HAL
open science

Curcuma et curcumine : de l'histoire aux intérêts thérapeutiques

Jean-Pierre Jourdan

To cite this version:

Jean-Pierre Jourdan. Curcuma et curcumine : de l'histoire aux intérêts thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01517353

HAL Id: dumas-01517353

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01517353

Submitted on 3 May 2017

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 CAEN
ANNEE 2016

U.F.R. DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
INNOVATION PHARMACEUTIQUE et RECHERCHE

soutenu devant le Jury Interrégional

le 1 décembre 2015
par
Jean-Pierre JOURDAN

conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

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

JURY

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

A Monsieur Patrick Dallemagne,

Professeur à l'Université de Caen Normandie et directeur du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie

A Monsieur Christophe Rochais,

Professeur à l'Université de Caen Normandie

A Madame Véronique Lelong-Boulouard,

Maître de Conférence à l'Université de Caen Normandie – Praticien Hospitalier au CHU de Caen

A Madame Cécile Breuil,

Praticien Hospitalier au CHU de Caen

…

Qui me font l'honneur de lire ce manuscrit,

Et de juger ce travail,

En témoignage de ma profonde reconnaissance

…

Remerciements

Les remerciements de ce travail sont adressés aux personnes qui ont participé à ma formation de pharmacien et d'interne en pharmacie.

Patrick et Christophe, je vous remercie d'avoir été là dès mon arrivée à Caen. Vous avez toujours répondu à mes questions et vous m'avez aidé à construire ce parcours particulier d'interne IPR qui était alors une nouveauté pour l'ensemble de la Basse-Normandie. Je suis content de dire aux éventuels futurs internes IPR combien il fait bon d'étudier en face de votre bureau.

Merci à Marie-Lys, Stéphanie et Didier, avec qui j'ai passé une première année inoubliable à Bayeux. Vous me suivez encore et m'encouragez depuis le début, merci pour tout.

La vocation d'exercer ce métier me vient de plusieurs expériences professionnelles lors de rencontres avec différentes personnes. L'origine est située dans une petite pharmacie provençale lors d'un stage d'une semaine lorsque j'étais au collège, merci à Michel et Annie. Cet élan s'est concrétisé lors de nombreux stages réalisés pendant mes études chez Dominique à Draguignan. L'expérience la plus proche du terrain et la plus mémorable concernant le service au patient s'est déroulée chez Christian avec Fabienne et Céline. Vous demeurez pour moi des pharmaciens modèles au service de la santé du patient et acteurs dans leur vie quotidienne. Merci à vous.

J'ai passé 6 années à la fac de pharma Marseille et je remercie Claire, Barbara, Romain, Mélanie, Smaël sans qui ces années auraient perdu de leur charme. Et nous sommes amis encore aujourd'hui, merci les amis ! Je ne peux pas passer cette thèse sans remercier ma bichette, mon guigui, mon binôme de TP avec qui j'ai appris les fondamentaux de la pratique expérimentale entre autre !

Je veux également remercier ma famille qui m'a permis de progresser dans ces études jusqu'à un point non imaginé alors et qui ont su, malgré leur amour et le manque que cela a créé, m'encourager à partir rejoindre la Normandie pour effectuer mon « tant désiré » internat. Merci beaucoup pour tout !

Un internat de cinq ans ne se termine pas sans copains !! Alors je veux remercier chaleureusement ceux avec qui je passe encore des moments inoubliables : Jonnhy, Pauline, Noël, Marie, Antoine, Martine, Cam. Heureusement que vous êtes là !

Je ne peux poursuivre dans cette voie sans remercier Cécile que j'ai eu l'occasion de connaître pendant mon internat et sans qui un rapprochement avec l'hôpital pour cette dernière année d'internat qui s'annonce n'aurait pas été possible.

Je veux également remercier Michel pour ta bienveillance et ton écoute lors de multiples rendez-vous.

Sommaire

AVANT-PROPOS **5**

CHAPITRE I. LE CURCUMA **7**

1.1. HISTOIRE DU CURCUMA 9
1.2. TAXONOMIE ET DESCRIPTION BOTANIQUE 10
1.3. UTILISATIONS DU CURCUMA 11
1.3.1. Curcuma longa : huile essentielle 11
1.3.1.1. Procédé d'extraction 11
1.3.1.2. Utilisations de l'huile essentielle de curcuma 12
1.3.2. Curcuma longa : forme pulvérulente 14
1.3.2.1. Procédé d'obtention de la poudre de curcuma[17] 14
1.3.2.2. Le curcuma en cuisine 16
1.3.2.3. Curcuma utilisé en industrie 16
1.3.3. Curcuma : de la tradition à la pharmacologie 18
1.3.4. Curcuma utilisé en association 19

CHAPITRE II. LA CURCUMINE **21**

1. HISTOIRE **23**

2. ISOLEMENT DE LA CURCUMINE **24**

2.1 SYNTHESE DE LA CURCUMINE **25**

2.1.1. Biosynthèse 25
2.1.2. Synthèse organique de la curcumine 27

2.2 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES **30**

2.1.3. Structure de la curcumine : interactions intermoléculaires 30
2.1.4. Capacités de donneur et accepteur de liaisons Hydrogène. 30
2.1.5. Capacités d'adaptations structurales dues aux conformères de la curcumine 34
2.1.6. Propriétés chélatantes de cations métalliques et non métalliques multivalents 35
2.1.7. La curcumine : accepteur de Michael. 36
2.1.8. Solubilité et coefficient de partage (log P) 36
2.1.8.1. Solubilité de la Curcumine 37
2.1.8.2. Conséquences biochimiques de la lipophilie de la curcumine 37
2.1.8.2.1. Interactions curcumine-biomembranes 38
2.1.8.2.2. La curcumine, un pan-assay interference compound ou PAINS[143] 39
2.1.1. Stabilité de la curcumine 40
2.1.1.1. Modification et dégradation oxydative *in vitro* de la curcumine 40
2.1.1.2. Dégradations photochimiques de la curcumine 41
2.1.1.3. Dégradations chimiques de la curcumine 42
2.1.1.4. Conséquences de l'instabilité (photo)chimique de la curcumine pour les préparations pharmaceutiques 43

CHAPITRE III. PROPRIETES THERAPEUTIQUES DE LA CURCUMINE 44

1. CANCEROLOGIE 46

1.1. CARACTERISTIQUES COMMUNES AUX PROCESSUS TUMORAUX 46

1.2. CIBLES MOLECULAIRES DIRECTES DE LA CURCUMINE ET CONSEQUENCES PHARMACOLOGIQUES 48

1.2.1. Récepteurs de la famille ErbB 48

1.2.2. Les protéines kinases C 50

1.2.3. Enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines 51

1.2.4. Le récepteur à la vitamine D.[99] 52

1.2.5. Acide Désoxyribo Nucléique 53

2. MALADIE D'ALZHEIMER 55

2.1. GENERALITES SUR LA MALADIE D'ALZHEIMER 55

2.1.1. Enjeux économiques et médicaux 56

2.1.2. Sémiologie et critères diagnostiques 57

2.2. PHYSIOPATHOLOGIE ET CAUSES MOLECULAIRES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER 58

2.2.1. Des hypothèses pour mieux comprendre la maladie 59

2.2.1.1. Hypothèse cholinergique et les traitements actuels 59

2.2.1.2. L'hypothèse des protéines *Tubule-Associated Unit* (Tau) 61

2.2.1.3. L'hypothèse de la cascade amyloïde 61

2.2.2. Peptide amyloïde et plaques séniles 61

2.2.2.1. Protéine Précurseur de l'Amyloïde ou APP. 62

2.2.2.2. Le peptide *β*-amyloïde ou A*β*. 63

2.2.2.3. Du peptide A*β* aux plaques amyloïdes 65

2.2.2.3.1. Cinétique d'agrégation 65

2.2.2.3.2. La séquence ^{16}KLVFF^{20} responsable de l'agrégation 68

2.2.2.4. Toxicité des oligomères A*β* 68

2.2.2.4.1. Distribution de la taille des oligomères 68

2.2.2.4.2. Toxicité et taille des oligomères 69

2.2.3. Stress oxydatif 71

2.2.3.1. Stress oxydatif et oligomères A*β* 71

2.2.3.2. Mécanisme de toxicité 71

2.2.3.3. Hypothèse du stress oxydatif et mitochondrie 73

2.2.4. La protéine Tubule Associated Unit (Tau) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) 73

2.2.4.1. Structure et fonctions de la protéine Tau 74

2.2.4.2. Physiopathologie moléculaire de la protéine Tau 74

2.2.5. Neuroinflammation chronique 76

2.2.6. Vision globale multifactorielle de la cascade amyloïde 77

2.2.6.1. Formation de pores membranaires 78

2.2.6.2. Interaction A*β*/récepteurs membranaires 80

2.2.6.3. Interactions A*β*-métaux 81

3. PROPRIETES THERAPEUTIQUES DE LA CURCUMINE D'INTERET POUR LA MA 82

3.1. LES EFFETS NEUROPROTECTEURS DE LA CURCUMINE POUR LA MA 82

3.1.1. Effets sur la cascade amyloïde 83

3.1.1.1. Mode de fixation de la curcumine sur les entités amyloïdes 83
3.1.1.2. Evaluation de l'efficacité *in vitro* d'inhibiteurs d'agrégation β-amyloïde 85
3.1.2. Inhibition de la β-sécrétase BACE-1 87
3.1.3. Actions sur la protéine Tau 87
3.1.3.1. Interaction directe et désagrégation de Tau 87
3.1.3.2. Action indirecte de la curcumine sur la pathologie Tau : glycogène synthase kinase-3 β ou GSK-3β. 89
3.1.3.3. Evaluation de la puissance d'inhibiteurs d'agrégation de la protéine Tau 90
3.1.4. Action sur les phénomènes d'oxydation 91
3.1.4.1. Mécanisme antioxydant de la curcumine 91
3.1.4.2. Evaluation du pouvoir antioxydant de la curcumine 92
3.1.4.2.1. Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ou DPP·, méthode de Blois[5] 93
3.1.4.2.2. Activité de piégeage du radical anion superoxyde, méthode de Beauchamp et Fridovich[172] 94
3.1.4.2.3. Chélation du fer ferreux (Fe^{2+}) et du Zinc (Zn^{2+}), méthode de Dinis *et al.*[173] 94

CHAPITRE IV. BIODISPONIBILITE ET FORMULATION 96

1. CURCUMINE : ELEMENTS DE BIODISPONIBILITE 98

1.1. ABSORPTION DE LA CURCUMINE 98
1.2. DISTRIBUTION DE LA CURCUMINE 99
1.3. METABOLISME DE LA CURCUMINE 100
1.4. ELIMINATION ET DEMI-VIE[179] 101

2. AMELIORATION DE LA BIODISPONIBILITE 103

2.1. CURCUMINE UTILISEE EN CO-ADMINISTRATION AVEC LA PIPERINE. 103
2.2. CURCUMINE UTILISEE AVEC D'AUTRES DERIVES NATURELS. 104
2.3. PROCEDES GALENIQUES : UTILISATION DE NANOLIPOSOMES 105

CONCLUSION 111

BIBLIOGRAPHIE 115

Avant-propos

Le Diplôme d'Etudes Spécialisées Innovation Pharmaceutique et Recherche fait partie de l'Internat en Pharmacie. Ce DES, créé pour les étudiants en Pharmacie particulièrement attirés par la recherche permet à ces derniers de pouvoir les y former, tout en acquérant également des compétences dans le secteur Hospitalier. La rédaction d'un manuscrit dit « mémoire de DES » et sa soutenance tiennent lieu de Thèse d'Exercice menant au diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie. J'ai choisi de réaliser un manuscrit bibliographique pour accompagner le manuscrit de la thèse d'Université qui s'est déroulée pendant mon internat.

Le sujet trouve sa source dans la médecine traditionnelle. Parmi d'autres procédés, elle utilise les épices pour faire face à différents maux. Ce travail propose l'étude du curcuma et de la curcumine, identifiée comme la molécule active parmi ces nombreux composants. Ce manuscrit s'organise en 4 chapitres. Après la description de la plante *Curcuma longa* L. et du curcuma, le deuxième volet est consacré à la curcumine et ses propriétés physico-chimiques. Une troisième partie décrit les intérêts thérapeutiques de ce polyphénol dans les pathologies cancéreuses et neurodégénératives. La conclusion générale sera précédée d'un chapitre dédié aux raisons pour lesquelles la curcumine n'est pas utilisée en médecine humaine et aux solutions qui ont été proposées pour les contourner.

Ce travail constitue une entrée en matière de la Thèse d'Université intitulée « **Conception, Synthèse et Evaluation Biologique de Nouveaux Analogues de la Curcumine, Potentiels Agents Pléiotropes d'Intérêt Thérapeutique dans la Maladie d'Alzheimer** » qui sera soutenue le 16 décembre 2015.

Chapitre I. Le Curcuma

Les épices tropicales sont connues comme étant utilisées depuis des temps ancestraux en cuisine et en médecine traditionnelle. Van der Veen et al. ont analysé des vestiges botaniques récupérés lors de fouilles archéologiques dans le port de Quseir al-Qadim (Egypte), très actif dans le commerce d'épices entre la Rome Antique et le Moyen Orient Islamique.[1] Ces fouilles archéologiques menées concomitamment avec des études de textes anciens nous permettent de suggérer que dans l'antiquité, les épices étaient utilisées dans des rituels (rites funéraires, offrandes), en parfumerie et en médecine traditionnelle. Parmi ces épices on retrouve le curcuma et l'on s'étonne de découvrir que la seule épice vraiment employée régulièrement dans le domaine culinaire est le poivre noir (*Piper nigrum* L.). Ce n'est qu'après, au début de l'époque Médiévale que l'intérêt culinaire s'est porté sur l'ensemble des épices.

Golden spice ou *spice of life*, le curcuma est utilisé en Inde depuis des millénaires en tant que plante médicinale et sacrée ainsi qu'en témoigne son appellation *herb of the Sun* en date des peuples Védiques. On retrouve des ouvrages traitant de l'utilisation médicinale du curcuma dans des communautés socioreligieuses diverses jusqu'à il y a 6000 ans environ.

Le nom anglais de cette épice *turmeric* provient du Latin Médiéval *terramerrita* devenu en Français Terre méritée.[2] Il en est de même pour le nom Latin *curcuma* dérivé du mot arabe *Kourkoum* qui était le nom original donné au safran. Il existe, en sanskrit, plus de 40 synonymes du curcuma.[3] Linné a choisi en 1737 le nom *curcuma* pour définir ce genre de plantes monocotylédones retrouvées en Inde.

Les pays producteurs de curcuma sont nombreux et géographiquement répartis dans le Sud-Ouest de l'Asie, on peut citer la Chine, la Thaïlande et le Cambodge mais le plus grand producteur est l'Inde avec quasiment 1 400 000 tonnes produites en 2012.[4]

1.1. Histoire du curcuma

L'*Atharvaveda* est le premier texte Hindou en rapport avec la médecine, faisant état de causes « vitales » de la maladie et non erratiques. Il relate qu'il y a 6 000 ans le curcuma était utilisé pour « chasser » la jaunisse.[2] Plus récemment, Marco Polo en 1280 retrace le transport du curcuma entre la Chine et l'Inde dans son journal de bord. Pendant ce siècle-là, les commerçants Arabes ont desservi le marché Européen depuis l'Inde. Un peu plus tard, lors du début de la colonisation de l'Inde par les Anglais (XVe siècle), le curcuma fut mélangé, entre autres, avec du cumin et de la coriandre pour former ce que l'on appelle le curry.

Le pays d'origine du Curcuma n'est pas clairement identifié aujourd'hui. On peut penser qu'il est originaire d'Inde ainsi que les autres espèces du genre *curcuma* mais les différents rapports traitant de *Curcuma longa* L. depuis 1810 ne font état que de sa culture agricole à des fins industrielles. Il existe une théorie établissant que le curcuma est originaire de Cochinchine (aujourd'hui représenté

géographiquement par le sud du Vietnam) et qu'il aurait été exporté dans le Nord Est de l'Inde par des tribus Bouddhistes durant la période post-Buddha.

1.2. Taxonomie et description botanique

Curcuma longa L. appartient au règne végétal, angiosperme, monocotylédone, division *Magnoliophyta*, classe des *Liliopsideae*, ordre des Zingiberales, famille des *Zingiberaceae*, genre *Curcuma*. La partie utilisée est le rhizome qui doit être récolté 7 à 8 mois après la plantation, quand il commence à sécher.

Figure 1 : Schémas et photographie de la plante *Curcuma longa* L.

Curcuma longa L. est une plante persistante qui peut mesurer de 60 à 100 cm de hauteur, pourvue d'une tige courte et de longues feuilles engainantes. Le feuilles sont très longues, avec des lames elliptiques disposées en touffes, pouvant mesurer jusqu'à 1 m ou plus et dont le pétiole, effilé à la base, peut être aussi long que la lame (Figure 1).

Les fleurs sont généralement jaunes et assemblées en épi. Elles mesurent entre 10 à 15 cm de long et leur pédoncule mesure 15 cm mais il est généralement caché par les gaines des pétioles. Quand il fleurit, les bractées vert clair deviennent violettes.

Le rhizome se compose de plusieurs parties (Figure 2). Le rhizome commercialisé est le rhizome primaire, il est ovale, oblon, piriforme et communément appelé « ampoule » ou curcuma « rond ». Les rhizomes secondaires sont plus cylindriques, mesurent 4 à 7 cm de long pour 1 à 1,5 cm de large et sont appelés « doigts ». Ils sont de couleur jaunâtre à brun-jaunâtre à l'extérieur et jaune ou jaune orange à l'intérieur. Leur odeur est aromatique, leur goût chaud et légèrement amer.

Figure 2 : Rhizomes primaires et secondaires de *Curcuma longa* L.

La teneur en curcumine d'un rhizome est très faible. En effet, bien que le parenchyme et la moelle soient les parties les plus riches en curcumine, on y retrouve une grande quantité de grains d'amidon, un panel très large de composants chimiques dont certains sont des analogues directs de la curcumine, et enfin, la curcumine elle-même, qui ne représente que 1,11 % de cet ensemble.

1.3. Utilisations du curcuma

Le curcuma est utilisé sous différentes formes brutes ou produits d'extraction. Seront abordées dans ce chapitre les procédures standards de production de l'huile essentielle et de la poudre de curcuma. Ces deux formes sont les plus utilisées dans le commerce, de nos cuisines aux études agroalimentaires.

1.3.1. Curcuma longa : huile essentielle

1.3.1.1. Procédé d'extraction

L'huile essentielle de curcuma est obtenue par extraction à partir des rhizomes fraichement récoltés. Le protocole d'extraction est classiquement le suivant : les rhizomes sont lavés avec de l'eau, coupés en morceaux et séchés une semaine au soleil puis 6 heures dans une étuve à 50°C. Ils sont ensuite coupés en morceaux plus fins puis placés au contact de l'éthanol absolu (solvant d'extraction), mixés et stockés à l'abri de la lumière à température ambiante. L'extrait est alors filtré sur filtre Wattman No. 1 et le filtrat est évaporé sous pression réduite.

La qualité d'un extrait de curcuma est fonction de sa teneur en curcumine. La curcumine possède, entre-autres, une forte activité antioxydante à l'inverse des autres curcuminoïdes se trouvant dans l'extrait. Des tests rapides, simples et fiables de spectrophotométrie permettent d'évaluer ses capacités antioxydantes en débit soutenu pour répondre à des attentes industrielles. On peut citer le dosage de l'activité réductrice du radical DPPH· sur lequel nous reviendrons en détail.[5]

L'extraction peut être faite à chaud avec un appareil de Soxhlet. Ici l'extraction et la filtration du produit sont faites en même temps. La poudre de curcuma est placée dans un manchon de papier qui est contenu dans un récipient en verre. Les vapeurs de solvant chaudes se condensent puis tombent et entrent en contact avec la poudre de curcuma. Par un système de vase communiquant, quand une goutte tombe dans le récipient, une autre tombe dans le ballon réservoir de solvant et ainsi de suite.

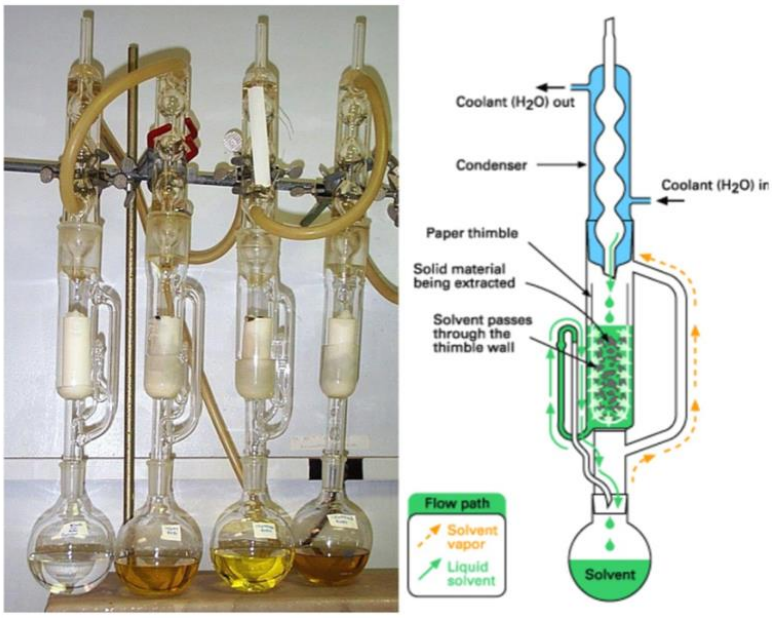


Figure 3 : Appareil de Soxhlet et diagramme de fonctionnement. wwww.aquaculture@ugent.be

Il existe d'autres méthodes d'obtention d'huile essentielle de curcuma telle que la distillation. Cependant, ces méthodes ont un inconvénient majeur. Ching *et al.* ont prouvé que la température réduit le caractère antioxydant de l'huile essentielle recueillie, et donc, sa qualité.[6] En conséquence de la sensibilité de ce composé naturel face à son environnement physicochimique, l'utilisation de la chaleur rend ces techniques impropres à l'obtention à l'échelle industrielle de curcumine de qualité.

1.3.1.2. Utilisations de l'huile essentielle de curcuma

Il suffit de taper les mots clés « huile essentielle de curcuma » dans un moteur de recherche sur internet pour avoir un aperçu du nombre incalculable de qualités prêtées à tort ou à raison à cette plante. Sur de nombreux sites d'aromathérapie et autres soins naturels, on peut trouver des applications à cette huile aussi bien en cas de problèmes gastriques que de cap émotionnellement difficile à franchir, en passant par les affections bronchiques, cutanées, urinaires, etc… Il nous est possible de trouver des publications scientifiques sur certaines vertus plus clairement élucidées.

Figure 4 : Exemple d'huiles essentielles de curcuma disponibles en aromathérapie.[7,8]

Concernant les effets métaboliques, l'huile essentielle de curcuma administrée en régime alimentaire avec de l'oléorésine de curcuma est capable de réduire la prise de poids ventrale et de réguler l'hyperglycémie chez une souris génétiquement modifiée pour exprimer un diabète de type 2. Ces extraits sont capables d'activer l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse, de la β-oxydation des acides gras et du métabolisme du cholestérol au niveau du foie. Ils sont également de réprimer les gènes codant pour les enzymes de la néoglucogenèse hépatique. [9]

L'huile essentielle de curcuma possède également des propriétés préventives de cancers. Ces propriétés sont médiées par une activité antiinflammatoire et antioxydante démontrée par des études scientifiques.[10] Par exemple, une étude menée sur l'effet préventif de cancers cutanés induits par des papillomavirus sur des souris, montre que les souris étant soumises à une application topique quotidienne d'huile essentielle de curcuma ne développent pas de signes cutanés d'infections à papillomavirus (Figure 5).[11]

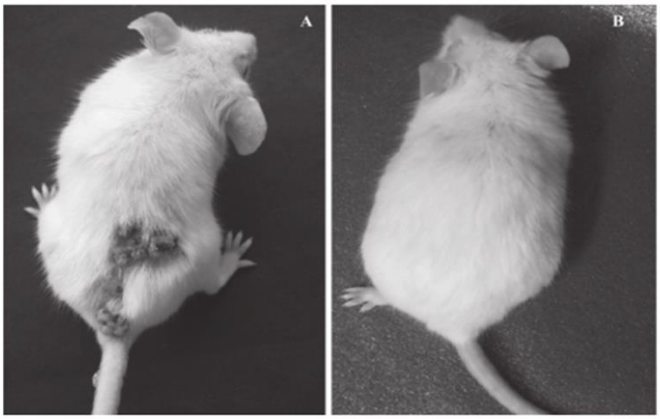
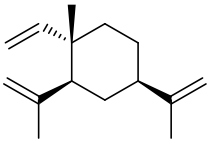


Figure 5 : Photographies d'une souris chez qui les symptômes cutanés d'une infection à papillomavirus ont été induits par diméthylbenzanthracène mélangé à de l'huile essentielle de croton (A) et d'une autre souris traitée de manière similaire pour exprimer les signes de l'infection mais bénéficiant d'une application cutanée d'huile essentielle de curcuma (B).[11]

Un article scientifique récent publié dans la revue *Joint Bone Spine* (2015) démontre que l'élémène (Figure 6), un des composants présents dans l'huile essentielle de curcuma, est capable d'inhiber la différenciation ostéogénique anormale dans des fibroblastes de drosophiles atteintes de spondylarthrite ankylosante.[12]

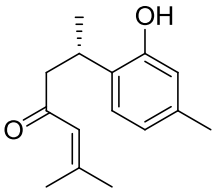


(1*S*,2*S*,4*R*)-1-méthyl-2,4-di(prop-1-en-2-yl)-1-vinylcyclohexane

Figure 6 : Structure de l'élémène, composant de l'huile essentielle de curcuma.[12]

Dans un domaine de santé différent : la prévention de la piqûre de moustique, l'huile essentielle de curcuma est utilisée, en association avec l'huile de citronnelle, pour augmenter l'effet répulsif de lotions anti-moustiques. Cet effet dure environ 5 h pour ces associations de produits naturels contre 7,5 h pour un répellent de synthèse.[13]

Dans le domaine agricole, l'huile essentielle de curcuma est utilisée pour lutter contre les proliférations fongiques des denrées. Son activité antifongique a effectivement été prouvée *in-vitro* sur 7 souches de micromycètes connues pour détériorer les denrées alimentaires et lieux de stockage tels que les silos à grains. Les chercheurs ont identifié la turmérone comme étant le composé de l'huile essentielle le plus actif concernant cette activité.[14]



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

Figure 7 : Structure de l'ar-turmérone, composé présent dans l'huile essentielle de curcuma.[15]

Les domaines d'applications sont variés et en raison de cette grande potentialité d'utilisation, il existe des études de toxicité aiguë, chronique et d'évaluation de l'effet mutagène de cette huile essentielle. L'huile essentielle de curcuma ne montre pas de signes de toxicité aiguë, chronique ou de génotoxicité chez des rats Wistar administrée à la dose de 0,5 $g.kg^{-1}$ de poids corporel pendant 13 semaines par voie orale (dose pour évaluer la toxicité chronique).[16]

1.3.2. Curcuma longa : forme pulvérulente

1.3.2.1. Procédé d'obtention de la poudre de curcuma[17]

La poudre de curcuma doit être obtenue *a minima*, lorsqu'elle est destinée à l'export ou à l'industrie, selon un procédé défini par la *Food and Agricultural Organization of the United Nations* qui publie ces protocoles sous la forme de recommandations post-récoltes. Les rhizomes doivent être, avant tout

procédé, nettoyés en les faisant bouillir dans l'eau jusqu'à ce qu'ils deviennent mous ou encore jusqu'à ce qu'on sente l'odeur caractéristique du curcuma, ce qui représente environ 45 min à 1h. Ce procédé gélifie l'amidon pour permettre un séchage uniforme et élimine les traces et les odeurs de terre fraîche dans laquelle ils ont été cultivés. Cette étape doit avoir lieu au maximum dans les 3 jours après la récolte. Ensuite, ils sont séchés une première fois rapidement avant d'être coupés grossièrement à l'aide d'une machine à découper spécialement développée pour les rhizomes de curcuma.

Le temps de séchage qui fait suite à cette opération doit durer entre 10 et 15 jours. Cette étape peut être réalisée au soleil mais elle ne fournit pas de curcuma de bonne qualité car c'est une poudre photosensible. On préfèrera les sécher dans des tunnels ventilés et chauffés à la température de 60°C, température qualifiée d'optimale.

L'avant dernière étape a pour but d'enlever les radicelles restantes et les écailles à la surface des rhizomes en utilisant des tambours rotatifs dans lesquels un maillage métallique a été installé pour éroder leur surface. A ce stade le rhizome est déjà commercialement exploitable sous une forme dans laquelle on peut le retrouver sur certains étals de marchés. Ces rhizomes sont aspergés d'eau contenant de la poudre de curcuma puis séchés de nouveau afin de leur donner un bel aspect. Pour obtenir une poudre, une ultime étape de broyage et de tamisage à travers plusieurs écrans doit être réalisée.

Figure 8 : Photographie représentant en arrière-plan des rhizomes en morceaux saupoudrés de curcuma propres à la vente et au premier plan, dans une cuillère, de la poudre de curcuma telle qu'elle est à la fin des procédés de broyage et tamisage.[18]

Les procédés d'obtention de la poudre de curcuma propre à la consommation sont nombreux. Dans le prochain paragraphe, les utilisations (non exhaustives) de cette poudre sont décrites. A l'image de l'huile, cette poudre est d'intérêt dans plusieurs domaines dont le plus connu par le grand public est l'art culinaire.

1.3.2.2. Le curcuma en cuisine

Certains plats sont préparés avec des épices afin de relever le goût, parfumer et conférer une couleur particulière à ces mets. De plus ces épices sont connues pour avoir des propriétés biologiques de par les principes actifs qu'elles renferment. Seulement, à l'image de la curcumine présente dans le curcuma, ils sont sensibles à leur environnement physicochimique. Ainsi que certains modes de cuisson peuvent altérer la nature des protéines, sucres, lipides et des vitamines, les épices voient leur biodisponibilité changer et leurs valeurs nutritionnelles se dégrader.

Dans le but de savoir dans quelles proportions sont dégradés les principes actifs de trois épices utilisées couramment dans la cuisine traditionnelle Hindoue, Suresh *et al.* ont étudié l'effet de différents modes de cuisson sur leurs concentrations avant et après la cuisson : bouilli 10 min, bouilli 20 min, cuisson vapeur sous pression 10 min. Les essais sont effectués sur trois épices renfermant des composés actifs : le curcuma (curcumine), le poivre rouge (capsaïcine) et le poivre noir (pipérine). Ces tests sont menés en présence ou en absence de tamarin, acidulant couramment utilisé dans l'élaboration de massalas. Ajoutée à hauteur de 0,5%, cette épice permet d'abaisser le pH des préparations de 6,2 à 5,2.

Concentration of spice principle (curcumin) in heat-processed turmeric

Sample	Curcumin concentration (mg/g spice)			
	Raw (untreated)	Heat treatment by boiling		Pressure cooking
		(10 min)	(20 min)	(10 min)
Turmeric	25.7 ± 1.44	18.8 ± 1.74 (27.0)	17.3 ± 1.26 (32.0)	12.1 ± 1.74 (53.0)
Turmeric + red gram	9.25 ± 1.23	5.33 ± 0.33 (42.3)	5.34 ± 0.55 (42.3)	4.61 ± 0.68 (50.2)
Turmeric + red gram + tamarind	8.74 ± 0.33	6.48 ± 0.83 (25.9)	5.53 ± 0.29 (37.0)	3.74 ± 0.14 (57.2)
Turmeric + tamarind	21.7 ± 0.15	18.5 ± 1.45 (14.7)	17.0 ± 1.65 (21.7)	14.3 ± 2.41 (34.3)

Values are mean ± SEM of 5 independent determinations. Figures in parenthesis denote % loss.

Figure 9 : Concentration en curcumine après différents modes de chauffage de curcuma seul ou en mélange avec d'autres épices, les pourcentages de perte sont donnés entre parenthèses.[19]

Concernant les teneurs en curcumine du curcuma cuisiné seul, les pertes de concentrations vont de 27% à 53%. Lorsqu'il est cuisiné en présence de poivre rouge, avec ou sans tamarin, ces baisses de teneurs sont maintenues. En revanche, dans les préparations où le curcuma est adjuvé de tamarin on constate une moindre dégradation de la curcumine.[19]

1.3.2.3. Curcuma utilisé en industrie

Le curcuma est utilisé, pour sa couleur jaune foncée, en tant que colorant alimentaire au même titre que 2 autres épices naturelles que sont le safran et le paprika. Cette couleur très caractéristique du curcuma est due à un groupe de pigments naturels que l'on appelle « curcuminoïdes ». Ils sont au nombre de 4 : la curcumine qui représente 77 % des curcuminoïdes, la déméthoxy-curcumine (17 %), *bis*-déméthoxy-curcumine (3 %) et la cyclocurcumine. Cette dernière forme n'a été identifiée que

récemment en raison de sa présence à l'état de traces. Ce mélange de curcuminoïdes fait l'objet de nombreuses études analytiques qui ont pour but de différencier les teneurs respectives en curcuminoïdes et en curcumine dans les préparations alimentaires.[20,21,22]

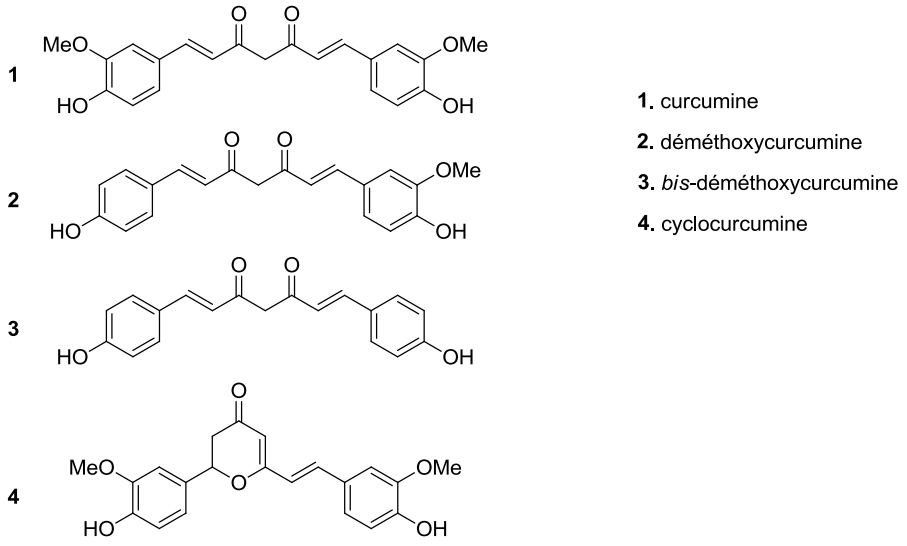


Figure 10 : Les pigments curcuminoïdes responsables de la couleur jaune foncée du curcuma.[15]

En Europe, la curcumine est enregistrée dans l'industrie alimentaire comme étant le colorant E 100. L'*European Food Safety Authority* (EFSA) est l'instance européenne qui a pour mission de règlementer et contrôler la composition des produits destinés à l'alimentation humaine. Le nombre d'essais *in vitro* conférant de toujours plus nombreuses activités biologiques à la curcumine dans des domaines allant des neurosciences à l'oncologie, ont conduit cette organisation à s'intéresser, depuis 2010, aux taux de curcumine présents dans les préparations alimentaires. Ainsi, dans la liste des catégories de nourriture dans lesquelles la curcumine (E100) est autorisée on retrouve des fromages, des préparations à base de poisson, des condiments, des assaisonnements, etc. L'EFSA a fixé pour chaque catégorie la concentration maximale de curcumine autorisée. Par exemple, la concentration maximale de curcumine que doit contenir un cidre s'élève à 200 $mg.L^{-1}$. En revanche, un cidre d'appellation « cidre bouché » ne doit pas contenir de curcumine. Pour répondre à ces règles, de nombreuses équipes de chimie analytique ont travaillé à la mise au point de méthodes rapides pour doser séparément la curcumine parmi les autres curcuminoïdes.[23,22]

Par la suite nous étudierons en détail les propriétés de la curcumine mais il faut également remarquer que les autres curcuminoïdes sont étudiés et impliqués dans divers essais d'intérêt pour la santé humaine. On retrouve des études dans le domaine de la cancérologie avec la faculté à inhiber la dissémination métastatique[24] ou encore l'activité inhibitrice de la topoisomérase II humaine[25], le blocage d'une enzyme responsable de chimiorésistance[26], des activités antioxydantes aussi intéressantes que celles de la curcumine[27], etc…

L'EFSA après avoir fait une étude d'exposition croisée avec l'ensemble des recueils de données déjà réalisés par la WHO (*World Health Organization*) et la FAO (*Food Agricultural Organization*), définit les populations les plus susceptibles d'être exposées à la curcumine. Il apparaît que ce sont les enfants âgés de 1 à 10 ans et les adolescents. Les adultes et les personnes âgées paraissent moins exposés. L'EFSA publie en 2014 dans son journal, qu'en raison de ses multiples activités biologiques, la dose acceptable quotidienne de curcumine pour les enfants de 1 à 10 ans admet un maximum de 3 $mg.kg^{-1}$ de poids corporel.

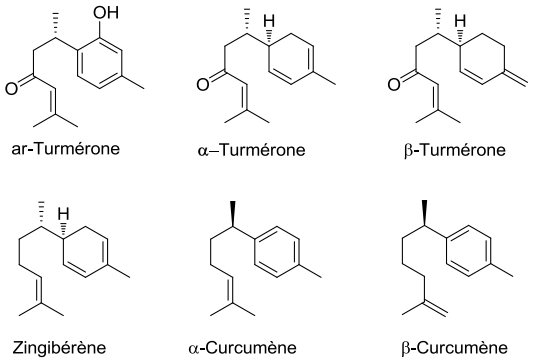


Figure 11 : Structure de quelques composants terpéniques retrouvés dans le curcuma.[15]

Le curcuma est un élément naturel qui ne contient pas que des pigments. Dans sa composition, en plus des curcuminoïdes on retrouve des dérivés terpéniques, dont certains ont déjà été décrit, tels que l'α- et β-turmerone (35 %), l'ar-turmérone (12 %), le turmérol, le zingibérène (25 %), le zingibérol, le curcumol, le β-curcumène et le xanthorrhizol.

1.3.3. Curcuma : de la tradition à la pharmacologie

La médecine holistique, à l'inverse de l'allopathie, prend en compte l'intégralité physique et psychologique de la personne avec également une dimension importante de l'environnement dans lequel elle évolue. Différents courants se distinguent dans ce type de médecine comme l'Ayurveda, développé en Inde durant la période Védique (IIème siècle av. JC) et la médecine de Siddha, originaire d'Inde également mais plus récente (500 ans av. JC). Intéressons-nous à cette dernière, pionnière dans l'intégration de la notion de médicament ou *Avizthan* dans la pratique de la médecine holistique. L'*Avizthan* est défini comme une substance ou un procédé effaçant la peine du patient pour réinstaurer la joie dans celui-ci et dans la société. Le curcuma, ou *Manjal*, est utilisé par les Siddhars, médecins de Siddha, en tant qu'agent cardioprotecteur. Ces écrits partent du fait que les maladies, notamment les maladies cardiovasculaires, dépendent de facteurs diététiques. De nos jours, les données épidémiologiques nous enseignent qu'une alimentation à base de fruits, de légumes et d'épices est associée à une diminution des risques d'être en mauvaise santé, toutes maladies confondues.[28]

Dans le domaine nutritionnel, Uma Pradeep et al. ont mené une étude de l'influence d'un mélange de 11 épices sur l'utilisation métabolique des protéines de haricots ailés (*Psophocarpus tetragonolobus*) et de horsegram (*Dolichos biflorus*).[29] Ces légumes sont très populaires en Inde et grandement consommés par les populations pauvres, c'est la raison pour laquelle cette étude est menée. Ces chercheurs de l'Université Agricole de Hyderabad en Inde ont prouvé que les protéines de ces légumes sont 10 à 20 % mieux assimilées si elles sont cuisinées et ingérées avec 1,5% d'un mélange de 11 épices parmi lesquelles on peut citer la coriandre, le curcuma, le poivre noir et le cumin pour les plus connues.[29]

Le curcuma est décrit comme possédant un très large spectre d'actions dans plusieurs domaines : utilisations traditionnelles ou études scientifiques actuelles. En médecine traditionnelle, le curcuma peut être utilisé pour traiter les affections hépatiques, les helminthiases, éléphantiasis et autres parasitoses, les ulcères gastriques ou cutanés, l'eczéma, les maladies inflammatoires, les hémopathies, les vertiges et les gonorrhées, etc… En 2003, Duke a fait une liste qui se veut exhaustive des utilisations du curcuma dont les activités ont été validées par des essais pharmacologiques ou même cliniques. On en compte 114.[30]

1.3.4. Curcuma utilisé en association

Le curcuma est utilisé en association avec d'autres plantes ou épices pour des raisons variées.

Comme nous le verrons plus loin, dans le domaine de la cancérologie, on retrouve beaucoup d'études associant la curcumine à d'autre thérapeutiques afin d'en augmenter les effets ou de diminuer les risques de chimiorésistance des cellules tumorales. Les études utilisant le curcuma en tant qu'épice sont faites sur des animaux étant placés ou non sous un régime alimentaire épicé par du curcuma. C'est le cas d'une étude associant un régime alimentaire à base de curcuma visant à savoir, si, combiné à l'ingestion de feuilles de Bétel, le risque de développement d'un cancer induit par les nitrosamines est diminué. Il apparaît ainsi que cette combinaison curcuma/bétel est efficace en tant qu'agent de chimio-prévention des cancers.[31]

Dans le domaine agro-alimentaire, les régimes complétés avec des doses massives d'antibiotiques ayant été bannis de certains pays, particulièrement dans les pays de l'Union Européenne, à cause de la présence de résidus antibiotiques dans les viandes et de l'accroissement des lignées de bactéries résistantes suite au mésusage de ceux-ci, différentes herbes et épices ont été développées en tant qu'additifs alimentaires dans les élevages d'animaux. Une étude récente (2014) a pour but d'étudier s'il est avantageux de traiter des volailles d'élevage intensif avec des mélanges d'épices en mesurant plusieurs paramètres[32] : leur croissance, leur ossature, quelques paramètres sanguins et leur réponse immunitaire humorale. Il en ressort que le groupe (n=30) ayant été traité avec un régime alimentaire à base de curcuma (0.5%) et de coriandre (2%) présente un meilleur taux d'anticorps et une ossature

plus solide signant un état de santé globalement amélioré. Il est donc utile de nourrir ces poulets d'élevage à l'aide d'un régime avec une association curcuma-coriandre pour augmenter leur résistance et ainsi s'affranchir de l'utilisation systématique et chronique d'antibiotiques dans les batteries d'élevage intensif.

Il existe bien d'autres exemples décrits dans la littérature scientifique ou holistique d'utilisations du curcuma seul ou associé à d'autres épices. La plupart des effets bénéfiques de ces adjuvants culinaires, dont les utilisations en médecine holistique sont relatées, ont été reconnus scientifiquement ces trente dernières années et il existe des formulations commercialisées à base de ces épices, ce qui leur donne le nom de « alicament » ou en anglais « nutraceuticals ».[33] Quelques-unes de ces épices ont un profil pharmacologique suffisant pour faire l'objet d'une exploitation thérapeutique.

Chapitre II. La Curcumine

En 1995, un brevet sur l'utilisation de la curcumine pour aider à la cicatrisation des blessures a été demandé et obtenu par deux chercheurs de l'Université du Mississippi aux Etats-Unis. Ils sont allés jusqu'à demander le droit exclusif du commerce du curcuma. Dès lors, en deux années de temps, le conseil Scientifique et de la Recherche Industrielle Indien obtient l'annulation de celui-ci en invoquant la biopiraterie sur l'argument de l'utilisation du curcuma décrite pour guérir des blessures dans des textes anciens. Depuis la curcumine demeure une « molécule nationale » pour l'Inde.[34]

1. Histoire

La découverte de la curcumine présente dans le curcuma parmi les autres curcuminoïdes, remonte au milieu du siècle des lumières quand Vogel et Pelletier publient en 1815 dans le *Journal de Pharmacie et Sciences Accessoires* l'isolement de la « matière colorante jaune » des rhizomes de Curcuma dans leur essai intitulé « Examen chimique de la racine de Curcuma ». A la suite de quoi ils ont nommé cette matière curcumine.[35] En 1842, Vogel pense avoir produit de la curcumine de synthèse pure mais n'en publie pas la formule précise. Ce n'est qu'en 1910, après l'émission de conjectures diverses, que Milobedzka et Lampe identifient la structure chimique de la curcumine comme le diféruloylméthane ou (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)-1,6-heptadiène-3,5-dione (Figure 12). Ils en publient la synthèse en 1913 puis Srinivasan sépare et quantifie les composants du curcuma par chromatographie.

