

N° d'ordre : 08/2012-D/CH

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE

FACULTE DE CHIMIE



Thèse

Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat

En : **CHIMIE**

Spécialité : **CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE**

Par : M^{me} DEHAK épouse OUGHLISSI Karima

Thème

**Contribution à l'étude phytochimique de quelques
plantes sahariennes à caractère médicinal, Cas de
*Ferula vesceritensis***

Soutenue publiquement, le 25/01/2012, devant le Jury composé de :

Mr B.Y MEKLATI
Mr Y. BADJAH-HADJ-AHMED
Mme Z. KAABOUCHE
Mr M.H. GUERMOUCHE
Mr M.HADJ MAHAMMED
Mr M. D. OULD-ELHADJ

Professeur de l'U-S.T.H.B
Professeur de l'U-RYAD K.S.A
Professeur l'U-Mentouri. Constantine
Professeur l'U-S.T.H.B
Professeur l'U-K.M.Ouargla
Professeur l'U-K.M.Ouargla

Président
Directeur de thèse
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

Mes vifs remerciements vont à Monsieur le Professeur Y. Badjah Hadj Ahmed pour avoir dirigé ce travail, ainsi que pour ses conseils et ses encouragements.

La 1^{ère} partie de cette recherche est réalisée au laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques (B.M.D) de la faculté des Sciences, de la Technologie et des sciences de la matière de l'université Kasdi Merbah de Ouargla, dirigé par Monsieur le Professeur M. Hadj-Mahammed. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et profonde gratitude pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, ainsi que pour sa disponibilité et ses encouragements incessants.

J'ai eu la chance et le plaisir de réaliser le travail de fractionnement, de purification et d'identification au laboratoire de Pharmacognosie (EA 3741 - Ecosystèmes et Molécules Bioactives, UCBL – Lyon I) dirigé par le Professeur M^{me} M.G. DIJOUX- FRANCA, et sous la direction du Professeur D. GUILLET. Je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Je suis particulièrement reconnaissante envers le Professeur D. GUILLET pour sa grande disponibilité et pour ses encouragements constants.

Les évaluations biologiques ont été menées dans les trois laboratoires suivants :

- Laboratoire de Cytologie Analytique (UCBL - Lyon1, dirigé par le Professeur C. Dumontet) pour Le test de criblage sur la Pgp (cellules sélectionnées).
- Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP - Lyon 1 dirigé par le Professeur A. Di Pietro pour le test de criblage sur Pgp et BCRP (cellules transfectées).
- Laboratoire de Parasitologie (ISPB, Faculté de pharmacie, UCBL - Lyon1) pour le test sur CPABC3 par le Professeur P. Lawton.

Je tiens donc à remercier Messieurs les Professeurs C. Dumontet, A. Di Pietro et P.Lawton ainsi que le Dr. I. Raad d'avoir accepté de tester mes extraits et mes composés.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur G. Comte et à F. Bellver de l'UMR 5557 Ecologie Microbienne- CNRS (UCBL, Lyon 1), pour m'avoir permis de réaliser les couplages LC-MS et GC-MS.

Je suis très honorée par l'acceptation de Monsieur B.Y. Meklati, Professeur à l'USTHB et directeur du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse physicochimique (CRAPC) de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également Madame Z. Kaabouche, Professeur à l'université de Constantine, Messieurs les Professeurs H. Guermouche (faculté de Chimie USTHB), M.D. Ould el-Hadj et M. Hadj-Mahammed (U.K.M.O) pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie de ce jury.

Que Monsieur le Professeur A. Baaliouamer, Directeur du laboratoire d'Analyse Organique et Fonctionnelle (LAOF-USTHB) trouve ici l'expression de mes remerciements pour ses encouragements.

Je remercie particulièrement Christine Bayet pour sa gentillesse, sa disponibilité et son amitié. Mes remerciements s'adressent également à Serge Michalet pour sa disponibilité et son aide précieuse. Mes vifs remerciements s'adressent à tous les membres du laboratoire de pharmacognosie (Lyon1) : à Nabila Zaabat, Michèle Carrier et Nicole Darbour et Inés pour leur gentillesse et leur amitié, à Stephane, Fabien, Monique Lussignol, Joël Reynaud, pour leur aide et leur soutien tout au long de la période passée dans ce laboratoire.

Je remercie vivement Messieurs Tir Rachid et Fodhil-Cherif Yazid (Chef de département de chimie à l'USTHB) ainsi que les autres membres LAOF et du CRAPC Noureddine, Nacera, Dalila, Amina, Latifa ... et mes collègues du laboratoire de BMD (UKMO) : Lamine, Mebarka, Nabila, Houria, Youssef, Rokia, Farah, Farid, Wafa, Habiba, Yamina ..., pour leur amitié, gentillesse et leurs encouragements

J'exprime aussi ma gratitude et ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Christian Rolando Directeur du laboratoire des Macromolécule et de la Chimie Organique (Lille 1) ainsi que tous mes amis Rajae, Mohammed, Kamel, Khadidja, Bouchra, Adeline, Karim et Guy, pour leur soutien et orientation durant mes séjours en France.

Dédicace

Cette thèse est dédiée :

A mes chers parents et mon époux lesquels par leur compréhension, leurs encouragements
m'ont aidée, soutenue incessamment dans la réalisation et la finalisation de ce travail

A mes chères enfants (Lina et Imène)

A mes frères et sœurs, à toute ma grande famille et ma belle famille

A toutes mes amies et à tous mes collègues

Liste des abréviations

Abréviations/ Symboles

Signification

Ac	acétyle
AcSCoA	acétyl coenzyme A synthase
AcOEt	acétate d'éthyle
ACN	acétonitrile
Ang	angéloyle
Anis	anisoyl (4-méthoxybenzoyle)
APG	<i>angiosperm phylogeny group</i>
ATP	adénosine triphosphate
BCRP (MXR, ABCP ou ABCG2)	<i>breast cancer resistance protein</i> ou protéine de résistance à la mitoxanthrone
Benz	Benzoyle
ButOH	Butanol
(iBu)	<i>iso</i> -Butyroyle
Calc.	Calculée
CC	chromatographie sur colonne ouverte
CCM	chromatographie sur couche mince
CCM prép.	chromatographie sur couche mince préparative
CG/SM	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CI ₅₀	concentration inhibitrice de 50%
Cinn	trans Cinnamoyle
CD ₃ OD	méthanol deutéré
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CH ₂ Cl ₂ ou DCM	Dichlorométane
CH ₃ OH ou MeOH	Méthanol
CMI	concentration minimale inhibitrice
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CLHP semip.	chromatographie liquide à haute performance semipréparative
CLMP	chromatographie liquide à moyenne pression
COSY	H-H <i>correlated spectroscopy</i>
Coum	coumarine (7-hydroxyumbelliférone)
CsA	cyclosporine A
<i>d</i>	doublet
DAD	détecteur à barette de diode
<i>dd</i>	doublet dédoublé
<i>ddd</i>	doublet dédoublé dédoublé
DMSO- d ₆	diméthylsulfoxyde deutéré
DMAPP	diméthylallyl diphosphate
DNR	Daunorubicine
Epoxyang	époxyangéloyle
<i>dt</i>	doublet de triplet

Fer	Féruloyle
FID	détecteur à ionisation de flamme
FPP	farnésyl pyrophosphate
GPP	géranyl pyrophosphate
GGPP	géranylgéranyl pyrophosphate
2-MeBu	2-méthylbutyrole
MVA	Mévalonate
Glu	Glucose
HECAMEG	6-O-[(N-heptylcarbamoyl) méthyl] α -D-glucopyranoside
HMBC	<i>heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HSQC	<i>heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<i>o</i> -OHcinn	<i>ortho</i> -hydroxycinnamoyle
HR	haute resolution
IPP	pyrophosphate d'isopentényle
<i>m</i>	Multiplet
MDR (RDM)	résistance à des drogues multiples
NBD	<i>nucleotide-binding domain</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<i>p</i> -OH-Benz	<i>p</i> -hydroxybenzoyle
<i>q</i>	Quadruplet
Pgp (ABCB1)	glycoprotéine P
Rham	Rhamnose
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMN ¹ H	résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	résonance magnétique nucléaire du carbone 13
<i>s</i>	Singlet
Sal	Salicyloyle
Sen	Sénécioyle
SM-ESI	spectrométrie de masse en mode électrospray
SM-IC	spectrométrie de masse par ionisation chimique
EPS (SPE)	Extraction en phase solide
<i>t</i>	Triplet
TFA	acide trifluoroacétique
TMS	Tétraméthylsilane
Um	umbélliférone
UV	Ultraviolet
Van	Vanilloyle
Ver	Veratroyle
VLC	chromatographie liquide sous vide
Hz	Hertz
<i>J</i>	constante de couplage exprimée en Hz
<i>m/z</i>	masse/charge d'un ion
ppm	partie par million
δ	déplacement chimique exprimé en ppm
$\lambda_{\max}$	longueur d'onde d'absorption maximale

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	2
 Chapitre I : RECUEILS BIBLIOGRAPHIQUES, PRESENTATION DE LA FAMILLE DES APIACEAE ET DU GENRE <i>FERULA</i>	 5
I. INTRODUCTION	5
II. POSITION SYSTEMATIQUE.....	6
III. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES DES APIACEAE.....	7
IV. ASPECTS PHARMACOLOGIQUES.....	9
V. ETUDE DU GENRE <i>FERULA</i>.....	10
V.1. Répartition géographique	10
V.2. Caractéristiques botaniques.....	11
V.3. Chimiotaxonomie du genre <i>Ferula</i>	11
V.4. Utilisations	14
V.5. Etude phytochimique et pharmacologique du genre <i>Ferula</i>	16
V.6. Métabolites secondaires isolés dans le genre <i>Ferula</i>	17
V.6.1. Sesquiterpènes type Daucanes	17
V.6.2. Sesquiterpènes coumariniques	33
V.6.3. Autres types de composés.....	44
VI.CONCLUSION	60
BIBLIOGRAPHIE.....	61
 Chapitre II : GENERALITES.....	 66
I. ETUDE DES TERPENOIDES	66
I.1. Généralités.....	66
I.2. Biosynthèse	66
I.3. Rôle et activités.....	67
I.4. Sesquiterpènes.....	68
I.4.1. Les sesquiterpènes de type Daucane	69
I.4.2. Biogenèse des daucanes	71
I.4.3. Les sesquiterpènes coumariniques	73
I.4.4. Biogenèse des sesquiterpènes coumariniques.....	75
II. ETUDE DES FLAVONOÏDES.....	77
II.1. Introduction.....	77
II.2. Biogenèse.....	78
II.3. Rôle dans les plantes et activités biologiques.....	79
III. ETUDE DES TRANSPORTEURS ABC	80
III.1. Introduction.....	80

III.2. MDR, Transporteurs ABC et cancer.....	81
III.3. La glycoprotéine-P.....	82
III.4. La protéine de résistance à la mitoxanthrone : BCRP	84
III.5. Les Modulateurs de la MDR.....	85
III.6. Produits naturels et MDR	87
IV. CONCLUSION	91
BIBLIOGRAPHIE	92
Chapitre III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE <i>FERULA VESCERITENSIS</i> COSS ET DURU (EX BATT. BARATTE)	96
I.RAPPELS BOTANQUES.....	96
II. UTILISATIONS EN MEDECINE TRADITIONNELLE	97
III. TRAVAUX PHARMACOLOGIQUES ET PHYTOCHIMIQUES	
ANTERIEURS SUR L'ESPECE.....	97
IV. CHIMIE EXTRACTIVE.....	99
IV.1. Obtention des extraits.....	99
IV.2. Purification	101
IV.3. Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane.....	101
V. CARACTERISATION DES COMPOSES OBTENUS.....	104
V.1. Composés nouveaux.....	104
V.1.1.Elucidation structurale du composé 1	105
V.1.2. Elucidation structurale du composé 2.....	113
V.1.3. Elucidation structurale du composé 3	119
V.1.4. Elucidation structurale du composé 4.....	127
V.1.5. Elucidation structurale du composé 5.....	132
V.2. Produits connus	138
V.2.1. Elucidation structurale du composé 6	139
V.2.2. Elucidation structurale du composé 7	147
V.2.3. Elucidation structurale du composé 8	154
V.2.4. Elucidation structurale du composé 9	157
V.2.5. Elucidation structurale du composé 10.....	162
V.2.6. Elucidation structurale du composé 11	168
V.2.7. Elucidation structurale du composé 12.....	174
V.2.8. Elucidation structurale du composé 13	178
VI. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE.....	180
VII. CARACTERISATION DES COMPOSES OBTENUS.....	181
VII.1 Elucidation structurale du composé 14	181
VII.2. Elucidation structurale du composé 15	187
VII.3. Elucidation structurale du composé 16.....	193
VIII. ETUDE DE L'EXTRAIT HEXANIQUE PAR LES TECHNIQUES COUPLEES CLHP-UV-DAD, CL-SM ET CG-SM	196
VIII.1. Etude de l'extrait hexanique par LC-UV et LC-MS.....	196

VIII.2. Analyse de l'extrait hexanique par GC/MS.....	201
BIBLIOGRAPHIE	204
 Chapitre IV : EVALUATIONS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET DES MOLECULES ISOLEES SUR LA PGP ET LA BCRP.....	 206
I.Criblage sur la Pgp (cellules sélectionnées).....	206
II. Criblage sur BCRP et Pgp (cellules transfectées).....	211
III. Criblage sur CpABC3 (Pgp).....	213
 BIBLIOGRAPHIE	 215
 PARTIE EXPERIMENTALE.....	 216
I. MATERIELS ET APPAREILLAGE.....	216
I.1. Récolte de la plante <i>Ferula vesceritensis</i>	216
I.2. Chimie extractive.....	216
I. 2.1. Méthodes chromatographiques analytiques.....	216
I. 2.2. Méthodes chromatographiques semi-préparatives ou préparatives	218
I. 3. Méthodes physico-chimiques.....	221
I. 3.1. Spectroscopie RMN	221
I.3.2. Spectrométrie de masse.....	222
I.3.3. Spectrométrie UV-Vis.....	222
I.3.4. Pouvoir rotatoire.....	222
II. ETUDE DE L'ESPECE <i>FERULA VESCERITENSIS</i>	223
II.1. Extraction des parties aériennes de <i>F.vesceritensis</i>	223
II.2. Fractionnement et purification de l'extrait DCM de l'espèce <i>F.vesceritensis</i>	223
II.3. Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique de l'espèce <i>F.vesceritensis</i>	226
III. DONNEES SPECTRALES ET CONSTANTES PHYSIQUES DES COMPOSES ISOLEES DE L'ESPECE <i>FERULA VESCERITENSIS</i>	228
IV. PARTIE BIOLOGIQUE.....	233
IV.1 .Test de criblage sur la Pgp (cellules sélectionnées).....	233
IV.2 .Test de criblage sur Pgp et BCRP (cellules transfectées).....	234
IV.3 Criblage sur CpABC3.....	236
 BIBLIOGRAPHIE	 237
 CONCLUSION GENERALE	 238

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les ressources nécessaires à sa survie et à son bien être. Ainsi, l'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures anciennes et contemporaines. A l'heure actuelle, les plantes demeurent une source précieuse de nourriture et de remèdes qu'une large couche des populations, notamment celles des pays en voie de développement continue à utiliser du fait de son incapacité à accéder à la médecine moderne [1].

La valorisation des plantes, utilisées en médecine traditionnelle, passe notamment par l'isolement et l'identification de molécules dotées d'activités biologiques dignes d'intérêt, et qui offrent de nouvelles alternatives à la médecine moderne. En effet, et à titre indicatif, plus de 50 % des médicaments utilisés aujourd'hui en chimiothérapie anticancéreuse sont d'origine naturelle. Paradoxalement, le règne végétal qui englobe environ 500000 espèces n'a été que partiellement étudié sur les plans chimique et pharmacologique [2 ; 3].

Parmi ces plantes, la famille des Apiaceae n'est que peu représentée dans le Sahara, mais les rares espèces qui y sont rencontrées sont utilisées par les populations locales en médecine traditionnelle [2 ; 3]. Les espèces appartenant au genre *Ferula* sont utilisées entre autres comme tranquillisants, antispasmodiques ou bien pour soigner les troubles digestifs et les problèmes de fertilité. Ce genre est connu comme une source importante de métabolites secondaires biologiquement actifs regroupant spécifiquement les dérivés sesquiterpéniques de types daucanes et sesquiterpènes coumariniques [4].

Les daucanes comme la férutinine et férutidine ont montré des activités antiprolifératives sur des cellules cancéreuses du colon humain et celles du sein humain MCF-7 [5].

Par ailleurs, les dérivés coumariniques tels que la conférone, la mogotlacine, la coladonine et le féséol sont reconnus pour leur pouvoir à surmonter la résistance aux agents anticancéreux en agissant sur la pompe d'efflux : la glycoprotéine P [6-10] .

Notre présent travail, qui s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore du Sahara septentrional notamment celle à caractère médicinal (un des axes de recherche développé par notre laboratoire "Biogéochimie des Milieux Désertiques"), concerne en premier lieu, l'étude phytochimique de l'espèce *Ferula vesceritensis* (Apiaceae) d'une part à cause de son endémisme et de ses usages en médecine traditionnelle, et d'autre part, parce qu'elle n'a été que très peu étudiée malgré l'importance biologique que présente généralement les substances isolées du genre *Ferula*.

En second lieu, nous nous sommes intéressés à la recherche d'inhibiteurs d'origine naturelle pour les deux transporteurs ABC impliqués dans les mécanismes de la MDR : la Pgp et la BCRP, une thématique développée par le laboratoire de Pharmacognosie (EA 3741 - Ecosystèmes et Molécules Bioactives, Université Claude Bernard – Lyon I, France).

