Thèse en poche
Les conférences santé de la BU

CURCUMA ET CURCUMINE, DE L'HISTOIRE AUX INTERETS THERAPEUTIQUES.

Mercredi 15 mars 2017

Dr. Jean-Pierre JOURDAN

Parcours

2016 - 2017

ATER Chimie Thérapeutique
UFR Pharmacie Amiens – Equipe THERA du LG2A
UMR-CNRS 6219

2003 - 2010

Études de Pharmacie,
Faculté de Pharmacie, Marseille (13)

2010 - 2015

Internat de Pharmacie, DES IPR + **année recherche**
UFR Sciences Pharmaceutiques – CHU de CAEN

Année hospitalière Pharmacie à Usage Intérieur
EHB (Bayeux) – CHU de CAEN

Master 2R Chimie Organique
Faculté de Sciences

Thèse d'Exercice
Thèse d'Université Pharmacochimie et modélisation moléculaire
UFR Sciences Pharmaceutiques – CERMN

2015 - 2016

Interne « Médaille d'or », PUI *CHU de CAEN*
Diplôme Universitaire médicoéconomie, *UFR Pharmacie Paris-Descartes*

Mémoire du diplôme d'études spécialisées innovation pharmaceutique et recherche :
Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

CURCUMA ET CURCUMINE, DE L'HISTOIRE AUX INTERETS THERAPEUTIQUES.

Président : Pr Patrick DALLEMAGNE (Directeur de Thèse)
Membres : Pr Christophe ROCHAIS (Maître de Thèse)
Dr Véronique LELONG-BOULOUARD
Dr Cécile BREUIL

Jean-Pierre JOURDAN

CHUCaen

Doctorat de l'Université de Caen Normandie

Conception, Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Analogues de la Curcumine, Potentiels Agents Pléiotropes d'Intérêt Thérapeutique dans la Maladie d'Alzheimer.

Membres du jury :

Pr. Patrick Dallemagne (Directeur de thèse)
Pr. Christophe Rochais (Codirecteur de thèse)

Pr. Ahcène Boumendjel (Rapporteur)
Pr. Pierre Verhaeghe (Rapporteur)

Pr. Olivier Duval (Examinateur)
Pr. Patrice Vanelle (Examinateur)

Jean-Pierre JOURDAN

Normandie Université

LECMA Vaincre Alzheimer

UNICAEN UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative, Santé, Environnement

4000 av JC	premiers récits ancestraux
XIIIème s	commerce Chine-Inde *journal de bord de Marco Polo* Europe-Inde *commerçants Arabes*
XVème s	utilisation en mélange : curry (colons Anglais)
1737	description de Linné → genre *Curcuma*
1810	culture agricole à des fins industrielles
2012	Inde : premier producteur mondial 1 400 000 tonnes[1]

Description

H : 60 – 100 cm
Tige : courte
Feuilles : longues, lames elliptiques, engainantes
Fleurs : en épi, 10 – 15 cm, pédonculées, vertes puis violettes
Partie exploitée : rhizome

Curcuma longa L.

Matière première et transformations

Rhizome primaire et doigts :
- brun jaunâtre extérieur
- jaune orangé intérieur
- couleur : curcuminoïdes
- odeur aromatique
- goût chaud / amer
- récoltés 7 à 8 mois après la plantation

- Broyage

pulvérulente

- Extraction

huile essentielle

[1] http://www.indianspices.com/pdf/Major spice wise area and productionsr.pdf (accessed Apr 16, 2015)

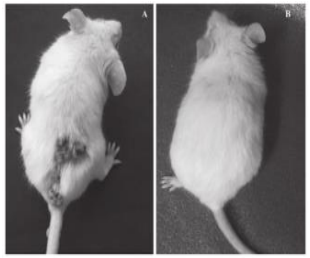
Utilisations

Forme pulvérulente

La plus consommée
Art culinaire : épice
Industrie : teintures textiles

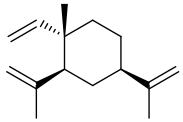
Huile essentielle

Diabète de type 2
Prévention papillomavirus
Répélent moustique
Élémène : Spondylarthrite Ankylosante
Turmérone : Antifongique



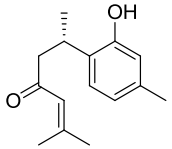
En association

Avec d'autres épices :
- En cuisine : curry
- Élevage intensif : limite l'utilisation d'antibiotiques
- Avec Betel : prévention cancer induit par les nitrosamines



(1*S*,2*S*,4*R*)-1-méthyl-2,4-di(prop-1-en-2-yl)-1-vinylcyclohexane

Elémène

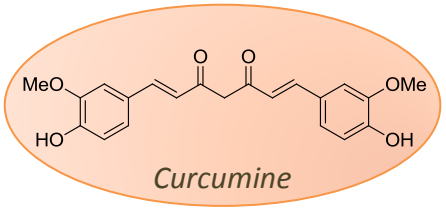


(*S*)-6-(2-hydroxy-4-méthylphenyl)-2-méthylhept-2-en-4-one

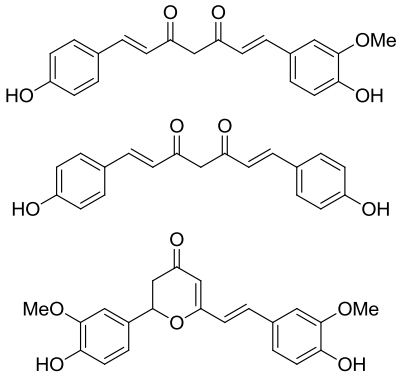
Turmérone

Composition du curcuma

Composant majoritaire : amidon
Composants chimiques :
- Dérivés terpéniques
- Curcuminoïdes



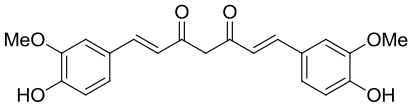
Curcumine



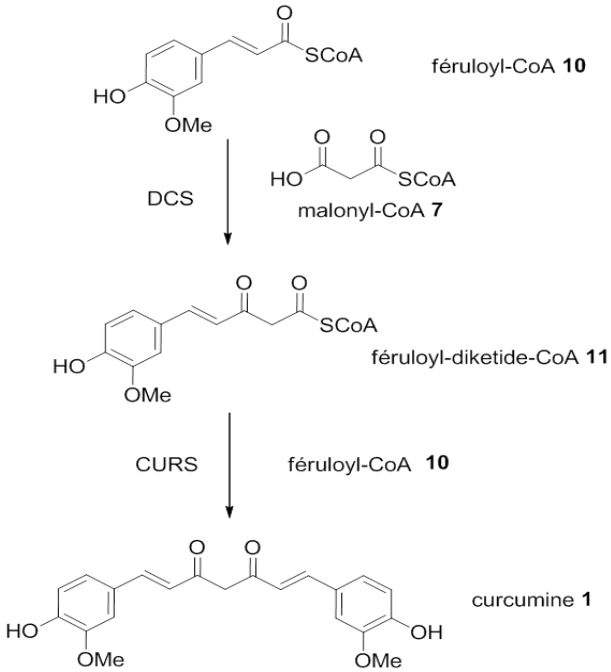
Curcuminoïdes

Histoire découverte - synthèse

1815	Vogel et Pelletier « curcumine » : matière jaune du curcuma [1]
1910	Milobedzka et Lampe : diféruloylméthane [2]
1918	Lampe : première synthèse chimique [3]
1949	Schraufstatter et Bernt : antiinfectieux [4]
1970	Intérêts scientifiques (antioxydante et antiinflammatoire)
1973	Roughley et Whiting : intérêt biosynthèse [5]
1980	Découverte de ses propriétés anticancéreuses
1998	FDA : curcumine classée *GRAS*
2015	Intérêt oncologie, neuropsychiatrie [6]



Curcumine

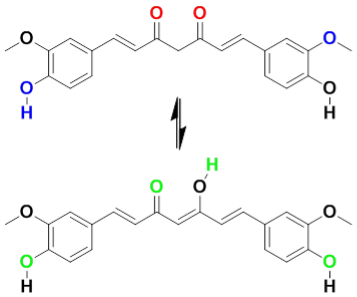


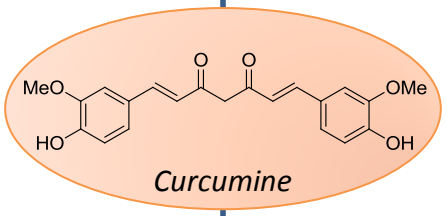
[1] Vogel; Pelletier. *Journal de Pharmacie et des Sciences Accessoires* **1815**, 289–300.
[2] Milobedzka, J.; Kostanecki, S. v.; Lampe, V. Zur Kenntnis Des Curcumins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1910**, *43*, 2164–2168.
[3] Lampe, V. Synthese von Curcumin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1918**, *51*, 1347–1355.
[4] Schraufstatter, E.; Bernt, H. Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds. *Nature* **1949**, *164*, 456–457.
[5] Roughley, P. J.; Whiting, D. A. Experiments in the Biosynthesis of Curcumin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1* **1973**, 2379–2388.
[6] Esatbeyoglu, T. *et al. Angewandte Chemie - International Edition* **2012**, *51* (22), 5308–5332.

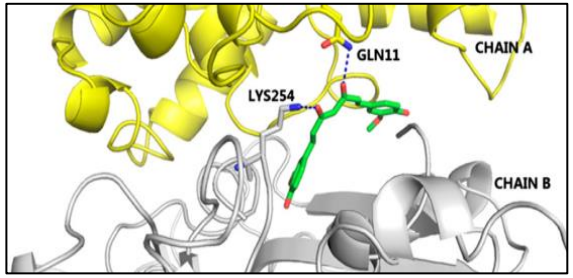
Propriétés physico-chimiques

Interactions Intermoléculaires

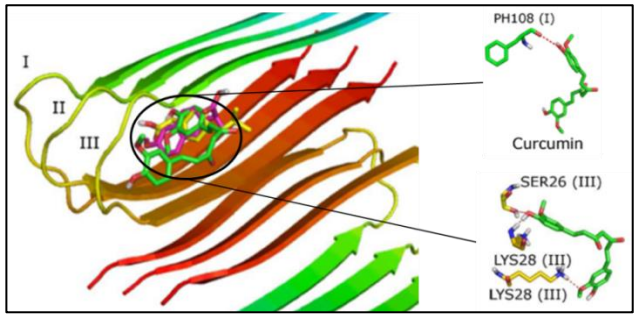
1. Equilibre céto-énolique
   → liaisons Hydrogène [1,2,3]



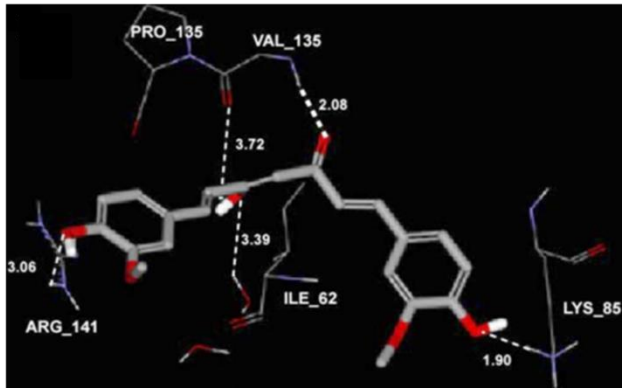




Curcumine et tubuline [1]



Curcumine et peptide β-amyloïde [2]



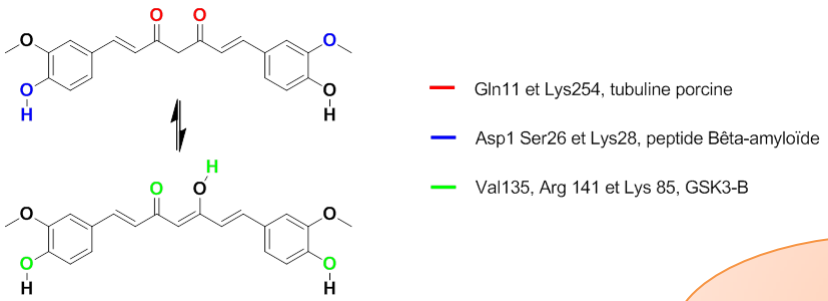
Curcumine et GSK-3β [3]

[1] Li, J. *et al. Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *265* (2), 190–199.
[2] Ngo, S. T. *et al. Journal of medicinal chemistry* **2012**, *116*, 10165–10175.
[3] Bustanji, Y. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778.
[4] Kolev, T. M. *et al. International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *102*, 1069–1079.
[5] Borsari, M. *et al. Inorganica Chimica acta* **2002**, *328*, 61–68.
[6] Dinkova-kostova, A. T. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *98* (6), 3404–3409.
[7] Sun, Y. *et al. Biophysical Journal* **2008**, *95* (5), 2318–2324.
[8] Baell, J. *et al. Nature* **2014**, *513*, 481–483.

