

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE de PHARMACIE

Année : 2005

Thèse N° []

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline / Spécialité :

Sciences de la Vie et de la Santé

Sciences Pharmaceutiques – Chimie fine/Biologie

présentée et soutenue à huis-clos par

Samir YAHIAOUI

le 28 février 2005

**Cancer du sein. Synthèse et évaluation de dérivés
flavonoïdiques inhibiteurs de l'aromatase**

Thèse dirigée par A. J. CHULIA et C. FAGNERE

JURY :

- | | |
|---|-----------------------|
| - M. Denis Barron, Professeur, Nestlé Research Center, Suisse. | Rapporteur |
| - M. Ahcène Boumendjel, MCF, Université J. Fourier, Grenoble 1. | Rapporteur |
| - M. Jean-Christophe Le Bail, Docteur, Sanofi-Aventis, Paris. | Examineur |
| - M. A. José Chulia, Professeur, Université de Limoges. | Directeur de thèse |
| - Mme Catherine Fagnère, MCF, Université de Limoges. | Co-Directeur de thèse |
| - M. Gérard Habrioux, Professeur, Université de Limoges. | Examineur |
| - Melle Christelle Pouget, MCF, Université de Limoges. | Examineur |

Remerciements

A Monsieur Denis BARRON,

Professeur des Universités, Food Sciences Department, Nestlé Research Center, Suisse.

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger mon travail de thèse et d'en être rapporteur. Je vous suis reconnaissant pour le temps que vous avez consacré à la lecture de mon manuscrit et pour vos conseils qui m'ont été précieux. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur Ahcène Boumendjel,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de l'Université Joseph Fourier de Grenoble.

C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de juger mon travail et d'en être rapporteur. Je vous remercie pour vos conseils et vos suggestions qui m'ont ouvert à d'autres perspectives. Veuillez accepter ici le témoignage de mon respect le plus sincère.

A Monsieur le Docteur Jean-Christophe LE BAIL,

Docteur en Biochimie, Sanofi-Aventis, Paris, France.

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury et d'être examinateur de mon travail de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma respectueuse et sincère reconnaissance.

A Monsieur Gérard HABRIOUX,

Professeur de Biochimie à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'être examinateur de mon travail de thèse. Je tiens aussi à vous remercier pour votre aide concernant l'évaluation de l'activité anti-aromatase. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Albert José CHULIA,

Directeur de thèse, Professeur de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée et pour m'avoir accueilli avec bienveillance dans votre laboratoire. Merci pour l'aide scientifique et technique que vous m'avez apportée pendant ces années de thèse ; votre disponibilité et votre gentillesse

m'ont été d'une aide précieuse dans l'accomplissement de ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Madame Catherine FAGNERE,

Maître de Conférences en Chimie Organique à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Je tiens à te remercier pour avoir accepté d'encadrer mon travail de thèse. Tes compétences m'ont beaucoup aidé à acquérir de nouvelles connaissances. Ta sympathie, ta bonne humeur et ta disponibilité m'ont permis de réaliser ce travail dans une ambiance toujours amicale et chaleureuse. Merci beaucoup pour ton soutien de tous les instants.

A Mademoiselle Christelle POUGET,

Maître de Conférences en Pharmacie Galénique à la Faculté de Pharmacie de Limoges.

Merci d'avoir toujours été présente au cours de ces trois années de thèse, nos discussions scientifiques et tes conseils m'ont été d'une grande utilité. Merci pour ta gentillesse et pour ton aide précieuse, je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Mes remerciements vont également à Madame Allais, Mr le Professeur Kaouadji, Mr le Professeur Duroux, Mme Cook-Moreau, Mme Chable-Rabinovitch et Patrice Fondanèche pour leur aide et leur soutien.

Je tiens à remercier toutes les personnes membres de l'équipe Biomolécules, et surtout :

- Bertrand Liagre, Cécile Corbière, David Léger et Mr le Professeur Beneytout pour leur accueil et leur soutien lors de la réalisation des tests biologiques
- Alain Simon pour avoir effectué les tests anti-prolifératifs, et pour sa disponibilité aussi et Mme le Professeur Christiane Delage d'avoir permis la réalisation de ces tests.
- Hayat Lotfi pour la réalisation des spectres de masse
- Yves Champavier pour son aide et pour tous les spectres RMN réalisés avec beaucoup de rigueur ;
- Mon collègue Martin Lawson, je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse, et beaucoup de réussite et de bonheur avec ta petite famille ;

À tous mes amis de la Faculté de Pharmacie de Limoges et tous les membres du laboratoire de Pharmacognosie de Grenoble et en particulier Mme Dijoux-Franca.

A

*Maman et Papa, mes deux anges,
Mes sœurs Fatiha, Saida et Azziza,
Mes frères Nouredine, Nadir et Saïd,
Mon cousin Moussa
Et à tous les autres membres de la famille,*

A toi Imane,

*A tous mes amis en France et dans le monde,
Pour m'avoir soutenu et encouragé,
Je dédie ce travail.*

Samir

Résumé :

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes entre 40 et 50 ans, il représente donc un problème majeur de santé publique. Environ 50 % des cancers du sein sont considérés comme estrogéno-dépendants. Aussi, une stratégie de traitement des tumeurs mammaires consiste en l'inhibition de la biosynthèse de ces hormones par les inhibiteurs de l'aromatase, enzyme clé dans la production des estrogènes. Des inhibiteurs de l'aromatase tels que le létrozole et l'anastrozole constituent ainsi aujourd'hui le traitement de deuxième ligne de référence des cancers du sein métastatiques chez la femme ménopausée.

Les flavonoïdes, composés très répandus dans le règne végétal, ont fait l'objet de nombreux travaux dans notre laboratoire. Il s'avère que certaines de ces molécules présentent un effet anti-aromatase comparable à celui de l'aminogluthétimide, premier inhibiteur de l'aromatase utilisé en clinique. Une modulation de ces composés a alors été entreprise et de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase ont pu être développés, avec pour certains une activité proche de celle des derniers composés utilisés en thérapeutique.

Le but de notre travail était de poursuivre la pharmacomodulation du squelette flavonoïdique afin d'augmenter l'activité biologique et de concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques candidates pour l'hormonothérapie du cancer du sein. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la stéréochimie des 4-imidazolyflavanes sur l'activité anti-aromatase. Ensuite, nos travaux de modulation du squelette flavonoïdique ont conduit à l'obtention de deux nouvelles familles d'inhibiteurs de l'aromatase : les 4-triazolyflavanes et les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes. Ces derniers présentent une activité anti-aromatase similaire à celle du létrozole. Nos travaux ouvrent donc des perspectives de recherche intéressantes dans le cadre de l'hormonothérapie du cancer du sein et plusieurs perspectives sont décrites en vue d'obtenir des molécules encore plus actives.

Mots-clés :

Cancer du sein ; Estrogènes ; Inhibiteurs de l'aromatase ; Flavonoïdes ; Pharmacomodulation.

Abstract :

Breast cancer, the first cause of death in women between 40 and 50 years old, is an important public health problem. Approximately 50 % of these breast cancers are considered to be estrogen-dependent. Estrogens are known to be important in the growth of breast cancer in both pre- and postmenopausal women. One pharmacological approach for breast cancer treatment is the inhibition of estrogen biosynthesis by blocking aromatase, a key enzyme of the process. Aromatase has been the target for the design of inhibitors such as letrozole or anastrozole, which have become the established second-line treatment for metastatic breast cancer in post-menopausal women.

Previous studies in our laboratory have been mainly focused on flavonoids, which are natural compounds inhibiting aromatase with about the same activity as aminoglutethimide, the first aromatase inhibitor used clinically. Then, new aromatase inhibitors were designed and synthesized through modulation of the flavonoid skeleton. These compounds were found to possess moderate to high anti-aromatase activity.

In this study, we investigated new strategies of flavonoid pharmacomodulation with the aim to increase biological activity and to identify new therapeutic candidate agents for the hormonal treatment of breast cancer. First, we investigated the stereochemical impact on the activity of the 4-imidazolylflavan family. Secondly, we synthesized two new classes of inhibitors, the 4-triazolylflavans and the 7,8-benzo-4-imidazolylflavans. This latter demonstrated a high potential against aromatase. Many perspectives are described which can also additionally increase the activity and probably give a novel drug candidate for the treatment of hormone-dependent breast cancer.

Key words :

Breast cancer ; Estrogens ; Aromatase inhibitors ; Flavonoids ; Pharmacomodulation.

Abréviations

AG : aminoglutéthimide
ANF : 7,8-benzoflavone
APTS : acide *p*-toluènesulfonique
ax : axial
C : chalcones
C_P : chalcone protégée
CCM : Chromatographie Couche Mince
CDI: 1,1'-carbonyldiimidazole
CI₅₀ : concentration inhibitrice à 50 %
COSY : COrrélation SpectroscopY
d : doublet
d él : doublet élargi
dd : doublet de doublet
ddd : doublet de doublet de doublet
dt : doublet de triplet
DHEA : déhydroépiandrostérone
3,4-DHP : 3,4-dihydro- α -pyrane
E1 : estrone
E2 : estradiol
E3 : estriol
eq : équatorial
éq : équivalent
Et₂O : éther éthylique
EtOAc : acétate d'éthyle
EtOH : éthanol
F : flavanones
f : flavan-4-ols
fc : 2,4-*cis*-flavan-4-ols
ft : 2,4-*trans*-flavan-4-ols
G6PDH : glucose 6-phosphate déshydrogénase
HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPLC : High Performance Liquid Chromatography
17 β -HSD : 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
3 β -HSD : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase Δ 5/ Δ 4 isomérase
Hz : Hertz
I : 4-imidazolylflavanes
Ic: 2,4-*cis*-4-imidazolylflavanes
It : 2,4-*trans*-4-imidazolylflavanes
J : constante de couplage
m : multiplet
MeOH : méthanol
MPLC : Medium Pressure Liquid Chromatography
MTT : 3-(5,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
PPTS : pyridinium-*p*-toluènesulfonate
Rdt : rendement
R_F : rapport frontal
RP : puissance relative
s : singulet
SM-ESP : spectrométrie de masse par électrospray
t : triplet
T: 4-triazolylflavanes
 Δ 4 : androstènedione

Table des matières

| | |
|---------------------------|----|
| INTRODUCTION | 10 |
|---------------------------|----|

Première Partie : Cancer du sein et Flavonoïdes

I. Cancer du sein, état de la question

1. Généralités :

| | |
|---|----|
| 1.1 Incidence et mortalité..... | 15 |
| 1.2 Facteurs de risque : | 15 |
| 1.2.1. Facteurs endogènes..... | 15 |
| 1.2.1.1. L'âge..... | 16 |
| 1.2.1.2. Hérité et facteurs génétiques..... | 16 |
| 1.2.1.3. Facteurs hormonaux | 16 |
| 1.2.2. Facteurs exogènes..... | 17 |
| 1.2.2.1. Grossesse..... | 17 |
| 1.2.2.2. Contraceptifs oraux..... | 17 |
| 1.2.2.3. Obésité et régime alimentaire..... | 17 |

2- Les estrogènes et le cancer du sein :

| | |
|---|----|
| 2.1. Introduction | 18 |
| 2.2. Rôle des estrogènes dans le développement du cancer du sein..... | 18 |
| 2.3. Biosynthèse des estrogènes..... | 20 |

3. L'aromatase :

| | |
|---|----|
| 3.1. Nature de l'aromatase..... | 20 |
| 3.2. Mécanisme d'action de l'aromatase..... | 21 |

4. Traitement du cancer du sein :

| | |
|---------------------------------|----|
| 4.1. Traitement loco-régional : | |
| 4.1.1. La chirurgie..... | 23 |
| 4.1.2. La radiothérapie..... | 23 |
| 4.2. Traitement adjuvant : | |
| 4.2.1. La chimiothérapie..... | 23 |
| 4.2.2. L'hormonothérapie..... | 24 |
| 4.2.2.1. Généralités..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2.2. Les anti-estrogènes..... | 26 |
| 4.2.2.3. Les inhibiteurs de l'aromatase : | |
| 4.2.2.3.1. Classification..... | 26 |
| 4.2.2.3.2. Les inhibiteurs stéroïdiens (type I)..... | 27 |
| 4.2.2.3.3. Les inhibiteurs non-stéroïdiens (type II)..... | 28 |
| II. Les flavonoïdes : | |
| 1. Introduction..... | 31 |
| 2. Structure chimique et classification..... | 32 |
| 3. Origine biosynthétique..... | 34 |
| 4. Propriétés biologiques des flavonoïdes..... | 35 |
| 5. Effet anti-aromatase des flavonoïdes | |
| 5.1. Introduction..... | 37 |
| 5.2. Interaction Flavonoïde / Aromatase..... | 38 |
| 5.3. Influence de la substitution du noyau chromane sur l'activité anti-aromatase : | |
| 5.3.1. Etude des flavones..... | 38 |
| 5.3.2. Etude des flavanones..... | 40 |
| 5.4. Influence de la substitution du noyau B des flavonoïdes sur l'activité anti-aromatase : | |
| 5.4.1. Etude des flavones..... | 40 |
| 5.4.2. Etude des flavanones..... | 40 |
| 5.5. Influence de la substitution du noyau C des flavonoïdes sur l'activité anti-aromatase..... | 42 |
| 5.6. Bilan de l'influence de la substitution sur le squelette flavonoïdique | 45 |
| III. Conclusion..... | 46 |

| |
|---|
| Deuxième Partie : Travaux personnels |
|---|

| | |
|---------------------------|-----------|
| I. Objectifs | 48 |
|---------------------------|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 1. Modulation du noyau C : | |
| 1.1. Influence de la stéréochimie sur l'activité anti-aromatase : | |
| synthèse de 2,4- <i>trans</i> -4-imidazolyflavanes..... | 48 |
| 1.2. Introduction d'un nouveau motif de substitution : synthèse de 4-triazolyflavanes.... | 49 |
| 1.3. Introduction d'une double liaison : synthèse de 4-imidazolyflav-2-ènes..... | 50 |
| 2. Modulation du noyau A : | |
| 2.1. Synthèse de 7,8-benzoflavanones..... | 51 |
| 2.2. Synthèse de 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes..... | 52 |
| II. Synthèse et évaluation biologique des composés..... | 53 |
| 1. Les 4-imidazolyflavanes : | |
| 1.1. Principe..... | 53 |
| 1.2. Synthèse : | |
| 1.2.1. Synthèse de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone..... | 53 |
| 1.2.2. Réduction des flavanones..... | 54 |
| 1.2.3. Synthèse des 4-imidazolyflavanes..... | 56 |
| 1.2.4. Essais de séparation..... | 58 |
| 1.3. Evaluation biologique..... | 59 |
| 2- Les 4-triazolyflavanes : | |
| 2.1. Synthèse et mécanismes..... | 62 |
| 2.2. Evaluation biologique..... | 64 |
| 2.3. Conclusion..... | 67 |
| 3. Les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes : | |
| 3.1. Introduction..... | 68 |
| 3.2. Les 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcones : | |
| 3.2.1. Synthèse..... | 68 |
| 3.2.2. Analyse structurale..... | 69 |
| 3.2.3. Evaluation biologique..... | 70 |
| 3.3. Les 7,8-benzoflavanones : | |
| 3.3.1. Synthèse..... | 72 |
| 3.3.2. Analyse structurale..... | |

| | |
|--|----|
| 3.3.3. Evaluation biologique : | |
| 3.3.3.1. Les 7,8-benzoflavanones..... | 73 |
| 3.3.3.2. La 7,8-benzoflavone..... | 75 |
| 3.4. Les 7,8-benzoflavan-4-ols..... | 76 |
| 3.5. Les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes : | |
| 3.5.1. Synthèse..... | 77 |
| 3.5.2. Analyse structurale..... | 78 |
| 3.5.3. Mécanismes : | |
| 3.5.3.1. Obtention des 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzo-4-imidazolyflavanes à partir de 2,4- <i>cis</i> -7,8-benzoflavan-4-ols..... | 80 |
| 3.5.3.2. Formation des 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzoflavan-4-ols lors de la réaction de substitution..... | 81 |
| 3.5.3.3. Obtention des 2,4- <i>cis</i> -7,8-benzo-4-imidazolyflavanes..... | 81 |
| 3.5.3.4. Cas particulier de l'imidazolé I2 | 82 |
| 3.5.4. Essais de purification..... | 82 |
| 3.5.5. Evaluation biologique..... | 85 |
| 4. Essais de modulation des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes : | |
| 4.1. 7,8-benzo-4-imidazolyflav-2-ènes..... | 88 |
| 4.1.1. Rappels bibliographiques..... | 89 |
| 4.1.2. Essais de synthèse..... | 91 |
| 4.2. Synthèse des dérivés hydroxylés du 7,8-benzo-4-imidazolyflavane..... | 92 |

III. Discussion 95

IV. Conclusion et perspectives.....100

| |
|--|
| Troisième Partie : Partie expérimentale |
|--|

1. Matériels et méthodes :

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 1.1. Purification des composés..... | 103 |
| 1.2. Analyse structurale..... | 104 |

| | |
|--|------------|
| 1.3. Méthodes d'évaluation biologique : | |
| 1.3.1. Principe d'étude de l'activité inhibitrice des flavonoïdes sur l'aromatase..... | 104 |
| 1.3.2. Principe d'étude de l'influence des flavonoïdes sur la prolifération des cellules MCF-7..... | 106 |
| 2. Préparation et caractérisation des composés : | |
| 2.1. Les 4-imidazolylflavanes..... | 108 |
| 2.2. Les 4-triazolylflavanes..... | 118 |
| 2.3. Les 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes : | |
| 2.3.1. Synthèse et caractérisation des 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcones..... | 122 |
| 2.3.2. Synthèse et caractérisation des 7,8-benzoflavanones..... | 128 |
| 2.3.3. Synthèse et caractérisation des 7,8-benzoflavan-4-ols..... | 133 |
| 2.3.4. Synthèse et caractérisation des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes..... | 139 |
| Références bibliographiques | 151 |
| LISTE DES TABLEAUX | 161 |
| LISTE DES SCHEMAS | 164 |

INTRODUCTION

Les flavonoïdes sont des composés naturels, appartenant à la famille des polyphénols, très répandus dans le règne végétal et présents dans notre alimentation à travers les légumes, les fruits et les céréales (Peterson et Dwyer, 1998). Parmi ces flavonoïdes, les isoflavonoïdes jouent un rôle protecteur vis-à-vis du cancer du sein ; il a en effet été observé que, pour les populations asiatiques, le régime alimentaire riche en isoflavonoïdes diminue l'incidence du cancer du sein (Hodek et coll., 2002).

A côté de ces isoflavonoïdes, d'autres classes de flavonoïdes ont fait l'objet d'études pharmacologiques démontrant leur activité anti-virale, anti-inflammatoire, anti-oxydante (protection vis-à-vis de maladies cardio-vasculaires) et anti-cancéreuse (Di Carlo et coll., 1999).

L'équipe «Biomolécules et Cibles Cellulaires Tumorales» est particulièrement impliquée dans la recherche de molécules végétales présentant des effets protecteurs sur certains cancers hormono-dépendants (cancer du sein et cancer de la prostate). De nombreuses investigations ont été réalisées sur les activités anti-estrogénique, anti-proliférative et anti-aromatase. Nos travaux concernent plus particulièrement la synthèse de composés flavonoïdiques à visée anti-aromatase, les inhibiteurs de l'aromatase appartenant à l'arsenal thérapeutique utilisé dans le cancer du sein.

Le cancer du sein représente un problème majeur de santé publique ; cette néoplasie constitue la première cause de décès chez les femmes entre 40 et 50 ans. Les données épidémiologiques mettent en évidence une forte augmentation de l'incidence et une quasi-stabilité de la mortalité grâce aux progrès en matière de diagnostic et de traitement.

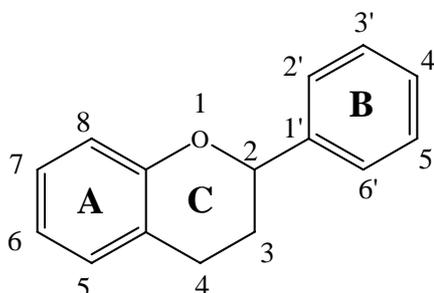
Outre la chirurgie et la radiothérapie, le traitement de cancer du sein peut faire appel aux traitements adjuvants tels que la chimiothérapie et l'hormonothérapie, traitement particulièrement adapté au cancer du sein hormono-dépendant.

Les estrogènes jouent un rôle très important dans le développement et la progression des tumeurs cancéreuses *via* leur liaison aux récepteurs estrogéniques et leur conversion en certains métabolites génotoxiques. L'hormonothérapie repose sur deux stratégies : la première utilise des anti-estrogènes pour bloquer l'action de estrogènes au niveau de leurs récepteurs, la deuxième consiste en l'inhibition de la biosynthèse de ces hormones par les inhibiteurs de l'aromatase. L'aromatase est une enzyme clé dans la production des estrogènes car elle catalyse la dernière étape de leur biosynthèse, c'est à dire la conversion des androgènes en estrogènes.

Les inhibiteurs de l'aromatase ont connu un véritable essor depuis le développement du premier inhibiteur utilisé en clinique : l'aminoglutéthimide, composé peu spécifique et

responsable de nombreux effets indésirables. Beaucoup de molécules plus actives et surtout plus spécifiques ont été développées à l'image des dérivés azolés tels que le létrozole et l'anastrozole, qui constituent aujourd'hui le traitement de première intention du cancer du sein métastatique dans plusieurs pays. Ces molécules possèdent un motif triazolé qui représente un domaine de chélation avec le fer de l'hème de l'aromatase.

Une étude menée dans notre équipe sur l'activité anti-aromatase des flavonoïdes a montré l'effet favorable d'un substituant hydroxyle ou méthoxy en position 7 des flavanones et flavones (Le Bail et coll., 1998a ; Le Bail et coll., 2001). Ces premiers résultats ont été à l'origine du travail de thèse de C. Pouget sur la conception et la synthèse de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase. Les deux principaux axes de recherche ont concerné la pharmacomodulation du noyau B puis celle du noyau C.



Divers groupements ont tout d'abord été introduits sur le noyau B. L'évaluation biologique des molécules synthétisées a permis de montrer l'influence favorable du groupement hydroxyle en position 3' et/ou 4' sur l'activité anti-aromatase ; ainsi la 3',4'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone s'avère la molécule la plus active de cette série, avec une activité deux fois supérieure à celle de l'aminogluthéimide (Pouget et coll., 2002c).

Sur le noyau C, et plus précisément sur les positions 3 ou 4, ont été introduits des hétérocycles azotés en vue de renforcer la chélation avec le fer de l'hème de l'aromatase. Ainsi, deux nouvelles classes de composés ont été développées :

- la classe des 3-(4-pyridinylméthylène)flavanones qui présente une activité supérieure à celle de l'aminogluthéimide, mais cette activité reste modérée vis-à-vis de l'aromatase (Pouget et coll., 2002a) ;

- la famille des 4-imidazolylflavanes qui constitue un ensemble de molécules présentant *in vitro* une activité biologique de l'ordre de celle des molécules thérapeutiques actuelles (Pouget et coll., 2002b). Notre travail de thèse a pour but de poursuivre cette étude de pharmacomodulation en se basant sur les éléments dégagés lors des travaux antérieurs, ceci afin de développer des inhibiteurs de l'aromatase encore plus actifs. Dans un premier temps,

nous dressons un bilan sur le cancer du sein, le rôle des estrogènes dans cette pathologie et les traitements, plus particulièrement, l'hormonothérapie avec les inhibiteurs de l'aromatase. Nous développons également dans cette première partie les principales caractéristiques des flavonoïdes et leur propriétés biologiques, en insistant sur leur activité anti-aromatase.

La deuxième partie est consacrée aux travaux personnels ; après une présentation générale des objectifs du travail qui s'articulent en trois thèmes principaux, chacun de ces axes de recherche est détaillé en termes de synthèse et d'évaluation biologique.

Le premier axe concerne l'étude de l'influence de la stéréochimie des 4-imidazolyflavanes, précédemment décrits, sur l'activité anti-aromatase.

La modulation du noyau C du squelette flavane, deuxième thème de ce travail, concerne l'introduction d'un noyau triazole en position 4 à l'image des inhibiteurs connus de l'aromatase tels que le létrozole et l'anastrozole. L'activité des 4-triazolyflavanes, nouvelle famille de composés, peut alors être comparée à celle des 4-imidazolyflavanes correspondants.

Le troisième axe de recherche est consacré à la synthèse de molécules comportant un noyau aromatique supplémentaire par rapport au squelette flavane. Cette extension est basée sur plusieurs travaux qui indiquent que la 7,8-benzoflavone est la molécule la plus inhibitrice de l'aromatase parmi tous les flavonoïdes naturels ou synthétiques testés (Nesnow et coll., 1983 ; Kellis et Vickery, 1984 ; Campbell et Kurzer, 1993). La synthèse de 7,8-benzoflavanones ainsi que leur activité vis-à-vis de l'aromatase sont présentées pour la première fois. L'introduction sur les noyaux B et C de ce nouveau squelette, de divers substituants sélectionnés selon les résultats antérieurs, permet ainsi de développer une nouvelle famille de molécules, les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes qui font l'objet d'une évaluation biologique.

D'autres essais de modulation sont réalisés et les premières observations sont exposées avant de présenter une discussion de l'ensemble des résultats obtenus. La partie expérimentale regroupant les matériels et méthodes utilisés, la synthèse et la caractérisation des composés, vient clore ce travail.

PREMIERE PARTIE :

CANCER DU SEIN ET FLAVONOÏDES

I. Cancer du sein, état de la question

1. Généralités :

1.1. Incidence et mortalité :

En France, le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme, avec 41 845 nouveaux cas et 11 637 décès en l'an 2000 (Remontet et coll., 2003). Cette tendance se généralise, mis à part certains pays asiatiques, à tous les pays industrialisés (Europe de l'Ouest, Etats-Unis, Canada, Afrique du Sud). Selon certaines estimations, environ un million de nouveaux cas de cancer du sein ont été enregistrés dans le monde en l'an 2000 (Boyle et coll., 2003).

L'incidence du cancer du sein augmente dans la quasi-totalité des pays, qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement, cette augmentation étant en moyenne de 1% par an (Sondik, 1994). Dans la plupart des pays développés, les données épidémiologiques sont caractérisées par une forte augmentation de l'incidence et une quasi-stabilité de la mortalité. En effet, entre 1980 et 2000, le nombre de cas en France est passé de 21 000 à 42 000 et le nombre de décès de 8 600 à 11 600 (Remontet et coll., 2003). Compte tenu de l'évolution démographique (taille de la population, distribution de l'âge et du sexe...), ces chiffres correspondent à une augmentation de l'incidence de 60 % sur 20 ans et à une augmentation de la mortalité de 5 % sur la même période (Esteve, 2004).

1.2. Facteurs de risque :

L'étiologie de la majorité des cancers du sein demeure inconnue. Il est possible que de nombreux facteurs, non encore identifiés, soient impliqués lors de l'initiation de cette pathologie. Ces facteurs peuvent être classés en deux catégories : les facteurs endogènes (facteurs propres à l'individu) et les facteurs exogènes.

1.2.1. Facteurs endogènes :

Tout d'abord, cette maladie peut être considérée comme étant spécifiquement féminine. Dans 99 % des cas, ce cancer se développe chez la femme. Les autres facteurs sont l'âge, les facteurs génétiques et les facteurs hormonaux.

1.2.1.1. L'âge :

Le cancer du sein est plus fréquent chez les personnes âgées. Le risque de développer cette pathologie augmente rapidement avec l'âge. Ainsi, l'incidence du cancer du sein pour les femmes en Europe et en Amérique du Nord est d'environ 2,7 % à 55 ans, de 5 % à 65 ans et de 7,7 % à 75 ans (Key et coll., 2001).

1.2.1.2. Héritéité et facteurs génétiques :

Les facteurs génétiques sont responsables de 5 à 10 % des cancers du sein. Il s'agit en fait de la transmission héréditaire d'une anomalie génétique impliquée dans les processus de cancérisation, comme par exemple une forme altérée de gènes tels que BRCA1 et BRCA2. Les femmes qui héritent d'anomalies sur le gène BRCA1 présentent un risque extrêmement élevé de développer un cancer du sein ainsi qu'un cancer de l'ovaire (Den Tonkelaar, 2000). Par contre, une anomalie sur le gène BRCA2 s'associe uniquement à une augmentation du risque de cancer du sein. Il semble que ces gènes codent pour les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Un tel risque concerne les femmes ayant un parent proche (mère, sœur, fille) atteint d'une de ces anomalies (Chodosh et coll., 1999).

1.2.1.3. Facteurs hormonaux :

Les hormones endogènes sont très impliquées dans le développement de la glande mammaire et, de ce fait, jouent un rôle important en tant que facteurs de risque du cancer du sein.

Plusieurs études montrent qu'il existe une relation entre les hormones et le risque de développer un cancer du sein chez la femme ménopausée. Ces études indiquent que les femmes, qui possèdent un taux sanguin très élevé en estradiol, ont deux fois plus de risque de développer un cancer du sein par rapport aux femmes qui présentent une faible concentration en cette hormone (Key et coll., 2001).

Parmi d'autres exemples de facteurs hormonaux, on peut citer l'apparition précoce des règles, ainsi qu'une ménopause tardive (Gourinel et coll., 1996).

1.2.2. Facteurs exogènes :

1.2.2.1. Grossesse :

Le risque de développer un cancer du sein est accru chez les femmes nullipares et les femmes ayant eu une grossesse tardive. Par ailleurs, il apparaît qu'une première grossesse, menée à terme à un âge précoce, est un élément protecteur. Cette première grossesse permet une maturation complète de la glande mammaire qui bénéficie alors de l'influence protectrice de la progestérone, prévenant ainsi une possible initiation tumorale. Un nombre important de grossesses réduirait également le risque (Gourinel et coll, 1996).

1.2.2.2. Contraceptifs oraux :

L'effet des contraceptifs hormonaux dans le cancer du sein n'est pas encore bien défini, mais certaines études montrent que l'utilisation prolongée de ces contraceptifs peut augmenter le risque du cancer du sein. Néanmoins, cette augmentation du risque disparaît environ dix ans après l'arrêt du contraceptif (Narod et coll., 2002 ; Mitrunen et Hirvonen, 2003 ; Nkondjock et Gharidian, 2004).

1.2.2.3. Obésité et régime alimentaire :

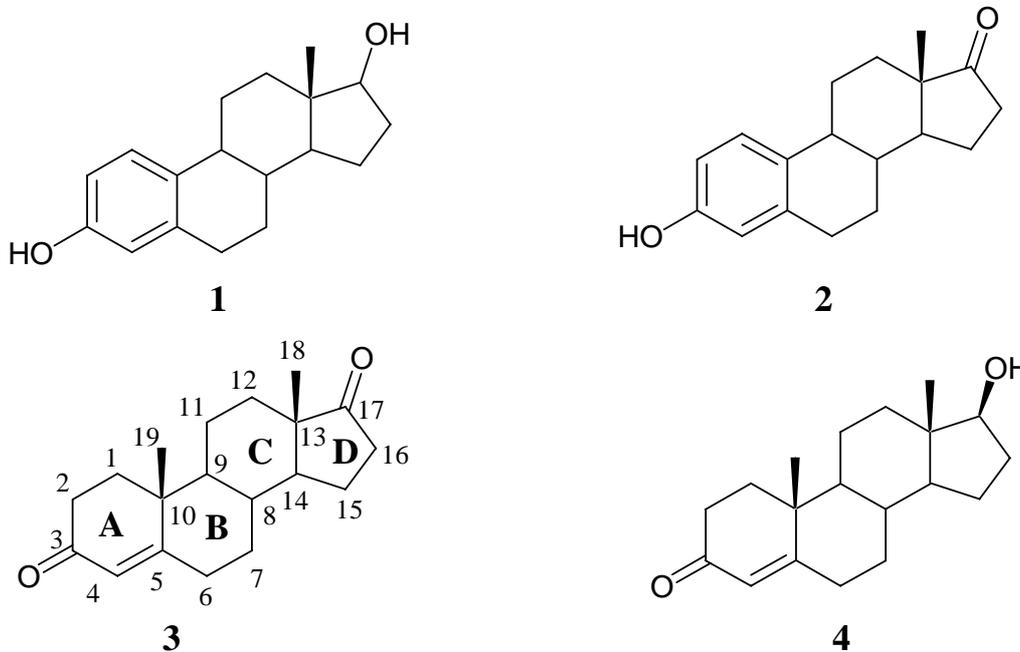
L'obésité n'entraîne pas un risque accru de cancer du sein chez les femmes jeunes. En revanche, après la ménopause, ce risque est multiplié par deux chez les femmes obèses. Un régime alimentaire riche en graisses augmenterait le risque de cancer du sein. Cette hypothèse est basée sur l'incidence faible du cancer du sein au Japon et dans les pays sous-développés dont les populations consomment moins de graisses. En effet, les graisses favoriseraient le développement d'une flore bactérienne colique capable de transformer ces corps gras en agents cancérogènes potentiels (Gourinel et coll., 1996).

L'alcool, les rayonnements ionisants à dose importante, ainsi qu'un déficit en vitamines A et E pourraient jouer aussi un rôle dans la survenue du cancer du sein (Gourinel et coll., 1996).

2. Les estrogènes et le cancer du sein :

2.1. Introduction :

Les estrogènes sont des hormones endogènes, impliquées dans plusieurs processus physiologiques. Plusieurs études montrent que ces hormones augmentent le risque de développer un cancer du sein chez la femme pré et post-ménopausée. Ces hormones favorisent également la croissance et la progression continues des tumeurs cancéreuses. Les estrogènes sont le 17 β -estradiol (E₂) **1**, le plus puissant, puis l'estrone (E₁) **2** et l'estriol (E₃). Ces estrogènes sont formés à partir de leurs précurseurs androgéniques (androstènedione **3** et testostérone **4**) par aromatisation du noyau A du stéroïde (Coelingh Bennink, 2004).



Afin de mieux comprendre le développement de ces cancers hormono-dépendants et leurs traitements, nous allons nous intéresser aux mécanismes par lesquels les estrogènes exercent leurs effets.

2.2. Rôle des estrogènes dans le développement du cancer du sein :

Deux mécanismes par lesquels les estrogènes pourraient être à l'origine du développement du cancer du sein ont été décrits (Coumoul et Barouki, 2002 ; Santen, 2003 ; Miller, 2004) (schéma 1). D'une part, il est démontré que l'estradiol peut promouvoir la prolifération de cellules cancéreuses. En effet, l'estradiol peut se lier aux récepteurs des

estrogènes et stimuler ainsi la transcription de gènes impliqués dans la division cellulaire (schéma 1, voie a). Lors de ces divisions, les cellules sont plus sensibles aux erreurs de réplication et à l'effet d'agents cancérigènes extérieurs. Les estrogènes constituent donc des promoteurs de cancérogenèse. D'autre part, certaines études décrivent une action initiatrice de la cancérogenèse qui passe cette fois par la conversion de l'estradiol en métabolites génotoxiques (schéma 1, voie b). Différentes voies métaboliques peuvent conduire à la synthèse de composés génotoxiques. La voie principale conduit à la synthèse de dérivés hydroxylés de l'estradiol, les catéchols (2-hydroxy-estradiol et 4-hydroxy-estradiol principalement) qui peuvent aboutir à des semi-quinones et enfin à des quinones. Ces dernières, fortement réactives, sont capables d'une part de former des adduits d'ADN (liaison par covalence à la guanine ou à l'adénine), et d'autre part, de provoquer l'oxydation des lipides cellulaires, *via* la formation de dérivés réactifs de l'oxygène comme l'ion superoxyde O_2^- (Santen, 2003).

Ces deux mécanismes peuvent agir de concert pour stimuler la prolifération cellulaire, favoriser l'accumulation de mutations et augmenter ainsi la tumorigenèse.

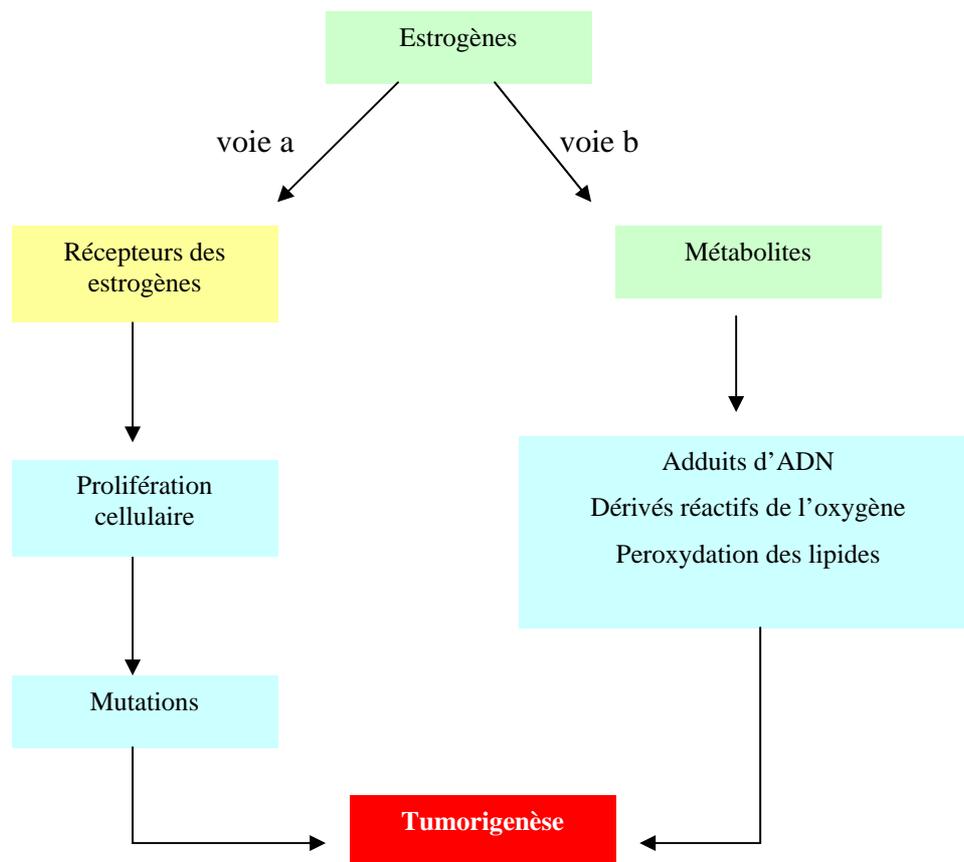


Schéma 1. Schéma du rôle des estrogènes dans la cancérogenèse mammaire.

2.3. Biosynthèse des estrogènes :

Les sites de biosynthèse des estrogènes chez la femme pré-ménopausée et la femme post-ménopausée sont différents. Avant la ménopause, l'ovaire est la source principale d'estrogènes ; en revanche, chez la femme ménopausée, la production par l'ovaire cesse et la synthèse des estrogènes a lieu essentiellement dans les tissus périphériques : tissu adipeux, placenta, peau, muscles, foie. Ces tissus présentent une activité aromatasique importante, l'aromatase étant une enzyme qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse des estrogènes : la conversion des androgènes en estrogènes.

3. L'aromatase :

3.1. Nature de l'aromatase :

L'aromatase est un complexe enzymatique multicomposant constitué d'un cytochrome P450 et d'un cytochrome P450 NADPH réductase. Le cytochrome P450 est une entité spécifique responsable du mécanisme de l'aromatation, dénommée P450 aromatase (P450_{arom}) ou CYP19 ou encore P450XIX. Le cytochrome P450 NADPH réductase est une flavoprotéine ubiquitaire localisée dans le réticulum endoplasmique, qui permet de donner les électrons nécessaires à la réaction enzymatique (Auvray et coll., 2000).

L'instabilité de l'aromatase, qui est une protéine hémunique, rend sa caractérisation très difficile. Des modèles sont établis par comparaison avec ceux d'autres cytochromes P450 issus de différentes bactéries et déterminés par cristallographie comme par exemple le cytochrome P450 cam isolé à partir de *Pseudomonas putida* (Laughton et coll., 1993 ; Graham-Lorence et coll., 1995). Graham-Lorence propose un modèle tridimensionnel de l'aromatase issu d'une étude comparative entre trois types de cytochrome P450 : P450cam, P450terp, P450BM-3.

Un nouveau modèle, publié récemment, est basé sur la structure, déterminée par rayons X, du premier modèle de cytochrome P450 d'origine mammifère, celui du lapin (P450 2C5). Cette enzyme catalyse l'hydroxylation du groupement méthyle en 21 de la progestérone, tout comme l'aromatase humaine, dont elle pourrait être le modèle le plus proche (Chen et coll., 2003).

Selon ce modèle, le site actif contient 20 résidus, 12 sont hydrophobes et 8 hydrophiles. L'androgène-substrat se lie aux résidus du site actif par plusieurs interactions :

- entre le noyau A de l'androstènedione et l'ensemble Asp-309, Ser-478 et His-480 (Kao et coll., 2001) ;
- le groupement méthyle en 19, qui subit l'oxydation, se retrouve centré au-dessous du fer de l'hème, en rapprochant ainsi le carbone C-2 du stéroïde de l'Asp-309, qui est supposé arracher un proton lors de l'aromatisation ;
- enfin, la Lys-119 et l'Arg-435 de l'enzyme participeraient par l'intermédiaire de liaisons hydrogène avec la cétone du noyau D.

3.2. Mécanisme d'action de l'aromatase :

L'étude du mécanisme biochimique de transformation des androgènes en estrogènes par l'aromatase a fait l'objet de nombreux travaux. Il a été démontré que trois molécules d'oxygène et six équivalents de NADPH sont consommés durant la formation d'estrogènes. Cette transformation a été résumée en trois étapes principales (schéma 2). Ces étapes successives aboutissent à la perte du groupement méthyle angulaire du C19 et à l'aromatisation du cycle A du stéroïde (Thompson et Siiteri, 1974).

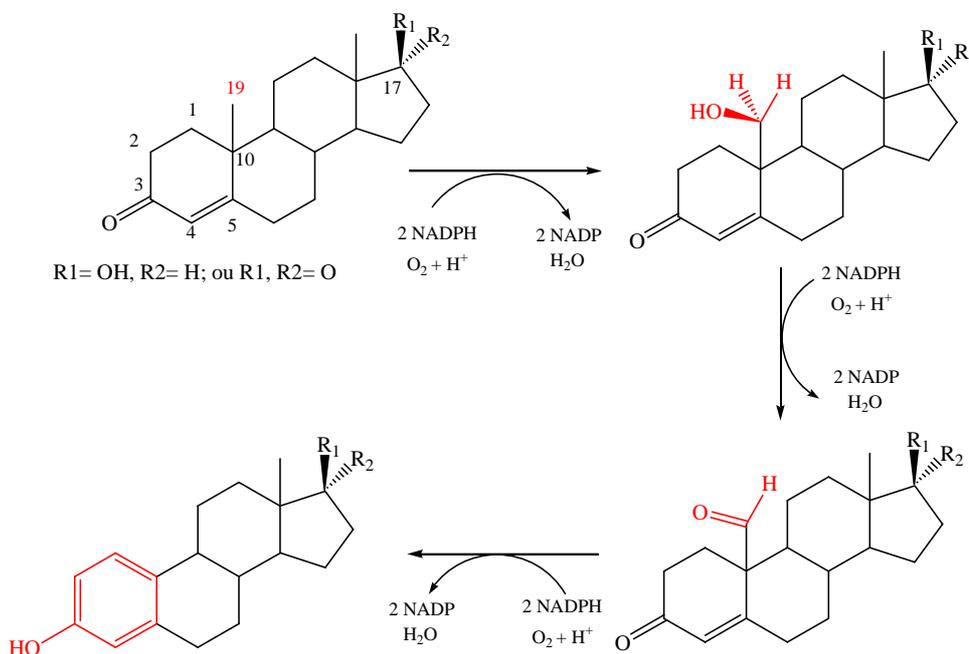


Schéma 2. Conversion des androgènes en estrogènes par l'aromatase (Debaert et coll., 1995).

Les deux premières étapes oxydatives sont des hydroxylations typiques des cytochromes P450. La première consiste en une oxydation de l'androgène en dérivé

hydroxylé en C19. La deuxième étape impliquerait, en position 19, la perte d'un hydrogène à partir de l'intermédiaire hydroxylé avec rétention de l'atome d'oxygène (Debaert et coll., 1995).

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette deuxième étape :

- l'une se base sur la formation d'un intermédiaire 19-*gem*-diol, lié notamment au site actif par le reste carboxylate Glu-302. Ce diol subit alors une déshydratation conduisant à l'intermédiaire 19-oxo du stéroïde et à la forme acide carboxylique du résidu Glu-302 (schéma 3, voie a) ;
- l'autre implique une élimination directe d'un atome d'hydrogène qui conduit au même intermédiaire 19-oxo avec maintien des liaisons hydrogène entre l'intermédiaire formé et le site actif (schéma 3, voie b).

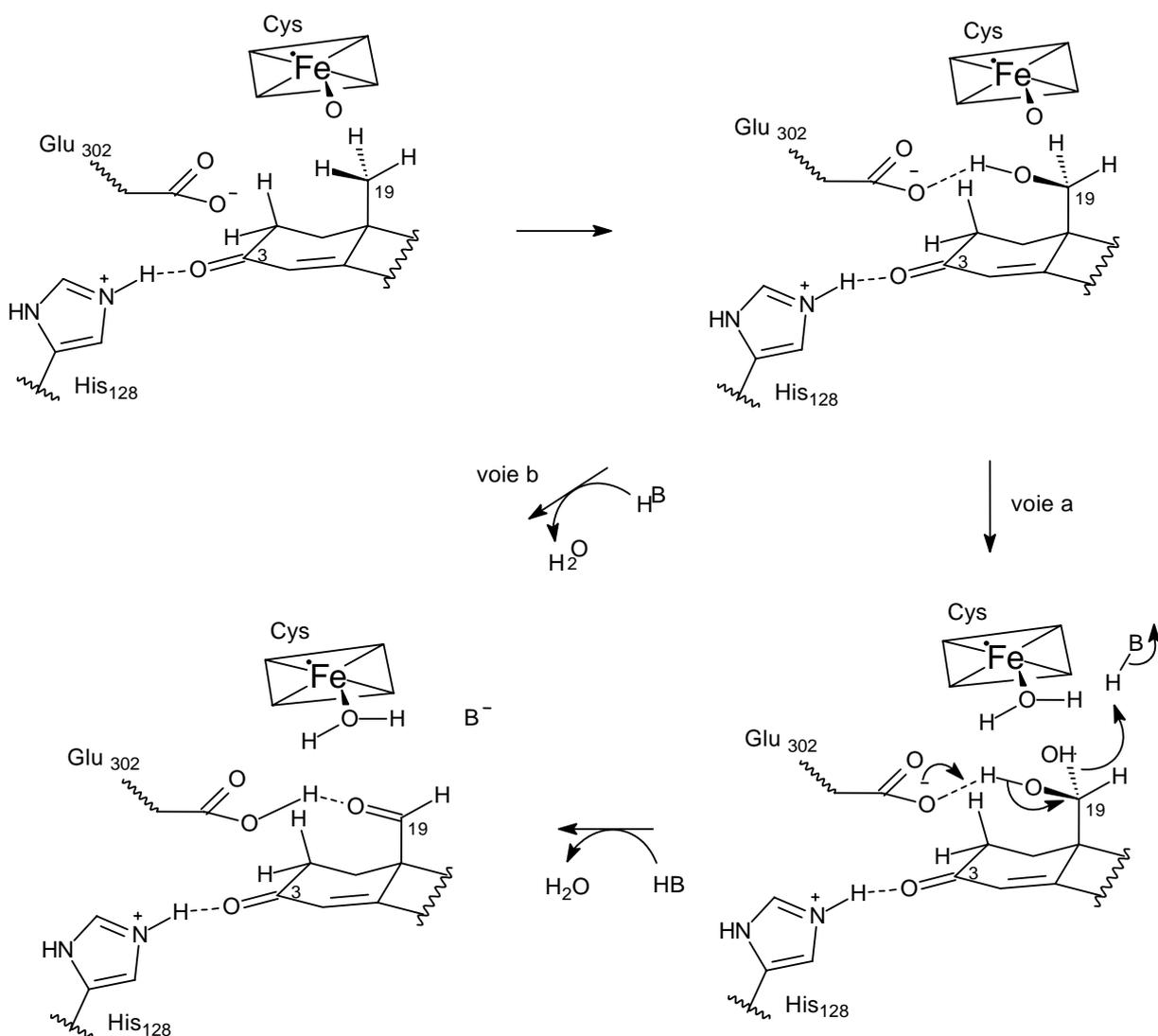


Schéma 3. Etapes 1 et 2 de l'oxydation du méthyle -19 : transformation en aldéhyde (selon Debaert, 1995).

Le mécanisme de la troisième oxydation n'est pas encore bien défini, certains auteurs suggèrent un mécanisme impliquant une attaque par des radicaux nucléophiles. Trois types de mécanismes sont proposés (Ahmed et Davis, 1995) :

- une attaque nucléophile sur l'aldéhyde en 19 par un radical ferroxyl (Fe-O) ;
- une attaque par un radical peroxyde ferrique (Fe-O-O) ;
- une combinaison des deux mécanismes.

Pour la formation finale de l'estrogène, Akhtar propose deux mécanismes de clivage de la liaison C10-C19, conduisant tous deux à la libération d'acide formique et à la perte des deux hydrogènes 1 et 2β (Akhtar et coll., 1993 ; Akhtar et coll., 1997).

4-Traitement du cancer du sein :

4.1. Traitement loco-régional :

4.1.1. La chirurgie :

La chirurgie est la technique la plus ancienne dans le traitement du cancer du sein, la mastectomie étant l'opération la plus fréquemment réalisée. Pour les tumeurs de petite taille, la mastectomie est remplacée par la tumorectomie associée à un curage axillaire et à de la radiothérapie.

4.1.2. La radiothérapie :

La radiothérapie représente le traitement post-opératoire quasi systématique du cancer du sein. Elle est le complément de l'exérèse dans la mesure où elle détruit les cellules malignes qui auraient échappé à l'acte chirurgical. Il est prouvé que la radiothérapie réduit de façon significative le taux de récurrences locales (Gourinel et coll., 1996).