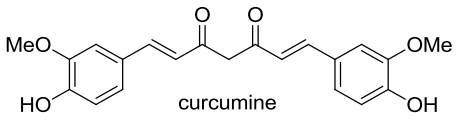


Figure 12 : Structure de la curcumine.

Alors que le curcuma, principale source de curcumine, est utilisé à l'échelle mondiale comme une épice, ce n'est qu'au cours de la première moitié du XXe siècle que ses caractéristiques biologiques commencent à être étudiées. Schraufstatter et Bernt décrivent le pouvoir antibactérien et antifongique de la curcumine dans la revue *Nature* en 1949.[36] Ils ont prouvé son activité sur des souches de *Staphylococcus aureus*, de *Salmonella paratyphi*, *Mycobacterium tuberculosis* et également sur un champignon micromycète tellurique *Trichophyton gypseum*.

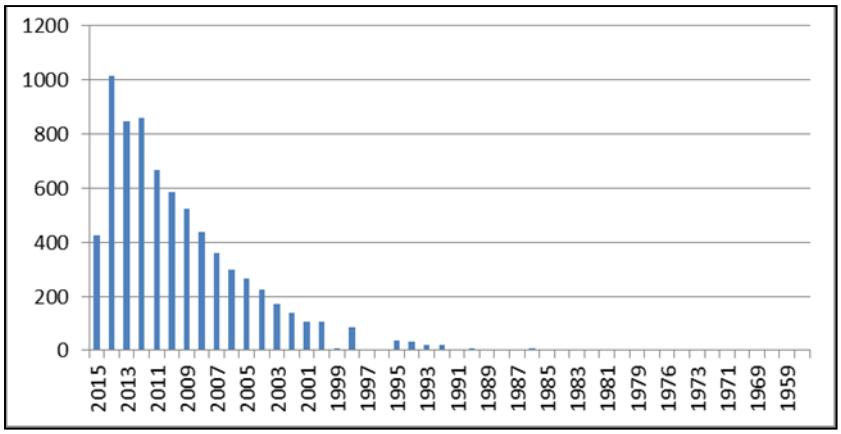


Figure 13 : Nombre de publications se rapportant à la curcumine par année selon la base de données en ligne PubMed® (dernier accès le 15/06/2015)

Les 20 années (Figure 13) suivant cette première découverte, seulement 5 publications ont été produites sur la curcumine. On peut dire qu'à partir des années 1970 la curcumine attire réellement l'attention de la communauté industrielle et scientifique. C'est alors que sont rapportées les activités normolipémiantes, normoglycémiantes, anti-inflammatoires et antioxydantes qu'on lui connaît aujourd'hui. Son activité anticancéreuse n'est mise en avant que dans les années 1980 sur plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo*.

A l'heure actuelle, des essais cliniques évaluant la curcumine ont prouvé son innocuité. La *Food and Drug Administration* des Etats Unis a depuis approuvé la curcumine en tant que composé *generally recognized as safe* (GRAS) dans son programme de notification alimentaire des adjuvants culinaires débuté en 1998.

2. Isolement de la Curcumine

Il existe différentes manières d'isoler la curcumine du curcuma. Les curcuminoïdes ne sont pas solubles dans l'eau donc l'extraction doit être faite à l'aide d'autres solvants. Plusieurs ont été évalués tels que l'hexane, l'acétone, le dichloréthylène, le méthanol et l'éthanol. Le solvant pour lequel on obtient le meilleur rendement d'extraction est l'acétone.[37]

Quelle que soit la technique employée, la seule manière d'obtenir une curcumine pure est de l'isoler à l'aide d'une méthode chromatographique préparative comme la colonne chromatographique sur gel de silice. Les essais préalables en chromatographie sur couche mince donnent le meilleur mélange d'éluant pour la séparation des curcuminoïdes : chloroforme:méthanol à 95:5 avec des rapports frontaux à 0,75, 0,55 et 0,27 pour la curcumine, la déméthoxycurcumine et la *bis*-déméthoxycurcumine respectivement. Une fois isolés, la cristallisation de ces trois curcuminoïdes peut

avoir lieu par évaporation lente du mélange de solvant chloroforme:méthanol (5:2) à la température de 5°C.[38]

Il peut être intéressant d'isoler la curcumine pure, cependant, il ne faut pas négliger le problème des quantités isolables à partir du curcuma, les difficultés de purifications inhérentes aux techniques chromatographiques, le volume de solvant à utiliser et le coût de ces purifications. On ne peut pas négliger non plus les risques de dégradation de la curcumine qui est un produit instable et thermosensible.[39]

2.1 Synthèse de la curcumine

2.1.1. Biosynthèse

Depuis des dizaines d'années, l'intérêt pharmaceutique que représente la curcumine est à l'origine de l'élan scientifique visant à déterminer comment elle est produite *in vivo*. Les voies de biosynthèse ont été au centre de beaucoup d'études pour lesquelles l'utilisation d'éléments radio-marqués étaient indispensables. Nous pouvons prendre en exemple les travaux de Roughley et Whiting qui furent les premiers à décrire, en 1973, l'utilisation de préparation à base de [1- et 3-^{14}C]phénylalanine et d'acides cinnamiques diversement substitués tels que l'acide [^{3}H]-4-hydroxy-3-méthoxy-cinnamique. Ces préparations étaient inclus dans les solutés de nutrition des jeunes plants de *Curcuma longa* L.[40]

La biosynthèse de la curcumine peut être qualifiée de synthèse multi-étapes dans laquelle le para-coumaroyl-Coenzyme A **6**, élément clé, est produit à partir de l'acide aminé L-phénylalanine **5** et du malonyl-CoA **7** qui apporte l'atome de carbone central.

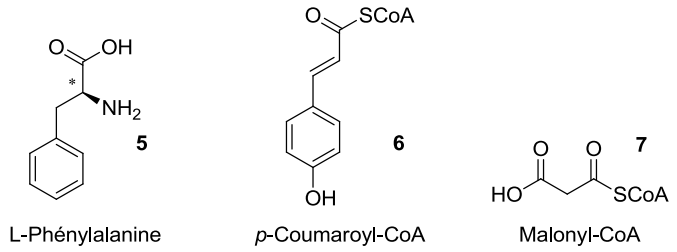


Figure 14 : Les 3 composés nécessaires à la biosynthèse de la curcumine

Le Coenzyme A, dans les réactions biochimiques, joue le rôle d' « activateur » grâce à une liaison thioester fortement énergétique, ce qui permet à ces composés de participer à des réactions auxquelles ils ne participeraient pas s'ils n'étaient pas activés par le coenzyme.

C'est à l'aide des travaux de Schröder en 1997[41] qui donne les étapes de biosynthèse essentielles des chalcones, puis de Kita, en 2008[42] qui s'est intéressé particulièrement à la curcumine, que nous pouvons aujourd'hui décrire cette biosynthèse. Nous savons aujourd'hui que les curcuminoïdes

dépendent tous de la voie de biosynthèse des acides phénylpropanoïques et que deux phénylalanines sont consommées pour une molécule de curcumine synthétisée.

Le premier composé activé par le Coenzyme A est l'acide cinnamique **8** généré à partir de la L-phénylalanine **5** par une ammonium-lyase (PAL). Il est ensuite activé en cinnamoyl-CoA **9** par une 4-coumarate:CoA ligase (4CL). La fonctionnalisation du groupement phényle est ensuite opérée par une cinnamate-4-hydroxylase (C4H) pour former le *p*-coumaroyl-CoA **6** puis le groupement méthoxy- est introduit par une *O*-méthyltranférase afin d'aboutir au féruloyl-CoA **10**.

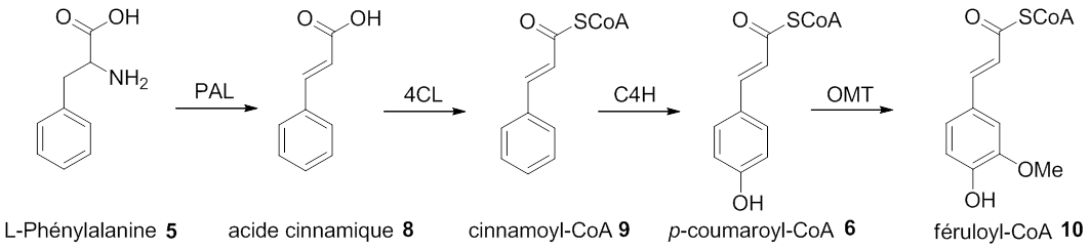


Figure 15 : Les 4 premières étapes de la biosynthèse de la curcumine.

C'est ensuite une enzyme plus récemment décrite qui opère la suite de la synthèse, la « Diketide-CoA Synthase » (DCS), chargée de condenser le féruloyl-CoA **10** avec le malonyl-CoA **7** pour former le féruloyl-diketide-CoA **11**. S'en suit enfin l'action « Curcumine Synthase » (CURS), qui condense **11** avec un autre féruloyl-CoA **10** pour former la curcumine après hydrolyse **1**.

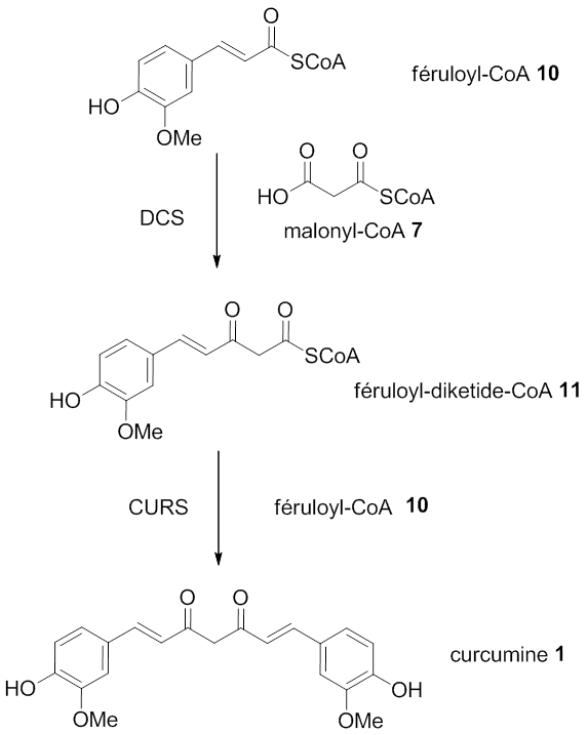


Figure 16 : Les polyketides synthases de type III, enzymes naturelles clés dans la biosynthèse de la curcumine.

Il est nécessaire de souligner l'importance et le temps qu'il a fallu aux scientifiques pour objectiver la présence de la Diketide-CoA Synthase (DCS) et de la Curcumine Synthase (CURS). Ces enzymes sont des Polyketide Synthases de type III dont Schröder a imaginé l'utilité en 1997 mais elles n'ont été décrites et caractérisées qu'en 2009 par Katsuyama *et al.* grâce aux techniques d'amplification génique et de culture cellulaire.[43]

Il existe, dans cette biosynthèse très simplifiée, de nombreuses étapes et enzymes qui peuvent modifier les groupements fonctionnels des 2 noyaux aromatiques. Leur présence explique que l'on trouve des curcuminoïdes et d'autres composés lorsque l'on procède à l'extraction des rhizomes de curcuma. Cette présence de produits « non-désirés » dans l'industrie, ajoutée à la faible quantité de curcumine pure extraite de ceux-ci, font qu'il est préférable et moins onéreux d'obtenir la curcumine pure par synthèse organique.

2.1.2. Synthèse organique de la curcumine

Le besoin d'obtenir de la curcumine pure et en quantités suffisantes afin de mieux évaluer ses activités biologiques, a obligé les scientifiques à se pencher sur une voie de synthèse chimique. Dès 1910, après la confirmation de sa formule brute $C_{21}H_{20}O_6$ par Milobedzka *et. al.*, les méthodes de synthèse et les hypothèses visant à la créer chimiquement se multiplient. En effet Milobedzka, en collaboration avec Lampe, ont émis l'hypothèse de sa structure de type diféruloylméthane qui était le dernier élément manquant pour permettre aux chimistes de se lancer sur les étapes de la synthèse.[44]

Malgré le grand nombre de synthèses existantes, l'analyse rétrosynthétique de la curcumine permet de dégager deux voies de synthèse principales. Il y a une matière première commune à ces deux séquences qui est l'acétylacétone **13** ou ses dérivés. La différence principale réside dans la volonté de créer des produits que l'on peut qualifier de symétriques tels que la curcumine ou bien des composés différents au niveau des aménagements fonctionnels effectués sur les noyaux aromatiques terminaux.

La voie de synthèse symétrique est facilement accessible et efficiente mais n'engendre pas autant de diversifications chimiques que le permet la voie asymétrique. Dans ce cas-là les deux coupures sont symétriques de part et d'autre de la β-dicétone centrale. La diversité chimique peut être attribuée uniquement au niveau des dérivés de vanilline **12** engagés à la hauteur de 2 équivalents du même composé.

La voie asymétrique admet deux coupures également et le caractère asymétrique du composé final tient aux synthons donnés par les dérivés diversement substitués de l'acide férulique engagé **14**, qui intervient respectivement au début et à la fin de la synthèse. Ce type de procédé fait partie des plus anciennement utilisés. Il est intéressant dans la pharmacomodulation de la curcumine mais nécessite un plus grand nombre d'étapes.

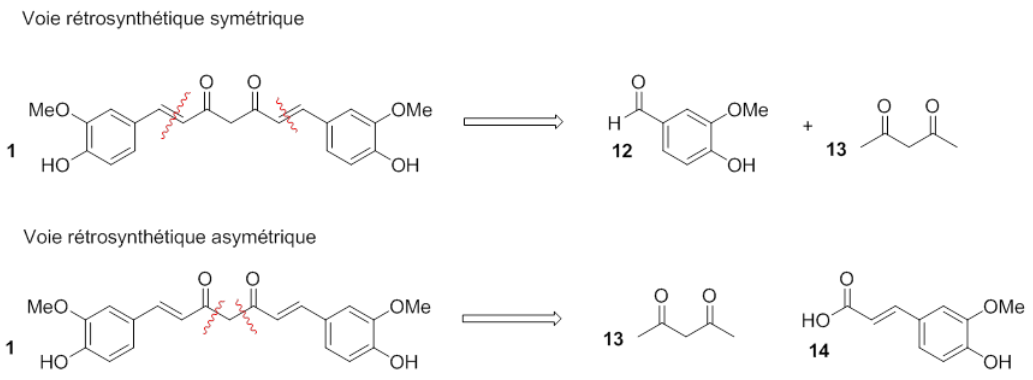


Figure 17 : Analyse rétrosynthétique simple de la curcumine qui est obtenue à partir d'acétylacétone **13**, matière première commune à deux procédés, un symétrique et l'autre asymétrique, faisant intervenir respectivement la vanilline **12** ou l'acide féruloïque **14**

On retrouve dans la littérature des synthèses comportant de nombreuses et fastidieuses étapes. Ce fut Lampe, en 1918, qui décrit la première synthèse de la curcumine en 5 étapes (Figure 18). Cette synthèse propose de commencer par la condensation d'un dérivé de l'acide ferulique, le chlorure de carbométhoxyféruloate **15** et l'acétoacétate d'éthyle **16** qui donnent l'acétyloxopentenoate d'éthyle **17**. Ensuite une saponification et une décarboxylation mènent à un produit intermédiaire **18**, qui est de nouveau engagé dans une condensation avec du chlorure de carbométhoxyféruloate. Ce dernier produit de condensation de type « carbométhoxy diféruloyl acétone **19** » est ensuite hydrolysé en milieu acide dilué à chaud pour former la curcumine.[45] Cette première synthèse est menée de telle manière que l'on peut, lors d'études de pharmacomodulation, engager des féruloates diversement substitués en début et en fin de synthèse.

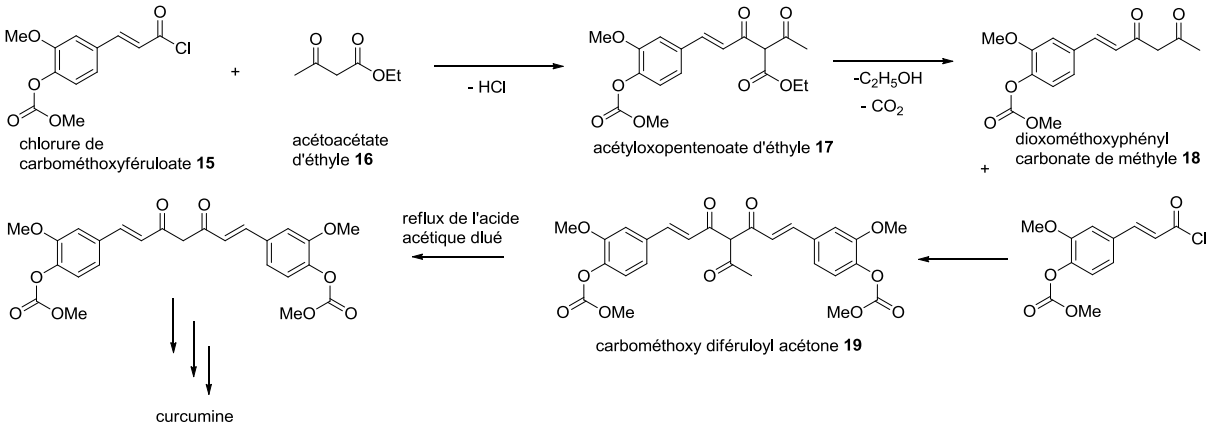


Figure 18 : Synthèse de curcumine selon Lampe (1918).[15,45]

Une autre méthode de synthèse est intéressante à relater car elle consiste en l'assemblage « one step » de la curcumine, ce qui correspond à une technique de synthèse dite multi-composants et fait partie des procédés symétriques. Elle a été décrite par Pavolini en 1950 avec un temps réactionnel de 30 minutes et un rendement de 10%. Il a décrit l'utilisation du trioxyde de bore, en présence d'un équivalent d'acétylacétone et de deux équivalents de vanilline.

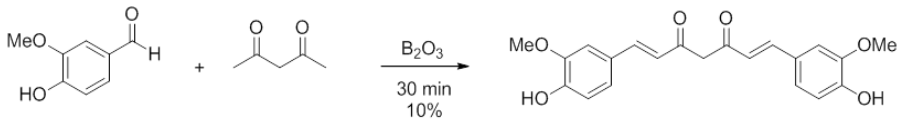


Figure 19 : Synthèse « one step » proposée par Pavolini (1950).[15,46]

Pabon en 1964 s'attache à améliorer la méthode de Pavolini. Tout d'abord, devant ce rendement médiocre, Pabon a émis l'hypothèse de la formation d'un borocomplexe. En conséquence, les équivalents de matières premières ont été ajustés et la séquence réactionnelle se termine par une hydrolyse acide. De plus, l'eau générée par la condensation est piégée directement dans le milieu réactionnel à l'aide du *n*-tributylborate. Le rendement de la synthèse est ainsi augmenté à 80%.

Les matières premières et le réactif principal sont les mêmes. Dans le schéma général (Figure 20) on met bien en évidence la complexation de l'acétylacétone avec le trioxyde de bore **20**, essentiel à la protection des groupes méthylènes de la condensation de Knoevenagel. On peut ensuite faire intervenir 4 équivalents de benzaldéhyde qui, après hydrolyse acide, donneront lieu à la formation de 2 molécules du curcuminoïde symétrique correspondant.

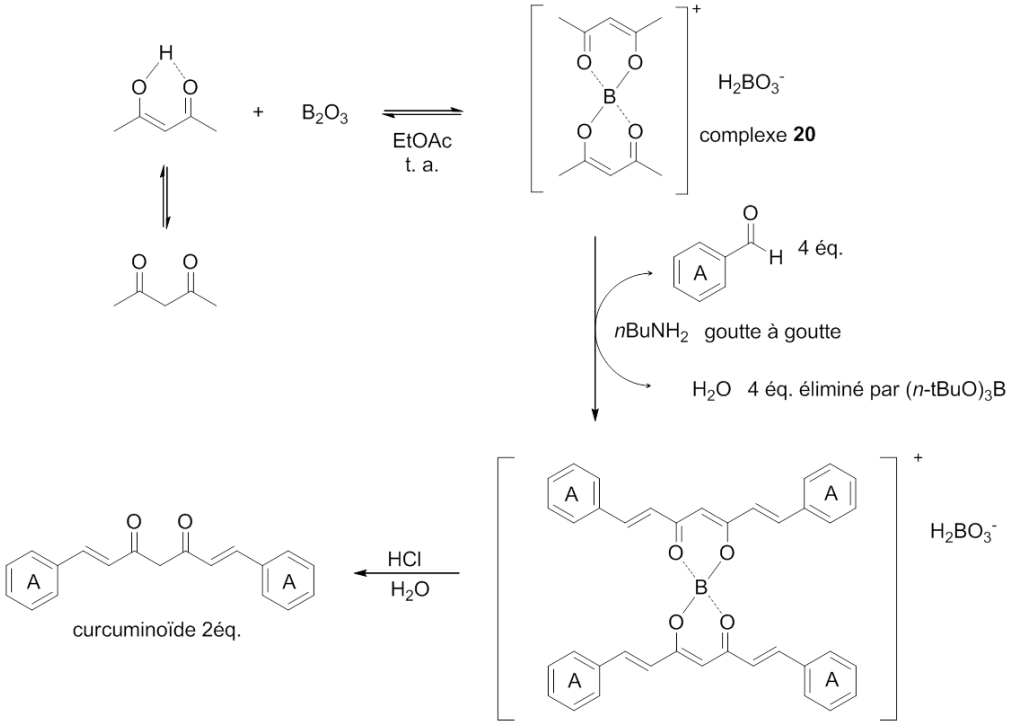


Figure 20 : Synthèse selon Pabon (1964).[15, 46]

C'est ainsi que Pabon a réalisé la synthèse univoque de la curcumine et de ses premiers analogues. Cette méthodologie est aujourd'hui très utilisée, par exemple pour concevoir des analogues comme les CRANADs.[47]

2.2. Propriétés physico-chimiques

La curcumine est un composé complexe constitué par des fonctions chimiques pouvant évoluer en fonction de l'environnement direct, de la présence de différents types de solvants, de la température et de la présence de lumière. Cette complexité confère à la curcumine une large collection d'interactions possibles qui multiplient le nombre de cibles moléculaires potentielles.

Dans ce chapitre, ces propriétés seront déclinées et mises en lumière avec des exemples concrets sur des cibles moléculaires d'intérêt en santé. Nous aborderons également les problèmes majeurs engendrés par cette structure car si l'activité *in vitro* de la curcumine sur ses cibles est toujours démontrée, lors d'essais plus en aval *in vivo* ses capacités s'en trouvent amoindries voire inexistantes et n'apportent pas souvent le bénéfice clinique recherché.

Les informations sur les propriétés physico-chimiques de la curcumine sont essentielles à l'interprétation et la compréhension de sa pharmacodynamie ou sa pharmacocinétique.

2.2.1. Structure de la curcumine : interactions intermoléculaires

La curcumine est un composé amphiphile car elle possède un centre et des extrémités polaires qui sont séparées par deux maillons insaturés apolaires. Heger *et al.* proposent une revue entièrement dédiée à l'étude structurale de la curcumine.[48] Cette étude décline les implications des sept propriétés chimiques de la curcumine facilitant les interactions intermoléculaires auxquelles on peut associer les cibles biomoléculaires. Premièrement, il y a les interactions dues à ses capacités de donneur et accepteur de liaison hydrogène venant du lien central β-dicarbonyl, puis celles pouvant avoir lieu avec les groupements hydroxy- présents sur les noyaux phényles des extrémités. Pour finir avec les liaisons hydrogène, il reste celles pouvant s'effectuer *via* l'oxygène des fonctions éthers sur les groupements méthoxy. Seront abordées ensuite les propriétés chélatantes de cations métalliques et non métalliques multivalents, son coefficient de partage assez fort (log P), les activités rendues possibles grâce aux libres rotations autour des multiples liaisons C-C et enfin les effets biologiques permis par sa capacité à réagir comme un accepteur de Michael.

2.2.2. Capacités de donneur et accepteur de liaisons Hydrogène.

Le comportement du noyau β-dicétone de la curcumine diffère des comportements typiques des β-dicétones classiques telle que l'acétylacétone par rapport à l'équilibre céto-énolique. En général ces molécules sont sous forme de dicétone dans les solvants possédant une forte permittivité relative (ε_r) ou polarité, tels que l'eau ou le diméthylsulfoxyde et sous forme énolique dans les solutions présentant une faible permittivité comme le cyclohexane ou le dichlorométhane.

La β-dicétone de la curcumine existe en fait préférentiellement sous la forme d'énol autant dans les solvants polaires protiques comme l'eau que dans le cyclohexane. Cette tendance de l'équilibre à se déplacer vers la forme énol a été confirmée par spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourrier par Kolev *et al.* en 2005.[48,49] Cependant, Balasubramanian en 2006 a pondéré cette affirmation en montrant par étude orbitalaire que dans les solvants apolaires, les formes énol et céto sont co-dominantes.[48,50] On peut donc schématiser comme dans la Figure 21 les comportements de la curcumine dans les différents types de solvants, polaires aprotiques, polaires protiques et apolaires.

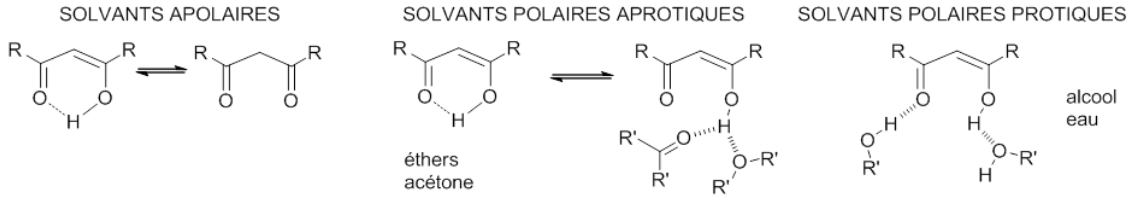


Figure 21 : Les différentes formes céto-énoliques de la curcumine et les liaisons hydrogènes de solvatation en fonction des types de solvants.

L'environnement chimique direct dans lequel se trouve la curcumine détermine donc les différentes conformations de cette partie β-dicétone de la molécule et va donc conditionner ses manières d'interagir avec d'autres composés.

Dans les solvants apolaires, la curcumine est sous forme d'un tautomère *cis*-énol fermé dans lequel le proton est considéré symétrique dans un système d'électrons délocalisés. Dans ces solvants, le proton énolique et l'oxygène du carbonyle n'autorisent pas de liaisons hydrogène.

A l'inverse, dans les solvants polaires ce système intramoléculaire délocalisé est perturbé et l'on tend, avec l'augmentation de la permittivité, au déplacement de l'équilibre vers un tautomère énolique ouvert qui permet la création de liaisons hydrogène fortes.

Par conséquent, en situation physiologique, ce tautomère énolique ouvert interagit avec l'eau du plasma et du cytosol, ou avec les aminoacides polaires présents sur des protéines cibles ou de transport directement ou par l'intermédiaire de molécules d'eau. Pour résumer, l'étude des interactions hydrogène médiées par la fonction β-dicétone de la curcumine nous permet de déterminer la manière dont elle interagit avec les protéines sur lesquelles elle possède une activité. Parmi celles-ci on peut citer la tubuline[51] et la Glycogen synthase kinase-3 β ou GSK-3β qui est impliquée dans les perturbations de la phosphorylation de la protéine Tau dans les pathologies neurodégénératives de type Alzheimer et dont nous avons développé les implications.[52]

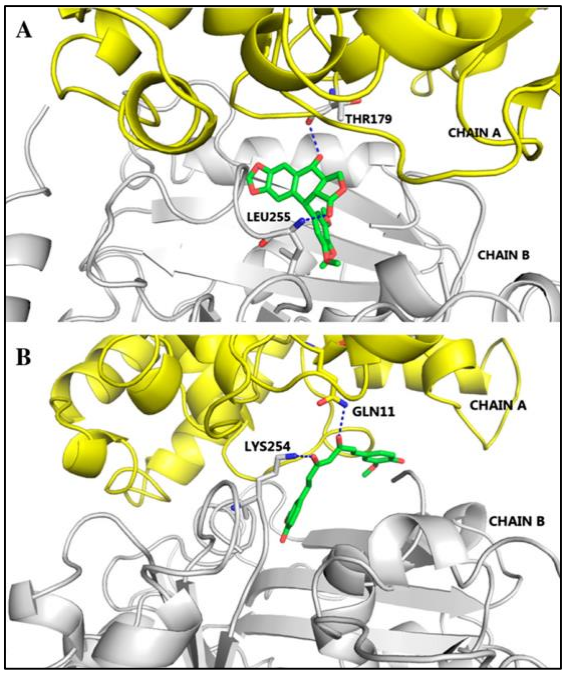


Figure 22 : (A) L'interaction entre la podophyllotoxine et la tubuline. (B) l'interaction entre la partie β-dicétone de la curcumine avec les résidus polaire la tubuline.[51]

La tubuline est un composant essentiel des microtubules du cytosquelette cellulaire et elle joue un rôle majeur, grâce à des procédés de polymérisation/dépolymérisation, dans le transport des chromosomes dupliqués pendant l'anaphase mitotique. Cette propriété est intéressante et a été très étudiée dans le domaine de la cancérologie. En effet une des principales caractéristiques d'une cellule cancéreuse est de se multiplier rapidement. La curcumine, en se liant à la tubuline pour empêcher sa polymérisation ne permet plus aux microtubules d'assurer leurs fonctions de transporteurs chromosomiques pour la répartition du matériel génétique dans chaque cellule fille et conduit au blocage du cycle cellulaire. La curcumine est donc dite anticancéreuse antiproliférative et une des actions lui étant prêtée est cette action sur le fuseau mitotique.

De la même manière que la fonction β-dicétone centrale, les groupements hydroxyles présents en position para aux extrémités de la curcumine ont une capacité d'interaction forte avec plusieurs cibles ou transporteurs protéiques. Ces aptitudes supplémentaires multiplient les capacités de fixation et expliquent le comportement pléiotropique de la curcumine. Heger *et al.* ont résumé sous forme de tableaux, de manière exhaustive, les acides aminés portés par des protéines d'intérêt thérapeutique interagissant avec la curcumine.[48]

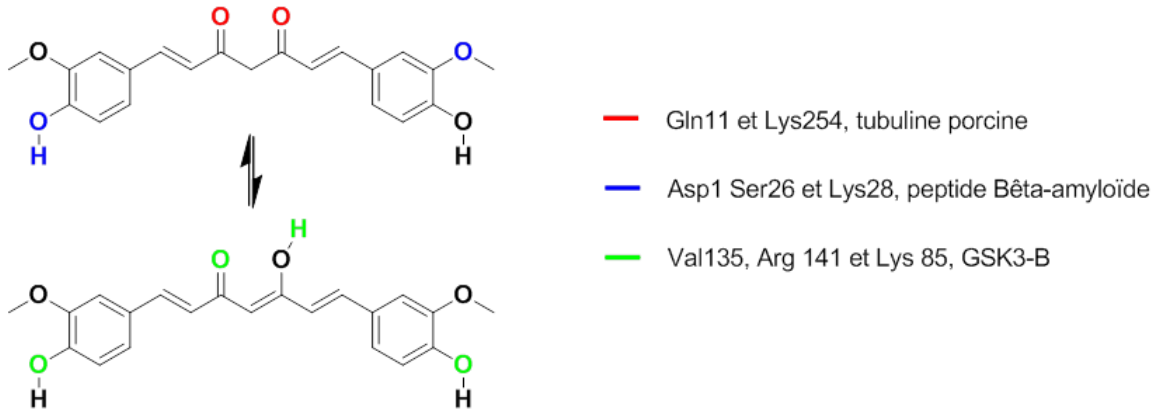


Figure 23 : Schéma général simplifié des différents sites impliqués dans les interactions hydrogènes entre la curcumine dans ces formes cétoniques et énoliques avec les chaînes latérales d'acides aminés de trois cibles d'intérêt thérapeutique.

On peut notamment relever les sites donneurs de liaisons hydrogène de la curcumine avec la lysine 28 et de la phénylalanine présentes sur le peptide β-amyloïde hexamérique. Ces points de liaisons avec la curcumine sont intéressants dans le cadre de recherche sur les activités neuroprotectrices. Ces données ont été exploitées par Ngo *et al.* en 2012.[53]

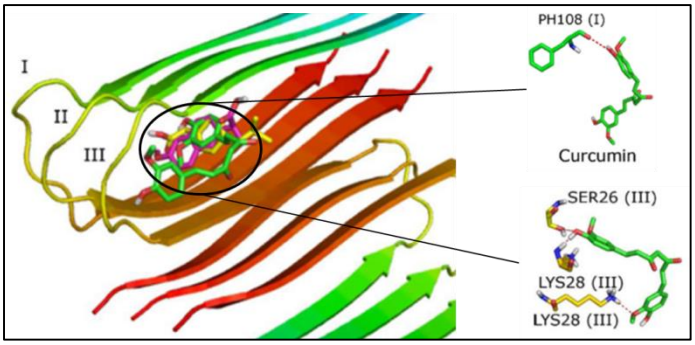


Figure 24 : Modélisation des interactions hydrogène entre la curcumine et le peptide β-amyloïde

L'atome d'oxygène impliqué dans cette fonction éther de la curcumine est le seul à ne pouvoir accepter qu'une liaison hydrogène. Il n'est pas décrit, à ce jour, d'interactions uniquement médiées par ces groupements méthoxy mais ils concourent à favoriser des interactions comme avec la Lys28 présente sur le peptide *β*A.

Cet équilibre céto-énolique entraîne des modifications des caractères physiques de la curcumine du point de vue de son spectre d'absorption de la lumière. La curcumine est un composé qui possède une longueur d'onde maximale d'absorption ou λ_{MAX} dans le domaine du visible qui varie en fonction de sa forme, dicétone ou énol, et de la nature du solvant dans lequel elle est dissoute. Cette modulation spectrale est très importante à évoquer et à prendre en compte car, nous le verrons plus tard, la spectrophotométrie UV-visible est une technique très employée dans le domaine des évaluations biologiques, y compris celles de la curcumine. Dans l'eau où la forme énolique est majoritaire sa λ_{MAX} est de 430 nm. Par exemple, on lui trouve une λ_{MAX} de 435 nm dans le diméthylsulfoxyde (DMSO)

sous la forme énolique alors que sa forme dicétone admet une λ_{MAX} de 454 nm. Les caractères physiques de la curcumine dans le DMSO sont importants à connaître car ce solvant est très largement utilisé, en limite de pourcentage dans l'eau, pour ses facultés de solvatation extraordinaires et son innocuité en faible concentration.[48]

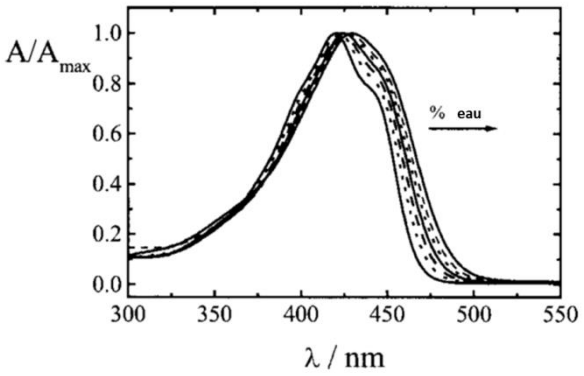


Figure 25 : Spectres de lecture en spectrophotométrie UV-visible donnant l'exemple de l'accroissement de la longueur d'onde maximale d'absorption de la curcumine ou λ_{MAX} (curcumine) dans le dioxane contenant un pourcentage croissant d'eau, respectivement : 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1.[54]

La λ_{MAX} est un paramètre physique propre à chaque réactif dont le rôle est crucial pour les analyses en spectrophotométrie car c'est à cette longueur d'onde que les mesures seront effectuées. Il faut donc connaître les variations de λ_{MAX} de la curcumine avant de sélectionner un réactif pour que les λ_{MAX} respectives soient suffisamment différentes afin de ne pas interférer avec la mesure d'activité et biaiser les résultats.

2.2.3. Capacités d'adaptations structurales dues aux conformères de la curcumine

Comme pour renforcer le pouvoir des sites donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène, la curcumine est capable de se conformer spatialement à une contrainte donnée par une cible moléculaire. Il y a aussi différentes configurations qu'elle peut adopter grâce aux doubles liaisons qui sont au nombre de 3 dans la forme énolique. Ainsi, le linker central peut être assimilé à un bras articulé qui favorise le plus d'interactions possibles entre la curcumine et ses cibles.

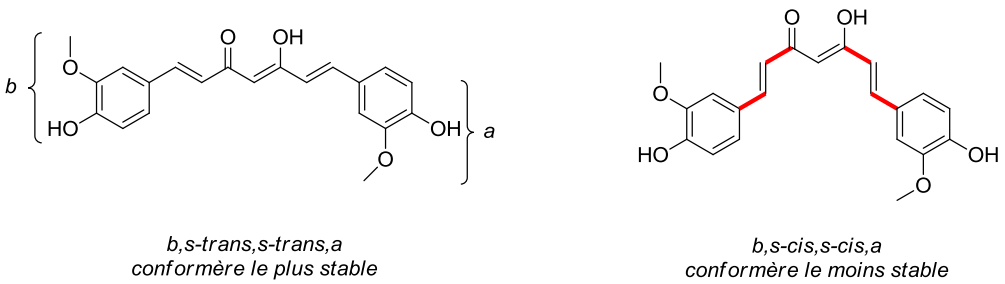


Figure 26 : Schéma de deux conformères de la curcumine où la rotation libre autour des liaisons C-C et C-Ph est représentée en rouge pour le conformère le moins stable.[49]

Dans les solvants polaires ou dans les cellules, que la curcumine est sous sa forme tautomèrique énolique ouverte et il peut alors s'effectuer des isomérisations « *cis*-to-*trans* » autour du carbone en alpha de l'énol. Kolev *et al.* ont donné les structures des conformères énoliques les plus stables de la curcumine. Ils ont nomenclaturé les positions des groupements méthoxy qui varient à cause de la liaison C-Ph. Il apparaît que le conformère le plus stable est le *b,s-trans,s-trans,a*.[49] Il est nécessaire de donner quelques éléments de nomenclature car la curcumine peut admettre jusqu'à 24 conformères étant donné qu'elle possède 4 liaisons autorisant des rotations libres, deux liaisons éthyléniques autorisant une isomérie *cis*/*trans* et 2 fonctions donnant lieu à un équilibre céto-énolique. Les lettres *a* et *b* indique l'orientation du groupement méthoxy, *a* signifie « vers le bas », *b* signifie « vers le haut ».

Globalement, la curcumine est capable de se fixer à de nombreuses molécules biologiques grâce à son adaptation structurale qui est exploitée afin de maximiser le nombre de liaisons intermoléculaires avec ses cibles. Cette capacité permet d'expliquer le caractère pléiotrope de ses propriétés naturelles.

2.2.4. Propriétés chélatantes de cations métalliques et non métalliques multivalents

La partie centrale β-dicétone de la curcumine agit comme toutes les β-dicétones quant à la chélation de cations. Elle a donc montré des capacités pour se lier au bore, cuivre, aluminium, magnésium, zinc, plomb, cadmium, fer ferrique (Fe^{3+}) et ferreux (Fe^{2+}) et le sélénium.

La plupart des sources scientifiques indique que les cations métalliques sont liés par l'oxygène de la forme dicétone, mais certains proposent également des sites de chélation sur les doublets non-liants des oxygènes des groupements méthoxy.[55]

Cette capacité de chélation est très intéressante car elle est aussi le moyen pour la curcumine d'aller se fixer indirectement sur des protéines utilisant des atomes de métaux ou métalloprotéines.

Dans la mesure où la moitié des protéines contiennent des métaux et sachant qu'environ 1/3 ont besoin de métaux pour fonctionner correctement, cette propriété de liaison aux métalloprotéines constitue un phénomène important chimiquement avec des retentissements biologiques exploitables dans des

domaines cliniques variés.[56] Nous verrons par la suite que la perturbation des concentrations plasmatiques de cations métalliques ou dyshoméostasie métallique peut concourir à l'entretien ou l'aggravation de certaines maladies neurodégénératives, et ce en raison de plusieurs points d'impact pharmacologiques qui seront évoqués au fur et à mesure dans la suite de cet ouvrage.

2.2.5. La curcumine : accepteur de Michael.

Cette propriété est un attribut de réactivité chimique de la curcumine pour favoriser les interactions de type covalentes avec des cibles possédant des fonctions nucléophiles comme des thiols, des thiolates ou des amines. Dinkova-Kostova *et al.* ont établi que les molécules acceptrices de Michael sont des inducteurs d'enzymes protectrices de la carcinogenèse et que leur réactivité se fait avec des fonctions thiols ou thiolates. Parmi ces molécules on retrouve des chalcones, des cinnamates, des coumarines, des bis(benzylidène)-acétones et des curcuminoïdes.[57]

L'exemple le plus simple et le plus illustratif est celui du glutathion réduit (GSH). Ce tripeptide de séquence glutamate-cystéine-glycine possède une fonction thiol rendant ce peptide donneur de Michael. L'incubation de curcumine avec un gradient de concentration de GSH mène à une diminution proportionnelle et temps-dépendante de l'absorbance à 430nm (λ_{MAX}) de la curcumine dans les solvants protiques ce qui signifie que la délocalisation électronique est interrompue sur la partie centrale de la curcumine car elle réagit avec le GSH. La formation de ces adduits indique aussi que la curcumine interfère avec le métabolisme redox du glutathion cellulaire.

Ce mécanisme covalent peut également intervenir avec des résidus séléno-cystéines des séléno-protéines.[58] Fang *et al.* ont démontré l'activité inhibitrice irréversible de la curcumine par sa fixation covalente aux thiorédoxines réductases. Ces enzymes cytosoliques, mitochondriales et nucléaires constituent un système, analogue du système glutathion – glutathion réduit, capable de piéger les radicaux libres. La curcumine s'y fixe par l'intermédiaire des résidus séléniés et soufrés et les empêche d'exercer leur pouvoir réducteur, activité recherchée en oncologie afin de favoriser l'apoptose cellulaire induite par la toxicité des radicaux libres que nous aurons l'occasion d'étudier plus en détail ultérieurement.

Ces propriétés à réagir avec des donneurs de Michael ont un rôle important dans la capacité de la curcumine à perturber de manière covalente et donc irréversible, les sites de fixation de certaines enzymes à leurs substrats. Cela concourt à l'action pléiotrope de ce composé naturel.

2.2.6. Solubilité et coefficient de partage (log P)

La curcumine est un composé d'apparence hydrophile par la nature des substituants polaires sur les noyaux aromatiques mais en dépit de ceux-ci, elle n'est pas soluble dans les solutions aqueuses et est au contraire facilement soluble dans les solvants organiques ce qui est confirmé par la mesure de son

log P. Le log P reflète la différence de solubilité d'un composé entre deux solvants non-miscibles (octanol/eau). Pour la curcumine il varie entre 2,3[59] et 2,6.[60] Ce degré relativement élevé de lipophilie est dû à la conjugaison électronique qui s'étend d'un noyau aromatique à l'autre.[50]

2.2.6.1. Solubilité de la Curcumine

La valeur de son log P est assez élevée fait que la curcumine est un composé pratiquement insoluble dans l'eau. Elle possède néanmoins une très bonne solubilité dans les solvants polaires aprotiques et protiques, par ordre de solubilité décroissant : acétone > 2-butanone > acétate d'éthyle > méthanol > éthanol > 1,2-dicholoréthane > 2-propanol > éther diéthylique > benzène > hexane.

