



**HAL**  
open science

# Arnebia euchroma (Royle) I. M. Johnston, une plante à naphtoquinones : de la médecine traditionnelle à la recherche

Clément Trancart

► **To cite this version:**

Clément Trancart. Arnebia euchroma (Royle) I. M. Johnston, une plante à naphtoquinones : de la médecine traditionnelle à la recherche. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01233128

**HAL Id: dumas-01233128**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01233128>**

Submitted on 24 Nov 2015

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

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

**UNIVERSITE DE ROUEN**  
**UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE**

Année

2015

**THESE**  
**pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN**  
**PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 28/09/2015

par

Trancart Clément

Né le 08/07/1988 à Abbeville

***Arnebia euchroma* (Royle) I. M. Johnston, une**  
**plante à naphtoquinones : de la médecine**  
**traditionnelle à la recherche**

Président du jury : Seguin, Elisabeth, Professeur

Membres du jury : Groult, Marie-Laure, Maître de conférences  
en botanique

Arvis, Luc, Pharmacien

**L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent  
donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse.  
Ces opinions sont propres à leurs auteurs.**

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 - 2014**  
**U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Benoît VEBER**  
**Professeur Pascal JOLY**

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **M-P. AUGUSTIN – J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO – J. BORDE – P. BRASSEUR – R. COLIN – E. COMOY – J. DALION – DESHAYES – C. FESSARD – J-P. FILLASTRE - P FRIGOT – J. GARNIER – J. HEMET – B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J-M. JOUANY – R. LAUMONIER – P. LAURET – M. LE FUR – J-P. LEMERCIER – J-P. LEMOINE – H. MAGARD – B. MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – A-M. ORECCHIONI – P. PASQUIS – H. PIGUET – M. SAMSON – D. SAMSON-DOLLFUS – J-C. SCHRUB – R. SOYER – B. TARDIF-J. TESTART – J-M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L-M. WOLF**

<b>I - MEDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno <b>BACHY</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul <b>BESSOU</b>	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise <b>BEURET-BLANQUART</b> ( <i>surnombre</i> )	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Guy <b>BONMARCHAND</b>	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mr Jean-François <b>CAILLARD</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HB	Médecine interne (gériatrie)

Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Pierre <b>CZERNICHOW</b>	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Jean <b>DOUCET</b>	HB	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
Mr Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologie
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel <b>GODIN</b>	HB	Néphrologie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Philippe <b>GRISE</b>	HCN	Urologie
Mr Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - Vénérologie
Mr Jean-Marc <b>KUHN</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
Mr Eric <b>LEREBOURS</b>	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile

Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Francis <b>MICHOT</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Bruno <b>MIHOUT</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Neurologie
Mr Jean-François <b>MUIR</b>	HB	Pneumologie
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc <b>PERON</b>	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
Mr François <b>PROUST</b>	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>mise en dispo</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme. Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mme Florence <b>THIBAUT</b>	HCN	Psychiatrie d'adultes
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
Mr Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
Mr François <b>TRON</b> ( <i>surnombre</i> )	UFR	Immunologie

Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
Mr Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

#### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy <b>BELLIEN</b>	HCN	Pharmacologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b>	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François <b>MENARD</b>	HCN	Biophysique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mr Francis <b>ROUSSEL</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
M. Pierre-Hugues <b>VIVIER</b>	HCN	Imagerie Médicale

#### PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique <b>LANIEZ</b>	UFR	Anglais
Mme Cristina <b>BADULESCU</b>	UFR	Communication

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS

Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
Mr Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b>	Toxicologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX</b>	Physiologie
Mr Paul <b>MULDER</b>	Sciences du médicament
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique <b>BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mr Jean <b>CHASTANG</b>	Biomathématiques
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mr Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mr Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique

Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia <b>LE GOFF</b>	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

#### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mr Jean-François <b>HOUIVET</b>	Pharmacie officinale

#### **PROFESSEURS CONTRACTUELS**

Mme Elizabeth <b>DE PAOLIS</b>	Anglais
Mr Thierry <b>WABLE</b>	Communication

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

Mr Jérémie <b>MARTINET</b>	Immunologie
----------------------------	-------------

#### **ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mme Imane <b>EL MEOUCHE</b>	Microbiologie
Mme Juliette <b>GAUTIER</b>	Pharmacie galénique
Mr Romy <b>RAZAKANDRAINIBE</b>	Parasitologie

<b>LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES</b>
---

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
Mr Jean <b>CHASTANG</b>	Mathématiques
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mr Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacodynamie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mr Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX-NICOLLET</b>	Physiologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR

Mr Jean-Loup HERMIL UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Pierre FAINSILBER UFR Médecine générale

Mr Alain MERCIER UFR Médecine générale

Mr Philippe NGUYEN THANH UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Emmanuel LEFEBVRE UFR Médecine générale

Mme Elisabeth MAUVIARD UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse THUEUX UFR Médecine générale

### ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

#### PROFESSEURS

Mr Sergueï FETISSOV Physiologie (ADEN)

Mme Su RUAN Génie Informatique

#### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine CLEREN Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline GAILDRAT Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mme Isabelle TOURNIER Biochimie (UMR 1079)

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :** Mme Véronique DELAFONTAINE

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

# Table des matières

Introduction .....	1
1. <i>Arnebia euchroma</i> (Royle) I. M. Johnst. Boraginaceae: étude botanique.....	2
1.1. Classification .....	2
1.2. Description botanique .....	3
1.2.1. Caractères généraux de la famille des Boraginaceae .....	3
1.2.1.1. Appareil végétatif .....	3
1.2.1.2. Appareil reproducteur .....	4
1.2.2. Caractères généraux du genre <i>Arnebia</i> .....	5
1.2.2.1. Appareil végétatif .....	5
1.2.2.2. Appareil reproducteur .....	5
1.2.3. Caractéristiques d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	6
1.2.3.1. Appareil végétatif .....	6
1.2.3.2. Appareil reproducteur .....	7
1.3. Cycle d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	7
1.4. Répartition géographique.....	8
2. Usages traditionnels .....	10
2.1. Usage traditionnel en médecine chinoise .....	10
2.2. Usage traditionnel en Iran .....	10
2.3. Usage traditionnel en Inde .....	11
3. Etude chimique d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	13
3.1. Les molécules extraites d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	13
3.1.1. Les esters d'acides gras .....	13
3.1.2. Les glucides.....	13
3.1.3. Les terpènes.....	14
3.1.4. Les lignanes.....	15
3.1.5. Les alcaloïdes .....	16

3.1.6. Les polycétides .....	17
3.2. Les quinones .....	18
3.2.1. Les benzoquinones .....	18
3.2.2. Les hydroquinones .....	19
3.2.3. Les naphtoquinones, les métabolites secondaires majeurs d' <i>Arnebia euchroma</i> 20	
3.2.3.1. La structure commune des shikonines et des alkannines .....	22
3.2.3.2. L'alkannine .....	22
3.2.3.3. La shikonine .....	23
3.2.3.4. Les esters de shikonine et d'alkannine.....	24
3.3. La biosynthèse de la shikonine et de ses dérivés .....	28
4. La production de naphtoquinones .....	31
4.1. L'extraction à partir d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	31
4.2. La production de naphtoquinones à partir de cultures cellulaires .....	32
4.2.1. La génération du cal et la culture cellulaire .....	33
4.2.2. L'influence du milieu d'incubation des cellules .....	34
4.2.3. L'extraction des naphtoquinones .....	36
4.3. Synthèse totale .....	37
4.3.1 Synthèse non stéréo-sélective .....	37
4.3.2. Synthèse stéréosélective.....	38
5. Etude pharmacologique .....	40
5.1. Propriétés anti-inflammatoires.....	40
5.1.1. L'arthrite .....	41
5.1.2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	42
5.1.3. Shikonine et lupus néphritique.....	43
5.2. Propriétés anti-oxydantes .....	43
5.3. Propriétés anti-bactériennes .....	44
5.4. Propriétés anti-fongiques .....	46

5.5. Propriétés anti-parasitaires.....	47
5.6. Propriétés anti virales.....	48
5.7. Cicatrisation.....	49
5.8. Métabolisme du glucose .....	51
5.9. Effet sur l'adipogenèse.....	52
5.10. Effets sur l'agrégation plaquettaire.....	52
5.11. Propriétés cardio-vasculaires .....	53
5.12. Propriétés anti-tumorales .....	54
5.13. Propriétés neuro-protectrices .....	65
5.14. Propriétés abortives.....	66
5.15. Propriétés diverses .....	66
5.16. Toxicité .....	68
Conclusion.....	70
Bibliographie : .....	71
Sitographie:.....	81
SERMENT DE GALIEN .....	82

## Index des illustrations

Illustration 1: <i>Arnebia euchroma</i> (Kumar <i>et al.</i> , 2011) A: parties aériennes B: racine .....	2
Illustration 2: Diagramme floral des fleurs des plantes de la famille des Boraginaceae (Anonyme).....	4
Figure 3: Planche descriptive d' <i>Arnebia euchroma</i> (1) .....	6
Figure 4: Carte de distribution d' <i>Arnebia euchroma</i> (1) .....	8
Illustration 5: 9-(2',5'-dihydroxyphényl)-nonanoate d'éthyle.....	13
Illustration 6: fêrulate d'octyle .....	13
Illustration 7: arnebinol .....	14
Illustration 8: acide 2 $\alpha$ -hydroxyursolique .....	14
Illustration 9: acide tormentique.....	14
Illustration 10: 9,17-époxyarnebinol .....	15
Illustration 11: rabdosiine .....	15
Illustration 12: isomère de la rabdosiine isolé par Kashiwada .....	16
Illustration 13: pyrrolizidine.....	16
Illustration 14: O-7-angéloylrétronécine .....	17
Illustration 15: O-9 angéloylrétronécine .....	17
Illustration 16: des-O-méthyllasiodiplodine.....	17
Illustration 17: 1,4-benzoquinone.....	18
Illustration 18: arnébifuranone, .....	19
Illustration 19: arnébinone.....	19
Illustration 20: benzène-1,4-diol .....	19
Illustration 21: shikonofurane A.....	19
Illustration 22: euchroquinol A.....	20
Illustration 23: euchroquinol B.....	20
Illustration 24: euchroquinol C.....	20
Illustration 25: naphtoquinone.....	20

Illustration 26: naphthazarine .....	21
Illustration 27: Structure de base des dérivés de la shikonine et de l'alkannine .....	22
Figure 28: alkannine .....	22
Figure 29: shikonine .....	23
Illustration 30: Structure de la shikonine attribuée par Majima en 1922 .....	23
Illustration 31: Schéma de la biosynthèse des précurseurs de la shikonine (Singh <i>et al.</i> , 2010).....	29
Illustration 32: Tableau comparatif des rendements de l'extraction de shikonine à partir d' <i>Arnebia euchroma</i> en utilisant différentes méthodes (Liu <i>et al.</i> , 2013) a:extraction en milieu homogène b:extraction par macération, c:extraction par ultrasons, d:extraction par CO2 supercritique, e:extraction par micro-ondes, f: extraction par reflux de chaleur .....	32
Illustration 33: Effet de la température d'incubation sur la production de dérivés de la shikonine par une culture cellulaire d' <i>Arnebia euchroma</i> (Malik <i>et al.</i> , 2011) .....	35
Illustration 34: Effet du pH sur la croissance cellulaire et la production de shikonine par les cellules d' <i>Arnebia euchroma</i> (Malik <i>et al.</i> ,2011) .....	35
Illustration 35: Schéma de la synthèse de shikalkine réalisée par Terada <i>et al.</i> en 1983 ....	38
Illustration 36: Synthèse de la shikonine par Wang .....	39

## Index des tables

Tableau 1: Distribution des différentes sous-espèces et variétés d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	9
Tableau 2: formule des dérivés d'alkannine et de shikonine isolés à partir d' <i>Arnebia euchroma</i> .....	28
Tableau 3: Influence des facteurs de croissance sur l'induction de cal d' <i>Arnebia euchroma</i> (Manjkhola <i>et al.</i> , 2005) .....	33
Tableau 4: zone d'inhibition de croissance (cm) de naphtoquinones isolées d' <i>Arnebia euchroma</i> sur différents types de bactéries.....	45
Tableau 5: Activité antifongique (CMI) de la shikonine et de différents dérivés de la shikonine (Sasaki <i>et al.</i> , 2002).....	47
Tableau 6: Inhibition de l'agrégation plaquettaire par la shikonine et ses dérivés ( Ko <i>et al.</i> , 1995).....	52
Tableau 7: DL50 de différents dérivés de la shikonine/alkannine chez les souris ( Papageorgiou <i>et al.</i> , 1999).....	69

## Introduction

La racine d'*Arnebia euchroma* fait partie de la liste A des plantes médicinales de la pharmacopée française publiée par l'ANSM en 2015 et y est répertoriée comme une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise. Cette plante est utilisée depuis longtemps dans différents types de médecine traditionnelle en Asie, en particulier en Chine, en Iran et en Inde.

De nombreux travaux scientifiques ont été publiés sur cette plante en raison de son usage en médecine traditionnelle. Les recherches sur la composition chimique de la plante ont conduit à l'isolement de plusieurs molécules à intérêt thérapeutique. Le potentiel thérapeutique de cette plante ainsi que des molécules qui en ont été isolées a conduit au dépôt de plusieurs brevets.

Dans ce travail seront présentés successivement l'étude botanique d'*Arnebia euchroma*, son étude chimique et l'étude pharmacologique des métabolites secondaires les plus importants de la plante, les dérivés de la shikonine et de l'alkannine.

1. *Arnebia euchroma* (Royle) I. M. Johnst. Boraginaceae: étude botanique



Illustration 1: *Arnebia euchroma* (Kumar et al., 2011) A: parties aériennes B: racine

1.1. Classification

Le nom actuellement accepté de la plante est *Arnebia euchroma* (Royle) I. M. Johnst. (Johnston, 1924). La classification de la plante selon la classification phylogénétique APG III (Angiosperms Phylogeny Group) est :

- Clade : Astéridae
- Sous-clade : Lamiidaes ou Eu-Asteridae I
- Famille : Boraginaceae
- Sous-famille : Boraginoidae
- Tribu : Lithospermae
- Genre : *Arnebia*
- Espèce : *Arnebia euchroma* (Royle) I.M. Johnst.

Il existe différentes sous-espèces :

- Arnebia euchroma* subsp.*andarabica* F. Sadat
- *Arnebia euchroma* subsp.*afghanica* F. Sadat
- *Arnebia euchroma* subsp.*caespitosa* Rech.fil.& H. Riedl
- Arnebia euchroma* var.*grandis* (Bornm.) Kazmi

*Arnebia euchroma* (Royle) I.M. Johnston a été identifiée la première fois par J.Forbes Royle en 1839 sous le nom de *Lithospermum euchromon* et les espèces suivantes sont acceptées comme synonymes d'*Arnebia euchroma* :

- Arnebia endochroma* Aitch
- Arnebia perennis* (Schrenk) A.DC.
- Arnebia tingens* A.DC.
- Lithospermum cyanochroum* Boiss.
- Macrotomia cyanochroa* (Boiss.) Boiss.
- Macrotomia endochroma* Hook. f. & Thomson ex G. Hend. & Hume
- Macrotomia euchroma* (Royle) Paulsen
- Macrotomia onosmoides* Regel et Smirnow
- Macrotomia perennis* Boiss.

*Arnebia euchroma* var. *grandis* a pour synonymes *Arnebia euchroma* subsp. *grandis* (Bornm.) H.Riedl et *Macrotomia grandis* Bornm. et *Arnebia euchroma* subsp. *caespitosa* a pour synonyme *Macrotomia oginoi* Kitam.

## 1.2. Description botanique

### 1.2.1. Caractères généraux de la famille des Boraginaceae

#### 1.2.1.1. Appareil végétatif

Les Boraginaceae sont principalement composées d'herbes annuelles ou vivaces par un rhizome. Il existe également certaines espèces d'arbrisseaux, d'arbres et de lianes dans les régions tropicales. Les feuilles ne sont pas stipulées et sont en général alternes et simples. On observe des poils à parois souvent calcifiées ou silicifiées et renfermant un cystolithe à leur base (Ge-ling *et al.*, 1995).

#### 1.2.1.2. Appareil reproducteur

L'inflorescence est en général en cyme scorpioïde.

Le périanthe est formé d'un calice de 5 sépales, soudés en une corolle pouvant être rotacée, tubuleuse, campanulée ou zygomorphe. Le tube de la corolle peut présenter des appendices ligulaires formant une couronne interne ou réduits à des poils.

L'androcée est isostémone, avec 5 étamines soudées au tube de la corolle. Les anthères s'ouvrent par des fentes longitudinales.

Le gynécée comporte 2 carpelles soudés en un ovaire supère, mais celui-ci présente 4 lobes correspondant à 4 loges issues de la formation d'une fausse cloison. Le style est souvent gynobasique. Chaque loge contient un ovule en placentation axile, unitégumenté et tenuinucellé. Cependant, chez les Hydrophyllaceae, il n'y a pas de fausse cloison, l'ovaire est uniloculaire et la placentation pariétale avec des placentas intrusifs portant de nombreux ovules. La formule florale est  $5S+5P+5E+2C$ .

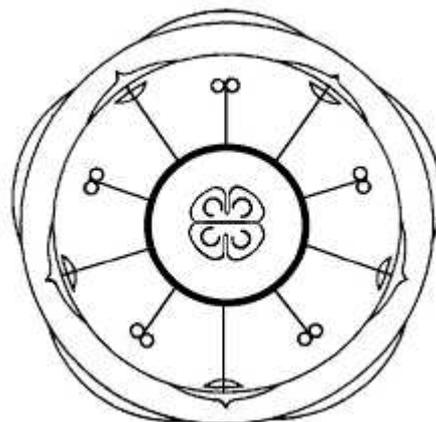


Illustration 2: Diagramme floral des fleurs des plantes de la famille des Boraginaceae (Anonyme)

Le fruit est souvent un fruit schizocarpe à 4 nucules uniséminées formant un tétrakène. Souvent, une portion de réceptacle lui reste adhérente, et forme un élaïsome favorisant la dissémination du fruit par les fourmis. Mais le fruit peut être également une drupe qui présente soit 1 noyau tétraséminé, soit 2 noyaux biséminés, soit 4 noyaux uniséminés (Ge-ling *et al.*, 1995).

### 1.2.2. Caractères généraux du genre *Arnebia*

Le genre *Arnebia* comprend 40 espèces acceptées.

#### 1.2.2.1. Appareil végétatif

La racine contient souvent un pigment pourpre. La tige peut être dressée ou couchée. Les feuilles sont alternes.

#### 1.2.2.2. Appareil reproducteur

L'inflorescence est en cyme. Les fleurs sont souvent hétérostyles.

Le calice est souvent pentamère.

La corolle est de forme campanulée formant un tube droit ou courbé. Les pétales présentent des poils sur leur face externe. La gorge de la corolle ne présente pas d'appendice. Les franges de la corolle sont plus courtes que le tube.

L'ovaire possède 4 loges.

Le style peut comporter 2 ou 4 branches. Chaque branche se termine par un stigmate.

Le gynobase est plat.

Les fleurs à longs styles possèdent des étamines incluses s'insérant au milieu du tube de la corolle. Dans les fleurs à styles courts les étamines sont insérées à la gorge de la corolle. Les styles arrivent jusqu'au milieu du tube.

Le fruit est une nucule ovale.

### 1.2.3. Caractéristiques d'*Arnebia euchroma*

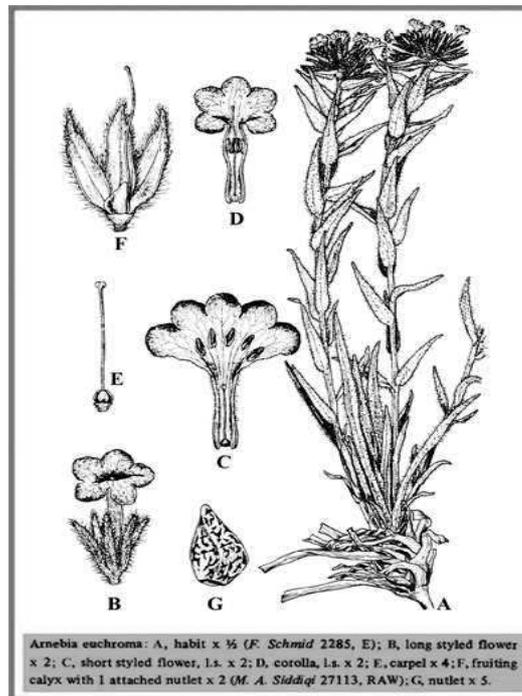


Figure 3: Plaque descriptive d'*Arnebia euchroma* (1)

#### 1.2.3.1. Appareil végétatif

*Arnebia euchroma* est une plante herbacée vivace mesurant entre 20 et 40 cm possédant des fleurs dont la couleur varie du jaune au violet.

La racine a un diamètre de 2 cm environ et contient un pigment pourpre. Il y a en général une ou deux tiges à feuilles engainantes. Les tiges sont dressées et mesurent entre 15 et 40 cm de haut, hirsutes avec des poils blancs à jaune clair mesurant jusqu'à 2 mm.

Les feuilles sont sessiles, hirsutes, alternes, hétérophylles. Les feuilles basales sont linéaires à linéaires-lancéolées avec une base engainante et mesurent de 7 à 20 cm de longueur et de 0,5 à 1,5 cm de largeur avec un apex acuminé.

Les feuilles caulinaires sont plus petites et n'ont pas de base engainante. Les nervures sont imprimées sur la face supérieure et proéminentes sur la face inférieure de la feuille.

### 1.2.3.2. Appareil reproducteur

L'inflorescence est en cyme terminale de 2 à 6 cm à l'anthèse. Les bractées sont lancéolées. Le calice comporte cinq sépales linéaires mesurant de 1,2 à 1,6 cm de long et pouvant mesurer jusqu'à 3 cm quand ils recouvrent le fruit. Ils présentent des poils jaune pâle sur les deux faces. Ils possèdent un apex subaigu.

La corolle est tubulaire et campanulée, de 9 à 17 mm de longueur et de 10 à 15 mm de diamètre. Le tube droit mesure de 1 à 1,4 cm et les 5 pétales se déployant dans la partie distale peuvent mesurer de 6 à 10 mm et sont de forme ovale. Leur couleur varie du violet au jaune, ponctué de taches violettes avec parfois des poils sur la face externe.

Les anthères sont linéaires, de 2,4 à 3 mm de long. Elles sont situées près de l'extrémité du tube ou au milieu.

Le gynécée présente un style bifide à son extrémité mesurant de 8 à 12,5 mm ainsi que deux stigmates ovales et allongés.

Le fruit est un tétrakène ovoïde d'environ 3,5 mm de long et 3 mm de large. La surface du fruit est réticulée et présente quelques excroissances. Le fruit est presque plat avec une ligne centrale proéminente sur le dessus alors que la face inférieure est convexe. L'apex est subaigu et la cicatrice d'attachement est triangulaire (Ge-ling *et al.*, 1995).

### 1.3. Cycle d'*Arnebia euchroma*

*Arnebia euchroma* est une plante vivace. Les bourgeons apparaissent au début de la fonte des neiges. L'ouverture de la fleur commence au mois de juillet et le processus de pollinisation dure jusqu'à la fin du mois de septembre. Les parties aériennes commencent ensuite à s'assécher. Il ne reste plus que les inflorescences contenant les graines matures jusqu'à la fin du mois d'octobre et les parties aériennes sont complètement desséchées au début du mois de novembre (Singh *et al.*, 2012).

#### 1.4. Répartition géographique



Figure 4: Carte de distribution d'*Arnebia euchroma* (1)

*Arnebia euchroma* pousse au niveau des régions montagneuses d'Asie entre 2500 et 4500 m d'altitude dans des zones de prairies ainsi que sur des pentes rocheuses. On retrouve *Arnebia euchroma* en Chine dans la région de Xinjiang et de Xizang (région autonome du Tibet). En Inde, la plante pousse dans les régions du Jammu-et-Cachemire, de l'Himashal Pradesh et de l'Uttarakand dans la zone-trans-himalayenne. Au Pakistan (Eberhardt *et al.*, 2007) on retrouve *Arnebia euchroma* au niveau de la chaîne montagneuse du Karakoram entre 2600 et 3900 mètres d'altitude dans la vallée de Batura (zone de steppe montagneuse) ainsi qu'au niveau de l'Hindou-Koush dans la région de Swat. En Iran, *Arnebia euchroma* est retrouvée dans la chaîne de montagnes de Zagros ainsi que sur la montagne d'Hezar dans les zones rocheuses situées entre 3600 et 4000 mètres d'altitude (Rajaei *et al.*, 2011). *Arnebia euchroma* est également présente au Tadjikistan et en Afghanistan dans les montagnes du Pamir. On retrouve également la plante en Sibérie, au Kazakhstan, au Népal, au Tibet, au Turkestan, au Kyrgyzstan et en Ouzbékistan.