4.2. Traitement adjuvant :

4.2.1. La chimiothérapie :

Les médicaments utilisés en chimiothérapie ont pour but de détruire les cellules malignes et d'éviter ainsi les métastases ; la cible de ces agents est l'ADN ou les protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Ils peuvent être administrés seuls

(monochimiothérapie) ou en combinaison (polychimiothérapie). Ils peuvent être classés en plusieurs familles selon leur mode d'action :

- les antimitotiques : certains inhibent la polymérisation de la tubuline en microtubules comme la vinorelbine (Navelbine[®]) alors que d'autres inhibent la dépolymérisation des microtubules tels le paclitaxel (Taxol[®]) et le docetaxel (Taxotère[®]) ;

- les agents alkylants : ce sont des molécules de synthèse qui se lient de manière covalente à l'ADN, ce qui provoque une inhibition de la progression de l'ADN polymérase. Dans le cas du cancer du sein, le cyclophosphamide (Endoxan[®]) est la molécule utilisée ;

- les anti-métabolites : ils perturbent la synthèse de l'ADN en bloquant les enzymes nécessaires à la synthèse des nucléotides ; les plus utilisés sont le 5-fluorouracile (Fluorouracile[®]) et le méthotrexate (Méthotrexate[®]).

4.2.2. L'hormonothérapie :

4.2.2.1. Généralités :

L'hormonothérapie du cancer du sein est née il y a presque un siècle. Elle constitue le premier traitement systématique du cancer du sein, après l'ovariectomie, permettant une régression de la tumeur mammaire. Elle a pour but d'arrêter la prolifération cellulaire, elle revêt une grande importance du fait du caractère hormono-dépendant de nombreux cancers du sein. Il existe trois types d'hormonothérapie :

☞ *L'hormonothérapie inhibitrice* avec les anti-aromatases. Elle consiste en l'inhibition de l'aromatase, enzyme responsable de la conversion des androgènes en estrogènes (schéma 4, voie a). L'inhibition de la biosynthèse des estrogènes prévient non seulement une prolifération cellulaire liée à la fixation des estrogènes sur leurs récepteurs mais également les effets génotoxiques des métabolites de ces estrogènes ;

☞ *L'hormonothérapie compétitive* avec les anti-estrogènes. Ils bloquent l'action des estrogènes en se fixant aux récepteurs estrogéniques des cellules tumorales (schéma 4, voie b)

☞ *L'hormonothérapie additive* avec la prise de progestatifs de synthèse (la médroxyprogestérone, l'acétate de mégestrol). A forte dose, ils se comportent comme les anti-estrogènes. Cependant, certains progestatifs inhibent également des enzymes impliquées dans la formation de l'estradiol (sulfatases et 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénases) (Pasqualini et

coll., 1998). Peu d'informations sur les effets de ces progestatifs vis-à-vis du cancer du sein sont pour l'instant disponibles, aussi leur utilisation reste très limitée.

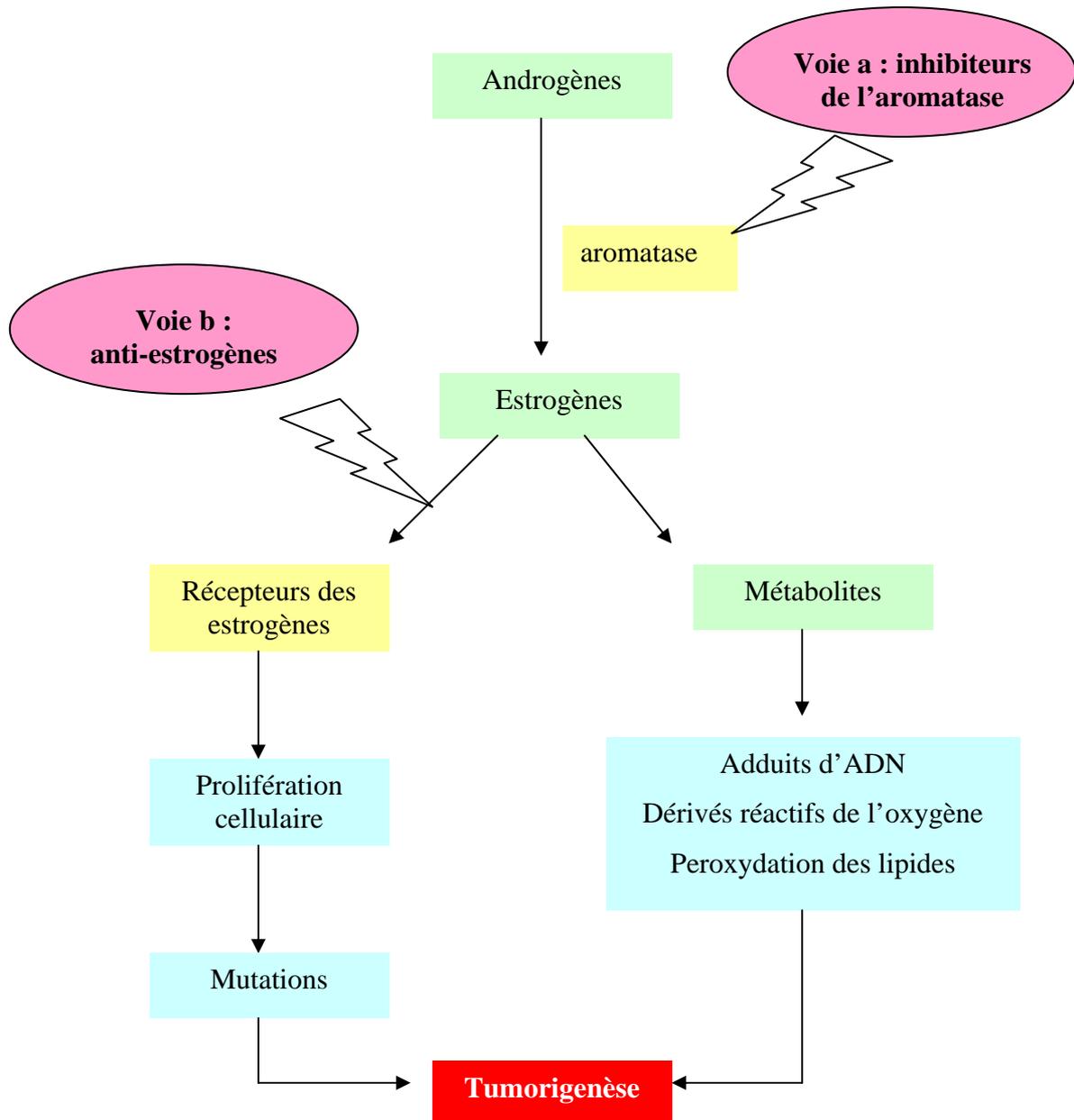
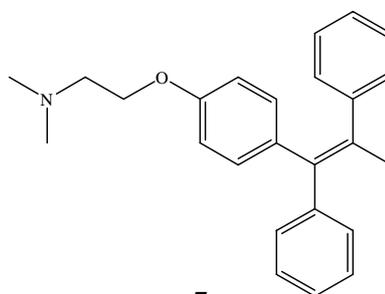


Schéma 4. Stratégies du traitement hormonal du cancer du sein. Voie a : inhibition de la biosynthèse des œstrogènes par les anti-aromatase. Voie b : blocage de l'action des œstrogènes au niveau de leurs récepteurs.

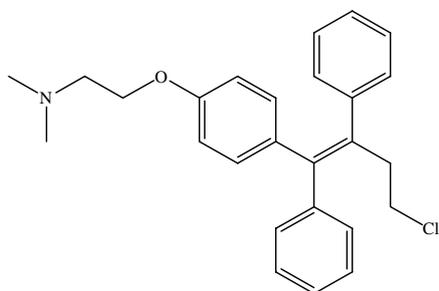
Le niveau d'action des inhibiteurs de l'aromatase, permet d'expliquer l'efficacité supérieure de ces molécules par rapport aux anti-œstrogènes, supériorité démontrée par plusieurs études récentes (Santen, 2003 ; Miller, 2004).

4.2.2.2. Les anti-estrogènes :

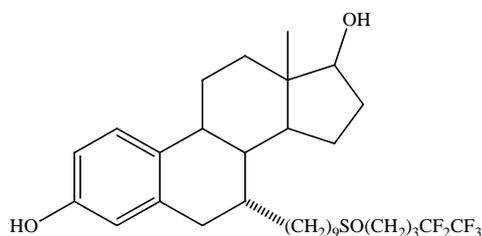
La molécule la plus largement utilisée à l'heure actuelle est le tamoxifène **5**, première molécule à agir principalement par inhibition de la liaison de l'estradiol avec ses récepteurs au niveau du sein. Le torémifène **6** a été récemment commercialisé en France (septembre 2000) pour le traitement de première intention du cancer du sein hormonosensible, situation dans laquelle il obtient des résultats comparables au tamoxifène. Enfin, L'ICI 182,780 (Faslodex[®]) **7** est présenté comme le chef de file d'une nouvelle classe thérapeutique, son affinité pour les récepteurs aux estrogènes est 100 fois supérieure à celle du tamoxifène dans les études précliniques (Lucchi-Angellier, 2001).



5



6



7

4.2.2.3. Les inhibiteurs de l'aromatase :

4.2.2.3.1. Classification :

Depuis des dizaines d'années, de nombreux inhibiteurs de l'aromatase sont synthétisés et étudiés pour améliorer le traitement des patientes atteintes de cancer du sein et d'autres pathologies estrogéno-dépendantes. L'ensemble de ces inhibiteurs de l'aromatase peut être divisé en deux grandes catégories :

- les inhibiteurs stéroïdiens (**type I**) dont la structure est construite de manière générale sur la base d'un squelette stéroïdique ;
- les inhibiteurs non stéroïdiens (**type II**) regroupant des inhibiteurs de structures très variées.

Ces inhibiteurs représentent trois générations d'évolution (tableau 1), chacune ayant une spécificité et une activité supérieures à celles de la précédente.

| | Génération | | |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 1 ^{ère} | 2 ^{ème} | 3 ^{ème} |
| Type I (stéroïdiens) | testolactone | formestane | exemestane |
| Type II (non-stéroïdiens) | aminoglutéthimide | fadrozole | létrozole |

Tableau 1. Classification des inhibiteurs de l'aromatase (Miller, 2004).

4.2.2.3.2. Les inhibiteurs stéroïdiens (type I) :

Les inhibiteurs stéroïdiens sont en général des analogues structuraux de l'androstènedione **3** avec des substitutions en position 3, 4, 6, 7, 10 ou 14, ou des modifications du nombre de doubles liaisons sur les cycles A et B. Ces inhibiteurs de type I présentent l'intérêt d'interagir avec le site actif de l'aromatase par l'intermédiaire d'une liaison covalente, ce qui explique que ces inhibiteurs soient généralement des inactivateurs (Auvray et coll., 2000). Leur mécanisme d'action repose sur une inhibition compétitive irréversible, ils sont d'ailleurs généralement appelés « inhibiteurs suicides ». La 4-hydroxy-androst-4-ène-3,17-dione (formestane, Lentaron[®]) **8**, de deuxième génération, est l'inhibiteur stéroïdien le plus couramment utilisé en deuxième ligne dans les cancers du sein hormono-dépendants (Lonning, 1996 ; Seralini et Moslemi, 2001). Après des essais cliniques dans plusieurs pays, l'exemestane **9**, inhibiteur de troisième génération s'est révélé plus efficace que le formestane, il présente également l'avantage d'être administrable par voie orale (Seralini et Moslemi, 2001). Actuellement, de nombreux autres inhibiteurs stéroïdiens font l'objet d'essais cliniques.

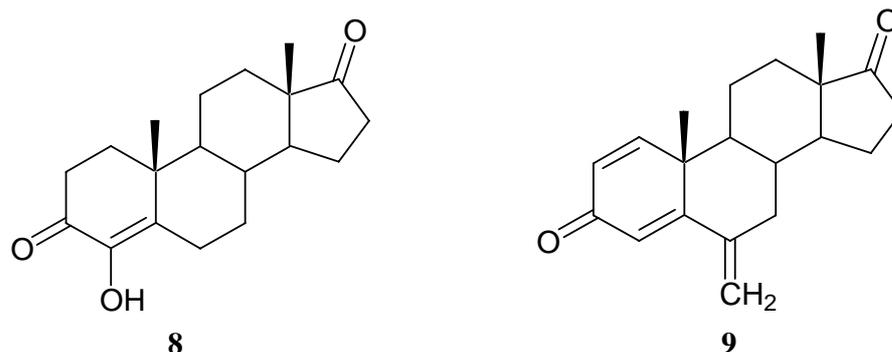
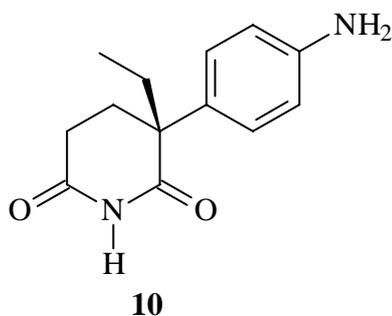


Schéma 5. Inhibiteurs stéroïdiens analogues de l'androstènedione

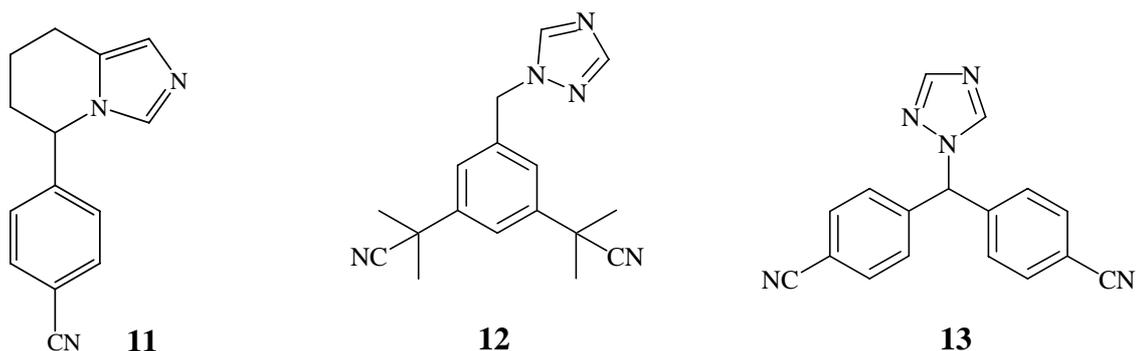
4.2.2.3.3. Les inhibiteurs non-stéroïdiens (type II) :

Il est démontré que certains inhibiteurs stéroïdiens peuvent inhiber d'autres enzymes de la stéroïdogénèse et présenter une activité androgénique. Dans le but d'augmenter la spécificité vis-à-vis de l'aromatase, de nombreux groupes de recherche ont développé la synthèse d'inhibiteurs non stéroïdiens. La structure de ces composés présente très souvent des noyaux aromatiques et un hétérocycle (un ou plusieurs hétéroatomes : S, N, O) capable de pénétrer dans le site actif de l'enzyme et d'établir une liaison avec le fer de l'hème.

Ainsi, l'aminoglutéthimide (AG) **10** (Orimétène[®]), premier inhibiteur de l'aromatase utilisé cliniquement dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant (Coombes et coll., 2003) possède un squelette non stéroïdien. Cette molécule a permis d'obtenir une régression du cancer chez les patientes. Elle est à l'origine du développement de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase (seconde et troisième génération) plus efficaces, plus spécifiques vis-à-vis de l'enzyme et entraînant donc moins d'effets secondaires que l'aminoglutéthimide.

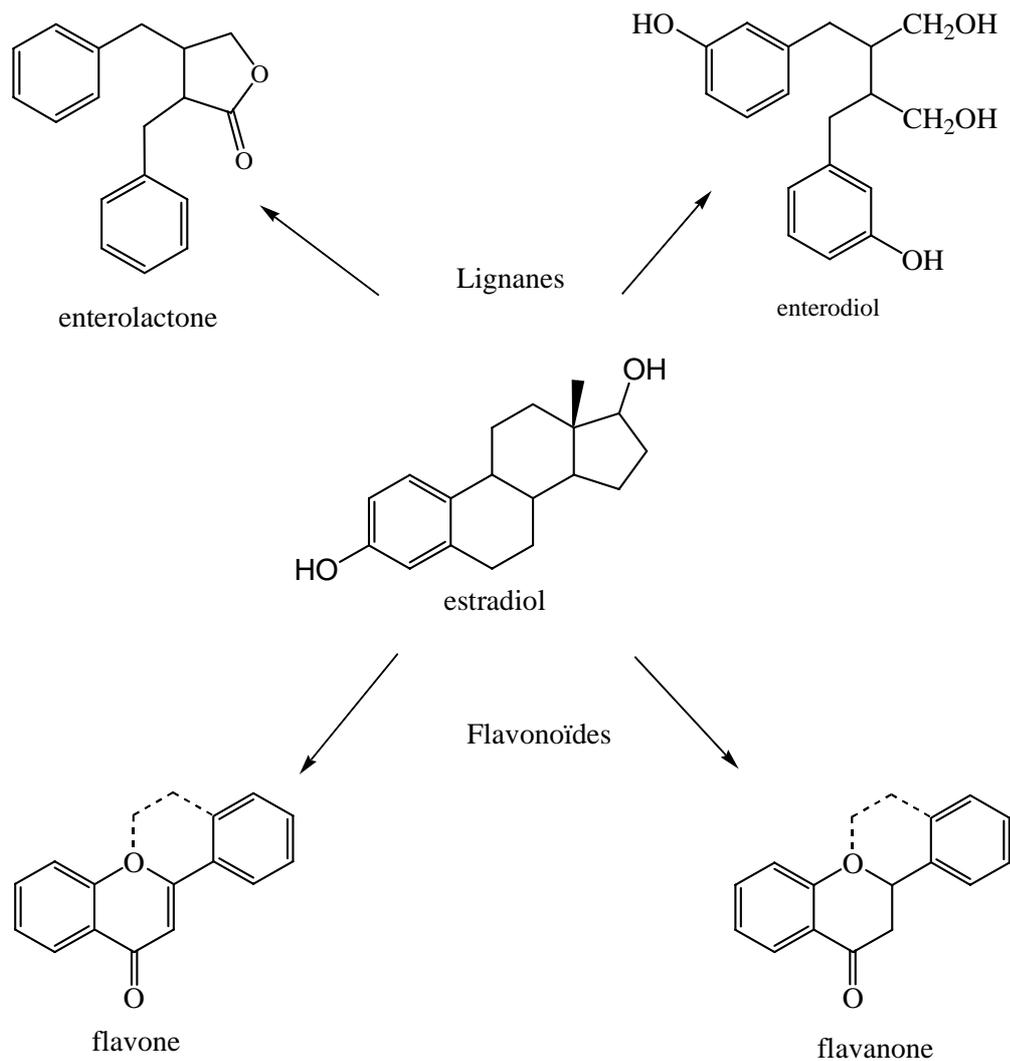


Parmi ces inhibiteurs non stéroïdiens, les plus connus sont le fadrozole **11**, dérivé imidazolé de 2^{ème} génération, l'anastrozole **12** (Arimidex[®]) et le létrozole **13** (Femara[®]), composés triazolés de 3^{ème} génération. Ces deux dernières molécules ont démontré leur intérêt dans la thérapie du cancer du sein et notamment en cas de résistance au tamoxifène. Elles ont également obtenu, dans plusieurs pays, une autorisation de mise sur le marché dans le cadre du traitement en première intention (Goss et Strasser, 2001).



A côté de ces inhibiteurs synthétiques non stéroïdiens de l'aromatase, il existe des inhibiteurs naturels très répandus dans le règne végétal (Blanco et coll., 1997). Les plus couramment étudiés sont les phytoestrogènes qui sont présents dans de nombreux végétaux dont certains sont de consommation courante comme le soja, les céréales, les légumes, les fruits et le thé.

Parmi ces phytoestrogènes, on trouve les flavonoïdes (flavanones, flavones), et les lignanes (schéma 6). La structure chimique de ces molécules évoque celle des estrogènes endogènes dans la mesure où elles possèdent un noyau phénolique et pour certaines d'entre elles, au moins une ou plusieurs autres fonctions hydroxyle qui miment celles présentes sur l'estradiol.



-----: extrapolation de la structure chimique

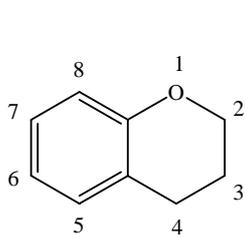
Schéma 6. Comparaison de la structure chimique de différents phytoestrogènes avec l'estradiol.

Les flavonoïdes sont les inhibiteurs naturels de l'aromatase les plus couramment étudiés *in vitro* (Kellis et Vickery, 1984 ; Ibrahim et Abul-Hajj, 1990 ; Pelissero et coll., 1996 ; Jeong et coll., 1999). Ces composés, qui constituent un des axes de recherche de notre laboratoire, font l'objet du prochain chapitre ; leur définition, origine biosynthétique et propriétés vis-à-vis de l'aromatase sont plus particulièrement détaillées.

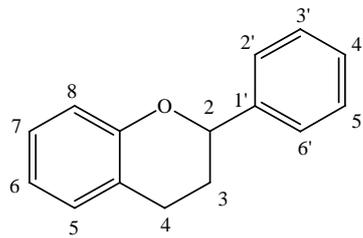
II. Les flavonoïdes :

1. Introduction :

Les flavonoïdes sont des composés de nature phénolique principalement végétaux. Ce sont des pigments très largement répandus, plus de 4000 composés ont été identifiés aujourd'hui (Bruneton, 1999). Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, la conséquence est qu'ils présentent le même élément structural de base, l'enchaînement 2-phénylchromane (excepté pour les isoflavonoïdes dont la structure de base est la 3-phénylchromane).

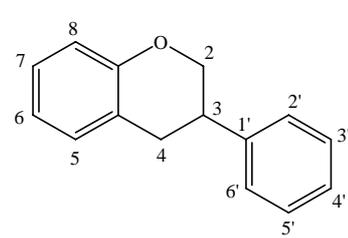


benzopyrane = chromane



2-phénylchromane

Flavonoïdes



3-phénylchromane

Isoflavonoïdes

Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (exemple : les anthocyanes dans les feuilles de vigne), au même titre que la chlorophylle, les caroténoïdes et les bétalaïnes. Ils ont également un rôle écologique important :

- dans la protection des plantes qui les renferment : vis-à-vis des rayonnements lumineux nocifs (UV), des insectes prédateurs, des microorganismes (bactéries et champignons) ;
- dans la pérennisation des espèces : attractivité vis-à-vis des insectes pollinisateurs (arôme, couleurs), compétition entre espèces végétales.

Les flavonoïdes sont surtout répandus chez les plantes supérieures où ils sont présents dans toutes les parties de plantes. Ce sont généralement les organes jeunes (feuilles, bourgeons floraux) qui présentent les taux maximum de flavonoïdes. Les flavonoïdes existent à l'état libre ou sous formes d'hétérosides et se rencontrent le plus souvent dans les tissus périphériques et superficiels (épiderme, entre épiderme et mésophylle, cuticule épidermique, etc...)

Depuis quelques années, l'étude de ces composés a pris un nouvel essor du fait de la mise en évidence de nouvelles propriétés pharmacologiques.

2. Structure chimique et classification :

Tous les flavonoïdes présentent l'élément structural de base, 2-phénylchromane (3-phénylchromane pour les isoflavonoïdes) (Bruneton, 1999).

Ces composés à 15 atomes de carbone sont constitués de deux noyaux aromatiques (A et B) reliés par une chaîne à trois atomes de carbone. Ces composés peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central :

- 2-phénylbenzopyriliums : anthocyanes ;
- 2-phénylchromones : flavones, flavonols (3-hydroxyflavones), flavanones (2,3-dihydroflavones) ;
- 2-phénylchromanes : flavanes, 3-hydroxyflavanes, 3,4-dihydroxyflavanes ;
- chalcones à cycle pyranique ouvert et caractérisé par un chaînon tricarboné, cétonique, α,β -insaturé ;
- 2-benzylidèncoumaranones : aurones.

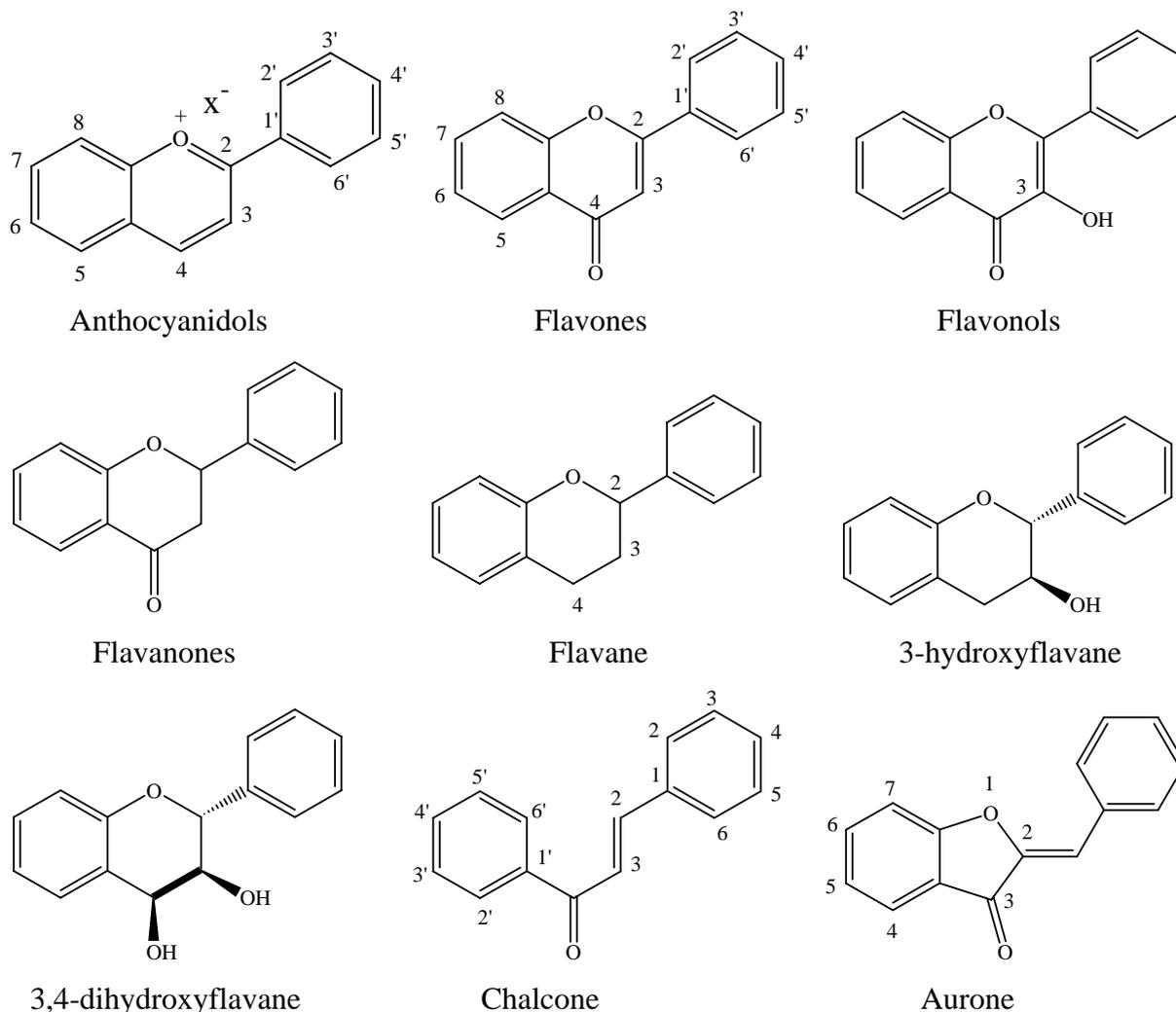


Schéma 7. Squelettes des différentes classes de flavonoïdes.

Le tableau ci-dessous montre les structures des flavonoïdes (flavanones, flavones...) les plus répandus.

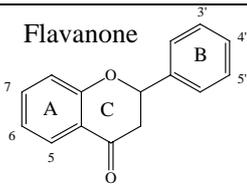
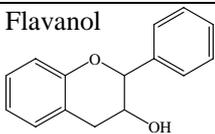
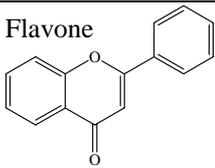
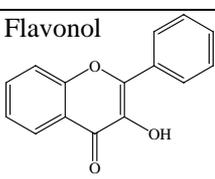
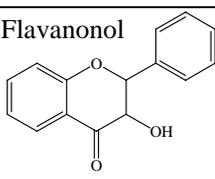
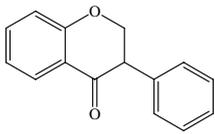
| Structure | Flavonoïdes | Substitutions | | | | | |
|---|---|---------------|---|----|----|----|----|
| | | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| <p>Flavanone</p>  | <p>Eriodictyol</p> <p>Hespérétine</p> <p>Naringénine</p> | OH | H | OH | OH | OH | H |
| <p>Flavanol</p>  | <p>Catéchine</p> <p>Gallocatéchine</p> | OH | H | OH | OH | OH | H |
| <p>Flavone</p>  | <p>Apigénine</p> <p>Chrysin</p> <p>Lutéoline</p> | OH | H | OH | H | OH | H |
| <p>Flavanol</p>  | <p>Kaempférol</p> <p>Myricétine</p> <p>Quercétine</p> | OH | H | OH | H | OH | H |
| <p>Flavanonol</p>  | <p>Taxifoline</p> | OH | H | OH | OH | OH | H |
| <p>Isoflavone</p>  | <p>Daidzéine</p> <p>Génistéine</p> <p>Glycitéine</p> <p>Formononétine</p> | H | H | OH | H | OH | H |

Tableau 2. Structures des flavonoïdes les plus répandus.

3. Origine biosynthétique :

L'origine des flavonoïdes est clairement représentée par leur structure. Les flavonoïdes résultent de la condensation de 3 unités C₂ (sous forme de 3 x malonyl-CoA), à l'origine du noyau A du flavonoïde, et d'un acide cinnamique activé, lui même à l'origine du noyau B et de la chaîne propane. La condensation, catalysée par la chalcone-synthase, enzyme clé de la formation des flavonoïdes, conduit à la chalcone. La cyclisation de la chalcone, catalysée par la chalcone isomérase entre le noyau A et la chaîne propane est à l'origine de la formation du cycle pyranique C (flavanone, flavones, etc...) ou furanique C (aurones). Ces structures sont les bases à partir desquelles est construit l'ensemble des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

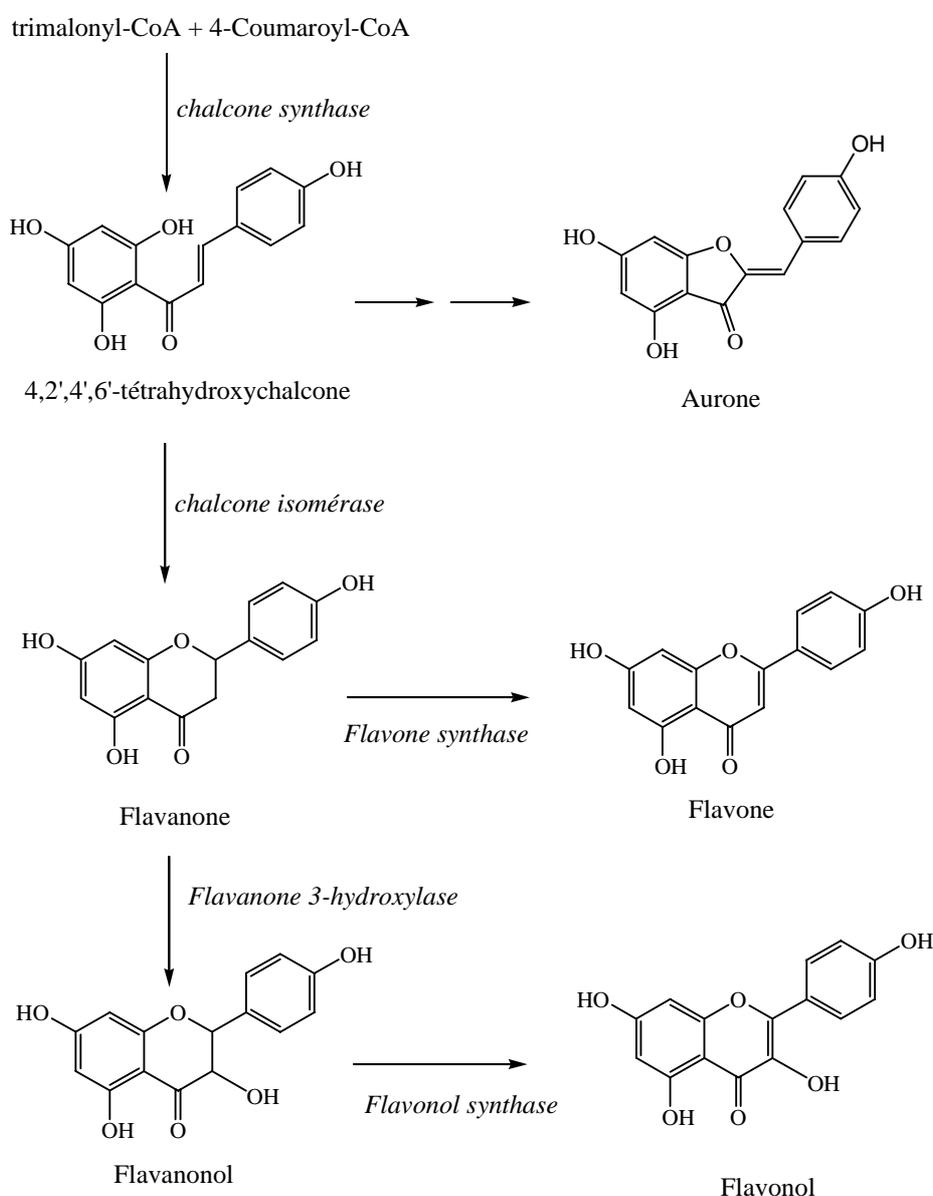


Schéma 8. Les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes.

4. Propriétés biologiques des flavonoïdes :

Les travaux concernant l'activité biologique des flavonoïdes sont nombreux et explorent des domaines d'activité très vastes. L'un des premiers intérêts de ces composés, est qu'ils sont largement présents dans le règne végétal et sont un élément incontournable de notre alimentation journalière (Peterson et Dwyer, 1998). La consommation quotidienne en flavonoïdes se situe dans une échelle qui varie entre 20 mg (Hertog et coll., 1993a) et 45 mg (Rimm et coll., 1996) et l'on peut supposer que leurs effets biochimiques et physiologiques ne sont pas anodins.

Les données récentes concernant les propriétés biologiques des flavonoïdes ont été relevées dans des revues générales dont celles de Di Carlo et coll. (1999), de Harborne et Williams (2000) et de Middleton et coll. (2000) ou dans des ouvrages généraux de pharmacognosie (Bruneton, 1999).

La principale activité attribuée à ces composés est leur effet sur les capillaires sanguins dont ils renforcent la résistance et diminuent la perméabilité, effet dénommé propriété « vitaminique P ». Cette appellation est actuellement abandonnée et les auteurs préfèrent pour désigner l'activité les termes de « veinotrope », « vasculo-protecteur et veinotonique » (Hollman et coll., 1996). Cette activité est cependant largement contestée ; ainsi, la Food and Drug Administration ne leur reconnaît aucun effet. Néanmoins, les drogues à base de flavonoïdes font toujours l'objet - en France et en Europe - d'un fréquent conseil pharmaceutique et d'une importante auto-médication dans le domaine des pathologies circulatoires mineures.

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme des hépatoprotecteurs. Pendant plusieurs siècles, des extraits de *Silybum marianum*, riches en flavonoïdes, ont été utilisés en médecine populaire pour le traitement des désordres hépatiques. Actuellement, la silybine qui est un flavolignane et d'autres flavonoïdes tels que l'hispiduline - extraite de *Baccaris trimera* - sont largement utilisés dans le traitement des maladies hépatiques.

De nombreuses études épidémiologiques indiquent qu'une alimentation riche en flavonoïdes réduit la survenue de maladies cardiovasculaires. Cet effet protecteur vis-à-vis des maladies coronariennes serait dû, en partie, à l'activité anti-oxydante des flavonoïdes. En

effet, ces composés semblent par exemple prévenir l'oxydation des lipoprotéines de faible densité, phénomène qui joue un rôle considérable dans la formation des plaques d'athérome (Hertog et coll., 1993b ; Heim et coll., 2002).

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs propriétés anti-allergiques. En fait, ces composés inhibent la phosphodiesterase de l'AMPc et l'ATPase calcium dépendante, enzymes qui augmentent la libération d'histamine par les mastocytes et les polynucléaires basophiles. Il a ainsi été démontré que la quercétine et d'autres composés étaient plus actifs que le cromoglycate de sodium (Lomudal[®]) au niveau de la dégranulation des mastocytes. Les flavonoïdes interviennent également dans le métabolisme de l'acide arachidonique, par inhibition de la 5-lipoxygénase et donc de la production des leucotriènes, médiateurs, entre autres, des manifestations allergiques.

Les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires démontrées *in vitro* et *in vivo* ; de nombreux composés inhibent certaines cyclooxygénases et lipoxygénases à des concentrations relativement élevées, ainsi que la NO-synthase. Cette activité anti-inflammatoire ne s'accompagne pas de l'effet ulcérogène habituellement observé avec les anti-inflammatoires conventionnels ; au contraire, les flavonoïdes sont décrits comme présentant des effets anti-ulcéreux. Cette activité s'explique par une action antisécrétoire (inhibition de la pompe à protons), une production de prostaglandines par la muqueuse gastrique ainsi qu'une inhibition de la croissance de *Helicobacter pylori*. L'inflammation chronique joue également un rôle important dans l'étiologie d'un certain nombre de cancers ; par exemple, les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 sont considérés comme des chimio-protecteurs du cancer du colon.

L'activité inhibitrice du développement tumoral de certains flavonoïdes a été démontrée sur plusieurs lignées cellulaires humaines, cette inhibition peut être le résultat de l'activité de ces composés sur la tyrosine kinase (impliquée dans la prolifération cellulaire), ou encore le résultat de leur effet anti-estrogénique (tumeurs estrogéno-dépendantes) (Le Marchand, 2002).

Enfin, les flavonoïdes présentent une activité anti-aromatase qui est détaillée ci-après.

5. Effet anti-aromatase des flavonoïdes :

5.1. Introduction:

Des études épidémiologiques menées en Chine et au Japon ont montré que la présence des flavonoïdes dans le régime alimentaire de ces populations pouvait réduire l'incidence de plusieurs types de cancers, et plus particulièrement les cancers hormono-dépendants du sein et de la prostate (Kolonel, 1988 ; Adlercreutz, 1991).

L'effet préventif des flavonoïdes vis-à-vis du cancer du sein s'explique en partie par l'activité anti-aromatase de certains composés, activité démontrée par plusieurs études.

Ainsi, les flavones naturelles comme la chrysin, l'apigénine et la lutéoline présentes dans les légumes, les céréales et les herbes telles que le persil, le thym ou le romarin possèdent une activité anti-aromatase voisine de celle de l'aminogluthéthimide (Jeong et coll., 1999). Des flavones synthétiques ont également fait l'objet d'une évaluation biologique et la 7,8-benzoflavone s'est révélée être un puissant inhibiteur de l'aromatase avec une activité environ 10 fois supérieure à celle de la chrysin et de l'apigénine (Kellis et Vickery, 1984).

Les autres classes de flavonoïdes ont également été étudiées ; des différences d'activité sont constatées, certains composés étant même dépourvus d'effet inhibiteur.

Pour les flavanones, le motif de substitution joue un rôle important. Il semble que leur activité soit, pour la plupart, plus faible que celle des flavones correspondantes (Le Bail et coll., 1998a ; Kao et coll., 1998 ; Le Bail et coll., 2001 ; Sanderson et coll., 2004) ; toutefois, certaines études montrent que ces deux classes ont parfois une activité voisine (Kellis et Vickery, 1984). En général, les flavanones, qui possèdent un centre d'asymétrie en position 2, sont testées sous forme d'un mélange racémique ; or, une étude menée par Kao montre que seul l'énantiomère de configuration *S* semble présenter une activité inhibitrice, ce qui peut expliquer l'effet inhibiteur plus faible des flavanones par rapport aux flavones (Kao et coll., 1998).

En revanche, pour les isoflavonoïdes, l'ensemble des études tend à prouver qu'ils sont pratiquement dénués d'activité (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990 ; Le Bail et coll., 2000). Seule la biochanine A (5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone) présente un effet significatif vis-à-vis de l'aromatase (Kao et coll., 1998 ; Le Bail et coll., 2000).

Enfin, les travaux antérieurs menés au laboratoire se sont intéressés à l'activité des 2'-hydroxychalcones, isomères des flavanones. Pour ces molécules, seules les chalcones substituées par un hydroxyle en position 2', 4' et 6', présentent un effet inhibiteur significatif (Le Bail et coll., 2001).

5.2. Interaction Flavonoïde / Aromatase :

Diverses études ont tenté d'établir la nature de l'interaction flavonoïde / aromatase. Ces études sont basées sur l'activité biologique des structures flavonoïdiques vis-à-vis de l'aromatase et de certains de ses mutants et optimisées par des travaux de modélisation moléculaire. Plusieurs éléments sont ressortis de ces recherches.

Certains flavonoïdes se positionnent dans le site actif de l'enzyme avec une orientation telle que les noyaux A et C miment respectivement les noyaux D et C du substrat androgénique (Laughton et coll., 1993 ; Chen et coll., 1997 ; Hodek et coll., 2002). En outre, la fonction carbonyle joue un rôle très important dans l'inhibition enzymatique grâce à l'interaction avec le fer de l'hème de l'enzyme ; la réduction de ce carbonyle diminue d'ailleurs considérablement l'activité (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990 ; Pouget, 2001a ; Hodek et coll., 2002).

Enfin, l'activité inhibitrice est considérablement influencée par la nature et la position des substituants. L'effet du groupement hydroxyle est le plus étudié, ce substituant étant le plus répandu sur les flavonoïdes naturels (Hodek et coll., 2002).

5.3. Influence de la substitution du noyau chromane sur l'activité anti-aromatase :

5.3.1. Etude des flavones :

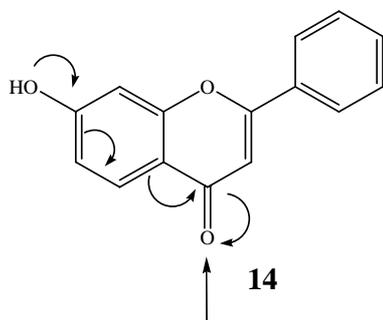
Différents travaux menés sur les flavones montrent que l'introduction du groupement hydroxyle en position 7 augmente l'activité anti-aromatase (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990 ; Le Bail et coll., 1998a). Le carbonyle est activé par la conjugaison $n-\pi-\pi-\pi$ due à l'hydroxyle en *para*, renforçant la liaison carbonyle-site actif et améliorant de ce fait l'activité inhibitrice (schéma 9) ; la 7-hydroxyflavone **14** est ainsi 20 fois plus active que la flavone non substituée (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990).

Ces études montrent aussi que la 5-hydroxyflavone **15** est un faible inhibiteur par rapport à la flavone (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990) et que la 5,7-dihydroxyflavone (chrysin)

présente une activité anti-aromatase inférieure à la 7-hydroxyflavone ; ainsi la présence d'un hydroxyle supplémentaire en position 5 diminue l'effet inhibiteur (Le Bail et coll., 1998a ; Kao et coll., 1998).

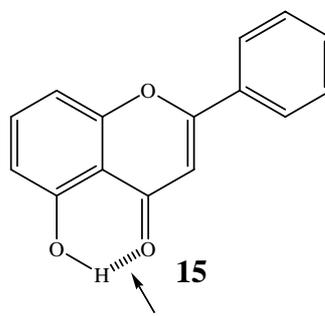
Il apparaît également que la présence d'un hydroxyle en 3 est défavorable à l'activité anti-aromatase. La 3-hydroxyflavone (flavonol) est ainsi 14 fois moins active que la flavone (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990) et la galangine (3,5,7-triOHflavone) présente un effet inhibiteur très réduit par rapport à la chrysin (Kao et coll., 1998). La diminution d'activité pour les dérivés hydroxylés en position 3 ou 5 s'explique probablement par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le groupement hydroxyle et le carbonyle, défavorisant en conséquence l'interaction carbonyle-site actif (schéma 10).

Enfin, il est démontré que l'hydroxylation sur les positions 6 et 8 engendre une réduction de l'effet inhibiteur vraisemblablement due à l'absence de conjugaison (schéma 11). La 6-hydroxyflavone **16** et la baicaléine (5,6,7-triOHflavone) sont moins actives que la flavone et la chrysin respectivement ; la 7,8-dihydroxyflavone présente une activité inférieure à la 7-hydroxyflavone (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990 ; Kao et coll., 1998).



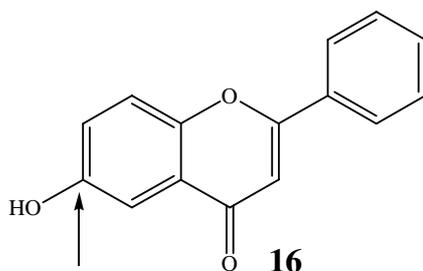
Activation du carbonyle

Schéma 9



liaison hydrogène intramoléculaire

Schéma 10



position *meta* par rapport au carbonyle
absence d'activation

Schéma 11

5.3.2. Etude des flavanones :

En ce qui concerne les flavanones, ces mêmes études montrent que la présence d'un hydroxyle en 7 sur le noyau A est essentielle pour obtenir une activité anti-aromatase optimale, la 7-hydroxyflavanone est 6 fois plus active que la flavanone non substituée (Le Bail et coll., 2001).

Il est également démontré que le groupement méthoxy en position 7 de la flavanone influence favorablement l'activité anti-aromatase ; la 7-méthoxyflavanone demeure cependant moins active que la 7-hydroxyflavanone (Le Bail et coll., 1998a ; Le Bail et coll., 2001).

La pinostrobin ou 5-hydroxy-7-méthoxyflavanone s'avère être un plus faible inhibiteur que la 7-méthoxyflavanone, confirmant la diminution d'activité liée au 5-OH supplémentaire déjà observée pour les flavones (Le Bail, 1998b).

5.4. Influence de la substitution du noyau B des flavonoïdes sur l'activité anti-aromatase :

Comme pour le noyau A, l'influence de la substitution du noyau B de certains flavonoïdes a été mise en évidence ; elle dépend d'une part, du squelette flavonoïdique (flavone, flavanone) et d'autre part, des substituants du noyau A.

5.4.1. Etude des flavones :

Pour les flavones, l'addition d'un groupement hydroxyle en 4' diminue l'effet inhibiteur, ainsi la 4',7-dihydroxyflavone est 4 fois moins active que la 7-hydroxyflavone (Ibrahim et Abul-Hajj, 1990) et l'apigénine est un plus faible inhibiteur que la chrysin (Kellis et Vickery, 1984 ; Le Bail et coll., 1998a). L'addition d'un groupement 3'-OH sur le noyau B déjà substitué par un hydroxyle en position 4' augmente l'activité anti-aromatase dans le cas des flavones, la lutéoline étant plus active que l'apigénine (Le Bail et coll., 2001).

5.4.2. Etude des flavanones :

Pour les flavanones, des molécules naturelles, présentes dans notre alimentation à travers notamment les agrumes, ont été testées. La naringénine (4',5,7-trihydroxyflavanone) est par exemple un inhibiteur de l'aromatase tout comme l'ériodictyol (3',4',5,7-

tétrahydroxyflavanone) qui s'avère être 15 fois plus actif que la naringénine (Le Bail et coll., 2001). La comparaison de leur activité permet de conclure que l'addition d'un hydroxyle en position 3' est favorable à l'effet inhibiteur, confirmant ainsi les résultats observés pour les flavones. L'évaluation de l'activité de l'hespérétine (3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone) montre, quant à elle, que la méthylation en 4' entraîne une réduction d'activité puisque l'hespérétine est moins puissante que l'ériodictyol (Le Bail et coll., 2001).

Les molécules naturelles sont le plus souvent des molécules hydroxylées en position 3' et/ou 4' ; les travaux antérieurs au laboratoire avaient donc pour but d'étudier non seulement l'influence de ces substituants mais aussi celle d'autres groupements (méthoxy, cyano, halogènes, diméthylamino) *via* la pharmacomodulation de deux flavanones : la 7-hydroxy et la 7-méthoxyflavanone, sélectionnées à partir des données de l'étude de Le Bail (Le Bail et coll., 1998a ; Le Bail et coll., 2001).

Il a ainsi été démontré que l'addition d'un hydroxyle en 4' sur le squelette de la 7-méthoxyflavanone accroît l'effet anti-aromatase alors qu'un tel groupement a peu d'influence sur le squelette de la 7-hydroxyflavanone. Dans la série des analogues de la 7-méthoxyflavanone, la 3',4'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone est la molécule la plus inhibitrice avec une activité deux fois supérieure à celle de l'aminoglutéthimide (Pouget et coll., 2002c). Ce résultat confirme ceux observés pour l'ériodictyol ou 3',4',5,7-tétrahydroxyflavanone (Le Bail et coll., 2001). Ensuite, la comparaison des activités de la 2',7-dihydroxyflavanone et de la 7-hydroxyflavanone permet d'établir que l'addition d'un hydroxyle en 2' n'influe pas sur l'effet inhibiteur. En confrontant l'activité de ces dérivés hydroxylés sur le noyau B avec celle de leurs analogues méthoxylés, on constate que la méthylation des groupements hydroxyle en 3' et 4' est défavorable à l'activité alors que la méthylation de l'hydroxyle en 2' augmente l'effet inhibiteur. Enfin, l'influence de substituants halogénés (Cl, Br, F) ou d'un groupement cyano sur la position 4' a été évaluée puisque de tels motifs de substitution sont retrouvés sur les molécules thérapeutiques comme le vorozole, l'anastrozole ou le létrozole. Il s'avère que ces substituants ont peu d'effet sur l'activité anti-aromatase du squelette flavonoïdique (Pouget et coll., 2002c).