Un solvant très utilisé pour les évaluations biologiques de la curcumine est le diméthylsulfoxyde ou DMSO. Il possède une DL_{50} à 18 $g.kg^{-1}$, dans lequel la curcumine est soluble à 11 $mg.mL^{-1}$. Cela dit, le solvant doit être injecté dans un groupe modèle de souris que l'on appelle « témoin ». Le DMSO n'est pas utilisé pur, mais en faible concentration en mélange avec l'eau (1% maximum). Le DMSO possède des propriétés de solvatations exceptionnelles, Il est capable de solvater des molécules dont les polarités et les profils de solubilité sont très variés.[61]

Pour améliorer la solubilité de la curcumine dans l'eau, certains ont fait l'expérience d'augmenter le pH du milieu aqueux. Cela se traduit par une dégradation et la formation d'ions phénolates par solvolyse. De plus, pour l'utilisation de tampons aqueux sur des études *in vivo* ou *in vitro,* le pH ne peut être inférieur à 7,3 et la solubilité de la curcumine à ce pH n'est que de 1,1 mM.

A l'inverse, dans les milieux aqueux légèrement acides, la curcumine est stable sous sa forme moléculaire mais insoluble. C'est la raison pour laquelle on préfère pour cela utiliser le DMSO en faible concentration pour favoriser sa solubilisation.

2.2.6.2. Conséquences biochimiques de la lipophilie de la curcumine

Une conséquence importante de cette lipophilie est que la chaîne centrale peut interagir avec des aminoacides hydrophobes dans des sites actifs de protéines. Par exemple, une étude de docking menée par Liu *et al.* en 2008 a confirmé, entre autres, les interactions hydrophobes entre la curcumine et l'alanine 92 et les tyrosines 91, 94 et 98 des Immunoglobuline G (Ig G) humaines. Cette étude visait à faire de ces immunoglobulines des transporteurs et vecteurs de curcumine, qui est, comme nous le verrons ultérieurement, un composé difficilement biodisponible et dont la vectorisation est une des solutions à l'étude afin d'en améliorer la drugabilité.[62] De manière générale on retrouve ce type d'interaction hydrophobe entre le *linker* central de la curcumine avec des aminoacides hydrophobes comme la leucine, l'isoleucine, l'alanine, la glycine et la valine. Il est également possible que ces liaisons hydrophobes renforcent certaines liaisons électrostatiques entre la curcumine et des résidus polaires.[48]

Le deuxième avantage de cette lipophilie est la capacité de la curcumine à interagir avec les biomembranes. Des études d'intercalation de curcumine *in vitro* dans des modèles de membranes composées de phosphatidyl choline mono-insaturées et saturées l'ont montré.[63] L'association de ces modèles de membranes avec la curcumine permet de mesurer de bonnes constantes de partage qui sont le reflet de sa capacité à être intégrée directement dans une cellule par intercalation dans les membranes.[64]

2.2.6.2.1. Interactions curcumine-biomembranes

Le passage transmembranaire de la curcumine a été très étudié, notamment pour essayer d'expliquer sa très faible biodisponibilité. La calorimétrie différentielle à balayage, la diffraction des rayons-X, la résonance magnétique nucléaire du proton et la spectroscopie infra-rouge à transformée de Fourrier sont les 4 outils d'analyse utiles pour déterminer les étapes essentielles de ce passage à travers une bicouche lipidique. Ces études ne sont réalisées, comme précisé dans le préambule de ce chapitre, que sur des modèles de bicouches lipidiques mimant des membranes cellulaires.

La cinétique de ces interactions correspond à celles des autres composés amphiphiles et suit un processus en deux phases connues et bien documentées. La première étape correspond à l'adsorption de la curcumine sur la bordure de la membrane externe à l'interface membrane-milieu extra-cellulaire avec une force de faible énergie. Ce phénomène est accompagné d'un amincissement de la membrane à cause du déplacement latéral des premières têtes polaires des phospholipides.[65] Après 60 secondes apparaît un état de liaison fortement énergétique qui correspond à la pénétration plus profonde de la curcumine dans le compartiment hydrophobe de la bicouche lipidique. On n'assiste pas à la dimérisation ou multimérisation de la curcumine durant ce processus de partition même lorsque les niveaux de saturation sont atteints à un rapport molaire curcumine/lipide de 0,1 environ.

Concernant la position de la curcumine lors de ce contact, plusieurs hypothèses sont à l'étude. D'un côté nous avons des études qui tendent à proposer que la curcumine s'insère dans la bicouche avec son axe principal disposé orthogonalement à celle-ci. D'autres théories sont proposées sur la base des multiples conformations possibles de la curcumine et des libres rotations autorisées par sa longue chaîne principale qui passerait par la formation préférentielle thermodynamique d'un « noyau membranaire » organisé autour de différents conformères plus ou moins solvatés par des molécules d'eau.

Cette interaction de la curcumine avec les membranes lui procure un rôle modulateur de la réponse de récepteurs membranaires. Elle possèderait une affinité pour la membrane, non pour le récepteur. En conséquence, elle fait partie d'une catégorie de composés appelés PAINS (*pan-assay interference compound*).[66] Ingólfsson *et al.* se sont chargés de lister les interférences possibles d'un ensemble de

composés phytochimiques vis-à-vis d'essais *in vitro* pour lesquels le mécanisme serait médié par cette interaction non-spécifique membranaire.[67]

2.2.6.2.2. La curcumine, un pan-assay interference compound ou PAINS[143]

Les PAINS sont des composés possédant des effets apparents qu'on peut qualifier d'artefacts. Ils sont capables d'interagir par différent biais, non pas avec les cibles pour lesquels ils sont évalués mais avec les techniques et/ou les outils employés pour la réalisation des essais pharmacologiques à l'aide desquels ils sont évalués. L'interaction peut engendrer deux conséquences. Le résultat de l'évaluation biologique réalisée peut masquer l'activité réelle et on prend le risque d'écarter un composé prometteur de la voie clinique. L'évaluation biologique est très satisfaisante et l'on investira des forces et des budgets à l'avenir pour le développement d'un composé qui se révèlera être, pendant les essais *in vivo*, inactif voire toxique.

Rassurons-nous, les PAINS sont connus à l'heure actuelle et des structures chimiques sont, à la manière de fragments, identifiées comme prédisposant à ces problèmes. Cette propriété a fait perdre beaucoup de temps et fonds de recherche et a donné lieu à la parution de nombreux errata dans la littérature scientifique. Les journaux tels que *Journal of Medicinal Chemistry* demandent à ce que les structures susceptibles d'être publiées soient données dans des formats lisibles par des logiciels de screening afin d'identifier les PAINS.[144]

Les mécanismes d'interférences avec les méthodes de test sont multiples mais correspondent, pour la plupart, à des phénomènes d'agrégation, de décomposition chimique, d'interaction avec des protéines et/ou de fluorescence. Un article paru dans le journal *Nature* donne un exemple d'essai que l'on peut réaliser pour un inhibiteur enzymatique : lors d'une dilution importante si l'activité de diminue pas, alors il faut suspecter une molécule PAINS.[143] Pour éviter ou déceler cette propriété, il est préconisé d'utiliser au moins deux tests différents qui pourraient éventuellement être complémentaires pour prouver l'activité recherchée.

La curcumine fait partie de cette catégorie de composés car elle peut moduler la réponse de récepteurs membranaire. Elle possèder une affinité pour la membrane, non pour le récepteur en question. Elle est aussi capable de réagir de façon covalente et non-spécifique avec des protéines d'une manière dite non-médicamenteuse. Elle a fait l'objet d'une étude avec les autres composés dits phytochimiques connus pour être des PAINS. Ingólfsson *et al.* se sont chargés de lister les interférences possibles de ces derniers avec des essais *in vitro* dont le mécanisme est médié par une interaction non-spécifique membranaire.[145]

2.2.7. Stabilité de la curcumine

La stabilité d'une drogue est essentielle, sauf dans le cas d'une pro-drogue, à la conservation de son activité pharmacologique. La connaissance de cette stabilité aide les scientifiques à optimiser la formulation galénique nécessaire pour obtenir une biodisponibilité suffisante et limite la toxicité occasionnée par les produits de dégradation ou de métabolisme.

La curcumine est un composé particulièrement sensible car sa dégradation peut être médiée par plusieurs processus et générée dans différents milieux. Il existe deux grands types de dégradations *in vitro* de la curcumine qui compliquent son usage dans l'industrie pharmaceutique. Il y a la dégradation due à son oxydation et les modifications structurales en découlant qui sont catégorisées en processus photochimiques et chimiques. Un résumé sous forme de logigramme est proposé dans la Figure 27.

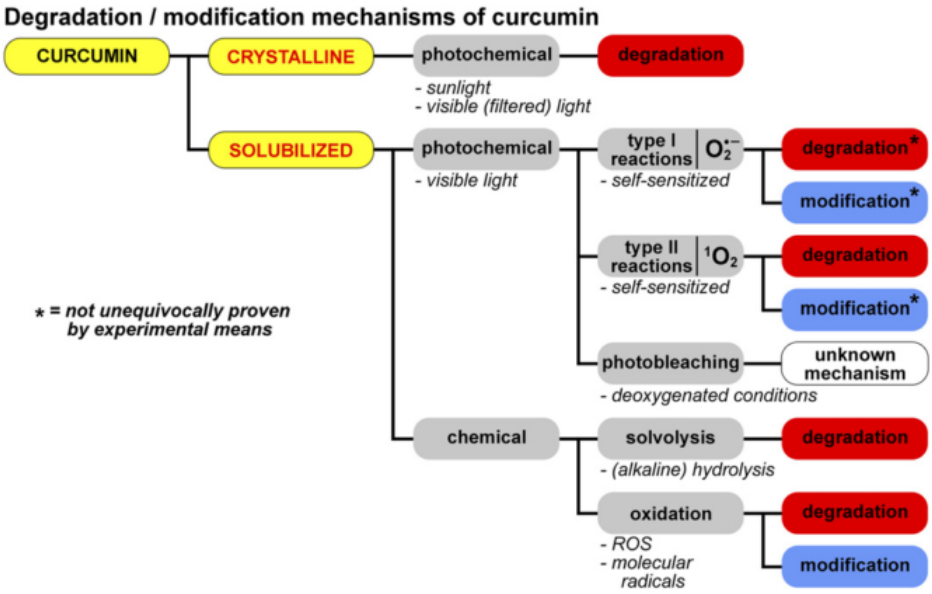


Figure 27 : Résumé des modes de dégradation de la curcumine en fonction de ses états.[48]

Nous avons vu combien chaque fonction chimique composant la curcumine est essentielle à sa distribution dans l'espace et, par conséquent, à son activité. Il apparaît alors évident que le résultat de la production rapide de sous-produits chimiquement différents se traduira comme une diminution, voire une perte totale d'activité.

2.2.7.1. Modification et dégradation oxydative *in vitro* de la curcumine

L'oxydation est le mode de dégradation principal de la curcumine. Il est médié par les Espèces Réactives de l'Oxygène ou ERO. La raison du pouvoir antioxydant de la curcumine réside justement dans le fait qu'elle est oxydée par des radicaux centrés sur l'oxygène produits physiologiquement tels que le radical hydroxyle $^{\bullet}OH$, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et des radicaux péroxyle $ROO^{\bullet}$. Elle réagit également avec les radicaux centrés sur l'azote comme le radical $NO^{\cdot}$ ou centrés sur le soufre comme

le radical glutathion GS·. Elle peut également réagir avec des oxydants comme le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou l'oxygène singulet $^1O_2$.[68] Ces propriétés réactives ne sont pas sans conséquences sur la curcumine qui subit des modifications structurales ou des dégradations. Les modifications structurales peuvent être le résultat de cyclisations intramoléculaires ou de polymérisations induites par la présence d'ERO.

La curcumine est également capable d'auto-oxydation pour former le même type de composés rencontrés après l'action des EROs.[69]

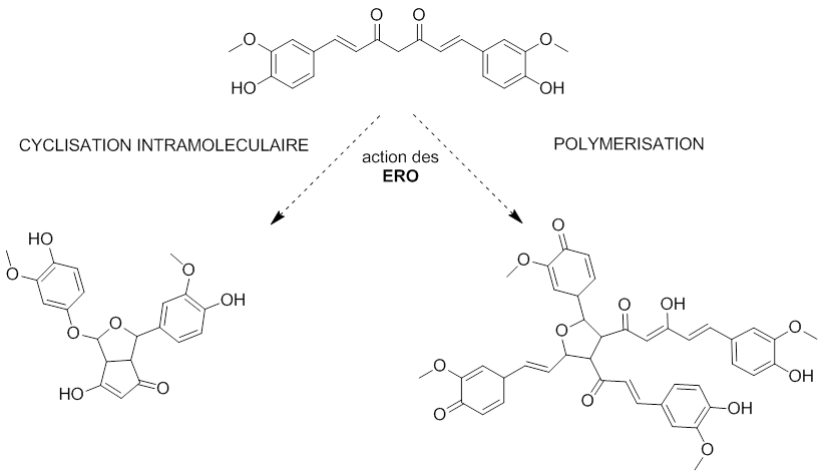


Figure 28 : Exemple de structures pouvant être rencontrées à la suite de l'oxydation de la curcumine par des ERO *in vitro*.

Du point de vue des tests *in vitro* quant à l'évaluation de son activité antioxydante, il est intéressant de relever la réactivité de la curcumine avec des radicaux non physiologiques tels que le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPP•.[5]

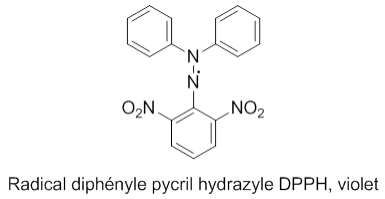


Figure 29 : Structure développée du radical stable N centré DPP·.

C'est un radical centré sur l'azote qui est très stable. On l'utilise pour évaluer l'activité anti radicaux-libres de divers produits naturels comme la curcumine. Cette valeur traduira la pureté de l'extrait. Nous étudierons l'utilité de ce radical ultérieurement.

2.2.7.2. Dégradations photochimiques de la curcumine

La curcumine peut être dégradée par la lumière ou photo-oxydée car elle absorbe fortement dans les longueurs d'onde du domaine du visible. On peut observer cette photo-dégradation quels que soient

son environnement chimique, ou son état cristallin ou solubilisé et ce, même en l'absence d'oxygène ou de lumière UV.

La dégradation photochimique de la curcumine à l'état cristallin dépend du temps d'exposition à la lumière et semble dépendre du type de solvant utilisé pour l'extraction. Ainsi après 120 h de radiation lumineuse, l'on retrouve 34% de vanilline si l'on extrait à l'aide d'éthanol contre seulement 2% à l'aide de méthanol (Figure 31).[70]

L'évaluation de la dégradation photochimique de la curcumine dissoute est plus complexe et très documentée. Les produits de dégradation sont les mêmes qu'à l'état solide et le solvant influe également sur la cinétique de dégradation qui est mesurée par la constante de dégradation k_{deg}.[71]

Réaction photochimique de type I (transfert d'électron)

$$^{3}\mathrm{Cur} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{Cur}^{\cdot-} + \mathrm{O_2}^{+\cdot}$$

Réaction photochimique de type II (transfert d'énergie)

$$^{3}\mathrm{Cur} + \mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{Cur} + {}^{1}\mathrm{O_2}$$

Figure 30 : Deux mécanismes de production d'ERO à partir de la ^{3}Cur.

La curcumine peut également générer des radicaux libres, dont la plupart sont des EROs, par le passage à un état triplet, riche en énergie, de la curcumine ^{3}Cur. Cet état triplet pour la curcumine se compte en microseconde ce qui explique la rapidité de sa dégradation. Elle serait encore accélérée par la présence de dioxyde de titane TiO_2 qui est utilisé dans les fabriques de coton pour « effacer » les tâches de curcuma.[72] Les EROs sont produites par des réactions photochimiques de type I par transfert d'électron à un oxygène moléculaire $O_2^{+\cdot}$ et de type II par un transfert d'énergie à un radical $O_2^{\cdot}$.[73]

2.2.7.3. Dégradations chimiques de la curcumine

A la photosensibilité de la curcumine il faut ajouter une dégradation rapide et conséquente dans les milieux aqueux basiques tamponnés, dans les milieux de culture cellulaire et dans le plasma humain.

On distingue la solvolyse qui est due aux ions hydroxyles présents dans le solvant, des autres processus de dégradation chimique non médiés par les radiations lumineuses. Les produits de la solvolyse sont cependant moins nombreux. On retrouve la vanilline, l'acide férulique et le féruloyl méthane.

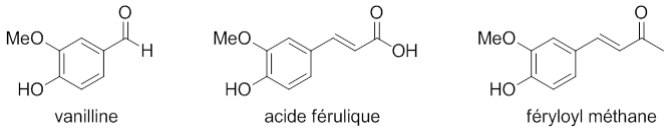


Figure 31 : Produits de solvolyse de la curcumine parmi lesquels on retrouve deux matières premières : la vanilline et l'acide férulique.

Les processus chimiques sont nombreux et sont majoritairement des mécanismes d'oxydo-réduction faisant intervenir des ERO qui peuvent être catalysées par des cations métalliques tels que le fer ou le cuivre. Ces réactions peuvent conduire à des dimérisations ou des cyclisations en fonction des espèces radicalaires générées.[48]

2.2.7.4. Conséquences de l'instabilité (photo)chimique de la curcumine pour les préparations pharmaceutiques

L'instabilité de la curcumine est un des inconvénients à l'origine de nombreux problèmes de biodisponibilité et de formulation pour l'ensemble du corps médical, particulièrement de l'industrie pharmaceutique et enfin pour les éventuels patients malades.

Sa stabilité vis-à-vis des solvants aqueux oblige les galénistes à inclure, pour une administration orale, une grande quantité de curcumine pour compenser une baisse d'activité pharmacologique. Bien évidemment, elle est dissoute dans des solvants pour lesquels sa stabilité est très satisfaisante (DMSO, éthanol) mais entre par la suite en contact avec les milieux aqueux du corps humain comme le suc gastrique, le sang ou encore le cytosol cellulaire. De plus, on ne peut pas comparer directement les milieux physiologiques avec des modèles *in vitro* de tampon en milieu aqueux. Il faut également prendre en compte les éléments actifs constituant les milieux physiologiques. Ainsi, en situation physiologique ou pathologique, les enzymes digestives, sanguines et cellulaires constituent également de grands « obstacles » à surmonter afin d'observer une activité physiologique pour la curcumine. Des essais cliniques ont montré que des administrations orales allant de 2 à 12 $g.j^{-1}$ ne peuvent décemment être administrées à des patients atteints de cancers sans causer une baisse de l'observance.[74,75]

Chapitre III. Propriétés thérapeutiques de la curcumine

La curcumine est donc un composé issu du milieu naturel possédant de nombreuses fonctions chimiques accompagnées d'une structure la rendant particulièrement adaptable à plusieurs cibles moléculaires. Ceci lui procure une importance dans le domaine de la santé car elle est capable d'agir sur des cibles impliquées dans plusieurs processus physiopathologiques dont le plus étudié à ce jour est la cancérologie. Une partie sera donc consacrée à la description globale des atteintes cancéreuses et des caractéristiques des cancers pour mieux appréhender les actions de la curcumine sur ces différents éléments.

Plus récemment découverte intéressante pour ces propriétés remarquables dans les atteintes neurodégénératives. La maladie d'Alzheimer et les actions de la curcumine sur ses causes moléculaires seront particulièrement développées dans ce chapitre en raison du faible nombre de solutions aujourd'hui proposées pour soigner cette maladie. La potentialité pléiotrope de la curcumine dans les pistes de traitement de cette maladie multifactorielle aux causes moléculaires complexes est pertinente. Ces dernières décennies ont été marquées par de nombreuses études fondamentales et cliniques qui, sans permettre d'améliorer les pronostics, ont accru les espoirs de mettre au point des thérapies modifiant l'évolution de la maladie.

1. Cancérologie

Après la description des caractéristiques des cellules tumorales et leur organisation en différentes catégories, nous décrirons pour lesquelles la curcumine présente un intérêt pharmacologique et comment elle intervient à ces niveaux.

1.1. Caractéristiques communes aux processus tumoraux

La nature complexe des cellules tumorales est très profondément étudiée. Il en résulte une multitude d'implications moléculaires ou bio moléculaires et ce, dans plusieurs cascades de signalisations le plus souvent liées entre-elles ou indépendantes. Devant cette complexité et dans l'esprit d'aider à répertorier les données cliniques et expérimentales Hanahan et Weinberg ont organisé les observations phénotypiques des cellules tumorales en huit caractères permettant de différencier d'une cellule saine.[76,77]

Heger *et al.* dans la revue *Cancer Pharmacology of Curcumin* donnent une version simplifiée de ces 8 caractéristiques afin de mieux appréhender les rôles de la curcumine sur les cellules tumorales. Cette classification repose sur huit chiffres Romain précédés du *H* de l'anglais *Hallmarks* traduit par « caractères » en français, soit H-I à H-VIII.[48]

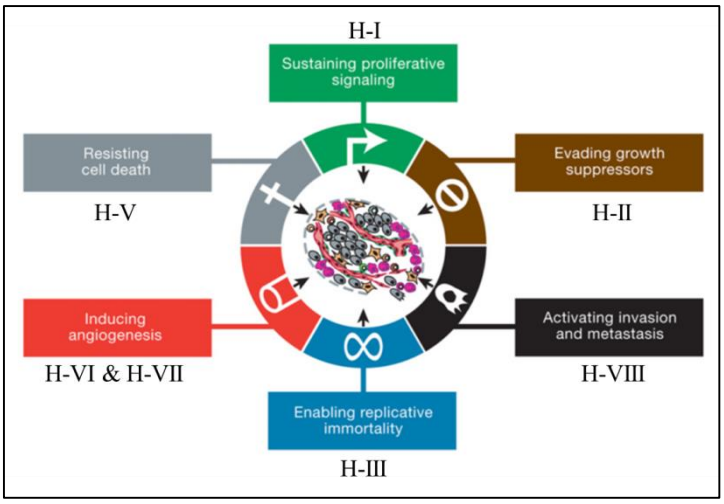


Figure 32 : Schéma général des caractéristiques du cancer proposé par Hanahan et Weinberg[76]

Le caractère souverain d'une cellule tumorale est sa capacité à maintenir un état de prolifération permanent, c'est la catégorie H-I. C'est le résultat d'une augmentation pathologique des concentrations de facteurs de croissance cellulaires et /ou d'une mutation « activatrice » ordonnant la surexpression de gènes codant pour des récepteurs aux facteurs de croissance.

Les tissus sains répondent à ces anomalies en produisant des facteurs d'inhibition tels que les facteurs de croissance transformant (TGF) β ou des inhibiteurs de cycle cellulaire.[78] Cependant les cellules tumorales sont devenues insensibles à ces signaux de non-croissance (H-II).

Les cellules saines sont capables de se renouveler un nombre limité de fois. Cela est dû aux extrémités de l'ADN, les télomères, qui sont diminués à chaque cycle cellulaire. Dans les cellules tumorales, l'enzyme chargée de « reconstruire » les télomères, la télomérase, est surexprimée et la longueur des télomères est conservée à chaque cycle cellulaire. Ceci donne une capacité de réplication d'ADN et un nombre de cycles cellulaires illimités (H-III).[79]

Le développement d'une tumeur cancéreuse n'est pas reconnu par le système immunitaire comme anormal, c'est la quatrième catégorie de dysfonctionnement d'une situation tumorale (H-IV). En situation pathologique, le développement de la masse tumorale est appuyé par une forme de sélection naturelle de la part du système immunitaire. Les cellules hautement immunogènes sont remplacées par des cellules à potentiel faiblement immunogène. De plus, les cellules tumorales sont capables de moduler leurs sécrétions de cytokines afin de diminuer le nombre de cellules cytotoxiques locales telles que les Lymphocyte T cytotoxiques ou encore les cellules *natural killer* (NK).[80]

Les cellules cancéreuses sont également capables d'inverser la balance physiologique qui existe entre les protéines pro- et anti-apoptotiques. Cette inversion se fait au profit de l'expression des gènes codant pour les membres anti-apoptotiques ou protéines de survie de la famille Bcl-2 et entraîne une résistance intrinsèque et extrinsèque à la mort cellulaire programmée (H-V).[81]

D'un point de vue métabolique, ces cellules qui se divisent sans cesse et anarchiquement ont besoin de nutriments et sont capables de reprogrammer leur métabolisme énergétique jusqu'à des taux disproportionnés d'utilisation du glucose et de la glycolyse anaérobie (H-VI). Reliée au problème de nutriments et d'oxygène, l'augmentation de leur métabolisme ne suffit pas pour contenter leurs besoins métaboliques, et le microenvironnement tumoral a besoin de nouvelles voies d'acheminement de nutriments qui se manifestent par la création de vaisseaux sanguins ou angiogenèse (H-VII). Ce phénomène angiogénique est médié principalement par les cellules immunitaires de lignée myéloïde qui sont attirées par chimiotactisme dans le microenvironnement tumoral. Une fois sur place, ces leucocytes sécrètent des protéases et des chimiokines qui vont non seulement induire une sécrétion de facteur de croissance épidermique et vasculaire (VEGF) mais également réprimer les messagers anti-angiogéniques comme l'interleukine (IL) -12.[82]

Une fois les néovaisseaux formés, la dissémination des cellules tumorales peut commencer. Elles quittent le foyer primaire et rejoignent les voies sanguines ou lymphatiques. Les cellules anormales vont proliférer et former un foyer tumoral secondaire appelé métastase. Les organes proches sont touchés, comme les côtes ou les vertèbres cervicales dans le cas de cancer mammaire ou pulmonaire. On retrouve également des atteintes d'organes à distance du foyer primaire dans les organes à fort débit sanguin comme le foie ou les reins. Cette caractéristique de migration de cellules tumorale et d'invasion d'organes sains est la huitième présentée par Hanahan (H-VIII).[83]

1.2. Cibles moléculaires directes de la curcumine et conséquences pharmacologiques

1.2.1.Récepteurs de la famille ErbB

Cette famille de récepteurs est constituée de quatre sous-familles : ErbB-1 codé par HER1 qui est le facteur de croissance épidermique (EGFR), ErbB-2 codé par HER2/neu qui est un proto-oncogène responsable de la prolifération cellulaire anormale dans des processus tumoraux, ErbB-3 et ErbB-4.

Au niveau structural, ce sont des protéines transmembranaires dont le domaine extra cellulaire est riche en résidus cystéines et le domaine intra cellulaire possède une tyrosine kinase. Ces récepteurs sont capables de former des hétéro- ou homo-dimères actifs s'autophosphorylant pour induire un signal cellulaire.

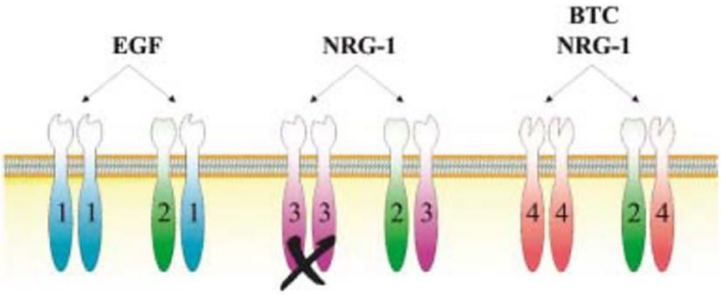


Figure 33 : Schémas des différents sous-types de récepteurs ErbB et les principaux ligands ainsi que leurs affinités respectives pour tel ou tel récepteur. La croix indique que NRG-1 empêche la transduction d'un signal par sa fixation sur l'homodimère ErbB-3.[84]

Grâce aux capacités acceptrices de Michael de son linker central, la curcumine est capable de se fixer de manière covalente sur le domaine tyrosine kinase des récepteurs ErbB-2.[85] Elle peut ainsi inhiber la phosphorylation de l'ATP considérée comme « cause » de prolifération cellulaire permanente (H-I). Un mode d'action similaire est applicable sur les récepteurs ErbB-1 et passe par deux voies de signalisation différentes. La voie du Ras-Raf-MAPK qui ne concerne que les récepteurs ErbB-1 et celle de PI3K-Akt qui concerne les récepteurs hétéro-dimèriques ErbB-1/2. Dans ce cas, la curcumine se fixe aussi de manière covalente sur le domaine tyrosine kinase d'ErbB-1 et condamne ce dernier à être dégradé par la voie des ubiquitines dans le protéasome. Ce phénomène conduit à une diminution directe du nombre de récepteurs capables de capter des facteurs de croissance ce qui réduit la prolifération cellulaire (H-I).

La curcumine agit sur l'insensibilité aux facteurs inhibiteurs de cycle cellulaire (H-II) en induisant l'expression de gènes codant pour des protéines inhibitrices du cycle cellulaire telles que pRB ou p53.[86] Cette induction est liée à l'inhibition, médiée par la curcumine, de la voie de signalisation ErbB-1-Akt qui entraîne une activation de la protéine p53 en cas de stress oncogénique. De la même façon, Lee et Chung ont montré que la curcumine, par l'activation de la protéine p53, réprime indirectement la production de télomérases ce qui permet de réduire la taille des télomères et diminue le nombre de réplications possibles de la cellule tumorale issue de cancers pulmonaires non à petites cellules humains.[87]

La diminution du nombre de récepteurs ErbB-1 entraîne une diminution de la résistance à l'apoptose (H-V) grâce à la non-répression de la protéine p53 qui induit l'augmentation des taux de membres pro-apoptotiques de la famille Bcl2.[88] Cette diminution est également importante dans la lutte contre l'angiogenèse (H-VII) et le développement de métastases (H-VII) car la dégradation d'ErbB-1 entraîne une diminution de la protéine NF-κB responsable de la hausse de la traduction de facteurs de croissance proangiogéniques tels que le VEGF.[89]

1.2.2.Les protéines kinases C

Les protéines kinases C ou PKC constituent une famille contenant une dizaine de sérine/thréonine kinases et sont classées selon leur mode d'activation et leur spécificité de substrats. Ce sont des protéines intracellulaires qui sont activées par le calcium ou du diacylglycérol produit par les protéines G couplées à des récepteurs (GPCR) et le VEGRF2. Ces deux voies de signalisation métabolique sont placées au centre de processus malins depuis plusieurs années et il a été prouvé que la stimulation des PKC est liée au développement, à la progression et à la métastase de tumeurs malignes.[90] Par conséquent, l'augmentation de l'activité des PKC a été pendant longtemps corrélée à la présence d'un processus tumoral. Depuis peu, l'étude de l'ensemble des isoformes de cette famille tend à montrer que chaque isoforme joue un rôle dans une voie de signalisation différente qui peut avoir des effets opposés.

Les études de docking moléculaire nous apprennent que la curcumine interagit avec le domaine C1B de la PKCδ par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogène, l'une entre un groupement hydroxy et la fonction carbonyle de la leucine 251, la seconde entre un oxygène phénolique et l'amide de la glutamine 257.[91]

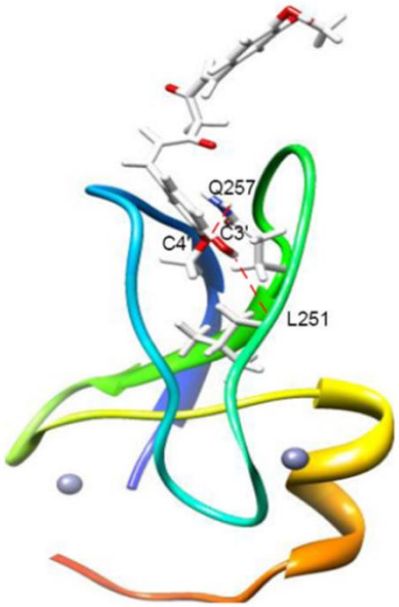


Figure 34 : Modèle de curcumine en contact avec PKCδ, les atomes d'oxygène sont en rouge et les liaisons hydrogènes potentielles sont représentées par des pointillés rouges avec la lysine 251 et la glutamine 257. Les petites sphères grises sont des atomes de Zinc.[91]

En modulant l'activité des voies de signalisation médiées par des PKC, la curcumine a montré qu'elle pouvait promouvoir l'apoptose et inhiber la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (H-V et H-VII).[92,93]

1.2.3.Enzymes impliquées dans la synthèse des prostaglandines

Les prostaglandines ou PG sont un groupe de lipides dont certains peuvent posséder la fonction de messagers. Elles sont produites par des cascades enzymatiques en réponse à des médiateurs pro inflammatoires ou des facteurs de croissance. Au niveau cellulaire, la cyclo oxygénase 2 ou COX-2 est une enzyme clé dans la synthèse des prostaglandines. La COX-2 est cytosolique et induite par des facteurs environnementaux comme le stress oxydatif et la libération de messagers pro-inflammatoires que l'on retrouve fréquemment en situation pathologique chronique, aiguë ou tumorale.[94]

La surproduction de PG suite à l'induction de la traduction de COX-2 entretient une inflammation tissulaire continue en situation tumorale. Ceci est propice à la vasodilatation et à l'apport de nutriments contribuant ainsi à la croissance de la masse tumorale et peut également faciliter la dissémination des cellules tumorales vers les vaisseaux sanguins puis les autres organes (processus métastatique).

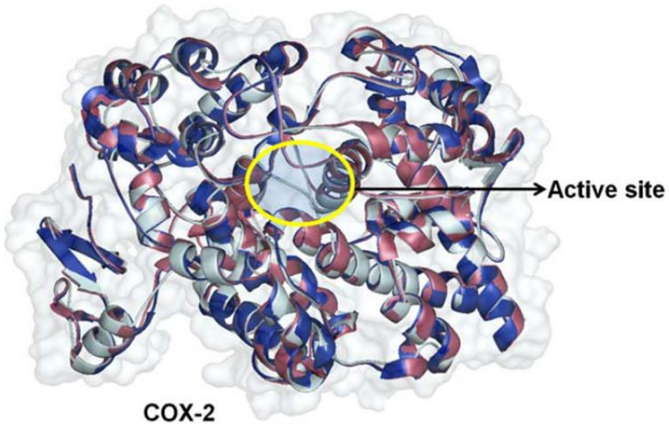


Figure 35 : Modélisation de la cyclooxygénase-2 et représentation de son site actif.[95]

Le rôle central attribué aux PGs dans l'oncogenèse a fait de la COX-2 une cible de choix dans le traitement des cancers par l'élaboration d'inhibiteurs de COX-2 en tant qu'agents de prévention ou cytostatiques. Malheureusement, ces agents se sont révélés antiagrégants plaquettaires, effet secondaire redoutable empêchant leur utilisation chez des patients déjà fragilisés par une pathologie cancéreuse.[96]

La curcumine peut interagir directement avec la COX-2, sur son site actif, par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes majoritairement et d'une liaison hydrogène avec la sérine 530. Le fait qu'elle se fixe dans le site catalytique indique qu'elle agit de manière compétitive à l'acide arachidonique qui en est le substrat naturel. Cependant, l'activité de la COX-2 n'est diminuée que de 20% en présence de curcumine. La curcumine reste intéressante car elle agit à d'autres endroits dans

l'anabolisme des PGs, notamment en amont, en diminuant la phosphorylation de phospholipase A2 cytosolique ($cPLA_2$).[97]

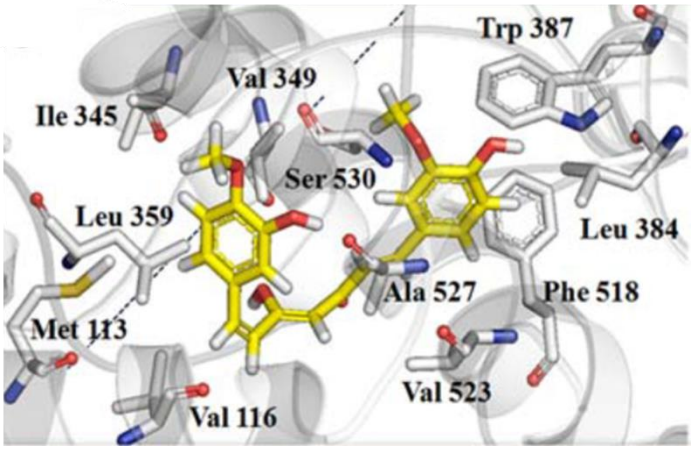


Figure 36 : Modélisation par docking du complexe COX-2/curcumine et représentation des acides aminés présents dans le site actif engageants des interactions hydrophobes avec les noyaux aromatiques de la curcumine et une liaison hydrogène avec la Ser530 avec un groupement méthoxy.

L'inhibition de la synthèse des PGs par la curcumine a de l'influence sur plusieurs caractéristiques du processus cancéreux. La concentration de NF-κB est dépendante de nombreux facteurs dont la présence de PGs (nous avons évoqué précédemment le rôle de ce dernier dans l'angiogenèse *via* la protéine p53) et NF-κB intervient également dans les cascades apoptotiques en régulant la sécrétion de microARN-21 qui est pro-apoptotique. La diminution de la production de PGs entraînée par la curcumine va donc avoir un impact pro-apoptotique (H-V). La surexpression de VEGF dépend partiellement de la présence de PGs.[98] Par cet intermédiaire la curcumine, en régulant négativement la production de PGs, exerce une activité anti-angiogénique (H-VII). La curcumine est aussi capable de rétablir un équilibre en faveur d'une immunité acquise par l'intermédiaire de la baisse du recrutement de macrophages qui sont des cellules de l'immunité innée et non spécifique (H-IV).[48]

1.2.4.Le récepteur à la vitamine D.[99]

La vitamine D_3 est une hormone stéroïdienne dont le $1\alpha,25\alpha(OH)_2D_3$, ou calcitriol, après avoir subi trois étapes d'activation successives, dans la peau, le foie et les reins, est le métabolite actif. Le calcitriol est considéré depuis longtemps comme un élément indispensable dans le maintien de l'homéostasie calcique et du remodelage osseux. Depuis moins d'une dizaine d'années, on lui reconnaît une propriété anticancéreuse par le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire. Nous savons aussi que dans une pathologie tumorale, il y a une déplétion de vitamine D dans la cellule et le cycle cellulaire peu « s'emballer ». La curcumine a été récemment identifiée comme étant un ligand direct du récepteur à la vitamine D ou RVD. Le K_i de la curcumine pour le RVD est de 2,9 µM, affinité ne pouvant pas pleinement expliquer son activité. Sa puissance réside dans le fait qu'elle possède une constante de dissociation, en présence de vitamine D_3, avec le complexe VitD/RVD ou K_d

de l'ordre de 0,1 nM. La curcumine peut donc ainsi rétablir une régulation de la multiplication cellulaire quand il y a une insuffisance en vitamine D_3 (H-I).

1.2.5.Acide Désoxyribo Nucléique

En situation physiologique, en amont de la division cellulaire, le patrimoine génétique de la cellule mère doit être sain car l'information génétique héréditaire transmise doit être intacte. Si un défaut mineur apparaît sur le matériel génétique, alors des processus se mettent en place pour le réparer. Lorsque ces défauts sont trop importants, la cellule mère émet des signaux de non viabilité et sa destruction est programmée. C'est un processus de mort cellulaire programmée que l'on appelle « apoptose ». De cette manière une anomalie génétique susceptible d'induire un processus cancérigène ne perdure pas dans la filiation.

Certaines erreurs génétiques peuvent parfois être conservées ou non détectées par les éléments réparateurs et, lorsque ces erreurs sont associées à la déficience de signaux apoptotiques, la cellule peut entrer dans un processus cancéreux. On retrouve dans les chimiothérapies anti-cancéreuses conventionnelles des agents ayant pour cible l'acide désoxyribonucléique ou ADN, support de l'information génétique. De plus, les cellules cancéreuses se multiplient beaucoup plus vite que les autres et c'est un moyen de cibler les cellules malades.

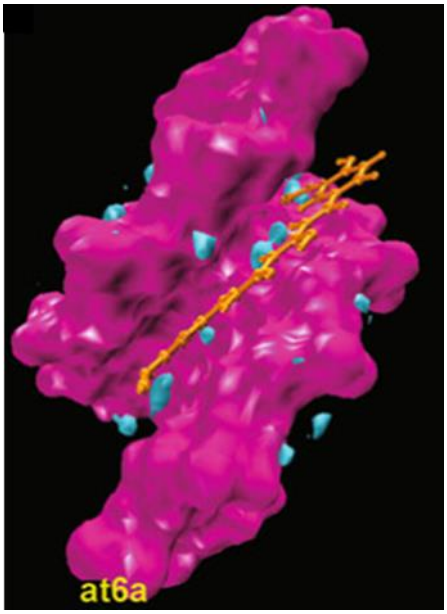


Figure 37 : La curcumine modélisée dans le petit sillon d'un fragment d'ADN. Elle interagit directement par des liaisons hydrogènes et par l'intermédiaire de molécules d'eau représentées en bleu.[100]

La curcumine est capable de se lier à l'ADN sur les thymines dans les petits sillons et les adénines et guanines dans les grands sillons de la double hélice par l'intermédiaire de liaisons hydrogène directes ou médiée par des molécules d'eau. Cette interaction est responsable d'un arrêt du cycle cellulaire (H-

I) et d'une induction d'apoptose (H-V). On peut ajouter à ce panel d'activités anti-cancéreuses des processus de modulations épigénétiques induits par la curcumine. [101]

La curcumine est capable d'induire et de réguler certains phénomènes épigénétiques engendrant des modifications d'encombrement stérique sur les histones qui ont pour rôle de réguler les régions pouvant être transcrites ou non de l'ADN par l'intermédiaire de la stabilisation des nucléosomes. Les nucléosomes sont des éléments nucléaires constitués de 8 sous unités appelées histones autour desquelles l'ADN s'enroule pour former ce que l'on appelle la chromatine condensée ou hétérochromatine. Le complexe nucléosome/ADN est stabilisé par l'histone H1 qui est une histone extérieure au nucléosome. La forme de l'histone H1 et des autres histones, par le biais d'acétylation/déacétylation réalisées par les enzymes respectives histone acétyltransférases (HAT) et histone désacétylases (HDACs), régule la condensation de l'ADN. Il existe d'autres réactions épigénétiques comme la méthylation de l'ADN contrôlés par les DNA méthyltransférases (DNMTs).

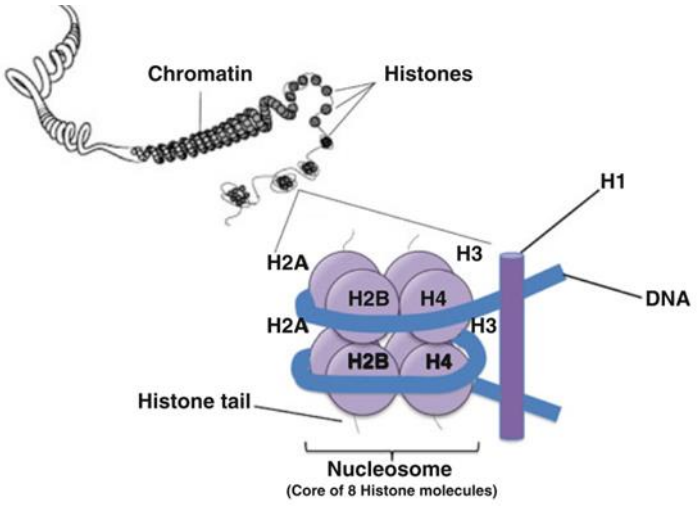


Figure 38 : Schéma représentant la chromatine condensée formée d'ADN enroulé autour des nucléosomes et stabilisés par l'histone H1.[101]

Ces phénomènes épigénétiques régulent l'expression de microRNA (miRNA) qui sont les fruits de la transcription de certaines régions de l'ADN. La curcumine ainsi que certains régimes alimentaire ont été identifiés comme capables d'altérer l'expression des miRNA en ayant une action sur les enzymes HDACs, HATs, DNMTs. L'action de la curcumine sur ces enzymes est responsable, accompagnée de l'ensemble des mécanismes déjà décrits, de l'apoptose cellulaire dans les situations tumorales.

La curcumine présente une potentialité pléiotrope dans le traitement de la MA, maladie multifactorielle aux causes moléculaires complexes. Elle agit directement en tant qu'inhibiteur de l'agrégation des peptides Aβ et de l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée et indirectement grâce à l'inhibition d'enzymes responsables de cette hyperphosphorylation. Elle possède également des propriétés chélatantes d'ions métalliques, antioxydantes et anti-inflammatoires. La suite de ce manuscrit est dédiée à la description de la MA et des actions de la curcumine sur cette pathologie.

