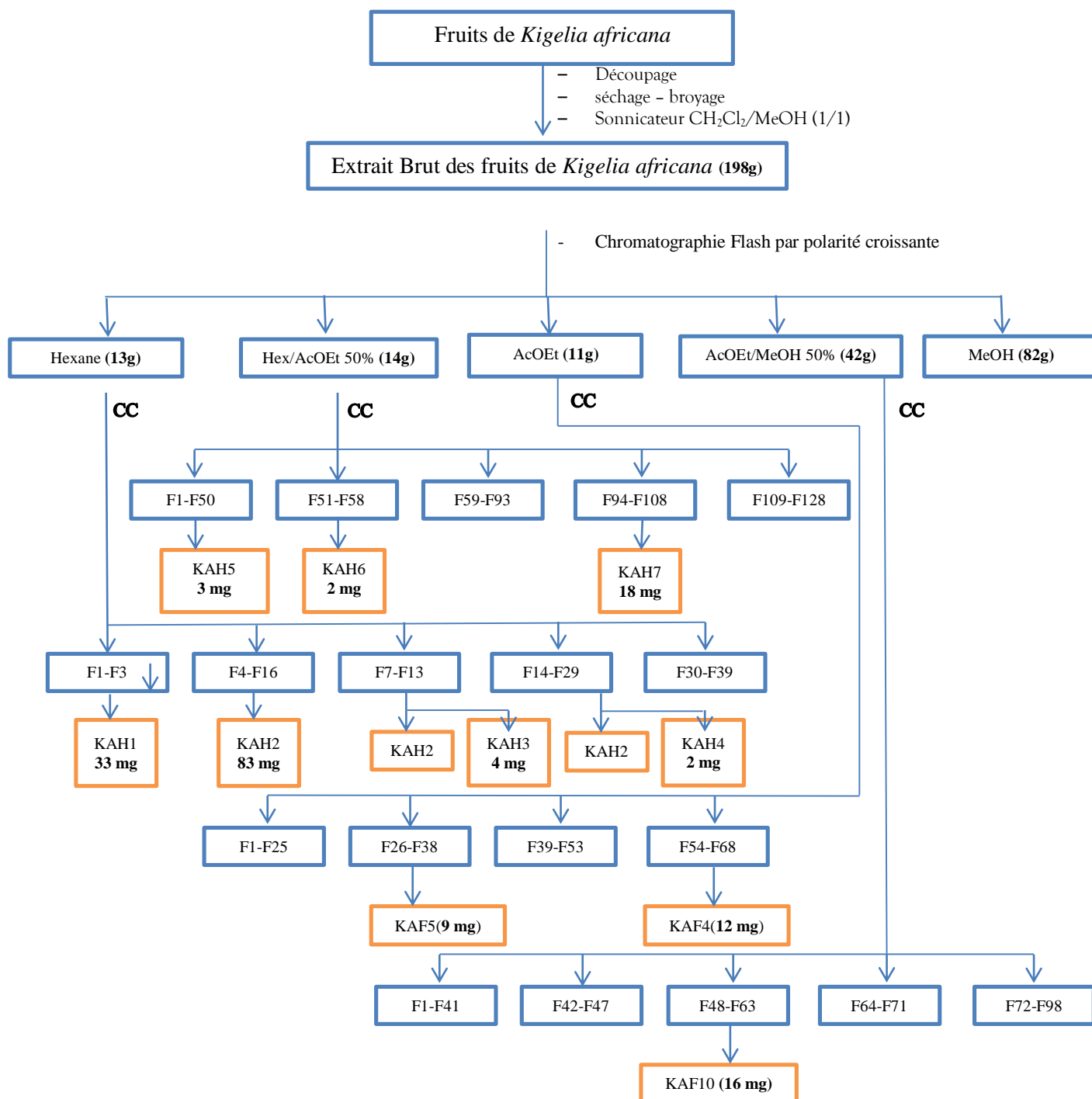


Diagramme 1 : Protocole d'extraction et d'isolément des fruits de *Kigelia africana*

III.3.3 Racines de *kigelia africana*

Les racines de *Kigelia africana* ont été découpées, séchées à l'ombre et écrasées pour donner 1050 g de poudre. L'extraction de cette poudre séchée a été effectuée à température ambiante au sonnicateur avec le système de solvants CH₂Cl₂/ MeOH (1:1) pour donner respectivement 122 g d'extrait brut. Cet extrait brut a été partitionné par chromatographie flash à l'aide de systèmes de solvant de polarité croissante pour donner 5,23 g de fraction à l'hexane, 2,23 g de fraction à l'hexane/acétate 10%, 31,70 g de fraction à l'acétate et 64,28 g de fraction au méthanol. Chacune de ces fractions a été chromatographiée sur colonne suivi des différentes techniques de purification.

III.3.3.1 Chromatographie de la fraction à l'Hexane

L'extrait à l'hexane d'une masse de 5,23 g a été fixé à 8 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 2 Cm de diamètre et de 150 Cm de long. 40 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluée avec le système hexane/Acétate d'éthyle de polarité croissante. Au total 49 fractions de 50mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 6 fractions majeures indexées de A à F.

- De la fraction B (Hex) précipite un composé sous forme de cristaux jaunes. Ce composé indexé KAH12 est filtré et possède une masse de 3 mg.
- De la fraction C (Hex /AcOET 2%) est filtré 12 mg du composé KAH20 sous forme de cristaux rougeâtres.
- De la fraction C (Hex /AcOET 4%) se dépose un composé ayant l'aspect d'un corps gras de couleur jaune. Ce composé d'une masse de 3 mg est filtré et indexé KAH13.
- De la fraction E (Hex /AcOET 15%) est filtré 4 mg du composé KAH14 sous forme de cristaux blancs.

polarité	Fractions	ID	TLC	Observations	Composés
Hex	F1-F6	A	Hex	RAS	RAS
Hex	F7-F8		Hex	4 taches	-
Hex	F9	B	Hex	2 taches	KAH12
Hex /AcOET 2%	F10-F11	C	5%	3 taches	KAH20
Hex /AcOET 4%	F12-F19		10%	4 taches	KAH13
Hex /AcOET 6%	F20-F30	D	10%	4 taches	-
Hex /AcOET 8%	F31-F38		10%	4 taches	-
Hex /AcOET 12%	F39-F40		15%	3 taches	-

Hex /AcOEt 15%	F41-F45	E	15%	3 taches	KAH14
Hex /AcOEt 20-25%	F46-F50		15%	2 taches	-
Hex /AcOEt 30%	F46-F50	F	15%	2 taches	-
AcOEt	F46-F50		20%	2 taches	-

III.3.3.2 Chromatographie de la fraction à l'Hexane/AcOEt 10%

L'extrait à l'hexane/AcOEt d'une masse de 2,23 g a été fixé à 5 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 2 Cm de diamètre et de 150 Cm de long. 40 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluée avec le système hexane/Acétate d'éthyle de polarité croissante. Au total 70 fractions de 50mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 6 fractions majeures indexées de A à F.

- De la fraction B (Hex /AcOEt 6%) est filtré 11 mg d'un composé sous forme de cristaux jaunes. Ce composé est indexé KAH10b.

Polarité	Fractions	ID	TLC	Observations	Composés
Hex	F1-F4	A	1%	-	-
Hex	F5-F7		2%	2 taches	-
Hex /AcOEt 4%	F8-F13		4%	3 taches	-
Hex /AcOEt 6%	F14-F17	B	5%	2 taches +trainée	KAH10b
Hex /AcOEt 8%	F18-F33	C	8%	2 taches +trainée	-
Hex /AcOEt 10%	F34-F39	D	10%	4 taches	-
Hex /AcOEt 15%	F40-F53	E	10%	3 taches	-
Hex /AcOEt 20%	F54-F66	F	15%	3 taches	-
EtOAc	F67-F70		20%	3 taches	-

III.3.3.3 Chromatographie de la fraction AcOEt

L'extrait à l'AcOEt d'une masse de 31,70 g a été fixé à 35 g de silice de type 254 MERCK, de granulométrie 0,06-0,200mm et chromatographié sur une colonne de 5 Cm de diamètre et de 150 Cm de long. 200 g de gel de silice de même granulométrie a été utilisé comme absorbant. La colonne ainsi constituée a été éluée avec le système hexane/Acétate d'éthyle/MeOH de polarité croissante. Au total 125 fractions de 100mL ont été récoltées et concentrées à chaque fois. Ces

fractions ont été regroupées judicieusement selon les résultats de la CCM en 9 fractions majeures indexées de A à I.

- De la fraction B (Hex/AcOEt 20%) est filtré 8 mg du composé KAH21 sous forme de cristaux jaunes.

polarité	Fractions	ID	TLC	Observations	Composés
Hex	F1-F3	A	1%	3 taches + trainée	-
Hex /AcOEt 10%	F4		10%	3taches	-
Hex /AcOEt 15%	F5-F9	B	10%	3 T + saletés	-
Hex /AcOEt 20%	F10-F25		10%	3 T + saletés	KAH21
Hex /AcOEt 30%	F26-F31	C	20%	5 taches	-
Hex /AcOEt 40%	F32-F38		20%	4 taches	-
Hex /AcOEt 45%	F39-F45	D	20%	4 taches	-
Hex /AcOEt 50%	F45-F53		20%	4 taches	-
Hex /AcOEt 60%	F54-F61	E	25%	2 taches	-
Hex /AcOEt 80%	F62-F68		30%	2 taches	-
EtOAc	F69-F79	F	30%	3 taches	-
EtOAc/MeOH	F80-F88		40%	3 taches	-
EtOAc/MeOH 3%	F89-F96	G	50%	3 taches + trainée	-
EtOAc/MeOH 6%	F97-F105	H	50%	2 taches + trainée	-
EtOAc/MeOH 10%	F106-F113		55%	trainée	-
EtOAc/MeOH 20%	F114-F121	I	60%	-	-
MeOH	F122-F125		AcOEt	-	-

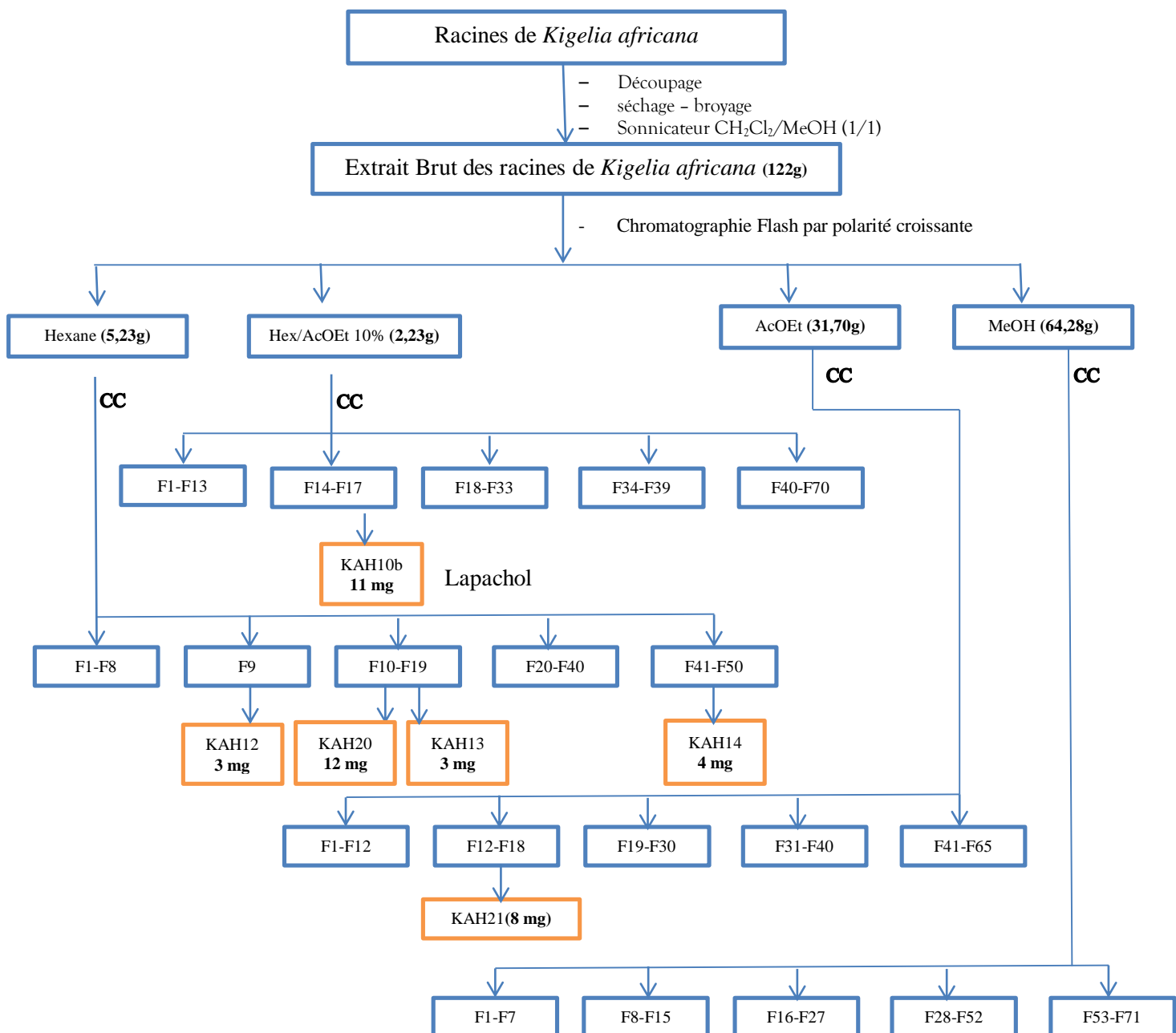


Diagramme 2 : Protocole d'extraction et d'isolément des racines de *Kigelia africana*

III.4 REACTIONS DE SYNTHÈSE

III.4.1 Conditions générales

Toutes les réactions nécessitant un milieu non aqueux ont été effectuées sous atmosphère d'azote dans de la verrerie séchée à l'étuve (125 ° C) ou séchée à la flamme, sauf indication contraire. Les solvants de réaction utilisés ont été pré-séchés en les faisant passer à travers des tamis moléculaires activés ou de l'alumine dans un système de séchage à solvant 'JC Meyer'. La diisopropyléthylamine (DIPEA) et la triéthylamine (NEt₃) ont été distillées sur du CaH₂ avant utilisation. Tous les traitements et les purifications ont été effectués à l'aide de solvants de qualité 'Grade'.

III.4.2 Hémissynthèse du composé **8** (2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione)

Dans une solution homogénéisée de lapachol **4**, (50 mg, 0,2 mmol), est ajouté de l'eau (1,4 mL), suivi par HCl conc. (0,03 mL, 0,3 mmol), le milieu réactionnel résultant est homogénéisé pendant 30 min, à température ambiante. La poudre jaune obtenue est filtrée et lavée à l'eau froide (3 × 1 mL), le produit brut est séché sous vide et une colonne chromatographique de purification du produit sous gel de silice utilisant 20–30% AcOEt dans l'hexane comme gradient de solvant donne le composé α -lapachone pure **8** (47 mg, 95%), sous forme de poudre jaune.

III.4.3 Hémissynthèse du composé **9** (2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromene-5,6-dione ou β -lapachone)

Dans une solution de lapachol homogénéisé **4**, (242 mg, 1.0 mmol), est ajouté de l'eau (7 mL), suivi par H₂SO₄ conc. (0.8 mL, 1.5 mmol), le milieu réactionnel résultant est homogénéisé pendant 3 h, à température ambiante. Les cristaux oranges obtenus sont filtrés et lavés avec de l'eau froide (3 × 5 mL), le produit brut est séché sous vide et une chromatographie sur colonne de purification sous gel de silice utilisant le système hexane/acétate 20–30% comme gradient d'éluion donne du β -lapachone pure **9** (237 mg, 97%), sous forme de cristaux orange. **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 8,04 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,80 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,63 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,49 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 2,55 (t, J = 6,8 Hz, 2 H), 1,84 (t, J = 6,4 Hz, 2 H), 1,45 (s, 6 H); **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃) δ 180,0, 178,7, 162,2, 134,9, 132,7, 130,8, 130,2, 128,7, 124,2, 112,8, 79,4, 31,7, 26,8, 16,2.

III.4.4 Hémissynthèse du composé **10** (2-Acetyl-naphtho [2,3-b]furan-4,9 dione)

Une solution de lapachol (65 mg, 0,27 mmol) dans le DCM sec (2,5 mL) est refroidit à -78 °C et de l'ozone est barboté à l'intérieur pendant 30 mn. Ensuite l'ozonide formé a été brisé avec du DMS à -78 °C et homogénéisé à l'agitateur magnétique en chauffant jusqu'à la température ambiante pendant 1h. Le milieu réactionnel est lavé à l'eau distillé et extrait avec du DCM (3 x 2,5 mL). La phase organique ainsi collectée est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre, concentrée à l'évaporateur rotatif et purifiée sur colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au système Hex/AcOEt 30% pour donner 40 mg (70%) de l'aldéhyde **50** et 19 mg (30%) de la 2-acéthylfuronaphthoquinone non attendu **10**.

III.4.5 Hémissynthèse du composé **48** (2,2-dimethyl-2H-benzo[g]chromene-5,10-dione)

Un mélange de lapachol **4** (50 mg, 0.21 mmol) et DDQ (150 mg, 0.66 mmol) dans le benzene (15 mL) est homogénéisé à température ambiante pendant 27 h, un précipité se forme graduellement.

Le précipité est filtré puis séparé par une chromatographie préparative au système Hexane/AcOEt 15% pour donner 5 mg (10%) du composé **48**.

III.4.6 Hémisynthèse du composé **51** (2-(prop-1-en-2-yl)naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione)

Le lapachol (100 mg, 0,4 mmol) et $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_2)_6$ (CAN) (4,54 g, 2 eq) sont solubilisés dans le système de solvant MeCN/H₂O 3 : 1 et homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique à température ambiante pendant 3h. Le résidu est filtré et purifié sur une colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au gradient du système hex/AcOEt de polarité croissante de 10 à 40%. 54 mg du composé **54** cristallise à 19 % tandis 42 mg du mélange des composé **51** et **52** est obtenu à 15%. Une chromatographie HPLC préparative du mélange de **51** et **52** sur un appareil HPLC avec détection UV à 254 nm (volume d'injection 50 μL) utilisant une collone C₁₈ Alltech Alltima de 5 μm (250 x 10 mm) avec H₂O (0.1 % HCOOH) (A) - MeOH (0.1 % HCOOH) (B) permet d'obtenir 5 mg du composé **51** et 34 mg du composé **52**.

III.4.7 Hémisynthèse du composé **55** (2-(1,2-dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione)

Le composé **60** (90mg, 0,36mmol) est dissout dans 3,6mL de DCM sec, refroidit à 3°C et 2 equiv de MCPBA a été ajouté. La réaction est maintenue à cette température pendant 2 heures et suivie par CCM. Une solution saturée de chlorure d'ammonium est ajoutée à la fin et le milieu réactionnel est ramené à la température ambiante suivi par une extraction utilisant le DCM sec, sous Na₂SO₄ anhydre, puis purifié par chromatographie sur colonne sous gel de silice (gradient d'éluion le système hexane/acétate 40-80%) pour donner les composés **55** (40%) et **56** (60%). Les composés **55** et **56** ont été obtenus sous forme de cristaux jaunes et rouges respectivement. **Composé 55** $[\alpha]_D^{27} +18,2$ (*c* 0,1, CHCl₃); **RMN ¹H (500MHz, CDCl₃)** 8,07 (m, 1H), 7,64 (m, 1H), 7,58 (m, 1H), 7,57 (m, 1H), 5,16 (dd, J=11, 9Hz, 1H), 3,79(d, J=11Hz, 1H), 3,62(d, J=11Hz, 1H), 3,20 (dd, J= 8,5, 17,5Hz, 1H), 3,13(dd, J=11, 17,5Hz, 1H), 1,27(s, 3H). **RMN ¹³C (125MHz, CDCl₃)**: 182,3, 177,8, 159,9, 134,4, 133,2, 133,1, 131,6, 126,4, 126,2, 125,2, 87,5, 73,4, 66,8, 28,0 et 19,0. **Composé 56** $[\alpha]_D^{27} +54,5$ (*c* 0,24, CHCl₃); **RMN ¹H (500MHz, CDCl₃)** 8,04 (d, J=7,5Hz, 1H), 7,64-7,62 (m, 2H), 7,58-7,56 (m, 1H), 5,16 (dd, J=8,0, 10Hz, 1H), 3,80(d, J=11Hz, 1H), 3,62(d, J=11Hz, 1H), 3,20(dd, J=7,5, 15,5Hz, 1H), 3,12(dd, J=10, 15,5Hz, 1H), 1,27(s, CH₃). **RMN ¹³C (125MHz, CDCl₃)** 181,2, 175,5, 170,1, 134,7, 132,2, 130,7, 129,7, 127,4, 124,6, 116,2, 89,1, 73,5, 67,8, 27,1 et 19,0.

III.4.8 Hémisynthèse du composé **56** (2-(1,2-dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione)

Confère synthèse du composé **55**.

III.4.9 Hémisynthèse du composé **57** ((R)-2-((S)-1,2-Dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[2,3-b]-furan-4,9-dione (+)-).

A une suspension homogénéisée de 'dried molecular sieves' (120 mg) dans du CH₂Cl₂ sec (2 mL) est ajouté le L-(+)-diethyl tartrate (24 mL, 0.14 mmol) et l'isopropoxide de titanium (IV) (34 mL, 0.12 mmol) à -23°C. Après 10 min, TBHP (6 M en solution dans du decane, 1,2 mL, 0.696 mmol) est ajouté. A ce mélange réactionnel le lomatiol **60** (60 mg, 0.232 mmol) dissout dans le CH₂Cl₂ (2 mL) est ajouté goutte à goutte et le mélange est homogénéisé pendant encore 7h à -23 °C sous atmosphère d'azote. Le milieu réactionnel est ramené librement à 0 °C, dilué avec le CH₂Cl₂ (8 mL) et les deux phases séparées. Ensuite la phase CH₂Cl₂ est lavée avec une solution saturée de Na₂SO₃ (3 X 10 mL), une solution de NaCl (6 mL) et séchée sous Na₂SO₄ anhydre. Le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner un produit brut qui est purifié sur colonne chromatographique sous gel de silice avec le système hexane/acetate 40–80% pour donner les composés purs (+)-**57** (20% ee, 20%) et (+)-**61** (20% ee, 40%); le composé (+)-**57** est obtenu sous forme de cristaux jaunes. Composé (+)-**61** est obtenu sous forme de cristaux rouges.

L'analyse HPLC du composé **57** (Daicel AD-H, 20% IPA/hexane, vitesse d'élution 1 mL min⁻¹, λ = 254 nm, 20% ee): tR 12,85 min (énantiomère mineur) et 10,35 min (énantiomère majeur). $[\alpha]_D^{27} + 18,2$ (c 0,1, CHCl₃); **RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)**: d 8,07 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 7,72 (td, J = 1,5, 7,5 Hz, 1H), 7,68 (td, J = 1,5, 7,5 Hz, 1H), 5,05 (dd, J = 9, 11 Hz, 1H), 3,81 (d, J = 11 Hz, 1H), 3,58 (d, J = 11 Hz, 1H), 3,29 (dd, J = 8,5, 17,5 Hz, 1H), 3,20 (dd, J = 11, 17,5 Hz, 1H), 2,46 (s*, OH), 2,01 (s*, OH), 1,26 (s, 3H); **RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)**: d 182,3, 177,8, 159,9, 134,4, 133,2, 133,1, 131,6, 126,4, 126,2, 125,2, 87,5, 73,4, 66,8, 28,0, 19,0.

L'analyse HPLC du composé **61** (Daicel AD-H, 20% IPA/hexane, vitesse d'élution 1 mL min⁻¹, λ = 254 nm, 20% ee): tR 11.29 min (énantiomère mineur) et 12,85 min (énantiomère majeur). $[\alpha]_D^{27} + 54,5$ (c 0,24, CHCl₃) **RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)**: d 8,04 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,64–7,62 (m, 2H), 7,58–7,56 (m, 1H), 5,16 (dd, J = 8,0, 10 Hz, 1H), 3,80 (d, J = 11 Hz, 1H), 3,62 (d, J = 11 Hz, 1H), 3,20 (dd, J = 7,5, 15,5 Hz, 1H), 3,12 (dd, J = 10, 15,5 Hz, 1H), 1,27 (s, 3H); **RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)**: d 181,2, 175,5, 170,1, 134,7, 132,2, 130,7, 129,7, 127,4, 124,6, 116,2, 89,1, 73,5, 67,8, 27,1, 19,0.

III.4.10 Hémisynthèse du composé **58** (3-bromo-2-(hydroxyméthyl)-2-méthyl-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromene-5,6-dione)

A un mélange homogénéisé du composé **65** (60 mg, 0,2 mmol) dans le DCM sec (4 mL) à 0°C est ajouté du brome (12 mL, 4,8 mmol). Le mélange réactionnel résultant est homogénéisé pendant 15 min à température ambiante. Ensuite le mélange réactionnel est mélangé à une solution saturée de Na₂S₂O₃ et extrait avec le DCM (2 x 10 mL), la phase de DCM collectée est lavée à

l'eau (10 mL), séché sous Na₂SO₄ anhydre et concentrée sous pression réduite pour donner le produit brut. La purification chromatographique du produit brut sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 40–70% donne les dérivés bromés **58**, **59**, **62** et **63**. Composé **59** **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,10 (m, 1H), 7,79 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,57 (m, 1H), 4,60 (m, 1H), 4,05 (m, 2H), 3,34 (m, 1H), 2,93 (m, 1H), 1,49 (s, 3H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 179,0, 177,8, 161,4, 135,2, 131,6, 131,5, 130,2, 129,3, 124,3, 112,3, 84,0, 66,8, 43,6, 27,3, 16,9; Spectre de masse (ACPI) [M]⁺ à m/z 336,80. Composé **62** Spectre de masse (ACPI) [M]⁺ à m/z 336,80. **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,10 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,69–7,58 (m, 3H), 5,40 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 3,93 (m, 2H), 3,30–3,27 (m, 2H), 1,76 (s, 3H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 181,0, 175,5, 150,2, 134,8, 132,3, 130,0, 129,8, 126,0, 124,5, 115,4, 88,2, 70,5, 69,1, 29,9, 21,8.

III.4.11 Hémisynthèse du composé **59** (3-bromo-2-(hydroxyméthyl)-2-méthyl-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromène-5,6-dione)

Confère synthèse du composé **58**.

III.4.12 Hémisynthèse du composé **60** (Lomatiol)

A une suspension de SeO₂ (7,2 mg, 0,06 mmol) et d'acide salicylique (10,8 mg, 0,156 mmol) dans le DCM sec (6 mL) à 0°C est ajouté le TBHP (490 µL, 6 M) et le composé **4** (200 mg, 0,84 mmol) dans le DCM sec (6 mL) et la solution résultante est homogénéisée à température ambiante pendant 2 h. A la fin de la réaction indiquée par CCM, de l'eau (15 mL) est ajouté au mélange réactionnel et extrait avec le DCM (2 x 15 mL). La phase organique collectée est séchée sous Na₂SO₄ anhydre et concentrée sous pression réduite pour donner le produit brut, qui est purifié au moyen d'une chromatographie sur colonne remplie au gel de silice utilisant le système hexane/acétate 30–40% comme éluant. Du lomatiol pure **60** (191 mg, 90%) est ainsi obtenu sous forme de cristaux jaunes. Composé **60** **RMN** ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 8,03 (m, 1H), 7,98 (m, 1H), 7,68 (m, 1H), 7,59 (m, 1H), 5,43 (t, 7,23 Hz, 1H), 3,93 (s, 2H), 3,28 (s, 2H), 1,17 (s, 3H); **RMN** ¹³C (100 MHz, CDCl₃): δ 184,6, 181,7, 153,1, 137,0, 135,1, 133,1, 129,6, 129,6, 127,0, 126,3, 122,9, 121,2, 68,8, 22,3, 13,9.

III.4.13 Hémisynthèse du composé **61** ((R)-2-((S)-1,2-dihydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione (+)-)

Confère synthèse du composé **57**.

III.4.14 Hémisynthèse du composé 62 (2-(2-bromo-1-hydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione)

Confère synthèse du composé 58.

III.4.15 Hémisynthèse du composé 63 (2-(2-bromo-1-hydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione)

Confère synthèse du composé 58.

III.4.16 Hémisynthèse du composé 64 (acétate de 3-((3-(hydroxyméthyl)-3-méthoxypropan-2-yl)méthyl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalène-2-yl)

Le composé **65** (90mg, 0,36mmol) est dissout dans 3,6 mL de DCM sec, refroidit à 3°C et 2 equiv de MCPBA a été ajouté. La réaction est maintenue à cette température pendant 2 heures et suivie par CCM. Une solution saturée de chlorure d'ammonium est ajoutée à la fin et le milieu réactionnel est ramené à la température ambiante suivi par une extraction utilisant le DCM sec, sous Na₂SO₄ anhydre, puis purifié par chromatographie sur colonne sous gel de silice (gradient d'élution le système hexane/acétate 40-80%) pour donner le mélange racémique **64** (95%) sous forme d'huile jaune. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):** δ 8,13–8,08 (m, 2H), 7,77–7,72 (m, 2H), 3,65 (d, J = 12 Hz, 1H), 3,55 (d, J = 12,4 Hz, 1H), 3,23 (t, J = Hz, 1H), 2,94 (dd, J = 5,2, 13,6 Hz, 1H), 2,80 (dd, J = 6,8, 3,6 Hz, 1H), 2,40 (s, 3H), 1,40 (s, 3H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):** δ 184,3, 177,9, 168,0, 152,5, 135,5, 134,4, 134,1, 131,9, 126,9, 126,8, 65,1, 61,7, 58,0, 23,8, 20,6, 14,4.

III.4.17 Hémisynthèse du composé 68 (2-hydroxy-3-(2-méthylprop-1-enyl)naphthalène-1,4-dione)

A une solution homogénéisée de lapachol (200 mg, 0,84 mmol) dans un système dioxane–eau (12 mL, 3 : 1) est ajouté Na₂CO₃ (108 mg, 1,08 mmol). Le mélange résultant est traité avec 30% H₂O₂ (0,4 mL) et homogénéisé à 60 °C pendant 1.5 h, le milieu réactionnel est refroidit à 0 °C puis traité avec HCl 36% (1 mL), suivi avec de l'eau et saturé avec SO₂, l'azote gazeux est barboté dans le milieu réactionnel pendant 30 min. puis une solution de NaOH 25% (2 mL) et CuSO₄ (0,8 g, 5 mmol, dans 7 mL H₂O) a été ajouté et homogénéisé à 50 °C pendant 1 h, le milieu réactionnel est refroidit à la température ambiante, filtré, le filtrat est traité avec HCl conc. (1 mL) pour ajuster le pH à 2 et extrait avec CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), sec sous Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. La purification chromatographique sur colonne remplie au gel de silice éluée au système hexane/acétate 20–30% donne le composé pur **68** (194 mg, 90%) sous forme de cristaux jaunes. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 7,87–7,80 (m, 2 H), 7,50–7,40 (m, 2 H), 7,25 (s, 1 H), 5,72 (s, 1 H), 1,72 (d, J = 4,4 Hz, 3 H), 1,40 (d, J = 4,8 Hz, 3 H);

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 184,8, 181,6, 151,2, 143,7, 134,9, 133,0, 132,9, 129,5, 126,9, 126,1, 120,9, 113,6, 26,6, 21,8.

III.4.18 Hémisynthèse du composé 65 ((E)-3-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl acétate ou acétate de lomatiol)

A une suspension de SeO₂ (8,8 mg, 0.07 mmol) et d'acide salicylique (13,2 mg, 0,095 mmol) dans le DCM sec (7 mL) à 0 °C est ajouté TBHP (600 µL, 6 M) et le composé **66** (68 mg, 0,24 mmol) dans le DCM sec (7 mL) et la solution résultante est homogénéisée à température ambiante pendant 2 h. A la fin de la réaction suivie par CCM, de l'eau (5 mL) est ajouté au mélange réactionnel et extrait à l'aide du DCM (2 x 5 mL). La phase organique est asséchée sous Na₂SO₄ anhydre et concentrée sous pression réduite pour donner le produit brut. Ce produit est purifié sur colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 30–40% pour donner l'acétate de lomatiol pur **65** (65 mg, 90%) sous forme de cristaux jaunes. **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃): δ 8,09 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 8,05 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,74 (t, J = 7,6Hz, 1H), 7,67 (t, J = 7,6Hz, 1H), 5,49 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 3,99 (s, 2H), 3,48 (d, J = 7,2Hz, 2H), 2,31 (s, 3H) et 1,86 (s, 3H); **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃): δ 184,6, 181,7, 169,1, 153,1, 136,9, 135,1, 133,1, 132,9, 129,5, 126,9, 126,3, 122,9, 121,2, 68,7, 22,4, 22,3, 13,9.

III.4.19 Hémisynthèse du composé 66 (acétate de 3-(3-methylbut-2-en-1-yl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl ou acétate de lapachol)

A une solution homogénéisée de lapachol **4**, (350 mg, 1,44 mmol) dans le CH₂Cl₂ (8 mL), à 0 °C, 2,6-lutidine (0,33 mL, 2,9 mmol) et du chlorure d'éthanoyle (0,2 mL, 2,9 mmol) ont été ajoutés successivement. Le mélange réactionnel résultant est homogénéisé pendant 3 h pour donner le produit brut. Ce produit est purifié sur colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–20% pour donner le dérivé acétylé du lapachol pur (328 mg, 80%) sous forme de cristaux jaune. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)**: δ 8,13 (m, 1 H), 8,10 (m, 1 H), 7,77 (dd, J = 6,4, 4,3 Hz, 1H), 7,74 (dd, J = 6,5, 4,5 Hz, 1H), 5,10 (m, 1H), 3,31 (s, 1H), 3,29 (s, 1H), 2,42 (s, 3H), 1,78 (s, 3H), 1,70 (s, 3H).

III.4.20 Hémisynthèse du composé 67 (+) 3-(((2S,3S)-3-(Hydroxymethyl)-3-methyloxiran-2-yl)methyl)-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalen-2-yl acetate

L'époxidation asymétrique de Sharpless du composé **65** (60 mg, 0,2 mmol) suivant la même procédure décrite précédemment (synthèse du composé **57**) donne (+)-**67** (50 mg, 80%) sous forme d'huile jaune clair. HPLC du composé (+)-**67** (Daicel AD-H, 20% IPA/hexane, vitesse d'éluion 1 mL min⁻¹, λ = 254 nm, 90% ee): tR 17,54 min (enantiomère majeure) et 19,82 min (enantiomère mineure). [α]_D²⁷ + 101,1 (c 0,2, CHCl₃); **RMN ¹H** et **¹³C** (voire composé **64**).

III.4.21 Hémisynthèse du composé **68** (2-hydroxy-3-(2-methylprop-1-enyl)naphthalene-1,4-dione)

A un mélange homogénéisé de lapachol (102 mg, 0,42 mmol) dans le système dioxane-eau (6 mL, 3 : 1) est ajouté du Na₂CO₃ (54 mg, 0,54 mmol). Le mélange obtenu est traité avec H₂O₂ 30% (0,2 mL) et homogénéisé à 60 °C pendant 1,5 h, le mélange réactionnel est refroidi à 0 °C puis traité avec du HCl 36% (0,5 mL), suivi par H₂O et saturé avec SO₂, l'azote gazeux est barboté à l'intérieur du milieu réactionnel pendant 30 min. Puis une solution de NaOH 25% (1 mL) et CuSO₄ (0,4 g, 2,5 mmol, dans 3,5 mL H₂O) est ajouté et homogénéisé à 50 °C pendant 1 h, le milieu réactionnel est refroidi à la température ambiante, filtré, le filtrat est traité à l'HCl conc (0,5 mL) pour ajuster le pH à 2 et extrait avec CH₂Cl₂ (3 × 5 mL), séché avec Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Ce produit est purifié sur colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 20–30% pour donner le composé pur **68** (97 mg, 90%) sous forme de cristaux jaunes.

III.4.22 Hémisynthèse du composé **69** (3,4-dihydro-4-hydroxy-2,2-diméthyl-2H-indeno-[1,2-b]furan-4-carboxylic acid)

Une solution de nor β -lapachone **70** (50 mg, 0,21 mmol) dans l'acetonitrile (2 mL) à température ambiante, est traitée avec une solution de NaOH 3 N (1 mL) et le mélange est homogénéisé pendant 6 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est acidifié à pH 5 à l'aide de HCl 5% (2 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué à l'eau (5 mL) et du CH₂Cl₂ (5 mL) est ajouté. Les deux phases sont séparées et le mélange réactionnel est extrait avec du CH₂Cl₂ (2 × 5 mL), la phase organique collectée est séchée sous Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Ce produit est purifié sur colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–20% pour donner le composé pur **69** (49 mg, 90%) sous forme de cristaux jaunes. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,11–8,06 (m, 2 H), 7,76–7,66 (m, 2 H), 2,87 (s, 2 H), 1,30 (s, 6 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 186,2, 181,2, 155,3, 134,8, 133,5, 132,5, 129,8, 127,0, 126,3, 121,0, 72,8, 36,8, 29,7.

III.4.23 Hémisynthèse du composé **70** (2,2-diméthyl-2,3-dihydronaphtho[1,2-b]furan-4,5-dione)

A un mélange homogénéisé de norlapachol **68** (100 mg, 0,42 mmol) à 0 °C, est ajouté de l'eau (4 mL) suivi par H₂SO₄ conc. (0,4 mL, 0,62 mmol) et le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 3 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est dilué à l'eau glacée (10 mL) et extrait avec du CH₂Cl₂ (2 × 10 mL). La phase organique collectée est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporée sous pression réduite pour donner le produit brut. Ce produit est

purifié sur colonne chromatographique remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–15% pour donner le composé pur **70** (80 mg, 80%) sous forme de cristaux rouges. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,06 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,62 (m, 2 H), 7,58–7,56 (m, 1 H), 2,93 (s, 2 H), 1,60 (s, 6 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 181,4, 175,7, 168,8, 134,5, 131,9, 130,9, 129,4, 127,9, 124,6, 115,0, 93,8, 39,3, 28,4.

III.4.24 Hémisynthèse du composé **71** ((1'S,2S)-1'-hydroxy-5,5-dimethyl-3'-oxo-1',3',4,5-tetrahydro-3H-spiro[furan-2,2'-indene]-1'-carboxylate de méthyl)

Dissoudre le composé **73** dans du méthanol et agiter à l'agitateur magnétique 30 min à température ambiante. A la fin de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite; le substrat résultant est dissout avec AcOEt (7 mL), lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (2 \times 5 mL), H₂O (2 \times 5 mL) et une solution saturée de NaCl (5 mL) puis séché avec du Na₂SO₄ anhydre. Le solvant est évaporé sous pression réduite, et ensuite une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–25%) du produit brut donne les composés purs **72** (40%) et **71** (5%) respectivement.

Les composés **71** et **72** sont obtenus sous forme de cristaux blancs. Composé **71** : **RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃)** δ 7,82 (td, J = 6,8, 1,2 Hz, 1 H), 7,74 (td, J = 6,4, 0,8 Hz, 1 H), 7,67 (dt, J = 6,0, 4,0 Hz, 1 H), 7,53 (dt, J = 6,0, 0,8 Hz, 1 H), 3,66 (s, 3 H), 1,91 (m, 2 H), 1,75 (m, 2 H), 1,46 (s, 3 H), 1,0 (s, 3 H). Composé **72** : **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 7,81 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,63 (dt, J = 7,6, 1,2 Hz, 1 H), 7,57 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,52 (dt, J = 7,6, 0,8 Hz, 1 H), 3,64 (s, 3 H), 2,44 (m, 1 H), 1,93 (m, 2 H), 1,43 (s, 3 H), 1,30 (s, 3 H); **RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)** δ 201,8, 173,5, 148,2, 135,6, 135,3, 129,9, 124,2, 123,5, 95,8, 85,0, 82,4, 53,9, 38,3, 33,0, 28,4, 28,1.

III.4.25 Hémisynthèse du composé **72** ((4aS,9bR)-4a-hydroxy-2,2-dimethyl-5-oxo-3,4,4a,5-tetrahydroindeno[1,2-b]pyran-9b(2H)-carboxylate de méthyl)

Confère synthèse du composé **71**.

III.4.26 Hémisynthèse du composé **73** (methyl 1,2-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylate)

A une solution homogénéisée de KOH 50% (30 mL) dans l'éther éthylique (10 mL) à 0 °C, N-nitroso-N-méthyluré (130 mg, 1.2 mmol) est ajouté. La phase organique jaune obtenue est séparée, séchée avec des pastilles de KOH et ajouté au composé **74** (250 mg, 0.9 mmol) dans l'éther (25 mL), le mélange réactionnel est homogénéisé pendant 2 h et le solvant est évaporé sous pression réduite. La purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–25%) donne 183 mg du composé pur **73** (70%) sous forme de cristaux blancs. **RMN ¹H (400 MHz CDCl₃)** δ 7,78 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,69 (dt, J = 7,6, 0,8 Hz,

1 H), 7,62 (d, $J = 7,6$ Hz, 1 H), 7,53 (dt, $J = 7,6, 0,8$ Hz, 1 H), 5,06 (qt, $J = 6,8, 2,4, 1,2$ Hz, 1 H), 4,43 (s, 1 H), 3,62 (s, 3 H), 3,16 (m, 1 H), 2,74 (dd, $J = 14,8, 8,4$ Hz, 1 H), 2,10 (dd, $J = 14,8, 6,8$ Hz, 1 H), 1,64 (s, 3 H), 1,49 (s, 3 H); **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)** δ 202,2, 173,0, 148,6, 137,6, 135,5, 135,0, 130,2, 124,3, 123,6, 116,5, 87,5, 83,3, 53,8, 34,0, 26,0, 18,0.

III.4.27 Hémisynthèse du composé 74 (1,2-dihydroxy-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylic acid)

A une solution homogénéisée de lapachol (300 mg, 1,2 mmol) dans le dioxane (20 mL), et de l'eau (20 mL) à température ambiante est ajouté Na_2CO_3 (280 mg, 2,6 mmol). Le mélange obtenu est traité avec H_2O_2 30% (600 μL) et homogénéisé à température ambiante pendant 1.5 h. le mélange réactionnel est saturé avec une solution saturée de NaCl (50 mL) et extrait avec CH_2Cl_2 (2×50 mL), la phase organique collectée est séchée avec du Na_2SO_4 anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluee au système hexane/acétate 5–10% donne un composé pur et amorphe **74** (270 mg, 90%). **RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz)** δ 7,71–7,63 (m, 3 H), 7,50–7,46 (m, 1 H), 5,08 (m, 1 H), 2,62 (dd, $J = 14,4, 6,8$ Hz, 1 H), 2,16 (dd, $J = 14,4, 6,8$ Hz, 1 H), 1,53 (s, 3 H), 1,37 (s, 3 H). **RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD)** δ 207,3, 184,5, 154,2, 137,7, 137,5, 137,4, 131,5, 126,0, 125,2, 120,5, 90,2, 87,5, 36,5 28,0, 19,8.

III.4.28 Hémisynthèse du composé 75 (acide 2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dihydroxy-2,2-dimethylindeno-[1,2-b]pyran-5-carboxylique)

Une solution du composé **53** (75 mg, 0.23 mmol) dans l'acétonitrile (2 mL) à température ambiante est traitée avec une solution de NaOH 3 N (1 mL) et homogénéisé pendant 10 h à température ambiante. Le milieu réactionnel est acidifié à pH 5 avec HCl 5% (2 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué avec de l'eau (5 mL) et extrait avec CH_2Cl_2 (2×5 mL). La phase organique collectée est séchée avec du Na_2SO_4 anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluee au système hexane/acétate 10–20%) donne le composé pur **75** (45 mg, 70%) sous forme de cristaux jaunes. **RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD)** δ 7,95 (d, $J = 7,6$ Hz, 2 H), 7,64 (m, 2 H), 3,56 (dd, $J = 9,6, 3,3$ Hz, 1 H), 2,73 (dd, 1 H), 2,71 (dd, 1 H), 1,18 (s, 3 H), 1,16 (s, 3 H); **RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD)** δ 186,9, 156,2, 135,4, 135,3, 134,0, 131,7, 127,2, 126,8, 123,5, 78,3, 78,3, 74,0, 26,8, 25,6, 25,4.

III.4.29 Hémisynthèse du composé **53** (3-bromo-2,2-diméthyl-3,4-dihydro-2H-benzo[h]-chromène-5,6-dione)

Une solution homogénéisée de lapachol **4**, (100 mg, 0,41 mmol) dans le CH₂Cl₂ (2,3 mL), à température ambiante, est traitée avec du Br₂ (11,4 µL, 1,44 mmol) pendant 10 min. le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–20%) donne le composé pur **53** (126 mg, 95%). **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,04 (t, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,81 (t, J = 8,0 Hz, 1 H), 7,67 (q, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,53 (q, J = 7,6 Hz, 1 H), 4,29-4,23 (m, 1 H), 3,24-3,16 (m, 1 H), 3,02–2,93 (m, 1 H), 1,63 (d, J = 9,6 Hz, 3 H), 1,60 (d, J = 9,6 Hz, 3 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 179,1, 177,9, 161,1, 135,0, 131,6, 131,2, 130,0, 128,8, 124,3, 111,0, 81,1, 49,9, 27,9, 26,1, 23,7.

III.4.30 Hémisynthèse du composé **76** (5-hydroxy-2,2-diméthyl-4-oxo-2,3,4,5-tetrahydroindeno[1,2-b]pyran-5-carboxylate de méthyl)

Méthylation du composé **78** avec le diazométhane. A Une solution homogénéisée de KOH 50% (10 mL) dans Et₂O (5,0 mL) à 0 °C, le N-nitroso-N-méthylurée (22,5 mg, 0,16 mmol, 2 eq) est doucement ajouté. La phase organique jaune obtenue contenant le diazométhane est séparée, séchée avec des pastilles de KOH et ajouté au composé **78** (100 mg, 0,4 mmol) dans Et₂O (10 mL), Le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 2 h et le solvant est évaporé sous pression réduite. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système de gradient hexane/acétate) donne un composé indanique dicarboxylé non attendu **76** (92 mg, 80%) et un ester **77** (11 mg, 10%). Composé **76** : **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,01-7,97 (m, 2 H), 7,65-7,19 (m, 2 H), 4,11 (s, 3 H), 2,80 (s, 2 H), 1,19 (s, 6 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 187,3, 181,5, 159,0, 134,1, 133,7, 131,8, 131,6, 131,3, 126,6, 126,3, 71,7(2C), 61,4, 37,1, 30,1, 29,8. Composé **77** : **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,05-8,04 (m, 2 H), 7,70-7,68 (m, 2 H), 4,14 (s, 3 H), 2,70-2,66 (m, 2 H), 1,75-1,65 (m, 2 H) 1,29 (s, 6 H). **RMN DEPT135 (100 MHz, CDCl₃)** δ 133,9, 133,4, 126,2 (2C), 61,4, 42,4, 29,8, 29,1, 18,9. HRMS (ES⁺) m/z calculé pour C₁₆H₁₉O₄ [M+H]⁺ : 275,1278; trouvé: 275,1297.

III.4.31 Hémisynthèse du composé **77** (5-hydroxy-2,2-diméthyl-2,3,4,5-tetrahydroindeno[1,2-b]pyran-5-carboxylate de méthyl)

Confère synthèse du composé **76**.

III.4.32 Hémisynthèse du composé **78** (2,3,4,5-tetrahydro-5-hydroxy-2,2-dimethylindeno-[1,2-b]pyran-5-carboxylic acid)

Une solution de β -lapachone **9** (50 mg, 0,2 mmol) dans l'acétonitrile (2 mL), à température ambiante est traitée avec une solution de NaOH 3 N (1 mL). Le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 10 h à température ambiante et le milieu est acidifié à pH 5 avec du HCl 5% (2 mL) et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué avec de l'eau (5 mL) et extrait avec CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). La phase organique collectée est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 10–20%) donne le composé pur **78** (43 mg, 80%) amorphe et de couleur rouge. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,12-8,05 (m, 2 H), 7,76-7,53 (m, 2 H), 2,71–2,67 (m, 2 H), 1,71-1,67 (m, 2 H), 1,27 (s, 6 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 185,0, 153,2, 135,0, 133,1, 129,6, 127,1, 126,9, 126,4, 126,3, 124,9, 71,2, 41,7, 36,9, 29,2, 18,5.

III.4.33 Hémisynthèse du composé **79** (1,2-dihydro-3,3-dimethyl-3H-benzo[a]pyrano[2,3-c]phenazine)

Un mélange de 198 mg (0,82 mmol) du composé **9**, 6,34 mmol d'acétate de sodium cristallin, 1,78 mmol d'hydrochloride de phenylenediamine et 3,6 mL d'acide acétique glacial est chauffé un petit moment dans un bain marie et suivi par CCM. Après la réaction, le milieu est dilué avec de l'eau et est conservé toute une nuit. L'huile obtenu est dissout dans du diéthyler et la solution organique lavée à l'eau distillée, séchée avec du sulfate de sodium anhydre, suivi d'une concentration sous vide pour obtenir un résidu amorphe à partir duquel 102 mg (40%) de la phenazine **79** est facilement isolée sous forme de cristaux après une purification au gel de silice éluée avec un gradient du système hexane/acétate de polarité croissante. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 9,34 (m, 1 H), 8,33 (m, 1 H), 8,30 (m, 1 H), 8,24 (m, 1 H), 7,78 (m, 1 H), 7,78 (m, 1 H), 7,78 (m, 1 H), 7,76 (m, 1 H), 3,34 (t, J = 6,5 Hz, 3 H), 2,07 (t, J = 6,5 Hz, 3 H), 1,53 (s, 6 H); **RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃)** 18,4, 32,5, 76,1, 151,6, 129,4, 122,2, 129,5, 127,6, 125,1, 130,6, 140,2, 142,6, 128,8, 129,4, 128,0, 129,6, 140,2, 144,3, 109,7, 26,9.

III.4.34 Hémisynthèse du composé **80** (2-oxyméthyle-3-(3-methylbut-2-enyl)-naphthalene-1,4-dione)

Le Lapachol **4**, (215 mg, 0,86 mmol) dans l'acétonitrile (13 mL) est chauffé avec un bain marie et sous reflux jusqu'à dissolution. La solution obtenue est refroidie à la température ambiante et le carbonate de potassium anhydre (133 mg, 0,95 mmol) suivi par l'iodure de méthyl (86 μ L, 1,38 mmol) sont ajoutés à température ambiante. Le milieu réactionnel est laissé au reflux pendant

6 h, la solution obtenue est refroidie à la température ambiante et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué avec de l'eau (20 mL) et extrait avec du CH₂Cl₂ (2 × 20 mL). La phase organique collectée est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 5-15%) donne le composé pur **80** (137 mg, 60%). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 8,08-8,04 (m, 2 H), 7,72-7,67 (m, 2 H), 5,15-5,12 (m, 1 H), 4,13 (s, 3 H), 3,31 (d, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 1,79 (s, 3 H) 1,69 (s, 3 H); RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) 185,3, 181,8, 157,4, 134,7, 133,7, 133,6, 133,2, 132,0, 131,5, 126,2, 126,0, 120,0, 61,2, 25,8, 23,0, 17,9.