En conclusion, l'activité de ces flavanones synthétisées reste modérée par rapport aux nombreuses molécules déjà utilisées ou candidates pour l'hormonothérapie du cancer du sein ; ces résultats s'avèrent néanmoins très encourageants et ont permis de sélectionner plusieurs molécules actives comme structure de base pour la modulation du noyau C, modulation dont les résultats sont décrits ci-après.

5.5. Influence de la substitution du noyau C des flavonoïdes sur l'activité anti-aromatase :

La stratégie adoptée pour la modulation du noyau C a été de greffer sur la structure polycyclique hydrophobe des flavonoïdes, un hétérocycle azoté, supposé être favorable à une meilleure interaction de l'inhibiteur avec le site actif de l'enzyme, ceci par chélation d'un atome sp^2 d'azote avec le fer de l'hème de l'aromatase.

Deux voies de modulation ont été explorées, l'introduction sur le squelette flavanone d'un groupement pyridinylméthylène en position 3 d'une part (schéma 12, voie 1) et d'un groupement imidazole en position 4 d'autre part (schéma 12, voie 2). Cette stratégie aboutit à la synthèse de deux familles de composés, les 3-(4-pyridinylméthylène)flavanones **17** et les 4-imidazolylflavanes **18**.

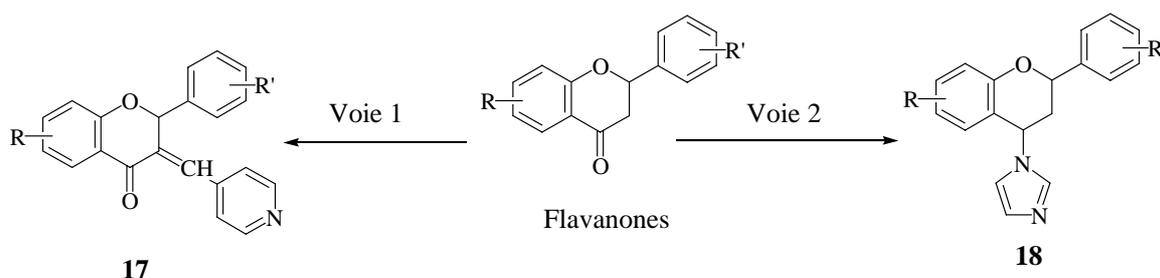
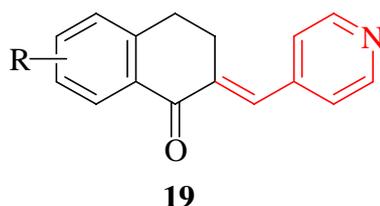


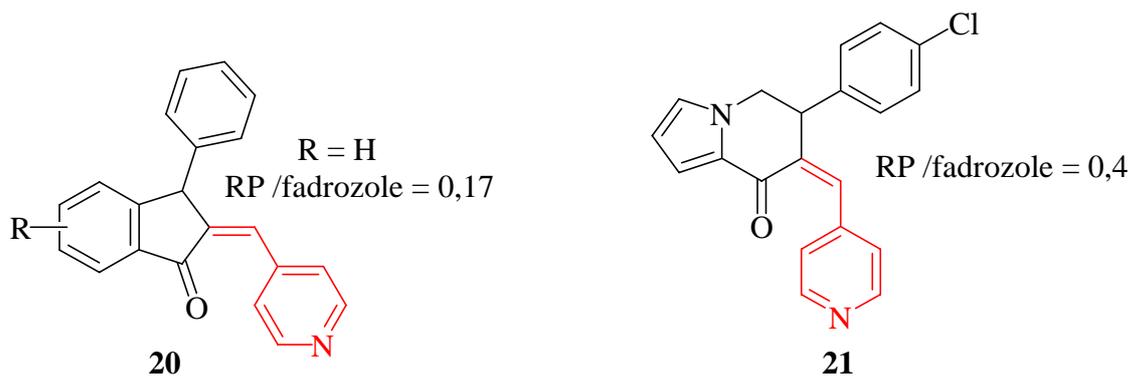
Schéma 12. Modulation du noyau C des flavanones.

La synthèse de 3-(4-pyridinylméthylène)flavanones repose sur le fait que plusieurs classes d'inhibiteurs de l'aromatase, comme les dérivés de tétralones **19** (Bayer et coll., 1991), les dérivés de l'indan-1-one **20** (Sonnet et coll., 1998), et les dérivés de l'indolizone **21** (Auvray et coll., 1999), possèdent en commun un groupement 4-pyridinylméthylène en α d'un carbonyle, motif qui, par l'intermédiaire de l'atome d'azote, interagit avec le fer de l'hème de l'aromatase.



R = 7-OH, RP /AG = 6,33

R = 5-OH, RP /AG = 27,5



La synthèse des 3-(4-pyridinylméthylène)flavanones est basée sur la condensation, en présence de pipéridine et à chaud, entre une flavanone et le 4-pyridinecarboxaldéhyde **22** (schéma 13) (Pouget et coll., 2002a). La flavanone et la 7-méthoxyflavanone ont fait l'objet de cette modulation. Les molécules obtenues présentent une activité inhibitrice supérieure à celles des flavanones de départ (8 et 35 fois plus actives respectivement). Toutefois, les puissances relatives par rapport à l'aminoglutéthimide restent modérées.

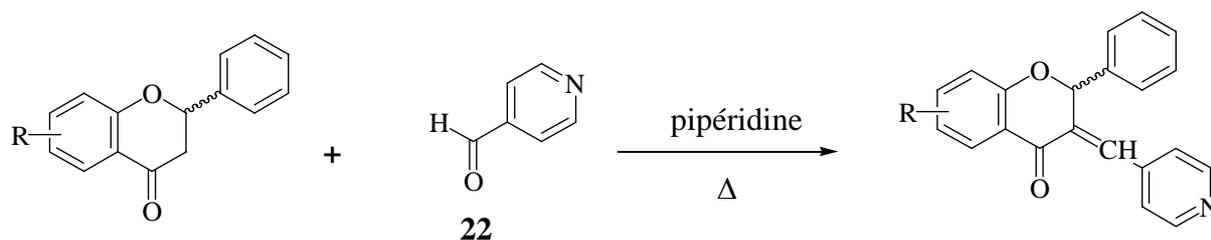
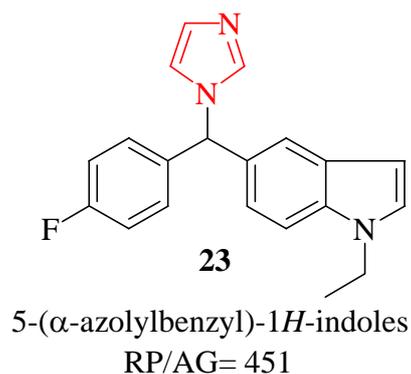
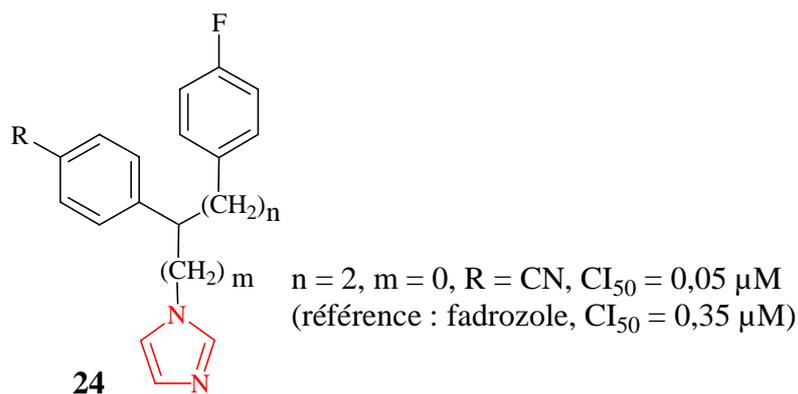


Schéma 13. Synthèse des 3-(4-pyridinylméthylène)flavanones.

La deuxième stratégie de modulation du noyau C concerne l'introduction d'un groupement imidazole en position 4 des flavanones ; le rôle essentiel de ce groupement vis-à-vis de l'activité anti-aromatase a été démontré pour de nombreuses molécules dont voici quelques exemples à travers les composés **23** (Le Borgne et coll., 1999) et **24** (Karjalainen et coll., 2000).





Les diarylalkylimidazoles

Les 4-imidazolylflavanes sont synthétisés à partir des flavan-4-ols, intermédiaires réactionnels obtenus par réduction stéréosélective des flavanones en présence de borohydrure de sodium (schéma 14). Le traitement des 2,4-*cis*-flavan-4-ols **25** avec du 1,1'-carbonyldiimidazole conduit à des 2,4-*trans*-4-imidazolylflavanes (schéma 15) (Pouget et coll., 2002b ; Pouget et coll., 2004).

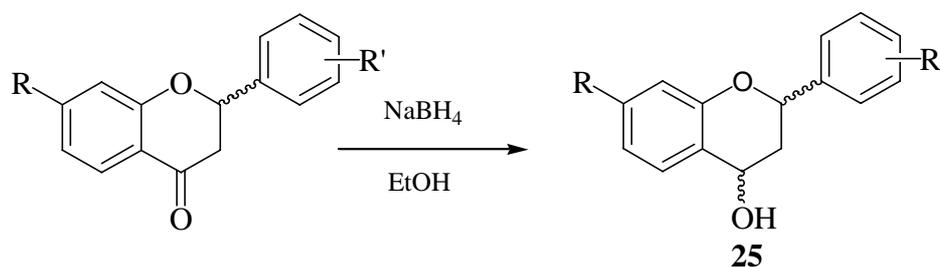


Schéma 14. Synthèse des 2,4-*cis*-flavan-4-ols.

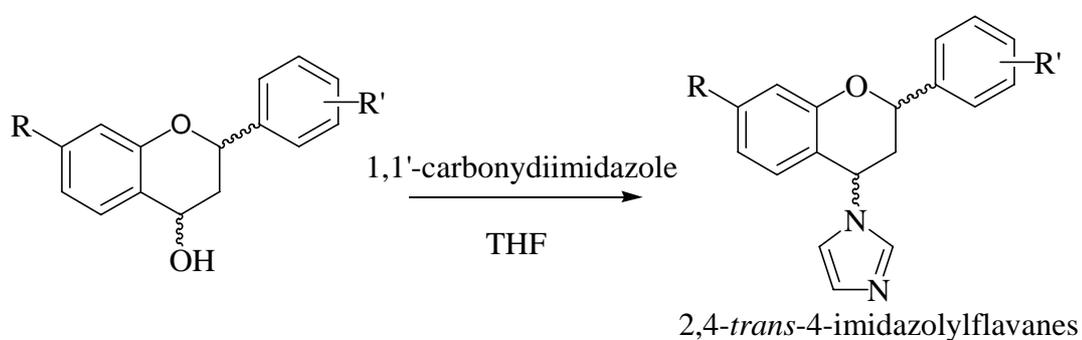


Schéma 15. Synthèse de 2,4-*trans*-4-imidazolylflavanes.

L'évaluation biologique de ces composés montre que le groupement imidazole augmente considérablement l'activité inhibitrice *in vitro* ; les molécules synthétisées présentent des puissances relatives par rapport à l'aminoglutéthimide comprises entre 26 et 130. Le 2,4-*trans*-4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane et le 2,4-*trans*-7-hydroxy-4-imidazolylflavane sont les molécules les plus actives, avec une activité comparable à celle du létrozole qui constitue un traitement de référence pour le cancer du sein.

5.6. Bilan de l'influence de la substitution sur le squelette flavonoïdique :

En résumé, les éléments susceptibles de renforcer l'interaction site actif / flavonoïde sont :

- un groupement hydroxyle sur le noyau B en position 3' et/ ou 4', groupement qui interagirait avec le site actif *via* une liaison hydrogène ;
- un groupement hydroxyle ou méthoxy en position 7, groupements activateurs de la fonction carbonyle pour les flavanones et les flavones ;
- une double liaison en position 2,3 ;
- un substituant contenant un atome d'azote de type sp^2 tel que l'imidazole en position 4 ou le 4-pyridinylméthylène en position 3 qui permet de renforcer l'interaction avec le fer de l'hème de l'aromatase.

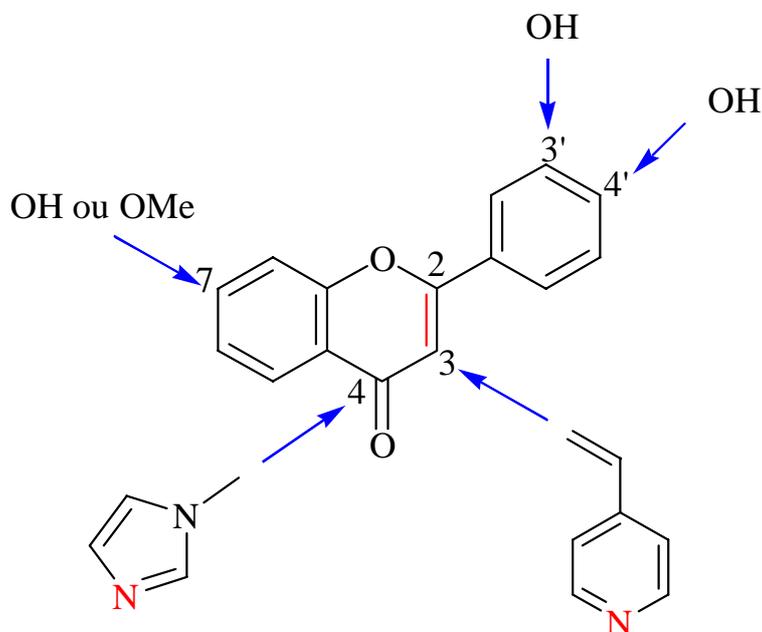


Schéma 16. Groupements susceptibles de renforcer l'interaction site actif / flavonoïde.

III. Conclusion

Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Les progrès en terme de compréhension des mécanismes de prolifération tumorale ont permis la mise en place de traitements très efficaces. Parmi ceux-ci, l'hormonothérapie par les inhibiteurs de l'aromatase, occupe une place de plus en plus importante dans le traitement des cancers du sein hormono-sensibles. Elle bloque la production des estrogènes dont l'implication dans l'initiation et la progression des tumeurs mammaires est aujourd'hui clairement établie. Le développement de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase a connu ces dernières années un nouvel essor, notamment grâce aux résultats des études cliniques concernant le létrozole et l'anastrozole.

Par ailleurs, l'intérêt s'est porté sur certains composés naturels qui possèdent un effet protecteur vis-à-vis du cancer du sein, à travers notamment un effet anti-aromatase. Parmi ces composés naturels, les flavonoïdes présents dans le régime alimentaire de populations faiblement touchées par le cancer du sein, tiennent une place importante. Leur structure chimique évoque celle des stéroïdes, et permet ainsi des interactions avec le site actif de l'aromatase. La pharmacomodulation de ces composés nous est apparue comme une voie à la fois originale et pertinente pour synthétiser de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase.

Les résultats prometteurs des travaux antérieurs menés dans notre laboratoire sont des témoins du potentiel biologique de ces flavonoïdes, et nous ont encouragés à compléter cette étude par la poursuite d'une pharmacomodulation du squelette 4-imidazolylflavane. Ces travaux sont exposés dans la seconde partie qui traite la synthèse des différents composés et leur activité vis-à-vis de l'aromatase.

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAUX PERSONNELS

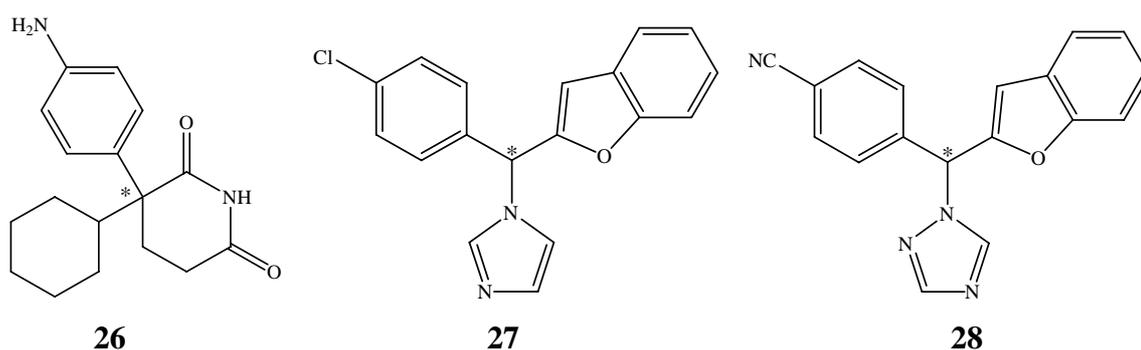
I. OBJECTIFS :

1. Modulation du noyau C :

1.1. Influence de la stéréochimie sur l'activité anti-aromatase : synthèse de 2,4-trans-4-imidazolylflavanes :

L'influence de la stéréochimie d'une molécule sur son activité biologique n'est plus à démontrer. Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux anti-aromatases, plusieurs exemples significatifs sont donnés dans la littérature.

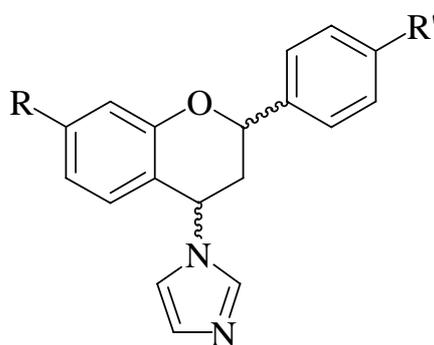
La 3-(4-aminophényl)-3-cyclohexylpipéridine-2,6-dione **26** est un puissant inhibiteur de l'aromatase, le mélange racémique est ainsi 123 fois plus actif que l'aminoglutéthimide. Les tests des deux énantiomères ont révélé que l'énantiomère (+) est 30 fois plus actif que l'énantiomère (-) et deux fois plus actif que le mélange racémique (Hartmann et coll., 1992). Pour le dérivé 4-chloro du 1-[2-benzofuranylphénylméthyl]imidazole **27**, l'énantiomère (+) présente un effet anti-aromatase 15 fois supérieur à celui de l'énantiomère (-) (Messina et coll., 1999). Enfin, l'inhibiteur MEN 11066 **28** testé sous forme de mélange racémique, est un puissant inhibiteur de l'aromatase puisqu'il est 15 fois plus actif que l'anastrozole. Son énantiomère (+) MEN 11623 est dix fois plus actif que l'énantiomère (-) MEN 11622 (Palma et coll., 2000).



Par ailleurs, les travaux de thèse de C. Pouget montrent que la réduction des flavanones aboutit à la formation d'une paire d'énantiomères : les 2,4-*cis*-flavan-4-ols (Pouget et coll., 2000), intermédiaires réactionnels dont la substitution permet d'obtenir probablement les 2,4-*trans*-4-imidazolylflavanes sous forme de mélange racémique 2*R*,4*S* et 2*S*,4*R* (Pouget

et coll., 2002b). L'activité anti-aromatase encourageante de ces molécules d'une part, et l'importance de tester des composés énantiomériquement purs d'autre part, nous ont incités, dans un premier temps, à préparer en quantité suffisante les 4-imidazolylflavanes les plus actifs, afin d'envisager une séparation chirale.

Trois 4-imidazolylflavanes ont été sélectionnés : le 2,4-*trans*-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_A**, le 2,4-*trans*-7-hydroxy-4-imidazolylflavane **I_B**, et le 2,4-*trans*-4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_C**, qui présentent respectivement une puissance relative par rapport à l'aminoglutéthimide de 57,124 et 130.



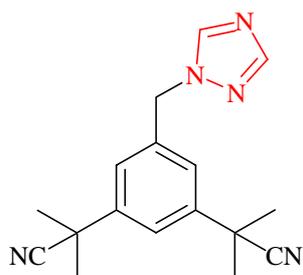
I_A: R = OMe, R' = H

I_B: R = OH, R' = H

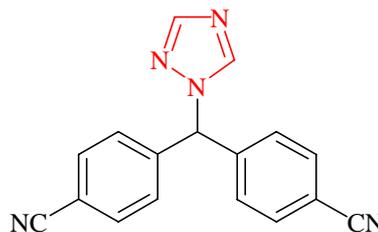
I_C: R = OMe, R' = OH

1.2. Introduction d'un nouveau motif de substitution : synthèse de 4-triazolylflavanes :

De puissants inhibiteurs de l'aromatase tels que l'anastrozole **12** ou le létrozole **13** dont l'efficacité se confirme de jour en jour dans le traitement hormonal du cancer du sein, contiennent un noyau triazolé, avec des azotes de type sp^2 nécessaires à la liaison inhibiteur-enzyme. Des études ont montré que l'activité biologique et la sélectivité des inhibiteurs envers l'aromatase dépend du nombre et de la position de ces azotes sp^2 dans l'hétérocycle (Jones et coll., 1990 ; Okada et coll., 1996 ; Okada et coll., 1997). Alors que les dérivés triazolés présentent une activité *in vitro* inférieure à celle des imidazolés correspondants, ils se révèlent plus actifs *in vivo* grâce à une plus grande stabilité métabolique et à une sélectivité supérieure vis-à-vis de l'aromatase (Lang et coll., 1993 ; Smith et coll., 2001).



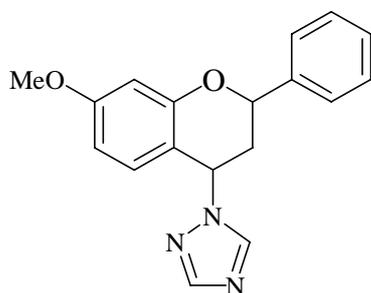
12



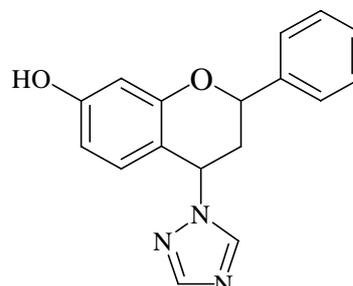
13

Notre stratégie consiste donc à greffer un noyau triazole à l'image de l'anastrozole et du létrozole, en position 4 des flavanones, ceci dans le but d'améliorer leur activité et de la comparer ensuite à celle des dérivés imidazolés déjà synthétisés.

Pour cela, en se référant aux imidazolés les plus actifs, il a été décidé de synthétiser deux 4-triazolylflavanes, le 7-méthoxy-4-triazolylflavane **T1** et le 7-hydroxy-4-triazolylflavane **T2**.



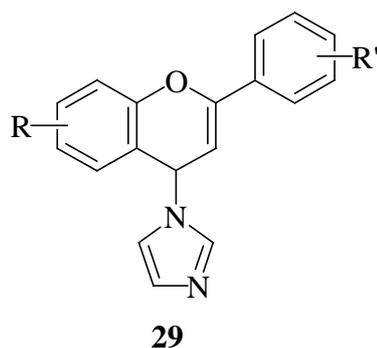
T1



T2

1.3. Introduction d'une double liaison : synthèse de 4-imidazolylflav-2-ènes :

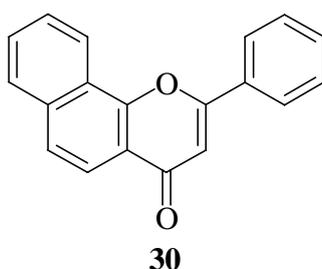
Plusieurs travaux de recherche ont montré que les flavones, sont des inhibiteurs compétitifs de l'aromatase (Kellis et Vickery, 1984), et qu'elles possèdent en général une activité supérieure à celle des flavanones correspondantes (Le Bail et coll., 1998a ; Kao et coll., 1998 ; Le Bail et coll., 2001 ; Sanderson et coll., 2004). L'importance de la double liaison en 2,3 des flavones vis-à-vis de l'activité anti-aromatase nous a incités à orienter nos synthèses vers la préparation des 4-imidazolylflav-2-ènes **29**, ceci afin de renforcer l'interaction inhibiteur / site actif de l'aromatase.



2. Modulation du noyau A :

2.1. Synthèse de 7,8-benzoflavanones :

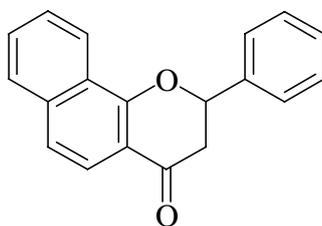
Chen et coll. montrent que l'interaction des inhibiteurs avec le site actif de l'aromatase est fortement influencée par la présence de régions hydrophobes au sein de la molécule (Chen et coll., 1997). Notre stratégie de modulation du squelette flavane consiste à synthétiser des molécules présentant un noyau aromatique supplémentaire sur le noyau A, à l'image de la 7,8-benzoflavone (α -naphthoflavone ou ANF) **30**. Celle-ci est un puissant inhibiteur synthétique de l'aromatase, qui présente une affinité avec l'enzyme comparable à celle des substrats naturels, l'androstènedione et la testostérone (Nesnow et coll., 1983 ; Kellis et Vickery, 1984 ; Kellis et coll., 1986).



De plus, une étude comparative portant sur l'activité anti-aromatase de 11 flavonoïdes, montre que la 7,8-benzoflavone est l'inhibiteur le plus actif : elle est 15 fois plus active que l'aminoglutéthimide et 136 fois plus active que la flavone, l'existence d'un groupement benzo en position 7,8 augmente donc considérablement l'activité inhibitrice (Campbell et Kurzer, 1993).

Outre la synthèse de la 7,8-benzoflavanone **F1**, la modulation du noyau B a également été réalisée, conduisant à l'obtention de 7,8-benzoflavanones diversement substituées. Les substituants sont introduits sur les position 3 et 4 du noyau B : il s'agit d'une part d'un

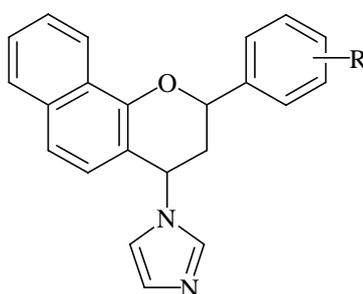
hydroxyle, groupement électrodonneur, et d'autre part, d'un groupement cyano, attracteur, présent sur certains inhibiteurs de l'aromatase comme le létrozole ou l'anastrozole.



F1

2.2. Synthèse de 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes :

Le dernier axe de modulation concerne ce nouveau squelette 7,8-benzoflavane et consiste à greffer un groupement imidazole dont l'influence favorable sur l'activité anti-aromatase a été démontrée pour la structure flavane. Ces travaux aboutissent à l'obtention de 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes substitués sur le noyau B **I1-I5**.



I1-I5

II. Synthèse et évaluation biologique des composés :

1. Les 4-imidazolylflavanes :

1.1. Principe :

Les 4-imidazolylflavanes sont obtenus par réduction de flavanones en flavan-4-ols, suivie d'une réaction de substitution par un groupement imidazole (schéma 17). Les résultats des travaux antérieurs ont permis de sélectionner, comme annoncé précédemment, trois 4-imidazolylflavanes : le 4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_A**, le 7-hydroxy-4-imidazolylflavane **I_B** et le 4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_C**. Les deux premières molécules sont préparées à partir de flavanones commerciales alors que l'obtention du troisième composé nécessite la synthèse de la flavanone correspondante.

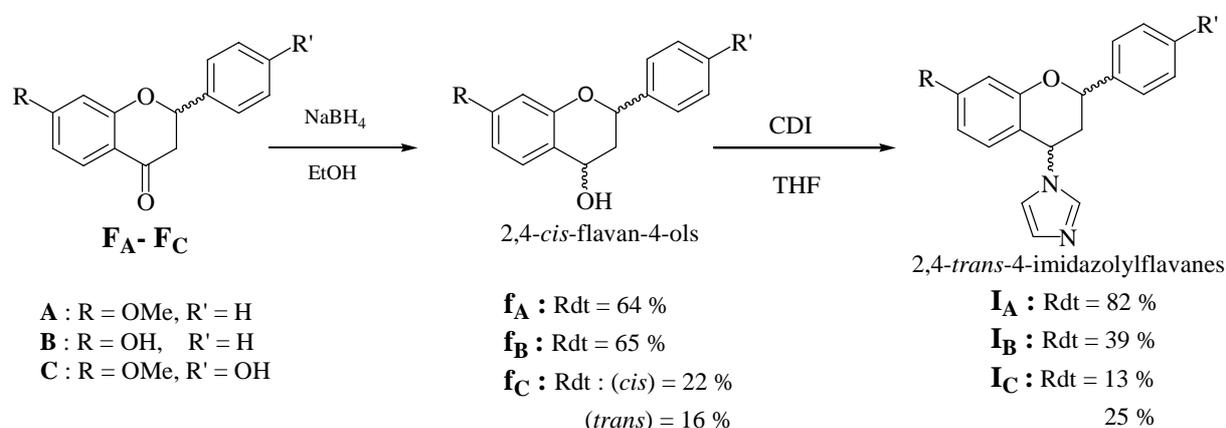


Schéma 17. Synthèse des 4-imidazolylflavanes à partir des flavanones.

1.2. Synthèse :

1.2.1. Synthèse de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone :

Certaines flavanones sont obtenues par synthèse totale comprenant la préparation de chalcones suivie d'une cyclisation en milieu acide (Schéma 18). La synthèse de chalcones repose sur la condensation de Claisen-Schmidt entre une acétophénone et un benzaldéhyde diversement substitué ; elle est réalisée en milieu alcalin, dans l'éthanol à reflux, en présence d'hydroxyde de baryum Ba(OH)₂ partiellement desséché (Alcantara et coll., 1987 ; Sathyanarayana et Krishnamurty, 1988).

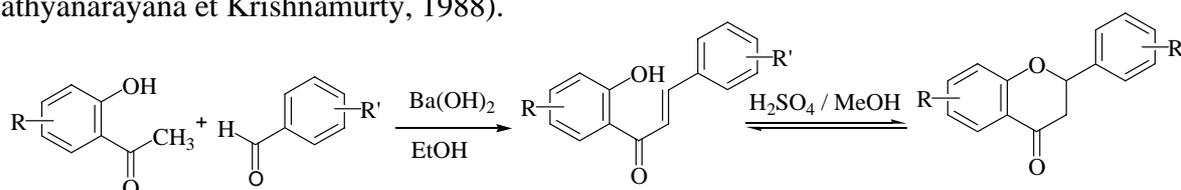


Schéma 18. Synthèse des flavanones.

La condensation d'acétophénones avec des benzaldéhydes substitués par un groupement hydroxyle en position 2 ou 4 nécessite une étape supplémentaire (Sathyanarayana et Krishnamurty, 1988). Il s'agit de la protection de ces hydroxyles par le 3,4-dihydro- α -pyrane, la réaction est catalysée par le pyridinium-*p*-toluènesulfonate dans le dichlorométhane. La déprotection de la chalcone obtenue est ensuite réalisée avec l'acide *p*-toluènesulfonique (Hsieh et coll., 1998 ; Severi et coll., 1998). Cette étape de protection / déprotection a été appliquée lors de la synthèse de la 2',4-dihydroxy-4'-méthoxychalcone **C_C** (schéma 19) ; la condensation est réalisée entre la 2-hydroxy-4-méthoxyacétophénone **31** et le 4-hydroxybenzaldéhyde protégé **32**. Après déprotection, le traitement de la 2',4-dihydroxy-4'-méthoxychalcone, avec une solution méthanolique d'acide sulfurique à reflux, aboutit à la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone **F_C** ; cette cyclisation, caractérisée par un équilibre chimique, est réalisée avec un rendement de 40 %.

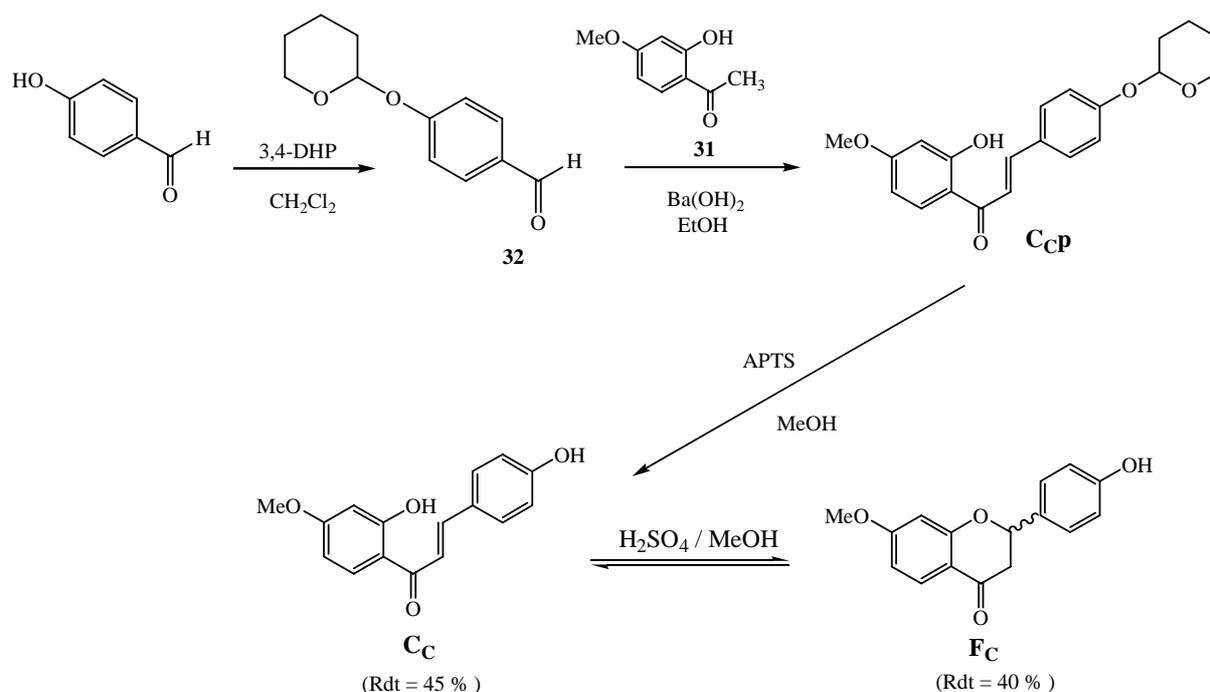


Schéma 19. Synthèse de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone.

1.2.2. Réduction des flavanones :

Les flavanones sont réduites par le borohydrure de sodium dans l'éthanol à température ambiante sauf pour la flavanone **F_C** dont la réduction se déroule à 6°C. La réaction est totale mais l'instabilité des flavan-4-ols obtenus influence fortement le

rendement, ces composés pouvant facilement subir une réaction de déshydratation pour donner les flav-3-ènes correspondants (Pouget et coll., 2000).

La réduction des flavanones commerciales (7-OMe et 7-OH) aboutit à l'obtention des 2,4-*cis*-flavan-4-ols avec un rendement respectif de 64 et 65 %, la configuration 2,4-*cis* est déterminée principalement par RMN du proton. Les flavanones commerciales étant sous forme d'un mélange racémique, les 2,4-*cis*-flavan-4-ols obtenus sont probablement sous forme d'un mélange d'énantiomères (2*S*,4*S*) et (2*R*,4*R*).

On constate la présence de signaux caractéristiques du noyau hétérocyclique des 2,4-*cis*-flavan-4-ols : deux doublets de doublet de doublet correspondant aux deux protons H-3 et deux signaux sous forme de deux doublets de doublet caractéristiques des protons H-2 et H-4. Pour H-3 axial, plus blindé que H-3 équatorial, on observe des constantes de couplage élevées (13,2, 11,4 et 10,2 Hz). La première constante correspond au couplage géminale avec H-3 eq ; les deux autres impliquent un couplage *trans*-diaxial avec les protons H-2 et H-4. Le proton H-4 occupe en fait une position quasi-axiale démontrée par la valeur plus faible du couplage H-3ax / H-4, position particulière due à la conformation demi-chaise de l'hétérocycle (schéma 20) (Pouget et coll., 2000). Quant au proton H-3eq, il couple avec H-2 avec une constante de l'ordre de 2 Hz et avec H-4 avec une constante plus élevée, voisine de 6 Hz, liée à la position quasi-axiale de H-4. L'attribution de tous les signaux est réalisée grâce aux autres expériences de RMN : RMN du carbone, COSY, HMQC, HMBC.

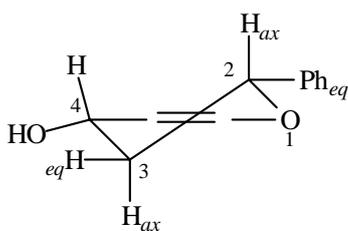


Schéma 20. Conformation demi-chaise du 2,4-*cis*-flavan-4-ol.

Si la réduction de la 7-hydroxy et de la 7-méthoxyflavanone conduit exclusivement aux flavan-4-ols de configuration 2,4-*cis*, celle de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone aboutit à un mélange 50/50 d'isomères *cis* et *trans* avec un rendement de 82 %. La nature du groupement 4'-hydroxyle, exerce un effet +M et provoque probablement une attaque de l'hydrure au dessus et en dessous du plan de la molécule, on obtient ainsi les deux configurations 2,4-*cis* et 2,4-*trans*, soit probablement un mélange des 4 diastéréoisomères, (2*S*,4*R*) et (2*R*,4*S*) pour la configuration *trans*, (2*S*,4*S*) et (2*R*,4*R*) pour la configuration *cis*.

Après séparation par HPLC sur colonne diol, l'isomère *cis* est obtenu avec un rendement de 22 % et l'isomère *trans* avec un rendement de 16 % ; une fraction où les deux isomères sont encore en mélange est également récupérée.

En RMN du proton, l'isomère *cis* présente les mêmes signaux caractéristiques des flavan-4-ols précédemment décrits. Pour le 2,4-*trans*-4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol, H-3 axial résonne sous forme d'un doublet de doublet de doublet (14, 9,6 et 2,5 Hz). La constante de 9,6 Hz correspond toujours au couplage *trans*-diaxial avec H-2; en revanche, la faible valeur pour le couplage avec H-4 (2,5 Hz) indique que celui-ci occupe une position quasi-équatoriale, d'où la configuration 2,4-*trans* (schéma 21). Le signal du proton H-3eq correspond alors à un doublet de triplet élargi lié aux valeurs proches des couplages H-3eq/H-2 et H-3eq/H-4. De la même façon, H-4 résonne sous la forme d'un triplet élargi dû à la similarité entre $J_{4,3eq}$ et $J_{4,3ax}$.

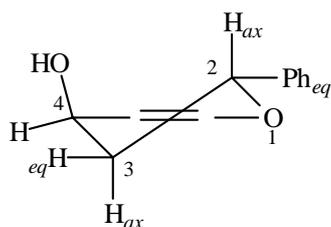


Schéma 21. Conformation demi-chaise du 2,4-*trans*-flavan-4-ol.

Enfin, il faut noter que les spectres de carbone des isomères *cis* et *trans* sont très proches ; la seule différence remarquable concerne le déplacement chimique du carbone C-2. Pour le *trans*-flavan-4-ol, ce carbone (à 74,3 ppm) est blindé par rapport à celui de l'isomère *cis* (à 78,6 ppm). Ce blindage s'explique par l'effet γ -gauche du groupement hydroxyle pseudo-axial des isomères *trans* (Wähälä et coll., 1997).

1.2.3. Synthèse des 4-imidazolylflavanes :

Les 7-OMe et 7-OH flavan-4-ols sont mis en présence du 1,1'-carbonyldiimidazole dans le THF pour donner les 4-imidazolylflavanes **I_A** et **I_B** avec un rendement respectif de 82 et 39 %.

L'étude RMN permet d'établir la configuration 2,4-*trans* de ces molécules. Les spectres montrent 4 protons caractéristiques du noyau hétérocyclique d'un flavane substitué

en 4. La nature des signaux et la valeur des constantes de couplage sont en adéquation avec une configuration 2,4-*trans* :

- H-3eq apparaît sous forme d'un doublet de triplet élargi dû aux constantes de couplage $J_{3eq,2}$ et $J_{3eq,4}$ très proches ;
- H-3ax résonne sous forme d'un doublet de doublet de doublet avec $J_{3ax,4}$ voisine de 4 Hz traduisant la position quasi-équatoriale de H-4 ;
- H-2 est sous forme d'un doublet de doublet avec $J_{2,3ax}$ caractéristique d'une constante *trans*-diaxiale ;
- H-4 couple avec les deux protons H-3 avec des constantes quasi similaires et apparaît donc sous forme d'un triplet élargi ;

Enfin, la présence de trois singulets correspondant chacun à un proton confirme la structure imidazolée.

L'obtention d'une configuration 2,4-*trans* implique une inversion de configuration suite à une réaction de type S_N2 : l'encombrement stérique lié au phényl en 2 implique une attaque de l'ion imidazolyl formé du côté opposé au groupement 4-hydroxy, les flavan-4-ols présentant une configuration 2,4-*cis*. Le schéma suivant, établi pour un *cis*-flavan-4-ol 2*S*,4*S*, permet d'expliquer l'inversion de configuration et s'applique également aux *cis*-flavan-4-ols 2*R*,4*R* (schéma 22).

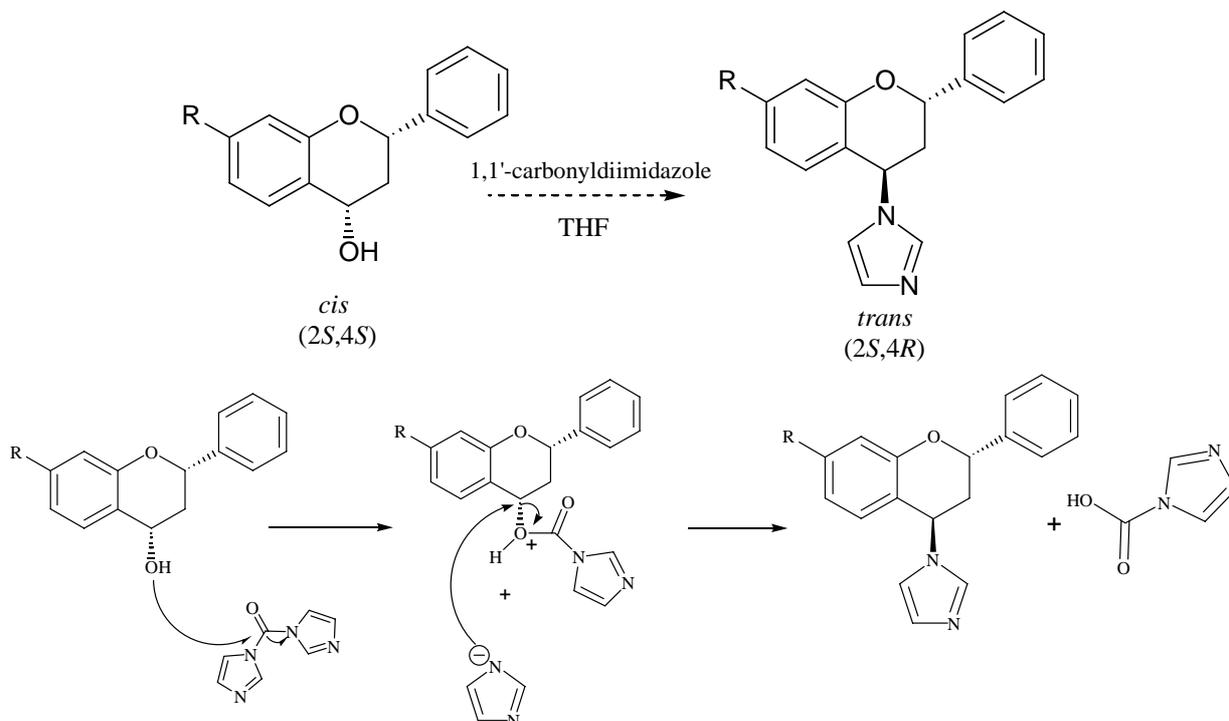


Schéma 22. Mécanisme d'obtention des 2,4-*trans*-4-imidazolylflavanes à partir des 2,4-*cis*-flavan-4-ols.

Pour le dérivé 4'-OH, 7-OMe, les deux isomères 2,4-*cis*-flavan-4-ol f_{CC} et 2,4-*trans*-flavan-4-ol f_{Ct} sont soumis à l'action du 1,1'-carbonyldiimidazole dans le tétrahydrofur conduisant chacun au 2,4-*trans*-4-imidazolyflavane I_C avec un rendement respectif de 13 et 25 %. Pour la fraction qui contient les deux flavan-4-ols en mélange, le 2,4-*trans*-4-imidazolyflavane est également obtenu avec un rendement de 23 %.

L'obtention du 2,4-*trans*-4-imidazolyflavane I_C à partir de l'isomère 2,4-*trans* du flavan-4-ol f_{Ct} implique probablement la formation d'un carbocation suivie d'une attaque nucléophile de l'hétérocycle azoté du côté le moins encombré c'est à dire du côté opposé au phényle en 2 (schéma 23).

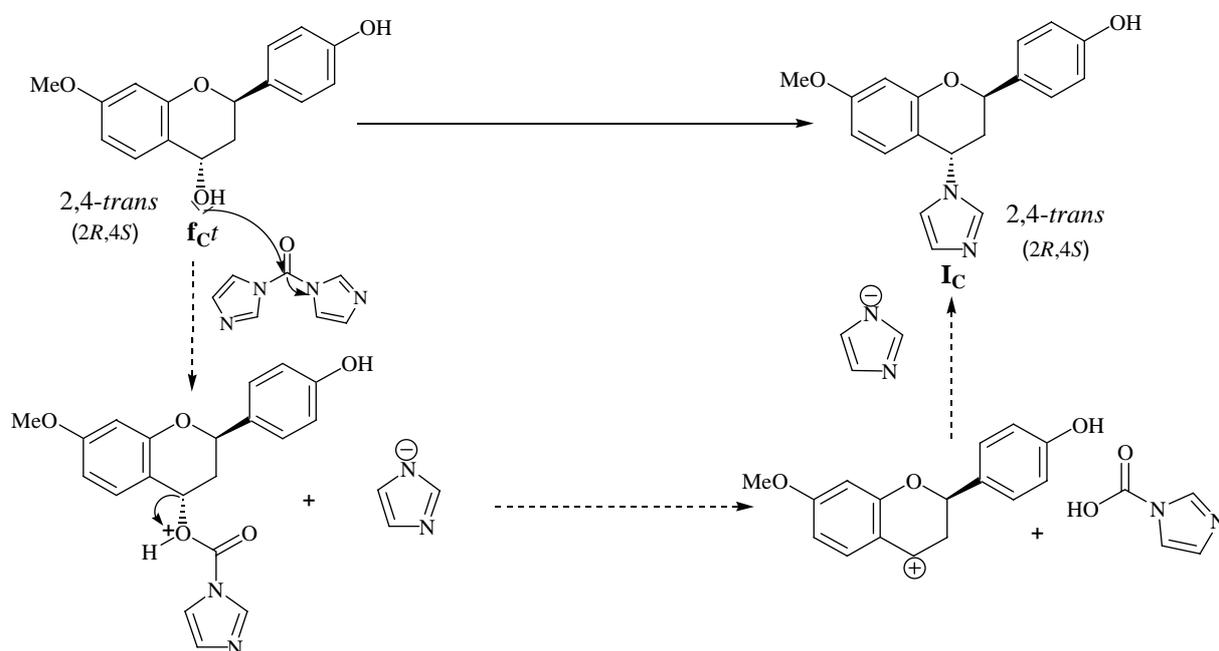


Schéma 23. Obtention du 2,4-*trans*-4'-hydroxy-4-imidazoly-7-méthoxyflavane I_C à partir de 2,4-*trans*-4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol f_{Ct} .

1.2.4. Essais de séparation

Lors des travaux antérieurs sur les flavan-4-ols (Pouget et coll., 2000), la présence des deux énantiomères (2*S*,4*S*) et (2*R*,4*R*) pour les isomères *cis*, (2*S*,4*R*) et (2*R*,4*S*) pour les isomères *trans*, a été mise en évidence grâce à une étude par HPLC sur colonne chirale CHIROSE C1[®]. Cette étude a été réalisée par la société Chiralsep qui développe de nouveaux supports pour la séparation chirale ; la collaboration s'est ensuite étendue à des séparations préparatives concernant ces énantiomères.

Ensuite, la séparation des énantiomères des 4-imidazolylflavanes **I_A**, **I_B** et **I_C** a été envisagée sur le même type de support. Cependant, des problèmes de solubilité des composés et de mise au point des méthodes séparatives n'ont pas permis à la société Chiralsep d'obtenir des composés énantiomériquement purs. Aussi, l'étude de l'influence de la stéréochimie des 4-imidazolylflavanes sur l'activité anti-aromatase n'a pu aboutir.

1.3. Evaluation biologique :

L'évaluation de l'activité anti-aromatase implique l'utilisation d'un substrat androgénique, l'androstènedione, et de microsomes placentaires humains qui renferment l'aromatase. Au cours du temps, une diminution de l'activité enzymatique est observée d'où l'obligation de préparer régulièrement de nouveaux lots de microsomes. De nouvelles conditions permettant une réaction enzymatique totale en absence d'inhibiteur doivent alors être déterminées : quantité de microsomes mise en œuvre et durée de la réaction. Ces conditions sont ensuite validées en évaluant l'activité d'une molécule référence comme l'aminoglutéthimide ou le létrozole et celle des composés déjà testés.

Au cours de notre étude, un lot de microsomes différent de celui des travaux antérieurs a été utilisé et nous avons donc mis au point de nouvelles conditions en testant les 4-imidazolylflavanes **I_A** et **I_B**. Ces derniers ont déjà fait l'objet d'une évaluation de leur activité anti-aromatase lors des travaux de thèse de C. Pouget ; leur CI_{50} était égale respectivement à 0,092 et 0,042 μM d'où une puissance relative par rapport à l'aminoglutéthimide (CI_{50} de 5,2 μM) égale à 57 et 124 respectivement.

Dans un premier temps, la cinétique de transformation de l'androstènedione en estrogènes a été étudiée en faisant varier le temps d'incubation (schéma 24). A partir de 12 minutes d'incubation, un plateau est observé ; il semble que quelque soit le temps d'incubation, la quantité de microsomes utilisée n'est pas suffisante pour obtenir une transformation totale du substrat.