2. Maladie d'Alzheimer

Il existe de nombreuses formes de démences. La démence est un syndrome qui est la conséquence de plusieurs troubles neuro-pathologiques qui s'installent progressivement. L'affection de la mémoire, du comportement et du raisonnement empêche les personnes atteintes de réaliser les gestes du quotidien. La maladie d'Alzheimer (MA) fait partie de ces neurodégénérescences qualifiées d'irréversibles.

Il est indispensable de bien connaître cette maladie multifactorielle afin d'apprécier la multitude de cibles moléculaires qui s'offrent à la science pour essayer d'enrayer sa progression et pour comprendre les effets multiples que la curcumine peut exercer.

2.1. Généralités sur la Maladie d'Alzheimer

La MA a été décrite pour la première fois en 1907 par le neuropsychiatre Allemand Aloïs Alzheimer,[102] à partir de l'étude d'une patiente âgée de 51 ans admise dans un asile psychiatrique pour cause de démence.

Il existe deux formes de MA, une familiale et une sporadique. La forme familiale est héréditaire et génétique, elle se manifeste assez tôt (< 60 ans) et c'est la moins fréquente (5 à 8 %). Sa transmission obéit aux lois de Mendel et s'effectue selon un mode autosomique dominant. Les mutations génétiques transmises portent sur les gènes codant pour la Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP) et les Présénilines 1 et 2 (PSEN1, PSEN2). La MA sporadique est majoritaire, non héréditaire. Elle se manifeste plus tardivement (> 60 ans) et représente 90% des formes de MA. Il existe une prédisposition génétique pour les patients qui sont porteurs d'une altération allélique sur les gènes codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE).

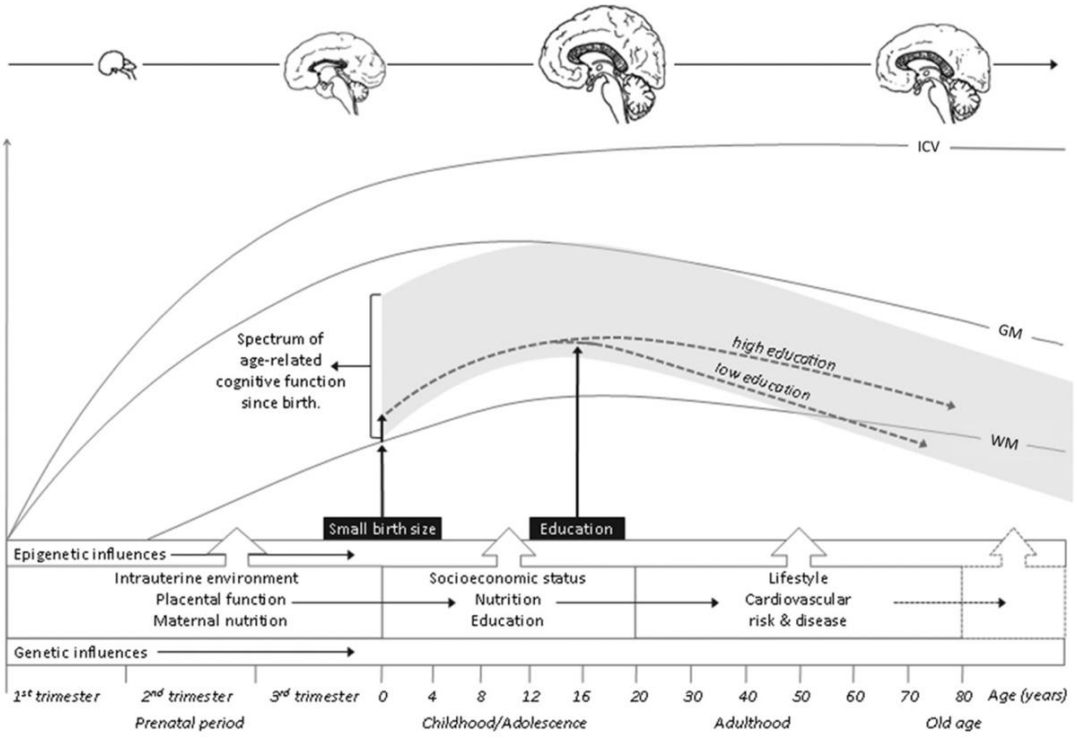


Figure 39 : Influences des différents stades de la vie sur le vieillissement cérébral basé sur les mesures du volume intracrânien (ICV), de la masse de substance grise (GM) et blanche (WM).[103]

Cette forme sporadique est aussi la conséquence de plusieurs facteurs environnementaux tels que l'alimentation, le tabagisme, la consommation d'alcool ou la sédentarité physique. On retrouve même certains facteurs sociaux comme l'éducation ou le déroulement de la période de croissance prénatale qui seraient des paramètres influençant la qualité du vieillissement cérébral et qui sont à prendre en compte dans le risque de développer une MA sporadique.[103]

2.1.1. Enjeux économiques et médicaux

La MA, forme de démence la plus commune chez la personne âgée, est un trouble chronique, progressif, dégénératif et irréversible du cerveau accompagné de déficits mnésiques et cognitifs.[102] Entre 2011 et 2014, l'estimation du nombre de personnes atteintes de MA dans le monde est passée de 35,6 millions à 44 millions. Ce chiffre devrait tripler d'ici 2050. Cette augmentation sera particulièrement constatée dans les pays en voie de développement. Les plus fortes augmentations sont prévues en Chine, en Inde et chez leurs voisins du Sud Asiatique et de l'Ouest Pacifique. Les coûts globaux engendrés par les démences séniles étaient estimés à 604 Milliards de dollars en 2011.[104]

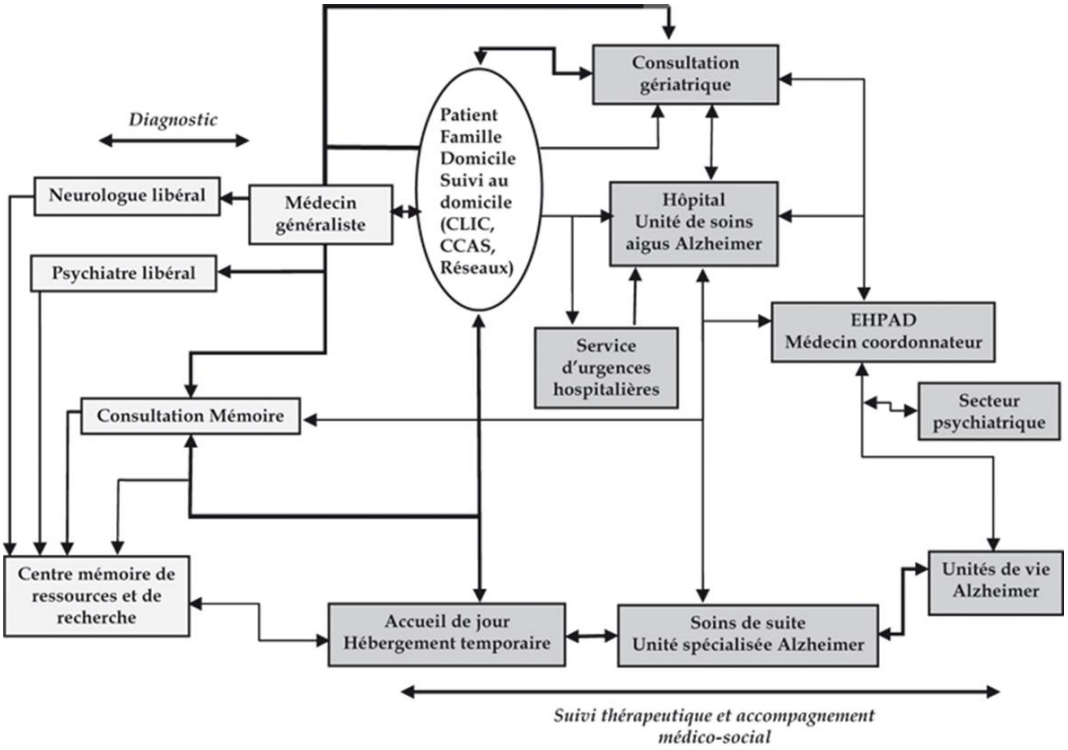


Figure 40 : Dispositifs Français de prise en charge pour les personnes atteintes de la MA en 2007.[105]

La Figure 40 représente les institutions françaises et les relations médico-sociales qui existent entre-elles. Un plan « Solidarité grand âge » a permis aux Etablissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes (EHPAD) de pouvoir accueillir plus de patients Alzheimer dans des secteurs spécifiques dit « protégés ».

La maladie d'Alzheimer a été décrétée « grande cause nationale » en 2007 et l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) s'est vue dotée d'un milliard et demi d'euros pour lancer le « Plan Alzheimer 2007-2011 », d'une envergure égale à celle du « Plan Cancer ». Un deuxième plan Alzheimer annoncé en 2014 a été intitulé « Plan Maladie Neurodégénératives 2014-2019 ». Il comprend cette fois-ci des axes de recherche portant sur d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson et en outre l'enveloppe s'en trouve considérablement réduite. Son montant s'élève à 470 millions d'euros.[105,106]

2.1.2. Sémiologie et critères diagnostiques

La MA est une maladie neurodégénérative corticale d'évolution lente entrainant un déclin cognitif continu et irréversible. Elle se traduit cliniquement comme un déficit cognitif multiple comprenant à la fois une **amnésie** (altération de la mémoire) et l'un ou plusieurs des troubles suivants : **aphasie** (difficultés à parler ou comprendre des paroles), **apraxie** (problèmes de préhension d'objet), **agnosie** (déficit de la reconnaissance d'objets ou de personnes) et/ou un **syndrome dysexécutif** (projets, organisation, pensées abstraites).[107] Lors de l'anamnèse, doivent être écartées les autres causes

d'affections du système nerveux central, les affections systémiques générales (hypothyroïdie, neurosyphilis, SIDA terminal, …), les affections toxicologiques chroniques (alcoolisme, dépendance opiacées, …) ou une affection psychiatrique sous-jacente.

Le diagnostic de certitude de la maladie d'Alzheimer (MA) est aujourd'hui encore effectué post-mortem. C'est pourquoi on retrouve en clinique la notion de « démence sénile de type Alzheimer » pour un ensemble de patients âgés souffrant de confusion progressive. Aujourd'hui, la science permet à la médecine d'établir un diagnostic précoce fiable grâce à l'association de critères cliniques, d'imagerie médicale et enfin, si nécessaire, de dosages ou détection de marqueurs biologiques. Mais pour que le diagnostic soit établi avec le moins de biais possibles, le cheminement du patient est très balisé et l'enchaînement des étapes doit être respecté.

Il commence chez le médecin généraliste qui s'aide de questionnaires types comme le *Mini Mental State Examination* ou MMSE, décrit par Folstein en 1975[108] et recommandé par le Groupe de Recherche sur les Evaluations Cognitives ou GRECO depuis les années 90 en France.[109]

Si le patient montre une perturbation de la cognition il est alors adressé à un réseau de soin constitué de praticiens spécialistes que l'on appelle « consultation mémoire de proximité » ; on en dénombre 400 en France aujourd'hui. Dans ces structures, sont alors réalisés des tests neuropsychologiques afin d'aider le patient à évaluer les répercussions psychologiques de ses troubles cognitifs sur lui-même et son entourage; puis une imagerie par résonance magnétique qui a pour but de déceler une anomalie de forme et de volume de l'hippocampe (région corticale touchée précocement dans la MA).

Lorsque le patient est jeune ou s'il subsiste un doute sur le diagnostic, il peut alors être conduit vers un centre expert (un par région en France) ou un complément de diagnostic sera établi par dosage des marqueurs biologiques présents dans le liquide céphalo-rachidien. Ces marqueurs biologiques seront décrits dans un paragraphe ultérieur. Cet examen complémentaire ne met pas en évidence les lésions de la maladie mais en est le reflet et est fiable à 85% lorsque le cheminement patient est respecté.

2.2. Physiopathologie et causes moléculaires de la maladie d'Alzheimer

La MA est une maladie multifactorielle qui s'articule autour de deux types de lésions cérébrales principales : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Les hypothèses physiopathologiques de la MA sont basées sur l'analyse spatio-temporelle des lésions ainsi que sur la perturbation de l'homéostasie environnementale à proximité de celles-ci. Les processus de formation et de progression de ces lésions ont été étudiés au niveau moléculaire pour mettre en évidence plusieurs protagonistes directs.

Au niveau moléculaire direct, ce sont des problèmes d'ordre protéique qui sont les éléments originels de la pathogenèse Alzheimer. Le peptide β-amyloïde ou Aβ est responsable de la formation des plaques séniles. Son accumulation est le fruit de dysfonctionnements physiologiques tant au niveau de sa production, à partir d'une Protéine Précurseur de l'Amyloïde (APP) clivée par diverses sécrétases, qu'au niveau de sa clairance. L'origine des DNF est due à l'hyperphosphorylation anormale de la protéine Tau dans l'espace intraneuronal. Ces deux dysfonctionnements protéiques sont liés et engendrent des modifications de l'équilibre physiologique cérébral aux niveaux biochimique et biologique qui sont des facteurs aggravant de la dégénérescence neuronale. On peut citer la perturbation de l'homéostasie des métaux, la présence d'un stress oxydatif permanent auto-entretenu par un état d'inflammation continue, le tout accompagné d'un dysfonctionnement mitochondrial.

Ces dysfonctionnements moléculaires et les liens plus ou moins étroits existant entre-eux sont à l'origine de l'établissement de plusieurs théories ou hypothèses mettant en relief ces causes et les interrelations existant entre-elles. L'intérêt scientifique et thérapeutique que peut apporter la curcumine dans ce cadre sera développé. Nous verrons ensuite les différents moyens existant pour évaluer l'activité de composés d'intérêt thérapeutique dans le traitement de la MA.

2.2.1. Des hypothèses pour mieux comprendre la maladie

La pathogenèse de la MA est complexe. Au fil des avancées sur les connaissances des causes moléculaires et des dysfonctionnements qui en découlent, plusieurs hypothèses sont émises afin de tenter d'expliquer le déroulement et l'imbrication entre ces faits. Il en existe essentiellement trois : la théorie cholinergique est la plus ancienne tandis que l'hypothèse amyloïde et la théorie de la pathologie Tau sont basées sur des éléments découverts plus récemment.

2.2.1.1. Hypothèse cholinergique et les traitements actuels

Basée sur l'atteinte du système cholinergique rencontrée dans la MA, elle est la mieux connue. A ce jour, les stratégies thérapeutiques disponibles sont issues de cette hypothèse. Il n'existe d'ailleurs sur le marché quasiment que des médicaments agissant sur le système cholinergique sur lesquels nous reviendrons plus tard.

Des explorations biochimiques de patients atteints de MA ont révélé que le déficit en acétylcholine dans le cortex cérébral est redondant et ont fait naître cette hypothèse. Au fil du temps, les plaques amyloïdes ont été incriminées *in vitro* préférentiellement dans la dégénérescence des neurones du cortex affectant donc la transmission cholinergique. Puis les symptômes neurologiques ont été reliés à ce déficit. Ont alors vu le jour de nombreuses études visant à restaurer, de manière symptomatique, cette neurotransmission.[110] Elles ont permis d'identifier une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE), responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline, comme cible préférentielle. Il en résulte

qu'aujourd'hui sur le marché du médicament, 4 inhibiteurs d'AChE composent l'arsenal thérapeutique disponible.

La base pharmacologique de leur mécanisme d'action est d'augmenter les taux d'acétylcholine synaptiques par l'inhibition de cette AChE au niveau du système nerveux central. La tacrine, spécialité COGNEX®, fut la première molécule utilisée mais elle a été retirée du marché pour sa forte hépatotoxicité et ses effets secondaires cholinergiques. Ne sont donc disponibles aujourd'hui que le donépézil (ARICEPT®), la rivastigmine (EXELON®) et la galantamine (REMINYL®) qui sont indiqués dans le traitement symptomatique de la MA dans ses formes légères à modérées. Ces médicaments ne sont plus remboursés qu'à 15% par la Sécurité Sociale en France depuis 2013.[111]

Pour compléter la liste des médicaments disponibles, un seul d'entre-eux est indiqué dans les formes modérées à sévère, la mémantine (EBIXA®). C'est un antagoniste des récepteurs au *N*-méthyl-D-aspartate du glutamate, neurotransmetteur dont la libération excessive a un rôle dans la dégénérescence neuronale. C'est le premier médicament à sortir sur le marché qui présente un mécanisme d'action différent des inhibiteurs d'AChE.

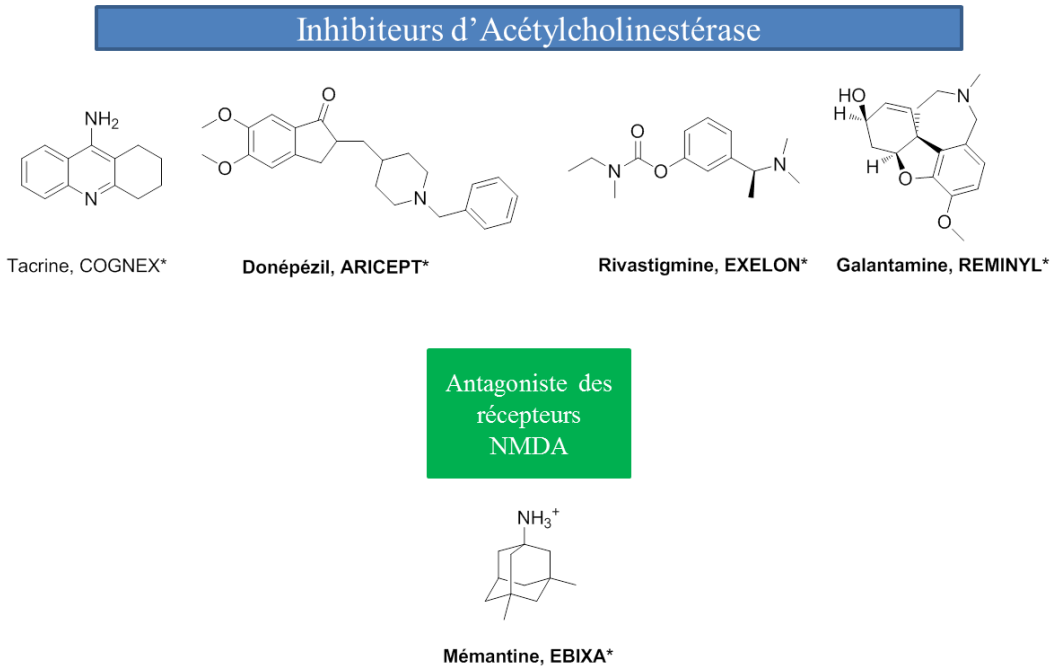


Figure 41 : Structure des médicaments inhibiteurs d'AChE et antagoniste des récepteurs NMDA disponibles pour traiter la MA (en gras), et la tacrine qui a été retirée.

Des facteurs de croissance ont été proposés afin de rétablir le fonctionnement de la transmission cholinergique en favorisant la différenciation de fibroblastes en neurones. Le principe est d'administrer des neurotrophines en intraventriculaire cérébrale mais les améliorations cognitives n'ont jamais été démontrées lors des phases d'essais cliniques.[112]

2.2.1.2. L'hypothèse des protéines *Tubule-Associated Unit* (Tau)

Contrairement à la perte de transmission cholinergique qui est une conséquence de la dégénérescence neuronale, les lésions neurofibrillaires intraneuronales sont directement responsables de celle-ci. Elles sont faites de protéines Tau. Les protéines Tau sont retrouvées essentiellement dans les neurones et appartiennent à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP). Elles ont un rôle dans la stabilisation des microtubules. Leur état de phosphorylation détermine leur capacité de fixation aux microtubules qu'elles vont ou pas stabiliser. Nous reviendrons plus tard en détail sur cette cause moléculaire. Avec l'âge apparaît une dérégulation positive chez les kinases responsables de sa phosphorylation ce qui va la faire s'agréger en amas et ainsi causer la mort neuronale. L'hypothèse Tau est basée sur des faits découverts plus récemment par rapport à l'hypothèse cholinergique. C'est une des raisons pour lesquelles il n'existe pas aujourd'hui de médicament sur le marché. Agir sur cette cause directe de neurodégénérescence est un réel espoir de pouvoir lutter contre les symptômes de la MA. Dans les voies de recherche actuelles on trouve des stratégies d'inhibition de l'agrégation de cette protéine Tau hyperphosphorylée afin d'empêcher de former des amas neurotoxiques. Sont également développés des inhibiteurs de kinases responsables de cette hyperphosphorylation.

2.2.1.3. L'hypothèse de la cascade amyloïde

Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, les agrégats de peptides Aβ dans différentes aires cérébrales sont à l'origine de la pathologie Alzheimer. L'accumulation de ces plaques semble être l'élément déclencheur d'une cascade, constituée de dommages neuronaux et de la formation de DNF *via* la protéine Tau, conduisant à la mort des neurones. Cette hypothèse est appuyée par de nombreuses études génétiques, biochimiques et pathologiques. Le détail des évènements de cette cascade sera décrit par la suite. Le peptide Aβ et différentes formes d'agrégats sont au centre de nombreuses stratégies de recherche visant à diminuer sa production ou augmenter sa clairance. Beaucoup de candidats médicaments ont participé aux essais cliniques mais à l'heure actuelle aucun n'est autorisé à être utilisé en pratique.

2.2.2. Peptide amyloïde et plaques séniles

En 1984, Glenner et Wong isolent le peptide Aβ à partir de capillaires méningés de patients atteints de la MA. Un an plus tard, ce même peptide est incriminé et considéré comme constituant essentiel des plaques séniles par Masters *et al.*[113] Cette agrégation est très étudiée car elle est l'une des grandes causes moléculaires de la pathologie Alzheimer. L'ensemble du corps médical et les scientifiques s'accordent à l'appeler la théorie amyloïdogénique.

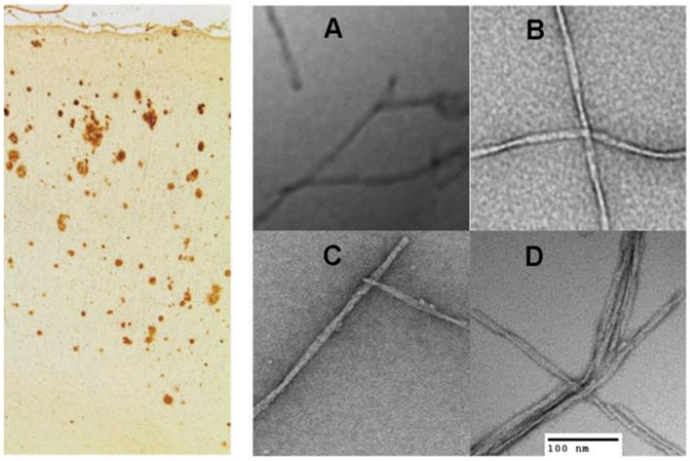


Figure 42 : Plaques séniles marquée avec des Anticorps anti- Aβ_{1-42}[114] et fibrilles amyloïdes observées en microscopie électronique à balayage : (A) fibrilles Aβ_{1-42} non marquées, (B) fibrilles Aβ_{1-40} non-marquées, (C) fibrilles Aβ_{1-42} marquées avec de la tétraméthylrhodamine (TMR), (D) fibrilles Aβ_{1-40} marquées à la TMR .[115]

2.2.2.1. Protéine Précurseur de l'Amyloïde ou APP.

Le peptide Aβ est un produit du métabolisme de l'APP. L'APP est codée par un gène comprenant 18 exons localisés sur le chromosome 21 et dont les exons 16 et 17 codent pour le peptide Aβ.[116] On dénombre plus de 6 mutations sur les exons 16 et 17 codant pour l'APP et les pré-sénilines 1 et 2 incriminées dans la pathologie Alzheimer pour les formes familiales autosomiques dominantes. Cette protéine transmembranaire est ubiquitaire du corps humain et des membranes, on la retrouve dans les membranes plasmiques mais également sur les réticulums endoplasmiques, l'appareil de Golgi, etc… Elle a des fonctions d'adhésion cellulaire, neurotrophique, de communication intercellulaire et possède également un rôle dans les voies de signalisation intracellulaires noyau-membrane.

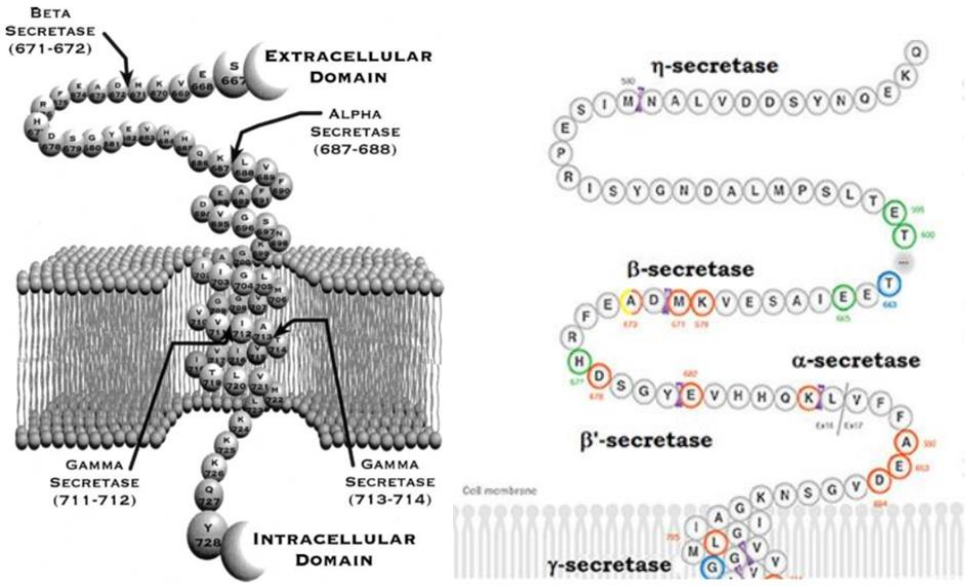


Figure 43 : (gauche) Représentation du domaine transmembranaire de l'APP et des points de clivages enzymatiques des α- β- et γ-sécrétases.[117] (droite) Schéma de l'APP et des différents points de clivage dans lequel l'η-sécrétase récemment découverte apparaît. www.alzforum.org dernier accès le 05/10/2015.

En situation physiologique, l'APP est clivée par des sécrétases les α- β- et γ-sécrétases en différents endroits et dont les activités sont fonction de l'âge. Chez un sujet jeune, les α- et les γ-sécrétases sont les enzymes prédominantes, on dit que l'APP est clivée selon une voie dite non-amyloïdogénique car un des produits du clivage est le peptide neuroprotecteur et neurotrophique sAPPα. Ce peptide est d'intérêt scientifique dans les diverses voies de traitements possibles de la MA.[117] La promotion de sa production peut notamment être induite par l'intervention d'agoniste des récepteurs à la sérotonine de type 4 (5-HT_4R).

Avec l'âge et en présence de certains facteurs favorisants, les β-sécrétases tendent à remplacer les α-sécrétases, c'est alors la voie amyloïdogénique de clivage de l'APP qui est prédominante. On assiste à la production accrue du peptide amyloïdogénique A*β* accompagnée de la diminution de production de sAPPα.

Les progrès récents dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis d'identifier une nouvelle enzyme appelée η-sécrétase qui serait responsable d'un clivage de l'APP dont Willem *et al.* viennent de démontrer qu'il serait responsable d'une inhibition d'activité neuronale hippocampique.[118]

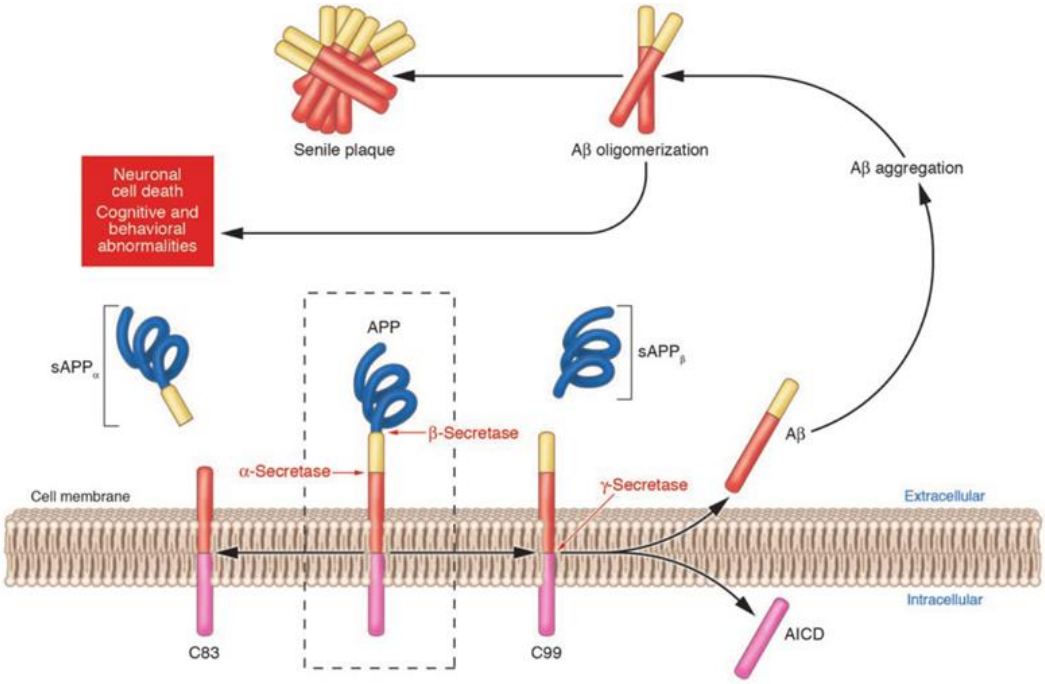


Figure 44 : Schéma des voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de clivage de la protéine précurseur du peptide A*β*.[119]

2.2.2.2. Le peptide *β*-amyloïde ou A*β*.

La région A*β* de l'APP comprend 28 acides aminés extra membranaires et un nombre plus variable, de 11 à 15, d'acides aminés intra membranaires. Le peptide A*β* est donc un polypeptide constitué variablement de 39 à 43 acides aminés. Le peptide le plus impliqué dans la pathologie Alzheimer est

formé de 42 acides aminés ou Aβ_{1-42} dont la masse moléculaire est de 4,5 kDa. Ce peptide Aβ présente une structure secondaire en hélice alpha alors qu'il est encore enchâssé dans la membrane cellulaire après le clivage de l'APP par la γ-sécrétase. Cependant cette structure conformationnelle n'est pas stable dès lors que le peptide se dégage de la bicouche lipidique. Il adopte rapidement, dans un milieu aqueux une conformation davantage repliée.

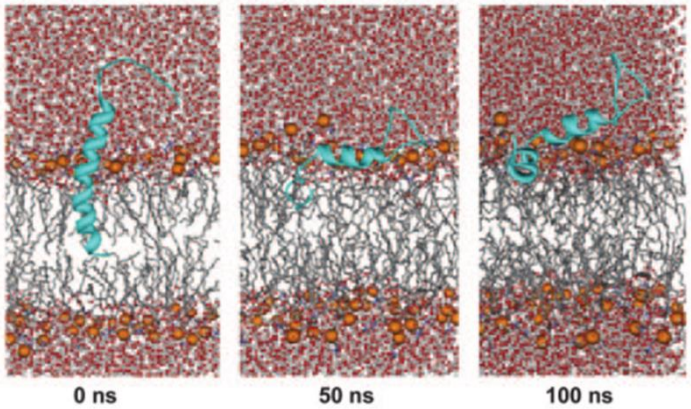


Figure 45 : Images par dynamique moléculaire illustrant le peptide Aβ_{1-40} sous forme d'hélice-α dans une bicouche lipidique mime d'une membrane cellulaire montrant la modification conformationnelle de ce peptide lorsqu'il sort au contact d'un milieu aqueux.[120]

L'analogie de séquence entre le peptide Aβ_{1-42} et le peptide Aβ_{1-40} permet aux scientifiques d'utiliser l'un ou l'autre pour ne pas compliquer certains calculs ou pour diminuer les coûts d'achat car le peptide Aβ_{1-40} est meilleur marché. Cependant, cette différence qui paraît négligeable a été étudiée afin de savoir si les deux peptides avaient autant d'impact sur le déroulement de la MA. Il apparaît que les résidus hydrophobes présents sur les aminoacides Ile-41 et Ala-42 du peptide Aβ_{1-42} engendrent une différence dans l'organisation et le nombre de structures secondaires de types épingles et brins-β, parallèles ou antiparallèles. Cette variation a un impact sur le repliement conformationel des deux peptides.

```
        1     5     10    15    20    25    30    35    40
Aβ40  DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
Aβ42  DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
```

Figure 46 : Les structures primaires des peptides Aβ_{1-40} et Aβ_{1-42}. Les séquences sont représentées en utilisant la nomenclature à une lettre des aminoacides et en commençant par le côté N-terminal avec un acide aspartique Asp1 ou D.[121]

Ball *et al.*, en 2013, combinent l'analyse par résonance magnétique nucléaire et la dynamique moléculaire pour étudier ces différences qui sont modélisées sur la Figure 47. Le peptide Aβ_{1-42} contient majoritairement des brins antiparallèles impliquant quelques résidus du cluster hydrophobe central 16 – 21, qui est impliqué dans les processus de fibrillation amyloïde (décrits plus tard) et les résidus 29 – 36. L'association de ces deux séquences est en accord avec les modèles d'agrégation amyloïde décrits à ce jour. Le peptide Aβ_{1-40} forme préférentiellement un repliement entre le cluster 16 – 21 et la séquence 9 – 13 parfois associé avec les résidus 35 – 37 pour former un feuillet-β.[122]

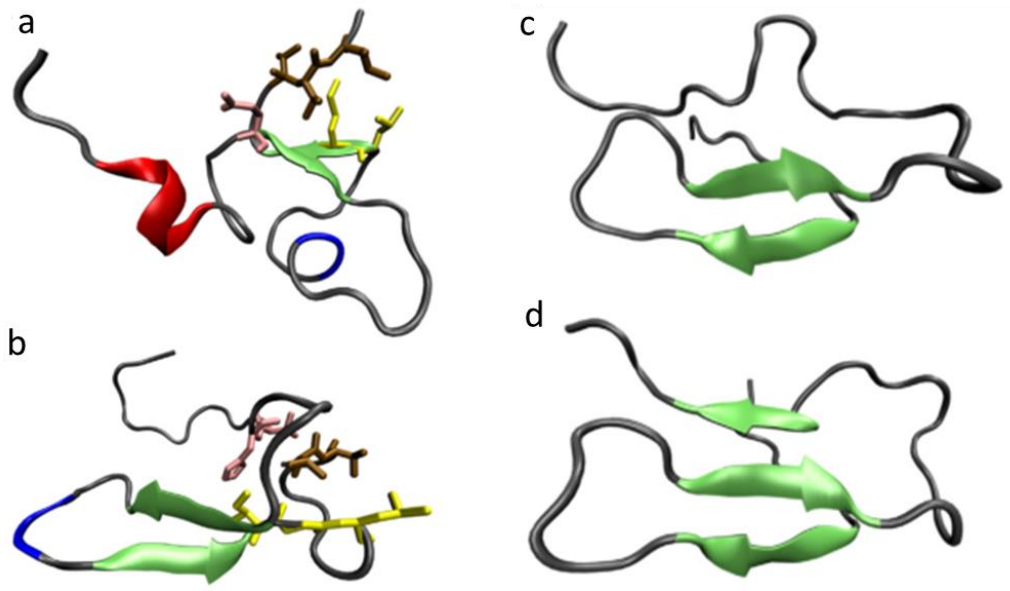


Figure 47 : Modélisation des formes dominantes et représentation des résidus impliqués dans la stabilisation des peptides Aβ_{1-42} (a,b) et Aβ_{1-40} (c,d) dans un milieu aqueux. (a) : le peptide Aβ_{1-42} replié et stabilisé par les brins-β antiparallèles entre les résidus 16 – 17 et les résidus 35 – 36 (vert). Les chaînes latérales des aminoacides 39 – 41 (marron) stabilisent la structure par interaction hydrophobe avec les chaînes latérales des aminoacides 34 – 35 (jaune). Une interaction existe entre la Gln-15 (rose) qui vient coiffer les résidus 37 – 38 (rouge). (b) : le peptide Aβ_{1-42} dans sa deuxième forme dominante stabilisée par interaction entre les résidus 39 – 40 (marron) et 32 – 34 (jaunes), cela ajouté aux brin-β et à l'interaction entre les résidus 12 - 13 (rose) avec le résidu C-terminal 38 (marron). (c) : le peptide Aβ_{1-40} stabilisé par un brin-β antiparallèle entre les résidus 9 - 13 et 16 - 21. (d) : le peptide Aβ_{1-40} stabilisé par les résidus 9 – 13 interagissant avec les résidus 17 – 20 simultanément avec les résidus 35 - 37 pour former un feuillet-β.[122]

La Figure 47 illustre le rôle joué par l'Ile-41 et l'Ala-42 (représentées en marron sur **b**) dans le renfort de stabilisation sous la forme repliée du peptide Aβ_{1-42}. Ceci est en adéquation avec les modèles d'oligomérisation de ces peptides s'associant pour former des plaques amyloïdes. A l'inverse, le caractère aléatoire du repliement du peptide Aβ_{1-40} ne permet pas autant de favoriser l'auto-agrégation.

2.2.2.3. Du peptide Aβ aux plaques amyloïdes

Lorsque ce peptide est présent en trop grande quantité il est capable de s'auto-agréger pour former des fibrilles amyloïdes puis des dépôts pré-amyloïdes diffus qui formeront les cœurs des plaques séniles. Au fil de l'évolution de cette agrégation les oligomères ont des tailles et des formes différentes et vont pouvoir exercer une toxicité plus ou moins forte. Ce sont ces oligomères (dimères, trimères, …, dodécamères) de peptides Aβ_{1-42} qui sont les plus toxiques ainsi que les fibrilles.[123]

2.2.2.3.1. Cinétique d'agrégation

L'auto-agrégation a lieu selon un mécanisme composé de deux phases, oligomérisation et fibrillation, dont les cinétiques sont différentes. Le monomère Aβ_{1-42} replié est l'entité constitutive de ce processus. Le processus est simple. Ce monomère s'agrège d'abord avec d'autres monomères qui s'organisent progressivement d'abord en oligomères puis en feuillets-β s'accumulant pour former des fibrilles constitutives des plaques amyloïdes (Figure 48).

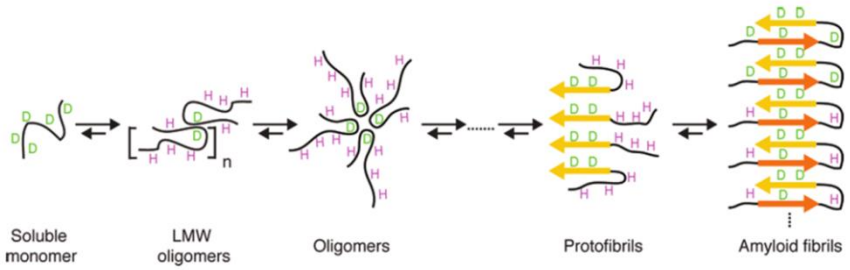


Figure 48 : Schéma du résultat d'une étude menée par Carulla *et al.*, utilisant l'analyse par résonance magnétique nucléaire suite à des échanges Hydrogène (violet)/Deutérium (vert) de solvatation sur des peptides, ils ont proposé une séquence d'agrégation menant aux fibrilles amyloïdes.[124]

L'analyse de cette cinétique a été publiée par Garai et Frieden dans le journal *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* en 2013 et a été réalisée avec des peptides A$\beta_{1\text{-}42}$ marqués avec la tétraméthylrhodamine et suivis par fluorescence.[115] La cinétique de fibrillation est divisée en trois phases qui sont fonction du temps : l'oligomérisation, la phase intermédiaire et la phase de croissance.

L'oligomérisation peut être découpée en deux phases. La phase précoce correspond à l'assemblage des peptides A$\beta_{1\text{-}42}$ en dimères et en trimères. C'est une étape rapide dont les constantes d'association k_{+12} et k_{+23} sont respectivement de 9,9 ± 1,9.10^{-2} et de 38 ± 5 M^{-1}.s^{-1}, les constantes de dissociation k_{-12} et k_{-23} étant par ailleurs très faibles ce qui traduit une agrégation quasiment irréversible.

$$m_1 \underset{}{\overset{k_{+12}}{\rightleftharpoons}} m_2 \overset{k_{+23}}{\rightleftharpoons} m_3$$

Figure 49 : Equilibre de formation des dimères et des trimères et leurs constantes d'associations.

Durant la phase de croissance intermédiaire ou phase finale d'oligomérisation, on voit apparaître des assemblages jusqu'au dodécamère. Cette étape a l'allure d'un plateau comme en témoigne son suivi en fluorescence et possède une cinétique lente. L'énergie d'activation nécessaire au passage à l'oligomérisation est en moyenne de 5,5 kCal.mol^{-1}, alors que celle nécessaire à la fibrillation est en moyenne de 12,1 kCal.mol^{-1}. Ces données présentées dans la Figure 50 permettent d'expliquer ce phénomène de plateau.

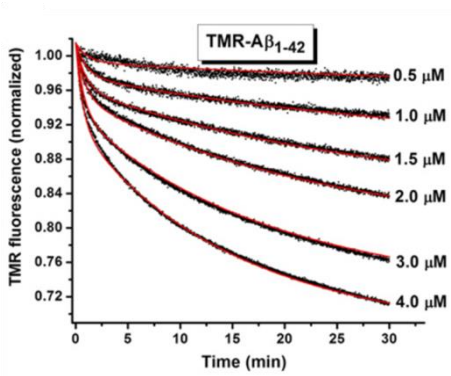


Figure 50 : Oligomérisation du peptide A$\beta_{1\text{-}42}$ marqué avec la TMR et suivie par fluorescence avec des concentrations de peptides décroissantes à 25°C. Les points noirs représentent les données mesurées alors que les lignes rouges sont des modèles d'oligomérisation calculés avec le modèle présenté en Figure 49.[115]

Il faut remarquer que les phases d'oligomérisation ne sont pas cloisonnées et que l'on peut assister à l'ajout de monomères mais également à l'agrégation de plusieurs oligomères entre-eux pouvant résulter d'un remaniement des espèces oligomériques présentes. L'ensemble de ces phénomènes ayant lieu durant cette phase ne permet de calculer aucune constante d'association. La durée approximative d'un plateau est de quelques heures et varie en fonction des conditions d'incubation sachant que les expériences sont suivies jusqu'à 48 h.

A la phase d'oligomérisation fait suite une phase de croissance qui correspond au processus de fibrillation des oligomères qui s'assemblent pour former des fibrilles qui constitueront les filaments tels qu'on peut les observer au début de ce chapitre (Figure 42). Elle est rapide et c'est la phase la plus sensible au pH et à la température d'incubation. On observe le début de cette phase par fluorescence aux environs des 750 minutes sur la cinétique d'agrégation présentée sur la Figure 51.