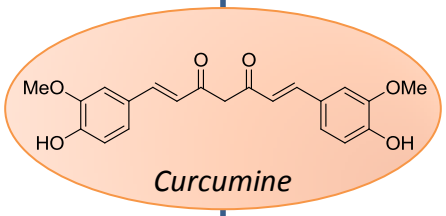
Propriétés physico-chimiques

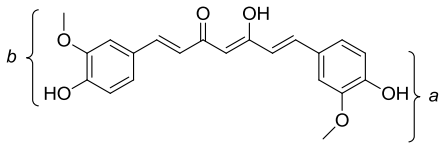
Interactions Intermoléculaires

1. Equilibre céto-énolique
   → liaisons Hydrogène [1,2,3]

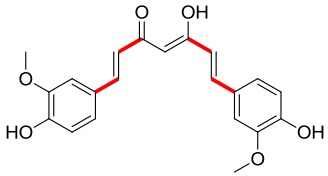


→ Adaptation structurale [4]





b,s-trans,s-trans,a
conformère le plus stable



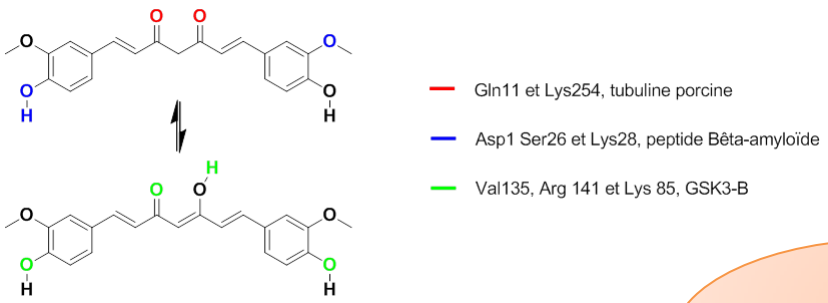
b,s-trans,s-trans,a
conformère le moins stable

[1] Li, J. *et al. Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *265* (2), 190–199.
[2] Ngo, S. T. *et al. Journal of medicinal chemistry* **2012**, *116*, 10165–10175.
[3] Bustanji, Y. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778.
[4] Kolev, T. M. *et al. International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *102*, 1069–1079.
[5] Borsari, M. *et al. Inorganica Chimica acta* **2002**, *328*, 61–68.
[6] Dinkova-kostova, A. T. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *98* (6), 3404–3409.
[7] Sun, Y. *et al. Biophysical Journal* **2008**, *95* (5), 2318–2324.
[8] Baell, J. *et al. Nature* **2014**, *513*, 481–483.

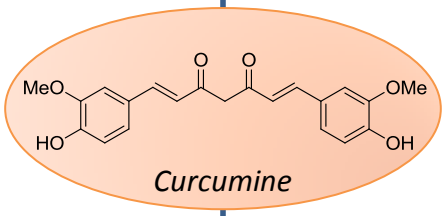
Propriétés physico-chimiques

Interactions Intermoléculaires

1. Equilibre céto-énolique
   → liaisons Hydrogène [1,2,3]



→ Adaptation structurale [4]



2. Chélation de cations métalliques [5]
   Fe, Cu, Zn, Al, Mg, Se, …

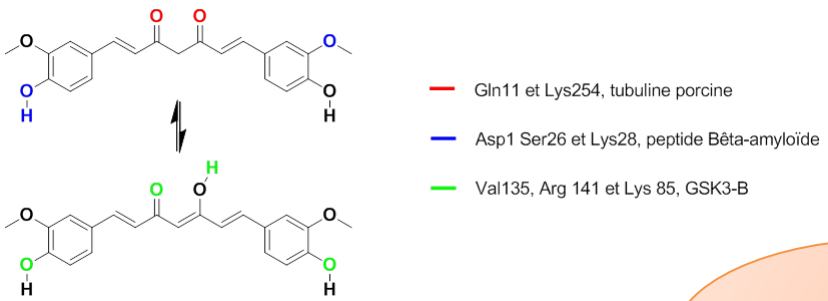
3. Accepteur de Michael [6]

[1] Li, J. *et al. Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *265* (2), 190–199.
[2] Ngo, S. T. *et al. Journal of medicinal chemistry* **2012**, *116*, 10165–10175.
[3] Bustanji, Y. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778.
[4] Kolev, T. M. *et al. International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *102*, 1069–1079.
[5] Borsari, M. *et al. Inorganica Chimica acta* **2002**, *328*, 61–68.
[6] Dinkova-kostova, A. T. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *98* (6), 3404–3409.
[7] Sun, Y. *et al. Biophysical Journal* **2008**, *95* (5), 2318–2324.
[8] Baell, J. *et al. Nature* **2014**, *513*, 481–483.

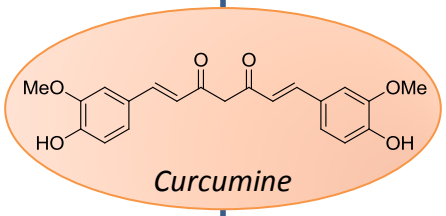
Propriétés physico-chimiques

Interactions Intermoléculaires

1. Equilibre céto-énolique
   → liaisons Hydrogène [1,2,3]



   → Adaptation structurale [4]



2. Chélation de cations métalliques [5]
   Fe, Cu, Zn, Al, Mg, Se, …

3. Accepteur de Michael [6]

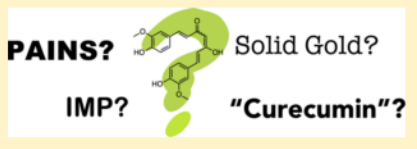
Lipophilie

Solubilité (0,03 µM) et Log P (2,3 – 2,6)
→ Interactions / biomembranes [7]
→ *PAINS* [8,9]

Controverses : Pan Assay Interference Compound [8,9]

Baell *et al.* (2010): composés pouvant être présentés comme des points de départ potentiels pour une exploration plus poussée, alors qu'ils ne possèdent pas d'activité intrinsèque.

Nelson *et al.* (2017)[10] : revue dédiée à la curcumine en tant que PAINS et IMPS (invalide metabolic panaceas).

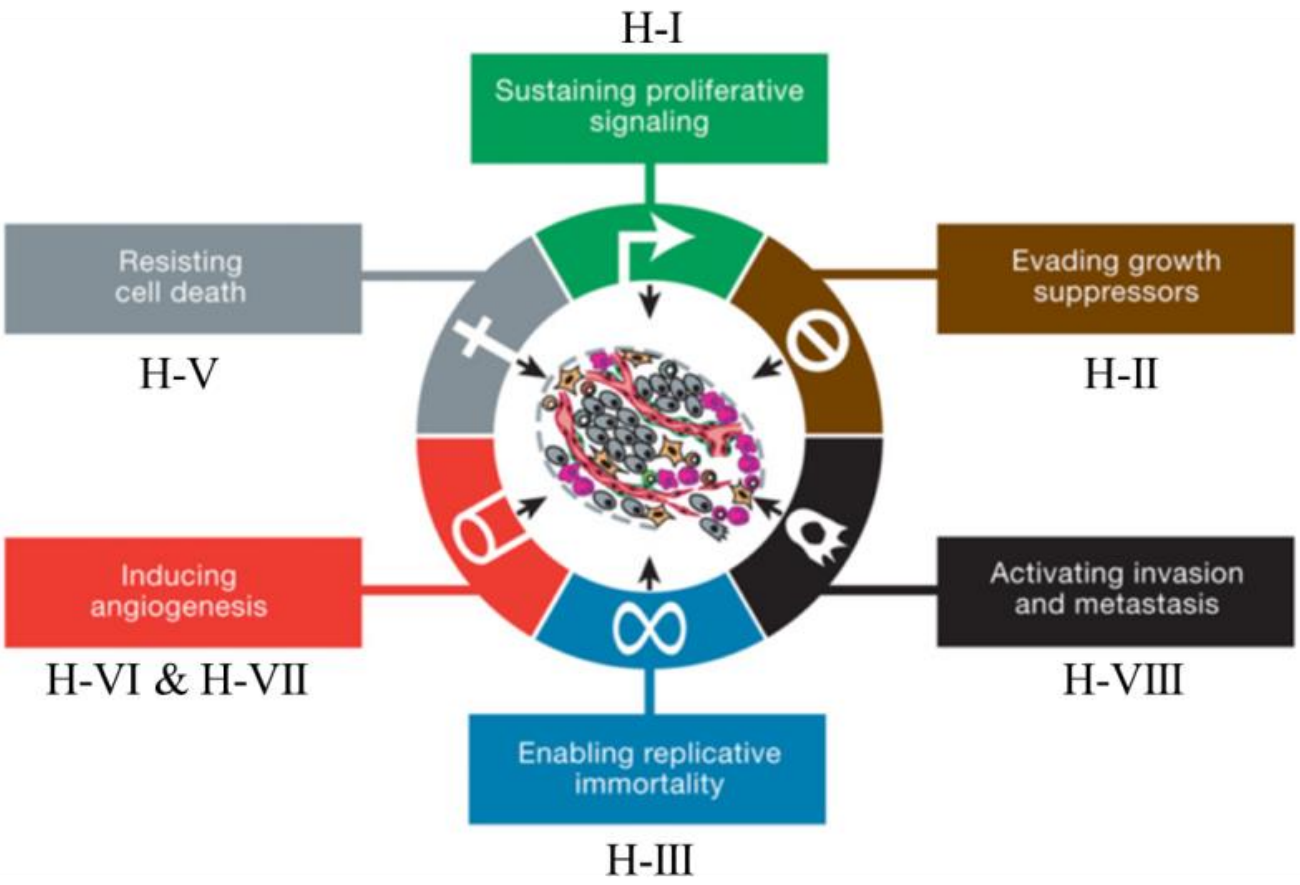


Padmanaban *et al. (fév. 2017)*[11] répond par publication interposée : EC rand. PAR, BPCO, Infectiologie …

"While a cautionary approach is welcome, summary dismissal of an entire area of research is like throwing the baby out with bathwater."

[1] Li, J. *et al. Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *265* (2), 190–199.
[2] Ngo, S. T. *et al. Journal of medicinal chemistry* **2012**, *116*, 10165–10175.
[3] Bustanji, Y. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778.
[4] Kolev, T. M. *et al. International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *102*, 1069–1079.
[5] Borsari, M. *et al. Inorganica Chimica acta* **2002**, *328*, 61–68.
[6] Dinkova-kostova, A. T. *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *98* (6), 3404–3409.
[7] Sun, Y. *et al. Biophysical Journal* **2008**, *95* (5), 2318–2324.
[8] Baell, J. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 2719-2740.
[9] Baell, J. *et al. Nature* **2014**, *513*, 481–483.
[10] Nelson, K. M. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 1620-1637.
[11] Padmanaban, G. ; Nagaraj, V. A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *8*, 274.

➢ *Propriétés anticancéreuses*

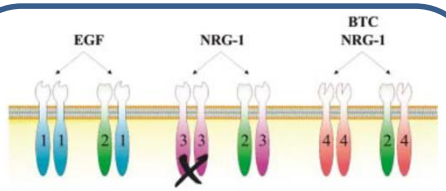


Caractéristiques des processus tumoraux [1]

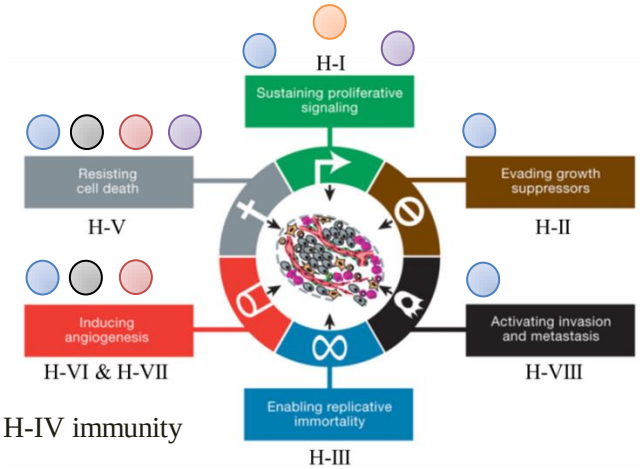
[1] Hanahan, D. *et al. Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.

➢ *Propriétés anticancéreuses*

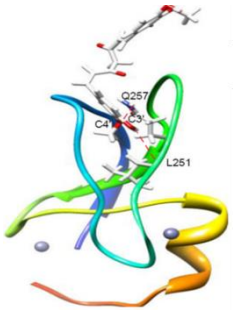
Action sur les récepteurs ErB



- ➢ Accepteur Michael [1]
- ➢ Modulation expression gènes (p53) [2]

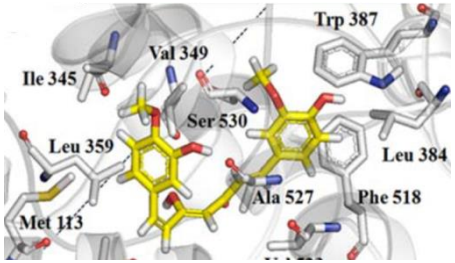


Action sur les protéines kinases C [3]



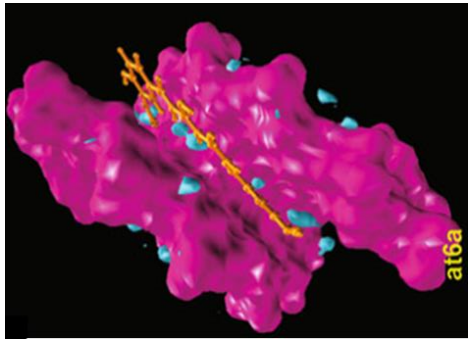
- ➢ liaisons H

Synthèse des PG : COX-2 [4]



- ➢ liaisons H

Fixation à l'ADN [6]



- ➢ liaisons H
- ➢ fixation dans le petit sillon de la double hélice
- ➢ altération miRNA : degré condensation

Récepteurs Vitamine D [5]

[1] Jung, Y. *et al. Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1773*, 383–390.
[2] Lee, J. *et al. Cancer Letters* **2010**, *290* (1), 76–86.
[3] Majhi, A. *et al. Bioorganic Medicinal Chemistry* **2011**, *18* (4), 1591–1598.
[4] Maldonado-Rojas, W. *et al. Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2011**, *30*, 157–166.
[5] Bartik, L. *et al. Journal of Nutrition Biochemistry* **2011**, *21* (12), 1153–1161.
[6] Koonammackal, M .V. *et al. Journal of Molecular Modeling* **2011**, *17* (11), 2805–2816.