Cette thèse est ainsi structurée en quatre chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique, dans laquelle la famille des Apiaceae et plus particulièrement le genre *Ferula* sont présentés sur les plans botanique, pharmacologique et phytochimique, où plus de 350 constituants divers de ce genre sont répertoriés. Des évaluations biologiques relatives à un bon nombre de ces composés y sont également rapportées.
- Dans le second chapitre, nous avons abordé des généralités relatives aux métabolites secondaires isolés dans ce travail. Il s'agit des sesquiterpènes de type daucanes et les sesquiterpènes coumariniques ainsi que les flavonoïdes présentant notamment un intérêt chimiotaxonomique. Nous y avons décrit également le phénomène de la résistance à de multiples drogues (MDR) ainsi que les deux protéines principalement impliquées dans ce mécanisme, en l'occurrence la glycoprotéine P (Pgp) et la protéine de résistance à la mitoxanthrone: MXR ou BCRP sur lesquelles nos extraits et nos molécules ont été évalués dans ce travail.
- L'étude phytochimique de *Ferula vesceritensis*, objet du troisième chapitre est entamée par une description botanique de cette espèce. Un état des connaissances antérieures phytochimiques et pharmacologiques est également présenté. Les différentes étapes d'extraction, de fractionnement et de purification des constituants phytochimiques sont décrites. De plus, l'élucidation structurale de tous les composés issus des deux extraits au dichlorométhane et au méthanol par les méthodes spectrales (UV, RMN du proton et RMN du carbone ¹³C, RMN à 2 dimensions et Spectrométrie de masse) est détaillée dans cette partie. Par ailleurs, ce chapitre comporte les résultats de l'analyse de l'extrait hexanique de cette espèce par les techniques couplées : CLHP-UV-DAD, CLHP-SM et CG-SM.
- Le quatrième chapitre est quant à lui consacré à l'évaluation de l'activité inhibitrice *in vitro* sur les deux transporteurs ABC : la Pgp et la BCRP. Les extraits préparés à partir de quatre plantes sahariennes différentes (*Ferula vesceritensis*, *Retama retam*, *Zygophyllum album* et *Pergularia tomentosa*) ont été testé au préalable sur Pgp dans le but de sélectionner l'espèce la plus active. La majorité des sesquiterpènes isolés à partir de l'extrait DCM de *Ferula vesceritensis* ont été par la suite testés sur les deux transporteurs ABC précédents.

Bibliographie

- [1]- J.M. Pelt, Les nouveaux actifs naturels. Marabout, Paris, 2001.
- [2]- P. Quezel, S. Santa, Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris, 1963.
- [3]- P. Ozenda, Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris, 1991.
- [4]- E.L. Ghisalberti, Phytochemistry, 37, 597-623, 1994.
- [5]- G. Appendino, P. Spagliardi, G. Cravotto, V. Pocock, S. Milligan, J. Nat. Prod., 65, 1612-1615, 2002.
- [6]- C. Barthomeuf, M. Demeule, J. Grassi, A. Saidkhodjaev, R. Beliveau, Planta Med. 72, 634- 639, 2006.
- [7]- F. Behnam Rassouli, M.M. Matin, M. Iranshahi, A.R. Bahrani, V. Neshati, S. Mollazadeh, Z. Neshati, Phytomedicine, 16, 181-187, 2009.
- [8]- C. Barthomeuf, J. Grassi, M. Demeule, C. Fournier, D. Boivin, R. Béliveau, Cancer Chemother. Pharmacol., 56, 173-181, 2005.
- [9]- C. Barthomeuf, S. Lim, M. Iranshahi, P. Chollet, Phytomedicine, 15, 103-111, 2008.
- [10]- K.Oughlissi-Dehak, P. Lawton, S. Michalet, C. Bayet, N. Darbour, M. Hadj-Mahammed, Y.A. Badjah-Hadj Ahmed., M.-G. Dijoux-Franca, D. Guilet; Phytochemistry 69, 1933– 1938, 2008.

CHAPITRE I- RECUEILS BIBLIOGRAPHIQUES

PRESENTATION DE LA FAMILLE DES APIACEAE ET DU GENRE *FERULA*

I. INTRODUCTION

La famille des Apiaceae appelées anciennement Ombellifères (Umbelliferae) est une famille de dicotylédones. Elle comprend plus de 3000 espèces réparties en 469 genres, présentes essentiellement dans l'hémisphère nord du globe terrestre et plus particulièrement dans les régions tempérées (Figure I.1). On rencontre quelques espèces rares dans les régions tropicales. En Algérie 55 genres regroupant 117 espèces (dont 24 sont endémiques) sont répertoriés [1].

Le continent asiatique connaît la concentration la plus dense avec un total de 281 genres (environ 2115 espèces) [2]. La chine et l'ex URSS regroupent à elles seules respectivement 672 espèces (142 genres) et 743 espèces. Dans les pays du Moyen Orient environ 200 espèces sont signalées, alors que la flore européenne compte 110 genres (417 espèces).

Dans les îles de l'Atlantique et de la Méditerranée près d'une cinquantaine de genres sont répertoriés [2].

En revanche, cette importante famille est très mal représentée au Sahara, notamment dans sa partie centrale. Les Apiaceae sahariennes sont bien différentes les unes des autres et leur détermination n'offre pas de grandes difficultés sauf la distinction entre les espèces du genre *Pituranthos*. Pour toute identification il est très important de recueillir des échantillons portant des fruits mûrs [3].

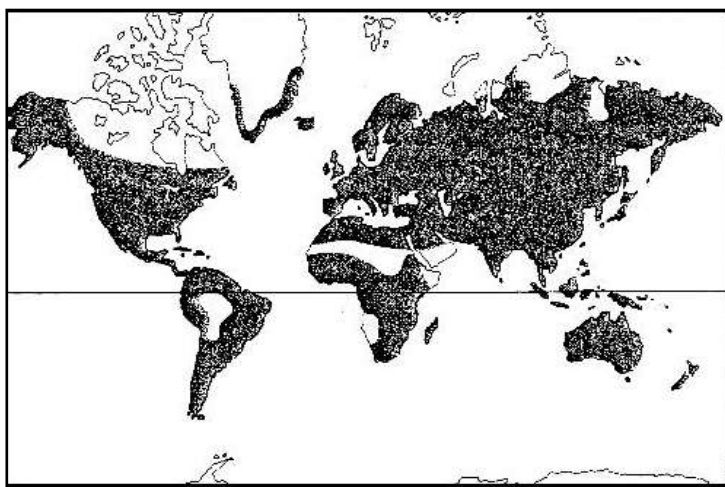


Figure I.1 : Distribution des Apiaceae [4]

II. POSITION SYSTEMATIQUE

La classification ancienne est basée sur des caractères tirés de l'organisation des ombelles et du fruit. De ce fait, les ombellifères étaient divisées en trois groupes :

- 1- Les Hydrocotyloïdées qui comprenaient les Saniculées et les Hydrocotylées.
- 2- Les Féniculoïdées qui regroupaient les Amminées, les Sésélinées et les Peucédanées (tribu contenant le genre *Ferula*).
- 3- Les Daucoïdées : regroupant les Caucalinées et les Laserpitiées [5]

Les travaux des deux chercheurs Pimenov et Leonov en 1993, constituent un renouvellement de la classification de Drude (1898), laquelle a été souvent jugée insuffisante et difficile à pratiquer sur le terrain. Elle a été également contestée par Downie (1996, 1997 et 1999). Selon Drude, les Apiaceae étaient divisées en 3 sous-familles, en fonction des caractéristiques morphologiques du fruit (*Apioideae*, *Saniculoideae* et *Hydrocotyloideae*), lesquelles à leur tour regroupaient plusieurs tribus et sous-tribus [6].

Parmi les classifications basées essentiellement sur les critères morphologiques et anatomiques, celle de Cronquist (1988) est la plus utilisée. La position de cette famille dans les systèmes de classifications évolutives est résumée dans le tableau I.1.

Tableau I.1 : Position des Apiaceae dans les systèmes de classifications évolutives

Auteur	Engler	Cronquist	Thorne	Dahlgren	Takhtajan	APG II
Super-classe						Tricolpées (Eudicotylédones)
Classe	Dicotyledonae	Magnoliopsida				Tricolpées évoluées
Sous-classe	Archichlamydae	Rosidae	Magnoliidae	Magnoliidae	Cornidae	Asteridae
Super-ordre			Cornanae	Aralianae	Aralianae	Euastéridées II ou Campanulidées
Ordre	Umbelliferae	Apiales	Araliales	Araliales	Araliales	Apiales
Famille	Umbelliferae	Apiaceae				

Les apports récents de la biologie et de la systématique moléculaires basées sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont donné naissance en 1998 à une nouvelle classification ordinale des plantes à fleurs : APG 1998.

Cette classification a fait l'objet de quelques révisions en 2003 et 2009. Elle reflète au mieux la phylogénie des familles mise en lumière par les avancées de la génétique.

La position des Apiaceae selon la classification APGIII 2009 est la suivante :

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe : Magnoliopsida (Dicotylédones)
Clade : Campanulidées ou Euastéridées
Ordre : Apiales
Famille : Apiaceae

III. CARACTERISTIQUES BOTANIQUES DES APIACEAE

Elles constituent une famille très homogène, une des plus faciles de la flore à reconnaître, grâce à ses inflorescences en ombelles. Inversement, les espèces sont parfois difficiles à distinguer les unes des autres [8].

➤ Appareil végétatif

Les Apiaceae sont majoritairement des plantes herbacées annuelles (comme le cerfeuil), bisannuelles (comme la carotte), ou vivaces, plus rarement des arbustes ou des arbres. La tige est souvent creuse, cannelée et noueuse.

Les feuilles sont alternes, sans stipules, généralement engainantes et exstipulées. Elles sont le plus souvent composées, pennées, palmées ou ternées, plus rarement entières (chez les buplèvres par exemple) ou phyllodiales. Elles peuvent être épineuses comme chez les panicauts (*Eryngium* spp.). Racines, tiges et feuilles sont parcourues par des canaux sécréteurs qui contiennent un mélange d'essences et de résines, ce qui explique l'odeur forte qui se dégage des Apiaceae lorsqu'on les écrase [8].

➤ Appareil reproducteur

a- L'inflorescence

Les Apiaceae sont caractérisées par leurs inflorescences en ombelles, ce qui a valu à la famille l'ancien nom d'ombellifères (Figure I.2). Les ombelles sont le plus souvent composées, plus rarement sous forme d'ombelles simples ou de capitules (chez certaines espèces d'*Azorella* et d'*Hydrocotyle*, l'ombelle est parfois réduite à une fleur). Les pédoncules floraux (appelés rayons) partent d'un même point et sont de longueurs différentes afin d'élever les fleurs à la même hauteur, ce qui confère une forme "plate" à l'inflorescence. Lorsque les pédoncules ont la même taille, l'ombelle prend une forme sphérique. Les ombelles sont souvent munies à leur base d'un involucre de bractées [8].

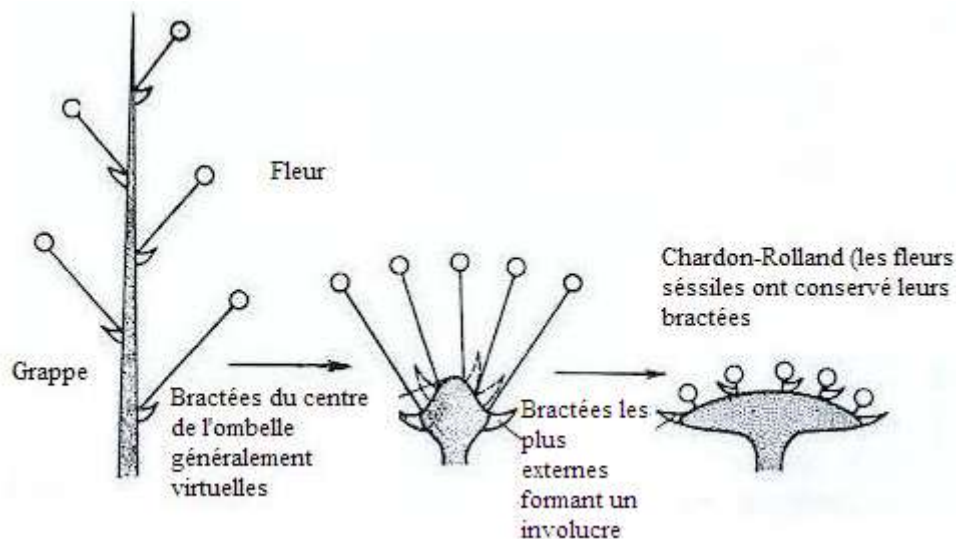


Figure I.2 : Origine de l'ombelle [8]

b- La fleur

Les fleurs sont le plus souvent blanches ou de couleur pâle (jaunâtres, verdâtres, ou rosées). Leur disposition en une inflorescence relativement condensée explique d'une part, qu'elles soient toujours de dimensions réduites et d'autre part, que le nombre des pièces florales soit réduit. On a une formule florale de type $5S+5P+5E+2C$.

Les cinq sépales sont souvent à peine visibles, quant aux cinq pétales, ils ont un limbe recourbé en dedans, alors que les cinq étamines alternent normalement avec les pétales.

Les deux carpelles sont soudés pour former un ovaire infère biloculaire, très rarement uniloculaire par avortement d'un carpelle, surmonté de deux styles distincts, parfois réduits. La base des styles peut être renflée pour former un stylopode qui conflue avec le disque nectarifère situé au sommet de l'ovaire.

Les étamines sont mûres avant les ovaires, et les fleurs extérieures de l'ombelle avant celles du centre, il s'ensuit que les fleurs extérieures sont pollinisées par les étamines des fleurs du centre de l'ombelle [8].

c- Le fruit

Après la fécondation, l'ovaire infère devient un diakène (Figure I.3). Les deux loges restent soudées, puis se séparent en deux akènes (schizocarpes). Les ovules solitaires dans chaque loge sont pendants, anatropes et unitéguminés. Le carpophore est rarement réduit ou absent. Les fruits peuvent présenter des crochets ou des épines, des protubérances ou des poils, parfois des ailes. Le tégument de la graine est souvent adhérent au péricarpe. L'embryon est droit, petit, inclus dans un albumen oléagineux.

Des canaux sécréteurs se trouvent en plus ou moins grand nombre, et expliquent l'emploi des fruits comme condiments [8].

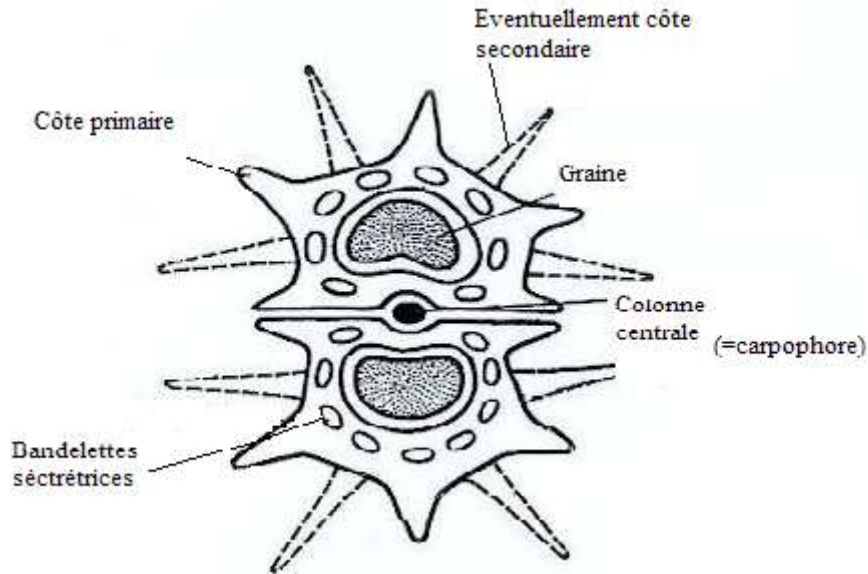


Figure I.3 : Structure schématique du diakène des ombellifères [8]

IV. ASPECTS PHARMACOLOGIQUES

Les Apiaceae sont le plus souvent des plantes aromatiques. Elles sécrètent des huiles essentielles qui leur confèrent des odeurs et saveurs caractéristiques. Ces propriétés organoleptiques font que de nombreuses espèces sont largement utilisées comme légumes ou condiments. Les principales plantes condimentaires sont le persil (*Petroselinum sativum*), la coriandre (*Coriandrum sativum*), l'aneth (*Anethum graveolens* L), l'anis (*Pimpinella anisum*), et le cumin (*Cuminum cyminum*). Le fenouil (*Foeniculum vulgare*), quant à lui, est à la fois utilisé comme légume et comme condiment notamment pour parfumer les boissons anisées [7].

L'utilisation de ces plantes s'étend à la médecine traditionnelle. Des exemples concernant l'usage des espèces du genre *Ferula* seront développés plus loin dans l'étude pharmacologique de ce genre. Certaines sont connues pour la production de gommés-résines, auxquelles sont attribuées des propriétés médicinales mises à profit depuis l'Antiquité. Une cinquantaine d'espèces de cette famille sont citées dans une liste établie par les grecs. Elle regroupe les plantes les plus importantes du point de vue de leurs multiples utilisations. Parmi les plus importantes, l'anis vert (*Pimpinella anisum* L.), dont les utilisations citées sont très diverses, notamment comme relaxant, antispasmodique, antiseptique, anticonvulsivant et diurétique [9]. L'angélique officinale (*Angelica archangelica*) est elle, hépatoprotectrice, alors que le fenouil commun (*Foeniculum vulgare*) possède en plus de ses propriétés diurétiques et carminatives des activités antioxydantes et anti-inflammatoires [7].

Plusieurs d'entre elles sont en revanche toxiques, comme la grande ciguë (*Conium maculatum* L.), connue pour avoir entraîné la mort de Socrate. Le genre *Cicuta* est entre autre un genre très toxique [10]. Les toxines responsables sont des alcaloïdes, notamment la coniine (1), s'attaquent au système nerveux et provoquent une paralysie progressive de tous les muscles du corps pour aboutir à la mort. Une fois sèche, la plante perd ses propriétés létales. La petite ciguë (*Aethusa cynapium*) est quant à elle vénéneuse, mais non mortelle. D'un point de vue phytochimique, ces toxines restent rares chez les Apiaceae qui sont en revanche généralement riches en coumarines.