Pays	Zones/Régions	Noms locaux	Sous-espèces
Turkestan			<i>euchroma</i>

Chine	XinJiang, Xizang	Xin jang zia zi cao, Ruan zi cao, Zi Cao	<i>euchroma</i>
Tibet		'Bri mag	<i>euchroma</i>
Iran	Hézar, Zagros	Havachue, Ho'e-Cho'e, Heveh Ghoach Sorkh Giah, Sorya	<i>euchroma, grandis</i>
Inde	Himashal Pradesh, Uttarakand, Jammu et Cachemire	Demock, Aambokh, Khamed, Balchari, Ratanjot, Lalmundi	<i>euchroma</i>
Tadjikistan	Pamir	Xipexk	<i>euchroma</i>
Népal			<i>euchroma</i>
Kazakhstan			<i>euchroma</i>
Ouzbékistan			<i>euchroma</i>
Afghanistan	Pamir	Xipexk	<i>afghanica, andarabica, caespitosa, euchroma, grandis</i>
Pakistan	Karakorum, Hindou Koush	Phosuk	<i>caespitosa, euchroma</i>
Kyrgyztan			<i>euchroma</i>

Tableau 1: Distribution des différentes sous-espèces et variétés d'*Arnebia euchroma*

## 2. Usages traditionnels

### 2.1. Usage traditionnel en médecine chinoise

En Chine, *Arnebia euchroma* est nommée xin zang jia zi cao et est une des sources du remède traditionnel nommé Zi cao avec *Lithospermum erythrorizon* et *Arnebia guttata*. Traditionnellement le Zi Cao est tiré de la racine de *Lithospermum erythrorizon*, cependant dans la région de Xinjiang, une des principales régions productrices de Zi Cao, *Arnebia euchroma* lui est substituée. Pour la préparation de Zi Cao, la racine d'*Arnebia euchroma* est séchée au soleil puis humidifiée pour être ensuite découpée en lamelles. Selon la théorie chinoise, Zi Cao est de nature froide, de saveur douce et salée et affecte les méridiens du cœur et du foie. Zi cao permet de rafraîchir le sang, de dissiper la chaleur, d'humidifier les intestins et de relâcher les éruptions cutanées. Cependant la théorie chinoise contre-indique l'usage de Zi cao en cas de diarrhée et de déficit de la rate.

En cas de rougeole accompagnée de chaleur toxique excessive dans le système du xue (Sang) ou de maladie fébrile avec arrêt de l'éruption cutanée, Zi Cao peut être utilisé en décoction associé à periostracum *Cicadae*, radix *Paeonia rubra* et fructus *Forsythiae*.

Pour l'hématémèse et l'épistaxis causés par la chaleur du sang et l'infection urinaire compliquée d'hématurie, le Zi Cao est combiné à radix *Rehmanniae*, herba *Cirsii* et rhizome *Imperatae*.

En cas d'infection et d'ulcères cutanés chroniques, de prurit vulvaire, d'eczéma, de gale ou de brûlure, Zi cao est utilisé associé à radix *Angelicae sinensis*, sanguis *Draconis* (Xue Jie) et radix *Angelica dahurica* sous forme de pommade ou de crème (Chen, 2010).

### 2.2. Usage traditionnel en Iran

Dans son canon de la médecine, Avicenne mentionne *Arnebia euchroma* sous le nom de Abu Khalsa. Il indique que le tempérament de la plante est chaud et sec selon Galien mais que

certaines médecins lui accordaient à cette époque les propriétés inverses (Aliasl et Khoshzaban, 2013). Dans l'ouvrage, il est écrit que la plante est utilisée en usage externe mélangée avec de la cire et de l'huile d'olive comme cicatrisant, en particulier pour les brûlures. De nos jours, *Arnebia euchroma* est connue en Iran sous les noms de Havachue, Ho'e-Cho'e, Heveh Ghoah ou Sorkh Giah selon la région. La tribu Bakhtyari, une tribu nomade du sud-ouest iranien, utilise la racine d'*Arnebia euchroma*, sous l'appellation vernaculaire de Sorya, mélangée à de la graisse de chèvre comme traitement pour les brûlures. La tribu utilise également la plante contre l'eczéma, et les infections cutanées (Pirbalouti *et al.*, 2011). Dans la région montagneuse de l'Hezar, *Arnebia euchroma* est utilisée par la population locale sous forme de cataplasme pour améliorer la cicatrisation, ainsi que pour les contusions et les fractures. *Arnebia euchroma* est également utilisée pour les maladies du foie et de la rate ainsi que pour la diarrhée.

### 2.3. Usage traditionnel en Inde

En Inde, *Arnebia euchroma* est connue sous plusieurs noms selon la région. Dans la région du Ladakh, elle est appelée Demock ou Aambokh. Les habitants de l'Himachal Pradesh la connaissent sous le nom de Khamed. Elle est connue sous le nom de Balchari dans la région de l'Uttarakand. La racine de la plante peut être trouvée sous le nom de Ratanjot, une racine utilisée en médecine Ayurvédique contenant un pigment rouge mais dont la source originelle n'est pas clairement définie.

La racine est utilisée pour le pigment qu'elle contient. Il est extrait en faisant macérer la racine dans de l'huile de moutarde ou du ghee. *Arnebia euchroma* est surtout utilisée dans les régions du nord de l'Inde, dans les zones himalayennes où le système de médecine traditionnelle est celui des Hamchi, originaires du Tibet et regroupant des influences des médecines traditionnelles chinoise, indienne et perse. Dans le Jammu et Cachemire, la racine d'*Arnebia euchroma* est utilisée en association avec d'autres plantes pour les inflammations et les saignements de l'appareil urinaire. L'extrait de racine fraîche est utilisé pour les douleurs dorsales et les pathologies pulmonaires, pour purifier le sang, comme antiseptique ainsi que comme stimulant intellectuel. De plus *Arnebia euchroma* est utilisée par les habitants de la vallée du Paddar et par ceux de la partie désertique de l'Himashal Pradesh pour les coupures, les maladies des yeux, les otites, les douleurs dentaires et les manifestations fébriles. L'extrait

de racine et la poudre de feuille sont utilisés pour soigner la toux. L'extrait de racine avec l'huile de moutarde est utilisé comme antipelliculaire (Gairola *et al.*, 2014).

### 3. Etude chimique d'*Arnebia euchroma*

En raison de ses propriétés, *Arnebia euchroma* a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques pour essayer de corréler les activités en médecines traditionnelles avec la présence de certains composants. Ces études ont conduit à l'extraction de plusieurs molécules.

#### 3.1. Les molécules extraites d'*Arnebia euchroma*

##### 3.1.1. Les esters d'acides gras

En 2010, Liu *et al.* ont isolé à partir de l'extrait éthanolique de racine d'*Arnebia euchroma* le 9-(2',5'-dihydroxyphényl)-nonanoate d'éthyle et le férulate d'octyle.

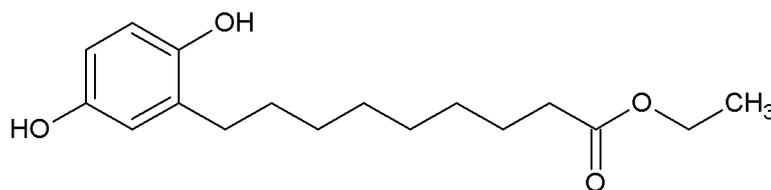


Illustration 5: 9-(2',5'-dihydroxyphényl)-nonanoate d'éthyle

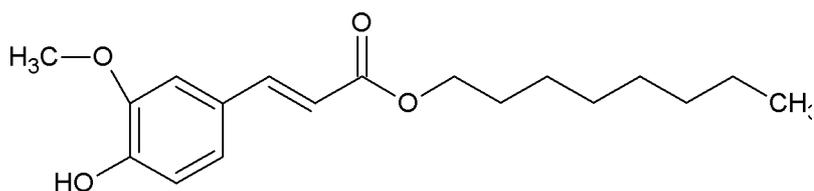


Illustration 6: férulate d'octyle

##### 3.1.2. Les glucides

En 2008, Deng *et al.* ont extrait un mélange de deux glycosaminoglycanes à partir d'*Arnebia euchroma*. Ils ont caractérisé ces deux glycosaminoglycanes, c'est à dire des polymères de

dissaccharides contenant un glucide contenant une fonction amide, par leur masse moléculaire de 27336 et 1152 mais ne les ont pas nommés.

### 3.1.3. Les terpènes

Les terpènes sont des composés naturels dont la structure chimique correspond à l'assemblage de plusieurs unités isoprènes. Les terpénoïdes reprennent la structure de base des terpènes à laquelle s'ajoutent d'autres groupements.

En 1983, Yao *et al.* ont isolé et identifié l'arnebinol, un monoterpénylbenzène de type ansa.

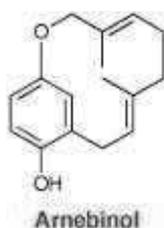


Illustration 7:  
arnebinol

En 1992, Yang *et al.* ont isolé et identifié deux acides triterpéniques, l'acide tormentique et l'acide 2 $\alpha$ -hydroxyursolique à partir d'*Arnebia euchroma*.

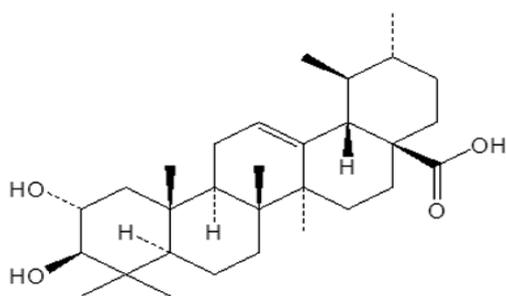


Illustration 8: acide 2 $\alpha$ -  
hydroxyursolique

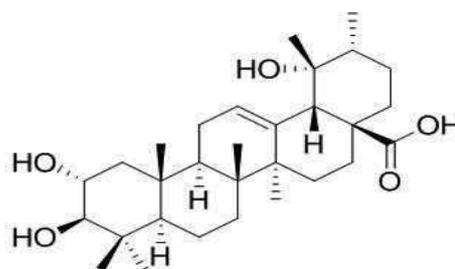


Illustration 9: acide tormentique

En 2012, Li *et al.* ont isolé un dérivé de l'arnebinol, le 9,17-époxyarnebinol.

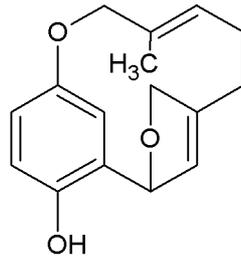


Illustration 10:  
9,17-époxyarnebinol

### 3.1.4. Les lignanes

Les lignanes sont des molécules dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropanoïques.

En 1995, Kashiwada *et al.* ont isolé deux lignanes à partir de l'extrait par l'acétone aqueuse d'*Arnebia euchroma*, la radosiine et son isomère sous forme de sels de potassium et de sodium.

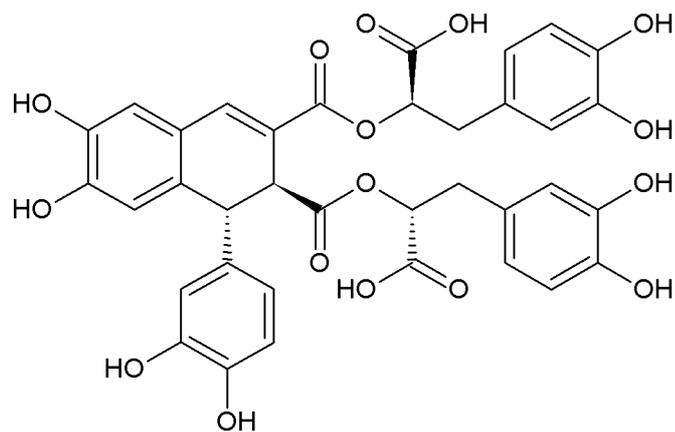


Illustration 11: radosiine

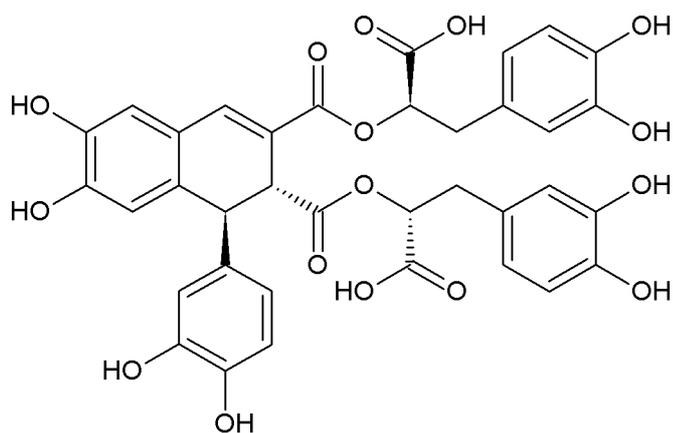


Illustration 12: isomère de la rabdosiine isolé par Kashiwada

### 3.1.5. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules naturelles azotées. Ils sont classés en fonction de leur noyaux azoté. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques comportent un cycle pyrrolizidine qui est formé par la fusion de deux cycles à 5 carbone avec un atome d'azote à la jonction entre les deux.

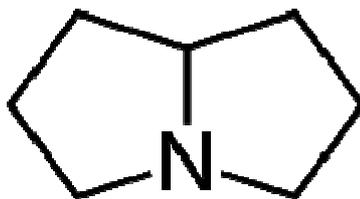


Illustration 13: pyrrolizidine

En 1993, Roëder *et al.* ont isolé deux alcaloïdes pyrrolizidiniques de la racine d'*Arnebia euchroma*, la O-7-angéloylrétronécine et la O-9-angéloylrétronécine.

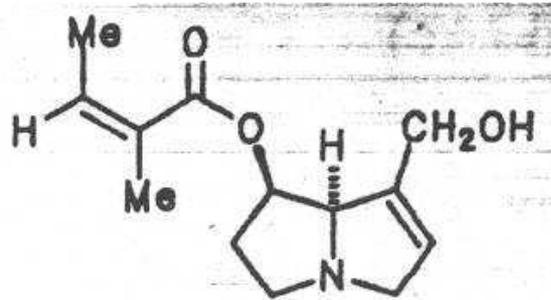


Illustration 14: O-7-angéloylrétronécine

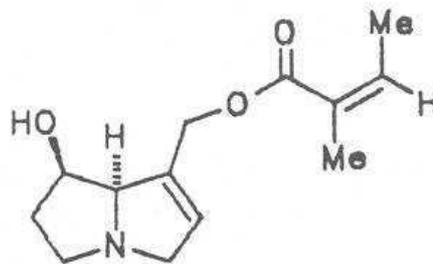


Illustration 15:  
O-9 angéloylrétronécine

### 3.1.6. Les polycétides

Les polycétides sont des lipides provenant de l'assemblage de groupements acétyl ou propionyl par la polycétide synthase.

En 1991, Yao *et al.* ont isolé la des-O-méthyllasiodiplodine à partir d'*Arnebia euchroma*.

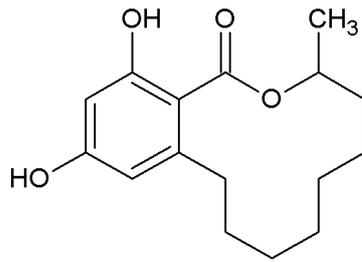


Illustration 16: des-O-méthyllasiodiplodine

### 3.2. Les quinones

Les quinones sont des composés comportant un noyau benzène dont deux hydrogènes sont remplacés par deux atomes d'oxygène formant des liaisons carbonyle. De nombreuses molécules comportant cette structure ont été isolées à partir d'*Arnebia euchroma*. Les quinones trouvées dans *Arnebia euchroma* peuvent être divisées en trois catégories : les benzoquinones, les hydroquinones et les naphthoquinones.

#### 3.2.1. Les benzoquinones

Les benzoquinones sont les composés de base de la famille des quinones. Il existe deux types de benzoquinones, les dérivés de la 1,2-benzoquinone et ceux de la 1,4-benzoquinone.

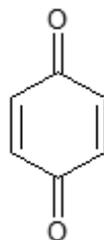


Illustration 17:  
1,4-benzoquinone

En 1984, Yao *et al.* ont isolé l'arnébifuranone à partir de l'extrait méthanolique d'*Arnebia euchroma*.

En 1991, Yao *et al.* ont isolé l'arnebinone, une monoterpénylbenzoquinone, à partir des

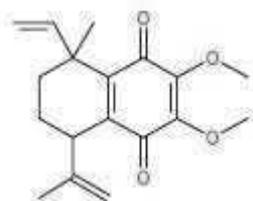


Illustration 19:  
arnebinone

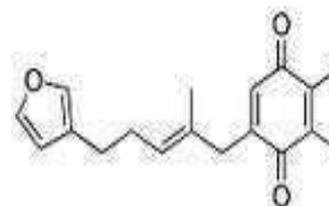


Illustration 18:  
arnébifuranone,

racines d'*Arnebia euchroma*.

### 3.2.2. Les hydroquinones

Les hydroquinones sont les dérivés du benzène-1,4-diol.

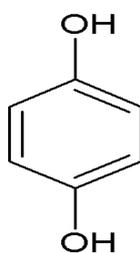


Illustration 20:  
benzène-1,4-diol

En 1984, Yao *et al.* ont isolé le shikonofurane A en procédant à plusieurs fractionnements à partir de l'extrait méthanolique d'*Arnebia euchroma*.

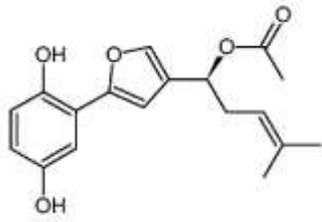


Illustration 21: shikonofurane A

En 2012, Li *et al.* ont rapporté l'extraction de trois nouveaux composés possédant un squelette de type benzogeijerene qu'ils ont nommé euchroquinols A,B et C.

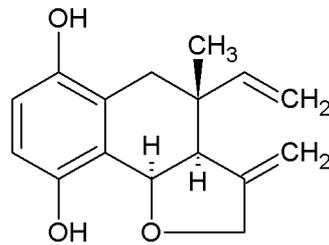


Illustration 22:  
euchroquinol A

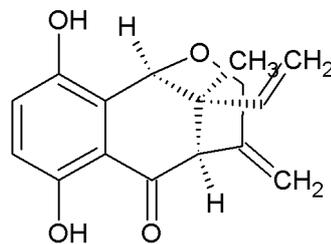


Illustration 23:  
euchroquinol B

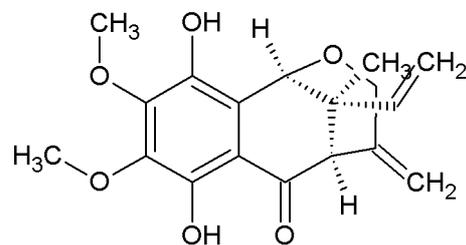


Illustration 24:euchroquinol C

### 3.2.3. Les naphtoquinones, les métabolites secondaires majeurs d'*Arnebia euchroma*

Les naphtoquinones sont des quinones dérivées du naphthalène.

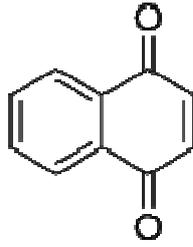


Illustration 25:  
naphthoquinone

La naphthoquinone est la structure de base de nombreuses molécules isolées à partir d'*Arnebia euchroma*. Nous verrons en particulier les molécules de la famille des shikonines et alkannines qui sont dérivés de la 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone, également appelée naphthazarine.

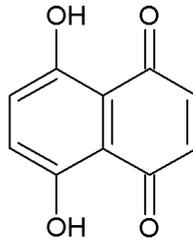


Illustration 26:  
naphthazarine

### 3.2.3.1. La structure commune des shikonines et des alkannines

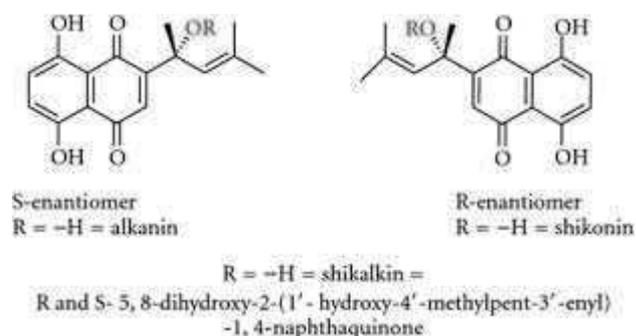
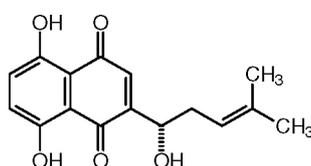


Illustration 27: Structure de base des dérivés de la shikonine et de l'alkannine

Le squelette de base de ces deux familles de molécules est la 5,8-dihydroxy-2-[1-hydroxy-4-méthyl-3-pentényl]-1,4-naphtoquinone.

C'est Brockmann, en 1936, qui a déterminé la structure de ces deux molécules suite à la correction de la structure du noyau naphazarine qui était jusqu'alors mal identifié (Papageorgiou *et al*, 1999). C'est également lui qui a déterminé l'énantiomérisation des deux molécules. Les molécules correspondant à l'énantiomère R sont classées dans le groupe des shikonines alors que celles correspondant à l'énantiomère S sont dans le groupe des alkannines. Le mélange des deux énantiomères a été baptisé shikalkine.

### 3.2.3.2. L'alkannine



alkannin  
Figure 28: alkannine

L'alkannine correspond à la 5,8-dihydroxy-2-[(1*S*)-1-hydroxy-4-méthylpent-3-èn-1-yl]naphthalène-1,4-dione. L'alkannine a été extraite la première fois par Pelletier à partir d'*Alkanna tinctoria*. Pelletier avait d'abord nommé la molécule extraite acide anchusique. A température ambiante, l'alkannine se présente sous la forme de petits cristaux rouge brunâtre ayant un point de fusion de 149°C et un point d'ébullition de 567°C. En milieu alcalin, l'alkannine prend une teinte violette alors qu'en milieu lipidique elle a une couleur rouge foncé.

### 3.2.3.3. La shikonine

La shikonine est le nom donné à la 5,8-dihydroxy-2-[(1*R*)-1-hydroxy-4-méthyl-3-pentényl]-1,4-naphtoquinone.

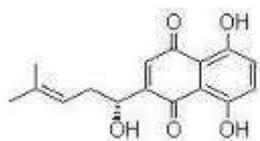


Figure 29: shikonine

La shikonine a été isolée pour la première fois sous forme d'acétate en 1922 par Majima et Kuroda, cependant, ceux-ci ont assigné une structure erronée à la molécule en raison d'une mauvaise identification de la formule de la naphtazarine à l'époque (Papageorgiou *et al.*, 1999). Le nom de la shikonine vient du mot japonais "shikon" qui désigne *Lithospermum erythrorizon* et *Arnebia euchroma* au Japon et est également utilisé pour désigner le pigment issu de ces plantes.

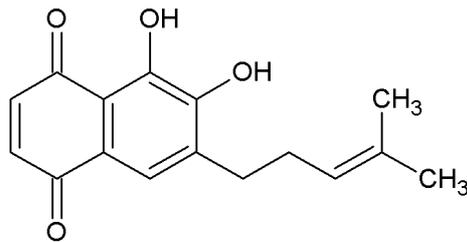


Illustration 30: Structure de la shikonine attribuée par Majima en 1922

Elle se présente sous la forme d'une poudre cristalline rouge à brune avec un point de fusion à 147°C et un point d'ébullition à 567,4°C à 760 mmHg. Elle est peu soluble dans l'eau. La shikonine a un pic d'absorbance à 518 nm et absorbe la lumière à partir de 290 nm.

#### 3.2.3.4. Les esters de shikonine et d'alkannine

En 1991, Davydenkov *et al.* ont isolé et identifié l'isobutylshikonine, la diméthylacrylshikonine, l'acétylshikonine, la déoxyshikonine et l'hydroxyisovalérylshikonine à partir de cultures cellulaires d'*Arnebia euchroma*.

En 1995, Ko *et al.* ont isolé la téracrylshikonine à partir d'*Arnebia euchroma*.