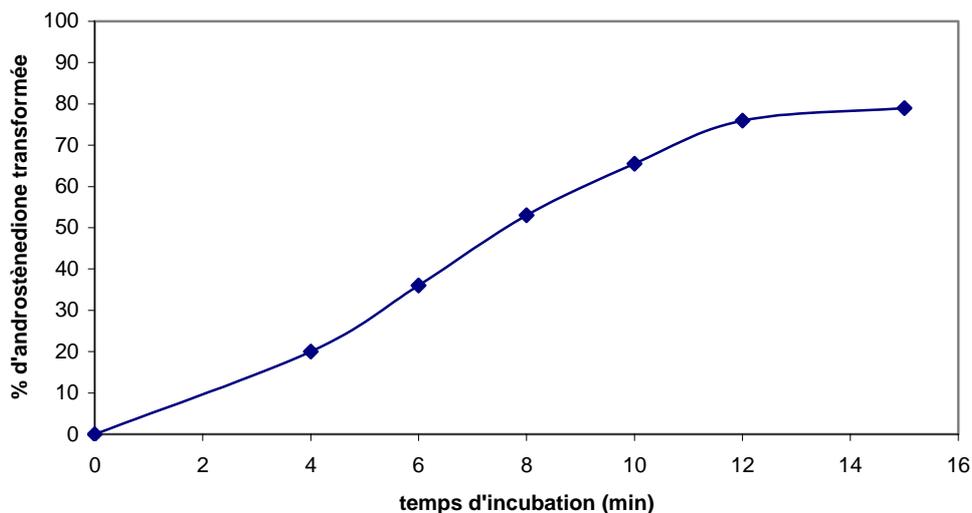


Schéma 24. Cinétique de transformation de l'androstènedione en estrogènes avec 6 μl de microsomes placentaires.

Aussi, il a été décidé de fixer le temps d'incubation à 12 minutes et de faire varier la quantité de microsomes mise en œuvre (schéma 25). Il apparaît que pour un volume de 16 μl de microsomes, le substrat est totalement transformé en estrone et estradiol.

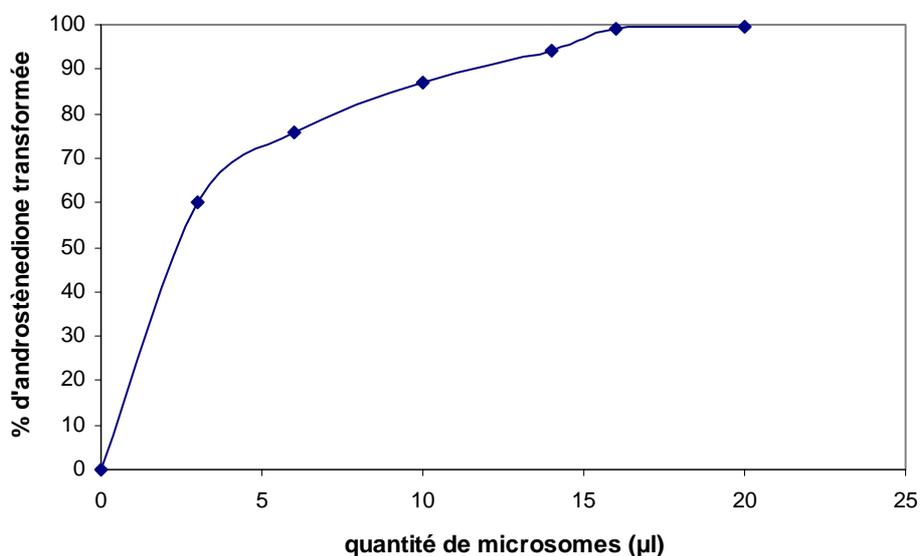


Schéma 25. Transformation de l'androstènedione en fonction de la quantité de microsomes utilisée, après 12 minutes d'incubation.

En résumé, pour obtenir une transformation complète de l'androstènedione, la réaction doit durer 12 minutes (7 minutes auparavant) et 16 µl de microsomes doivent être utilisés (au lieu de 6 µl précédemment).

Ces nouvelles conditions ont été appliquées lors des évaluations de l'aminoglutéthimide, du létrozole et des 4-imidazolyflavanes **I_A** et **I_B**. De nouvelles CI₅₀ ont été déterminées, elles sont reportées dans le tableau ci-dessous.

| Composé | CI ₅₀ (µM) | CI ₅₀ (µM) | RP (/AG) | RP (/AG) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|----------------|
| | ancien modèle | nouveau modèle | ancien modèle | nouveau modèle |
| aminoglutéthimide | 5,2 | 5,7 | / | / |
| létrozole | 0,018 | 0,018 | 289 | 317 |
| I_A | 0,092 | 0,092 | 57 | 62 |
| I_B | 0,042 | 0,045 | 124 | 127 |

RP (/AG) : puissance relative par rapport à l'aminoglutéthimide, calculée à partir des CI₅₀.

Tableau 3. Comparaison des activités anti-aromatases de certains composés selon le modèle enzymatique.

Les nouvelles puissances relatives calculées sont conformes à celles précédemment établies, ce qui nous permet de valider le nouveau lot de microsomes placentaires et les conditions pour la réaction enzymatique ; l'activité de ces 4-imidazolyflavanes pourra alors être comparée à celle des 4-triazolyflavanes, décrits dans le chapitre suivant.

2. Les 4-triazolylflavanes :

2.1. Synthèse et mécanismes :

L'introduction sur le noyau C d'un motif triazolé concerne deux flavanones, la 7-méthoxyflavanone et la 7-hydroxyflavanone. Comme pour les 4-imidazolylflavanes, les flavan-4-ols sont utilisés comme intermédiaires réactionnels ; les 4-triazolylflavanes sont en effet obtenus par action du 1,1'-sulphinylditriazole sur les 2,4-*cis*-flavan-4-ols, le 1,1'-sulphinylditriazole étant préparé par traitement du 1*H*-1,2,4-triazole par le chlorure de thionyle.

Pour chacun des 4-triazolylflavanes, deux isomères de configuration 2,4-*trans* sont obtenus, il s'agit de l'isomère 1*H* et de l'isomère 4*H* (schéma 26).

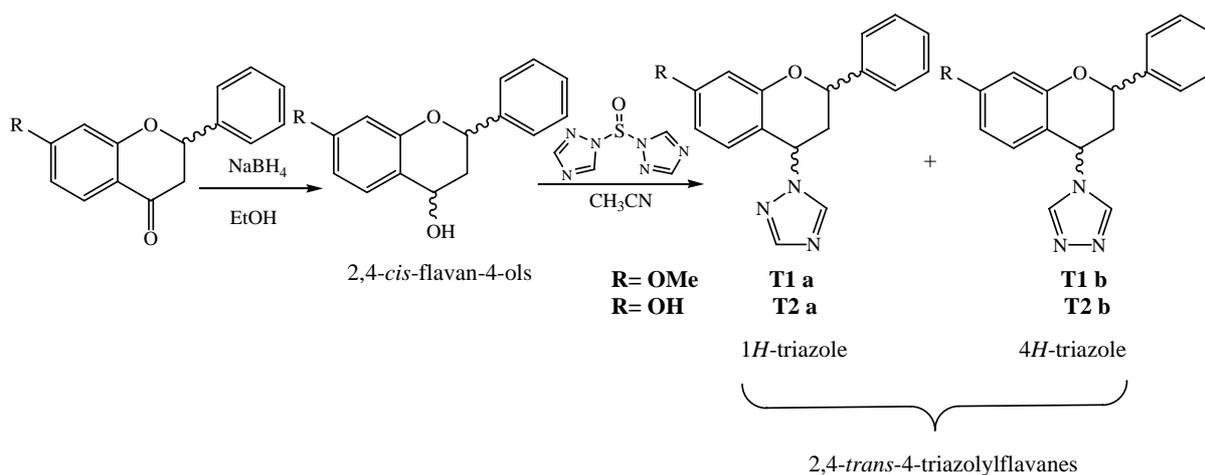


Schéma 26. Synthèse de 4-triazolylflavanes.

Pour le dérivé 7-méthoxy, les deux isomères sont obtenus en quantités équivalentes, l'isomère 1*H* est synthétisé avec un rendement de 33 % et le rendement de l'isomère 4*H* est de 34 %. Par contre, pour les 7-hydroxy-4-triazolylflavanes, l'isomère 1*H* est majoritaire, avec un rendement de 24 % ; l'autre isomère est obtenu avec un rendement de 12 %.

Les deux isomères du 7-méthoxy-4-triazolylflavane **T1a** et **T1b** et l'isomère 1*H* du dérivé 7-hydroxy **T2a** sont des composés stables ; en revanche, l'isomère 4*H* du 7-hydroxy-4-triazolylflavane **T2b** est instable et semble, au cours du temps, se réarranger en son isomère 1*H*, hypothèse avancée par l'observation des plaques de chromatographie puis confirmée par l'étude des spectres RMN. Bentley et coll. constate le même réarrangement pour la famille des 1,2,4-triazol-4-yléthanol (Bentley et coll., 1992).

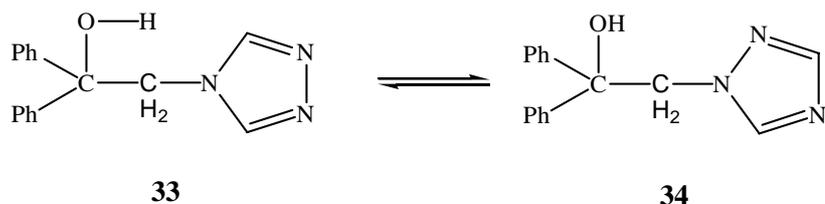


Schéma 27. Réarrangement du 1,1-diphényl-2-(1,2,4-triazol-4-yl)éthanol **33** en 1,1-diphényl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)éthanol **34**.

Le réarrangement du 7-hydroxy-4-triazol-4-ylflavane en 7-hydroxy-4-triazol-1-ylflavane semble être dû à la présence de l'hydroxyle en position *para* par rapport au C4. L'effet mésomère positif du OH permet au doublet électronique de se délocaliser jusqu'à l'hétérocycle favorisant ainsi le départ du triazole ; l'attaque nucléophile de l'anion triazolé au niveau de l'azote 1 permet ensuite d'obtenir l'isomère *1H* (schéma 28).

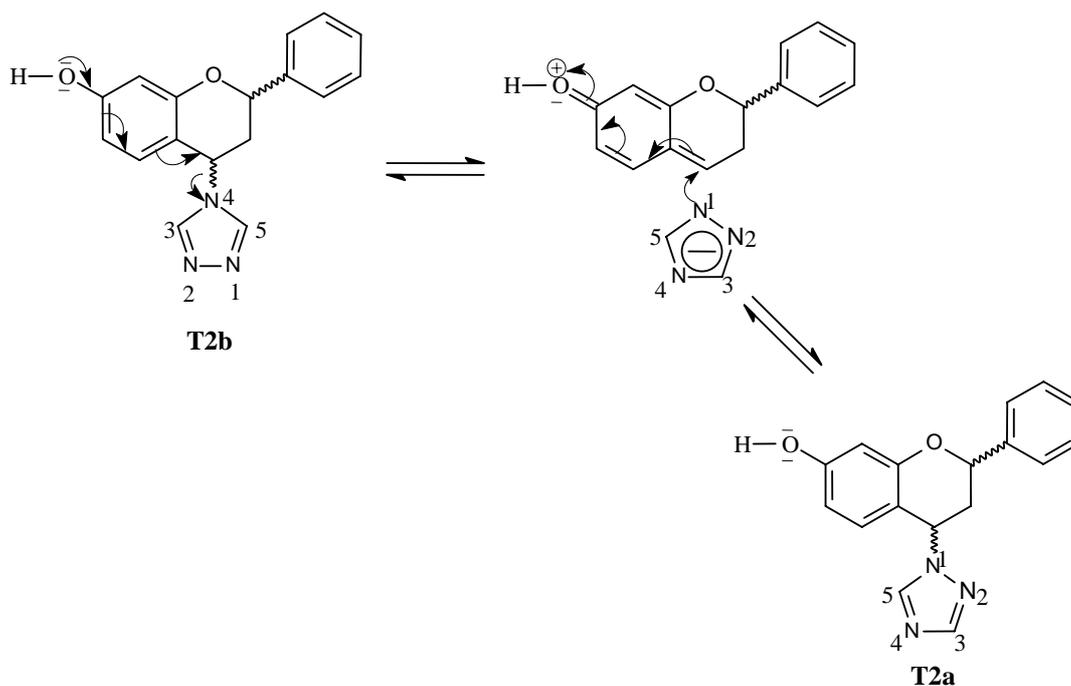


Schéma 28. Mécanisme de réarrangement de l'isomère *4H* **T2b** en l'isomère *1H* **T2a**.

Les spectres RMN du proton et du carbone nous permettent de différencier facilement les deux isomères. La partie azotée de l'isomère *4H* présente une symétrie, les deux protons du triazole sont identiques et donc représentés par un seul signal de type singulet ; de la même façon, les deux carbones apparaissent sous forme d'un seul pic.

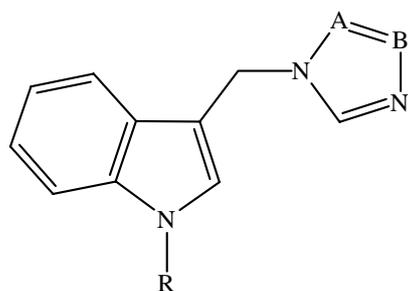
2.2. Evaluation biologique :

L'activité anti-aromatase des 4-triazolylflavanes est évaluée à l'exception du composé **T2b** instable. Ces composés présentent en général des activités biologiques modérées mais néanmoins supérieures, pour deux molécules, à celle de l'aminoglutéthimide (Yahiaoui et coll., 2004). En effet, celui-ci présente une CI_{50} de 5,7 μM alors que celles des 4-triazolylflavanes testés sont comprises entre 0,43 et 31,6 μM (tableau 4).

| T1a | | T1b | | T2a | |
|---|----------------|--|----------------|--|----------------|
| concentrations | % d'inhibition | concentrations | % d'inhibition | concentrations | % d'inhibition |
| 10 μM | 73,1 \pm 0,3 | 50 μM | 68,7 \pm 1,3 | 5 μM | 88,2 \pm 0,3 |
| 1 μM | 45,2 \pm 1,4 | 25 μM | 45,1 \pm 0,4 | 1 μM | 77,0 \pm 1,5 |
| 0,5 μM | 29,3 \pm 1,2 | 10 μM | 39,1 \pm 1,6 | 0,5 μM | 52,9 \pm 5,0 |
| 0,2 μM | 17,2 \pm 0,7 | 5 μM | 24,8 \pm 2,8 | 0,2 μM | 40,2 \pm 1,7 |
| 0,1 μM | 6,0 \pm 2,1 | 1 μM | 7,8 \pm 0,9 | 0,1 μM | 24,3 \pm 0,1 |
| $CI_{50} = 1,4 \mu M$ | | $CI_{50} = 31,6 \mu M$ | | $CI_{50} = 0,43 \mu M$ | |

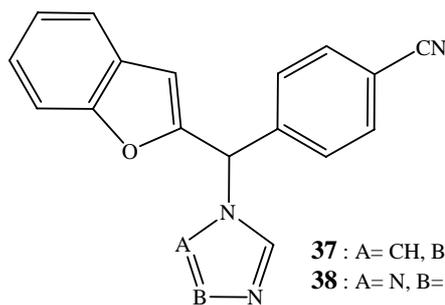
Tableau 4. Activité anti-aromatase des 4-triazolylflavanes.

Il existe une différence remarquable d'activité entre les deux isomères **T1a** et **T1b** du dérivé 7-méthoxy ; l'isomère *4H* est ainsi 20 fois moins actif que l'isomère *1H*. Des résultats similaires ont été obtenus par Marchand et coll. : pour les deux dérivés triazolés du 1-benzyl-3-(triazolylméthyl)-*1H*-indole, le dérivé *1H* **35** présente une activité inhibitrice de l'aromatase 35 fois supérieure à celle de son isomère *4H* **36** (Marchand et coll., 1998). En revanche, une autre étude, menée sur une série de benzofuranes montre que le composé *4H*-triazole **37** possède une activité inhibitrice de l'ordre de 0,065 μM qui est 3 fois supérieure à celle de son isomère *1H* (CI_{50} **38** = 0,21 μM) (Vinh, 2002).



35 : R= benzyl, A= N, B= CH

36 : R= benzyl, A= CH, B= N



37 : A= CH, B= N

38 : A= N, B= CH

Le fait que le composé **T1a** est plus actif que son isomère **T1b**, est plus ou moins attendu car l'azote 4 sp^2 de l'isomère **1H** peut présenter une meilleure coordination avec le fer de l'hème de l'aromatase, grâce à une densité électronique probablement supérieure à celle de l'azote de coordination de l'isomère **4H** (Schéma 29).

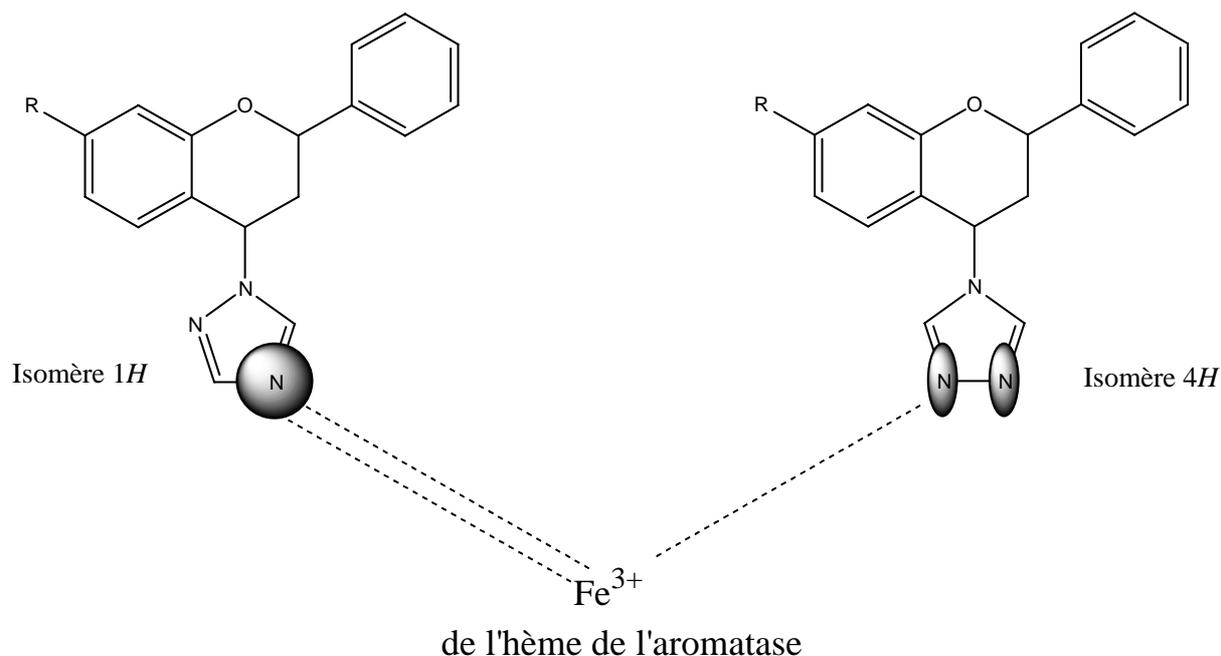


Schéma 29. Coordination des deux isomères **1H** et **4H**-triazole avec le fer de l'hème de l'aromatase.

Au-delà de ce premier constat, l'objectif de cette étude est de comparer l'activité de ces 4-triazolyflavanes à celle des 4-imidazolyflavanes correspondants afin d'analyser l'influence *in vitro* du remplacement du noyau imidazole par un noyau triazole sur le squelette flavane.

Comme l'ont déjà montré Marchand et Vinh, une diminution d'activité des 4-triazolyflavanes par rapport à leurs analogues imidazolés est constatée, les composés **T1a** et **T2a** sont respectivement 15 et 10 fois moins actifs de que le 7-méthoxy- et le 7-hydroxy-4-imidazolyflavane (**I_A** et **I_B**) (tableau 5).

| | T1a | T1b | T2a | I_A | I_B |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------------------|----------------------|
| CI ₅₀ (μM) | 1,4 | 31,6 | 0,43 | 0,092 | 0,045 |
| RP (/aminoglutethimide)* | 4,1 | 0,18 | 13,3 | 62 | 127 |

* RP = puissance relative calculée à partir des CI₅₀

Tableau 5. Comparaison de l'activité des molécules azolées synthétisées.

Pour les composés imidazolés, il est démontré que le noyau imidazole participe à travers l'atome d'azote sp^2 à l'établissement d'une liaison avec le fer de l'hème de l'aromatase. En ce qui concerne les triazolés, l'introduction d'un azote supplémentaire sur l'hétérocycle semble diminuer la densité électronique de l'atome chélateur et donc la coordination avec le fer de l'hème de l'enzyme (Vinh et coll., 1999). S'il est démontré que les triazolés sont moins actifs *in vitro*, ils présentent en revanche une activité *in vivo* supérieure à celle des imidazolés, d'où leur intérêt en thérapeutique à l'image du létrozole et de l'anastrozole. Deux propriétés permettent d'expliquer ces résultats :

- les inhibiteurs de l'aromatase qui contiennent un groupement triazole, présentent généralement une grande sélectivité envers l'aromatase alors que les composés imidazolés inhibent également d'autres enzymes de la stéroïdogenèse voire d'autres enzymes à cytochrome P450 (Lang et coll., 1993) ;

- les triazoles se caractérisent par une plus grande stabilité métabolique (Smith et coll., 2001).

2.3. Conclusion :

Une nouvelle classe d'inhibiteurs de l'aromatase a été synthétisée, les 2,4-*trans*-4-triazolylflavanes. Deux isomères 1*H* et 4*H* sont obtenus par action du 1,1'-sulphinylditriazole sur des flavan-4-ols de configuration 2,4-*cis*.

L'évaluation biologique de ces 4-triazolylflavanes montre d'une part que l'isomère 4*H* est moins actif que l'isomère 1*H* et d'autre part, que ces dérivés triazolés possèdent *in vitro* une activité anti-aromatase modérée et surtout inférieure à celle des 4-imidazolylflavanes.

Néanmoins, le composé **T2a** présente une activité intéressante et fera prochainement l'objet d'une séparation sur support chiral et d'essais concernant l'activité envers les autres enzymes de la stéroïdogénèse.

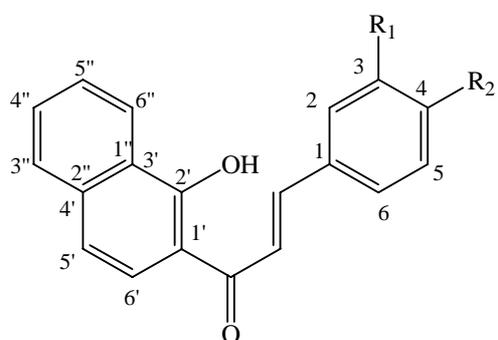
3. Les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes :

3.1. Introduction :

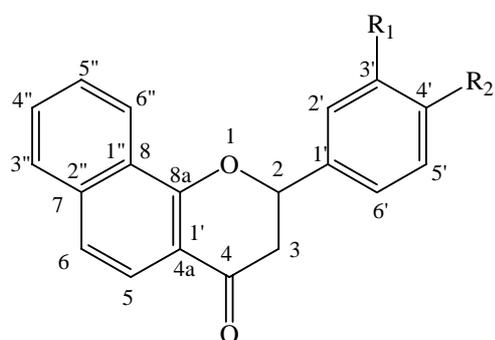
Un autre axe de modulation du squelette flavane consiste à introduire sur le noyau A un noyau aromatique supplémentaire.

La méthode de synthèse des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes est la même que celle mise en œuvre lors de la synthèse des 4-imidazolyflavanes. L'obtention des dérivés imidazolés implique la formation de benzochalcones, benzoflavanones et enfin benzoflavan-4-ols comme intermédiaires réactionnels.

La nomenclature adoptée pour les benzochalcones, benzoflavanones et leurs dérivés, est basée sur celle des chalcones et des flavanones selon la figure ci-dessous.



Les 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcones

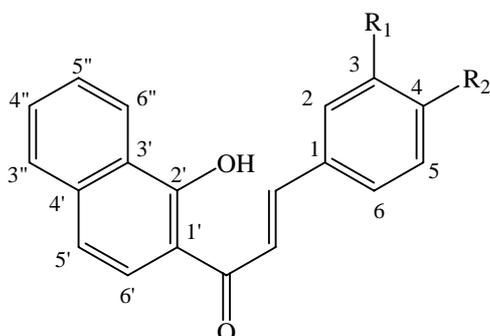


Les 7,8-benzoflavanones

3.2. Les 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcones :

3.2.1. Synthèse :

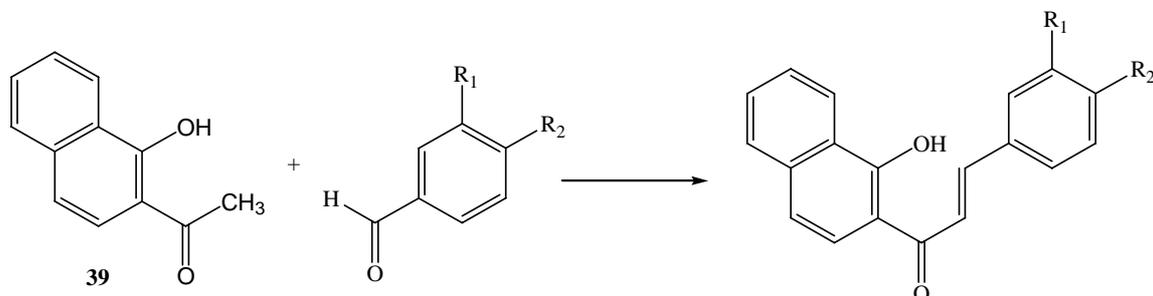
Cinq benzochalcones ont été synthétisées, il s'agit de la 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcone, de deux dérivés hydroxylés en position 3 et 4 et de leur analogue cyano (tableau 6).



| composé | R1 | R2 |
|-----------|----|----|
| C1 | H | H |
| C2 | CN | H |
| C3 | H | CN |
| C4 | OH | H |
| C5 | H | OH |

Tableau 6. Structure des chalcones C1-C5.

Les benzochalcones sont synthétisées par condensation de Claisen-Schmidt entre la 1-hydroxy-2-acétonaphtone **39** et les benzaldéhydes appropriés. La synthèse du dérivé hydroxylé en position 4 nécessite une étape de protection du benzaldéhyde. Les caractéristiques concernant la synthèse de ces chalcones sont rapportées dans le tableau 7.



| Composé | rapport stoechiométrique* | temps de réaction | Rdt |
|---------|---------------------------|-------------------|------|
| C1 | 1 / 1,2 | 1 h ½. | 85 % |
| C2 | 1 / 1,5 | 4 h | 35 % |
| C3 | 1 / 1,5 | 20 h | 56 % |
| C4 | 1 / 2,0 | 29 h | 45 % |
| C5 | 1 / 2,0 | 48 h | 72 % |

* rapport quantitatif entre la 1-hydroxy-2-acétonaphtone et le benzaldéhyde approprié.

Tableau 7. Caractéristiques de la synthèse des chalcones **C1-C5**.

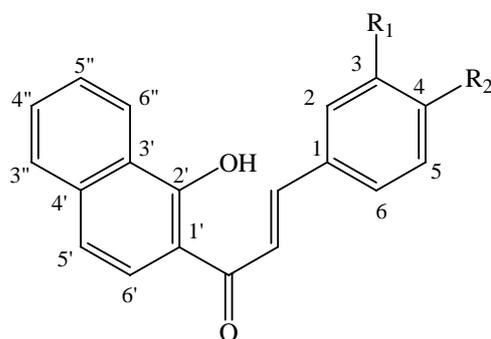
Pour la chalcone non substituée C1, la synthèse est effectuée avec un rapport acétophénone / benzaldéhyde de 1 éq / 1,2 éq, rapport utilisé lors de la synthèse des précédentes chalcones (Pouget et coll., 2002c). Le nombre d'équivalents de benzaldéhyde a cependant dû être augmenté pour les autres chalcones.

3.2.2. Analyse structurale :

La spectroscopie de RMN met en évidence plusieurs éléments :

- le déplacement chimique de l'ensemble des protons est situé entre 6,8 ppm et 8,5 ppm, qui correspond aux protons éthyléniques et aromatiques ;
- deux protons sont couplés entre eux avec une constante voisine de 15,5 Hz caractéristique d'un couplage *trans*-éthylénique ;

- pour la partie benzo, les protons H-3'' et H-6'' résonnent sous forme de deux doublets élargis en raison de la faible constante de couplage *meta* tandis que les protons H-4'' et H-5'' résonnent sous forme de multiplet ;



- les protons H-5' et H-6' apparaissent sous forme de doublet, ils couplent entre eux avec une constante ortho comprise entre 8,5 et 9 Hz ;
- on constate que pour les chalcones **C1**, **C2**, **C5**, le proton H-β est déblindé par rapport au proton H-α, suite à l'effet -M du carbonyle ;
- pour le composé **C4**, les deux protons éthyléniques résonnent au même champ ;
- pour le dérivé **C3**, la présence d'un cyano en 4 explique que le proton H-α est déblindé par rapport au proton H-β ; cependant le carbone C-α reste, comme pour les autres chalcones, blindé par rapport au C-β.

3.2.3. Evaluation biologique :

L'équipe « Biomolécules et Cibles Cellulaires Tumorales » étudie les phénomènes impliqués dans la cancérogenèse mammaire et notamment l'effet sur la prolifération de cellules cancéreuses. Les travaux antérieurs menés au laboratoire ont ainsi démontré l'effet anti-prolifératif des chalcones vis-à-vis des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes de type MCF-7 (Pouget et coll., 2001b). Les benzochalcones **C1**, **C3** et **C4** ont fait l'objet d'une étude de leur activité anti-proliférative sur la même lignée cellulaire.

| C1 | | C3 | | C4 | |
|--|-----------------|--|----------------|---|----------------|
| concentrations | % de viabilité | concentrations | % de viabilité | concentrations | % de viabilité |
| 1 μM | 100,0 \pm 2,3 | 1 μM | 95,5 \pm 1,8 | 1 μM | 95,3 \pm 1,4 |
| 5 μM | 92,0 \pm 4,8 | 5 μM | 79,5 \pm 4,5 | 5 μM | 91,5 \pm 5,0 |
| 10 μM | 79,1 \pm 6,2 | 10 μM | 30,4 \pm 4,9 | 10 μM | 68,7 \pm 4,5 |
| 15 μM | 46,0 \pm 5,1 | 15 μM | 20,4 \pm 2,7 | 15 μM | 55,8 \pm 1,8 |
| 20 μM | 24,4 \pm 4,8 | 20 μM | 10,8 \pm 0,4 | 20 μM | 34,6 \pm 5,4 |
| CI₅₀ = 10μM < CI₅₀ < 15μM | | CI₅₀ = 5μM < CI₅₀ < 10 μM | | CI₅₀ = 15μM < CI₅₀ < 20 μM | |

Tableau 8. Activité anti-proliférative des benzochalcones.

Par rapport à la chalcone non substituée, on constate que l'addition d'un hydroxyle en 3 est défavorable à l'effet anti-prolifératif. En revanche, la présence d'un cyano en 4 augmente l'activité, la 3',4'-benzo-4-cyano-2'-hydroxychalcone **C3** étant la plus active des chalcones testées. Ces résultats sont en accord avec les éléments dégagés lors des investigations précédentes réalisées sur le squelette de la 2'-hydroxy-4'-méthoxychalcone. La 4-cyano-2'-hydroxy-4'-méthoxychalcone était en effet la plus active de la série synthétisée avec une CI₅₀ de 11 μM (Pouget, 2001a). Enfin, la comparaison des activités pour ces deux séries de chalcones révèle l'influence favorable du groupement benzo sur le noyau A.

3.3. Les 7,8-benzoflavanones :

3.3.1. Synthèse :

La cyclisation en milieu acide des 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcones conduit à l'obtention des 7,8-benzoflavanones correspondantes (schéma 30).

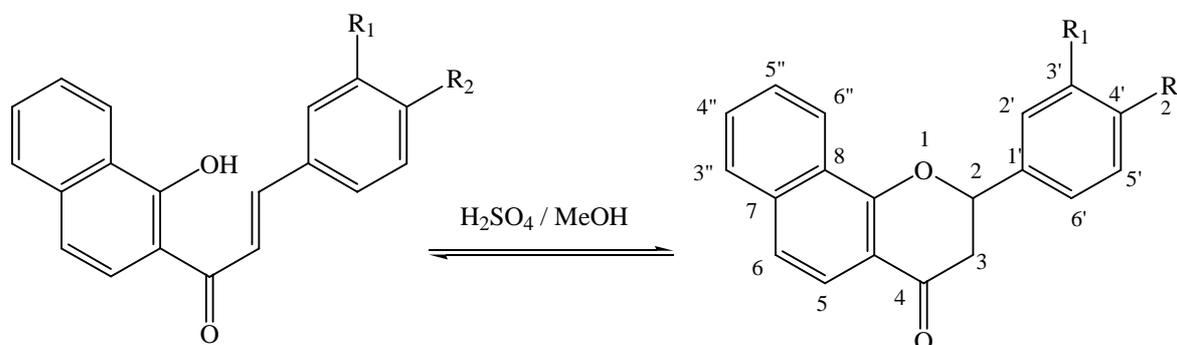


Schéma 30. Synthèse des 7,8-benzoflavanones **F1-F5**.

Pour cette réaction qui est caractérisée par un équilibre chimique, les rendements sont satisfaisants (tableau 9). Seule la 7,8-benzo-4'-cyanoflavanone **F3** présente un rendement inférieur à 50 % qui peut s'expliquer par la présence d'un groupement cyano en *para* du noyau B. Ce groupement exerce un effet -M contraire à celui du carbonyle et rend ainsi le carbone C β moins sensible à l'attaque du doublet de l'oxygène en 2' impliquée dans la cyclisation.

| Composé | R1 | R2 | temps de réaction | Rdt |
|---------|----|----|-------------------|------|
| F1 | H | H | 4 h | 59 % |
| F2 | CN | H | 24 h | 59 % |
| F3 | H | CN | 7 h | 25 % |
| F4 | OH | H | 6 h | 86 % |
| F5 | H | OH | 5 h | 66 % |

Tableau 9. Caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzoflavanones.

3.3.2. Analyse structurale :

La spectroscopie RMN montre les mêmes signaux, caractéristiques de la partie benzo, que ceux décrits pour les chalcones et également trois doublets de doublet, dans la zone aliphatique, caractéristiques des trois protons du noyau hétérocyclique des flavanones, H-3ax, H-3éq et H-2.

Les deux protons H-3ax et H-3éq couplent entre eux avec une constante d'environ 17 Hz et couplent également avec H-2 qui occupe une position axiale (schéma 31). La constante $J_{2,3ax}$ de l'ordre de 13 Hz est en effet caractéristique d'un couplage *trans*-diaxial alors que la constante $J_{2,3eq}$ est voisine de 3,5 Hz.

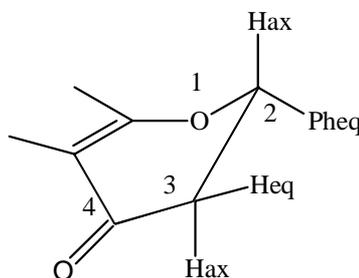


Schéma 31 : Conformation du noyau hétérocyclique des flavanones

3.3.3. Evaluation biologique :

3.3.3.1. Les 7,8-benzoflavanones :

L'ensemble des 7,8-benzoflavanones possède une activité anti-aromatase très intéressante (tableau 10), l'activité de la 7,8-benzoflavanone **F1** est comparable à celle de l'aminoglutéthimide alors que les benzoflavanones substituées sur le noyau B sont plus actives que cette molécule de référence.

L'extension du cycle A par un noyau benzo augmente considérablement l'activité inhibitrice par rapport aux analogues de la 7-hydroxy et de la 7-méthoxyflavanone substitués sur le noyau B. Ainsi, la 4',7-dihydroxyflavanone et la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone possèdent une activité comparable à celle de l'aminoglutéthimide alors que la 7,8-benzo-4'-hydroxyflavanone **F5** est 9 fois plus inhibitrice.

| Flavanones | CI ₅₀ (μM) | Puissance relative (flavanone/AG) |
|------------|-----------------------|-----------------------------------|
| F1 | 4,30 | 1,3 |
| F2 | 1,37 | 4,2 |
| F3 | 1,54 | 3,7 |
| F4 | 0,61 | 9,3 |
| F5 | 0,63 | 9,0 |

Tableau 10. Activité anti-aromatase des 7,8-benzoflavanones.

La nature de la substitution du noyau B influence également l'activité des 7,8-benzoflavanones. En effet, le remplacement du groupement cyano en 3' ou en 4' par un groupement hydroxyle entraîne une amélioration significative de l'effet anti-aromatase : les dérivés hydroxylés **F4** et **F5** sont respectivement deux fois plus actifs que les dérivés cyano **F2** et **F3**. Ces résultats confirment ceux obtenus pour la série 7-méthoxyflavanone (Pouget et coll., 2002c).

Enfin, pour un même motif de substitution, une légère différence d'activité est observée en fonction de la position du substituant sur le noyau B ; la substitution en position 3' semble plus favorable à l'activité anti-aromatase. Ainsi, les composés **F2** (3'-CN) et **F4** (3'-OH) sont respectivement plus actifs que les dérivés **F3** (4'-CN) et **F5** (4'-OH).

| % d'inhibition de l'aromatase en fonction de la concentration | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|
| | 0,2 μM | 0,5 μM | 1 μM | 5 μM | 10 μM | 25 μM | CI ₅₀ (μM) |
| F1 | / | / | 21,8 ± 3,4 | / | 65,9 ± 7,2 | 76,0 ± 3,4 | 4,30 |
| F2 | / | 24,8 ± 0,8 | 43,1 ± 0,1 | 76,0 ± 1,0 | 87,3 ± 0,4 | / | 1,37 |
| F3 | / | 24,8 ± 0,6 | 39,3 ± 2,0 | 79,0 ± 1,0 | 84,4 ± 2,3 | / | 1,54 |
| F4 | / | 44,5 ± 0,1 | 62,1 ± 0,4 | 86,2 ± 1,0 | 92,7 ± 0,5 | / | 0,61 |
| F5 | 23,0 ± 0,8 | 41,5 ± 2,3 | 63,1 ± 0,3 | / | 91,8 ± 2,3 | / | 0,63 |

Tableau 11. Activité inhibitrice de l'aromatase des 7,8-benzoflavanones.

Par ailleurs, l'introduction d'un noyau aromatique supplémentaire sur le noyau A ayant été motivée par la forte activité de la 7,8-benzoflavone, il nous a semblé pertinent de comparer l'effet inhibiteur de cette molécule à celle de la 7,8-benzoflavanone **F1** synthétisée.

3.3.3.2. La 7,8-benzoflavone :

L'évaluation biologique de la 7,8-benzoflavone commerciale, montre qu'elle est deux fois plus active que la flavanone correspondante.

| | CI ₅₀ (μM) | Puissance relative/ AG |
|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 7,8-benzoflavone | 2,0 | 2,9 |
| 7,8-benzoflavanone | 4,3 | 1,3 |

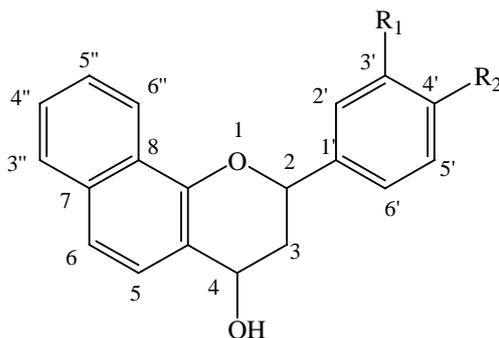
Tableau 12. Activité de la 7,8-benzoflavone et de la flavanone correspondante.

| | <u>% d'inhibition en fonction de la concentration</u> | | | | | |
|-------------------------|---|------------|------------|------------|------------|-----------------------|
| | 0,5 μM | 1 μM | 5 μM | 10 μM | 25 μM | CI ₅₀ (μM) |
| 7,8-benzoflavone | 29,9 ± 1,2 | 34,2 ± 0,5 | 73,1 ± 2,5 | 76,6 ± 3,0 | 79,9 ± 2,4 | 2,0 |

Tableau 13. Activité anti-aromatase de la 7,8-benzoflavone.

3.4. Les 7,8-benzoflavan-4-ols :

Les 7,8-benzoflavanones sont réduites selon la même méthode que celle utilisée lors de la réduction des flavanones précédentes. Comme pour la réduction de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone, il est toutefois indispensable d'opérer à basse température (6°C) pour éviter l'isomérisation de la flavanone en chalcone. Le tableau ci-dessous présente les caractéristiques de la synthèse de ces flavan-4-ols.



| Composé | R1 | R2 | temps de réaction | Rdt |
|---------|----|----|-------------------|------|
| f1 | H | H | 24 h | 81 % |
| f2 | CN | H | 24 h | 64 % |
| f3 | H | CN | 24 h | 81 % |
| f4 | OH | H | 24 h | 93 % |
| f5 | H | OH | 24 h | 81 % |

Tableau 14. Caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzoflavan-4-ols.

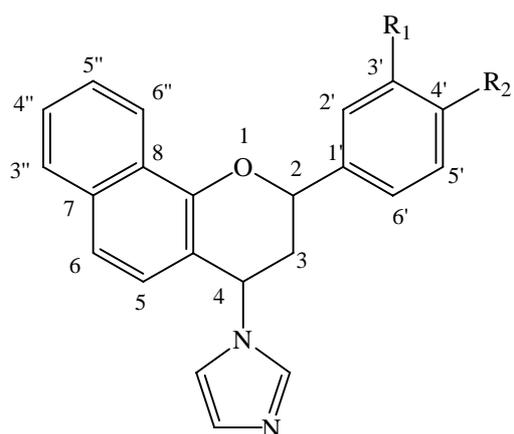
La réduction de la 7,8-benzoflavanone **F1**, des deux dérivés cyano **F2** et **F3** et de la 7,8-benzo-3'-hydroxyflavanone **F4** conduit à l'obtention des 2,4-*cis*-7,8-benzoflavan-4-ols. En revanche, l'action du borohydrure de sodium sur la 7,8-benzo-4'-hydroxyflavanone **F5** donne un mélange d'isomères *cis* et *trans*, résultat déjà constaté lors de la réduction de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone et de la 4',7-dihydroxyflavanone (Pouget, 2001a).

L'analyse des spectres RMN a permis de déterminer un rapport de 50/50 entre les deux isomères. Ceux-ci n'ont pas été séparés mais les spectres réalisés sur le mélange ont néanmoins permis de les caractériser. Comme décrit précédemment pour la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone, l'obtention des deux isomères *cis* et *trans* est liée à la présence du groupement hydroxyle en 4'.

3.5. Les 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes :

3.5.1. Synthèse :

Les 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes **I1-I5** sont obtenus par action du 1,1'-carbonyldiimidazole sur les 7,8-benzoflavan-4-ols **f1- f5** (tableau 15). La préparation de ces composés s'est toutefois révélée plus difficile à réaliser que celle des 4-imidazolylflavanes précédemment décrits.



| composé | R1 | R2 |
|-----------|----|----|
| I1 | H | H |
| I2 | CN | H |
| I3 | H | CN |
| I4 | OH | H |
| I5 | H | OH |

Tableau 15. Les 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes.

La première molécule synthétisée est le 7,8-benzo-4-imidazolylflavane **I1**. Lors des premiers essais, la réaction entre le 2,4-*cis*-7,8-benzoflavan-4-ol **f1** et le CDI pendant 4 heures a semblé ne donner aucun nouveau produit. En réalité, après purification et analyse, il s'avère que le produit récupéré avec un rendement de 76 % est bien un flavan-4-ol mais de configuration 2,4-*trans*. En augmentant le temps de réaction, le composé imidazolé **I1** est cette fois obtenu (Rdt : 21 %), accompagné du 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ol (Rdt : 40 %).

Le tableau suivant indique les caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes :

| Composés | R1 | R2 | nb d'éq* de CDI | temps de réaction |
|----------|----|----|-----------------|-------------------|
| I1 | H | H | 4 | 2 jours |
| I2 | CN | H | 20 | 19 heures |
| I3 | H | CN | 10 | 19 heures |
| I4 | OH | H | 12 | 4 jours |
| I5 | H | OH | 4 | 6 heures |

* : nombre d'équivalent

Tableau 16. Caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes.

Les autres 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes sont synthétisés avec des rendements modérés (tableau 17) et la réaction qui permet de les obtenir engendre plus ou moins de 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ol. Il faut également préciser qu'une partie du 2,4-*cis*-flavan-4-ol de départ ne réagit pas ; lors de la purification, celui-ci se dégrade en flav-3-ène. Enfin, il est intéressant de noter que la chromatographie sur couche mince permet de distinguer les deux flavan-4-ols *cis* et *trans* : une différence de R_F notable est observée (tableau 18). L'isomère *cis* est systématiquement moins polaire que l'isomère *trans*.

| Substitutions | Imidazolé | Rdt | Flavan-4-ol 2,4- <i>trans</i> | Rdt |
|---------------|-----------|------|----------------------------------|------|
| Non substitué | I1 | 21 % | f1 <i>t</i> | 40 % |
| 3'-cyano | I2 | 17 % | f2 <i>t</i> | 57 % |
| 4'-cyano | I3 | 37 % | f3 <i>t</i> | 9 % |
| 3'-hydroxy | I4 | 33 % | f4 <i>t</i> | 16 % |
| 4'-hydroxy | I5 | 46 % | f5 <i>t</i> | 19 % |

Tableau 17. Rendements réactionnels des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes et des 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ols.

| Substitution | R_F <i>cis</i> -flavan-4-ol | R_F <i>trans</i> -flavan-4-ol | Système |
|---------------|-------------------------------|---------------------------------|---|
| Non substitué | 0,41 | 0,37 | Toluène-EtOAc 10 % |
| 3'-CN | 0,60 | 0,57 | CH ₂ Cl ₂ -EtOAc 20 % |
| 4'-CN | 0,62 | 0,60 | CHCl ₃ -MeOH 2,5 % |
| 3'-OH | 0,57 | 0,50 | CH ₂ Cl ₂ -MeOH 5 % |
| 4'-OH | 0,52 | 0,42 | CHCl ₃ -MeOH 5 % |

Tableau 18. Rapports frontaux des 2,4-*cis*-7,8-benzoflavan-4-ols et de leurs isomères 2,4-*trans*.

3.5.2. Analyse structurale :

La réaction de substitution réalisée sur les 2,4-*cis*-7,8-benzoflavan-4-ols présente certaines spécificités en fonction du composé de départ. Si elle est réalisée sur les flavanols **f1** et **f4**, elle conduit d'une part aux 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolylflavanes **I1** et **I4** et d'autre part aux 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ols correspondants. Par contre, les 7,8-benzo-4-

imidazolyflavanes **I2**, **I3** et **I5** sont obtenus sous forme d'un mélange *cis* et *trans*, accompagné là encore du 2,4-*trans*-flavan-4-ol.

La détermination des configurations 2,4-*cis* et 2,4-*trans* des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes est établie d'après les données RMN des protons de l'hétérocycle C.

Il est important de préciser que pour les flavan-4-ols (configuration *cis* ou *trans*), le proton H-3eq est déblindé par rapport au proton H-3ax. Il en est de même pour le proton H-2 par rapport au proton H-4. Ensuite, contrairement à un 2,4-*cis*-flavan-4-ol, un composé 2,4-*trans* présente une constante de couplage $J_{3eq,2}$ proche de la constante $J_{3eq,4}$, ce qui explique la résonance de H-3eq sous la forme d'un doublet de triplet. De la même façon, pour un isomère *trans*, le couplage entre H-4 et H-3eq similaire à celui entre H-4 et H-3ax (lié à la position quasi-équatoriale de H-4) explique la résonance de H-4 sous la forme d'un triplet élargi.

Ces caractéristiques sont reportées dans le tableau ci-dessous (tableau 19) et peuvent être comparées à celles des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes (tableau 20).

| | H-3ax | H-3eq | H-4 | H-2 |
|---------------------------|--------------|--------------|------------|------------|
| Isomère 2,4- <i>cis</i> | ddd | ddd | dd | dd |
| Isomère 2,4- <i>trans</i> | ddd | dt | t él | dd |

Tableau 19. Données RMN des protons de l'hétérocycle C des 2,4-*cis* et 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ols.

| | H-3ax | H-3eq | H-4 | H-2 |
|---------------------------|--------------|--------------|------------|------------|
| Isomère 2,4- <i>cis</i> | dt | ddd | dd | d él |
| Isomère 2,4- <i>trans</i> | ddd | dt | t él | dd |

Tableau 20. Données RMN des protons de l'hétérocycle C des 2,4-*cis* et 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolyflavanes.

Ainsi, on observe que pour un 7,8-benzo-4-imidazolyflavane (configuration *cis* ou *trans*), le proton H-4 est cette fois plus déblindé que le proton H-2, comme déjà observé pour les 4-imidazolyflavanes. On constate également que pour un isomère *cis*, H-3eq est toujours

plus déblindé par rapport à H-3ax alors que pour un isomère *trans*, le phénomène contraire est observé.

Enfin, il apparaît que, pour un isomère 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolyflavane, la nature des signaux pour les protons H-2, H-3ax, H-3eq et H-4 est identique à celle des signaux pour un 2,4-*trans*-flavan-4-ol. Ce n'est pas le cas entre un 2,4-*cis*-flavan-4-ol et un 2,4-*cis*-7,8-benzo-4-imidazolyflavane : pour ce dernier, H-3ax résonne sous la forme d'un doublet de triplet (ddd pour un flavan-4-ol) ce qui implique une valeur très voisine pour $J_{3ax,2}$ et $J_{3ax,4}$.