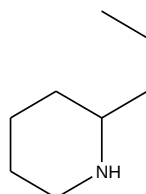


Figure I.4 : structure de la coniine (1)

L'hyperpigmentation provoquée par l'application de certaines Rutaceae et **Apiaceae** riches en furanocoumarines suivie d'une exposition au soleil ou aux UV, a été mise à profit par les Egyptiens, la médecine ayurvédique et Dioscoride pour traiter le psoriasis, le vitiligo et d'autres affections dermatologiques. La médecine contemporaine a repris ces pratiques anciennes pour traiter les mêmes affections. Cette photochimiothérapie (PUVA thérapie) n'est pas sans risque et peut être la cause de cancérogenèse, si l'on considère la photosensibilisation des furanocoumarines en cas d'exposition solaire. La présence de ces furanocoumarines dans l'huile essentielle de *Citrus aurantium* ssp. *Bergamia* (Rutaceae) a poussé l'Union Européenne, en juin 1995, à interdire la commercialisation des préparations destinées à accélérer le bronzage et dont la teneur en bergaptène dépassait 0,2 % [11].

V. ETUDE DU GENRE *FERULA*

V.1. Répartition géographique

Le genre *Ferula* comporte près de 180 espèces poussant à travers le Monde, principalement dans des régions arides. Un total de 130 espèces sont communes au bassin méditerranéen (Algérie, Maroc, Italie, France, Turquie...), jusqu'en Asie centrale où il représente le genre le plus abondant (177 espèces), notamment en Iran, Ouzbekistan, Afganistan et au Népal [12].

L'Algérie compte à son tour plusieurs espèces de *Ferula* (Tableau I.2) parmi lesquelles *F. communis* est la plus commune au nord algérien. Le ferulisme (« ferulosis » en Anglais) qui sévit toujours dans le sud de l'Europe a été décrit dès 1887 en Algérie comme une maladie mortelle des moutons ayant ingérés notamment l'espèce *Ferula communis* var. *breviedia* [13].

Tableau I.2 : Espèces du genre *Ferula* rencontrées en Algérie [14, 1]

Espèces	Biotopes
<i>F. communis</i>	Atals téllien
<i>F. cossoniana</i>	Hauts plateaux
<i>F. lutea</i>	Atals téllien
<i>F. sulcata</i> Def	Grande Kabylie
<i>F. loscossii</i>	Partie méridionale du sud Algérien
<i>F. assa foetida</i>	Hauts plateaux
<i>F. tingitana</i>	Sahara septentrional
<i>F. vesceritensis</i>	Partie orientale de l'Atlas Saharien et du Sahara septentrional

V.2. Caractéristiques botaniques

Ce genre est représenté par des plantes vivaces à tiges élevées, 1-3 m, ayant des feuilles 3-pennatiséquées ainsi que des fleurs de couleur jaune et des fruits grands et lisses [1].

Il a été monographié par Korovin dès 1947, qui a ensuite examiné sa relation avec le genre *Ferulago* Koch. Sur le plan morphologique, la structure pétiolaire est relativement constante dans ce genre, alors que l'aspect du fruit diffère légèrement entre les différentes espèces. Il existe également des espèces différentes par quelques détails au niveau du système sécréteur et dans l'histologie du péricarpe, ce qui permet de déterminer l'appartenance d'une espèce au genre *Ferula*.

Par ailleurs, l'étude caryologique montre des différences négligeables. Le nombre de chromosomes pour toutes les espèces étudiées est identique ($2n=22$). La morphologie des caryotypes des espèces de ce genre montre qu'il constitue un groupe homogène avec une prédominance de chromosomes métacentriques et sub-métacentriques [15].

V.3. Chimiotaxonomie du genre *Ferula*

L'étude monographique de Korovin repose essentiellement sur les particularités morphologiques internes. Cependant l'étude des constituants chimiques des espèces s'avère intéressante pour confirmer cette classification. Ainsi, le genre *Ferula* est l'un des genres pour lesquels l'étude chimiotaxonomique revêt une importance capitale, en raison de la variation de la composition en sesquiterpènes en fonction des différentes sections [15; 16].

L'étude chimiotaxonomique a d'ailleurs montré que la classification de Korovin n'était pas toujours juste. Il a été constaté que des espèces apparemment proches pouvaient présenter une différence dans leur composition en terpénoïdes.

En 1982 une étude chimiotaxonomique de la section *Paleonarthex* à laquelle appartient *Ferula vesceritensis* a été menée par l'équipe de Pimenov. Suite à cette étude des modifications ont été apportées dans la nomenclature la classification des espèces de cette section. Par ailleurs, elle a été divisée en trois sous-sections selon la classe de terpénoïdes prédominante qui découle de chemins de biosynthèse différents (Figure I.5).

Les 3 sous-sections sont définies comme suit :

- Sous-section *Foetidissimae* : (ex : *F. foetidissimae*, *F. violacea*, *F. eugenii*...), avec une prédominance de sesquiterpènes coumariniques.
- Sous-section *Tumidae* : (ex : *F. malacophylla*, *F. gigantea*...), avec une prédominance de sesquiterpènes lactones avec des groupements acyles ainsi que des monoterpènes coumariniques.
- Sous-section *Jaeschkeanae* : (ex : *F. jaeschkeanae*, *F. kuhistanica*...), avec une prédominance d'esters de daucanes [15].

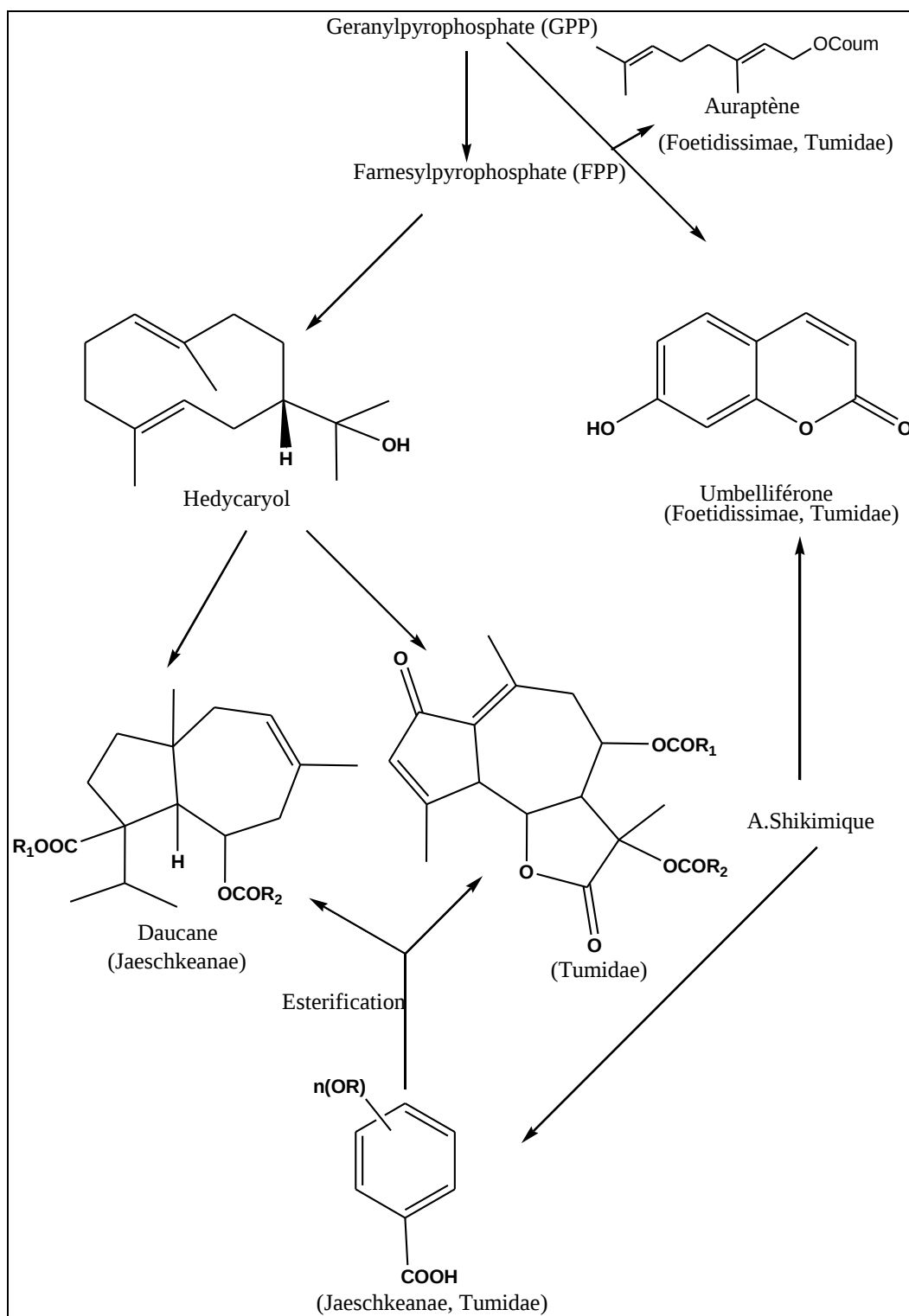


Figure I.6 : Biosynthèse de terpénoïdes et des acides aromatiques dans la section *Paléonarthex* du genre *Ferula* [15]

V.4. Utilisations

L'utilisation des espèces du genre *Ferula* remonte à l'antiquité. Les Romains appelaient *F. communis* « narthex ». Cette espèce était très convoitée en médecine, en cuisine ainsi qu'en parfumerie [17]. Le motif du silphion figurait dans l'ornement d'une ancienne monnaie libyenne pour à fois faire la promotion d'une plante médicinale et montrer son importance économique. L'espèce de *Ferula* représentée, n'a pas été déterminée avec précision mais il s'agirait plutôt de *F. tingitana*. Les utilisations citées pour ce silphion sont très nombreuses, notamment comme contraceptif, abortif et contre les piqûres de scorpion [18].

Les bédouins du sud de la wilaya de Naama ont recourt à la fêrûle (*F. communis* et *F. assa foetida*) pour traiter les piqûres de scorpions. Il est appelé localement « El'heltit » et on lui attribue une action de désintoxication en cas de morsure. Les espèces *F. tingitana* et *F. vesceritensis* sont utilisées dans la région de Ghardaia, notamment pour soigner la stérilité chez l'Homme et le cheptel ainsi que pour soigner les angines, les maux de tête et les troubles digestifs.

Au Maroc *F. communis*, appelée entre autres El fassoukh, est réputée pour de nombreux usages. Elle est mélangée à de l'huile d'olive pour d'une part, soigner localement quelques maladies du derme, d'autre part elle est administrée par voie orale comme vermifuge, antihystérique, anti dysentérique, aphrodisiaque et antispasmodique. Par ailleurs elle est employée dans la magie et la sorcellerie. Ses racines sont également utilisées dans des préparations dépilatoires [19].

L'espèce *F. assa foetida* est connue parmi les espèces de *Ferula* utilisées en tant que sources de gommes-oléorésines comme le galbanum et l'ase fétide. Elle rentre également dans de nombreuses préparations traditionnelles pour le traitement de la grippe et du cancer [20 ; 21]. En Turquie, les espèces *F. assa foetida*, *F. foetida*, *F. narthex* et *F. scorodosma* sont bouillies, puis laissées macérer dans une eau salée pendant une vingtaine de jours. Les résidus égouttés sont utilisés dans la préparation des fromages ou en omelettes. Elles sont employées comme épices en Iran, Afghanistan et en Inde. Leurs effets bénéfiques sur la digestion sont bien connus des populations de ces pays. La poudre des racines mélangée à du miel est préconisée notamment contre le diabète et comme aphrodisiaque.

Du fait de l'odeur agréable des gommes, ces populations les utilisent entre autres pour se parfumer [22]. La gomme obtenue par incision des racines de plusieurs ces espèces, tel que l'*ammoniacum* et le *sagapenum*, est utilisée soit comme condiment ou bien pour soigner particulièrement les troubles digestifs, pour calmer les douleurs des rhumatismes et les céphalées [23]. Des exemples d'utilisations thérapeutiques de plusieurs espèces sont répertoriés dans le Tableau I.3.

Tableau I.3 : Propriétés de quelques espèces du genre *Ferula*

Plante	Partie utilisée	Utilisations/ Propriétés	Pays	Référence
<i>F. assa- foetida</i>	Gomme (latex)	Odorante, expectorante, carminative, laxative, antispasmodique, emménagogue, antihelminthique, sédative, aphrodisiaque	Afghanistan, Iran, Népal, Inde	[23, 24]
<i>F.jaeschkeana</i>	Gomme	Odorante, expectorante, carminative, laxative, antispasmodique, antihelminthique, sédative,	Inde	[23]
<i>F.sinaica</i>	Résine, racine	Antihystérique, stomachique, fébrifuge, vermifuge, carminative	Egypte	[25, 26]
<i>F.persica</i>	Gomme Racines	Antihystérique, stomachique, fébrifuge, vermifuge, carminative, antidiabétique,	Iran	[27, 28]
<i>F. communis</i> var. subsp var.breviedia	Latex	Antihystérique, antidiabétique,	Turquie	[29]
	Rhizomes Fleurs	Antidysentérique, infections de la peau, antipyrétique	Arabie Saoudite	[30]
	P. aérienne	Toxique pour l'homme et l'animal	Sardaigne, Maroc	[31, 32]
<i>F.elaeochytris</i>	P. aérienne	Augmente la fertilité du bétail	Turquie	[33]
<i>F.orientalis</i>	Gomme	Antispasmodique, antioxydante	Turquie	[34]
<i>F.sumbul</i>		Antispasmodique, stimulante, carminative, tranquillisante, odorante	Ouzbekistan	[35, 23]
<i>F. szoswitziana</i>	Gomme	Antirhumatismale, anticarcinogène	Iran	[23]
<i>F. tingitana</i>	Gomme	Antispasmodique	Turquie	[23]
<i>Ferula gummosa</i>	Gomme	Antispasmodique, expectorante, anticonvulsivante, anticataracte	Iran	[36]
<i>F.kuhistanica</i>	Fruits	Maladies de la peau, blessures	Ouzbekistan	[37]
<i>F.hermonis</i>	Racines	Stimulant du système nerveux aphrodisiaque, antidiabétique	Liban, Syrie	[38, 39]
<i>F. sinkiangensis</i>	Racines	Arthrites rumathoides, maux d'estomac	Chine	[40]
<i>F.teterrima</i>	Racines	Arthrites rhumatoïdes, maux d'estomac, piqûre de scorpions	Chine	[40]
<i>F .diversivittata</i>	Racines	Antihystérique , anticonvulsivante	Iran	[41]
<i>F.varia</i>	Racines	Antiparasitaire intestinal, antipyrétique, antiseptique buccal	Ouzbekistan	[42]
<i>F. fukanensis</i>	Racines	Anti-inflammatoire, bronchites et arthrites rhumatoïdes	Chine	[43]

V.5. Etude phytochimique et pharmacologique du genre *Ferula*

Les divers usages thérapeutiques, connus depuis l'Antiquité à ces espèces ont été validés par des tests biologiques appropriés. En effet les plantes du genre *Ferula* ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques. Ces études ont concerné aussi bien la partie aérienne, le fruit et le latex que les racines et les rhizomes. Elles ont permis l'isolement et la caractérisation d'un nombre important de métabolites secondaires, principalement des sesquiterpènes avec divers squelettes (daucanes, germacrane, himachalane, humulane, selinane et guaiane). Nous notons toutefois que parmi les classes précédentes, les daucanes représentent la classe prédominante. Ce genre est également réputé pour être une source importante d'éthers de coumarine et de sesquiterpènes.

Kumar et al. ont étudié l'activité antimolluscicide des racines de *F. assa foetida*. Ils ont constaté que la toxicité des extraits dépendait de deux facteurs, le temps et la concentration. De plus selon cette étude, cette plante se présente comme une bonne candidate comme source d'antimolluscicides naturels [44].

Plusieurs études pharmacologiques ont été réalisées sur divers extraits de *F. gummosa*, espèce endémique d'Iran. L'huile essentielle ainsi que différents extraits ont montré une activité spasmolytique sur les contractions de l'ileum de rat [45]. Dans une autre étude, l'extrait chloroformique de cette espèce a montré un effet antinociceptif sur des souris et des rats [46].

Les propriétés oestrogéniques sur les humains et les animaux de ces espèces ont été également exploitées depuis l'Antiquité. L'étude réalisée par P. Zanolli et al. a permis de mettre en évidence l'effet potentiel des extraits de *F. hermonis* [47]. Les racines de cette plante appelées «Zaloo» en Syrie et au Liban y sont très utilisées d'une part comme aphrodisiaque et d'autre part pour leur haute valeur nutritive. Elles renferment beaucoup de vitamines, notamment une quantité importante en α -tocophérol (5 mg/g) [48].

Le téfestrol est une préparation traditionnelle largement utilisée en Ouzbékistan pour soigner les dérèglements ovariens, la stérilité et les hémorragies post accouchement. C'est un mélange préparé à base des racines de *F. tenuisecta*. Il contient principalement des daucanes [49]. Les extraits à l'acétone et au mélange (1:1) méthanol-eau ainsi que l'huile essentielle de *F. orientalis* L. ont montré une importante activité antioxydante [34].

V.6. Métabolites secondaires isolés dans le genre *Ferula*

V.6.1. Sesquiterpènes de type Daucanes

Les sesquiterpènes, ayant un squelette daucane ou carotane ont été longtemps considérés comme constituants exclusifs de la famille des Apiaceae, avant d'être isolés dans d'autres familles botaniques notamment, les Asteraceae et les Rosaceae. Ils ont été par ailleurs identifiés dans quelques champignons et organismes d'origine marine. La majorité des composés ayant ce squelette ont été isolés entre 1950 et 1970. Ils ont été identifiés pour la première fois dans les fruits de *Daucus carota*. Par la suite ils ont été également signalés dans le genre *Laserpitium* [23]. Cependant, les daucanes restent largement plus répandus dans le genre *Ferula*.