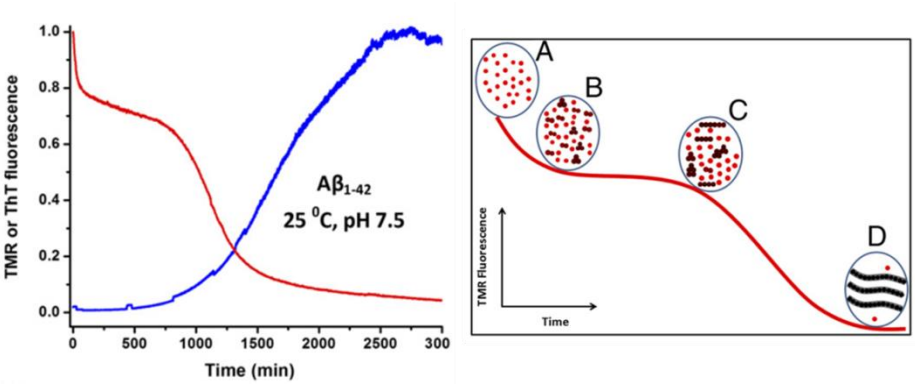


Figure 51 : (à gauche) Cinétique d'agrégation des peptides A$\beta_{1\text{-}42}$ suivie par la fluorescence de la TMR (rouge) ou la fluorescence de la Thioflavine T (bleu) au pH physiologique et à 25°C effectuée pendant 50 heures. (à droite) schéma récapitulatif de cette même cinétique avec les stades d'agrégations : monomères (A), dimères-trimères (B), oligomères intermédiaires (C) et fibrilles (D). [115]

2.2.2.3.2. La séquence ^{16}KLVFF^{20} responsable de l'agrégation

Dans le but d'identifier une séquence peptidique responsable de l'agrégation, Tjernberg *et al.* ont testé plusieurs oligopeptides formés à partir du peptide Aβ pour trouver la séquence qui a la plus grande affinité pour ce même peptide Aβ. Ce fut la séquence ^{16}KLVFF^{20} qui présenta l'affinité la plus forte. C'est alors que cet enchaînement de 5 aminoacides ^{16}KLVFF^{20} fut identifié comme crucial dans la formation et la stabilisation des feuillets β formés de peptides A$\beta_{1\text{-}42}$.[125]

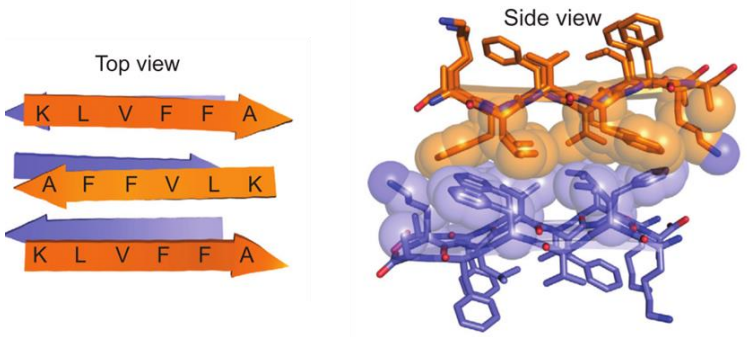


Figure 52 : Structure étudiée par diffraction des rayons X sur un assemblage du peptide linéaire KLVFF. Les différentes couches sont représentées en orange et en violet.[126]

2.2.2.4. Toxicité des oligomères Aβ

Du peptide aux plaques séniles, différents niveaux de toxicité ont été relevés. La dynamique de formation des oligomères est complexe. Cependant la science nous permet de connaître la toxicité des plaques amyloïdes qui sont aujourd'hui considérées comme un réservoir non-toxique de peptides Aβ créé par un défaut de clairance ou une surproduction de ces peptides. Il est prouvé que ce sont les formes plus petites d'agrégats qui sont les plus toxiques : les oligomères. Les mécanismes de toxicité sont nombreux et ont été étudiés tant individuellement et *in vitro*, qu'*in vivo*.

Cette toxicité s'applique sur divers éléments cellulaires par la formation de pores membranaires conduisant à l'augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires en perturbant l'homéostasie ionique. En conséquence, on retrouve une activation d'effecteurs inflammatoires qui induit un stress oxydatif conforté par la formation de complexes Aβ-métaux de type fer, cuivre, zinc ou aluminium. Les oligomères sont également capables de se fixer à des récepteurs membranaires pour entraîner leur dysfonctionnement. Enfin, à ce jour a aussi été recensée une fixation à certains types d'ADN entraînant une modification de leurs structures.[127]

2.2.2.4.1. Distribution de la taille des oligomères

L'étude de la cinétique d'agrégation du peptide Aβ nous montre que l'étape de formation des oligomères est une étape clé dans la genèse des plaques amyloïdes. Leur toxicité est renforcée par la cinétique de leur formation que nous décrirons comme lente. Le nombre de monomères pouvant

constituer un oligomère peut varier de 2 à 28. Ces associations sont-elles distribuées de manière homogène entre chaque taille ? Urbanc *et al.* ont réalisé une étude par dynamique moléculaire en tenant compte des liaisons hydrogène et des interactions spécifiques des chaînes latérales pouvant exister entre ces peptides.[128]

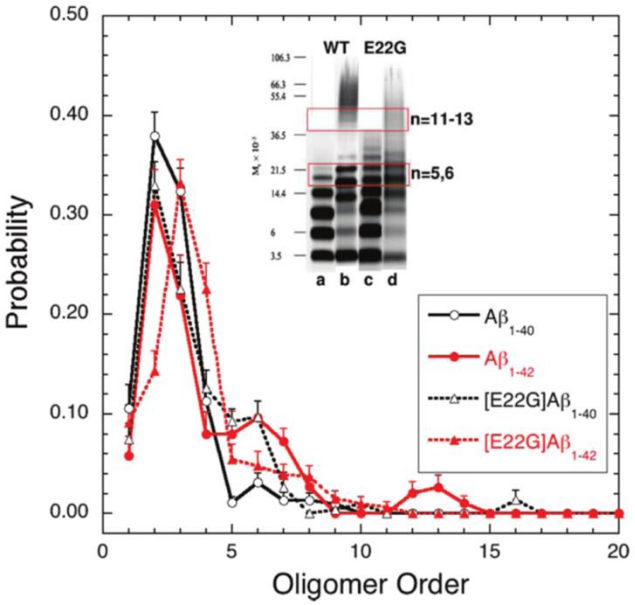


Figure 53 : Distribution de la taille des oligomères de peptides Aβ1-40, Aβ1-42 et leur mutants arctiques respectifs [E22G] Aβ1-40 et [E22G] Aβ1-42. Le résultat d'une électrophorèse est représenté au-dessus et montre les bandes correspondant aux tailles d'oligomères retrouvés dans un agrégat de (a) Aβ1-40, (b) Aβ1-42, (c) [E22G] Aβ1-40 et (d) [E22G] Aβ1-42.[128]

Les oligomères de faibles poids moléculaire et constitués de 3 à 6 peptides semblent être les plus significativement présents parmi les oligomères. Etudions maintenant leur profil de toxicité.

2.2.2.4.2. Toxicité et taille des oligomères

Il est important de prendre en compte l'hétérogénéité de taille des oligomères pour mieux connaître les mécanismes moléculaires de la MA et essayer d'agir au plus près du problème.

Des études électrophysiologiques ont démontré que des trimères de peptide Aβ_{1-42} inhibent la potentialisation de l'influx nerveux à long-terme. Une observation fortuite est à la base de ces études : des préparations fraîches de peptides ont induit, par leur action de stress sur le réticulum endoplasmique, la mort cellulaire par activation des caspases de neurones corticaux, alors que des préparations incubées depuis plus longtemps se sont révélées moins toxiques. Ce sont les premiers éléments qui, corrélés à ce que nous savons de la cinétique d'agrégation, laissent penser que les oligomères sont plus toxiques que les agrégats de plus grande taille.

Dans le but d'identifier la taille des oligomères qui mettent en péril la viabilité neuronale, la toxicité d'oligomères de différents poids moléculaires a été évaluée. Nous pouvons apprécier la cytotoxicité

neuronale des oligomères Aβ_{1-42} dont la taille est de 1 à 2 nm sur la Figure 54 et comparer cette donnée à celle engendrée par les monomères ou les fibrilles par rapport au contrôle.

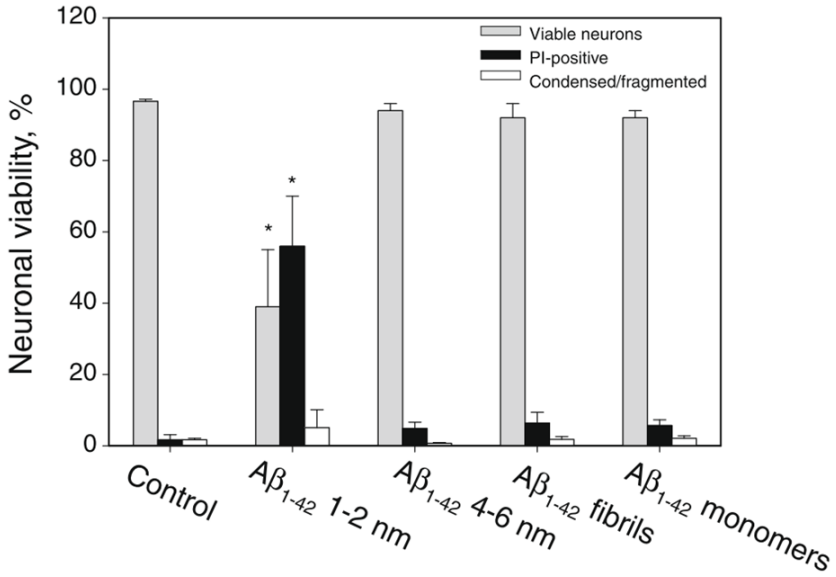


Figure 54 : Résultats de l'étude de la viabilité de neurone ayant été mis en contact avec des peptides de différentes tailles. La concentration en oligomères est de 1µM et le temps d'incubation est fixé à 24h.[129]

Le diamètre d'un oligomère est un paramètre important pour évaluer le profil de toxicité mais l'étude de cette toxicité en fonction du poids moléculaire de ces oligomères donne une idée plus précise du nombre de peptides constituant la particule. C'est pourquoi Cizas *et al.* ont également tenu à évaluer la toxicité d'oligomères, cette fois-ci en comparant les poids moléculaires et c'est entre 10 et 30 kDa qu'ils sont les plus toxiques comme en témoigne la Figure 55.

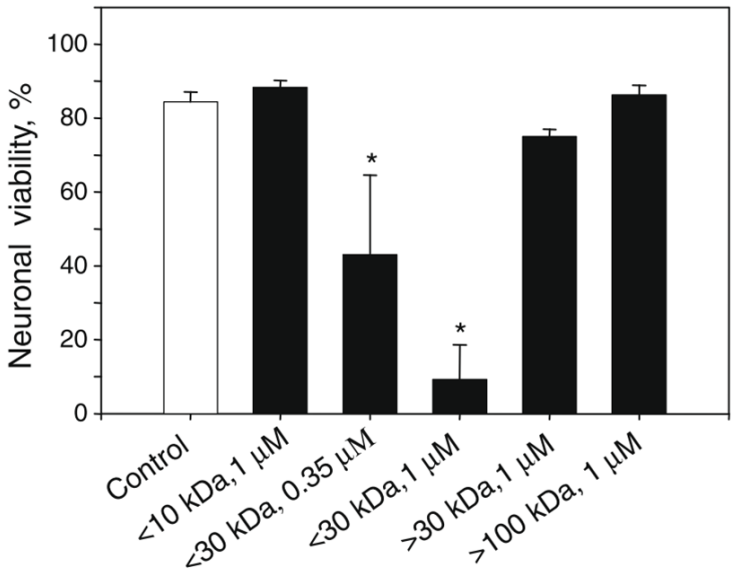


Figure 55 : Viabilité neuronale en fonction du poids moléculaire des oligomères présents dans le milieu d'incubation à la concentration de 1 µM pendant 24h (exception faite des oligomères de poids inférieurs à 30kDa qui sont également évalués à 0,35µM).[129]

2.2.3. Stress oxydatif

2.2.3.1. Stress oxydatif et oligomères A*β*

Les patients atteints de MA montrent un niveau élevé et chronique de stress oxydatif qui est notamment caractérisé par une peroxydation lipidique qui provoque l'oxydation de protéines, de l'ADN et de l'ARN. Chez ces patients des interconnexions ont été établies entre le stress oxydatif et les autres évènements moléculaires pathologiques (Figure 56) ce qui augmente encore le degré de complexité de cette maladie. Un schéma est proposé par Rosini *et al.*[130]

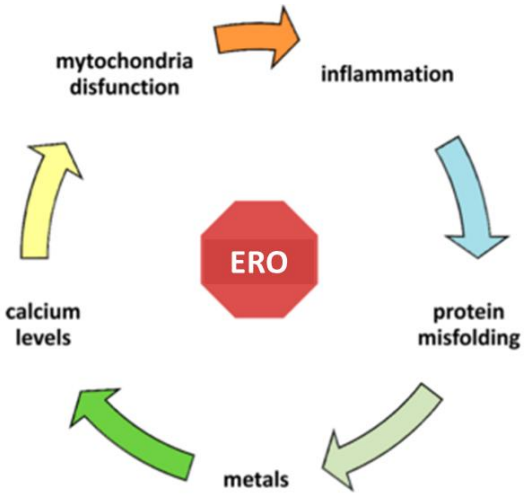


Figure 56 : Représentation des interconnexions présumées entre le stress oxydatif et les autres acteurs clés de la MA.[130]

Les oligomères A*β* sont, entre autres, à l'origine de ce processus d'oxydation qui augmente lui-même la production de peptide A*β*. C'est un système auto-entretenu qui génère des radicaux libres *in situ*, active les macrophages et les voies apoptotiques lysosomales. Des lésions extra neuronales peuvent également être provoquées par la surexpression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et l'action de l'oxyde nitrique synthase neuronale constitutive (nNOS).[131] La méthionine 35 ou Met-35 sur le peptide A*β* est identifiée comme étant le résidu clé impliqué dans le stress oxydatif. En effet plusieurs équipes ont réussi à démontrer qu'une mutation de cette Met-35 réduit significativement le stress oxydatif induit par le peptide A*β*.[132]

2.2.3.2. Mécanisme de toxicité

Le H_2O_2 réagit avec les ions métalliques réduits présents tels que le cuivre, selon les réactions de Fenton et de Haber-Weiss, pour générer le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$) initiateur des réactions en chaînes qui se propagent jusqu'aux macromolécules.[133]

Pour décrire les étapes de ce mécanisme, on peut prendre l'exemple de l'oxydation qui se propage entre des phospholipides, constituants membranaires majeurs dérivant de l'acide *cis*,*cis*-octadéca-9,12-diénoïque (acide linoléique).

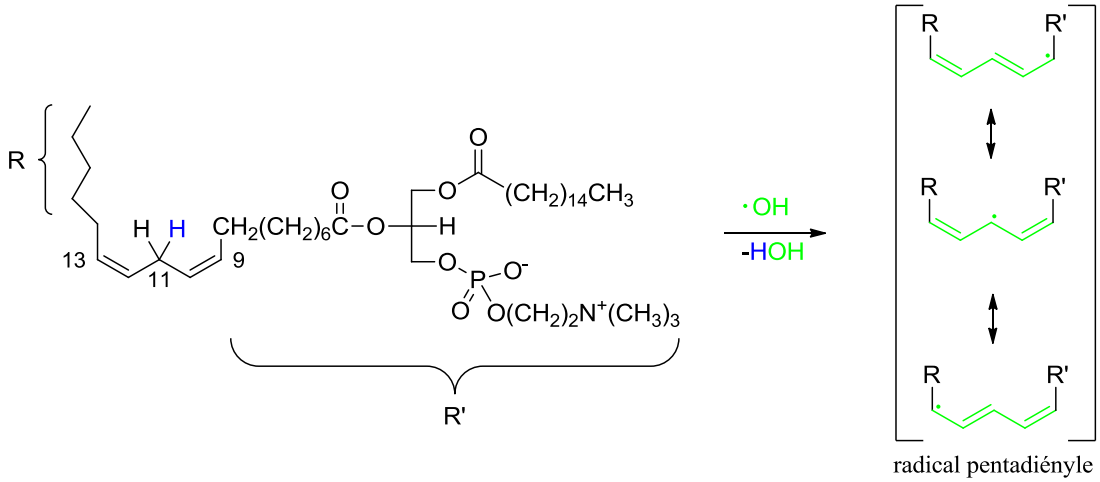


Figure 57 : Amorçage de l'oxydation des phospholipides membranaires

Il y a d'abord une étape d'amorçage (Figure 57) où les atomes d'Hydrogène allyliques en C_{11} se laissent facilement arracher par le radical ˙OH. Le radical pentadiényle formé est stabilisé par résonance.

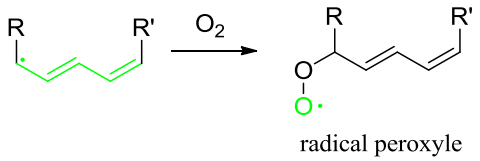


Figure 58 : Première étape de propagation de l'oxydation des phospholipides membranaires

S'en suit une première étape de propagation (Figure 58), où le radical pentadiényle se combine rapidement avec l'oxygène O_2 sur les carbones C9 ou C13, qui conduit à la formation d'un radical peroxyle contenant un système diénique conjugué.

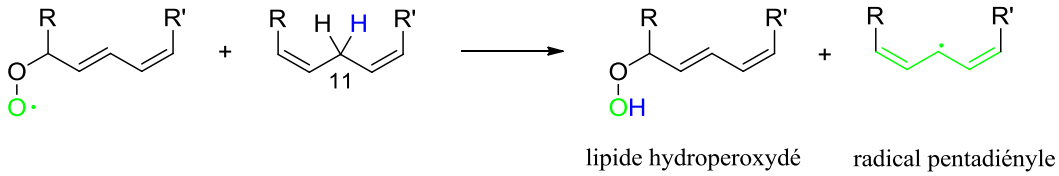


Figure 59 : Deuxième étape de propagation de l'oxydation des phospholipides membranaires.

La deuxième étape de propagation (Figure 59) est basée sur la capacité du peroxyle formé à arracher un électron de l'atome d'hydrogène du C11 se trouvant sur une autre molécule de phosphoglycéride ou d'un autre lipide.

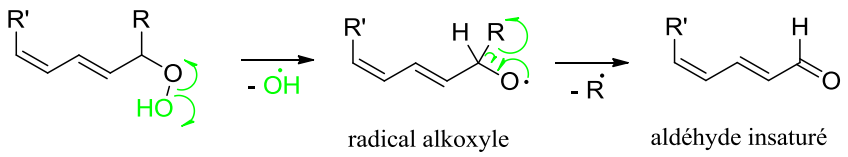


Figure 60 : Le lipide hydroperoxydé génère un radical alkoxyle toxique et un aldéhyde α,β-insaturé extrêmement toxique.

Cette étape génère un nouveau radical peroxyle (Figure 60) qui entrera de nouveau dans une phase de propagation 1 et un lipide hydroperoxydé toxique qui va générer un radical alkoxyle dont la toxicité est augmentée, accompagné d'un radical hydroxyle.

2.2.3.3. Hypothèse du stress oxydatif et mitochondrie

Cette hypothèse est basée sur la détérioration de la qualité des mitochondries qui, augmentant avec l'âge, provoque des dommages physiologiques non dépourvus de conséquences. Cette dysfonction est liée à la chaîne de transport électronique s'effectuant à la membrane de cette organelle cellulaire. La chaîne de transport d'électron (CTE) fait le lien entre les électrons donnés par les cofacteurs réduits aux atomes d'Oxygène et le transport de protons depuis la matrice mitochondriale à travers la membrane mitochondriale interne vers l'espace intermembranaire. Une fois les EROs produits, ils amplifient les processus toxiques de clivage de l'APP, augmentant ainsi la production de peptides Aβ_{1-42}. En même temps, les peptides Aβ_{1-42} sont aussi responsables des problèmes de plasticité membranaire mitochondriale qui empêchent le fonctionnement normal de la CTE. Ainsi, les problèmes mitochondriaux locaux se délocalisent progressivement sur toute la chaîne respiratoire et engendrent la dyshoméostasie globale de l'équilibre oxydo-réducteur de l'environnement neuronal pour engendrer des lésions synaptiques.

L'exploration scientifique de cette hypothèse permet de situer le rôle pathologique de l'oxydation dans la cytotoxicité neuronale qui est elle-même la résultante de facteurs multiples dont les connections sont nombreuses.

2.2.4. La protéine Tubule Associated Unit (Tau) et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

La protéine Tau a été découverte au milieu des années 1970 lors d'études sur la formation des microtubules. La protéine Tau est impliquée dans l'assemblage de la tubuline en microtubules qui sont les constituants majeurs du cytosquelette cellulaire et neuronal. C'est au cytosquelette que la cellule doit sa morphologie et son maintien structural. La liaison tubuline-protéine Tau est régulée par son état de phosphorylation qui dépend lui-même d'un ensemble de kinases et de phosphatases. En conditions pathologiques de la MA, l'hyperphosphorylation anormale de la protéine entraîne non seulement un défaut de liaison aux microtubules et une désorganisation de ceux-ci, mais peut conduire, selon son état de phosphorylation, à son auto-agrégation dans l'espace intra neuronal pour former des DNF.[134]

2.2.4.1. Structure et fonctions de la protéine Tau

La protéine Tau appartient au groupe des protéines associées aux microtubules (MAP). Mis à part le rôle de stabilisation des microtubules elles sont thermorésistantes et ne rencontrent pas de pertes de fonction avec des traitements acides. Nous connaissons aujourd'hui sa structure primaire qui se compose de 441 acides aminés pour la plus longue de ses 6 isoformes. Ce séquençage protéique a rendu possibles les études dynamiques et structurales des parties impliquées dans la liaison aux microtubules.

Les isoformes de cette protéine (Figure 61) diffèrent par la présence de 3 (3R) ou 4 (4R) domaines de fixation à la tubuline (R pour *repeat*), de 31 ou 32 acides aminés à l'extrémité C-terminale de la protéine et d'un (1N), deux (2N) ou d'aucun insert de 29 acides aminés chacun dans la partie N-terminale de Tau.

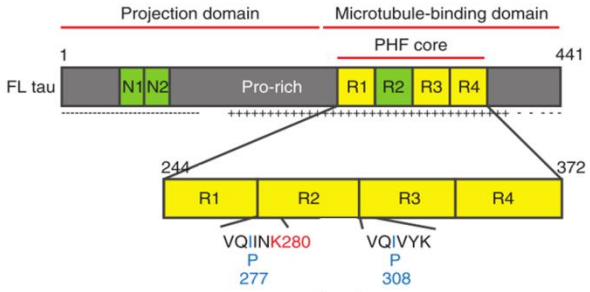


Figure 61 : Schéma de la protéine Tau montrant les domaines de projection et de fixation aux microtubules et les 4 domaines de redondance R1, R2, R3 et R4.[135]

Chacune des 6 isoformes de la protéine Tau est retrouvée au cours du développement cérébral, du fœtus à l'âge adulte. La protéine Tau est majoritairement présente et indispensable dans les axones neuronaux et les oligodendrocytes. Le domaine de projection de la protéine Tau interagit avec les autres constituants du cytosquelette et la membrane plasmique neuronale. Il a pour fonction de maintenir les distances entre les microtubules et il peut faire augmenter le diamètre axonal.

Le rôle du domaine de fixation à la tubuline est de promouvoir sa polymérisation par une interaction entre les domaines R1, R2, R3 et R4 appelés domaines de répétition de liaison aux microtubules ou *microtubules-binding repeats* (MTBR), avec les hétérodimères α et β composant la tubuline.[136] Deux séquences hexa peptidiques particulières sont impliquées dans cette liaison. Une est à la jonction entre R1 et R2 ^{275}VQIINK^{280} (PHF6*) et l'autre, nommée PHF6 est située sur le début de R3 ^{306}VQIVYK^{311} (Figure 61).[137]

2.2.4.2. Physiopathologie moléculaire de la protéine Tau

La protéine Tau anormale, parce qu'elle est hyperphosphorylée, subit des modifications conformationelles ou misfolding conduisant à son agrégation aberrante sous forme de structures

fibrillaires qui s'accumulent dans la partie somatodendritique du neurone. Une perte de fonction de stabilisation des microtubules de la protéine Tau empêche l'exocytose et affecte la distribution mitochondriale conduisant à la disparition progressive de mitochondrie et de réticulum endoplasmique dans les axones. En conséquence on assiste à une baisse des taux de glucose, du métabolisme lipidique, de la synthèse d'ATP et une perte de l'homéostasie calcique entraînant une dégénération distale axonale puis le repliement de l'axone vers le neurone et la mort de celui-ci.

Les mécanismes par lesquels la protéine Tau devient non-fonctionnelle sont nombreux et font débat. Des modifications anormales post-transcriptionnelles semblent être les causes de ces anomalies : hyperphosphorylation, glycation, acétylation, dégradation par la voie des ubiquitines, nitration, clivage protéolytique, … Parmi elles, la phosphorylation anormale et surnuméraire est à ce jour la plus étudiée et la mieux connue car elle est identifiée comme la cause principale de l'agrégation de la protéine Tau en fibrilles.

Il existe sur la protéine Tau plus de 80 sites de phosphorylation pathologique sur les résidus sérines et les thréonines. Deux kinases jouent un rôle majeur dans cette hyperphosphorylation, la glycogène synthase kinase-3*β* (GSK-3*β*) et la kinase cycline dépendante-5 (cdk-5).

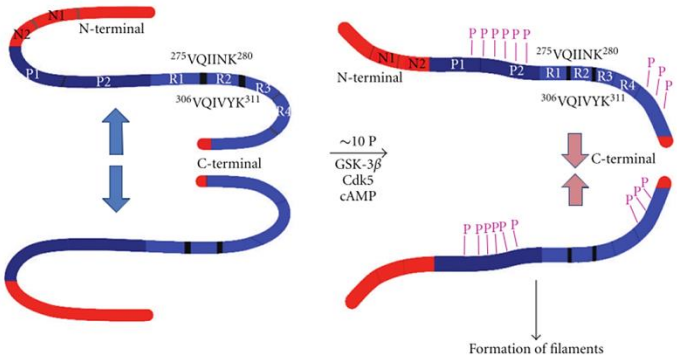


Figure 62 : Phosphorylation de la protéine Tau *in vitro*. Les sites de phosphorylation apparaissent en violet. On peut apprécier le changement conformationnel favorisant le rapprochement des séquences ^{275}VQIINK^{280} et ^{306}VQIVYK^{311} impliquées dans la fibrillation de la protéine Tau.[137]

La protéine Tau hyperphosphorylée possède une structure propice à son auto-agrégation sous la forme de feuillets β (Figure 62). C'est au niveau des séquences de répétition R1 à R4 que cette agrégation s'effectue, plus particulièrement au niveau des séquences ^{275}VQIINK^{280} (PHF6*) et ^{306}VQIVYK^{311} (PHF6) impliquées dans la fixation aux microtubules que nous avons évoquée précédemment.[138] Il est désormais établi que les oligomères A*β* et la pathologie de la protéine Tau sont fortement associés et impliqués dans le dysfonctionnement mitochondrial et la mort neuronale dans la MA. De nombreuses études ont révélé que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau est causée par différents facteurs comme les oligomères A*β* intraneuronaux, le stress oxydatif chronique, la répression des récepteurs à l'insuline 1 induit ou constitutif (IRS-1 / IGFR-1) et l'activation A*β*-induite des caspases *via* les astrocytes (Figure 63). D'une manière générale il est démontré que les dégénérescences

neurofibrillaires sont les conséquences d'un ensemble de dysfonctionnements médiés par les oligomères Aβ qui peuvent cependant parfois être retrouvés dans les cerveaux de patients non-atteints de MA.[139]

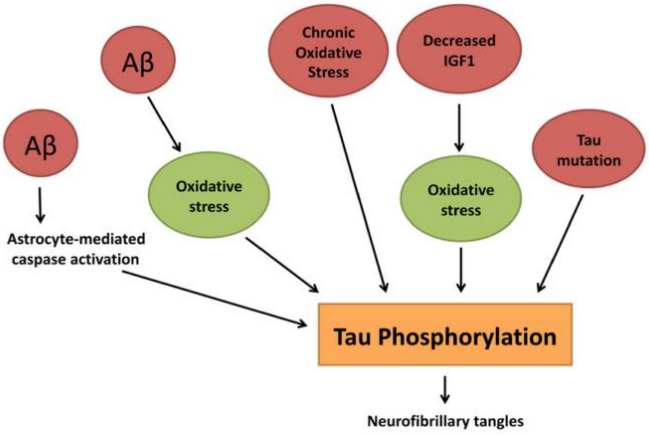


Figure 63 : Les différents facteurs pouvant induire l'hyperphosphorylation de la protéine Tau.[139]

2.2.5. Neuroinflammation chronique

La réponse inflammatoire est secondaire à un traumatisme physique ou une infection initiale dans laquelle elle joue un rôle important de retour en situation physiologique. En situation chronique, comme dans la MA, l'inflammation peut être la cause d'une plus grande perte de neurones par rapport au traumatisme initial. Dans le cas de la MA, les traumatismes initiaux sont aussi chroniques. Ce sont les atteintes neuronales engendrées par les processus physiopathologiques décrits précédemment. Le terme « neuroinflammation » est généralement utilisé pour caractériser les réponses inflammatoires du système nerveux central. On assiste alors à un recrutement de cellules gliales comme les astrocytes et les microglies qui convergent immédiatement sur le lieu du dysfonctionnement. Ce recrutement a lieu par chimiotactisme faisant suite à la présence dans le milieu de cytokines, de molécules du complément qui ont, par ailleurs, des fonctions activatrices des cellules gliales.

Pro-Inflammatory elements	Effect
Chemokines	Dysfunction, apoptosis and necrosis of neuron, microglia and astrocytes
IL-1β, IL-6, IL-12 INF-γ, TNFα	Astrocytes and microglia activation, dysfunction, apoptosis and necrosis of neuron, microglia and astrocytes
NO, ROS, O_2^-	Oxidative stress in cells; dysfunction, apoptosis and necrosis of neuron, microglia and astrocytes

Figure 64 : Médiateurs pro-inflammatoires sécrétés par les astrocytes et les cellules gliales à l'origine du processus de neuroinflammation.[140]

Le caractère chronique de l'inflammation est crucial car il est délétère, spécifiquement dans la MA, et mène de façon directe à l'activation de cascades cellulaires responsables de la neurodégénérescence.[141]

Concernant le traitement de cette inflammation, des études épidémiologiques ont établi un lien entre l'utilisation chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et le risque amoindri de développer une MA.[140]

2.2.6. Vision globale multifactorielle de la cascade amyloïde

Afin d'organiser l'implication de chacune des causes moléculaires que nous avons décrites comme appartenant à la cascade amyloïde et des facteurs environnementaux extracellulaires favorisant la progression de la MA, il est bon de projeter cela sur un schéma. Lee *et al.* proposent dans *Current Neuropharmacology* de donner un aperçu de ces « enchevêtrements » physiopathologiques (Figure 65).

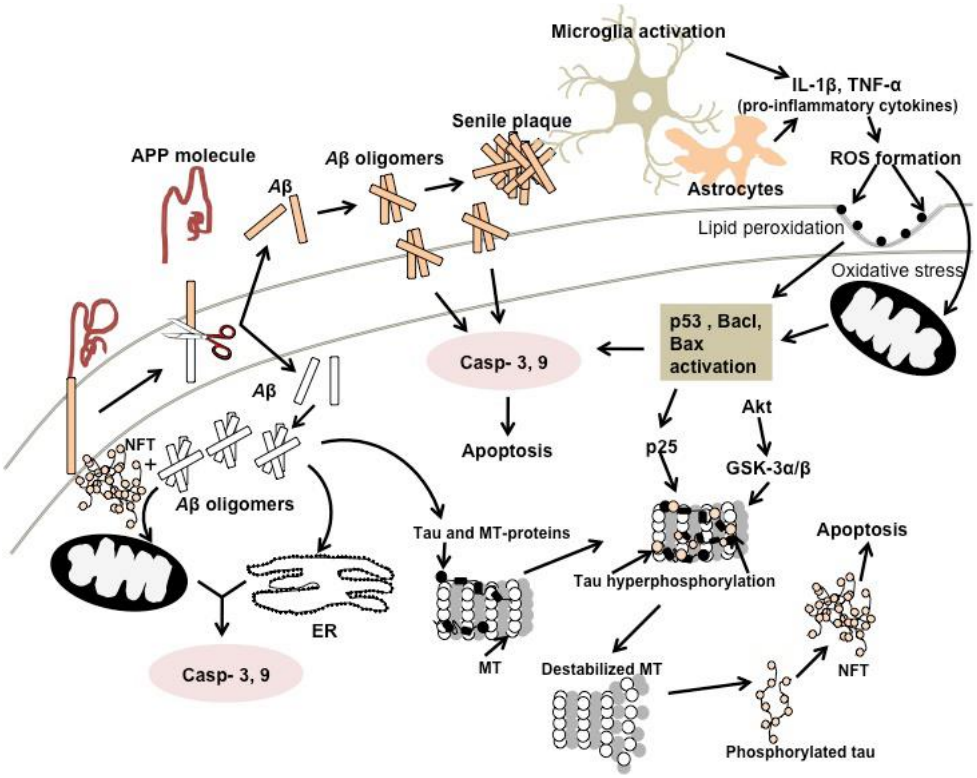


Figure 65 : Schéma montrant l'implication des différents acteurs moléculaires de la perte de fonctions cognitives dans la maladie d'Alzheimer.[142]

Ainsi, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence de plaques séniles extracellulaires dont le constituant élémentaire est le peptide A*β*. Associé à des neurodégénérescences neurofibrillaires intracellulaires formées de protéines Tau hyperphosphorylées, ils entraînent des dommages oxydatifs et inflammatoires chroniques entretenus par une perturbation de l'homéostasie des ions métalliques. Ils aboutissent à différents modes de mort neuronale et à la perte de fonctions cognitives puis fonctionnelles.

Le clivage de l'APP selon la voie amyloïdogénique est responsable de la formation d'oligomères A*β* neurotoxiques qui vont causer des perturbations mitochondriales, un stress oxydatif, la peroxydation

des lipides membranaires et entretiennent une neuroinflammation chronique avec le concours de métaux, de cytokines pro-inflammatoires et des protéines pro-apoptotiques. Concomitamment la phosphorylation anormale et/ou surnuméraire de la protéine Tau entraîne une désorganisation des microtubules et l'agrégation de cette dernière (Figure 66). La mort neuronale par nécrose ou apoptose est l'issue de cette cascade.

Les premières années de recherche concernant la MA ont permis d'incriminer les fibrilles Aβ comme agents neurotoxiques responsables de la mort cellulaire neuronale, de la perte de mémoire et des autres caractéristiques de la MA. Depuis 20 ans, les avancées technologiques ont permis d'approfondir ces études et d'affirmer que les fibrilles matures ne sont pas les agents toxiques principaux. Ce sont donc les formes préfibrillaires et oligomériques d'agrégation du peptide Aβ qui se sont montrées les plus toxiques pour les cellules cérébrales. La « cascade amyloïdogénique » semble être la théorie la plus largement défendue pour expliquer et élucider l'implication des différentes formes d'agrégats et leur toxicité avant d'aboutir aux plaques séniles.

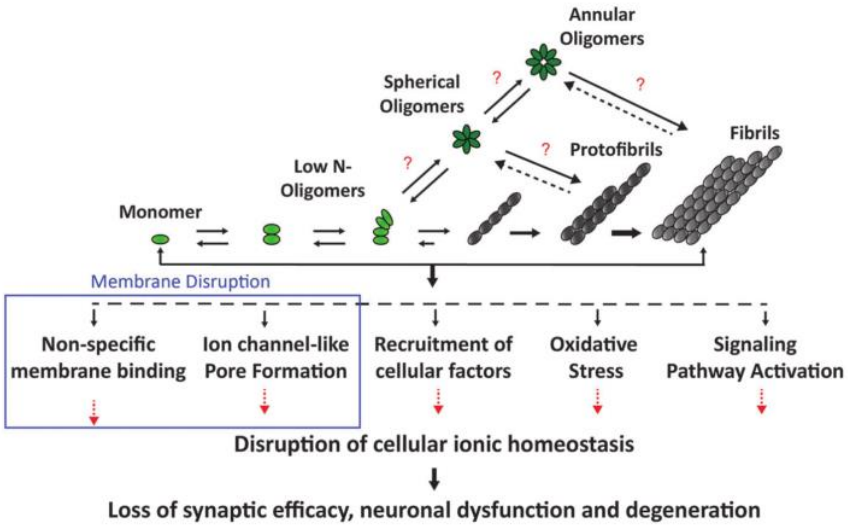


Figure 66 : L'hypothèse amyloïdogénique de la MA. L'agrégation Aβ est très diverse et peu connue. Cependant les oligomères représentés sur ce schéma sont parmi les plus toxiques connus et leur toxicité passe principalement par une interaction avec les membranes.[143]

2.2.6.1. Formation de pores membranaires

La base pharmacologique de la toxicité des oligomères Aβ est leur capacité à interagir et perturber les membranes cellulaires. Des études menées sur les modèles membranaires s'accordent toutes à dire que l'adhésion des monomères Aβ aux membranes cellulaires promeut son auto-agrégation. Les forces motrices de cette agrégation sont des effets de désolvatation et des interactions électrostatiques.[144] Nous savons aujourd'hui que les zones membranaires où est clivée le plus fréquemment l'APP pour produire du peptide A$\beta_{1\text{-}42}$ sont très riches en cholestérol, ganglioside et sphingomyéline. On les

appelle les « radeaux lipidiques » et cet environnement accélère l'agrégation du peptide Aβ_{1-42} (Figure 67).

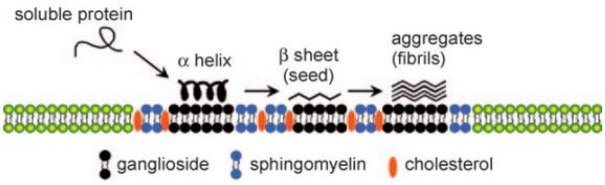


Figure 67 : Schéma de formation de fibrilles Aβ à la surface de radeaux lipidiques[145]

Lashuel et Butterfield proposent une revue sur le mécanisme d'interaction entre les protéines amyloïdogéniques et les membranes afin de mieux comprendre la formation de pores membranaires et ses conséquences.[145] On peut observer sur la Figure 68 le rôle joué par l'accumulation de protofibrilles amyloïdes à la surface membranaire et dont la concentration augmente jusqu'à avoir la capacité de s'assembler sous la forme de pores. Ces pores sont les outils de la fuite de matériels intracellulaires. Il faut noter la coexistence d'une deuxième voie de formation de pores. Celle-ci dépend de la formation de protofibrilles circulaires produites par l'agrégation amyloïde dans le milieu extra-cellulaire précédemment décrit. Ces dernières n'étant pas imbriquées dans la membrane pendant leur formation, il est nécessaire de souligner que ce sont par des effets tensio-actifs sur les lipides membranaires que ces protofibrilles forment les pores.

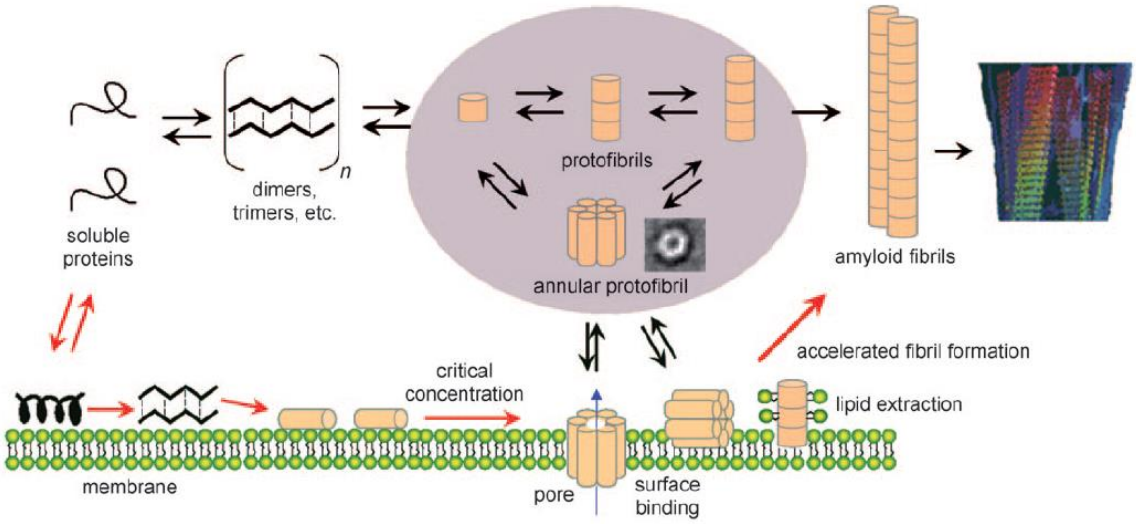


Figure 68 : Interconnections entre l'agrégation amyloïde et la perturbation membranaire.[145]

Initialement, peu de crédit était accordé à la formation de ces pores, établissant que la désorganisation de la membrane suffisait à installer la dyshoméostasie rencontrée aux abords membranaires. Depuis, de nombreuses équipes se sont chargées d'établir des modèles de pores créés par différents peptides amyloïdogéniques, dont ceux produits par l'agrégation de peptides Aβ_{1-42}, qui ont pu être modélisés par Jang *et al.* en 2007 (Figure 69).[146]

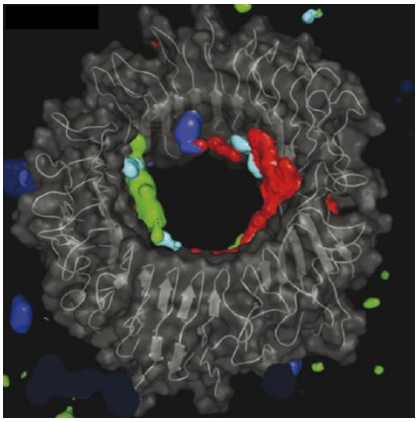


Figure 69 : Représentation par dynamique moléculaire d'un pore formé par les peptides A$\beta_{1\text{-}42}$.[146]

La formation de ces pores est toxique car la membrane se trouve déformée et perd la nature nécessaire au bon déroulement de ses fonctions de plasticité, particulièrement car ils fonctionnent comme des canaux ioniques à l'origine d'une augmentation de la concentration d'ions calcium Ca^{2+} intracellulaires. De manière globale une augmentation de calcium intracellulaire est retrouvée et n'est pas uniquement le fruit de la formation de pores. Les phénomènes pro-apoptotiques et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau sont aussi impliqués dans cette dyshoméostasie favorisant la lyse cellulaire.[147]

L'affirmation de l'existence de ces pores a permis d'engager des recherches dans le but de contrer leur formation ou leurs effets. Dans cette optique, le Béxarotène est en cours d'étude. Cette molécule antinéoplasique (TARGRETIN®) a fait récemment l'objet de polémiques quant à ces capacités à réduire certains déficits cognitifs précoces en ayant un rôle à jouer dans le métabolisme lipidique de l'apoE4.[148,149,150] Une équipe de recherche Marseillaise relance le débat en décrivant en 2014, dans le journal *ACS Chemical Neuroscience* le fait que le Béxarotène est capable de bloquer ces pores et donc de limiter la perturbation de l'homéostasie calcique qu'elles engendrent.

2.2.6.2. Interaction Aβ/récepteurs membranaires

Les oligomères Aβ sont capables de jouer le rôle de ligands pathogéniques et d'avoir une action d'ordre mécanique sur différents récepteurs. Ils peuvent induire une détérioration et/ou une perte de synapses, qui, ajouté au stress oxydatif, concourt à l'altération de la plasticité neuronale. Les oligomères Aβ sont également capables de se lier avec différents récepteurs pour initier de nombreuses cascades de signalisation, régulant l'expression de récepteurs à la surface membranaire.

Les oligomères Aβ ont une action directe activatrice sur les kinases c-Jun *N*-terminale (JNK) qui conduit à la phosphorylation et à la dégradation des récepteurs à l'insuline-1 (IRS-1). Ces récepteurs ont un rôle régulateur pour certaines kinases et sont impliqués dans la neuroprotection. En 2009, Qui-

Lan Ma *et al.* ont démontré que l'activation de JNK par les oligomères A*β* cause une inactivation des IRS-1 et induit une hyperphosphorylation de la protéine Tau.[151]

La sur-activation des récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) a été étudiée comme une conséquence directe et indirecte de la présence de peptides A*β*. La concentration de calcium s'en trouve encore augmentée dans la cellule et concourt à l'apoptose.[152] Il existe d'ailleurs parmi les rares molécules sur le marché aujourd'hui, la Mémantine (Figure 70), qui agit comme un antagoniste des récepteurs NMDA et qui aurait une action préventive sur la toxicité des oligomères A*β*.

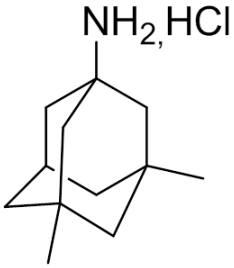


Figure 70 : Structure chimique de la mémantine, principe actif de la spécialité EBIXA®, antagoniste des récepteurs NMDA.