A l'image des deux isomères *cis* et *trans* du 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol (cf. II.1.2.2), une différence de déplacement chimique pour le carbone C-2 entre les deux isomères *cis* et *trans* des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes est également observée. Le carbone C-2 de la forme *trans* est blindé par rapport à celui de la forme *cis*. Ce blindage était dû pour les flavan-4-ols à l'effet γ -gauche de l'hydroxyle (4-OH) en position pseudo-axial ; pour les 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolyflavanes, le groupement imidazolé toujours en position quasi-axiale doit être à l'origine de ce blindage. Le tableau ci-dessous illustre les déplacements chimiques du carbone C-2 des isomères 2,4-*cis* et 2,4-*trans* des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes.

| | 2,4- <i>cis</i> | 2,4- <i>trans</i> |
|------------|-----------------|-------------------|
| I2 (3'-CN) | 76,3 | 72,4 |
| I3 (4'-CN) | 77,8 | 72,7 |
| I5 (4'-OH) | 77,1 | 73,2 |

Tableau 21. Déplacements chimiques (ppm) des carbones C-2 des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes.

3.5.3. Mécanismes :

3.5.3.1. Obtention des 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolyflavanes à partir de 2,4-*cis*-7,8-benzoflavan-4-ols :

L'inversion de configuration qui permet d'obtenir un imidazolé de configuration *trans* est due à une réaction de substitution nucléophile de type SN_2 , l'agent nucléophile étant un ion imidazole libéré après attaque du carbonyldiimidazole par l'oxygène (cf. II. 1.2.3).

3.5.3.2. Formation des 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ols lors de la réaction de substitution :

La formation de 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ols peut s'expliquer par la production d'une seconde réaction de type SN₂ en compétition avec la première, où l'entité nucléophile est une molécule d'eau. La présence de traces d'eau dans les réactifs semble être une explication possible. La déprotonation de l'oxonium intermédiaire par l'ion imidazolyl toujours présent dans le milieu réactionnel génère le *trans* flavan-4-ol et l'imidazole, composé identifié lors de la synthèse du dérivé 3'-cyano (schéma 32).

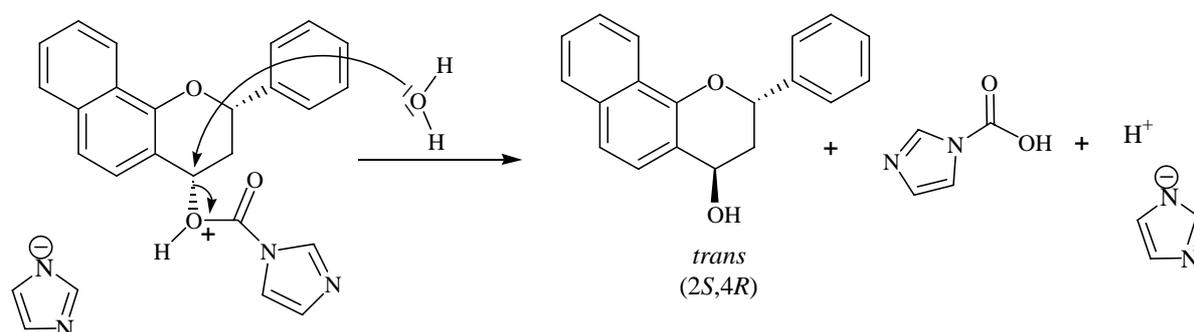


Schéma 32. Mécanisme d'obtention des 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ols.

3.5.3.3. Obtention des 2,4-*cis*-7,8-benzo-4-imidazolylflavanes :

La substitution des 2,4-*cis*-flavan-4-ols **f2** et **f3** conduit à un mélange d'isomères imidazolés *cis* et *trans*. L'obtention des 2,4-*cis*-7,8-benzo-4-imidazolylflavanes est due à la réaction de type SN₂ sur les *trans*-flavan-4-ols formés dans le milieu réactionnel. La substitution est cependant plus difficile dans ce cas, car l'attaque par l'ion imidazole du côté opposé au groupement hydroxyle est gênée par l'encombrement stérique du noyau B (schémas 33 et 34). Ainsi, pour ces dérivés 4'-CN et 3'-CN, l'imidazolé *trans* est majoritaire (81 et 73 % respectivement) par rapport à l'isomère *cis*.

Pour le dérivé 4'-OH, la substitution est réalisée sur le mélange 50/50 *cis* et *trans* de flavan-4-ols obtenu après réduction de la flavanone ; elle aboutit à un mélange 50/50 *cis/trans* du 7,8-benzo-4'-hydroxy-4-imidazolylflavane. Ces résultats sont en adéquation avec les mécanismes décrits ci-après.

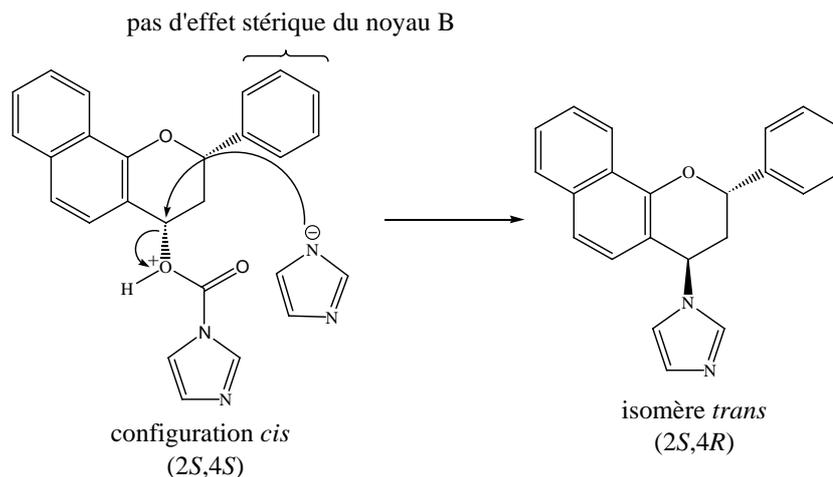


Schéma 33. Obtention du 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolylflavane à partir de 2,4-*cis*-7,8-benzoflavan-4-ol.

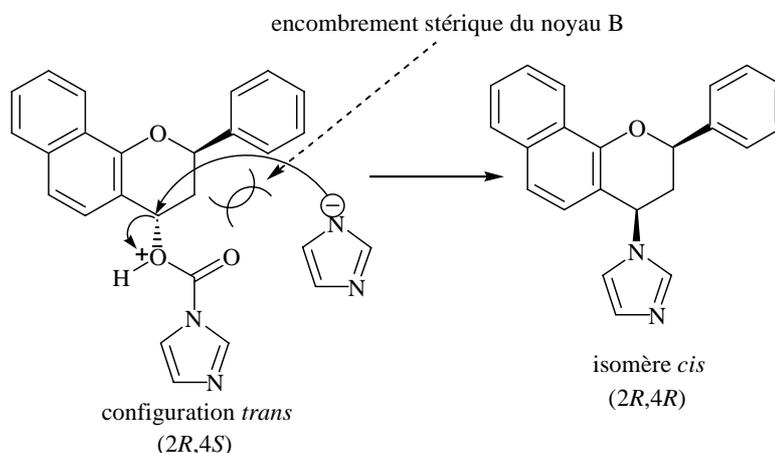


Schéma 34. Obtention du 2,4-*cis*-7,8-benzo-4-imidazolylflavane à partir de 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ol.

3.5.3.4. Cas particulier de l'imidazolé I2 :

Pour le dérivé 3'-cyano **I2**, la synthèse, réalisée à partir du 2,4-*cis*-flavan-4-ol aboutit à la formation du 2,4-*trans*-flavan-4-ol avec un rendement de 57 % et à un mélange d'isomères *cis* et *trans* de l'imidazolé avec un rendement de 17 %. La quantité importante de 2,4-*trans*-flavan-4-ol nous a amenés à effectuer la substitution sur ce composé, réaction qui a conduit à nouveau à un mélange d'isomères d'imidazolés avec un rendement de 37 %. Ce résultat confirme qu'un *trans* imidazolé peut être obtenu à partir d'un *trans*-flavan-4-ol (cf. II-1.2.3 ; synthèse des 4-imidazolylflavanes). Ceci implique probablement la formation d'un carbocation suivie d'une attaque nucléophile de l'hétérocycle azoté du côté le moins encombré c'est à dire du côté opposé au phényle en 2.

3.5.4. Essais de purification :

Les résultats précédents nous ont incités à concentrer nos efforts sur la purification des isomères *cis* et *trans* des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes afin de pouvoir étudier l'influence de la stéréochimie de nos molécules sur l'activité anti-aromatase.

Lors de nos essais de purification, seuls les isomères du dérivé 4'-cyano **I3** ont pu être isolés avec des rendements de 30 % pour l'isomère *trans* **I3t** et de 7 % pour l'isomère *cis* **I3c**. Cette purification a été effectuée par CCM sur silice avec un système éluatif CHCl₃/MeOH (97,5/2,5). Pour le dérivé 3'-cyano **I2**, après purification par CCM sur silice (CH₂Cl₂/EtOAc – 80/20), deux fractions sont recueillies, l'une où l'isomère *trans* **I2t** est majoritaire à 83 % et l'autre où l'isomère *cis* **I2c** est majoritaire à 71 %.

Enfin, après réaction entre le 7,8-benzo-4'-hydroxyflavan-4-ol **f5** (mélange *cis/trans*, 50/50) et le carbonyldiimidazole, le milieu réactionnel est évaporé et le résidu est lavé successivement par de l'acétate d'éthyle, du dichlorométhane et du méthanol. Ce lavage aboutit d'une part, à un précipité blanc qui correspond à l'imidazolé **I5** (mélange d'isomères 50/50) et d'autre part, à une solution contenant **I5** et **f5** qui subit plusieurs séparations par CCM afin d'isoler **I5**. Les deux fractions de **I5** sont rassemblées car elles correspondent toutes deux à un mélange *cis/trans* dans les mêmes proportions. L'évaluation biologique de **I5** est réalisée sur ce mélange. Lors d'une deuxième synthèse, le même schéma de purification est suivi mais conduit cette fois à un mélange d'imidazolés où l'isomère *trans* est majoritaire (rapport 77/23). Le premier essai de purification de ce mélange par CCM n'ayant pas permis de séparer les deux isomères, deux autres méthodes sont envisagées, l'une par HPLC, l'autre par séparation sur plaques commerciales. Cette opération permet d'obtenir trois produits en quantité trop faible pour permettre une analyse structurale par RMN. Les essais de purification par HPLC, rendus compliqués par la faible solubilité de **I5**, se sont limités au mode analytique ; il semble toutefois que cette méthode permet la séparation des isomères *cis* et *trans* de **I5** (cf chromatogramme, schéma 35). Ces résultats encourageants nous incitent à poursuivre dans cette voie de séparation par HPLC.

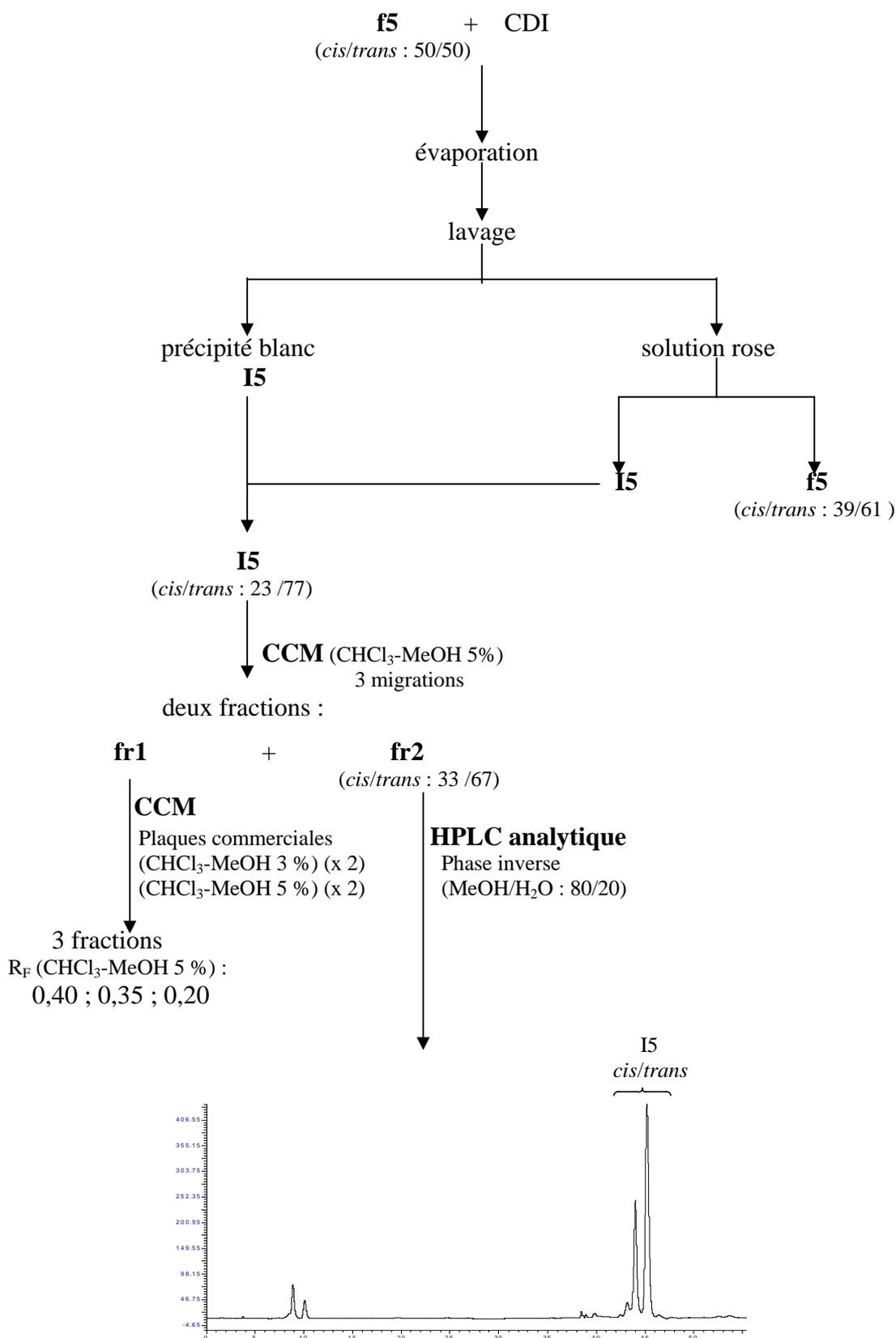


Schéma 35. Essais de purification du composé **I5**.

Le tableau suivant indique la nature des différents 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes obtenus après purification.

| | |
|-------------------------|--|
| Composés | |
| Non substitué I1 | 100 % <i>trans</i> |
| 3'-cyano I2 | I2a (83 % <i>trans</i> - 17 % <i>cis</i>), I2b (71 % <i>cis</i> - 29 % <i>trans</i>) |
| 4'-cyano I3 | I3a (100 % <i>trans</i>) + I3b (100 % <i>cis</i>) |
| 3'-hydroxy I4 | 100 % <i>trans</i> |
| 4'-hydroxy I5 | I5a (50 % <i>trans</i> -50 % <i>cis</i>) + I5b (77 % <i>trans</i> -23 % <i>cis</i>) |

Tableau 22. Nature des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes obtenus.

3.5.5. Evaluation biologique :

L'évaluation biologique des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes montre que ces composés présentent une activité anti-aromatase supérieure à celle des 7,8-benzoflavanones correspondantes et qu'ils sont beaucoup plus actifs que l'aminoglutéthimide, leur puissance relative variant de 11 à 178.

| Flavanones | CI ₅₀ (µM) | 4-imidazolylflavanes | CI ₅₀ (µM) | Puissance relative (imidazolés / à AG) |
|------------|-----------------------|---|-----------------------|--|
| F1 | 4,30 | I1 (100 % <i>trans</i>) | 0,036 | 158 |
| F2 | 1,37 | I2a (83 % <i>trans</i> - 17 % <i>cis</i>) | 0,084 | 68 |
| | | I2b (29 % <i>trans</i> - 71 % <i>cis</i>) | 0,395 | 14 |
| F3 | 1,54 | I3a (100 % <i>trans</i>) | 0,034 | 168 |
| | | I3b (100 % <i>cis</i>) | 0,534 | 11 |
| | | I3c (50 % <i>trans</i> - 50 % <i>cis</i>)* | 0,078 | 73 |
| F4 | 0,61 | I4 (100 % <i>trans</i>) | 0,043 | 133 |
| F5 | 0,63 | I5a (50 % <i>trans</i> - 50 % <i>cis</i>) | 0,032 | 178 |

* : mélange composé à partir de **I3a** et **I3b**

Tableau 23. Activité anti-aromatase des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes.

Le remplacement du groupe carbonyle en 4 par un hétérocycle azoté tel que l'imidazole entraîne donc une augmentation significative de l'activité inhibitrice vis-à-vis de l'aromatase. D'autres facteurs peuvent intervenir tels que la nature et la position des substituants ainsi que la stéréochimie des composés.

En ce qui concerne la nature et la position des substituants, seules les activités des imidazolés de même configuration ou des mélanges de même composition peuvent être comparées. Ainsi, il apparaît que l'activité des composés **I3a** et **I4** est comparable à celle du dérivé **I1** qui, bien que non substitué, se révèle déjà un puissant inhibiteur de l'aromatase. L'addition d'un cyano en 4' ou d'un hydroxyle en 3' influence donc peu l'activité anti-aromatase. D'autre part, un groupement hydroxyle en 4' est plus favorable qu'un 4'-cyano (**I5a** vs **I3c**).

Concernant l'influence de la configuration des molécules synthétisées sur l'activité anti-aromatase, des éléments indiscutables ressortent de nos travaux ; pour l'évaluation des fractions en mélange, les résultats doivent être certes consolidés, mais se révèlent encourageants. D'une façon générale, les résultats indiquent que la configuration *trans* est beaucoup plus favorable à l'activité biologique que la configuration *cis*. Ce constat est clairement illustré par l'activité du composé **I3** pour lequel l'isomère *trans* est 16 fois plus actif que l'isomère *cis*. L'évaluation biologique de **I2** est réalisée sur les deux fractions **I2a** (*trans* majoritaire) et **I2b** (*cis* majoritaire). L'activité de **I2a** est 5 fois supérieure à celle de **I2b**, confirmant les résultats précédents.

La plupart des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes sont de puissants inhibiteurs de l'aromatase avec des CI_{50} voisines de 0,040 μ M, donc proches de celle du létrozole ($CI_{50} = 0,018 \mu$ M), molécule de référence dans le traitement du cancer du sein. Une molécule retient plus particulièrement notre attention, il s'agit du 7,8-benzo-4'-hydroxy-4-imidazolylflavane **I5**. Seule une fraction correspondant à un mélange 50/50 des deux isomères *cis* et *trans* a pu être testée et celle-ci s'avère la plus active parmi l'ensemble des fractions évaluées ($CI_{50} = 0,032 \mu$ M). Si l'on extrapole les résultats précédents, on peut considérer qu'un isomère *trans* est toujours plus actif qu'un isomère *cis* ; l'isomère *trans* du dérivé 4'-OH **I5t** présenterait ainsi une CI_{50} inférieure à 0,032 μ M. Pour confirmer cette hypothèse, il nous a semblé intéressant de réaliser un mélange **I3c** en proportions égales des deux isomères *cis* et *trans* du dérivé 4'-cyano pour lesquels la CI_{50} a été déterminée. La mesure de l'activité biologique de **I3c** indique que ce mélange se révèle 2 fois moins actif que l'isomère *trans* **I3a**. Il nous est

alors permis d'estimer que l'isomère *trans* du dérivé 4'-OH présente une activité 2 fois supérieure à celle du mélange 50/50 soit une CI_{50} proche de 0,016 μ M donc comparable à celle du létrozole. Il est évident que seules la séparation des deux isomères et leur évaluation biologique pourront asseoir ces hypothèses.

Les 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes de configuration 2,4-*trans* présentent une activité anti-aromatase très supérieure à celle des analogues 2,4-*cis*. Ces composés 2,4-*trans* sont probablement obtenus sous forme d'un mélange racémique de deux énantiomères 2*R*,4*S* et 2*S*,4*R*. Au delà de la configuration *cis* et *trans*, l'énantiométrie de ces molécules devrait influencer l'activité biologique à l'image d'autres composés inhibiteurs cités précédemment (cf. I-1.1). La séparation des énantiomères de **15** pourrait alors permettre d'obtenir un composé plus actif *in vitro* que le létrozole.

4. Essais de modulation des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes :

4.1. 7,8-benzo-4-imidazolyflav-2-ènes :

Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'intérêt du noyau aromatique supplémentaire sur le noyau A :

- les 7,8-benzoflavanones présentent une activité supérieure à celle des flavanones évaluées précédemment (substituées sur le noyau A en position 7 par un groupement hydroxyle ou méthoxy) ;
- les 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolyflavanes se révèlent plus actifs que les 7-méthoxy-4-imidazolyflavanes identiquement substitués sur le noyau B. Parmi tous les composés que nous avons synthétisés, ces 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolyflavanes sont les molécules les plus inhibitrices de l'aromatase.

D'autre part, nous avons effectué l'évaluation de la 7,8-benzoflavone, molécule commerciale, et cette molécule s'est avérée deux fois plus active que la 7,8-benzoflavanone **F1** synthétisée.

L'ensemble de ces résultats nous a confortés dans notre objectif de synthèse de 7,8-benzo-4-imidazolyflav-2-ènes, autrement dit l'introduction d'une double liaison en position 2,3 sur le squelette 7,8-benzo-4-imidazolyflavane.

L'analyse rétrosynthétique pour ces 7,8-benzo-4-imidazolyflav-2-ènes nous permet de nous orienter vers deux voies de synthèse :

- la première implique une réduction sélective de la fonction carbonyle des 7,8-benzoflavones suivie d'une substitution de l'hydroxyle obtenu par le motif imidazolé (schéma 36, voie a) ;
- la seconde est une oxydation directe des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes (schéma 36, voie b).

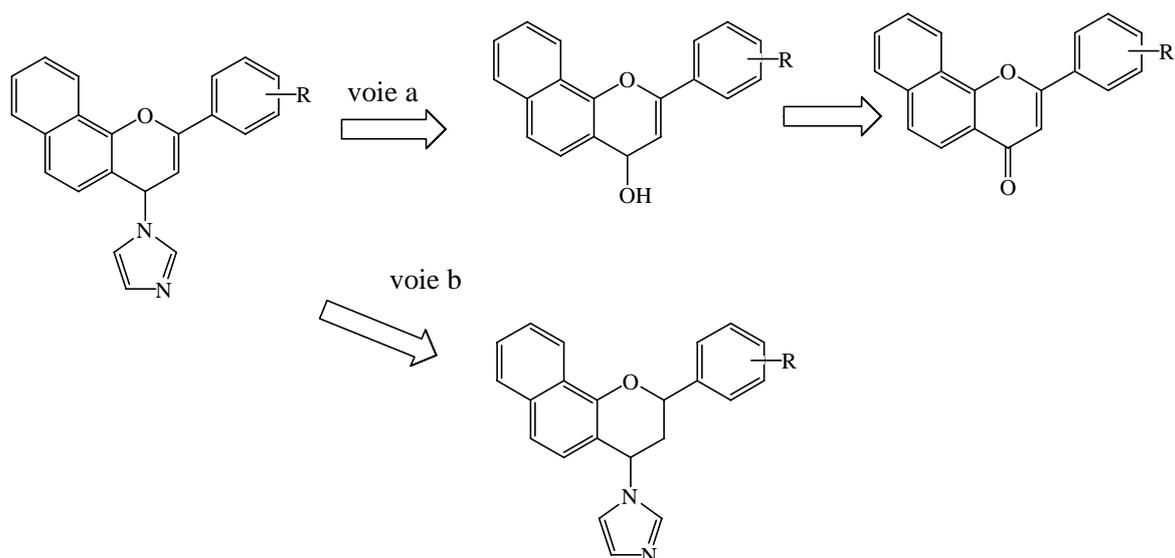


Schéma 36. Rétrosynthèse des 7,8-benzo-4-imidazolylflav-2-ènes.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'effectuer des essais de réduction sur la 7,8-benzoflavone. Celle-ci est une cétone α,β -insaturée ; la réduction doit être sélective sur la fonction carbonyle (réduction 1,2) pour obtenir un alcool allylique et ne pas concerner la double liaison, ce qui aboutirait à un alcool saturé.

4.1.1. Rappels bibliographiques :

L'agent réducteur utilisé, lors de nos synthèses, pour la réduction du carbonyle des flavanones est le borohydrure de sodium. Celui-ci peut aussi être mis en jeu pour la réduction de cétones α,β -éthyléniques ; cependant, la réaction peut conduire à des mélanges d'alcools (Seyden-Penne, 1988).

Des travaux ont étudié la régiosélectivité de la réaction en utilisant le borohydrure de sodium dans différents solvants. Ainsi, la réduction de la cyclohex-2-ène dans l'éthanol aboutit à un alcool allylique et à un alcool saturé dans un rapport 51/49 (Luche, 1978) alors que la réaction dans le THF (Nutaitis et Bernardo, 1989) augmente la sélectivité en faveur de l'addition 1,2 (rapport 71/29). Des dérivés du NaBH_4 , notamment des (acyloxy)-borohydrures, sont également utilisés et favorisent une réduction 1,2 (Nutaitis et Bernardo, 1989). Ainsi, la cyclohex-2-ène et la 3-méthylcyclohex-2-ène sont soumises à l'action du mono-, du di- et du triacétoxyborohydrure de sodium, générés par l'addition d'une quantité adéquate d'acide acétique glacial sur une suspension de NaBH_4 dans le THF anhydre. La

régiosélectivité la plus importante est obtenue avec le mono- et le triacétoxyborohydrure de sodium (tableau 24).

| composé | Rapport addition 1,2 / addition 1,4 | |
|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | avec NaBH ₃ (OAc) | avec NaBH(OAc) ₃ |
| cyclohex-2-ènone | 97/3 | 97/3 |
| 3-méthylcyclohex-2-ènone | 96 /4 | 98/2 |

Tableau 24. Réduction de cétones α,β -insaturées par des acétoxyborohydrures de sodium.

D'autres méthodes mettant en jeu le borohydrure de sodium sont utilisées pour la réduction des cétones α,β -éthyléniques en alcools allyliques. On peut citer les systèmes suivants :

- NaBH₄/MeOH/THF : une exaltation du pouvoir réducteur du borohydrure de sodium dans le THF à chaud, par addition de méthanol, après reflux de la solution, est observée (Seyden-Penne, 1988) ;

- NaBH₄/ halogénures de terres rares : parmi les lanthanides testés, le samarium et le cérium offrent les meilleures possibilités en terme de rapport rendement/sélectivité (Luche, 1978). Par exemple, la réduction de la cyclohex-2-ènone par le NaBH₄ seul aboutit à un rapport alcool allylique / alcool saturé de 51/49 ; en présence de chlorure de samarium hexahydraté, le rapport est largement en faveur de la réduction 1,2 (rapport 93/7). Enfin, la réduction est régiospécifique (addition 1,2) avec du chlorure de cérium ; de telles conditions sont notamment appliquées lors de la réduction du carbonyle en 3 de certains stéroïdes (Gemal et Luche, 1979).

D'autres dérivés de borohydrure interviennent dans les réductions de cétones α,β -éthyléniques tels que :

- NaBH₃CN ; ce réactif conduit toutefois à des mélanges d'alcools pour certaines énonés cycliques (Hutchins et Kandasamy, 1975) ;

- le borohydrure de zinc sur gel de silice ; là encore, les deux types d'addition sont observées (Ranu et Das, 1991) ;

- le borohydrure de diisopropoxytitane dans le dichlorométhane à -20 °C (Ravikumar et coll., 1993) ; ces conditions permettent d'obtenir exclusivement des alcools allyliques avec d'excellents rendements ;

- LiBH_4 ; ce réactif mis en œuvre dans la réduction d'isoflavones conduit en fait à des isoflavan-4-ols (Wähälä et coll., 1997).

Enfin, des systèmes réducteurs totalement différents ont été étudiés à l'image :

- du complexe diméthylphénylphosphine-hydrure de cuivre qui catalyse l'hydrogénation de cétones α,β -insaturées en alcools allyliques (Chen et coll., 2000) ;
- des catalyseurs au platine et au palladium sur alumine (Von Arx et coll., 1999).

4.1.2. Essais de synthèse :

Pour les essais de réduction de la 7,8-benzoflavone, le borohydrure de sodium a été utilisé, dans différents solvants ; le premier essai effectué dans l'éthanol en présence de 30 équivalents de NaBH_4 n'a abouti à aucune réaction. L'essai réalisé dans le THF s'est également avéré négatif tout comme la réaction dans le THF + acide acétique glacial (rapport $\text{NaBH}_4/\text{AcOH}$: 1/1).

Ces essais de réduction à l'aide de NaBH_4 doivent être poursuivis et peut-être effectués sur la flavone non substituée ; d'autres agents réducteurs doivent être testés afin d'obtenir l'alcool allylique désiré. La protection de la double liaison, par addition d'halogènes, a été également envisagée afin de réduire plus facilement le carbonyle et d'obtenir l'énol après déprotection (schéma 37).

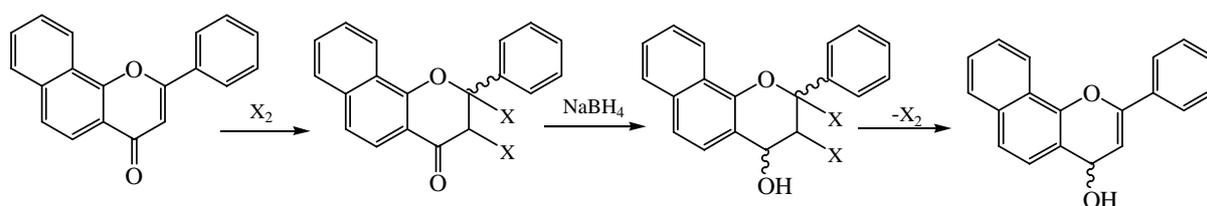


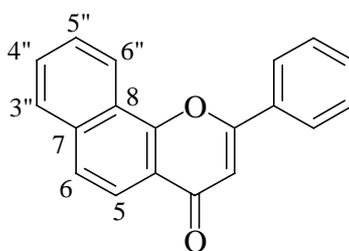
Schéma 37. Synthèse du 7,8-benzoflav-2-én-4-ol.

Enfin, l'oxydation des 4-imidazolylflavanes (schéma 36, voie b) reste à explorer car cette synthèse nécessite une seule étape. L'utilisation du système I_2/DMSO pour oxyder les flavanones en flavones (Doshi et coll., 1986), nous a amenés à effectuer un tel essai sur le 7-méthoxy-4-imidazolylflavane, essai qui a finalement abouti à la décomposition du produit de départ. D'autres essais d'oxydation doivent être réalisés.

4.2. Synthèse des dérivés hydroxylés du 7,8-benzo-4-imidazolylflavane :

La 7,8-benzoflavone (α -naphthoflavone) est un puissant inhibiteur compétitif de l'aromatase (Nesnow et coll., 1983 ; Kellis et Vickery, 1984 ; Campbell et Kurzer, 1993). Une étude concernant l'activité anti-aromatase des dérivés de la 7,8-benzoflavone (Kellis et coll., 1986), a montré que :

- le noyau fusionné en 7,8 de l' α -naphthoflavone est essentiel pour l'activité anti-aromatase ;
- la substitution de la 7,8-benzoflavone par un groupement hydroxyle influence l'inhibition de l'aromatase.

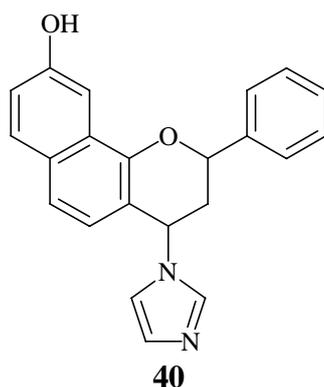


7,8-benzoflavone

L'hydroxylation de la 7,8-benzoflavone en position 6'' n'a pas d'influence sur l'activité, alors que l'hydroxylation en position 5, 6, 3'', ou 4'' réduit significativement l'effet inhibiteur. La 7,8-benzoflavone présente une CI_{50} de l'ordre de 70 nM ; l'addition d'un groupement hydroxyle en position 5'' augmente considérablement l'activité puisque la CI_{50} de la 7,8-benzo-5''-hydroxyflavone est de l'ordre de 20 nM.

Plusieurs études concernant l'activité inhibitrice de l'aromatase de certains flavonoïdes ont montré que la 7,8-benzoflavone et son dérivé hydroxylé en 5'' sont les inhibiteurs les plus actifs (Kellis et coll., 1986 ; Hodek et coll., 2002).

A partir de ces résultats, l'introduction d'un groupement hydroxyle en position 5'' sur le squelette 7,8-benzo-4-imidazolylflavane a été envisagée afin d'améliorer l'effet anti-aromatase.



7,8-benzo-5''-hydroxy-4-imidazolylflavane

La stratégie de synthèse est basée sur la substitution du 1,7-dihydroxynaphtalène **41** en position 2 par un groupement acétyle pour obtenir la 1-(1,7-dihydroxy-2-naphtyl)éthanone **42** (Le Mahieu, 1984), suivie de la condensation de cette molécule avec un benzaldéhyde selon le même schéma réactionnel utilisé pour la préparation des 7,8-benzoflavanones précédentes (schéma 38).

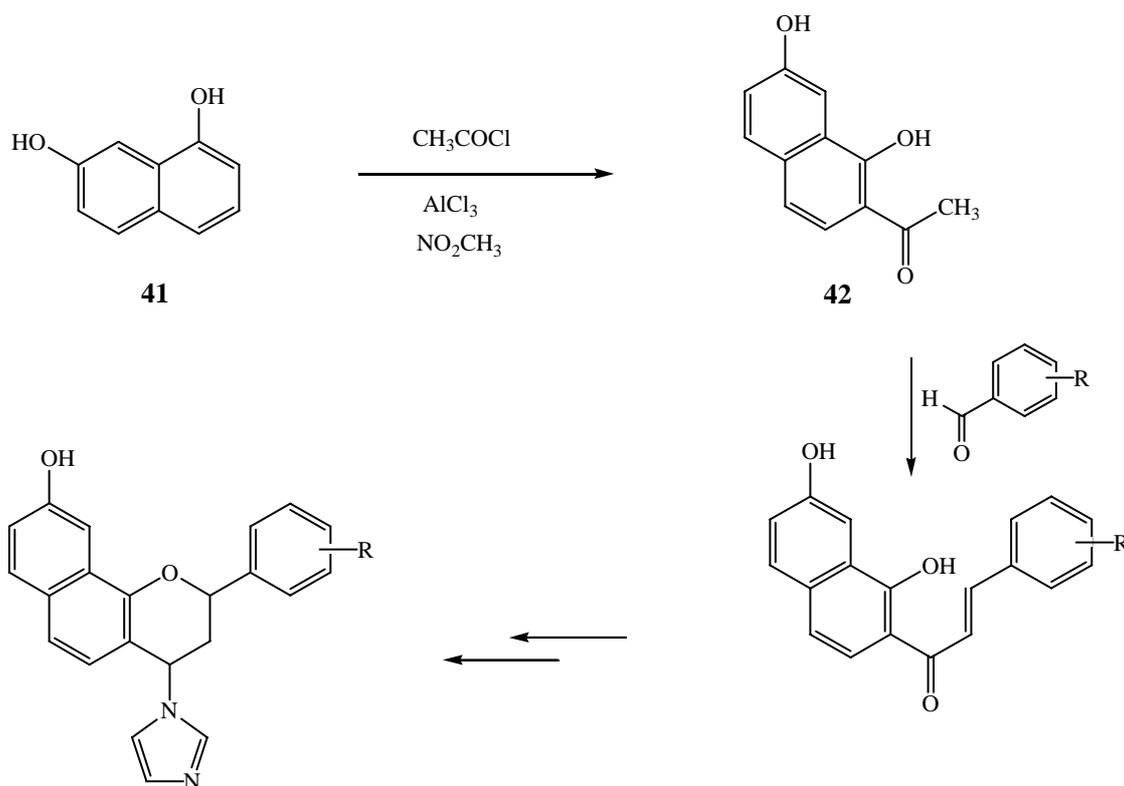


Schéma 38. Stratégie de synthèse des 7,8-benzo-5''-hydroxy-4-imidazolylflavanes.

Deux essais d'acétylation ont été entrepris, l'un dans le chloroforme, l'autre dans le dichlorométhane. Dans les deux cas, plusieurs produits de polarité très voisine ont été obtenus, contrairement à ce qui est décrit dans les travaux de Le Mahieu ; l'effet activant des deux groupements hydroxyle du 1,7-dihydroxynaphtalène favorise en effet les polysubstitutions. Il faut néanmoins préciser que la réaction de référence a lieu dans le nitrométhane, solvant qui doit donc jouer un rôle important sur la régiosélectivité de la substitution.

La difficulté de séparation des différents produits obtenus n'a pas permis d'identifier le composé attendu. Des essais de purification et de synthèse dans d'autres solvants doivent être menés.

III. Discussion :

Les travaux antérieurs menés au laboratoire de Pharmacognosie, ont concerné la pharmacomodulation des flavonoïdes, avec dans un premier temps, la modulation du noyau B. L'étude des relations structure-activité a mis en évidence l'influence d'un hydroxyle en position 4' sur l'effet anti-aromatase, influence qui s'avère dépendre du motif de substitution du noyau A (en l'occurrence un hydroxyle ou un méthoxy en position 7). D'autre part, ces travaux ont permis le développement d'une nouvelle famille d'inhibiteurs de l'aromatase : les 2,4-*trans*-4-imidazolylflavanes. Le composé le plus actif de cette série, le 4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane, présente une puissance relative de 130 par rapport à l'aminoglutéthimide, premier inhibiteur utilisé en clinique. L'intérêt de ces molécules nous a incités à entreprendre la modulation du squelette 4-imidazolylflavane.

Ci-dessous, nous présentons la structure de ce squelette afin de mettre en évidence les sites pharmacophores mais également les régions à moduler en vue d'augmenter l'effet anti-aromatase. Ce schéma respecte l'hypothèse selon laquelle les noyaux C et A du squelette flavane miment respectivement les noyaux C et D du substrat stéroïdien (Kao et coll., 1998), dont la structure est également présentée afin de préciser les éléments responsables de l'interaction avec l'aromatase (Laughton et coll., 1993).

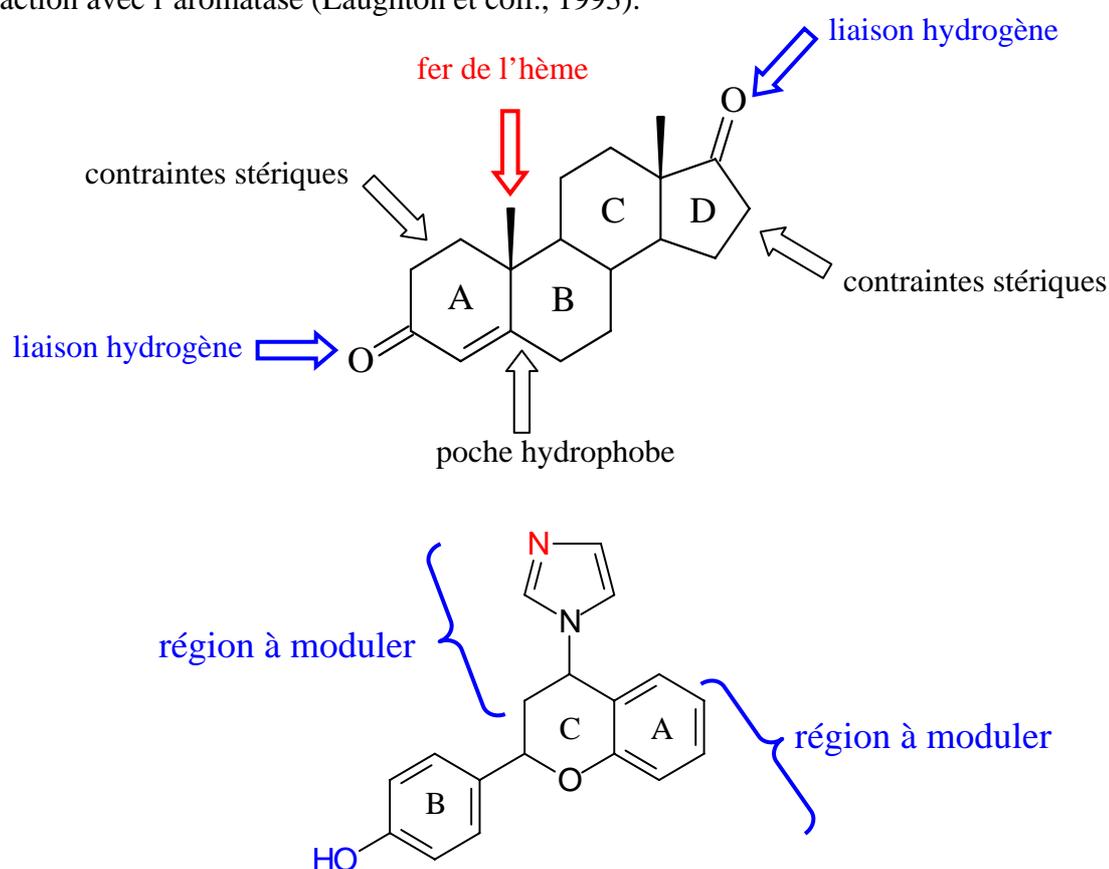


Schéma 39. Analogies entre le squelette 4-imidazolylflavane et le substrat stéroïdien.

L'analyse de cette représentation schématique nous a conduit à envisager deux types de modulation :

- **la modulation du noyau C** : en substituant le motif imidazolé, site pharmacophore essentiel *via* l'interaction de l'azote sp^2 avec le fer de l'hème de l'aromatase, par d'autres hétérocycles azotés. Ainsi, nos travaux concernent la synthèse de 4-triazolylflavanes, le motif triazolé étant présent sur de puissants inhibiteurs de l'aromatase tels que le létrozole et l'anastrozole. Deux isomères sont obtenus lors de ces synthèses : l'isomère 1*H* et l'isomère 4*H* dont l'activité est inférieure à celle du premier cité. En outre, ces composés présentent un effet inhibiteur plus faible que celui des dérivés imidazolés correspondants. Néanmoins, le 7-hydroxy-4-triazol-1-ylflavane semble être une molécule intéressante puisque son activité est supérieure à celle de l'aminoglutéthimide et qu'il est démontré que les dérivés triazolés sont plus actifs *in vivo* que leurs analogues imidazolés.

- **la modulation du noyau A** : en introduisant un noyau aromatique supplémentaire. Cette modulation est motivée par l'importance des régions hydrophobes d'un inhibiteur quant à son interaction avec le site actif de l'enzyme (Chen et coll., 1997) mais aussi par la forte activité de la 7,8-benzoflavone, démontrée par plusieurs études (Nesnow et coll., 1983 ; Kellis et Vickery, 1984 ; Kellis et coll., 1986).

Les investigations ont d'abord concerné des 7,8-benzoflavanones, intermédiaires dans la synthèse des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes. Ces 7,8-benzoflavanones présentent une activité déjà remarquable, supérieure à celle des flavanones naturelles ou synthétiques jusqu'à présent étudiées. Les deux molécules les plus actives, substituées par un hydroxyle en position 3' ou 4', présentent un effet inhibiteur 9 fois supérieur à celui de l'aminoglutéthimide.

L'étape ultime de modulation a conduit à l'obtention des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes ; l'étude de ces composés a mis en évidence plusieurs points particulièrement intéressants. Tout d'abord, des composés de configuration 2,4-*trans* ont été obtenus ainsi que des molécules de configuration 2,4-*cis* et ce, pour la première fois. La stéréochimie est établie par RMN en se basant sur les éléments dégagés par les travaux antérieurs concernant les 2,4-*cis* et 2,4-*trans*-flavan-4-ols. Ainsi, les éléments déterminants pour un isomère 2,4-*cis*-7,8-benzo-4-imidazolylflavane sont les suivants :

- la résonance de H-4 sous la forme d'un doublet de doublet car la position quasi-axiale de H-4 entraîne une valeur de $J_{4,3ax}$ très différente de celle de $J_{4,3eq}$;
- un doublet de doublet de doublet pour le signal correspondant à H-3eq ;
- la résonance de H-3ax sous la forme d'un doublet de triplet car les constantes $J_{3ax,2}$ et $J_{3ax,4}$ sont voisines ;

- le déplacement chimique voisin de 77 ppm pour le carbone C-2.

Par contre, un 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolylflavane présente les caractéristiques suivantes :

- le proton H-4 apparaît sous la forme d'un triplet élargi car les constantes $J_{4,3ax}$ et $J_{4,3eq}$ sont proches ;

- le proton H-3eq résonne sous la forme d'un doublet de triplet car les constantes $J_{3eq,2}$ et $J_{3eq,4}$ sont voisines ;

- le proton H-3ax apparaît comme un doublet de doublet de doublet ;

- le carbone C-2 est blindé (δ voisin de 73 ppm) par rapport à l'isomère 2,4-*cis* suite à l'effet du groupement imidazolé en position quasi-axiale.

L'obtention des isomères *cis* et *trans* nous a amenés à approfondir les mécanismes impliqués dans ces synthèses. Comme établi précédemment, il apparaît qu'un 2,4-*cis*-flavan-4-ol, via une substitution nucléophile de type 2, conduit à un 2,4-*trans*-4-imidazolylflavane. Un élément nouveau est l'obtention d'un 2,4-*trans*-flavan-4-ol lors de ces réactions de substitution avec le CDI, sans doute due à une compétition entre le CDI et de l'eau présente en faibles quantités dans le milieu réactionnel. A partir de ce 2,4-*trans*-flavan-4-ol, l'obtention d'un 2,4-*cis*-4-imidazolylflavane est possible selon un mécanisme SN_2 , cependant défavorisée par l'encombrement stérique dû au phényle en 2. Enfin, le 2,4-*trans*-flavan-4-ol peut également conduire à un 2,4-*trans*-4-imidazolylflavane via une SN_1 . Le carbocation formé subit une attaque nucléophile du côté le moins encombré donc du côté opposé au phényle en 2.

La compréhension de tous ces mécanismes doit nous permettre, dans l'avenir, de mieux contrôler certains paramètres lors des réactions (caractère anhydre des solvants pour éviter la compétition avec l'eau par exemple). Si la formation de produits secondaires est diminuée, il en résulte alors une augmentation des rendements, une simplification des purifications mais aussi une limitation des problèmes de solubilité. En effet, ces derniers ont rendu le plus souvent les étapes de purification longues et pénibles et sont liés en général à la présence de plusieurs produits, en proportions variables selon les réactions, dans les fractions à purifier. La réduction de ces problèmes de solubilité doit nous donner la possibilité d'étudier le comportement de ces composés par HPLC et donc d'envisager des purifications entre les isomères *cis* et *trans*, opérations indispensables pour conclure définitivement sur l'activité de certains composés.

En effet, pour le dérivé substitué par un cyano en 4', la séparation des isomères *cis* et *trans* a été possible et nous avons démontré avec certitude que l'isomère *trans* était beaucoup

plus actif que le composé *cis*. Par contre, pour les autres composés, la séparation n'a pu être menée à terme, notamment pour le dérivé substitué par un hydroxyle en 4'. Or, la fraction testée pour ce composé (mélange 50/50 *cis/trans*) s'avère la plus active parmi tous les tests effectués et par extrapolation des résultats du dérivé 4'-cyano, on estime que le composé 2,4-*trans* pourrait présenter une activité voisine de celle du létrozole. L'ultime opération serait alors d'obtenir des composés énantiomériquement purs ; la séparation chirale des énantiomères du composé 2,4-*trans* permettrait d'étudier l'influence de la stéréoisométrie sur l'activité anti-aromatase et d'obtenir un composé éventuellement plus actif *in vitro* que le létrozole.

Toutes ces données sont intéressantes à intégrer dans une étude de modélisation moléculaire afin de mieux cerner les interactions avec le site actif de l'aromatase et donc d'orienter les nouvelles modulations du squelette 7,8-benzoflavane. Les informations relevées à partir des travaux sur les 4-triazolyflavanes (isomères 1*H* et 4*H*) sont aussi importantes à analyser pour une meilleure compréhension de la nature de l'interaction entre l'azote sp^2 du motif azolé et le fer de l'hème de l'aromatase. Si l'on reprend les schémas précédents, quelques points peuvent déjà être éventuellement éclaircis. Il est possible que les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes et les 4-imidazolyflavanes précédemment synthétisés ne se lient pas au site actif de la même façon. Si l'on considère que les noyaux C et A miment toujours les noyaux C et D du substrat stéroïdien (schéma 39), il semble que le motif 7,8-benzo supplémentaire n'est pas favorable puisqu'il existe des contraintes stériques à ce niveau. Il est donc envisageable que les composés se lient plutôt selon le schéma ci-dessous (schéma 40), avec le noyau 7,8-benzo qui s'insère facilement dans la poche hydrophobe.

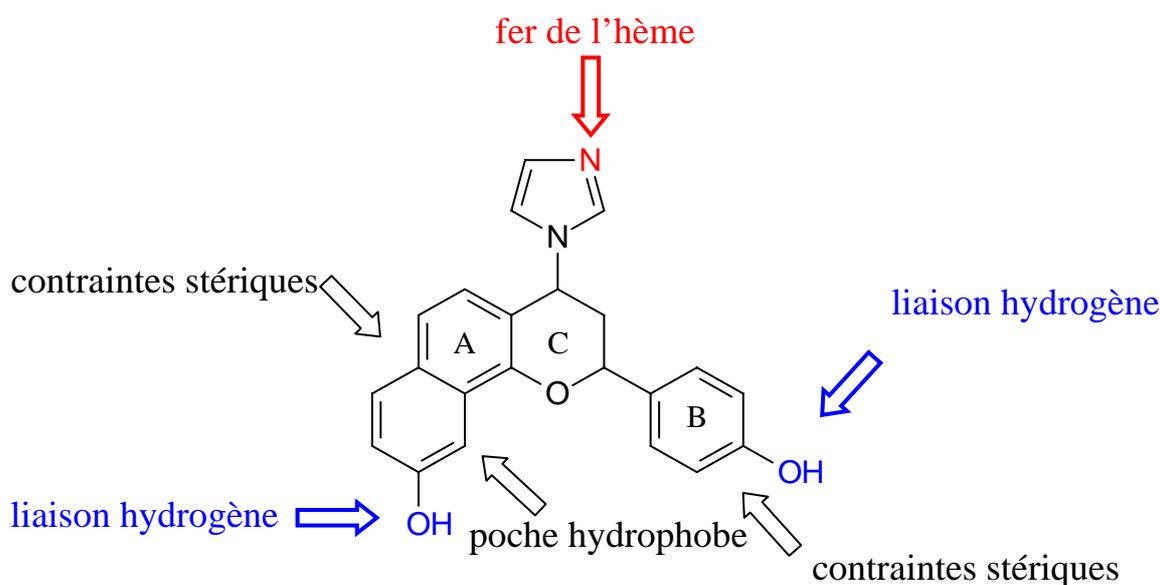


Schéma 40. Interactions du squelette 7,8-benzo-4-imidazolyflavane avec le site actif de l'aromatase.