III.4.35 Hémisynthèse du composé **81** (1-hydroxy-2-méthyl-2-(3-méthylbut-2-en-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indène-1-carboxylate de méthyl)

Le lapachol (200 mg 0,84 mmol) dans 4 mL d'acetone sec est chauffé à reflux jusqu'à dissolution. La solution résultante est refroidie à température ambiante et 120.4 mg (0,88 mmol) de carbonate de potassium anhydre est ajouté suivi par 181 mg (1,28mmol) diiodure de méthyl. Le mélange est chauffé sous reflux dans un bain d'huile à 55-60 °C pendant 6 hrs. L'acetone est évaporé et le produit obtenu à partir d'une solution saturée de NaCl et de Chloroforme. La phase organique est purifiée par une chromatographie sur colonne pour donner 80 mg (0,32 mmol, 60 %) du composé **80** avec un système hex/AcOEt à 1 %, et un mélange diastéréoisomérique de 25 mg de 1-hydroxy-2-méthyl-2-(3-méthylbut-2-en-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indène-1-carboxylate de méthyl **81** (10 %) avec un système hex/AcOEt à 12 %. Le composé **81** (mélange diastéréoisomérique) a été purifié par une chromatographie HPLC préparative sur un appareil HPLC avec detection UV à 254 nm (volume d'injection 50 µL) utilisant une collone C₁₈ Alltech Alltima de 5 µm (250 x 10 mm) avec H₂O (0.1 % HCOOH) (A) - MeOH (0.1 % HCOOH) (B) avec un programme de gradient comme suit (debit 4 mL min⁻¹): 80 % A linéaire jusqu'à 100 % B pendant 25 min, après 100 % B isocratique pour 5 min, le system a été retourné dans ses conditions initiales (80 % A) pendant 1 min et a été équilibré pendant 4 min. pour donner **81a** and **81b**. Composé **81** : RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,77 (d, *J*=7,5 Hz, 1H), 7,65 (td, *J*=7,5, 1 Hz, 1H), 7,58 (d, *J*=7,5 Hz, 1H), 7,51 (td, *J*=7,5, 1 Hz, 1H), 4,99 (td, *J*=8,5, 8 Hz, 1H), 3,61 (s, OMe), 2,47 (dd, *J*= 8,5, 14,5 Hz, 1H), 2,05 (dd, *J*= 8,0, 14,5 Hz, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,45 (s, 3H), et 1,11 (s, 3H) RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) 204.6, 174,6, 150,3, 136,5, 134,8, 134,4, 129,6, 123,8, 123,2, 118,9, 83,5, 59,9, 53,4, 35,2, 25,9, 17,7, 14,9.

III.4.36 Hémisynthèse du composé **82** (6-hydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)benzo[a]-phenazin-5(6H)-one)

A une solution homogénéisée du composé **83** (100 mg, 0,36 mmol) dans le système THF-H₂O (8 mL, 1 : 1) à 5 °C, est ajouté du HClO₄70% (7 µL, 0,073 mmol). Le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 3 h à la même température, puis l'*o*-phenylenediamine (50 mg, 0.5 mmol) dissout dans le CH₃CN (1 mL) est ajouté à 5 °C. Le milieu réactionnel est homogénéisé pendant 3 h, à température ambiante, le milieu réactionnel est dilué avec CH₂Cl₂ (5 mL), et extrait avec du CH₂Cl₂ (2 × 5 mL). La phase organique collectée est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit brut. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 15-25%) donne le composé pur **82** (97 mg, 80%) sous forme de cristaux blancs. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,73 (d, J = 8,0 Hz, 1 H), 8,20–8,17 (m, 1 H), 8,15–8,12 (m, 1 H), 8,06 (d, J = 7,6 Hz, 1 H), 7,83–7,74 (m, 3 H), 7,61 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 4,92 (t, J = 7,6 Hz, 1 H), 4,42 (s, 1 H), 2,66 (d, J = 7,6 Hz, 2 H), 1,50 (s, 3 H), 1,14 (s, 3 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 199,0, 153,3, 143,9, 142,2, 141,4, 137,8, 136,1, 135,2, 131,5, 130,8, 130,7, 130,5, 129,5, 129,2, 127,3, 125,7, 116,0, 81,9, 43,2, 25,8, 17,7.

III.4.37 Hémisynthèse du composé **83** (1a-oxyméthyle-7a-(3-methylbut-2-en-1-yl)-1a,7adihydronaphtho[2,3-b]oxirene-2,7-dione)

A une solution homogénéisée du composé **80**, (120 mg, 0,46 mmol) dans le dioxane (2 mL) et de l'eau (2 mL) à température ambiante est ajouté du Na₂CO₃ (56 mg, 0,52 mmol). Le mélange obtenu est traité avec H₂O₂ 30% (120 µL) et homogénéisé pendant 1.5 h. le milieu réactionnel est dilué avec une solution saturée de NaCl (10 mL) et extrait avec CH₂Cl₂ (2 × 10 mL). La phase organique collectée est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et le solvant est évaporé sous pression réduite pour donner le produit pur. Une purification chromatographique (sur colonne remplie au gel de silice et éluée au système hexane/acétate 5-10%) donne le composé pur **83** (120 mg, 95%) qui apparait amorphe. **RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8,06–7,99 (m, 2 H), 7,76–7,72 (m, 2 H), 5,24–5,20 (m, 1 H), 3,85 (s, 3 H), 3,0 (dd, J = 14,5, 7,5 Hz, 1 H), 2,64 (dd, J = 14,5, 6,5 Hz, 1 H), 1,75 (s, 3 H), 1,71 (s, 3 H); **RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)** δ 190,1, 189,7, 136,0, 134,5, 134,2, 132,4, 131,6, 127,5, 127,2, 116,8, 85,9, 70,0, 56,9, 25,9, 24,5, 18,1.

III.5 ACTIVITE BIOLOGIQUE

III.5.1 Lignées cellulaires

La cytotoxicité des composés a été évaluée sur un panel de sept lignées de cellules humaines contenant des modèles *in-vitro* de cancers tels que BE(2)-C, Kelly, SKNSH, CHLA-90 (tous les neuroblastomes ; Esposito et *al.*, 2017 ; Zhao et *al.*, 2016), A549 (Cancer du poumon non

à petites cellules ; Rossi et *al.*, 2017) SKMEL-28 (Melanome ; Amann et *al.*, 2017), U373 (Glioblastome multiforme, Osuka et Meir, 2017). L'usage de cette grande variété de cellules cancéreuses se justifie par l'hétérogénéité des marqueurs cellulaires et moléculaires qui peuvent être exprimés par chaque type de cellule, offrant de ce fait une plus grande variété de possibilités d'activité antiprolifératives des dérivés testés ainsi que l'éventualité des cas de spécificité d'activité.

Les cellules BE(2)-C et SK-N-SH ont été achetées auprès de 'the American Tye Culture Collection' (ATCC). Les cellules Kelly ont été obtenues du conservatoire de lignées cellulaires de l'Institut de recherche sur le cancer de Greehey, 'University of Texas Health Science Center' à San Antonio. Les cellules CHLA-90 ont été obtenus du 'Children's Oncology Group'. Les lignées cellulaires de neuroblastome ont été maintenues dans le DMEM/F12 complété avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine (P/S) sous des conditions de culture standard. Les cellules A549 (DSMZ) sont cultivées dans le milieu de culture RPMI complété avec 10% de FBS désactivé par la chaleur. Les cellules SKMEL-28 (ATCC) et U373 GBM (ECACC) sont cultivées dans le milieu de culture RPMI complété avec 10% de FBS désactivé par la chaleur (Life Technologies code 10270106). Le milieu de culture est complété avec 4 mM de glutamine (Code lonza BE17-605E), 100 µg/mL gentamicine (Code lonza 17-5182), et pénicilline-streptomycine (200 unités/mL et 200 µg/mL) (Code lonza 17-602E) à 37 °C avec 5% de CO₂.

III.5.2 Test de prolifération cellulaire

L'activité antiproliférative des composés testés a été évaluée par le test au MTT (bromure de 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, un tetrazole). Les composés ont été dissout dans le DMSO ou MeOH/CH₂Cl₂ à une concentration de soit 10 mM ou 50 mM en fonction des cellules traitées. Les cellules ont été traitées à la trypsine etensemencées à différentes concentrations, en fonction du type de cellule. Les cellules ont été cultivées pendant 24 h à 72 h, traitées avec les composés à tester aux concentrations requises et incubées pendant 72 h dans un milieu de 100 ou 200 µL en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Le nombre d'expériences et de réplicats variait en fonction de la lignée cellulaire. Les cellules traitées avec 0,1% de DMSO, 1% de CH₂Cl₂ ou 1% de MeOH ont été utilisées comme contrôle négatif. L'effet du traitement du composé sur la survie cellulaire a été évalué en comparant les cellules traitées au composé avec les cellules traitées avec le contrôle, avec $p < 0,05$ considéré comme statistiquement significatif. La CI50 correspond à la concentration du composé d'intérêt qui réduit de 50% la croissance de la lignée de cellules cancéreuses d'intérêt après l'avoir cultivée pendant 72 h en présence du composé par rapport à la condition de contrôle (non traitée).

III.6 DOCKING MOLÉCULAIRE

III.6.1 Base de données des composés

Les structures 2D des composés ont été construites à l'aide du logiciel ChemDraw Ultra 12.0. Le logiciel Chem3D Pro 12.0 a ensuite été utilisé pour convertir tous les composés en 3D, minimiser l'énergie et enregistrer les fichiers au format .pdb. Ensuite, AutoDockTools-1.5.6 (ADT) a été utilisé pour fusionner des atomes d'hydrogène non polaires, ajouter des charges de 'Gasteiger' et configurer des liaisons rotatives via des 'AutoTors'. Enfin, tous les composés ont été enregistrés au format de fichier '.pdbqt', un format nécessaire pour le docking avec AutoDock4.

III.6.2 Structure tridimensionnelle des protéines

Les structures 3D (obtenues par rayon-X) des cibles protéiques utilisées ont été extraites de la banque de données protéiques (PDB) (<http://www.rcsb.org>), notamment: aromatase (PDB: 3EQM), BCL-2 (PDB: 2o2f), CDK-2 (PDB: 1di8), CDK-6 (PDB: 1xo2), Topoisomerase 1 (PDB: 1t8i) et VEGFR2 (PDB: 2oh4). Le ligand co-cristallisé de chaque protéine a été extrait du fichier PDB. ADT a ensuite été utilisé pour attribuer des hydrogènes polaires et des charges de Gasteiger aux structures protéiques et les structures ont également été enregistrées au format .pdbqt. AutoGrid4 a été utilisé pour créer des grilles d'affinité pour chaque structure de protéine et pour tous les types d'atomes présents sur la protéine et les ligands. Toutes les grilles d'affinité sont centrées sur le site actif et les coordonnées sont sélectionnées de manière à englober l'ensemble du site actif pour chaque protéine. La grille d'affinité de 3EQM est un volume de 100 Å sur 100 Å sur 100 Å avec un espacement de 0,375 Å, centré sur les coordonnées $x = 86,312$, $y = 51,204$, $z = 48,26$. La grille d'affinité de 2o2f est un volume de 60 Å sur 60 Å sur 60 Å avec un espacement de 0,375 Å, centrés sur les coordonnées $x = 2,868$, $y = 5,336$, $z = 3,650$. La grille d'affinité de 1di8 est un volume de 60 Å sur 60 Å sur 60 Å avec un espacement de 0,375 Å, centrés sur les coordonnées $x = -8,773$, $y = 50,057$, $z = 12,795$. La grille d'affinité de 1xo2 est un volume de 60 Å sur 60 Å sur 60 Å avec un espacement de 0,375 Å, centrés sur les coordonnées $x = 1,271$, $y = 37,228$, $z = 139,091$. La grille d'affinité de 1t8i est un volume de 60 Å sur 60 Å sur 60 Å avec un espacement de 0,375 Å, centrés sur les coordonnées $x = 19,579$, $y = -1,761$, $z = 28,238$. La grille d'affinité de 2oh4 est un volume de 60 Å sur 60 Å sur 60 Å avec un espacement de 0,508 Å, centrés sur les coordonnées $x = 2460$, $y = 34,813$, $z = 16,278$.

III.6.3 Docking moléculaire sur Autodock4

AutoDock4 (version 4.0.1) avec l'algorithme génétique Lamarckian a été utilisé pour simuler le docking moléculaire protéine-ligand pour les six structures protéiques sélectionnées.

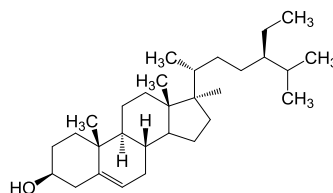
Les paramètres de docking sélectionnés pour les exécutions d'AutoDock4 étaient les suivants : 50 cycles de docking, taille de la population de 200, conformation et position de départ aléatoire, plages de pas de translation de 2,0 Å, taux de mutation de 0,02, taux de croisement de 0,8, taux de recherche locale de 0,06 et 2,5 millions d'évaluations d'énergie. Les conformations dockées ont été regroupées en utilisant une tolérance de 2,0 Å RMSD (root mean square deviation). Toute l'expérience virtuelle a été réalisée sur un ordinateur doté d'un processeur Intel Core I5 à 2,70 GHz. Les valeurs estimées de la constante d'inhibition (Ki) pour tous les composés ont été calculées par AutoDock4 comme suit : $K = \exp((\Delta G * 1000) / (Rcal * TK))$ où ΔG est l'énergie de liaison, Rcal est égal à 1,9719 et TK à 298,15. Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten (km) des ligands naturels sont calculées par AutoDock4 à l'aide de la même équation présentée ci-dessus et les valeurs de pKm ont été calculées à l'aide de l'équation suivante : $pKm = \log(1/Km)$. Les poses 3D des complexes protéines-ligands dockées ont été analysées manuellement à l'aide d'ADT et les images présentées ont été préparées à l'aide du logiciel Discovery Studio (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>).

III.7 CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ISOLES

III.7.1 Triterpènes

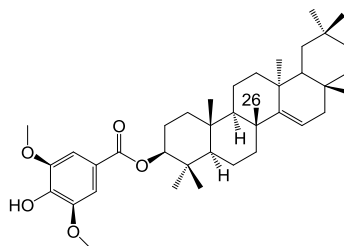
III.7.1.1 KAH2 : β -sistostérol (traces de stigmastérol)

Cristaux blancs
P.F : 132-134°C
Révélation : UV et I₂
Solubilité : CH₂Cl₂.
Formule brute : C₃₀H₅₂O.



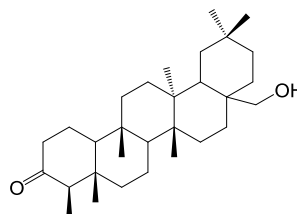
III.7.1.2 KAF4 : Fibrarecisine

Poudre blanche
Révélation : UV et I₂
Solubilité : CH₂Cl₂.
Formule brute : C₃₈H₅₅O₅.



III.7.1.3 KAF5 : Canophyllol

Poudre blanche
P.F : 282-283°C
Révélation : UV et I₂
Solubilité : CH₂Cl₂.
Formule brute : C₃₀H₅₀O₂.



III.7.1.4 KAF10 : Acide pomolique

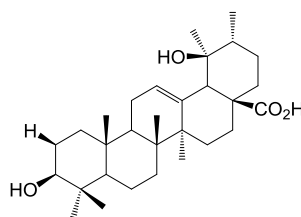
Poudre blanche

P.F : 298-300°C

Révélation : UV et I₂

Solubilité : CH₂Cl₂.

Formule brute : C₃₀H₄₈O₄



III.7.2 Coumarines

III.7.2.1 KAH7 : 6-hydroxycoumarine

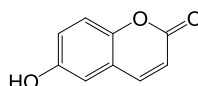
Cristaux blancs

P.F : 229-230 °C

Révélation : UV et I₂

Solubilité : (CH₃)₂CO.

Formule brute : C₉H₆O₃



III.7.3 Quinones

III.7.3.1 KAH10b : Lapachol

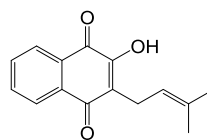
Cristaux jaunes

P.F : 138 °C

Révélation : UV et I₂

Solubilité : CH₂Cl₂.

Formule brute : C₁₅H₁₄O₃



III.7.3.2 KAH20 : Dehydro-α-lapachone

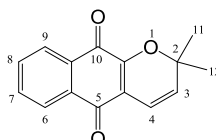
Cristaux rougeâtres

P.F : 142 °C

Révélation : UV et I₂

Solubilité : CH₂Cl₂.

Formule brute : C₁₅H₁₂O₃



III.7.3.3 KAH21 : 2-Acetyl-naphtho [2,3-b]furan-4,9 dione

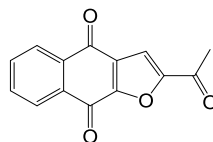
Cristaux jaunes

P.F : 223-224 °C

Révélation : UV et I₂

Solubilité : CH₂Cl₂.

Formule brute : C₁₄H₈O₄



REFERENCES

- Agyare, C., Asase, A., Lechtenberg, M., Nihues, M., Deters, A., & Hensel, A. (2009). An ethnopharmacological survey and in vitro confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*, *125*, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.024>
- Aksenov, A. V., Smirnov, A. N., Magedov, I. V., Reisenauer, M. R., Aksenov, N. A., Aksenova, I. V., ... Frolova, L. V. (2015). Activity of 2-Aryl-2-(3-indolyl)acetoxyhydroxamates against Drug-Resistant Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry*, *58*(5), 2206–2220. <https://doi.org/10.1021/jm501518y>
- Akulapalli, S. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science Therapy*, *1*(2), 1. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2927383/>
- Akunyili, D. N., & Houghton, P. J. (1993). Meroterpenoids and naphthaquinones from *Kigelia pinnata*. *Phytochemistry*, *32*(4), 1015–1018. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85246-N](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85246-N)
- Amann, V. C., Ramelyte, E., Thurneysen, S., Pitocco, R., Bentele-Jaberg, N., Goldinger, S. M., ... Mangana, J. (2017). Developments in targeted therapy in melanoma. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, *43*(3), 581–593. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.10.014>
- Antonio Nardi, Mara Sada, Annibale Salvi, & Stefano Maiorana. (2010). Process for the preparation of trans-2,3Disubstituted naphthoquinones - US7842840B2 - United States Patent. Retrieved from <https://patents.google.com/patent/US7842840B2/en>
- Armstrong, J. E. (1985). The delimitation of bignoniaceae and Scrophulariaceae based on floral anatomy, and the placement of problem genera. *American Journal of Botany*, *72*(5), 755–766. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1985.tb08336.x>
- Arnold, H. J., & Gulumian, M. (1984). Pharmacopoeia of traditional medicine in Venda. *Journal of Ethnopharmacology*, *12*, 35–74. Retrieved from <http://www.ethnopharmacologia.org/prelude2018/pdf/biblio-ha-22-arnold.pdf>
- Arrault, A. (2007). *Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma*. Université d'Orleans.
- Baskauf, S. J. (2002). *Campsis radicans* (Bignoniaceae) - fruit - lateral or general close-up. Retrieved January 31, 2019, from <http://bioimages.vanderbilt.edu/baskauf/17397>
- Bastard, K. (2005). *Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques*. Thèse Doctorat. Université de paris 7.
- Binutu, O., Adesogan, K., & Okogun, J. (1996). Antibacterial and Antifungal Compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Medica*, *62*(04), 352–353. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957900>
- Block, J. B., Serpick, A. A., Miller, W., & Wiernik, P. H. (1974). Early clinical studies with lapachol (NSC-11905). *Cancer Chemotherapy Reports. Part 2*, *4*(4), 27–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4614904>
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(3), 135–160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725110>
- Bonner, F. (2010). southern catalpa, *Catalpa bignonioides* (Scrophulariales: Bignoniaceae) - 5424006. Retrieved January 31, 2019, from <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5424006>
- Bremer, B., Bremer, K., Heidari, N., Erixon, P., Olmstead, R. G., Anderberg, A. A., ... Barkhordarian, E. (2002). Phylogenetics of asterids based on 3 coding and 3 non-coding chloroplast DNA markers and

the utility of non-coding DNA at higher taxonomic levels. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24(2), 274–301. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00240-3)

- Brooijmans, N., & Kuntz, I. D. (2003). Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 32(1), 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- Buchan, S. (2006). Fruits of *Crescentia cujete* (Calabash). Retrieved January 31, 2019, from <https://www.flickr.com/photos/stephenbuchan/526272103/in/photostream/>
- Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9), 239–242. <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i9.11613>
- Ciesla, W. M. (2018). trumpetflower, *Tecoma stans* (Scrophulariales: Bignoniaceae) - 5579280. Retrieved January 31, 2019, from <https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5579280>
- Consolacao, D., Linardi, M., De Oliveira, M. M., Sampaio, M. R. P., & Sampaio, M. R. (1975). Lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18(11), 1159–1161. <https://doi.org/10.1021/jm00245a027>
- Dasari, R., De Carvalho, A., Medellin, D. C., Middleton, K. N., Hague, F., Volmar, M. N. M., ... Kornienko, A. (2015). Wittig derivatization of sesquiterpenoid polygodial leads to cytostatic agents with activity against drug resistant cancer cells and capable of pyrrolylation of primary amines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.047>
- de Miranda, F. G., Vilar, J. C., Alves, I. A., Cavalcanti, S. C., & Antonioli, A. R. (2001). Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology*, 1, 6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11574048>
- Dennis, S. (2002). *Parmentiera cereifera* (Bignoniaceae) image 322 at PlantSystematics.org. Retrieved January 31, 2019, from http://www.plantsystematics.org/imgs/dws/r/Bignoniaceae_Parmentiera_cereifera_322.html
- Douay, L. (2001). La thérapie cellulaire pour l'intensification thérapeutique en onco-hématologie : manipulation des greffons de cellules souches périphériques. *Bulletin Du Cancer*, 88(9), 826–832. Retrieved from https://www.jle.com/fr/revues/bdc/e-docs/la_therapie_cellulaire_pour_l_intensification_therapeutique_en_onco_hematologie_manipulation_des_greffons_de_cellules_souches_peripheriques_70293/article.phtml
- Dréo, J., Pétrowsky, A., Siarry, P., & Taillard, E. (2003). *Métaheuristiques pour l'optimisation difficile [recuit simulé, recherche avec tabous, algorithmes évolutionnaires et algorithmes génétiques, colonies de fourmis ...]*. Eyrolles. Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00843020>
- Duarte, D. S., Dolabela, M. F., Salas, C. E., Raslan, D. S., Oliveiras, A. B., Nenninger, A., ... Lopes, M. T. P. (2000). Chemical Characterization and Biological Activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(3), 347–352. <https://doi.org/10.1211/0022357001773904>
- Dupont, B. (2013). File:Sausage Tree (*Kigelia africana*) fruit (11493304814).jpg - Wikimedia Commons. Retrieved January 31, 2019, from [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sausage_Tree_\(Kigelia_africana\)_fruit_\(11493304814\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sausage_Tree_(Kigelia_africana)_fruit_(11493304814).jpg)
- EL- Sayyad, S. . (1982). Flavonoids of the Leaves and Fruits of *Kigelia pinnata*. *Fitoterapia*, 52, 189–191.
- Epifano, F., Genovese, S., Fiorito, S., Mathieu, V., & Kiss, R. (2014). Lapachol and its congeners as

-
- anticancer agents: a review. *Phytochemistry Reviews*, 13(1), 37–49. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9289-1>
- Esposito, M. R., Aveic, S., Seydel, A., & Tonini, G. P. (2017). Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0319-y>
- Eyong, K.O., Ketsemen, H. L., Ghansenyuy, S. Y., & Folefoc, G. N. (2015). Chemical constituents, the stereochemistry of 3-hydroxy furonaphthoquinones from the root bark of *Newbouldia laevis* Seem (Bignoniaceae), and screening against *Onchocerca ochengi* parasites. *Medicinal Chemistry Research*, 24(3). <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1173-z>
- Eyong, Kenneth O., Chinthapally, K., Senthilkumar, S., Lamshöft, M., Folefoc, G. N., & Baskaran, S. (2015). Conversion of lapachol to lomatiol: synthesis of novel naphthoquinone derivatives. *New Journal of Chemistry*, 39(12), 9611–9616. <https://doi.org/10.1039/C5NJ01484K>
- Eyong, Kenneth O., Foyet, H. S., Eyong, C. A., Sidjui, L. S., Yimdjo, M. C., Nwembe, S. N., ... Nastasa, V. (2013). Neurological activities of lapachol and its furano derivatives from *Kigelia africana*. *Medicinal Chemistry Research*, 22(6), 2902–2911. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0284-7>
- Eyong, Kenneth O., Kumar, P. S., Kuete, V., Folefoc, G. N., Nkengfack, E. A., & Baskaran, S. (2008). Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(20), 5387–5390. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2008.09.053>
- Eyong, Kenneth O, Hussain, H., Folefoc, G. N., Nkengfack, A. E., Saeftel, M., Sarite, S. R., ... Krohn, K. (2011). Synthesis of novel phenazine derivatives by solid state chemistry and preliminary screening against plasmodium falciparum in vitro. *Rasayan Journal of Chemistry*, 4(4), 713–722. Retrieved from <http://www.rasayanjournal.com>
- Eyong, Kenneth O, Puppala, M., Kumar, P. S., Lamshöft, M., Folefoc, G. N., Spitteller, M., & Baskaran, S. (2013). A mechanistic study on the Hooker oxidation: synthesis of novel indane carboxylic acid derivatives from lapachol. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 11(3), 459–468. <https://doi.org/10.1039/c2ob26737c>
- Fieser, L. F. (1927). The alkylation of hydroxynaphthoquinone. III. A synthesis of lapachol. *Journal of the American Chemical Society*, 49(3), 857–864. <https://doi.org/10.1021/ja01402a030>
- Fieser, L. F., & Fieser, M. (1948). Naphthoquinone Antimalarials. XII. The Hooker Oxidation Reaction ¹. *Journal of the American Chemical Society*, 70(10), 3215–3222. <https://doi.org/10.1021/ja01190a005>
- Fiorito, S., Epifano, F., Bruyère, C., Mathieu, V., Kiss, R., & Genovese, S. (2014). Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(2), 454–457. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2013.12.049>
- Forest, & Kim, S. (1986). catclaw-vine, *Macfadyena unguis-cati* (Scrophulariales: Bignoniaceae) - 5418802. Retrieved January 31, 2019, from <https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5418802>
- Frosina, G. (2000). Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *European Journal of Biochemistry*, 267(8), 2135–2149. [https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01266.X@10.1002/\(ISSN\)1742-4658\(CAT\)FREEREVIEWCONTENT\(VI\)REVIEWS9613](https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01266.X@10.1002/(ISSN)1742-4658(CAT)FREEREVIEWCONTENT(VI)REVIEWS9613)
- Fu, J.-L., Tan, C.-H., Lin, L.-P., Huang, J., & Zhu, D.-Y. (2007). Fibrarecisin, a novel triterpenoid from *Fibraurea recisa* with antitumor activity. *Natural Product Research*, 21(4), 351–353. <https://doi.org/10.1080/14786410701193197>
- Gates, M., & Moesta, D. L. (1948). Syntheses in the Lapachol Series. *Journal of the American Chemical Society*, 70(2), 614–616. <https://doi.org/10.1021/ja01182a051>

-
- Gentry, A. H. (1980). Bignoniaceae. Part I. Tribes Crescentieae and Tourretieae. *Flora Neotropica Monograph*, 25, 1–131.
- Gerber, D. E., Bisen, A. K., Beg, M. S., Frankel, A. E., Fatunde, O., Fattah, F., ... Leff, R. (2017). Phase 1 study of ARQ 761, a β -lapachone analog that promotes NQO1-mediated programmed cancer cell necrosis. *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), 2517–2517. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.2517
- Gouda, Y. G., Abdel-baky, A. M., Darwish, F. M., Mohamed, K. M., Kasai, R., & Yamasaki, K. (2003). Iridoids from *Kigelia pinnata* DC. fruits. *Phytochemistry*, 63(8), 887–892. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00262-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00262-0)
- Gouda, Y. G., Abdel-baky, A. M., Mohamed, K. M., Darwish, F. M., Kasai, R., & Yamasaki, K. (2006). Phenylpropanoid and phenylethanoid derivatives from *Kigelia pinnata* DC. fruits. *Natural Product Research*, 20(10), 935–939. <https://doi.org/10.1080/14786410500462702>
- Govindachari, T. R., Patankar, S. J., & Viswanathan, N. (1971). Isolation and structure of two new dihydroisocoumarins from *Kigelia pinnata*. *Phytochemistry*, 10(7), 1603–1606. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(71\)85032-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(71)85032-X)
- Grace, O., M., & Davis, S., D. (2002). *Kigelia africana* (Lam.) Benth. Retrieved December 16, 2019, from [https://uses.plantnet-project.org/fr/Kigelia_africana_\(PROTA\)](https://uses.plantnet-project.org/fr/Kigelia_africana_(PROTA))
- Grace, O. M., & Davis, S. D. (2002). *Kigelia africana* (Lam.) Benth. In L. P. A. Oyen, R. H. M. J. Lemmens, S. D. Davis, M. Chauvet, & J. S. Siemonsma (Eds.), *Ressources végétales de l'Afrique tropicale* (pp. 111–116). Wageningen, Pays-Bas. Retrieved from [https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=pe&p=Kigelia+africana+\(Lam.\)+Benth.](https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=pe&p=Kigelia+africana+(Lam.)+Benth.)
- Grosfeld, J. (2009). *Ecremocarpus scaber*. Retrieved January 31, 2019, from <https://www.flickr.com/photos/stationalpinejosephfourier/4408613162/in/photolist-4bkkqg-7Hzi6L/>
- Gupta, M. M., Lal, R. N., & Shukla, Y. N. (1981). 5 α -Stigmast-9(11)-en-3 β -ol, a sterol from *Costus speciosus* roots. *Phytochemistry*, 20(11), 2557–2559. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)83093-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)83093-2)
- Habtemariam, S. (2010). Knipholone anthrone from *Kniphofia foliosa* induces a rapid onset of necrotic cell death in cancer cells. *Fitoterapia*, 81(8), 1013–1019. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.021>
- Hajduk, P. J., & Greer, J. (2007). A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(3), 211–219. <https://doi.org/10.1038/nrd2220>
- Hall, J., & Angèle, S. (1999, April 1). Radiation, DNA damage and cancer. *Molecular Medicine Today*. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(99\)01435-5](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01435-5)
- Harlan, B. H. (1967). trumpet creeper, *Campsis radicans* (Scrophulariales: Bignoniaceae) - 5504465. Retrieved January 31, 2019, from <https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5504465>
- Hattori, M., Kuo, Kue-P., Shu, Y.-Z., Tezuka, Y., Kikuchi, T., & Namba, T. (1988). A triterpene from the fruits of *Rubus chingii*. *Phytochemistry*, 27(12), 3975–3976. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83061-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83061-9)
- Hodouto, K.-K. (1990). Etude chimique des plantes a flavonodes du Togo. *Revue de Médecines et Pharmacojeos Africaines in Bulletin de Medecine Trad. Pharm*, 4, 38–48.
- Hooker, S. C. (1892). LVII.—The constitution of “lapachic acid”(lapachol) and its derivatives. *J. Chem. Soc., Trans.*, 61(0), 611–650. <https://doi.org/10.1039/CT8926100611>
- Hooker, S. C. (1896). LXXXVII.—The constitution of lapachol and its derivatives. Part III. The structure of the amylenic chain. *J. Chem. Soc., Trans.*, 69(0), 1355–1381.

<https://doi.org/10.1039/CT8966901355>

- Hooker, S. C. (1936a). The Constitution of Lapachol and its Derivatives. Part IV. ¹ Oxidation with Potassium Permanganate ^{2,3}. *Journal of the American Chemical Society*, 58(7), 1168–1173. <https://doi.org/10.1021/ja01298a029>
- Hooker, S. C. (1936b). The Constitution of Lapachol and its Derivatives. Part V. The Structure of Paternò's "Isolapachone" ^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*, 58(7), 1190–1197. <https://doi.org/10.1021/ja01298a033>
- Houghton, P., & Akunyili, D. (1993). Iridoids from *Kigelia pinnata* bark. *FITOTERAPIA*, 64, 473–474. Retrieved from https://scholar.google.fr/scholar?hl=fr&as_sdt=0%2C5&q=9%29%09Houghton+P.J.%2C+Akunyili%2C+D.N.%2C+Iridoids+from+Kigelia+pinnata+bark+%281993%29.+Fitoterapia+64%2C+473-+474&btnG=
- Hussain, H, Krohn, K., Ahmad, V., Miana, G., & Green, I. (2007). Lapachol: an overview. *Arkivoc*. Retrieved from <https://www.arkat-usa.org/get-file/23192/>
- Hussain, Hidayat, & Green, I. R. (2017). Lapachol and lapachone analogs: a journey of two decades of patent research (1997-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(10), 1111–1121. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1339792>
- Inoue, K., Inouye, H., & Chen, C.-C. (1981). A naphthoquinone and a lignan from the wood of *Kigelia pinnata*. *Phytochemistry*, 20(9), 2271–2276. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)80128-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)80128-8)
- Jain†, A. N. (2003). Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(4), 499–511. <https://doi.org/10.1021/JM020406H>
- Joshi, K. C., Singh, P., Taneja, S., Cox, P. J., Allan Howie, R., & Thomson, R. H. (1982). New terpenoid aldehydes from *Kigelia pinnata*: crystal structure of pinnatal. *Tetrahedron*, 38(17), 2703–2708. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(82\)80025-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(82)80025-2)
- Kakuno, T., Yoshikawa, K., & Arihara, S. (1992). Triterpenoid saponins from *Ilex crenata* fruit. *Phytochemistry*, 31(10), 3553–3557. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)83726-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)83726-F)
- Kay, A. (2012). *Tourrettia lappacea*, Bignoniaceae. Retrieved January 31, 2019, from <https://www.flickr.com/photos/andreaskay/7331853064>
- Kazantzi, G., Malamidou-Xenikaki, E., & Spyroudis, S. (2007). Palladium-Catalyzed Allylation of 2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone: Application to the Preparation of Lapachol. *ChemInform*, 38(26). <https://doi.org/10.1002/chin.200726085>
- Kenji, G., Gachanja, A., Keriko, J., Keriko, J., & Mungai, G. (2004). Traditional medicines among the Embu and Mbeere people of Kenya. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(1), 75–86. Retrieved from <https://www.ajol.info/index.php/ajtcam/article/view/31193>
- Khalil, A. T., Chang, F.-R., Lee, Y.-H., Chen, C.-Y., Liaw, C.-C., Ramesh, P., ... Wu, Y.-C. (2003). Chemical constituents from the *Hydrangea chinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 26(1), 15–20. <https://doi.org/10.1007/BF03179924>
- KIRKIACHARIAN, S. (2005). Chiralité et médicaments. *Ref: TIP598WEB - "Médicaments et Produits Pharmaceutiques."*
- Kisangau, D. P., Lyaruu, H. V., Hosea, K. M., & Joseph, C. C. (2007). Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-29>

-
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Koné, W. M., Kamanzi Atindehou, K., Terreaux, C., Hostettmann, K., Traoré, D., & Dosso, M. (2004). Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.006>
- Kornienko, A., Mathieu, V., Rastogi, S. K., Lefranc, F., & Kiss, R. (2013). Therapeutic Agents Triggering Nonapoptotic Cancer Cell Death. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(12), 4823–4839. <https://doi.org/10.1021/jm400136m>
- Krishnan, P., & Bastow, K. F. (2000). Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives—eleutherin, α lapachone, and β lapachone*. *Biochemical Pharmacology*, 60(9), 1367–1379. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00437-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00437-8)
- Lameijer, E., Bäck, T., Kok, J., & Ijzerman, A. (2005). Evolutionary algorithms in drug design. *Natural Computing*, 4(3), 177–243.
- Lim, S. M., Jeong, Y., Lee, S., Im, H., Tae, H. S., Kim, B. G., ... Hong, S. (2015). Identification of β -Lapachone Analogs as Novel MALT1 Inhibitors To Treat an Aggressive Subtype of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(21), 8491–8502. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01415>
- Lindahl, T., & Nyberg, B. (1972). Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry*, 11(19), 3610–3618. <https://doi.org/10.1021/bi00769a018>
- Lodish, H., Arnold, B., Arnold, B., Chris, A. K., Monty, K., Matthew, P. S., ... James, D. (2003). *Molecular Cell Biology*. (W. h. F. A. Company, Ed.) (Fifth Edit). New York.
- Malzy, P. (1954). Quelques plantes du Nord Cameroun et leurs utilisations. *Journal d'agriculture Tropicale et de Botanique Appliquée*, 1(5), 148–179. <https://doi.org/10.3406/jatba.1954.2147>
- Maregesi, S. M., David Ngassapa, O., Pieters, L., & Vlietinck, A. J. (2007). Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 113, 457–470. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.006>
- May, A., Eisenhardt, S., Schmidt-Ehrenberg, J., & Cordes, F. (2003). *Rigid body docking for Virtual Screening*. Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik Berlin. Berlin-Dahlem. Retrieved from <https://opus4.kobv.de/opus4-zib/frontdoor/index/index/docId/769>
- Miller, J. A., & Miller, E. C. (1975). Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 33(1), 25–26. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(75\)90039-1](https://doi.org/10.1016/0027-5107(75)90039-1)
- Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D., & Graham, D. G. (1992). Quinone chemistry and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112(1), 2–16. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90273-U](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90273-U)
- Nagata, K., Hirai, K.-I., Koyama, J., Wada, Y., & Tamura, T. (1998). Antimicrobial Activity of Novel Furanonaphthoquinone Analogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(3), 700–702. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.3.700>
- Nakai, T. (1949). Classes, ordinae, familiae, subfamiliiae, tribus, genera nova quae attinent ad plantas koreanas. *Journal of Japanese Botany*, 24, 8–14.
- Nakamura, A., & Nakada, M. (2013). Allylic oxidations in natural product synthesis. *Synthesis (Germany)*. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338426>

- Nepomuceno, J. C. (2014). Lapachol and its derivatives as potential drugs for cancer treatment. In *Plants and Crop The Biology and Biotechnology Research* (1er ed., p. 19). iConcept Press Ltd.
- Nozaki, H., Suzuki, H., Hirayama, T., Kasai, R., Wu, R.-Y., & Lee, K.-H. (1986). Antitumour triterpenes of *Maytenus diversifolia*. *Phytochemistry*, 25(2), 479–485. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85505-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85505-3)
- Oliveira, M. F., Lemos, T. L. G., Mattos, M. C. DE, Segundo, T. A., Santiago, G. M. P., & Braz-Filho, R. (2002). New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 74(2), 211–221. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000200004>
- Olmstead, R. G., Bremer, B., Scott, K. M., & Palmer, J. D. (1993). A Parsimony Analysis of the Asteridae Sensu Lato Based on rbcL Sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80(3), 700. <https://doi.org/10.2307/2399855>
- Olmstead, R. G., de Pamphilis, C. W., Wolfe, A. D., Young, N. D., Elisons, W. J., & Reeves, P. A. (2001). Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*, 88(2), 348–361. <https://doi.org/10.2307/2657024>
- Osuka, S., & Meir, E. G. Van. (2017). Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 415–426. <https://doi.org/10.1172/JCI89587>
- Parkhurst, R. M., Thomas, D. W., Adams, R. P., Makhubu, L. P., Mthupha, B. M., Wolde-Yohannes, L., ... Jones, W. O. (1990). Triterpene aglycones from various *Phytolacca dodecandra* populations. *Phytochemistry*, 29(4), 1171–1174. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85422-C](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85422-C)
- Paternó, E. (1882). Ricerche sull'acido lapacico. *Gazz. Chim. Ital*, 12, 337–392.
- Pérez-Sacau, E., Díaz-Peñate, R. G., Estévez-Braun, A., Ravelo, A. G., García-Castellano, J. M., Pardo, L., & Campillo, M. (2007). Synthesis and Pharmacophore Modeling of Naphthoquinone Derivatives with Cytotoxic Activity in Human Promyelocytic Leukemia HL-60 Cell Line. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(4), 696–706. <https://doi.org/10.1021/jm060849b>
- Pettit, G. R., & Houghton, L. E. (1968). Lapachol. *Canadian Journal of Chemistry*, 46(14), 2471–2472. <https://doi.org/10.1139/v68-404>
- Pettit, G. R., & Houghton, L. E. (1971). Synthesis of hydroxyhydrolapachol and lapachol. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 509. <https://doi.org/10.1039/j39710000509>
- Porter, P. L. I. (2008). *Colea delphinensis* (Bignoniaceae) – Agroneo □. Retrieved January 31, 2019, from <https://agroneo.com/gaia/colea-delphinensis>
- Potel, A.-M. (2002). Les plantes médicinales au Sénégal. Retrieved January 20, 2019, from <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.ethnopharmacologia.org/prelud e2018/pdf/biblio-hp-11-potel.pdf>
- Rahman, A.-, & Ahmad, V. U. (1994). *Handbook of Natural Products Data: Pentacyclic triterpenoids*. Michigan: Elsevier.
- Ríos-Luci, C., Bonifazi, E. L., León, L. G., Montero, J. C., Burton, G., Pandiella, A., ... Padrón, J. M. (2012). β -Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.04.008>
- Rossi, A., Sacco, P. C., Santabarbara, G., Sgambato, A., Casaluce, F., Palazzolo, G., ... Gridelli, C. (2017). Developments in pharmacotherapy for treating metastatic non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(2), 151–163. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1280460>
- Routledge, R. (2001). northern catalpa, *Catalpa speciosa* (Scrophulariales: Bignoniaceae) - 5474028. Retrieved January 31, 2019, from

<https://www.insectimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5474028>

- Sacau, E. P., Estévez-Braun, A., Ravelo, A. G., Ferro, E. A., Tokuda, H., Mukainaka, T., & Nishino, H. (2003). Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *11*(4), 483–488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538012>
- Saini, S., Kaur, H., Verma, B., & Singh, S. (2009). *Kigelia africana* (Lam.) Benth.—an overview. *Oduct Radiance*, *8*(2), 190–197. Retrieved from <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/4043>
- Saini, Sangita, Kaur, H., Verma, B., Ripudaman, A., & Singh, S. K. (2008). *Kigelia africana* (Lam.) benth. - an overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *8*(2), 190–197.
- Salas, C., Tapia, R. A., Ciudad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmerling, U., ... Morello, A. (2008). Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(2), 668–674. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.038>
- Santana, C. F., Lins, L. J. P., Asfora, J. J., Melo, A. M., Lima, G., & D'Albuquerque, I. L. P. (1980). Primeiras observações com o emprego de lapachol em pacientes humanos portadores de neoplasias malignas. *Revista Do Instituto de Antibioticos*, *20*(61).
- Sewani-Rusike, C. R. (2010). *PLANTS OF ZIMBABWE USED AS ANTI-FERTILITY AGENTS*. *Afr. J. Trad. CAM* (Vol. 7). Retrieved from www.africanethnomedicines.net
- Sidjui, L. S., Melong, R., Mahiou-Leddet, V., Herbette, G., Tchinda, A. T., Ollivier, E., & Folefoc, G. N. (2015). Triterpenes and lignans from *Kigelia africana*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *5*(Suppl 2), 1–6. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.58.S1>
- Sotriffer, C., Klebe, G., Stahl, M., & Böhm, H.-J. (2003). Docking and Scoring Functions/Virtual Screening. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (pp. 281–331). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc007>
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2006). Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, *65*(1), 15–26. <https://doi.org/10.1002/prot.21082>
- Spangler, R. E., & Olmstead, R. G. (1999). Phylogenetic Analysis of Bignoniaceae Based on the cpDNA Gene Sequences *rbcl* and *ndhF*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, *86*(1), 33. <https://doi.org/10.2307/2666216>
- Spyrakakis, F., Cozzini, P., & Kellogg, G. E. (2010). Docking and Scoring in Drug Discovery. In *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery* (pp. 601–684). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471266949.bmc140>
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version14.
- Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of Cancer Science Therapy*, *1*(2), 1.
- Sun, J. S., Geiser, A. H., & Frydman, B. (1998). A preparative synthesis of lapachol and related naphthoquinones. *Tetrahedron Letters*, *39*(45), 8221–8224. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01880-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01880-2)
- Tania, S. M. S., Camara, C. A., Barbosa, T. P., Soares, A. Z., da Cunha, L. C., Pinto, A. C., & Vargas, M. D. (2005). Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*(1), 193–196. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2004.09.043>
- Tanis, S. P., Chuang, Y. H., & Head, D. B. (1988). Furans in synthesis. 8. Formal total syntheses of (+-)-

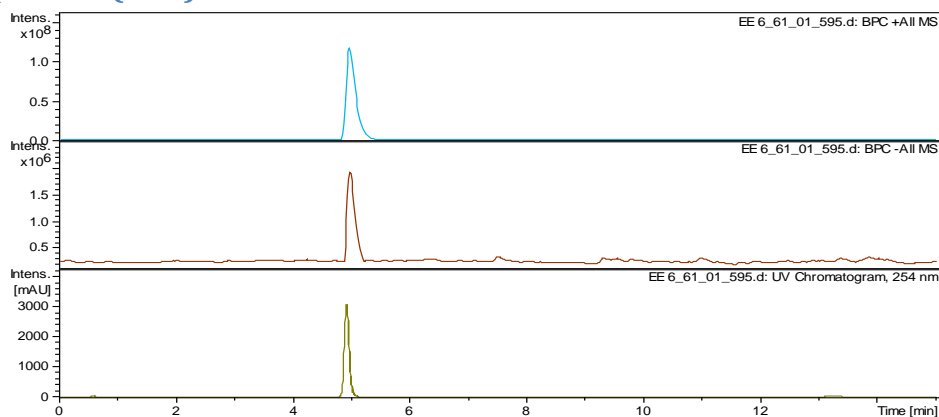
and (+)-aphidicolin. *The Journal of Organic Chemistry*, 53(21), 4929–4938. <https://doi.org/10.1021/jo00256a007>

- Terashima, H. (1988). *Wild plant utilization of the balese and the efe of the ituri forest, the repu bllic of Zaïre. African Study Monographs* (Vol. 8). Retrieved from http://www.africa.kyoto-u.ac.jp/kiroku/asm_suppl/abstracts/pdf/ASM_Sup.8/Hideaki_TERASHIMA_Mitsuo_ICHIKAWA_Masato_SAWADA.pdf
- Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>
- Torrens, F. (2003). Structural, Chemical Topological, Electrotopological and Electronic Structure Hypotheses. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 6(8), 801–809. <https://doi.org/10.2174/138620703771826919>
- Ueda, S. (2005). 5663197. U.S.
- Westhead, D., Clark, D., & CW Murray. (1997). A comparison of heuristic search algorithms for molecular docking. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 11(3), 209–228. Retrieved from https://scihub.tw/https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1023/A:1007934310264&casa_token=SkLz-fWDgfMAAAAA:963i_dOmiLtlN7fNAO7pIQ2mRPi9QfAJI727QdTepSom_X4neyDg3CUrn12T-ZfD43OBHSOaG07k_v6a
- Yamashita, M., Kaneko, M., Iida, A., Tokuda, H., & Nishimura, K. (2007). Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellaneda*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(23), 6417–6420. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.005>
- Yan, C., Guo, Z., Liu, Y., Shi, P., Tian, H., & Zhu, W.-H. (2018). A sequence-activated AND logic dual-channel fluorescent probe for tracking programmable drug release. *Chemical Science*, 9(29), 6176–6182. <https://doi.org/10.1039/C8SC02079E>
- Yong, R. L., & Won, K. L. (2004). Efficient synthesis of biologically interesting dehydro- α -lapachone and α -lapachone. *Synthetic Communications*, 34(24), 4537–4543. <https://doi.org/10.1081/SCC-200043216>
- Zhao, Z., Ma, X., Shelton, S. D., Sung, D. C., Li, M., Hernandez, D., ... Du, L. (2016). A combined gene expression and functional study reveals the crosstalk between N-Myc and differentiation-inducing microRNAs in neuroblastoma cells. *Oncotarget*, 7(48). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12676>
- Zhao, Z., Ma, X., Sung, D., Li, M., Kostis, A., Lin, G., ... Du, L. (2015). microRNA-449a functions as a tumor suppressor in neuroblastoma through inducing cell differentiation and cell cycle arrest. *RNA Biology*, 12(5), 538–554. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1023495>

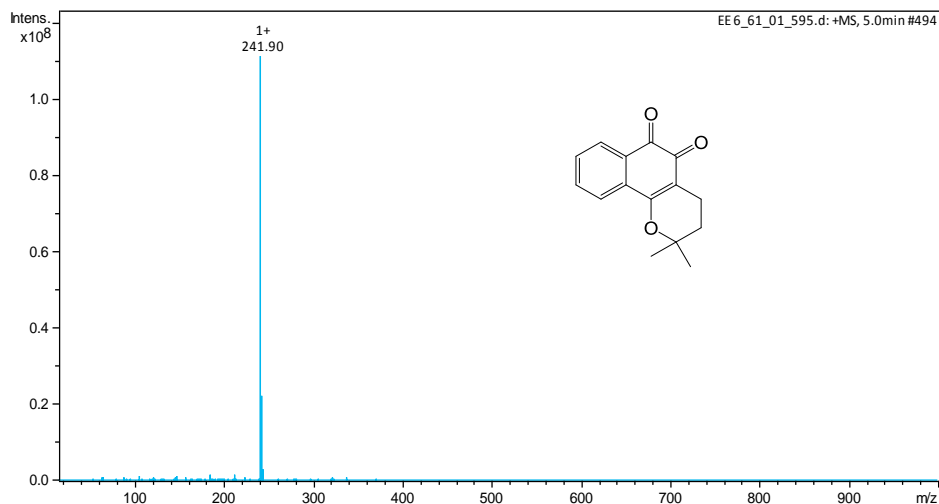
ANNEXE

SPECTRES RMN ^1H , ^{13}C ET DEPT135 DES COMPOSES D'EMISYNTHESE

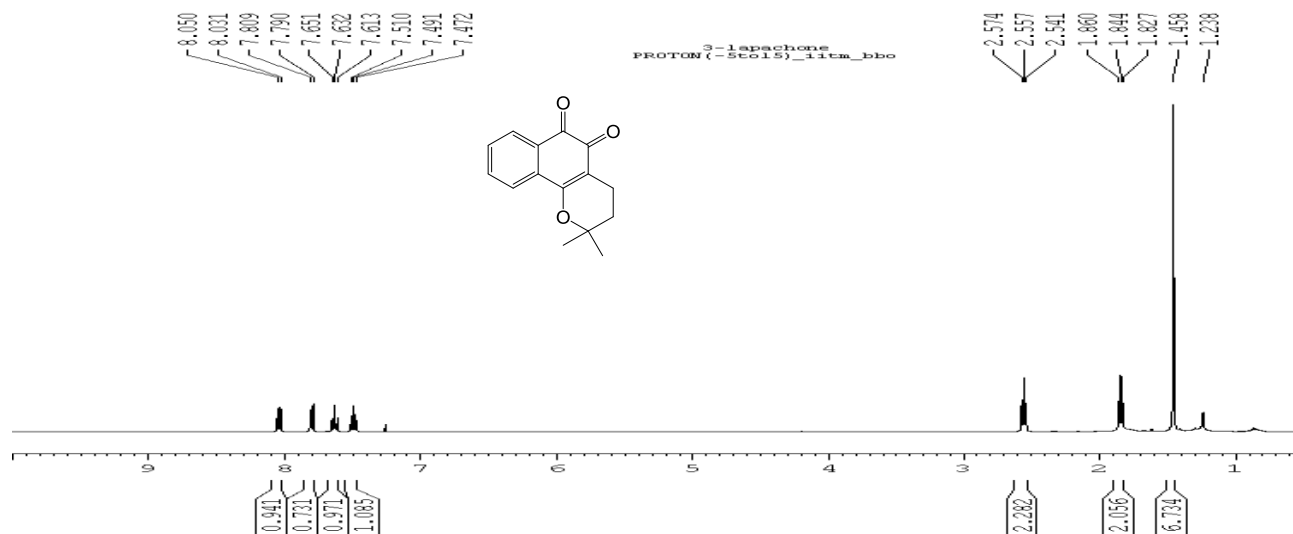
IV.1 Composé 9 (EE6)