Les protéines Prion (PrP^c) sont des protéines membranaires que l'on retrouve au niveau cérébral. Elles sont bien connues par les cliniciens et le grand public pour leurs implications dans les maladies à prions. Elles sont généralement neurotrophiques et impliquées dans la régulation des β-sécrétases responsables du clivage amyloïdogénique de l'APP. Les oligomères A*β* se fixent spécifiquement au domaine central des protéines Prion et entraînent un effet neurotoxique *in vitro* et une neurodégénérescence étendue.[153]

D'autres types de récepteurs sont étudiés en tant que cibles des oligomères A*β* mais font l'objet de débats scientifiques et n'ont encore aucun rôle clairement élucidé à ce jour. On peut citer les récepteurs nicotiniques de l'Acétylcholine (nAChRs), les récepteurs à la neurotrophine (P75NTR) et les clusters de différenciation 36 (CD36) disposés à la surface des cellules gliales.

2.2.6.3. Interactions A*β*-métaux

L'homéostasie des ions métalliques, particulièrement du zinc (Zn), du cuivre (Cu) et du fer (Fe), est altérée dans la MA. La dégénérescence neuronale fait suite au stress oxydatif découlant de la génération excessive de radicaux libres favorisée par les réactions avec ces métaux présents dans les agrégats A*β*. La génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) requiert usuellement une réaction de l'oxygène avec un ion métallique comme le Cu ou le Fe. Le peptide A*β* possède *in vitro* des affinités pour le Cu (fortes), le Fe et le Zn (plus faibles).[154] Le peptide A*β* est coordiné à ces métaux grâce aux histidines présentes dans la séquence en position 6, 13 et 14 de la même manière que la sphère de coordination avec les métaux présente dans le site actif de la super oxyde dismutase. Sayre *et al.* ont prouvé que les plaques séniles isolées génèrent des ERO de manière dépendante des atomes de Cu et de Fe.[155] De plus, les atomes de fer, de cuivre et de zinc ont un pouvoir inductif de

l'agrégation β-amyloïde et peuvent, lorsqu'ils sont en grande concentration, induire la formation de métallo-oligomères Aβ solubles à partir des plaques séniles. Ces derniers vont amplifier les phénomènes de production d'ERO, la peroxydation des lipides membranaires et sont des facteurs du maintien constant de l'inflammation cérébrale.

Nous avons décrit l'ensemble des étapes menant à la formation des plaques séniles et étudié les différents niveaux de toxicité qui sont fonction de la taille des agrégats β-amyloïdes. La connaissance des mécanismes de toxicité des oligomères Aβ est indispensable pour progresser vers des traitements et des outils diagnostiques plus efficaces.

3. Propriétés thérapeutiques de la curcumine d'intérêt pour la MA

La curcumine est donc un composé issu du milieu naturel possédant de nombreuses fonctions chimiques accompagnées d'une structure la rendant particulièrement adaptable à plusieurs cibles moléculaires. Ceci lui procure une importance dans le domaine de la santé car elle est capable d'agir sur des cibles impliquées dans plusieurs processus physiopathologiques dont le plus étudié à ce jour est la cancérologie.

Ses propriétés remarquables dans les atteintes neurodégénératives ont été découvertes plus récemment. La maladie d'Alzheimer et les actions de la curcumine sur ses causes moléculaires seront particulièrement développées dans ce chapitre en raison du faible nombre de solutions aujourd'hui proposées pour soigner cette maladie. La potentialité pléiotrope de la curcumine dans les pistes de traitement de cette maladie multifactorielle aux causes moléculaires complexes est pertinente. Ces dernières décennies ont été marquées par de nombreuses études fondamentales et cliniques qui, sans permettre d'améliorer les pronostics, ont accru les espoirs de mettre au point des thérapies modifiant l'évolution de la maladie.

3.1. Les effets neuroprotecteurs de la curcumine pour la MA

Pour tout type de nouvelles molécules, issues d'un milieu naturel ou de synthèse organique, l'évaluation d'éventuelles activités biologiques est initiée en premier lieu *in vitro* dans des conditions contrôlées avec des techniques certifiées et éprouvées. Lorsque ces évaluations se montrent satisfaisantes et reproductibles, alors vient la phase d'essais *in vivo* qui fait logiquement suite à des évaluations de paramètres de drugabilité.

La curcumine est un produit naturel reconnu comme pléiotrope et d'intérêt thérapeutique essentiel dans le traitement de la MA. Cette évidence est née d'une étude épidémiologique. Les populations Indiennes dans lesquelles la consommation de curcuma est quotidienne, l'incidence est 4,4 fois moins

importante que la population des Etats-Unis concernant la MA.[156] Depuis lors, des preuves convaincantes données par des études *in vitro*, des études *in vivo* et des phases pré-cliniques d'essais thérapeutiques ont confirmé l'effet thérapeutique de la curcumine dans la MA.

3.1.1. Effets sur la cascade amyloïde

3.1.1.1. Mode de fixation de la curcumine sur les entités amyloïdes

L'importance de l'agrégation amyloïde dans la MA engage le monde scientifique à trouver des stratégies dirigées contre ce phénomène. Une attention considérable a été accordée aux plantes contenant des composés polyphénoliques comme la curcumine, les extraits de thé ou de *ginkgo biloba* L.

Au niveau biologique *in vitro*, la curcumine possède une affinité de liaison aux agrégats Aβ reflétée par son K_i de 0,07 µM. Elle inhibe de façon dose dépendante la formation de fibrilles Aβ avec une concentration efficace 50 ou EC_{50} de 0,63 µM. Elle inhibe l'extension des fibrilles Aβ avec une EC_{50} de 0,52 µM et elle peut les déstabiliser avec une EC_{50} de 0,32 µM.[157] La compréhension des différentes étapes de fibrillation des peptides Aβ nous permet également de mieux comprendre comment d'éventuels inhibiteurs agissent. Les feuillets β ne sont malheureusement à ce jour toujours pas cristallisés et seules des études de docking ou de dynamique moléculaire permettent de mettre à jour nos connaissances des interactions entre eux et la curcumine.

Nous avons vu que la séquence hexapeptidique ^{16}KLVFFA^{21} est essentielle à l'organisation et la stabilisation des peptides Aβ en feuillets β ou en oligomères. C'est pourquoi cet hexapeptide est un modèle très utile pour l'étude des interactions et l'évaluation du pouvoir des agents inhibiteurs de l'agrégation amyloïde. De plus, ces séquences sont cristallisables ce qui affine la fiabilité des études.

La curcumine possède une structure chimique qui la rend capable de se fixer aux peptides Aβ sous différentes formes d'oligomères. Des études de docking sur la forme énolique de la curcumine ont été menées pour déterminer comment elle interagit avec le fragment Aβ-hexapeptidique ^{16}KLVFFA^{21}. Elle est orientée dans une conformation linéaire étendue à l'intérieur d'une colonne constituée des chaînes latérales de deux tétramères de feuillets β. A l'échelle de l'acide aminé, l'interaction se fait de haut en bas, avec la lysine ^{16}<u>K</u>LVFFA, la leucine K^{17}<u>L</u>VFFA, la valine KL^{18}<u>V</u>FFA et la phénylalanine KLV^{19}<u>F</u>FA. La curcumine établit une liaison polaire ou non-polaire avec chacun de ces acides aminés. Les noyaux aromatiques sont orientés parallèlement à l'axe de la fibre et les substituants 3-méthoxy et 4-hydroxy d'un côté se lient par des interactions hydrogène avec la lysine ^{16}<u>K</u>LVFFA^{21} du monomère *n*, tandis que le noyau aromatique les portant se lie par l'intermédiaire de forces de Van der Waal's avec la valine KL^{18}<u>V</u>FFA du monomère *n+1*. Le linker central α,β-insaturé interagit également par le biais de forces de Van der Waals avec une phénylalanine d'un côté KLV^{19}<u>F</u>FA et une valine de l'autre

KL[18]VFFA. Le deuxième noyau aromatique interagit par l'intermédiaire d'une liaison π-alkyl avec la phénylalanine KLVF[20]FA.[158]

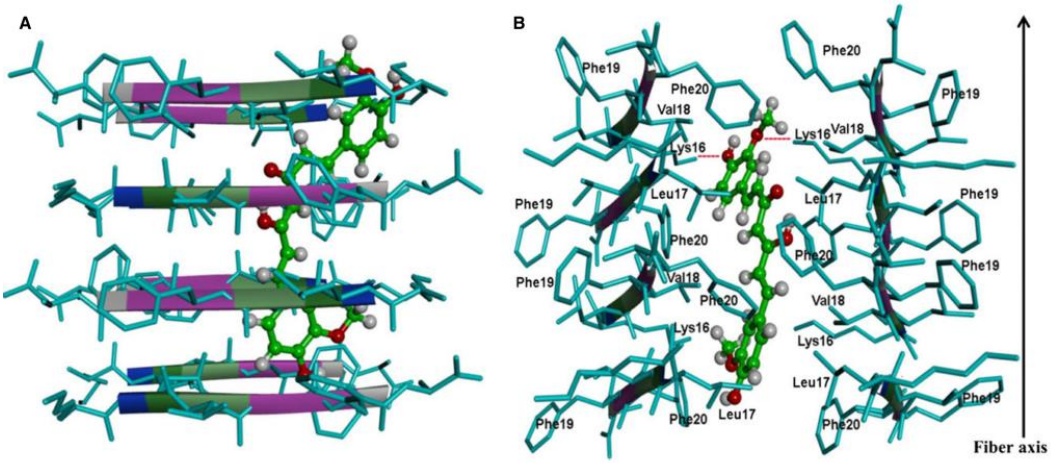


Figure 71 : La curcumine liée dans un modèle d'octamère hexapeptidique [16]KLVFFA[21] (A) et la curcumine dans la même situation orientée parallèlement à l'axe de la fibre (B) où l'on peut apercevoir deux liaisons hydrogènes en pointillés rouge.[158]

Pour ce qui est de l'interaction avec le peptide A$\beta_{1\text{-}40}$, sur un octamère constitué de la même manière que précédemment, les données de dynamique moléculaire montrent que l'interaction de la curcumine admet une liaison supplémentaire avec une histidine de type π-π stacking entre le noyau aromatique de la curcumine et l'imidazole de l'histidine. On résume les interactions comme suit : [14]HQ[16]KL[18]VF[20]FA.

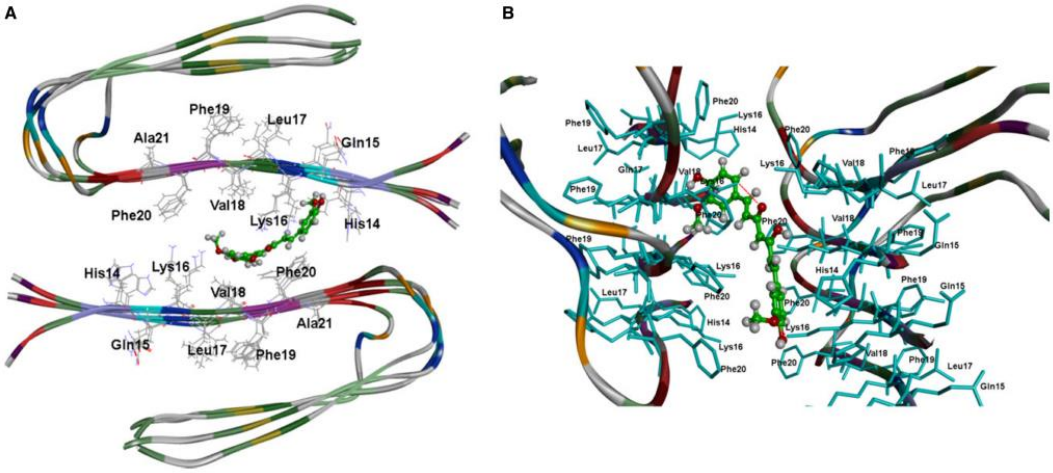


Figure 72 : (A) curcumine liée au peptide A$\beta_{1\text{-}40}$ entier sous la forme d'octamère, (B) les interactions de liaison de la curcumine à l'interface entre deux tétramères A$\beta_{1\text{-}40}$ avec les séquences [14]HQKLVFFA[21].[158]

Une étude réalisée par simulation de dynamique moléculaire à propos de la stabilité du complexe curcumine-A$\beta_{1\text{-}40}$, permet de renforcer les études de docking précédemment décrites et d'établir la non toxicité des oligomères Aβ qui sont fixés à la curcumine car cela entraîne un changement conformationel qui déplace l'équilibre vers la formation de feuillets β non-toxiques.[158]

Afin de permettre à la science de progresser vers la synthèse ou la découverte de nouvelles molécules naturelles capables d'inhiber de manière similaire l'agrégation toxique des peptides en oligomères, Reinke et Gestwicki en 2007 ont publié une étude de relation structure-activité de molécules connues pour se fixer aux peptides Aβ dont les structures sont basées sur la curcumine.[159] Il ressort que trois paramètres sont à prendre en compte : la longueur et la flexibilité du linker central et la nature des extrémités de ces ligands.

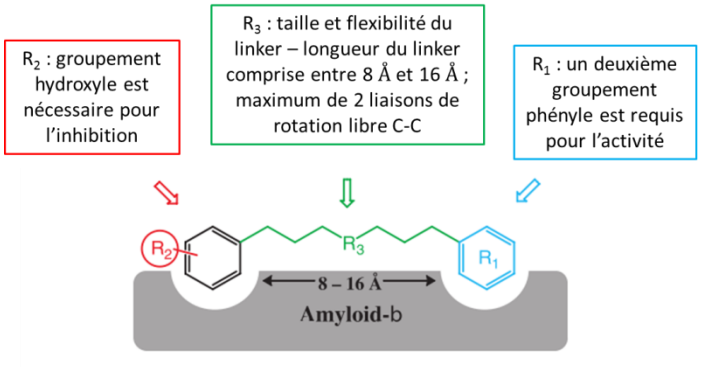


Figure 73 : Eléments de relation structure-activité importants pour le design de nouveaux inhibiteurs de l'agrégation amyloïde.[159]

Ainsi nous pouvons affirmer que la présence de deux noyaux aromatiques est essentielle à l'activité dont au moins un doit être substitué par un groupement hydroxyle. Ces deux noyaux doivent être séparés par un *linker* central dont la longueur est comprise entre 8 Å et 16 Å et qui ne doit pas être trop flexible.[159]

3.1.1.2. Evaluation de l'efficacité *in vitro* d'inhibiteurs d'agrégation β-amyloïde

Les efforts intenses pour la détection, la diagnose et l'analyse cinétique et structurale des propriétés des fibrilles amyloïdes ont aidé à générer des moyens puissants d'évaluation. Le test le plus utilisé de nos jours est basé sur la fluorescence de Thioflavine-T (ThT) lorsqu'elle est fixée sur des fibrilles. Depuis sa première description en 1959 par Vassar et Culling, cette substance fluorescente est devenue le réactif de référence utilisé pour identifier *in vitro* et *in vivo* les fibrilles amyloïdes. Cette molécule émet une fluorescence croissante en fonction de la présence de fibrilles ce qui fait d'elle un outil particulièrement intéressant.[160]

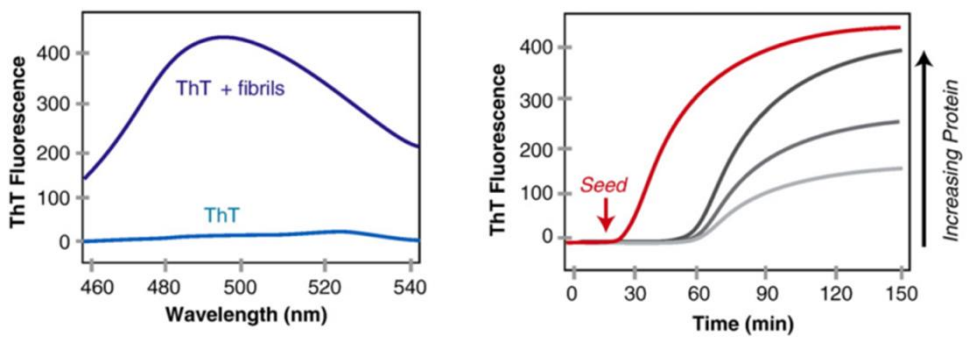


Figure 74 : (gauche) Fluorescence de la ThT en présence et en absence de fibrilles ; (droite) cinétique de fibrillation monitorée par la fluorescence de la ThT, l'apparition rapide de la fibrillation induite par l'ajout direct de fibrilles préformées est également représentée (rouge).[161]

La fluorescence de la ThT uniquement en présence de fibrilles permet, en pratique, de pouvoir mesurer le pouvoir de molécules à inhiber la fibrillation ou déstabilisant celle-ci.[162] On mesure ainsi la différence de fluorescence émise quand le peptide A$\beta_{1\text{-}42}$ s'agrège en fibrilles avec et sans perturbateur. On peut également mesurer l'effet désagrégeant d'un composé lorsqu'on le place en présence de fibrilles préformées et qu'on quantifie la diminution de fluorescence induite.

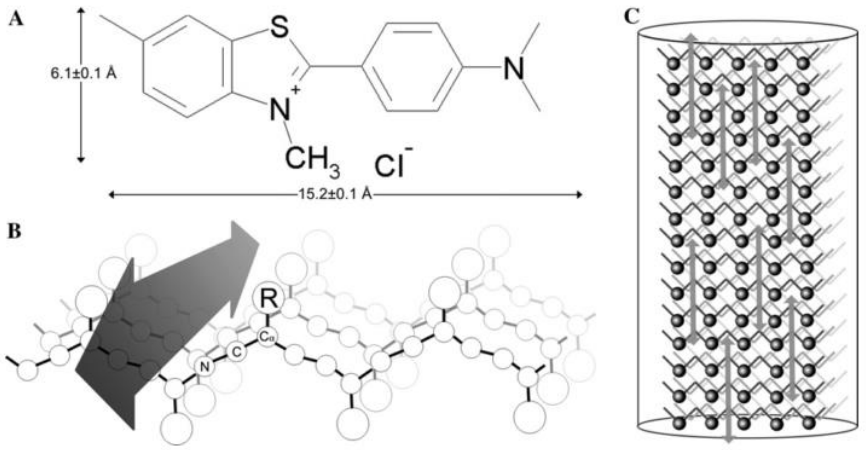


Figure 75 : (A) Structure et dimensions de la Thioflavine T qui est placée parallèlement à l'axe de fibrillation d'un feuillet-β pour former un *channel* (B) et organisée dans une fibrille entière (C).[163]

L'affinité de ce colorant pour les assemblages de type feuillet-β amène les scientifiques à se demander par quels moyens d'interaction et comment les molécules de thioflavine s'assemblent dans ces structures. Krebs *et al.* ont affirmé que la thioflavine T se fixe aux fibrilles amyloïdes parallèlement à l'axe d'agrégation selon une disposition en canaux (*channel* est le terme employé en anglais). La proximité stérique entre la thioflavine et les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans l'agrégation explique l'intensité de fluorescence de celle-ci. Cette affinité diffère selon le type de feuillet-β. Concernant les agrégats de peptides Aβ, la thioflavine trouve sa place et interagit avec les résidus phénylalanine des feuillets comme indiqué dans la Figure 76.

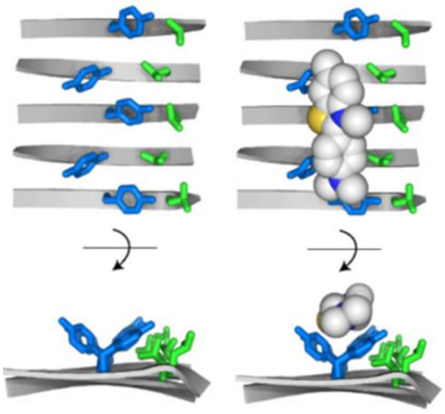


Figure 76 : Représentation d'un feuillet-β vue du dessus et à travers avec ou sans Thioflavine T qui se fixe en *channel* entre plusieurs résidus latéraux de phénylalanine.[161]

3.1.2. Inhibition de la β-sécrétase BACE-1

Une des étapes clé dans la production de peptide A*β* est le clivage de l'APP par la *β*-sécrétase 1 ou *β*-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE-1). De manière directe, la curcumine possède une activité inhibitrice de cette enzyme avec une concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) de 0,56 mM. Cette valeur très modeste ne permet pas à elle seule de justifier une activité inhibitrice dans des milieux physiologiques.[164] Une étude vient justifier son activité qui est *in fine*, indirecte. La curcumine s'avère être capable, dans une culture cellulaire de neurones corticaux issus d'embryons de rats, de supprimer l'induction de l'expression de BACE-1 pour des concentrations comprises entre 1 et 30 µM.[165] Une autre étude montre qu'à la concentration de 20 µM, la curcumine peut également totalement supprimer la traduction excessive des ARNmessagers de l'APP et de BACE-1 médiée par l'augmentation des concentrations des ions Cu^{2+} et Mn^{2+}.[166]

3.1.3. Actions sur la protéine Tau

3.1.3.1. Interaction directe et désagrégation de Tau

Nous avons décrit précédemment comment la protéine Tau hyperphosphorylée étant surnuméraire en situation pathologique est capable d'auto-agrégation sous forme de feuillets *β*. La séquence essentielle à cette agrégation est la partie PHF6 de la protéine ou ^{306}VQIVYK^{311}. De manière similaire aux études menées sur les interactions entre la curcumine et les feuillets *β* des peptides *β*-amyloïdes à l'aide de la séquence ^{16}KLVFFA^{21}, les études permettant d'analyser le comportement des agrégats de la protéine Tau avec des perturbateurs tels que la curcumine sont menées sur cette séquence ^{306}VQIVYK^{311}.

Les études de perturbation des feuillets *β* formés d'hexapeptides ^{306}VQIVYK^{311} par la curcumine sont également faites par dynamique moléculaire.Cependant la formation de complexes cristallins semble plus évidente avec ce peptide. Les segments ^{306}VQIVYK^{311}, en présence de curcumine, forment des structures en feuillets-*β* parallèles assemblées par complémentarité stérique puis réunies 2 à 2 pour

constituer une fibre. La curcumine se fixe dans la cavité aménagée entre ces deux ensembles stériques décalés.[167]

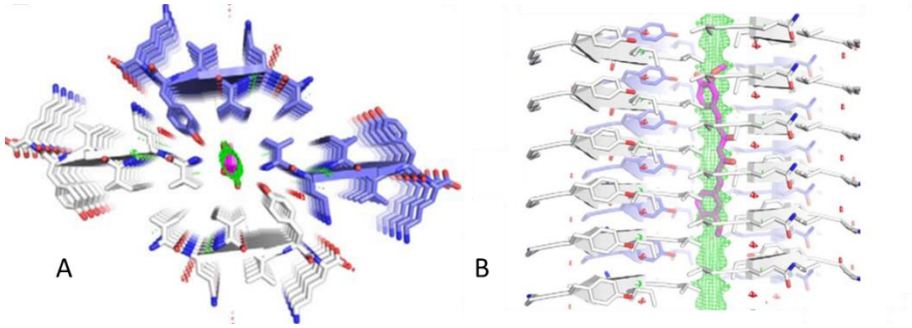


Figure 77 : Structure du complexe de la curcumine co-cristallisée avec les séquences ^{306}VQIVYK^{311} ou PHF6 de la protéine Tau, (A) avec une vue selon l'axe de la fibre à l'intérieur de la colonne stérique s'organisant entre les 2 ensembles stériques en bleu et blanc, (B) vue au travers de l'axe de la fibre avec la colonne de densité électronique de forme tubulaire en vert et la curcumine à l'intérieur.[167]

L'aire de cette cavité occupée par une molécule de curcumine représente 351Å² et l'affinité de celle-ci pour la fibre se fait grâce à 50 % d'interactions hydrophobes avec les résidus valine et isoleucine ^{306}VQ^{308}IVYK et de 50 % de liaisons polaires avec la fonction hydroxyle de la tyrosine VQIV^{310}YK et l'amine terminale de la lysine VQIVY^{311}K. La cavité dans laquelle se trouve la curcumine est également un site pour lequel la plupart des polyphénols ont une affinité. Ce sont des molécules telles que les flavonoïdes entrant dans la composition du vin, d'autres épices, du thé vert, etc…

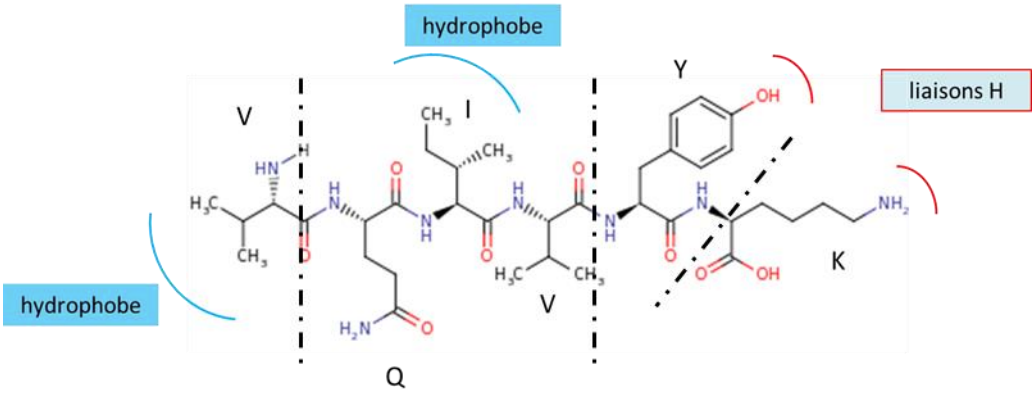


Figure 78 : Les différents sites d'interactions possibles situés sur le peptide VQIVYK, les pointillés signalent que les interactions ne se font jamais sur un seul peptide.

Des simulations faites par dynamique moléculaire permettent de comprendre comment ces molécules peuvent induire la désagrégation de ces fibres. La puissance des calculateurs modernes a permis à Berhanu et Masunov en 2015 de publier leur étude visant à simuler la séquence de désagrégation de 0 à 20 nanosecondes à partir du complexe de curcumine/PHF6 précédemment décrit.

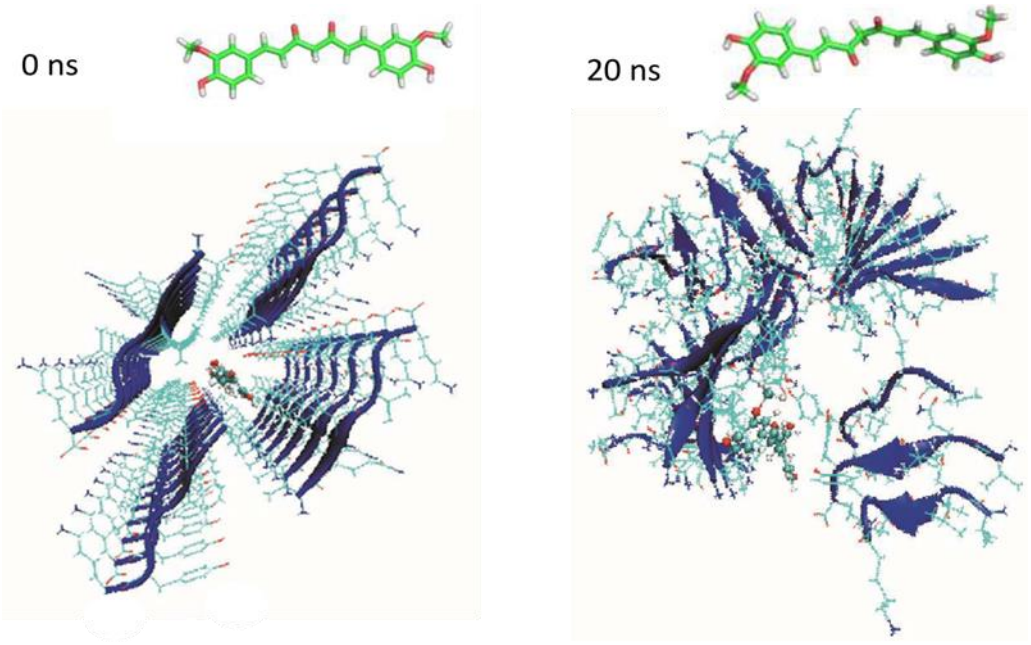


Figure 79 : Simulation entre 0 s et 20 ns de la désagrégation des fibrilles PHF6 de Tau avec la curcumine et les conformations de celle-ci sont représentées dans le haut de l'image.[168]

La curcumine présente dans la cavité a tendance à changer de conformation par une rotation effectuée autour du carbone méthylénique placé entre les deux fonctions cétones du linker central, ce qui permet de fournir assez d'énergie pour rompre les liaisons hydrogène entre deux des quatre feuillets-*β* et ainsi détacher l'un d'eux. A ce moment les autres feuillets se désorganisent et vrillent sur eux-mêmes.[168]

3.1.3.2. Action indirecte de la curcumine sur la pathologie Tau : glycogène synthase kinase-3 β ou GSK-3β.

Une kinase est une enzyme responsable de la phosphorylation d'une autre protéine pour l'activer ou la réprimer. Le substrat de cette activité enzymatique est l'adénosine tri-phosphate (ATP) qui sera accueilli dans une poche de fixation à l'ATP sur la kinase afin qu'elle transfère un phosphate de l'ATP sur la protéine à phosphoryler en relarguant ainsi de l'adénosine di-phosphate.

La protéine GSK-3 est une kinase phosphorylant spécifiquement les chaîne latérales des acides aminés sérine et thréonine, est appartient donc à la catégorie des sérine/thréonine kinase. La GSK-3β est une des iso-enzyme constituée de la famille GSK-3. Elle est impliquée dans le métabolisme du glucose car elle inhibe la glycogène synthase par phosphorylation et empêche la glycogénogenèse. Elle a également un rôle dans la régulation de l'activité de plusieurs autres enzymes impliquées, par exemple, dans des processus inflammatoires ou oncogènes. Le sous type GSK-3β est connu pour être suractivé dans la MA et, entre autres kinases, responsable de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. GSK-3β fait donc partie des causes moléculaires indirectement à l'origine de l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée.

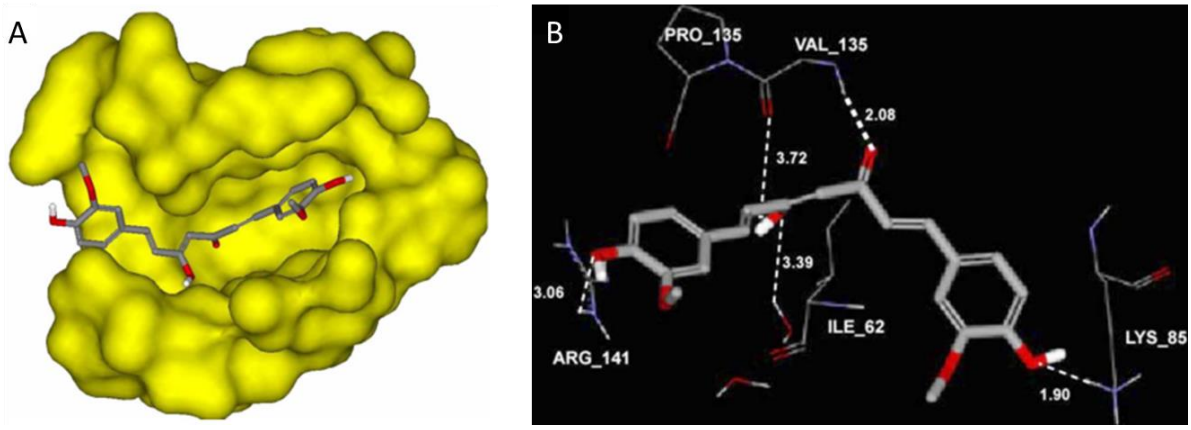


Figure 80 : Représentation de la curcumine modélisée dans le site de fixation de l'ATP sur GSK-3β (A) et les interactions engagées avec les chaînes latérales des acides aminés (B).[52]

La curcumine est un inhibiteur du sous type GSK-3β avec une IC_{50} de 66,3 nM. Cette faculté vient compléter la liste des actions pléiotropes de cette molécule. Elle agit en entrant en compétition avec l'ATP dans le site actif de la kinase qui ne sera plus en mesure de phosphoryler les protéines dont elle régule l'activité. Des études de modélisation moléculaire par docking affirment le mécanisme de cette activité au niveau du site de fixation de l'ATP de la curcumine sur GSK-3β et la caractérisation des interactions possibles entre eux est représentée dans la Figure 80.

Pour déterminer *in vitro* cette capacité inhibitrice, Bustanji *et al.* ont démontré que dans un milieu contenant la protéine Tau, l'ajout de curcumine à concentration croissante diminue l'activité de GSK-3β en dosant la quantité de protéine Tau phosphorylée produite.[52]

Cette activité inhibitrice *in vivo* a également été étudiée par la quantification du glycogène accumulé dans le foie de souris subissant des injections intrapéritonéales de doses croissantes de curcumine. C'est à la dose de 60 $mg.kg^{-1}$ que le meilleur résultat est obtenu.

3.1.3.3. Evaluation de la puissance d'inhibiteurs d'agrégation de la protéine Tau

De la même manière que les fibrilles formées par l'agrégation des peptides A*β*, la thioflavine est ici encore un très bon moyen d'étudier l'agrégation de la protéine Tau. La différence avec le test réalisé pour suivre l'agrégation des peptides A*β* est l'indicateur de fluorescence qui peut être la Thioflavine S (ThS) qui a une structure similaire à celle de la ThT.

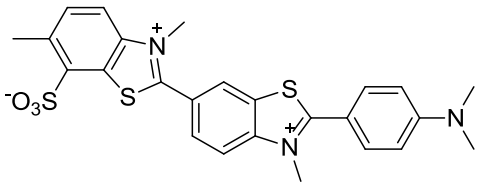


Figure 81 : Structure de la thioflavine S (ThS).

Les deux types de thioflavines sont capables de mesurer le degré d'agrégation des feuillets-β formés par la protéine Tau hyperphosphorylée. Cependant Friedhoff *et al.* ont montré que la fluorescence de la ThS est plus intense que la ThT dans les conditions d'agrégation de la protéine Tau dans lequel la quantité de polyanions est plus importante.[169]

3.1.4. Action sur les phénomènes d'oxydation

L'oxygène participe à des réactions qui peuvent endommager les biomolécules par l'intermédiaire des ERO, et ainsi altérer la structure et la nature d'éléments cellulaires. Ces réactions sont présentes dans les systèmes vivants comme le corps humain. Il existe dans la nature des antioxydants qui empêchent perpétuellement ces transformations dans les organismes vivants. Concernant les matières brutes ou transformées comme les produits industriels, des agents de conservations synthétiques ou naturels sont ajoutés pour retarder ces phénomènes.

3.1.4.1. Mécanisme antioxydant de la curcumine

La curcumine minimise les lésions créées par le stress oxydatif grâce ses propriétés anti radicaux-libres. Vu l'importance accordée aux régimes antioxydants dans la prévention de maladies chroniques comme les cancers, les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et cardio-vasculaires, les mécanismes antioxydants de la curcumine ont été largement étudiés. Cette capacité de piège de radicaux-libres est aussi exprimée par une inhibition de la peroxydation lipidique. Nous avons vu précédemment que la curcumine possède différentes formes dans les milieux en fonction de la qualité du solvant et du pH. Elle possède donc deux mécanismes d'action différents qui sont fonction de sa structure β dicétonique ou énolique.

Dans sa forme énolique, dans les milieux aqueux polaires de pH neutre, elle agit grâce aux extrémités phénoliques. Les composés antioxydants phénoliques, dont la curcumine fait partie, piègent les radicaux-libres par un mécanisme de transfert électronique. Le caractère électro-donneur d'une molécule est déterminé par le potentiel d'oxydation électronique des antioxydants parents, défini par le potentiel réducteur du radical phénoxyl correspondant. Or, le potentiel d'oxydation de la curcumine est estimé à pH 7, à E_7 = 0,77 V. Cette valeur est supérieure aux E_7 des antioxydants physiologiques comme la Vitamine C E_7(vitamine C) = 0,28 V et la vitamine E E_7(vitamine E) = 0,28 V ce qui veut dire que le radical phénoxyl de la curcumine peut oxyder ces 2 molécules. Cette capacité lui permet de piéger les radicaux alkoxyles générés lors des phases de propagation des réactions radicalaires.

Le pouvoir anti-oxydant de la forme cétonique réside dans la stabilité du radical central de sa structure β dicétone *α,β*-insaturée qui admet 3 formes mésomères.[170]

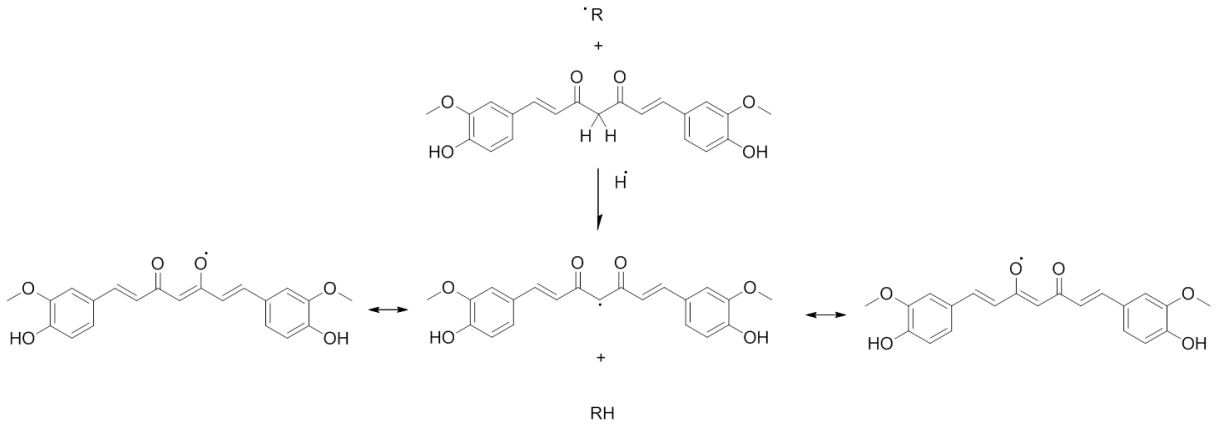


Figure 82 : Pouvoir antioxydant de la curcumine passant par le transfert d'atome d'hydrogène et stabilisation du radical par résonance.

Nous avons évoqué que la curcumine en milieu polaire est insoluble sous la forme dicétone à pH neutre. Il apparaît donc difficile de conclure sur son activité anti radicaux-libres dans le milieu extra-cellulaire. L'intérieur d'une cellule est légèrement acide. Il est donc probable d'y retrouver préférentiellement la forme dicétone. Cette forme dicétone exerce son pouvoir par ce transfert d'atome d'hydrogène central dont le radical est stable et elle apparaît être un meilleur donneur de protons que les molécules telles que le glutathion.

3.1.4.2. Evaluation du pouvoir antioxydant de la curcumine

Le pouvoir antioxydant des composés chimiques de synthèse ou d'origine naturelle est très étudié pour des applications pratiques dans de vastes domaines tels que l'agro-alimentaire, la dermo-cosmétique et l'industrie du médicament. C'est pourquoi il existe pléthore de moyens d'évaluation en fonction de la cible (vivante ou matière) et du milieu (polaire, apolaire). Parmi ces outils d'analyse, la spectrophotométrie UV-visible est la plus utilisée car elle est la plus adaptée à l'évaluation de « changement de couleur » d'une molécule sous forme radicalaire stabilisée à une forme moléculaire. C'est une méthode très bien maîtrisée, fiable, facile à mettre en œuvre et bon marché qui n'admet qu'une limite : la capacité des spectrophotomètres à distinguer la longueur d'onde maximale d'absorption ou λ_{MAX} de deux composés (sensibilité).

L'activité antioxydante de la curcumine *in vitro* peut être évaluée par calcul du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ou DPPH· et d'autre radicaux stabilisés. L'activité antioxydante « totale » peut être déterminée par des tests au thiocyanate ferrique. On peut également évaluer sa capacité à piéger le radical anion superoxyde et réduire le peroxyde d'hydrogène. L'évaluation du pouvoir chélatant des ions ferreux Fe^{2+} et autres cations métalliques permet de dévoiler un pouvoir antioxydant indirect car, nous l'avons vu précédemment, ils ont été identifiés comme facilitateurs de l'oxydation de matériels cellulaires.

3.1.4.2.1. Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle ou DPP·, méthode de Blois[5]

Ce test de piégeage du DPP· permet d'apprécier l'activité globale anti-radicalaire de composés. Cette méthode est facile à mettre en œuvre, automatisable et adaptable à la lecture en microplaque pour le screening de chimiothèque et elle est particulièrement utilisée en contrôle qualité sur des chaînes de production industrielles.

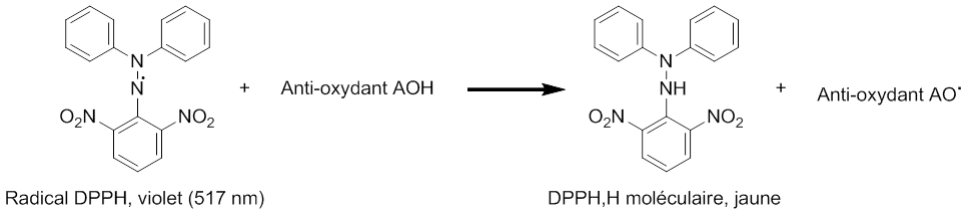


Figure 83 : Schéma de la réaction ayant lieu entre le radical DPPH et une molécule évaluée pour son pouvoir antioxydant.

En effet le radical DPPH· absorbe dans le visible à la λ_{MAX} de 517 nm, après réduction par un composé possédant une activité anti-radicaux libres, il se forme du DPPH,H réduit qui a une λ_{MAX} différente. La diminution d'absorption comparée à un essai blanc, après 30 minutes d'incubation, permet d'évaluer la puissance anti-radicaux libres du composé testé. Cette méthode est quantitative, elle nous permet d'avoir un pourcentage d'activité ou une concentration inhibitrice 50.

Concernant la curcumine ce test est réalisé dans l'éthanol, le réactif est à 0,1 mM de DPPH·. Une gamme de concentrations croissantes en curcumine est réalisée de 15 à 45 $\mu g.mL^{-1}$. Après 30 minutes d'incubation du mélange de 0,5 mL de réactif et de 1,5 mL de solution test, une lecture est effectuée à la longueur d'onde de 517 nm et on obtient A_S absorbance en présence de curcumine. On réalise un essai blanc en parallèle et on mesure l'absorbance à 517 nm pour obtenir A_C absorbance du contrôle ou du blanc en absence de curcumine.[171] Le pourcentage d'activité antioxydante nous est donné par la formule :

ACTIVITE DE PIEGE ANTI RADICAL DPPH· (%) = $(1 - A_S/A_C) \times 100$

Ce test nous donne une activité anti radicaux-libres de la curcumine à 34,86 $\mu g.mL^{-1}$.

Des essais basés sur le même principe existent afin de pouvoir évaluer l'activité des composés à d'autres longueurs d'onde car si les composés testés présentent une absorption maximale proche de celle du radical DPPH· ils masqueront potentiellement l'activité anti radicaux-libres. On peut citer les tests avec le radical cation 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid ou ABTS qui possède une λ_{MAX} à 734 nm et la *N*,*N*-diméthyl-*p*-phénylènediamine mélangée au chlorure ferrique qui admet un maximum d'absorption à 505 nm.

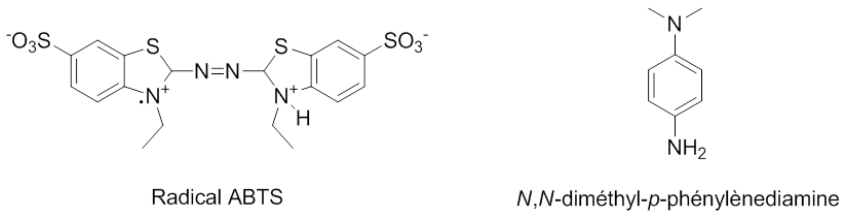


Figure 84 : Structure du radical ABTS et de la *N*,*N*-diméthyl-*p*-diphénylènediamine.