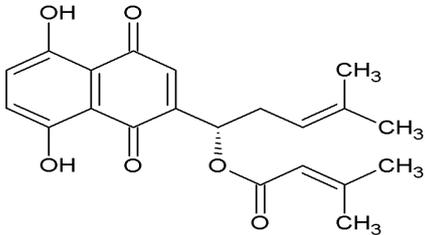
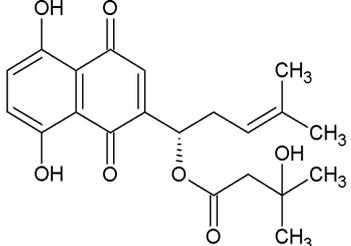
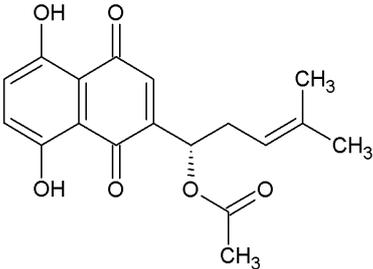
En 2000, Khatoon et Mehrotra ont identifié la shikonine, l'alkannine, la  $\beta,\beta$ -diméthylacryl alkannine, la  $\beta,\beta$ -diméthylacrylshikonine, l'acétylalkannine, la déoxyshikonine, la  $\beta,\beta$ -diméthylacrylhydroxyalkannine, l'hydroxyalkannane et l'acétyl hydroxy alkannine dans l'extrait hexanique d'*Arnebia euchroma*.

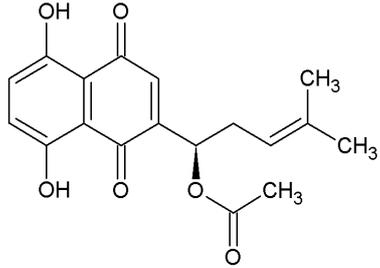
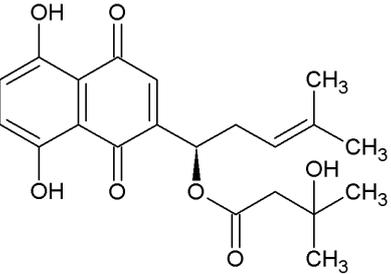
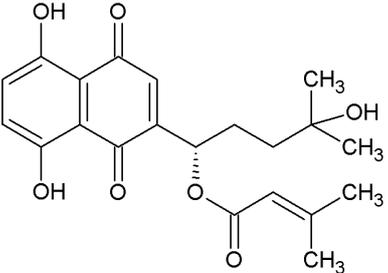
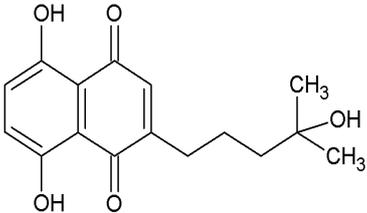
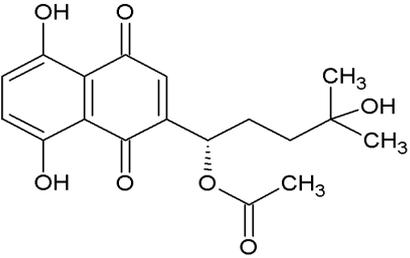
En 2002, Shen *et al.* ont extrait et identifié la  $\alpha$ -méthylbutyryl alkannine à partir d'*Arnebia euchroma*.

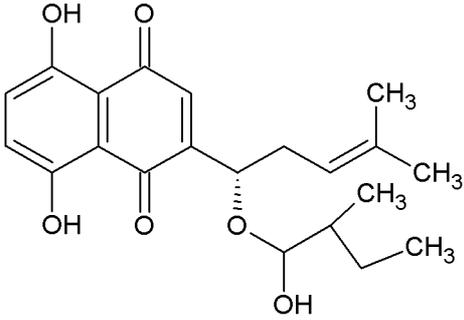
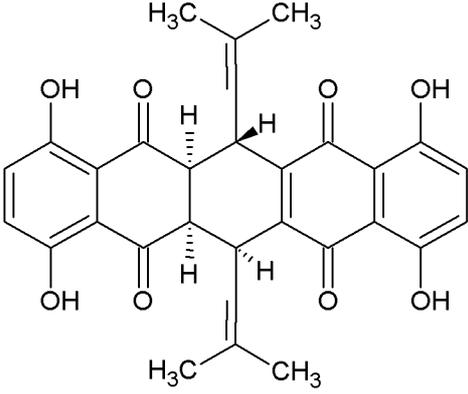
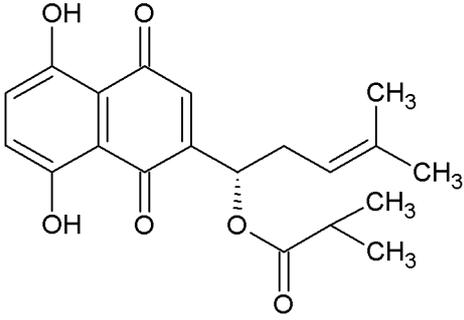
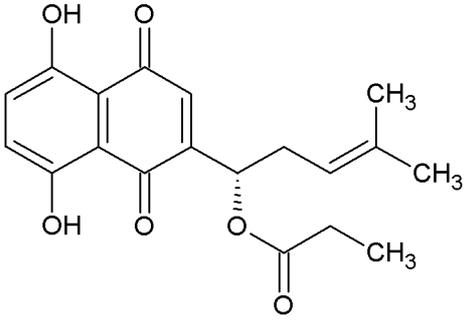
En 2010, Liu *et al.* ont isolé un dimère de naphthoquinones qu'ils ont nommé l'arnebiabinone à partir de l'extrait éthanolique d'*Arnebia euchroma*.

En 2012, Damianakos *et al.* ont extrait et isolé l'isobutyrylalkannine, l'acétylalkannine, la  $\beta$ -hydroxyisovalérylalkannine, la 2''-(S)- $\alpha$ -méthylbutyrylalkannine, la propionnylalkannine, et la tétracrylalkannine à partir d'une culture cellulaire d'*Arnebia euchroma*. En 2015, Wang et al. ont extrait et identifié la 5,8-O-diméthyl-11-déoxyalkannine à partir de la racine d'*Arnebia euchroma*.

En 2015, Singh *et al.* ont isolé la butyrylalkannine à partir l'extrait hexanique de la racine d'*Arnebia euchroma*.

Nom du dérivé	Formule
$\beta,\beta$ -diméthylacryl alkannine	
hydroxyisovalérylalkannine	
Acétylalkannine	

acétylshikonine	
hydroxyisovalérylshikonine	
β,β-diméthylacrylhydroxyalkannine	
hydroxyalkannane	
acétyl hydroxy alkannine	

<p><math>\alpha</math>-méthylbutyryl alkannine</p>	 <p>The structure shows a 1,5-dihydroxy-2,4-dione core (alkanninone) with a side chain at the 3-position. The side chain consists of a propyl chain ending in a double bond with two methyl groups, and a chiral center bonded to a hydroxyl group and an isobutyl group.</p>
<p>arnebiabinone</p>	 <p>The structure shows a dimeric 1,5-dihydroxy-2,4-dione core (arnebiabinone) with two isopropenyl groups attached to the central ring system.</p>
<p>isobutyrylalkannine</p>	 <p>The structure shows a 1,5-dihydroxy-2,4-dione core (alkanninone) with a side chain at the 3-position. The side chain consists of a propyl chain ending in a double bond with two methyl groups, and a chiral center bonded to an isobutyryl group.</p>
<p>propionnylalkannine</p>	 <p>The structure shows a 1,5-dihydroxy-2,4-dione core (alkanninone) with a side chain at the 3-position. The side chain consists of a propyl chain ending in a double bond with two methyl groups, and a chiral center bonded to a propionnyl group.</p>

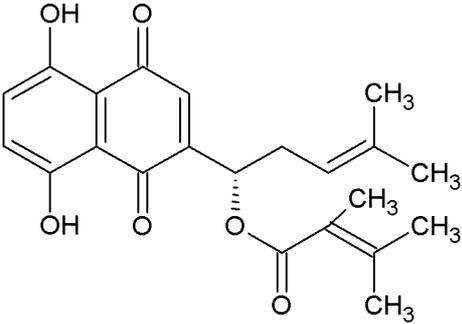
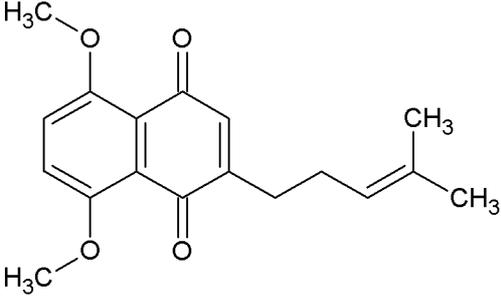
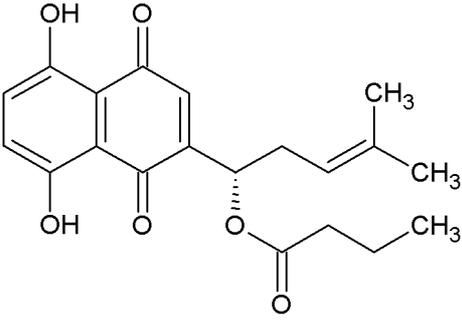
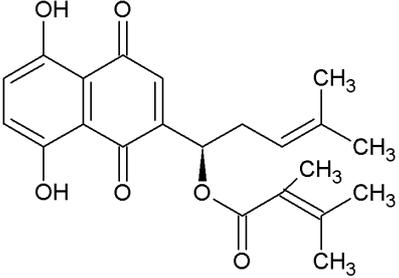
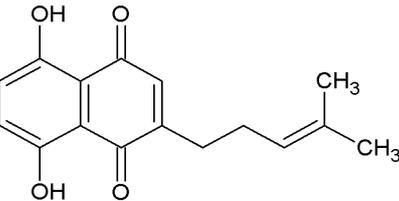
téracrylalkannine	
5,8-O-diméthyl-11-déoxyalkannine	
butyrylalkannine	
téracrylshikonine	
Déoxyshikonine/ déoxyalkannine	

Tableau 2: formule des dérivés d'alkannine et de shikonine isolés à partir d'*Arnebia euchroma*

### 3.3. La biosynthèse de la shikonine et de ses dérivés

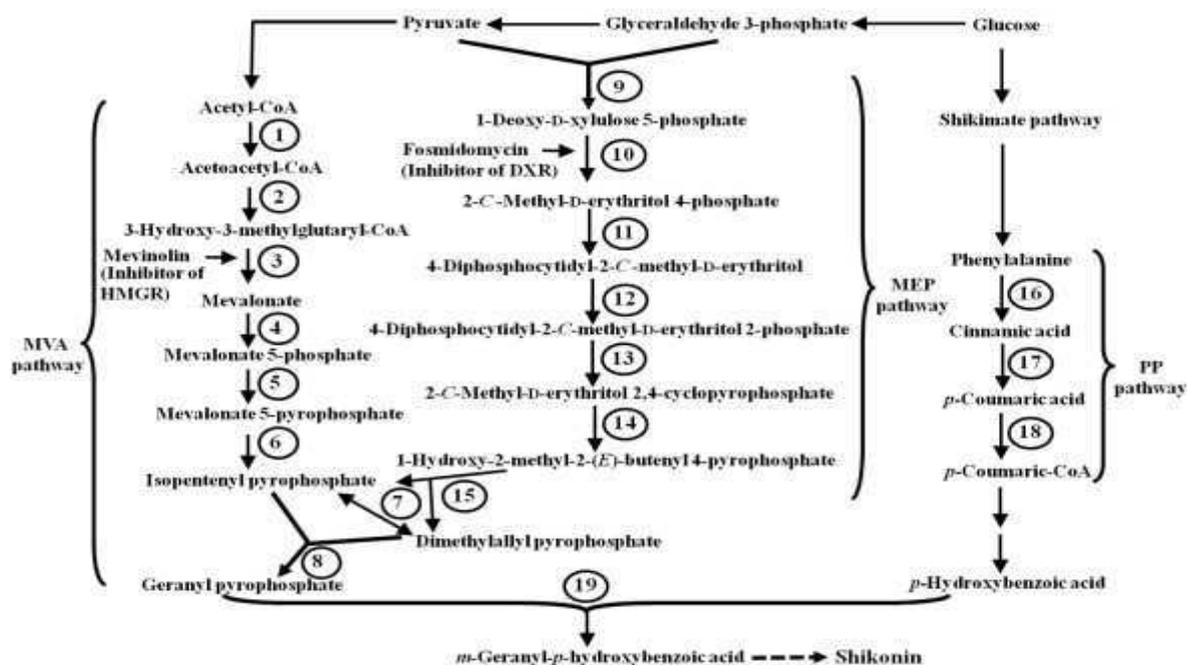


Illustration 31: Schéma de la biosynthèse des précurseurs de la shikonine (Singh *et al.*, 2010)

La biosynthèse des shikonines/alkannines nécessite deux précurseurs principaux, le géranyl pyrophosphate (GPP) et le *p*-hydroxybenzoate (PHB). Le GPP peut être obtenu par deux voies métaboliques différentes, la voie du mévalonate et celle du 2-C-méthyl-D-érythritol 4-phosphate (MEP).

La voie du mévalonate commence par la fusion de deux molécules d'acétylCoA catalysée par l'acétylCoA kinase (1). Une troisième molécule est ensuite rajoutée grâce à la 3-hydroxy-3-méthylglutarylCoA synthase (2) pour obtenir le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMGCoA) qui est transformé en mévalonate par la HMGCoA réductase (3). Le mévalonate est ensuite phosphorylé deux fois par la mévalonate kinase (4) et la phosphomévalonate kinase (5) pour

donner le mévalonate-5-pyrophosphate. Celui-ci est transformé en isopenténylpyrophosphate (IPPP) par la mévalonate-diphosphate- décarboxylase (6).

L'autre voie métabolique permettant l'obtention de GPP commence par l'addition d'une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate et d'une molécule de pyruvate pour obtenir le 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate grâce à la 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (9). Le 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate est ensuite transformé en 2-C-méthylérythritol-4-phosphate par la 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate-réductoisomérase (10). Un groupement cytidyl vient ensuite se greffer à la molécule grâce à la 2-C-méthylérythritol-4-phosphate-cytidyl transférase (11) pour obtenir le 4-diphosphocytidyl-2-C-méthyl-D-érythritol. La molécule est ensuite phosphorylée par la 4-(cytidine-5-diphospho)-2-C-méthylérythritol kinase (12) puis transformée en 2-C-méthylérythritol-2,4-cyclophosphate par la 2-C-méthylérythritol-2,4-cyclophosphate synthase (13) pour être ensuite transformée en 1-hydroxyl-2-méthyl-2 (E)-butényl-4-diphosphate par la 1-hydroxyl-2-méthyl-2 (E)-butényl-4-diphosphate synthase (14).

La 1-hydroxyl-2-méthyl-2 (E)-butényl-4-diphosphate réductase (15) permet ensuite la formation d'IPPP et de diméthylallylpyrophosphate qui sont deux isomères et peuvent se changer l'un en l'autre grâce à l'IPPP isomérase (7).

L'IPPP est ensuite transformé en GPP par la géranyldiphosphate synthase (8). La voie du mévalonate est, selon une étude Singh *et al.* en 2010, la voie privilégiée chez *Arnebia euchroma*.

Le PHB est synthétisé à partir de la phénylalanine qui est transformée en acide cinnamique par l'action de la phénylalanine ammonia lyase (16). L'acide cinnamique est ensuite hydroxylé en acide p-coumarique par la cinnamic acid-4-hydroxylase (17). Une unité CoA vient ensuite se greffer grâce à la 4-coumaroyl-CoA lyase (18). Ensuite la molécule subit plusieurs transformations aboutissant au PHB.

Le GPP et le PHB se condensent ensuite par action de la p-hydroxybenzoate-m-géranyltransférase (19) en acide m-géranyl-p-hydroxybenzoïque qui subit ensuite plusieurs métabolisations pour obtenir la shikonine et ses dérivés. Les étapes de cette transformation ne sont pas encore totalement connues, cependant la déoxyshikonine est connue comme étant l'une des étapes de la synthèse.

#### 4. La production de naphthoquinones

En 1984, Fu *et al.* ont comparé le contenu en pigments des racines de plusieurs racines de Boraginaceae et parmi les plantes testées c'est *Arnebia euchroma* qui a permis l'extraction de la plus grande quantité de pigments, conduisant les auteurs à envisager *Arnebia euchroma* comme une source possible pour l'extraction de naphthoquinones de la famille de la shikonine.

##### 4.1. L'extraction à partir d'*Arnebia euchroma*

Traditionnellement les extraits d'*Arnebia euchroma* utilisés étaient préparés avec des solvants apolaires tels que le ghee ou l'huile d'olive. Les études ont montré que les pigments actifs sont plus concentrés dans la racine que dans le reste de la plante. En 2003, Wang a déposé un brevet pour la préparation de médicaments contenant des molécules de la famille des shikonines. Dans ce brevet deux méthodes d'extraction à partir d'*Arnebia euchroma* sont décrites. La première méthode consiste en une extraction par des éthers de pétrole suivie de l'élimination du solvant pour obtenir une pâte qui est ensuite chromatographiée sur une colonne sur gel de silice en utilisant un gradient d'éthers de pétrole et d'acétate d'éthyle. Cette étape permet d'obtenir des monomères d'esters de shikonine qui sont ensuite purifiés par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP). L'autre méthode décrite utilise le CO<sub>2</sub> supercritique pour l'extraction.

En 2013, Liu *et al* ont travaillé sur la méthode d'extraction en milieu homogène en utilisant un blender pendant l'extraction, et ont mesuré l'influence des différents facteurs pour les optimiser. Ils ont également comparé les résultats obtenus avec ceux obtenus grâce à d'autres méthodes d'extraction et ont conclu que la méthode d'extraction en milieu homogène peut être envisagée pour l'extraction de pigments à partir de la racine d'*Arnebia euchroma*.

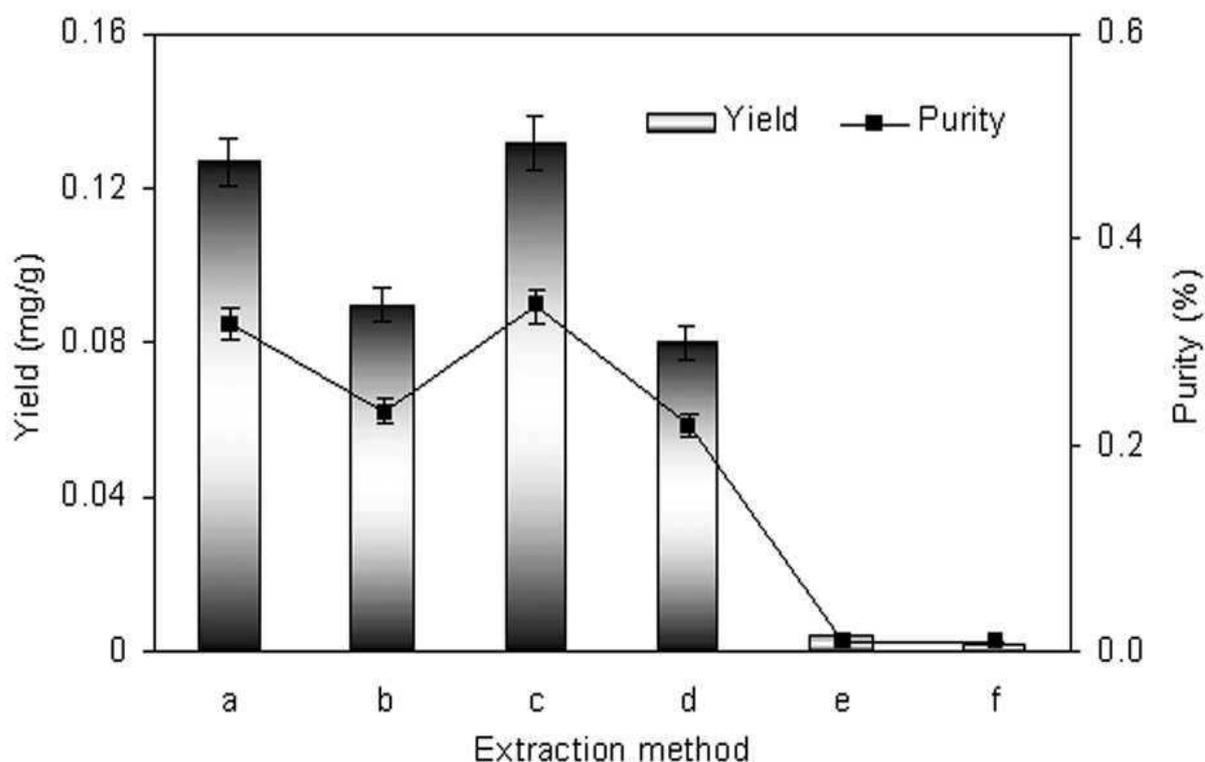


Illustration 32: Tableau comparatif des rendements de l'extraction de shikonine à partir d'*Arnebia euchroma* en utilisant différentes méthodes (Liu *et al.*, 2013) a:extraction en milieu homogène b:extraction par macération, c:extraction par ultrasons, d:extraction par CO<sub>2</sub> supercritique, e:extraction par micro-ondes, f: extraction par reflux de chaleur

#### 4.2. La production de naphtoquinones à partir de cultures cellulaires

*Arnebia euchroma* est une espèce menacée par la cueillette par les indigènes et difficile à cultiver. Ceci a conduit au développement de cultures cellulaires pour l'obtention de pigments. Ce sont Davydenkov *et al.* qui ont en premier testé la possibilité d'extraire des pigments à partir de cellules d'*Arnebia euchroma* en 1991. La culture cellulaire dans des bioréacteurs permet la production de dérivés de la shikonine à grande échelle. La production de naphtoquinones à partir de cultures cellulaires comprend trois étapes ; d'abord les cellules sont cultivées en milieu solide ou liquide, ensuite les cellules sont mises à incuber dans un milieu liquide servant à améliorer la production de métabolites et finalement on procède à l'extraction et la séparation des différents composés.

#### 4.2.1. La génération du cal et la culture cellulaire

Le cal est une amas de cellules indifférenciées obtenu à partir d'une partie de plante. Le fragment est disposé dans un milieu de culture et exposé à des hormones végétales pour déclencher la dédifférenciation et la croissance des cellules de la plante.

Selon la partie de plante utilisée pour la formation de cal, les cellules obtenues n'auront pas les mêmes caractéristiques. En 2005, Manjkhola *et al.* ont testé les possibilités d'organogenèse et d'embryogenèse à partir de cals d'*Arnebia euchroma*. Ils ont comparé l'efficacité de différentes combinaisons de facteurs de croissance pour l'induction de la formation de cal. Lors des tentatives d'embryogenèse, ils ont constaté que les cals de cellules de racines n'ont pas entraîné la formation d'organes alors qu'avec les cellules de feuilles, une organogenèse ainsi qu'une embryogenèse ont été observées. De plus, ils ont testé la production de graines synthétiques en encapsulant l'embryon formé et ont réussi à faire germer une partie des graines ainsi formées.

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	IBA ( $\mu\text{M}$ )	BA ( $\mu\text{M}$ )	Feuille (% d'induction de cal)	Racine (% d'induction de cal)
0	0	0	0	0
1		0,5	26,2	20
1		1	39,4	26,2
1		2,5	46,6	38
1		5	53,3	60
2,5		0,5	67,1	73
2,5		1	90,7	97,6
2,5		2,5	86	90,7
2,5		5	80,6	86,1
	1	0,5	46,6	32,9
	1	1	66,6	53,3
	1	2,5	67,1	73,8
	1	5	73,8	80
	2,5	0,5	90,7	97,6
	2,5	1	97,2	100
	2,5	2,5	100	97,6
	2,5	5	100	86

Tableau 3: Influence des facteurs de croissance sur l'induction de cal d'*Arnebia euchroma* (Manjkhola *et al.* , 2005)

BA : benzyladénine ; IBA:acide indole-3-butyrique ;D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

#### 4.2.2. L'influence du milieu d'incubation des cellules

Plusieurs études ont été réalisées en vue d'améliorer le rendement de l'extraction de pigments à partir de cultures cellulaires ainsi que sur l'optimisation des cultures cellulaires.

En 1992, Yong-Hua *et al.* ont découvert que l'extrait aqueux de *Plectonema boryamum* à forte concentration dans le milieu de culture permet d'accélérer la production de pigments et d'augmenter la fraction de shikonines.

En 1999, Fu *et al.* ont découvert que l'ajout d'éliciteur fongiques provenant d'*Aspergillus niger* et *Rhizopus oryzae* permet d'augmenter la production de pigment par les cultures cellulaires d'*Arnebia euchroma*.

En 2006, Ge *et al.* ont prouvé que l'addition de certains éléments chimiques au milieu de culture augmente également la production de pigments.

En 2011, Malik *et al.* ont testé l'influence des facteurs physico-chimiques sur la production de naphtoquinones par les cultures cellulaires obtenues à partir de feuille d'*Arnebia euchroma* dans un milieu supplémenté en 6-benzylaminopurine et en acide indole-3-butyrique. Ils ont testé les effets de la lumière, du pH, de la température et de la concentration de sucrose dans le milieu de culture. Ils ont constaté que l'exposition à la lumière inhibe la production de naphtoquinones par la plante. De plus, la concentration de pigments dans les cellules augmente avec le pH mais la croissance des cellules diminue lorsque le pH augmente. Ils ont déterminé que les conditions optimales de culture pour la production de shikonine sont une température de 25°C avec un pH du milieu de 8,75 et dans un milieu contenant 6% de sucrose.