Les structures daucanes comportent en général une ou deux insaturations sur un et/ou les deux cycles. Certaines positions sont oxygénées. Leur présence à l'état d'alcool libre est relativement rare, l'estérification est réalisée avec des groupements divers. Ils sont soit des acides aliphatiques à titre d'exemple : les acides acétique, angélique, valérique et époxyangélique soit des acides aromatiques tels que les acides benzoïque, salicylique, *p*-hydroxybenzoïque, *p*-méthoxybenzoïque (anisique), 3,4-dihydroxybenzoïque, vanillique, isovanillique, veratrique, 3,4,5-trihydroxybenzoïque, 3,4,5-triméthoxybenzoïque, *p*-hydroxycinnamique, et *p*-coumarique). Les structures de ces substituants sont illustrées dans la Figure I.7.

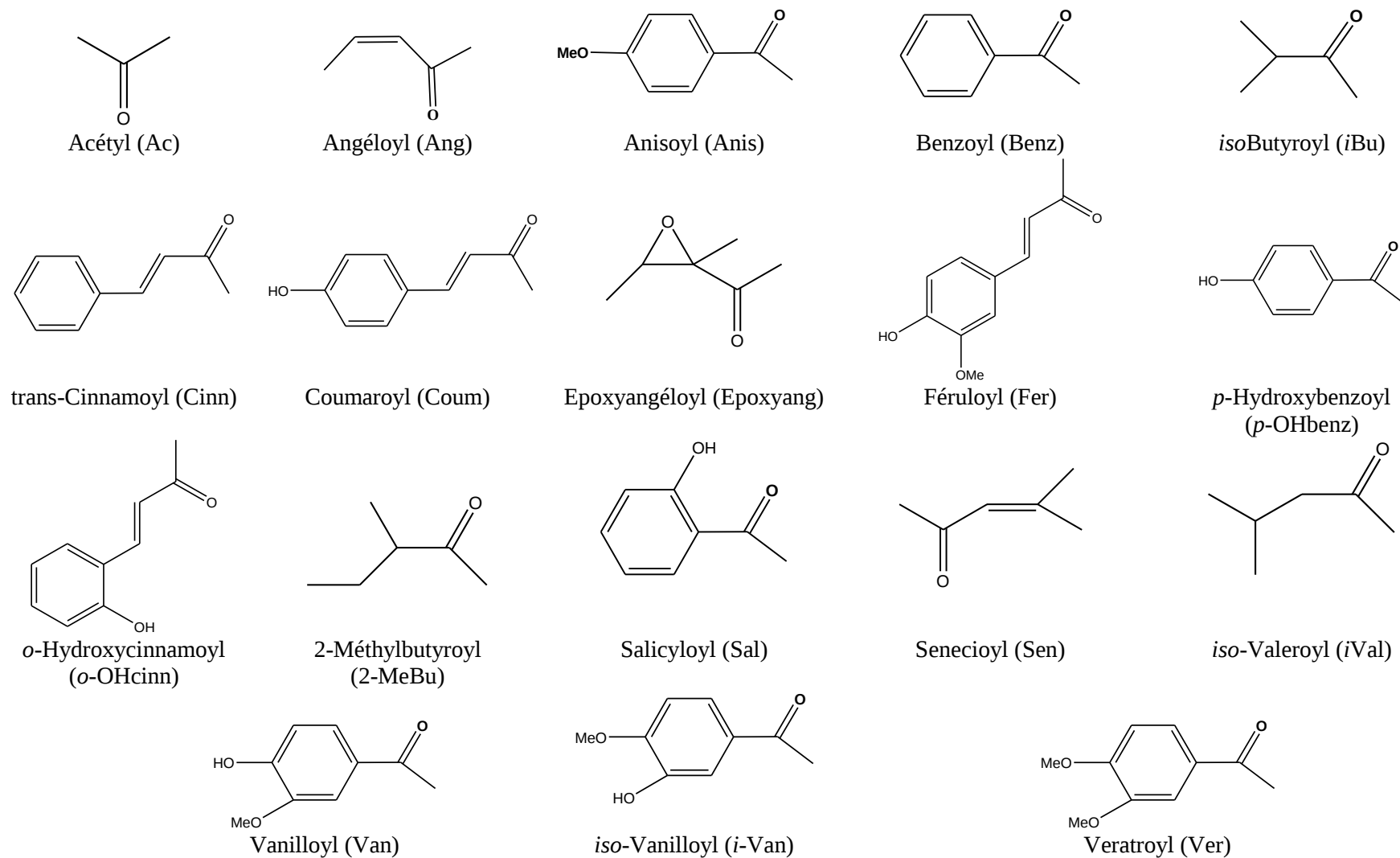


Figure I. 7 : Structure des substituents des daucanes les plus répandus

En plus de l'intérêt chimiotaxonomique que présentent ces daucanes, ils se sont avérés être des molécules dotées d'activités biologiques aussi intéressantes que variées. Les dérivés du jaeschkeanadiol (**2**) diversement substitués représentent le groupe le plus commun dans ce genre. Ils constituent le principe actif de plusieurs espèces de *Ferula* [50, 51].

L'activité antiproliférative sur des cellules cancéreuses du colon humain est rapportée pour quelques daucanes isolés à partir de *F. arrigoni* et *F. communis*. L'effet de ces composés a été donné dans l'ordre décroissant suivant : la férutinine (**3**), l'2 α -hydroxyférutidine (**4**), la férutidine (**5**), l'anisoysliol (**6**), la lapiférine (**7**) et le jaeschkeanadiol (**2**) [52].

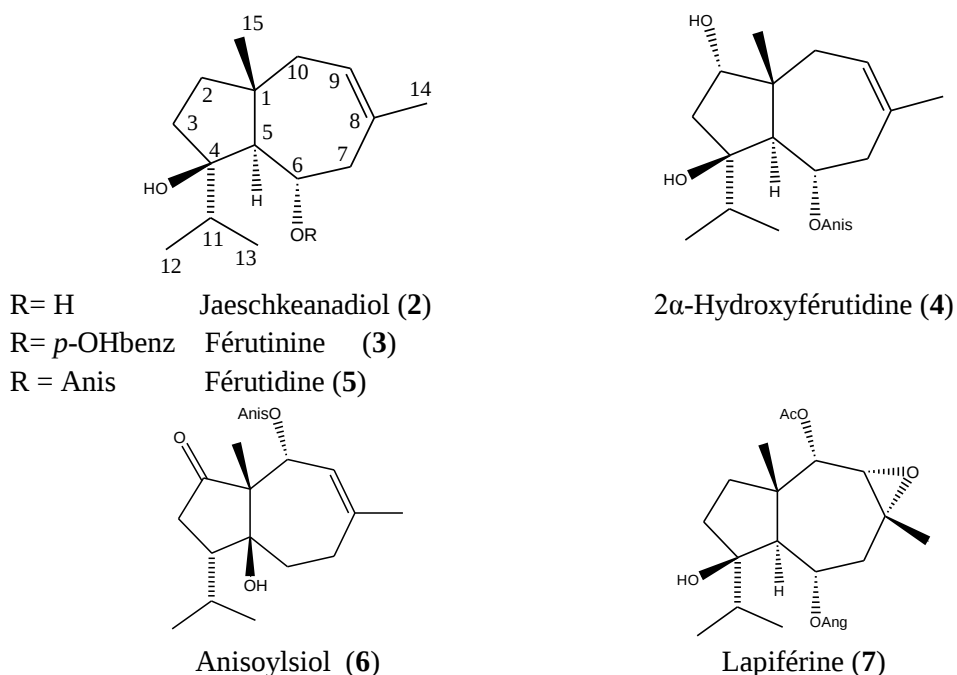


Figure I. 8 : Structures de quelques daucanes isolés du genre *Ferula*

L'espèce *F. hermonis* est caractérisée par une teneur particulièrement élevée en dérivés du jaeschkeanadiol [40]. L'extrait hexanique des racines de *F. hermonis* ainsi que les composés **8**, **9**, **10** et **4** issus de cet extrait ont été évalués pour leur activité oestrogénique, et particulièrement leur impact sur la prolifération des cellules cancéreuses du sein humain MCF-7. La férutinine (**3**) et l'extrait hexanique dont le composé **3** est le constituant majoritaire ont montré des activités dépendant de leur concentration. A faible concentration, ils ont présenté une activité proliférative alors que l'inverse est constaté à des concentrations plus élevées. Les 3 autres composés sont testés à la même concentration. Les composés **8** et **10** ont montré une activité proliférative importante tandis que le composé **9** avait un effet antiprolifératif [39].

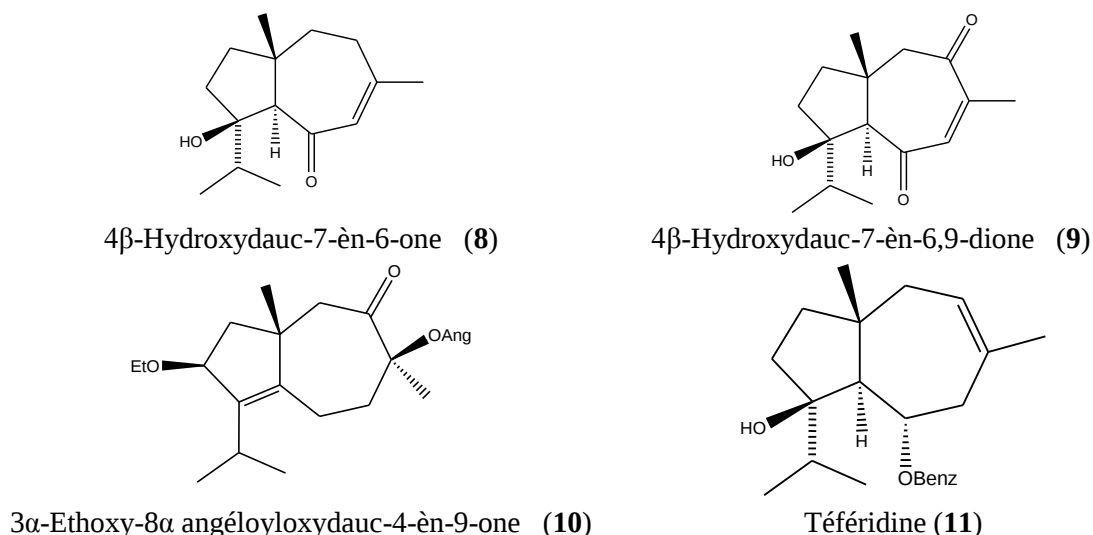


Figure I.9 : Structures de quelques daucanes issus de *F.hermonis* [39]

La relation structure–activité a été étudiée par Appendino *et al.* en 2005, pour la première fois. Différents homologues ont été synthétisés à partir de la férutinine (3), dans lesquels la partie OAc-cycle aromatique varie. Le jaeschkeanadiol (2), la téféredine (11) et la férutidine (5) n’ont montré aucun effet. Inversement, la férutinine (3) a montré une importante activité (approximativement 200 fois moins que l’estradiol) suivi de son dérivé acétylé la férsorine. La férutinine (3) pourrait être considérée comme un potentiel phytoestrogène à côté de la 8-prenylnaringénine et du coumestrol. Elle se lie aux deux récepteurs oestrogéniques ERα et ERβ d’une manière sélective. Des travaux ont révélé que la partie *p*-hydroxybenzoyle est la partie clé de l’activité de la férutinine. L’acide *p*-hydroxybenzoïque testé seul, s’est montré faiblement actif, ce qui prouve que cette activité est due probablement à l’estérification du daucane par la partie aromatique [52].

Une étude pharmacologique sur quelques daucanes du genre *Ferula* a montré que la férutinine (3) est capable de diminuer l’activité de la NO synthase et l’accumulation de l’inositol monophosphate dans la partie médiane du cerveau des rats [53].

D’autre part, ces composés sont décrits parmi les produits naturels actifs contre les *Staphylococcus*, à l’exemple de la férutinine (3) et du 14-*p*-hydroxybenzoyloxy-4β-hydroxydauc-8-ène (12) avec respectivement des CMI de 6,25 µg mL⁻¹ pour le composé 3 et 8 à 16 µg mL⁻¹ pour le 12. Après hydrolyse de la férutinine, l’effet diminue considérablement (CMI 125 µg mL⁻¹) à cause de la perte de la partie *p*-hydroxybenzoïque. L’acide benzoïque testé seul, était complètement inactif. Les deux parties sont donc indispensables pour assurer cette activité [54].

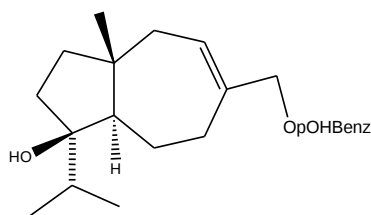


Figure I.10 : Structure du 14-*p*-hydroxybenzoyloxy-4 β -hydroxydauc-8-ène (12)

La férutinine (**3**) et la téféline (**11**) isolées des racines et rameaux de *F.kuhistanica*, se sont montrées actives sur les bactéries à Gram positif, notamment *Staphylococcus aureus*, *Salmonella epidermidis*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis*. Leurs activités étaient similaires à celles de l'ampicilline et du chloramphénicol utilisés comme des références [55].

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait méthanolique des racines de *F.kuhistanica* a par ailleurs permis l'isolement et l'identification d'un nombre important de daucanes avec des squelettes peu rencontrés dans les autres *Ferula*. Il s'agit principalement des kuhistanicols H (**13**) et J (**14**) [31] ainsi que les kuhistanicaols A (**15**) et B (**16**) [53].

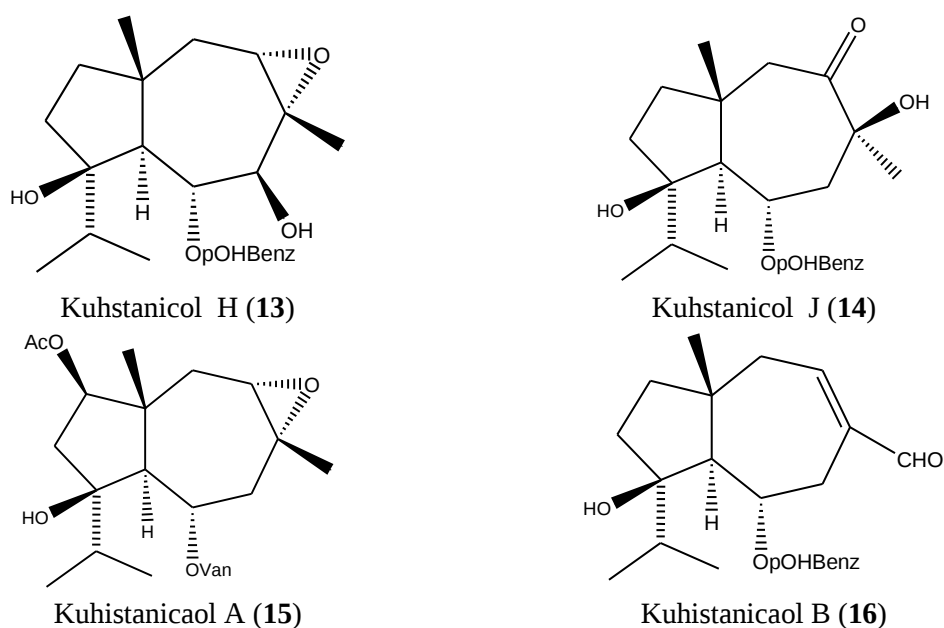


Figure I.11 : Structures de quelques daucanes issus de *F.kuhistanica* [37, 55]

Plusieurs daucanes ont fait l'objet d'une étude de leur influence sur la perméabilité des mitochondries et des biphasés lipidiques. Nous notons la férutinine (**3**), la férutidine (**5**), la ténuféridine (**17**), la lapidine (**18**) et la lapiférine (**7**). Les 3 premiers esters comportant une partie aromatique se sont montrés actifs, alors que les 2 autres estérifiés avec des groupements aliphatiques n'avaient aucun effet [56].

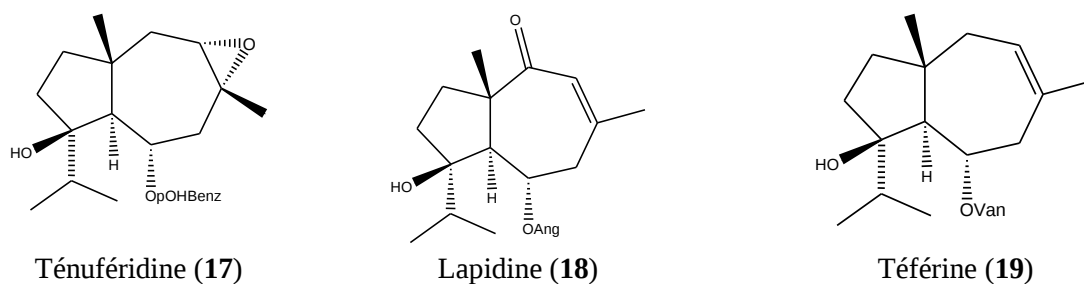


Figure I.12: Structures de quelques daucanes isolés du genre *Ferula*

L'effet de la férutinine (3) ainsi que de 3 molécules homologues, la férutidine (5), la 2 α -hydroxyférutidine (4) et la téférine (19) sur les propriétés ionophorétiques et apoptotiques du calcium dans des lignées de cellules humaine Jurkat T est évalué. La *p*-hydroxylation du cycle benzénique s'est avérée indispensable dans cette activité [57].

La lapidine (18) a été identifiée dans le genre *Ferula*, en l'occurrence dans les fruits de *F. communis*. Nous signalons que cette molécule a été d'abord répertoriée dans la famille des Asteraceae, notamment dans l'espèce *Amrosia trifida* [58].