3.1.4.2.2. Activité de piégeage du radical anion superoxyde, méthode de Beauchamp et Fridovich[172]

Le principe est le même mais évalue l'activité sur les radicaux anions superoxydes qui sont présents et incriminés dans la physiopathologie Alzheimer.

Les radicaux superoxydes sont générés par photoinduction sur un mélange de riboflavine et de méthionine irradié avec des lampes à fluorescence (20W). Le radical formé réduit un indicateur coloré, le nitro bleu de tétrazolium ou NBT en bleu formazan qui a un maximum d'absorption à 560 nm. L'ajout d'un composé capable de réduire le radical anion superoxyde dans le milieu pendant l'incubation (40 min, 25°C) fait que le milieu reste incolore, à l'inverse des tests précédents.

3.1.4.2.3. Chélation du fer ferreux (Fe^{2+}) et du Zinc (Zn^{2+}), méthode de Dinis *et al.*[173]

Dans cet essai la capacité de la curcumine à se complexer avec le fer ferreux est donnée par le suivi de l'absorbance du complexe entre la ferrozine et les ions ferreux à la longueur d'onde de 562 nm. La curcumine est d'abord mise en solution avec des ions ferreux amenés par du chlorure de fer, puis la ferrozine est ajoutée pour complexer les ions ferreux libres qui n'ont pas été complexés par la curcumine. Ici l'incubation est de 10 minutes à température ambiante. On mesure ensuite l'absorbance du milieu à 562 nm et plus il y a d'effet complexant du composé testé, moins il y aura de coloration.

Le même principe méthodologique est utilisé pour évaluer les activités chélatantes d'autres métaux impliqués dans la MA. Le zinc Zn^{2+} est un métal cible car il est connu pour induire l'agrégation amyloïde, stabiliser les plaques séniles et désorganiser la polymérisation des microtubules quand il est en trop grande concentration.[174] La perturbation de l'homéostasie de ce cation, dont les cellules gliales sont grandement responsables, entraîne également des problèmes de transmission synaptique ce qui fait de lui un neuromodulateur.[175]

Chapitre IV. Biodisponibilité et formulation

1. Curcumine : éléments de biodisponibilité

Après avoir détaillé les propriétés physico-chimiques de la curcumine il convient de faire le point et de rassembler ces informations pour mieux comprendre comment cette substance se comporte lors de son utilisation en médecine humaine. En effet, la plupart des paramètres que nous avons abordés décrivent une molécule douée de facultés variées qui, pour certaines, ont été illustrées par des exemples. Dans le domaine pharmaceutique, lorsqu'une molécule est capable de présenter d'aussi nombreuses propriétés pharmacologiques, la démarche de recherche ouvre la voie aux évaluations de profils pharmacocinétiques et toxicologiques. La pharmacocinétique est une discipline permettant d'apprécier le devenir de molécules actives dans le corps humain. Alors que la biodisponibilité absolue sera le reflet de ce devenir lorsque l'administration est réalisée par voie intraveineuse, seront déclinées, en fonction des utilisations recherchées les biodisponibilités relatives selon d'autres abords physiologiques, oraux, cutanés et percutanés (sous-cutané, intradermique, intramusculaire, …), rectaux, vaginaux, oro-pharyngés, etc… Concernant plus particulièrement la curcumine, la biodisponibilité absolue a été déterminée et il est intéressant de décrire aussi sa biodisponibilité par voie orale.

De nombreuses étapes permettent de dégager les éléments essentiels au profil pharmacocinétique ou « drugabilité » d'un composé. On retrouve dans l'ordre physiologique des évènements, pour la voie orale : l'absorption à travers la large surface membranaire du tractus digestif, la distribution dans les différents compartiments disponibles dans le corps humain tels que les compartiments sanguin ou méningé, le métabolisme effectué par les organes riches en enzymes dont le principal est le foie mais il ne faut pas négliger les reins ou les poumons. Pour finir, les métabolites ou le composé originel seront éliminés par les voies physiologiques principales urinaire et fécale mais aussi cutanée, salivaire et lacrymale.

Ce chapitre doit éclairer le lecteur sur les raisons pour lesquelles la curcumine, malgré ses activités intéressantes en thérapeutique dans de nombreux domaines, n'est pas utilisée à ce jour en tant que médicament. Les études de pharmacocinétique de ces trente dernières années relatent une absorption pour la voie orale médiocre pour ce composé ainsi qu'un métabolisme très efficace ne permettant qu'un faible pic de concentration plasmatique de très courte durée pour des doses très élevées de l'ordre du gramme par kilogramme de poids corporel.

1.1. Absorption de la curcumine

Une étude réalisée par Shoba *et al.* parue dans la revue *Planta Medica* en 1998 a eu pour but d'évaluer les paramètres d'absorption de la curcumine chez le rat et chez l'Homme. Pour cela on administre par

voie orale une dose dite « de cherche » en une seule prise puis on dose régulièrement les concentrations plasmatiques de curcumine. La curcumine a été administrée chez le rat à la dose de 2 $g.kg^{-1}$ et chez l'Homme à moindre dose : 33 $mg.kg^{-1}$ soit une dose de charge de 2g pour un adulte de 60 kg. L'équipe a été en mesure de déterminer une concentration maximale ou C_{max} de 0,006 ± 0,005 $\mu g.mL^{-1}$ de curcumine à 1 heure de l'administration (T_{max} = 1h).[176] Pour mettre en relief ce résultat, une étude portant sur le lorazépam, benzodiazépine anxiolytique possédant une C_{max} parmi les plus faibles des médicaments présents sur le marché, relate qu'après une administration par voie orale de 1 mg en dose de charge de produit on obtient une C_{max} de 0,025 $\mu g.mL^{-1}$.[177]

Il n'existe que peu d'étude chez l'Homme. Il en est une remarquable qui est réalisée avec de grandes quantités de curcuminoïdes : on n'en retrouve seulement 57,6 $ng.mL^{-1}$ deux heures après l'administration par voie orale de 12 g d'extrait de *curcuma*. Le problème est que pour 8 des 20 patients sains participant à l'étude ont été atteints de diarrhées. Compte tenu de ces résultats, qu'il faut bien entendu croiser avec les données d'activité pharmacologique de la curcumine, on peut affirmer que la curcumine possède une absorption médiocre même à forte dose. Cette faible absorption concourt à faire de la curcumine un composé difficilement biodisponible par voie orale chez l'Homme et inconvenante en de trop fortes quantités.[178]

Cette absorption médiocre a des conséquences quant à la poursuite des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques et notamment les concentrations efficaces de curcumine n'ont à ce jour pas pu être déterminées chez l'Homme. Etant donné l'impossibilité de déterminer ces paramètres pour la voie orale, les autres voies d'administration plus invasives ne sont pas explorables à ce jour avec de telles quantités de produit.

1.2. Distribution de la curcumine

La distribution tissulaire de la curcumine est un paramètre assez peu exploré en raison des problèmes d'absorption. Le nombre d'études scientifiques est limité à ce sujet et les publications que l'on retrouve sont malheureusement différentes sur les méthodologies mises en œuvre avec des paramètres d'évaluation disparates et des matières premières utilisées différentes car l'on peut trouver des études avec l'utilisation directe de curcumine ou des études utilisant de grande quantités d'extraits contenant des curcuminoïdes.

Cependant on sait que chez le rat, après une administration d'une dose de charge de 400 mg, seulement des traces de curcumine inchangée ont été retrouvées au niveau du foie et des reins. Il reste à 30 min de la prise orale, 90 % de curcumine inchangée dans l'estomac et le tractus digestif ; en revanche, à 24 h, on n'en retrouve que 1 %. Dans la mesure où la curcumine possède des activités intéressantes pour les maladies neurodégénératives, sa distribution tissulaire cérébrale est également

médiocre. Une étude faite chez la souris montre une très faible quantité de curcumine, 0,4µg.g^{-1}, 1 heure après administration intra-péritonéale de 0,1 g.kg^{-1}.[179]

1.3. Métabolisme de la curcumine

Une fois absorbée, la curcumine va être très rapidement métabolisée, *via* des mécanismes de conjugaison, en glucuronoconjugué **21** et en sulfate **22** (Figure 85). Ces modifications sont appelées réactions de phase 2. Elles sont réalisées par des UDP-glucuronosyl transférases et des sulfonyl transférases dans le but de rendre la curcumine moins lipophile afin qu'elle soit éliminée plus rapidement. Le foie est l'organe principal dans lequel se déroulent ces réactions. Le fait d'être métabolisé rapidement au niveau du foie est une étape subie par certaines substances absorbées par voie orale. On dit que la curcumine subit un fort « effet de premier passage hépatique ».

De manière compétitive à la conjugaison et plus facilement pour une administration intraveineuse, la curcumine subit des réactions de phase 1 qui sont responsables de modifications structurales.[180] Les réactions de phase 1 sont réalisées pas les enzymes hépatiques microsomales, les réductases. On assiste alors à la formation de métabolites qui sont majoritairement des dérivés réduits de la curcumine : dihydrocurcumine **23**, tétrahydrocurcumine **24**, hexahydrocurcumine **25** et hexahydrocurcuminol **26**. Ces composés, une fois réduits, pourront également être métabolisés par les enzymes de phase 2 afin d'être éliminés rapidement. Etant donné que la structure singulière de la curcumine est essentielle à l'exercice de ses activités pharmacologiques, les métabolites réduits structurellement différents au niveau du pont inter-aromatique heptadiénique, sont peu, voire complètement, inactifs.

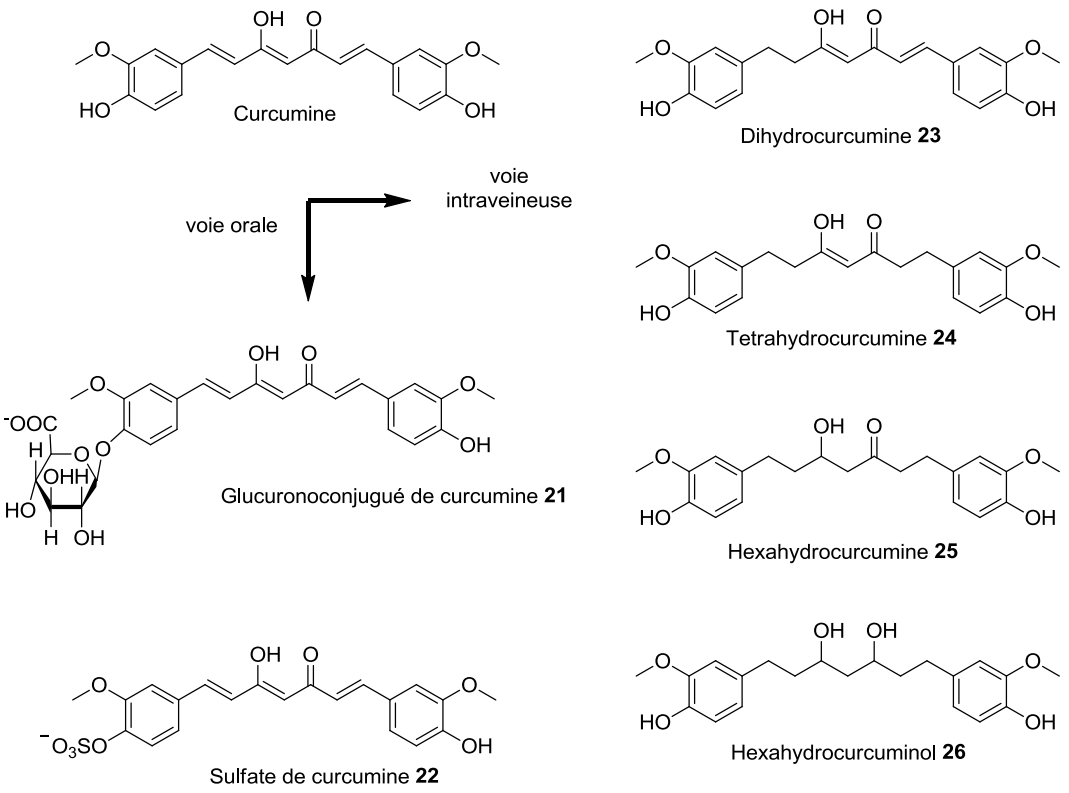


Figure 85 : Schéma simplifié du métabolisme prépondérant de la curcumine en fonction de la voie d'administration choisie (orale ou intraveineuse) avec les structures des principaux métabolites.[179]

1.4. Elimination et demi-vie[179]

L'élimination d'un composé est appréciée par le calcul de la demi-vie qui correspond au temps qu'il faut à l'organisme pour éliminer la moitié de la quantité de médicament parvenue jusqu'au compartiment plasmatique ou pour atteindre la moitié de la concentration maximale. La clairance détermine les paramètres pour évaluer la part de chaque organe dans cette élimination. Ainsi on peut déterminer la clairance hépatique, rénale et pulmonaire dont la somme est qualifiée de clairance totale.

Chez le rat, après une administration orale à la dose de 1 $g.kg^{-1}$, 75 % de curcumine sont retrouvés dans les fèces et quasiment rien n'est retrouvé dans les urines. Par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, après administration d'une dose de 400 mg, 40 % de curcumine sont retrouvés sous forme inchangée dans les fèces. La voie majeure d'élimination de curcumine radiomarquée est également biliaire mais elle n'est pas distinguable, par compteur de radioactivité, de ses conjugués. Nous n'avons de demi-vie d'élimination que dans les cas d'administration chez le rat qui est de 1,7 ± 0,5 h. Chez l'Homme, à la même dose que chez le rat, les taux de curcumine absorbée sont si faibles qu'ils n'ont pas produit de données exploitables pour le calcul des caractéristiques d'élimination de la curcumine.

La curcumine est donc un composé qui souffre d'une biodisponibilité non seulement médiocre mais difficile à déterminer. En effet les données de pharmacocinétique semblent assez complètes et exploitables chez le rat et la souris. En revanche, chez l'Homme cela est parfois impossible à apprécier. Pour résumer, malgré une absorption assez satisfaisante, la curcumine subit un fort effet de premier passage hépatique pour être métabolisée rapidement en dérivés conjugués ou réduits puis conjugués qui seront éliminés ou excrétés rapidement quels que soient le mode et la voie d'administration.

2. Amélioration de la biodisponibilité

Les essais de phase I évaluent la toxicité d'un produit. Ils ont démontré que la curcumine n'est pas toxique à des doses très élevées (jusqu'à 12 g par jour), mais sa biodisponibilité médiocre la rend inefficace même à ces doses. De ce fait, les essais cliniques évaluant la curcumine en l'état sont très peu nombreux. C'est donc en co-administration avec d'autres principes actifs ou en usant de stratégies de vectorisation galéniques qu'elle est le plus souvent testée. Ces stratégies sont décrites dans ce paragraphe.

2.1. Curcumine utilisée en co-administration avec la pipérine.

C'est le cas de la pipérine, composé naturel déjà évoqué dans le paragraphe 1.3.2.2 « Le curcuma en cuisine » par exemple. La pipérine est extraite de la plante *Piper nigrum* L. ou poivre noir. Elle est connue pour inhiber la glucuronoconjugaison hépatique et intestinale. Or nous avons décrit que cette transformation métabolique de phase 2 tient une grande part dans l'élimination de la curcumine.

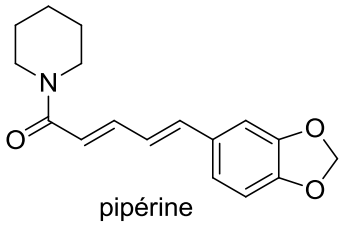


Figure 86 : Structure de la Pipérine.

En co-administrant la pipérine et la curcumine à des volontaires sains, en 1998, Shoba *et al.* ont évalué les paramètres pharmacocinétiques de la curcumine.[176] Il ressort qu'à la dose de 2 g de curcumine administrée par voie orale avec 20 mg de pipérine, la biodisponibilité de la curcumine fut augmentée de 2000 % au regard de la même dose de curcumine administrée seule. Il apparaît que cette co-administration augmente la distribution tissulaire cérébrale jusqu'à 48 % de plus dans le cerveau que dans le reste de l'organisme. C'est ce que Ryu *et al.* ont publié dans la revue Américaine *Journal of Medicinal Chemistry* en 2006.[181]

Cette association de composés naturels et leur influence sur le métabolisme est intrigante. On peut s'interroger sur l'utilisation de cette association, par ailleurs commerciale, peut avoir une conséquence pour la santé des patients soignés par chimiothérapie. L'équipe de Volak *et al.* ont analysé la pharmacocinétique du midazolam, du flurbiprofène et du paracétamol lorsqu'ils sont co-administrés avec l'association curcumine/pipérine. Il ressort que la pharmacocinétique de ces principes actifs n'est pas modifiée.

2.2. Curcumine utilisée avec d'autres dérivés naturels.

Depuis la découverte de l'effet de la pipérine sur la biodisponibilité de la curcumine, d'autres dérivés naturels ont été co-administrés. Dans le but d'apprécier un effet pharmacologique *in vivo* plus que d'étudier l'influence sur la pharmacocinétique de la curcumine.

La quercétine est un composé antioxydant puissant.[3] Cruz-Correa *et al.* ont co-administré la curcumine (480 mg) et la quercétine (20 mg) par voie orale trois fois par jour pendant 6 mois à 5 patients atteints de polypose adénopathique familiale.[182] La taille des polypes des 5 patients a été diminuée de 50,9 % et leur nombre de 60 %. Malheureusement, ils n'ont pas comparé les effets d'une éventuelle administration seule de chacun des principes actifs.

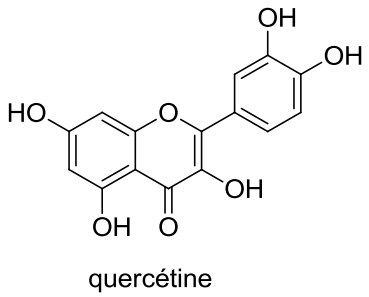


Figure 87 : Structure de la Quercétine.

La curcumine fait l'objet d'une étude en co-administration avec l'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG) en 2013.[183] Ce composé naturel est extrait du thé vert. Cette association a conduit à réduire significativement la prolifération *in vitro* de cellules de leiomyosarcome utérin par un rétablissement des voies apoptotiques, une inhibition des protéines kinase B (PKB), de la mammalian target of rapamycine (mTOR) et de la phosphorylation médiée par la kinase 6S.

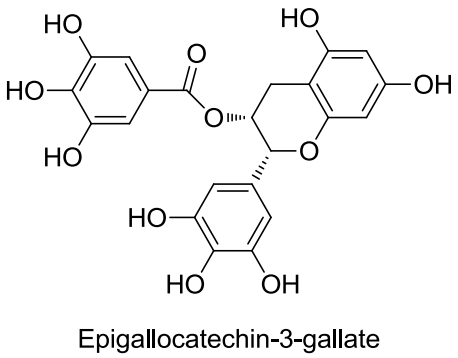


Figure 88 : Structure de l'Epigallocatéchin-3-gallate.

2.3. Procédés galéniques : utilisation de nanoliposomes

La formulation de nanoparticules est plus explorée ces dernières années. Ces formulations galéniques peuvent augmenter la biodisponibilité de la curcumine en modifiant certains de ses paramètres physico-chimiques ou en constituants des réservoirs de curcumine. On peut également incorporer des signaux d'adressage à ces formulations pour cibler l'endroit de diffusion du principe actif qu'elles contiennent, on parle alors de vectorisation. Ces procédés sont regroupés sous l'acronyme DDS pour *drug delivery system*.

Quelques caractéristiques sont communes à tous les DDS utilisables en thérapeutique ou en diagnostic. Les matériaux employés doivent être bioéliminables, non toxiques et non immunogènes. Leur diamètre doit être inférieur au micromètre pour éviter les embolies. Ils doivent pouvoir contenir le principe actif ou le produit de contraste. Ils doivent présenter une action protectrice vis-à-vis d'une dégradation chimique ou biochimique dans les milieux biologiques. Ils ne doivent pas modifier la nature du principe actif ou de produit de contraste. Pour le cas des nanovecteurs, ils doivent interagir de manière spécifique avec la cible biologique et ne libérer le principe actif que lorsque la cible est atteinte.

Parmi ces méthodes nous allons décrire celles employées pour améliorer la biodisponibilité de la curcumine. On retrouve les nanoliposomes, les micelles polymériques, les micelles hétérogènes, les nanocristaux, les micelles PEG-PE/vitamine E et les nanoémulsions.

Un liposome est une particule sphérique d'aspect vésiculaire dont l'enveloppe possède les mêmes caractéristiques qu'une membrane lipidique. Elle est faite de molécules amphiphiles et peut être constituée d'une ou plusieurs couches.

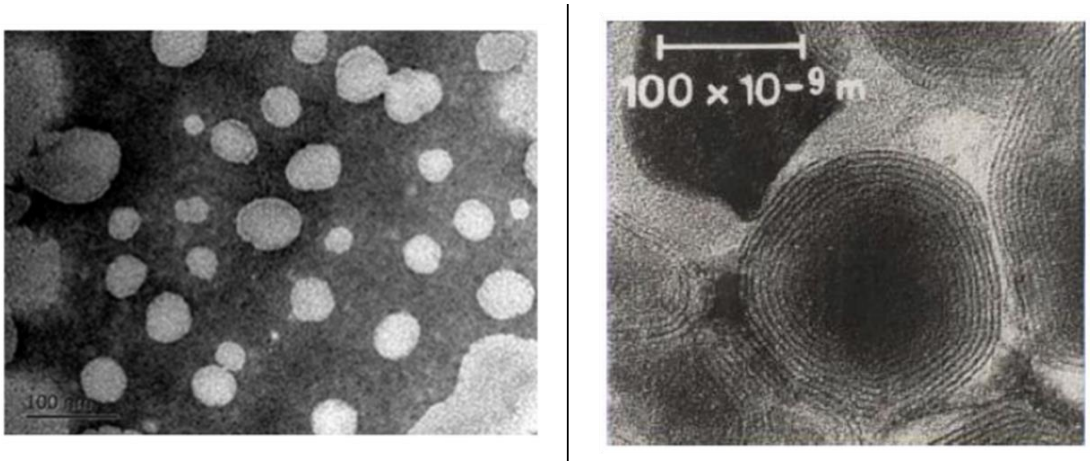


Figure 89 : Photographies en microscopie électronique à transmission de liposomes (gauche) où l'on peut apercevoir les multiples couches membranaires (droite).[184]

On trouve plusieurs exemples dans la littérature de ce type de DDS dans le but d'améliorer la biodisponibilité de la curcumine. Sood *et al.* publient en 2014 dans le journal *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* un système optimisé de nanoémulsions chargées en curcumine pour instillation nasale.[185] Le but de cette voie d'administration est de pouvoir transporter la curcumine au système nerveux central directement en traversant la muqueuse nasale. De ce fait, la curcumine ne passe que faiblement dans la circulation sanguine générale pour aller directement traverser la BHE vers le SNC. La voie intranasale est intéressante pour les principes actifs devant agir au niveau cérébral mais présente quelques difficultés. Les molécules testées comme la curcumine montrent une clairance mucocilliaire très rapide et une perméabilité nasale très faible. C'est ce qui a conduit Sood *et al.* à élaborer des nanoémulsions de curcumine.

Ils ont élaboré un système mucoadhésif qui permet de diminuer la clairance mucocilliaire. Ils augmentent ainsi le temps de contact et de diffusion de la curcumine. Les essais sont menés sur des muqueuses nasales de mouton, les nanoémulsions mucoadhésives de curcumine permettent une perméation plus importante que les nanoémulsions classiques, et la solution de curcumine simple.

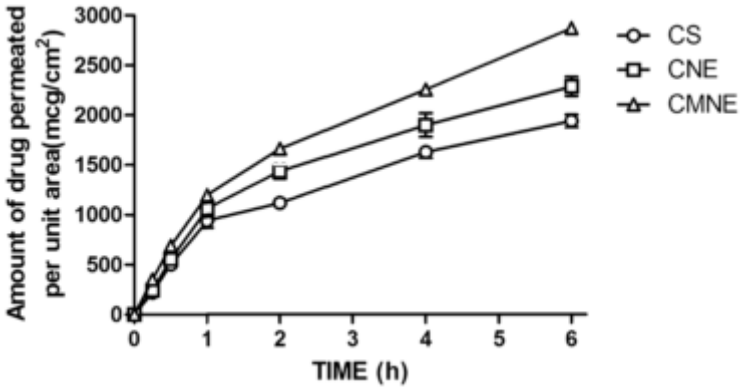


Figure 90 : Perméation de muqueuses nasales de mouton après instillation intranasale de solution de curucmine (CS), d'une nanoémulsion simple de curcumine (CNE) et d'une nanoémulsion mucoadhésive de curcumine (CMNE).[185]

Un deuxième exemple d'utilisation de curcumine encapsulée est intéressant à décrire, cette fois-ci pour une administration par voie orale. Une équipe Lyonnaise, en 2015, a utilisé des micelles de caséine dont la propriété mise en avant est la gélification en milieu acide. A la manière d'une formulation gastrorésistante, le but est de rendre la curcumine incorporée dans ces micelles hors d'atteinte du pH acide du suc gastrique pour qu'elle puisse être libérée dans le duodénum. Dans cette publication ils démontrent que ce type de formulation est compatible et reste stable avec la présence de polyphénols tels que la curcumine. Leurs investigations devraient maintenant aller vers l'étude de la diffusion de curcumine après cette gélification.[186]

Pour entrer dans le domaine de la vectorisation, Yu *et al.* publient en 2014 un moyen, basé sur le pH acide des environnement tumoraux de diffuser de la curcumine directement dans le cytoplasme

cellulaire. Ce phénomène est basé sur deux caractéristiques du copolymère méthoxy polyéthylène glycol)-poly(lactide)-poly(β-amino ester) ou MPEG-PLA-PAE (Figure 91).

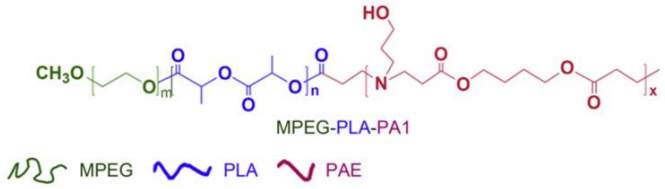


Figure 91 : Structure du copolymère MPEG-PLA-PA1. La partie MPEG est hydrophile et la partie PLA hydrophobe. Le PAE possède une capacité de protonation en milieu acide.[187]

Ce copolymère est constitué d'une partie MPEG-PLA qui a fait l'objet d'une évaluation clinique de phase 2 sous le nom de Genexol-PM® dans le cadre du cancer du sein.[188] C'est la partie amphiphile à l'origine de la formation du liposome. Le MPEG est doué de propriétés d'adressage car il créé des charges positives partielles à la surface de la micelle qui sont attirées par le potentiel électrique négatif de la surface membranaire des cellules.

La partie PAE constitue un élément « contractile » de la micelle. La partie PAE est hydrophobe lorsque sa fonction amine tertiaire est sous forme moléculaire à pH physiologique de la circulation sanguine (7,4) et protonée en milieu acide comme dans le cytoplasme d'une cellule tumorale. Cette protonation entraîne une contraction de la micelle car la partie PAE^+ rejoint le MPEG hydrophile à l'extérieur de la micelle. Celle-ci expulse alors la curcumine présente en son intérieur. Le schéma proposé par Yu *et al.* est présenté dans la Figure 92.

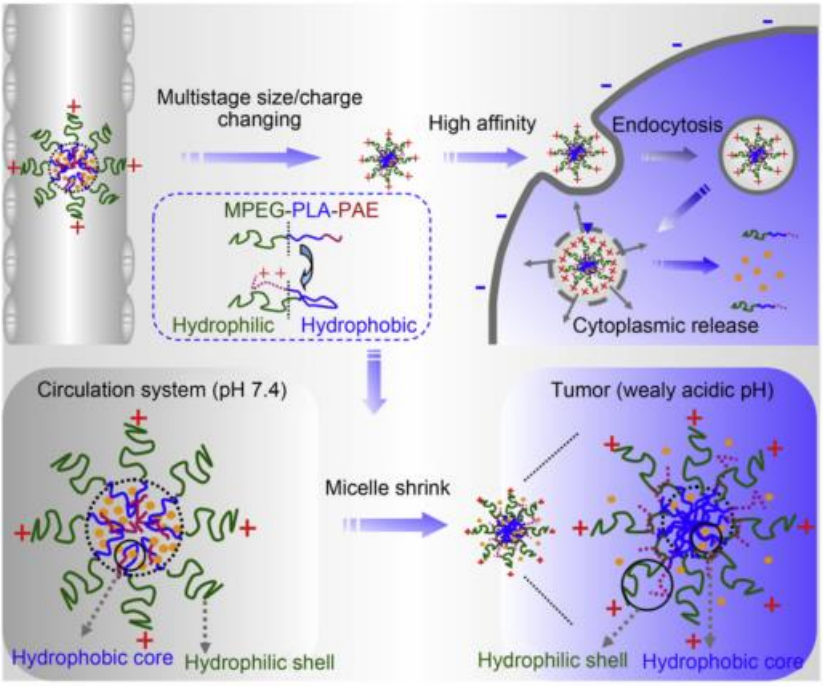


Figure 92 : Schéma explicatif de l'intérêt de la formulation MPEG-PLA-PAE. On observe la micelle formée par ces copolymères dans la circulation sanguine et dans une cellule.

Ils ont mis en œuvre une série de tests afin de valider leur hypothèse *in vitro* et *in vivo*. Après avoir validé la charge des micelles, ils ont tout d'abord mis en présence des cellules cancéreuses avec les copolymères MPEG/PLA et MPEG/PLA-PAE aux pH de 7,4 et 6,5. Comme indiqué dans la Figure 93, on constate qu'à un pH de 6,5 la coloration des cellules est plus intense lorsque les micelles sont constituées de PAE alors qu'avec le système MPEG-PLA seul, le pH ne modifie pas l'intensité de coloration.

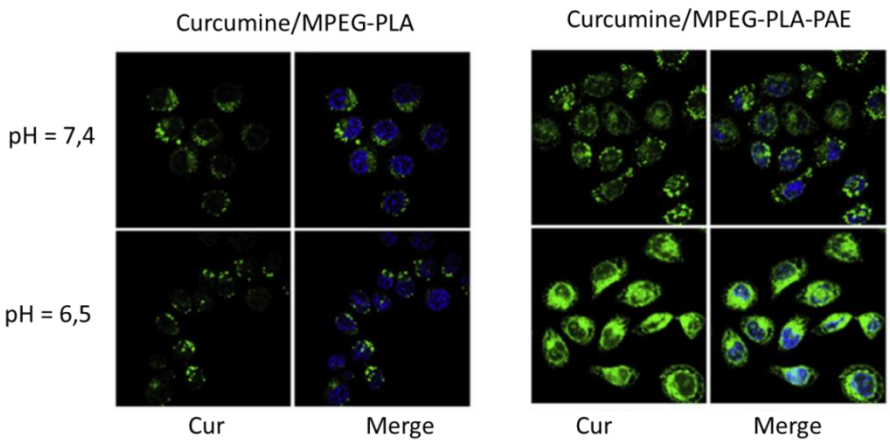


Figure 93 : Observation de cellules HT-29 incubées en présence de micelles chargées de curcumine + MPEG/PLA ou curcumine + MPEG/PLA/PAE aux pH de 7,4 (haut) et 6,5 (bas). La couleur jaune représente la fluorescence de la curcumine (gauche) et les couleurs bleue et jaune représentent la superposition de la fluorescence de la curcumine et la coloration de Hoechst (bleue).[187]

Pour valider le marquage différentiel des tissus tumoraux et sains *in vivo*, ils ont injecté à des souris portant une tumeur MCF-7 les deux formulations chargées avec un indicateur de fluorescence, le vert indocyanine (ICG). Ils ont observé une persistance de fluorescence de la tumeur portée par la souris à laquelle ils ont injecté la formulation ICG/MPEG-PLA-PAE jusqu'à 48 h (Figure 94).

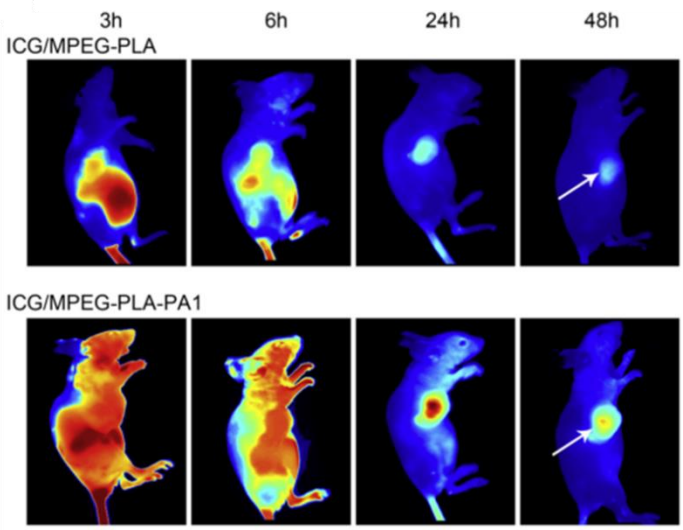


Figure 94 : Images de fluorescence donnée après une injection IV du vert indocyanine contenu dans les formulations MPEG/PLA (haut) et MPEG/PLA-PAE (bas) en fonction du temps. La flèche blanche indique l'emplacement de la tumeur.[187]

Nous avons abordé les études les plus récentes de l'utilisation de nanovecteurs développés pour augmenter la distribution cytoplasmique, le passage vers le SNC ou encore la résistance de la curcumine. Ces techniques de formulations galéniques sont applicables à d'autres composés.

D'autres formulations galéniques vectorisées ou non sont à l'étude et ont pour objet l'amélioration de la biodisponibilité de la curcumine. On peut citer des nanogels,[189] des implants destinés à la diffusion prolongée de curcumine,[190] ou des nanodisques utilisant l'apolipoprotéine E en tant qu'agent d'adressage.[191]

Conclusion

Ce travail bibliographique décrit l'histoire de la curcumine. L'exploration de ses capacités structurales et sa réactivité sont également traitées et mises en relations avec ses actions pléiotropes neuroprotectrices et antinéoplasiques. Ses vertus ont également été mises à profit dans d'autres domaines de la santé. La littérature décrit notamment une action sur le métabolisme lipidique et du glucose[192] et une activité antibactérienne en association avec l'EGCG.[193] Aggarwal *et al.* proposent une revue des activités de la curcumine déjà détaillées ou citées dans ce manuscrit avec aussi les activités contre des maladies respiratoires, auto-immunes et cardiovasculaires.[192]

Sa biodisponibilité médiocre explique qu'elle ne soit pas utilisée en clinique de nos jours mais encourage la recherche de solutions toujours plus innovantes pour la rendre efficace. La conception d'analogues de la curcumine est une manière parmi celles existantes de promouvoir ses effets neuroprotecteurs en améliorant sa biodisponibilité. C'est l'objet des travaux de thèse d'Université qui m'ont été confiés. Ils consistent en la conception d'analogues de la curcumine, reproduisant ses effets antioxydants, chélateurs de métaux et antiagrégants amyloïdes, mais en outre dépourvus de cytotoxicité et davantage biodisponibles. Le choix de la plateforme structurale devant permettre l'accès à ces nouveaux dérivés s'est porté sur le système phénylpyrrolizinone. Celui-ci a en effet déjà été synthétisé au sein du Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN).[194,195,196]

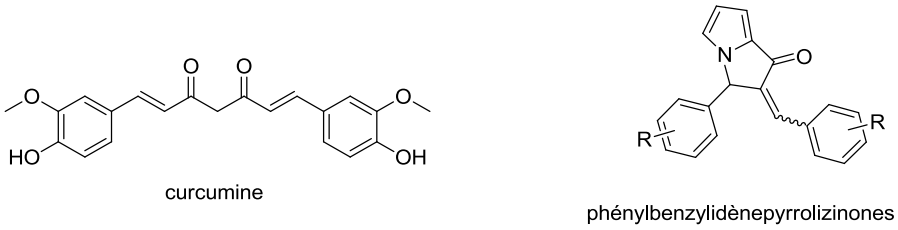


Figure 95 : Structure générale des phénylbenzylidènepyrrolizinones.

Les phénylbenzylidènepyrrolizinones ont été évaluées par la plateforme de screening et drugabilité du CERMN quant à leur activité d'inhibition directe de l'agrégation β-amyloïde, leurs propriétés antioxydantes, protectrices de membranes lipidiques, chélatantes d'ions métalliques divalents et leur drugabilité.

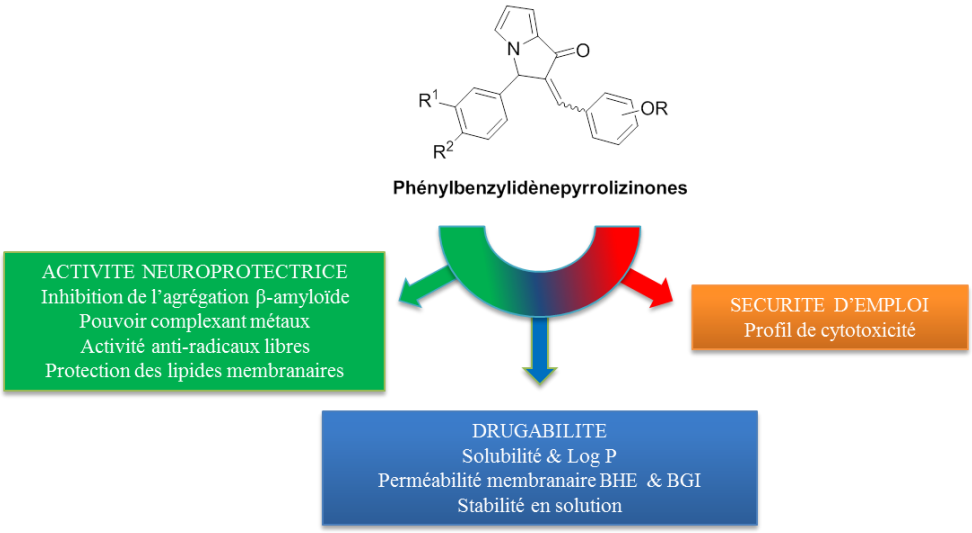


Figure 96 : Représentation des structures générales de la famille phénylbenzylidènepyrrolizinones et des évaluations biologiques effectuées sur ces composés.

Ces travaux ont permis l'accès à 22 nouveaux composés qui s'avèrent pour certains très intéressants vis-à-vis des propriétés évaluées et dont les profils d'utilisation sont compatibles avec d'éventuelles évaluations *in vitro*.

Le manuscrit de cette thèse d'Université sera disponible à la bibliothèque de l'Université de Caen Normandie à partir du 16 décembre 2015 date de la soutenance publique qui aura lieu à l'UFR de Sciences Pharmaceutiques de Caen.

Bibliographie

(1) Van der Veen, M.; Morales, J. The Roman and Islamic Spice Trade : New Archaeological Evidence. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, 1–10.

(2) Ravindran, P. N.; Babu Nirmal, K.; Sivaraman, K. *Turmeric: The Genus Curcuma*; CRC Press, 2007.

(3) Scartezzini, P.; Speroni, E. Review on Some Indian Traditional Medicine with Antioxidant Activity. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, *71* (1-2), 23–43.

(4) Major spice wise area and production-web.xls - Major spice wise area and productionsr.pdf http://www.indianspices.com/pdf/Major spice wise area and productionsr.pdf (accessed Apr 16, 2015).

(5) Blois, M. s. Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181* (4617), 1199–1200.

(6) Ching, W.-Y.; Bin-Yusoff, Y.; Wan-Amarina, W.-N. B. Extraction of Essential Oil from Curcuma Longa. *Journal of Food Chemistry and Nutrition* **2014**, *02* (01), 01–10.

(7) PHYTOSUN AROMS Huile Essentielle Curcuma - Pharmacie du Dr. Marche https://www.drmarche.com/essences/3103-phytosun-aroms-huile-essentielle-curcuma.html (accessed Jul 21, 2015).

(8) Huile essentielle de curcuma - Huile essentielle Digestive http://www.lca-aroma.com/les-epicees/36-huile-essentielle-de-curcuma-safran-des-indes.html (accessed Jul 21, 2015).

(9) Honda, S.; Aoki, F.; Tanaka, H.; Kishida, H.; Okada, S.; Matsumoto, I.; Abe, K.; Mae, T. Effects of Ingested Turmeric Oleoresin on Glucose and Lipid Metabolisms in Obese Diabetic Mice : A DNA Microarray Study Effects of Ingested Turmeric Oleoresin on Glucose and Lipid Metabolisms in Obese Diabetic Mice : A DNA Microarray Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 9055–9062.

(10) Xia, G.; Zhou, L.; Ma, J.; Wang, Y.; Ding, L.; Zhao, F.; Chen, L.; Qiu, F. Sesquiterpenes from the Essential Oil of Curcuma Wenyujin and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 143–148.

(11) Liju, V. B.; Jeena, K.; Kuttan, R. Chemopreventive Activity of Turmeric Essential Oil and Possible Mechanisms of Action. **2014**, *15*, 6575–6580.

(12) Zhou, Y.; Liu, H.; Jiang, N.; Feng, X.; Feng, X.; Zhang, H.; Wu, Z.; Liang, H.; Jiang, Q.; Chen, P. Elemene, the Essential Oil of Curcuma Wenyujin, Inhibits Osteogenic Differentiation in Ankylosing Spondylitis. *Joint Bone Spine* **2015**, *82* (2), 100–103.

(13) Das, N. G.; Dhiman, S.; Talukdar, P. K.; Rabha, B.; Goswami, D.; Veer, V. Synergistic

Mosquito-Repellent Activity of Curcuma Longa, Pogostemon Heyneanus and Zanthoxylum Limonella Essential Oils. *Journal of Infection and Public Health* **2015**, *8* (4), 323–328.

(14) Dhingra, O. D.; Jham, G. N.; Barcelos, R. C.; Mendonça, F. a.; Ghiviriga, I. Isolation and Identification of the Principal Fungitoxic Component of Turmeric Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research* **2007**, *19* (4), 387–391.

(15) Esatbeyoglu, T.; Huebbe, P.; Ernst, I. M. a; Chin, D.; Wagner, A. E.; Rimbach, G. Curcumin-from Molecule to Biological Function. *Angewandte Chemie - International Edition* **2012**, *51* (22), 5308–5332.

(16) Liju, V. B.; Jeena, K.; Kuttan, R. Acute and Subchronic Toxicity as Well as Mutagenic Evaluation of Essential Oil from Turmeric (Curcuma Longa L). *Food and Chemical Toxicology* **2013**, *53*, 52–61.

(17) Organization Food and Agriculture, of the U. N. *TURMERIC : Post-Harvest Operations*; 2004.

(18) Chronique de la douleur http://algoweb.blogspot.fr/ (accessed Jul 20, 2015).

(19) Suresh, D.; Manjunatha, H.; Srinivasan, K. Effect of Heat Processing of Spices on the Concentrations of Their Bioactive Principles : Turmeric (Curcuma Longa), Red Pepper (Capsicum Annuum) and Black Pepper (Piper Nigrum). *Journal of Food Composition Analysis* **2007**, *20*, 346–351.

(20) Lee, J. H.; Choung, M. G. Determination of Curcuminoid Colouring Principles in Commercial Foods by HPLC. *Food Chemistry* **2011**, *124* (3), 1217–1222.

(21) Scotter, M. J. Synthesis and Chemical Characterisation of Curcuminoid Colouring Principles for Their Potential Use as HPLC Standards for the Determination of Curcumin Colour in Foods. *LWT - Food Science and Technology* **2009**, *42* (8), 1345–1351.

(22) Péret-Almeida, L.; Cherubino, a. P. F.; Alves, R. J.; Dufossé, L.; Glória, M. B. a. Separation and Determination of the Physico-Chemical Characteristics of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* **2005**, *38* (8-9), 1039–1044.

(23) EFSA. Refined Exposure Assessment for Curcumin (E100). **2013**, *11* (10), 1–18.

(24) Yodkeeree, S.; Chaiwangyen, W.; Garbisa, S.; Limtrakul, P. Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin Differentially Inhibit Cancer Cell Invasion through the down-Regulation of MMPs and uPA. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2009**, *20* (2), 87–95.