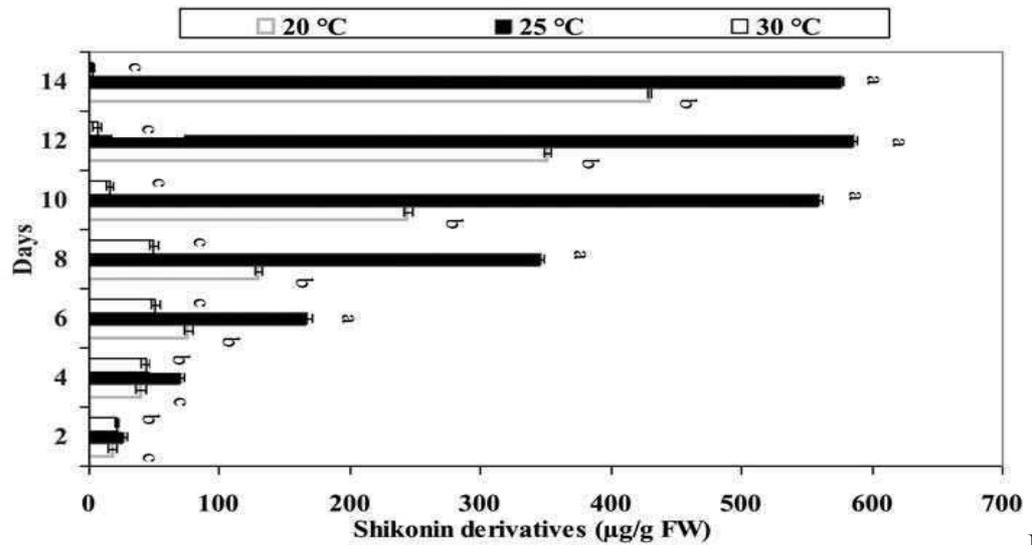


Illustration 33: Effet de la température d'incubation sur la production de dérivés de la shikonine par une culture cellulaire d'*Arnebia euchroma* (Malik *et al.*, 2011)

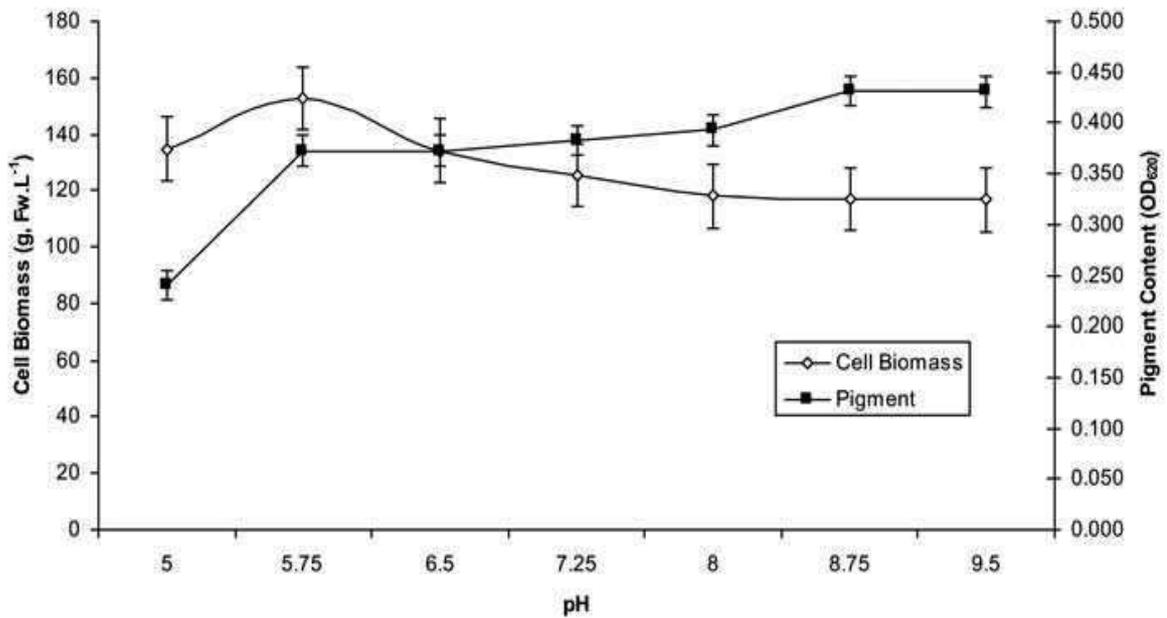


Illustration 34: Effet du pH sur la croissance cellulaire et la production de shikonine par les cellules d'*Arnebia euchroma* (Malik *et al.*, 2011)

En 2011, Kumar *et al.* ont déterminé que l'utilisation de sel de potassium comme source de phosphate permet un rendement supérieur aux sels de sodium ou d'ammonium. Ils ont également mesuré l'influence du type d'inoculum dans le milieu d'extraction (milieu M9) et on

obtenu des rendements supérieurs grâce à l'utilisation d'un inoculum direct. La même année Sykłowska-Baranek *et al.* ont montré que l'ajout de phénylalanine dans le milieu de culture diminue la production de dérivés de la shikonine. Ceci entre en contradiction avec une étude réalisée par Deqiu *et al.* en 1994 dans laquelle il avait été démontré que la concentration de 5 ou de 10M de phénylalanine dans le milieu permet d'améliorer le rendement de la culture cellulaire.

En 2014, Sykłowska-Baranek *et al.* ont testé un milieu liquide supplémenté en perfluorodécane pour une culture cellulaire d'*Arnebia euchroma*. La perfluorodécane (PFD) utilisée était soit dégazée soit saturée en éthylène ou en air. Les cultures supplémentées en PFD dégazée et aérée ont montré une croissance supérieure à la culture contrôle pendant les trois premières semaines de culture alors que dans le cas de la culture avec la PFD saturée en éthylène la quantité de masse sèche obtenue est diminuée par rapport au contrôle. De plus la quantité de pigments produite par la cultures avec la PFD dégazée et celle avec la PFD aérée présente un rendement supérieur à celui de la culture témoin. On a également remarqué que dans les cultures dans la PFD les pigments s'accumulent majoritairement dans la phase extracellulaire contrairement à ce qui est observé dans la culture témoin. Cette présence de pigments dans la phase extracellulaire permet aux auteurs d'envisager leur extraction in-situ dans le but d'augmenter le rendement de l'extraction. De plus les proportions des énantiomères sont différentes selon le milieu de culture bien que dans tous les cas les dérivés alkannines sont majoritaires.

En 2014, Wang *et al.* ont découvert que la supplémentation en méthyljasmonate du milieu de culture permet d'augmenter la production de naphthoquinones.

#### 4.2.3. L'extraction des naphthoquinones

En 2014, lors d'expérimentations sur l'utilisation de PFD dans le milieu de culture, Sykłowska-Baranek *et al.* ont extrait les dérivés de la shikonine de la phase cellulaire, de la phase aqueuse extracellulaire et de la phase PFD. Les cellules préalablement lyophilisées ont été placées dans du n-hexane pendant 15 minutes à 40°C. La phase aqueuse et celle de perfluorodécane ont été séparées dans un entonnoir de séparation. Les naphthoquinones de la

phase aqueuse ont été extraites par du n-hexane. La phase PFD a subi deux extractions successives avec du méthanol.

### 4.3. Synthèse totale

Parallèlement aux recherches effectuées pour améliorer les rendements en shikonine et alkannine par extraction, des recherches sur la synthèse totale de la shikonine et de l'alkannine ont été effectuées. Différentes synthèses ont été réalisées, cependant la synthèse totale n'est pas utilisée pour la synthèse de dérivés de la shikonine à grande échelle car elles ne sont pas rentables. Pour exemple, sont présentées ci-dessous une synthèse non-stéréosélective et une synthèse stéréosélective.

#### 4.3.1 Synthèse non stéréo-sélective

En 1983, Terada *et al.* ont réussi la première synthèse de shikalkine à partir du 2-formyl-1,4,5,8-tétraméthoxynaphtalène (**89**). Ils utilisent d'abord le réactif de Grignard pour obtenir le 2-[4,4-(éthylènedioxy)-1-hydroxypentyl]-1,4,5,8-tétraméthoxynaphtalène (**98**) (rendement 96%). Le composé obtenu subit ensuite une hydrolyse du groupement cétal (rendement 87%) formé précédemment ainsi que l'addition d'iodure de méthylmagnésium (rendement 86%) pour obtenir le 2-(1,4-dihydroxy-4-méthylpentyl)-1,4,5,8-tétraméthoxynaphtalène (**99**). Les quatre groupements méthyles protégeant les fonctions cétone de la naphtoquinone sont ensuite éliminés en deux étapes (rendements de 70% et 27% respectivement). La 5,8-dihydroxy-2-(1,4-dihydroxy-4-méthylpentyl)-1,4-naphtoquinone (**101**) ainsi obtenue est traitée avec de l'anhydride acétique pour former un triacétate (**102**) (rendement 88%) subissant ensuite une élimination par le chlorure de thionyle et la pyridine (rendement 34%) suivie d'une hydrolyse alcaline (rendement 37%) pour obtenir la shikalkine.

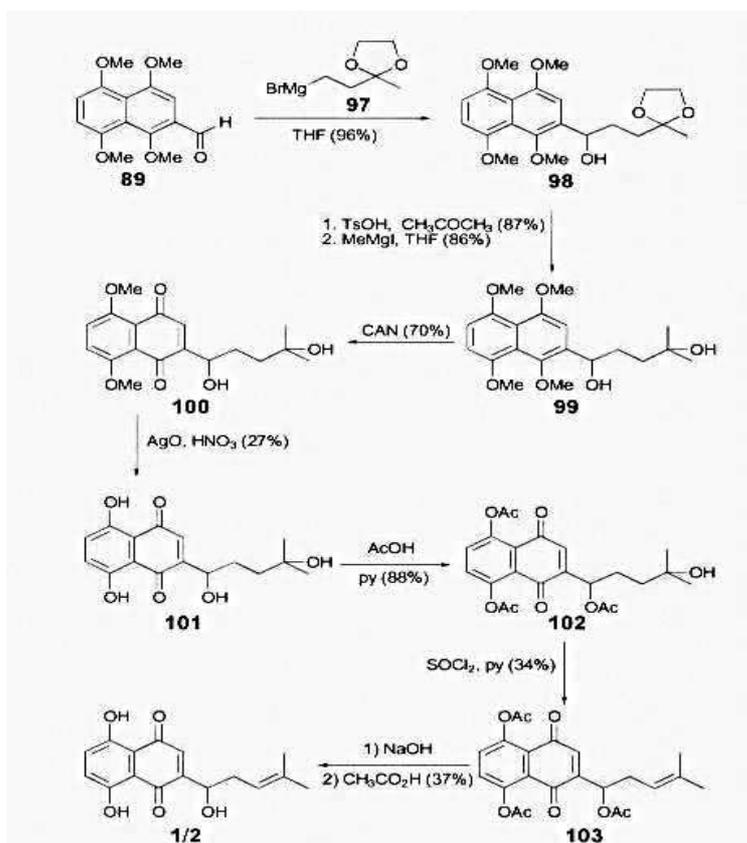
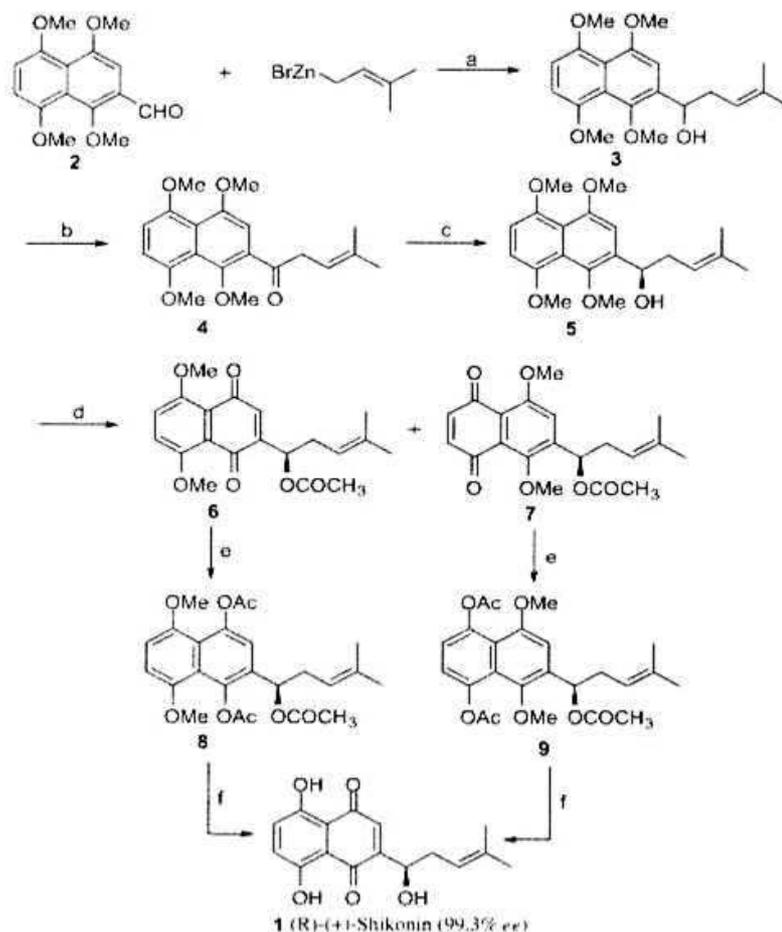


Illustration 35: Schéma de la synthèse de shikalkine réalisée par Terada *et al.* en 1983

#### 4.3.2. Synthèse stéréosélective

Des méthodes de synthèse stéréosélectives ont également été mises au point. En 2012, Wang *et al.* ont mis au point une nouvelle méthode de synthèse de la shikonine possédant une bonne stéréosélectivité (99,3%e) ainsi qu'un rendement de 47% à partir du 2-formyl-1,4,5,8-tétraméthoxynaphtalène. Le 2-formyl-1,4,5,8-tétraméthoxynaphtalène réagit d'abord avec un composé organozincique mixte pour former un mélange d'énantiomères de la 1,4,5,8-tétraméthoxyshikonine (shikonine dont les atomes d'oxygène sont protégés par des groupements méthyle). Cette molécule subit ensuite une oxydation de Dess-Martin pour obtenir un dérivé cétonique de la shikonine qui est ensuite réduit de façon stéréo-sélective en utilisant le RuCl<sub>2</sub> pour obtenir l'énantiomère R souhaité. Cet énantiomère réagit ensuite avec l'anhydride acétique pour obtenir un mélange de deux dérivés acétylés différents. Chacun des composés peut réagir à nouveau avec l'anhydrique acétique en présence de zinc pour obtenir

une acétylation des oxygènes restés libres. Les composés obtenus subissent ensuite une hydrolyse en trois étapes pour obtenir la shikonine.



**Scheme 3.** Total synthesis of shikonin: (a) THF, 25 °C, 1 h, then HMPA, 120 °C, 6 h, 91%; (b) Dess–Martin periodinane, 0 °C, 15 min, 80%; (c)  $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3/\text{L-3}$ , *t*-BuOK/*i*-PrOH,  $\text{H}_2$  (10 atm), 0 °C, 24 h, 99%; (d)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP, dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 20 min, then CAN,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 15 min, 25% (**6**), 67% (**7**); (e) Zn,  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP, 2 h, rt, 76% (**8**), 86% (**9**); (f) CAN,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , rt, 10 min, then 1 M NaOH, 6 h, then 10% HCl, 85%.

Illustration 36: Synthèse de la shikonine par Wang

## 5. Etude pharmacologique

Le pigment extrait de la racine d'*Arnebia euchroma* ainsi que les naphthoquinones qu'il contient ont fait l'objet de nombreuses études.

### 5.1. Propriétés anti-inflammatoires

De nombreuses études pharmacologiques ont permis de mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire d'*Arnebia euchroma* et de certaines molécules en ayant été extraites.

En 1996, des extraits d'*Arnebia euchroma* ont été testés sur le modèle d'oedème de la patte de rat par Kaith et son équipe. Quatre solvants ont été utilisés pour préparer les extraits, l'éther de pétrole, le chloroforme, l'alcool et l'eau. Les résultats ont montré une inhibition de l'oedème de 61,2% pour l'extrait par l'éther de pétrole, 45% pour l'extrait chloroformique, 27,5% pour l'extrait alcoolique et 60% pour l'extrait aqueux. Les extraits par l'éther de pétrole et l'eau ont démontré une efficacité similaire à celle de l'ibuprofène utilisé comme référence. De plus, le fait que ces deux extraits aient montré une activité anti-inflammatoire laisse supposer que différentes familles de molécules sont responsables de ces propriétés.

En 1996, Kawakami *et al.* ont rapporté que l'acétylshikonine diminue la production de radicaux libres par les polynucléaires de cochon d'Inde. Ils avaient également remarqué que l'acétylshikonine inhibe l'activation de la NADPH oxydase mais n'a pas d'effet sur la NADPH oxydase déjà activée. De plus ils ont noté que l'inhibition de la génération de radicaux est irréversible.

En 1997, Wang *et al.* ont testé l'effet de l'acétylshikonine sur le relargage de radicaux libres dans les polynucléaires neutrophiles du rat induit par le fMLP/CB et par le PMA. Ils ont observé une diminution de la consommation d'oxygène ainsi que de la génération de radicaux libres induite par les deux molécules dans les cellules exposées à l'acétylshikonine avec des CI50 de 0,48±0,03 et 0,39±0,03 µM respectivement. Ils ont également mesuré l'effet de l'acétylshikonine sur la production d'inositol diphosphate et d'inositol triphosphate. L'acétylshikonine a diminué la production d'inositol triphosphate de 39% à 10µM et de 70% à 30µM. Ils ont ensuite testé l'effet de l'acétylshikonine sur la phosphorylation des tyrosines. Le

mécanisme d'action n'a pas été entièrement élucidé mais les auteurs ont conclu que l'inhibition d'une tyrosine kinase devait jouer un rôle dans l'action pharmacologique de l'acétylshikonine.

En 2001, Subbaramaiah *et al.* ont testé l'effet de l'extrait éthanolique d'*Arnebia euchroma* sur l'expression de la cyclooxygénase de type 2 sur la lignée cellulaire de chondrosarcome SW1353. L'extrait a diminué l'activité de la COX2 stimulée par l'alliance de PMA et IL1 $\beta$  ainsi que celle induite par NF- $\kappa$ B. Cette diminution d'activité est attribuée par les auteurs à la diminution de la transcription de la COX2.

En 2010, Andujar *et al.* ont testé sur la souris l'utilisation de la shikonine sur le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le TPA. Une diminution de l'œdème a été observée. La shikonine a inhibé l'activité de iNOS et la cyclooxygénase de type 2. L'application topique de shikonine inhibe la translocation de protéine kinase C induite par le TPA ainsi que phosphorylation et l'activation de ERK1/2, la translocation nucléaire et la liaison à l'ADN de NF- $\kappa$ B ainsi que la translocation de p65, une sous-unité de NF- $\kappa$ B *via* un mécanisme entraînant une diminution de la phosphorylation de I $\kappa$ B, un inhibiteur de NF- $\kappa$ B. Ils ont également découvert que la shikonine et ses dérivés diminuent l'expression de leukotriènes B4.

En 2011, Lu *et al.* ont testé la shikonine sur l'œdème auriculaire induit par le xylène et l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique. Ils ont mesuré que 4mg/kg de shikonine entraîne une inhibition de l'œdème similaire à celle obtenue avec la dose de 2,5mg/kg de dexaméthasone<sup>DCI</sup>. *In vitro*, ils ont découvert que la shikonine inhibe la production de TNF $\alpha$  induite par la stimulation des macrophages par le LPS. De plus, à 1  $\mu$ M la shikonine inhibe la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B *via* l'inhibition de la dégradation de I $\kappa$ B par le protéasome et induit la mort cellulaire des macrophages.

#### 5.1.1. L'arthrite

En 2009, Dai *et al.* ont testé les propriétés anti-inflammatoires de la shikonine dans le cadre des inflammations d'origine auto-immune. Entre autres, dans le cadre d'une expérimentation sur le modèle de l'arthrite, ils ont enregistré la diminution de certains marqueurs de l'inflammation dans le liquide synovial. Ces marqueurs sont les cytokines pro-inflammatoires Th1, TNF $\alpha$  et IL-12 jouant un rôle dans l'immunité cellulaire. Le facteur de transcription Tbet

semble jouer un rôle dans cette diminution. Cependant ils ont observé une augmentation de la protéine de liaison au GATA3 indiquant l'absence d'effet de la shikonine sur les cytokines Th2, IL-10 ni IL-4, jouant un rôle dans l'immunité humorale.

En 2010, Kim *et al.* ont publié un article sur l'efficacité de la shikonine comme chondroprotecteur chez la souris présentant une arthrite rhumatoïde. Ils ont relevé une augmentation de l'inhibiteur de la métalloprotéinase de la matrice 1, diminuant ainsi la dégradation du collagène au niveau articulaire et limitant la dégradation de l'articulation due à l'inflammation.

En 2012, Fan *et al.* ont testé l'effet de l'extrait d'*Arnebia euchroma* contre l'arthrite. L'extrait par l'éther de pétrole d'*Arnebia euchroma*, contenant des naphtoquinones identifiées comme étant de l'alkannine, de l'acétylalkannine, de la  $\beta$ -acétoxyisovalérylalkannine, de la déoxyalkannine, de la  $\beta$ - $\beta$ -diméthylacrylalkannine, de l' $\alpha$ -méthylacrylalkannine et de l'isovalérylalkannine, a été testé sur un modèle d'arthrite induite par le collagène chez le rat. Le mélange d'hydroxynaphtoquinones a permis de diminuer le gonflement des articulations dû à l'arthrite. De plus la diminution de poids due à la maladie est atténuée par l'administration de naphtoquinones. L'aspect histologique des articulations a été amélioré par le mélange de naphtoquinones par rapport au sujet témoin. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux obtenus grâce à l'étanercept<sup>DCI</sup> et les naphtoquinones à 10mg/kg ont montré une efficacité similaire à celle de l'étanercept à 0,8mg/kg. Les auteurs ont également testé l'extrait d'*Arnebia euchroma* avec le test de la plaque chaude et celui de l'injection d'acide acétique dans le péritoine. Dans les deux expériences les résultats obtenus avec la dose de 14,4mg/kg sont comparables à ceux obtenus avec l'aspirine. L'analyse du sérum de rat a montré une diminution des taux de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans le sérum des rats traités.

### 5.1.2. Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

En 2013, Fan *et al.* ont administré l'extrait d'*Arnebia euchroma* à différentes doses (2,5 ,5 et 10 mg/kg) à des rats présentant une colite induite par TNBS (2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid). L'aspect histologique des cellules a été amélioré ainsi que les symptômes de la colite.

De plus on a noté une diminution du taux de TNF $\alpha$  dans le sérum. La dose de 10mg/kg a un effet significatif et comparable à celui de la mésalazine<sup>DCI</sup> à 100mg/kg.

En 2014, Zhang *et al.* ont testé l'effet des naphthoquinones extraites à partir d'*Arnebia euchroma* sur des souris Balb/C auxquelles on a administré du dextrane sodium sulfate à 5% pour induire une colite ulcéreuse. La shikonine prévient le raccourcissement du tube digestif et diminue la perte de poids. De plus, ils ont observé une diminution de l'activité de la myéloperoxydase.

### 5.1.3. Shikonine et lupus néphritique

En 2009, Wang *et al.* ont administré oralement de la shikonine (24 et 40 mg/kg/jour) à des souris NZB/W F1 âgées de 28 semaines et présentant toutes une protéinurie pendant 14 semaines et ont rapporté que la protéinurie est diminuée de façon dose-dépendante. Ils ont également observé la diminution des protéines d'adhésion circulantes. Le dosage des anticorps anti ADN a permis de constater que le traitement par la shikonine diminue l'augmentation de leurs production par rapport au groupe témoin. De plus ils ont observé une diminution de l'expression des ARNm des molécules d'adhésion intercellulaire-1 et des molécules d'adhésion vasculaire-1 au niveau des reins des souris traitées. L'examen optique des tissus a démontré que la shikonine permet de préserver les organes des lésions glomérulaires, interstitielles et périphériques dues au lupus néphritique.