➢ *La maladie d'Alzheimer*

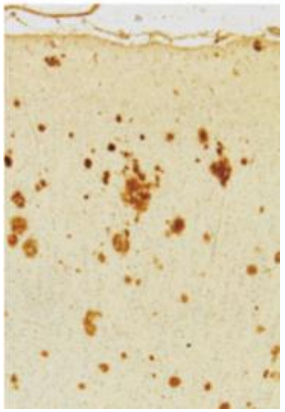
Aloïs Alzheimer
1906 [1]

Neurodégénérative, progressive et irréversible

- déficit cognitif multiple des « 4 A » **: a praxie, a gnosie, a phasie, a mnésie**
- 44 millions de patients dans le monde atteints en 2014 (× 3 en 2050)

Physiopathologie

- Physiopathologie due à des dys-agrégations protéiques :
  - Plaques séniles : peptide Aβ
  - Dégénérescences neurofibrillaires : protéine Tau hyperphosphorylée



Plaques séniles

Dégénérescences neurofibrillaires

- Contexte de toxicité cellulaire neuroinflammatoire : cations métalliques et stress oxydant

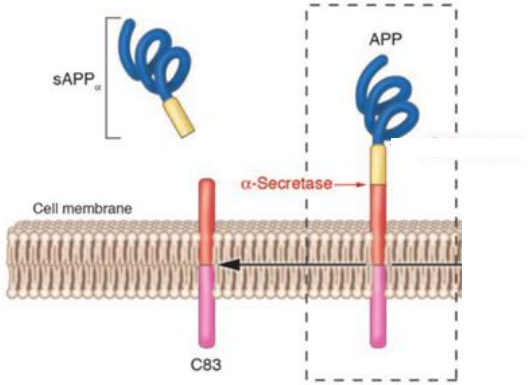
- Atteint préférentiellement les voies cholinergiques

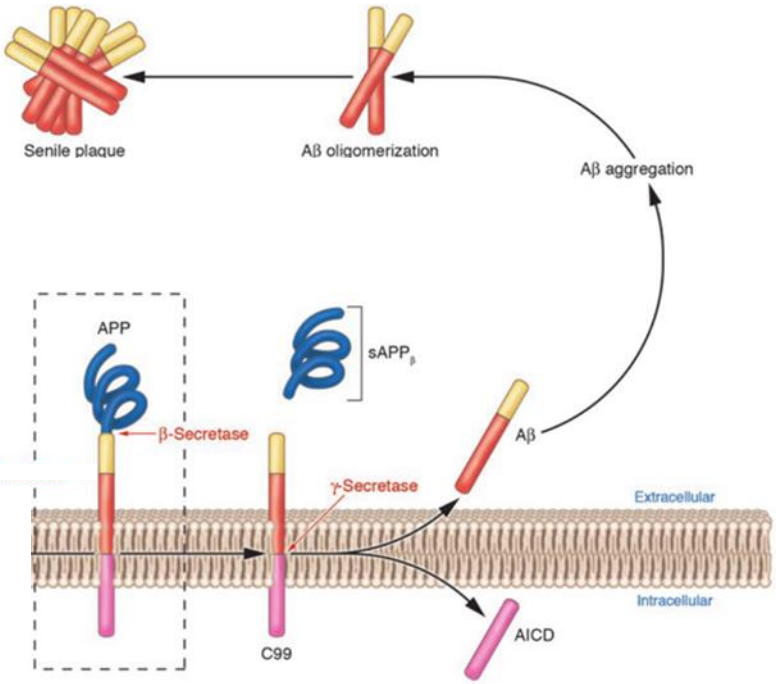
[1] Alzheimer, A. *Neurologisches Centralblatt* **1906**, *23*, 1129 – 1136.

➢ *La maladie d'Alzheimer : anomalies moléculaires*

➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

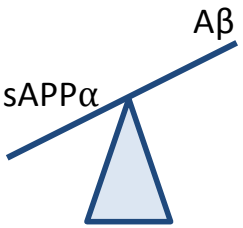
- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - deux modes de clivage possible en parallèle





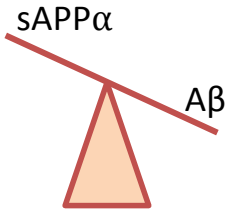
- voie non amyloïdogénique (sAPPα)
  - action α-sécrétases
    - neuroprotecteur
    - neurotrophique

sujet jeune



- voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
  - action β- et γ-sécrétases

sujet âgé



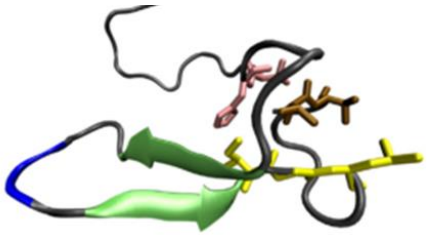
- Pathologie Alzheimer : accumulation
  - agrégation
  - plaques séniles

[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129.

➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

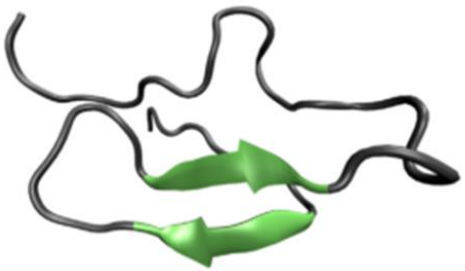
➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - voie non amyloïdogénique (sAPP∝)
  - voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
- $A\beta_{1-42}$: tendance accrue à l'agrégation [2]



($A\beta_{1-42}$)

- plus stable
- tendance accrue à l'agrégation [2]



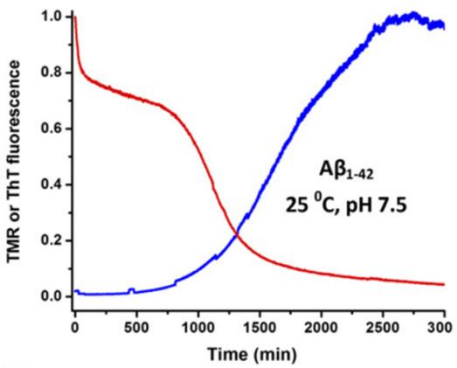
($A\beta_{1-40}$)

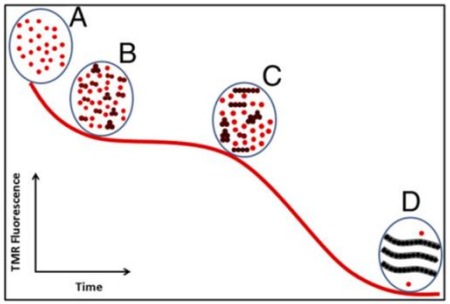
[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.

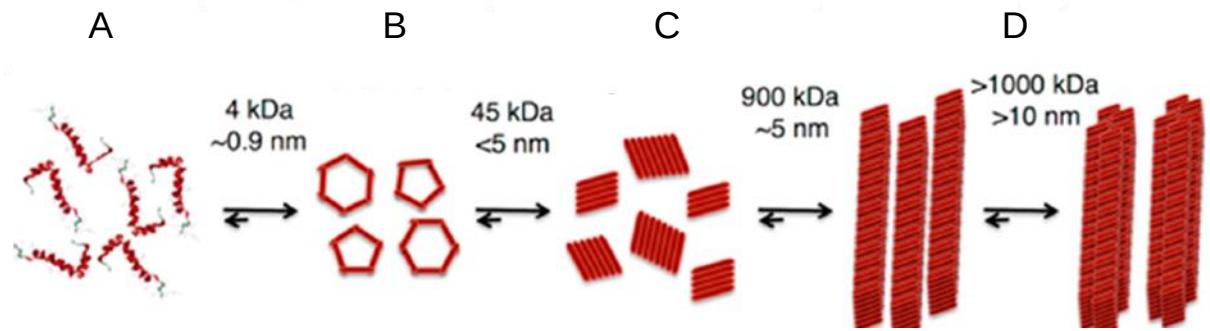
➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

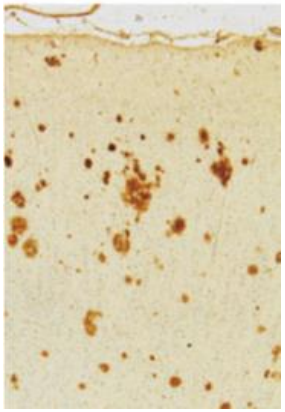
➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - voie non amyloïdogénique (sAPP∝)
  - voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
- $A\beta_{1-42}$: tendance accrue à l'agrégation [2]
- Cinétique d'agrégation [3]
  - plateau : oligomères [4]
  - fibrillation [3]
  - formation des plaques séniles [5]







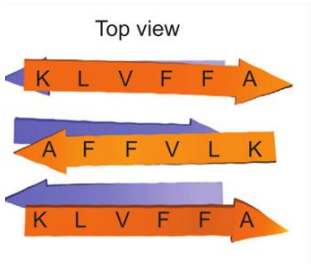


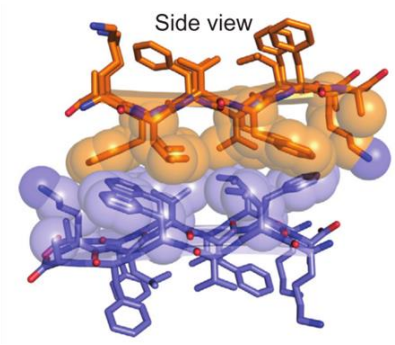
[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129.
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.

➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - voie non amyloïdogénique (sAPP∝)
  - voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
- $A\beta_{1-42}$: tendance accrue à l'agrégation [2]
- Cinétique d'agrégation [3]
  - plateau : oligomères [4]
  - fibrillation [3]
  - formation des plaques séniles [5]
  - séquence impliquée : ^{16}KLVFFA^{21}



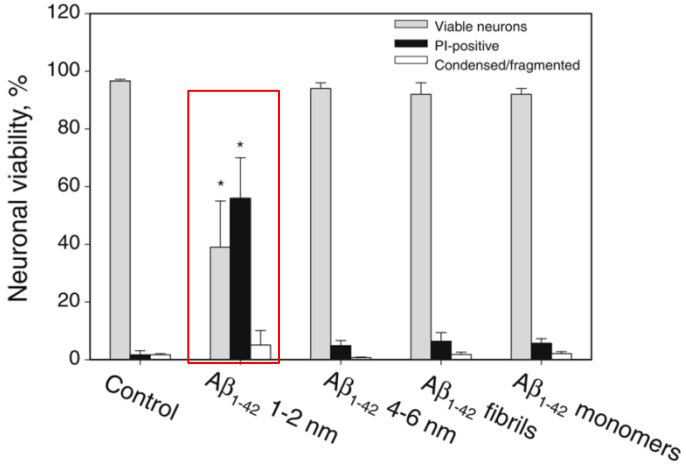


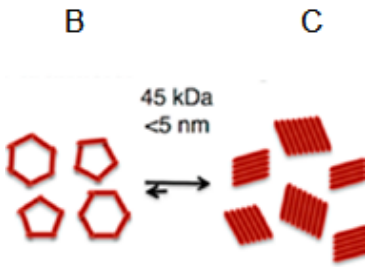
[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.

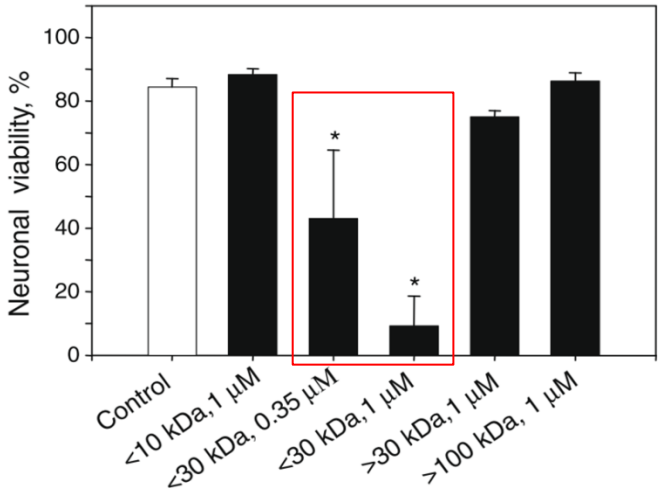
➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - voie non amyloïdogénique (sAPP∝)
  - voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
- $A\beta_{1-42}$: tendance accrue à l'agrégation [2]
- Cinétique d'agrégation [3]
  - plateau : oligomères [4]
  - fibrillation [3]
  - formation des plaques séniles [5]
  - séquence impliquée : ^{16}KLVFF^{20}
- Toxicité
  - formes oligomériques [6] : 1 - 2 nm ; 10 - 30 kDa





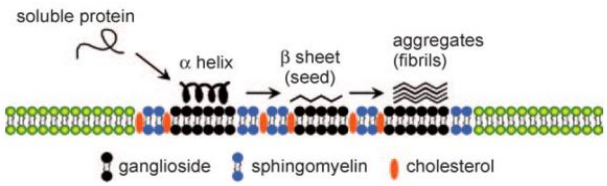


[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.
[6] Cizas, P. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *496* (2), 84–92.