L'étude phytochimique menée sur les rhizomes de *F. communis* native d'Arabie Saoudite par Yahia *et al.* a permis de caractériser un daucane, avec un nouveau type de substituant dans ce genre. Il s'agit du 14-(*o*-hydrocinnamoyloxy)-dauc-4,8-diène (20). Ce composé a manifesté une activité significative sur les bactéries Gram-positif notamment *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus durans* et *Enterococcus faecalis* [30].

A l'issue de l'investigation phytochimique de *F. linkii*, 2 dérivés du lasidiol ont été identifiés. Il s'agit du 10-acétyllasidiol (21) et du 10-veratrotyllasidiol (22) [23]. Les dérivés du lasidiol sont signalés aussi bien dans le genre *Ferula* que dans les Asteraceae. L'angéloyllasidiol (23) est présent dans les racines d'*Ambrosia trifida* (Asteraceae) à côté du 10-(2-méthylbutyroyl)lasidiol (24) [58]. Par ailleurs, on retrouve le 10-angéloyllasidiol (23) dans *Petroselinum sativum* (Apiaceae) [59] et dans *Lasianthus fruticosa* (Rubiaceae) [60]. L'espèce *Xanthium catharticum* (Asteraceae) renferme à son tour, le 10-anisoyllasidiol (25) [61].

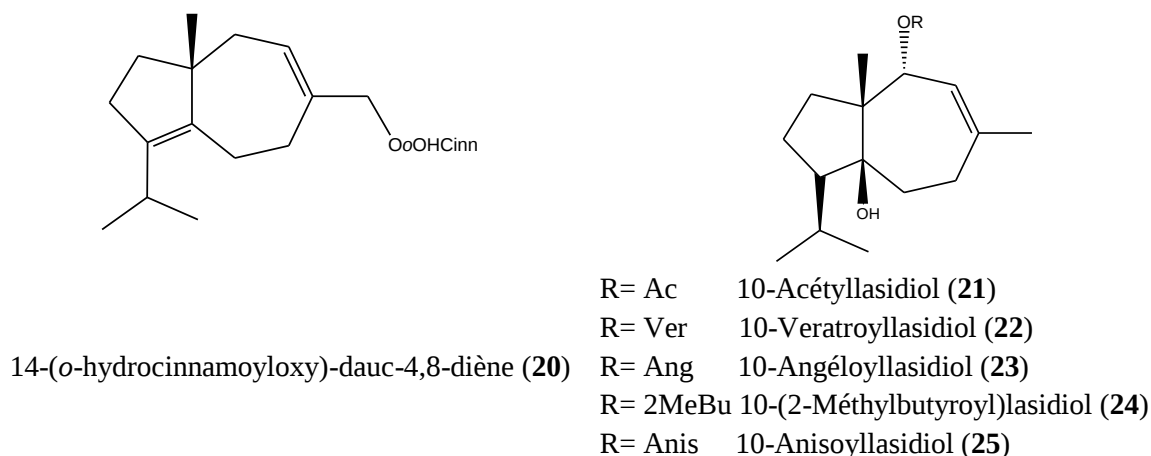


Figure I.13 : Structures de quelques daucanes issus de *F.linkii* [23]

Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *F. elaeochytris* a conduit à l'identification de 2 nouveaux daucanes les élaeochytrine A (26) et B (27). Le premier est substitué avec un groupement *ortho*-aminobenzoyl (acide anthranilique), très peu commun dans les produits naturels. L'élaeochytrine A (26), s'est montrée particulièrement cytotoxique sur les lignées de cellules leucémiques K562R et DA1-3b/M2^{BCR-ABL} [62].



Figure I.14 : Structures des élaeochytrine A et B issues de *F.eleaocytris* [61]

Concernant les isodaucanes, nous avons répertorié une seule molécule signalée dans les rhizomes de *F. Jaeschkeana*. Il s'agit du férujaesenol (28) [63].

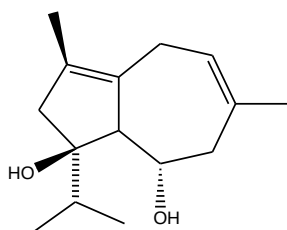
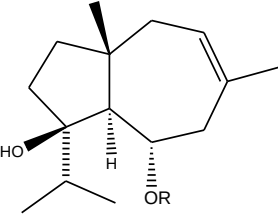
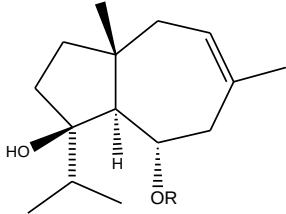
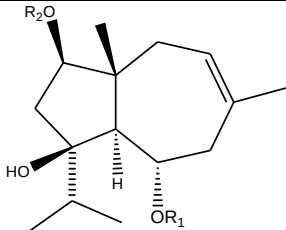
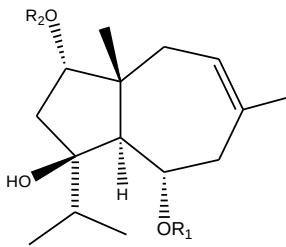
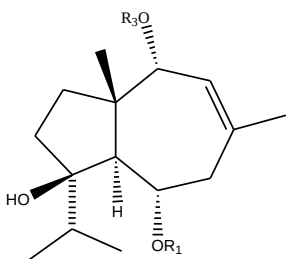


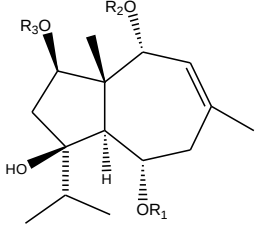
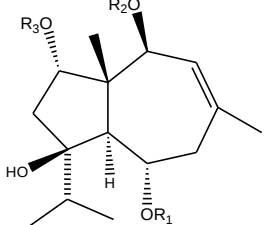
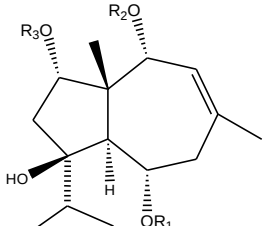
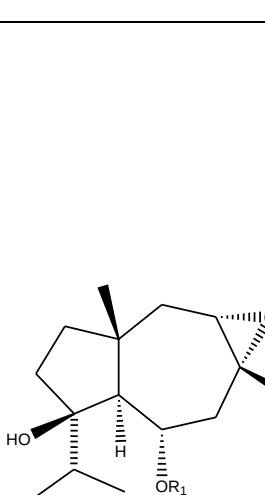
Figure I.15 : Structure du Ferujaesenol (28)

De nombreux exemples de daucanes identifiés dans le genre *Ferula* sont regroupés dans le tableau récapitulatif I.4.

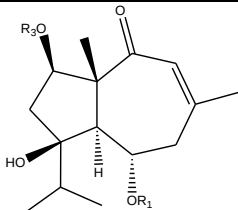
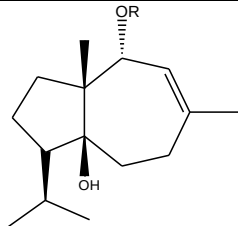
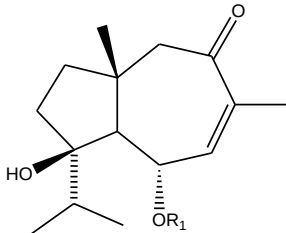
Tableau I.4 : Daucanes identifiés dans le genre *Ferula*

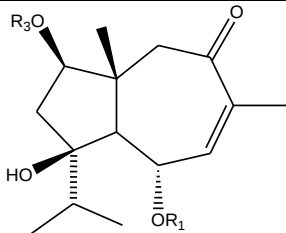
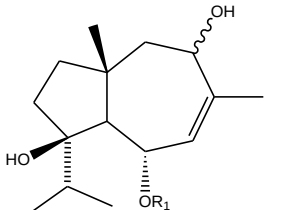
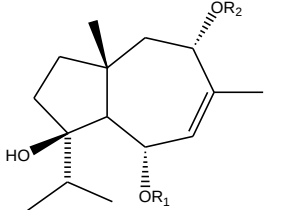
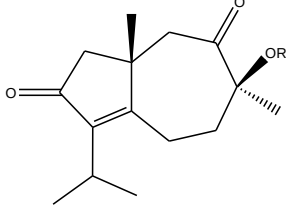
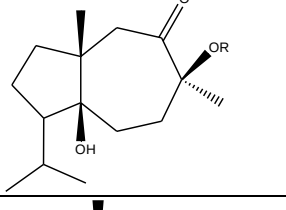
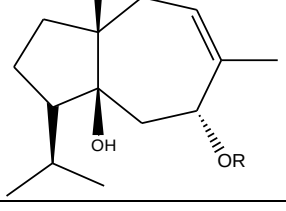
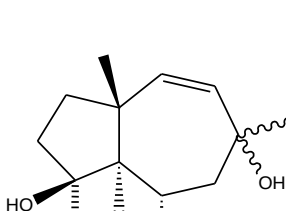
Structure	Molécule	Espèces (organes)	Référence
	R=H (Jaeschkeanadiol, Férutinol) (2)	<i>F. jaeschkeana</i> (rhiz) <i>F. communis</i> (fru) <i>F. hermonis</i> (rac) <i>F. sinaica</i> <i>F.kuhistanica</i>	[63,64] [50,65] [38,39] [23] [37]
	R= Anis (Férutidine) (5)	<i>F. jaeschkeana</i> <i>F. communis</i> <i>F. hermonis</i> <i>F. lancerottensis</i> <i>F. arrigonii</i> (rac) <i>F. sinaica</i> <i>F. communis</i> (lat, rac, fr) <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. elaeochytris</i> (pa) <i>F.kuhistanica</i> <i>F.linkii</i> <i>F. rigidula</i>	[26] [50, 65] [38, 39] [66] [67] [68] [29, 69] [64] [33] [37] [70] [23]
	R= Benz (Téférine) (11)	<i>F.elaeochytris</i> (pa) <i>F.tenuisecta</i> <i>F.hermonis</i> (rac) <i>F.communis</i> (rac) <i>F.jaeschkeana</i> <i>F.sinaica, F.rigidula</i>	[33] [23] [38, 39] [51] [23] [23]
	R= <i>p</i> -OHbenz (Férutinine) (3)	<i>F. communis</i> (lat, rac,fr) <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. elaeochytris</i> (pa) <i>F. hermonis</i> (rac) <i>F. kuhistanica</i> <i>F.lancerottensis</i> <i>F. rigidula</i> <i>F. orientalis</i> <i>F. sinaica</i> <i>F. tenuisecta</i>	[29, 69] [64] [33] [38, 39] [37] [23] [23] [23] [23] [23]
	R= Fer (29)	<i>F. communis</i> (rac)	[51]
	Sal (30)	<i>F. elaeochytris</i> (pa)	[33]
	Van (Téférine) (19)	<i>F.sinaica</i> <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. elaeochytris</i> <i>F.kuhistanica</i> <i>F. hermonis</i> (rac) <i>F.communis</i> <i>F. orientalis</i> <i>F. rigidula</i> <i>F.tenuisecta</i>	[71] [64] [33] [37] [38, 39] [65] [23] [23] [33]
	Ang (31)	<i>F. communis</i> (rac, fr) <i>F. elaeochytris</i> (pa) <i>F. jaeschkeana</i>	[50,51] [33] [23]

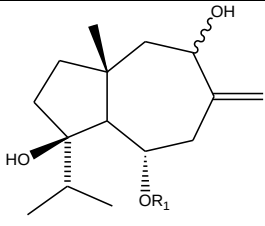
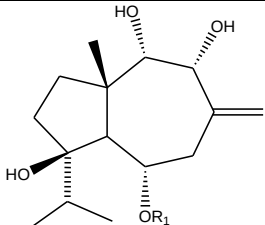
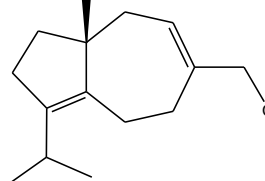
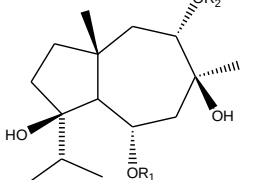
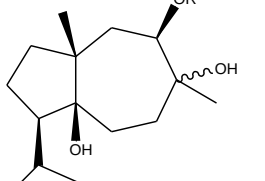
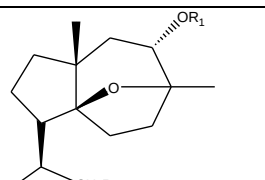
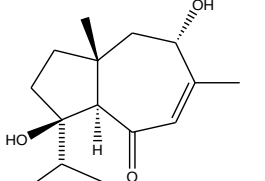
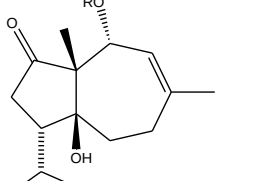
	<i>i</i> -Val (32) Cinn (33) Coum (34)	<i>F. linkii</i> <i>F. linkii</i> <i>F. rigidula</i> <i>F. communis</i> (rac)	[70] [72] [23] [65]
	3,4-diOHBenz (35) <i>i</i> -Van (Akiféridine) (36)	<i>F. jaeschkeana</i> <i>F. akitschkensis</i> <i>F. tenuisecta</i>	[23] [23] [33]
	R = 2-MeBu (37) Ver (Akiférine) (38)	<i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. linkii</i> <i>F. akitschkensis</i> <i>F. arrigonii</i> (rac)	[70,23] [50, 65] [64] [70] [23] [67]
	R=3,4,5-triméthoxybenz (Palliféridine) (39) 2-hydroxybenz (40)	<i>F. pallida</i> <i>F. jaeschkeana</i> , <i>F. Rigidula</i> , <i>F. elaeochytris</i>	[33] [23] [23] [23]
	R ₁ = R ₂ = H (Akichénol) (41) R ₁ =Anis, R ₂ = H(42)	<i>F. jaeschkeana</i> (rhiz) <i>F. sinaica</i>	[63] [60]
	R ₁ = R ₂ = H (2α-Hydroxy-jaescheanadiol) (43) R ₁ =Anis, R ₂ = H (6α-Anisoyl-2α-hydroxy-jaescheanadiol) (4)	<i>F. communis</i> (fr) <i>F. communis</i> <i>F. arrigonii</i> (rac)	[50] [65] [67]
	R ₁ = Benz, R ₂ = Ac (44) R ₁ = H, R ₂ = Ac (45) R ₁ = Anis, R ₂ = Ac (46) R ₁ = p-OHbenz, R ₃ = Ac (47) R ₁ = Ang, R ₂ = Ang (48)	<i>F. communis</i> (rhiz, rac) <i>F. communis</i> (rhiz, rac) <i>F. communis</i> <i>F. communis</i> <i>F. communis</i>	[29, 30] [29, 30] [65] [50] [50]
	R ₁ = R ₂ = H (Férulinkiol) (49) R ₁ = Anis, R ₃ = Ac (50) R ₁ = iVal, R ₃ = Ac (51)	<i>F. communis</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac) <i>F. linkii</i> <i>F. latipinna</i>	[65] [30] [70] [23]
	R ₁ = H, R ₃ = Ang (52) R ₁ = Anis, R ₃ = H (53) R ₁ = 2-MeBu, R ₃ = H (54) R ₁ = Ang, R ₃ = H (55) R ₁ = Ver, R ₃ = Ang (56)	<i>F. communis</i> (rac) <i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. arrigonii</i> (rac) <i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> <i>F. communis</i> <i>F. arrigonii</i> (rac) <i>F. latipinna</i> , <i>F. pallida</i> <i>F. communis</i> (rac)	[65] [72] [65] [72] [30] [67] [23] [23] [23] [70] [30]

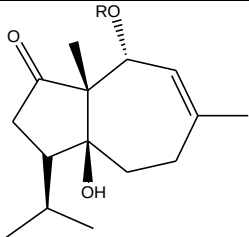
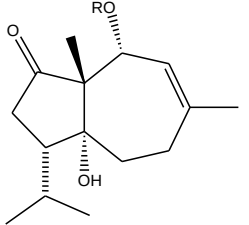
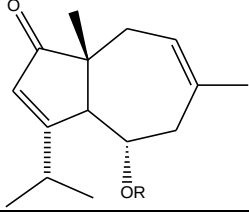
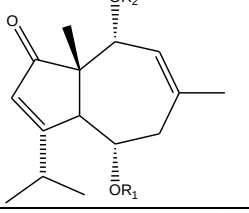
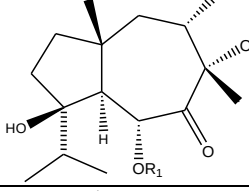
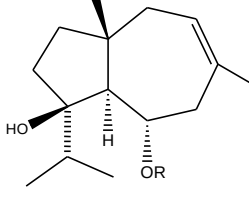
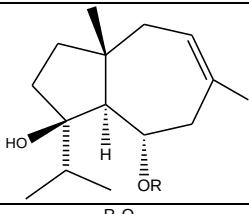
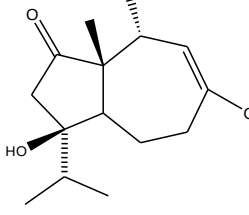
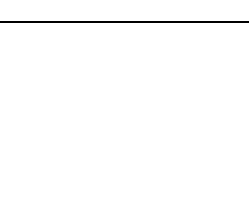
	$R_1 = \text{Ang}, R_3 = \text{Ang}$ (Pallidine) (57) $R_1 = \text{Benz}, R_3 = \text{Ang}$ (58) $R_1 = p\text{-OHbenz}, R_3 = \text{Ang}$ (Fértidine) (59) $R_1 = \text{Anis}, R_3 = \text{Ang}$ (60)	<i>F. communis</i> <i>F. arrigonii</i> (rac) <i>F. pallida</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. latipinna</i> <i>F. sinaica</i> <i>F. tingitana</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac) <i>F. latipinna</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. tingitana</i> (rac)	[23] [67] [60] [30] [23] [23] [73] [30] [23] [30] [23] [30] [74]
	$R_1 = R_2 = \text{Ang}, R_3 = \text{H}$ (Tingitanol) (61) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{Ang}, R_3 = \text{Ac}$ (62) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{Ang}$ (63) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Ang}$ (64) (Desoxodehydrolaserpitine) (65)	<i>F. tingitana</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac) <i>F. tingitana</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac) <i>F. tingitana</i> (rac) <i>F. tingitana</i> (rac)	[74] [30] [73] [30] [73] [73]
	$R_1 = \text{Anis}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Ac}$ (2 α -Acétyl-6 α -anisoyl -10 β -hydroxyjaeschkeanadiol) (66) $R_1 = \text{Anis}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{Ac}$ (67)	<i>F. communis</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac) <i>F. sinaica</i>	[50] [50] [23]
	$R_1 = \text{Anis}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{Ac}$ (2 α , 10 α -Diacétyl-6 α -anisoyljaeschkeanadiol) (68) $R_1 = \text{Ver}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{Ac}$ (69) $R_1 = \text{Anis}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Ac}$ (70) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{H}$ (71) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{Ac}$ (72)	<i>F. communis</i> (rac) <i>F. communis</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac) <i>F. communis</i> (rac)	[65] [30, 65] [65] [65]
	$R_1 = \text{H}$ (Epoxyjaeschkeanadiol) (73) Benz (74) <i>p</i>-OHbenz (jaeschkeanine ou ténuféridine) (17) Van (75) Anis (76) <i>i</i> -Val (77)	<i>F. hermonis</i> <i>F. latipinna</i> <i>F. linkii</i> <i>F. hermonis</i> <i>F. sinaica</i> <i>F. communis</i> <i>F. hermonis</i> (rac) <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. lancerottensis</i> (pa) <i>F. kuhistanica</i> <i>F. orientalis</i> <i>F. elaeochytris</i> <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. linkii</i> <i>F. lancerottensis</i> <i>F. rigidula</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. linkii</i>	[38, 39] [23] [70] [25] [38, 39] [65] [39] [23] [66] [55] [23] [33] [23] [55] [70] [66] [23] [55] [70]