### 5.2. Propriétés anti-oxydantes

En 2008, Chang *et al.* ont mesuré les propriétés anti-oxydantes des extraits aqueux et méthanoliques d'*Arnebia euchroma*. Les deux extraits ont démontré une activité anti oxydante significative. Ils ont également mesuré les propriétés de capture de radicaux libre en utilisant le DPPH. L'extrait aqueux s'est montré significativement plus actif dans ce test. Ils ont également mesuré la capacité des extraits à réduire les ions ferriques.

Les propriétés de capture de radicaux libres de la shikonine ont été testées sur les radicaux du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS), le mélange Fe<sup>2+</sup>/ascorbate/cerveau de rat, de la xanthine oxydase et de

la superoxyde oxydase. Les tests avec la xanthine oxydase et la superoxyde oxydase n'ont pas montré d'activité de la shikonine. Par contre, la shikonine a démontré une activité anti radicalaire sur les autres tests.

En 2014, Yoshida *et al.* ont testé les propriétés de la shikonine et de l'alkannine sur les radicaux générés par la NADPH oxydase. Une diminution des radicaux a été constatée quand la shikonine est introduite avant l'activation de la NADPH oxydase mais pas après celle-ci. L'auteur a donc conclu que la shikonine inhibe l'activité de la NADPH oxydase. De plus, les propriétés anti-radicalaires de la shikonine et de l'alkannine ont été mesurées sur les radicaux alkyloxy et l'anion O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Les résultats ont été rapportés à ceux obtenus avec le trolox<sup>DCI</sup>, un analogue hydrosoluble de la vitamine E à activité anti-oxydante comparable.

### 5.3. Propriétés anti-bactériennes

En 1992, Fujii *et al.* ont déterminé que les effets bactéricides de la shikonine et ses dérivés sont liés à la capacité de la shikonine de bloquer la topoisomérase de type II.

En 2002, Shen *et al.* ont testé l'activité anti-bactérienne de différentes naphthoquinones issues d'*Arnebia euchroma* sur *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant, et *Enterococcus faecium* et *E. faecalis* vancomycine résistants. Les dérivés de la shikonine et de l'alkannine testés ont montré une activité bactéricide contre les différentes souches testées.

En 2004, Kuo *et al.* ont montré que la shikonine inhibe la croissance d'*Helicobacter pylori* de façon dose dépendante (CI50:18µM). Selon les auteurs, cette activité antibactérienne pourrait être due à la capacité de la shikonine à inhiber l'activité de la N-acétyltransférase.

En 2010, Kumar *et al.* ont testé les propriétés antibactériennes de l'extrait éthanolique d'*Arnebia euchroma* ainsi que d'autres plantes trans himalayennes. Les résultats pour *Arnebia euchroma* sont les suivants:

-*Bacillus subtilis*: concentration minimale inhibitrice(CMI)=32 µgrammes/ml

-*Staphylococcus aureus*: CMI>1 mg/ml

-*Escherichia coli*: CMI = 64 µg/ml

-*Pseudomonas aeruginosa*: CMI = 8 µg/ml

En 2011, Hagbeen *et al.* ont découvert que l'extrait par le tétrahydrofurane (THF) d'*Arnebia euchroma* inhibe de façon significative la croissance de *Micrococcus luteus*.

En 2011, Ding *et al.* ont montré que la shikonine, à la dose de 200 µM, inhibe la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia*.

En 2012, Damianakos *et al.* ont extrait et isolé plusieurs dérivés de l'alkannine à partir d'une culture cellulaire d'*Arnebia euchroma* pour ensuite mesurer leur activité antimicrobienne sur *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia cloacae* et *Escherichia coli*. Les extraits de cal et de culture cellulaire d'*Arnebia euchroma* ont également été testés. Les différents composés ont montré une activité antibactérienne significative bien que moins élevée que les molécules de références utilisées, la métilmycine et l'amoxicilline accompagnée de l'acide clavulanique.

Composé/bactérie	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.cloacae</i>	<i>E.coli</i>
Extrait hexanique de cal d' <i>Arnebia euchroma</i>	15	15	12	11	11	11
Extrait de culture cellulaire	16	16	13	12	12	12
deoxyalkannine	12	12	11	10	11	12
alkannine	15	14	12	11	11	12
acétylalkannine	10	11	10	10	10	9
isobutyrylalkannine	14	13	13	11	11	12
β-hydroxyisovalérylalkannine	15	15	13	13	12	14
2''-(S)-α-methylbutyrylalkannine	13	12	12	11	11	12
propionylalkannine	12	13	11	12	12	11
teracrylalkannine	12	11	12	10	10	11
acétylshikonine	15	14	12	12	11	11
métylmycine	22	24	20	25	23	22
Amoxicilline/ acide clavulanique	21	21	25	23	22	24

Tableau 4: zone d'inhibition de croissance (cm) de naphtoquinones isolées d'*Arnebia euchroma* sur différents types de bactéries

En 2014, Ohen-Agyeie *et al.* ont réalisé une recherche de molécules naturelles pouvant se lier à la protéine AcrB en utilisant le logiciel AutoDock 4.2 et ont découvert que la shikonine peut se lier au site Asn-274 de la protéine. Ils ont également mesuré les CMI de différents antibiotiques sur *E.coli* en présence des différentes molécules ayant présenté une affinité potentielle avec AcrB et ont constaté que la shikonine augmente la sensibilité de *E.Coli* au tétraphénylphosphonium et ont confirmé que la shikonine inhibe les protéines de reflux en utilisant une méthode de fluorescence.

En 2015, Singh *et al.* ont testé l'efficacité antibactérienne de la butyrylalkannine isolée à partir de l'extrait hexanique d'*Arnebia euchroma* sur des souches d'*Enterococcus faecalis* résistantes à la vancomycine et ont mesuré les CMI qui varient selon les souches entre 3,13 et 6,26µg/mL. Ils ont également testé le composé sur des souches de *Staphylococcus* à sensibilité intermédiaire (VISA) et résistante (MRSA) à la vancomycine. Sur les deux souches la CMI de la butyrylalkannine a été mesurée à 1,56µg/L.

#### 5.4. Propriétés anti-fongiques

En 2002, Sasaki *et al* ont testé l'activité antifongique de la shikonine, de l'acétylshikonine et de la déoxyshikonine sur *Candida albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon cutaneum* et *Aspergillus fumigatus*. Les différents composés ont montré une activité antifongique intéressante bien qu'inférieure à celle du fluconazole sur la majorité des souches. Par contre, la déoxyshikonine a démontré une activité supérieure au fluconazole sur *Candida krusei* et *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant l'auteur considère qu'aucun des dérivés n'a démontré d'efficacité significative sur *Candida albicans*.

Molécule/germe	déoxyshikonine	shikonine	acétylshikonine	fluconazole
<i>Candida albicans</i>	>64µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	0,13µg/mL
<i>C.albicans</i> (résistant au fluconazole)	>64 µg/mL	>64 µg/mL	32µg/mL	32µg/mL
<i>C.glabrata</i>	16µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	8µg/mL
<i>C.krusei</i>	4µg/mL	4µg/mL	16µg/mL	64µg/mL
<i>C.tropicalis</i>	32µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	2µg/mL
<i>C.parapsilosi</i>	32µg/mL	16µg/mL	16µg/mL	2µg/mL

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2µg/mL	4µg/mL	8µg/mL	8µg/mL
<i>Cryptococcus neoformans</i>	8µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	4µg/mL
<i>Trichosporon cutaneum</i>	8µg/mL	8µg/mL	16µg/mL	4µg/mL
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>64µg/mL	>64µg/mL	32µg/mL	64µg/mL

Tableau 5: Activité antifongique (CMI) de la shikonine et de différents dérivés de la shikonine (Sasaki *et al.* , 2002)

En 2012, Miao *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur la croissance de *Candida albicans*. Les doses de 2, 4 et 8µg/mL ont été introduites dans le milieu de culture. La MIC80 (minimum inhibitory concentration) a été calculée sur plusieurs souches de *C.albicans* et comparée à celle de différents antifongiques, le fluconazole, le kétoconazole et le miconazole. La shikonine c'est alors montrée efficace sur les souches résistantes au fluconazole. Ils ont ensuite mesuré l'activité fongicide de la shikonine en fonction du temps. Une diminution du nombre de germes a été constatée pour les concentrations de 4 et 8µg/mL. Les auteurs ont alors exploré le mécanisme d'action de la shikonine et on constaté une augmentation du taux de radicaux libres dans les souches traitées. De plus, l'effet fongicide de la shikonine est fortement diminué par l'ajout d'anti-oxydants dans le milieu de culture. Ils ont donc déduit que la shikonine a un effet fongicide *via* un mécanisme impliquant la production de radicaux libres.

En 2015, Yang *et al.* ont testé les propriétés antifongiques de plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise parmi lesquelles figure *Arnebia euchroma*. *A. euchroma* a montré avoir une activité antifongique sur *Trichophyton rubrum* (CMI:500µg/mL), *Microsporum canis* (CMI:200µg/mL), *T. tonsurans* (CMI:350µg/mL) et *T. violaceum* (CMI:150µg/mL).

### 5.5. Propriétés anti-parasitaires

En 2008, Michaelakis *et al.* ont testé la toxicité de la shikonine, de l'alkannine et de la shikalkine racémique sur les larves de *Culex pipiens*, le vecteur du virus du Nil occidental. La shikonine a montré l'effet larvicide le plus élevé parmi les composés testés avec une LC50 de

3,9mg/L alors que l'alkannine et la shikalkine ont des LC50 de 12,35 et 8,73 mg/L respectivement. Les auteurs ont conclu que les naphthoquinones testées pourraient être utilisées dans la lutte contre les moustiques mais qu'il faudrait tester leur efficacité sur d'autres espèces de moustiques.

En 2011, Ali *et al.* ont testé différentes naphthoquinones sur les formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania major*. Parmi celles-ci, les dérivés de la shikonine et de l'alkannine ont montré une toxicité sur les formes intracellulaires amastigotes avec des CI50 situées entre 1 et 3µM avec une CI50 de 1,9µM pour la shikonine.

### 5.6. Propriétés anti virales

En 2003, Chen *et al.* ont étudié les effets de la shikonine contre le VIH-1 et ont découvert une activité antagoniste des récepteurs de chimiokines. A des concentrations de l'ordre du µM, la shikonine inhibe le chimiotactisme des monocytes et le flux de calcium en réponse à une variété de chimiokines. Il régule à la baisse l'expression de l'ARNm de CCR5, un co-récepteur primaire du VIH, dans les macrophages à un degré plus élevé que les autres récepteurs. En outre, la shikonine inhibe la réplication de souches multirésistantes du VIH dans les cellules mononucléaires périphériques, avec une IC 50 allant de 96 à 366 nM. La shikonine a également inhibé efficacement la réplication du VIH Ba-L dans l'isolat les monocytes / macrophages (IC50 = 470 µM). Ces résultats suggèrent qu'à la fois l'anticorps anti-VIH et les activités anti-inflammatoires de la shikonine peuvent être liés à son interférence avec l'expression et la fonction des récepteurs de chimiokine. Les auteurs estiment donc que la shikonine, un inhibiteur du récepteur de chimiokine naturelle, est une molécule potentielle pour la conception et le développement d'agents thérapeutiques contre le VIH.

En 2011, Gao *et al.* ont rapporté les effets antiviraux de shikonine contre AdV3. Ces auteurs ont constaté que la shikonine inhibe la croissance de AdV3 d'une manière dose-dépendante (de 0,0156 à 1 µM), avec un taux d'inhibition de virus de 24 à 69%. Plus précisément, l'expression de la protéine hexon dans AdV3 était plus élevée dans le groupe de contrôle du virus que dans les groupes traités par la shikonine, tandis que le taux d'apoptose des cellules HeLa traitées par la shikonine diminue de manière significative quand on augmente la concentration. Les auteurs ont conclu que la shikonine possède des capacités anti-AdV3 et

que le mécanisme antiviral potentiel implique à la fois l'inhibition de l'apoptose et de la protéine hexon d'expression Adv.

Plus récemment, plusieurs composés phytochimiques d'*Arnebia euchroma*, y compris la shikonine, ont été évalués pour leur activité contre le VHC. Parmi les composés testés, la shikonine a présenté une activité anti-VHC plus puissante, avec une concentration efficace (CE) 50 de 25 ng / ml, bien inférieure à celle de la ribavirine témoin positif (CE 50 = 2,6 ng / mL), et CC 50 de 1,1 ug / mL. La shikonine semble être un inhibiteur de la réplication du VHC et peut donc être un bon candidat pour une meilleure optimisation et le développement de médicaments.

### 5.7. Cicatrisation

En 1993, Ozaki *et al.* ont testé l'effet de l'extrait d'éther d'*Arnebia euchroma* sur la prolifération de tissu de granulation induite par une boule de coton implantée en sous-cutané à un rat. La boule est enduite de l'extrait d'*Arnebia* dilué. L'extrait dilué à 1,93% a accéléré la prolifération de tissu de granulation de manière significative par rapport au contrôle.

En 1994, Ozaki *et al.* ont testé les facultés d'accélération de la prolifération du tissu de granulation de la shikonine, de l'alkannine et du mélange d'énantiomères d'acétylshikonine et d'acétylalkannine extraits d'*Arnebia euchroma* et *Lithospermum erythrorizon*. Les différents dérivés ont tous permis d'accélérer la prolifération. De plus, la comparaison des mélanges d'acétylshikonine et d'acétylalkannine d'*Arnebia euchroma* et de *Litrospermum erythrorizon* a montré que la configuration S ou R ne joue pas un rôle significatif sur l'activité de la molécule. Ils ont également constaté une augmentation de la quantité de récepteurs CD11b+ au niveau de la zone traitée. L'augmentation de ce récepteur indique l'augmentation du nombre de leucocytes. En examinant le tissu cellulaire au niveau de la cicatrice, ils constatent également l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins.

En 2012, Ashkani-Esfahani *et al.* ont testé les propriétés de l'extrait d'*Arnebia euchroma* sous la forme d'un gel à 10% et un à 20% sur des brûlures au second degré chez des rats. Ils ont remarqué une accélération de la prolifération du tissu de granulation et des fibroblastes ainsi qu'une amélioration de la revascularisation. On note cependant que le gel à 20% entraîne une cicatrisation légèrement plus lente que celle obtenue avec la sulfadiazine et le gel à 10% et

l'induction de la revascularisation induite par les deux extraits est supérieure à celle induite par la sulfadiazine.

En 2012, Hsiao *et al.* ont testé l'effet de la shikonine à 100nM sur des fibroblastes humains. Ils ont constaté que la shikonine augmente la prolifération de fibroblastes de 25% par rapport au témoin. Ils ont également constaté la modification de l'expression de 32 protéines chez les fibroblastes traités. Ces protéines sont principalement impliquées dans la mobilité cellulaire, le contrôle de l'apoptose, la régulation du stress oxydatif, la prolifération cellulaire, la sécrétion de collagène et le métabolisme des protéines anormales.

En 2013, Yin *et al.* ont mesuré les changements dans l'expression de plusieurs gènes chez des souris ayant reçu une lésion provoquée par l'acétone mélangée à de la shikonine, avec l'acétone seule faisant office de contrôle négatif. Ils ont d'abord comparé l'aspect histologique des lésions et ont constaté que la shikonine accélère la cicatrisation à un stade précoce après 4 heures de traitement. Ils ont ensuite mesuré l'expression de différents microARN et ont remarqué que les modifications d'expression des gènes induites par la shikonine, en particulier l'activation des gènes *Zeb1* (*Tcf8*) et *Zeb2* (*Sip1*), favorisent la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ils ont ensuite utilisé une méthode de coloration pour observer les cellules en marge de blessure et ont observé que la shikonine augmente la migration cellulaire par rapport au contrôle et que les cellules traitées par la shikonine montrent des signes de TEM.

En 2013, Prangsaengtong *et al.* ont testé *in vitro* l'effet de la déoxyshikonine sur la prolifération des cellules de l'endothélium microvasculaire lymphatique (HMVEC-dLy) et des cellules de l'endothélium microvasculaire (HMVEC-d) pour déterminer l'effet de la déoxyshikonine sur la lymphangiogenèse. A la concentration de 0,8µM, la déoxyshikonine active la prolifération des deux lignées cellulaires testées, en particulier celle de HMVEC-dLy. Ils ont ensuite procédé à une PCR pour détecter les gènes affectés par la déoxyshikonine, et ont noté une augmentation des ARNm des VEGF (vascular endothelial growth factor) A et C, en particulier celui du VEGF-C, qui joue un rôle sur la croissance des endothéliums des voies lymphatiques, *via* un mécanisme impliquant l'HIF-1α. Ils ont ensuite testé l'effet de la déoxyshikonine dans le test de cicatrisation *in vitro*. La déoxyshikonine a permis de refermer le trou formé entre les cellules HMVEC-dLy aux doses de 1,6 et 3µM.

En 2013, Andujar *et al.* ont testé les effets de la shikonine sur des cellules de l'épithélium intestinal. Ils ont conclu que la shikonine améliore la cicatrisation en induisant le TGFβ1 et en augmentant la migration cellulaire sans influencer sur la prolifération cellulaire.

### 5.8. Métabolisme du glucose

En 2002, Kamei *et al.* ont rapporté que le traitement avec 10–50 μM de shikonine stimule l'absorption de glucose dans les cellules 3 T3-L1, ni par le récepteur à l'insuline, ni par des protéines substrats du récepteur à l'insuline, ou la phosphatidylinositol 3-kinase, mais par un mécanisme impliquant une tyrosine kinase inconnue, résultant en l'activation de l'Akt kinase et la stimulation de l'absorption de glucose avec l'augmentation de la translocation de GLUT4. De plus, dans une cellule ovarienne de hamster chinois transfectée avec un récepteur à l'insuline, la shikonine (30 μM) inhibe les homologues de la phosphatase et de la tensine, ce qui peut expliquer son action similaire à l'insuline, en particulier l'augmentation de l'absorption de glucose. En comparant les résultats obtenus lors de cette expérience à ceux de Nigorikawa *et al.* en 2006 et ceux publiés par Lee *et al.* en 2010, au moins deux cibles de la shikonine sont probables: une cible activant l'absorption de glucose et une cible pour l'inhibition de l'accumulation de graisse (Andujar *et al.* , 2013).

En 2011, Öberg *et al.* ont démontré que la shikonine (1 μM) augmente l'absorption de glucose dans les myocytes L6 de façon comparable à l'insuline sans affecter la phosphorylation Akt. Ces résultats semblent indiquer que la shikonine augmente l'absorption de glucose, et les concentration intracellulaires de calcium *via* un mécanisme indépendant de l'insuline. Ces auteurs ont conclu que la shikonine augmente la translocation de GLUT4 des vésicules intracellulaires à la surface de la membrane cellulaire, ce qui est le même effet que celui de l'insuline, mais avec un autre déclencheur (phosphorylation Akt).

De plus, Öberg *et al.* ont démontré l'effet bénéfique de la shikonine *in vivo* sur des rats diabétiques Goto-Kakizaki. Quand les rats ont été traités par 10 mg/kg de shikonine (1 fois par jour pendant 4 jours) leur niveau de glucose plasmatique a diminué significativement. De plus, un test de sensibilité à l'insuline (0,5 U/kg insuline, s.c.) a montré des taux de glucose diminués dans le groupe traité par shikonine. Les auteurs ont conclu que la shikonine pourrait avoir un effet sur le métabolisme du glucose.

### 5.9. Effet sur l'adipogenèse

En 2010, Lee *et al.* ont tenté d'élucider le mécanisme d'action de la shikonine à l'égard de l'adipogenèse de 3 cellules T3-L1. La shikonine (IC 50 = 1,1  $\mu$ M) a montré qu'elle inhibe la formation de gouttelettes de graisse et l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes 3 T3-L1 par un mécanisme impliquant l'inhibition de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, tels que FABP4 et LPL. La shikonine inhibe également la capacité de PPAR $\gamma$  et C / EBP $\alpha$ , les principaux facteurs de transcription de l'adipogenèse, à se lier à leurs séquences d'ADN cibles. Parmi les régulateurs en amont de l'adipogenèse, le SREBP1c (sterol regulatory element binding protein) qui régule l'adipogenèse, est régulé à la baisse par la shikonine, ce qui suggère que la shikonine inhibe d'abord l'expression de SREBP1c et par la suite l'expression de PPAR $\gamma$  et C / EBP $\alpha$ , ce qui entraîne la suppression des enzymes de métabolisation des lipides et la réduction de l'accumulation de graisse. Dans un article plus récent, ces mêmes auteurs ont démontré que la shikonine inhibe l'adipogenèse *in vitro* par l'activation de la voie WNT /  $\beta$  caténine, voie pour maintenir les niveaux nucléaires de  $\beta$  caténine, supprimant ainsi l'expression de PPAR  $\gamma$ , C / EBP  $\alpha$ , et l'accumulation de graisse intracellulaire (Andujar *et al.*, 2013).

### 5.10. Effets sur l'agrégation plaquettaire

Ko *et al.* ont testé en 1995 l'effet de la shikonine, de l'acétylshikonine, de la téracrylshikonine, et de la  $\beta,\beta$ -diméthylacrylshikonine sur l'agrégation plaquettaire induite par le collagène sur les plaquettes de lapin. Ils ont découvert que ces dérivés inhibent de façon dose dépendante l'agrégation plaquettaire.

Molécule	Concentration inhibitrice 50( $\mu$ M)
acétylshikonine	2,1
téracrylshikonine	2,8
$\beta,\beta$ -diméthylacrylshikonine	4,2
shikonine	10,7

Tableau 6: Inhibition de l'agrégation plaquettaire par la shikonine et ses dérivés ( Ko *et al.*, 1995)

Ils ont ensuite étudié les mécanismes d'action possibles de l'acétylshikonine. Ils ont testé l'activité de l'acétylshikonine (AS) sur l'agrégation et le relargage d'ATP provoqués par la thrombine, le U46619, le PAF et l'acide arachidonique et ont constaté que l'acétylshikonine inhibe l'agrégation et le relargage d'ATP de manière concentration-dépendante.

Ils ont mesuré les taux de thromboxane B<sub>2</sub> et de prostaglandine D<sub>2</sub> dans les cellules traitées. L'acétylshikonine inhibe la formation de thromboxane B<sub>2</sub> induite par le collagène, le PAF et la thrombine mais pas celle induite par l'acide arachidonique. Quant à la production de prostaglandine D<sub>2</sub> formée en présence d'acide arachidonique, elle est légèrement augmentée par l'ajout d'acétylshikonine. Ils ont également mesuré l'activité des cyclooxygénases en mesurant le taux de prostaglandine E<sub>2</sub>. L'activité de la cyclooxygénase ne semble pas être affectée par l'acétylshikonine. L'acétylshikonine inhibe les augmentations de phosphoinositol et de calcium induites par les différents inducteurs de la coagulation cités précédemment et n'a pas d'effet sur le taux d'AMPc dans la cellule.

### 5.11. Propriétés cardio-vasculaires

En 2009, Takano-Ohmuro *et al.* ont testé l'effet de la shikonine et de l'alkannine aux doses de 0,03, 0,1, 0,3 et 1  $\mu$ M sur la relaxation de l'aorte de rat en réponse à l'acétylcholine suite à une stimulation par la phényléphrine. Les deux composés ont diminué la relaxation induite par l'acétylcholine de façon dose dépendante avec des CI<sub>50</sub> de 0,51 et 0,26  $\mu$ M respectivement.

Ensuite, dans le but d'éclaircir le mécanisme d'action de la shikonine, ils ont testé l'effet de la shikonine aux doses de 0,1, 1, 10 et 100  $\mu$ M sur différentes isoformes de NO synthase (eNOS, iNOS et nNOS) dans un milieu dépourvu de cellules. La shikonine inhibe l'activité de eNOS avec une IC<sub>50</sub> de 7,1  $\mu$ M, celle de iNOS avec une IC<sub>50</sub> de 7  $\mu$ M et celle de nNOS avec une IC<sub>50</sub> de 4  $\mu$ M lorsque la shikonine est ajoutée avant la phase d'incubation de la NOS. Cependant, quand la shikonine est ajoutée après le NAPH et l'arginine on ne constate pas d'inhibition de l'activité de l'enzyme.

Ces auteurs ont ensuite testé l'effet de la shikonine sur la synthèse de NO dans des cellules RAW264.7 stimulées par LPS. La shikonine aux doses de 0,1, 0,3 et 1  $\mu$ M a été comparée à l'inhibiteur de Syk (kinase de la rate) OXSI-2 aux mêmes concentrations pour déterminer si l'effet de la shikonine provient de l'inhibition de cette enzyme. La shikonine diminue la

production de NO de façon dose dépendante. OXSI-2 a également entraîné une diminution de la production de NO mais de façon plus faible que la shikonine laissant supposer aux auteurs que si l'inhibition Syk contribue à l'action de la shikonine sur la production de NO ce n'est pas le seul mécanisme impliqué.