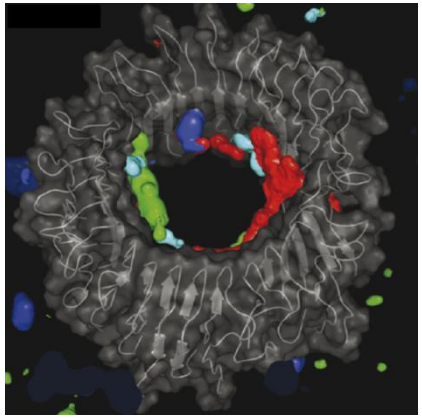
➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - voie non amyloïdogénique (sAPP∝)
  - voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
- $A\beta_{1-42}$: tendance accrue à l'agrégation [2]
- Cinétique d'agrégation [3]
  - plateau : oligomères [4]
  - fibrillation [3]
  - formation des plaques séniles [5]
  - séquence impliquée : ^{16}KLVFF^{20}
- Toxicité
  - formes oligomériques [6] : 1 - 2 nm ; 10 - 30 kDa
  - accumulation à la surface membranaire (radeaux lipidiques) [7]
  - formation de pores membranaires [8]



radeaux lipidiques [7]

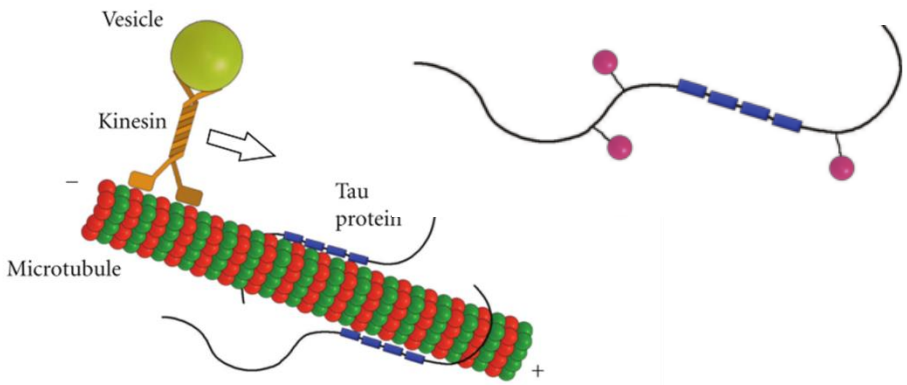


pores membranaires [8]

[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.
[6] Cizas, P. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *496* (2), 84–92.
[7] Butterfield, S. M. *et al. Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (33), 5628–5654.
[8] Jang, H. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (2), 91–100.

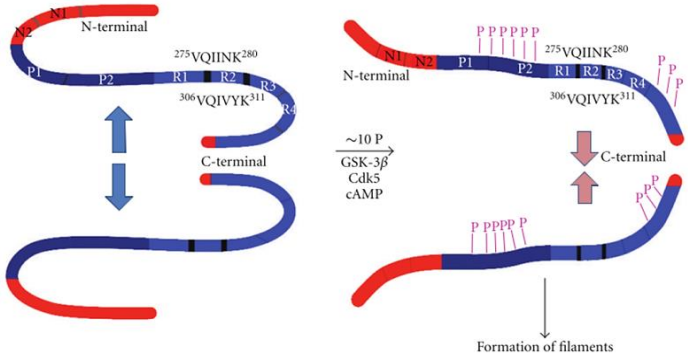
➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

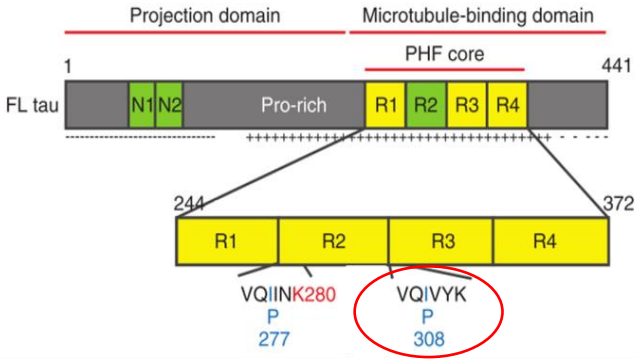
➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*



➢ *Pathologie de la protéine Tau*

- Protéine Tau [9]
  - associée aux microtubules (MAP)
  - maintien structural neurones
- Hyperphosphorylation
  - GSK-3β
  - repliement et agrégation
- Séquence incriminée [10] : ^{306}VQIVYK^{311} = PHF6



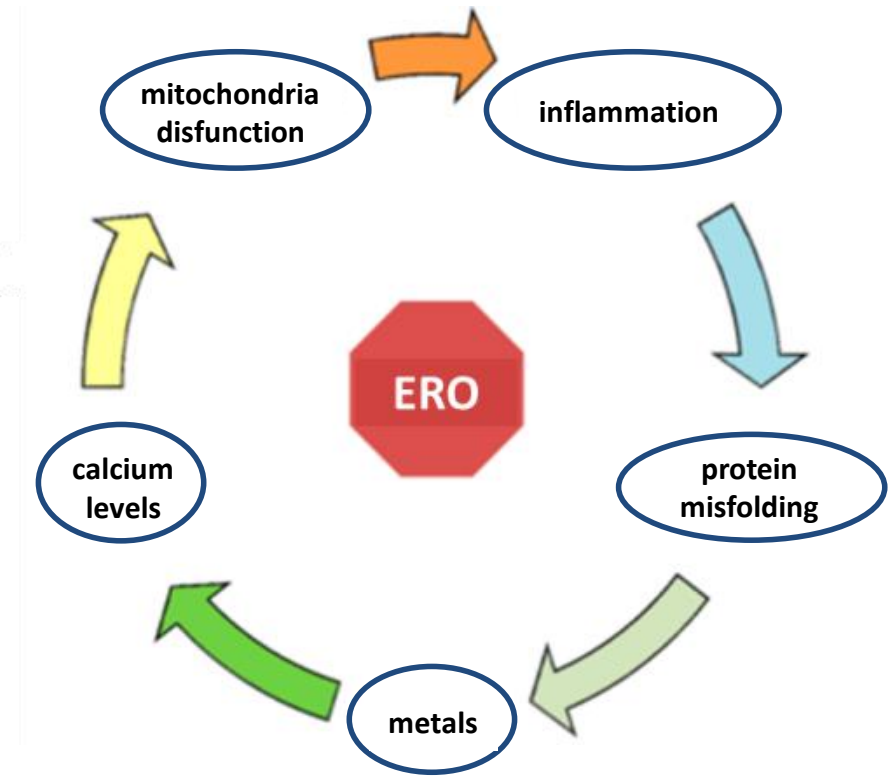


PHF6

[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.
[6] Cizas, P. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *496* (2), 84–92.
[7] Butterfield, S. M. *et al. Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (33), 5628–5654.
[8] Jang, H. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (2), 91–100.
[9] Shammas, S. L. *et al. Nature Communications* **2015**, *6*, 1–10.
[10] Kolarova, M. *et al. International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 1–13.

➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*



➢ *Pathologie de la protéine Tau*

- Protéine Tau [9]
  - associée au microtubules (MAP)
  - maintien structural neurones
- Hyperphosphorylation
  - GSK-3β
  - repliement et agrégation
- Séquence incriminée [10] : ^{306}VQIVYK^{311} = PHF6

- Contexte de toxicité cellulaire neuroinflammatoire
  - *favorise la dys-agrégation*

[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.
[6] Cizas, P. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *496* (2), 84–92.
[7] Butterfield, S. M. *et al. Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (33), 5628–5654.
[8] Jang, H. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (2), 91–100.
[9] Shammas, S. L. *et al. Nature Communications* **2015**, *6*, 1–10.
[10] Kolarova, M. *et al. International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 1–13.

➢ *La maladie d'Alzheimer : physiopathologie*

➢ *Hypothèse de la cascade amyloïde*

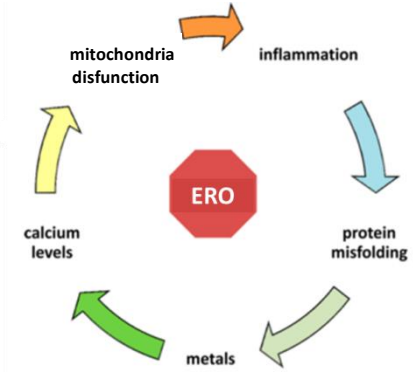
- Protéine précurseur de l'amyloïde : APP [1]
  - voie non amyloïdogénique (sAPP∝)
  - voie amyloïdogénique ($A\beta_{1-42}$)/($A\beta_{1-40}$)
- $A\beta_{1-42}$: tendance accrue à l'agrégation [2]
- Cinétique d'agrégation [3]
  - plateau : oligomères [4]
  - fibrillation [3]
  - formation des plaques séniles [5]
  - séquence impliquée : ^{16}KLVFF^{20}
- Toxicité
  - formes oligomériques [6] : 1 - 2 nm ; 10 - 30 kDa
  - accumulation à la surface membranaire (radeaux lipidiques) [7]
  - formation de pores membranaires [8]

⇒ dégénérescence neuronale irréversible

➢ *Pathologie de la protéine Tau*

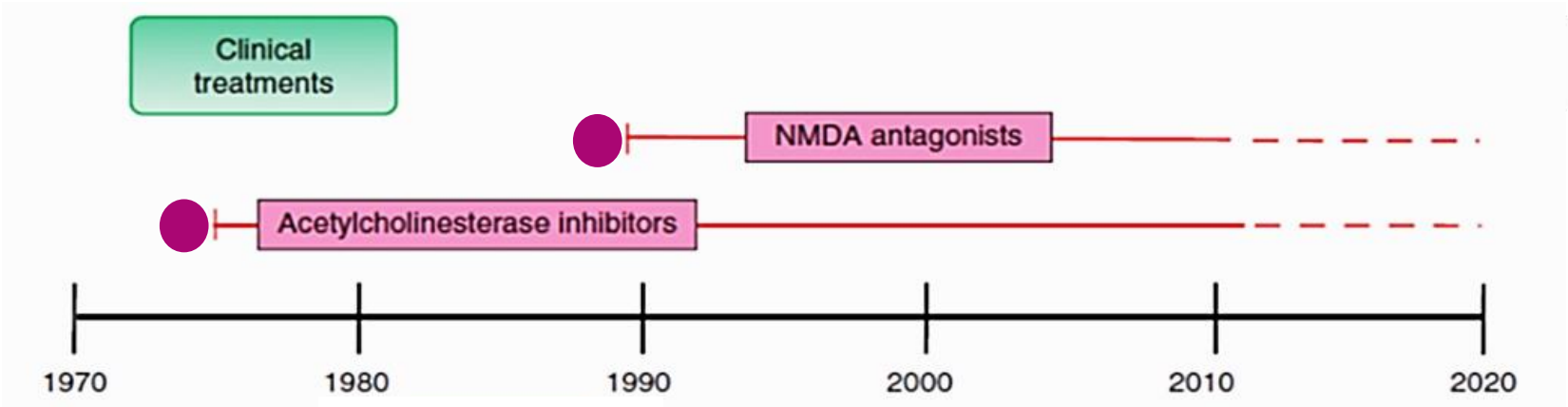
- Protéine Tau [9]
  - associée au microtubules (MAP)
  - maintien structural neurones
- Hyperphosphorylation
  - GSK-3β
  - repliement et agrégation
- Séquence incriminée [10] : ^{306}VQIVYK^{311} = PHF6

➢ Contexte de toxicité cellulaire neuroinflammatoire

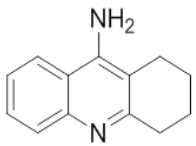


[1] Gandy, S. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129..
[2] Ball, K. A. *et al. Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.
[3] Garai, K.; Frieden, C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.
[4] Carulla, N. *et al. Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.
[5] Rijal Upadhaya, A. *et al. Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.
[6] Cizas, P. *et al. Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *496* (2), 84–92.
[7] Butterfield, S. M. *et al. Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (33), 5628–5654.
[8] Jang, H. *et al. Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (2), 91–100.
[9] Shammas, S. L. *et al. Nature Communications* **2015**, *6*, 1–10.
[10] Kolarova, M. *et al. International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 1–13.

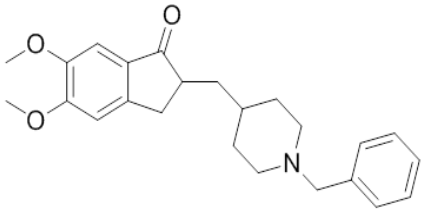
➢ *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]