	Ver (78)	<i>F. linkii</i>	[70]
	$R_1 = R_2 = H$ (Lapiférol) (79) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = H$ (80) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{Ac}$ (Lapiférine) (7)	<i>F. latipinna</i> <i>F. lapidosa, F. linkii</i> <i>F. latipinna</i> <i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. arrigonii</i> (rac)	[23] [70, 23] [23] [70] [65] [67]
	$R_1 = \text{Van}, R_3 = \text{Ac}$ (Kuhistanicaol A) (15) $R_1 = \text{Ver}, R_3 = \text{Ac}$ (Lapiférinine) (81)	<i>F. kuhistanica</i> (fr) <i>F. lapidosa</i>	[37] [23]
	$R_1 = \text{Ver}, R_2 = H, R_3 = \text{Ac}$ (Lapidolinine) (82) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{Ac}$ (83)	<i>F. lapidosa</i>	[23]
	$R = p\text{-OHbenz}$ (Kuhstaniel H) (13)	<i>F. kuhistanica</i> (fr)	[37]
	$R = \text{Van}$ (Kuhstaniel I) (84)	<i>F. kuhistanica</i> (fr)	[37]
	$R = p\text{-OHbenz}$ (Kuhstaniel J) (14)	<i>F. kuhistanica</i> (fr)	[37]
	$R_1 = H$ (10-Oxojaeschkeanadiol) (Lapidol) (85) Ang (Lapidine) (18)	<i>F. linkii</i> <i>F. sinaica</i> <i>F. communis</i> (fr) <i>F. latipinna</i> <i>F. linkii</i> <i>F. lapidosa</i>	[23] [71] [50] [23] [23] [23]

	<i>i</i> -Bu (86) <i>i</i> -Val (87) Val (88) Anis (89) Ver (Férkuchine) (90) <i>p</i>-OHbenz (91) Van (92) 3,4,5-triméthoxybenz (Palliférine) (93)	<i>F. linkii</i> <i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> <i>F. communis</i> <i>F. linkii</i> <i>F. communis</i> (rac) <i>F. kuhistanica</i> <i>F. linkii</i> <i>F. sinaica</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. latipinna</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. pallida</i>	[70] [70] [50] [50, 65] [70] [23] [75] [23] [23] [55] [55] [23] [55] [23]
	R ₁ = Ang, R ₃ = Ang (2β-Angéloyloxylapidine) (94)	<i>F. sinaica</i> (rac)	[71]
	R = H (Lasidiol) Ac (21) Ver (22)	<i>F. linkii</i> <i>F. linkii</i>	[23]
	R ₁ = H (Lancerodiol) <i>p</i>OHbenz (95) Van (96) Anis (97) Ver (98) Cinn (99) Coum (100)	<i>F. lancerottensis</i> (pa) <i>F. sinaica</i> (rac) <i>F. lancerottensis</i> (pa) <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. linkii</i> <i>F. rigidula</i> <i>F. orientalis</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. rigidula</i> <i>F. kuhistanica</i> <i>F. orientalis</i> <i>F. linkii</i> <i>F. lancerottensis</i> (pa) <i>F. linkii</i> <i>F. sinaica</i> <i>F. rigidula</i> <i>F. rigidula</i>	[66] [76, 71] [66] [23] [77] [23] [55] [23] [55] [23] [77] [66] [77] [78] [23] [23]

	$R_1 = p\text{-OHBenz}$, $R_3 = \text{H}$ (2 β -Hydroxy-6 α - <i>p</i> -hydroxybenzoyllancerodiol) (101) $R_1 = \text{Anis}$, $R_3 = \text{H}$ (102)	<i>F.sinaica</i> (rac)	[71]
	$R_1 = \text{H}$, $\beta\text{-OH}$ (Lancerotriol) (103) <i>p</i> -OHBenz, $\beta\text{-OH}$ (104) <i>p</i> -OHBenz, $\alpha\text{-OH}$ (105) Anis, $\beta\text{-OH}$ (106) Van, $\beta\text{-OH}$ (107) Van, $\alpha\text{-OH}$ (108)	<i>F. lancerottensis</i> (pa) [66] <i>F. sinaica</i> [23] <i>F. kuhistanica</i> [55] <i>F. kuhistanica</i> [37] <i>F. elaeochytris</i> (pa) [33] <i>F. rigidula</i> [23] <i>F. kuhistanica</i> [55] <i>F. kuhistanica</i> [55]	
	$R_1 = p\text{-OHbenz}$, $R_2 = \text{Ac}$ (9 α -Acétoxy-4 β -hydroxy-6 α - <i>p</i> -hydroxybenzoyldauc-7-ène) (109)	<i>F. sinaica</i> (rac)	[68]
	$R = \text{H}$ (Wébbiol) (110) Epoxyang (111) Ang (112)	<i>F.linkii</i> [77] <i>F.linkii</i> [77] <i>F. communis</i> (fr) [50] <i>F. arrigoni</i> (rac) [67] <i>F. latipinna</i> [23]	
	$R = \text{H}$ (Félikol) (113) Ang (114)	<i>F. latipinna</i> [23] <i>F.linkii</i> [77] <i>F. latipinna</i> [23] <i>F. tenuisecta</i>	
	$R = \text{H}$ (Carotdiol) (115) Ac (116) Ver (117)	<i>F.linkii</i>	[79]
	$R = \text{H}$, $\alpha\text{-OH}$ (Férutriol) (118) $R = p\text{-OHbenz}$, αOH (Kuhistanicaol G) (119) <i>i</i> -Val (120) Van, $\beta\text{-OH}$ (121) Van, $\alpha\text{-OH}$ (122)	<i>F. sinaica</i> [60] <i>F. jaeschkeana</i> [23] <i>F. kuhistanica</i> [55] <i>F. linkii</i> [77] <i>F. rigidula</i> [23] <i>F.kuhistanica</i> (pa) [37] <i>F. sinaica</i> (rac) [68] <i>F. rigidula</i> [23] <i>F. kuhistanica</i> [37]	

	R = H, α -OH (Isolancerotriol) (123) p -OHBenz, α -OH (Féruone) (124) i -Val, α -OH(125) p -OHBenz, β -OH(126)	<i>F.sinaica</i> <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. linkii</i> <i>F.sinaica</i> (rac) <i>F. rigidula</i> <i>F.sinaica</i> (rac)	[71] [23] [23] [71] [23] [71]
	R = Ang (6 α -Angéloyl-10 α -hydroxyisolancerotriol) (127) = i -Val (128)	<i>F. linkii</i> <i>F. linkii</i>	[23] [23]
	R = o -OHCinn (14- o -Hydroxycinnamoyloxydauc-4,8-diène) (129) = Anis (130)	<i>F.communis</i> (rhiz) <i>F.communis</i> (rac) <i>F. tingitana</i> (rac)	[29] [80] [73]
	R ₁ = H, R ₂ = p -OHBenz (4 β ,8 β ,9 α -Trihydroxy-6 α - p -hydroxybenzoyldaucane) (131) R ₁ = p -OHBenz, R ₂ = H(132)	<i>F.sinaica</i> (rac) <i>F.sinaica</i> <i>F.kuhistanica</i> (pa)	[71] [71] [55]
	Carotol (133) R= H, α -OH(134) Anis, α -OH(135) Ang, α -OH(136) 3,4,5-triméthoxybenz, β -OH(137)	<i>F. linkii</i> <i>F. lancerottensis</i> (pa) <i>F. linkii</i> <i>F. pallida</i>	[23] [66] [23] [23]
	R ₁ = R ₂ = H (Daucol) (138) R ₁ = H, R ₂ = Van(139)	<i>F. linkii</i> <i>F. rigidula</i>	[79] [60]
	Féruone (140)	<i>F. jaeschkeana</i>	[23]
	R = H (Siol) (141) Anis (6) p -OHBenz (142) Ac(143) Ang (144)	<i>F.communis</i> (lat, rac, fr) <i>F. communis</i> <i>F.communis</i> (lat, rac) <i>F.communis</i> (lat, rac)	[69,65] [51] [69, 80] [69, 80]

	R = Anis (Fércomine) (145)	<i>F. tingitana</i> (rac)	[73]
	R = Ac (10β-Acétoxy-5α-hydroxydauc-8-én-2-one) (146) = Ang (147)	<i>F. communis</i> (rac)	[80]
	R = Anis (6α-Anisoyloxydauc-3,8-dién-2-one) (148)	<i>F. communis</i> (rac)	[33]
	R ₁ = Ang, R ₂ = Ang (6α,10α-Diangéloyloxydauc-3,8-dién-2-one) (149)	<i>F. communis</i> (rac)	[33]
	R = <i>p</i> -OHBenz (4β,9α,8α-Trihydroxy-6- <i>p</i> -hydroxybenzoyloxydauc-7-one) (150)	<i>F. jaeschkeana</i>	[23]
	R = <i>p</i> -OHBenz (Féruginidine) (151)	<i>F. jaeschkeana</i>	[23]
	R = Anis (6α-Anisoyloxy-4β,14-dihydroxydauc-8-éne) (152)	<i>F. kuhistanica</i> (pa, rac)	[55]
	R = <i>p</i> -OHBenz (Kuhistanicaol B) (16)	<i>F. kuhistanica</i> (pa, rac)	[55]
	R ₂ = Ang (10α-Angeloyloxy-4β,14-dihydroxydauc-8-én-2-one) (153)	<i>F. sinaica</i>	[23]

	$R_2 = \text{Ang}$ (10-Angéloyloxy-5 α ,14-dihydroxydauc-8-ène-2-one) (154)	<i>F. sinaica</i>	[23]
	$R = p\text{-OHBenz}$ (6 α -p-Hydroxybenzoyloxy-4 α -hydroxydauc-8-ène-2-one) (155) Anis (156)	<i>F. jaeschkeana</i> <i>F. arrigonii</i> (rac) <i>F. jaeschkeana</i>	[23] [67] [23]
	14-Hydroxydauc-6-ène (157)	<i>F. sinaica</i> (rac)	[68]
	$R_1 = R_2 = \text{H}$ (Torosol) (158) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{Ang}$ (159) $R_1 = \text{Ang}, R_2 = \text{Et}$ (10)	<i>F. rigidula</i> <i>F. hermonis</i> (rac)	[23] [37]
	4 β ,6 α ,9 β -Trihydroxy-7,8-époxydaucane (160)	<i>F. jaeschkeana</i>	[23]
	$R = i\text{-Val}$ (Isovaleroyl-14,8-époxy-lancerotétrol) (161)	<i>F. linkii</i>	[23]
	$R = \text{Anis}$ (14-p-Anisoyloxy-4 α ,5 α -époxydauc-8-ène) (162)	<i>F. communis</i> (rac) <i>F. tingitana</i> (rac)	[33] [73]
Fr = fruits rhiz = rhizomes Rac = racines Pa = partie aérienne Lat = latex			

V.6.2. Sesquiterpènes coumariniques

Les coumarines sont des molécules dérivées du phénylpropane, très répandues chez les Apiaceae. Elles sont représentées par les hydroxycoumarines comme l'umbelliférone (**163**) et l'esculétine (**164**) (Figure I.16). Les coumarines simples sont moins répandues dans cette famille, de même que les pyranocoumarines. Elles sont également présentes dans plusieurs genres d'Asteraceae d'où leur importance du point de vue chimiotaxonomique [81].



Figure I.16 : Structures de l'umbelliférone et l'esculétine

Les dérivés de la structure 4-hydroxy-3-farnésylcoumarine ou féruléol (**165**) sont répandus dans le genre *Ferula*, mais la structure la plus typique de ce genre est l'umbelliférone 7-O-terpène éther. La partie sesquiterpénique est très souvent un squelette bicyclique drimane, comme la farnésiférone A (**166**) ou un groupement farnésyl comme l'umbelliprénine (**167**). Cette dernière peut être plus ou moins oxygénée.

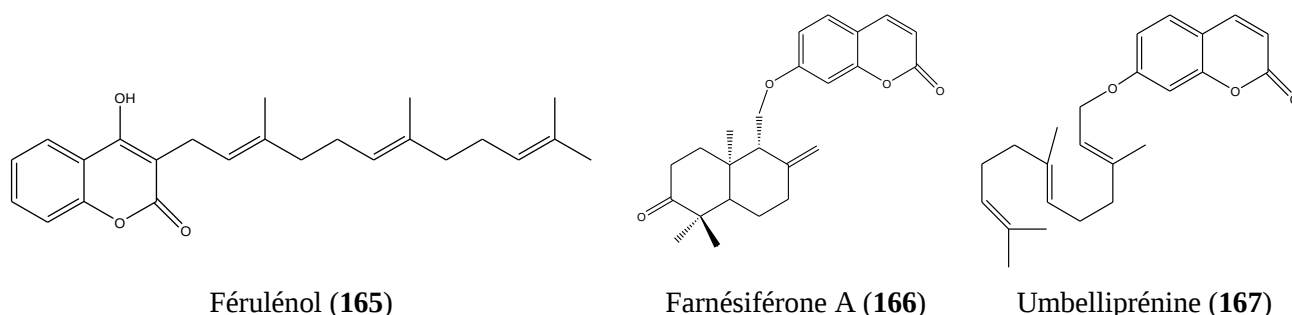


Figure I.17 : Structures de quelques Sesquiterpènes coumariniques isolés du genre *Ferula*

De nombreuses activités biologiques ont été mises en évidence pour cette classe de composés ce qui a incité à multiplier les études sur les espèces du genre *Ferula*. L'équipe de Barthomeuf a décrit quelques sesquiterpènes coumariniques des *Ferula*, comme agents modulateurs des protéines impliquées dans le mécanisme de la Résistance aux Multiples Drogues (MDR) [82]. Ils ont par ailleurs, démontré l'activité antiproliférative de l'auraptène (**168**) et de l'umbelliprénine sur des cellules cancéreuses humaines de cinq lignées différentes, notamment des cellules M4Beu (*metastatic pigmented malignant melanoma*). Nous notons que ces deux molécules sont toutes les deux des composés majoritaires de l'espèce *F. szowitsiana*. Ils ont suggéré que l'apport de cette molécule par voie médicamenteuse ou par la consommation d'aliments riches en umbelliprénine et en auraptène, pourrait prévenir l'évolution et la récurrence de quelques formes de cancers.

L'umbelliprénine s'est montrée plus active que l'auraptène. La partie aliphatique dans cette molécule est responsable de la majorité des activités notamment la cytotoxicité sur les cellules cancéreuses, comme dans le cas des flavonoïdes, les xantones prénylées et les phénylpropanoïdes [83].

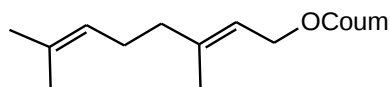


Figure I.18: Structure de l'auraptène (168)

Le féruléol (165) est doté d'une action antivitamine K ou anticoagulante. Il est à l'origine de la toxicité du chémotype toxique de *F. communis*. L'ingestion de cette plante cause une hémorragie mortelle appelée : le mal de ferula, le férulisme ou « *ferulosis* » en anglais. Elle est responsable de pertes considérables de bétail notamment en Sardaigne et sur d'autres îles voisines [51, 60, 69]. Les nombreux travaux réalisés sur *F. communis* ont montré qu'il existait une intraspécificité dans l'espèce. La composition du chémotype toxique est prédominée par les hydroxycoumarines prénylées alors que les daucanes sont plus communs dans l'autre chémotype [50].

Le féruléol a montré un large spectre d'activité contre les bactéries Gram-positif notamment *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. durans* et *E. fecalis* et sur les individus du genre *Mycobacterium* dont nous citons, *M. intracellulare*, *M. xenopei*, *M. chelonae* et *M. smegmatis* [29].

L'étude de l'effet mitochondrial du féruléol a montré qu'il inhibait la synthèse de l'ATP même à de faibles concentrations. Ce dysfonctionnement serait à l'origine de la toxicité des *Ferula* [84].

Parmi les molécules signalées dans les racines de *F. persica*, l'umbelliprénine a montré une activité antibactérienne importante et un pouvoir de décoloration de la bactérie Gram-négatif *Serratia marcescens*. Ces effets ont été constatés dans le cas de la badrakémone (169), la farnésiférone A, les farnésiférol A (170) et B (171), ce qui suggère que la partie aliphatique de l'umbelliprénine joue encore un rôle important dans ces 2 activités [85].