Ils ont également testé l'activité de la shikonine sur différentes kinases, PKA, Akt1, PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ 1, PKC $\delta$ , ainsi que sur 3 protéines kinases activées par le mitogène (MAPK), MEK1 (mitogen activated protein kinase 2), ERK1 (extracellular-regulated kinase1) et l'isoforme  $\alpha$  de p38. La shikonine n'a pas inhibé les kinases PKC ni Akt1. MEK1, qui régule les kinases ERK1 et p38, a été inhibé. PKA a également été inhibé. PKA régule l'enzyme eNOS, ceci conduit les chercheurs à penser que PKA peut être impliqué dans l'effet de la shikonine sur la contraction aortique.

Cette expérience confirme celle de Hu *et al.* qui avaient testé en 2004 l'effet de l'extrait d'*Arnebia euchroma* sur la contraction aortique qui avait conclu que les dérivés de la shikonine extraits agissaient en inhibant la production de NO au niveau de l'endothélium. De plus, ceux-ci avaient trouvé que l'extrait d'*Arnebia euchroma* pouvait induire une contraction de l'aorte à des concentrations supérieures à 10 $\mu$ M et que cette contraction peut être inhibée par l'indométacine.

En 2015, Huang *et al.* ont démontré que la shikonine inhibe l'effet des LDL oxydés sur les cellules endothéliales *in vitro*. Ainsi ils ont observé une diminution de l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire permettant aux monocytes d'adhérer à l'endothélium, de la production de radicaux libres et de la translocation de Nf $\kappa$ B. Ils ont observé l'augmentation de l'expression de l'hème oxygénase 1, la glutamate-cystéine ligase, la catalase, la superoxyde dismutase 1, la glutathion peroxydase, et la glutathion réductase. L'inhibition de l'expression de Nrf2 diminue l'activité protectrice de la shikonine, ce qui permet aux auteurs de conclure que l'activité de la shikonine dépend de l'activation de la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/Nrf2.

### 5.12. Propriétés anti-tumorales

En 1974, Driscoll *et al.* ont testé de nombreuses naphthoquinones pour identifier celles possédant une activité anti-tumorale potentielle. Parmi les quinones testées, l'alkannine et certains de ses esters ont démontré une cytotoxicité *in vitro*. Des recherches similaires

effectuées au Japon par Sankawa *et al.* en 1977 ont démontré que la shikonine et ses dérivés possédaient également des propriétés cytotoxiques (Papageorgiou *et al.*, 1999). Suite à ces découvertes, de nombreuses recherches ont été effectuées sur les propriétés cytotoxiques et anti-tumorales de ces molécules.

En 1992, Fujii *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur le clivage de l'ADN par la topoisomérase de type II. Ils ont mesuré que la shikonine favorise la formation d'ADN linéaire de façon dose dépendante. Le clivage induit par la shikonine disparaît lors du chauffage du milieu de réaction, suggérant aux chercheurs que le clivage de l'ADN se fait *via* la formation d'un complexe. Ils ont ensuite testé la cytotoxicité de la shikonine sur des cellules BALBc/3T3 H-ras. La shikonine a montré une CI50 de 0,063 $\mu$ M. Cependant, la shikonine a été comparée à d'autres molécules dont la plumbalgine lors de cette étude et la cytotoxicité des composés ne semble pas proportionnelle à l'induction du clivage de l'ADN qu'elles induisent.

En 2004, Wu *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur les cellules de mélanome A375-S2. Ils ont trouvé que la shikonine inhibe la croissance des cellules de façon dose et temps dépendante avec une CI50 à 48h de 7,1 $\pm$ 0,9 $\mu$ M. Ils ont ensuite testé l'effet de la shikonine sur le cycle cellulaire et ont remarqué que la shikonine bloque le passage de la phase G1 à la phase S du cycle de façon dose dépendante. Ils ont ensuite réalisé un western blot pour évaluer l'expression de p53, cdk4, Bcl2 et Bax. Le taux de p53 diminue lors de l'exposition à la shikonine, ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, le taux de Bcl2 diminue alors que celui de Bax augmente favorisant ainsi l'apoptose. Ils ont également voulu savoir si la shikonine induit principalement l'apoptose ou la nécrose des cellules. Ils ont alors remarqué que les doses élevées de shikonine provoquent l'apoptose de façon plus rapide que les doses plus faibles et également qu'avec des doses élevées la shikonine induit également la mort cellulaire par nécrose. Ils ont ensuite découvert que l'apoptose déclenchée par la shikonine est bloquée par l'inhibition des caspases 9, 3 et 8.

En 2008, Mao *et al.* ont observé que la shikonine induit l'apoptose par la voie mitochondriale et par voie caspase dépendante chez les cellules de la lignée de leucémie myéloïde chronique K562. Ils ont ensuite étudié la chronologie des différentes modifications conduisant à l'apoptose des cellules et ont déduit que chez les cellules de la lignée K562 c'est une

augmentation de la production de radicaux libres qui déclenche la phosphorylation de JNK, une modification du potentiel de membrane mitochondriale et l'activation des caspases.

En 2008, Lee *et al.* ont rapporté que la shikonine et l'acétylshikonine inhibent la croissance des cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC) induite par le VEGF. Ils ont également noté que la shikonine, l'acétylshikonine et l'isobutyrylshikonine inhibent la migration cellulaire induite par le VEGF chez les cellules HUVEC. Ils ont mesuré que les dérivés de la shikonine diminuent la production de VEGF chez les cellules stimulées par le VEGF. Ils ont également testé les dérivés sur les cellules A549 et ont mesuré leur effet sur l'expression de uPA et uPAR et ont trouvé que les dérivés de la shikonine diminuent l'expression de uPA. Ils ont ensuite testé les 3 dérivés *in vivo* sur des souris auxquelles ont été injectées des cellules de la lignée LLC. Les trois dérivés ont diminué la croissance de la tumeur. La shikonine a donné le taux d'inhibition de la croissance le plus élevé parmi les dérivés mais a également entraîné plus d'effets secondaires.

En 2009, suite à une étude de la configuration spatiale de la shikonine, Yang *et al.* ont testé l'interaction de la shikonine avec le protéasome 20S de lapin et ont constaté que la shikonine inhibe la fonction chymotripsine du protéasome. Ils ont ensuite testé l'activité de la shikonine sur la lignée cellulaire PC-3 (cancer de la prostate) et y ont mesuré l'activité du protéasome 26S. La shikonine inhibe l'activité de ce protéasome avec une CI50 de 16,5µM. Ils ont constaté que les cellules traitées présentent une accumulation de protéines IκB-α30 ubiquitinées ainsi qu'une augmentation des protéines pro-apoptotiques Bax et p27 ainsi que de la protéine Hsp70 et ont constaté la présence de cellules apoptotiques.

Ces auteurs ont alors testé la cytotoxicité de la shikonine sur les lignées cellulaires H22 (hépatome de souris) et P388 (leucémie murine) et ont confirmé la cytotoxicité de la shikonine sur ces lignées. Ils ont également vérifié la cinétique des modifications entraînées par la shikonine et ont confirmé que l'inhibition du protéasome précède l'induction de l'apoptose.

Ils ont ensuite testé *in vivo* l'effet de la shikonine en injectant des cellules de la lignée P388 à des souris mâles KMF et en leur administrant quotidiennement pendant 7 jours la dose de 4mg/kg de shikonine en injection intra péritonéale. Ils ont constaté une augmentation de la survie dans le groupe traité par rapport au groupe témoin. Ils ont ensuite confirmé la cible de la shikonine *in vivo* en injectant des cellules H22 à des souris et en les traitant pendant 7 jours avec de la shikonine aux doses de 4 et 8 mg/kg/jour et en les sacrifiant deux jours après la fin

du traitement. Ils ont constaté une diminution significative de la taille de la tumeur chez les souris traitées ainsi que des signes d'inhibition du protéasome dans les cellules de la tumeur. Ils ont alors vérifié que le mécanisme s'applique également avec les cellules PC-3 et ont constaté que l'inhibition de la croissance de la tumeur semble correspondre avec le taux d'inhibition du protéasome, ce qui amène les auteurs à conclure que la cytotoxicité de la shikonine est liée à l'inhibition du protéasome *in vitro* et *in vivo*.

En 2009, Xiong *et al.* ont testé l'effet de l'acétylshikonine isolée d'une culture cellulaire d'*Arnebia euchroma* sur la croissance des lignées cellulaires de l'adénocarcinome du poumon humain A549, du carcinome hépatocellulaire humain Bel-7402, de l'adénocarcinome du sein humain MCF-7 et du carcinome pulmonaire de Lewis de la souris (LLC). L'acétylshikonine a provoqué une inhibition de la croissance dose dépendante sur les 4 lignées cellulaires avec des IC50 à 48h de 5,6±0,6µg/mL sur la lignée A549, 6,82±1,5µg/mL sur la lignée Bel-7402, 3,4±0,44µg/mL sur la lignée MCF-7 et de 2,72±0,38µg/mL sur la lignée LLC. De plus, la lignée A549 a été utilisée pour établir une courbe de croissance en présence d'acétylshikonine. Celle-ci a démontré qu'elle inhibe également la croissance de la lignée de façon temps-dépendante.

Ils ont ensuite implanté des cellules de la lignée LLC sur des souris C57BL/6 pour évaluer l'effet anti-tumoral de l'acétylshikonine. Ils ont séparé les souris en 5 groupes ; un groupe témoin, un groupe recevant du cyclophosphamide<sup>DCI</sup> à la dose de 60mg/kg et trois groupes recevant l'acétylshikonine aux doses de 0,5, 1 et 2mg/kg. Les souris du groupe cyclophosphamide n'ont reçu qu'une injection au jour 1 alors que les autres groupes ont reçu une injection intrapéritonéale tous les deux jours pendant 12 jours. La taille de la tumeur a été mesurée régulièrement. Le groupe recevant l'acétylshikonine a montré un volume de tumeur significativement inférieur au témoin mais cependant supérieur au groupe ayant reçu le cyclophosphamide. De plus, la mesure des taux de Bax, de caspase-3 et de Bcl-2 dans les tumeurs ont montré que l'acétylshikonine augmente les taux de Bax et de caspase-3 et diminue celui de Bcl-2 de manière dose dépendante. Les auteurs en ont conclu que l'acétylshikonine provoque l'apoptose en activant des protéines pro-apoptotique et active ainsi la voie des caspases menant à l'apoptose chez les cellules de la lignée LLC.

La même année, Zeng *et al.* ont testé l'acétylshikonine sur la lignée SGC-7901 (cellule de cancer gastrique humain). L'acétylshikonine inhibe la croissance des cellules *in vitro* et *in vivo*. De plus ils remarquent que l'acétylshikonine régule la production des ARNm des protéines de la famille Bcl-2.

En 2010, Chang *et al.* ont découvert que la shikonine induit l'apoptose chez les cellules de l'ostéosarcome 143B. Ils ont noté une augmentation de la phosphorylation des kinases activées par signal extracellulaire (ERK) ainsi que la génération de radicaux libres.

En 2011, Chen *et al.* ont rapporté que la shikonine et l'alkannine inhibent la pyruvate kinase M2(PKM2) spécifique à la tumeur chez les cellules de la lignées MCF7 et A549. Ceci a entraîné chez ces cellules une diminution de la glycolyse et l'accumulation d'acide lactique. Ils ont ensuite testé les composés sur des cellules de la lignée HeLa auxquelles ont été transfecté le gène PKM1 et ont noté une sensibilité réduite de ces cellules aux naphtoquinones testées. Ceci amène les auteurs à conclure que la shikonine, l'alkannine et leurs dérivés inhibent spécifiquement PKM2 qui est spécifique des cellules cancéreuses.

En 2011, Cheng *et al.* ont montré que la shikonine entraîne une dégradation de l'ADN due à l'augmentation du taux de radicaux libres dans la cellule en présence d'ions CuII dans les cellules de la lignée HeLa.

En 2012, Long *et al.* ont testé l'effet d'un extrait d'*Arnebia euchroma* dont le composant majoritaire a été identifié comme étant l'acétylshikonine sur des souris ayant subi l'implantation de cellules cancéreuses des lignées HepA22, S180, YAC-1 et CTLL-2. L'extrait a été administré aux souris par voie orale aux doses de 10, 5 et 2,5 mg/kg/jour à partir du quatrième jour après l'injection des cellules tumorales et les souris ont été sacrifiées après 10 jours de traitement. Les temps de survis des souris traitées par le mélange de dérivés de la shikonine s'est montré comparable à celui des souris traitées par du 5-fluoro-uracile. De plus, la shikonine a montré qu'elle diminue la croissance de la tumeur de manière dose dépendante. Les souris auxquelles ont été injectées les cellules tumorales non traitées ou traitées par le 5-fluoro-uracile présentent une diminution des marqueurs CD3- et CD19-. Les souris traitées par l'extrait ont montré des concentrations de ces marqueurs supérieures à celles des autres souris porteuses de tumeur. Il a été également remarqué que le thymus et la rate présentent des dommages chez les souris porteuses de tumeur et que ce rétrécissement est accentué par le traitement par le 5-fluoro-uracile alors que les souris traitées par l'extrait présentent moins de dommages des organes impliqués dans les réactions immunitaires, le groupe traité par l'extrait à 10mg/kg/jour présentant un aspect normal et permet un maintient des cellules immunitaires NK et lymphocytes T. Ceci conduit les auteurs à conclure qu'en plus d'avoir une activité

cytotoxique, les dérivés de la shikonine ont un effet protecteur sur les organes impliqués dans les réactions immunitaires.

En 2012, Wiench *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur les lignées cellulaires U937 (cellules de lymphome humain), 789-O, MCF-7, SK-BR-3, SW1116, HCT-116, SW680, Capan1 CCRF-CEM, CEM/ADR5000, MDAMB231 pcDNA3, MDAMB2 1BCRP, U2OS, RPE-1 et SUI-2. La shikonine a inhibé la prolifération de toutes les lignées cellulaires testées avec une CI50 inférieure à 10 $\mu$ M à 24h de traitement sauf pour la lignée SUI-2 qui a une CI50 à 24h de 12,9 $\mu$ M. Ils ont également observé que les lignées de cellules de leucémie étaient particulièrement sensibles à la shikonine. La lignée U937 est celle qui a montré la plus grande sensibilité à la shikonine et a été utilisée pour les essais suivants. Ils ont ensuite fait une PCR pour déterminer l'effet de la shikonine sur l'expression des gènes. Ils ont ensuite utilisé une méthode de coloration pour visualiser les zones où s'accumule la shikonine dans les cellules des lignées U937 et SK-BR-3 et ont découvert que la shikonine s'accumule au niveau de la membrane des mitochondries et diminue le potentiel de membrane, ce qui provoque l'augmentation de la production de radicaux libres dans la cellule et entraîne des dommages sur l'ADN. Les auteurs ont ensuite mesuré l'effet de la shikonine sur le flux de calcium dans la cellule. Peu après l'administration il y a une faible diminution de la concentration de Ca<sup>2+</sup> libre dans la cellule qui se transforme en une augmentation longue et continue de la concentration d'ions Ca<sup>2+</sup> dans la cellule. Ils ont ensuite fait un test de fermeture de plaie les cellules de la lignée SKBR-3 et ont mesuré que la shikonine diminue la vitesse de fermeture et ont conclu que la shikonine diminue la migration des cellules. Ils ont ensuite testé la shikonine à la dose de 25 $\mu$ M sur des cellules U2OS sur lesquelles a été transfecté un gène codant pour l' $\alpha$  tubuline pour déterminer si l'inhibition de la migration est liée à la tubuline et ont constaté que la shikonine empêche la formation de microtubules mais ne s'accumule pas directement autour des filaments, ce qui laisse les auteurs penser que l'inhibition de la formation des filaments est une conséquence du stress oxydatif généré par la shikonine.

En 2013, Wu *et al.* ont testé la shikonine sur les cellules des lignées K562 (cellules de leucémie myéloïde chronique humaine) et MCF-7 pour étudier l'apparition de résistances lors du traitement. Les cellules ont été exposées régulièrement à la shikonine pendant 18 mois. Au bout des 18 mois, les cellules des lignées MCF-7 et K562 ont développé une résistance à la shikonine obligeant à doubler les doses mais pas de résistance aux analogues de la shikonine

testés. Les cellules MCF-7 ont également développé une faible résistance au paclitaxel<sup>DCI</sup> et au cisplatine<sup>DCI</sup> et les cellules K562 ont développé une faible résistance au cisplatine. Ils ont découvert que la résistance à la shikonine est liée à la tubuline  $\beta$ II. Cependant cela n'explique pas entièrement l'absence de résistances croisées avec les analogues de la shikonine. Ils ont également testé la shikonine sur la lignée cellulaire multirésistante K562/Adr et n'ont pas mesuré de différences majeures avec la lignée K562 dans l'induction de résistances par la shikonine. Ils ont ensuite répété leur expérience mais en exposant alternativement les cellules à la shikonine et la doxorubicine<sup>DCI</sup> pendant 18 mois. Les cellules ainsi traitées ont développé des résistances à la doxorubicine, à la vincristine<sup>DCI</sup> et au paclitaxel mais pas à la shikonine et à ses dérivés. Les auteurs ont conclu que la shikonine n'est pas un puissant inducteur de résistances des cellules des lignées testées et qu'une des raisons pourrait être la multiplicité des cibles de la shikonine.

En 2013, Huang *et al.* ont testé *in vitro* la cytotoxicité de la shikonine sur les cellules de gliome des lignées U87 et C6. Ils ont constaté un effet cytotoxique de la shikonine sur les deux lignées cellulaires avec une IC50 au bout de 3h de 5,85 $\mu$ mol/L pour C6 et de 10 $\mu$ mol/L chez U87. Ils ont constaté que les cellules traitées présentent un taux de radicaux libres élevé ainsi que des signes de nécrose et que l'effet cytotoxique de la shikonine sur les cellules C6 est inhibé par l'inhibiteur de nécroptose Nec-1. Nec-1 inhibe également l'augmentation du taux de radicaux libres. Les auteurs ont ensuite mesuré l'expression de la protéine RIP-1 qui agit dans l'induction de la nécroptose et constatent que la shikonine augmente l'expression de RIP-1 dans la cellule. Les chercheurs concluent que l'activation de RIP-1 peut provoquer l'augmentation du stress oxydatif entraîné par la shikonine.

En 2013, Zhang *et al.* ont testé la shikonine ainsi que le topotécan<sup>DCI</sup> sur les lignées U251 et U87 et en particulier sur la portion de cellules souches dans les cultures de ces lignées. La shikonine a montré qu'elle inhibe la croissance des cultures et ont aussi observé l'induction de l'apoptose chez les cellules souches par des mécanisme impliquant l'inhibition de Bcl2 et l'induction de l'activité des caspases 3 et 9. L'année précédente, Zhang *et al.* avaient testé l'effet de la shikonine sur les cellules de la lignée H-60. Ils ont montré que la shikonine inhibe la prolifération des cellules H-60 avec une CI50 avoisinant les 100ng/mL à 72h. Ils ont remarqué que les concentrations inférieures à 100ng/mL inhibent la prolifération des cellules mais ne provoquent que faiblement l'apoptose des cellules et pas du tout la nécrose. De plus, ils ont observé chez les cellules traitées des signes de différenciation cellulaire et ont mesuré

l'expression des marqueurs CD11b et CD14 qui s'est révélée augmentée dans les cellules traitées, ce qui leur a permis de conclure que la shikonine favorise la différenciation des cellules de la lignée H-60. Ils ont ensuite mesuré l'expression de différentes enzymes régulées par la voie du Nrf2/ARE, ils ont découvert que l'expression des ARNm de la catalase et de la glutathion-peroxydase est augmentée par la shikonine alors que celle des ARNm de la quinone-oxydoréductase, la glutathion S-transférase, la superoxyde dismutase et la glutamate cystéine ligase est inhibée par la shikonine. Les auteurs ont conclu que la différenciation des cellules H-60 est provoquée par une modification de l'homéostasie redox en faveur de l'oxydation.

En 2014, Jang *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur les lignées de cellules de cancer de la prostate LNCaP et 22RV1. Ils ont mesuré que la shikonine diminue la quantité des récepteurs aux androgènes dans le cytoplasme et dans le noyau de manière dose et temps dépendante et ont constaté que la shikonine bloque la transcription des gènes codant pour ces récepteurs. Ils ont également constaté que la shikonine bloque la croissance des cellules de deux lignées et provoque l'apoptose dans ces cellules.

En 2013, Tung *et al.* ont testé l'alkannine sur les cellules des lignées de cancer colorectal HCT-116 et SW-480. L'alkannine inhibe la prolifération des deux lignées cellulaires avec une CI50 de 2,38 $\mu$ M sur les cellules HCT-116 et de 4,53 $\mu$ M sur les cellules SW-480. Ils ont également testé l'alkannine sur des cellules épithéliales de rat IEC-6 et n'ont pas constaté d'activité anti-proliférative significative. Ils ont également constaté que les cellules cancéreuses traitées sont bloquées en phase G1.

En 2014, Chen *et al.* ont cherché à élucider le mécanisme d'action de la shikonine sur les cellules des lignées de cancer prostatique PC-3 et DU145. La shikonine a inhibé la croissance des deux lignées cellulaires en provoquant l'apoptose des cellules. Contrairement à ce qui a été observé dans d'autres expériences avec la shikonine sur des lignées de cellules cancéreuses, ils ont observé une augmentation des cellules en phase G2 ainsi qu'une diminution des cellules en phase G1. Ils ont également constaté que la shikonine diminue la mobilité des cellules et en particulier ils ont noté que la shikonine diminue l'invasion des cellules à travers un filtre enduit de collagène de type I. Pour expliquer la diminution de la capacité d'invasion des cellules, ils ont mesuré l'expression des métalloprotéinases de la matrice 2 et 9 (MMP-2 et MMP-9). Ils ont également montré que la shikonine supprime la

phosphorylation de Akt et mTOR et augmente la phosphorylation de ERK1/2, JNK1/2 et p38 et conclu que la diminution des métalloprotéases est due à la génération de radicaux libres entraînant l'augmentation de la phosphorylation d'ERK.

En 2014, Wenjing *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur les cellules de la souche A549. La shikonine a inhibé la prolifération des cellules de façon dose dépendante. Ils ont ensuite mesuré la quantité de cellules en état d'apoptose et ont remarqué que la shikonine entraîne l'apoptose des cellules A549. Ils ont également remarqué que le taux de cellules en phase G1 de leur cycle augmente de façon dose dépendante avec la shikonine, la PCR indique une diminution de CCND1, codant pour la cycline D1 qui permet normalement le passage de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. La shikonine entraîne également une augmentation de la transcription et de la production de caspases 3 et 7 dans la cellule, favorisant ainsi l'apoptose. Les auteurs concluent donc que la shikonine exerce sa cytotoxicité sur les cellules A549 par le blocage du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose.

La même année, Yang *et al.* a testé l'effet de la shikonine sur les cellules des lignées U87MG et Hs683. Ils ont incubé les cellules avec la shikonine et divers inhibiteurs d'enzymes intervenant dans la production de radicaux libres pour déterminer la source de l'augmentation du stress oxydatif due à la shikonine. Ils ont conclu que les 3 principaux producteurs de radicaux libres induits par la shikonine sont le complexe II de la mitochondrie, la lipooxygénase et la NADPH oxydase. Ils ont ensuite identifié les composés oxydants produits comme étant l'ion superoxyde, le radical OH et l'oxyde nitrique dans les cellules de la lignée U87MG alors que dans la lignée Hs683 l'espèce principalement produite est l'ion superoxyde. Ils ont mesuré l'expression de Nrf2 dans les cellules traitées et ont mesuré une faible augmentation après 6h de traitement et une inhibition après 24h de traitement. De plus, après 6h de traitement, le potentiel de la membrane mitochondriale est diminué, ce qui conduit après 12h de traitement au relargage de cytochrome c dans le cytosol. Ils ont ensuite vérifié la voie d'apoptose induite par la shikonine et ont trouvé que la shikonine induit l'expression des caspases 3, 8 et 9, indiquant que la shikonine induit l'apoptose par la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

En 2014, Shi *et al.* ont testé la shikonine sur des cellules de la lignée de cancer pancréatique BXPC-3. Ils ont noté que la shikonine augmente le rapport LC3-II/LC3-I. L'augmentation du rapport LC3-II/LC3-I indique la transformation de la membrane cytoplasmique en membrane

d'autophagie. Une diminution de l'expression de p62 vient renforcer l'hypothèse de l'auteur selon laquelle la shikonine peut induire l'autophagie chez des cellules cancéreuses.

En 2015, Hao *et al.* ont testé la shikonine sur les cellules de carcinome ovarien de la lignée SKOV-3. Ils ont observé que la shikonine entraîne l'apoptose des cellules cancéreuses et qu'elle empêche la migration des cellules cancéreuses en diminuant l'expression de FAK et de Src.