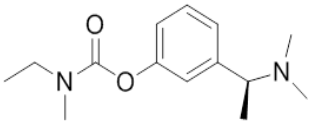
Inhibiteurs d'Acétylcholinestérase



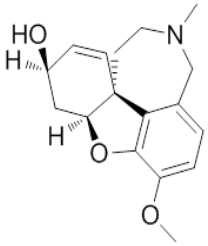
Tacrine, COGNEX*



Donépézil, ARICEPT*

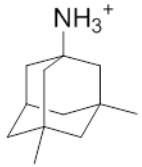


Rivastigmine, EXELON*



Galantamine, REMINYL*

Antagoniste des récepteurs NMDA



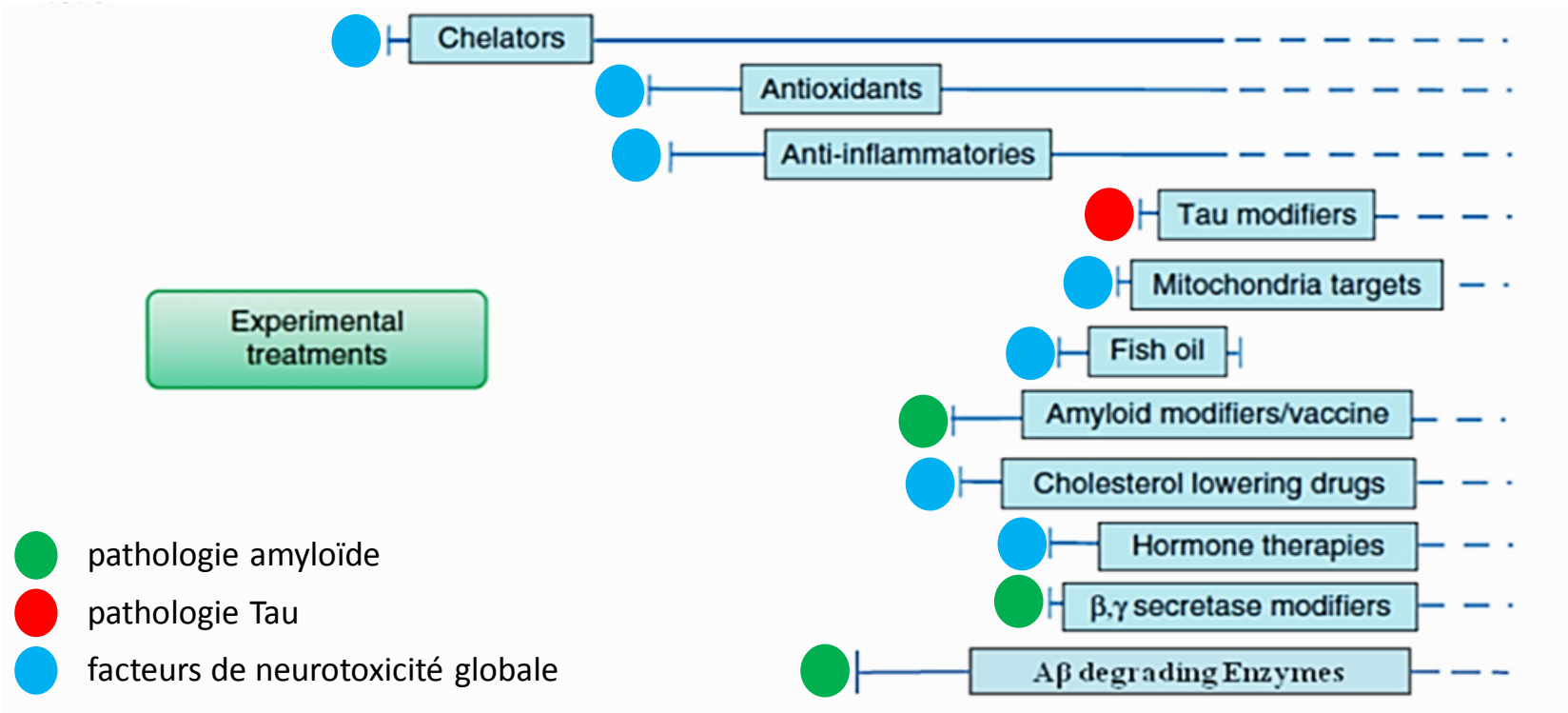
Mémantine, EBIXA*

● AMM

[1] Barage, S. H. *et al. Neuropeptides* **2015**, http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008.

- *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]

  - *Maladie présentant des anomalies moléculaires complexes*
  - *Les traitements expérimentaux sont nombreux*



- *Echecs des essais cliniques*
- *Insuffisance d'efficacité clinique*

Why Pleiotropic Interventions are Needed for Alzheimer's Disease

Sally A. Frautschy · Greg M. Cole

[1] Barage, S. H. *et al. Neuropeptides* **2015**, http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008.
Frautschy, S. A. ; Cole, G. M. *Molecular Neurobiology* **2010**, *41* (2-3), 392-409.

- *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]

- *Association de principes actifs : cocktails médicamenteux*

+

=

Principe actif 1 | **Principe actif 2**

Cible 1 | **E ind** | **Cible 2** | **E ind**

- *engendre un défaut d'observance*
- *augmente le risque iatrogène*

- *Formulation galénique unique*
  - *améliore l'observance*
  - *ne diminue pas le risque iatrogène*

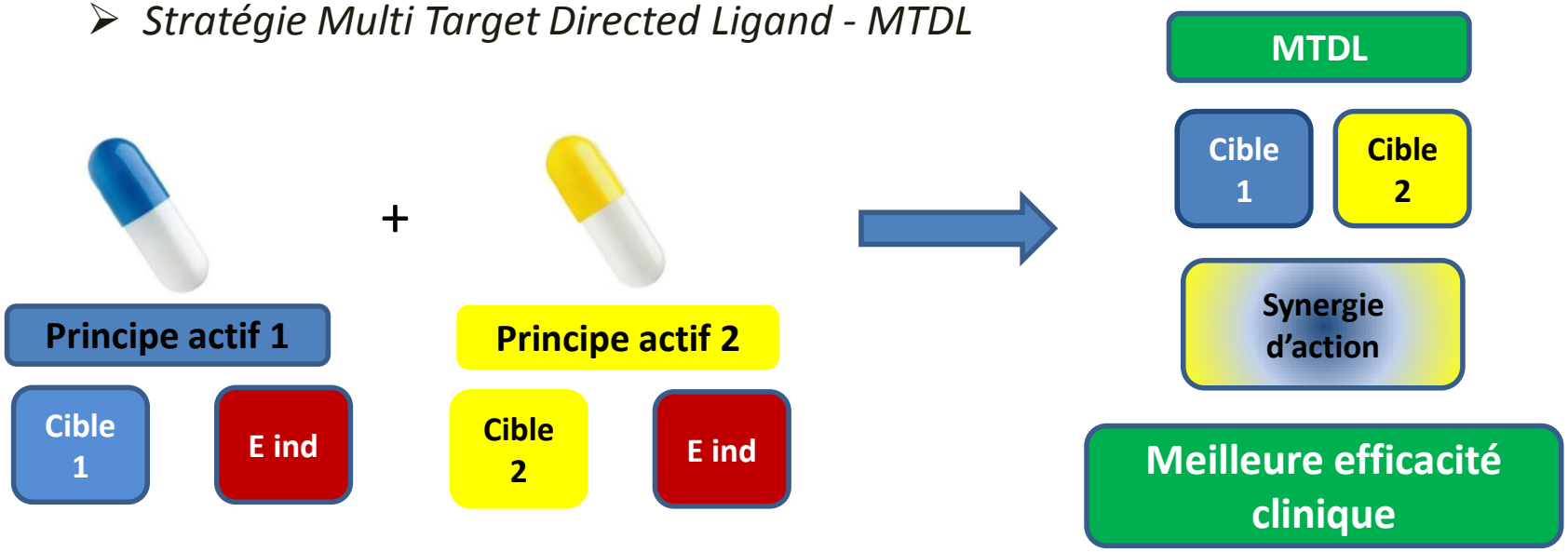
- *Hypertension artérielle*

=

- *Infectiologie VIH*

- *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]

  - *Stratégie Multi Target Directed Ligand - MTDL*

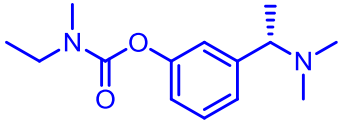


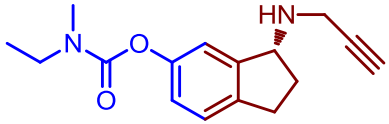
  - Exemple disposant d'une AMM

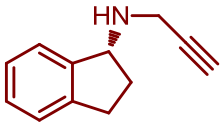
crizotinib, XALKORI®

- *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]
  - *Stratégie Multi Target Directed Ligand - MTDL*
    - *MTDLs de synthèse*

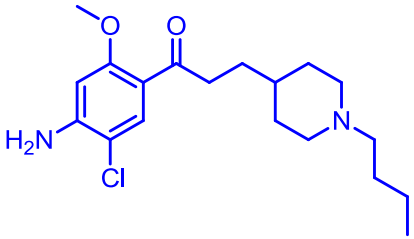
- *Ladostigil : inhibiteur dual AChE et MAO-A et B* [1] (essais cliniques phase II)

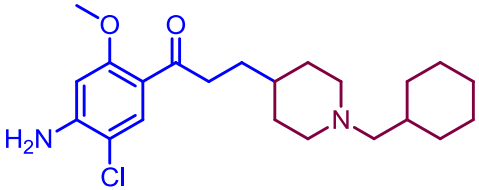

Rivastigmine, EXELON®

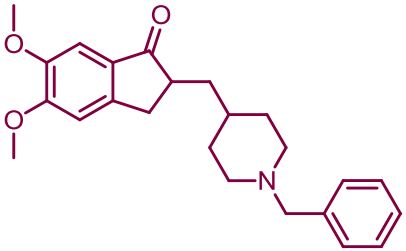

Ladostigil


Rasagiline, AZILECT®

- *Donécopride : ligand dual agoniste partiel 5-HT$_4$R et inhibiteur AChE* [2]

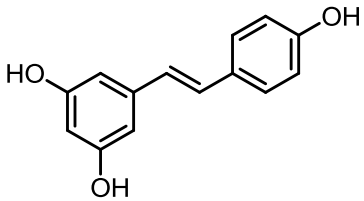

RS67333


Donécopride

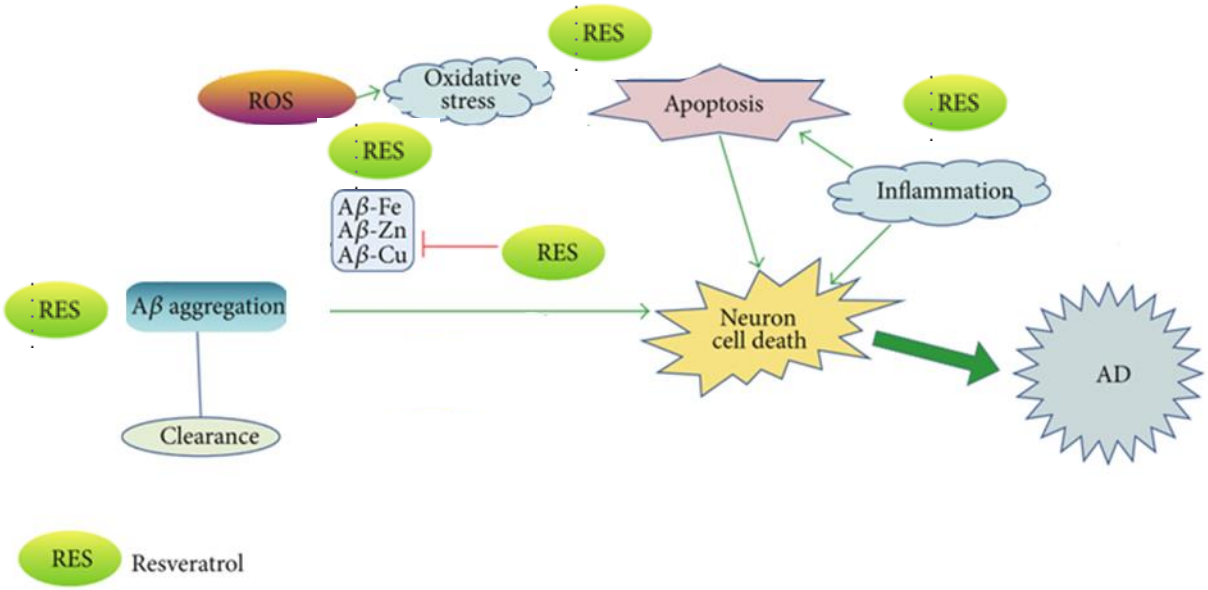

Donépézil, ARICEPT®

[1] Weinreb, O. *et al. Current Drug Targets* **2012**, *13* (4), 483–494.
[2] Rochais, C. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 3172–3187.

- *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]
  - *Stratégie Multi Target Directed Ligand - MTDL*
    - *Produits naturels pléiotropes* [1,2]

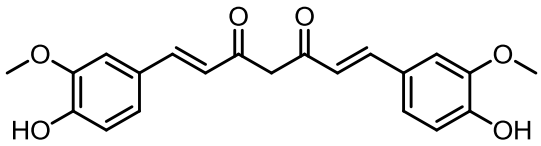


Resvératrol



[1] Bieschke, J. *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (17), 7710–7715.
[2] Ono, K. *et al.* *Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750.

- *La maladie d'Alzheimer : traitements et innovations thérapeutiques* [1]
  - *Stratégie Multi Target Directed Ligand - MTDL*
    - *Produits naturels pléiotropes* [1,2]



Curcumine

Curcuma longa L.

Rhizomes

Curcuma

[1] Bieschke, J. *et al.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (17), 7710–7715.
[2] Ono, K. *et al.* *Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750.

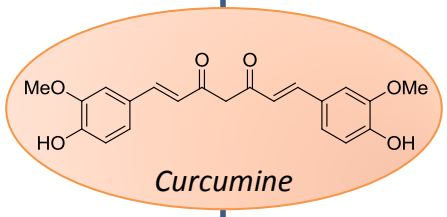
Propriétés neuroprotectrices

- propriétés pléiotropes de la curcumine d'intérêt dans le traitement de la MA
  - études *in vitro* et *in vivo*

pathologie amyloïde

- Interactions Intermoléculaires

- Effets sur la β-sécrétase BACE-1 [3]
  - inhibition directe IC_{50} = 0,56 mM
  - inhibition indirecte
    - expression génique 1 - 30 µM



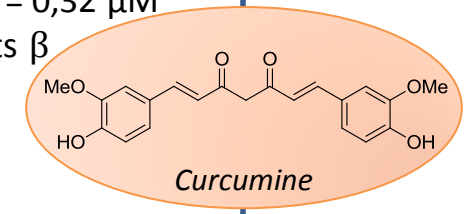
[1] Ono, K. *et al. Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750..
[2] Rao, P. P. N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* **2015**, doi: 10.1111/cbdd.12552.