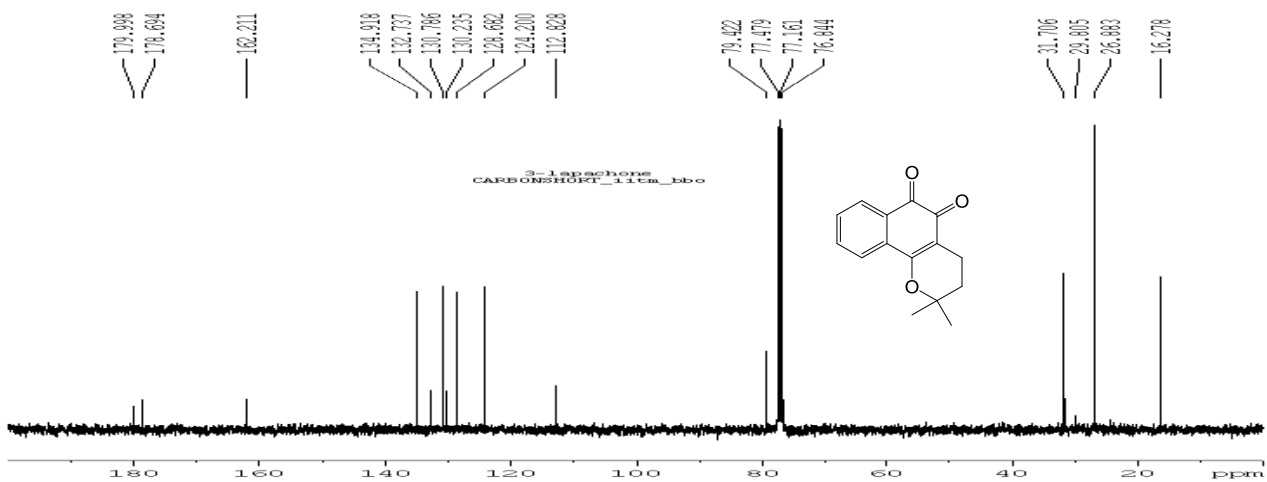
Annexe 1 : Chromatogramme Composé 9 (EE6)



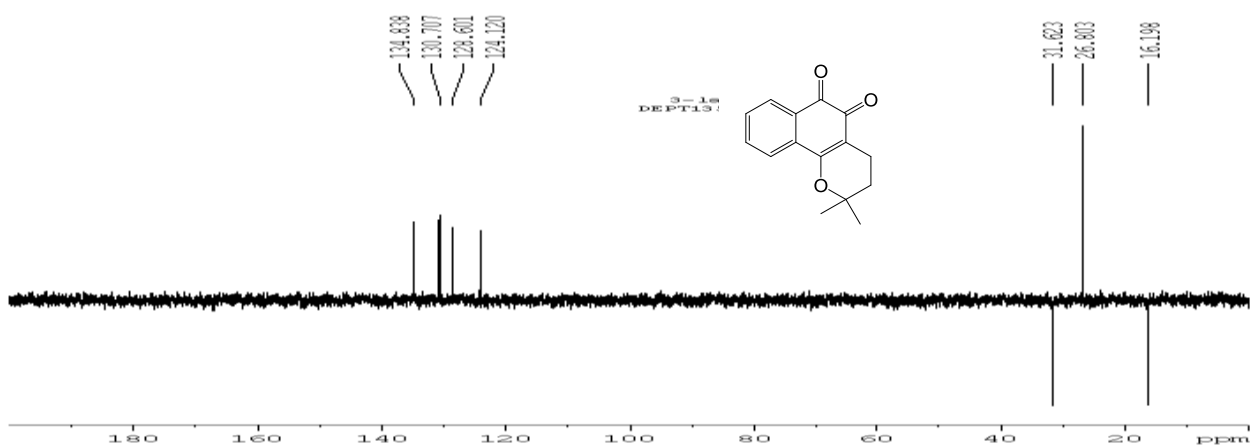
Annexe 2 : Spectre de masse (ACPI⁺) Composé 9 (EE6)



Annexe 3 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 9 (EE6)

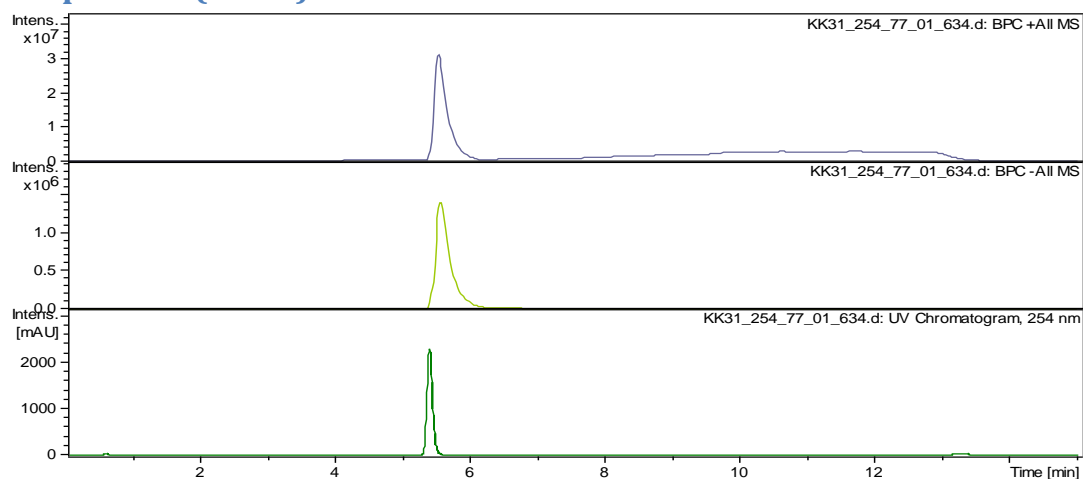


Annexe 4 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 9 (EE6)

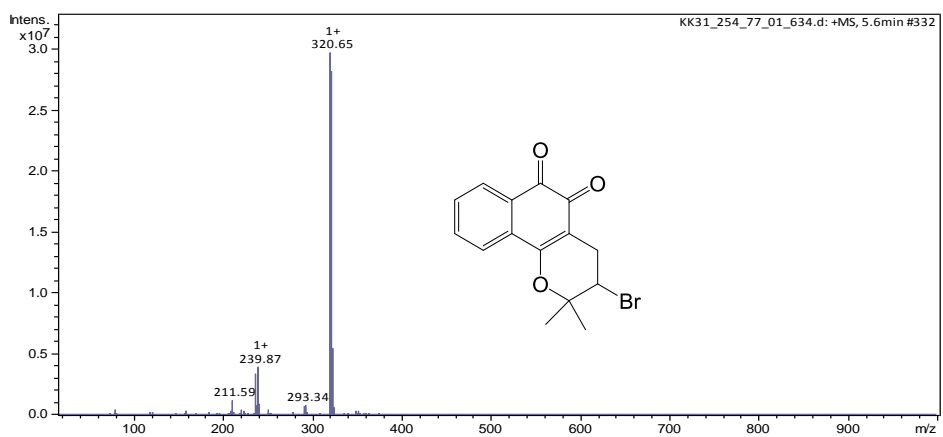


Annexe 5 : Spectre RMN DEPT135 (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 7 (EE6)

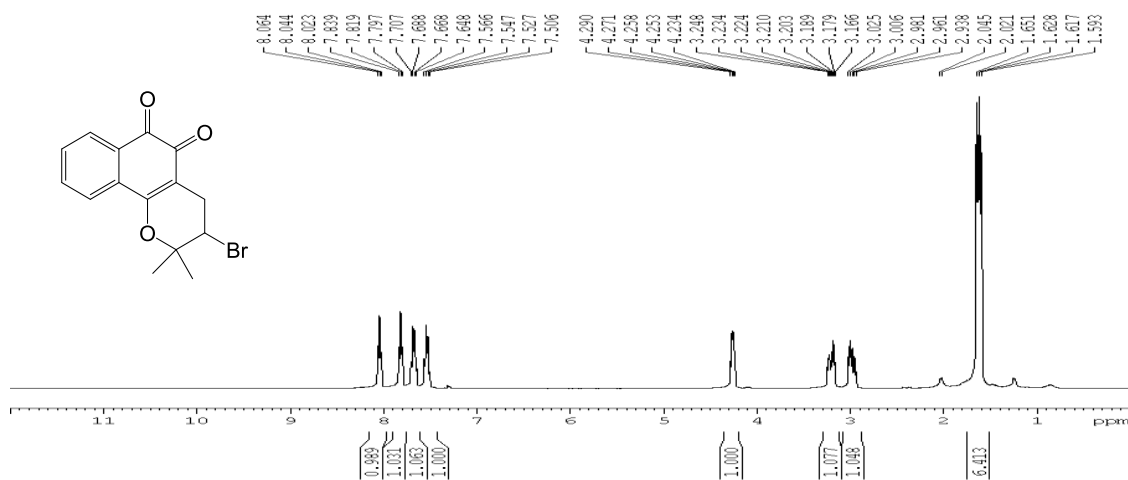
IV.2 Composé 53 (KK31)



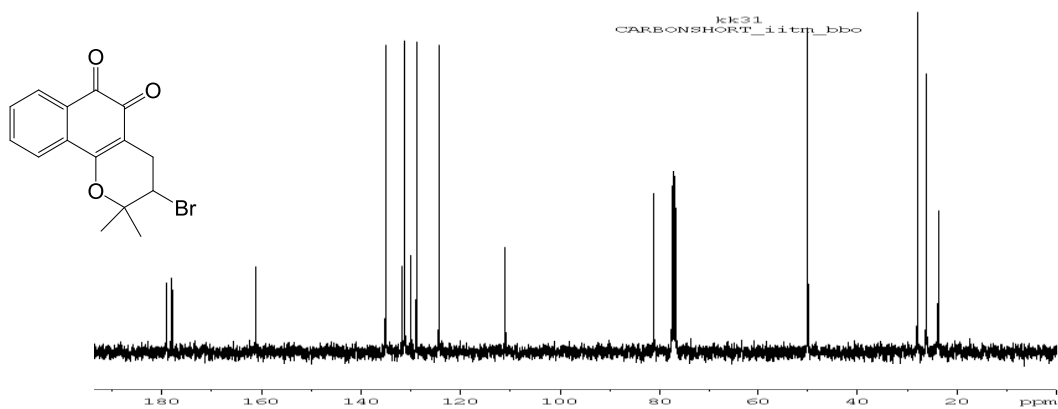
Annexe 6 : Chromatogramme du composé 53 (KK31)



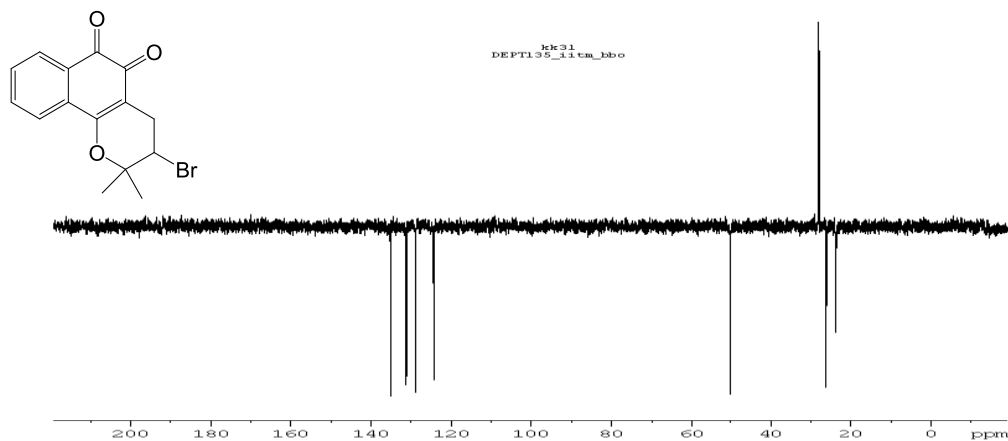
Annexe 7 : Spectre de masse du composé 53 (KK31)



Annexe 8 : Spectre RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 53 (KK31)

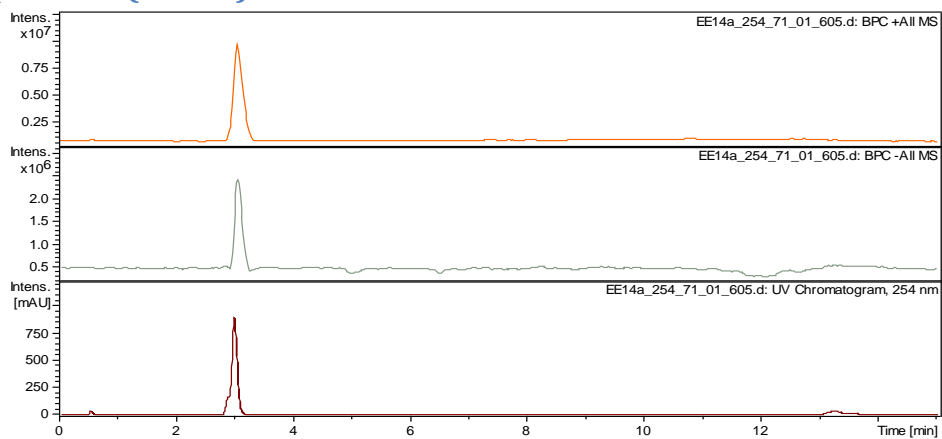


Annexe 9 : Spectre RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 53 (KK31)

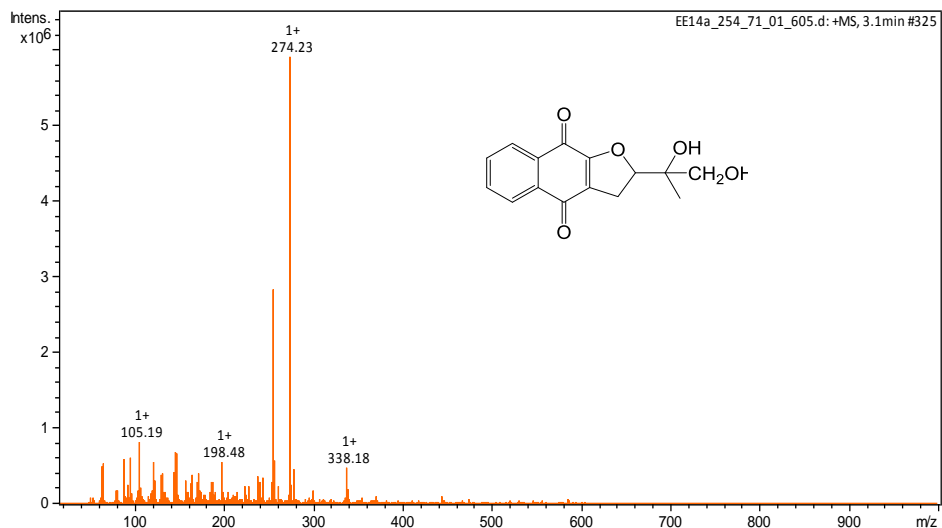


Annexe 10 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 53 (KK31)

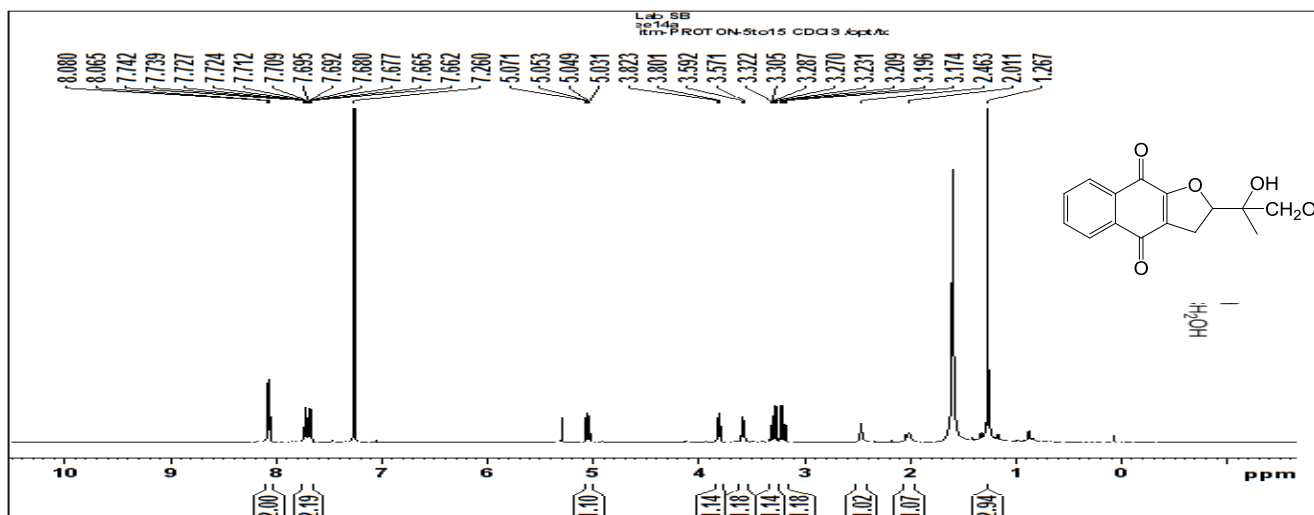
IV.3 Composé 55 (ee14a)



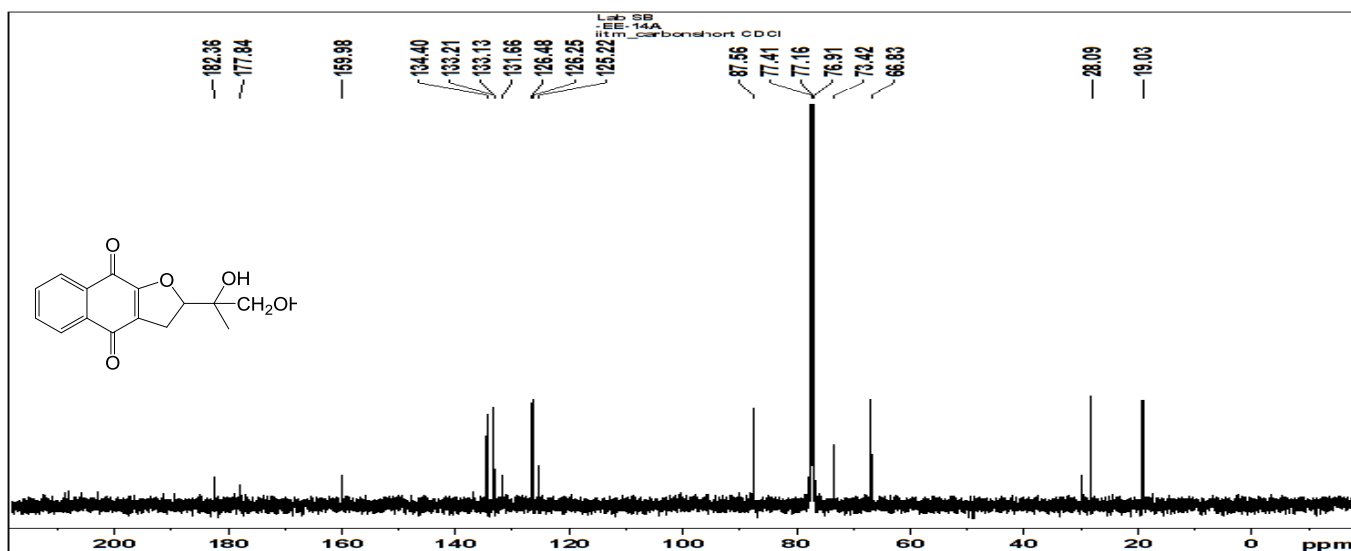
Annexe 11 : Chromatogramme du composé 55 (EE14A)



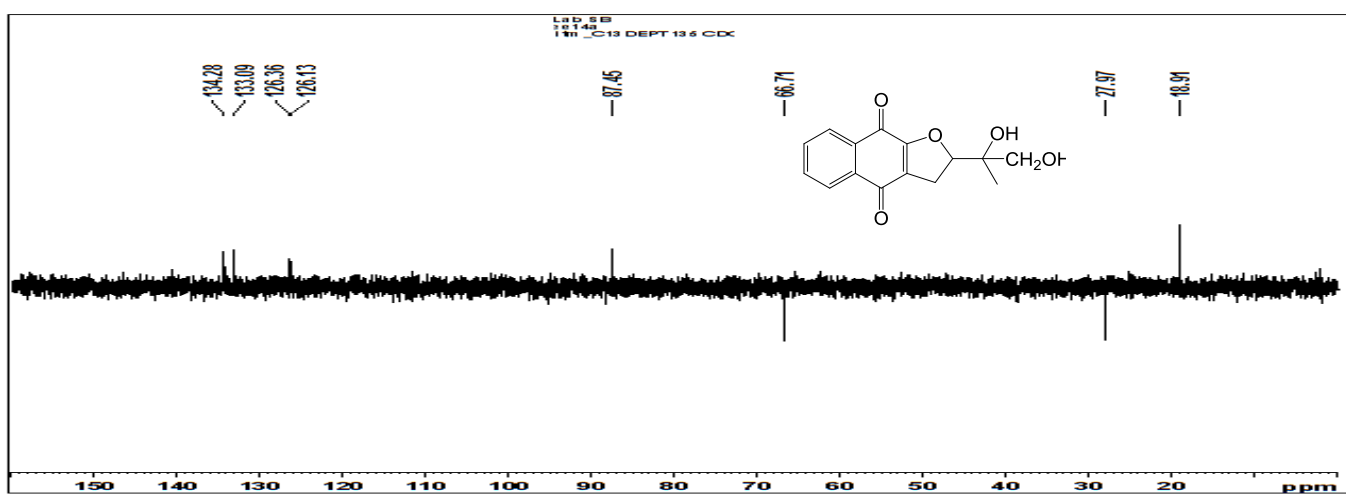
Annexe 12 : Spectre de masse (ACPI) du composé 55 (EE14A)



Annexe 13 : Spectre RMN 1H (CDCl3, 400 MHz) du composé 55 (EE14A)

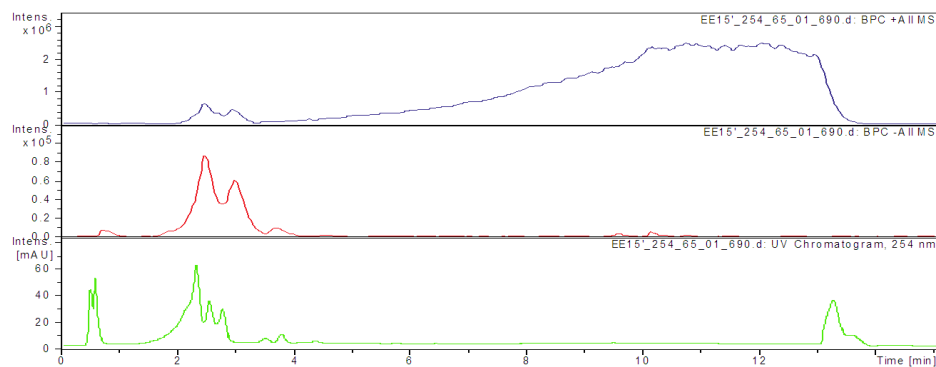


Annexe 14 : Spectre RMN 13C (CDCl3, 100 MHz) du composé 55 (EE14A)

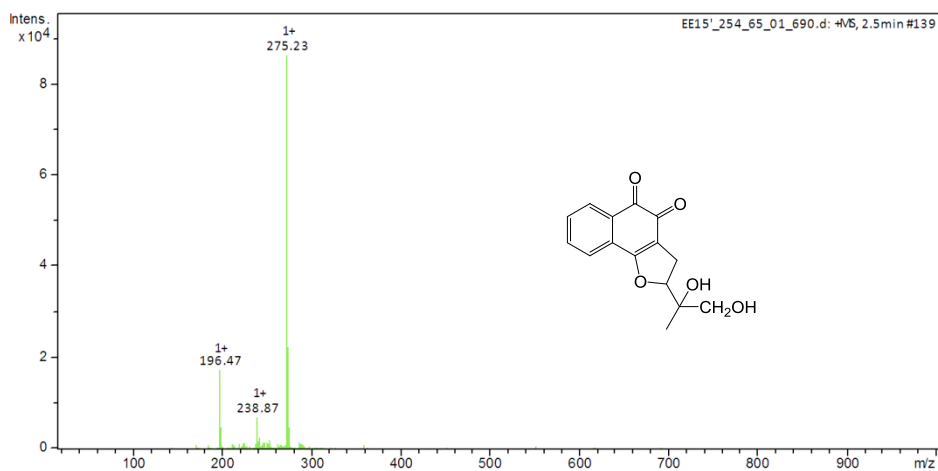


Annexe 15 : Spectre DEPT135 (CDCl3, 100 MHz) du composé 55 (EE14A)

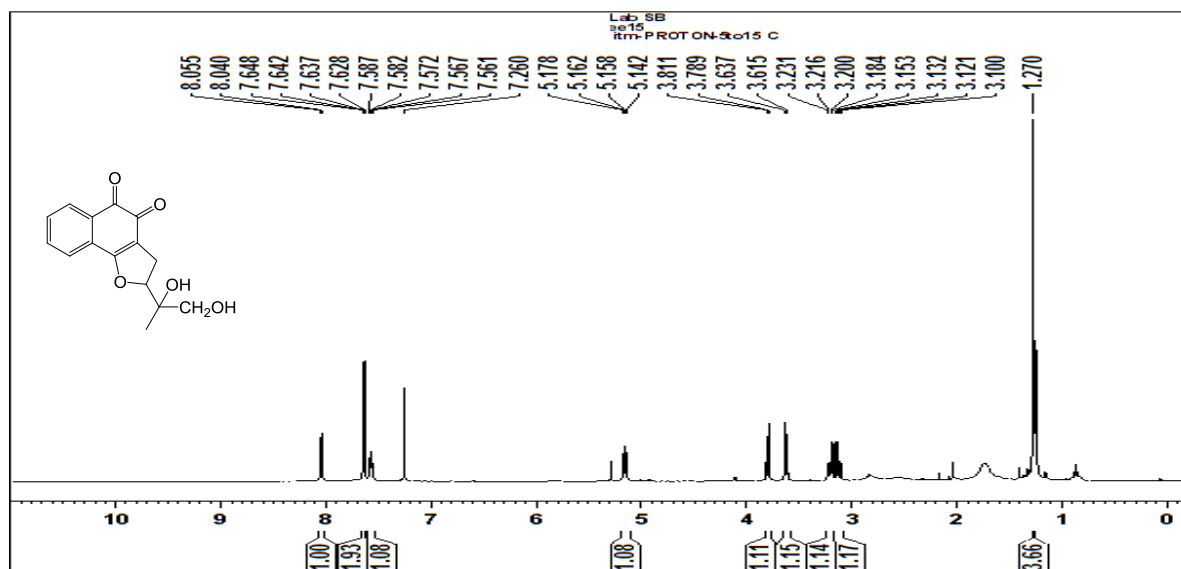
IV.4 Composé 56 (ee15)



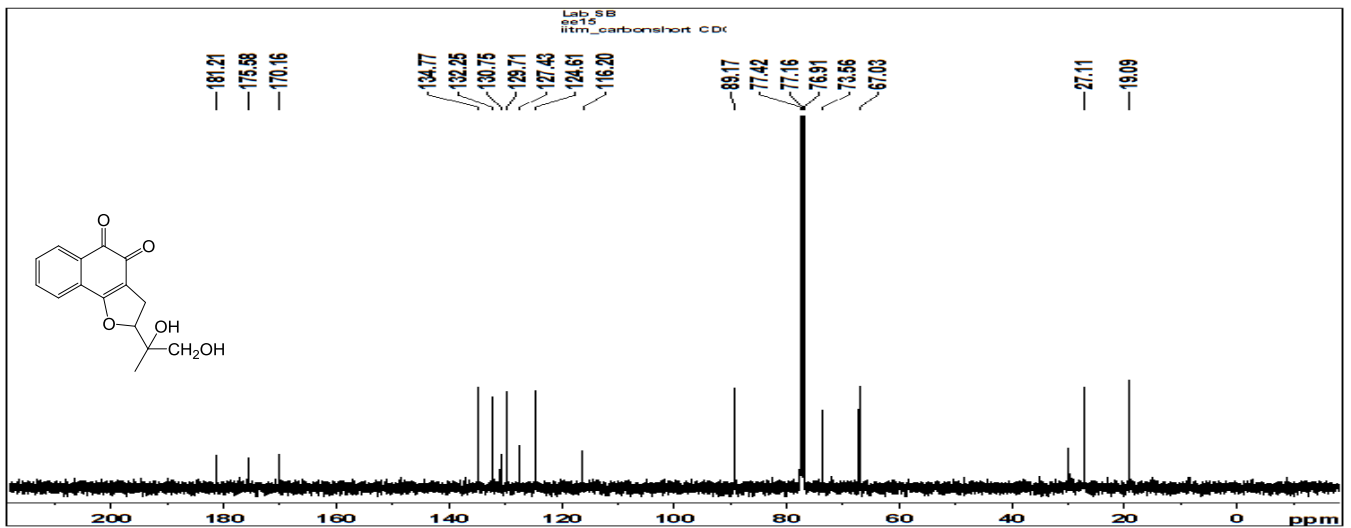
Annexe 16 : Chrommatogramme du composé 56 (EE15)



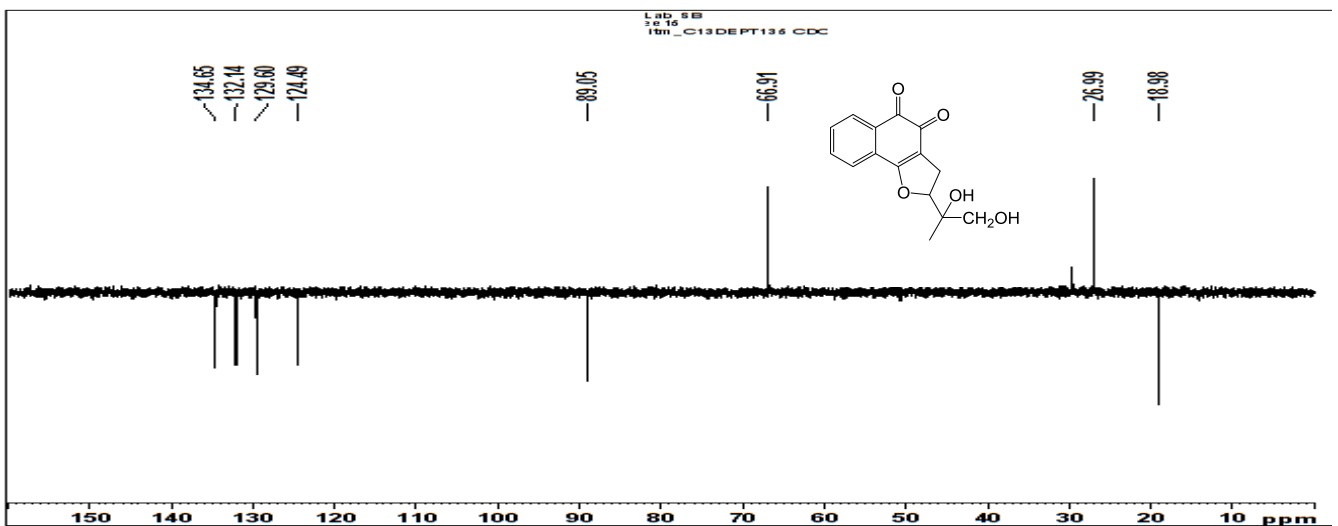
Annexe 17 : Spectre de masse (ACPI) du composé 56 (EE15)



Annexe 18 : Spectre RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 56 (EE15)

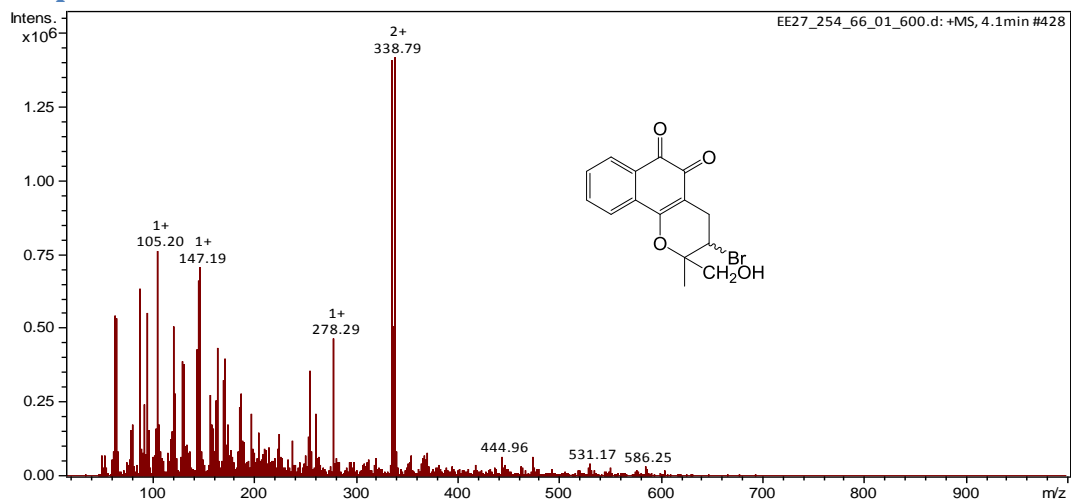


Annexe 19 : Spectre RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 56 (EE15)

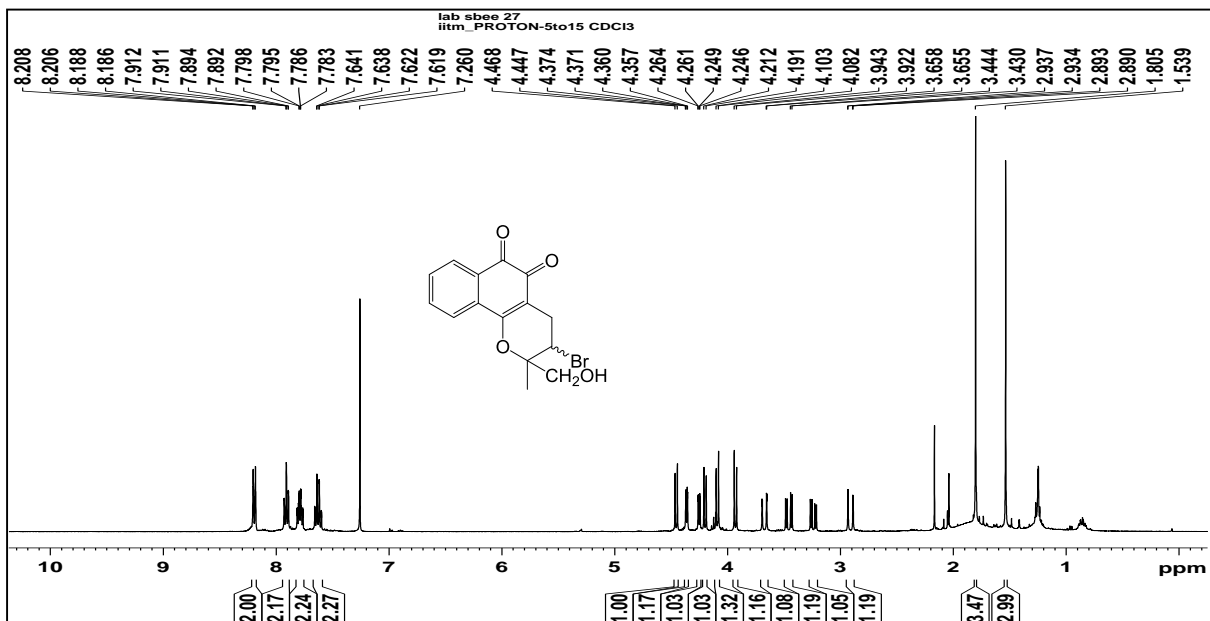


Annexe 20 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 56 (EE15)

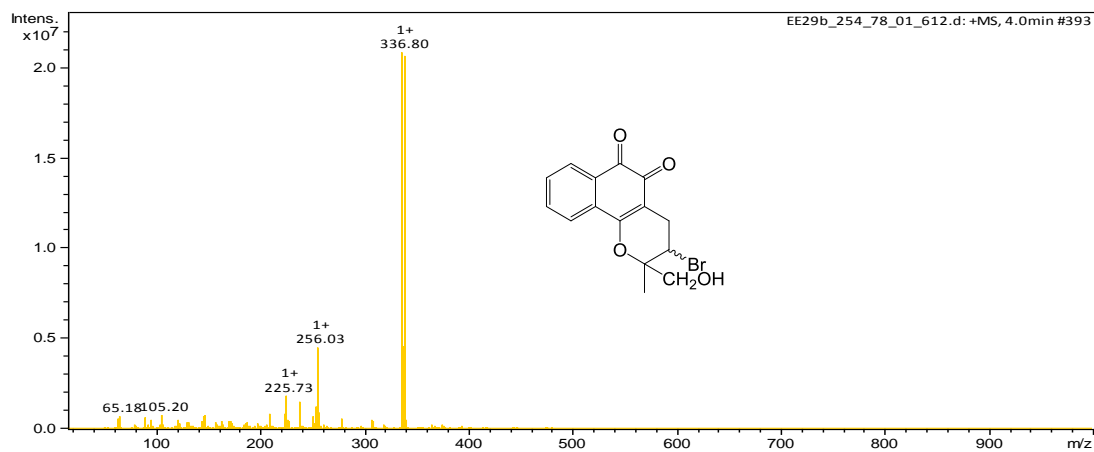
IV.5 Composé 58 et 59



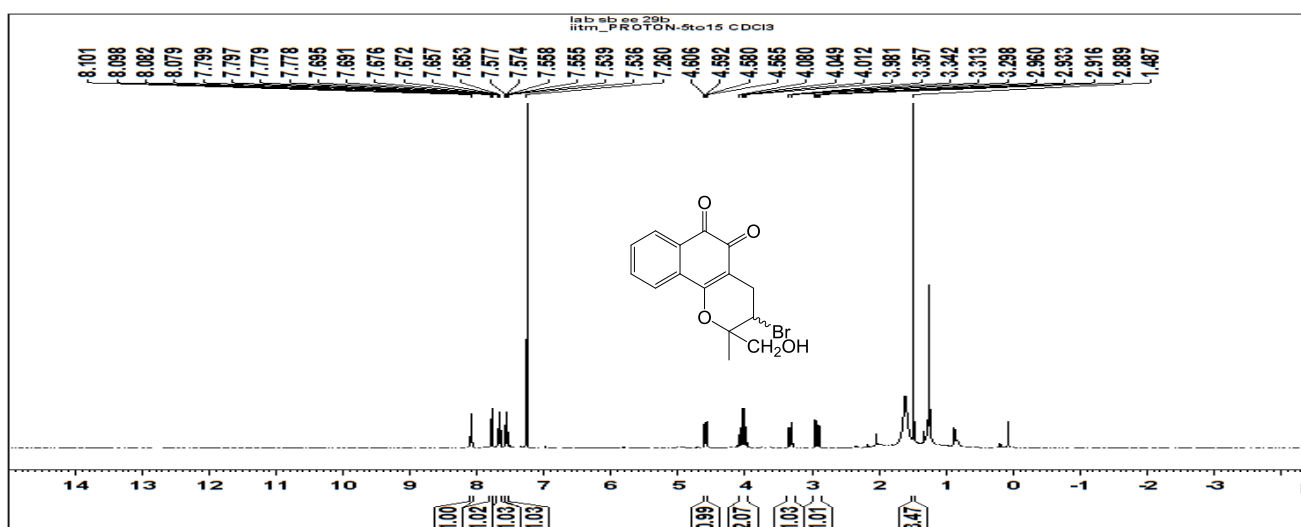
Annexe 21 : Spectre de masse (ACPI) du composé 58 (EE27)



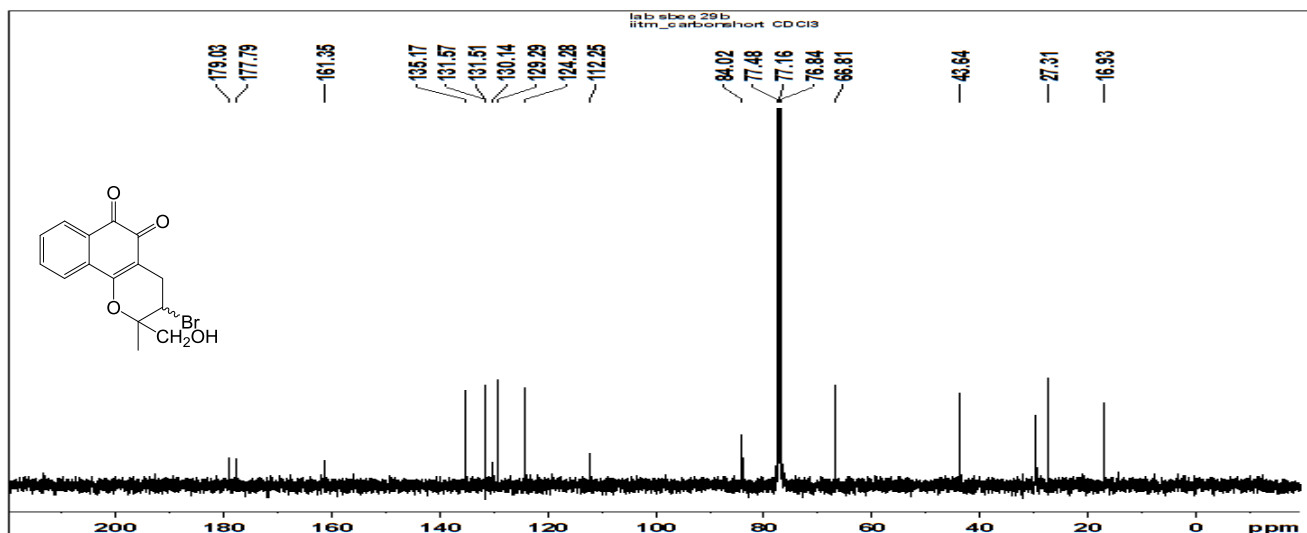
Annexe 22 : Spectre RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 58 (EE27)



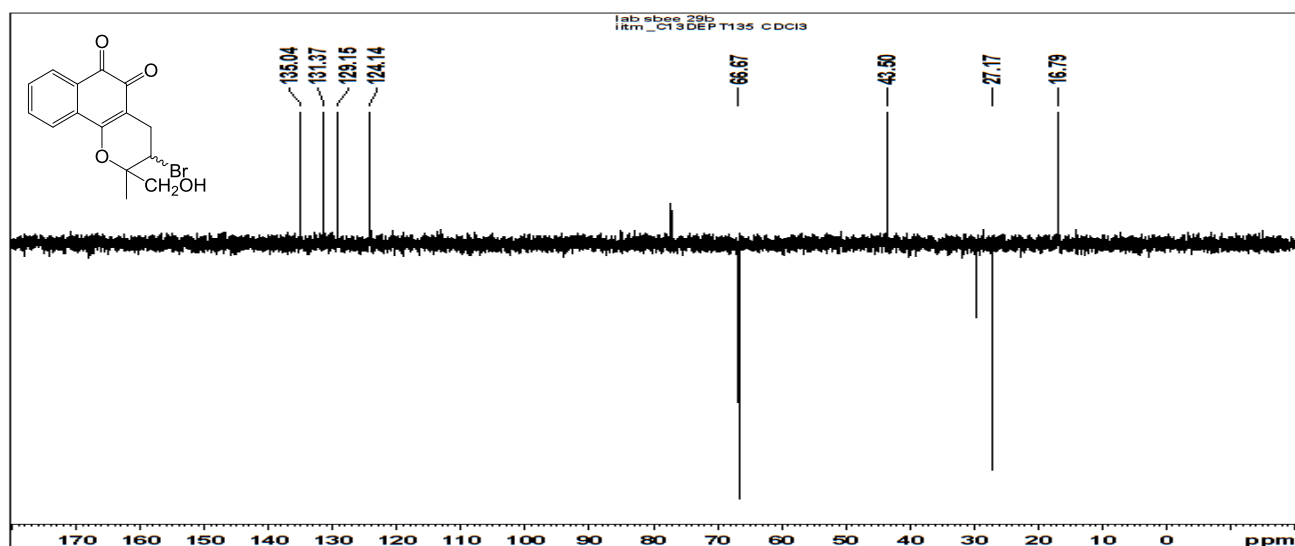
Annexe 23 : Spectre de masse (ACPI) du composé 59



Annexe 24 : RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 59 (EE29B)

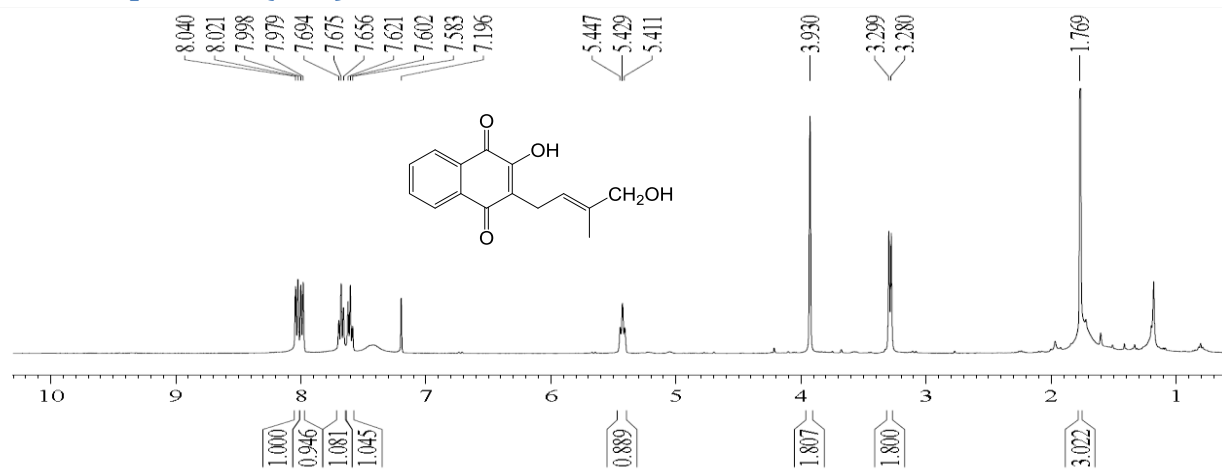


Annexe 25 : RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 59 (EE29B)

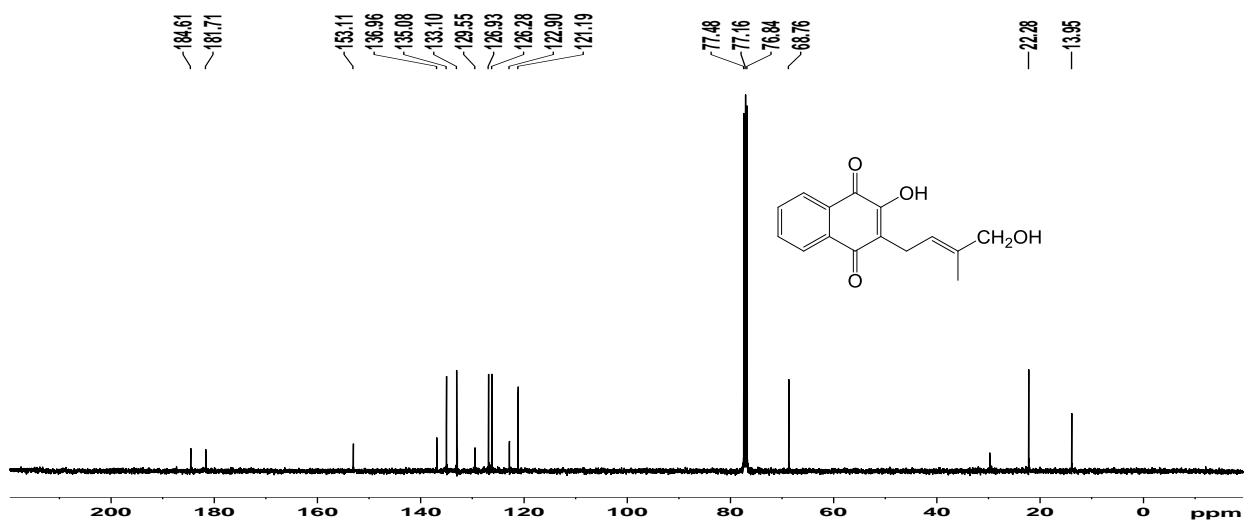


Annexe 26 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 59 (EE29B)

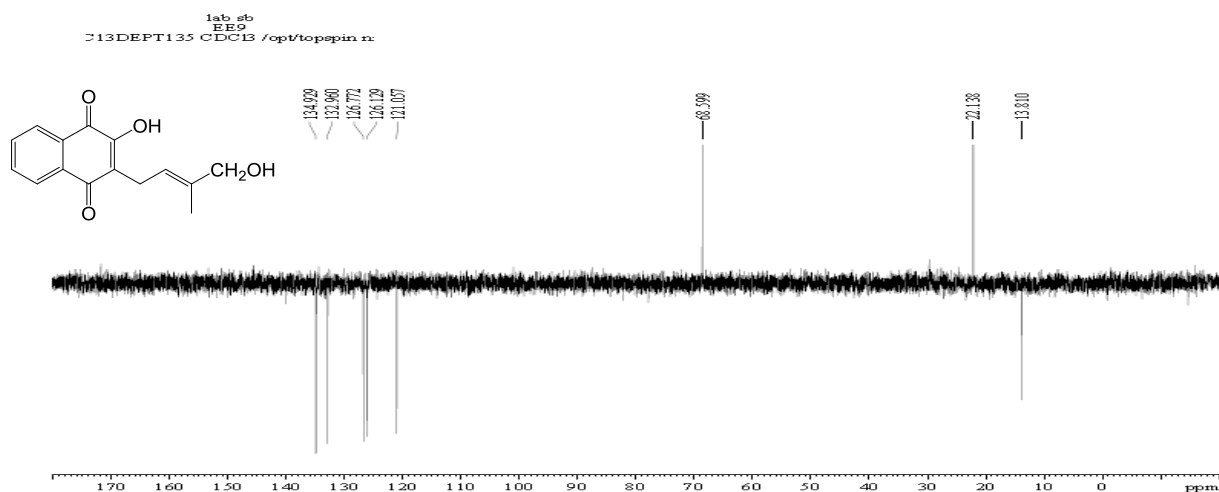
IV.6 Composé 60 (EE9)



Annexe 27 : Spectre RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 60 (EE9)

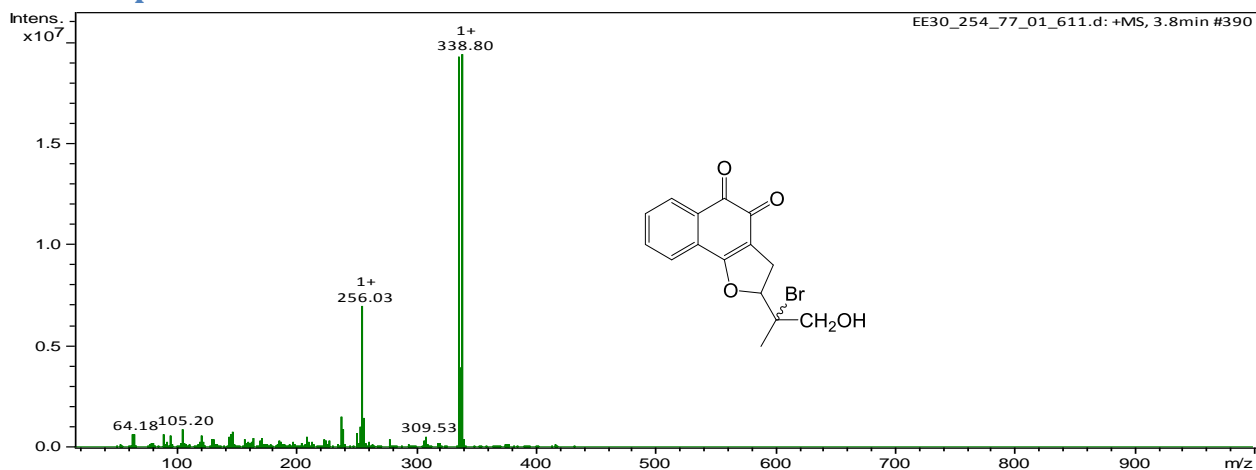


Annexe 28 : RMN 13C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 60 (EE9)