(25) Gordon, O. N.; Luis, P. B.; Ashley, R. E.; Osheroff, N.; Schneider, C. Oxidative Transformation of Demethoxy- and Bisdemethoxycurcumin: Products, Mechanism of Formation, and Poisoning of Human Topoisomerase IIα. *Chemical Research in Toxicology* **2015**, *28* (5), 989–996.

(26) Teng, Y.-N.; Hsieh, Y.-W.; Hung, C.-C.; Lin, H.-Y. Demethoxycurcumin Modulates Human P-Glycoprotein Function via Uncompetitive Inhibition of ATPase Hydrolysis Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63* (3), 847–855.

(27) Jayaprakasha, G. K.; Jaganmohan Rao, L.; Sakariah, K. K. Antioxidant Activities of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry* **2006**, *98* (4), 720–724.

(28) Aruna, R.; Sathiyarajeswaran, P.; Gopakumar, K.; Ramaswamy, R. S. Cardioprotective Effects of Kitchen Culinaries Mentioned in Siddha Literature. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2014**, *3* (3), 71–79.

(29) UMA PRADEEP, K.; GEERVANI, P. Influence of Spices on Protein Utilisation of Winged Bean (Psophocarpus Tetragonolobus) and Horsegram (Dolichos Biflorus). *Plant Foods for Human Nutrition* **1994**, *46*, 187–193.

(30) Duke, J. A.; Bogenschutz-Godwin, M. J.; DuCellier, J.; Duke, P.-A. K. *CRC Handbook of Medicinal Spices*; 2002.

(31) Azuine, M. A.; BHIDE, S. V. Protective Single/combined Treatment with Betel Leaf and Turmeric against Methyl (acetoxymethyl) Nitrosamine-Induced Hamster Oral Carcinogenesis. **1992**, *51*, 412–415.

(32) Abou-Elkhair, R.; Ahmed, A. H.; Selim, S. Effects of Black Pepper (Piper Nigrum), Turmeric Powder (Curcuma Longa) and Coriander Seeds (Coriandrum Sativum) and Their Combinations as Feed Additives on Growth Performance , Carcass Traits , Some Blood Parameters and Humoral Immune Response of B. **2014**, *27* (6), 847–854.

(33) Srinivasan, K. Spices as Influencers of Body Metabolism : An Overview of Three Decades of Research. *Food Research International* **2005**, *38*, 77–86.

(34) Shetty, D.; Kim, Y.; Shim, H.; Snyder, J. Eliminating the Heart from the Curcumin Molecule: Monocarbonyl Curcumin Mimics (MACs). *Molecules* **2014**, *20* (1), 249–292.

(35) Vogel; Pelletier. Examen Chimique de La Racine de Curcuma. *Journal de Pharmacie et des Sciences Accessoires* **1815**, 289–300.

(36) Schraufstatter, E.; Bernt, H. Antibacterial Action of Curcumin and Related Compounds. *Nature* **1949**, *164*, 456–457.

(37) Revathy, S.; Elumalai, S.; Benny, M.; Antony, B. Isolation , Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (Curcuma Longa L .) by Column Chromatography. *Journal of Experimental Sciences* **2011**, *2* (7), 21–25.

(38) Gupta, A. P.; Gupta, M. M.; Kumar, S. Simultaneous Determination of Curcuminoids in

Curcuma Samples Using High Performance Thin Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* **1999**, *22* (10), 1561–1569.

(39) Wang, Y. J.; Pan, M. H.; Cheng, A. L.; Lin, L. I.; Ho, Y. S.; Hsieh, C. Y.; Lin, J. K. Stability of Curcumin in Buffer Solutions and Characterization of Its Degradation Products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1997**, *15* (12), 1867–1876.

(40) Roughley, P. J.; Whiting, D. A. Experiments in the Biosynthesis of Curcumin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 1* **1973**, 2379–2388.

(41) Schröder, J. A Family of Plant-Specific Polyketide Synthases: Facts and Predictions. *Trends in Plant Science* **1997**, *2* (10), 373–378.

(42) Kita, T.; Imai, S.; Sawada, H.; Kumagai, H.; Seto, H. The Biosynthetic Pathway of Curcuminoid in Turmeric (Curcuma Longa) as Revealed by 13C-Labeled Precursors. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2008**, *72* (7), 1789–1798.

(43) Katsuyama, Y.; Kita, T.; Funa, N.; Horinouchi, S. Curcuminoid Biosynthesis by Two Type III Polyketide Synthases in the Herb Curcuma Longa. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (17), 11160–11170.

(44) Milobedzka, J.; Kostanecki, S. v.; Lampe, V. Zur Kenntnis Des Curcumins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1910**, *43*, 2164–2168.

(45) Lampe, V. Synthese von Curcumin. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1918**, *51*, 1347–1355.

(46) Pabon, H. J. J. A Synthesis of Curcumin and Related Compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* **1964**, *83*, 379–386.

(47) Zhang, X.; Tian, Y.; Zhang, C.; Tian, X.; Ross, A. W.; Moir, R. D.; Sun, H.; Tanzi, R. E.; Moore, A.; Ran, C. Near-Infrared Fluorescence Molecular Imaging of Amyloid Beta Species and Monitoring Therapy in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (31), 9734–9739.

(48) Heger, M.; van Golen, R. F.; Broekgaarden, M.; Michel, M. C. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer. *Pharmacological Reviews* **2014**, *66* (1), 222–307.

(49) Kolev, T. M.; Velcheva, E. A.; Stamboliyska, B. A.; Spiteller, M. DFT and Experimental Studies of the Structure and Vibrational Spectra of Curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry* **2005**, *102*, 1069–1079.

(50) Balasubramanian, K. Molecular Orbital Basis for Yellow Curry Spice Curcumin ' S Prevention of Alzheimer ' S Disease. *Journal Agricultural Food Chemistry* **2006**, *54* (10), 3512–3520.

(51) Li, J.; Dai, C.; Sun, H.; Jin, L.; Guo, C.; Cao, W.; Wu, J.; Tian, H.; Luo, C.; Ye, W.; Jiang, R. Protective Effects and Mechanisms of Curcumin on Podophyllotoxin Toxicity in Vitro and in Vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2012**, *265* (2), 190–199.

(52) Bustanji, Y.; Taha, M. O.; Almasri, I. M.; Al-Ghussein, M. A. S.; Mohammad, M. K.; Alkhatib, H. S. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase by Curcumin: Investigation by Simulated Molecular Docking and Subsequent in Vitro/in Vivo Evaluation. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2009**, *24* (3), 771–778.

(53) Ngo, S. T.; Li, M. S. Curcumin Binds to Aβ 1−40 Peptides and Fibrils Stronger Than Ibuprofen and Naproxen. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *116*, 10165–10175.

(54) Ortica, F.; Rodgers, M. a. A Laser Flash Photolysis Study of Curcumin in Dioxane-Water Mixtures. *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *74* (6), 745–751.

(55) Borsari, M.; Ferrari, E.; Grandi, R.; Saladini, M. Curcuminoids as Potential New Iron-Chelating Agents : Spectroscopic , Polarographic and Potentiometric Study on Their Fe (III) Complexing Ability. *Inorganica Chimica acta* **2002**, *328*, 61–68.

(56) Thomson, A. J.; Gray, H. B. Bio-Inorganic Chemistry Editorial Overview. *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, *2*, 155–158.

(57) Dinkova-kostova, A. T.; Massiah, M. A.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. Potency of Michael Reaction Acceptors as Inducers of Enzymes That Protect against Carcinogenesis Depends on Their Reactivity with Sulfhydryl Groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *98* (6), 3404–3409.

(58) Fang, J.; Lu, J.; Holmgren, A. Thioredoxin Reductase Is Irreversibly Modified by Curcumin. *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280* (26), 25284–25290.

(59) Jankun, J.; Aleem, A. M.; Malgorzewicz, S.; Szkudlarek, M.; Zavodszky, M. I.; Dewitt, D. L.; Feig, M.; Selman, S. H. Synthetic Curcuminoids Modulate the Arachidonic Acid Metabolism of Human Platelet 12-Lipoxygenase and Reduce Sprout Formation of Human Endothelial Cells. *American Association for Cancer Research Journal* **2006**, *5* (May), 1371–1383.

(60) Tomren, M. a.; Másson, M.; Loftsson, T.; Tønnesen, H. H. Symmetric and Asymmetric Curcuminoids: Stability, Activity and Complexation with Cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *338* (1-2), 27–34.

(61) Patil, M.; Shivapraskash, B. V. Pharmacology and Clinical Use of Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review. *International Journal of Molecular Veterinary Research* **2013**, *3* (6), 23–33.

(62) Liu, Y.; Yang, Z.; Du, J.; Yao, X.; Lei, R. Interaction of Curcumin with Intravenous Immunoglobulin : A Fluorescence Quenching and Fourier Transformation Infrared Spectroscopy Study. *Immunobiology* **2008**, *213*, 651–661.

(63) Karewicz, A.; Bielska, D.; Gzyl-malcher, B.; Kepczynski, M.; Lach, R.; Nowakowska, M. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Interaction of Curcumin with Lipid Monolayers and Liposomal Bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *88* (1), 231–239.

(64) Hung, W.; Chen, F.; Lee, C.; Sun, Y.; Lee, M.; Huang, H. W. Membrane-Thinning Effect of Curcumin. *Biophysical Journal* **2008**, *94* (11), 4331–4338.

(65) Sun, Y.; Lee, C.; Hung, W.; Chen, F.; Lee, M.; Huang, H. W. The Bound States of Amphipathic Drugs in Lipid Bilayers : Study of Curcumin. *Biophysical Journal* **2008**, *95* (5), 2318–2324.

(66) Baell, J.; Walters, M. a. Chemical Con Artists Foil Drug Discovery. *Nature* **2014**, *513*, 481–483.

(67) Ingólfsson, H. I.; Thakur, P.; Herold, K. F.; Hobart, E. A.; Ramsey, N. B.; Periole, X.; de Jong, D. H.; Zwama, M.; Yilmaz, D.; Hall, K.; Maretzky, T.; Hemmings, H. C.; Blobel, C.; Marrink, S. J.; Koçer, A.; Sack, J. T.; Andersen, O. S. Phytochemicals Perturb Membranes and Promiscuously Alter Protein Function. *ACS Chemical Biology* **2014**, *9* (8), 1788–1798.

(68) Subramanian, M.; Sreejayan; Rao, M. N. A.; Devasagayam, T. P. A.; Singh, B. B. Diminution of Singlet Oxygen-Induced DNA Damage by Curcumin and Related Antioxidants. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1994**, *311*, 249–255.

(69) Gordon, O. N.; Luis, P. B.; Sintim, H. O.; Schneider, C. Unraveling Curcumin Degradation. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (8), 4817–4828.

(70) Khurana, A.; Ho, C. T. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Curcuminoids and Their Photo-Oxidative Decomposition Compounds in Curcuma Longa L. *Journal of Liquid Chromatography* **1988**, *11* (11), 2295–2304.

(71) Tonnesen, H. H.; Karlsen, J.; Beijersbergen van Henegouwen, G. Photochemical Stability of Curcumin. In *Studies on curcumin and curcuminoids*; 1986; pp 116–122.

(72) Priyadarsini, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* **2014**, *19* (12), 20091–20112.

(73) Chignell, C. F.; Bilski, P.; Reszka, K. J.; Motten, A. G.; Sik, R. H.; Dahl, T. A. Spectral and Photochemical Propoerties of Curcumin. *Photochemistry and Photobiology* **1994**, *59* (3), 295–302.

(74) Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC, H. C. Phase I Clinical Trial of Curcumin, a Chemopreventive Agent, in Patients with High-Risk or Pre-Malignant Lesions. *Anticancer research* **2001**, *21*, 2895–2900.

(75) Irving, G. R. B.; Howells, L. M.; Sale, S.; Kralj-hans, I.; Atkin, W. S.; Clark, S. K.; Britton, R.

G.; Jones, D. J. L.; Scott, E. N.; Berry, D. P.; Hemingway, D.; Miller, A. S.; Brown, K.; Gescher, A. J.; Steward, W. P. Prolonged Biologically Active Colonic Tissue Levels of Curcumin Achieved After Oral Administration — A Clinical Pilot Study Including Assessment of Patient Acceptability. *Cancer Prevention Research* **2013**, *6* (2), 119–129.

(76) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.

(77) Hanahan, D.; Weinberg, R. A.; Francisco, S. The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. *Cell* **2000**, *100*, 57–70.

(78) Hannon, G. J.; Beach, D. P15INK4B Is a Potentiel Effector of TGF-Beta-Induced Cell Cycle Arrest. *Nature* **1994**, *371*, 267–261.

(79) Artandi, S. E.; Depinho, R. A. Telomeres and Telomerase in Cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (1), 9–18.

(80) Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. Review Immunity , Inflammation , and Cancer. *Cell* **2010**, *140* (6), 883–899.

(81) Cotter, T. G. Apoptosis and Cancer : The Genesis of Research Field. *Nature Reviews Cancer* **2009**, *9*, 501–507.

(82) Murdoch, C.; Muthana, M.; Coffet, S. B.; Lewis, C. E. The Role of Myeloid Cells in the Promotion of Tumour Angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 618–631.

(83) Nürnberg, A.; Kitzing, T.; Grosse, R. Nucleating Actin for Invasion. *Nature Reviews Cancer* **2011**, *11*, 177–187.

(84) Olayioye, M. a; Neve, R. M.; Lane, H. a; Hynes, N. E. The ErbB Signaling Network: Receptor Heterodimerization in Development and Cancer. *The EMBO journal* **2000**, *19* (13), 3159–3167.

(85) Jung, Y.; Xu, W.; Kim, H.; Ha, N.; Neckers, L. Curcumin-Induced Degradation of ErbB2 : A Role for the E3 Ubiquitin Ligase CHIP and the Michael Reaction Acceptor Activity of Curcumin. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1773*, 383–390.

(86) Bharat B. Aggarwal *; Banerjee, S.; Bhardwaj, U.; Sung, B.; Shishodia, S.; Sethi, G. Curcumin Induces the Degradation of Cyclin E Expression through Ubiquitin-Dependent Pathway and up-Regulates Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p27 Multiple Human Tumor Cell Lines. *Biochemical Pharmacology* **2007**, *73*, 1024–1032.

(87) Lee, J. H.; Chung, I. K. Curcumin Inhibits Nuclear Localization of Telomerase by Dissociating the Hsp90 Co-Chaperone p23 from hTERT. *Cancer Letters* **2010**, *290* (1), 76–86.

(88) Manning, B. D.; Cantley, L. C. Review AKT / PKB Signaling : Navigating Downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261–1274.

(89) Nagai, S.; Kurimoto, M.; Washiyama, K.; Hirashima, Y.; Kumanishi, T. Inhibition of Cellular Proliferation and Induction of Apoptosis by Curcumin in Human Malignant Astrocytoma Cell Lines. **2005**, 105–111.

(90) Grinner, E. . M.; Kazanietz, M. G. Protein Kinase C and Other Dialcylglycerol Effectors in Cancer. *Nature Reviews Cancer* **2007**, *7*, 281–294.

(91) Majhi, A.; Rahman, G. M.; Panchal, S.; Das, J. Binding of Curcumin and Its Long Chain Derivatives to the Activator Binding Domain of Novel Protein Kinase C. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **2011**, *18* (4), 1591–1598.

(92) Scott, D. W.; Loo, G. Curcumin-Induced GADD153 Gene up-Regulation in Human Colon Cancer Cells. *Carcinogenesis* **2004**, *25* (11), 2155–2164.

(93) Woo, M.; Jung, S.; Kim, S.; Hyun, J.; Ko, K.-H.; Kim, W.-K.; Kim, H.-S. Curcumin Suppresses Phorbol Ester-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression by Inhibiting the PKC to MAPK Signaling Pathways in Human Astroglioma Cells. *Biochemical and Biophysical Resarch Communications* **2005**, *335*, 1017–1025.

(94) Grivennikov, S. I.; Karin, M. Inflammation and Oncogenesis : A Vicious Connection. **2010**, 65–71.

(95) Maldonado-Rojas, W.; Olivero-Verbel, J. Potential Interaction of Natural Dietary Bioactive Compounds with COX-2. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2011**, *30*, 157–166.

(96) Kerr, D. J.; Dunn, J. A.; Langman, M. J.; Smith, J. L.; Midgley, R. S. J.; Stanley, A.; Stokes, J. C.; Julier, P.; Iveson, C.; Duvvuri, R.; Mcconkey, C. C. Rofecoxib and Cardiovascular Adverse Events in Adjuvant Treatment of Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medecine* **2007**, *357*, 360–369.

(97) Hong, J.; Bose, M.; Ju, J.; Ryu, J.; Chen, X.; Sang, S.; Lee, M.; Yang, C. S. Modulation of Arachidonic Acid Metabolism by Curcumin and Related B -Diketone Derivatives : Effects on Cytosolic Phospholipase A 2 , Cyclooxygenases and. *Carcinogenesis* **2004**, *25* (9), 1671–1679.

(98) Hernández, B. G. L.; Volpert, O. V; Íñiguez, M. A.; Lorenzo, E.; Martínez-martínez, S.; Grau, R.; Fresno, M.; Redondo, J. M. Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor – Mediated Angiogenesis by Cyclosporin A : Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2. *Journal of Experimental Medecine* **2001**, *193* (5), 607–620.

(99) Bartik, L.; Whitfield, G. K.; Kaczmarska, M.; Lowmiller, C. L.; Moffet, W.; Furmick, J. K.; Hernandez, Z.; Haussler, C. A.; Mark, R.; Jurutka, P. W. Curcumin : A Novel Nutritionally-Derived Ligand of the Vitamin D Receptor with Implications for Colon Cancer Chemoprevention. *Journal of Nutrition Biochemistry* **2011**, *21* (12), 1153–1161.

(100) Koonammackal, M. V.; Nellipparambil, U. V. N.; Sudarsanakumar, C. Molecular Dynamics Simulations and Binding Free Energy Analysis of DNA Minor Groove Complexes of Curcumin. *Journal of Molecular Modeling* **2011**, *17* (11), 2805–2816.

(101) Reuter, S.; Gupta, S. C.; Park, B.; Goel, A.; Aggarwal, B. B. Epigenetic Changes Induced by Curcumin and Other Natural Compounds. **2011**, 93–108.

(102) Stelzma, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murllagh, F. R. An English Translation of Alzheimer ' S 1907 Paper , " über Eine Eigenartige Erlranliung Der Hirnrinde ." *Clinical Anatomy* **1995**, *8*, 429–431.

(103) Muller, M.; Sigurdsson, S.; Kjartansson, O.; Jonsson, P. V.; Garcia, M.; von Bonsdorff, M. B.; Gunnarsdottir, I.; Thorsdottir, I.; Harris, T. B.; van Buchem, M.; Gudnason, V.; Launer, L. J. Birth Size and Brain Function 75 Years Later. *Pediatrics* **2014**, *134* (4), 761–770.

(104) Prince, M.; Albanese, E.; Guerchet, M.; Prina, M. *World Alzheimer Report 2014*; 2014.

(105) INSERM. Maladie d'Alzheimer : Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux. http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/113/Sommaire.html (accessed Oct 10, 2015).

(106) Ministère des Affaires Sociales de la Santé et des Droits des Femmes. *Plan Maladies Neurodégénératives 2014-2019*; 2014.

(107) Guelfi, J. D.; Crocq, M.-A. *DSM-IV-TR Manuel Diagnostique et Statistique Des Troubles Mentaux*; 2005.

(108) Folstein, M. F.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. "MINI-MENTAL STATE" A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician. *Journal of Psychiatric Research* **1975**, *12*, 189–198.

(109) Derouesné, C.; Poitreneau, J.; Hugonot, L.; Kalafat, M.; Dubois, B.; Laurent, B. Le Mini-Mental State Examination (MMSE) : Un Outil Pratique Pour L'évaluation de L'état Cognitif Des Patients Par Le Clinicien. *La Presse Médicale* **1999**, *28* (21), 1141–1148.

(110) Barage, S. H.; Sonawane, K. D. Amyloid Cascade Hypothesis: Pathogenesis and Therapeutic Strategies in Alzheimer's Disease. *Neuropeptides* **2015**, http://dx.doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008.

(111) Vital Durand, D.; Le Jeune, C. *DOROSZ*; 2010.

(112) Jönhagen, M. E.; Nordberg, A.; Amberla, K.; Bäckman, L.; Ebendal, T.; Meyerson, B.; Olson, L.; Seiger, Å.; Shigeta, M.; Theodorsson, E.; Viitanen, M.; Winblad, B.; Wahlund, L. O. Intracerebroventricular Infusion of Nerve Growth Factor in Three Patients with Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **1998**, *9* (5), 246–257.

(113) Masters, C. L.; Simms, G.; Weinman, N. a; Multhaup, G.; McDonald, B. L.; Beyreuther, K. Amyloid Plaque Core Protein in Alzheimer Disease and Down Syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, *82* (12), 4245–4249.

(114) Rijal Upadhaya, A.; Kosterin, I.; Kumar, S.; Von Arnim, C. a F.; Yamaguchi, H.; Fändrich, M.; Walter, J.; Thal, D. R. Biochemical Stages of Amyloid-β Peptide Aggregation and Accumulation in the Human Brain and Their Association with Symptomatic and Pathologically Preclinical Alzheimer's Disease. *Brain* **2014**, *137* (3), 887–903.

(115) Garai, K.; Frieden, C. Quantitative Analysis of the Time Course of Aβ Oligomerization and Subsequent Growth Steps Using Tetramethylrhodamine-Labeled Aβ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (9), 3321–3326.

(116) Hendriks, L.; Van Broeckhoven, C. The PA4 Amyloid Precursor Protein Gene and Alzheimer ' S Disease. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *237*, 6–15.

(117) Turner, P. R.; O'Connor, K.; Tate, W. P.; Abraham, W. C. *Roles of Amyloid Precursor Protein and Its Fragments in Regulating Neural Activity, Plasticity and Memory*; 2003; Vol. 70.

(118) Willem, M.; Tahirovic, S.; Busche, M. A.; Ovsepian, S. V.; Chafai, M.; Kootar, S.; Hornburg, D.; Evans, L. D. B.; Moore, S.; Daria, A.; Hampel, H.; Müller, V.; Giudici, C.; Nuscher, B.; Wenninger-Weinzierl, A.; Kremmer, E.; Heneka, M. T.; Thal, D. R.; Giedraitis, V.; Lannfelt, L.; Müller, U.; Livesey, F. J.; Meissner, F.; Herms, J.; Konnerth, A.; Marie, H.; Haass, C. η-Secretase Processing of APP Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus. *Nature* **2015**, *526*, 443–447.

(119) Gandy, S. The Role of Cerebral Amyloid Beta Accumulation in Common Forms of Alzheimer Disease. *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, *115* (5), 1121–1129.

(120) Xu, Y.; Shen, J.; Luo, X.; Zhu, W.; Chen, K.; Ma, J.; Jiang, H. Conformational Transition of Amyloid Beta-Peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (15), 5403–5407.

(121) Yang, M.; Teplow, D. B. Amyloid ??-Protein Monomer Folding: Free-Energy Surfaces Reveal Alloform-Specific Differences. *Journal of Molecular Biology* **2008**, *384* (2), 450–464.

(122) Ball, K. A.; Phillips, A. H.; Wemmer, D. E.; Head-Gordon, T. Differences in β-Strand Populations of Monomeric Aβ40 and Aβ42. *Biophysical Journal* **2013**, *104* (12), 2714–2724.

(123) Hardy, J.; Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *297* (5580), 353–356.

(124) Carulla, N.; Zhou, M.; Giralt, E.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M. Structure and Intermolecular Dynamics of Aggregates Populated during Amyloid Fibril Formation Studied by Hydrogen/deuterium Exchange. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (8), 1072–1079.

(125) Tjernberg, L. O.; Näslund, J.; Lindqvist, F.; Johansson, J.; Karlström, a R.; Thyberg, J.; Terenius, L.; Nordstedt, C. Arrest of Beta-Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (15), 8545–8548.

(126) Cheng, P.-N.; Liu, C.; Zhao, M.; Eisenberg, D.; Nowick, J. S. Amyloid β-Sheet Mimics That Antagonize Protein Aggregation and Reduce Amyloid Toxicity. *Nature Chemistry* **2012**, *4* (11), 927–933.

(127) Geng, J.; Zhao, C.; Ren, J.; Qu, X. Alzheimer's Disease Amyloid Beta Converting Left-Handed Z-DNA back to Right-Handed B-Form. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **2010**, *46* (38), 7187–7189.

(128) Urbanc, B.; Betnel, M.; Cruz, L.; Bltan, G.; Teplow, D. B. Elucidation of Amyloid β-Protein Oligomerization Mechanisms: Discrete Molecular Dynamics Study. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (12), 4266–4280.

(129) Cizas, P.; Budvytyte, R.; Morkuniene, R.; Moldovan, R.; Broccio, M.; Lösche, M.; Niaura, G.; Valincius, G.; Borutaite, V. Size-Dependent Neurotoxicity of β-Amyloid Oligomers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2010**, *496* (2), 84–92.

(130) Rosini, M.; Simoni, E.; Milelli, a; Minarini, a; Melchiorre, C. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Are We Connecting the Dots? *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (7), 2821–2831.

(131) Butterfield, D. A.; Reed, T.; Newman, S. F.; Sultana, R. Roles of Amyloid β-Peptide-Associated Oxidative Stress and Brain Protein Modifications in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Free Radical Biology and Medicine* **2007**, *43* (5), 658–677.

(132) Butterfield, D. A.; Galvan, V.; Lange, M. B.; Tang, H.; Sowell, R. a.; Spilman, P.; Fombonne, J.; Gorostiza, O.; Zhang, J.; Sultana, R.; Bredesen, D. E. In Vivo Oxidative Stress in Brain of Alzheimer Disease Transgenic Mice: Requirement for Methionine 35 in Amyloid β-Peptide of APP. *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *48* (1), 136–144.

(133) Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis). *Chemical Reviews* **2006**, *106* (6), 1995–2044.

(134) Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I. Alzheimer Neurofibrillary Degeneration: Significance, Etiopathogenesis, Therapeutics and Prevention: Alzheimer Review Series. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2008**, *12* (1), 38–55.

(135) Shammas, S. L.; Garcia, G. A.; Kumar, S.; Kjaergaard, M.; Horrocks, M. H.; Shivji, N.; Mandelkow, E.; Knowles, T. P. J.; Mandelkow, E.; Klenerman, D. A Mechanistic Model of Tau Amyloid Aggregation Based on Direct Observation of Oligomers. *Nature Communications* **2015**, *6*, 1–10.

(136) Kadavath, H.; Hofele, R. V.; Biernat, J.; Kumar, S.; Tepper, K.; Urlaub, H.; Mandelkow, E.; Zweckstetter, M. Tau Stabilizes Microtubules by Binding at the Interface between Tubulin Heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, doi : 10.1073/pnas.1504081112.

(137) Kolarova, M.; Garc, F.; Bartos, A.; Ricny, J.; Ripova, D.; Gene, T. T. Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* **2012**, 1–13.

(138) Bergen, M. Von; Friedhoff, P.; Biernat, J.; Heberle, J.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E. Assembly of Tau Protein into Alzheimer Paired Helical Filaments Depends on a Local Sequence Motif (306 VQIVYK 311) Forming β Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (10), 5129–5134.

(139) Reddy, P. H. Abnormal Tau, Mitochondrial Dysfunction, Impaired Axonal Transport of Mitochondria, and Synaptic Deprivation in Alzheimer's Disease. *Brain Research* **2011**, *1415*, 136–148.

(140) Morales, I.; Guzmán-Martínez, L.; Cerda-Troncoso, C.; Farías, G. a; Maccioni, R. B. Neuroinflammation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. A Rational Framework for the Search of Novel Therapeutic Approaches. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2014**, *8* (112), 1–9.

(141) Frank-Cannon, T. C.; Alto, L. T.; McAlpine, F. E.; Tansey, M. G. Does Neuroinflammation Fan the Flame in Neurodegenerative Diseases? *Molecular Neurodegeneration* **2009**, *4* (47), 1–13.

(142) Lee, W.-H.; Loo, C.-Y.; Bebawy, M.; Luk, F.; Mason, R. S.; Rohanizadeh, R. Curcumin and Its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11* (4), 338–378.

(143) Kotler, S. a; Walsh, P.; Brender, J. R.; Ramamoorthy, A. Differences between Amyloid-β Aggregation in Solution and on the Membrane: Insights into Elucidation of the Mechanistic Details of Alzheimer's Disease. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 8–10.

(144) Zhao, L. N.; Long, H.; Mu, Y.; Chew, L. Y. The Toxicity of Amyloid β Oligomers. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13* (6), 7303–7327.

(145) Butterfield, S. M.; Lashuel, H. a. Amyloidogenic Protein-Membrane Interactions: Mechanistic Insight from Model Systems. *Angewandte Chemie - International Edition* **2010**, *49* (33), 5628–5654.

(146) Jang, H.; Zheng, J.; Lal, R.; Nussinov, R. New Structures Help the Modeling of Toxic Amyloid?? Ion Channels. *Trends in Biochemical Sciences* **2008**, *33* (2), 91–100.

(147) Williams, T. L.; Serpell, L. C. Membrane and Surface Interactions of Alzheimer's Aβ Peptide - Insights into the Mechanism of Cytotoxicity. *FEBS Journal* **2011**, *278* (20), 3905–3917.

(148) Zhao, J.; Fu, Y.; Liu, C.-C.; Shinohara, M.; Nielsen, H. M.; Dong, Q.; Kanekiyo, T.; Bu, G. Retinoic Acid Isomers Facilitate Apolipoprotein E Production and Lipidation in Astrocytes through the Retinoid X Receptor/Retinoic Acid Receptor Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289* (16), 11282–11292.

(149) O'Hare, E.; Jeggo, R.; Kim, E.-M.; Barbour, B.; Walczak, J.-S.; Palmer, P.; Lyons, T.; Page, D.; Hanna, D.; Meara, J. R.; Spanswick, D.; Guo, J.-P.; McGeer, E. G.; McGeer, P. L.; Hobson, P. Lack of Support for Bexarotene as a Treatment for Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology* **2016**, *100*, 124–130.

(150) Boehm-Cagan, a.; Michaelson, D. M. Reversal of apoE4-Driven Brain Pathology and Behavioral Deficits by Bexarotene. *Journal of Neuroscience* **2014**, *34* (21), 7293–7301.

(151) Ma, Q.-L.; Yang, F.; Rosario, E. R.; Ubeda, O. J.; Beech, W.; Gant, D. J.; Chen, P. P.; Hudspeth, B.; Chen, C.; Zhao, Y.; Vinters, H. V; Frautschy, S. a; Cole, G. M. Beta-Amyloid Oligomers Induce Phosphorylation of Tau and Inactivation of Insulin Receptor Substrate via c-Jun N-Terminal Kinase Signaling: Suppression by Omega-3 Fatty Acids and Curcumin. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience* **2009**, *29* (28), 9078–9089.

(152) Texidó, L.; Martín-Satué, M.; Alberdi, E.; Solsona, C.; Matute, C. Amyloid β Peptide Oligomers Directly Activate NMDA Receptors. *Cell Calcium* **2011**, *49* (3), 184–190.

(153) Nygaard, H. B.; Strittmatter, S. M. Cellular Prion Protein Mediates the Toxicity of Beta-Amyloid Oligomers: Implications for Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* **2009**, *66* (11), 1325–1328.

(154) Bush, A. I.; Masters, C. L.; Tanzi, R. E. Copper, β-Amyloid, and Alzheimer's Disease: Tapping a Sensitive Connection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100* (20), 11193–11194.

(155) Sayre, L. M.; Perry, G.; Harris, P. L. R.; Liu, Y.; Schubert, K. a; Smith, M. a. In Situ Oxidative Catalysis by Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in Alzheimer ' S Disease : A Central Role for Bound Transition Metals. *Journal of Neurochemistry* **2000**, *74* (1), 270–279.

(156) Ganguli, M.; Chandra, V.; Kamboh, I.; Johnston, J. M.; Dodge, H. H.; Thelma, B. K.; Juyal, R.; Pandav, R.; Belle, S. H.; DeKosky, S. Apolipotrotein E Polymorphism Ansd Alzheimer Disease. *Archives of neurology* **2000**, 824–830.

(157) Ono, K.; Hasegawa, K.; Naiki, H.; Yamada, M. Curcumin Has Potent Anti-Amyloidogenic Effects for Alzheimer's ??-Amyloid Fibrils In Vitro. *Journal of Neuroscience Research* **2004**, *75* (6), 742–750.

(158) Rao, P. P. N.; Mohamed, T.; Teckwani, K.; Tin, G. Curcumin Binding to Beta Amyloid: A Computational Study. *Chemical Biology & Drug Design* **2015**, doi: 10.1111/cbdd.12552.

(159) Reinke, A. a.; Gestwicki, J. E. Structure-Activity Relationships of Amyloid Beta-Aggregation

Inhibitors Based on Curcumin: Influence of Linker Length and Flexibility. *Chemical Biology and Drug Design* **2007**, *70* (3), 206–215.

(160) LeVine, H. Thioflavine T Interaction with Synthetic Alzheimer's Disease Beta-Amyloid Peptides: Detection of Amyloid Aggregation in Solution. *Protein science : a publication of the Protein Society* **1993**, *2* (3), 404–410.

(161) Biancalana, M.; Koide, S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2010**, *1804* (7), 1405–1412.

(162) Wolfe, L. S.; Calabrese, M. F.; Nath, A.; Blaho, D. V; Miranker, A. D.; Xiong, Y. Protein-Induced Photophysical Changes to the Amyloid Indicator Dye Thioflavin T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (39), 16863–16868.

(163) Krebs, M. R. H.; Bromley, E. H. C.; Donald, a. M. The Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils: Localisation and Implications. *Journal of Structural Biology* **2005**, *149* (1), 30–37.

(164) Murata, K.; Matsumura, S.; Yoshioka, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, H. Screening of β-Secretase and Acetylcholinesterase Inhibitors from Plant Resources. *Journal of Natural Medicines* **2014**, *69* (1), 123–129.

(165) Yoshiari, S.; Takishi, K.; Akinori, A.; Tetsuhiro, N.; Hachiro, S. Epigallocatechin-3-Gallate and Curcumin Suppress Amyloid Beta-Induced Beta-Site APP Cleaving Enzyme-1 Upregulation. *NeuroReport* **2008**, *19* (13), 1329–1333.

(166) Hamaguchi, T.; Ono, K.; Yamada, M. Curcumin and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics* **2010**, *16* (5), 285–297.

(167) Landau, M.; Sawaya, M. R.; Faull, K. F.; Laganowsky, A.; Jiang, L.; Sievers, S. a.; Liu, J.; Barrio, J. R.; Eisenberg, D. Towards a Pharmacophore for Amyloid. *PLoS Biology* **2011**, *9* (6), 25–27.

(168) Berhanu, W.; Masunov, A. Atomistic Mechanism of Polyphenol Amyloid Aggregation Inhibitors: Molecular Dynamics Study of Curcumin, Exifone and Myricetin Interaction with the Segment of Tau Peptide For Peer Revie. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2014**.

(169) Bergen, M. Von; Friedhoff, P.; Schneider, A.; Kampera, T.; Biernat, J.; Mandelkow, E. M.; Mandelkow, E. Rapid Assembly of Microtubule-Associated Protein Tau into Alzheimer-like Paired Helical Filaments Monitored by Fluorescence in Solution. *Biochemistry* **1998**, *37* (28), 10223–10230.

(170) Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Boone, C. W.; Simic, M. G. H-Atom Transfer Is a Preferred Antioxidant Mechanism of Curcumin. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (41), 9677–9681.

(171) Ak, T.; Gülçin, I. Antioxidant and Radical Scavenging Properties of Curcumin. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *174* (1), 27–37.

(172) Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* **1971**, *44* (1), 276–287.

(173) Dinis, T. C. P.; Madeira, V. M. C.; Almeida, L. M. Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate)as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **994**, *315* (1), 161–169.

(174) Craddock, T. J. a; Tuszynski, J. a.; Chopra, D.; Casey, N.; Goldstein, L. E.; Hameroff, S. R.; Tanzi, R. E. The Zinc Dyshomeostasis Hypothesis of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* **2012**, *7* (3), e33552.

(175) Hancock, S. M.; Finkelstein, D. I.; Adlard, P. a. Glia and Zinc in Ageing and Alzheimer's Disease: A Mechanism for Cognitive Decline? *Frontiers in Aging Neuroscience* **2014**, *6* (137), 1–6.

(176) Shoba, G.; Joy, D.; Joseph, T.; Majeed, M.; Rajendran, R.; Srinivas, P. S. S. R. Influence of Piperine on the Pharmacokinetics of Curcumin in Animals and Human Volunteers. *Planta Medica* **1998**, *64*, 353–356.

(177) Greenblatt, D. J.; Divoll, M.; Harmatz, J. S.; Shader, R. I. Pharmacokinetic Comparison of Sublingual Lorazepam with Intravenous, Intramuscular, and Oral Lorazepam. *Journal of pharmaceutical sciences* **1982**, *71* (2), 248–252.

(178) Lao, C. D.; Ruffin, M. T.; Normolle, D.; Heath, D. D.; Murray, S. I.; Bailey, J. M.; Boggs, M. E.; Crowell, J.; Rock, C. L.; Brenner, D. E. Dose Escalation of a Curcuminoid Formulation. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2006**, *6* (10), 1–4.

(179) Anand, P.; Kunnumakkara, A. B.; Newman, R. a.; Aggarwal, B. B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4* (6), 807–818.

(180) Pan, M. H.; Huang, T. M.; Lin, J. K. Biotransformation of Curcumin through Reduction and Glucuronidation in Mice. *Drug Metabolism and Disposition* **1999**, *27* (4), 486–494.

(181) Ryu, E. K.; Choe, Y. S.; Lee, K. H.; Choi, Y.; Kim, B. T. Curcumin and Dehydrozingerone Derivatives: Synthesis, Radiola- Beling, and Evaluation for β-Amyloid Plaque Imaging. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49* (20), 6111–6119.

(182) Cruz-Correa, M.; Shoskes, D. A.; Sanchez, P.; Zhao, R.; Hylind, L. M.; Wexner, S. D.; Giardiello, F. M. Combination Treatment with Curcumin and Quercetin of Adenomas in Familial Adenomatous Polyposis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **2006**, *4* (8), 1035–1038.

(183) Kondo, A.; Takeda, T.; Li, B.; Tsuiji, K.; Kitamura, M.; Wong, T. F.; Yaegashi, N. Epigallocatechin- 3-Gallate Potentiates Curcumin's Ability to Suppress Uterine Leiomyosarcoma Cell Growth and Induce Apoptosis. *International Journal of Clinical Oncology* **2013**, *18*, 380–388.

(184) Chen, X.; Zou, L.-Q.; Niu, J.; Liu, W.; Peng, S.-F.; Liu, C.-M. The Stability, Sustained Release and Cellular Antioxidant Activity of Curcumin Nanoliposomes. *Molecules* **2015**, *20* (8), 14293–14311.

(185) Sood, S.; Jain, K.; Gowthamarajan, K. Optimization of Curcumin Nanoemulsion for Intranasal Delivery Using Design of Experiment and Its Toxicity Assessment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *113*, 330–337.

(186) Khanji, A. N.; Michaux, F.; Jasniewski, J.; Petit, J.; Lahimer, E.; Cherif, M.; Salameh, D.; Rizk, T.; Banon, S. Structure and Gelation Properties of Casein Micelles Doped with Curcumin under Acidic Conditions. *Food and FunctionFunction* **2015**, doi : 10.1039/C5FO00829H.

(187) Yu, Y.; Zhang, X.; Qiu, L. The Anti-Tumor Efficacy of Curcumin When Delivered by Size/charge-Changing Multistage Polymeric Micelles Based on Amphiphilic Poly(β-Amino Ester) Derivates. *Biomaterials* **2014**, *35* (10), 3467–3479.

(188) Lee KS; HC, C.; SA, I.; YH, P.; CS, K.; S-B, K. Multicenter Phase II Trial of Genexol-PM, a Cremophor-Free, Polymeric Micelle Formulation of Paclitaxel, in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Breast Cancer Research Treatment* **2008**, *108* (2), 241–250.

(189) Nagahama, K.; Sano, Y.; Kumano, T. Anticancer Drug-Based Multifunctional Nanogels through Self-Assembly of Dextran–curcumin Conjugates toward Cancer Theranostics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25* (12), 2519–2522.

(190) Bansal, S. S.; Kausar, H.; Aqil, F.; Jeyabalan, J.; Vadhanam, M. V.; Gupta, R. C.; Ravoori, S. Curcumin Implants for Continuous Systemic Delivery: Safety and Biocompatibility. *Drug Delivery and Translational Research* **2011**, *1* (4), 332–341.

(191) Ghosh, M.; Ryan, R. O. ApoE Enhances Nanodisk-Mediated Curcumin Delivery to Glioblastoma Multiforme Cells. *Nanomedicine* **2014**, *9* (6), 763–771.

(192) Aggarwal, B. B.; Harikumar, K. B. Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-Inflammatory Agent, against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2009**, *41* (1), 40–59.

(193) Betts, J. W.; Wareham, D. W. In Vitro Activity of Curcumin in Combination with Epigallocatechin Gallate (EGCG) versus Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii. *BMC Microbiology* **2014**, *14* (1), 172.

(194) Tembo, O. N.; Dallemagne, P.; Rault, S.; Robba, M. An Efficient Synhtesis of New Phenylpyrrolizine and Phenylpyrrolopyrazine Derivatives. *Heterocycles* **1993**, *36* (9), 2129–

2137.

(195) Lisowski, V.; Léonce, S.; Kraus-Berthier, L.; Sopková-de Oliveira Santos, J.; Pierré, A.; Atassi, G.; Caignard, D.-H.; Renard, P.; Rault, S. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Thienopyrrolizinones as Antitubulin Agents. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47* (6), 1448–1464.

(196) Rault, S.; Cugnon de Sevicourt, M.; Godard, A. M.; Robba, M. A Convenient Synthesis of New Aminopyrroloindoles via an Iminium Salt. *Tetrahedron Letters* **1985**, *26* (19), 2305–2308.

Curcuma et Curcumine, de l'Histoire aux Intérêts Thérapeutiques.

Les épices tropicales sont exploitées par l'Homme depuis des temps ancestraux. Leurs vertus s'expriment aux travers de leurs intérêts culinaires, colorants, odorants mais également en médecine traditionnelle. *Curcuma longa* L. est une plante dont les rhizomes broyés et extraits fournissent l'épice éponyme tant connue. La science magnifie les médecines traditionnelles au service de la recherche et les nombreuses propriétés de cette épice sont attribuées à une molécule se trouvant dans le curcuma : la curcumine. Depuis son isolement, ce polyphénol naturel fait l'objet de nombreuses évaluations. Antioxydant, conservateur, antiinflammatoire, propriétés anticancéreuses, antiinfectieuses et cicatrisantes sont autant d'activités faisant d'elle un composé remarquable. Les propriétés d'intérêt thérapeutique dans le traitement de démences liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer sont particulièrement décrites dans cet ouvrage. L'objet de ce travail est d'établir les propriétés physico-chimiques et structurales de la curcumine permettant d'expliquer ses propriétés pharmacologiques. Sont également décrites les raisons limitant son utilisation en thérapeutique, notamment sa faible biodisponibilité, et les moyens mis en œuvre pour y remédier.

Mots Clés : Curcuma ; Curcumine ; Alzheimer, Maladie d' ; Anticancéreux ; Polyphénols végétaux ; Pharmacologie ; Curcuma longa

Turmeric and Curcumin, from History to Therapeutic Interest.

Tropical spices are exploited by humans since ancient times. Their virtues are expressed through to their culinary interests, dyes and odorants, but also in traditional medicine. *Curcuma longa* L. is a plant whose crushed and extracted ground rhizomes provide the eponymous spice known as. Science magnifies traditional medicine in the service of research and many properties of this spice are attributed to a molecule found in turmeric: curcumin. Since its isolation, this natural polyphenol had been the object of numerous evaluations. Antioxidant, preservative, anti-inflammatory, anticancer, ant infectious and healing properties are all activities making her as a remarkable compound. The therapeutically valuable properties in the treatment of age-related dementias such as Alzheimer's disease are particularly described in this item. The purpose of this work is to establish the physico-chemical and structural properties of curcumin to explain its pharmacological effects. Are also described the reasons limiting its use in therapy, especially its low bioavailability, and ways to circumvent them.