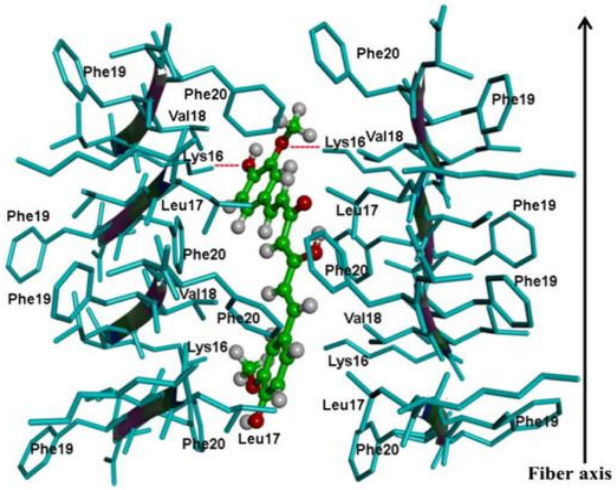
Propriétés neuroprotectrices

- propriétés pléiotropes de la curcumine d'intérêt dans le traitement de la MA
  - études *in vitro* et *in vivo*

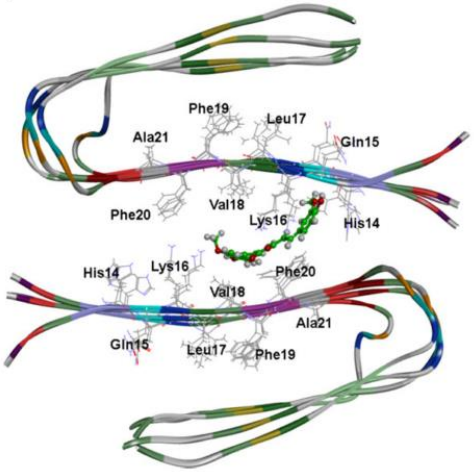
pathologie amyloïde

- Interactions Intermoléculaires
- Effets sur la β-sécrétase BACE-1 [1]
  - inhibition directe IC_{50} = 0,56 mM
  - inhibition indirecte
    - expression génique 1 -30 µM
- Effets sur la cascade amyloïde
  - inhibition agrégation EC_{50} = 0,63 µM [2]
  - déstabilisation des fibrilles EC_{50} = 0,32 µM
  - pas de cristallisation des feuillets β
  - docking [3]





Curcumine dockée dans un octamère hexapeptidique [16]KLVFFA[21]



Curcumine dockée dans un octamère de peptide entier $A\beta_{1-40}$

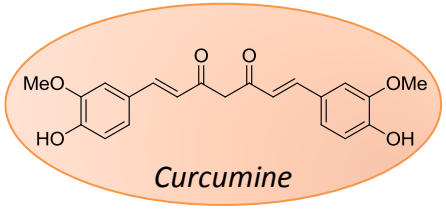
[1] Murata, K. *et al. Journal of Natural Medicines* **2014**, *69* (1), 123–129.
[2] Ono, K. *et al. Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750..
[3] Rao, P. P. N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* **2015**, doi: 10.1111/cbdd.12552.

Propriétés neuroprotectrices

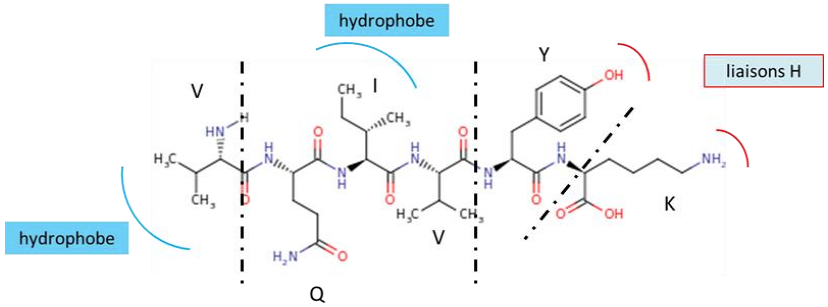
- propriétés pléiotropes de la curcumine d'intérêt dans le traitement de la MA
  - études *in vitro* et *in vivo*

pathologie amyloïde

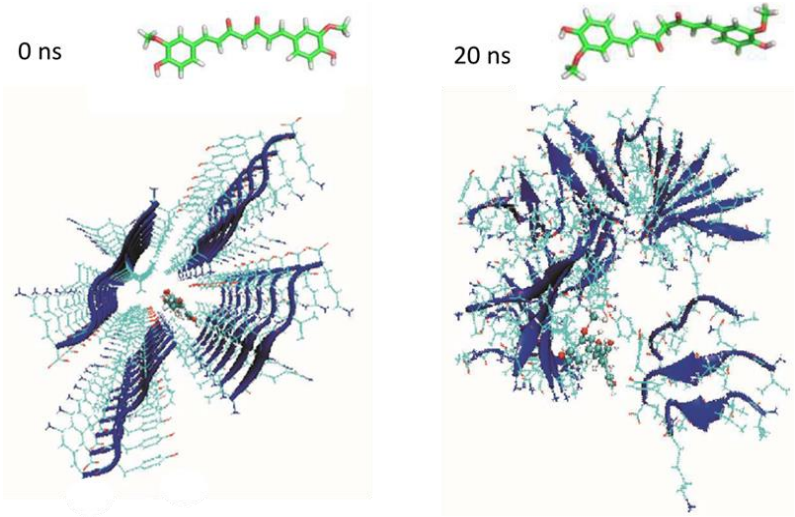
pathologie Tau



- Interactions Intermoléculaires
- Effets sur la β-sécrétase BACE-1 [1]
  - inhibition directe IC_{50} = 0,56 mM
  - inhibition indirecte
    - expression génique 1 -30 µM
- Effets sur la cascade amyloïde
  - inhibition agrégation EC_{50} = 0,63 µM [2]
  - déstabilisation des fibrilles EC_{50} = 0,32 µM
  - pas de cristallisation des feuillets β
  - docking [3]
- Effets sur la protéine Tau
  - inhibition directe de l'agrégation [4]
    - docking et dynamique moléculaire



Sites d'interaction curcumine – hexapeptide [306]VQIVYK[311]



Dynamique moléculaire de la désagrégation de fibres constituées de [306]VQIVYK[311] par la curcumine

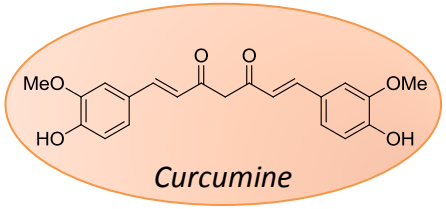
[1] Murata, K. *et al. Journal of Natural Medicines* **2014**, *69* (1), 123–129.
[2] Ono, K. *et al. Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750..
[3] Rao, P. P. N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* **2015**, doi: 10.1111/cbdd.12552.
[4] Berhanu, W. *et al. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2014.**

Propriétés neuroprotectrices

- propriétés pléiotropes de la curcumine d'intérêt dans le traitement de la MA
  - études *in vitro* et *in vivo*

pathologie amyloïde

pathologie Tau

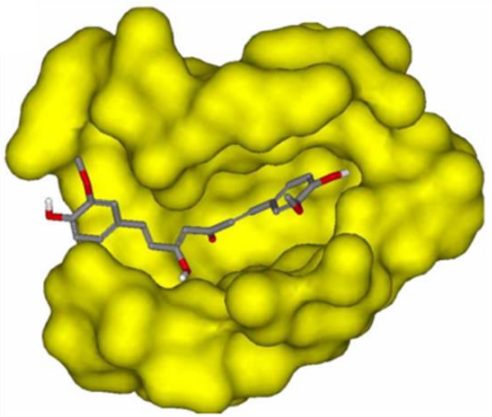


- Interactions Intermoléculaires

- Effets sur la β-sécrétase BACE-1 [1]
  - inhibition directe IC_{50} = 0,56 mM
  - inhibition indirecte
    - expression génique 1 -30 µM

- Effets sur la cascade amyloïde
  - inhibition agrégation EC_{50} = 0,63 µM [2]
  - déstabilisation des fibrilles EC_{50} = 0,32 µM
  - pas de cristallisation des feuillets β
  - docking [3]

- Effets sur la protéine Tau
  - inhibition directe de l'agrégation [4]
    - docking et dynamique moléculaire
  - inhibition directe de l'hyperphosphorylation
    - action sur GSK-3β [5]
    - fixation site ATP

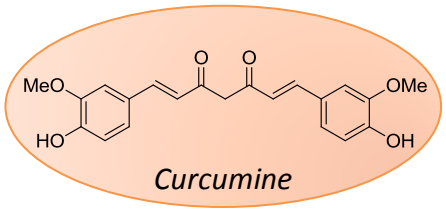


Docking de la curcumine dans le site catalytique de GSK-3β

[1] Murata, K. *et al. Journal of Natural Medicines* **2014**, *69* (1), 123–129.
[2] Ono, K. *et al. Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750..
[3] Rao, P. P. N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* **2015**, doi: 10.1111/cbdd.12552.
[4] Berhanu, W. *et al. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2014.**
[5] Bustanji, Y. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778

Propriétés neuroprotectrices

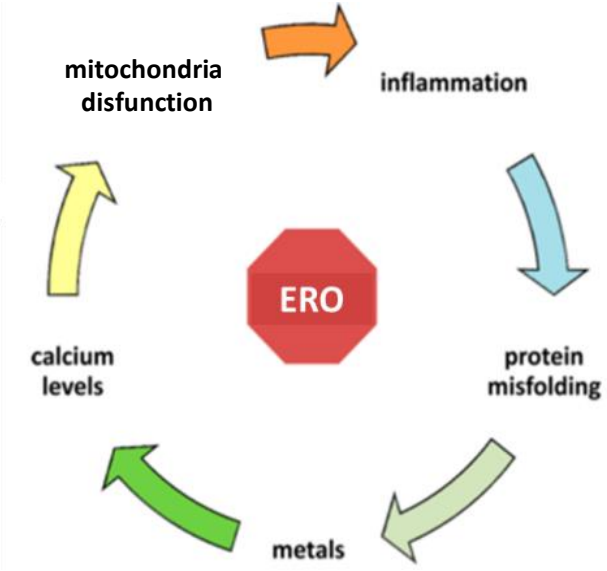
- propriétés pléiotropes de la curcumine d'intérêt dans le traitement de la MA
  - études *in vitro* et *in vivo*



- pathologie amyloïde
- pathologie Tau
- facteurs de neurotoxicité globale

- Interactions Intermoléculaires
- Effets sur la β-sécrétase BACE-1 [1]
  - inhibition directe IC_{50} = 0,56 mM
  - inhibition indirecte
    - expression génique 1 -30 µM
- Effets sur la cascade amyloïde
  - inhibition agrégation EC_{50} = 0,63 µM [2]
  - déstabilisation des fibrilles EC_{50} = 0,32 µM
  - pas de cristallisation des feuillets β
  - docking [3]
- Effets sur la protéine Tau
  - inhibition directe de l'agrégation [4]
    - docking et dynamique moléculaire
  - inhibition directe de l'hyperphosphorylation
    - action sur GSK-3β [5]
    - fixation site ATP
- Actions sur l'environnement neuronal [6]

- Antioxydant
- Anti radicaux-libres
- Chélatante de métaux



[1] Murata, K. *et al. Journal of Natural Medicines* **2014**, *69* (1), 123–129.
[2] Ono, K. *et al. Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750..
[3] Rao, P. P. N. *et al. Chemical Biology & Drug Design* **2015**, doi: 10.1111/cbdd.12552.
[4] Berhanu, W. *et al. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2014.**
[5] Bustanji, Y. *et al. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778
[6] Jovanovic, S. V. *et al. Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (41), 9677–9681.

Biodisponibilité et utilisations

➢ *Absorption*

- Shoba *et al.* : études chez le rat et l'Homme [1]
  - C_{max} = 0,006 ± 0,005 µg.mL^{-1}
  - T_{max} = 1 h

  } DC = 2 g
- comparaison avec le lorazépam [2]
  - C_{max} = 0,025 µg.mL^{-1}
  - DC = 1 mg

➢ *Distribution*

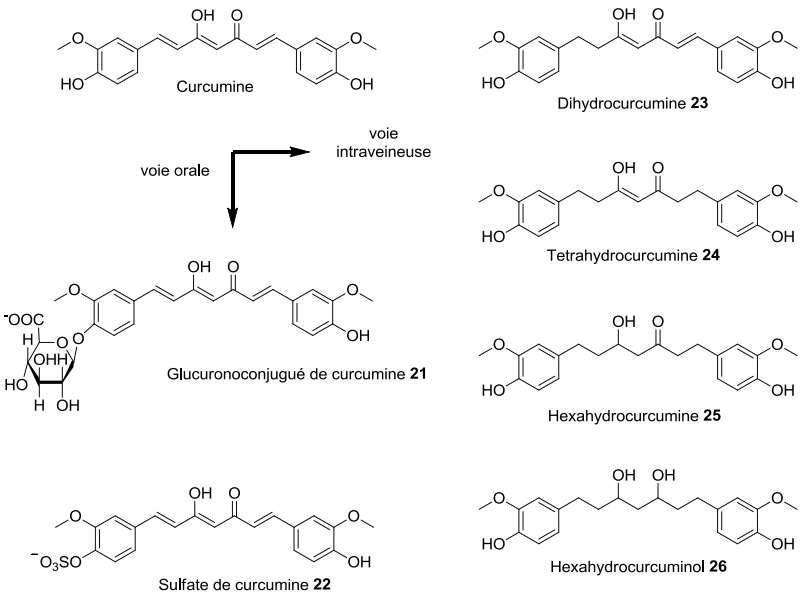
- peu de données
- distribution très faible au niveau périphérique et SNC

➢ *Métabolisme*

- fort métabolisme hépatique
- très rapidement et efficacement conjuguée : phase 2
- réductions : phase 1
- inactivation

➢ *Elimination et $t_{1/2}$* [3]

- pas de données chez l'Homme
- $t_{1/2}$ chez le rat est de 1,7 ± 0,5 h.