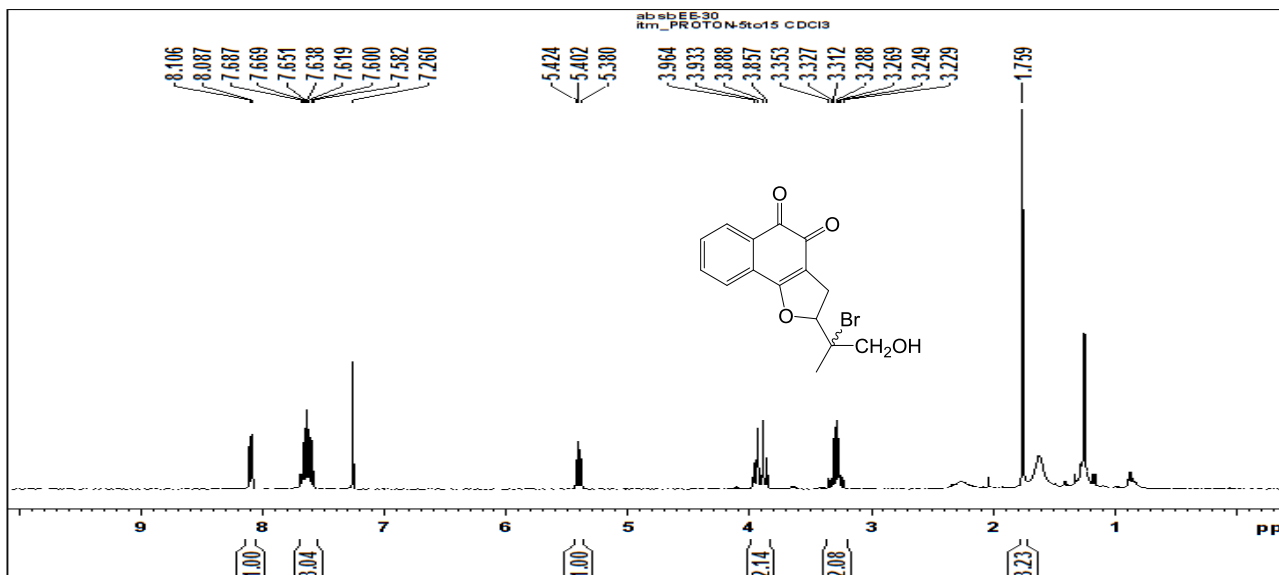


Annexe 29 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 60 (EE9)

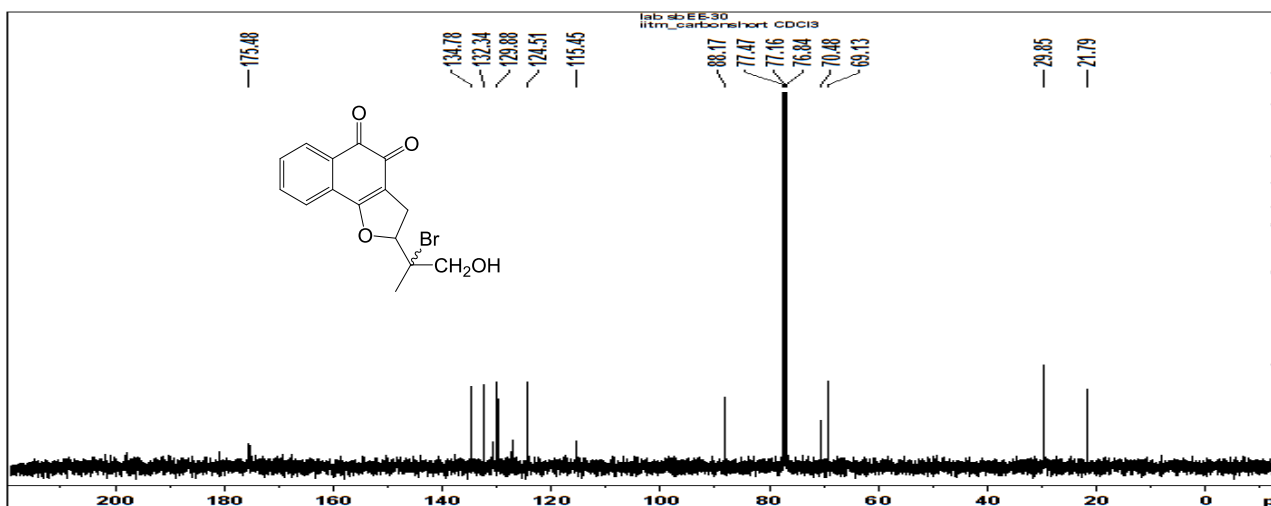
IV.7 Composé 62 et 63



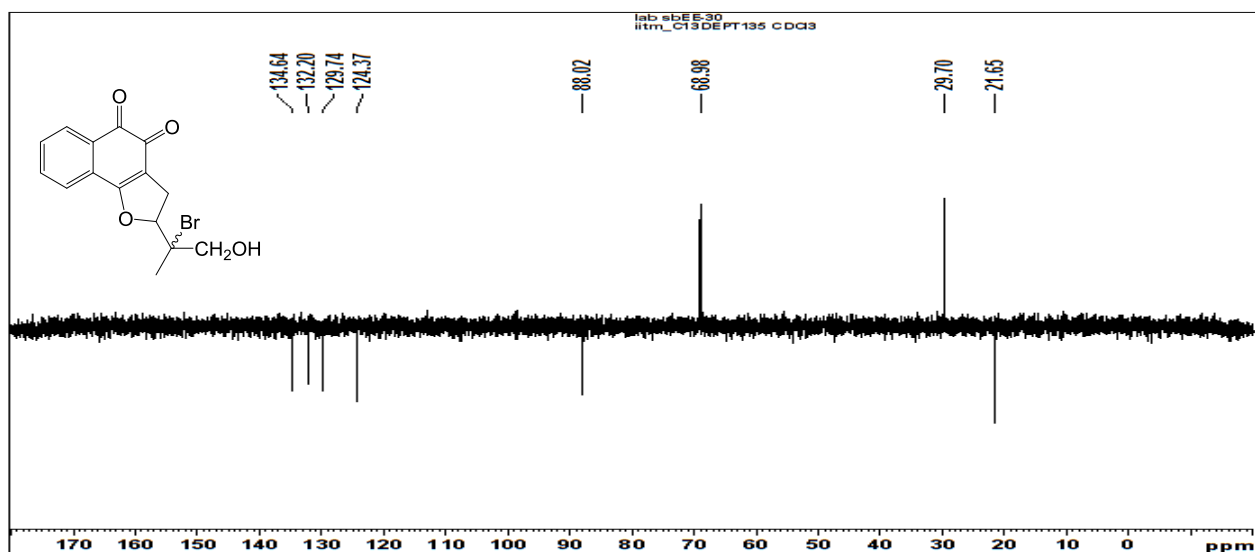
Annexe 30 : Spectre de masse (ACPI) du composé 62



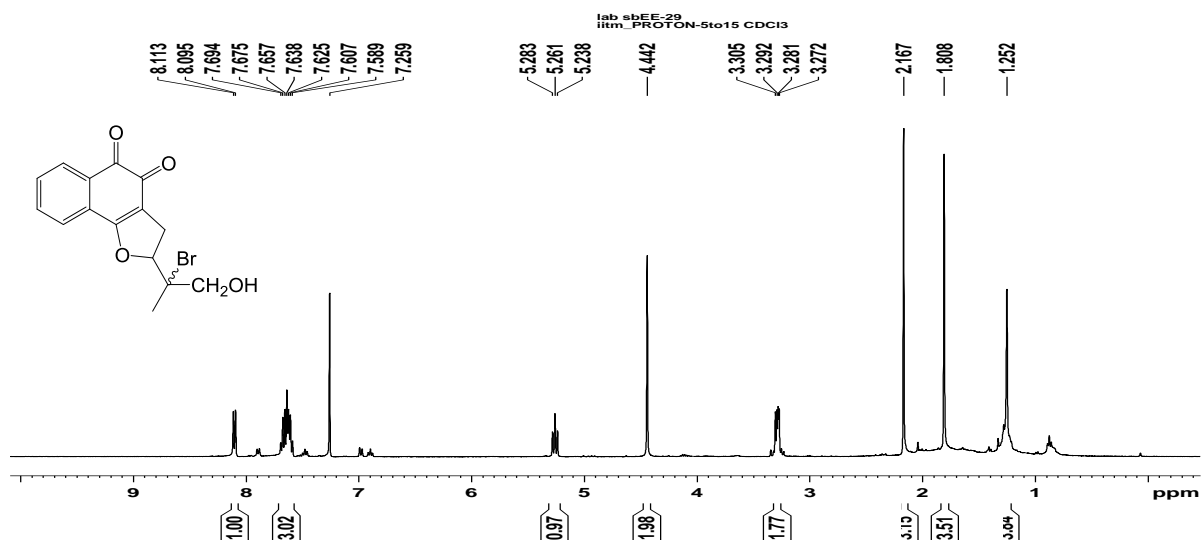
Annexe 31 : Spectre RMN 1H (CDCl3, 400 MHz) du composé 62 (EE30)



Annexe 32 : RMN 13C (CDCl3, 100 MHz) du composé 62 (EE30)

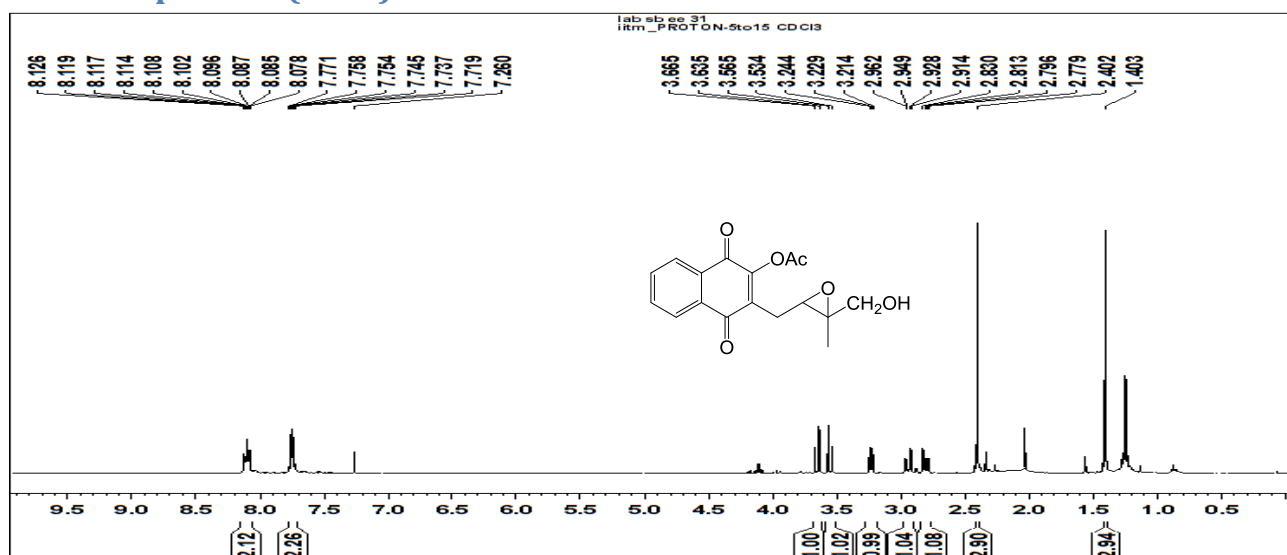


Annexe 33 : Spectre DEPT135 (CDCl3, 100 MHz) du composé 62 (EE30)

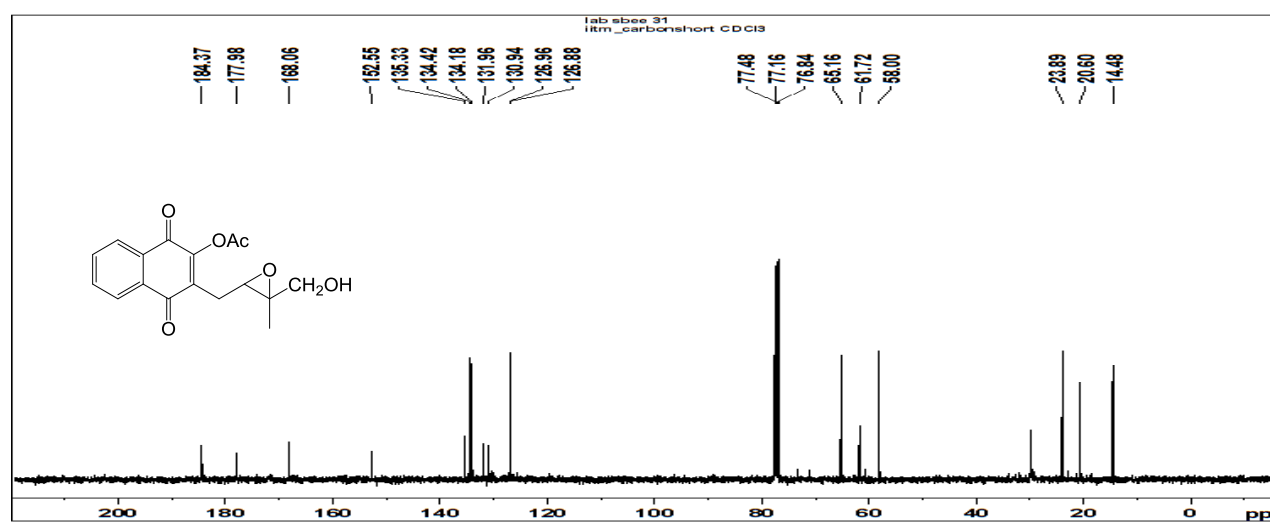


Annexe 34 : Spectre RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 63 (EE29)

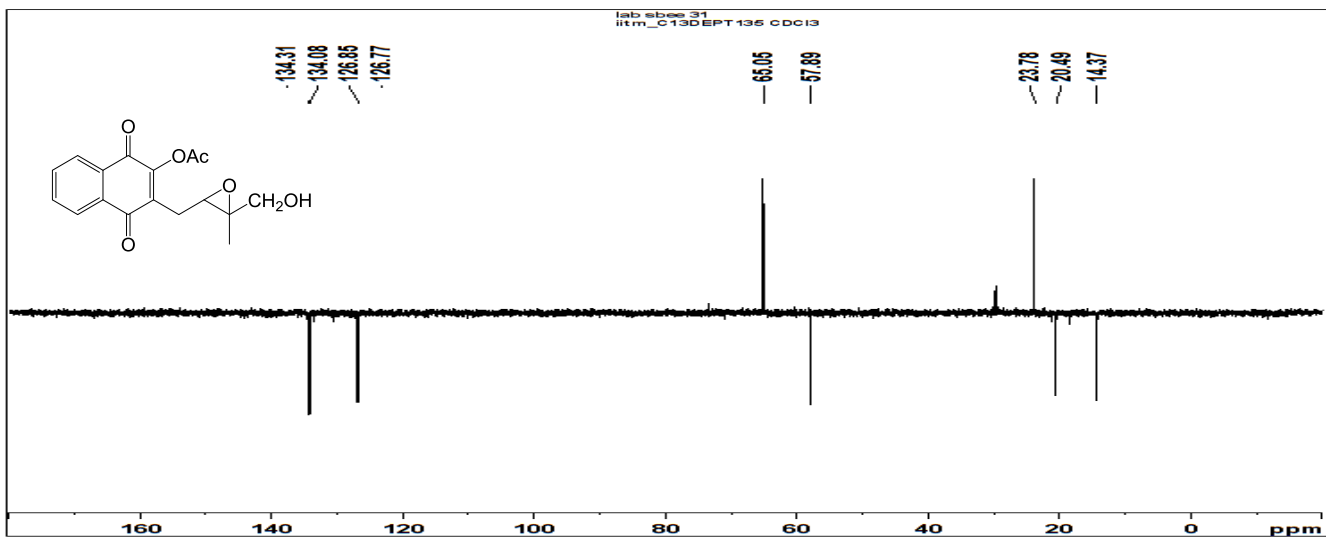
IV.8 Composé 64 (ee31)



Annexe 35 : RMN 1H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 64 (EE31)

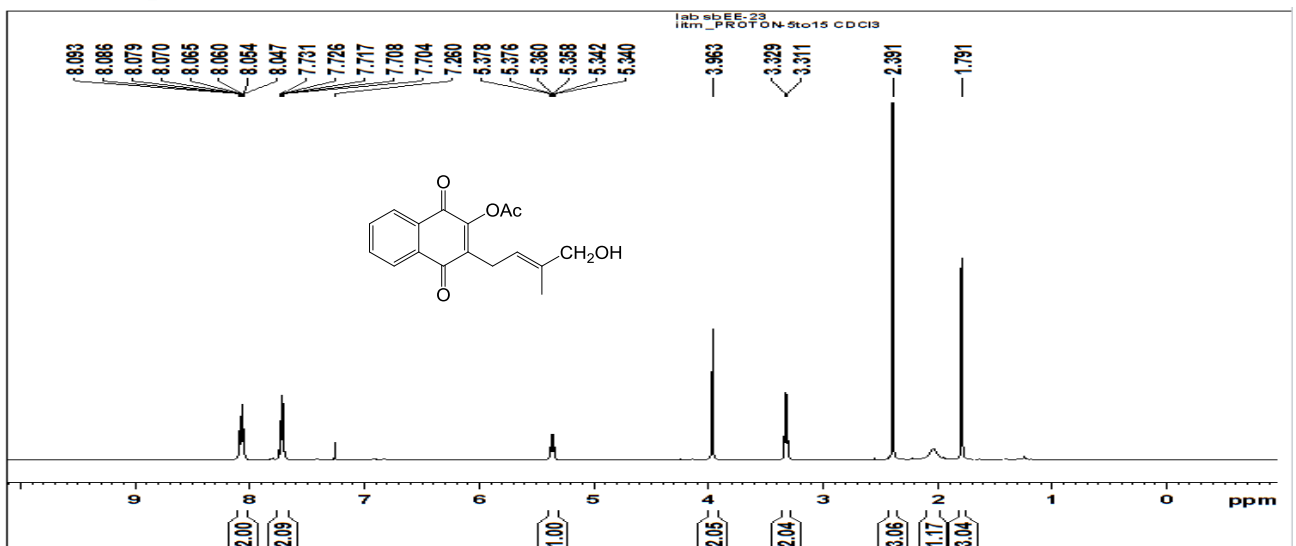


Annexe 36 : RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 64 (EE31)

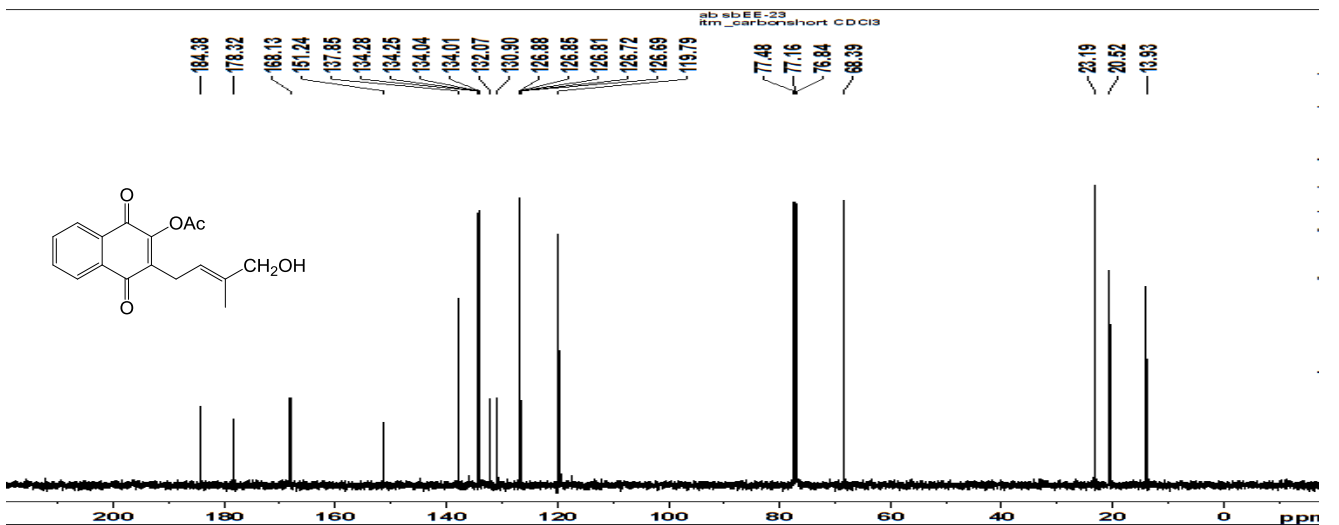


Annexe 37 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 64 (EE-31)

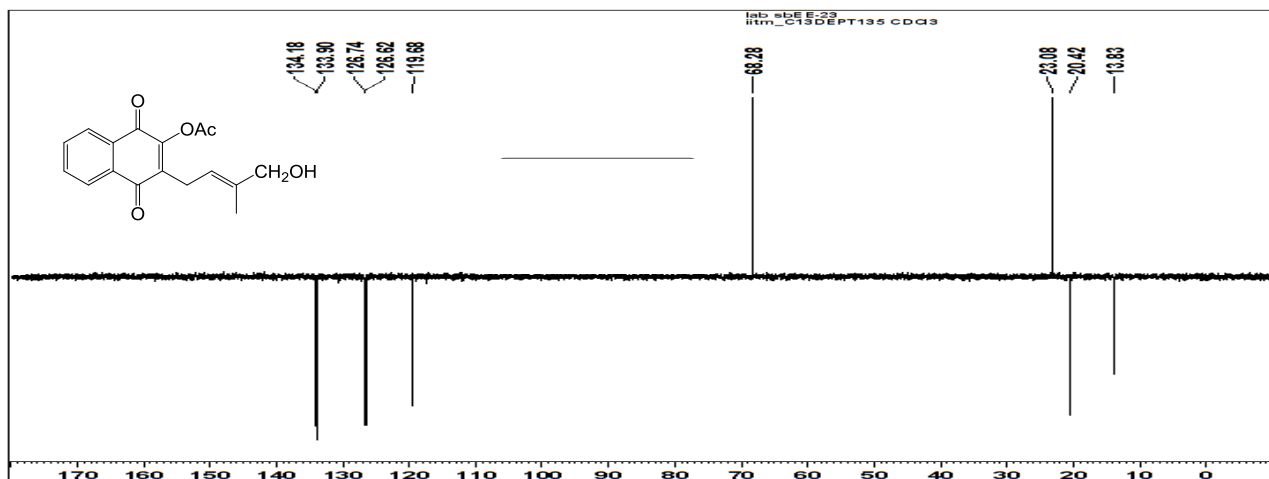
IV.9 Composé 65 (EE-23)



Annexe 38 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 65 (EE-23)

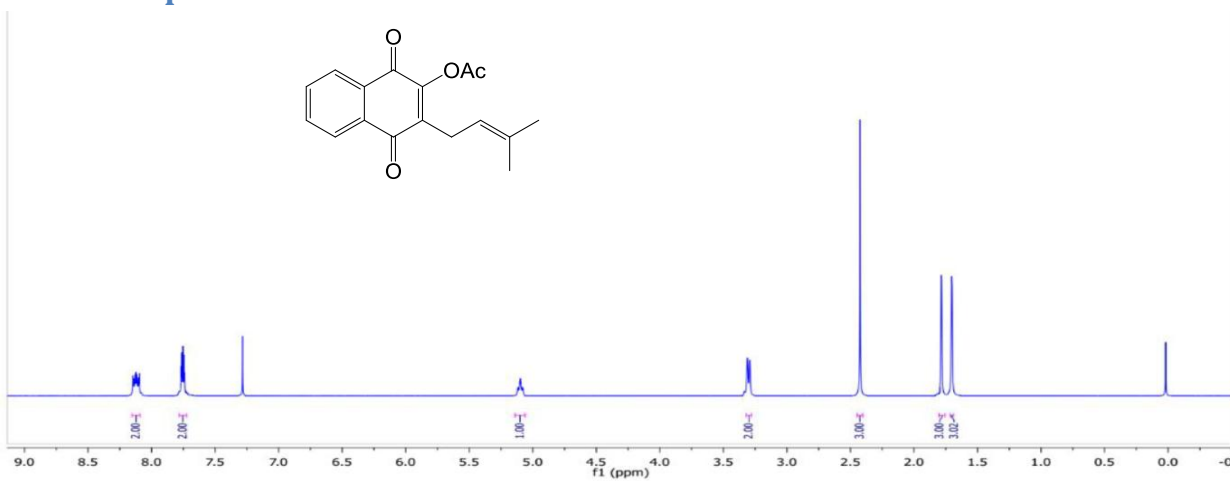


Annexe 39 : RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 65 (EE-23)

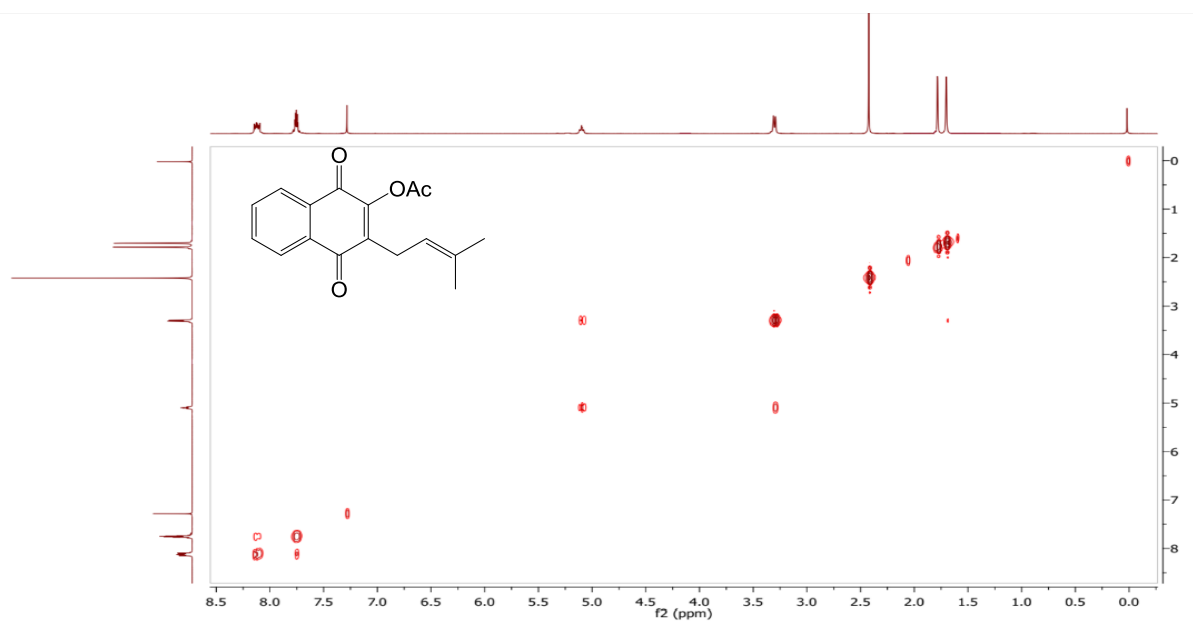


Annexe 40 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 65 (EE-23)

IV.10 Composé 66

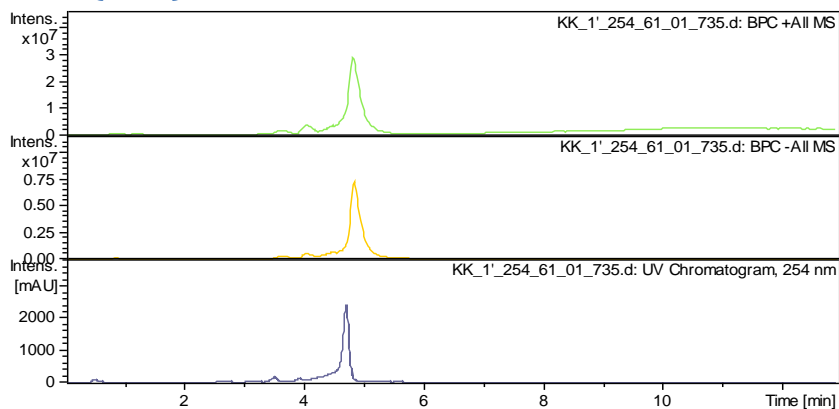


Annexe 41 : Spectre RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) du Composé 66

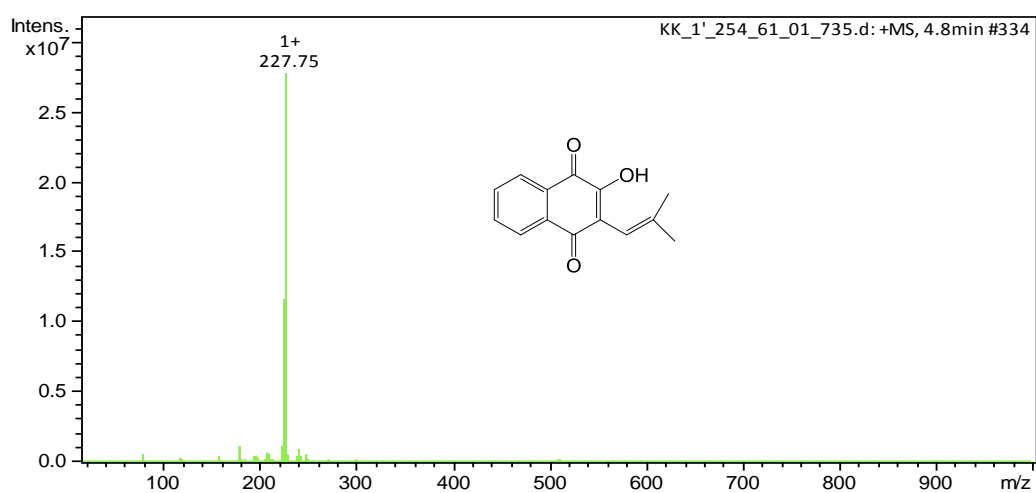


Annexe 42 : Spectre COSY du Composé 66

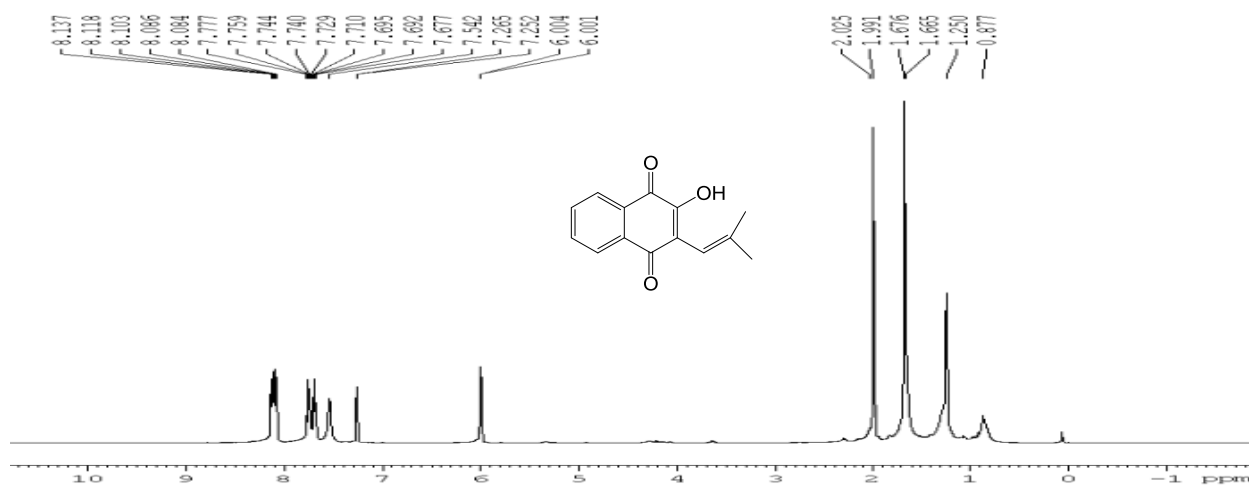
IV.11 Composé 68 (KK1)



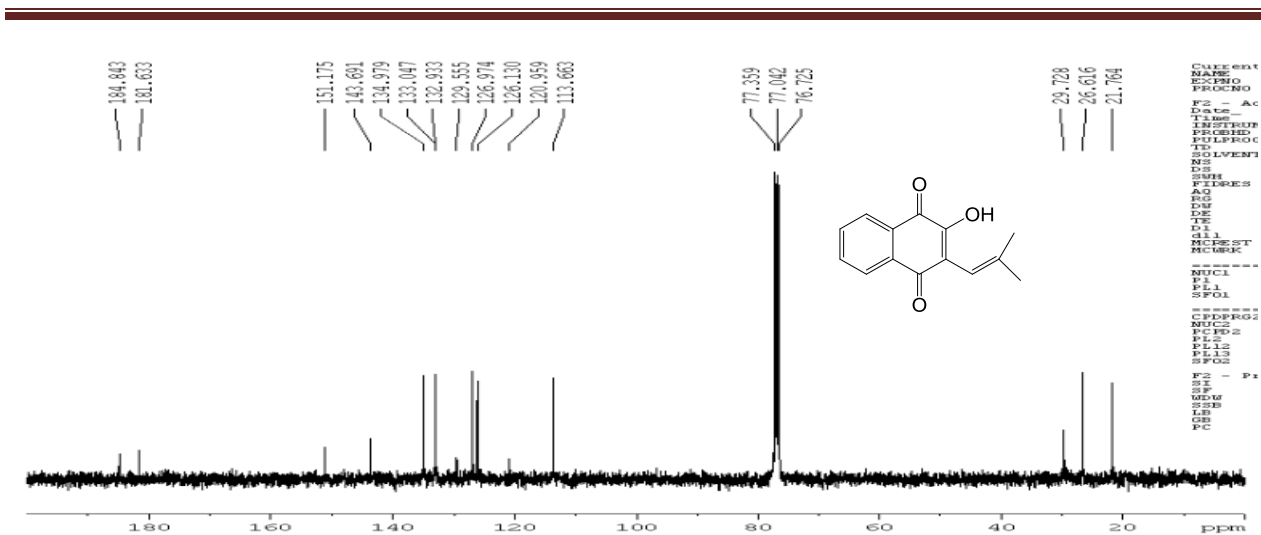
Annexe 43 : Chromatogramme du composé 68



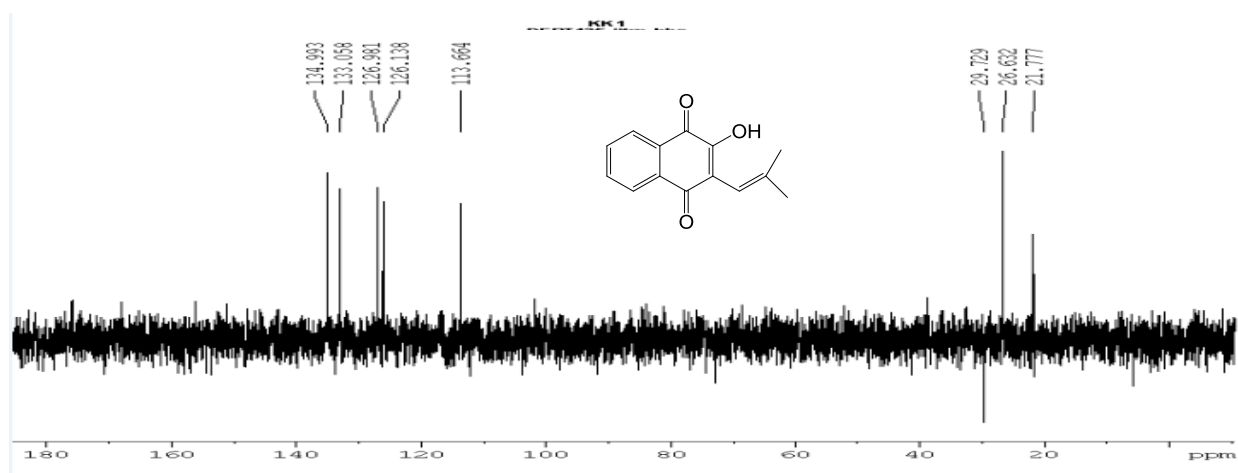
Annexe 44 : Spectre de masse (ACPI) du composé 68



Annexe 45 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 68 (KK1)

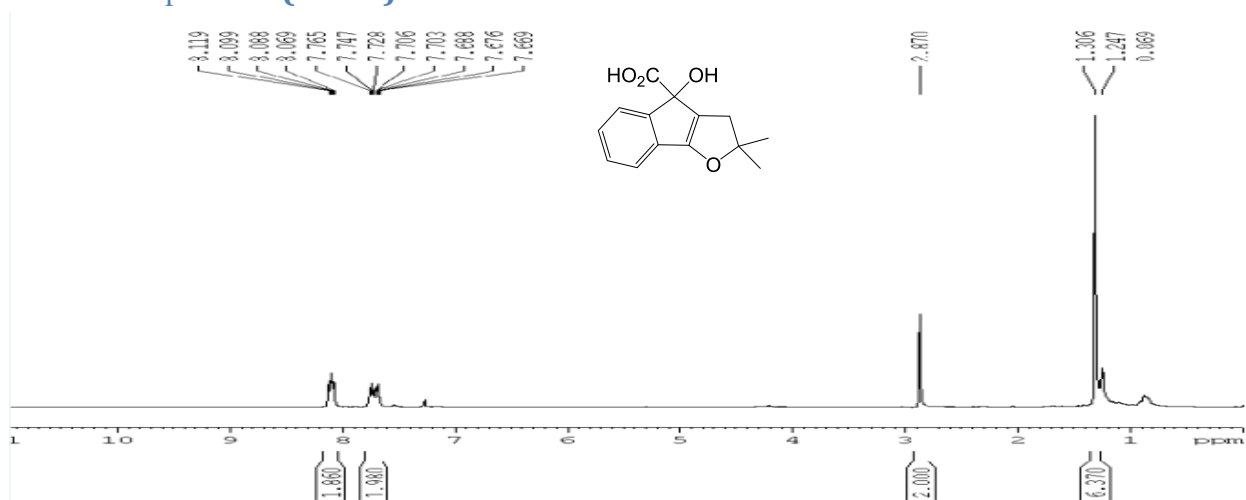


Annexe 46 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 68 (KK1)

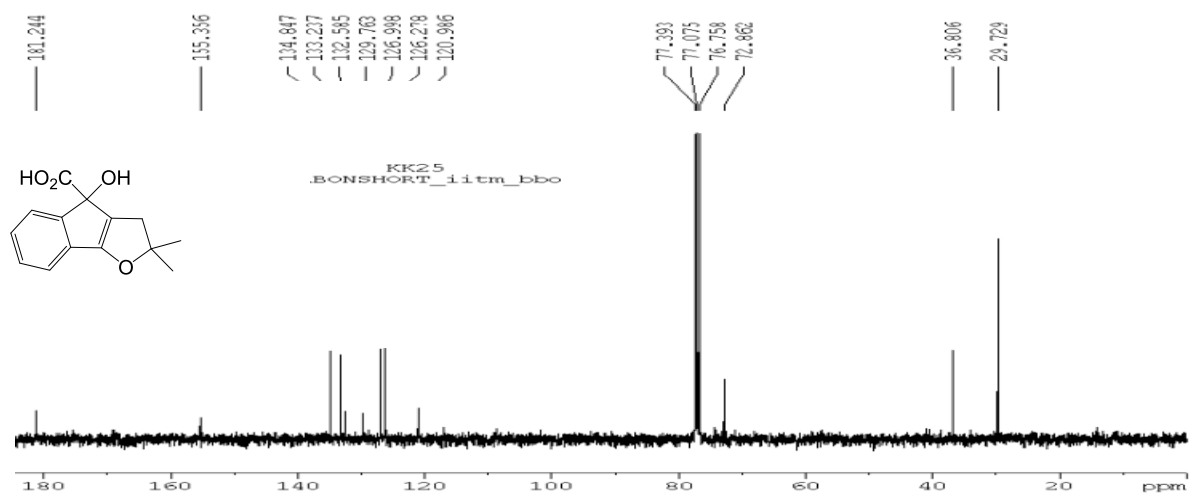


Annexe 47 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 68 (KK1)

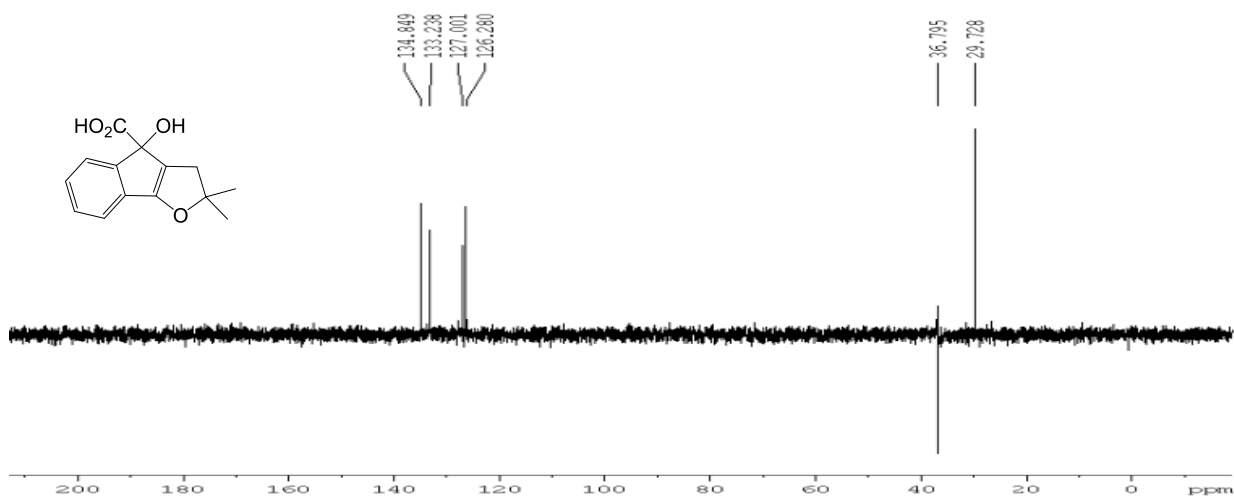
IV.12 Composé 69 (KK25)



Annexe 48 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 69 (KK25)

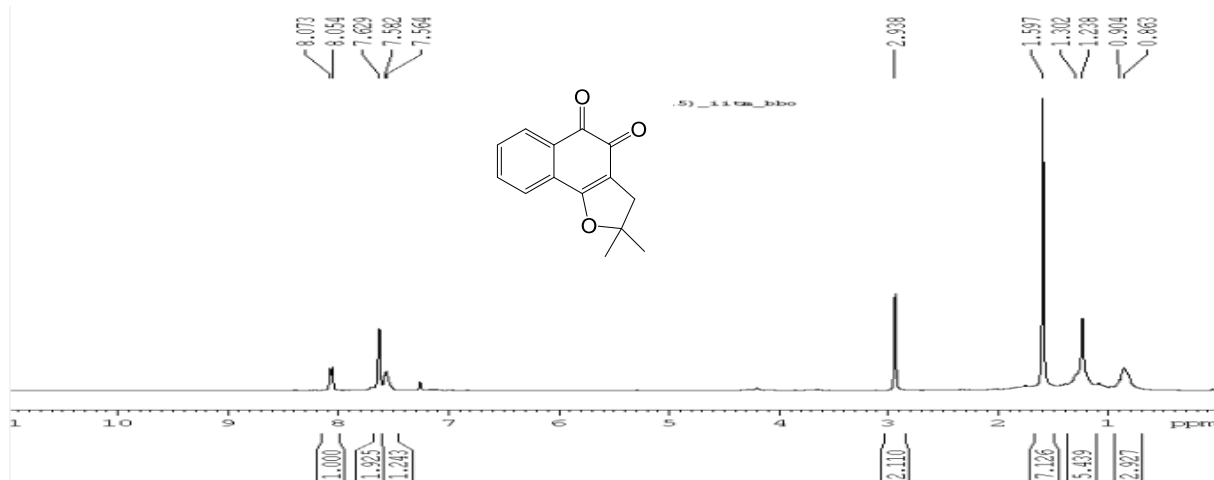


Annexe 49 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 69 (KK25)

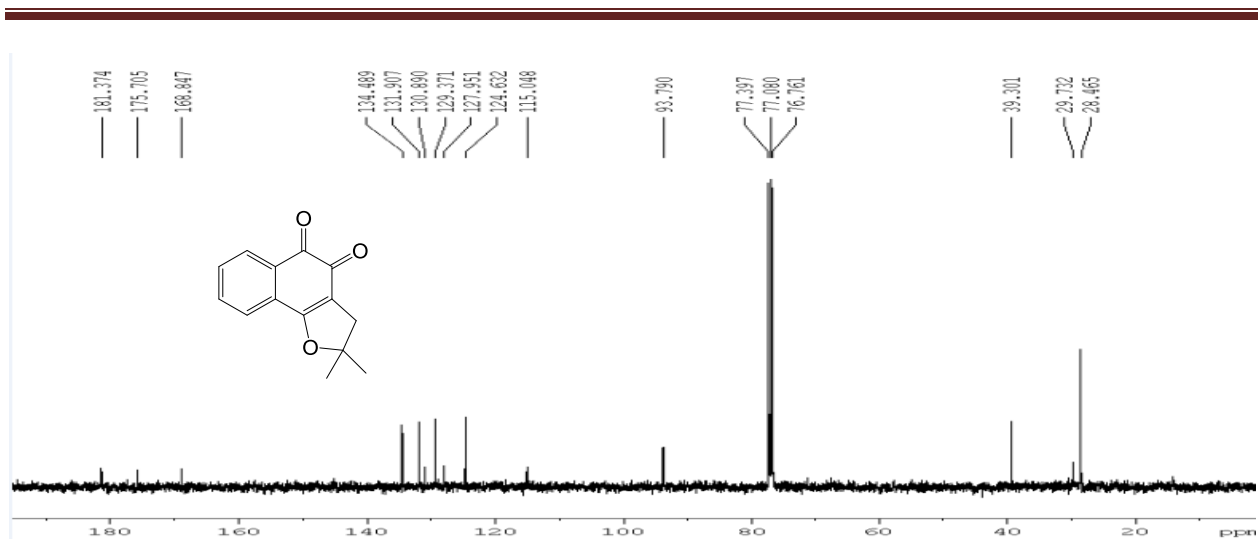


Annexe 50 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 69 (KK25)

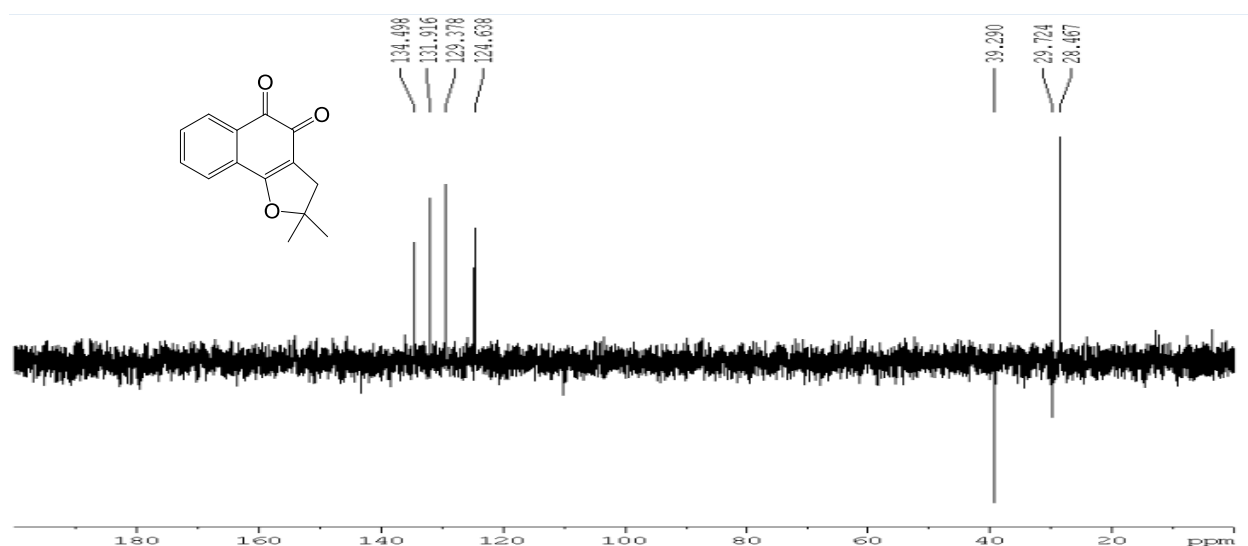
IV.13 Composé 70 (KK24)



Annexe 51 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 70 (KK24)

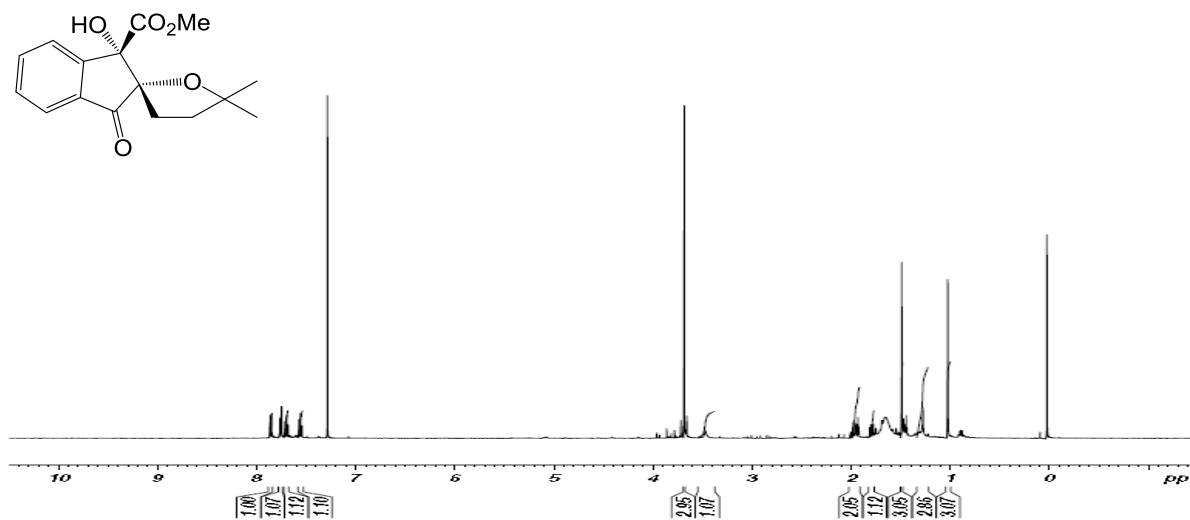


Annexe 52 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 70 (KK24)



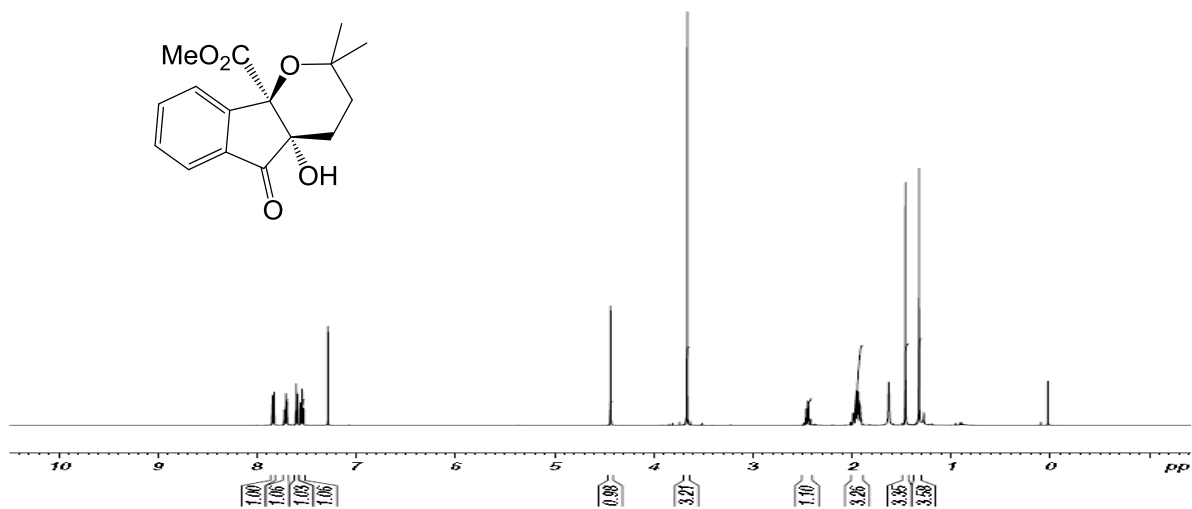
Annexe 53 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 70 (KK24)