Ce schéma permettrait d'expliquer l'influence favorable d'un hydroxyle en 5'' démontrée par les travaux de Kellis et coll. concernant des dérivés hydroxylés de la 7,8-benzoflavone (Kellis et coll., 1986). Ce groupement pourrait renforcer la liaison avec le site actif de l'aromatase *via* une liaison hydrogène. Aussi, des essais sont à réaliser pour compléter les travaux débutés lors de cette thèse, en vue de synthétiser un 7,8-benzo-4-imidazolylflavane substitué en 5'' par un hydroxyle.

IV. Conclusion et Perspectives :

Le cancer du sein demeure la première cause de mortalité par cancer chez la femme, il représente donc un problème majeur de santé publique. En France, une augmentation de 60 % de l'incidence du cancer du sein et de 5% pour la mortalité, est constatée depuis 20 ans. Cette pathologie concerne la quasi totalité des pays du monde qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement.

Le cancer du sein de type hormono-dépendant est le plus répandu ; son traitement repose, entre autres, sur l'hormonothérapie qui consiste à réduire les effets des estrogènes dont l'implication dans l'initiation et la progression des tumeurs mammaires est aujourd'hui parfaitement établie. Il existe ainsi deux classes thérapeutiques : les anti-estrogènes qui bloquent l'action des estrogènes au niveau de leurs récepteurs et les inhibiteurs de l'aromatase, enzyme clé dans la production des estrogènes. Le retentissement du cancer du sein en terme de santé publique et sur un plan personnel a motivé le développement de nouveaux agents thérapeutiques afin d'obtenir :

- une augmentation de la durée de survie ;
- une amélioration du confort de la patiente ;
- voire une chimioprévention.

Dans cette optique, notre équipe de recherche a mis en œuvre plusieurs projets ; ainsi, nos travaux ont consisté en la synthèse de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase. En se basant sur les résultats des travaux antérieurs, notre étude s'est orientée vers la modulation du squelette 4-imidazolyflavane et a conduit à l'obtention de deux nouvelles familles d'inhibiteurs de l'aromatase : les 4-triazolyflavanes et les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes. Les résultats obtenus pour les 4-triazolyflavanes nous incitent à poursuivre dans cette voie car il est montré que les dérivés triazolés présentent une activité *in vivo* particulièrement intéressante.

Quant aux 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes, ils s'avèrent être de puissants inhibiteurs de l'aromatase, les isomères 2,4-*trans* étant beaucoup plus actifs que les isomères 2,4-*cis*. Le 7,8-benzo-4'-hydroxy-4-imidazolyflavane, testé sous la forme d'un mélange 50/50 *cis/trans*, est le composé le plus actif. La séparation entre les deux isomères se révèle indispensable, le composé 2,4-*trans* pourrait alors présenter une activité comparable à celle du létrozole qui constitue un des traitements de référence du cancer du sein.

Dans le but d'améliorer encore l'activité de ces nouveaux inhibiteurs, plusieurs perspectives sont évidemment envisagées :

- la synthèse de 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes substitués en 5'' par un hydroxyle, groupement qui pourrait renforcer la liaison avec le site actif de l'aromatase *via* une liaison hydrogène ;
- l'introduction d'une double liaison en 2,3 sur le noyau C, les essais effectués dans le cadre de ces travaux n'ayant pas été concluants ;
- la substitution du noyau imidazolé par d'autres hétérocycles azotés (1,2,3-triazole, 1,2,4-triazole, tétrazole, pyridine) à l'image des travaux de Lang et coll. concernant des dérivés du létrozole (Lang et coll., 1993) ;
- la synthèse d'isostères par remplacement de l'atome d'oxygène au niveau de l'hétérocycle par un atome d'azote, de soufre ou un par un méthylène.

En parallèle, l'évaluation pharmacologique des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes doit être approfondie en étudiant :

- la sélectivité par rapport à d'autres enzymes de la stéroïdogénèse ;
- l'étude *in vivo* sur différents modèles expérimentaux déjà définis (Auvray et coll., 2000). ;
- l'affinité pour le récepteur aux estrogènes :
- l'effet sur la prolifération cellulaire de lignées cancéreuses mammaires comme les cellules MCF-7.

Nos travaux ouvrent donc des perspectives de recherche prometteuses dans le domaine de l'hormonothérapie des tumeurs mammaires. De nouvelles investigations s'offrent encore à nous en vue d'obtenir des molécules encore plus actives, notamment en termes de séparation chirale et de substitution des cycles aromatiques. Les résultats obtenus motivent également une étude de modélisation moléculaire et des essais pharmacologiques plus approfondis, pour confirmer l'intérêt du développement de molécules thérapeutiques à partir de modèles naturels.

TROISIEME PARTIE :
PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériels et méthodes.

1.1. Purification des composés :

Tous les réactifs utilisés sont de pureté commerciale. Les techniques chromatographiques de purification utilisées sont :

- la purification par CCM :

Les chromatographies sur couche mince analytiques sont réalisées sur des plaques de gel de silice Macherey Nagel réf. 818 133 de 0,2 mm d'épaisseur, avec indicateur de fluorescence à 254 nm.

Les purifications par chromatographie sur couche mince préparative sont effectuées sur des plaques (20 x 20 cm) de gel de silice Kieselgel N/UV 254 Macherey Nagel réf. 816340.

Les purifications sur plaques CCM commerciales sont effectuées sur des plaques (20 x 20 cm) de gel de silice prêtes à l'emploi 60 F-254 Merck.

- la purification par MPLC :

La chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) utilise une pompe moyenne pression Büchi 681, la détection est assurée par un détecteur UV multicanaux Waters 490 ; les séparations sont effectuées sur une colonne Büchi (460 x 26 mm) remplie de silice Merck RG 1040 Si Impaq 40 µm ou sur une colonne Büchi (460 x 15mm) remplie de silice greffée Merck Lichroprep® RP18 15-25 µm réf. 13901.

- la purification par HPLC :

La purification par chromatographie liquide haute pression (HPLC) préparative est réalisée sur une chaîne Merck prep Sep Tech équipée d'un détecteur UV multicanaux Waters 490, d'un contrôleur de gradient Sep Tech GP-900 et d'une électrovanne ; la colonne utilisée est une colonne Merck LiChroCART®, LiChrospher® 100 diol, 10 µm, 250 x 10 mm.

Une chaîne analytique Perkin Elmer a été utilisée, elle se compose d'une pompe série 200, d'un pilote de gradient automatique, d'un détecteur UV/VIS série 200, et d'un interface chromatographique série 600 piloté par le logiciel Totalchrom version 6.2.0 ; la colonne utilisée est une colonne Macherey-Nagel C-18, 10 µm, 250 x 10 mm.

Une chaîne analytique Waters a été utilisée pour effectuer des purifications par HPLC semi-préparative ; elle se compose de deux pompes Waters 600, et d'un détecteur UV à barrettes de diodes Waters PDA 996 piloté par le logiciel Millennium³². Les colonnes utilisées sont une

colonne Waters X-terra, 5 μ m, 150 x 4,6 mm ou une colonne Macherey-Nagel C-18, 10 μ m, 250 x 10 mm.

1.2. Analyse structurale :

Les spectres UV des composés ont été réalisés dans le méthanol sur un spectrophotomètre Secomam S-750. Les spectres de masse ont été enregistrés sur deux types d'appareil : les spectres de masse haute résolution ont été effectués sur un appareil VG ZAB2-SEQ du service central d'analyse du CNRS de Lyon en utilisant la technique d'électrospray alors que les spectres de masse basse résolution ont été réalisés sur un système Waters Alliance équipé d'un interface électrospray. L'ensemble des spectres de RMN ont été réalisés à la Faculté de Pharmacie de Limoges sur l'appareil Brüker DPX Avance 400 MHz du Service Commun de Résonance Magnétique de l'Université de Limoges.

1.3. Méthodes d'évaluation biologique.

1.3.1. Principe d'étude de l'activité inhibitrice des flavonoïdes sur l'aromatase.

Le principe de mesure de l'activité anti-aromatase des flavonoïdes est schématisé ci-dessous.

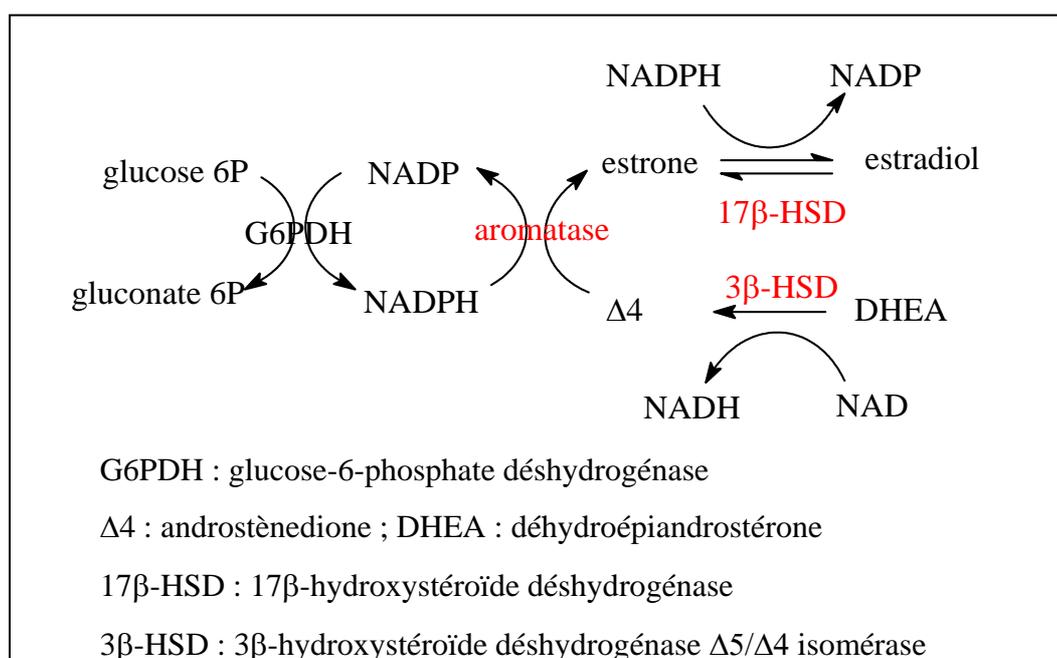


Schéma 41. Principe d'étude de l'activité anti-aromatase.

- Matériel biologique :

↳ Obtention des microsomes placentaires :

La faible quantité d'aromatase présente dans les cellules MCF-7 ainsi que dans la préparation microsomiale de cellules MCF-7 a conduit le laboratoire de Biochimie de Mr le Professeur Habrioux à mettre au point un protocole d'étude d'activité enzymatique à partir de microsomes placentaires, qui présentent un équipement enzymatique important (Le Bail, 1998b). Dans la cellule, le système du cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique qui, après homogénéisation du tissu et ultracentrifugation, se retrouve dans la fraction dite microsomiale.

↳ Mesure de l'activité anti-aromatase :

Les mesures de l'activité inhibitrice de l'aromatase de l'ensemble des flavanones, des 4-imidazolylflavanes et des 4-triazolylflavanes ont été effectuées par nos soins dans le laboratoire de Biochimie.

↳ Incubation :

La réaction est effectuée dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 0,1 M, dithiothréitol 10^{-3} M, pH 7,4) en présence de NADP (0,5 mM), de glucose-6-phosphate (3 mM), de la solution du produit à tester à des concentrations variables, de glucose-6-phosphate déshydrogénase (0,1 U/ml) et des microsomes placentaires (16 μl). La dissolution pour tous les produits est réalisée dans le DMSO. La dilution est effectuée de façon à obtenir une concentration qui implique l'addition d'un volume fixé à 1 μl de la solution du composé ; en effet, il est montré que l'ajout d'1 μl de DMSO n'entraîne aucun effet sur l'activité de l'aromatase. En général une solution mère à 10^{-2} M dans le DMSO est préparée et à partir de celle-ci, sont effectuées des dilutions pour obtenir différentes solutions selon la gamme de concentrations à étudier :

| | |
|--|--|
| Pour 50 μM : 1 μl de la solution à $5 \cdot 10^{-2}$ M | Pour 0,5 μM : 1 μl de la solution à $5 \cdot 10^{-4}$ M |
| Pour 25 μM : 1 μl de la solution à $2,5 \cdot 10^{-2}$ M | Pour 0,1 μM : 1 μl de la solution à 10^{-4} M |
| Pour 10 μM : 1 μl de la solution à 10^{-2} M | Pour 0,05 μM : 1 μl de la solution à $5 \cdot 10^{-5}$ M |
| Pour 1 μM : 1 μl de la solution à 10^{-3} M | etc... |

Les tubes sont pré-incubés pendant 30 secondes à 37°C puis l'androstènedione radiomarquée ($1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$)- $\Delta 4$ (20 nM) est ajoutée. Enfin, les tubes sont incubés sous agitation à 37°C pendant 12 minutes. Les incubations sont arrêtées par addition de méthanol 50 / HCl 1M 50.

↳Extraction :

Elle s'effectue dans un tube Itrich en ajoutant un mélange acétate d'éthyle / cyclohexane (50 /50). Les tubes sont ensuite agités et, après décantation, le surnageant est récupéré et évaporé sous azote à 50°C. Les extraits secs sont repris dans 500 µl d'éthanol ; une nouvelle évaporation est effectuée.

↳Etude HPLC :

Les métabolites issus de l'incubation sont analysés par HPLC en phase normale sur une colonne silice de diamètre 5 µm. Le système chromatographique comporte également une pompe Perkin Elmer série 200 (débit : 1 ml / min). La radioactivité est mesurée par un système Packard Flow Scintillation Analyzer 150 TR avec un débit de liquide scintillant ULTIMA-FLO™ M Packard de 1,5 ml / min. Chaque échantillon à analyser est repris dans 50 µl de phase mobile (isooctane / acétate d'éthyle, 64 / 36). Les temps de rétention des stéroïdes sont les suivants : estrone : 5,2 min ; estradiol : 7,5 min ; androstènedione : 15,8 min.

Les pourcentages d'inhibition de l'aromatase sont calculés en fonction du pourcentage de $\Delta 4$ non transformée et correspondent à la moyenne de deux expériences (la déviation doit être inférieure à +/- 5 %). Les CI_{50} sont déterminées graphiquement.

1.3.2. Principe d'étude de l'influence des flavonoïdes sur la prolifération des cellules MCF-7.

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de Chimie Physique et Chimie Minérale de M^{me} le Professeur Delage.

Les cellules MCF-7 sont une lignée cellulaire d'origine humaine, obtenue à partir d'une métastase pleurale d'un adénocarcinome mammaire. Les cellules MCF-7 sont des cellules adhérentes, elles se fixent à leur support et s'y multiplient en formant un tapis cellulaire.

24 heures après l'ensemencement, les molécules à évaluer sont ajoutées à différentes concentrations ; les cellules sont laissées au contact de ces effecteurs pendant 6 jours en atmosphère humide, à 37 °C et 5 % de CO₂.

La technique du MTT a été utilisée afin de quantifier l'effet des molécules sur la prolifération des cellules MCF-7. Cette méthode est basée sur le clivage du tétrazolium de couleur jaune en cristaux de formazan violets, principalement sous l'action des déshydrogénases mitochondriales actives. Après une période d'incubation, ces cristaux sont solubilisés par le sodium dodécyl sulfate et la solution colorée résultante est quantifiée par

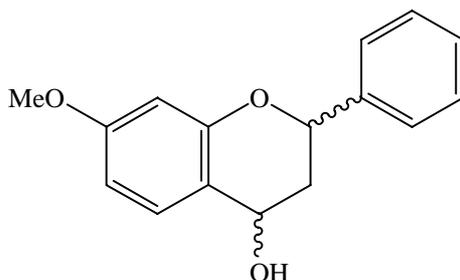
lecture ELISA. La quantité de formazan produite, déterminée par absorbance à 550 nm, est proportionnelle au nombre de cellules vivantes ce qui permet de calculer le pourcentage d'inhibition de la prolifération par rapport à des cellules témoins non traitées. Les pourcentages d'inhibition exprimés correspondent à une moyenne de trois expériences.

2. Préparation et caractérisation des composés.

2.1. Les 4-imidazolylflavanes.

2.1.1. Synthèse et caractérisation du 4-imidazolyl-7-méthoxyflavane I_A.

2.1.1.1. 7-méthoxyflavan-4-ol f_A :



a) Synthèse :

200 mg de 7-méthoxyflavanone **F_A** ($7,9 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 150 mg de NaBH₄ (5 éq, $3,9 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 4 heures à température ambiante. Après extraction et évaporation, le résidu est purifié sur CCM silice préparative dans toluène/éther 80-20. On obtient 127 mg de 2,4-*cis*-7-méthoxyflavan-4-ol **f_A** ($5,0 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 64 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,37$ sur CCM silice dans Toluène/Et₂O 80-20.

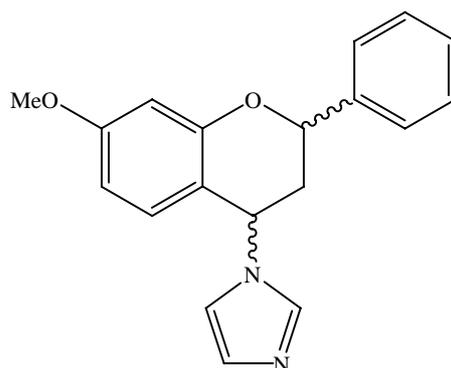
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\max} = 229$ et 282 nm.

➤ RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,12 (1H, ddd, $J = 10,2 ; 11,4 ; 13,2$ Hz, H-3_{ax}), δ 2,50 (1H, ddd, $J = 2,0 ; 6,2 ; 13,2$ Hz, H-3_{eq}), δ 3,77 (3H, s, OMe), δ 5,05 (1H, dd él, $J = 7,4 ; 10,3$ Hz, H-4), δ 5,16 (1H, dd, $J = 1,8 ; 11,5$ Hz, H-2), δ 6,45 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8), δ 6,57 (1H, dd, $J = 2,5 ; 8,6$ Hz, H-6), δ 7,35 - 7,46 (6H, m, H-5 et Ph).

➤ RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ : δ 40,2 (C-3), δ 55,4 (OCH₃), δ 65,6 (C-4), δ 77,1 (C-2), δ 101,2 (C-8), δ 108,2 (C-6), δ 118,2 (C-4_a), δ 126,1 (C-2'/6'), δ 127,9 (C-4'), δ 128,3 (C-5), δ 128,7 (C-3'/5'), δ 140,4 (C-1'), δ 155,5 (C-8_a), δ 165,5 (C-7).

➤ SM-ESP (-40V): m/z 255 [M-H]⁻.

2.1.1.2. 4-imidazolyl-7-méthoxyflavane I_A:



a) Synthèse :

115 mg de 2,4-*cis*-7-méthoxyflavan-4-ol **f_A** (1 éq, $4,5 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 291 mg (4 éq, $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans l'éther. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée puis séchée sur Na₂SO₄ et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans toluène/éther 70-30 permet d'obtenir 114 mg de produit **I_A** ($3,7 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 82 %).

b) Caractérisation :

➤R_F = 0,24 sur CCM silice dans CH₂Cl₂/MeOH 2,5 %.

➤UV dans MeOH : λ max = 218 et 279 nm.

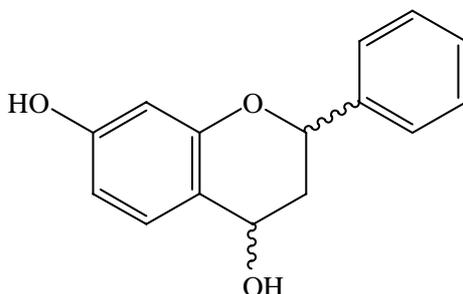
➤RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,36 (1H, dt él, *J* = 2,7 ; 14,3 Hz, H-3eq), δ 2,47 (1H, ddd, *J* = 4,5 ; 11,3 ; 14,3 Hz, H-3ax), δ 3,81 (3H, s, OMe), δ 4,97 (1H, dd, *J* = 2,3 ; 11,2 Hz, H-2), δ 5,33 (1H, t él, *J* = 3,6 Hz, H-4), δ 6,57 (1H, d, *J* = 1,9 Hz, H-8), δ 6,59 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H-6), δ 6,93 (1H, s él, H-imid), δ 7,03 (1H, d, *J* = 9,4 Hz, H-5), δ 7,11 (1H, s, H-imid), δ 7,30 - 7,44 (5H, m, Ph), δ 7,47 (1H, s, H-imid).

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ : δ 38,3 (C-3), δ 50,9 (C-4), δ 55,4 (OCH₃), δ 73,1 (C-2), δ 101,6 (C-8), δ 109,2 (C-6), δ 109,6 (C-4a), δ 118,3 (C-imid), δ 126,1 (C-2'/6'), δ 128,4 (C-4'), δ 128,7 (C-3'/5'), δ 129,7 (C-imid), δ 131,2 (C-5), δ 136,8 (C-imid), δ 139,6 (C-1'), δ 156,4 (C-8a), δ 161,4 (C-7).

➤SM-ESP (+ 20 V): m/z 307 [M+H]⁺.

2.1.2. Synthèse et caractérisation du 7-hydroxy-4-imidazolyflavane I_B :

2.1.2.1. 7-hydroxyflavan-4-ol f_B :



a) Synthèse :

300 mg de 7-hydroxyflavanone **F_B** ($1,25 \cdot 10^{-3}$ mol), sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 950 mg de NaBH₄ (20 éq, 0,025 mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Après extraction et évaporation, le résidu est purifié sur CCM silice préparative dans Hexane/EtOAc 70-30. On obtient 196 mg du 2,4-*cis*-7-hydroxyflavan-4-ol **f_B** ($8,1 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 65 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,13$ sur CCM silice dans Hexane-EtOAc 70-30.

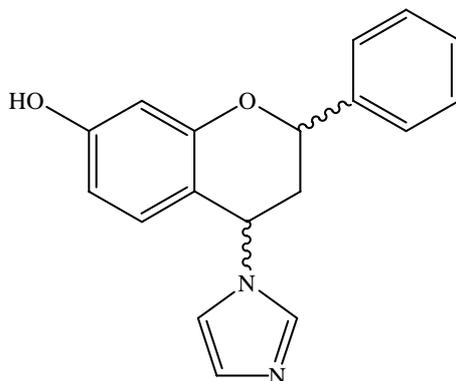
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\max} = 219$ et 282 nm.

➤ RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃: δ 2,10 (1H, ddd, $J = 10,3 ; 11,2 ; 13,1$ Hz, H-3ax), δ 2,51 (1H, ddd, $J = 1,9 ; 6,2 ; 13,2$ Hz, H-3eq), δ 5,04 (1H, dd, $J = 6,2 ; 10,0$ Hz, H-4), δ 5,16 (1H, dd, $J = 1,7 ; 11,2$ Hz, H-2), δ 6,38 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8), δ 6,49 (1H, dd, $J = 2,4 ; 8,4$ Hz, H-6), δ 7,37 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 7,34 - 7,45 (5H, m, Ph).

➤ RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃: δ 40,2 (C-3), δ 65,6 (C-4), δ 77,1 (C-2), δ 103,2 (C-8), δ 108,7 (C-6), δ 118,5 (C-4a), δ 126,0 (C-2'/6'), δ 128,3 (C-4' et C-5), δ 128,6 (C-3'/5'), δ 140,4 (C-1'), δ 155,6 (C-8a), δ 156,3 (C-7).

➤ SM-ESP (- 40 V): m/z 241 [M-H].

2.1.2.2 7-hydroxy-4-imidazolylflavane **I_B** :



a) Synthèse :

190 mg de 2,4-*cis*-7-hydroxyflavan-4-ol **f_B** (1 éq, $7,9 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 508,8 mg (4 éq, $3,1 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans l'éther. La phase organique, lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée, aboutit à un précipité blanc. La purification par lavages successifs de ce précipité avec de l'éther permet d'obtenir 90 mg de produit **I_B** ($3,1 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 39 %).

b) Caractérisation :

➤R_F = 0,21 sur CCM silice dans CH₂Cl₂/MeOH 5 %.

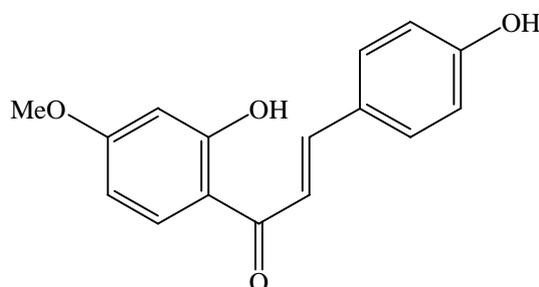
➤RMN ¹H (400 MHz) dans DMSO-d₆ : δ 2,37 (1H, dt él, *J* = 2,8 ; 14,6 Hz, H-3eq), δ 2,48 (1H, ddd, *J* = 4,8 ; 11,2 ; 14,8 Hz, H-3ax), δ 5,01 (1H, dd, *J* = 2,3 ; 10,8 Hz, H-2), δ 5,41 (1H, t él, *J* = 3,9 Hz, H-4), δ 6,36 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-8), δ 6,41 (1H, dd, *J* = 2,2 ; 8,4 Hz, H-6), δ 6,90 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), δ 6,93 (1H, s, H-imid), δ 7,16 (1H, s él, H-imid), δ 7,32 – 7,42 (5H, m, Ph), δ 7,59 (1H, s él, H-imid), δ 9,59 (1H, s, 7-OH).

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans DMSO-d₆ : δ 37,4 (C-3), δ 50,1 (C-4), δ 73,3 (C-2), δ 103,3 (C-8), δ 109,8 (C-6), δ 110,2 (C-4a), δ 119,1 (C-imid), δ 126,7 (C-2'/6'), δ 128,5 (C-4'), δ 128,9 (C-3'/5'), δ 129,0 (C-imid), δ 131,4 (C-5), δ 137,2 (C-imid), δ 140,5 (C-1'), δ 156,1 (C-8a), δ 159,3 (C-7).

➤SM-ESP (+ 40 V): m/z 293 [M+H]⁺.

2.1.3. Synthèse et caractérisation du 4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane I_C

2.1.3.1. 2',4-dihydroxy-4'-méthoxychalcone C_C :



a) Synthèse :

a.1) Protection du benzaldéhyde :

1g de 4-hydroxybenzaldéhyde ($8,1 \cdot 10^{-3}$ mol) et 2,07 g (3 éq, $24,6 \cdot 10^{-3}$ mol) de 3,4-dihydropyrane (3,4-DHP) sont dissous dans 35 ml de dichlorométhane, le PPTS (0,052 g ; $2,06 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,025 éq) est alors ajouté au milieu réactionnel qui est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le milieu est lavé, séché sur Na₂SO₄ et évaporé. La purification par MPLC silice dans CHCl₃-MeOH 5 % permet d'obtenir 1,85 g de benzaldéhyde protégé **32** sous forme d'un produit sirupeux.

a.2) Condensation du benzaldéhyde protégé avec l'acétophénone :

1,13 g (1 éq, $4,7 \cdot 10^{-3}$ mol) de 2-hydroxy-4-méthoxyacétophénone **31** et 1,69 g de benzaldéhyde protégé **32** (1,2 éq, $8,19 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 1,5 g d'hydroxyde de baryum sont ajoutés. Le milieu réactionnel est maintenu à reflux pendant 5 heures. Après extraction et évaporation, la purification par MPLC silice dans toluène/éther 97-3 permet d'obtenir environ 567 mg de la chalcone protégée C_{Cp}.

a.3) Déprotection de la chalcone :

La chalcone protégée C_{Cp} et 30 mg d'APTS (0,1 éq ; $1,6 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans le méthanol. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 6 heures. Après extraction et évaporation, la purification sur CCM silice préparative dans toluène/éther 97-3 permet d'obtenir 560 mg de la chalcone C_C ($2,1 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 45 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,48$ sur CCM silice dans Toluène/Et₂O 97-3.

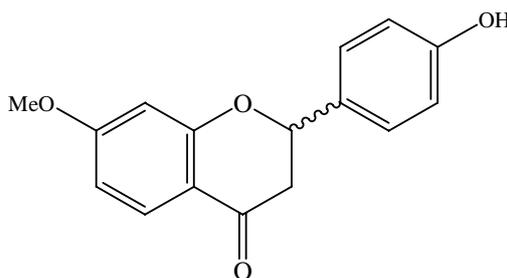
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\max} = 372$ nm.

➤ RMN ¹H (400 MHz) dans CD₃OD : δ 3,85 (3H, s, OMe), δ 6,47 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-3'), δ 6,53 (1H, dd, $J = 2,5 ; 9,0$ Hz, H-5'), δ 6,85 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3/5), δ 7,62 (2H, d, $J = 8,7$ Hz, H-2/6), δ 7,62 (1H, d, $J = 15,2$ Hz, H- α), δ 7,81 (1H, d, $J = 15,3$ Hz, H- β), δ 8,03 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-6').

➤ RMN ¹³C (100 MHz) dans CD₃OD : δ 56,2 (OCH₃), δ 102,0 (C-3'), δ 108,4 (C-5'), δ 115,4 (C-1'), δ 117,0 (C-3/5), δ 118,2 (C- α), δ 127,8 (C-1), δ 132,0 (C-2/6), δ 133,0 (C-6'), δ 146,1 (C- β), δ 161,8 (C-4), δ 167,5 (C-2'), δ 167,7 (C-4'), δ 193,8 (C=O),

➤ SM-ESP (- 40 V) : m/z 269 [M-H]⁻.

2.1.3.2. 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone F_C :



a) Synthèse :

567 mg de 2',4-dihydroxy-4'-méthoxychalcone C_C ($2,1 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans une solution méthanolique d'acide sulfurique à 4%. La solution est maintenue à reflux pendant 10 heures. La purification par MPLC silice dans toluène/éther 90-10 permet d'obtenir 224 mg de 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone F_C ($8,3 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 40 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,35$ sur CCM silice dans Toluène/Et₂O 80-20.

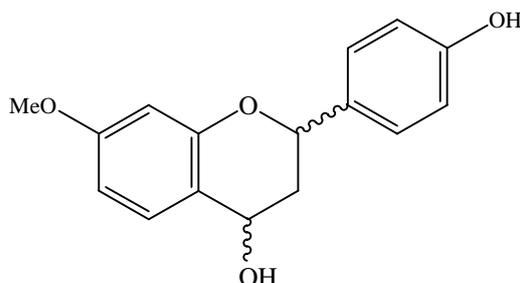
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\max} = 231, 273$ et 311 nm.

➤ RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,81 (1H, dd, $J = 2,8 ; 16,9$ Hz, H-3eq), δ 3,06 (1H, dd, $J = 13,2 ; 16,8$ Hz, H-3ax), δ 3,83 (3H, s, OMe), δ 5,41 (1H, dd, $J = 2,6 ; 13,2$ Hz, H-2), δ 6,48 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8), δ 6,61 (1H, dd, $J = 2,4 ; 8,8$ Hz, H-6), δ 6,90 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5'), δ 7,35 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/6'), δ 7,85 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5).

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ : δ 44,3 (C-3), δ 55,9 (OMe), δ 80,0 (C-2), δ 101,1 (C-8), δ 110,5 (C-6), δ 115,0 (C-4a), δ 115,9 (C-3'/5'), δ 128,2 (C-2'/6'), δ 129,0 (C-5), δ 131,1 (C-1'), δ 156,4 (C-4'), δ 163,9 (C-8a), δ 166,5 (C-7), δ 191,4 (C-4).

➤SM-ESP (- 40V) : m/z 269 [M-H]⁻.

2.1.3.3. 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol f_C :



a) Synthèse :

160 mg de 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone **F_C** ($6,0 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 114 mg de NaBH₄ (5 éq, $3,0 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 4 heures à une température de 6°C. Après extraction et évaporation, le résidu est purifié sur CCM silice préparative dans toluène/éther 70-30. On obtient 132 mg d'un mélange d'isomère *cis* et *trans* du 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol ($4,9 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 82 %). La purification du mélange d'isomères par HPLC préparative sur colonne Diol (système Hexane-iPrOH 3% (95 %) / Méthanol 5 %, débit de 5ml/min, 10 injections) permet d'obtenir 26 mg de l'isomère *trans* **f_{Ct}**, 35 mg de l'isomère *cis* **f_{Cc}** et 33 mg du mélange.

b) Caractérisation :

b.1) Caractérisation du 2,4-*cis*- 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol **f_{Cc}** :

➤R_F = 0,3 sur CCM silice dans Toluène/Et₂O 70-30.

➤UV dans MeOH : λ max = 226 et 279 nm.

➤RMN ¹H (400 MHz) dans CD₃OD : δ 2,02 (1H, ddd, *J* = 10,9 ; 12,0 ; 13,0 Hz, H-3ax), δ 2,32 (1H, ddd, *J* = 1,6 ; 6,3 ; 13,0 Hz, H-3eq), δ 3,73 (3H, s, OMe), δ 4,98 (1H, dd, *J* = 6,3 ; 10,7 Hz, H-4), δ 5,03 (1H, dd, *J* = 1,3 ; 12,0 Hz, H-2), δ 6,33 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H-8), δ 6,52 (1H, dd, *J* = 2,5 ; 8,6 Hz, H-6), δ 6,80 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-3'/5'), δ 7,27 (2H, d, *J* = 8,6 Hz, H-2'/6'), δ 7,36 (1H, d, *J* = 8,6 Hz, H-5).

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 41,2 (C-3), δ 55,7 (OCH_3), δ 66,3 (C-4), δ 78,6 (C-2), δ 102,0 (C-8), δ 108,4 (C-6), δ 116,2 (C-3'/5'), δ 120,0 (C-4a), δ 128,7 (C-2'/6'), δ 129,1 (C-5), δ 133,3 (C-1'), δ 157,2 (C-4'), δ 158,5 (C-8a), δ 161,6 (C-7).

➤SM-ESP (- 40 V): m/z 271 $[\text{M-H}]^-$.

b.2) Caractérisation du 2,4-*trans*-4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol f_{Ct} :

➤ R_{F} = 0,3 sur CCM silice dans Toluène/ Et_2O 70-30.

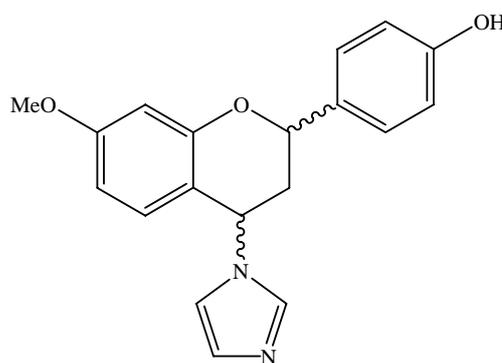
➤UV dans MeOH : λ max = 226 et 279 nm.

➤RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 2,07 (1H, dt, $J = 3,3 ; 14,2$ Hz, H-3eq), δ 2,11 (1H, ddd, $J = 2,5 ; 9,6 ; 14,0$ Hz, H-3ax), δ 3,75 (3H, s, OMe), δ 4,57 (1H, s él, 4-OH), δ 4,71 (1H, t, $J = 2,9$ Hz, H-4), δ 5,12 (1H, dd, $J = 4,5 ; 9,6$ Hz, H-2), δ 6,40 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8), δ 6,52 (1H, dd, $J = 2,5 ; 8,5$ Hz, H-6), δ 6,80 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3'/5'), δ 7,22 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,27 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/6').

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 40,0 (C-3), δ 55,7 (OCH_3), δ 64,3 (C-4), δ 74,3 (C-2), δ 102,2 (C-8), δ 108,8 (C-6), δ 116,2 (C-3'/5'), δ 117,5 (C-4a), δ 128,8 (C-2'/6'), δ 132,5 (C-5), δ 133,5 (C-1'), δ 157,5 (C-4'), δ 158,4 (C-8a), δ 162,3 (C-7).

➤SM-ESP (- 40 V) : m/z 271 $[\text{M-H}]^-$.

2.1.3.4. 4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane I_{C} :



a) Synthèse :

a.1) à partir du 2,4-*trans*-4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol f_{Ct} :

20 mg de 2,4-*trans*-4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol f_{Ct} (1 éq, $7,4 \cdot 10^{-5}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 48 mg (4 éq, $3,0 \cdot 10^{-4}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé, le résidu est repris dans le chloroforme. La

phase organique est lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée puis séchée sur Na₂SO₄ et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CHCl₃-MeOH 5 % permet d'obtenir 6 mg de 2,4-*trans*-4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_C** (1,86.10⁻⁵ mol, rendement 25 %).

a.2) à partir du 2,4-*cis*- 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol **f_{CC} :**

35 mg de 2,4-*cis*-4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol **f_{CC}** (1 éq, 12,9.10⁻⁵ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 82,4 mg (4 éq, 5,15.10⁻⁴ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans le chloroforme. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée puis séchée sur Na₂SO₄ et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CHCl₃-MeOH 5 % permet d'obtenir 5,3 mg de 2,4-*trans*-4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_C** (1,65.10⁻⁵ mol, rendement 13 %).

a.3) à partir du mélange 2,4-*cis* et 2,4-*trans*- 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol :

33 mg de mélange d'isomères de 4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol (1 éq, 12,1.10⁻⁵ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 78,4 mg (4 éq, 4,9.10⁻⁴ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 5 heures et demi à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans le chloroforme. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée puis séchée sur Na₂SO₄ et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CHCl₃-MeOH 5 % permet d'obtenir 9 mg de 2,4-*trans*-4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane **I_C** (2,8 10⁻⁵ mol, rendement 23 %).

b) Caractérisation :

➤R_F= 0,39 sur CCM silice dans CHCl₃-MeOH 3 %.

➤UV dans MeOH : λ max = 280 nm.

➤RMN ¹H (400 MHz) dans CD₃OD : δ 2,34 (1H, dt, J = 2,5 ; 14,5 Hz, H-3eq), δ 2,49 (1H, ddd, J = 4,5 ; 11,5 ; 14,4 Hz, H-3ax), δ 3,79 (3H, s, OMe), δ 4,90 (1H, dd, J = 2,0 ; 11,4 Hz, H-2), δ 5,50 (1H, t él, J = 3,5 Hz, H-4), δ 6,54 (1H, d, J = 2,5 Hz, H-8), δ 6,58 (1H, dd, J =

2,5 ; 8,5 Hz, H-6), δ 6,77 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3'/5'), δ 7,03 (1H, s él, H-imid), δ 7,05 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,13 (1H, s él, H-imid), δ 7,18 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H2'/6'), δ 7,59 (1H, s él, H-imid).

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 39,1 (C-3), δ 52,7 (C-4), δ 55,9 (OCH_3), δ 74,4 (C-2), δ 102,7 (C-8), δ 109,8 (C-6), δ 111,4 (C-4a), δ 116,3 (C-3'/5'), δ 120,3 (C-imid), δ 128,7 (C-2'/6'), δ 128,9 (C-imid), δ 132,2 (C-1'), δ 132,3 (C-5), δ 138,0 (C-imid), δ 158,2 (C-4'), δ 158,7 (C-8a), δ 163,0 (C-7).

➤ SM-ESP (+ 40 V) : m/z 323 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.2. Les 4-triazolyflavanes :

2.2.1. Synthèse et caractérisation du 7-méthoxy-4-triazolyflavane :

a) Synthèse :

a.1) Synthèse du sulfinylditriazole :

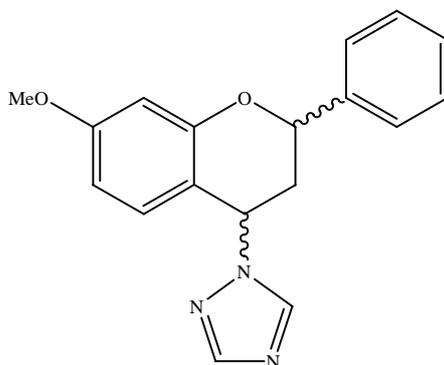
849 mg du 1,2,4-triazole (4 éq, $1,23 \cdot 10^{-2}$ mol) sont dissous dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. A cette solution refroidie dans la glace, sont ajoutés 366 mg de chlorure de thionyle (1 éq, $7,7 \cdot 10^{-4}$ mol). Le mélange est maintenu sous atmosphère d'azote et sous agitation à température ambiante pendant 1 heure.

a.2) Synthèse du 7-méthoxy-4-triazolyflavane :

Le milieu réactionnel qui contient le sulfinylditriazole est ajouté à une solution de 2,4-*cis*-7-méthoxyflavan-4-ol **f_A** (199 mg soit $7,7 \cdot 10^{-4}$ mol, 0,25 éq) dans l'acétonitrile anhydre. Le mélange est maintenu sous atmosphère d'azote et sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. L'acétonitrile est ensuite évaporé et le résidu est repris dans le chloroforme. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par de l'eau distillée puis séchée sur Na₂SO₄ et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CH₂Cl₂-MeOH 2% permet d'obtenir les deux isomères du 7-méthoxy-4-triazolyflavane : 78 mg de l'isomère 1*H*-triazole **T1a** ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 33 %), et 80 mg de l'isomère 4*H*-triazole **T1b** ($2,6 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 34 %).

b) Caractérisation :

b.1) Caractérisation du 2,4-*trans*-7-méthoxy-4-triazol-1-ylflavane T1a :



➤R_F = 0,28 sur CCM silice dans CH₂Cl₂-MeOH 2 %.

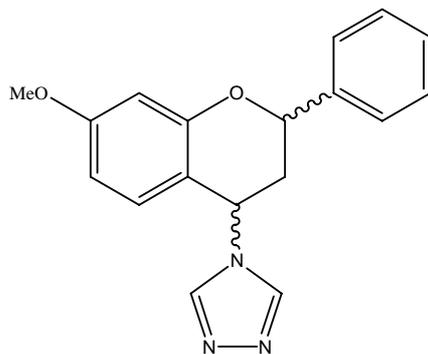
➤UV dans MeOH : λ max = 288 nm.

➤RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,43 (1H, ddd, *J* = 4,4 ; 12,0 ; 14,5 Hz, H-3ax), δ 2,73 (1H, dt él, *J* = 2,2 ; 14,6 Hz, H-3eq), δ 3,82 (3H, s, OCH₃), δ 4,88 (1H, dd, *J* = 1,9 ; 12,0 Hz, H-2), δ 5,53 (1H, dd, *J* = 2,2 ; 4,2 Hz, H-4), δ 6,59 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-8), δ 6,61 (1H, dd, *J* = 2,5 ; 8,4 Hz, H-6), δ 7,11 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), δ 7,32 - 7,41 (5H, m, Ph), δ 7,90 (1H, s, H-triazole), δ 8,04 (1H, s, H-triazole).

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ : δ 36,0 (C-3), δ 54,3 (C-4), δ 55,4 (OCH₃), δ 73,1 (C-2), δ 101,9 (C-8), δ 108,2 (C-4a), δ 109,4 (C-6), δ 126,1 (C-2'/6'), δ 128,4 (C-4'), δ 128,7 (C3'/5'), δ 131,3 (C-5), δ 139,5 (C-1'), δ 143,2 (CH-triazole), δ 152,6 (CH-triazole), δ 156,8 (C-8a), δ 161,8 (C-7).

➤ESP-MS *m/z* expérimental [M+H]⁺ 308,1400 C₁₈H₁₈N₃O₂. *m/z* calculé [M+H]⁺, 308,1399.

b.2) Caractérisation du 2,4-*trans*-7-méthoxy-4-triazol-4-ylflavane T1b :



➤R_F = 0,05 sur CCM silice dans CH₂Cl₂-MeOH 2 %.

➤UV dans MeOH : λ max = 287 nm.

➤RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,36 (1H, dt él, *J* = 2,5 ; 14,6 Hz, H-3eq), δ 2,55 (1H, ddd, *J* = 4,4 ; 11,6 ; 14,6 Hz, H-3ax), δ 3,82 (3H, s, OCH₃), δ 4,90 (1H, dd, *J* = 2,0 ; 11,6 Hz, H-2), δ 5,45 (1H, dd, *J* = 3,0 ; 3,9 Hz, H-4), δ 6,59 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-8), δ 6,61 (1H, dd, *J* = 2,5 ; 8,4 Hz, H-6), δ 7,03 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-5), δ 7,33 - 7,42 (5H, m, Ph), δ 8,16 (2H, s, H-triazole).

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ : δ 38,0 (C-3), δ 50,2 (C-4), δ 55,5 (OCH₃), δ 72,8 (C-2), δ 102,0 (C-8), δ 108,0 (C-4a), δ 109,7 (C-6), δ 126,1 (C-2'/6'), δ 128,7 (C-4'), δ 128,8 (C3'/5'), δ 130,9 (C-5), δ 139,0 (C-1'), δ 142,3 (2 x CH-triazole), δ 156,7 (C-8a), δ 161,9 (C-7).

ESP-MS *m/z* expérimental [M+Na]⁺: 330,1220 C₁₈H₁₇N₃O₂Na. *m/z* calculé [M+Na]⁺, 330,1218.

2.2.2. Synthèse et caractérisation du 7-hydroxy-4-triazolylflavane :

a) Synthèse :

a. 1) Synthèse du sulfinylditriazole :

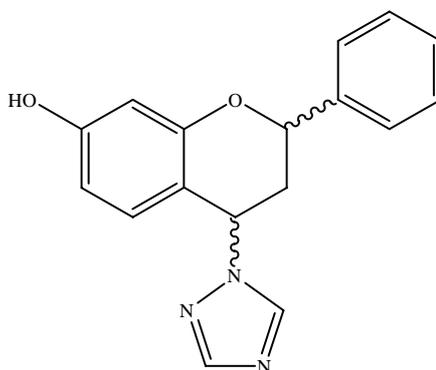
1,38 g du 1,2,4-triazole (4 éq, $2,0 \cdot 10^{-2}$ mol) sont dissous dans 10 ml d'acétonitrile anhydre. A cette solution refroidie dans la glace, sont ajoutés 395 mg de chlorure de thionyle (1éq, $5,0 \cdot 10^{-3}$ mol). Le mélange est maintenu sous atmosphère d'azote et sous agitation à température ambiante pendant 1 heure.

a.2) Synthèse du 7-hydroxy-4-triazolylflavane :

Le milieu réactionnel qui contient le sulfinylditriazole est ajouté à une solution de 2,4-*cis*-7-hydroxyflavan-4-ol **f_B** (302,5 mg soit $1,25 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,25 éq) dans l'acétonitrile anhydre. Le mélange est maintenu sous atmosphère d'azote et sous agitation à température ambiante pendant 1 heure. L'acétonitrile est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans le chloroforme. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par de l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CHCl_3 -EtOAc 60% permet d'obtenir les deux isomères du 7-hydroxy-4-triazolylflavane : 88 mg de l'isomère 1*H*-triazole **T2a** ($3 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 24 %), et 44 mg de l'isomère 4*H*-triazole **T2b** ($1,5 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 12 %).

b) Caractérisation :

b.1) caractérisation du 2,4-*trans*-7-hydroxy-4-triazol-1-ylflavane **T2a** :



➤ $R_F = 0,34$ sur CCM silice dans CHCl_3 -EtOAc 30-70.

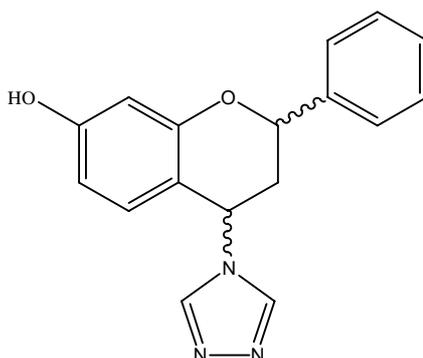
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 286$ nm.

➤RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 2,45 (1H, ddd, $J = 4,8 ; 11,7 ; 14,6$ Hz, H-3ax), δ 2,59 (1H, dt él, $J = 2,3 ; 14,6$ Hz, H-3eq), δ 5,08 (1H, dd, $J = 2,2 ; 11,7$ Hz, H-2), δ 5,61 (1H, dd, $J = 2,3 ; 4,6$ Hz, H-4), δ 6,43 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8), δ 6,47 (1H, dd, $J = 2,4 ; 8,4$ Hz, H-6), δ 7,03 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), δ 7,30 - 7,38 (5H, m, Ph), δ 8,06 (1H, s, H-triazole), δ 8,28 (1H, s, H-triazole).

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 35,3 (C-3), δ 52,1 (C-4), δ 72,9 (C-2), δ 102,8 (C-8), δ 109,0 (C-4a), δ 109,2 (C-6), δ 121,1 (C-2'/6'), δ 128,0 (C-4'), δ 128,4 (C-3'/5'), δ 130,8 (C-5), δ 140,1 (C-1'), δ 143,5 (CH-triazole), δ 151,6 (CH-triazole), δ 155,7 (C-8a), δ 158,8 (C-7).

➤ESP-MS m/z expérimental $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294,1247. $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$. m/z calculé $[\text{M}+\text{H}]^+$, 294,1243.

b.2) caractérisation du 2,4-*trans*-7-hydroxy-4-triazol-4-ylflavane T2b :



➤ $R_F = 0,03$ sur CCM silice dans CHCl_3 -EtOAc 30-70.