➢ *Stabilité* [4]

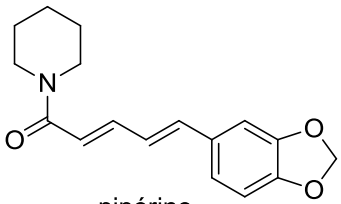
- nombreuses voies de dégradations (solvolyse, photosensibilité, oxydation)
- perte d'activité
- problèmes de conservation

[1] Shoba, G. *et al. Planta Medica* **1998**, *64*, 353–356.
[2] Greenblatt, D. J. *et al. Journal of pharmaceutical sciences* **1982**, *71* (2), 248–252.
[3] Anand, P. *et al. Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4* (6), 807–818.
[4] Heger, M. *et al. Pharmacological Reviews* **2014**, *66* (1), 222–307.

Biodisponibilité et solutions proposées

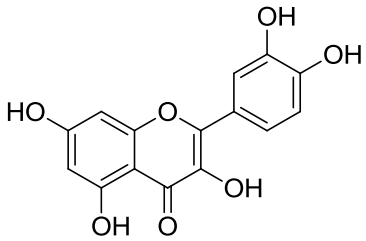
➢ *Co-administration d'adjuvants*

- pipérine extraite de poivre noir
  - inhibiteur de la glucuronoconjugaison hépatique
  - 2 g de curcumine + 20 mg de pipérine BD × 2000 %
  - distribution dans le SNC + 48 % [1]



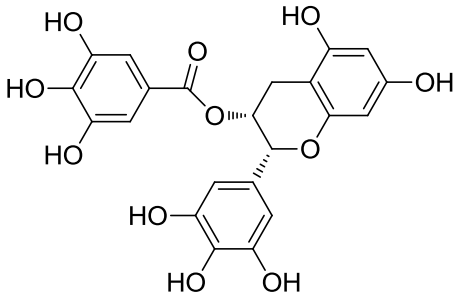
pipérine

- quercétine
  - puissant antioxydant
  - curcumine 480 mg + quercétine 20 mg
  - polypose adénopathique familiale [2]



quercétine

- Epigallocatechin-3-gallate
  - extrait du thé vert
  - leiomyosarcome utérin [3]

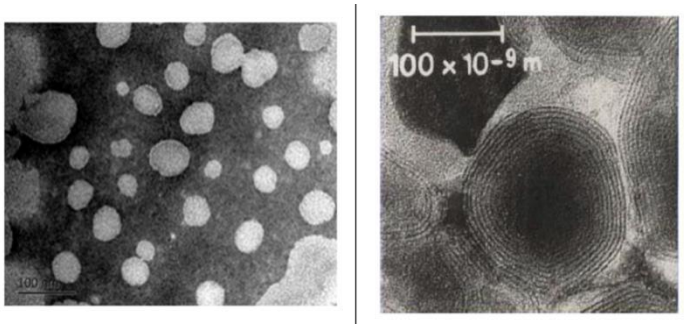


Epigallocatechin-3-gallate

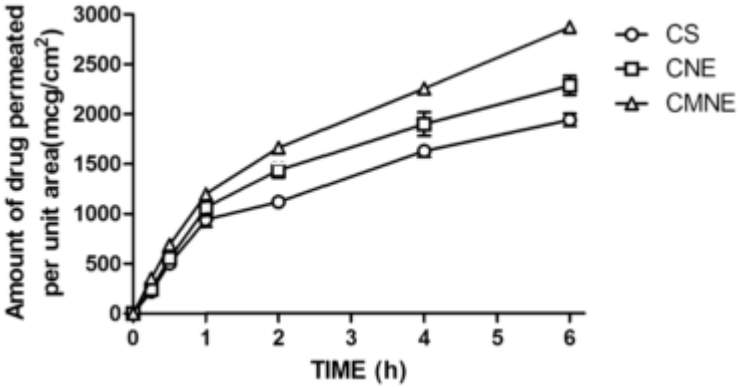
[1] Ryu, E. K. *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (20), 6111–6119.
[2] Cruz-Correa, M. *et al. Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2006**, *4* (8), 1035–1038.
[3] Kondo, A. *et al. International Journal of Clinical Oncology* **2013**, *18*, 380–388.

Biodisponibilité et solutions proposées

➢ *Formulations galéniques et vectorisation*



- nano émulsions mucoadhésives [1]
  - distribution directe au SNC : voie intra-nasale
  - diminution de la clairance mucocilliaire
  - perméation plus importante avec ce système



CS : Curcumine seule
CNE : nanoE de curcumine
CMNE : nanoE Mucoadhésives

[1] Sood, S.; Jain, K. *et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *113*, 330–337.
[2] Khanji, A. N. *et al. Food and FunctionFunction* **2015**, doi : 10.1039/C5FO00829H.
[3] Yu, Y. *et al. Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3467–3479.

Biodisponibilité et solutions proposées

- *Formulations galéniques et vectorisation*

- nano emulsions mucohadédhésives [1]
  - distribution directe au SNC : voie intra-nasale
  - diminution de la clairance mucocilliaire
  - perméation plus importante avec ce système

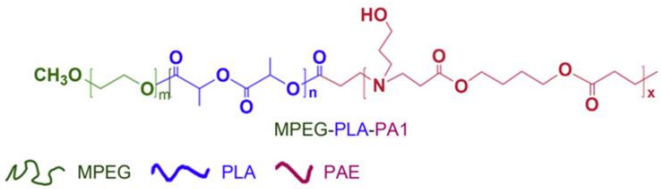
- micelles de caséines gélifiantes [2]
  - gélification en milieu acide
  - forme gastrorésistante pour relargage dudodénal
  - compatibilité du système avec la curcumine

[1] Sood, S.; Jain, K. *et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *113*, 330–337.
[2] Khanji, A. N. *et al. Food and Function* **2015**, doi : 10.1039/C5FO00829H.
[3] Yu, Y. *et al. Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3467–3479.

Biodisponibilité et solutions proposées

➢ *Formulations galéniques et vectorisation*

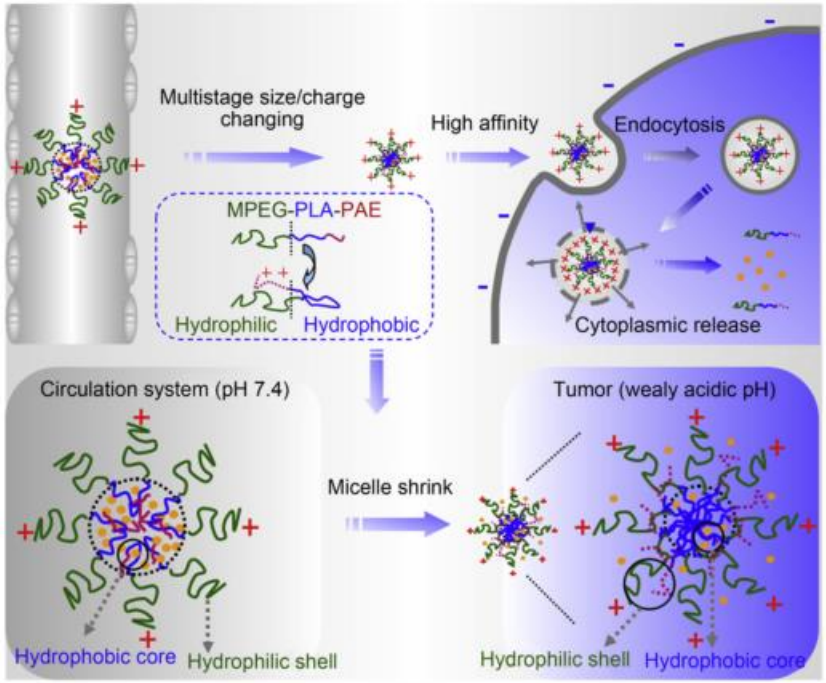
- nano emulsions mucohadédhésives [1]
  - distribution directe au SNC : voie intra-nasale
  - diminution de la clairance mucocilliaire
  - perméation plus importante avec ce système



unité micellaire MPEG-PLA-PAE

- micelles de caséines gélifiantes [2]
  - gélification en milieu acide
  - forme gastrorésistante pour relargage dudodénal
  - compatibilité du système avec la curcumine

- procédé innovant de relargage [3]
  - unité micellaire triphasique innovante
  - partie polyaminoester est « contractile »
  - évaluations *in vitro* et *in vivo*.



Système de contraction en milieu acide

[1] Sood, S.; Jain, K. *et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *113*, 330–337.
[2] Khanji, A. N. *et al. Food and Function* **2015**, doi : 10.1039/C5FO00829H.
[3] Yu, Y. *et al. Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3467–3479.

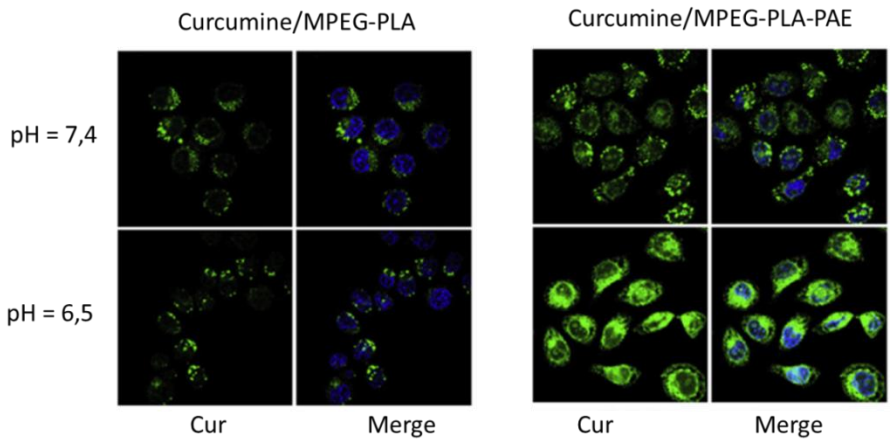
Biodisponibilité et solutions proposées

➢ *Formulations galéniques et vectorisation*

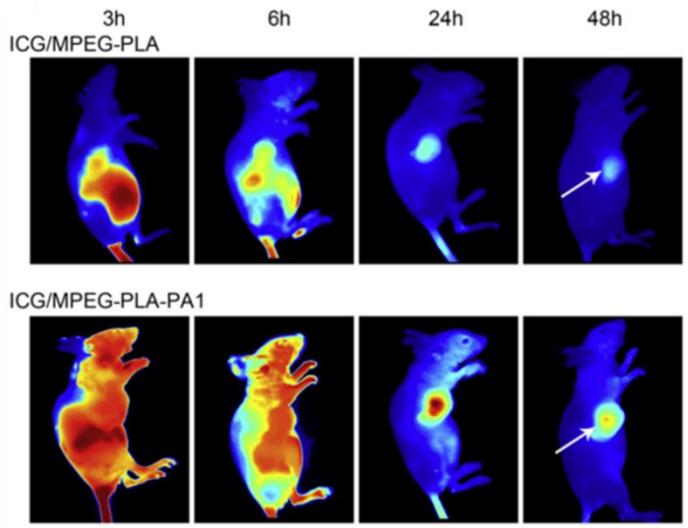
- nano emulsions mucohadédhésives [1]
  - distribution directe au SNC : voie intra-nasale
  - diminution de la clairance mucocilliaire
  - perméation plus importante avec ce système

- micelles de caséines gélifiantes [2]
  - gélification en milieu acide
  - forme gastrorésistante pour relargage dudodénal
  - compatibilité du système avec la curcumine

- procédé innovant de relargage [3]
  - unité micellaire triphasique innovante
  - partie polyaminoester est « contractile »
  - évaluations *in vitro* et *in vivo*.



Essais in vitro sur cellules HT-29



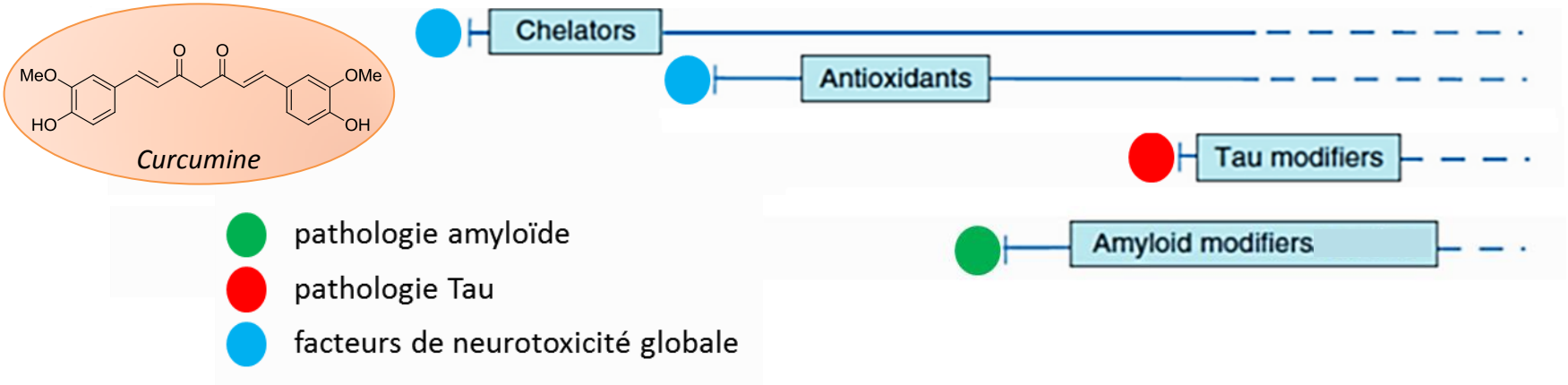
Essais in vivo sur des souris porteuses de tumeurs

[1] Sood, S.; Jain, K. *et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *113*, 330–337.
[2] Khanji, A. N. *et al. Food and FunctionFunction* **2015**, doi : 10.1039/C5FO00829H.
[3] Yu, Y. *et al. Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3467–3479.