IV.14 Composé 71 (KK13a)

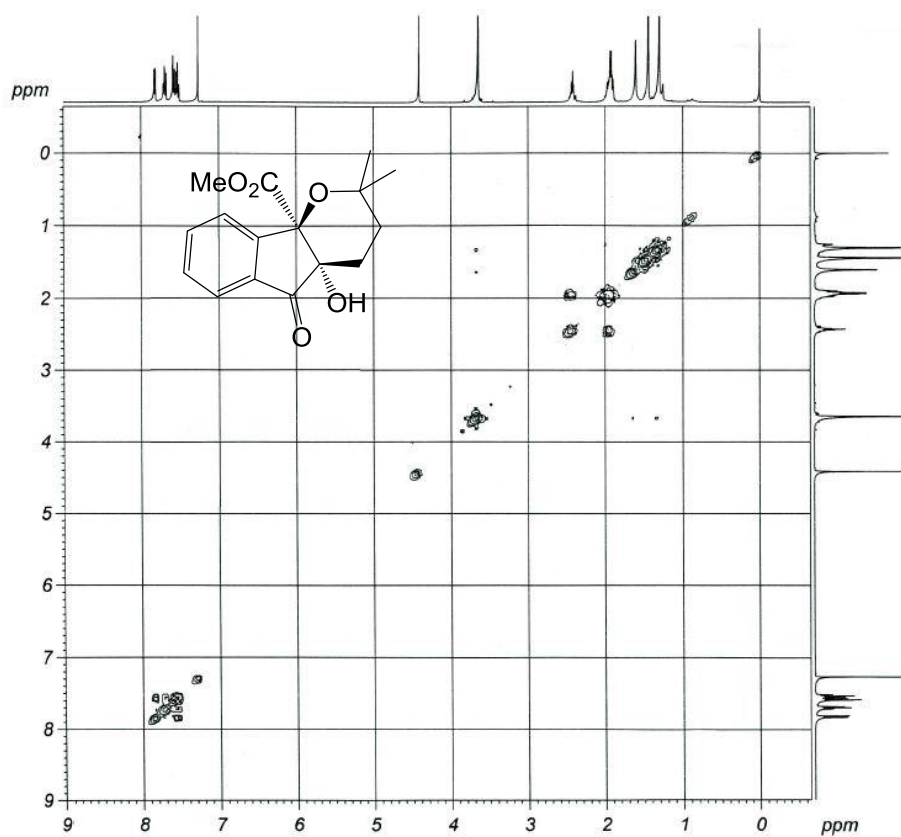


Annexe 54 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 71 (KK13a)

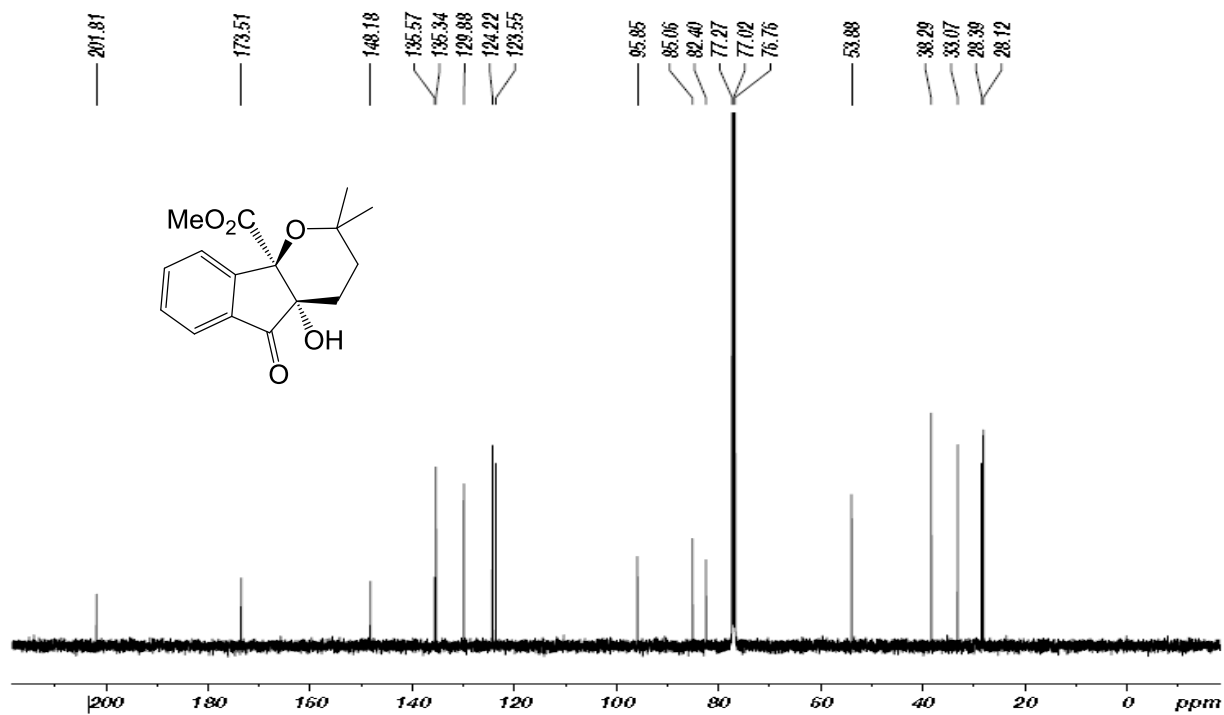
IV.15 Composé 72 (KK14)



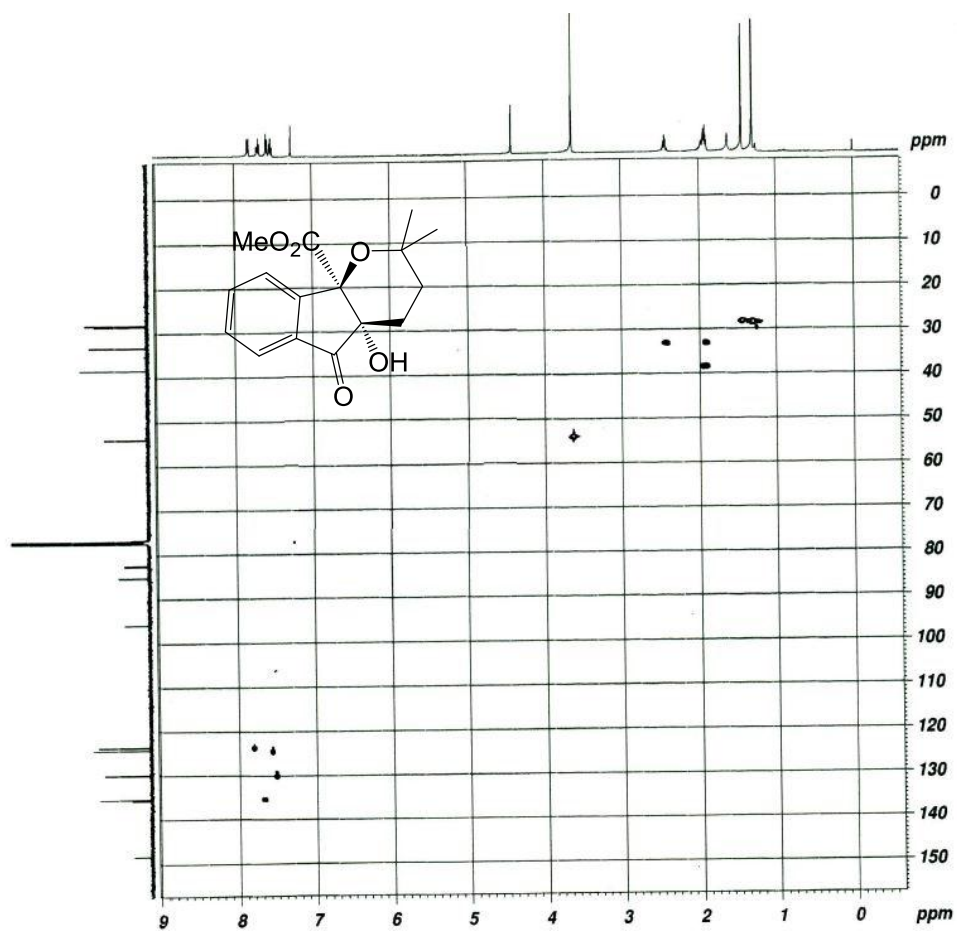
Annexe 55 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 72 (KK14)



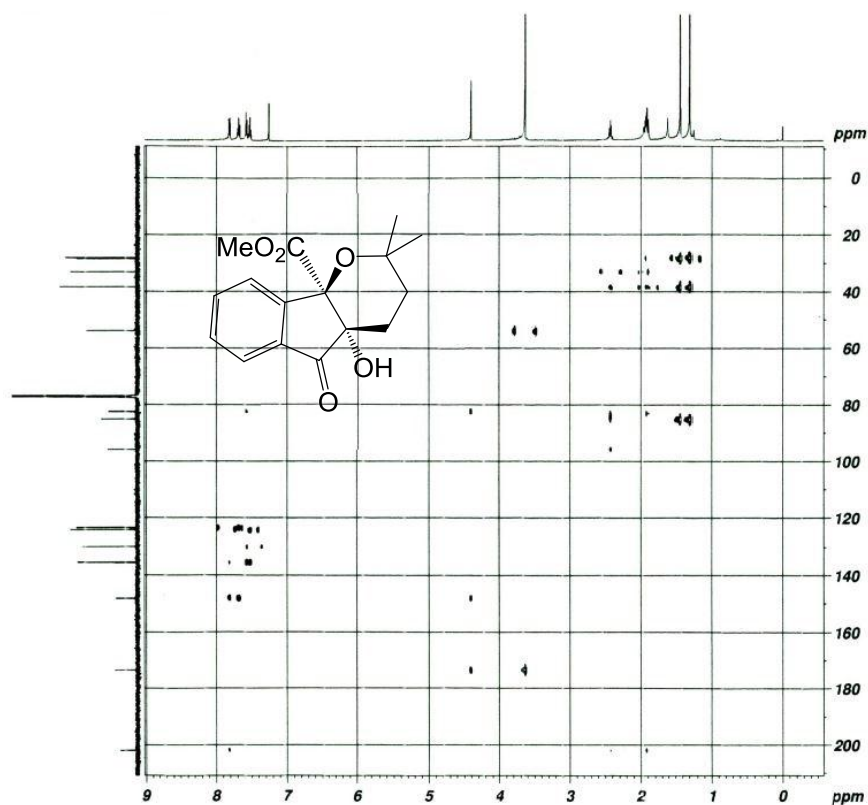
Annexe 56 : Spectre COSY du composé 72 (KK14)



Annexe 57 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 72 (KK14)

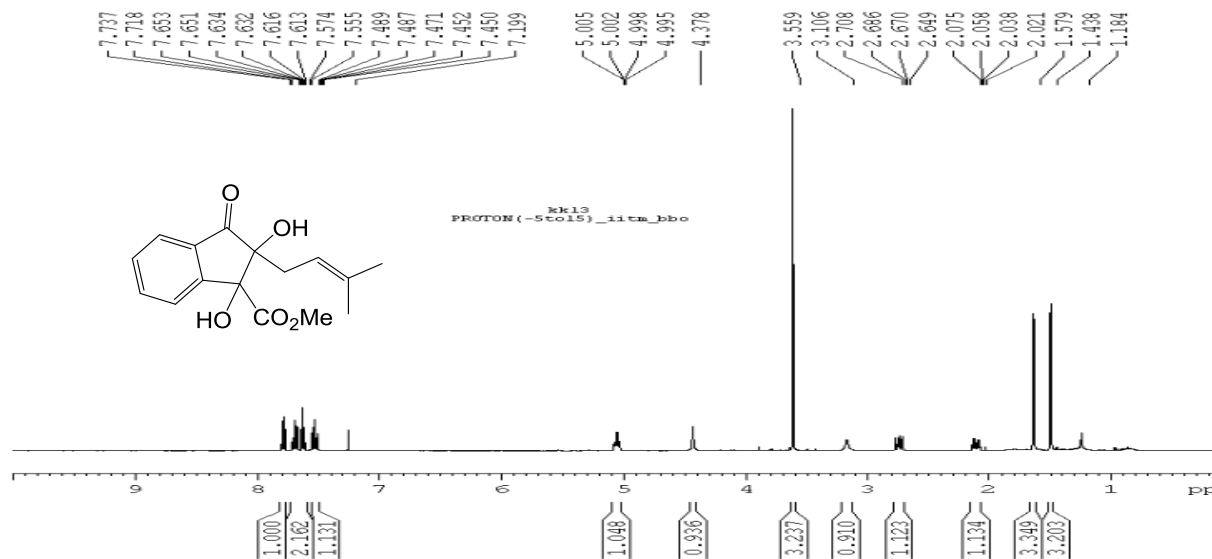


Annexe 58 : Spectre HSQC du composé 72 (KK14)

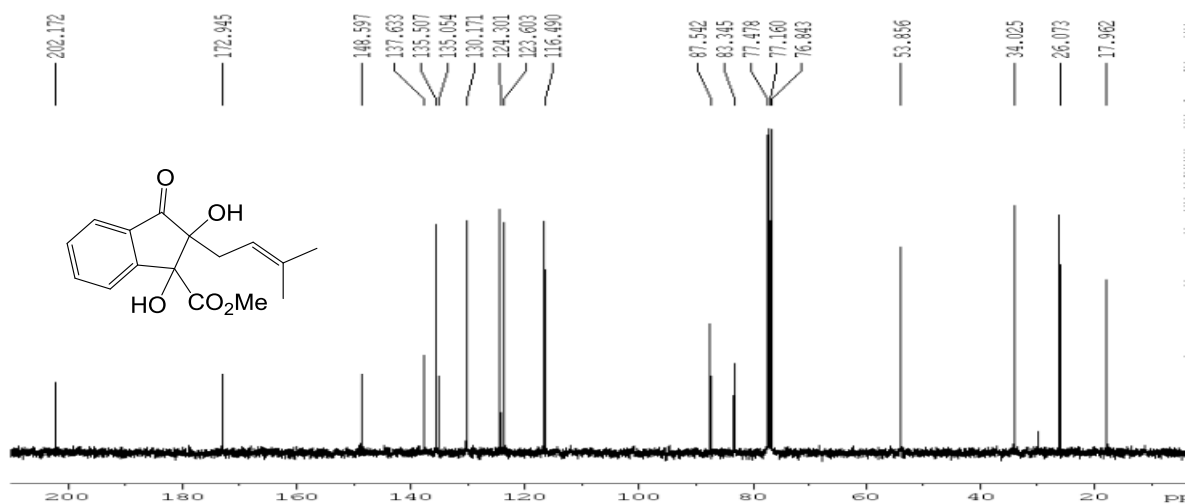


Annexe 59 : Spectre HMBC du composé 72 (KK14)

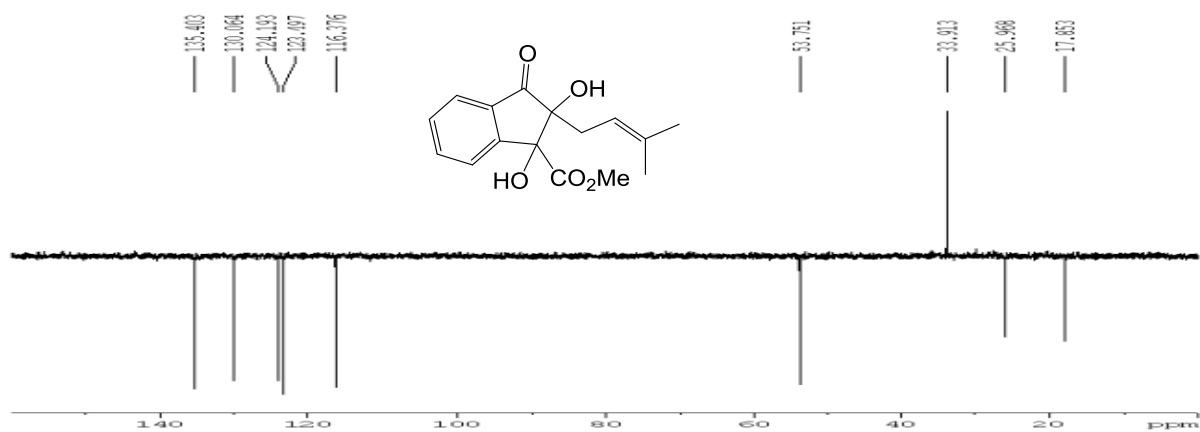
IV.16 Composé 73 (KK13)



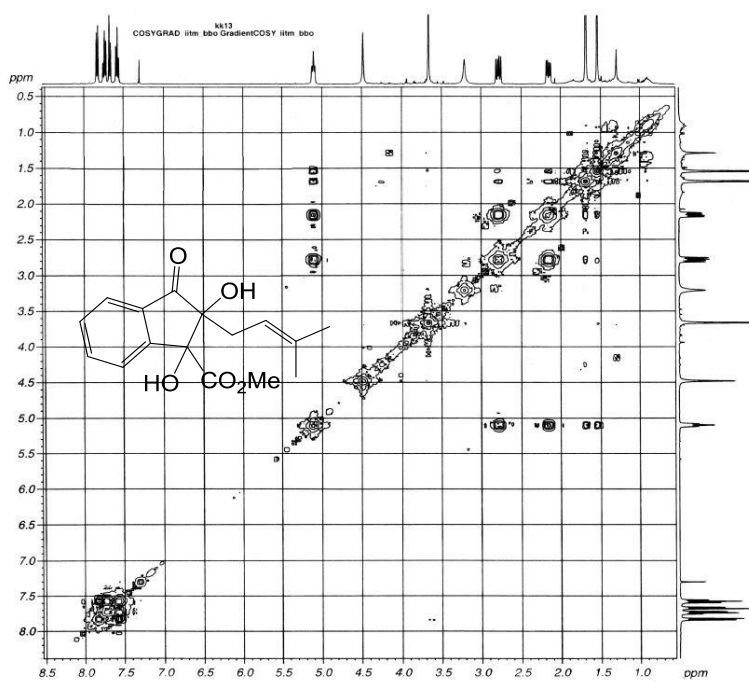
Annexe 60 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 73 (KK13)



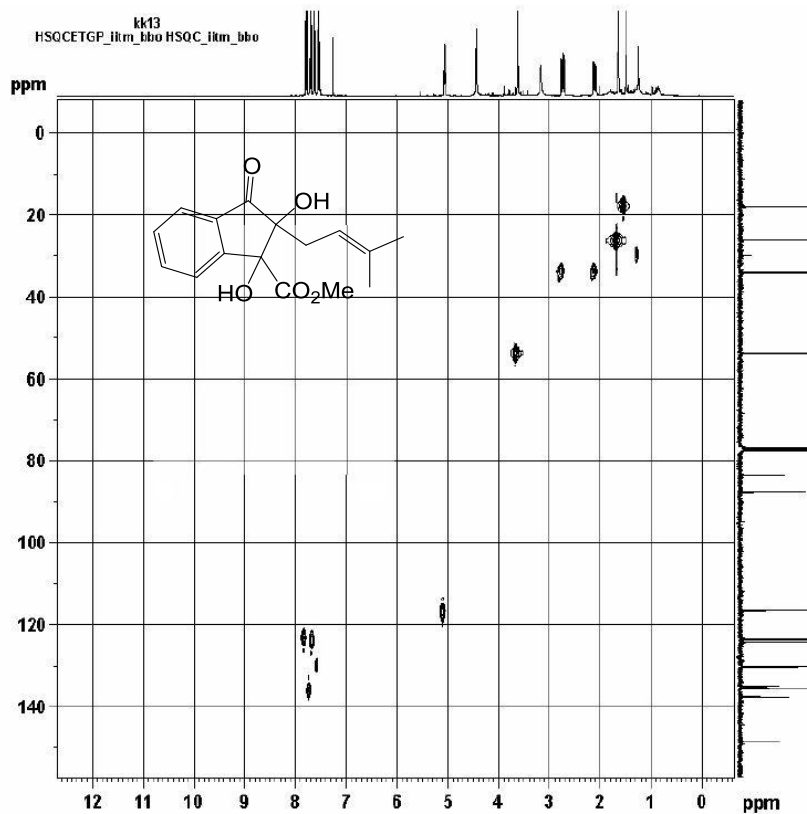
Annexe 61 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 73 (KK13)



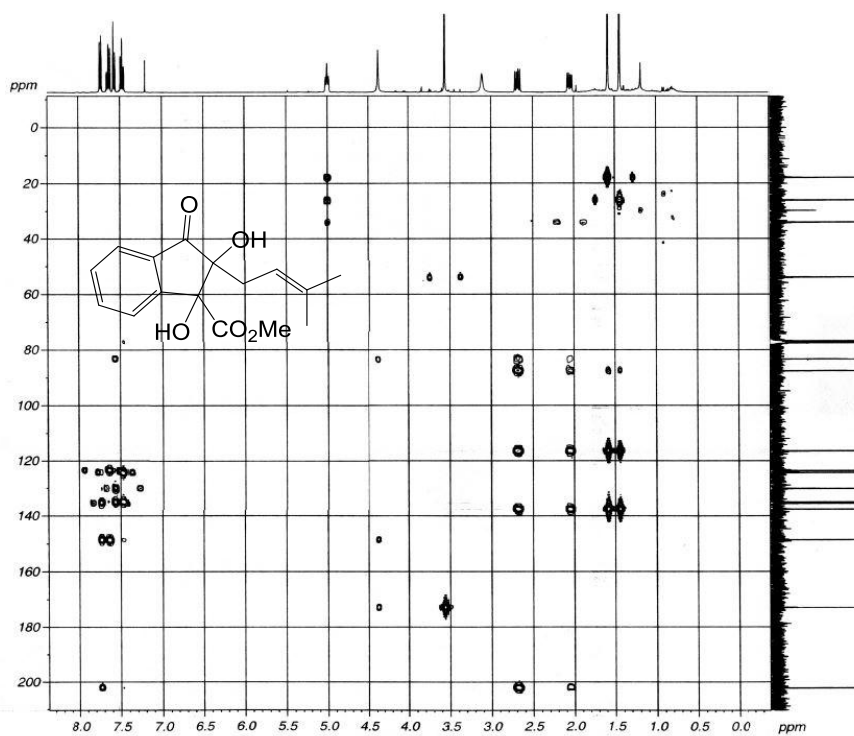
Annexe 62 : Spectre DEPT135 (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 73 (KK13)



Annexe 63 : Spectre COSY du composé 73 (KK13)

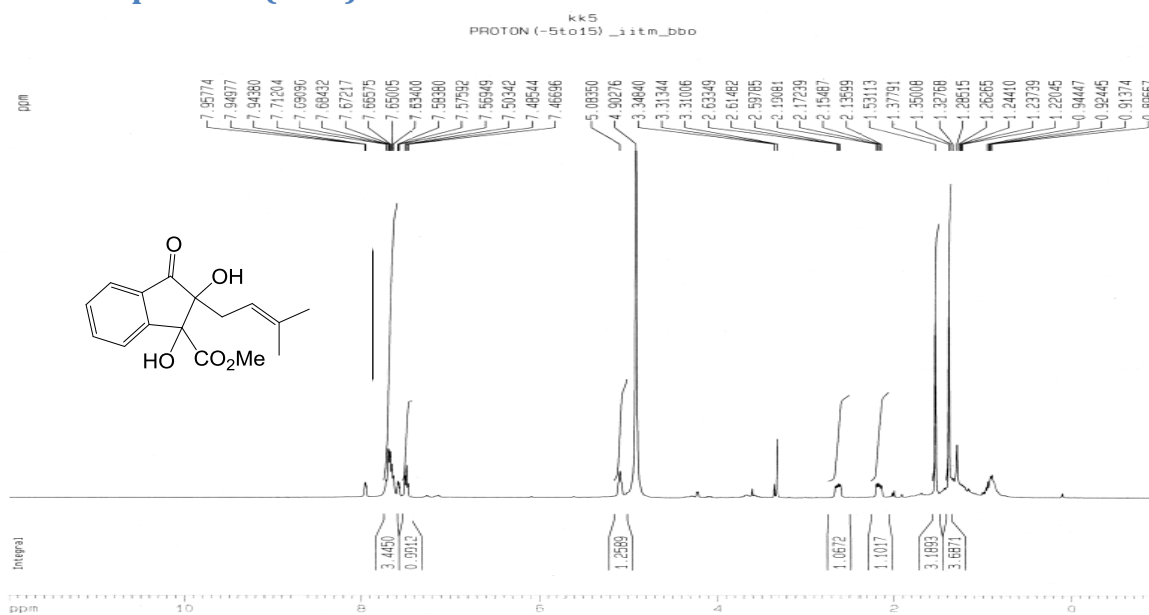


Annexe 64 : Spectre HSQC du composé 73 (KK13)

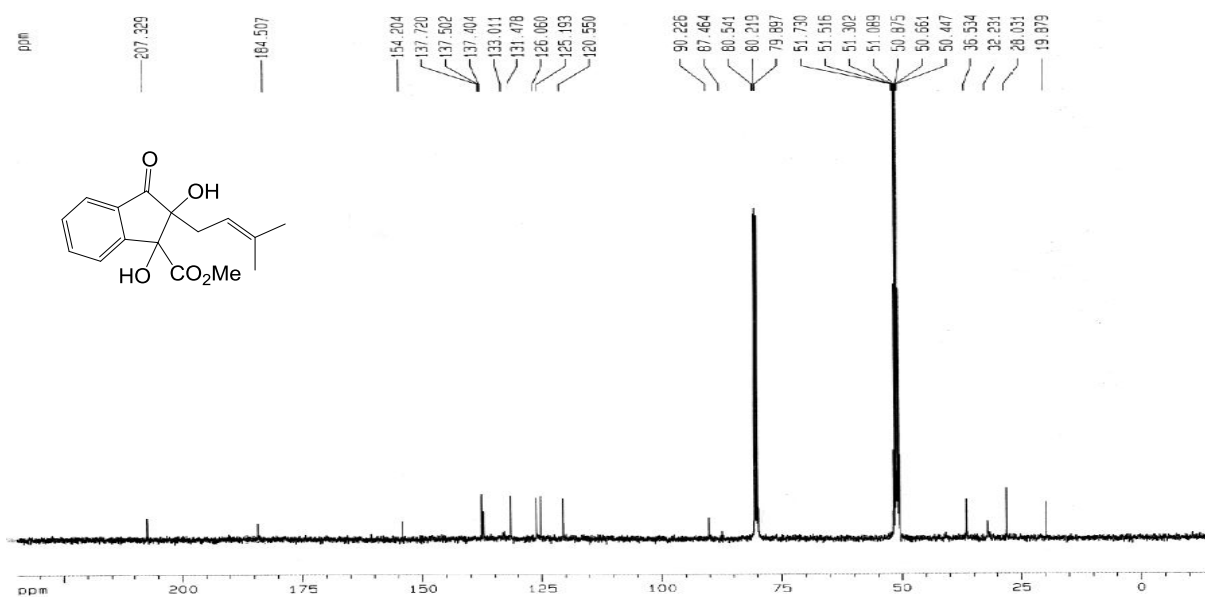


Annexe 65 : Spectre HMBC du composé 73 (KK13)

IV.17 Composé 74 (KK5)

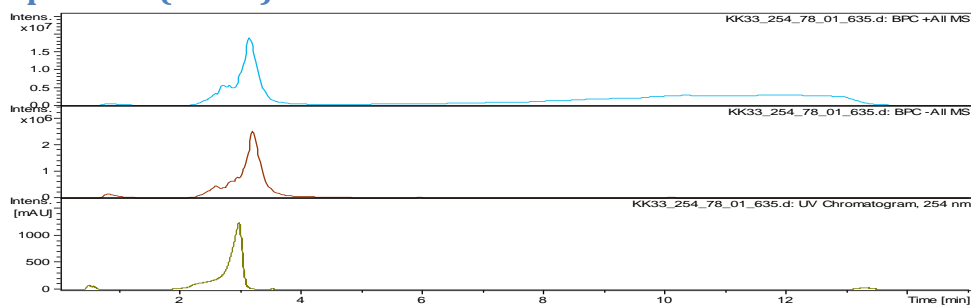


Annexe 66 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 74 (KK5)

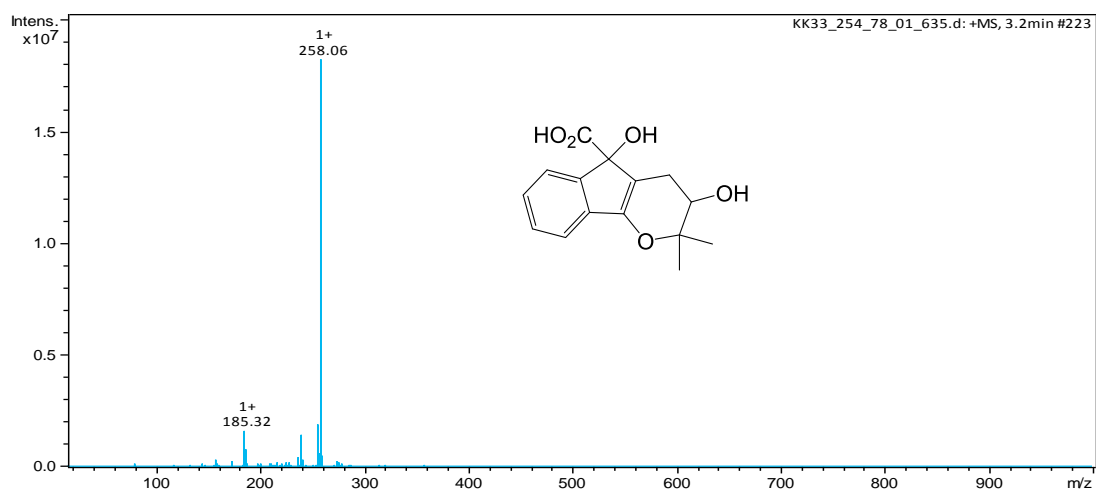


Annexe 67 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 74 (KK5)

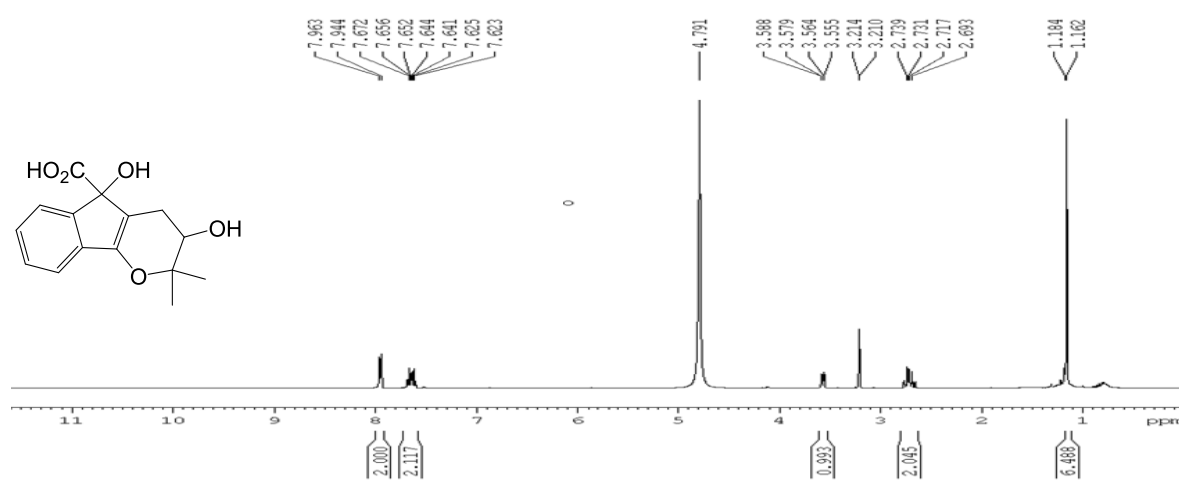
IV.18 Composé 75 (KK33)



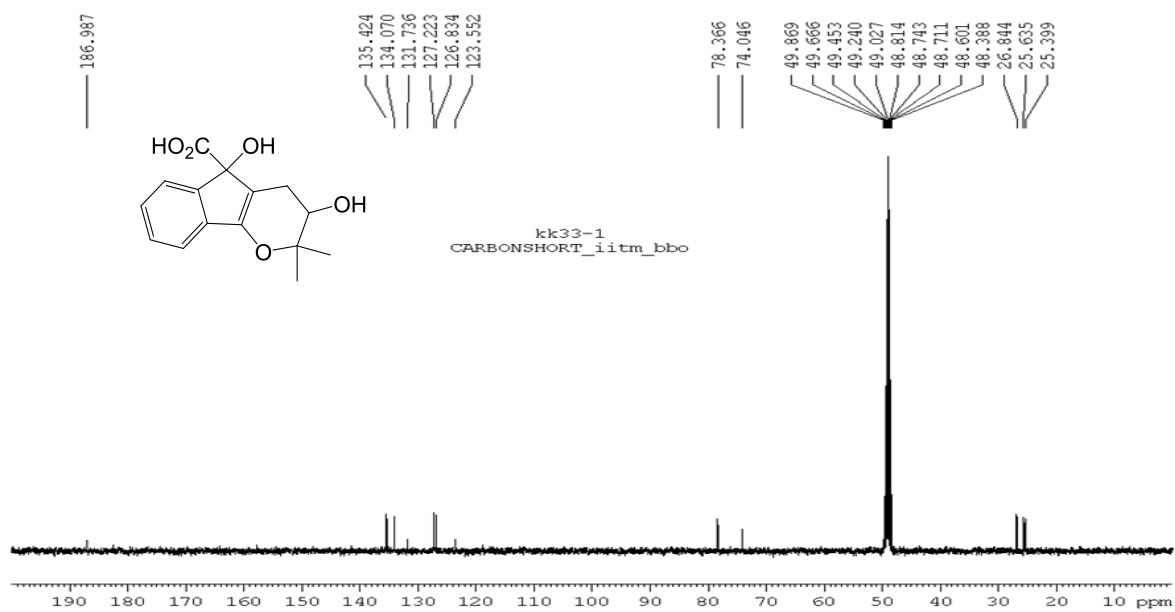
Annexe 68 : Chromatogramme du composé 75 (KK33)



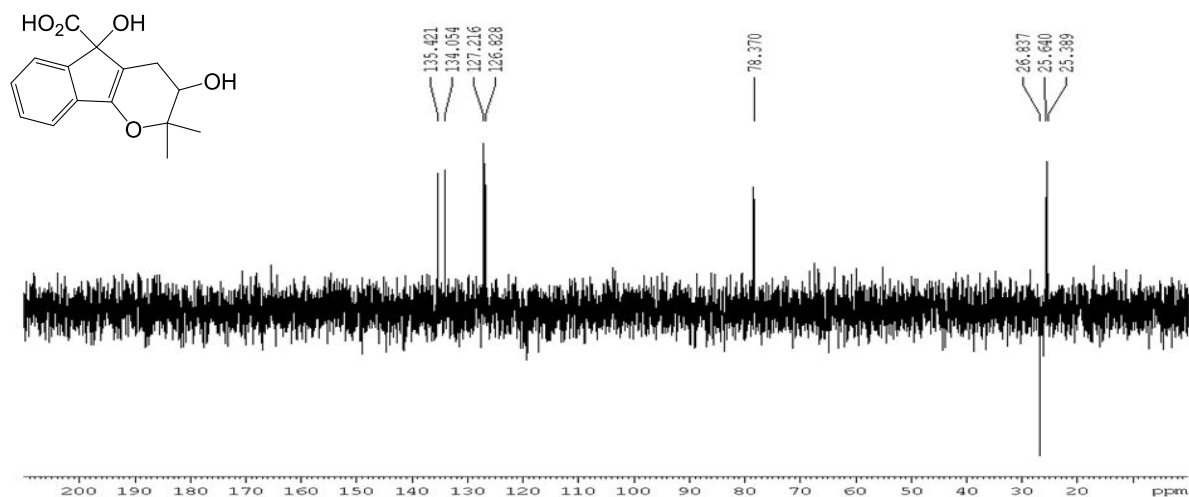
Annexe 69 : Spectre de masse (ACPI) du composé 75 (KK33)



Annexe 70 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) du composé 75 (KK33)

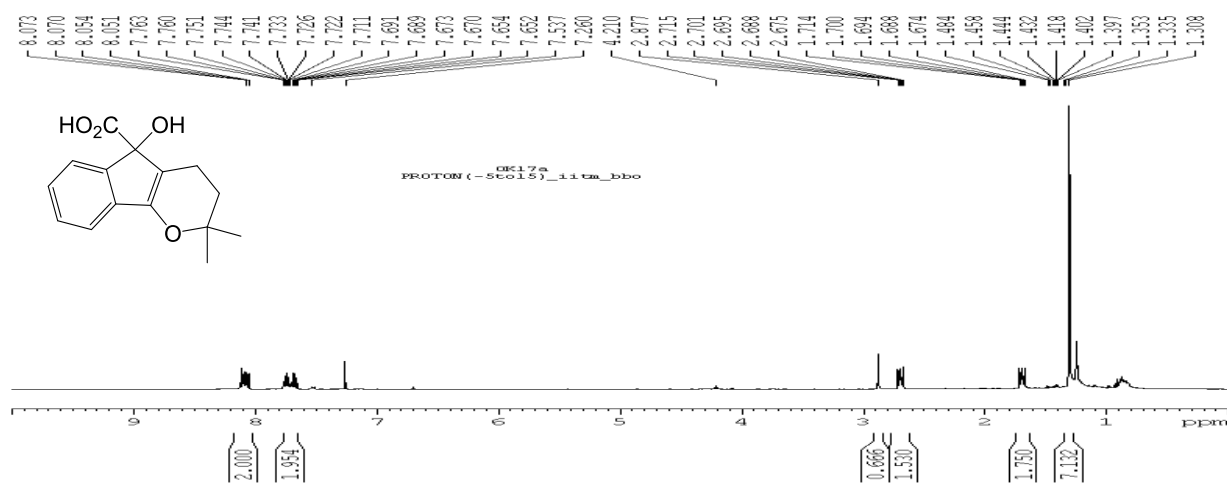


Annexe 71 : Spectre RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) du composé 75 (KK33)

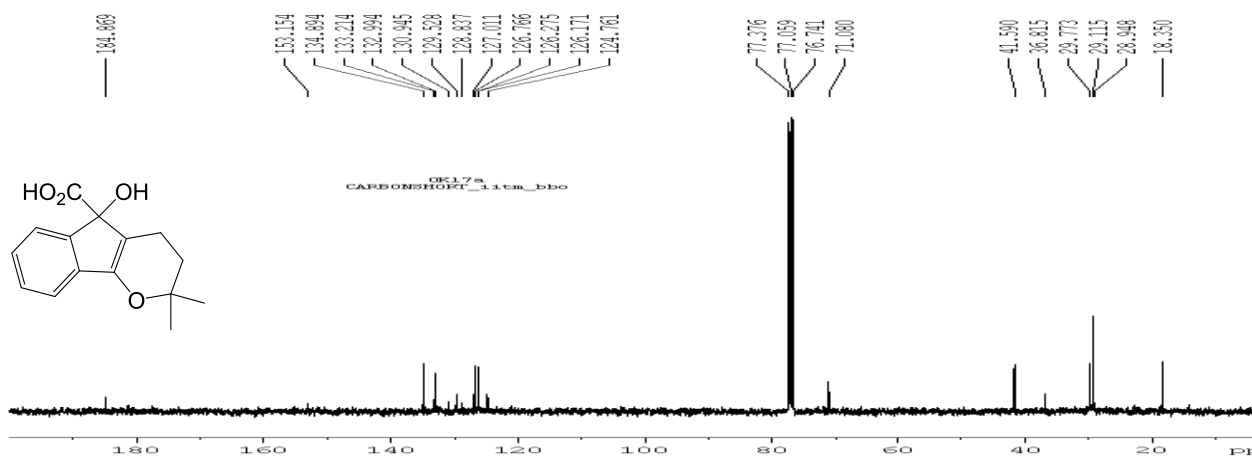


Annexe 72 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 75 (KK33)

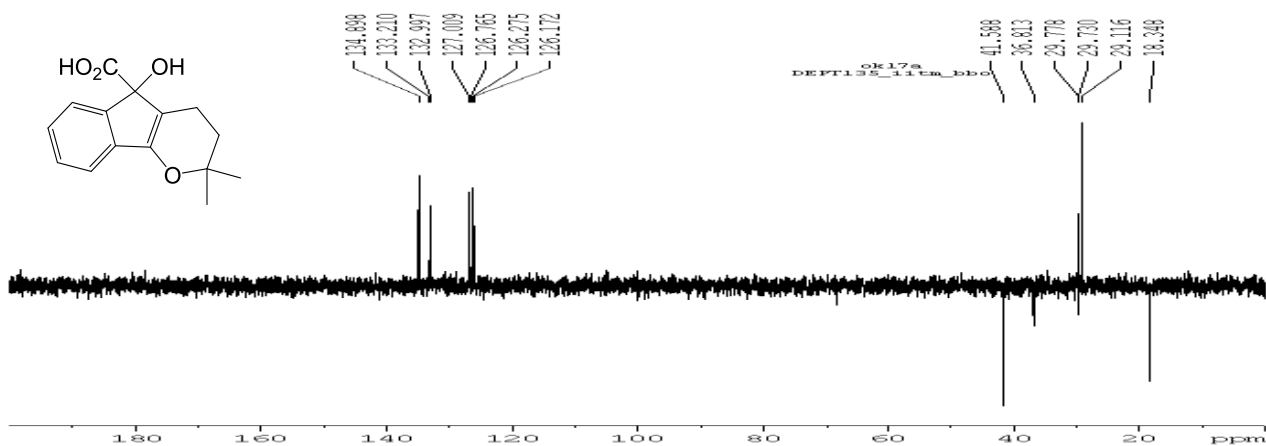
IV.19 Composé 78 (OK17a)



Annexe 73 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 78 (OK17a)

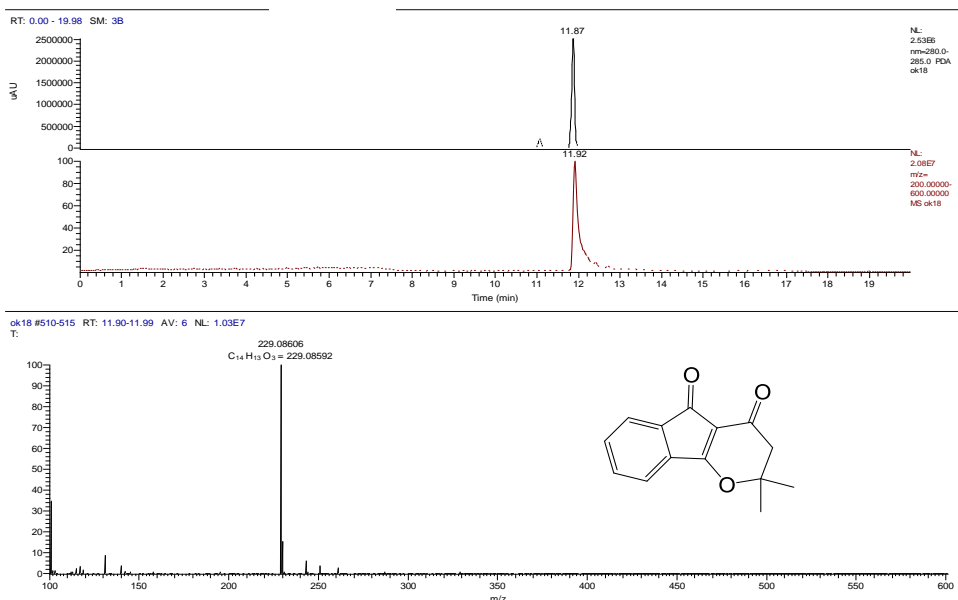


Annexe 74 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 78 (OK17a)

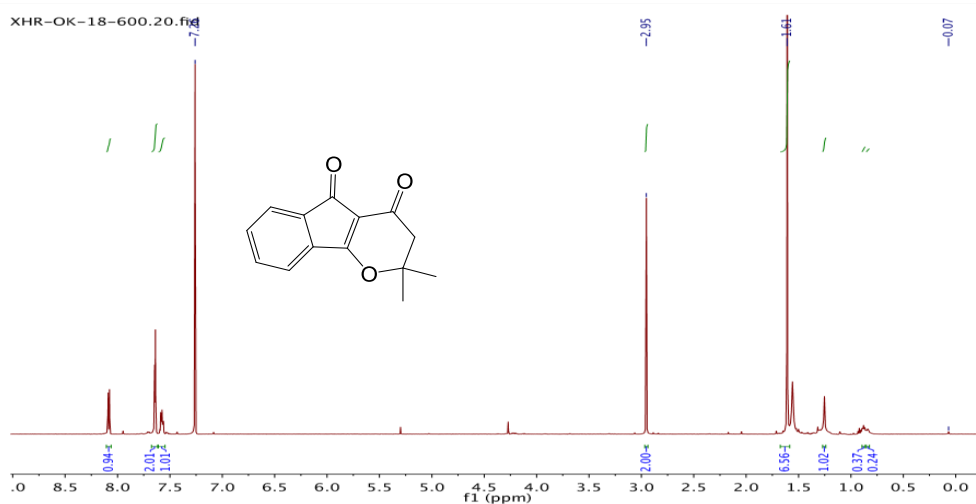


Annexe 75 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 78 (OK17a)

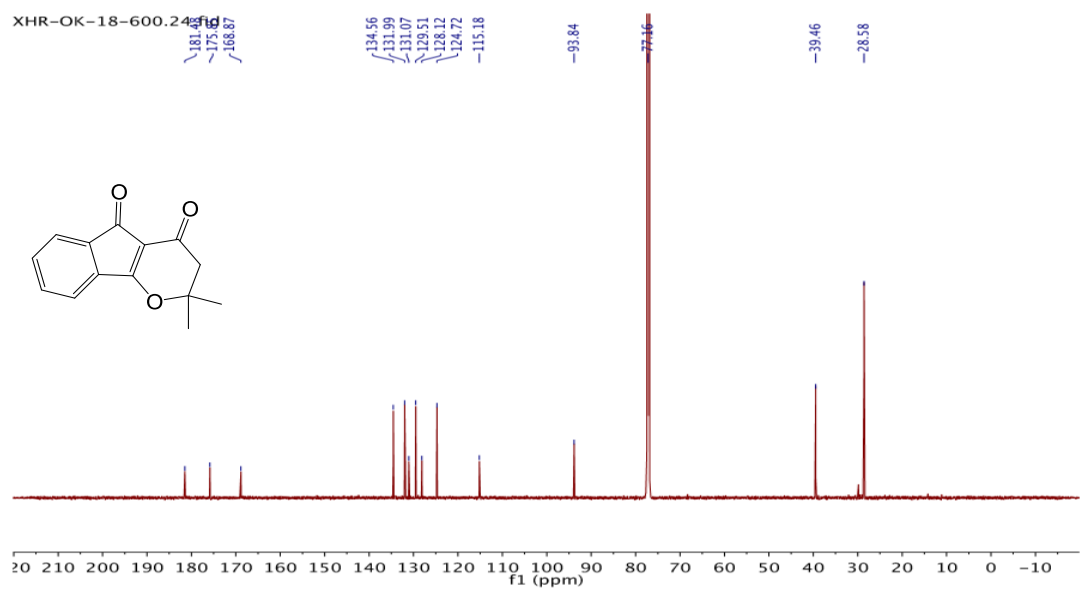
IV.20 Composé 76 (OK18)



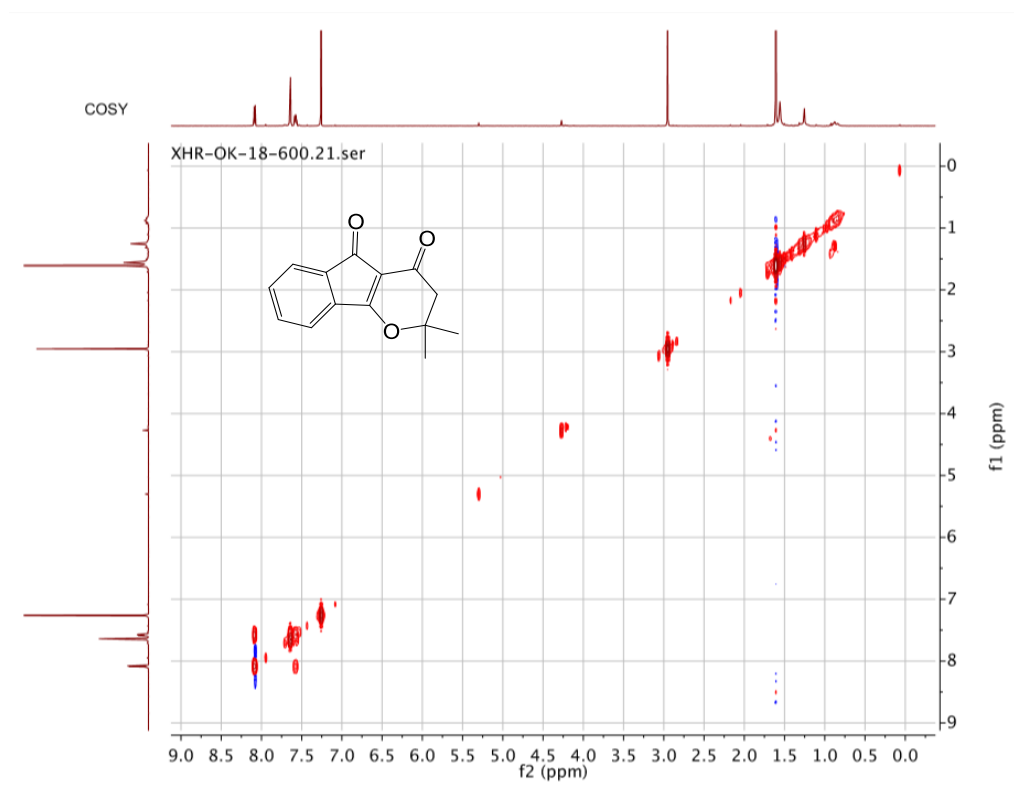
Annexe 76 : Chromatogramme LCMS du composé 76



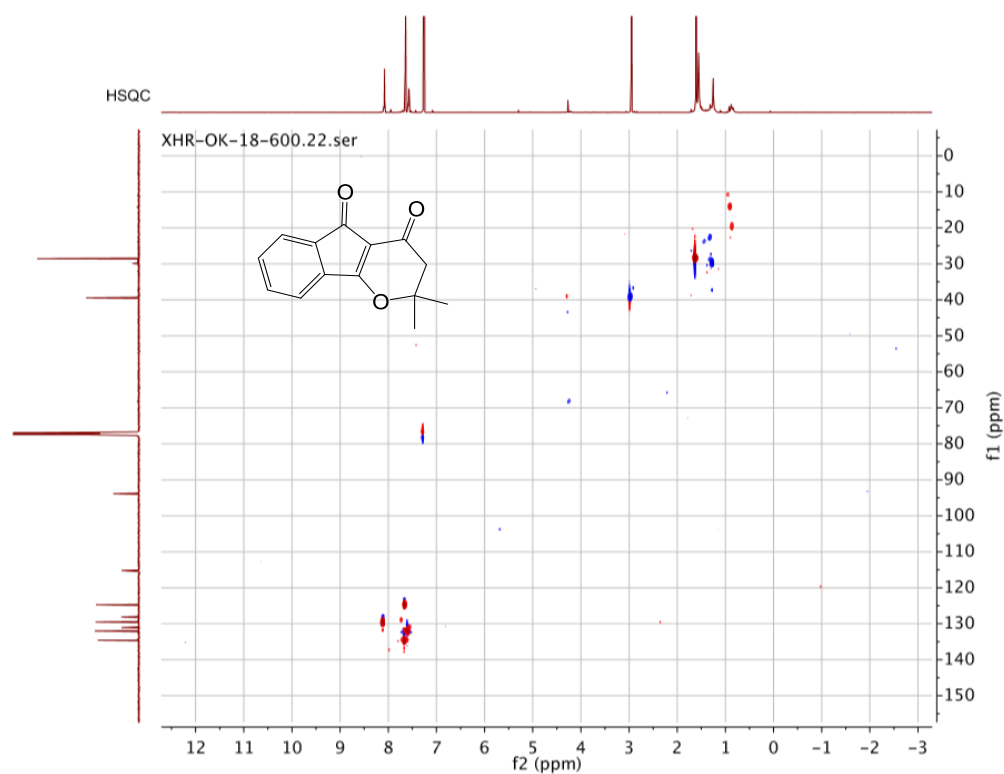
Annexe 77 : Spectre RMN¹H (CDCl₃, 600 MHz) du composé 76 (OK18)