En 2015, Zhao *et al.* ont testé l'activité de différents dérivés de la shikonine et de l'alkannine sur les cellules de la lignée de glioblastome humain U87MG dont une souche U87MG $\Delta$ EGFR ( $\Delta$ EGFR est une forme d'EGFR ne possédant pas de domaine extracellulaire et ayant une activité tyrosine kinase indépendante de la liaison d'un ligand et représente un facteur de mauvais pronostic). Parmi les dérivés testés, la shikonine, l'acétylshikonine, l'acétylalkannine, la déoxyshikonine, l'isobutyrylshikonine, la tétracyclalkannine, la  $\beta$ -hydroxyvalérylshikonine, la  $\beta,\beta$ -diméthylacrylshikonine, l'isovaltryshikonine et la 2-méthylbutyrylalkannine ont inhibé la croissance des cellules. Il est à noter que l'alkannine n'a pas démontré d'activité cytotoxique sur les souches testées. Les auteurs ont également noté que les dérivés de la shikonine sont plus efficaces sur la souche U87MG $\Delta$ EGFR que sur la souche U87MG. Les chercheurs ont également testé l'effet de l'erlotinib<sup>DCI</sup> sur les deux souches et les deux se sont montrées résistantes à l'erlotinib.

L'effet de la shikonine combinée à l'erlotinib a ensuite été testé et il a été constaté un léger antagonisme entre les deux molécules sur les cellules de la souche U87MG sauvages alors qu'elles présentent une synergie d'action sur les cellules U87MG $\Delta$ EGFR. Les auteurs ont ensuite vérifié si la synergie se produit également sur d'autres lignées possédant une variation de EGFR avec la lignée cellulaire BS153 sur laquelle la combinaison a montré un effet similaire à celui observé sur U87MG $\Delta$ EGFR. Pour confirmer la synergie entre la shikonine et l'erlotinib, ils ont utilisé le modèle d'analyse d'additivité de Loewe en utilisant les lignées cellulaires A431 et DK-MG qui sont sensibles à l'erlotinib pour pouvoir calculer une CI50. L'association a montré une simple additivité d'effet sur la souche DK-MG et une synergie sur la souche A431. Ils ont ensuite vérifié si les analogues de la shikonine présentent également une relation synergistique avec l'erlotinib et ont confirmé la présence d'une synergie pour la déoxyshikonine, l'acétylalkannine, la  $\beta,\beta$ -diméthylacrylshikonine, l'acétylshikonin et l'isobutyrylshikonine.

En 2015, Wada *et al.* ont testé la shikonine sur les lignées cellulaires de myélome multiple KMS-12-PE, KMS-12-BM, RPMI-8226, KMM1, U266, KMS11 ainsi que des cellules de la lignée KMS11 résistantes au bortézomib<sup>DCI</sup> et au lénalidomide<sup>DCI</sup>. La shikonine a démontré un effet cytotoxique sur toutes les lignées testées. Ils ont ensuite testé l'effet de la shikonine en présence d'un inhibiteur de caspases sur les lignées U266, KMS-12-PE et RPMI-8226 et ont constaté que la cytotoxicité est diminuée, indiquant que l'apoptose est caspase dépendante. Ils ont remarqué que sur les cellules de la lignée KMS-12-PE, la shikonine a un effet synergique avec le bortézomib. De plus la shikonine s'est montrée plus efficace sur les cellules KMS11 résistantes au bortézomib que sur celles qui y sont sensibles et elle sensibilise les cellules résistantes au bortézomib. Les chercheurs ont testé la shikonine sur des mononucléaires de donneur sain et n'ont pas remarqué de cytotoxicité significative. Ils ont constaté que la shikonine induit les protéines de choc thermique 70 et 72 et que la combinaison de shikonine et de l'inhibiteur des protéines de choc thermique 70 et 72 VER-155008 semble présenter une synergie sur la cytotoxicité des deux composés. De plus, ils ont remarqué qu'à des concentrations supérieures à 10µM, la shikonine induit la nécroptose et ont constaté que la quantité de RIP-1 non clivée dans la cellule augmente de façon dose dépendante avec la shikonine.

En 2015, Qu *et al.* ont déterminé que la shikonine exerce une cytotoxicité sur les cellules de la lignée NCI-H460. Ils ont montré que la concentration de Cbl-b, un inhibiteur des ERK, augmente dans la cellule. L'utilisation de Ps341, un inhibiteur de Cbl-b, leur a permis de confirmer que l'effet de la shikonine est lié à l'augmentation de la concentration de Cbl-b. La diminution de l'activation de ERK entre en contradiction avec l'augmentation constatée par Chen *et al.* en 2014, cette différence pourrait cependant être due à la différence des lignées cellulaires utilisées.

En 2015, Wang *et al.* ont testé l'activité cytotoxique de la 5,8-O-diméthyl-11-déoxyalkannine (5,8ODM11DA) sur des cellules des lignées MG-63 et SNU387 et ont mesuré des CI50 de 2,69µM et 6,08µM respectivement.

### 5.13. Propriétés neuro-protectrices

En 2013, Esmailzadeh *et al.* ont testé la shikonine sur les cellules de phéochromocytome du rat PC12 pour mesurer l'efficacité de la shikonine contre l'effet de la 6-hydroxydopamine. 10MM de shikonine augmente le taux de survie des cellules exposées à la 6-hydroxydopamine de 54 à 69%. La shikonine diminue le taux intracellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'étude des ARNm a montré que la shikonine stimule la production de protéines anti-oxydantes dont la glutathion-peroxydase et la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD). Ils ont également quantifié les ARNm de la Bax et de Bcl2 et ont constaté une augmentation de Bcl2 et une diminution de Bax, protégeant la cellule contre l'apoptose. Ce résultat est cependant contradictoire avec les recherches effectuées sur les propriétés cytotoxiques de la shikonine. Les auteurs concluent que la shikonine protège les neurones dopaminergiques en diminuant le stress oxydatif et en protégeant la cellule contre l'apoptose. Ils expliquent les différences de résultats obtenus avec les expériences faites sur la cytotoxicité de la shikonine par la différence des lignées cellulaires utilisées.

En 2013, Wang *et al.* ont utilisé la modélisation 3D pour déterminer plusieurs inhibiteurs d'acétylcholine estérase potentiels. Parmi les molécules possédant potentiellement une affinité avec l'acétylcholine estérase figurent l'acétylshikonine, la  $\beta,\beta$ -diméthylacrylshikonine, l'isovalérylshikonine et la shikonine. L'acétylshikonine a montré la meilleure activité parmi les dérivés de la shikonine testés avec une CI50 de 34,6 $\mu$ M. Ils ont ensuite voulu tester si l'acétylshikonine protège les cellules des lignées SH-SY5Y et PC12 de la toxicité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ils ont mesuré que l'acétylshikonine diminue la génération de radicaux libres ainsi que la diminution du potentiel de membrane mitochondriale induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et diminue ainsi l'apoptose induite par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en stimulant l'activation de l'hème oxygénase 1. En se rapportant aux recherches faites sur la shikonine ils évoquent la possibilité que la stimulation de l'hème oxygénase 1 résulte de l'induction du système Nrf2-ARE. Ils concluent également que l'acétylshikonine pourrait potentiellement être utilisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

#### 5.14. Propriétés abortives

En 2004, Liu *et al.* ont testé l'utilisation d'*Arnebia euchroma* sous forme de granulés ou de décoction en complément de la mifépristone<sup>DCI</sup> et du misoprostol<sup>DCI</sup>. Les groupes traités avec *Arnebia euchroma* ont obtenu des taux d'avortements incomplets inférieur au taux obtenu avec la mifépristone et le misoprostol seuls. De plus, *Arnebia euchroma* diminue la durée des saignements suivant l'avortement.

En 2011, Ren *et al.* ont testé l'activité anti-implantation d'*Arnebia euchroma* sur des souris. L'extrait aqueux d'*Arnebia euchroma* a été administré à des souris du jour 1 à 4 post-coïtum aux concentrations de 7, 10.5 et 14 mg/g. Les souris ont ensuite été sacrifiées au jour 8 pour compter le nombre de sites d'implantation au niveau des cornes utérines ainsi que le nombre de corps jaunes au niveau des ovocytes. On a découvert que l'extrait d'*Arnebia euchroma* diminue le nombre de sites d'implantation de façon dose dépendante. Cependant il n'y a pas d'influence du traitement sur le nombre de corps jaunes.

Sur d'autres souris, l'extrait d'*Arnebia euchroma* a été administré du jour 11 à 14 *post-coïtum* aux même concentrations que précédemment. Les souris ont ensuite été sacrifiées au jour 18 pour étudier l'état du fœtus. Le nombre de fœtus viables est diminué de façon dose dépendante par l'extrait d'*Arnebia euchroma*.

Des souris auxquelles on a administré l'extrait d'*Arnebia euchroma* pendant les jours 1 à 4 *post-coïtum* ont été sacrifiées le jour 5 pour quantifier l'expression de la protéine Muc1 (Mucine1) possédant des propriétés anti-implantatoires. L'extrait d'*Arnebia euchroma* augmente de façon dose dépendante l'expression de cette protéine.

D'autres souris ayant subit le traitement pendant 4 jours *post-coïtum* ont été accouplées 30 jours plus tard, le taux de grossesses du groupe traité était le même que celui du groupe témoin. Ceci montre que les effets contraceptifs d'*Arnebia euchroma* sont réversibles.

#### 5.15. Propriétés diverses

En 2009, Yuan *et al.* ont testé l'effet de la shikonine sur des souris auxquelles ont été implantés des fragments d'endomètre humains prélevés sur des femmes souffrant d'endométriose. Les souris ont été divisées en 5 groupes, un groupe témoin recevant un traitement oral par DMSO, un groupe recevant une injection sous cutanée de 30µg/kg de

tryptoréline, et 3 groupes recevant de la shikonine par voie orale aux doses de 2,5, 5 et 10mg/kg pendant 28 jours. Ils ont trouvé que la shikonine réduisait la taille des lésions de l'endomètre et que le tissu présentait des traces d'atrophie. Ils ont également mesuré une augmentation de la concentration de mRANTES dans le liquide péritonéal des souris traitées par la shikonine.

Ils ont ensuite utilisé les cellules de la lignée U937, des cellules humaines mésothéliales du péritoine et des cellules stromales de l'endomètre (ESC) pour identifier le mécanisme d'action de la shikonine. En mesurant la concentration de mRANTES, ils ont confirmé que la shikonine inhibe la sécrétion de mRANTES. De plus, ils ont mesuré que la shikonine inhibe le chimiotactisme des cellules U937 provoqué par RANTES de façon dose dépendante. De plus, l'inhibition de mRANTES est éliminée par l'addition d'immunoglobuline mRANTES dans le milieu.

En 2010, Lee *et al.* ont démontré que la shikonine diminue l'expression de marqueurs de surface des cellules dendritiques de la moelle osseuse induite par l'ovalbumine et la lymphopoiétine de stroma thymique et les cellules ainsi traitées stimulent moins les lymphocytes T CD4 et que ceux stimulés ont une production de cytokines inférieure à celle des lymphocytes stimulés par des cellules non traitées. Ils ont ensuite testé la shikonine sur un modèle murin d'asthme. Ils ont constaté que la shikonine diminue l'inflammation trachéale provoquée par allergène.

En 2012, Yoshihisa *et al.* ont testé l'effet protecteur de l'alkannine et la shikonine sur les cellules HaCaT (kératinocytes humains) exposées aux UVB. Les deux molécules ont augmenté la concentration de protéines de choc thermique HSP70 dans les cellules et ont diminué le taux d'apoptose chez les cellules exposées de façon significative. De plus les auteurs ont détecté que les UVB augmentent l'activité des caspases dans les cellules exposées et que les naphthoquinones testées ont pour effet de diminuer l'activation des caspases. Ils ont ensuite confirmé que l'augmentation de la viabilité des cellules est due à l'augmentation de l'expression des protéines de choc thermique en utilisant un inhibiteur qui a annulé l'effet protecteur des molécules testées. De plus ils ont observé que l'alkannine empêche la translocation nucléaire de NfκBα. Les auteurs ont conclu que l'alkannine protège les cellules des rayons UVB en augmentant l'expression de HSP70 par des mécanismes n'étant pas encore définis.

En 2013, Li *et al.* ont testé la shikonine sur des lymphocytes T humains. Ils ont constaté que la shikonine inhibe la prolifération des lymphocytes engendrée par OKT/CD28 et PMA/ionomycine sans altérer la viabilité des cellules. Le traitement par la shikonine s'accompagne d'une diminution de la stimulation de la sécrétion d'IL-2 et de IFN $\gamma$  et du passage des cellules en phase S. L'expression des marqueurs CD69, CD71 et CD25 qui sont exprimés lors du passage de la phase G1 à la phase S a également été diminuée par le traitement par la shikonine. Ils remarquent que l'expression de NF $\kappa$ B est diminuée par la shikonine en raison de l'inhibition de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ . IKK $\beta$ , l'enzyme responsable de la phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$ , est inhibée par la shikonine.

Ils ont ensuite observé l'effet de la shikonine sur les MAP kinases ERK, JNK et p38 et ont découvert que la shikonine inhibe la phosphorylation réalisée par JNK, ce qui peut avoir des effets sur la réponse immunitaire impliquant les lymphocytes T. Les auteurs concluent cependant que l'effet de la shikonine est principalement liée à l'inhibition de IKK $\beta$ .

En 2014, Wang *et al.* ont testé le potentiel de la shikonine à inhiber la dégranulation mastocytaire induite par les IgE ou les ionophores de calcium chez les cellules de la lignées 2H3. Ils ont mesuré lors de cette inhibition la diminution de la production de TNF $\alpha$  ainsi que la diminution des ARNm codant pour les récepteurs nucléaires de la famille 4a (Nr4a1 et Nr4a2 jouent un rôle dans la régulation du TNF $\alpha$  par les IgE). De plus, par modélisation informatique, ils ont découvert que les sites de liaison de la shikonine aux immunophilines sont proches de ceux de la cyclosporine A et que la shikonine inhibe l'expression de la calcineurine de façon comparable à la cyclosporine A. Ceci amène les auteurs à envisager l'utilisation de la shikonine dans les pathologies allergiques.

#### 5.16. Toxicité

En 1975, Ames *et al.* ont testé la mutagénicité de l'alkannine et de ses esters et ont conclu que ces molécules ne sont pas mutagènes (Papageorgiou *et al.* 1999).

En 2014, Su *et al.* ont administré l'extrait éthanolique d'*Arnebia euchroma* à des rats Wistar aux doses de 200, 400 et 800 mg/kg par jour pendant 180 jours. Ils ont procédé à des analyses biologiques et hématologiques pendant cette période et on ensuite examiné les organes des rats à la fin de la période et n'ont constaté aucune toxicité. En 1971, une expérience similaire a été réalisée par Majlathova *et al.* en incluant 1% d'alkannine dans l'alimentation de souris

pendant 15 semaines. Ceux-ci n'avaient pas non plus observé de signes de toxicité à l'issu de cette expérience. Une expérience similaire a été réalisée par Hayashi *et al.* en 1977 avec la shikonine et l'acétylshikonine et les résultats de l'expérience ont été similaires. Cependant, Hayashi *et al.* ont montré la même année que la shikonine et l'acétylshikonine sont toxiques quand elles sont administrées par voie intra-péritonéale.

Composé	Voie d'administration	DL50 (mg/kg)
Shikonine	intra-péritonéale	20
Alkannine	orale	3000
Acétylshikonine	intra-péritonéale	41

Tableau 7: DL50 de différents dérivés de la shikonine/alkannine chez les souris ( Papageorgiou *et al.* , 1999)

Par ailleurs, *Arnebia euchroma* contient deux alcaloïdes pyrrolizidiniques, la O-7-angeloylrétronécine et de la O-9-angéloylrétronécine. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques sont connu pour entraîner l'apparition de tumeurs hépatiques. Cependant ces alcaloïdes sont en faible quantité dans *Arnebia euchroma* (0,0006% de la masse), et aucune toxicité n'a été mise en évidence avec cette plante.

## Conclusion

Les propriétés pour lesquelles *Arnebia euchroma* est traditionnellement utilisée ont été étudiées et confirmées par la recherche moderne. Cette plante récemment inscrite à la pharmacopée française pourrait donc être utilisée en phytothérapie, notamment comme cicatrisant. Cependant, l'existence de plantes locales répondant déjà à cette indication laisse s'interroger sur l'intérêt de l'usage d'*Arnebia euchroma* dans le cadre de la cicatrisation.

Malgré cette compétition avec les plantes françaises dans le cadre de l'usage en phytothérapie, *Arnebia euchroma* présente un intérêt dans le cadre de la production de certaines molécules, notamment les naphthoquinones de la famille des shikonines présentant un intérêt dans la recherche contre le cancer. Cet intérêt pour la production de molécules à but thérapeutique a provoqué le dépôt de plusieurs brevets concernant cette plante.

## Bibliographie :

- Ali A., Assimopoulou A.N., Papageorgiou V.P., Kolodziej H. (2011). Structure/antileishmanial activity relationship study of naphthoquinones and dependency of the mode of action on the substitution patterns. *Planta Medica*, 77(18):2003-12
- Ali H., Qaiser M.(2009). The ethnobotany of Chitral valley, Pakistan with particular reference to medicinal plants. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4): 2009-2041,
- Aliasl J., Khoshzaban F., Barikbin B., Naseri M., Kamalinejad M., Emadi F., Razzaghi Z., Talei D., Yousefi M., Aliasl F., Barati M., Mohseni-Moghaddam P., Abbas Hasheminejad S., Nami H.E. (2014). Comparing the Healing Effects of *Arnebia euchroma* Ointment With Petrolatum on the Ulcers Caused by Fractional CO<sub>2</sub> Laser: A Single-Blinded Clinical Trial. *Iran Red Crescent Medical Journal*, 16(10)
- Aliasl J., Khoshzaban F. (2013 ) Traditional Herbal Remedies for Burn Wound Healing in Canon of Avicenna. Jundishapur. *Journal of Natural Pharmaceutical Product*, 8(4), 192-6.
- Andújar I., Recio M.C., Bacelli T., Giner R.M., Ríos J.M.(2010). Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with I $\kappa$ B $\alpha$  degradation thus inhibiting translocation of NF- $\kappa$ B to the nucleus. *British Journal of Pharmacology*, 160, 376-388
- Andújar I., Ríos J.L., Giner R.M., Recio M.C. (2013). Pharmacological Properties of Shikonin – A Review of Literature since 2002. *Planta Medica*, 79(18), 1685-1697
- Ashkani-Esfahani S., Hossein Imanieh M., Meshksar A., Khoshneviszadeh M., Noorafshan A., Geramizade B., Ebrahimi S., Handjani F., Nadimi E. (2012). Enhancement of Fibroblast Proliferation, Vascularization and Collagen Synthesis in the Healing Process of Third-Degree Burn Wounds by Topical *Arnebia euchroma*, a Herbal Medicine. *Ghana Medical Journal*, 1(2), 53-59
- Ballabh B., Chaurasia O.P., Ahmed Z., Bala Singh S. (2008) Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh-Used against kidney and urinary disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 331-339
- Botineau M. *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Editions TEC&DOC. 2010
- Chang I.C., Huang Y.J., Chiang T.I., Yeh C.W., Hsu L.S. (2010). Shikonin Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species/Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway in Osteosarcoma Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), 816-824
- Chang M.J., Huang G.J., Ho Y.L., Lin I.H., Huang S.S., Chang T.N., Chang H.Y., Chang Y.S. (2008). Study on the Antioxidant Activities of Crude Extracts from the Roots of *Arnebia euchroma* and *Lithospermum erythrorhizon*.
- Chen Y.W. *Le manuel illustré des plantes médicinales chinoises*. Edition You Feng 2010

- Chen Y., Zheng L., Liu J., Zhou Z., Cao X., Lv X., Chen F. (2014) Shikonin inhibits prostate cancer cells metastasis by reducing matrix metalloproteinase-2/-9 expression via AKT/mTOR and ROS/ERK1/2 pathways. *International Immunopharmacology*, 21(2), 447–455
- Chen X., Yang L., Zhang N., Turpin J.A., Buckheit R.W., Osterling C., Oppenheim J.J., Howard O.M.Z. (2003) Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine, Inhibits Chemokine Receptor Function and Suppresses Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(9), 2810–2816
- Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, Hu X. (2011). Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene*, 30(42), 4297-4306
- Cheng H.M., Qiu Y.K., Wu Z., Zhao Y.F. (2011). DNA damage induced by shikonin in the presence of Cu(II) ions: potential mechanism of its activity to apoptotic cell death. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(1), 12-19
- Dai Q., Fang J., Zhang F.S. (2009). Dual role of shikonin in early and late stages of collagen type II arthritis. *Molecular Biology Reports*, 36(6), 1597-1604
- Damianakos H., Kretschmer N., Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Bauer R, Chinou I. (2012). Antimicrobial and Cytotoxic Isohexenylnaphthazarins from *Arnebia euchroma* (Royle) Jonst. (Boraginaceae) Callus and Cell Suspension Culture, *Molecules*, 17(12), 14310-14322
- Davydenkov V. N., Patudin A.V., Popov Y.G., Rabinovich S.A., Miroshnikov A.I. (1991). Cultured *Arnebia-euchroma* (Royle) Jonst cells, a new source of shikonin production. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 25(1), 53-55.
- Deng Y.H., Wang H.L., Han L. (2008). Isolation, purification and biological activities of *Arnebia euchroma* glycosaminoglycans. *Zhong Yao Cai*, 31(5), 753-6
- Deqiu F., Songsheng H., Xingming L., Hechun Y., Guofeng L. (1994). Effect of nutritional factors on cell growth and shikonin derivative formation in suspension cultures of *Arnebia euchroma* cells. *Journal of Wuhan botanical research*, 4.
- Ding X, Yin B, Qian L, Zeng Z, Yang Z, Li H, Lu Y, Zhou S. (2011). Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Medical Microbiology*, 60, 1827–1834
- Eberhardt E., Bernhard Dickore W., Miede G. (2007). Vegetation map of the Batura valley (Hunza Kaeakorum, north Pakistan) . *Erdkunde Band*, 61(1), 93-112
- Esmailzadeh E., Gardaneh M., Gharib E., Sabouni F. (2013). Shikonin protects dopaminergic cell line PC12 against 6-Hydroxydopamine-Mediated neurotoxicity Via both Glutathione-Dependent and independent pathways and by inhibiting apoptosis. *Neurochemical research*, 38(8), 1590-1604.
- Fahy E., Subramaniam S., Brown H.A., Glass C.K., Merrill A.H., Murphy R.C., Raetz C.R., Russell D.W., Seyama Y., Shaw W., Shimizu T., Spenser F., Van Meer G., VanNieuwenhze

- M.S., White S.H., Witztum J.L., Dennis EA. (2005) A comprehensive classification system for lipids, *Journal of Lipid Research*, 46(5), 839-861
- Fan H., Yang M., Che X., Zhang Z., Xu H., Liu K., Meng Q. (2012). Activity study of a hydroxynaphthoquinone fraction from *Arnebia euchroma* in experimental arthritis. *Fitoterapia*, 83(7), 1226-1237
- Fan H.Y., Zhang Z.L., Liu K., Yang M.Y., Lv W.H., Che X., Xu H., Song W.W. (2013). Effectiveness of a hydroxynaphthoquinone fraction from *Arnebia euchroma* in rats with experimental colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 19(48), 9318-9327
- Fèvre F., Métaillé G. *Dictionnaire RICCI des plantes de chine*. Editions du Cerf. 2005
- Fu S.L., Shang T.M., Xiao P.M. (1984). Analysis of naphthoquinone pigments in some chinese medicinal "ZiCao". *Arnebia euchroma*, *Acta Pharmaceutica Sinica*, 19(12), 921-925
- Fu X.Q., Lu D.W. (1999) Stimulation of shikonin production by combined fungal elicitation and *in situ* extraction in suspension cultures of *Arnebia euchroma*. *Enzyme and Microbial Technology*. 24(5-6), 243-246
- Fujii N., Yamashita Y., Arima Y., Nagashima M., Nakano H. (1992) Induction of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by the Plant Naphthoquinones Plumbagin and Shikonin. *Antimicrobial agents en chemotherapy*, 36(12), 2589-2594
- Gairola S., Sharma J., SinghBedi Y. (2014). A cross-cultural analysis of Jammu, Kashmir and Ladakh (India) medicinal plant use. *Journal of Ethnopharmacology*, 155, 925–986
- Gao D., Hiromura M., Yasui H., Sakurai H. (2002). Direct Reaction between Shikonin and Thiols Induces Apoptosis in HL60 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(7), 827-832
- Gao H., Liu L., Qu Z.Y., Wei F.X., Wang S.Q., Chen G., Qin L., Jiang F.Y., Wang Y.C., Shang L., Gao C.Y. (2011) Anti-adenovirus Activities of Shikonin, a Component of Chinese Herbal Medicine in Vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(2), 197-202
- Ge F., Yuan X., Wang X., Bing Z., Wang Y. (2006). Cell growth and shikonin production of *Arnebia euchroma* in a periodically submerged airlift bioreactor. *Biotechnology Letters* 28, 525–529
- Ge-ling Z., Riedl H., Kamelin ..*Flora of China (Gentianaceae through Boraginaceae)*. Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis 1995.
- Gwon S.Y., Ahn J.Y., Jung C.H., Moon B.K., Ha J.K. (2013). Shikonin suppresses ERK 1/2 phosphorylation during the early stages of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 207-215
- Haghbeen K., Pourmolaei S., Mareftjo M.J., Mousavi A., Akbari Noghabi K., Hosseini Shirazi F., Meshkat A. (2011) Detailed Investigations on the Solid Cell Culture and Antimicrobial Activities of the Iranian *Arnebia euchroma*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 165852, 8 pages