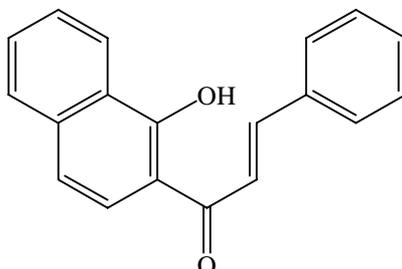
➤RMN ^1H (400 MHz) dans pyridine- d_5 : δ 2,52 - δ 2,56 (2H, m, H-3ax et H-3eq), δ 5,23 (1H, dd, $J = 4,3 ; 9,4$ Hz, H-2), δ 5,72 (1H, t él, $J = 3,5$ Hz, H-4), δ 6,87 (1H, dd, $J = 2,4 ; 8,4$ Hz, H-6), δ 6,97 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-8), δ 7,11 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-5), δ 7,32 - δ 7,39 (5H, m, Ph), δ 8,89 (2H, s, H-triazole).

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans pyridine- d_5 : δ 38,2 (C-3), δ 50,5 (C-4), δ 73,4 (C-2), δ 104,5 (C-8), δ 108,8 (C-4a), δ 111,2 (C-6), δ 126,9 (C-2'/6'), δ 128,8 (C-4'), δ 129,2 (C-3'/5'), δ 131,9 (C-5), δ 140,6 (C-1'), δ 143,5 (2x CH-triazole), δ 157,2 (C-8a), δ 161,3 (C-7).

2.3. Les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes :

2.3.1. Synthèse et caractérisation des 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcones :

2.3.1.1. 3',4'-benzo-2'-hydroxychalcone C1:



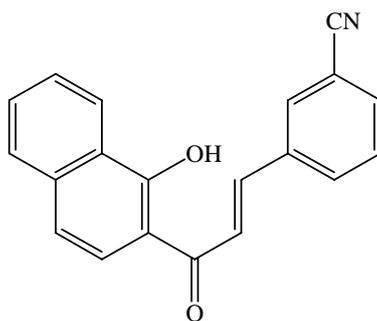
a) Synthèse :

La 1-hydroxy-2-acétonaphtone **39** (200 mg, $1,08 \cdot 10^{-3}$ mol) et 1,2 équivalents de benzaldéhyde (137,4 mg, $1,30 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol en présence de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, et maintenus sous agitation à reflux pendant 1 heure et demi. Après extraction et évaporation, la purification sur CCM silice préparative dans le toluène permet d'obtenir 251 mg de chalcone **C1** ($9,2 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 85 %).

b) Caractérisation :

- $R_F = 0,83$ sur CCM silice dans Toluène 100 %.
- UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 220, 267, 309, 325$ et 409 nm.
- RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 7,30 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H-5'), δ 7,44 (3H, m, H-3/H-4/H-5), δ 7,53 (1H, m, H-5''), δ 7,63 (1H, m, H-4''), δ 7,69 (2H, m, H-2/H-6), δ 7,74 (1H, d, $J = 15,4$ Hz, H- α), δ 7,77 (1H, d él, $J = 7,8$ Hz, H-3''), δ 7,84 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-6'), δ 7,98 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H- β), δ 8,50 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6'').
- RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 113,6 (C-1'), δ 118,3 (C-5'), δ 120,7 (C- α), δ 124,0 (C-6'), δ 124,6 (C-6''), δ 125,6 (C-3'), δ 126,0 (C-5''), δ 127,4 (C-3''), δ 128,7 (C-2/C-6), δ 129,1 (C-3/C-5), δ 130,2 (C-4''), δ 130,8 (C-4), δ 134,9 (C-1), δ 137,5 (C-4'), δ 145,1 (C- β), δ 164,5 (C-2'), δ 193,3 (C=O).
- SM-ESP (-40V) : m/z 273 $[\text{M-H}]^-$.

2.3.1.2. la 3',4'-benzo-3-cyano-2'-hydroxychalcone C2 :



a) Synthèse :

La 1-hydroxy-2-acétonaphtone **39** (500 mg, $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol) et 1,5 équivalents de 3-cyanobenzaldéhyde (528 mg, $4,03 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol en présence de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, et maintenus sous agitation à reflux pendant 4 heures. Après extraction et évaporation, la purification par MPLC silice (dépôt sec) dans le toluène permet d'obtenir 280 mg de chalcone **C2** ($0,94 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 35 %).

b) Caractérisation:

➤ $R_F = 0,44$ sur CCM silice dans Toluène 100 %.

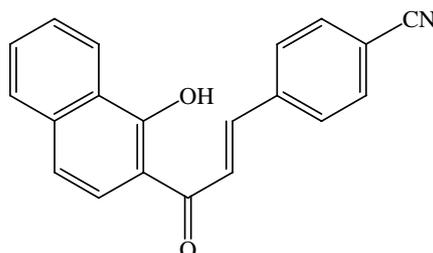
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 221, 277, 308, 323$ et 409 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 7,32 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-5'), δ 7,55 (1H, m, H-5''), δ 7,57 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5), δ 7,66 (1H, m, H-4''), δ 7,70 (1H, dt, $J = 1,2 ; 7,8$ Hz, H-4), δ 7,76 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H- α), δ 7,78 (1H, d él, $J = 7,8$ Hz, H-3''), δ 7,81 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-6'), δ 7,88 (1H, dt él, $J = 7,8$ Hz, H-6), δ 7,90 (1H, d, $J = 15,4$ Hz, H- β), δ 7,96 (1H, t él, H-2), δ 8,50 (1H, d él, $J = 8,3$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 113,3 (C-1'), δ 113,5 (C-3), δ 118,1 (CN), δ 118,5 (C-5'), δ 123,0 (C- α), δ 123,7 (C-6'), δ 124,6 (C-6''), δ 125,4 (C-3'), δ 126,1 (C-5''), δ 127,5 (C-3''), δ 129,9 (C-5), δ 130,6 (C-4''), δ 131,5 (C-2), δ 133,5 (C-4), δ 132,6 (C-6), δ 137,5 (C-4'), δ 136,1 (C-1), δ 141,9 (C- β), δ 164,7 (C-2'), δ 192,5 (C=O).

➤ SM-ESP (+30V) : m/z 300 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2.3.1.3. La 3',4'-benzo-4'-cyano-2'-hydroxychalcone C3 :



a) Synthèse:

La 1-hydroxy-2-acétonaphtone **39** (500 mg, $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol) et le 4-cyanobenzaldéhyde (528 mg, $4,03 \cdot 10^{-3}$ mol, 1,5 éq) sont dissous dans 35ml d'éthanol en présence de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, et maintenus sous agitation à reflux pendant 20 heures. Après extraction et évaporation, la purification par MPLC silice (dépôt sec) dans le toluène permet d'obtenir 447 mg de **C3** ($1,5 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 56 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,57$ sur CCM silice dans Toluène 100 %.

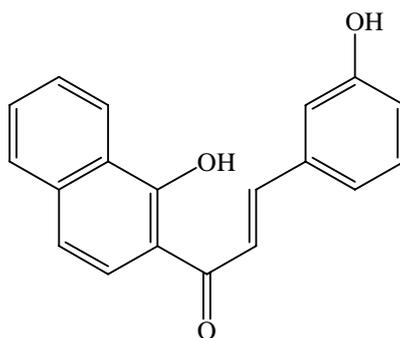
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 221, 277, 313, 325$ et 415 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 7,47 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-5'), δ 7,61 (1H, m, H-5''), δ 7,74 (1H, m, H-4''), δ 7,94 (1H, d él, $J = 8,0$ Hz, H-3''), δ 7,95 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, H-3/H-5), δ 7,96 (1H, d, $J = 15,3$ Hz, H- β), δ 8,17 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, H-2/H-6), δ 8,31 (1H, d, $J = 9,1$ Hz, H-6'), δ 8,32 (1H, d, $J = 15,4$ Hz, H- α), δ 8,36 (1H, d él, $J = 8,3$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 112,6 (C-4), δ 113,4 (C-1'), δ 118,4 (C-5'), δ 118,6 (CN), δ 123,7 (C-6''), δ 124,3 (C-3'), δ 124,4 (C- α), δ 125,1 (C-6'), δ 126,3 (C-5''), δ 127,7 (C-3''), δ 129,8 (C-2/C-6), δ 130,7 (C-4''), δ 132,7 (C-3 /C-5), δ 137,2 (C-4'), δ 138,9 (C-1), δ 142,9 (C- β), δ 163,4 (C-2'), δ 193,3 (C=O).

➤ SM-ESP (-40V) : m/z 298 $[\text{M-H}]^-$.

2.3.1.4. La 3',4'-benzo-2',3-dihydroxychalcone C4 :



a) Synthèse :

La 1-hydroxy-2-acétonaphtone **39** (500 mg, $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol) et le 3-hydroxybenzaldéhyde (656 mg, $5,28 \cdot 10^{-3}$ mol, 2 éq) sont dissous dans 35 ml d'éthanol en présence de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, et maintenus sous agitation à reflux pendant 29 heures. Après extraction et évaporation, la purification par MPLC silice (dépôt sec) dans CH_2Cl_2 -EtOAc 2,5% permet d'obtenir 343 mg de **C4** ($1,2 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 45 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,59$ sur CCM silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 2,5 %.

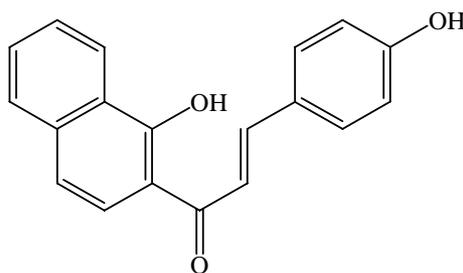
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 216, 265, 309, 324$ et 409 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 6,89 (1H, dt, $J = 2,6 ; 6,4$ Hz, H-4), δ 7,18 (1H, m, H-2), δ 7,27 (1H, m, H-6), δ 7,28 (1H, m, H-5), δ 7,37 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H-5'), δ 7,53 (1H, m, H-5''), δ 7,65 (1H, m, H-4''), δ 7,81 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-3''), δ 7,88 (2H, s él, H- β et H- α), δ 8,02 (1H, d él, $J = 9,0$ Hz, H-6'), δ 8,43 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 114,8 (C-1'), δ 116,1 (C-2), δ 119,2 (C-4), δ 119,6 (C-5'), δ 121,5 (C-6), δ 121,7 (C- α), δ 125,1 (C-6''), δ 125,5 (C-6'), δ 126,5 (C-3'), δ 127,0 (C-5''), δ 128,6 (C-3''), δ 131,2 (C-4''), δ 131,3 (C-5), δ 137,6 (C-1), δ 139,0 (C-4'), δ 146,6 (C- β), δ 159,2 (C-3), δ 164,9 (C-2'), δ 195,2 (C=O).

➤ SM-ESP (-40V) : m/z 289 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

2.3.1.5. La 3',4'-benzo-2',4-dihydroxychalcone **C5** :



a) Synthèse :

a.1) Protection du 4-hydroxybenzaldéhyde :

Le 4-hydroxybenzaldéhyde (1 g, $8,1 \cdot 10^{-3}$ mol) et le 3,4-DHP (2,07 g ; $24,6 \cdot 10^{-3}$ mol, 3 éq) sont dissous dans 35 ml de dichlorométhane, le PPTS (0,052 g ; $2,06 \cdot 10^{-3}$ moles, 0,025 éq) est alors ajouté au milieu réactionnel qui est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 6 heures et demi. Le milieu réactionnel est ensuite lavé, séché puis évaporé. La purification par MPLC silice dans le chloroforme-acétate d'éthyle 2 % permet d'obtenir 1,940 g de benzaldéhyde protégé **32** sous forme d'un produit sirupeux.

a.2) Condensation du benzaldéhyde protégé avec l'acétophénone :

La 1-hydroxy-2-acétonaphtone **39** (0,875 g, $4,7 \cdot 10^{-3}$ mol, 0,5 éq) et le benzaldéhyde protégé (1 éq) sont dissous dans 35 ml d'éthanol en présence de $\text{Ba}(\text{OH})_2$, et maintenus sous agitation à reflux pendant 48 heures. Après extraction et évaporation, la purification par lavages successifs avec le méthanol permet d'obtenir 1,3 g de **C5p**.

a.3) Déprotection de la chalcone :

1,3 g de la chalcone protégée **C5p** ($3,4 \cdot 10^{-3}$ mol) et 0,065 g d'APTS (0,1 éq ; $3,4 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans le méthanol. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 6 heures et demi. La réaction est totale et aboutit après l'extraction à la chalcone **C5** pure (1g, $3,4 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 72 %).

b) Caractérisation:

➤ $R_F = 0,53$ pour la chalcone protégée **C5p** et $R_F = 0,21$ pour la chalcone **C5** sur CCM silice dans Toluène-EtOAc 5 %.

➤UV dans MeOH : λ max = 219, 265, 306, 368 et 414 nm.

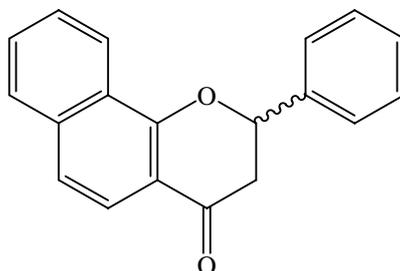
➤RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 6,87 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3/H-5), δ 7,35 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5'), δ 7,52 (1H, m, H-5''), δ 7,63 (1H, m, H-4''), δ 7,67 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2/H-6), δ 7,77 (1H, d, $J = 15,4$ Hz, H- α), δ 7,80 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-3''), δ 7,92 (1H, d, $J = 15,3$ Hz, H- β), δ 8,02 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-6'), δ 8,41 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-6'').

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 114,8 (C-1'), δ 117,0 (C-3/5), δ 118,3 (C- α), δ 119,4 (C-5'), δ 125,1 (C-6''), δ 125,5 (C-6'), δ 126,6 (C-3'), δ 126,8 (C-5''), δ 127,8 (C-1), δ 128,6 (C-3''), δ 131,1 (C-4''), δ 132,2 (C-2/C-6), δ 138,8 (C-4'), δ 147,0 (C- β), δ 162,0 (C-4), δ 164,6 (C-2'), δ 195,1 (C=O).

➤SM-ESP (-40V) : m/z 289 $[\text{M-H}]^-$.

2.3.2. Synthèse et caractérisation des 7,8-benzoflavanones:

2.3.2.1 la 7,8-benzoflavanone F1 :



a) Synthèse :

La chalcone **C1** (192 mg, $7,0 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissoute dans une solution méthanolique d'acide sulfurique à 4 %. La solution est maintenue à reflux pendant 4 heures. La purification sur CCM préparative silice dans le toluène aboutit à l'obtention de 113 mg de flavanone **F1** ($4,1 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 59 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,28$ sur CCM silice dans Toluène 100 %.

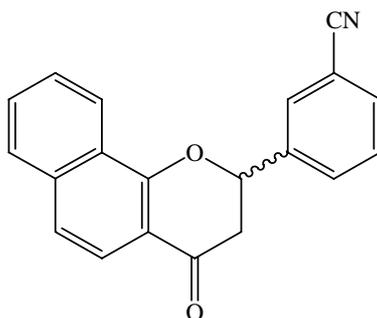
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{max} = 217, 260, 280, 290$ et 362 nm.

➤ RMN 1H (400 MHz) dans $CDCl_3$: δ 2,99 (1H, dd, $J = 3,2 ; 16,8$ Hz, H-3eq), δ 3,18 (1H, dd, $J = 13,5 ; 16,8$ Hz, H-3ax), δ 5,69 (1H, dd, $J = 3,1 ; 13,5$ Hz, H-2), δ 7,40-7,48 (4H, m, H-6/3'/4'/5'), δ 7,52 (1H, m, H-5''), δ 7,58 (2H, d él, $J = 8,0$ Hz, H-2'/6'), δ 7,62 (1H, m, H-4''), δ 7,81 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-3''), δ 7,91 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-5), δ 8,34 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans $CDCl_3$: δ 44,1 (C-3), δ 80,2 (C-2), δ 115,5 (C-4a), δ 121,3 (C-6), δ 121,7 (C-5), δ 123,7 (C-6''), δ 124,9 (C-8), δ 126,1 (C-2/6), δ 126,3 (C-5''), δ 127,9 (C-3''), δ 128,8 (C-4'), δ 128,9 (C-3'/5'), δ 129,7 (C-4''), δ 137,6 (C-7), δ 138,8 (C-1'), δ 159,8 (C-8a), δ 191,6 (C-4).

➤ SM-ESP (-40V): m/z 273 [M-H] $^-$.

2.3.2.2. La 3'-cyano-7,8-benzoflavanone F2 :



a) Synthèse :

La chalcone **C2** (385 mg, $1,3 \cdot 10^{-3}$ mol) est dissoute dans une solution méthanolique d'acide sulfurique à 4 %. Le milieu réactionnel est maintenu à reflux pendant 24 heures. La purification par MPLC silice (dépôt sec) dans le toluène permet d'obtenir 227 mg de flavanone **F2** ($7,6 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 59 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,22$ sur CCM silice dans Toluène 100 %.

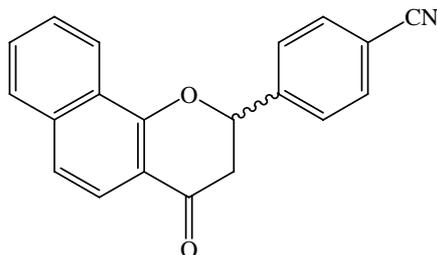
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\max} = 216, 259, 281, 289$ et 361 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 3,01 (1H, dd, $J = 3,4 ; 16,8$ Hz, H-3eq), δ 3,12 (1H, dd, $J = 13,1 ; 16,8$ Hz, H-3ax), δ 5,72 (1H, dd, $J = 3,4 ; 13,1$ Hz, H-2), δ 7,48 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-6), δ 7,56 (1H, m, H-5''), δ 7,61 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5'), δ 7,66 (1H, m, H-4''), δ 7,72 (1H, dt, $J = 1,3 ; 7,8$ Hz, H-4'), δ 7,79 (1H, dt él, $J = 7,8$ Hz, H-6'), δ 7,83 (1H, d él, $J = 8,1$ Hz, H-3''), δ 7,90 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-5), δ 7,93 (1H, t él, $J = 1,6$ Hz, H-2'), δ 8,33 (1H, d él, $J = 8,3$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 43,9 (C-3), δ 79,1 (C-2), δ 113,3 (C-3'), δ 115,6 (C-4a), δ 118,4 (CN), δ 121,6 (C-5), δ 121,8 (C-6), δ 123,4 (C-6''), δ 124,6 (C-8), δ 126,6 (C-5''), δ 128,0 (C-3''), δ 129,7 (C-2'), δ 129,8 (C-5'), δ 130,0 (C-4''), δ 130,3 (C-6'), δ 132,4 (C-4'), δ 137,7 (C-7), δ 140,5 (C-1'), δ 159,2 (C-8a), δ 190,4 (C=O).

➤ SM-ESP (-40V): m/z 298 $[\text{M-H}]^-$.

2.3.2.3. La 7,8-benzo-4'-cyanoflavanone F3 :



a) Synthèse :

La chalcone **C3** (429 mg, $1,4 \cdot 10^{-3}$ mol) est dissoute dans une solution méthanolique d'acide sulfurique à 4 %. La solution est maintenue à reflux pendant 7 heures. La purification par MPLC silice (dépôt sec) dans toluène-EtOAc 2,5 % permet d'obtenir 108 mg de flavanone **F3** ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 25 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,18$ sur CCM silice dans Toluène-EtOAc 2,5 %.

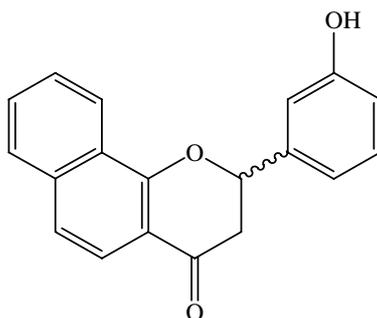
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\max} = 216, 258, 280, 290$ et 361 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 3,02 (1H, dd, $J = 3,6 ; 16,8$ Hz, H-3eq), δ 3,12 (1H, dd, $J = 12,9 ; 16,8$ Hz, H-3ax), δ 5,76 (1H, dd, $J = 3,6 ; 12,9$ Hz, H-2), δ 7,48 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-6), δ 7,56 (1H, m, H-5''), δ 7,66 (1H, m, H-4''), δ 7,71 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, H-2'/6'), δ 7,79 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'/5'), δ 7,83 (1H, d él, $J = 8,1$ Hz, H-3''), δ 7,90 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-5), δ 8,33 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 43,9 (C-3), δ 79,3 (C-2), δ 112,7 (C-4'), δ 115,6 (C-4a), δ 118,4 (CN), δ 121,6 (C-5), δ 121,8 (C-6), δ 123,4 (C-6''), δ 124,6 (C-8), δ 126,6 (C-5''), δ 126,7 (C-2'/6'), δ 128,0 (C-3''), δ 129,9 (C-4''), δ 132,8 (C-3'/5'), δ 137,7 (C-7), δ 140,5 (C-1'), δ 159,2 (C-8a), δ 190,4 (C=O).

➤ SM-ESP (+30V): m/z 300 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.3.2.4. La 7,8-benzo-3'-hydroxyflavanone F4 :



a) Synthèse :

La chalcone **C4** (343 mg, $1,2 \cdot 10^{-3}$ mol) est dissoute dans une solution méthanolique d'acide sulfurique à 4 %. La solution est maintenue à reflux pendant 6 heures. La purification par MPLC silice (dépôt sec) dans CH_2Cl_2 -EtOAc 2,5 % permet d'obtenir 295 mg de flavanone **F4** ($1,02 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 86 %).

b) Caractérisation:

➤ $R_F = 0,37$ sur CCM silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 2,5 %.

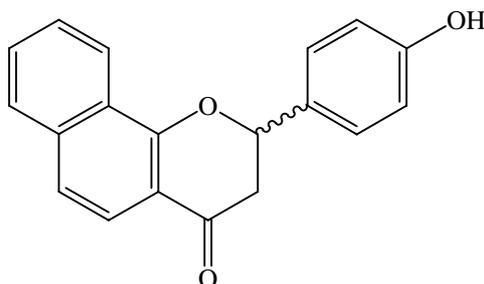
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 216, 260, 281, 289$ et 362 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 2,97 (1H, dd, $J = 3,3 ; 16,8$ Hz, H-3eq), δ 3,26 (1H, dd, $J = 12,6 ; 16,7$ Hz, H-3ax), δ 5,84 (1H, dd, $J = 3,3 ; 12,5$ Hz, H-2), δ 6,80 (1H, dt, $J = 1,6 ; 7,9$ Hz, H-4'), δ 7,03 (1H, d él, $J = 7,4$ Hz, H-6'), δ 7,04 (1H, s él, H-2'), δ 7,26 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, H-5'), δ 7,55 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-6), δ 7,62 (1H, m, H-5''), δ 7,72 (1H, m, H-4''), δ 7,78 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 7,95 (1H, d él, $J = 8,1$ Hz, H-3''), δ 8,27 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6''), δ 9,51 (1H, s, 3'-OH).

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 42,7 (C-3), δ 79,3 (C-2), δ 113,1 (C-2'), δ 115,1 (C-4a), δ 115,3 (C-4'), δ 116,7 (C-6'), δ 120,7 (C-6), δ 121,1 (C-5), δ 122,9 (C-6''), δ 124,2 (C-8), δ 126,5 (C-5''), δ 127,9 (C-3''), δ 129,5 (C-5'), δ 129,7 (C-4''), δ 136,8 (C-7), δ 140,2 (C-1'), δ 157,5 (C-3'), δ 158,8 (C-8a), δ 190,9 (C=O).

➤ SM-ESP (+30V): m/z 291 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.3.2.5. La 4'-hydroxy-7,8-benzoflavanone F5:



a) Synthèse:

La chalcone **C5** (500 mg, $1,7 \cdot 10^{-3}$ mol) est dissoute dans une solution méthanolique d'acide sulfurique à 4 %. La solution est maintenue à reflux pendant 5 heures. La purification par MPLC silice (dépôt sec) dans CH_2Cl_2 -EtOAc 2 % permet d'obtenir 329 mg de flavanone **F5** ($1,13 \cdot 10^{-3}$ mol, rendement 66 %).

b) Caractérisation:

➤ $R_F = 0,20$ sur CCM silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 2 %.

➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 218, 260, 280, 290$ et 362 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans acétone- d_6 : δ 2,90 (1H, dd, $J = 3,0 ; 16,7$ Hz, H-3eq), δ 3,27 (1H, dd, $J = 13,3 ; 16,7$ Hz, H-3ax), δ 5,76 (1H, dd, $J = 3,0 ; 13,2$ Hz, H-2), δ 6,96 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-3'/H-5'), δ 7,51 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-6), δ 7,54 (2H, d, $J = 8,6$ Hz, H-2'/H-6'), δ 7,57 (1H, m, H-5''), δ 7,68 (1H, m, H-4''), δ 7,83 (1H, d, $J = 8,7$ Hz, H-5), δ 7,91 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-3''), δ 8,28 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-6'').

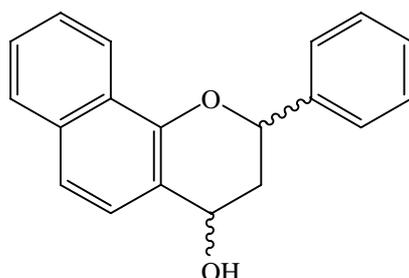
➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans acétone- d_6 : δ 44,1 (C-3), δ 81,2 (C-2), δ 116,2 (C-3'/5'), δ 116,4 (C-4a), δ 121,6 (C-6), δ 122,4 (C-5), δ 124,2 (C-6''), δ 125,9 (C-8), δ 126,1 (C-2'/6'), δ 127,2 (C-5''), δ 128,8 (C-3''), δ 130,4 (C-4''), δ 130,9 (C-1'), δ 138,4 (C-7), δ 158,7 (C-4'), δ 160,4 (C-8a), δ 191,8 (C=O).

➤ SM-ESP (-40V): m/z 289 [M-H] $^-$.

2.3.3. Synthèse et caractérisation des 7,8-benzoflavan-4-ols:

La réduction des flavanones en flavan-4-ols est une réaction qui est totale, l'instabilité de ces composés réduit cependant le rendement.

2.3.3. 1. Le 2,4-cis-7,8-benzoflavan-4-ol **f1** :



a) Synthèse :

52 mg de flavanone **F1** ($1,9 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 35,9 mg de NaBH_4 (5 éq, $9,5 \cdot 10^{-4}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à la température de 6°C . Après extraction et évaporation, le résidu est purifié sur CCM silice préparative dans toluène-EtOAc 10 %. On obtient 42,5 mg de 2,4-cis-7,8-benzoflavan-4-ol **f1** ($1,5 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 81 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,38$ sur CCM silice dans Toluène-EtOAc 10 %.

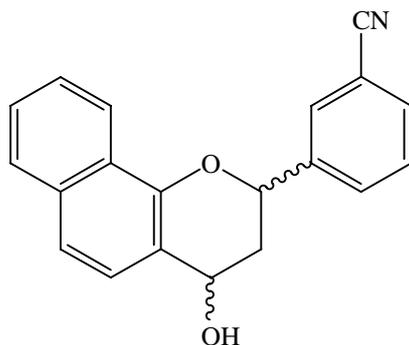
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 218, 239, 296$ et 324 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 2,25 (1H, ddd, $J = 9,9 ; 11,3 ; 13,2$ Hz, H-3ax), δ 2,66 (1H, ddd, $J = 2,1 ; 6,4 ; 13,3$ Hz, H-3eq), δ 5,20 (1H, t él, $J = 7,7$ Hz, H-4), δ 5,35 (1H, dd, $J = 1,7 ; 11,3$ Hz, H-2), δ 7,36 (1H, dt, $J = 2,4 ; 7,2$ Hz, H-4'), δ 7,41-7,53 (5H, m, H-6/H-4''/H-5''/H3'/H5'), δ 7,52 (2H, d, $J = 7,2$ Hz, H-2'/6'), δ 7,58 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,77 (1H, d él, $J = 7,9$ Hz, H-3''), δ 8,23 (1H, d él, $J = 8,6$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 40,0 (C-3), δ 65,8 (C-4), δ 76,9 (C-2), δ 119,1 (C-4a), δ 120,4 (C-6), δ 122,2 (C-6''), δ 124,3 (C-5), δ 124,8 (C-8), δ 125,5 (C-5''), δ 125,9 (C-2'/6'), δ 126,5 (C-4''), δ 127,4 (C-3''), δ 128,1 (C-4'), δ 128,6 (C-3'/5'), δ 134,1 (C-7), δ 140,7 (C-1'), δ 149,6 (C-8a).

➤ SM-ESP (+40): m/z 299 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.3.2. Le 2,4-*cis*-7,8-benzo-3'-cyano-flavan-4-ol **f2** :



a) Synthèse:

158 mg de flavanone **F2** ($5,3 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 100 mg de NaBH_4 (5 éq, $2,6 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à la température de 6°C . Après extraction et évaporation, le résidu est purifié sur CCM silice préparative dans CHCl_3 -EtOAc 2,5 %. On obtient 101 mg du 2,4-*cis*-7,8-benzo-3'-cyano-flavan-4-ol **f2** ($3,4 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 64 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,31$ sur CCM silice dans CHCl_3 -EtOAc 2,5 %.

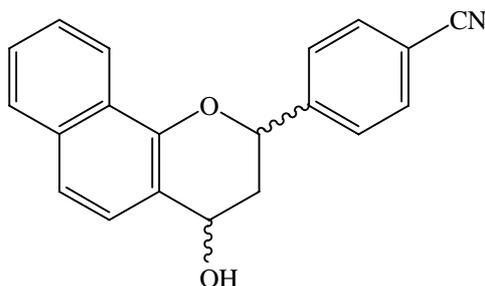
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 222, 240, 285$ et 325 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 2,19 (1H, ddd, $J = 10,0 ; 11,6 ; 13,2$ Hz, H-3ax), δ 2,66 (1H, ddd, $J = 2,1 ; 6,4 ; 13,2$ Hz, H-3eq), δ 5,26 (1H, dd, $J = 6,4 ; 10,0$ Hz, H-4), δ 5,39 (1H, dd, $J = 1,8 ; 11,5$ Hz, H-2), δ 7,48 – 7,53 (3H, m, H-6 ; H-4'' et H-5''), δ 7,55 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5'), δ 7,59 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,67 (1H, dt, $J = 1,2 ; 7,8$ Hz, H-4'), δ 7,77 (1H, dt él, $J = 7,9$ Hz, H-6'), δ 7,80 (1H, dd, $J = 3,4 ; 6,4$ Hz, H-6''), δ 7,87 (1H, t él, H-2'), δ 8,20 (1H, d él, $J = 8,3$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 40,0 (C-3), δ 65,6 (C-4), δ 75,9 (C-2), δ 112,9 (C-3'), δ 118,7 (CN), δ 119,0 (C-4a), δ 121,0 (C-6), δ 122,0 (C-6''), δ 124,1 (C-5), δ 124,6 (C-8), δ 125,9 (C-5''), δ 126,8 (C-4''), δ 127,6 (C-3''), δ 129,5 (C-5'), δ 129,6 (C-2'), δ 130,3 (C-6'), δ 131,7 (C-4'), δ 134,1 (C-7), δ 142,4 (C-1'), δ 149,0 (C-8a).

➤ SM-ESP (+60V) : m/z 324 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.3.3. Le 2,4-*cis*- 7,8-benzo-4'-cyano-flavan-4-ol **f3** :



a) Synthèse :

108 mg de la flavanone **F3** ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 68,3 mg de NaBH_4 (5 éq, $1,8 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à une température de 6°C . Après extraction et évaporation, le résidu est purifié sur CCM silice préparative dans CHCl_3 -EtOAc 2,5 %. On obtient 87,5 mg du 2,4-*cis*-7,8-benzo-4'-cyano-flavan-4-ol **f3** ($2,9 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 81 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,42$ sur CCM silice dans CHCl_3 -EtOAc 2,5 %.

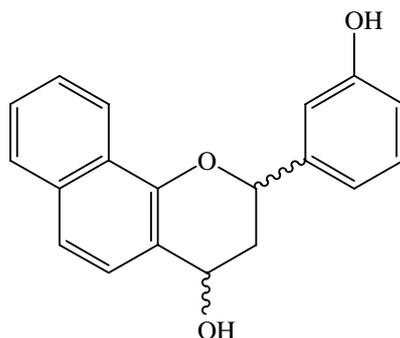
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 221, 237, 294$ et 323 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 2,09 (1H, ddd, $J = 10,3 ; 12,0 ; 12,9$ Hz, H-3ax), δ 2,58 (1H, ddd, $J = 1,9 ; 6,4 ; 13,0$ Hz, H-3eq), δ 5,22 (1H, dd, $J = 6,4 ; 10,3$ Hz, H-4), δ 5,46 (1H, dd, $J = 1,7 ; 11,9$ Hz, H-2), δ 7,42 (1H, m, H-5''), δ 7,45 (1H, m, H-4''), δ 7,46 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-6), δ 7,60 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 7,77 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, H-2'/6'), δ 7,78 (1H, m, H-3''), δ 7,81 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5'), δ 8,14 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 40,9 (C-3), δ 66,0 (C-4), δ 77,8 (C-2), δ 112,7 (C-4'), δ 119,7 (CN), δ 121,2 (C-4a), δ 121,5 (C-6), δ 122,8 (C-6''), δ 125,7 (C-5), δ 126,1 (C-8), δ 126,5 (C-5''), δ 127,4 (C-4''), δ 128,0 (C-2'/6'), δ 128,6 (C-3''), δ 133,7 (C-3'/5'), δ 135,5 (C-7), δ 148,2 (C-1'), δ 150,3 (C-8a).

➤ SM-ESP (-40V): m/z 300 [M-H].

2.3.3.4. Le 2,4-*cis*-7,8-benzo-3'-hydroxy-flavan-4-ol **f4** :



a) Synthèse:

115 mg de la flavanone **F4** ($3,97 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 75 mg de NaBH_4 (5 éq, $2,0 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à une température de 6°C . Après extraction et évaporation, 108 mg d'un précipité blanc sont obtenus, la CCM montre une seule tache qui correspond au flavan-4-ol **f4** pur ($3,70 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 93 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,51$ sur CCM silice dans $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH } 5\%$.

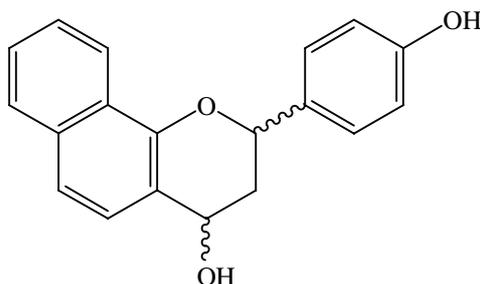
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 221, 239, 283$ et 324 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 2,12 (1H, ddd, $J = 10,6 ; 12,2 ; 12,8$ Hz, H-3ax), δ 3,26 (1H, ddd, $J = 1,8 ; 6,4 ; 13,0$ Hz, H-3eq), δ 5,21 (1H, dd, $J = 6,4 ; 10,5$ Hz, H-4), δ 5,29 (1H, dd, $J = 1,5 ; 12,0$ Hz, H-2), δ 6,79 (1H, ddd, $J = 0,8 ; 2,5 ; 8,1$ Hz, H-4'), δ 7,02 (1H, dt él, $J = 7,6$ Hz, H-6'), δ 7,05 (1H, m, H-2'), δ 7,25 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, H-5'), δ 7,41 (1H, m, H-5''), δ 7,43 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), δ 7,44 (1H, m, H-4''), δ 7,60 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,76 (1H, d él, $J = 8,3$ Hz, H-3''), δ 8,15 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 41,4 (C-3), δ 66,5 (C-4), δ 78,7 (C-2), δ 114,0 (C-2'), δ 116,0 (C-4'), δ 118,3 (C-6'), δ 121,2 (C-6), δ 121,3 (C-4a), δ 123,1 (C-6''), δ 125,8 (C-5), δ 126,3 (C-8), δ 126,4 (C-5''), δ 127,3 (C-4''), δ 128,6 (C-3''), δ 130,8 (C-5'), δ 135,6 (C-7), δ 144,3 (C-1'), δ 150,9 (C-8a), δ 159,0 (C-3').

➤ SM-ESP (+30V) : m/z 315 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2.3.3.5. le 7,8-benzo-4'-hydroxy-flavan-4-ol f5:



a) Synthèse :

151 mg de la flavanone **F5** ($5,2 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 35 ml d'éthanol et 98,5 mg de NaBH_4 (5 éq, $2,6 \cdot 10^{-3}$ mol) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 24 heures à une température de 6°C . Après extraction et évaporation, le résidu est purifié par lavages successifs avec de l'éther ; on obtient 124 mg d'un mélange 50-50 d'isomères 2,4-*cis* et 2,4-*trans* du flavan-4-ol ($4,2 \cdot 10^{-4}$ mol, 81 %).

b) Caractérisation :

➤ $R_F = 0,52$ sur CCM silice dans CHCl_3 -MeOH 5 %.

➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 221, 238, 284$ et 322 nm.

➤ SM-ESP (+30V) : m/z 315 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

➤ données RMN du 2,4-*cis*- 7,8-benzo-4'-hydroxy-flavan-4-ol f5c :

RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 2,17 (1H, ddd, $J = 10,7 ; 12,6 ; 13,0$ Hz, H-3ax), δ 2,49 (1H, ddd, $J = 1,7 ; 6,4 ; 13,0$ Hz, H-3 eq), δ 5,19 (1H, dd, $J = 6,5 ; 10,5$ Hz, H-4), δ 5,23 (1H, dd, $J = 1,2 ; 12,6$ Hz, H-2), δ 6,85 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5'), δ 7,37 (1H, m, H-5''), δ 7,38 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'/6'), δ 7,38-7,47 (2H, m, H-6 et H-4''), δ 7,59 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 7,74 (1H, d él, $J = 7,3$ Hz, H-3''), δ 8,09 (1H, d él, $J = 8,0$ Hz, H-6'').

RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 41,0 (C-3), δ 66,6 (C-4), δ 78,7 (C-2), δ 116,3 (C-3'/5'), δ 118,5 (C-4a), δ 120,9 (C-6), δ 123,1 (C-6''), δ 125,7 (C-5), δ 126,2 (C-5''), δ 126,6 (C-8), δ 127,2 (C-4''), δ 128,4 (C-3''), δ 128,8 (C-2'/6'), δ 133,6 (C-1'), δ 135,5 (C-7), δ 151,1 (C-8a), δ 158,5 (C-4').

➤ données RMN du 2,4-*trans*- 7,8-benzo-4'-hydroxy-flavan-4-ol f5t :

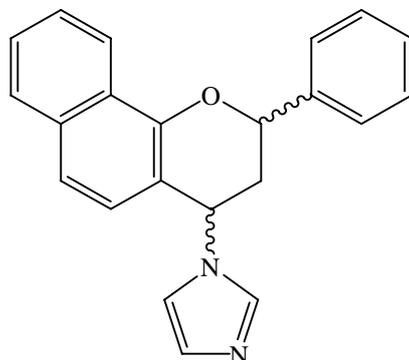
RMN ^1H (400 MHz) dans CD_3OD : δ 2,19 (1H, ddd, $J = 3,5 ; 11,4 ; 15,0$ Hz, H-3ax), δ 2,26 (1H, dt, $J = 2,6 ; 14,2$ Hz, H-3 eq), δ 4,85 (1H, m, H-4), δ 5,27 (1H, dd, $J = 2,8 ; 11,5$ Hz, H-2), δ 6,86 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5'), δ 7,38 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'/6'), δ 7,38 - 7,43

(3H, m, H-5 ; H-6 et H-5''), δ 7,45 (1H, m, H-4''), δ 7,76 (1H, d él, $J = 7,6$ Hz, H-3''), δ 8,17 (1H, d él, $J = 7,7$ Hz, H-6'').

RMN ^{13}C (100 MHz) dans CD_3OD : δ 40,1 (C-3), δ 64,7 (C-4), δ 74,7 (C-2), δ 116,3 (C-3'/5'), δ 121,0 (C-6), δ 121,1 (C-4a), δ 123,2 (C-6''), δ 126,3 (C-5''), δ 126,6 (C-8), δ 127,6 (C-4''), δ 128,5 (C-3''), δ 128,7 (C-2'/6'), δ 128,9 (C-5), δ 133,4 (C-1'), δ 135,6 (C-7), δ 151,6 (C-8a), δ 158,4 (C-4').

2.3.4. Synthèse et caractérisation des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes :

2.3.4.1. Le 7,8-benzo-4-imidazolylflavane **I1** :

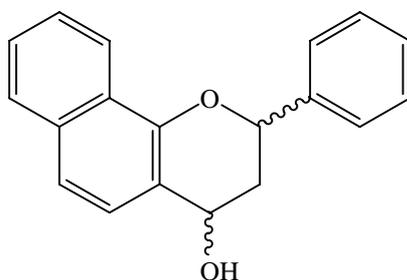


a) Synthèse:

18,7 mg de *cis*-flavan-4-ol **f1** ($6,8 \cdot 10^{-5}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 43,9 mg (4 éq, $2,7 \cdot 10^{-4}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 2 jours à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris par du chloroforme. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par de l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CHCl_3 -MeOH 1,5 % permet d'obtenir 4,5 mg de produit **I1** ($1,4 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 21 %) et 7,5 mg de *trans*-flavan-4-ol **f1t** ($2,7 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 40 %).

b) Caractérisation:

b.1) caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzoflavan-4-ol **f1t** :



➤ $R_F = 0,75$ sur CCM silice dans CHCl_3 -MeOH 1,5 %.

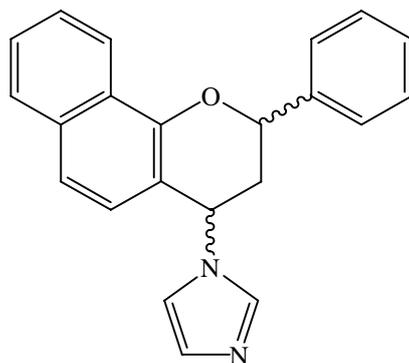
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 220, 237, 293$ et 323 nm.

➤RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,18 (1H, ddd, *J* = 3,6 ; 12,2 ; 14,3 Hz, H-3ax), δ 2,32 (1H, dt, *J* = 2,2 ; 14,3 Hz, H-3eq), δ 4,92 (1H, t él, *J* = 2,6 Hz, H-4), δ 5,38 (1H, dd, *J* = 2,0 ; 12,2 Hz, H-2), δ 7,35 – 7,52 (7H, m, H-6/H-5/H-3'/H-4'/H-5'/H4''/H-5''), δ 7,57 (2H, d ; *J* = 7,9 Hz, H2'/6'), δ 7,77 (1H, d él, *J* = 7,6 Hz, H-3''), δ 8,29 (1H, d él, *J* = 7,9 Hz, H-6'').

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃ : δ 38,6 (C-3), δ 64,0 (C-4), δ 73,4 (C-2), δ 116,9 (C-4a), δ 120,4 (C-6), δ 122,4 (C-6''), δ 125,2 (C-8), δ 125,6 (C-5''), δ 126,2 (C-2'/6'), δ 126,9 (C-5/C-4''), δ 127,5 (C-3''), δ 127,9 (C-4'), δ 128,6 (C-3'/5'), δ 134,5 (C-7), δ 141,2 (C-1'), δ 150,4 (C-8a).

➤SM-ESP (+40): *m/z* 299 [M+Na]⁺.

b.2) caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzo-4-imidazolylflavane II:



➤R_F = 0,34 sur CCM silice dans CHCl₃-MeOH 1,5 %.

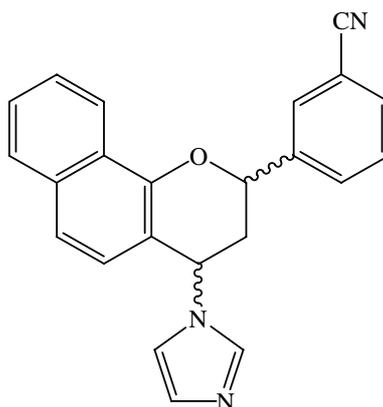
➤UV dans MeOH : λ max = 216, 236, 291 et 323 nm.

➤RMN ¹H (400 MHz) dans CDCl₃ : δ 2,50 (1H, dt, *J* = 2,6 ; 14,4 Hz, H-3eq), δ 2,59 (1H, ddd, *J* = 4,6 ; 11,0 ; 14,4 Hz, H-3ax), δ 5,18 (1H, dd, *J* = 2,4 ; 11,0 Hz, H-2), δ 5,49 (1H, t él, *J* = 3,6 Hz, H-4), δ 6,70 (1H, s él, H-imid), δ 7,12 (1H, s él, H-imid), δ 7,14 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-5), δ 7,35 - 7,59 (9H, m, H-6/H-2'/H-3'/H-4'/H-5'/H-6'/H-4''/H-5''/H-imid), δ 7,82 (1H, d él, *J* = 7,5 Hz, H-3''), δ 8,20 (1H, d él, *J* = 8,0 Hz, H-6'').

➤RMN ¹³C (100 MHz) dans CDCl₃: δ 38,5 (C-3), δ 51,6 (C-4), δ 73,5 (C-2), δ 110,9 (C-4a), δ 118,7 (C- imid), δ 121,2 (C-6), δ 122,3 (C-6''), δ 125,2 (C-8), δ 126,0 (C-2'/6'), δ 126,1 (C-5''), δ 126,5 (C-5), δ 127,5 (C-4''), δ 127,6 (C-3''), δ 128,4 (C-4'), δ 128,8 (C-3'/5'), δ 129,7 (C-imid), δ 134,7 (C-7), δ 137,0 (C- imid), δ 139,8 (C-1'), δ 151,3 (C-8a).

➤SM-ESP (+40V): *m/z* 349 [M+Na]⁺.

2.3.4.2. Le 7,8-benzo-3'-cyano-4-imidazolylflavane **I2** :



a) Synthèse:

a.1) à partir du 2,4-*cis*-7,8-benzo-3'-cyanoflavan-4-ol **f2** :

90 mg de *cis*-flavan-4-ol **f2** ($0,3 \cdot 10^{-3}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 388 mg (8 éq, $2,4 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 6 heures et demi à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans le dichlorométhane et le chloroforme. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par de l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 20 % permet d'obtenir 17,8 mg de produit **I2** ($5,1 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 17 %), 50 mg de *trans*-flavan-4-ol **f2t** ($1,7 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 57 %) et 8,7 mg de l'imidazole.

a.2) à partir de 2,4-*trans*-7,8-benzo-3'-cyano-flavan-4-ol **f2t** :

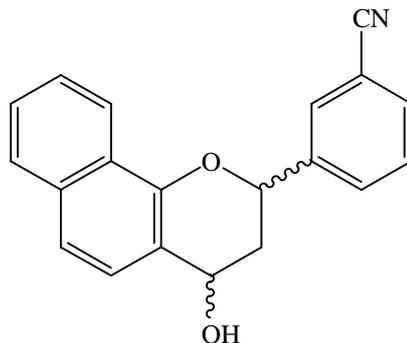
50 mg de *trans*-flavan-4-ol **f2t** ($1,7 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 538 mg (20 éq, $3,3 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 19 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris par du dichlorométhane. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par de l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. La purification sur CCM commerciale silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 20 % (deux migrations) permet d'obtenir 21,7 mg de produit **I2** correspondant au mélange d'isomères *cis* et *trans* ($6,2 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 37 %) sous forme de deux fractions :

- 18,3 mg ($5,2 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 31 %) de **I2a** où l'isomère *trans* **I2t** est majoritaire (83 %)
- 3,4 mg ($9,6 \cdot 10^{-6}$ mol, rendement 6 %) de **I2b** où l'isomère *cis* **I2c** est majoritaire (71 %)

Lors de cette réaction, 3,2 mg de l'imidazole ont également été isolés.

b) Caractérisation :

b.1) caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzo-3'-cyanoflavan-4-ol f2t :



➤ $R_F = 0,57$ sur CCM silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 20 %.

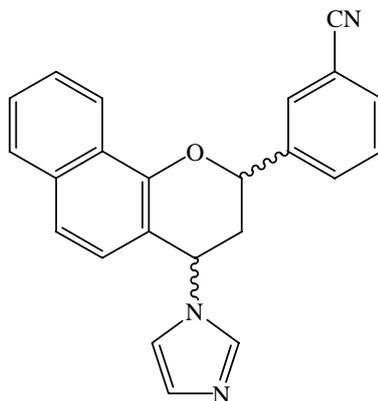
➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 220, 242, 283$ et 322 nm.

➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 2,19 (1H, ddd, $J = 3,5 ; 12,3 ; 14,2$ Hz, H-3ax), δ 2,42 (1H, dt, $J = 2,2 ; 14,2$ Hz, H-3eq), δ 4,98 (1H, t él, $J = 2,8$ Hz, H-4), δ 5,47 (1H, dd, $J = 1,8 ; 12,2$ Hz, H-2), δ 7,42 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-6), δ 7,47 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5) δ 7,50 (1H, m, H-5''), δ 7,52 (1H, m, H-4''), δ 7,56 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5'), δ 7,67 (1H, m, H-4'), δ 7,75 - 7,84 (2H, m, H-6' et H-3''), δ 7,92 (1H, t él, H-2'), δ 8,27 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-6'').

➤ RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 38,9 (C-3), δ 63,4 (C-4), δ 72,5 (C-2), δ 112,8 (C-3'), δ 117,2 (C-4a), δ 118,8 (CN), δ 120,8 (C-6), δ 122,1 (C-6''), δ 125,0 (C-8), δ 125,8 (C-5), δ 126,9 (C-5''), δ 127,0 (C-4''), δ 127,6 (C-3''), δ 129,4 (C-5'), δ 129,8 (C-2'), δ 130,6 (C-6'), δ 131,5 (C-4'), δ 134,5 (C-7), δ 143,0 (C-1'), δ 149,7 (C-8a).