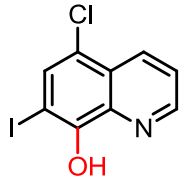
- *Autres moyens : conception d'analogues de la curcumine* : enjeux
  - *conserver ses propriétés intéressantes*
  - *s'affranchir des problèmes liés à sa stabilité/drugabilité*

Conception, Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Analogues de la Curcumine, Potentiels Agents Pléiotropes d'Intérêt Thérapeutique dans la Maladie d'Alzheimer.

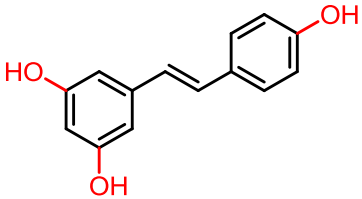
- *Genèse du projet et RSA de la Curcumine*



➢ *Propriétés des polyphénols*



Clioquinol, PBT1



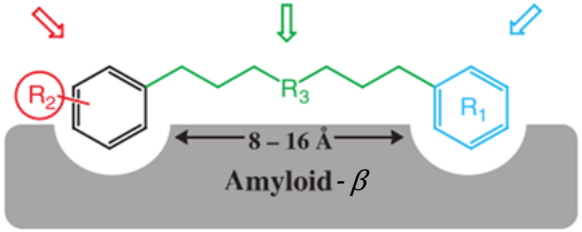
Resvératrol

➢ *Disposition des noyaux aromatiques satisfaisant aux règles de fixation au peptide Aβ*[1]

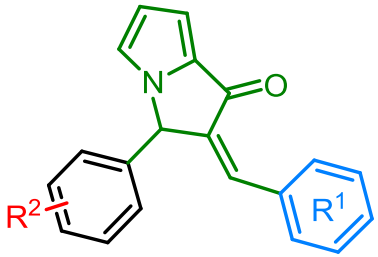
R_2 : groupement hydroxyle est nécessaire pour l'inhibition

R_3 : taille et flexibilité du linker – longueur du linker comprise entre 8 Å et 16 Å ; maximum de 2 liaisons de rotation libre C-C

R_1 : un deuxième groupement phényle est requis pour l'activité

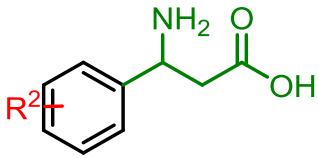


➢ *Conception de nouveaux analogues basée sur les RSA de la Curcumine*



Phénylbenzylidènepyrrolizinones

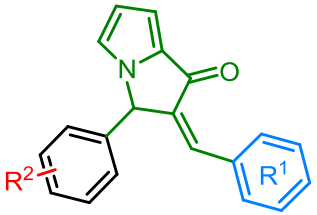
⇒



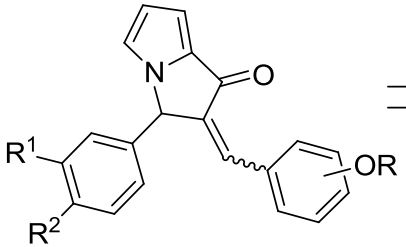
Acides β-aminoarylpropioniques [2]

[1] Reinke, A. A. ; Gestwicki, J. E. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, *70*, 206-215.
[2] Rochais, C. ; Rault, S. ; Dallemagne, P. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17 (35)*, 4342-4369.

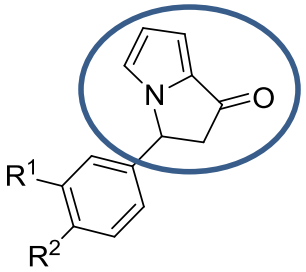
➢ *Synthèse en Série Phénylbenzylidènepyrrolizinone - PBP*



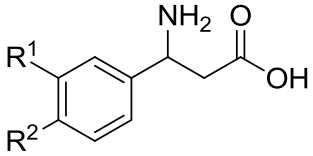
➢ *Accès rétrosynthétique*



phénylbenzylidènepyrrolizinones



phénylpyrrolizinones

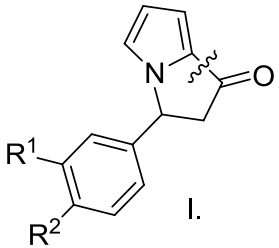


acide β-vanillinoaminopropionique R^1= OMe R^2= OH

acide β-isovanillinoaminopropionique R^1= OH R^2= OMe

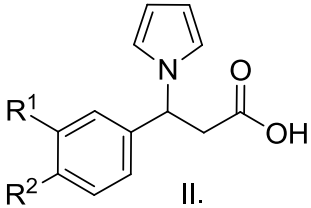
➢ série isovanilline et vanilline

➢ *Noyau hétérocyclique pyrrolizinone*



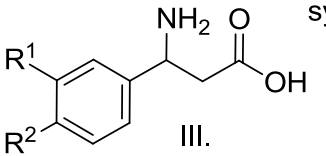
I.

cyclisation



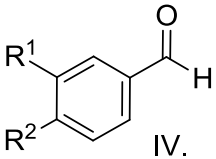
II.

synthèse pyrrolique



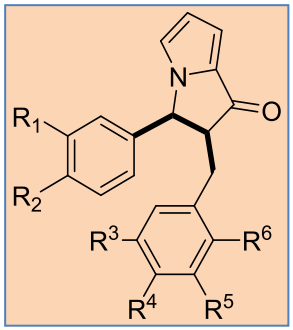
III.

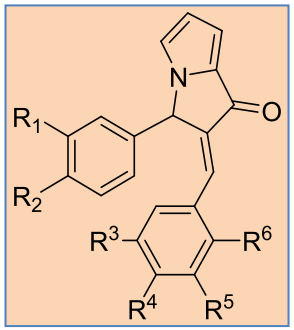
synthèse d'acide β–aminé



IV.

➢ *Synthèse de 22 composés*





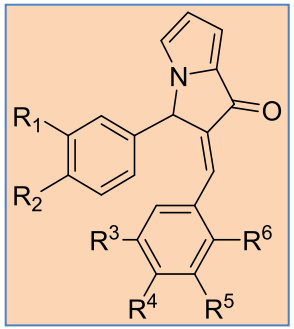
ACTIVITE NEUROPROTECTRICE
Inhibition de l'agrégation β-amyloïde
Pouvoir complexant métaux
Activité anti-radicaux libres
Protection des lipides membranaires

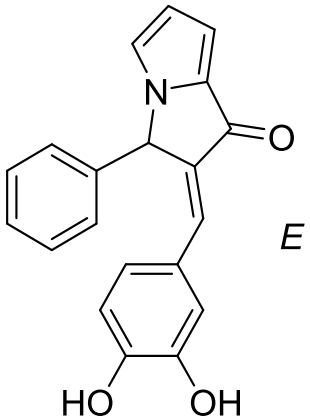
SECURITE D'EMPLOI
Profil de cytotoxicité

DRUGABILITE
Solubilité & Log P
Perméabilité membranaire BHE & BGI
Stabilité en solution

➢ *Evaluation de l'effet neuroprotecteur des PBPs*

- Inhibition directe de l'agrégation Aβ_{1-42}
- Interactions avec les métaux
- Activités antioxydantes
  - radical DPP·
  - peroxydation lipidique
  - radical NO·





Compd	**Inhibit° of Aβ_{1-42} aggreg° (%) [10 µM] n = 1, triplicate**	**DPPH test IC_{50} [µM] n = 3**	**NO scavenging activity (%) [40µM] n = 3**	**Lipid peroxidation (%) after 2 h [40µM] n = 3**	**Cu^{2+} complex activity**	
					Stoichiometry ($X:Cu^{2+}$)	**Kd**
Curcumin	68.9 ± 4.9	19.2 ± 3.3	60.4 ± 4.2	-		
Trolox	-	18.2 ± 1.6	-	-		
Ferulic acid	-	43.2 ± 3.3	46.4 ± 3.9	47.0 ± 1.7		
Quercetin	-	-	70.7 ± 4.5	-		
24	28.7 ± 3.3	12.6 ± 1.6	65.6 ± 2.2	57.0 ± 2.5	1:1	2.2

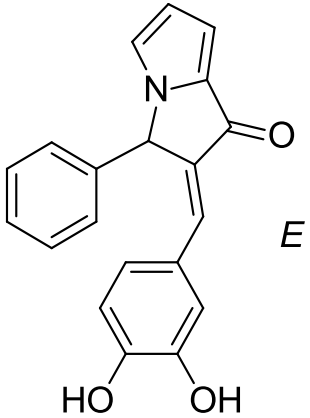
➢ *Evaluation de l'effet neuroprotecteur des PBPs*

- Inhibition directe de l'agrégation Aβ_{1-42}
- Interactions avec les métaux
- Activités antioxydantes
  - radical DPP·
  - peroxydation lipidique
  - radical NO·

➢ *Evaluation de la drugabilité des molécules synthétisées*

- Solubilité
- Perméabilité membranaire
- Log P et stabilité de certains produits
  - Log P
  - Stabilité
- Cytotoxicité

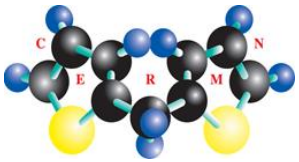
1



Compd	**Cytotoxicity Inhibition % at 10^{-5}M (KB cells) n = 3**	**-log Pe for PAMPA-BBB assay**	**-log Pe for PAMPA-GIT assay**	**Chemical stability at pH 7.4 : calculated half-life [hour]**
Curcumin	83 ± 1	4.6 ± 0.0	4.3 ± 0.2	n a
1	0 ± 3	4.1 ± 0.0	3.9 ± 0.0	No degradation

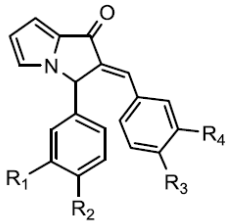
2012 - 2015

Interne en Pharmacie DES IPR,
Thèse d'Université spécialité *Pharmacochimie et Modélisation Moléculaire*,
CERMN, UFR Sciences Pharmaceutiques, UCBN
Pr Patrick DALLEMAGNE et Pr Christophe ROCHAIS tel. : 02.31.56.68.13



4 communications par affiches internationales 1 primée (RICT 2016) / 3 communications orales

Composés insaturés publiés en 2016 :



European Journal of Medicinal Chemistry 114 (2016) 365–379

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ejmech

Research paper

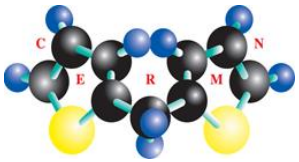
Novel benzylidenephenylpyrrolizinones with pleiotropic activities potentially useful in Alzheimer's disease treatment

Jean-Pierre Jourdan [a], Marc Since [a], Laïla El Kihel [a], Cédric Lecoutey [a], Sophie Corvaisier [a], Rémi Legay [a], Jana Sopkova-de Oliveira Santos [a], Thierry Cresteil [b], Aurélie Malzert-Fréon [a], Christophe Rochais [a, **], Patrick Dallemagne [a, *]

[a] Normandie Université, UNICAEN, CERMN (Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie), F-14032 Caen, France
[b] CIBLOT, IPSIT – IFR14, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290 Chatenay-Malabry, France

2012 - 2015

Interne en Pharmacie DES IPR,
Thèse d'Université spécialité *Pharmacochimie et Modélisation Moléculaire*,
CERMN, UFR Sciences Pharmaceutiques, UCBN
Pr Patrick DALLEMAGNE et Pr Christophe ROCHAIS tel. : 02.31.56.68.13



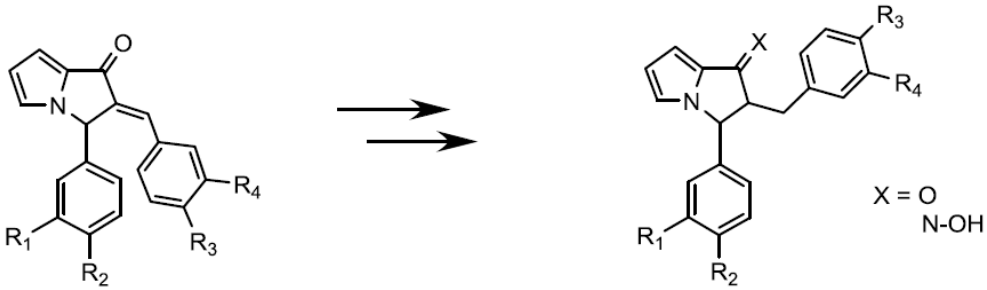
4 communications par affiches internationales 1 primée (RICT 2016) / 3 communications orales

Composés saturés soumise 2017 :

ChemMedChem

Benzylphenylpyrrolizinones with anti-amyloid and scavenging effects, potentially useful in Alzheimer's disease treatment.

--Manuscript Draft--



benzylidenephenylpyrrolizinones with antioxidant and amyloid aggregation inhibition properties

benzylidenephenylpyrrolizinones with enhanced properties

Merci

Rémi Legay
Sophie Corvaisier
Marc Since
Aurélie Malzert-Fréon
Laïla El Kihel
Jana Sopkova de Oliveira Santos
Faustine Siebert
Agnès Guillaumin

CM34 :
Directeurs de thèse :
Pr Patrick Dallemagne
Pr Christophe Rochais

Dr Cédric Lecoutey
Dr Julien Lalut

CIBLOT T. Cresteil

Inserm M. Moulin

LG2A
Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources

Thèse en poche
Les conférences santé de la BU

CURCUMA ET CURCUMINE, DE L'HISTOIRE AUX INTERETS THERAPEUTIQUES.

Merci de votre attention…

Mercredi 15 mars 2017

Dr. Jean-Pierre JOURDAN