- Han W., Xie J., Fang Y., Wang Z., Pan H. (2012). Nec-1 Enhances Shikonin-Induced Apoptosis in Leukemia Cells by Inhibition of RIP-1 and ERK1/2. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 7212-7225
- Hao M., Zhao L., Li C., Shang Q., Lu H., Fu Z., Li W., Jiang Y., Cao Y. (2012). Inhibitory Effect of Shikonin on *Candida albicans* Growth. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 11 (35), 1956-1963.
- Hao Z., Qian J. and Yang J. (2015). Shikonin induces apoptosis and inhibits migration of ovarian carcinoma cells by inhibiting the phosphorylation of Src and FAK. *Oncology letters*, 9(2), 629-633
- Hou Y., Guo T., Wu C., He X., Zao M. (2006). Effect of shikonin on human breast cancer cells proliferation and apoptosis In Vitro. *Yakugaku Zasshi*, 126(12), 1383-1386
- Hsiao C.Y., Tsai T.H., Chak K.F. (2012). The Molecular Basis of Wound Healing Processes Induced by *Lithospermi Radix*: A Proteomics and Biochemical Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 508972
- Huang C S., Lin A.H., Yang, T.C., Liu K.L., Chen H.W., Lii C.K. (2015). Shikonin inhibits oxidized LDL-induced monocyte adhesion by suppressing NFκB activation via up-regulation of PI3K/Akt/Nrf2-dependent antioxidation in EA. hy926 endothelial cells. *Biochemical pharmacology*, 93(3), 352-361.
- Hu C.M., Cheng Y.W., Cheng H.W., Kang J.J. (2004). Impairment of vascular function of rat thoracic aorta in an endothelium-dependent manner by shikonin/alkannin and derivatives isolated from roots of *Macrotomia euchroma*. *Planta Medica*, 70(1):23-8.
- Huang C., Luo Y., Zhao J., Yang F., Zhao H., Fan W., Ge P. (2013). Shikonin Kills Glioma Cells through Necroptosis Mediated by RIP-1. *Plos One*, 8(6), e66326
- Jang S.Y., Jang E.H., Jeong S.Y., Kim J.H. (2014). Shikonin inhibits the growth of human prostate cancer cells via modulation of the androgen receptor. *International Journal of Oncology*, 44(5), 1455-1460
- Kaith B.S., Kaith N.S., Chauhan N.S. (1996). Anti-inflammatory effect of *Arnebia euchroma* root extracts in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 55, 77-80
- Kashiwada Y., Nishizawa M., Yamagishi T., Tanaka T., Nonaka G., Cosentino L.M., Snider J.V., Lee K. (1995). Anti-AIDS agents. Sodium and potassium salts of caffeic acid triterpenes from *Arnebia euchroma* as anti-HIV agents. *Journal of Natural Products*. 58(3), 392-400.
- Kassam K.A., Karamkhudoeva M., Ruelle M., Baumflek M. Indigenous Knowledge of Medicinal Plant Use And Health Sovereignty: Findings from the Tajik and Afghan Pamirs. CIIFAD-IARD Seminar. October 13th, 2010
- Kawakami N., Koyama Y., Tanaka J., Ohara A., Hayakawa T., Fujimoto S. (1996). Inhibitory effect of acetylshikonin on the activation of NADPH oxydase in polymorphonuclear leukocytes in both whole cell and cell-free systems. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(10), 1266-1270

- Khatoon S., Mehrotra S. (2000). Pharmacognostical study of Japanese drug 'Nan-Shikon', root of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston growing in India. *Natural medicines*, 54(4), 171-177,
- Kim Y.O., Hong S.J., Yim S.V. (2010). The Efficacy of Shikonin on Cartilage Protection in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 14(4), 199-204
- Ko F.N., Lee Y.S., Kuo S.C., Chang Y.S., Teng C.M. (1995). Inhibition on platelet activation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchroma*. *Biochimica et biophysica acta*, 1268(3), 329-334.
- Kumar R., Sharma N., Malik S., Bhushan S., Kumar Sharma U., Kumari D., Kumar Sinha A., Sharma M., Singh Ahuja P. (2011). Cell suspension culture of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston – A potential source of naphthoquinone pigments *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(25), 6048-6054
- Kuo H.M., Hsia T.C., Chuang Y.C., Lu H.F., Lin S.Y., Chung J.G. (2004). Shikonin inhibits the growth and N-acetylation of 2-aminofluorene in *Helicobacter pylori* from ulcer patients. *Anticancer Research*, 24(3a), 1587-1592
- Lee C.C., Wang C.N., Lai Y.T., Kang J.J., Liao J.W., Chiang B.L., Chen H.C., Cheng Y.W. (2010). Shikonin inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and suppresses allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *British Journal of Pharmacology*, 161(7), 1496–1511
- Lee H.J., Magesh V., Nam D., Lee E.O., Ahn K.S., Jung M.H., Ahn K.S., Kim D.K., Kim J.Y., Kim S.H. (2008). Shikonin, acetylshikonin and isobutyrylshikonin inhibit VEGF-induced angiogenesis and suppress tumor growth in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *Yakugaku Zasshi*, 128(11), 1681-1688
- Li T., Yan F., Wang R., Zhou H., Liu L. (2013). Shikonin Suppresses Human T Lymphocyte Activation through Inhibition of IKK $\alpha$  Activity and JNK Phosphorylation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 379536, 13 pages
- Li H.M., Tang Y.L., Zhang Z.H., Liu C.J., Li H.Z., Li R.T., Xia X.S. (2012). Compounds from *Arnebia euchroma* and their related anti-HCV and antibacterial activities. *Planta Medica*, 78(1), 39-45
- Liu J.H., Sun H., Fa Y.Y. (2004). Comparative Study on Effects of *Arnebia Euchroma* (Royle) Johnston Granular and Decoction Forms on Medical Abortion with Mifepristone and Misoprostol. *Journal of Reproduction & Contraception*, 15(2), 95-100.
- Liu H., Jin Y.S., Song Y., Yang X.N., Yang X.W., Geng D.S., Chen H.S. (2010). Three new compounds from *Arnebia euchroma*. *Journal of Asian natural products research*. 12 (4), 286-292
- Liu J., Zhou W., Li S.S., Sun Z., Lin B., Lang Y.Y., He J.Y., Cao X., Yan T., Wang L., Lu J., Han Y.H., Cao Y., Zhang X., Zeng J.Z. (2008). Modulation of Orphan Nuclear Receptor

- Nur77-mediated Apoptotic Pathway by Acetylshikonin and Analogs. *Cancer Research*, 68(21), 8871-8880
- Liu T., Ma C., Yang L, Wang W, Sui X, Zhao C and Zu Y. (2013). Optimization of Shikonin Homogenate Extraction from *Arnebia euchroma* using Response Surface Methodology. *Molecules*, 18, 466-481
- Long S., GuangZhi Y., BaoJie G., Weil X., YanYong H., YingLi W., Yang Z., LiHua L. (2012). Shikonin Derivatives Protect Immune Organs from Damage and Promote Immune Responses In Vivo in Tumour-bearing Mice. *Phytotherapy Research*, 26(1), 26-33
- Lu L., Qin A., Huang H., Zhou P., Zhang C., Liu N., Li S., Wen G., Zhang C., Dong W., Wang X., Ping Q., Liu J. (2011). Shikonin extracted from medicinal Chinese herbs exerts antiinflammatory effect via proteasome inhibition. *European Journal of Pharmacology*, 658(2-3), 242-247
- Malik S., Bhushan S., Sharma M., Singh Ahuja P. (2011). Physico-chemical factors influencing the shikonin derivatives production in cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston, a medicinally important plant species. *Cell Biology International*, 35(2), 153-158
- Manjkhola S., Dhar U., Joshi M. (2005). Organogenesis, embryogenesis, and synthetic seed production in *Arnebia euchroma*-a critically endangered medicinal plant of the himalaya. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(3), 244-248
- Mao X., Yu C.R., Li W.H., Li W.X. (2008). Induction of apoptosis by shikonin through a ROS/JNKmediated process in Bcr/Abl-positive chronic myelogenous leukemia (CML) cells. *Cell Research*, 18, 879-888
- Michaelakis A., Strongilos A.T., Bouzas E.A., Koliopoulos G., Couladouros E.A. (2009). Larvicidal activity of naturally occurring naphthoquinones and derivatives against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 104, 657-662
- Öberg A.I., Yassin K., Csikasz R.I., Dehvari N., Shabalina I.G., Hutchinson D.S., Wilcke M., Östenson C.G., Bengtsson T. (2011). Shikonin Increases Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells and Improves Plasma Glucose Levels in Diabetic Goto-Kakizaki Rats. *Plos One*, 6(7), e22510
- Ohene-Agyei T., Mowla R., Rahman T., Venter H. (2014). Phytochemicals increase the antibacterial activity of antibiotics by acting on a drug efflux pump. *Microbiologyopen*, 3(6), 885-896
- Ozaki Y., Ohno A., Abe K., Saito Y., Satake M. (1993). Comparative Study on the Accelerative Effect of "Koushikon" and "Nanshikon" and Their Constituents on Proliferation of Granuloma Tissue in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16(7), 683-685
- Ozaki Y., Ohno A., Saito Y., Satake M. (1994). Accelerative Effect of Shikonin, Alkannin and Acetylshikonin on the Proliferation of Granulation Tissue in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17(8), 1075-1077

- Papageorgiou V.P., Assimopoulou A.N., Couladouros E.A., Hepworth D., Nicolaou K.C. (1999). The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin. Natural Products. *Angewandte Chemie*, 38, 270-300
- Pirbalouti A.G., Malekpoor F., Hamed B. (2012). Ethnobotany and antimicrobial activity of medicinal plants of Bakhtiari Zagross mountains, Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(5), 675-679
- Prangsaengtong O., Park J.W., Inujima A., Igarashi Y., Shibahara N., Koizumi K. (2013) Enhancement of Lymphangiogenesis *In Vitro* via the Regulations of HIF-1 $\alpha$  Expression and Nuclear Translocation by Deoxyshikonin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , Article ID 148297, 11 page
- Qu D., Chen Y., Xu X.M., Zhang M., Zhang Y., Li S.Q. (2015). Cbl-b-regulated extracellular signal-regulatedkinase signaling is involved in the shikonin-inducedapoptosis of lung cancer cells *in vitro*. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(4), 1265-1270
- Rajaei P., Maassoumi A.A., Mozaffarian V., Nejad Sattari T., Pourmirzaei A. (2011). Alpine flora of Hezar mountain (SE Iran). *Rostaniha*, 12(2), 111-127
- Ren S ., Wang X., Maa B., Yuana Q., Zhanga H., Yua X., Hao A. (2011). Arnebia preventing the expression of Mucl protein decrease results in anti-implantation in early pregnant mice. *Contraception*, 83(4), 378-384
- Roöder E., Rengel-Mayer B. (1993). Pyrrolizidine Alkaloids from *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*, 59(2), 192
- Sasaki H., Yoshizaki F. (2002). In Vitro Antifungal Activity of Naphthoquinone Derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 669-670
- Sharma N., Sharma U.K., Malik S., Bhushan S., Kumar V., Chandra S., Naina V., Sharma. N., Sharma M., Sinha A.K. (2008). Isolation and purification of acetylshikonin and b-acetoxyisovalerylshikonin from cell suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using rapid preparative HPLC. *Journal of Separation Science*,31(4), 629-635
- Shen C.C., Syu W.J., Li S.Y., Lin C.H., Lee G.H., Sun C.M. (2002) Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma*. *Journal of Natural Products*, 65(12), 1857-1862
- Shi S., Cao H. (2014). Shikonin promotes autophagy in BXPC-3 human pancreatic cancer cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncology letters*, 8(3), 1087-1089
- Singh K.N., Lal B., Chand G., Todaria N.P. (2012). Ecological features and conservation of *Arnebia euchroma*. a critically endangered medicinal plant in western Himalaya. *International journal of conservation science*,3(3), 189-198
- Singh R.S., Gara R.K., Bhardwaj P.K., Kaachra A., Malik A., Kumar R., Sharma M., Ahuja P.S., Kumar S. (2010). Expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, p-hydroxybenzoate-m-geranyltransferase and genes of phenylpropanoid pathway exhibits

positive correlation with shikonins content in arnebia [*Arnebia euchroma* (Royle) Johnston]. *BMC Molecular Biology*, 11, 88-99

-Singh L.K., Maheshwari DK, Shukla S. (2015). Antibacterial effect of butyryl alkannin from *Arnebia euchroma* against vancomycin-resistant pathogens of *Enterococcus faecalis* causing urinary tract infections. *Natural products research*, 30, 1-3

-Su L., Liu L., Wang Y., Yan G., Zhang Y. (2014). Long-term systemic toxicity of shikonin derivatives in Wistar rats. *Pharmaceutical Biology*, 52, 486-490

-Subbaramaiah K., Bulic P., Lin Y., Dannenberg A.J., Pasco D.S. (2001). Development and use of a gene promoter-based screen to identify novel inhibitors of cyclooxygenase-2 transcription. *Journal of Biomolecular Screening*, 6(2), 101-110

-Sykłowska-Baranek K., Pietrosiuk A., Naliwajski M., R., Kawiak A., Jeziorek M., Wyderska S., Chinou I. (2012). Effect of l-phenylalanine on PAL activity and production of naphthoquinone pigments in suspension cultures of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48(5), 555-564.

-Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., Cichosz M., Pietrosiuk A. (2014). Liquid Perfluorodecalin Application for In Situ Extraction and Enhanced Naphthoquinones Production in *Arnebia euchroma* Cell Suspension Cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2618–2627

-Takano-Ohmuro H., Yoshida L.S., Irie K., Himi T., Yuda Y., Kawada T. (2009). Effects of shikonin on the acetylcholine-induced relaxation response of vascular smooth muscle. *Journal of pharmacological sciences*, 109, 199.

-Terada A., Tanoue Y., Hatada A., Sakamoto H. (1983). Total synthesis of shikalkin [(±)-shikonin] *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 18, 987-988

-Tung N.H., Du G.J., Yuan C.S., Shoyama Y., Wang C.Z. (2013). Isolation and chemopreventive evaluation of novel naphthoquinone compounds from *Alkanna tinctoria*. *Anticancer Drugs*, 24(10), 1058-68

-Wada N., Kawano Y., Fujiwara S., Kikukawa Y., Okuno Y., Tasaki M., Hata H. (2015). Shikonin, dually functions as a proteasome inhibitor and a necroptosis inducer in multiple myeloma cells. *International journal of oncology*, 46(3), 963-972.

-Wang R., Guo H., Cui J., Li S. (2012). A novel and efficient total synthesis of shikonin *Tetrahedron Letters*, 53(31), 3977-3980

-Wang J.P., Tsao L.T., Raung S.L., Mei F, Sheng H., Kuo C.(1997) Investigation of the inhibition by acetylshikonin of the respiratory burst in rat neutrophils. *British Journal of Pharmacology*, 121(3), 409-416.

-Wang F., Pharmaceuticals comprising shikonins as active constituent Designated Contracting States : AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LI LU MC NL PT SE SI SK TR. Application number: 03815939.8, date : 21.02.2003

- Wang X.C., Feng J., Huang F., Fan Y.S., Wang Y.Y., Cao L.Y., Wen C.P. (2009). Effects of Shikonin Isolated from Zicao on Lupus Nephritis in NZB/W F1 Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(9), 1565-1570
- Wang X., Dou Q.P., Liu J. (2009). Shikonin exerts antitumor activity via proteasome inhibition and cell death induction *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2450-2459
- Wang Y., Pan W.L., Liang W.C., Law W.L., Ip D.T.M., Ng T.B., Miu-YeeWaye M., Chi-CheongWan D. (2013). Acetylshikonin, a Novel AChE Inhibitor, Inhibits Apoptosis via Upregulation of Heme Oxygenase-1 Expression in SH-SY5Y Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 937370, 11 pages
- Wang S., Guo L.P., Xie T., Yang J., Tang J.F., Li X., Wang X., Huang L.Q. (2014). Different secondary metabolic responses to MeJA treatment in shikonin-proficient and shikonin-deficient cell lines from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 119(3), 587-598
- Wang L., Li F., Liu X., Chen B., Yu K., Wang M.K. (2015). Meroterpenoids and a naphthoquinone from *Arnebia euchroma* and their cytotoxic activity. *Planta Medica*, 81(4), 320-326
- Wenjing L., Shengbang W., Weiqing G., Heyong W., Songwen Z. (2014). Mechanisms Behind the Inhibition of Lung Adenocarcinoma Cell by Shikonin. *Cell Biochemistry and Biophysic*, 70, 1459-1467
- Wiench B., Eichhorn T., Paulsen M., Efferth T. (2012). Shikonin Directly Targets Mitochondria and Causes Mitochondrial Dysfunction in Cancer Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 726025, 15 pages
- Wu H., Xie J., Pan Q., Wang B., Hu D., Hu X. (2013). Anticancer Agent Shikonin Is an Incompetent Inducer of Cancer Drug Resistance. *Plos One*, 8(1), e52706
- Wu Z., Wu L., Li L., Tashiro S., Onodera S., Ikejima T. (2004). p53-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Shikonin via a Caspase-9-Dependent Mechanism in Human Malignant Melanoma A375-S2 Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(2), 166-176
- Xiong W., Luo G., Zhou L., Zeng W., Yang W. (2009). *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of acetylshikonin isolated from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst (Ruanzicao) cell suspension cultures. *Chinese Medicine*, 4(14),
- Yang J.T., Li Z.L., Wu J.Y., Lu F.J., Chen C.H. (2014). An Oxidative Stress Mechanism of Shikonin in Human Glioma Cell. *Plos One*, 9(4), e94180
- Yang H., Zhou P., Huang H., Chen D., Ma N., Cui C.Q., Shen S., Dong W., Zhang X., Lian W., Wang Y., Dou Q.P., Liu J. (2009). Shikonin Exerts Antitumor Activity via Proteasome Inhibition and Cell Death Induction *in vitro* and *in vivo*. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2450-2459

- Yang F., Ding S., Liu W., Liu J., Zhang W., Zhao Q., Ma X. (2015). Antifungal activity of 40 TCMs used individually and in combination for treatment of superficial fungal infections. *Journal of ethnopharmacology*, 163, 88-93.
- Yang M.H., Blunden G., O'Neill M.J., Lewis J.A. (1992). Tormentic Acid and 2 $\alpha$ -Hydroxyursolic Acid from *Arnebia euchroma*. *Planta Medica*. 58(2), 227
- Yao X.S., Yutaka E., Hiroshi N., Fumi-yuki K., Yoichi I., Ushio S. (1983). Structure of arnebinol, a new ansa-type monoterpenylbenzenoid with inhibitory effect to prostaglandin biosynthesis *Tetrahedron Letters*, 24(23), 2407-2410
- Yao X.S., Yutaka E., Hiroshi N., Fumi-yuki K., Haruo S., Ushio S. (1984) Structure of arnebifuranone, a new monoterpenylbenzoquinone from *Arnebia euchroma* *Tetrahedron Letters*, 25(48), 5541-5542,
- Yao X.S., Ebizuka Y., Noguchi H., Kiuchi F., Shibuya M., Iitaka Y., Seto H., Sankawa U. (1991). Biologically active constituents of *Arnebia euchroma* structures of new monoterpenylbenzoquinones: arnebinone and arnebifuranone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(11), 2962-2964
- Yin S.Y., Peng A.P., Huang L.T., Wang Y.T., Lan C.W., Yang N.S. (2013). The Phytochemical Shikonin Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Skin Wound Healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 262796, 13 pages
- Yong-Hua, Y., Jun, L., Qun-Hua, Z., & Ri-Qiang, C. (1992). Effect of water extract of algae on growth and pigment formation in *Lithospermum erythrorhizon* and *Arnebia euchromu* cell cultures. *Journal of Plant Resources and Environment*, 4, 008
- Yoshida L.S., Kohri S., Tsunawaki S., Kakegawa T., Taniguchi T., Takano Ohmuro H., Fujii H. (2014). Evaluation of radical scavenging properties of shikonin. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 55 (2), 90-96
- Yoshihisa Y., Ali Hassan M., Furusawa Y., Tabuchi Y., Kondo T., Shimizu T. (2012). Alkannin, HSP70 Inducer, Protects against UVB-Induced Apoptosis in Human Keratinocytes. *Plos One*, 7(10), e47903
- Yuan D.P., Gu L., Long J., Chen J., Ni J., Qian N., Shi Y.L. (2009). Shikonin reduces endometriosis by inhibiting RANTES secretion and mononuclear macrophage chemotaxis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(3), 685-690
- Zeng Y., Liu G., Zhou L.M. (2009). Inhibitory effect of acetylshikonin on human gastric carcinoma cell line SGC-7901 *in vitro* and *in vivo*. *World Journal of Gastroenterology*, 15(15), 1816-1820
- Zhang F.L., Wang P., Liu Y.H., Liu L., Liu X.B., Li Z., Xue Y.X. (2013) Topoisomerase I Inhibitors, Shikonin and Topotecan, Inhibit Growth and Induce Apoptosis of Glioma Cells and Glioma Stem Cells. *Plos One*, 8(11), e81815.

-Zhang Z.L., Fan H.Y., Yang M.Y., Zhang Z.K., Liu K. (2014). Therapeutic effect of a hydroxynaphthoquinone fraction on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis *World Journal of Gastroenterology*, 20(41), 15310-15318

-Zhao Q., Kretschmer N., Bauer R., Efferth T. (2015). Shikonin and its derivatives inhibit the epidermal growth factor receptor signaling and synergistically kill glioblastoma cells in combination with erlotinib. *International Journal of cancer*; Accepted Article

Sitographie:

-(1)Tropicos <http://www.tropicos.org/> consulté le 25/08/2015

-(2)Hassler M.Catalogue of life.  
<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/21569613> consulté le 10/07/2015

-(3)eFlora.org [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=5&taxon\\_id=200018936](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=5&taxon_id=200018936)  
consulté le 11/05/2015

## **SERMENT DE GALIEN**

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



**TRANCART Clément**

**Arnebia euchroma (Royle) I. M. Johnston, une plante à naphthoquinones : de la médecine traditionnelle à la recherche .**

Th. D. Pharm., Rouen, 2015, 98 p.

---

**RESUME**

*Arnebia euchroma* (Royle) I.M. Johnston est une plante utilisée en médecine traditionnelle dans la région Himalayenne de l'Asie, principalement en raison de ses propriétés cicatrisantes. Ces propriétés ont entraîné l'inscription d'*Arnebia euchroma* dans la liste A des plantes médicinales de la pharmacopée française.

Les recherches sur les différentes propriétés de cette plante ont conduit à l'isolement de plusieurs molécules, en particulier des molécules de type shikonine et alkannine de la famille des naphthoquinones dont *Arnebia euchroma* semble être une source exploitable.

La shikonine et l'alkannine ont fait l'objet de nombreuses études en raison de leur cytotoxicité, laquelle en fait des molécules d'intérêt dans la recherche de nouvelles molécules actives contre les tumeurs. Cependant le mécanisme d'action de ces molécules n'est pas complètement élucidé et semble faire intervenir plusieurs mécanismes.

De plus les propriétés cicatrisantes d'*Arnebia euchroma* et de la shikonine paraissent en contradiction avec les propriétés cytotoxiques de la shikonine et de ses dérivés. L'étude des mécanismes d'action impliqués dans ces différentes propriétés doit être poursuivie.

---

**MOTS CLES** : Arnebia euchroma, shikonine, alkannine, médecine traditionnelle, extraction

---

**JURY**

Président : Mme SEGUIN Elisabeth

Membres : Mme GROULT Marie Laure

Mr ARVIS Luc

**DATE DE SOUTENANCE** : 28/09/2015