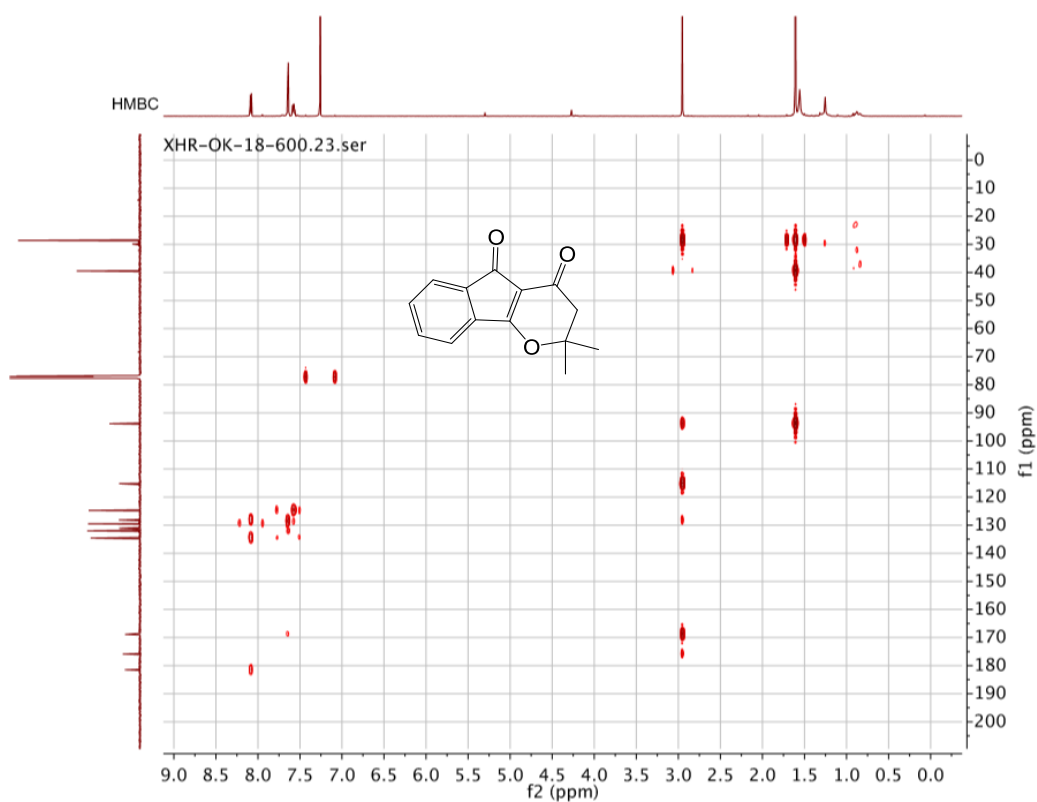
Annexe 78 : Spectre RMN¹³C (CDCl₃, 150 MHz) du composé 76 (OK18)



Annexe 79 : Spectre COSY du composé 76 (OK18)

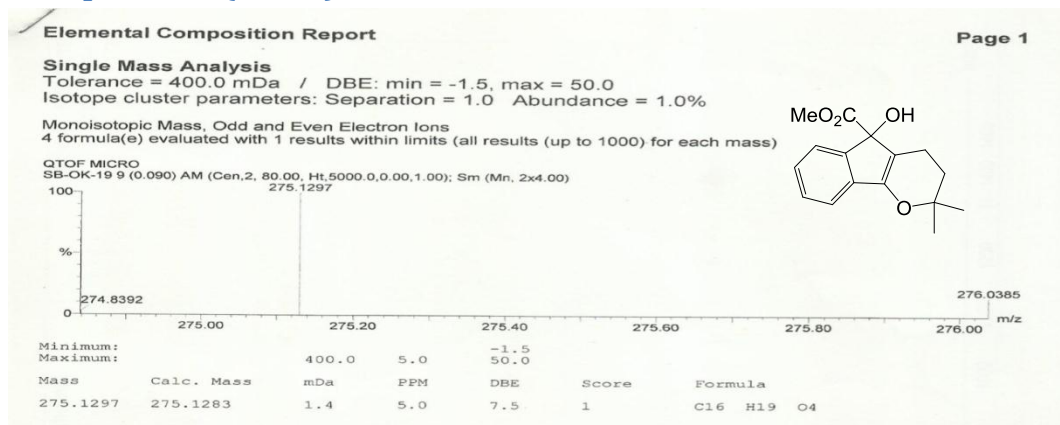


Annexe 80 : Spectre HSQC du composé 76 (OK18)

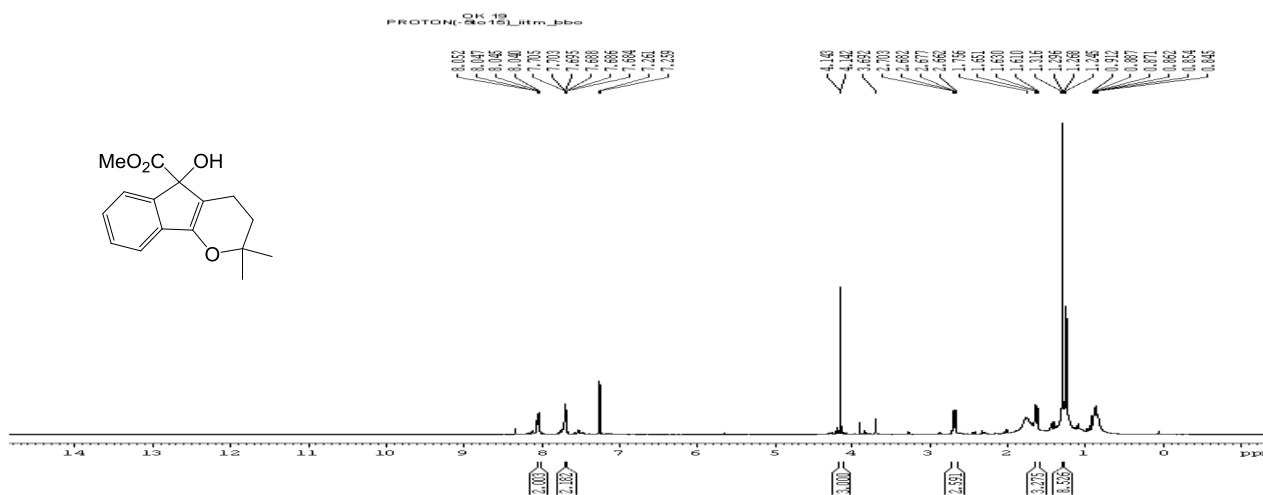


Annexe 81 : Spectre HMBC du composé 76 (OK18)

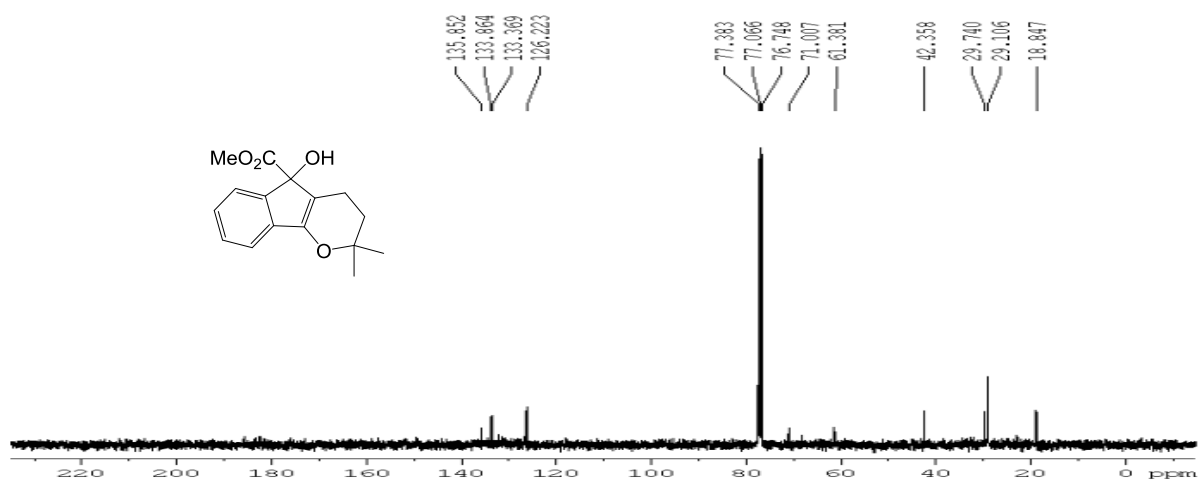
IV.21 Composé 77 (OK19)



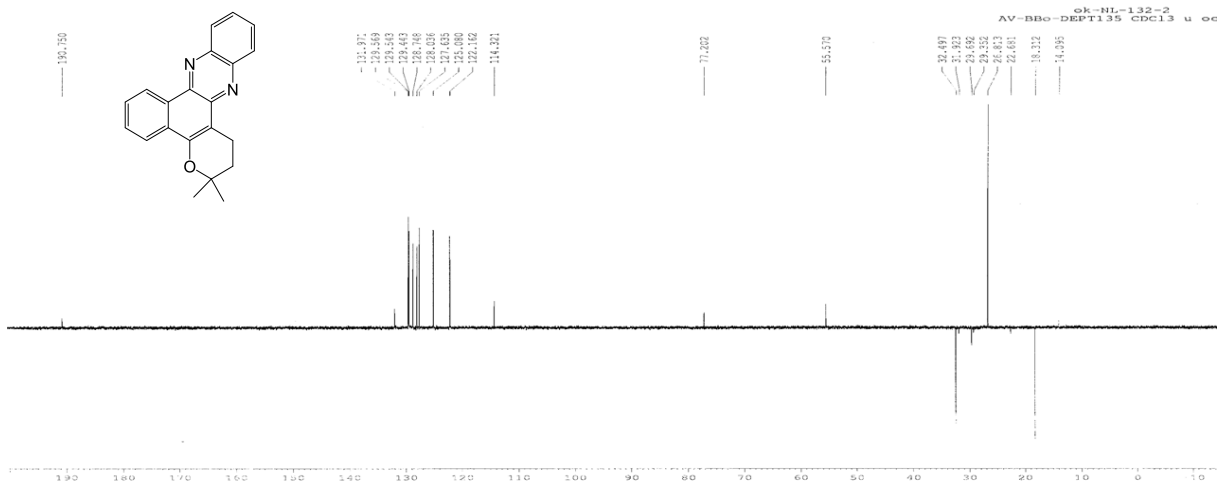
Annexe 82 : Spectre de masse (ESI-TOF) du composé 77 (OK19)



Annexe 83 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 77 (OK19)



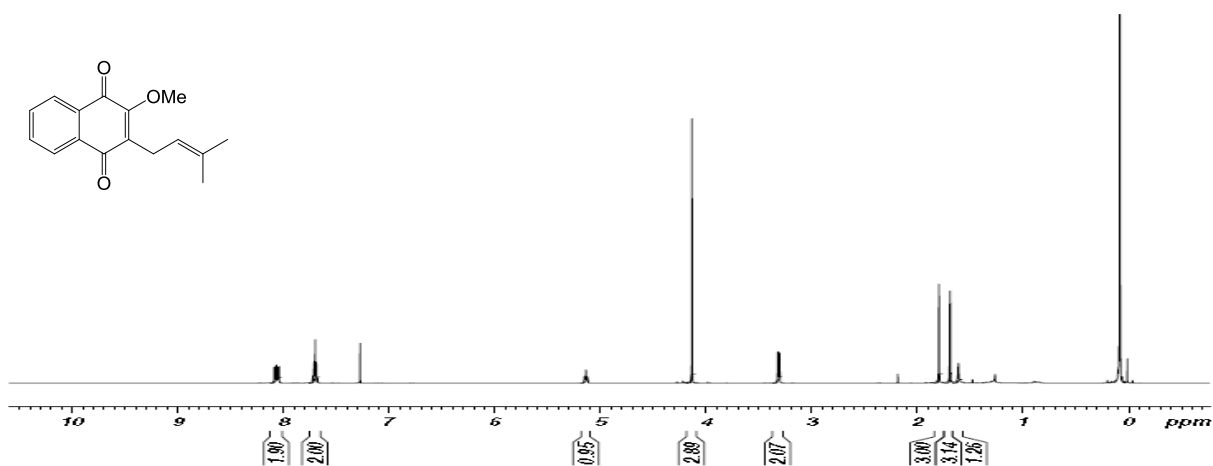
Annexe 84 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 77 (OK19)



Annexe 88 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 79 (NL)

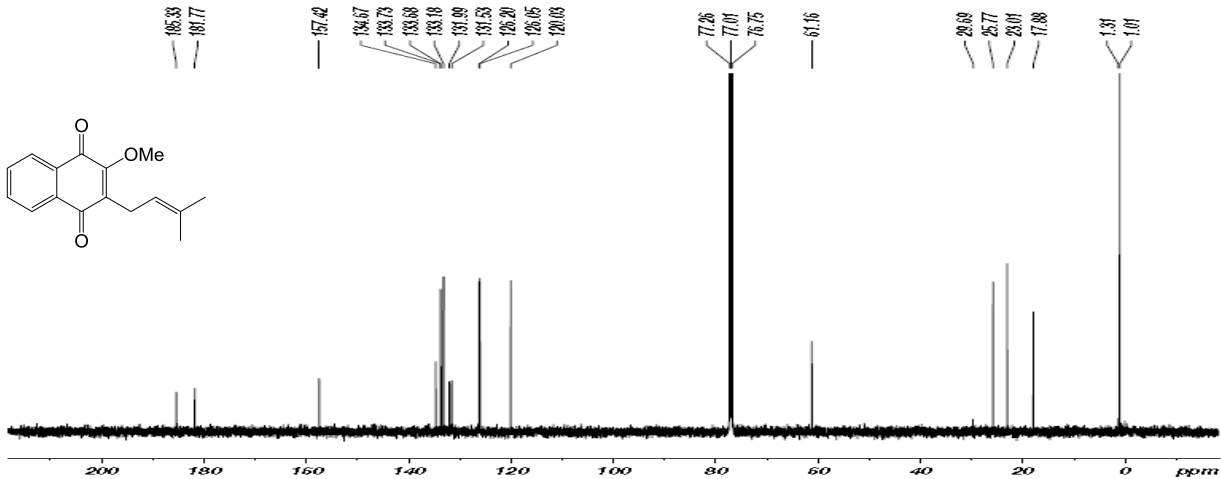
IV.23 Composé 80 (KK3)

SB2/KK3.....Baskar, Chemistry



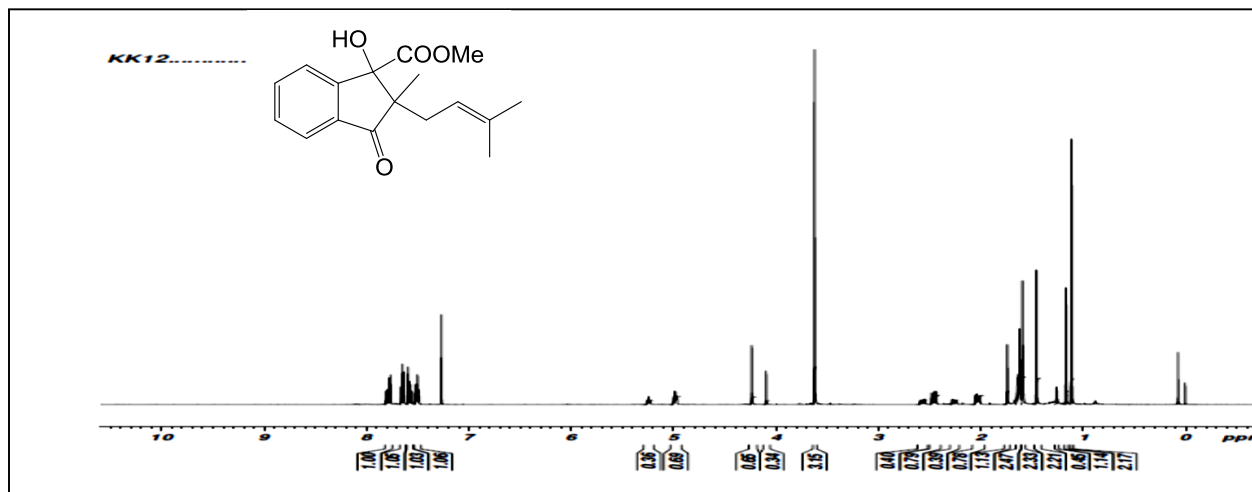
Annexe 89 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 80 (KK3)

SB2/KK3.....Baskar, Chemistry

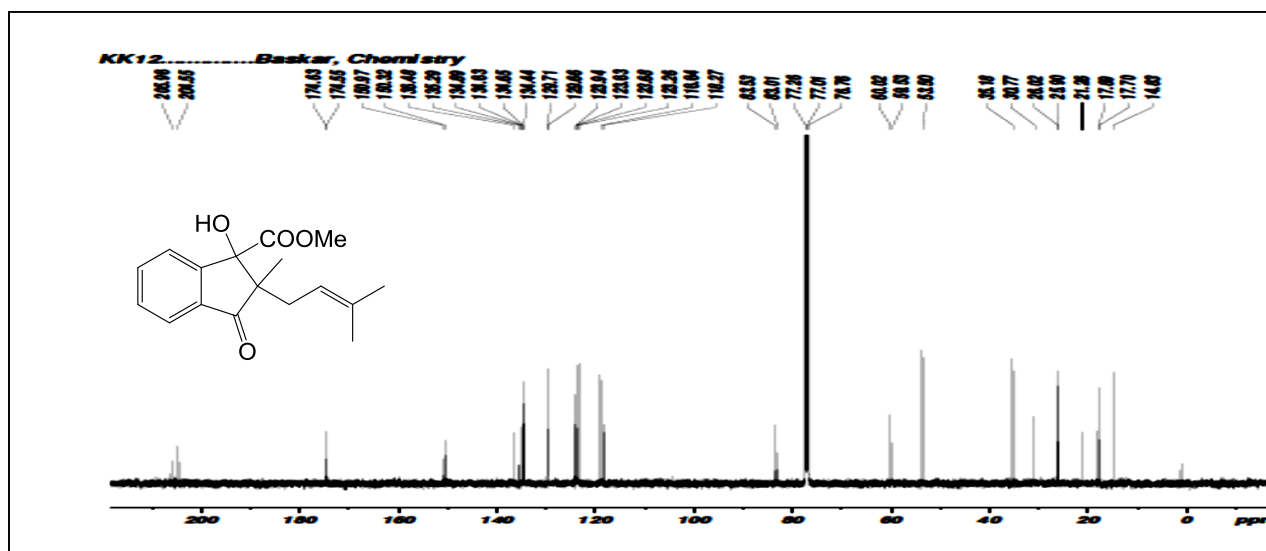


Annexe 90 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 80 (KK3)

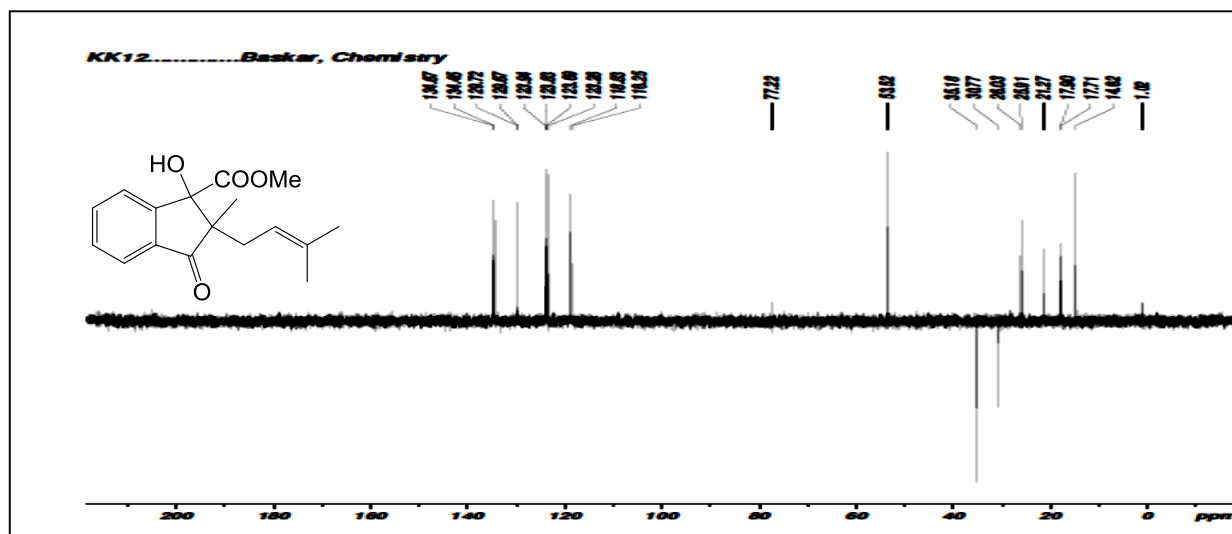
IV.24 Composé 81 (KK12)



Annexe 91 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 81 (KK12)

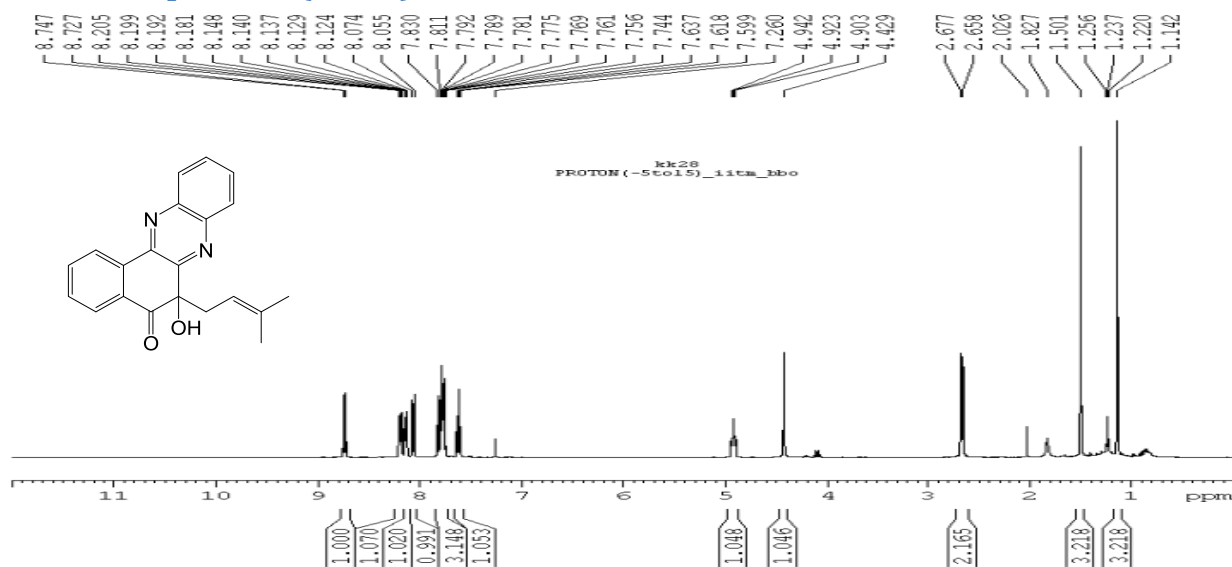


Annexe 92 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 81 (KK12)

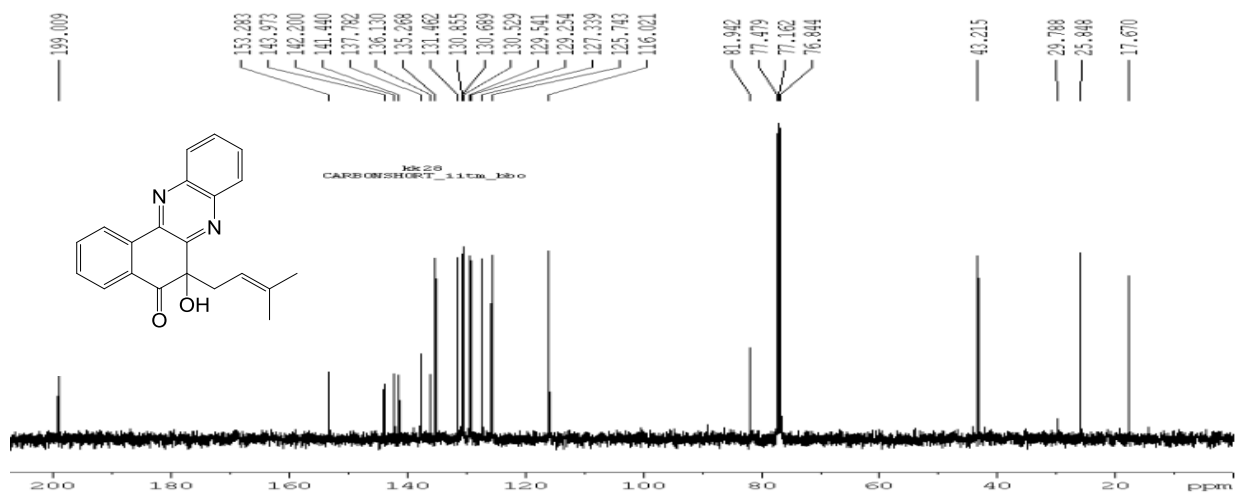


Annexe 93 : Spectre DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 81 (KK12)

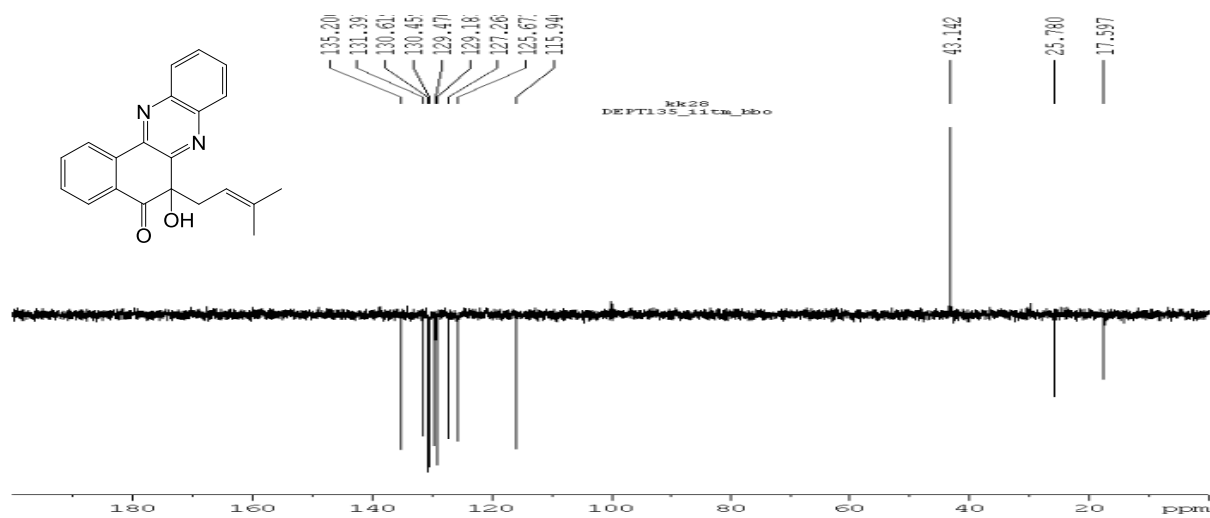
IV.25 Composé 82 (KK28)



Annexe 94 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 82 (KK28)

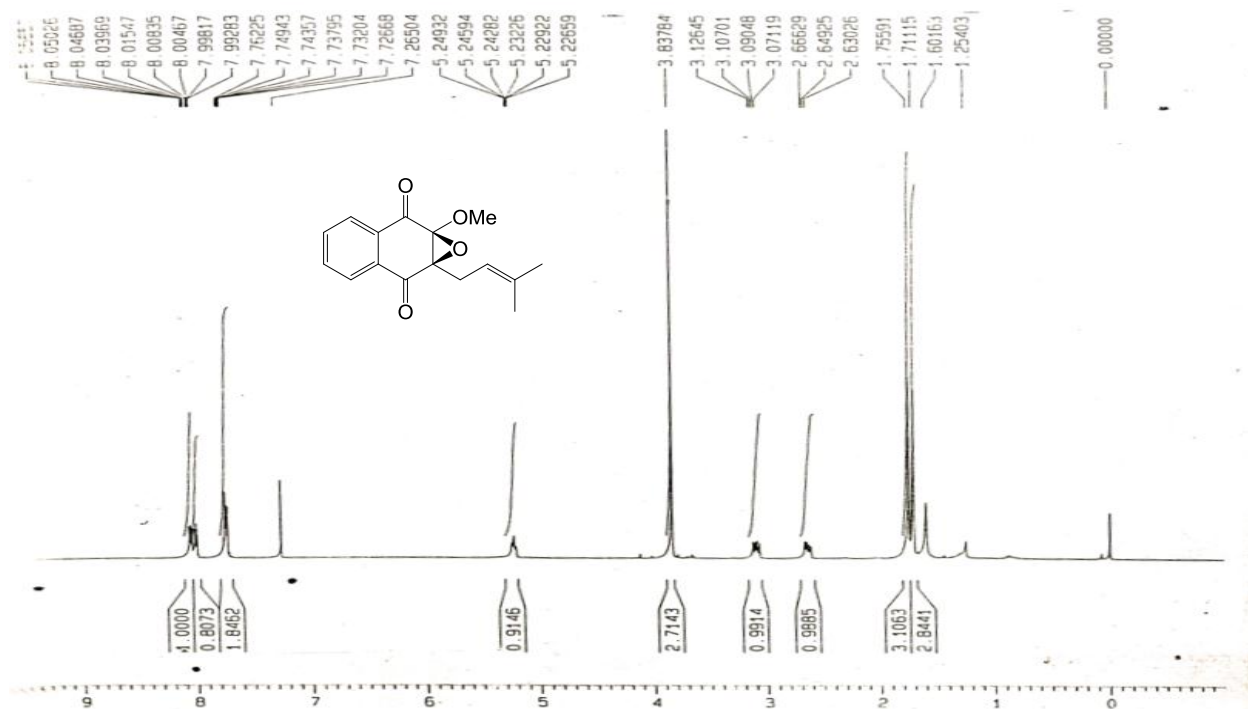


Annexe 95 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 82 (KK28)

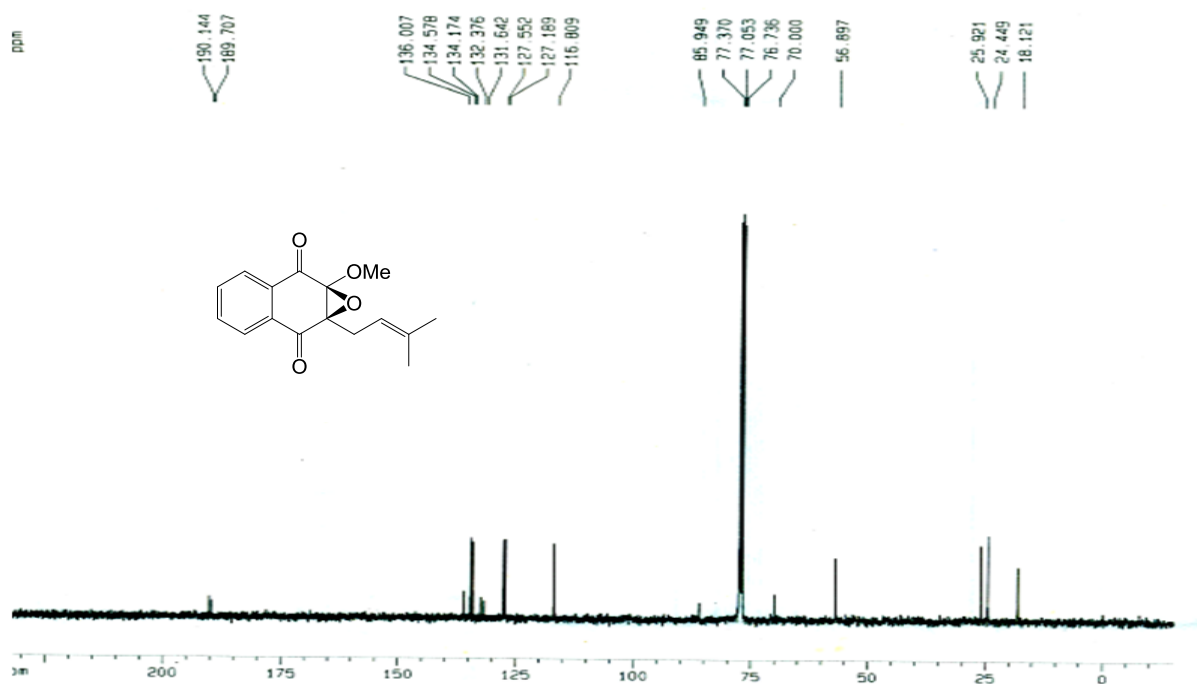


Annexe 96 : Spectres DEPT135 (CDCl₃, 100 MHz) du composé 82 (KK28)

IV.26 Composé 83 (KK4a)



Annexe 97 : Spectre RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) du composé 83 (KK4a)



Annexe 98 : Spectre RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) du composé 83 (KK4a)

PUBLICATIONS

Kenneth O. Eyong, Herve L. Ketsemen, Ghansenyuy, S. Y. & Gabriel N. Folefoc, (2015). Chemical Constituents, the Stereochemistry of 3-Hydroxy Furonaphthoquinones from the Root Bark of *Newbouldia Laevis Seem* (Bignoniaceae), and Screening against *Onchocerca Ochengi* Parasites. *Med. Chem. Res*, 24 (3), 965–969.

Kenneth O. Eyong, Herve L. Ketsemen, Lamshoft, M., & Gabriel N. Folefoc, (2015). Preparative Separation and Characterization of the four Stereoisomers of an Indane Carboxylic Acid Derivative of Lapachol. *The Natural Products Journal*, 5(3), 180–185.

Kenneth O. Eyong, Herve L. Ketsemen, Zhenze Zhao, Liqin Du, Aude Ingels, Veronique Mathieu, Alexander Kornienko, Kenneth G. Hull, Gabriel N. Folefoc, Sundarababu Baskaran and Daniel Romo (2020). Anti-proliferative activity of naphthoquinones and indane carboxylic acids from lapachol against a panel of human cancer cell lines, *Medicinal Chemistry Research*, 29, 1058–1066.

Herve L. Ketsemen, Kenneth O. Eyong, Shafi U. Khan, Qazi N. Us Saqib, Folefoc N. Gabriel and Daniel Romo (2020). Reverse-docking study of a new indeno [1, 2-b] pyran skeleton: Target investigation. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 1660-1665.

Chemical constituents, the stereochemistry of 3-hydroxy furonaphthoquinones from the root bark of *Newbouldia laevis* Seem (Bignoniaceae), and screening against *Onchocerca ochengi* parasites

Kenneth O. Eyong · Herve L. Ketsemen ·
Salome Y. Ghansenyuy · Gabriel N. Folefoc

Received: 18 February 2014 / Accepted: 6 July 2014 / Published online: 29 July 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Through bioassay-guided fractionation, 13 compounds (**1–13**) were isolated from the CH₂Cl₂/MeOH (1:1) extracts of the root bark of *Newbouldia laevis* and characterized mainly by NMR and X-ray spectroscopy. Among these, nine quinone derivatives (**1–7**, **12–13**), one triterpenoid (**8**), and three steroids (**9–11**) were isolated. The stereochemistry of 3-hydroxy furonaphthoquinones isolated from this plant has been established for the first time as (2*S*,3*R*) on the basis of single X-ray crystal structure analysis and show marked ³J_{H,H} deviations from the Karplus curve from ¹H-NMR spectral analysis. The fractions together with three of the isolated compounds namely lapachol, 2-acetyl-naphtho [2,3-*b*]furan-4,9-dione, and 2-(1-hydroxyethyl)-2-acetyl-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione were screened against *Onchocerca ochengi* parasites. Lapachol and 2-(1-hydroxyethyl)-2-acetyl-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione showed 100 % inhibition at a concentration of 5 μg/mL after 5 days.

Keywords Bignoniaceae · *Newbouldia laevis* · Lapachol · Furanonaphthoquinone · *Onchocerca ochengi*

Introduction

Onchocerciasis, also known as river blindness is a parasitic disease caused by the filarial worm, *Onchocerca volvulus*

and is transmitted by the black fly, *Simulium damnosum*. It remains a major public health problem with over 37 million patients and a risk population of 120 million (Cho *et al.*, 2010). Chemotherapy remains the main method of control and treatment with the use of ivermectin. This drug effectively kills the microfilariae but not the adult worms (macrofilariae) which may live for up to 18 years in humans.

The emergence of ivermectin resistance in parasitic nematodes of veterinary importance, raises serious concerns on the use of this drug on the human *O. volvulus*. Thus, the search for more efficient filaricides is inevitable (Cho *et al.*, 2010).

The genus *Newbouldia* (Bignoniaceae) comprises only one species distributed throughout the tropical and subtropical zones of the world (Burkill, 1985). *Newbouldia laevis* Seem. locally called “Oogly C,” is a shrub or small tree growing in West and Central Africa (Senegal, Ivory Coast, Gabon and Cameroon, Nigeria etc.). Apart from the economic uses of *N. laevis* such as fuel wood and boundary tree, different parts of this plant have been used in African folk medicine as an astringent in diarrhea, dysentery, and in the treatment of various diseases such as worms, malaria, sexual transmitted disease, and in the reduction of dental caries (Burkill, 1985). The root bark of *N. laevis* Seem. is used in the African folk medicine as aphrodisiac and in the treatment of syphilis, migraine, ear ache, and stomach ache. Previous pharmacological study proved that the plant showed significant anti-bacterial, malarial, and cancer activities. Previous studies undertaken on this species have resulted in the isolation of a number of secondary metabolites which belong to the classes of furanonaphthoquinones, pyrazole alkaloids, phenylpropanoid glycosides, and benzofurans (Gorman *et al.*, 2003). The medicinal uses and the presence of different classes of compounds in the title

K. O. Eyong (✉) · H. L. Ketsemen · S. Y. Ghansenyuy ·
G. N. Folefoc (✉)
Department of Organic Chemistry, The University of Yaounde I,
BP 812, Yaounde, Cameroon
e-mail: eyongkk@yahoo.com

G. N. Folefoc
e-mail: gfolefoc@yahoo.com

plant prompted the present investigation on root metabolites. We isolated and characterized 13 compounds from the root bark, three of which were screened against *Onchocerca ochengi*, a model parasite for *O. volvulus* that is responsible for onchocerciasis. The stereochemistry of 3-hydroxy furonaphthoquinones from *N. laevis* has also been determined for the first time.

Results and discussion

The CH₂Cl₂–MeOH (1:1) extracts of roots' bark of *N. laevis* were fractionated by flash chromatography using hexane, hexane–EtOAc 10 %, hexane–EtOAc 25 %, and EtOAc.

Silica gel column chromatography of each fraction afforded 2-(prop-1-èn-2-yl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione **1**, lapachol **2**, 2-acetylfuro-1,4-naphthoquinone **3**, 3-hydroxydehydroiso- α -lapachone **4**, 3,8-dihydroxydehydroiso- α -lapachone **5**, 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-(prop-1-èn-2-yl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione **6**, 2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione **7**, oleanolic acid **8**, β -sitosterol **9**, stigmasterol **10**, β -sitosterol glucopyranoside **11**, newbouldiaquinone **12**, and newbouldiaquinone A **13** (Fig. 1) (Gafner *et al.*, 1996; Eyong *et al.*, 2005, 2006; Kuete *et al.*, 2007; Vouffo *et al.*, 2008; Hussain *et al.*, 2007).

The structure of compound **4** was unambiguously confirmed from single crystal studies (CCDC 971193) (Fig. 2) and reveals protons H2 and H3 in trans configuration.

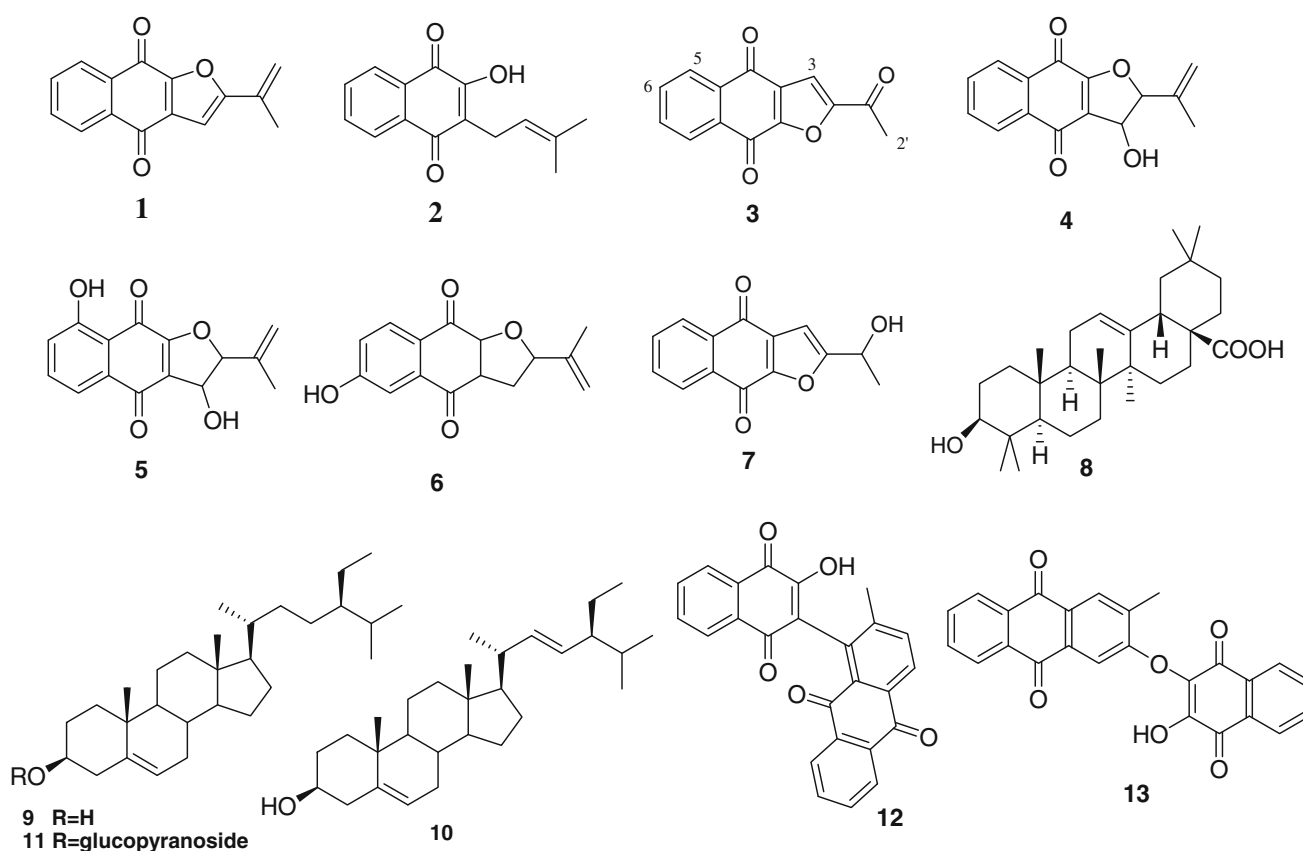


Fig. 1 Structures of isolated compounds from *N. laevis* root bark

Fig. 2 ORTEP structure of compound **4** (CCDC 971193)

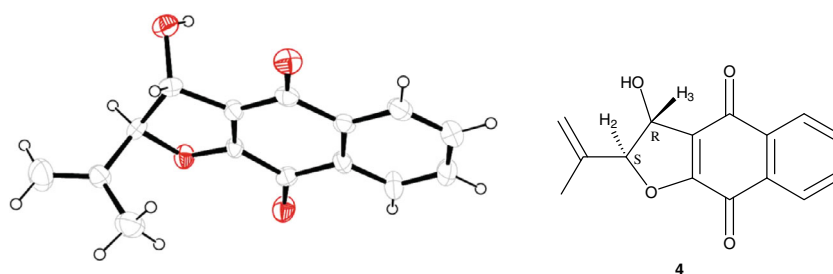


Table 1 ^1H and ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 400 and 100 MHz) data of Compound **4** and ^1H -NMR data of **5**

Comps position	4 ^1H (J : Hz) ^a	^{13}C (DEPT) ^b	5 ^1H (J : Hz) ^a
1			
2	5,44 (1H, d, $J = 4$)	95.7 (CH)	5,44 (1H, d, $J = 4.3$)
3	5,17 (1H, d, $J = 4$)	74.9 (CH)	5,17 (1H, d, $J = 4.3$)
3a		119.3 (C)	
4		182.7 (C)	
4a		131.8 (C)	
5	8,17 (1H, d, $J = 7,2$)	126.7 (CH)	8,12 (1H, m)
6	7,79 (1H, td, $J = 7.2, 1.3$)	139.3 (CH)	7,80 (1H, m)
7	7,78 (1H, td, $J = 7.2, 1.3$)	137.4 (CH)	7,60 (1H, m)
8	8,13 (1H, d, $J = 7,2$)	126.2 (CH)	
8a		133.4 (C)	
9		178.2 (C)	
9a		160.9 (C)	
1'		181.6 (C)	
2'	5,20 (1H, d, $J = 17$) and 5,06 (1H, d, $J = 17$)	114.2 (CH_2)	5,05 (2H, s)
3'	1.83 (s, CH_3)	17.3 (CH_3)	1.9 (s, CH_3)
–OH	3.17 (br.s)		11.70 (br.s)

^a ^1H NMR carried out at 400 MHz^b ^{13}C NMR carried out at 100 MHz

From the ^1H -NMR data (Table 1) of compound **4**, the H2,H3 coupling constant ($^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3}$) = 4.0 Hz. The magnitude of 3J couplings are generally smallest when the torsion angle is close to 90° (cis, $J < 3$) and largest at angles of 0 and 180° (trans, $J > 7$) (Karplus, 1963). Similar coupling constants were equally observed for 3,8-dihydroxydehydroiso- α -lapachone **5** with $^3J_{\text{H}_2,\text{H}_3}$ = 4.3 Hz. From these results, 3-hydroxy furano naphthoquinones with trans configurations show considerable deviation from the Karplus curve. From CIF check, their stereochemistry was attributed as (2*S*,3*R*).

Fractions of the root bark extract of *N. laevis* (Hex/EtOAc 10 %, Hex/EtOAc 25 %, and EtOAc 100 %) were screened against *O. ochengi* parasites (mfs) according to the protocol described by Cho (Cho *et al.*, 2010). Of the tested fractions, Hex/EtOAc 25 % showed 100 % inhibition of mfs at 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, all the tested extracts showed 100 % inhibition at 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2).

The Hex/EtOAc 25 % fraction was therefore, the most active of the three fractions with an IC_{50} mfs of 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, the Hex/EtOAc 10 % and Hex/EtOAc 25 % fractions were more toxic (IC_{50} = 187.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) than the EtOAc 100 % fraction (IC_{50} = 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the monkey epithelial cells which hosted the parasites.

Table 2 Biological activity results for fractions of the MeOH/ CH_2Cl_2 1:1 root bark extracts against *Onchocerca ochengi*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Hex/ EtOAc 10 %	Hex/ EtOAc 25 %	EtOAc 100 %
% mfs viability at 120th hour (day 5) of fractions			
1,000	0	0	0
500	0	0	0
250	0	0	0
125	25	0	50
62.5	50	25	100
31.25	100	50	100
15.625	100	100	100
7.8125	100	100	100
IC_{50} mfs	62.5	31.25	125
IC_{100} mfs	250	125	250
IC_{50} on Monkey kidney epithelial cells ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	187.5	187.5	500

Table 3 Biological activity results of some isolated quinones against *Onchocerca ochengi*

Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Compound 2	Compound 3	Compound 7
% mfs viability at 120th hour (day 5)			
20	0	0	0
10	0	25	0
5	0	100	0
IC_{50} on Monkey kidney cells ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5	7.5	<5
% mfs viability on day 10			
20	0	0	0
10	0	0	0
5	0	25	0
IC_{50} on Monkey cells	<5	<5	<5

Three isolated naphthaquinones from the active fractions namely lapachol **2**, 2-acetyl-naphtho [2,3-*b*]furan-4,9-dione **3**, and 2-(1-hydroxyethyl)-2-acetyl-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione **7** were equally screened against *O. ochengi* parasites (mfs). Compounds **2** and **7** showed 100 % inhibition at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ after 5 days unlike **3** which was inactive. However, compound **3** showed 25 % inhibition after 10 days (Table 3).

Since all quinones exhibited activity at different concentrations, it could be concluded that naphthoquinones of different structural type could be good candidates against *O. ochengi* parasites if investigated further. All compounds were, however, highly toxic against the monkey epithelial cells, with IC_{50} less than 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Experimental

General

¹H, ¹³C, DEPT) and 2D (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) NMR spectra were measured on Bruker 400 and 500 instruments. Chemical shift (δ) values are given in ppm, with CDCl₃ and CD₃OD as internal standards, and coupling constants (*J*) are in Hz. Low-resolution ESIMS and X-ray were measured on a Bruker machine. TLC was performed on either Kieselgel 60 F254 (0.25 mm, Merck) or RP-18 F254S (0.25 mm, Merck) plates, and compounds were detected under UV-lamp or Iodine.

Plant material

The root bark of *N. laevis* was harvested in February 2013 at Nkolbising Yaounde, and a voucher specimen N^o 1754/SRFK was deposited at the National Herbarium Yaounde-Cameroon.

Extraction and isolation

Seven kilogram of dried plant material was extracted at room temperature using CH₂Cl₂/MeOH 1:1 to afford 291 g of crude extract. The crude extract was subjected to flash chromatography using hexane, Hex/EtOAc 10 %, Hex/EtOAc 25 %, and EtOAc afforded 20, 20, 25, and 40 g fractions, respectively. Subsequent silicagel cc purification of the different fractions afforded 13 compounds (1–13) eluted using Hex/EtOAc of increasing polarity: Hex/EtOAc 2 % 1 (50 mg), Hex/EtOAc 3 % 2 (2 g), Hex/EtOAc 8 % 3 (100 mg), Hex/EtOAc 10 % 9, 10 (200 mg), Hex/EtOAc 12 % 8 (100 mg), Hex/EtOAc 15 % 12 (25 mg), Hex/EtOAc 20 % 5 (6 mg), 7 (20 mg), Hex/EtOAc 30 % 13 (40 mg), Hex/EtOAc 40 % 4 (200 mg), 6 (60 mg) and Hex/EtOAc 70 % 11 (100 mg).

Extraction and culture of microfilariae (mf)

Fresh infected cattle skin containing palpable *O. ochengi* nodules was first washed thoroughly and sterile with 70 % ethanol. The sterilized skin was then tautly attached onto a cylindrical piece of wood under sterile conditions, and close criss-cross cuts were made into the dermis. The assembly was incubated in the culture medium for 4 h. The emerged and highly motile microfilariae were concentrated by centrifugation at 400×*g* for 10 min. Monkey kidney epithelial cells (LLC-MK2) (ATCC, USA) serving as feeder layer when they become fully confluent were co-cultured with the microfilariae. All cultures and assays were

conducted at 37 °C under an atmosphere of 5 % CO₂ in humidified air. The culture medium consisted of RPMI-1640 supplemented with 25 mM HEPES, 2 g/L sodium bicarbonate, 20 Mm L-glutamine, 5 % newborn calf serum (SIGMA, USA), 150 units/ml penicillin, and 150 µg/mL streptomycin, pH 7.2 (Cho *et al.*, 2010).