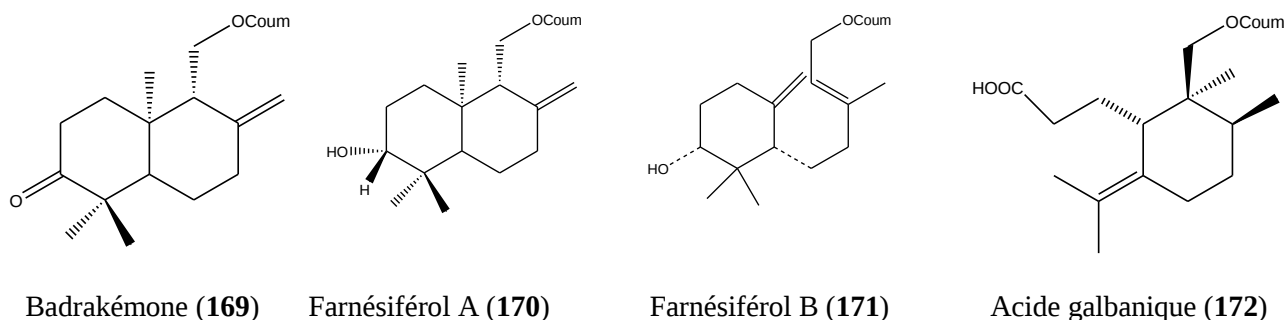


Figure I.19 : Structures de quelques Sesquiterpènes coumariniques isolés du genre *Ferula*

Dans l'optique de rechercher de nouvelles molécules actives sur les promastigotes de la leishmaniose, les coumarines prénylées isolées de l'extrait acétonique des racines de *F. szowitsiana* ont été testées. L'auraptène et l'umbelliprénine ont été modérément actives avec respectivement des CI_{50} de 4.9 $\mu\text{g/mL}$ et 5.1 $\mu\text{g/mL}$, tandis que l'acide galbanique (172) n'était que faiblement actif [86].

Dans une autre étude du même extrait, son impact et celui de l'acide galbanique ont été évalués sur l'activité antibactérienne de la pénicilline G et de la céphalexine contre *Staphylococcus aureus*. L'acide galbanique utilisé avec une concentration inhibitrice de 100 $\mu\text{g/mL}$ réduisait la CMI de la pénicilline G de 64 à 1 $\mu\text{g/mL}$ et celle de la céphalexine de 128 à 1 $\mu\text{g/mL}$. Cet effet considérable suggère la possible utilisation de cet acide en combinaison dans la thérapie contre *S.aureus* par les 2 antibiotiques précédents [87].

L'étude phytochimique des racines de *F. sinaica* a permis l'isolement de 2 nouveaux sesquiterpènes coumariniques présentant chacun un squelette original. Ces 2 composés sont importants du point de vue chimiotaxononique. Il s'agit de l'acide férulsinaïque (173) [51] et du férusinol (174). A côté de ce dernier, un stéréoisomère de la samarcandone (175) a été identifié. L'activité antibactérienne des composés 174 et 175 a été évaluée sur des bactéries Gram-négatif, en l'occurrence *Serratia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli* et des bactéries Gram-positif dont *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*. Le férusinol a montré une importante activité aussi bien sur les Gram-positif, particulièrement sur *Bacillus cereus* que sur les Gram-négatif. Le stéréoisomère de la samarcandine (175) a été le plus actif sur les Gram-négatif, alors qu'il était inactif sur les espèces Gram-positif [88].

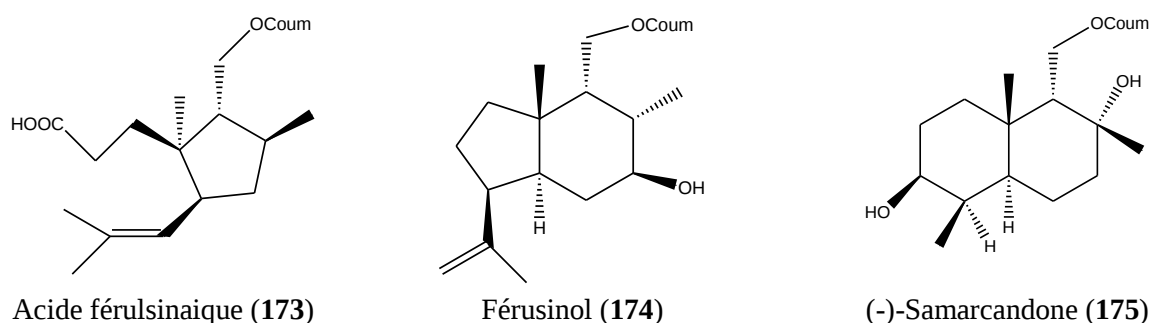
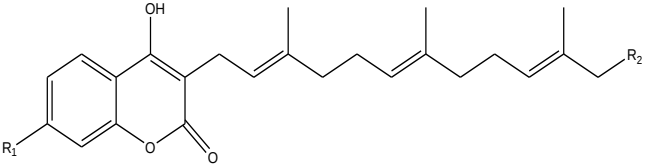
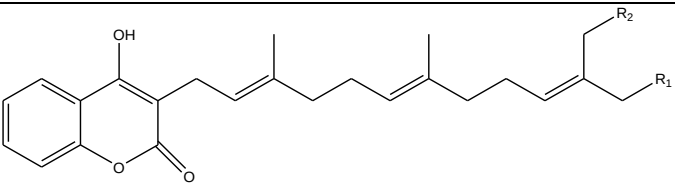
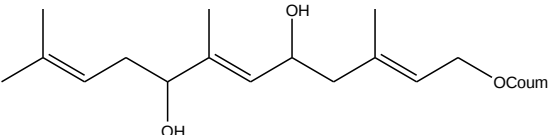
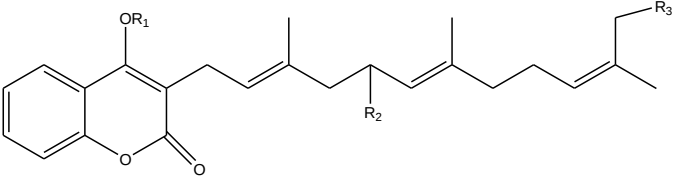
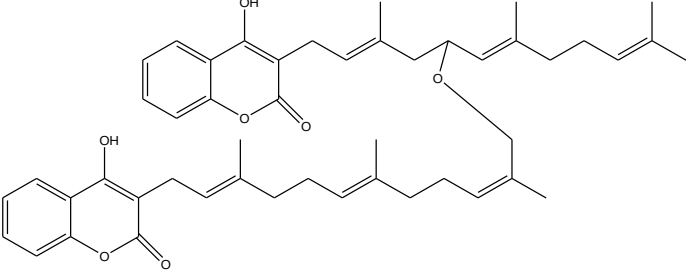
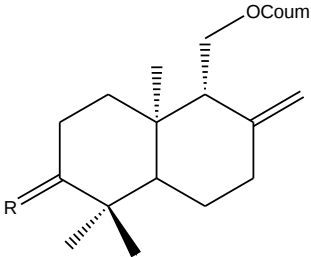
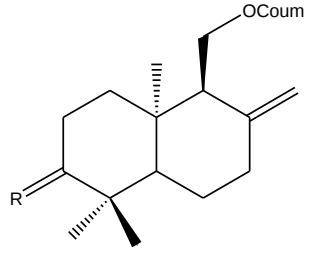
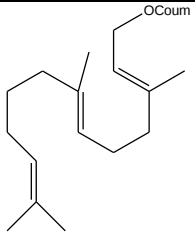


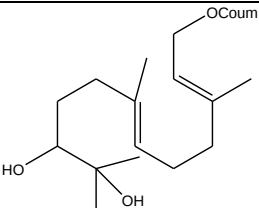
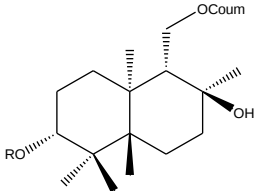
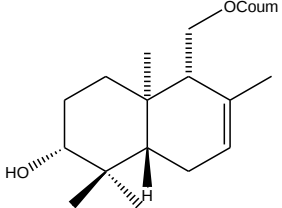
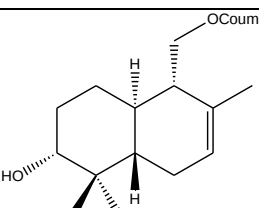
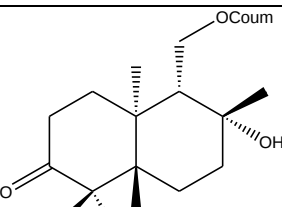
Figure I.20 : Structures de sesquiterpènes coumariniques isolés de *F. sinaica* [51, 88]

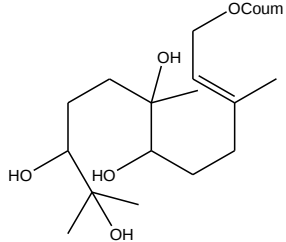
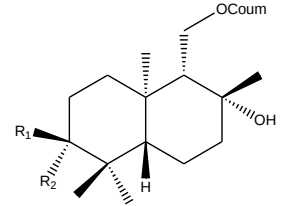
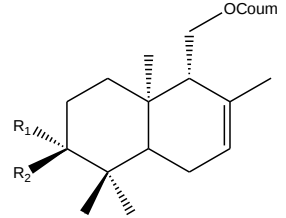
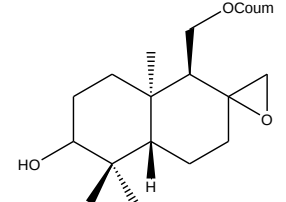
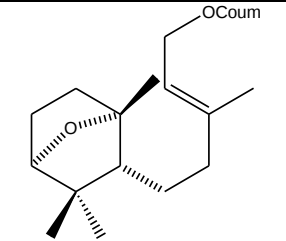
Un nombre important d'exemples de sesquiterpènes coumariniques isolés du genre *Ferula* sont regroupés dans le Tableau I.5.

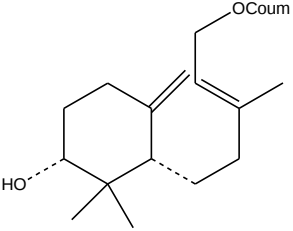
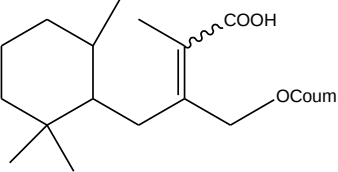
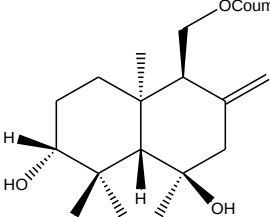
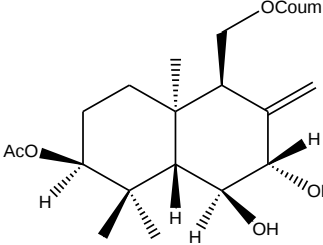
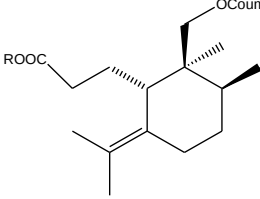
Tableau I.5 : Sesquiterpènes coumariniques identifiés dans le genre *Ferula*

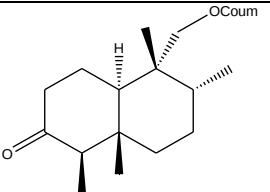
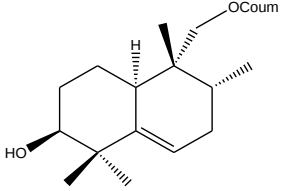
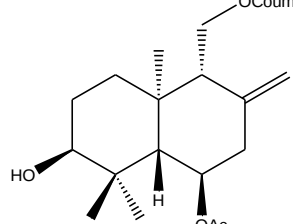
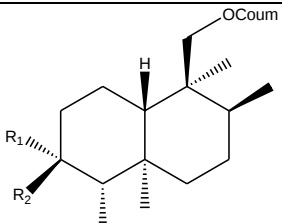
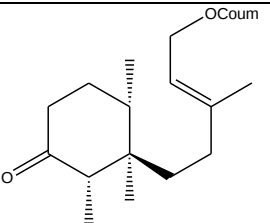
Structure	Molécule	Espèces (organes)	Référence
	$R_1 = R_2 = H$ (Féculénol) (165) $R_1 = H, R_2 = OH$ (12'-Hydroxyféculénol) (176) $R_1 = OH, R_2 = Me$ (177) $R_1 = H, R_2 = Ac$ (178)	<i>F. communis</i> (lat, rh.)	[69, 29]
	$R_1 = H, R_2 = OH$ (15'-Hydroxyféculénol) (179) $R_1 = H, R_2 = Ac$ (180) $R_1 = Benz, R_2 = H$ (181) $R_1 = H, R_2 = Benz$ (182)	<i>F. communis</i> (ra)	[65]
	Asacoumarine A (183)	<i>F. assa-foetida</i> (ré)	[69]
	$R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$ (5'-Hydroxyféculénol) (184)	<i>F. communis</i> (ra)	[31]
	Féculénoloxylféculénol (185)	<i>F. communis</i> (ra)	[15]

	R = αOH (Coladonine) (186) αOAc (Coladine) (187) Oxo (Badrakémone) (169) β-OH(Badrakémine) (188)	<i>F.communis</i> (rhiz) <i>F.arrigonii</i> (ra) <i>F.tingitana</i> (ra) <i>F. sinaica</i> (ra) <i>F.linkii</i> (pa) <i>F.arrigonii</i> (ra) <i>F. sinaica</i> (ra) <i>F.linkii</i> (pa) <i>F.arrigonii</i> (ra) <i>F. persica</i> (ra, pa) <i>F. assa-foetida</i> (ré)	[29, 51] [67] [89] [25] [72] [67] [25] [72] [67] [90] [91]
	R=Oxo (Farnésiférone A) (166) β-OH(Gummosine) (189) α-Ac (Polyanthine) (190) α-OH(Farnésiférol A) (170)	<i>F. persica</i> (ra, pa) <i>F. persica</i> (ra, pa) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F. samarcandica</i> (ra) <i>F.cocanica</i>(ra) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F.cocanica</i> (ra) <i>F. persica</i> (ra, pa) <i>F. samarcandica</i> (ra) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F.cocanica</i> (ra)	[90] [90] [91] [92] [93] [91] [93] [90] [92] [69] [93]
	Umbélliprénine (167)	<i>F.arrigonii</i> (ra) <i>F. persica</i> (ra) <i>F.linkii</i> (pa) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F.szowitsiana</i> (ra)	[67] [90] [72] [91] [86]

	Kataravicinol (191)	<i>F. arrigonii</i> (ra) <i>F. sinaica</i> (ra) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F. cocanica</i> (ra)	[67] [68] [94] [93]
	R = H (Isosamarcandine) (192) R = Ang (Angéloylisosamarcandine) (193)	<i>F. sinaica</i> (ra) <i>F. arrigonii</i> (ra) <i>F. communis</i> (rh.) <i>F. tingitana</i> (ra)	[68] [67] [51] [89]
	Fésélol (194)	<i>F. tingitana</i> (ra) <i>F. communis</i> (rh.) <i>F. sinaica</i> (ra) <i>F. sumbul</i> (ra) <i>F. pallida</i> (ra)	[89] [95] [25] [96] [97]
	13-Hydroxyfésélol (195)	<i>F. sinaica</i> (ra)	[25]
	Neveskone (196)	<i>F. assa-foetida</i> (ré)	[91]

	6,7-Dihydroxykaratavicol (197)	<i>F. sinaica</i> (ra)	[68]
	$R_1 = H, R_2 = OH$ (Samarcandine) (198) $R_1, R_2 = Oxo$ (Samarcandone) (199)	<i>F. sinaica</i> (ra) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F. samarcandica</i> (ra) <i>F. sinaica</i> (ra) <i>F. samarcandica</i> (ra)	[68] [91] [92] [68] [92]
	$R_1 = H, R_2 = OH$ (Conférol) (200) $R_1, R_2 = Oxo$ (Conférone) (201)	<i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F. sumbul</i> (ra) <i>F. pallida</i> (ra) <i>F. sumbul</i> (ra)	[24] [96] [97] [96]
	Sumféline (202)	<i>F. sumbul</i> (ra)	[35]
	Farnésiférol C (203)	<i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F. szowitsiana</i> (ra)	[24] [87]

	Farnésiférol B (171)	<i>F. persica</i> (ra, pa) <i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F.szowitsiana</i> (ra)	[90] [24] [87]
	Asacoumarine B (204)	<i>F. assa-foetida</i> (ré)	[24]
	Assafoetidinol A (205)	<i>F. assa-foetida</i> (ré)	[91]
	Assafoetidinol B (206)	<i>F. assa-foetida</i> (ré)	[91]
	R = H (Acide galbanique) (172) R = Me (Méthylgalbanate) (207)	<i>F. assa-foetida</i> (ré) <i>F.szowitsiana</i> (ra) <i>F.cocanica</i> (ra) <i>F.szowitsiana</i> (ra) <i>F. assa-foetida</i> (rés)	[91] [87] [93] [87] [94]

	Szowitsiacoumarine A (208)	<i>F.szowitsiana</i> (ra)	[87]
	Szowitsiacoumarine B (209)	<i>F.szowitsiana</i> (ra)	[87]
	Isofétérine (210)	<i>F. teterrima</i> (ra)	[40]
	R ₁ , R ₂ = Oxo(Lehmannolone) (211) R ₁ = H, R ₂ = OH (Lehmannol) (212)	<i>F. sinkiangensis</i> (ra)	[40]
	Sinkianone (213)	<i>F. sinkiangensis</i> (ra)	[40]

L'étude phytochimique de l'extrait acétonique de la gomme-résine de *F. assa foetida* a conduit à l'isolement de 2 nouveaux sesquiterpènes coumariniques drimanes : les foetidone A (**214**) et B (**215**). Par ailleurs l'activité inhibitrice sur l'activation monocyttaire de NF-κB pour le composé 8-acétoxy-5-hydroxyumbelliprénine (**216**), produit majoritaire de la gomme-résine a été mise en évidence [94].