➤ SM-ESP (+60V) : m/z 324 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

b.2) caractérisation du 7,8-benzo-3'-cyano-4-imidazolylflavane I2 :



➤ $R_F = 0,12$ pour **I2t** ; $R_F = 0,18$ pour **I2c** ; sur CCM silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 20 % avec deux migrations.

➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 216, 241, 283$ et 323 nm.

➤ SM-ESP (+30V): m/z 374 $[M+Na]^+$.

➤ **données RMN du 2,4-*cis*-7,8-benzo-3'-cyano-4-imidazolyflavane I2c :**

RMN 1H (400 MHz) dans $CDCl_3$: δ 2,55 (1H, dt, $J = 11,5 ; 13,6$ Hz, H-3ax), δ 2,77 (1H, ddd, $J = 1,8 ; 6,3 ; 13,4$ Hz, H-3eq), δ 5,51 (1H, d él, $J = 11,8$ Hz, H-2), δ 5,87 (1H, dd, $J = 6,3 ; 11,2$ Hz, H-4), δ 6,82 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 6,87 (1H, s él, H-imid), δ 7,12 (1H, s él, H-imid), δ 7,40 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-6), δ 7,50 - 7,56 (2H, m, H-4'' et H-5''), δ 7,59 (1H, t, $J = 7,9$ Hz, H-5'), δ 7,69 (1H, s él, H-imid), δ 7,70 (1H, dt él, $J = 7,8$ Hz, H-4'), δ 7,77 - 7,86 (2H, m, H-6' et H-3''), δ 7,92 (1H, t él, H-2'), δ 8,25 (1H, d él, $J = 7,4$ Hz, H-6'').

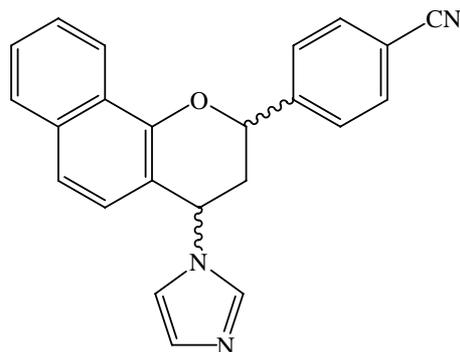
RMN ^{13}C (100 MHz) dans $CDCl_3$: δ 39,1 (C-3), δ 53,3 (C-4), δ 76,3 (C-2), δ 113,1 (C-3'), δ 114,3 (C-4a), δ 117,5 (C-imid), δ 118,5 (CN), δ 121,6 (C-6), δ 121,9 (C-6''), δ 123,7 (C-5), δ 124,7 (C-8), δ 126,3 (C-5''), δ 127,3 (C-4''), δ 127,7 (C-3''), δ 129,5 (C-5')*, δ 129,7 (C-2')*, δ 130,1 (C-6'), δ 130,2 (C-imid), δ 132,1 (C-4'), δ 134,3 (C-7), δ 137,2 (C-imid), δ 141,4 (C-1'), δ 150,0 (C-8a).

➤ **données RMN du 2,4-*trans*-7,8-benzo-3'-cyano-4-imidazolyflavane I2r:**

RMN 1H (400 MHz) dans $CDCl_3$: δ 2,47 - 2,61 (2H, m, H-3eq et H-3ax), δ 5,19 (1H, dd, $J = 4,1 ; 9,9$ Hz, H-2), δ 5,52 (1H, t él, $J = 3,2$ Hz, H-4), δ 6,98 (1H, s él, H-imid), δ 7,14 (1H, s él, H-imid), δ 7,17 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 7,49 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6), δ 7,52 (1H, s él, H-imid), δ 7,53 - 7,56 (3H, m, H-5'; H-4'' et H-5''), δ 7,66 (1H, dt él, $J = 8,5$ Hz, H-4'), δ 7,77 - 7,86 (3H, m, H-2', H-6' et H-3''), δ 8,31 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-6'').

RMN ^{13}C (100 MHz) dans $CDCl_3$: δ 38,7 (C-3), δ 51,1 (C-4), δ 72,4 (C-2), δ 110,7 (C-4a), δ 113,1 (C-3'), δ 117,5 (C-imid), δ 118,5 (CN), δ 121,7 (C-6), δ 122,0 (C-6''), δ 124,9 (C-8), δ 126,4 (C-5''), δ 126,5 (C-5), δ 127,7 (C-4''), δ 127,8 (C-3''), δ 129,6 (C-5')*, δ 129,7 (C-2')*, δ 130,0 (C-imid), δ 130,4 (C-6'), δ 132,0 (C-4'), δ 134,7 (C-7), δ 136,9 (C-imid), δ 141,5 (C-1'), δ 150,6 (C-8a).

2.3.4.3. le 7,8-benzo-4'-cyano-4-imidazolylflavane **I3** :

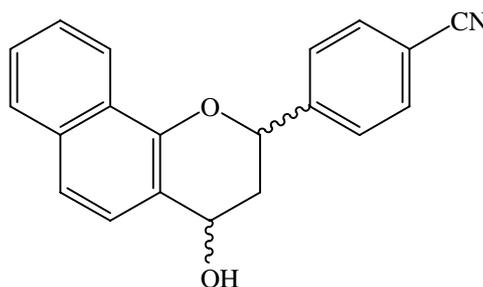


a) Synthèse :

74 mg de *cis*-flavan-4-ol **f3** ($2,5 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 405 mg (10 éq, $2,5 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 19 heures et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans du chloroforme et de l'éther. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par de l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. La purification sur CCM préparative silice dans CHCl_3 -MeOH 2,5 % permet d'obtenir 26,5 mg de produit **I3a** correspondant au *trans*-imidazolé **I3t** ($7,5 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 30 %), 6 mg de produit **I3b** correspondant au *cis*-imidazolé **I3c** ($1,7 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 7 %), et 6,8 mg de *trans*-flavan-4-ol **f3t** ($2,2 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 9 %).

b) Caractérisation:

b.1) caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzo-4'-cyanoflavan-4-ol **f3t** :



➤ $R_F = 0,60$ sur CCM silice dans CHCl_3 -MeOH 2,5 %.

➤ UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 222, 238, 294$ et 324 nm.

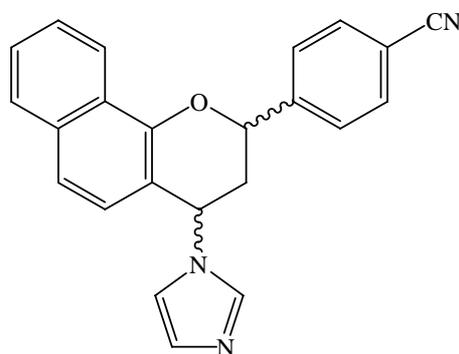
➤ RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 2,13 (1H, ddd, $J = 3,5 ; 12,3 ; 14,3$ Hz, H-3ax), δ 2,40 (1H, dt, $J = 2,2 ; 14,2$ Hz, H-3eq), δ 4,97 (1H, t él, $J = 2,8$ Hz, H-4), δ 5,47 (1H, dd, $J = 1,9 ; 12,2$ Hz, H-2), δ 7,40 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6), δ 7,48 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,50 (1H, m,

H-5''), δ 7,53 (1H, m, H-4''), δ 7,71 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, H-2'/6'), δ 7,76 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'/5'), δ 7,81 (1H, d él, $J = 7,2$ Hz, H-3''), δ 8,14 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6'').

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 38,6 (C-3), δ 63,6 (C-4), δ 72,7 (C-2), δ 111,8 (C-4'), δ 118,7 (CN), δ 121,0 (C-4a et C-6), δ 122,1 (C-6''), δ 125,8 (C-5), δ 126,8 (C-2'/6'), δ 127,1 (C-5''), δ 127,6 (C-4''), δ 130,5 (C-3''), δ 132,5 (C-3'/5'), δ 134,5 (C-7), δ 146,6 (C-1'), δ 149,7 (C-8a).

➤SM-ESP (-40V): m/z 300 $[\text{M-H}]^-$.

b.2) caractérisation du 7,8-benzo 4'-cyano-4-imidazolylflavane I3



b.2.1) caractérisation du 2,4-cis-7,8-benzo-4'-cyano-4-imidazolylflavane I3c :

➤ $R_F = 0,26$ sur CCM silice dans CHCl_3 -MeOH 2,5 %.

➤UV dans MeOH : λ max = 221, 242, 282 et 323 nm.

➤RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 2,54 (1H, dt, $J = 11,6 ; 13,2$ Hz, H-3ax), δ 2,77 (1H, ddd, $J = 1,8 ; 6,3 ; 13,5$ Hz, H-3eq), δ 5,53 (1H, d él, $J = 10,5$; H-2), δ 5,88 (1H, dd, $J = 6,3 ; 11,2$ Hz, H-4), δ 6,82 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 6,85 (1H, s él, H-imid), δ 7,12 (1H, s él, H-imid), δ 7,40 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-6), δ 7,53 (1H, m, H-5''), δ 7,55 (1H, m, H-4''), δ 7,69 (1H, s él, H-imid), δ 7,71 (2H, d, $J = 8,3$ Hz, H-2'/6'), δ 7,77 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'/5'), δ 7,80 (1H, m, H-3''), δ 8,25 (1H, d él, $J = 8,0$ Hz, H-6'').

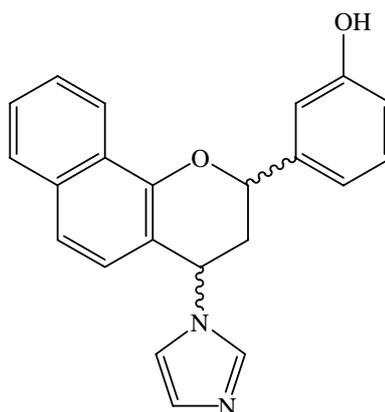
➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 39,1 (C-3), δ 53,3 (C-4), δ 76,6 (C-2), δ 112,4 (C-4'), δ 114,3 (C-4a), δ 117,5 (C-imid), δ 118,5 (CN), δ 121,7 (C-6), δ 121,9 (C-6''), δ 123,7 (C-5), δ 124,8 (C-8), δ 126,3 (C-5''), δ 126,6 (C-2'/6'), δ 127,3 (C-4''), δ 127,7 (C-3''), δ 130,2 (C-imid), δ 132,7 (C-3'/5'), δ 134,3 (C-7), δ 137,2 (C-imid), δ 144,9 (C-1'), δ 150,0 (C-8a).

➤SM-ESP (+30V): m/z 374 $[\text{M+Na}]^+$.

b.2.2) caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzo 4'-cyano-4-imidazolylflavane I3t :

- $R_F = 0,17$ sur CCM silice dans CHCl_3 -MeOH 2,5 %.
- UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 222, 241, 281$ et 323 nm.
- RMN ^1H (400 MHz) dans CDCl_3 : δ 2,48 – 2,57 (2H, m, H-3eq et H-3ax), δ 5,22 (1H, dd, $J = 4,7 ; 9,2$ Hz, H-2), δ 5,51 (1H, t él, $J = 3,6$ Hz, H-4), δ 6,97 (1H, s él, H-imid), δ 7,15 (1H, s él, H-imid), δ 7,17 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,49 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6), δ 7,51 (1H, s él, H-imid), δ 7,57 (1H, m, H-5''), δ 7,59 (2H, d, $J = 8,2$ Hz, H-2'/6'), δ 7,60 (1H, m, H-4''), δ 7,73 (2H, d, $J = 8,4$ Hz, H-3'/5'), δ 7,84 (1H, d él, $J = 8,4$ Hz, H-3''), δ 8,31 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6'').
- RMN ^{13}C (100 MHz) dans CDCl_3 : δ 38,7(C-3), δ 51,1(C-4), δ 72,7 (C-2), δ 110,8 (C-4a), δ 112,3 (C-4'), δ 118,5 (C-imid), δ 118,5 (CN), δ 121,7 (C-6), δ 122,0 (C-6''), δ 124,9 (C-8), δ 126,3 (C-5''), δ 126,5 (C-5), δ 126,7 (C-2'/6'), δ 127,7 (C-4''), δ 127,8 (C-3''), δ 130,0 (C-imid), δ 132,7 (C-3'/5'), δ 134,7(C-7), δ 136,9 (C-imid), δ 145,1 (C-1'), δ 150,6 (C-8a).
- SM-ESP (-40V): m/z 350 [M-H] $^-$.

2.3.4.4. le 7,8-benzo-3'-hydroxy-4-imidazolylflavane **I4** :



a) Synthèse:

101 mg de *cis*-flavan-4-ol **f4** ($3,45 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 672 mg (12 éq, $4,14 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 4 jours à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris par du chloroforme, l'éther et un peu d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. Les lavages successifs du milieu par le dichlorométhane, le méthanol, et l'acétate d'éthyle permettent d'obtenir un précipité blanc correspondant au produit **I4** et une fraction qui contient l'imidazolé **I4** et le *trans*-flavan-4-ol. La purification de cette fraction sur CCM préparative silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 15 % permet d'obtenir 16,2 mg de *trans*-flavan-4-ol **f4t** ($5,5 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 16 %), la quantité globale obtenue de **I4** est 38,6 mg ($1,1 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 33 %). La dégradation de **f4t** ne nous a pas permis d'effectuer l'analyse spectrale de ce composé.

b) Caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzo-3'-hydroxy-4-imidazolylflavane

I4 :

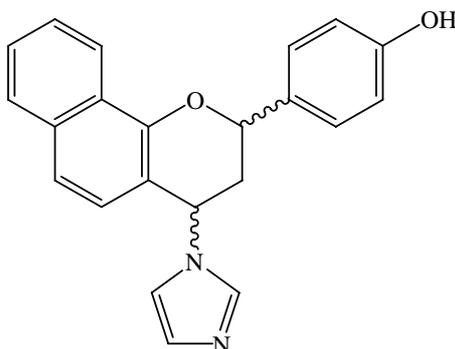
- $R_F = 0,10$ sur CCM silice dans CH_2Cl_2 -EtOAc 15 %.
- UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 222, 242, 283$ et 323 nm.
- RMN ^1H (400 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 2,52 (1H, dt, $J = 2,8 ; 14,5$ Hz, H-3eq), δ 2,59 (1H, ddd, $J = 4,6 ; 10,2, 14,5$ Hz, H-3ax), δ 5,25 (1H, dd, $J = 2,7 ; 10,2$ Hz, H-2), δ 5,64 (1H, t él, $J = 4,2$ Hz, H-4), δ 6,76 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-4'), δ 6,89 (1H, d él, $J = 7,6$ Hz, H-6'), δ 6,91 (1H, s él, H-2'), δ 6,95 (1H, s él, H-imid), δ 7,12 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5), δ 7,22 (1H, t, $J = 7,8$ Hz, H-5'), δ 7,24 (1H, s él, H-imid), δ 7,48 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-6), δ 7,57 (1H, m, H-

5''), δ 7,59 (1H, m, H-4''), δ 7,71 (1H, s él, H-imid), δ 7,90 (1H, d él, $J = 8,0$ Hz, H-3''), δ 8,22 (1H, d él, $J = 8,2$ Hz, H-6''), δ 9,44 (1H, s, 3-OH).

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans DMSO- d_6 : δ 36,9 (C-3), δ 49,7 (C-4), δ 73,2 (C-2), δ 112,7 (C-2'), δ 112,9 (C-4a), δ 114,9 (C-4'), δ 116,3 (C-6'), δ 118,7 (C-imid), δ 120,3 (C-6), δ 121,5 (C-6''), δ 124,4 (C-8), δ 125,8 (C-5''), δ 126,5 (C-5), δ 127,0 (C-4''), δ 127,5 (C-3''), δ 128,6 (C-imid), δ 129,5 (C-5'), δ 133,8 (C-7), δ 137,0 (C-imid), δ 141,4 (C-1'), δ 149,9 (C-8a), δ 157,5 (C-3').

➤SM-ESP (-40V): m/z 341 $[\text{M-H}]^-$.

2.3.4.5. le 7,8-benzo-4'-hydroxy-4-imidazolylflavane **I5** :



a) Synthèse:

78 mg de flavan-4-ol **f5** (mélange d'isomères *cis* et *trans*) ($2,7 \cdot 10^{-4}$ mol) sont dissous dans 5 ml de THF et 173,1mg (4 éq, $1,07 \cdot 10^{-3}$ mol) de 1,1'-carbonyldiimidazole sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation pendant 6 heures à température ambiante et sous atmosphère d'azote. Le THF est ensuite évaporé ; le résidu est repris dans l'éther. La phase organique est lavée à plusieurs reprises par l'eau distillée puis séchée sur Na_2SO_4 et enfin évaporée. Les lavages successifs du milieu par le dichlorométhane, le méthanol et l'acétate d'éthyle permettent d'obtenir 20,4 mg d'un précipité blanc correspondant au produit **I5** et une fraction qui contient de l'imidazolé **I5** et le flavan-4-ol. La purification de cette fraction sur CCM préparative silice dans CHCl_3 -MeOH 5 % avec 4 migrations permet d'obtenir 14,5 mg du mélange d'isomères du flavan-4-ol **f5** ($5,0 \cdot 10^{-5}$ mol, rendement 19 %), et 21,9 mg de produit **I5**. La quantité globale de **I5** (mélange d'isomères *cis* et *trans* 50-50) est 42,3 mg ($1,2 \cdot 10^{-4}$ mol, rendement 46 %).

b) Caractérisation de **I5** :

- $R_F = 0,30$ sur CCM silice dans CHCl_3 -MeOH 5 % avec 4 migrations.
- UV dans MeOH : $\lambda_{\text{max}} = 221, 241, 283$ et 323 nm.
- SM-ESP (+30V): m/z 365 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

b.1) caractérisation du 2,4-*trans*-7,8-benzo-4'-hydroxy-4-imidazolylflavane **I5t** :

- RMN ^1H (400 MHz) dans DMSO-d_6 : δ 2,45 (1H, dt, $J = 2,6 ; 14,6$ Hz, H-3eq), δ 2,59 – 2,76 (1H, m, H-3ax), δ 5,19 (1H, dd, $J = 1,9 ; 11,1$ Hz, H-2), δ 5,66 (1H, t él, $J = 3,8$ Hz, H-4), δ 6,81 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5'), δ 6,97 (1H, s él, H-imid), δ 7,14 (1H, d, $J = 8,5$

Hz, H-5), δ 7,23 (1H, s él, H-imid), δ 7,32 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/6'), δ 7,49 – 7,60 (3H, m, H-4'', H-5'' et H-6), δ 7,71 (1H, s él, H-imid), δ 7,82 (1H, d él, $J = 8,0$ Hz, H-3''), δ 8,09 (1H, d él, $J = 8,3$ Hz, H-6''), δ 9,47 (1H, s él, 4-OH).

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans DMSO- d_6 : δ 36,5 (C-3), δ 50,1 (C-4), δ 73,2 (C-2), δ 112,7 (C-4a), 115,2 (C-3'/5'), δ 119,0 (C-imid), δ 120,0 (C-6), δ 121,7 (C-6''), δ 124,2 (C-8), δ 125,8 (C-5''), δ 126,7 (C-5), δ 127,1 (C-4''), δ 127,6 (C-3''), δ 127,7 (C-2'/6'), δ 128,5 (C-imid), δ 130,1 (C-1'), δ 133,9 (C-7), δ 137,7 (C-imid), δ 150,3 (C-8a), δ 157,4 (C-4').

b.2) caractérisation du 2,4-cis-7,8-benzo-4'-hydroxy-4-imidazolylflavane I5c :

➤RMN ^1H (400MHz) dans DMSO- d_6 : δ 2,59 – 2,76 (2H, m, H-3ax et H-3eq), δ 5,46 (1H, d él, $J = 10,3$ Hz, H-2), δ 6,05 (1H, dd, $J = 6,2; 11,2$ Hz, H-4), δ 6,64 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-5), δ 6,86 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3'/5'), δ 6,95 (1H, s él, H-imid), δ 7,23 (1H, s él, H-imid), δ 7,39 (1H, d, $J = 8,6$ Hz, H-6), δ 7,46 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/6'), δ 7,49 – 7,60 (2H, m, H-4'' et H-5''), δ 7,88 (1H, d él, $J = 7,6$ Hz, H-3''), δ 7,91 (1H, s él, H-imid), δ 8,16 (1H, d él, $J = 7,9$ Hz, H-6''), δ 9,49 (1H, s él, 4-OH).

➤RMN ^{13}C (100 MHz) dans DMSO- d_6 : δ 36,7 (C-3), δ 52,5 (C-4), δ 77,1 (C-2), δ 115,3 (C-3'/5'), δ 116,2 (C-4a), δ 118,3 (C-imid), δ 120,3 (C-6), δ 121,6 (C-6''), δ 123,7 (C-5), δ 124,5 (C-8), δ 125,9 (C-5''), δ 126,8 (C-4''), δ 127,5 (C-3''), δ 127,8 (C-2'/6'), δ 128,9 (C-imid), δ 130,4 (C-1'), δ 133,5 (C-7), δ 137,1 (C-imid), δ 149,7 (C-8a), δ 157,3 (C-4').

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adlercreutz, H., Phytoestrogens : epidemiology and a possible role in cancer protection, *Environmental Health Perspectives*, 1995, **103**, 103-112.

Ahmed, S., Davis, P.J., Molecular modeling of inhibitors of aromatase : a novel approach, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, **5**, 1673-1678.

Akhtar, M., Njar, V.C.O., Wright, J.N., Mechanistic studies on aromatase and related C-C bond cleaving P-450 enzymes, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1993, **44**, 375-387.

Akhtar, M., Lee-Robichaud, P., Akhtar, M.E., Wright, J.N., The impact of aromatase mechanism on other P450s, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1997, **61**, 127-132.

Alcantara, A.R., Marinas, J.M., Sinisterra, J.V., Synthesis of 2'-hydroxychalcones and related compounds in interfacial solid-liquid conditions, *Tetrahedron Letters*, 1987, **28**, 1515-1518.

Auvray, P., Sourdain, P., Moslemi, S., Séralini, G.E., Sonnet, P., Enguehard, C., Guillon, J., Dallemagne, P., Bureau, R., Rault, S., MR 20492 and MR 20494 : two indolizinone derivatives that strongly inhibit human aromatase, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1999, **70**, 59-71.

Auvray, P., Bichat, F., Genne, P., Evaluation préclinique de l'activité antitumorale des inhibiteurs de l'aromatase, *Bull. Cancer*, 2000, **87**, 7-22.

B

Bayer, H., Batzl, C., Hartmann, R.W., Mannschreck, A., New aromatase inhibitors. Synthesis and biological activity of pyridyl-substituted tetralone derivatives, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 2685-2691.

Bentley, T.W., Howle, L.M., Wareham, P.J., Rearrangement of (1,2,4-Triazol-4-yl)ethanols to (1,2,4-triazol-1-yl)ethanols, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 7869-7878.

Blanco, J.G., Gil, R.R., Alvarez, C.I., Patrino, L.C., Genti-Raimondi, S., Flury, A., A novel activity for group of sesquiterpenes lactones : inhibition of aromatase, *FEBS Letters*, 1997, **409**, 396-400.

Boyle, P., Leon, M.E., Maisonneuve, P., Autier, P., Cancer control in women. Update 2003, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2003, **83**, 179-202.

Bruneton, J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris : *Technique et documentation*, 1999, 3^{ème} édition.

C

Campbell, D.R., Kurzer, M.S., Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1993, **46**, 381-388.

Chen, S., Kao, Y.C., Laughton, C.A., Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1997, **61**, 107-115.

Chen, J.X., Daeuble, J.F., Brestensky, D.M., Stryker, J.M., Highly chemoselective catalytic hydrogenation of unsaturated ketones and aldehydes to unsaturated alcohols using phosphine-stabilized copper(I) hydride complexes, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 2153-2166.

Chen, S., Zhang, F., Sherman, M.A., Kijima, I., Cho, M., Yuan, Y.C., Toma, Y., Osawa, Y., Zhou, D., Eng, E.T., Structure-function studies of aromatase and its inhibitors : a progress report, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 2003, **86**, 231-237.

Chodosh, L.A., D'Cruz, C.M., Gardner, H.P., Ha, S.I., Marquis, S.T., Rajan, J.V., Stairs, D.B., Wang, J.Y., Wang, M., Mammary gland development, reproductive history, and breast cancer risk, *Cancer Res.*, 1999, **59**, 1765-1771.

Coelingh Bennink, H.J.T., Are all estrogens the same ?, *Maturitas*, 2004, **47**, 269-275.

Coombes, R.C., Gibson, L., Hall, E., Emson, M., Bliss, J., Aromatase inhibitors as adjuvant therapies in patients with breast cancer, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 2003, **86**, 309-311.

Coumoul, X., Barouki, R., Génotoxicité des métabolites des estrogènes et cancers, *Médecine/Sciences*, 2002, **18**, 86-90.

D

Debaert, M., Poisson, J., Loiseau, P., *Traité de Chimie Thérapeutique, Médicaments en relation avec des systèmes hormonaux*, volume 4, chapitre 10 : inhibiteurs de l'aromatase, Tec & doc Lavoisier, 1995, pp 479-500.

Den Tonkelaar, I., Gynaecology and breast cancer, *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2000, **92**, 179-181.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 1999, **65**, 337-353.

Doshi, A.G., Soni, P.A., Ghiya, B.J., oxidation of 2'-hydroxychalcones, *Indian Journal of Chemistry*, 1986, **25B**, 759-760.

E

Esteve, J., Incidence et mortalité du cancer du sein en France. Quelle relation avec le dépistage ?. In : Séradour, B. *Le dépistage du cancer du sein : un enjeu de santé publique*. Paris : Springer-Verlag., 2004, 33-40.

G

Gemal, A.L., Luche, J.L., Lanthanoids in organic synthesis. 4. Selective ketalization and reduction of carbonyl groups, *J. Org. Chem.*, 1979, **44**, 4187-4089.

Goss, P.E., Strasser, K., Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer, *J. of Clinical Oncology*, 2001, **19**, 881-894.

Gourinel, C., Buxeraud, J., Coulon, J.P., Lagarde, A., Comby, F., Bernard, M., Dossier : Le cancer du sein, *Actualités Pharmaceutiques*, 1996, **347**, 37-47.

Graham-Lorence, S., Amarneh, B., White, R.E., Peterson, J.A., Simpson, E.R., A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450, *Protein Sci.*, 1995, **4**, 1065-1080.

H

Harborne, J.B., Williams, C.A., Advances in flavonoids research since 1992, *Phytochemistry*, 2000, **55**, 481-504.

Hartmann, R.W., Grün, G., Bartz, U., Palzer, M., Evaluation of the racemate and the enantiomers of a new highly active and selective aromatase inhibitor of the aminoglutethimide type, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1992, **43**, 641-648.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., Flavonoids antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, **13**, 572-584.

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D., Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands, *Nutrition Cancer*, 1993a, **20**, 21-29.

Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen elderly study, *Lancet*, 1993b, **342**, 1007-1011.

Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M., Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450, *Chemico-Biological Interactions.*, 2002, **139**, 1-21.

Hollman, P.C.H., Hertog, M.G.L., Katan, M.B., Analysis and health effects of flavonoids, *Food Chemistry*, 1996, **57**, 43-46.

Hsieh, H.K., Lee, T.H., Wang, J.P., Wang, J.J., Lin, C.N., Synthesis and anti-inflammatory effect of chalcones and related compounds, *Pharm. Res.*, 1998, **15**, 39-46.

Hutchins, R.O., Kandasamy, D., Reductions of conjugated carbonyl compounds with cyanoborohydride in acidic media, *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 2530-2533.

I

Ibrahim, A.S., Abul-Hajj, Y.J., Aromatase inhibition by flavonoids, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1990, **37**, 257-260.

J

Jeong, H.J., Shin, Y.G., Kim, I.H., Pezzuto, J.M., Inhibition of aromatase activity by flavonoids, *Arch. Pharm. Res.*, 1999, **22**, 309-312.

Jones, C.D., Winter, M.A., Hirsch, K.S., Stamm, N., Taylor, H.M., Holden, H.E., Davenport, J.D., Krumkalns, E.V., Suhr, R.G., Estrogen synthetase inhibitors. 2. Comparison of the in vitro aromatase inhibitory activity of a variety of nitrogen heterocycles substituted with diarylmethane or diarylmethanol groups, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 416-429.

K

Kao, Y.C., Zhou, C., Sherman, M., Laughton, C.A., Chen, S., Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens : a site-directed mutagenesis study, *Environment Health Perspectives*, 1998, **106**, 85-92.

Kao, Y.C., Korzekwa, K.R., Laughton, C.A., Chen, S., Evaluation of the mechanism of aromatase cytochrome P450 : a site-direct mutagenesis study, *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**, 243-251.

Karjalainen, A., Kalapudas, A., Södervall, M., Pelkonen, O., Lammintausta, R., Synthesis of new potent and selective aromatase inhibitors based on long-chained diarylalkylimidazole and diarylalkyltriazole molecule skeletons, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, **11**, 109-131.

Kellis, J.T., Vickery, L.E., Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones, *Science*, 1984, **225**, 1032-1034.

Kellis, J.T., Nesnow, S., Vickery, L.E., Inhibition of aromatase cytochrome P-450 (estrogen synthetase) by derivatives of α -naphthoflavone, *Biochemical Pharmacology*, 1986, **35**, 2887-2891.

Key, T.J., Verkasalo, P.K., Banks, E., Epidemiology of breast cancer, *The Lancet Oncology*, 2001, **2**, 133-140.

Kolonel, L.N., Variability in diet and its relation to risk in ethnic and migrant groups, *Basic Life Sciences*, 1988, **43**, 129-135.

L

Lang, M., Batzl, C., Furet, P., Bowman, R., Häuser, A., Bhatnagar, A.S., Structure-activity relationships and binding model of novel aromatase inhibitors, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1993, **44**, 421-428.

Laughton, C.A., Zvelebil, M.J.J.M., Neidle, S., A detailed molecular model for human aromatase, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1993, **44**, 399-407.

Le Bail, J.C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., Habrioux, G., Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids, *Cancer Letters*, 1998a, **133**, 101-106.

Le Bail, J.C., Conversion métabolique du sulfate de déhydroépiandrostérone en composés à activité estrogénique dans les cellules cancéreuses mammaires, Thèse de l'Université de Limoges, 1998b.

Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G., Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells, *Life Sciences*, 2000, **66**, 1281-1291.

Le Bail, J.C., Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J.P., Chulia, A.J., Habrioux, G., Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities, *Life Sciences*, 2001, **68**, 751-761.

Le Borgne, M., Marchand, P., Delevoye-Seiller, B., Robert, J.M., Le Baut, G., Hartmann, R.W., Palzer, M., New selective nonsteroidal aromatase inhibitors : synthesis and inhibitory activity of 2,3 or 5-(α -azolybenzyl)-1H-indoles, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 333-336.

Le Mahieu, R.A., Naphthyloxyalkanecarboxylic acid derivatives, FR2545484. 11.09.1984.

Le Marchand, L., Cancer preventive effects of flavonoids- A review., *Biomed. Pharmacother.*, 2002, **56**, 296-301.

Lonning, P.E., Aromatase inhibition for breast cancer treatment, *Acta oncologia*, 1996, **35**, 38-43.

Lucchi-Angellier, E., Hormonothérapie et cancers du sein : mise au point, *La Revue de Médecine Interne*, 2001, **22**, 1213-1224.

Luche, J.L., Lanthanides in organic chemistry. 1. Selective 1,2-reductions of conjugated ketones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 2226-2227.

M

Marchand, P., Le Borgne, M., Duflos, M., Robert-Piessard, S., Le Baut, G., Ahmadi, M., Hartmann, R.W., Palzer, M., 3-(1-azolylmethyl)-1H-indoles as selective P450 aromatase inhibitors, *Pharm. Pharmacol. Comm.*, 1998, **4**, 211-218.

Messina, F., Botta, M., Corelli, F., Mugnaini, C., Chiral azole derivatives. 3. Synthesis of the enantiomers of the potent aromatase inhibitor 1-[2-benzofuranyl(4-chlorophenyl)methyl]-1H-imidazole, *Tetrahedron Letters*, 1999, **40**, 7289-7292.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer, *Pharmacol. Rev.*, 2000, **52**, 673-751.

Miller, W.R., Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004, **18**, 1-32.

Mitrunen, K., Hirvonen, A., Molecular epidemiology of sporadic breast cancer : the role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism, *Mutation Research*, 2003, **544**, 9-41.

N

Narod, S.A., Dubé, M.P., Klijn, J., et coll., Oral contraceptives and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutations carriers, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 2002, **94**, 1173-1179.

Nesnow, S., Bryant, B.J., Rudo, K., Easterling, R., Reanalysis and clarification of the structures of α -naphthoflavone dihydrodiols formed by uninduced and induced rat liver microsomes from Charles River CD and Sprague-Dawley rats, *Carcinogenesis*, 1983, **4**, 425-430.

Nkondjock, A., Ghadirian, P., Epidemiology of breast cancer among BRCA mutation carriers : an overview, *Cancer Letters*, 2004, **205**, 1-8.

Nutaitis, C.F., Bernardo, J.E., Regioselective 1,2-reduction of conjugated enones and enals with sodium monoacetoxyborohydride : preparation of allylic alcohols, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 5629-5630.

O

Okada, M., Yoden, T., Kawaminami, E., Shimada, Y., Kudoh, M., Isomura, Y., Shikama, H., Fujikura, T., Studies on aromatase inhibitors. I. Synthesis and biological evaluation of 4-amino-4*H*-1,2,4-triazole derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, 1996, **44**, 1871-1879.

Okada, M., Yoden, T., Kawaminami, E., Shimada, Y., Kudoh, M., Isomura, Y., Studies on aromatase inhibitors. II. Synthesis and biological evaluation of 1-amino-4*H*-1,2,4-triazole derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, 1997, **45**, 333-337.

P

Palma, C., Criscuoli, M., Lippi, A., Muratori, M., Mauro, S., Maggi, C.A., Effect of the aromatase inhibitor, MEN 11066, on growth of two different MCF-7 sublines, *European Journal of Pharmacology*, 2000, **409**, 93-101.

Pasqualini, J.R., Paris, J., Sitruk-Ware, R., Chetrite, G., Botella, J., Progestins and breast cancer, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1998, **65**, 225-235.

Pelissero, C., Lenczowski, M.J.P., Chinzi, D., Davail-Cuisset, B., Sumpter, J.P., Fostier, A., Effects of flavonoids on aromatase activity, an *in vitro* study, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1996, **57**, 215-223.

Peterson, J., Dwyer, J., Flavonoids : dietary occurrence and biochemical activity, *Nutrition Research*, 1998, **18**, 1995-2018.

Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J.P., Leveque, H., Chulia, A.J., Synthesis and structure of flavan-4-ols and 4-methoxyflavans as new potential anticancer drugs, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 6047-6052.

Pouget, C., Pharmacomodulation de flavonoïdes : conception et synthèse de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase, Thèse de l'Université de Limoges, 2001a.

Pouget, C., Lauthier, F., Simon, A., Fagnere, C., Basly, J.P., Delage, C., Chulia, A.J., Flavonoids : structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001b, **11**, 3095-3097.

Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J.P., Habrioux, G., Chulia, A.J., New aromatase inhibitors. Synthesis and inhibitory activity of pyridinyl-substituted flavanone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002a, **12**, 1059-1061.

Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J.P., Habrioux, G., Chulia, A.J., Design, synthesis and evaluation of 4-imidazolylflavans as new leads for aromatase inhibition, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002b, **12**, 2859-2861.

Pouget, C., Fagnere, C., Basly, J.P., Besson, A.E., Champavier, Y., Habrioux, G., Chulia, A.J., Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones, *Pharm. Res.*, 2002c, **19**, 286-291.

Pouget, C., Yahiaoui, S., Fagnere, C., Habrioux, G., Chulia, A.J., Synthesis and biological evaluation of 4-imidazolylflavans as non steroidal aromatase inhibitors, *Bioorg. Chem.*, 2004, **32**, 494-503.

R

Ranu, C., Das, A.R., Silica gel supported zinc borohydride. Regioselective 1,2-reduction of conjugated ketones and aldehydes to the corresponding allylic alcohols, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 4798-4799.

Ravikumar, K.S., Baskaran, S., Chandrasekaran, S., Diisopropoxytitanium (III) tetrahydroborate : a highly useful reagent for the remarkably selective 1,2-reduction of α,β -unsaturated carbonyl compounds, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 5981-5982.

Remontet, L., Esteve, J., Bouvier, A.M., Grosclaude, P., Launoy, G., Menegoz, F., Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000, *Rev. Epidemiol. Santé Publique*, 2003, **51**, 3-30.

Rimm, E.B., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J., Willett, W.C., Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals, *Ann. Intern. Medicine*, 1996, **125**, 384-389.

S

Sanderson, J.T., Hordijk, J., Denison, M.S., Springsteel, M.F., Nantz, M.H., Van den Berg, M., Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Sci.*, 2004, **82**, 70-79.

Santen, R.J., Inhibition of aromatase : insights from recent studies, *Steroids*, 2003, **68**, 559-567.

Sathyanarayana S., Krishnamurty, H.G., Corroborative studies on the highly efficient preparation of 2'-hydroxychalcones using partially dehydrated barium hydroxide catalyst, *Current Science*, 1988, **57**, 1114-1116.

Seralini, G.E., Moslemi, S., Aromatase inhibitors : past, present and future, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001, **178**, 117-131.

Severi, F., Benvenuti, S., Costantino, L., Vampa, G., Melegari, M., Antolini, L., Synthesis and activity of a new series of chalcones as aldose reductase inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.*, 1998, **33**, 859-866.

Seyden-Penne, J., Réductions par les alumino et borohydrures en synthèse organique. Paris : *Edition Technique et Documentation, Lavoisier*, 1988.

Smith, H.J., Nicholls, P.J., Simons, C., Le Lain, R., Inhibitors of steroidogenesis as agents for the treatment of hormone-dependent cancers, *Exp. Opin. Ther. Patents*, 2001, **11**, 789-824.

Sondik, E.J., Breast cancer trends : incidence, mortality and survival, *Cancer*, 1994, **74**, 995-999.

Sonnet, P., Guillon, J., Enguehard, C., Dallemagne, P., Bureau, R., Rault, S., Design and synthesis of a new type of non steroidal human aromatase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 1041-1044.

T

Thompson, E.A., Siiteri, P.K., The involvement of human placental microsomal cytochrome P450 in aromatisation, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 5373-5378.

V

Vinh, T.K., Ahmadi, M., Lopez Delgado, P.O., Fernandez Perez, S., Walters, H.M., Smith, H.J., Nicholls, P.J., Simons, C., 1-[(benzofuran-2-yl)phenylmethyl]-triazoles and -tetrazoles-potent competitive inhibitors of aromatase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2105-2108.

Vinh, T.K., Yee, S.W., Kirby, A.J., Nicholls, P.J., Simons, C., 1-[(benzofuran-2-yl)phenylmethyl]triazoles as steroidogenic inhibitors : synthesis and in vitro inhibition of human placental CYP19 aromatase, *Anticancer Drug Design*, 2002, **16**, 217-225.

Von Arx, M., Mallat, T., Baiker, A., Unprecedented selectivity behaviour in the hydrogenation of an α,β -unsaturated ketone : hydrogenation of ketoisophorone over alumina-supported Pt and Pd, *Journal of Molecular Catalysis A*, 1999, **148**, 275-283.

W

Wähälä, K., Koskimies, J.K., Mesilaakso, M., Salakka, A.K., Leino, T.K., Adlercreutz, H., The synthesis, structure, and anticancer activity of *cis*- and *trans*-4',7-dihydroxyisoflavan-4-ols, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7690-7693.

Y

Yahiaoui, S., Pouget, C., Fagnere, C., Champavier, Y., Habrioux, G., Chulia, A.J., Synthesis and evaluation of 4-triazolylflavans as new aromatase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 5215-5218.

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Classification des inhibiteurs de l'aromatase..... | 27 |
| Tableau 2. Structures des flavonoïdes les plus répandus..... | 33 |
| Tableau 3. Comparaison des activités anti-aromatiques de certains composés selon le modèle enzymatique..... | 61 |
| Tableau 4. Activité anti-aromatique des 4-triazolyflavanes..... | 64 |
| Tableau 5. Comparaison de l'activité des molécules azolées synthétisées..... | 66 |
| Tableau 6. Structure des chalcones C1-C5 | 68 |
| Tableau 7. Caractéristiques de la synthèse des chalcones C1-C5 | 69 |
| Tableau 8. Activité anti-proliférative des benzochalcones..... | 71 |
| Tableau 9. Caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzoflavanones..... | 72 |
| Tableau 10. Activité anti-aromatique des 7,8-benzoflavanones..... | 74 |
| Tableau 11. Activité inhibitrice de l'aromatase des 7,8-benzoflavanones..... | 74 |
| Tableau 12. Activité de la 7,8-benzoflavone et de la flavanone correspondante..... | 75 |
| Tableau 13. Activité anti-aromatique de la 7,8-benzoflavone..... | 75 |
| Tableau 14. Caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzoflavan-4-ols..... | 76 |
| Tableau 15. Les 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes..... | 77 |
| Tableau 16. Caractéristiques de la synthèse des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes..... | 77 |
| Tableau 17. Rendements réactionnels des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes et des 2,4-trans-7,8-benzoflavan-4-ols..... | 78 |
| Tableau 18. Rapports frontaux des 2,4- <i>cis</i> -7,8-benzoflavan-4-ols et de leurs isomères 2,4- <i>trans</i> | 78 |
| Tableau 19. Données RMN des protons de l'hétérocycle C des 2,4- <i>cis</i> et 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzoflavan-4-ols..... | 79 |
| Tableau 20. Données RMN des protons de l'hétérocycle C des 2,4- <i>cis</i> et 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzo-4-imidazolyflavanes | 79 |
| Tableau 21. Déplacements chimiques (ppm) des carbones C-2 des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes | 80 |
| Tableau 22. Nature des 7,8-benzo-4-imidazolyflavanes obtenus..... | 85 |

| | |
|---|----|
| Tableau 23. Activité anti-aromatique des 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes..... | 85 |
| Tableau 24. Réduction de cétones α,β -insaturées par des acétoxyborohydrures de sodium... | 90 |

LISTE DES SCHEMAS

| | |
|---|----|
| Schéma 1. Schéma du rôle des estrogènes dans la cancérogenèse mammaire..... | 19 |
| Schéma 2. Conversion des androgènes en estrogènes par l'aromatase..... | 21 |
| Schéma 3. Etapes 2 et 3 d'oxydation du méthyle -19 : transformation en aldéhyde | 22 |
| Schéma 4. Stratégies du traitement hormonal du cancer du sein..... | 25 |
| Schéma 5. Inhibiteurs stéroïdiens analogues de l'androstènedione..... | 28 |
| Schéma 6. Comparaison de la structure chimique de différents phytoestrogènes avec l'estradiol..... | 30 |
| Schéma 7. Squelettes des différentes classes de flavonoïdes..... | 32 |
| Schéma 8. Les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes..... | 34 |
| Schéma 9, 10 et 11. | 39 |
| Schéma 12. Modulation du noyau C des flavanones | 42 |
| Schéma 13. Synthèse des 3-(4-pyridinylméthylène)flavanones..... | 43 |
| Schéma 14. Synthèse des 2,4- <i>cis</i> -flavan-4-ols..... | 44 |
| Schéma 15. Synthèse de 2,4- <i>trans</i> -4-imidazolylflavanes..... | 44 |
| Schéma 16. Groupements susceptibles de renforcer l'interaction site actif / flavonoïde..... | 45 |
| Schéma 17. Synthèse des 4-imidazolylflavanes à partir des flavanones..... | 53 |
| Schéma 18. Synthèse des flavanones..... | 53 |
| Schéma 19. Synthèse de la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone..... | 54 |
| Schéma 20. Conformation demi-chaise du 2,4- <i>cis</i> -flavan-4-ol..... | 55 |
| Schéma 21. Conformation demi-chaise du 2,4- <i>trans</i> -flavan-4-ol..... | 56 |
| Schéma 22. Mécanisme d'obtention des 2,4- <i>trans</i> -4-imidazolylflavanes à partir des 2,4- <i>cis</i> -flavan-4-ols..... | 57 |
| Schéma 23. Obtention du 2,4- <i>trans</i> -4'-hydroxy-4-imidazolyl-7-méthoxyflavane I_C à partir de 2,4- <i>trans</i> -4'-hydroxy-7-méthoxyflavan-4-ol f_{CT} | 58 |
| Schéma 24. Cinétique de transformation de l'androstènedione en estrogènes avec 6 µl de microsomes placentaires..... | 60 |

| | |
|---|-----|
| Schéma 25. Transformation de l'androstènedione en fonction de la quantité de microsomes utilisée, après 12 minutes d'incubation..... | 60 |
| Schéma 26. Synthèse de 4-triazolylflavanes..... | 62 |
| Schéma 27. Réarrangement du 1,1-diphényl-2-(1,2,4-triazol-4-yl)éthanol 33 en 1,1-diphényl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)éthanol 34 | 63 |
| Schéma 28. Mécanisme de réarrangement de l'isomère <i>4H T2b</i> en l'isomère <i>1H T2a</i> | 63 |
| Schéma 29. Coordination des deux isomères <i>1H</i> et <i>4H</i> -triazole avec le fer de l'hème de l'aromatase..... | 65 |
| Schéma 30. Synthèse des 7,8-benzoflavanones F1-F5 | 72 |
| Schéma 31 : Conformation du noyau hétérocyclique des flavanones..... | 73 |
| Schéma 32. Mécanisme d'obtention des 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzoflavan-4-ols..... | 81 |
| Schéma 33. Obtention du 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzo-4-imidazolylflavane à partir de 2,4- <i>cis</i> -7,8-benzoflavan-4-ol..... | 82 |
| Schéma 34. Obtention du 2,4- <i>cis</i> -7,8-benzo-4-imidazolylflavane à partir de 2,4- <i>trans</i> -7,8-benzoflavan-4-ol..... | 82 |
| Schéma 35. Essais de purification du composé I5 | 84 |
| Schéma 36. Rétrosynthèse des 7,8-benzo-4-imidazolylflav-2-ènes..... | 89 |
| Schéma 37. Synthèse du 7,8-benzoflav-2-én-4-ol..... | 91 |
| Schéma 38. Stratégie de synthèse des 7,8-benzo-5"-hydroxy-4-imidazolylflavanes..... | 93 |
| Schéma 39. Analogies entre le squelette 4-imidazolylflavane et un substrat stéroïdien..... | 95 |
| Schéma 40. Interactions du squelette 7,8-benzo-4-imidazolylflavane avec le site actif de l'aromatase..... | 98 |
| Schéma 41. Principe d'étude de l'activité anti-aromatase..... | 104 |

Résumé : Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes entre 40 et 50 ans, il représente donc un problème majeur de santé publique. Environ 50 % des cancers du sein sont considérés comme estrogéno-dépendants. Aussi, une stratégie de traitement des tumeurs mammaires consiste en l'inhibition de la biosynthèse de ces hormones par les inhibiteurs de l'aromatase, enzyme clé dans la production des estrogènes. Des inhibiteurs de l'aromatase tels que le létrozole et l'anastrozole constituent ainsi aujourd'hui le traitement de deuxième ligne de référence des cancers du sein métastatiques chez la femme ménopausée. Les flavonoïdes, composés très répandus dans le règne végétal, ont fait l'objet de nombreux travaux dans notre laboratoire. Il s'avère que certaines de ces molécules présentent un effet anti-aromatase comparable à celui de l'aminogluthétimide, premier inhibiteur de l'aromatase utilisé en clinique. Une modulation de ces composés a alors été entreprise et de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase ont pu être développés, avec pour certains une activité proche de celle des derniers composés utilisés en thérapeutique. Le but de notre travail était de poursuivre la pharmacomodulation du squelette flavonoïdique afin d'augmenter l'activité biologique et de concevoir de nouvelles molécules thérapeutiques candidates pour l'hormonothérapie du cancer du sein. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la stéréochimie des 4-imidazolylflavanes sur l'activité anti-aromatase. Ensuite, nos travaux de modulation du squelette flavonoïdique ont conduit à l'obtention de deux nouvelles familles d'inhibiteurs de l'aromatase : les 4-triazolylflavanes et les 7,8-benzo-4-imidazolylflavanes. Ces derniers présentent une activité anti-aromatase similaire à celle du létrozole. Nos travaux ouvrent donc des perspectives de recherche intéressantes dans le cadre de l'hormonothérapie du cancer du sein et plusieurs perspectives sont décrites en vue d'obtenir des molécules encore plus actives.

Title : Breast Cancer. Synthesis and evaluation of flavonoids derivatives as aromatase inhibitors.

Abstract : Breast cancer, the first cause of death in women between 40 and 50 years old, is an important public health problem. Approximately 50 % of these breast cancers are considered to be estrogen-dependent. Estrogens are known to be important in the growth of breast cancer in both pre- and postmenopausal women. One pharmacological approach for breast cancer treatment is the inhibition of estrogen biosynthesis by blocking aromatase, a key enzyme of the process. Aromatase, has been the target for the design of inhibitors such as letrozole or anastrozole, which have become the established second-line treatment for metastatic breast cancer in post-menopausal women. Previous studies in our laboratory have been mainly focused on flavonoids, which are natural compounds inhibiting aromatase with about the same activity as aminoglutethimide, the first aromatase inhibitor used clinically. Then, new aromatase inhibitors were designed and synthesized through modulation of the flavonoid skeleton. These compounds were found to possess moderate to high anti-aromatase activity. In this study, we investigated new strategies of flavonoid pharmacomodulation with the aim to increase biological activity and to identify new therapeutic candidate agents for the hormonal treatment of breast cancer. First, we investigated the stereochemical impact on the activity of the 4-imidazolylflavan family. Secondly, we synthesized two new classes of inhibitors, the 4-triazolylflavans and the 7,8-benzo-4-imidazolylflavans. This latter demonstrated a high potential against aromatase. Many perspectives are described which can also additionally increase the activity and probably give a novel drug candidate for the treatment of hormone-dependent breast cancer.

Key words : Breast cancer ; Estrogens ; Aromatase inhibitors ; Flavonoids ; Pharmacomodulation.