Drug preparation

Stock solutions of crude plant extracts were prepared in 100 % hybrimax™ dimethylsulfoxide (DMSO) (SIGMA, USA) at 25 mg/ml and sterile filtered with tiny DMSO-safe (regenerated cellulose) 0.2 µm filters (Corning, USA, Cat. 431212). Pure compounds were prepared in 100 % DMSO, at 1 mg/ml.

Drug screening

Crude extracts were tested in duplicate at varying concentrations beginning with a concentration of 1,000 µg/mL (highest) and a serial dilution of 8 concentrations done in order to determine the IC_{50s}. The pure compounds were also tested in duplicate at three different concentrations (20, 10, and 5 µg/mL). Microfilarial viability was assessed by mean motility scores on a scale of 0 (immotile), through 0.25 (only tail or head shaking occasionally), through 0.5 (whole body motile, but sluggishly or with difficulties), to 1 (normal or vigorous motility). Scores for microfilariae (mfs) assessment were made every 24 h, terminating on day 10. Any culture with microbial contamination was not considered.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the TWAS-UNESCO Associateship scheme to Dr. Eyong K, IIT Madras India for facilities and Pr. Cho Ngwa for Bioassays.

References

- Burkill HM (1985) The useful plants of West Tropical Africa, vol I. Royal Botanic Gardens, Kew, London
- CCDC 971193 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif
- Cho N, Abongwa M, Ngemenya MN, Nyongbela KD (2010) Selective activity of extracts of *Margaritaria discoidea* and *Homalium africanum* on *Onchocerca ochengi*. BMC Complement Altern Med 10(4):62–69
- Eyong OK, Krohn K, Hussain H, Folefoc GN, Nkengfack AE, Schulz B, Hu Q (2005) Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone-anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. Chem Pharm Bull 53(6):616–619
- Eyong OK, Folefoc GN, Kuete V, Beng VP, Hussain H, Krohn K, Nkengfack AE, Saftel M, Sarite RS, Hoerauf A (2006) Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone-anthraquinone ether

- coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry* 67:605–609
- Gafner S, Wolfender JL, Nianga M, Stoeckli EH, Hostetmann K (1996) Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry* 42(5):1315–1320
- Gorman R, Kaloga M, Li XC, Ferreira D, Bergenthal D, Kolodziej H (2003) Furanonaphthoquinones, atraric acid and a benzofuran from the stem barks of *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry* 64:583–587
- Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR (2007) Lapachol: an overview. *ARKIVOC* ii:145–171
- Karplus M (1963) Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance. *J Am Chem Soc* 85(18):2870–2871
- Kuete V, Eyong OK, Folefoc GN, Beng VP, Hussain H, Krohn K, Nkengfack AE (2007) Antimicrobial screening of methanolic extract and chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis* Seem. *Pharmazie* 62:552–556
- Vouffo B, Hussain H, Eyong OK, Dongo E, Folefoc GN, Krohn K (2008) Chemical constituents of *Dorstenia picta* and *Newbouldia laevis*. *Biochem Sys Eco* 32:730–732

Preparative Separation and Characterization of the four Stereoisomers of an Indane Carboxylic Acid Derivative of Lapachol

Kenneth O. Eyong^{a,*}, Herve L. Ketsemen^a, Marc Lamshöft^b and Gabriel N. Folefoc^a

^aDepartment of Organic Chemistry, University of Yaounde 1, BP 812 Yaounde, Cameroon; ^bBayer CropScience Aktiengesellschaft, Bcs AG-R & D-D-EnSa-MeA, Monheim, 6670, 273 Germany



K.O. Eyong

Abstract: Preparative separation and characterization of an indane carboxylic acid diastereomer **3** from chemical transformation of lapachol **1** and the enantiomeric resolution of each one of the former compounds by chiral HPLC, plus the comparison between the experimental and calculated CD spectra, by spectroscopic and quantum chemical calculation of their circular dichroism (CD) spectra is described. The use of simple and correct cis-trans nomenclature, based on the relative direction (above or below the ring plane) of the two priority substituents, namely the hydroxy and prenyl groups explains clearly the formation of the diastereomers in different proportions. The *cis*-isomer **3b** was presumed to be the major diastereomer on the basis of steric factors (interaction with methyl ester) and later on, this assumption was experimentally confirmed (CD experimental-calculated comparison) and attributed (RS/SR) absolute configuration. The diastereoisomer **3a** was attributed (RR/SS) or *trans*-isomer. The formation of compound **3** from Lapachol involves benzilic acid rearrangement reaction.

Keywords: Circular dichroism (CD), diastereomers, HPLC, indane carboxylic acid, lapachol, naphthoquinone, *Newbouldia laevis*.

1. INTRODUCTION

Chiral purity of compounds obtained during chemical transformations is important for structure activity relationship investigations. It is possible that both stereoisomer (enantiomers or diastereoisomers) are active. However, only one is active in some cases [1]. Hence, the unambiguous knowledge of the stereochemistry of synthesized compounds is essential. Lapachol a biologically active naphthoquinone isolated mostly from plants of the Bignoniaceae family, has been the object of many chemical transformations in order to improve on its activity and for structure activity studies [2]. Indane carboxylic acid, is a principal intermediate in the Hooker oxidation, an intriguing reaction of lapachol [3]. Despite the presence of two stereo centers, the complete attribution of the absolute configuration of such a structure has not been the object of any chemical study. In this paper, we describe preparative purification by HPLC of an indane carboxylic acid diastereomer and the enantiomeric resolution of each one of the former compounds by chiral HPLC, plus the comparison between the experimental and calculated CD spectra, by spectroscopic and quantum chemical calculation of their circular dichroism (CD) spectra.

2. EXPERIMENTAL

NMR spectra were recorded using 500 MHz (¹H-NMR) and 125 MHz (¹³C-NMR) or 400 (¹H-NMR) and 100 (¹³C-NMR)

machine. High-Resolution mass spectra (HR-MS) were recorded using a LTQ Orbitrap Spectrometer equipped with an APCI ion source (Ion Max) operating in positive mode. The spectrometer was equipped with a surveyor HPLC system consisting of LC-pump, PDA detector, and auto-sampler (injection volume 10 μ L). Nitrogen was employed as both the sheath (40 arbitrary units) and auxiliary (10 arbitrary units) gas. The capillary temperature was set to 190 °C. The vaporizer temperature was set to 400 °C. The separations were performed using a Phenomenex synergi Fusion RP column (4 μ m, 3 x 150 mm) with a water (+ 0.1% HCOOH / + 10 mM NH₄AC) (A) - acetonitrile (+ 0.1% HCOOH) (B) gradient (flow rate 500 μ L.min⁻¹). Samples were analyzed using a gradient program as follows: 80% A isocratic for 4 min, linear gradient to 0% A over 20 min, after 100% B isocratic for 10 min, the system returned to its initial condition (80% A) within 1 min, and was equilibrated for 5 min.

Lapachol was isolated from *Newbouldia laevis* SEEM. (Bignoniaceae) while reactions were monitored using TLC plates on aluminium-backed pre-coated silica gel 60 F254 plates.

Methyl 1-hydroxy-2-methyl-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylate **3**

Lapachol (50 mg 0.21 mmol) in 1 mL of dry acetone was heated on a steam bath under reflux until it dissolved. The resulting solution was cooled to room temperature and 30.4 mg (0.22 mmol) of anhydrous potassium carbonate added followed by 45.44 mg (0.32 mmol) of methyl iodide. The mixture was heated under reflux on an oil bath at 55-60 °C

*Address correspondence to this author at the Department of Chemistry, Faculty of Science, Yaounde I University, P.O. Box: 812, Yaounde, Cameroon; Tel/Fax: +237-677-951-126; E-mails: eyongkk@yahoo.com or oyong@uy1.uninet.cm

for about 6 hrs. Acetone was evaporated and the product obtained from saturated brine solution and chloroform. The organic phase was purified using column chromatography to afford 20 mg (0.08 mmol, 60%) of **2** using a 1% AcOEt/hexane solvent mixture, and a diastereomeric mixture of methyl 1-hydroxy-2-methyl-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indene-1-carboxylate **3** (10% yield) using a 12% AcOEt/hexane solvent mixture [4]. Compound **3** (diastereomeric mixture) was purified by preparative HPLC on HPLC apparatus with UV detection at 254 nm (injection volume 50 μ L) using a Alltech Alltima column C₁₈, 5 μ m (250 x 10 mm) with H₂O (0.1% HCOOH) (A) - MeOH (0.1% HCOOH) (B) with a gradient program as follows (flow rate 4 mL min⁻¹): 80% A linear to 100% B for 25 min, after 100% B isocratic for 5 min, the system was returned to its initial condition (80% A) over 1 min and was equilibrated for 4 min. to afford **3a** and **3b**. Each diastereoisomer (**3a** and **3b**) was further separated with a Shimadzu preparative HPLC apparatus using a chiral (Daicel AD-H) column to afford compounds **3a-1**, **3a-2** and **3b-1**, **3b-2** respectively. The CD spectra of **3a-1** (Specific rotation = +16.26, Optical rotation = 0.0081 concentration = 0.1 temperature = 28 °C Cell length = 50 mm) and **3b-1** (Specific O.R = + 24.5 concentration = 0.2 temperature = 26 °C Cell length = 50 mm) were recorded (Fig. 2).

Lapachol Methyl Ether 2

IR (neat) 2922, 2855, 1661, 1602, 1450, 1333, 1254 cm⁻¹; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.08-8.04 (m, 2 H), 7.72-7.67 (m, 2 H), 5.15-5.12 (m, 1 H), 4.13 (s, 3 H), 3.31 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H), 1.79 (s, 3 H) 1.69 (s, 3 H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) 185.3, 181.8, 157.4, 134.7, 133.7, 133.6, 133.2, 132.0, 131.5, 126.2, 126.0, 120.0, 61.2, 25.8, 23.0, 17.9; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₁₇O₃ (M⁺ + H) 257.1172, found 257.1173.

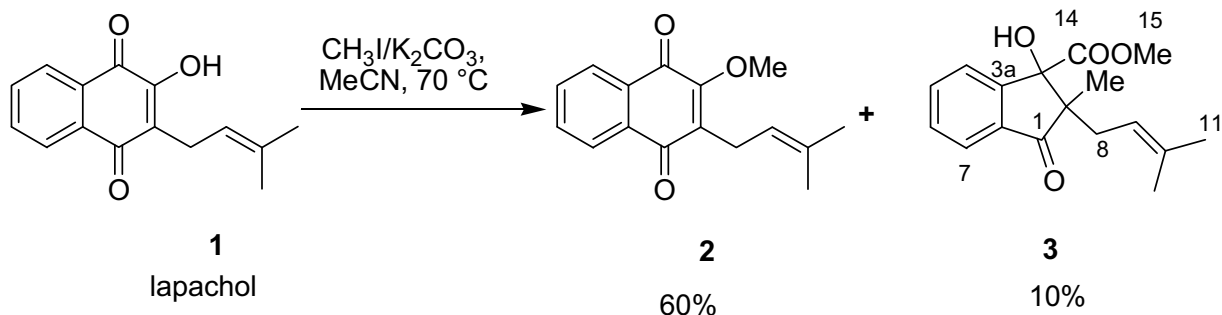
COMPOUND 3a: White amorphous material. Yield: 40%; UV: λ_{\max} 245 nm and 285 nm, ¹³C-NMR (CDCl₃, 125MHz): 204.6(C-1), 174.6(C-14), 150.3(C-3a), 136.5(C-7a), 134.8(C-10), 134.4(C-5), 129.6(C-7), 123.8(C-6), 123.2(C-9), 118.9(C-4), 83.5(C-3), 59.9(C-2), 53.4(OMe), 35.2(C-8), 25.9(C-11), 17.7(C-12), 14.9(13); ¹H-NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 7.77 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, C7H), 7.65 (td, *J*=7.5, 1 Hz, 1H, C6H), 7.58 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, C4H), 7.51 (td, *J*=7.5, 1 Hz, 1H, C5H), 4.99 (td, *J*=8.5, 8 Hz, 1H, C9H), 4.21 (s*, OH,), 3.61 (s, OMe), 2.47 (dd, *J*= 8.5, 14.5 Hz, 1H, C8H); 2.05 (dd, *J*= 8.0, 14.5 Hz, 1H, C8H), 1.58 (s, 3H, C11H), 1.45 (s, 3H, C12H), and 1.11 (s, 3H, C13H). HR-MS

[M+H]⁺ *m/z* 289.14345 (calcd for C₁₇H₂₁O₄, 289.14344).

Compound 3b: White amorphous material. Yield: 60%; UV: λ_{\max} 245 nm and 285 nm, ¹³C-NMR (CDCl₃, 125MHz): 206.6(C-1), 174.5(C-14), 150.9(C-3a), 136.3(C-7a), 136.1(C-5), 134.6(C-10), 131.1(C-7), 125.4(C-6), 125.1(C-9), 119.7(C-4), 83.0(C-3), 60.0(C-2), 54.9(C-8), 53.5(OMe), 27.5(C-11), 22.7(C-12), 19.4(C-13); ¹H-NMR (CDCl₃, 500MHz) δ 7.80 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, C7H), 7.65 (td, *J*=7.5, 1.5 Hz, 1H, C5H), 7.56 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, C4H), 7.50 (t, *J*=7.5 Hz, 1H, C6H), 5.25 (t, *J*= 7.5 Hz, 1H, C9H), 4.07 (s*, OH,), 3.61 (s, OMe), 2.58 (dd, *J*=7.5, 16 Hz, 1H, C8H); 2.28 (dd, *J*=7.5, 16 Hz, 1H, C8H), 1.73 (s, 3H, C11H), 1.61 (s, 3H, C12H) and 1.16 (s, 3H, C13H). HR-MS [M+H]⁺ *m/z* 289.14337 (calcd for C₁₇H₂₁O₄, 289.14344).

Quantum Chemical Calculations

Quantum chemical calculations are performed with GAUSSIAN 98 and Dalton 2.0 program packages. The result files are processed by GausView03. The geometries of the diastereoisomers were optimized at M06-2X function [5, 6]. The 2X applies as high nonlocality function with double the amount of nonlocal exchange, and it is parameterized only for non-metals. The function of Becke-Perdew and Wang (B3PW91) with Coulomb-attenuated exchange-correlation [7] is also applied. This function has been shown promising results for electronic excitation energies, in the case of Rydberg and charge-transfer transitions [8-11]. For every structure the stationary points found on the molecule potential energy hypersurfaces were characterized using standard analytical harmonic vibrational analysis. The absence of the imaginary frequencies, as well as of negative eigen-values of the second-derivative matrix, confirmed that the stationary points correspond to minima of the potential energy hyper surfaces. The absorption and electronic circular dichroism (ECD) spectra are obtained by TD-DFT calculations. Same function was used for calculations of the excitation energies. The solvent effects of the geometry and the excited-state properties have been evaluated by the Polarizable Continuum Model (PCM) [7, 12], utilizing the basis set aug-cc-pVDZ [7]. To describe the species in methanol were used also a "mixed" approach, in which several solvent molecules are coordinated to chromophores in the solute at the optimized geometry, and a polarisable continuum approach [13, 14]. The CD spectroscopic curves are processed by curve-fitting, baseline correction approaches for treatment of overlapping patterns, as well an extrapolating by a multi-peaks Gaussian function by Grams/AITM and program package.



Scheme 1. Methyl iodide treatment of lapachol.

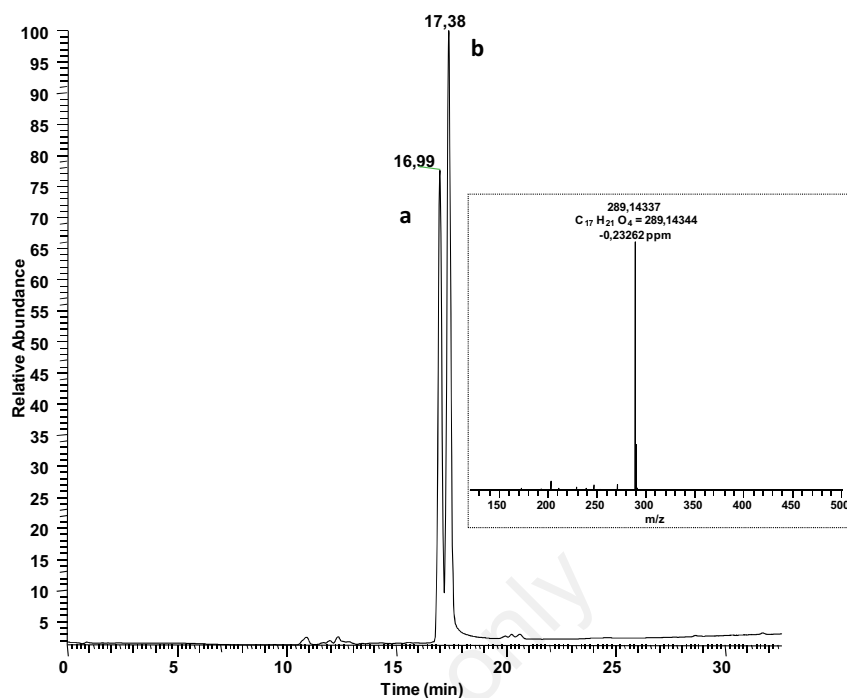
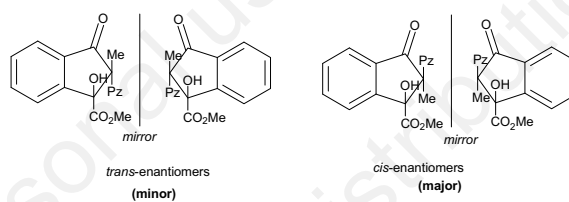


Fig. (1). LC-MS Chromatogram mass range (m/z 150-500) of diastereomer mixture of compound **3a** and **3b** before preparative separation and its associated mass spectrum.



cis/trans stereoisomers of compound **3** as a pair of diastereoisomer.

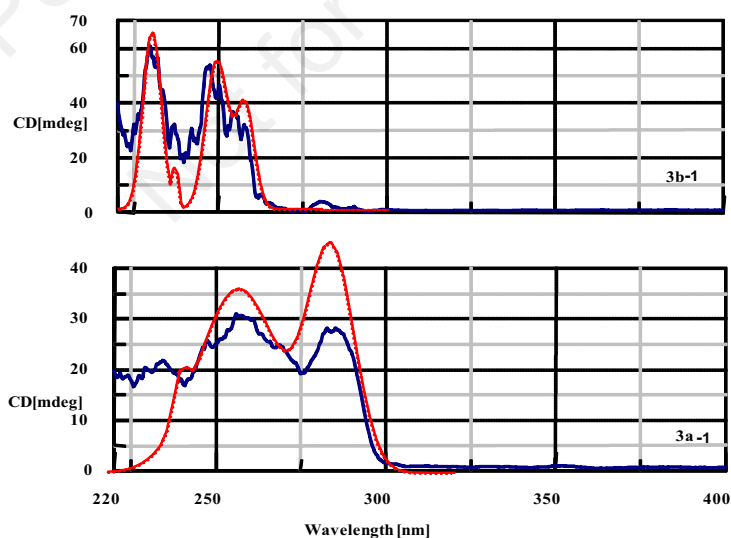


Fig. (2). Experimental (line) and calculated (dots) CD spectra of **3a-1** and **3b-1**.

3. RESULTS AND DISCUSSION

During our recent mechanistic study [4] on the Hooker oxidation of lapachol, protection of lapachol **1** using methyl-iodide afforded the *O*-methylated derivative **2** (60% yield)

as well as C-methylation followed by benzylic acid rearrangement to afford a novel diastereomeric mixture of Methyl 1-hydroxy-2-methyl-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-

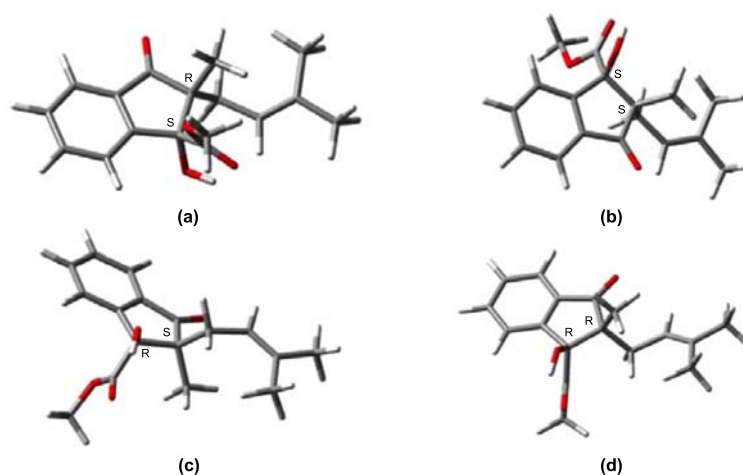
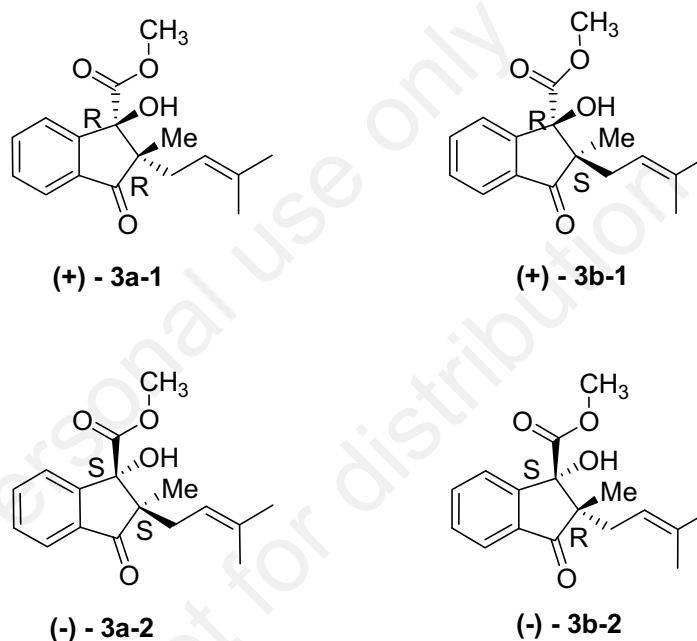


Fig. (3). Most stable conformations of the diastereoisomers (a)-(d).



oxo-2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylate **3**, (10% yield) as a white amorphous material (Scheme 1).

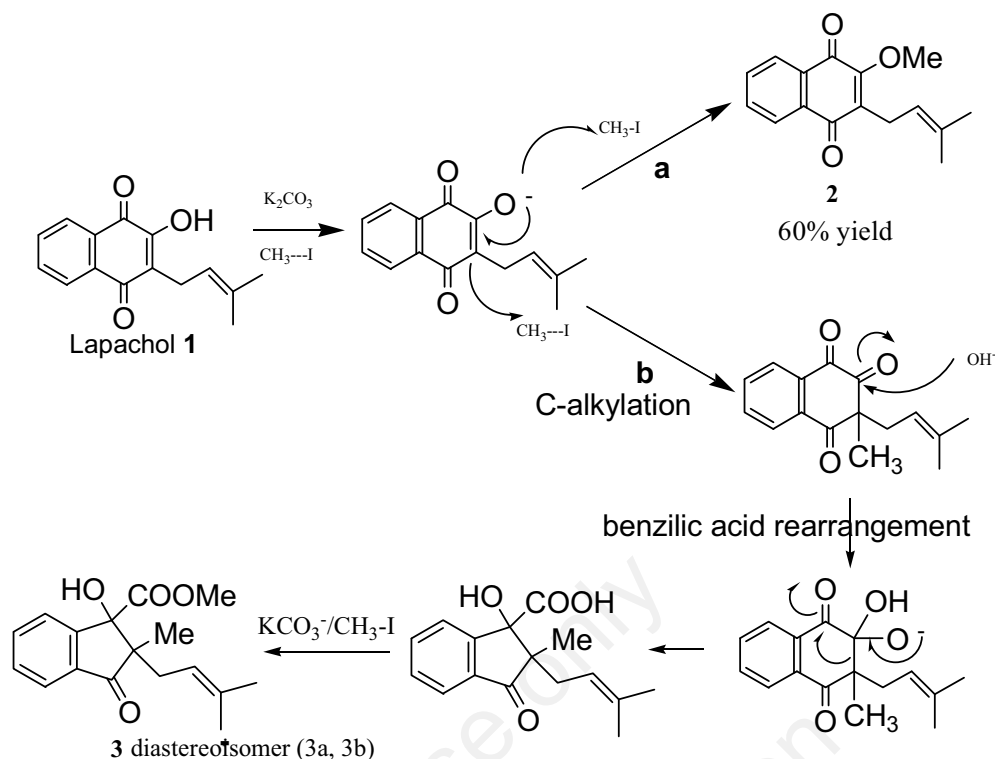
¹H and ¹³C NMR spectral analysis of compound **3** revealed that compound **3** is a diastereomeric mixture. This was confirmed by high resolution LC-MS analysis (Fig. 1).

Analysis of the high resolution LC-MS mass spectra reveals that the two diastereoisomers are in a 2:3 ratio. The *cis*-isomer was presumed to be the major compound on the basis of steric factors (interaction with methyl ester) and later on, this assumption was experimentally confirmed (CD experimental-calculated comparison).

The diastereomeric mixture of compound **3** was separated using an achiral preparative HPLC column to afford **3a** (*trans*) and **3b** (*cis*) as racemic mixtures with optical rotation values very closed to zero. Each diastereoisomer (**3a** and **3b**) was further separated with a Shimadzu preparative HPLC apparatus using a chiral (Daicel AD-H) column to afford compounds **3a-1**, **3a-2** and **3b-1**, **3b-2** respectively. The CD spectra of **3a-1** and **3b-1** were recorded (Fig. 2).

To elucidate the stereochemistry of these compounds a conformational analysis by quantum chemical calculations of the four possible stereoisomers (a)-(d) of the molecule was performed, resulting in the depicting geometries (Fig. 3).

Among these conformers, those with the lowest energy were (a) and (c), (*cis* isomer) with preferred (c) as most stable form. These results could be explained by steric factors of the bulk substituent, in addition they are in accordance with the experimentally obtained ratio of the diastereomeric mixture (ratio 40:60). By comparison of theoretical and experimental spectroscopic data, and suggesting that the absorption peak at 288 nm is influenced by the methylester group, it could be assumed that most probably **3b-1** corresponds to (c) as Methyl 1-(*R*)-hydroxy-2-(*S*)-methyl-2-(3-methylbut-2-en-1-yl)-3-oxo-2,3-dihydro-1H-indene-1-carboxylate. Comparison of experimental CD spectra of **3b-1** and calculated spectra of (c) is in a very good agreement to confirm the two chiral centers as 1-(*R*)-2-(*S*) while **3a-1** is the *trans*-isomer or 1-(*R*)-2-(*R*) stereoisomer



Scheme 2. Mechanism of formation of compound 2 and 3 involving path a (O-methylation) or path b (C-methylation) and subsequent benzoic acid rearrangement.

(Fig. 3). This would explain the different “Cotton” effects of **3a-1** and **3b-1** in the region of 288 nm.

The mechanism of formation of the diastereomers (**3a** and **3b**) involves C-methylation (pathway b) with subsequent benzoic acid rearranged of the resulting ortho diquinone intermediate under basic condition. Scheme 2.

Moreover, to ascertain the formation of **3** via benzoic acid rearrangement, several *o*-quinones derived from lapachol were subjected to basic conditions to accord novel indane carboxylic acid derivatives [4].

CONCLUSION

In conclusion, a novel indane carboxylic acid diastereoisomer was separated using successive HPLC and its absolute configuration was determined as *cis*-isomer (SR/RS) and *trans*-isomer (RR/SS) using spectroscopic and quantum chemical calculation of their circular dichroism (CD) spectra. The mechanism of formation of the compound **3** from lapachol **1** involves C-methylation followed by benzoic acid rearrangement. Moreover, the involvement of benzoic acid rearrangement was further tested with a variety of *o*-quinones prepared from lapachol **1**, which resulted in the isolation of novel indane carboxylic acid derivatives. The molecules synthesized during the course of our investigation will be tested for their biological activities in the near future.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no potential conflict of interest to disclose.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. Eyong acknowledges the TWAS-UNESCO Associate Scheme, IIT-Madras and DAAD for financial Support. The authors also thank the DST, India, DST-FIST program for NMR facilities. Drs. Kurtant and Spiteller are thanked for optical rotation and CD measurements and Prof. Ivanova is acknowledged for her assistance with the quantum calculations. The Government of Cameroon for financial support through the ‘Fonds d’Appuis `a la Recherche’.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

NMR spectra of Diastereomers before (**3**) and after (**3a**, **3b**) HPLC separations are attached.

REFERENCES

- [1] (a) Eriksson, T.; Bjorkman, S.; Roth, B.; Fyge, A.; Hoglund, P. Stereospecific determination, chiral inversion *in vitro* and pharmacokinetics in humans of the enantiomers of thalidomide. *Chirality* **1995**, *7*, 44-52; (b) Wade, L.G. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; Prentice Hall, Englewood Cliffs: New Jersey 07632, **1991**.
- [2] (a) Eyong, K.O.; Kumar, S.P.; Kuete, V.; Folefoc, G.N.; Langmi, H.; Meyer, M.J.J.; Lall N.; Baskaran, S. Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*(8), 2117-2122; (b) Hussain, H.; Krohn, K.; Ahmad, V.U.; Miana, G. A.; Green, I.R. Lapachol: An overview. *Arxivoc*, 2007, *ii*, 145-171; (c) Pérez-Sacau, E.; Diaz-Peñate, R.G.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; García-Castellano, J.M.; Pardo, L.; Campillo, M. Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 696-706; (d) Andrade-Neto, V.F.; Goulart, M.O.F.; Filho, J.F.S.; Silva, M.J.; Pinto, M.C.F.R.; Zalis, M.G.; Carvalho, L.H.; Krettl, A.U.

- Antimalarial activity of phenazines from lapachol, beta-lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 1145-1149; (e) Eyong, K.O.; Kumar, P.S.; Kuete, V.; Folefoc, G.N.; Nkengfack, E.A.; Baskaran, S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 5387-5390.
- [3] (a) Fieser, L.F.; Fieser, M.J. Naphthoquinone antimalarials. XII. The Hooker oxidation reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, **1948**, *70*, 3215-3222; (b) Fieser, L.F.; Hartwell, J.L.; Seligman, A.M. Concerning the mechanism of the hooker oxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1936**, *58*, 1223-1228; (c) Lee, K.; Turnbull, P.; Moore, H.W. Concerning the mechanism of the hooker oxidation. *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 461-464.
- [4] Eyong, K.O.; Puppala, M.; Kumar, P.S.; Lamshöft, M.; Folefoc, G.N.; Spitteller, M.; Baskaran, S. A mechanistic study on the Hooker oxidation: synthesis of novel indane carboxylic acid derivatives from lapachol. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 459-468.
- [5] (a) Zhao, Y.; Truhlar, D. Density functionals with broad applicability in chemistry. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 157-167; (b) Tacheva, D.; Ivanova, B.B.; Mayer-Figge, H.; Sheldrick, W.S.; Spitteller, M. Properties of the Michael's adducts of the substituted 2-amino-5-oxonitriles. *Spectrochim. Acta Part A*, **2010**, *77*, 588-593.
- [6] Zhao, Y.; Truhlar, D. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functional. *Theor. Chem. Acc.*, **2008**, *120*, 215-241.
- [7] Burke, K.; Perdew, J.P.; Wang, Y. In: *Electronic Density Functional Theory: Recent Progress and New Directions*, ed. Dobson, J.F.; Vignale, G.; Das, M.P. *Plenum Press*, **1998**, pp. 81-111.
- [8] Stephens, P.; Devlin, F.; Cheeseman, J.; Frisch, M.; Bortolini, O.; Besse, P. Determination of absolute configuration using *ab initio* calculation of optical rotation. *Chirality*, **2003**, *15*, S57-S64.
- [9] De Proft, F.; Geerlings, P. Conceptual and computational DFT in the study of aromaticity. *Chem. Rev.*, **2001**, *101*(5), 1451-1464.
- [10] Santoro, F.; Barone, V.; Lami, A.; Improta, R. The excited electronic states of adenine-guanine stacked dimers in aqueous solution: a PCM/TD-DFT study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*(19), 4934-4948.
- [11] Georigk, L.; Grimme, S. Calculation of electronic circular dichroism spectra with time-dependent double-hybrid density functional theory. *J. Phys. Chem. A*, **2009**, *113*(4), 767-776.
- [12] Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*(8), 2999-3093.
- [13] Pappalardo, R.; Reguero, M.; Robb, M.; Frisch, M. Calculation of solvatochromic shifts using MC-SCF theory. The $n-\pi^*$ transition of acetone. *Chem. Phys. Lett.*, **1993**, *92*, 12-17.
- [14] Barone, V.; Improta, R.; Rega, N. Quantum mechanical computations and spectroscopy: From small rigid molecules in the gas phase to large flexible molecules in solution. *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 605-616.

*Antiproliferative activity of
naphthoquinones and indane carboxylic
acids from lapachol against a panel of
human cancer cell lines*

**Kenneth O. Eyong, Herve L. Ketsemen,
Zhenze Zhao, Liqin Du, Aude Ingels,
Veronique Mathieu, Alexander
Kornienko, Kenneth G. Hull, et al.**

Medicinal Chemistry Research

ISSN 1054-2523

Volume 29

Number 6

Med Chem Res (2020) 29:1058-1066

DOI 10.1007/s00044-020-02545-0

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Antiproliferative activity of naphthoquinones and indane carboxylic acids from lapachol against a panel of human cancer cell lines

Kenneth O. Eyong^{1,2} · Herve L. Ketsemen² · Zhenze Zhao³ · Liqin Du³ · Aude Ingels⁴ · Veronique Mathieu⁴ · Alexander Kornienko^{3,5} · Kenneth G. Hull¹ · Gabriel N. Folefoc² · Sundarababu Baskaran⁶ · Daniel Romo¹

Received: 15 January 2020 / Accepted: 6 April 2020 / Published online: 29 April 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Lapachol (**1**) is a well-studied natural product isolated from plants of the *Bignoniaceae* family and demonstrates diverse biological effects. Historically, chemical transformation of the lapachol scaffold has yielded new derivatives with impressive biological activity and rich chemical diversity. β -lapachone (**2**), α -lapachone (**3**), and 2-acetylfuronaphthoquinone (**4**) are examples of analogs derived from lapachol that show superior antitumor activity compared with the natural product. In the present study, novel indane carboxylic acid: 2,2-dimethyl-2,3-dihydroindeno[1,2-b]pyran-4,5-dione (**9**) and methyl 5-hydroxy-2,2-dimethyl-2,3,4,5-tetrahydroindeno[1,2-b]pyran-5-carboxylate (**10**) and naphthoquinone derivatives were synthesized from lapachol with structural similarities to the antitumor lapachol derivatives. The synthesized compounds were evaluated for antiproliferative activities against a panel of human cancer cell lines including in vitro models for neuroblastoma, melanoma, glioblastoma, and non-small cell lung cancer. As expected, the most potent derivatives were those incorporating β -naphthoquinone and α -naphthoquinono[2,3-b]furan skeletons. Many of these compounds possessed nanomolar to single digit micromolar antiproliferative potency. However, the most interesting analog evaluated was the dione **9** with an indeno[1,2-b]pyran skeleton, which demonstrated potent cytotoxic activity. The current investigation identified several new lead compounds that could be used as starting points for anticancer drug discovery.

Keywords Lapachol · Naphthoquinone · Indane carboxylic acid · Cancer cell lines · Benzilic acid rearrangement

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00044-020-02545-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Kenneth O. Eyong
eyongkk@yahoo.com

¹ Department of Chemistry and Biochemistry and the CPRIT Synthesis and Drug-Lead Discovery Laboratory, Baylor University, Waco, TX 76798, USA

² Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaounde I, P.O. Box 812, Yaounde, Cameroon

³ Department of Chemistry and Biochemistry, Texas State University, San Marcos, TX 78666, USA

⁴ Laboratoire de Cancérologie et de Toxicologie Expérimentale, Faculté de Pharmacie, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium

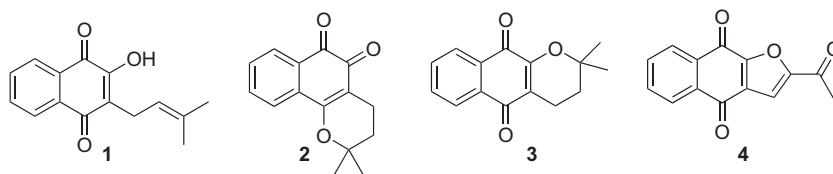
⁵ Department of Chemistry, North Caucasus Federal University, 1a Pushkin St., Stavropol 355009, Russian Federation

⁶ Department of Chemistry, Indian Institute of Technology Madras, Chennai 600 036, India

Introduction

Natural products isolated from various traditional herbal plants have had a huge impact on the development of various lead compounds used in the treatment of health issues in societies throughout the world. The tremendous biodiversity of plants in tropical and subtropical regions has led to the identification of equally diverse chemical structures with a wide range of biological activity (Nepomuceno 2011). In 1882, the Italian scientist Emanuele Paterno reported on the isolation of lapachol (**1**) (Fig. 1) from a traditional herbal plant viz., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC) Standl (Castellanos et al. 2009). The first detailed anticancer effects of lapachol (**1**) (Nepomuceno 2011) were evaluated in 1968 and this compound was shown to possess very potent effects toward cancerous tumors in rats (Hussain et al. 2007). Unfortunately, in 1974, the National Cancer Institute demonstrated in a phase I clinical trial that lapachol (**1**) was not an effective treatment of cancer due to lack of a therapeutic window and this essentially terminated further clinical research at the time. However, in 1980, in a

Fig. 1 Structures of lapachol (**1**), β -lapachone (**2**), α -lapachone (**3**), 2-acetylfuronaphthoquinone (**4**)



small study with nine patients from Nice with various cancers (liver, kidney, breast, prostate, and cervix), pure lapachol (**1**) demonstrated the ability to shrink tumors, reduce pain, and achieve complete remissions in three of the patients without significant adverse effects (Hussain et al. 2007).

This discovery and the fact that additional antitumor effects of lapachol (**1**) were found, led to it being considered a good candidate for derivatization to identify new lead compounds through structure–activity relationship (SAR) studies. Moreover, various lapachol analogs have been prepared and studied for the treatment of lung, breast, prostate, melanoma, leukemic, ovarian, glioblastoma, prostate, colon, and renal cancer (Hussain et al. 2007; Fiorito et al. 2014). In addition to its cytotoxic activity, lapachol (**1**) has also been shown to possess very broad biological effects including antibacterial, antiviral, analgesic, anti-inflammatory, and fungicidal activity (Hussain et al. 2007; Oliveira et al. 2002).

Derivatives of lapachol are also of interest due to their diverse biological properties recently identified. β -lapachone (**2**) and α -lapachone (**3**) isolated from *T. impetiginosa* (Castellanos et al. 2009) and 2-acetylfuronaphthoquinone (**4**) isolated from the Bignoniaceae *Newbouldia laevis* (Eyong et al. 2005) also possess unique properties. For example, β -lapachone (**2**) displays a broad spectrum of biological and pharmacological effects including antifungal, anti-inflammatory, anticancer, antibacterial, antiangiogenic, DNA damaging, and anti-trypanocidal activity (Hussain et al. 2007; Queiroz et al. 2008; Rios-Luci et al. 2012; Li et al. 2000; Lim et al. 2015; Ramos-Perez et al. 2014; Perez-Sacau et al. 2007; Sunassee et al. 2013; da Silva et al. 2007). Interestingly, it has been reported that β -lapachone (**2**) is able to selectively induce cell death in various human cancer cells without killing non-transformed cells and in combination therapy with taxol it displays potent anticancer effects against many cultured cancer cells including ovarian, prostate, lung, breast, colon, melanoma, and pancreatic cell lines (Hussain et al. 2007). In addition, α -lapachone (**3**) has been shown to possess trypanocidal effects toward *Trypanosoma cruzi* and its analogs display antileishmanial activity toward *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis* (Souza-Silva et al. 2014), while 2-acetylfuronaphthoquinone (**4**) is a potential chemopreventive agent (Ueda 2005).

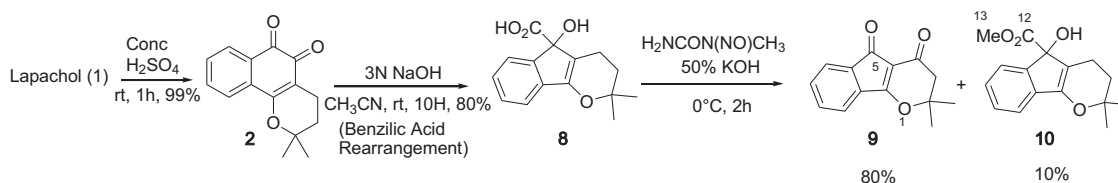
Results and discussion

Chemical transformation

The aim of this study was to prepare new derivatives of lapachol that are structurally related to β -lapachone, α -lapachone, and 2-acetylfuronaphthoquinone with potentially enhanced biological activity. In addition, we sought to probe how changes to the stereochemistry and electronics of the core structures influence bioactivity. Finally, from previous studies, quinones represent a class of generally cytotoxic moieties, which lead to a variety of generally undesirable effects in vivo, including acute cytotoxicity, immunotoxicity, and carcinogenesis. Quinones, often considered nuisance pharmacophores (Dahlin et al. 2015), are Michael acceptors, and cellular damage can occur through alkylation of crucial cellular proteins and/or DNA. Alternatively, quinones are highly redox active molecules, which can engage in redox cycles with their semi-quinone radicals, leading to formation of reactive oxygen species (ROS), including superoxide, hydrogen peroxide, and ultimately the hydroxyl radical. Production of ROS can cause severe oxidative stress within cells through the formation of oxidized cellular macromolecules, including lipids, proteins, and DNA (Bolton et al. 2000; Monks et al. 1992). In a pharmacomodulation attempt to remove these quinone groups, orthoquinones were converted to indane carboxylic acids via benzilic acid rearrangement and to phenazines using a Schiff base reaction to avoid these potential pitfalls associated with drugs that possess a quinone moiety.

To obtain new derivatives for anticancer screening, lapachol (**1**) was treated with conc. H_2SO_4 at room temperature (rt) to afford β -lapachone (**2**), which undergoes a benzilic acid rearrangement to yield compound **8** when treated with 3 N sodium hydroxide as previously described (Eyong et al. 2013). Treatment of **8** with diazomethane generated in situ from nitrosomethylurea (NMU) afforded an unexpected dione derivative **9** as the major compound alongside the expected methyl ester **10** (Scheme 1).

The dione **9** was obtained as a red solid (mp 178–180 °C) from silica gel purification by gradient elution (20 → 30%, hexane/ethyl acetate). The molecular formula was determined to be $C_{14}H_{12}O_3$ on the basis of LCMS (APCI⁺) m/z Calcd for $C_{14}H_{13}O_3$ [M+H]⁺ 229.08647, found 229.08606. The ¹H NMR spectrum (600 MHz, $CDCl_3$) of compound **9**



Scheme 1 New indane derivatives from lapachol (**1**)

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR data (600 and 150 MHz) of compounds **9** and **10** (400 and 100 MHz) (δ_{H} , CDCl_3 , J in Hz)

Position	Compound 9		Compound 10
	^1H	^{13}C	
2	–	93.8	–
3	2.95 (s, 2H)	39.5	1.63 (t, $J = 8.4$, 2H)
4	–	175.9	2.68 (t, $J = 8.4$, 2H)
4a	–	115.1	–
5	–	181.5	–
5a	–	128.1	–
6	8.15 (m, 1H)	129.5	8.05 (m, 1H)
7	7.60 (m, 1H)	132.0	7.69 (m, 1H)
8	7.65 (m, 1H)	134.6	7.69 (m, 1H)
9	7.65 (m, 1H)	124.7	8.05 (m, 1H)
9a	–	131.1	–
9b	–	168.9	–
10	1.61 (s, 3H)	28.6	1.29 (s, 3H)
11	1.61 (s, 3H)	28.6	1.29 (s, 3H)
12	–	–	–
13	–	–	4.14 (s, 3H)

exhibited signals indicative of four aromatic protons at δ_{H} 8.15 (1H, m), 7.65 (2H, m), and 7.60 (1H, m), a methylene group at δ_{H} 2.95 (2H, s) and two methyl groups at δ_{H} 1.61 (6H, s). The ^{13}C NMR spectrum (150 MHz, CDCl_3) exhibited 13 carbon signals that were assigned by a DEPT from multiplicity edited HSQC experiment as four methine sp^2 at 134.6, 132.0, 129.5, and 124.7, one methylene at 39.5, two methyl at 28.6 appearing as a single peak, and seven carbon signals including six sp^2 carbon atoms at 181.5 (C=O), 175.9 (C=O), 168.9 (=C–O), 131.1 (C=C), 128.1 (C=C), 115.1 (C=C) and an sp^3 carbon atom at 93.8 (C–O). The ^1H and ^{13}C NMR data (Table 1) were assigned using ^1H – ^1H COSY, HSQC, and HMBC spectra (see Supporting Information). In the ^1H – ^1H COSY, correlations were observed between H-6 (δ_{H} 8.15, 1H, m) and H-7 (7.60, 1H, m), between H-7 (7.60, 1H, m) and H-8 (7.65, 1H, m), and between H-8 (7.65, 1H, m) and H-9 (7.65, 1H, m) indicating AA'BB' spin system of four aromatic protons. HMBC spectrum showed correlations of H-3 (δ_{H} 2.95, 2H, s) with C-4 (175.9), C-9b (168.9), C-4a (115.1), C-2 (93.8),

C-10 (28.6), and C-11 (28.6) supporting H-3 connectivity in ^2J or ^3J and ^4J . Decarboxylation followed by benzylic oxidation occurs under the reaction conditions or during workup to form dione **9**. Further investigations into the mechanism for the reaction resulting in compound **9** will be pursued.

Compound **10** was obtained as a white solid from silica gel purification by gradient elution (2.5 \rightarrow 5%, hexane/ethyl acetate). The molecular formula was determined to be $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_4$ on the basis of HRMS (ESI-TOF) m/z Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 275.1283, found 275.1295. The ^1H NMR spectrum (400 MHz, CDCl_3) of compound **10** exhibited signals indicative of four aromatic protons at δ_{H} 8.05 (2H, m) and 7.70 (2H, m), attributed to an AA'BB' spin system. A singlet at 4.14 (3H, s) attributed to a methoxy group. Two set of triplets at 2.69 (2H, t, $J = 8.4$ Hz) and at 1.63 (2H, t, $J = 8.4$ Hz) corresponding to two adjacent methylene groups. A singlet at δ_{H} 1.29 (6H, s) for two methyl groups. Compound **10** is the expected ester from previously reported carboxylic acid **8**. The ^1H NMR spectra of compound **10** is very similar to compound **8** with just the appearance of the new methyl ester peak in compound **10**. See SI including a stacked spectra with compounds **8** and **10**.

Previously synthesized compounds **5**, **6**, **7**, **8**, **11–23** (Eyong et al. 2013, 2015a; Tanis et al. 1988), which are structurally related to α -lapachone, β -lapachone, and 2-acetylfuronaphthoquinone were re-synthesized to evaluate their anticancer activities in a comprehensive panel of human cancer cell line assays. Lapachol (**1**) under the Hooker oxidation condition afforded nor-lapachol (**5**). Treatment of compound **5** with conc. H_2SO_4 afforded nor- β -lapachone (**6**), which underwent benzylic acid rearrangement using 3 N NaOH to give hydroxy acid **7** (Eyong et al. 2013).

Lapachol also afforded 3-bromo- β -lapachone (**11**) upon bromination and the benzylic acid rearrangement of **11** provides compound **12** (Eyong et al. 2013). Finally, hydrogen peroxide oxidation of lapachol afforded the Hooker intermediate **13** which on esterification provided methyl ester **14** (Eyong et al. 2013).

In an attempt to obtain naphthoquinones stereoselectively for SAR studies, lapachol (**1**) was converted to lomatiol (**15**) under allylic oxidation conditions (Tanis et al. 1988). Subsequent treatment of lomatiol with m-CPBA afforded

compounds **16** and **17** as a 1:1 mixture of diastereomers, while under the Sharpless asymmetric epoxidation conditions lomatiol afforded compounds **18** and **19** in 2:3 diastereomeric ratio. On bromination, lomatiol afforded monobrominated compounds **20**, **21**, **22**, and **23** (Eyong et al. 2015a).

These naphthoquinones together with some previously isolated and synthesized quinone derivatives were screened for their cytotoxicity, including 7-methoxy-2-acetylfuronaphthoquinone (**24**), 2,3-dihydro-6-hydroxy-2-(prop-1-en-2-yl)naphtha[2,3-b]furan-4,9-dione (**25**), 2-acetylfuronaphthoquinone (**4**), knipholone (**26**), knipholone anthrone (**27**), 3-hydroxydehydroiso- α -lapachone (**28**), 2-(prop-1-en-2-yl)naphtha[2,3-b]furan-4,9-dione (**29**), 3,4 dehydro- α -lapachone (**30**), tithoniamarin (**31**), new-bouldiaquinone (**32**), acetyl lapachol (**33**), 4-(1,4-dihydro-2-hydroxy-1,4-dioxonaphthalen-3-yl)-2-methylbut-2-enal (**34**), 2-hydroxy-3-(4,4-dimethoxy-3-methylbutyl)naphthalene-1,4-dione (**35**), 1,4-dihydro-2-((3-(hydroxymethyl)-3-methylloxiran-2-yl)methyl) 1,4-dioxonaphthalen-3-yl acetate (**36**), 4-(1,4-dihydro-2-hydroxy-1,4-dioxonaphthalen-3-yl)-2-methylbutanal (**37**), acetyl lomatiol (**38**), methoxy lomatiol (**39**), 1,4-dihydro-2-((3-(hydroxymethyl)-3-methylloxiran-2-yl)methyl)-1,4-dioxonaphthalen-3-yl acetate (**40**), lapachol-OMe (**41**), 1a-methoxy-7a-(3-methylbut-2-en-1-yl)-1a,7a-dihydronaphtho[2,3-b]oxirene-2,7-dione (**42**), 6-hydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)benzo[a]phenazin-5(6H)-one (**43**), β -lapachone-o-phenylene diamine (**44**), and 3-bromo-5-hydroxy-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-benzo[h]chromene-6 carbaldehyde (**45**) (Eyong et al. 2005, 2006, 2008 2013, 2015a, 2015b; Kuete et al. 2007; Induli et al. 2013) (Fig. 2).

Cytotoxic activity

The compounds were evaluated in a panel (Dasari et al. 2015; Zhao et al. 2015) of human cell lines containing in vitro models for cancers typically associated with dismal prognosis, such as BE(2)-C, Kelly, SKNSH, CHLA-90 (all neuroblastoma) (Esposito et al. 2017; Zhao et al. 2016), A549 (non-small cell lung cancer) (Rossi et al. 2017), SKMEL-28 (melanoma) (Amann et al. 2017), and U373 (glioblastoma) (Osuka and Van Meir 2017).

First, the compounds were tested at a single concentration of 10 μ M and the percent residual growth of cancer cells was recorded after a 72-h treatment (Table 2).

In most cases, the active compounds did not discriminate between the cell lines used with the exception of a few, such as β -lapachone derivative **21**, which was essentially inactive in three neuroblastoma cell lines, yet showed potent activity against the other cell lines in the panel.

Fourteen of the most potent compounds were then selected and evaluated against A549, SKMEL-28, and

U373 cell lines to determine their IC₅₀ values (Table 3). Most of these compounds possess the β -naphthoquinone and the α -naphthoquinono[2,3-b]furan structural skeletons. Indeed, a literature search reveals a significant number of reports describing antiproliferative properties of compounds in these classes (Rios-Luci et al. 2012; Yamashita et al. 2007). Our results show that submicromolar to single digit micromolar IC₅₀ values are associated with compounds in which the β -naphthoquinone ring is fused with a saturated pyran (**2**, **11**, **20**, **21**) or a furan (**6**, **22**, **23**) moiety.

In the α -naphthoquinono[2,3-b]furan derivatives, the furan ring can be aromatic (**4**, **24**, **29**) or saturated (**16** and **28**) and retain activity, exhibiting submicromolar to low micromolar IC₅₀ values. Within the α -naphthoquinono[2,3-b]furan class, the acetyl furan **4** led to the highest cytotoxic activity indicating that the carbonyl of the acetoxy group on the furan ring may play an important role in bioactivity (cf. isopropylidene furan **29**).

Knipholone anthrone (**27**) exhibited a mean IC₅₀ of ca. 1 μ M, a value that is consistent with the literature data (Habtemariam 2010). It should be noted that this compound was recently found to induce necrotic cell death in cancer cells, identifying it as a promising anticancer agent to fight cancers with intrinsic resistance to apoptosis (Kornienko et al. 2013; Aksenov et al. 2015). Activity was found in the indeno[1,2-b]pyran skeleton, as represented with the product of the benzilic acid rearrangement, dione **9**, showing submicromolar to single digit micromolar potency depending on the cell line tested.

Conclusion

In this study, the cytotoxic activity of some previously isolated quinones and derivatives of lapachol, which are structurally related to known anticancer agents (i.e. β -lapachone, α -lapachone, and 2-acetylfuronaphthoquinone), and two new indeno[1,2-b]pyran derivatives were evaluated in a panel of human cancer cell lines. Fourteen of the tested compounds were most active with submicromolar to low micromolar IC₅₀ values. Among these compounds, seven are based on the β -naphthoquinone and five on the α -naphthoquinono[2,3-b]furan structural skeletons. These results are comparable with values described in the literature for these classes of compounds (Rios-Luci et al. 2012; Yamashita et al. 2007). Among the two new indeno[1,2-b]pyran derivatives, the further oxidized, benzilic acid rearrangement product, dione **9** was the most interesting finding given that anticancer activity with this structural skeleton appears to be unprecedented. Given the ease of synthesis and potent cytotoxic activity of dione **9** from commercially available lapachol (**1**), this tricyclic pyranone-fused indenone represents a compelling starting

Fig. 2 Previously isolated and synthesized quinone derivatives

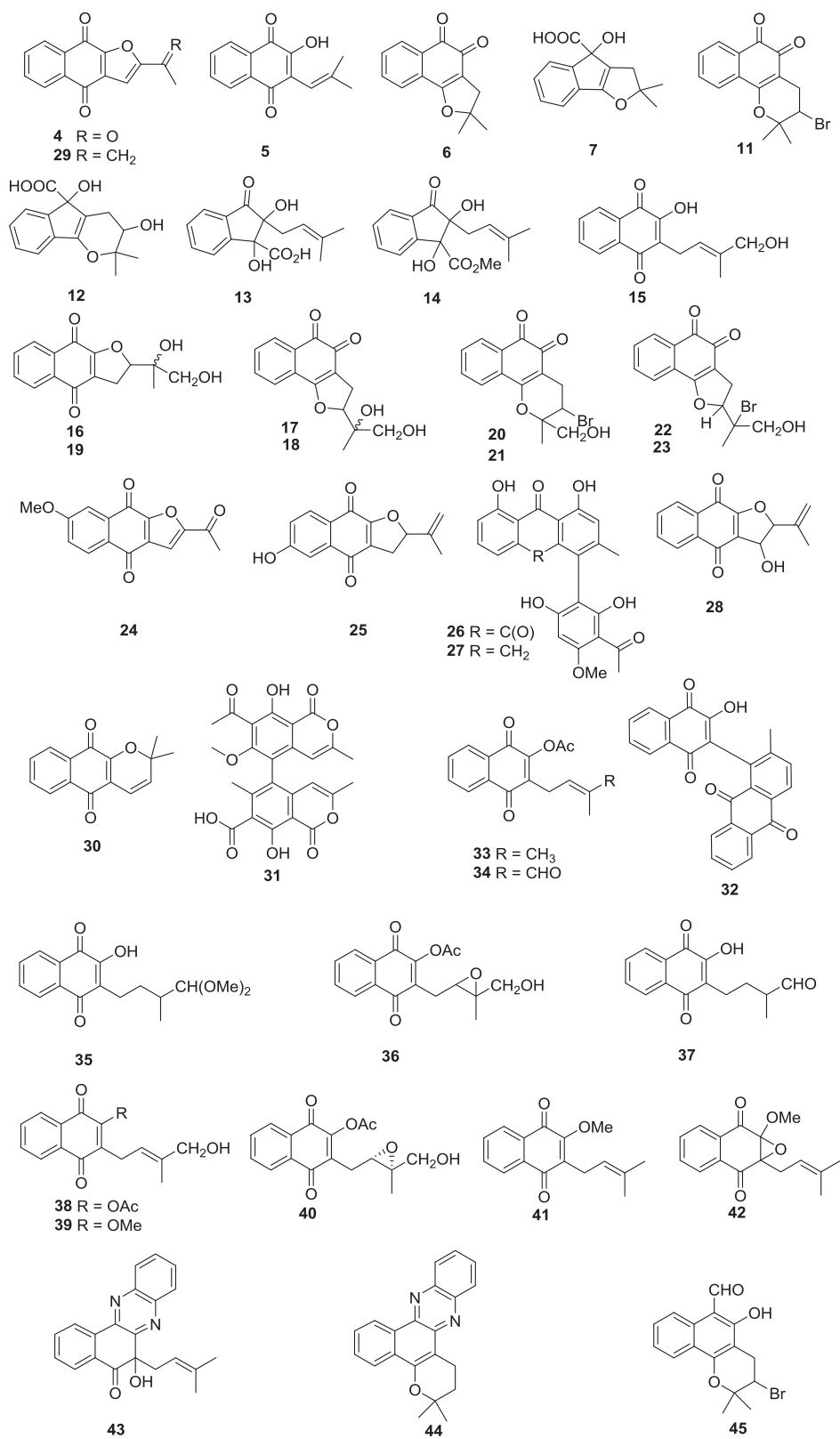


Table 2 Percent residual growth of cancer cell lines after a 72 h of treatment with 10 μ M of each compound as determined by the colorimetric MTT assay

Compound	Residual growth (%)							Mean
	BE(2)-C	Kelly	SKNSH	CHLA-90	A549	SKMEL-28	U373	
1	77	89	81	95	83	75	73	82
2	1	6	1	2	2	3	4	3
4	2	1	28	5	2	2	4	6
5	81	68	82	88	72	83	61	76
6	2	1	1	2	2	1	5	2
7	95	82	93	94	102	94	82	92
8	93	81	96	98	67	88	70	85
9	3	3	2	3	2	3	6	3
10	13	88	88	89	NT ^a	NT	NT	69
11	2	2	1	1	1	1	4	2
12	95	82	93	94	85	78	71	85
13	101	48	80	86	101	110	99	89
14	90	59	92	86	74	75	63	77
15	91	76	99	98	69	94	63	84
16	1	1	1	3	2	3	6	2
17	83	66	89	96	NT	NT	NT	83
18	38	76	74	85	78	87	74	73
19	1	2	2	3	NT	NT	NT	2
20	4	4	2	2	1	2	6	3
21	2	97	74	87	1	2	4	38
22	28	95	79	86	13	7	65	53
23	1	2	2	32	1	3	5	7
24	3	4	4	5	2	2	5	4
25	37	69	76	66	29	18	39	47
26	93	65	101	96	64	68	74	80
27	2	5	95	7	3	4	14	19
28	6	69	57	65	2	3	37	34
29	1	44	58	34	1	2	31	25
30	68	79	88	96	88	63	86	81
31	82	65	93	85	78	76	94	82
32	76	79	88	95	40	48	77	72
33	24	84	81	97	66	76	48	68
34	87	61	89	93	56	67	56	73
35	85	73	92	94	67	66	65	78
36	78	89	87	98	51	64	78	78
37	36	99	80	91	17	77	72	67
38	9	84	91	97	58	80	58	68
39	16	77	62	74	59	20	64	53
40	2	35	54	29	3	3	41	24
41	58	91	85	94	93	77	84	83
42	4	88	87	101	78	98	78	76
43	92	64	90	89	67	84	73	80
44	94	75	89	88	77	68	78	81
45	72	90	66	85	NT	NT	NT	78

^aNot tested

Table 3 In vitro growth inhibition (IC₅₀) after a 72 h of treatment with each compound as determined by the colorimetric MTT assay

Compound	Structural skeleton	IC ₅₀ (μM)					
		A549	SKMEL-28	U373	IC ₅₀ ± SEM		
2	β-naphthoquinone	0.03	0.05	0.24	0.1	0.07	
11	β-naphthoquinone	3	2	2	2.2	0.2	
20	β-naphthoquinone	3	3	2	2	0.4	
21	β-naphthoquinone	2	1	1	1.4	0.5	
6	β-naphthoquinone	3	2	3	2.5	0.1	
22	β-naphthoquinone	5	2	NT	3.5	1.3	
23	β-naphthoquinone	0.3	0.4	2.2	1.0	0.6	
4	α-naphthoquinono[2,3-b]furan	0.01	0.02	0.22	0.09	0.07	
24	α-naphthoquinono[2,3-b]furan	0.2	0.3	2	0.9	0.7	
29	α-naphthoquinono[2,3-b]furan	3	2	NT	2.4	0.4	
16	α-naphthoquinono[2,3-b]furan	2	3	3	2.6	0.2	
28	α-naphthoquinono[2,3-b]furan	3	3	3	3.0	0.0	
27	anthrone	0.1	2	2	1.1	0.5	
9	indeno[1,2-b]pyran	0.8	0.6	2.0	1.1	0.5	

point for further derivative synthesis and mode of action studies.

Experimental

Synthetic procedures

Synthesis of 2,2-dimethyl-2,3-dihydroindeno[1,2-b]pyran-4,5-dione (**9**) and methyl 5-hydroxy-2,2-dimethyl-2,3,4,5-tetrahydroindeno[1,2-b]pyran-5-carboxylate (**10**)

To a stirred solution of lapachol (**1**), (242 mg, 1.0 mmol, 1 equiv) in CH₂Cl₂ (7 mL) was added conc. H₂SO₄ (0.8 ml, 1.5 mmol, 1.5 equiv), the resulting reaction mixture was stirred for 3 h, at room temperature. The orange suspension was filtered and washed with ice cold water (3 × 5 ml), the crude product was dried under vacuum and column chromatographic purification of the crude compound over silica gel using 20–30% EtOAc in hexane as solvent gradient afforded pure β-lapachone (**2**) (218 mg, 90% yield), as an orange solid (Eyong et al. 2013).

A solution of β-lapachone (**2**) (50 mg, 0.2 mmol) in acetonitrile (2 ml) at 25 °C was treated with 3 N NaOH solution (1 ml). The resultant mixture was stirred for 10 h at 25 °C, then the mixture was acidified to pH 5 using 5% HCl (2 ml) and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was diluted with water (5 ml) and CH₂Cl₂ (5 ml). The layers were separated, the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂ (2 × 5 ml) and the combined organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄. The solvent was removed under reduced pressure to give crude compound,

which was purified by column chromatography over silica gel using 10–20% EtOAc in hexane as solvent gradient afforded pure compound **8** (43 mg, 80% yield) as a red solid (s).

Methylation of compound **8** with diazomethane. To a stirred slurry of 50% aq. KOH (10 ml) in Et₂O (5.0 ml) at 0 °C, N-nitroso-N-methylurea (22.5 mg, 0.16 mmol, 2 equiv) was added slowly. The resulting yellow colored organic layer containing diazomethane was separated, dried over KOH pellets, and added to compound **8** (20.8 mg, 0.08 mmol, 1 equiv) in Et₂O (2 ml), the reaction mixture was stirred for 2 h and the solvent was removed under reduced pressure. Column chromatographic purification of the crude products over silica gel using hexane-EtOAc gradient systems afforded the unexpected dione **9** (18.4 mg, 80% yield) and ester **10** (2.2 mg, 10% yield). dione **9**: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) 8.15 (m, 1H), 7.60 (m, 1H), 7.65 (m, 1H), 7.65 (m, 1H), 2.95 (s, 2H), 1.61 (s, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 181.5, 175.9, 168.9, 134.6, 132.0, 131.1, 129.5, 128.1, 124.7, 115.1, 93.8, 39.5, 28.6, 28.6. LCMS (APCI+) *m/z* calcd for C₁₄H₁₃O₃ [M+H]⁺: 229.08592; found: 229.08606. Ester **10**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05–8.04 (m, 2H), 7.70–7.68 (m, 2H), 4.14 (s, 3H), 2.70–2.66 (m, 2H), 1.75–1.65 (m, 2H) 1.29 (s, 6H). HRMS (ES+) *m/z* calcd for C₁₆H₁₉O₄ [M+H]⁺: 275.1278; found: 275.1297.

Biological assays

Cell lines

BE(2)-C and SK-N-SH cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Kelly cells

were obtained from the cell line repository at the Greehey Children's Cancer Research Institute, University of Texas Health Science Center at San Antonio. CHLA-90 cells were obtained from Children's Oncology Group. The neuroblastoma cell lines were maintained in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin–streptomycin (P/S) under standard cell culture conditions. The A549 cells (DSMZ) were cultured in RPMI culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. SKMEL-28 cells (ATCC) and U373 GBM cells (ECACC) were cultured in RPMI culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Life Technologies code 10270106). Cell culture media were supplemented with 4 mM glutamine (Lonza code BE17-605E), 100 µg/ml gentamicin (Lonza code 17-5182), and P/S (200 units/ml and 200 µg/ml) (Lonza code 17-602E) at 37 °C with 5% CO₂.

Cell proliferation assay

The effect of the investigated compounds on cell proliferation was determined by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) assay. The compounds were dissolved in DMSO or MeOH/CH₂Cl₂ at a concentration of either 10 or 50 mM prior to cell treatment. The cells were trypsinized and seeded at various cell concentrations depending on the cell type. The cells were grown for 24–72 h, treated with test compounds at required concentrations and incubated for 72 h in 100 or 200 µl media depending on the cell line used. The number of experiments and replicates varied depending on the cell line. Cells treated with 0.1% DMSO, 1% CH₂Cl₂, or 1% MeOH were used as a negative control. The effect of compound treatment on cell survival was evaluated by comparing compound-treated cells to cells treated with control using two-tailed student's *t* test, with *p* < 0.05 considered as statistically significant. The IC₅₀ corresponds to the concentration of the compound of interest that reduces by 50% the growth of the cancer cell line of interest after having cultured it for 72 h in the presence of the compound in comparison to the untreated control condition.

Acknowledgements The authors would like to acknowledge the council for International Exchange of Scholars (CIES) for the J. William Fulbright Visiting Scholar program to Pr Kenneth Eyong. The Molecular Bioscience Center, the CPRIT Synthesis and Drug-Lead Discovery Laboratory and the Departments of Chemistry/Biochemistry and Biology at Baylor University, and Baylor University and Texas State University, San Marcos for infrastructure and financial support. The University of Yaounde I and the Government of Cameroon for financial support through the Fonds d'Appuis à la Recherche.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Aksenov AV, Smirnov AN, Magedov IV, Reisenauer MR, Aksenov NA, Aksenova IV, Pendleton AL, Nguyen G, Johnston RK, Rubin M, De Carvalho A, Kiss R, Mathieu V, Lefranc F, Correa J, Cavazos DA, Brenner AJ, Bryan BA, Rogelj S, Kornienko A, Frolova LV (2015) Activity of 2-Aryl-2-(3-indolyl)acetohydroxamates against drug-resistant cancer cells. *J Med Chem* 58(5):2206–2220
- Amann VC, Ramelyte E, Thurneysen S, Pitocco R, Bentele-Jaberg N, Goldinger SM, Dummer R, Mangana J (2017) Developments in targeted therapy in melanoma. *Eur J Surg Oncol* 43(3):581–593
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol* 13(3):135–160
- Castellanos JRG, Prieto JM, Heinrich M (2009) Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)—a global ethnopharmacological comodity? *J Ethnopharmacol* 121:1–13
- Dahlin JL, Nissink JWM, Strasser JM, Francis S, Higgins LA, Zhou H, Zhang Z, Walters MA (2015) PAINS in the assay: chemical mechanisms of assay interference and promiscuous enzymatic inhibition observed during a sulfhydryl-scavenging HTS. *J Med Chem* 58(5):2091–2113
- Dasari R, De Carvalho A, Medellin DC, Middleton KN, Hague F, Volmar MNM, Frolova LV, Rossato MF, De La Chapa JJ, Dybdal-Hargreaves NF, Pillai A, Kälin RE, Mathieu V, Rogelj S, Gonzales CB, Calixto JB, Evidente A, Gautier M, Munirathinam G, Glass R, Burth P, Pelly SC, Van Otterlo WA, Kiss R, Kornienko A (2015) Wittig derivatization of sesquiterpenoid polygodial leads to cytostatic agents with activity against drug resistant cancer cells and capable of pyrrolylation of primary amines. *Eur J Med Chem* 103:226–237
- da Silva Jr EN, de Souza MCBV, Pinto AV, Pinto MCFR, Goulart MOF, Barros FWA, Pessoa C, Costa-Lotufu LV, Montenegro RC, de Moraes MO, Ferreira VF (2007) Synthesis and potent antitumor activity of new arylamino derivatives of nor-beta-lapachone and nor-alpha-lapachone. *Bioorg Med Chem* 15:7035–7041
- Esposito MR, Aveic S, Seydel A, Tonini GP (2017) Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. *J Biomed Sci* 24(1):14
- Eyong KO, Krohn K, Hussain H, Folefoc GN, Nkengfack AE, Schulz B, Hu Q (2005) Newbouldiaquinone and newbouldiamide: a new naphthoquinone–anthraquinone coupled pigment and a new ceramide from *Newbouldia laevis*. *Chem Pharm Bull* 53(6):616–619
- Eyong KO, Folefoc GN, Kuete V, Beng VP, Hussain H, Krohn K, Nkengfack AE, Saeftel M, Sarite SR, Achim H (2006) Newbouldiaquinone A: a naphthoquinone–anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry* 67:605–609
- Eyong KO, Kumar SM, Folefoc GN, Nkengfack AE, Baskaran S (2008) Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg Med Chem Lett* 18:5387–5390
- Eyong KO, Puppala M, Kumar PM, Lamshöft M, Folefoc GN, Spittler M, Baskaran S (2013) A mechanistic study on the Hooker

- oxidation: synthesis of novel indane carboxylic acid derivatives from lapachol. *Org Biomol Chem* 11:459–468
- Eyong KO, Chinthapally K, SenthilKumar S, Lamshöft M, Folefoc GN, Baskaran S (2015a) Conversion of lapachol to lomatiol: synthesis of novel naphthoquinone derivatives. *New J Chem* 39:9611–9616
- Eyong KO, Ketsemen LH, Ghansenyuy YS, Folefoc NG (2015b) Chemical constituents, the stereochemistry of 3-hydroxy furonaphthoquinones from the root bark of *Newbouldia laevis* Seem (Bignoniaceae), and screening against *Onchocerca ochengi* parasites. *Med Chem Res* 24:965–969
- Fiorito S, Epifano F, Bruyère C, Mathieu V, Kiss R, Genovese S (2014) Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 24:454–457
- Habtemariam S (2010) Knipholone anthrone from *Kniphofia foliosa* induces a rapid onset of necrotic cell death in cancer cells. *Fitoterapia* 81(8):1013–1019
- Hussain H, Krohn K, Ahmad VU, Miana GA, Green IR (2007) Lapachol: an overview. *Arkivoc* 2:145–171
- Induli M, Gebru M, Abdissa N, Akala H, Wekesa I, Byamukama R, Heydenreic M, Murunga S, Dagne E, Yenesew A (2013) Antiplasmodial quinones from the rhizomes of *Kniphofia foliosa*. *Nat Prod Commun* 8(9):1261–1264
- Kuete V, Eyong KO, Folefoc NG, Beng VP, Hussain H, Krohn K, Nkengfack AE (2007) Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. *Pharmazie* 62:552–556
- Kornienko A, Mathieu V, Rastogi SK, Lefranc F, Kiss R (2013) Therapeutic agents triggering nonapoptotic cancer cell death. *J Med Chem* 56(12):4823–4839
- Li Y, Li CJ, Yu D, Pardee AB (2000) Potent induction of apoptosis by beta-lapachone in human multiple myeloma cell lines and patient cells. *Mol Med* 6(12):1008–1015
- Lim SM, Jeong Y, Lee S, Im H, Tae HS, Kim BG, Park HD, Park J, Hong S (2015) Identification of β -Lapachone analogs as Novel MALT1 inhibitors to treat an aggressive subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *J Med Chem* 58:8491–8502
- Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG (1992) Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 112(1):2–16
- Nepomuceno JC (2011) Lapachol and its derivatives as potential drugs for cancer treatment. iConcept Press, Brazil
- Oliveira MF, Lemos TLG, Mattos MCD, Segundo TA, Santiago GMP, Braz-Filho R (2002) New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *An da Academia Brasileira de Ciências* 74:211–221
- Osuka S, Van Meir EG (2017) Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J Clin Invest* 127(2):415–426
- Perez-Sacau E, Diaz-Penate RG, Estevez-Braun A, Ravelo AG, Garcia-Castellano JM, Pardo L, Campillo M (2007) Synthesis and pharmacophore modeling of naphthoquinone derivatives with cytotoxic activity in human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *J Med Chem* 50:696–706
- Queiroz MLS, Valadares MC, Torello CO, Ramos AL, Oliveira AB, Rocha FD, Arruda VA, Accorei WR (2008) Comparative studies of the effects of *Tabebuia avellanadae* bark extract and beta-lapachone on the hematopoietic response of tumour-bearing mice. *J Ethnopharmacol* 117:228–235
- Ramos-Perez C, Lorenzo-Castrillejo I, Quevedo O, Garcia-Luis J, Matos-Perdomo E, Medina-Coello C, Estevez-Braun A, Machin F (2014) Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent β -lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA damage. *Biochemical Pharmacol* 92:206–219
- Rios-Luci C, Bonifazi EL, Leon LG, Montero JC, Burton G, Pandiella A, Misico RI, Padron JM (2012) β -Lapachone analogs with enhanced antiproliferative activity. *Eur J Medicinal Chem* 53:264–274
- Rossi A, Sacco PC, Santabarbara G, Sgambato A, Casaluce F, Palazzolo G, Maione P, Gridelli C (2017) Developments in pharmacotherapy for treating metastatic non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 18(2):151–163
- Souza-Silva F, Nascimento SB, Bourguignon SC, Pereira BA, Carneiro PF, Da Silva WS, Alves CR, De Pinho RT (2014) Evidences for leishmanicidal activity of the naphthoquinone derivative epoxy- α -lapachone. *Exp Parasitol* 147:81–84
- Sunasse SN, Veale CGL, Shunmoogam-Gounden N, Osoniyi O, Hendricks DT, Caira MR, de la Mare J-A, Edkins AL, Pinto AV, da Silva Jr EN, Davies-Coleman MT (2013) Cytotoxicity of lapachol, β -lapachone and related synthetic 1,4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. *Eur J Med Chem* 62:98–110
- Tanis SP, Chuang YH, Head DB (1988) Furans in synthesis. 8. Formal total syntheses of (+)- and (-)-aphidicolin. *J Org Chem* 53:4929–4938
- Ueda S (2005) The present invention relates to a novel compound possessing antitumor activity, and an antitumor agent comprising said compounds. US Patent 5663197
- Yamashita M, Kaneko M, Iida A, Tokuda H, Nishimura K (2007) Stereoselective synthesis and cytotoxicity of a cancer chemopreventive naphthoquinone from *Tabebuia avellanadae*. *Bioorg Med Chem Lett* 17(23):6417–6420
- Zhao Z, Ma X, Sung D, Li M, Kosti A, Lin G, Chen Y, Pertsemlidis A, Th H, Du L (2015) microRNA-449a functions as a tumor suppressor in neuroblastoma through inducing cell differentiation and cell cycle arrest. *RNA Biol* 12(5):538–554
- Zhao Z, Ma X, Shelton SD, Sung DC, Li M, Hernandez D, Zhang M, Losiewicz MD, Chen Y, Pertsemlidis A, Yu X, Liu Y, Du L (2016) A combined gene expression and functional study reveals the crosstalk between N-Myc and differentiation-inducing microRNAs in neuroblastoma cells. *Oncotarget* 7:79372–79387



E-ISSN: 2278-4136

P-ISSN: 2349-8234

www.phytojournal.com

JPP 2020; 9(4): 1660-1665

Received: 19-05-2020

Accepted: 21-06-2020

Ketsemen H Landry

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, the University of Yaounde 1, BP 812 Yaounde-Cameroon

Awantu A Fusi

Department of Chemistry, Faculty of Science, The University of Bamenda, Cameroon

Omdim N Irène

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, the University of Yaounde 1, BP 812 Yaounde-Cameroon

Shafi U Khan

Department of Pharmacy, COMSATS University of Information Technology, Abbottabad, Pakistan

Qazi N Us Saqib

Department of Pharmacy, COMSATS University of Information Technology, Abbottabad, Pakistan

Folefoc N Gabriel

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, the University of Yaounde 1, BP 812 Yaounde-Cameroon

Eyong O Kenneth

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, the University of Yaounde 1, BP 812 Yaounde-Cameroon

Reverse-docking study of a new indeno[1,2-b]pyran skeleton: Target investigation

Ketsemen H Landry, Awantu A Fusi, Omdim N Irène, Shafi U Khan, Qazi N Us Saqib, Folefoc N Gabriel and Eyong O Kenneth

Abstract

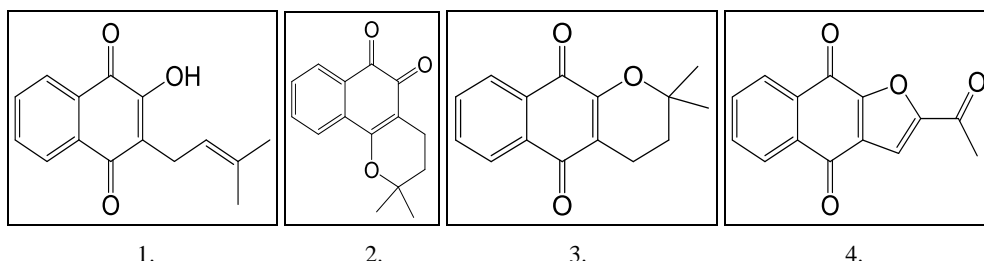
The reverse-docking of a new indeno[1,2-b] pyran skeleton on a panel of 25 protein targets is described. Reverse-docking analysis was performed by using AutoDockTools-1.5.6. The parameters used for the docking analysis are binding energy (ΔG), inhibition constant (K_i), Van der waals energy (vdw), torsional energy (Tors), intermolar energy (U) and H-Bond interactions (binding affinity). The 25 targets were retrieved from Protein Data Bank in pdb format. The comparative inhibition activity was analyzed by inhibition constant (K_i) and H-Bond interactions. The reverse-docking analysis reveals that the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 protein (VEGFR2) followed by the Disintegrin and Metalloprotease protein (ADAMTS-5) gave the best binding affinities and could therefore be the biological targets of this new indeno[1,2-b] pyran skeleton. Three other proteins, the Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9), the Serine/threonine-protein kinase (PLK-2) and the Receptor tyrosine-protein kinase (HER2) showed that they could also be involved with small contributions in the whole antiproliferative activity of compound 5.

Keywords: Indeno-pyran, reverse-docking, anti-proliferative, binding affinity, autodock4

Introduction

Cancer is the uncontrolled growth of abnormal cells in the body. Cancer develops when the body's normal control mechanism stops working. Old cells do not die and instead grow out of control, forming new, abnormal cells. These extra cells may form a mass of tissue, called a tumor. One in five men and one in six women worldwide will develop cancer during their lifetime, and almost one in six deaths worldwide is due to cancer [1]. Although effective on the tumor response, chemotherapy treatments are not without consequences. Indeed, they can present toxicities which can lead to deterioration in the quality of life.

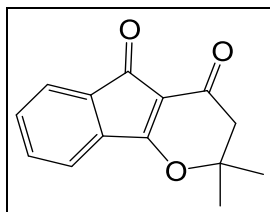
In the search for new bioactive molecules with anticancer activity, we carried out phytochemical studies on *Kigelia Africana*, *Markhamia stipulata*, *Stereospermum kunthianum*, *Stereospermum acuminatissimum*, *Newbouldia laevis* [2]. Plants of the Bignoniaceae family. This study resulted in the isolation of many compounds amongst which lapachol (1) has been the most active [3]. The first detailed anticancer effects of lapachol were evaluated in 1968 [4] and this compound was shown to possess very potent effects toward cancerous tumors in rats [3]. Historically, chemical transformation of the lapachol scaffold has yielded new derivatives with impressive biological activity and rich chemical diversity. β -lapachone (2), α -lapachone (3) and 2-acetylfuronaphthoquinone (4) are examples of analogs derived from lapachol that show superior antitumor activity compared to the natural product.

**Corresponding Author:****Ketsemen H Landry**

Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, the University of Yaounde 1, BP 812 Yaounde-Cameroon

In a pharmacomodulation attempt to remove the quinone groups, which is generally associated with undesirable effects, including acute cytotoxicity, immunotoxicity, and carcinogenesis [5, 6], orthoquinones were converted to indene-pyran derivatives via benzylic acid rearrangement. To avoid these potential pitfalls associated with drugs that possess a quinone moiety. We unexpectedly obtained a 1, 3 indene-pyran di-one (5). This compound showed potent

cytotoxic activity and eliminated virtually all cells in culture (close to 0% cell viability) at concentrations just slightly exceeding its IC₅₀ value [7].



5

Considering the good activity associated with this compound (5) and the fact that this scaffold has not been the object of any cancer study, we sought to find out by virtual screening possible biological targets and therefore the mode of action mechanism.

Virtual screening-based drug designs have successfully resulted in some approved drugs in recent history and the technique used to this end is molecular docking which is a one-target (protein or enzyme) many ligand (small molecule) concept [8]. A docking program predicts the binding mode of a small molecule/target protein complex. In order to find the most plausible binding modes, the docking program ranks possible conformations using a scoring function. Reverse docking is a method that does the opposite of direct docking.

That is a one-ligand many-target protein complex [8]. With the list of ranked target proteins, the relevance of a given ligand for particular diseases or its side effects can be estimated. Therefore, the reverse docking method is useful in finding activities of new drugs or for drug repositioning. This procedure looks for natural products of which the exact effects are not yet known such as compound (5) and also for new targets of drugs already approved.

Materials and Methods

Reverse Molecular docking studies

Preparation of Ligand

The 3D molecular structure of compound (5) was generated using Chem3D 15.0 running a windows workstation with an Intel(R) Core (TM) i5-3340M processor. The 3D structures of the compound was then saved in .pdb format. It was imported to the workspace and preparation was done for docking studies. The docking results of different targets were compared against the corresponding crystalized complex and listed in descending order.

Preparation of Enzyme

To perform reverse docking of compound (5), a panel of twenty five targets was selected based on their function in the cellular life. These targets are summarize in the table 1 below and the 3D structures were obtained from protein data bank (<http://www.rcsb.org>) in .pdb format.

Table 1: Some enzyme targets in Cancer therapy

Function	Targets
Targets involved in cell proliferation	HER2, IGF-1R, HSP90, ADAMTS-5, C-Src, PI3K, AKT, mTOR
Targets involved in tumor vascularization	ITK, VEGFR-2
Targets involved in the cell cycle	CDK5, CDK6, CDK7, CDK9, CHK1, CHK2, Aurora A, Aurora C, PLK2
Targets involved in repairing DNA damage	PARP
Targets involved in the apoptosis mechanism	BCL-2
Histone deacetylase inhibitors	HDAC1, HDAC2, HDAC3

The AutoDockTools [9] (ADT) was used to prepare the ligand and receptor structures, add appropriate Gasteiger and Kollman charges, identify and modify ligand rotatable bonds [10]. The potential binding sites of target were calculated using the Lamarckian GA (4.2) algorithm implemented in Autodock4 [11]. The population size, maximum number of evaluation (medium) and maximum number of generations were set at 150, 27 000 and 2 500 000 respectively [12]. The search space of the simulation exploited in the docking studies was studied as a subset region of the active site containing the co-crystallized ligand. The water molecules were removed from the enzyme to decrease interactions between functional group of ligands and water molecules. AutoDock program performs the research and evaluation of the different ligand configurations. It is possible to use several techniques to obtain the configurations (by simulated annealing, genetic algorithm or by Lamarckian genetic algorithm). A grid-based method was used to enhance the quick evaluation of the binding energy of conformations of

the complexes formed. The grid boxes were centered using coordinates of a virtual center of mass atom for the enzymes [14]. For each protein, the grid box was determined respectively in x, y and z dimension according to amino acids which formed active site. The affinity of the docked complexes was described using inhibition constant (K_i) and binding energy based on a semi empirical force field [9].

Results

The ability of compound (5) to bind with a particular target is given in terms of binding energy. The binding energy and inhibition constants are used as the parameters for analyzing the docking results. The protein targets are ranked according to their binding energy. The proteins possessing the lowest binding energy show a strong affinity for the target.

The important results of *in-silico* reverse-docking analysis of compound (5) on the twenty five selected proteins ranking based on binding energy and inhibition constant are presented in Table 2.

Table 2: Summarises the docking results of each selected protein with its natural ligand and the reverse docking of compound 5 with these proteins.

Target	Protein code	Natural ligand code (L0)	Ligand name	Estimated $\Delta G_{\text{Binding}}$ (L0) (kcal/mol)	Inhibition constant Ki (L0) (μM)	Estimated $\Delta G_{\text{Binding}}$ (kcal/mol)	Inhibition constant Ki (μM)
VEGFR2	3vhe	42Q	1-{2-FLUORO-4-[(5-METHYL-5H-PYRROLO[3,2-D]PYRIMIDIN-4-YL)OXY]PHENYL}-3-[3-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]UREA	-11.59	0.00322	-7.86	1.72
ADAMTS-5	2rjq	BAT	4-(N-HYDROXYAMINO)-2R-ISOBUTYL-2S-(2-THIENYLTHIOMETHYL)SUCCINYL-L-PHENYLALANINE-N-METHYLAMIDE	-7.61	2.63	-7.79	1.95
PI3K	1e7v	LY2	2-MORPHOLIN-4-YL-7-PHENYL-4H-CHROMEN-4-ONE	-8.55	0.64814	-7.67	2.4
Top 1	1t8i	EHD	4-ETHYL-4-HYDROXY-1,12-DIHYDRO-4H-2-OXA-6,12A-DIAZA-DIBENZO[B,H]FLUORENE-3,13-DIONE CAMPTOTHECIN	-10.37	0.02487	-7.54	2.95
mTOR	4jzp	AGS	PHOSPHOTHIOPHOSPHORIC ACID-ADENYLATE ESTER	-7.5	3.18	-7.36	4
PARP	4l6s	1WQ	(2S)-6-[[4-(4-CHLOROPHENYL)-3,6-DIHYDROPYRIDIN-1(2H)-YL]METHYL]-2-METHYL-2H-1,4-BENZOXAZIN-3(4H)-ONE	-9.95	0.0505	-7.34	4.19
AKT	2uzt	SS3	(2S)-1-[[5-(3-METHYL-1H-INDAZOL-5-YL)PYRIDIN-3-YL]OXY]-3-PHENYLPROPAN-2-AMINE	-10.93	0.00981	-7.25	4.84
BCL2	2o2f	LIO	4-(4-BENZYL-4-OXYMETHYLEPIPERIDIN-1-YL)-N-[[4-[[1,1-DIMETHYL-2-(PHENYLTHIO)ETHYL]AMINO]-3-NITROPHENYL]SULFONYL]BENZAMIDE	-10.72	0.01379	-7.17	5.56
IGF-1R	3o23	MQY	(5S)-5-METHYL-1-(QUINOLIN-4-YLMETHYL)-3-{4-[(TRIFLUOROMETHYL)SULFONYL]PHENYL}IMIDAZOLIDINE-2,4-DIONE	-11.13	0.00693	-7.09	6.31
CDK5	3o0g	3O0	{4-AMINO-2-[(4-CHLOROPHENYL)AMINO]-1,3-THIAZOL-5-YL}(3-NITROPHENYL)METHANONE	-10.37	0.02504	-7.07	6.61
ITK	4l7s	G7K	TRANS-4-({4-[DIFLUORO(4-FLUOROPHENYL)METHYL]-6-[(5-METHOXY[1,3]THIAZOLO[5,4-B]PYRIDIN-2-YL)AMINO]PYRIMIDIN-2-YL}AMINO)CYCLOHEXANOL	-9.57	0.09585	-7.07	6.63
CDK9	3tn8	F18	4-[(E)-(3,5-DIAMINO-1H-PYRAZOL-4-YL)DIAZENYL]PHENOL	-5.64	73.4	-7.04	6.93
HSP90	2xhr	COP	4-CHLORO-6-[2,4-DICHLORO-5-(2-MORPHOLIN-4-YLETHOXY)PHENYL]PYRIMIDIN-2-AMINE	-8.93	0.28278	-7.01	7.32
Aurora C	6gr9	VX6	CYCLOPROPANECARBOXYLIC ACID [4-[4-(4-METHYL-PIPERAZIN-1-YL)-6-(5-METHYL-2H-PYRAZOL-3-YLAMINO)-PYRIMIDIN-2-YLSULFANYL]-PHENYL]-AMIDE	-9.36	0.13687	-6.97	7.8
CDK6	4ez5	ORS	{5-[4-(DIMETHYLAMINO)PIPERIDIN-1-YL]-1H-IMIDAZO[4,5-B]PYRIDIN-2-YL}[2-(ISOQUINOLIN-4-YL)PYRIDIN-4-YL]METHANONE	-10.18	0.03448	-6.92	8.5
CHK1	1nvs	UCM	REL-(9R,12S)-9,10,11,12-TETRAHYDRO-9,12-EPOXY-1H-DIINDOLO[1,2,3-FG:3',2',1'-KL]PYRROLO[3,4-I][1,6]BENZODIAZOCINE-1,3(2H)-DION	-9.35	0.14101	-6.9	8.79
CDK7	1ua2	ATP	ADENOSINE-5'-TRIPHOSPHATE	-6.58	14.94	-6.8	10.42
PLK-2	4i6b	11G	(7R)-8-CYCLOPENTYL-7-ETHYL-5-METHYL-7,8-DIHYDROPTERIDIN-6(5H)-ONE	-6.62	14.01	-6.76	11.02
CHK2	2xk9	XX9	N-{4-[(1E)-N-(N-HYDROXYCARBAMIMIDOYL)ETHANEHYDRAZONOYL]PHENYL}-7-NITRO-1H-INDOLE-2-CARBOXAMIDE	-9.57	0.09631	-6.75	11.19
C-Src	4u5j	RXT	(3R)-3-CYCLOPENTYL-3-[4-(7H-PYRROLO[2,3-D]PYRIMIDIN-4-YL)-1H-PYRAZOL-1-YL]PROPANENITRILE	-6.72	11.89	-6.72	11.96
Aurora A	3h10	97B	9-CHLORO-7-(2,6-DIFLUOROPHENYL)-N-{4-[(4-METHYLPIPERAZIN-1-YL)CARBONYL]PHENYL}-5H-PYRIMIDO[5,4-D][2]BENZAZEPIN-2-AMINE	-9.76	0.06978	-6.59	14.89
HDAC3	4a69	IOP	D-MYO INOSITOL 1,4,5,6 TETRAKISPHOSPHATE	-15.45	0.00000475	-6.58	15.01

HDAC2	3max	LLX	N-(4-AMINOBIHENYL-3-YL)BENZAMIDE	-10.58	0.01745	-6.56	15.45
HDAC1	5icn	I6P	INOSITOL 1,2,3,4,5,6-HEXAKISPHOSPHATE	-14.44	0.00002613	-6.17	29.87
HER2	1n8z	NAG	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	-5.4	109.42	-5.72	64.08
ADAMTS-5	2rjq	NAG	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	-4.98	223.44	-5.37	116.72

Discussion

Table 2 shows 25 proteins with binding energy between $\Delta = -5.37$ kcal/mole and $\Delta = -7.86$ kcal/mol. The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 protein (VEGFR2) showed lower binding energy $\Delta = -7.86$ kcal/mole than the other proteins followed by the Disintegrin and Metalloprotease protein ADAMTS-5 ($\Delta = -7.86$ kcal/mole) in one of its two active sites. But the binding energy of the VEGFR2-compound 5 complex is higher than that of VEGFR2-co-crystallized complex ($\Delta = -11.59$ kcal/mole) when the binding energy of the ADAMTS-5-compound 5 complex is less (BAT: $\Delta = -7.79$ kcal/mole, NAG: $\Delta = -5.37$ kcal/mole) than that of the ADAMTS-5-co-crystallized complex (BAT: $\Delta = -7.61$ kcal/mole, NAG: $\Delta = -4.98$ kcal/mole) showing that these two targets should be both considered for experimental validation.

The affinity of the VEGFR2-compound 5 complex (Figure 1) is manifested by one hydrogen bond interaction of the carbonyl of the pyrane moiety with the amino acid residue

LYS A:868, Alkyl and Pi-Alkyl interactions with the amino acid residues ALA A:866, VAL A:916, LEU A:889 and VAL A:914, one Carbon Hydrogen bond interaction with PHE A:1047 and one Pi-Sigma interaction with LEU A:1035.

The affinity of the ADAMTS-5-compound 5 complex (BAT Pocket) (Figure 2) is manifested by three hydrogen bond interactions: two between the carbonyl of the indene moiety and the amino acid residues Leu A:379 and GLY A:380 and one between the oxygen of the ether of the pyran moiety and LEU A:443, one Pi-Cation interaction with HIS A:410, Alkyl and Pi-Alkyl interactions with the amino acid residues LEU A:379, LEU A:443 and ILE A:442, two Carbon Hydrogen bond interactions with THR A:378 and ILE A:442.

The affinity of the ADAMTS-5-compound 5 complex (NAG Pocket) (Figure 3) is manifested by two hydrogen bond interactions of both the two carbonyls with the amino acid residue TYR A:491, one Pi-Sigma interaction with GLY A:286 and Alkyl and Pi-Alkyl interactions with the amino acid residues LEU A:499 and TYR A:283.

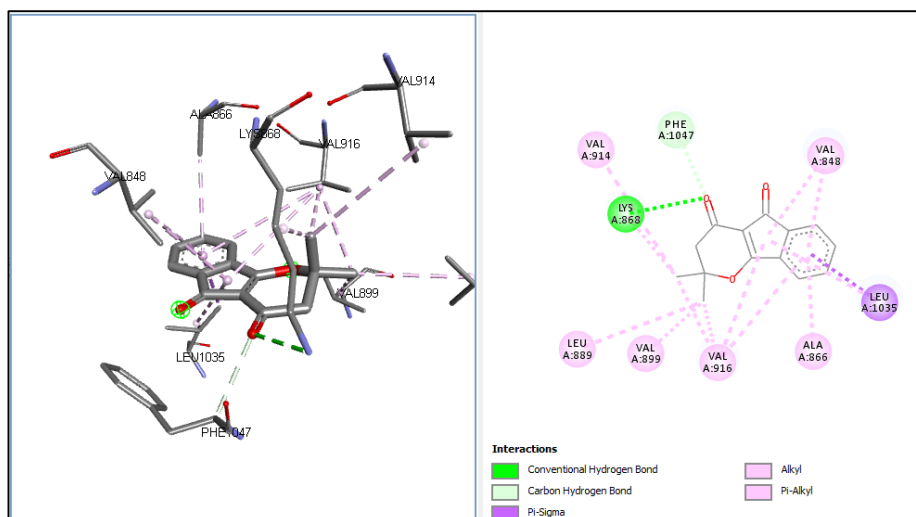


Fig 1: 3-dimensional and 2-dimensional results of docking of compound 5 in VEGFR protein

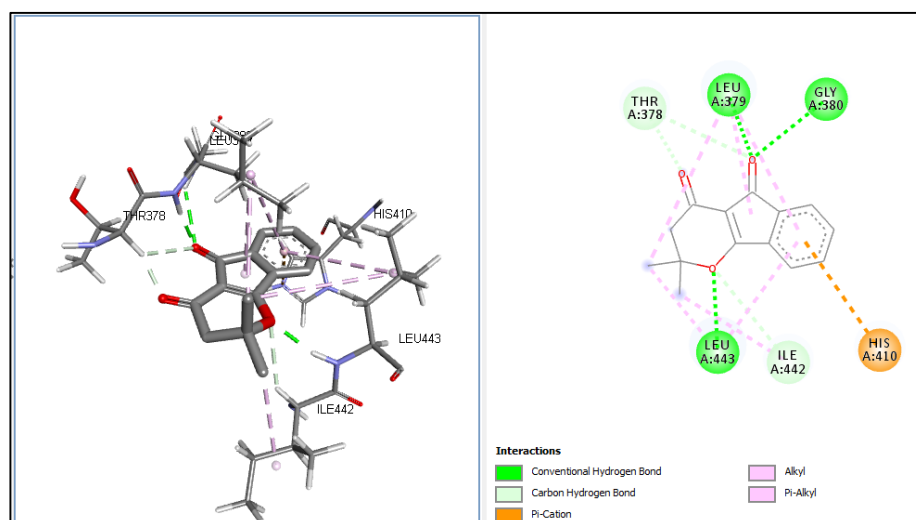


Fig 2: 3-dimensional and 2-dimensional results of docking of compound 5 in ADAMTS-5 protein (BAT Pocket)

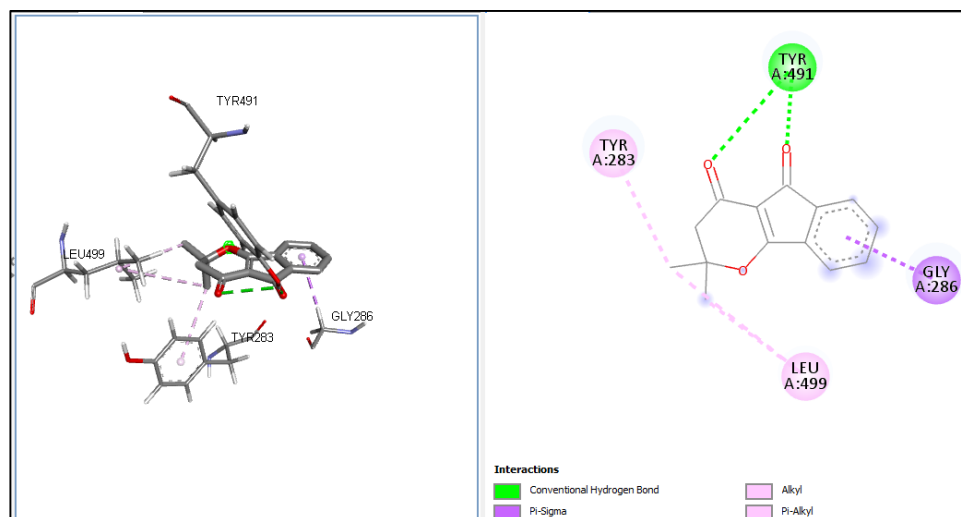


Fig 3: 3-dimensional and 2-dimensional results of docking of compound 5 in ADAMTS-5 protein (NAG Pocket)

Beside these two best values of binding affinities, there are three others protein-compound 5 complex with relatively high binding energy, but less compared to the corresponding protein-co-crystalized ligand. There are Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) (CDK9-compound 5: $\Delta = -7.04$ kcal/mole, CDK9-F18: $\Delta = -5.64$ kcal/mole), Serine/threonine-protein kinase (PLK-2) (PLK-2-compound 5: $\Delta = -6.76$ kcal/mole, PLK-2-11G: $\Delta = -6.62$ kcal/mole) and Receptor tyrosine-protein kinase (HER2) (HER2-compound 5: $\Delta = -5.72$ kcal/mole, HER2-NAG: $\Delta = -5.4$ kcal/mole). These three proteins can therefore be possible targets of small side effects which add small contributions to the whole antiproliferative activity of compound 5.

Conclusion

In summary, reverse-docking analysis of a new indeno[1,2-b]pyran skeleton was performed on 25 protein targets. The docking score and binding patterns were compared with that of the co-crystalized ligand of each protein. The proteins VEGFR2 and ADAMTS-5 were the most active and thus could therefore be consider for *in-vitro* enzymatic validation as the biological targets of compound (5). The affinities of compound (5) with the proteins HER2, CDK9 and PLK-2 are also comparable to the affinities of these proteins with their co-crystallization ligands. These proteins can therefore also be involved in the activity of compound (5). Further studies can be performed to validate our docking results through *in-vitro* screening , to discover pharmacokinetic properties, to know the absorption, distribution, metabolism and excretion of this new antiproliferative indeno[1,2-b]pyran skeleton.

Acknowledgements

The authors thank the Faculty of Science of the University of Yaounde I, the Third World Academy of Sciences (TWAS) for sponsoring the fellowship Mr Ketsemen at the COMSATS University of Abbotabad in Pakistan and the Government of Cameroon for financial support through the 'Fonds d'Appuis a la Recherche'.

References

1. WHO. Cancer <https://www.who.int/fr/news-room/factsheets/detail/cancer> (accessed Jun 3, 2020).
2. Eyong KO, Ketsemen HL, Ghansenyuy SY, Folefoc GN. Chemical Constituents, the Stereochemistry of 3-Hydroxy Furonaphthoquinones from the Root Bark of *Newbouldia Laevis* Seem (Bignoniaceae), and Screening

- against *Onchocerca Ochengi* Parasites. *Med. Chem. Res.* 2015, 24(3):965-969. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-1173-z>.
3. Hussain H, Krohn K, Ahmad V, Miana G, Green I. Lapachol: An Overview. *Arkivoc*, 2007.
4. Nepomuceno JC. Lapachol and Its Derivatives as Potential Drugs for Cancer Treatment. In *Plants and Crop The Biology and Biotechnology Research*; iConcept Press Ltd, 2014, 19.
5. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of Quinones in Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* 2000; 13(3):135-160.
6. Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. Quinone Chemistry and Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 112(1):2-16. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90273-U](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90273-U).
7. Eyong KO, Ketsemen HL, Zhao Z, Du L, Ingels A, Mathieu V *et al.* Antiproliferative Activity of Naphthoquinones and Indane Carboxylic Acids from Lapachol against a Panel of Human Cancer Cell Lines. *Med. Chem. Res.* 2020; 29:1058-1066. <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02545-0>.
8. Kharkar PS, Warriar S, Gaud RS. Reverse Docking: A Powerful Tool for Drug Repositioning and Drug Rescue. *Future Medicinal Chemistry. Future Science* 2014, 333-342. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.207>.
9. Morris GM, Ruth H, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS *et al.* Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J Comput. Chem.* 2009; 30(16):2785-2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
10. Model M SJ, MG. undefined. Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *academia.edu*. 1999,
11. Autodock A, Morris G, Goodsell D, Halliday R. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function, 1998.
12. Bahadori MB, Dinparast L, Valizadeh H, Farimani MM, Ebrahimi SN. Bioactive Constituents from Roots of *Salvia Syriaca* L.: Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Molecular Docking Studies. *South African J. Both.* 2016; 106:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.12.003>.

13. Robien MA, Bosch J, Buckner FS, Van Voorhis WCE, Worthey EA, Myler P Mehlin *et al.* Crystal Structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Plasmodium Falciparum* at 2.25 Å Resolution Reveals Intriguing Extra Electron Density in the Active Site. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2005; 62(3):570-577. <https://doi.org/10.1002/prot.20801>.
14. Forlemu N, Watkins P, Sloop J. Molecular Docking of Selective Binding Affinity of Sulfonamide Derivatives as Potential Antimalarial Agents Targeting the Glycolytic Enzymes: GAPDH, Aldolase and TPI. *Open J Biophys.* 2017; 07(01):41-57. <https://doi.org/10.4236/ojbiphy.2017.71004>.