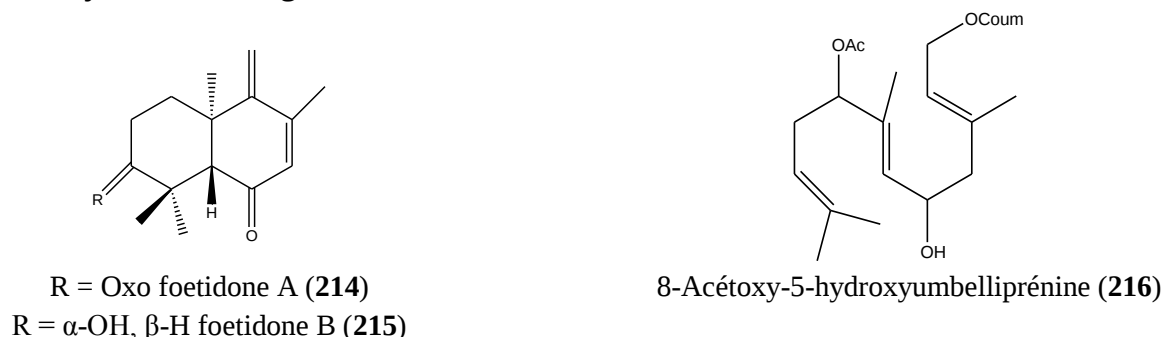


Figure I. 21: Structures de quelques Sesquiterpènes coumariniques isolés de *F.assa foetida* [94]

Les travaux sur le genre *Ferula* se sont plus concentrés sur les constituants peu polaires. Néanmoins quelques dérivés glycosylés ont été mis en évidence dans ce genre. L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des racines de *F. persica* a conduit à l'identification de 4 sesquiterpènes coumariniques glycosylés. Il s'agit des persicaoside A (**217**), B (**218**), C (**219**) et D (**220**) [27].

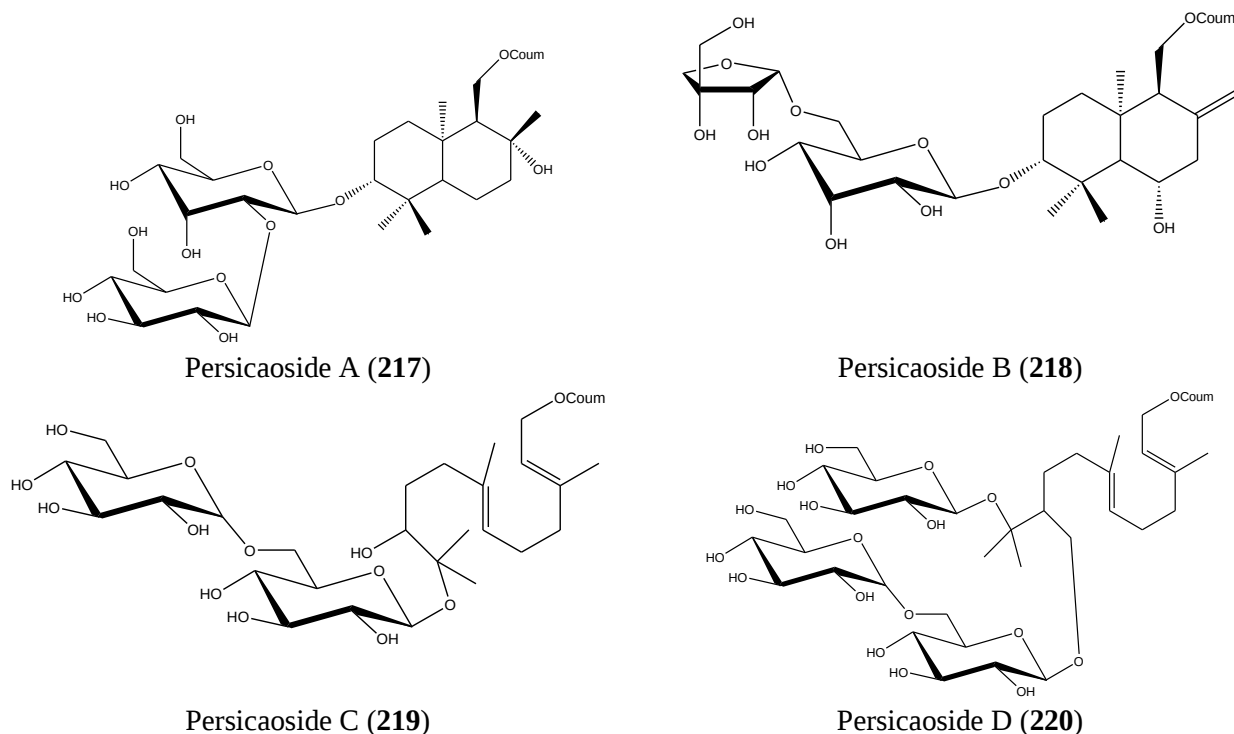


Figure I. 22 : Structures de quelques sesquiterpènes coumariniques glycosylés isolés de *F. persica* [27]

La séparation de l'extrait benzénique des racines de *F. communis* a également fourni deux sesquiterpènes coumariniques : le fércoprénol (221) et la fércoprolone (222) [32].

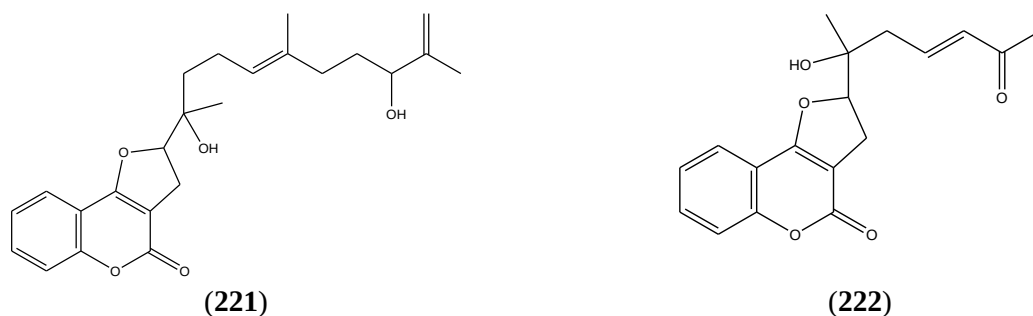


Figure I.23: Structures du fércoprénol et de la fércoprolone [32]

L'extrait hydro-méthanolique (80%) des racines de *F. fukanensis* a montré entre autres une importante inhibition de la production de l'oxyde d'azote (NO). Son fractionnement bioguidé, s'est soldé par l'isolement et l'identification de 4 nouveaux sesquiterpènes coumariniques. Il s'agit des fukanemarine B (223), fukanefuomarine E (224), fukanefuomarine F (225) et fukanefuomarine G (226). Le potentiel inhibiteur de la production de NO dans les macrophages pour les 4 composés a été aussi mis en évidence [43].

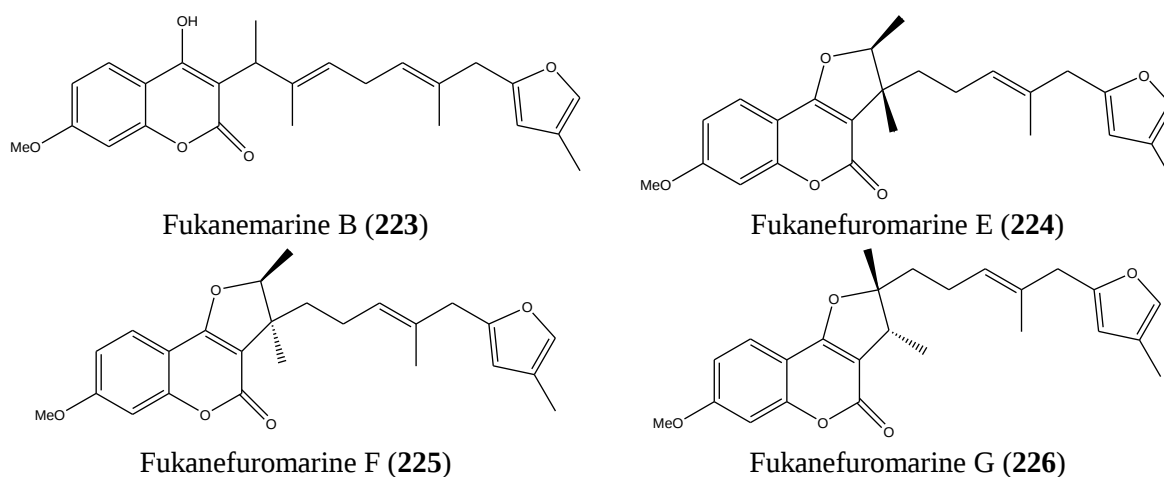


Figure I. 24: Structures de quelques dérivés sesquiterpéniques isolés du genre *Ferula* [43]

V.6.3. Autres types de composés

➤ Les furanocoumarines

Les furanocoumarines ne sont pas très communes dans tous les genres de la famille des Apiaceae. Elles ont été détectées notamment dans les genres *Angelica*, *Peucedanum* et *Seseli*. Cependant, certaines des molécules de ce type ont été signalées dans le genre *Ferula*. Le noyau de base des furanocoumarines rencontrées est majoritairement, le psoralène (227).

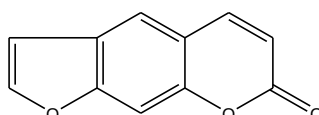


Figure I. 25 : Structure du psoralène (227)

La fésuamtuorine A (228) et la fésuamtuorine B (229) ont été caractérisées pour la première fois dans le règne végétal dans l'extrait méthanolique des racines de *F. sumbul* par Zhou *et al.* De plus, plusieurs structures similaires connues ont été élucidées. Il s'agit de l'oxypeucedaninhydrate (230), l'heraclénol (231), l'oxypeucedanine (232), l'heraclénine (233), Oxypeucedanine méthanolate (234), l'heraclénine méthanolate (235), le pranférol (236), l'impératorine (237), le pabulénol (238), le xantoxol (239) et la xanthotoxine (240).

Des furanocoumarines à l'état de dimères ont été également signalées dans la même étude. Nous citons les composés nommés fésuamtuorine C (241) et fésuamtuorine D (242). L'activité anti HIV et l'inhibition de la libération des cytokines ont été évaluées pour la majorité des composés précédents. Les composés 230, 231, 232, 236 et 240 ont montré une activité anti HIV significative, alors que le pouvoir inhibiteur de la production des cytokines pour tous les composés était relativement faible [96].

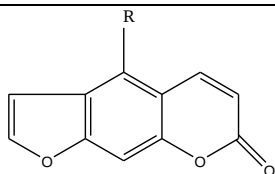
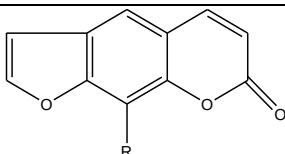
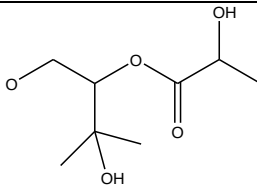
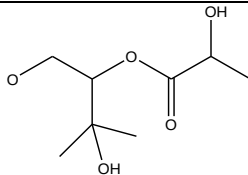
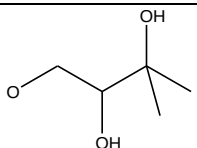
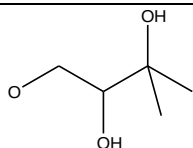
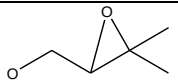
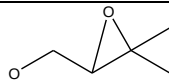
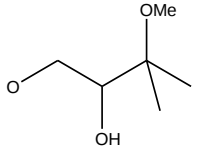
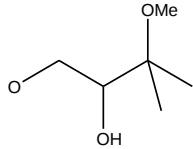
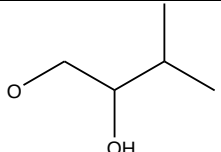
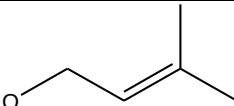
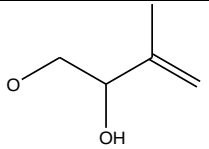
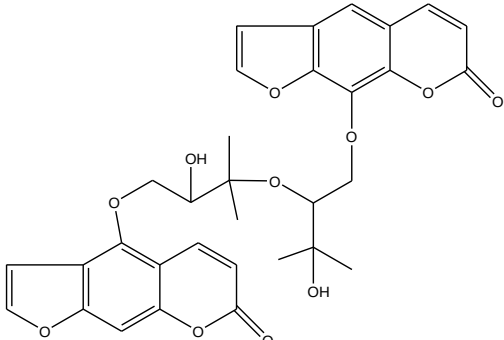
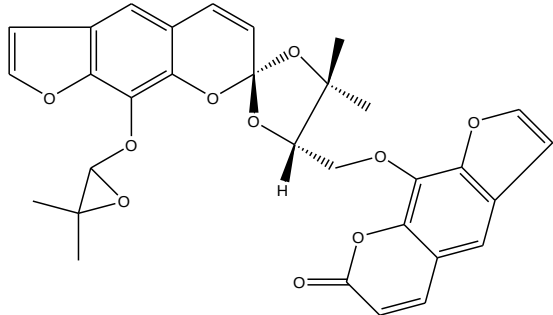
				
	Fésumtuorine A (228)		Fésumtuorine B (229)	
	Oxypeucedanine hydrate (230)		Heraclénol (231)	
	Oxypeucedanine (232)		Heraclénine (233)	
	Oxypeucedanin méthanolate (234)		Heraclénol méthanolate (235)	
	Pranférol (236)		Imperatorine (237)	
	Pabulérol (238)	OH	Xanthoxol (239)	
		OMe	Xanthotoxine (240)	
				
Fesumtuorine C (241)		Fesumtuorine D (242)		

Figure I.26 : Exemples de structures de dérivés furanocoumariniques isolés de *F.sumbul* [96]

L'investigation phytochimique de l'extrait méthanolique des racines de *F. ferulaoides* a permis l'identification de 9 nouvelles prenyl-dihydrofurocoumarines de type sesquiterpènes. Nous citons à titre d'exemple la 2,3-dihydro-7-hydroxy-2*S**,3*R**-diméthyl-2-[4,8-diméthyl-3(*E*), 7-nonadièn-6-onyl]-furo[3,2-*c*]coumarine (**243**) et la 2,3-dihydro-7-hydroxy-2,3-diméthyl-2-[4,8-diméthyl-3(*E*),7-nonadiényl]-furo[3,2-*c*]coumarine (**244**) [98, 99].

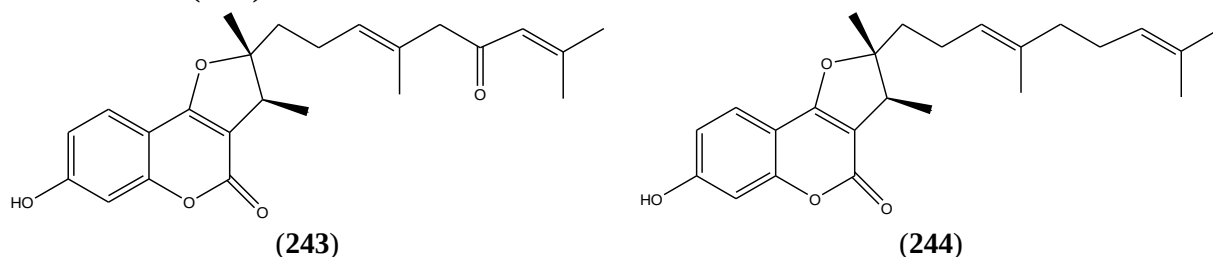


Figure I.27 : Exemples de structures de dihydrofuranocoumarines isolés de *F. ferulaoides* [98, 99]

D'autres types de dérivés coumariniques ont été par ailleurs isolés de ce genre, en l'occurrence les monoterpènes coumariniques comme l'auraptène (**168**). L'étude de l'extrait chloroformique des racines de *F. ferulago* a conduit à la caractérisation de deux nouvelles molécules de ce type. Il s'agit des Férulagol A (**245**) et B (**246**). Des structures similaires telles que la diversine (**247**) ont été identifiées antérieurement dans *F. diversivitata* [100].

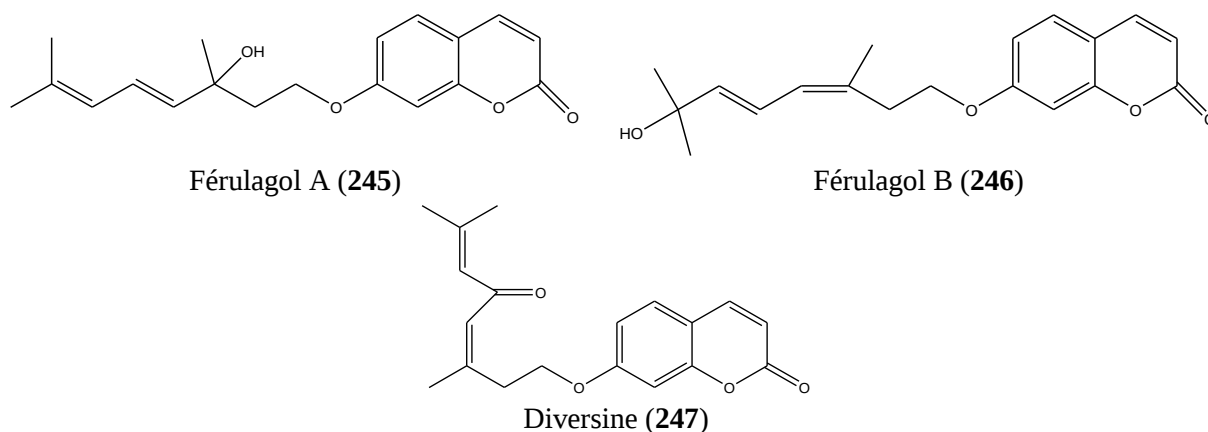
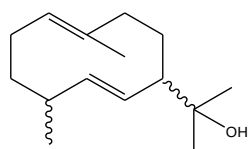


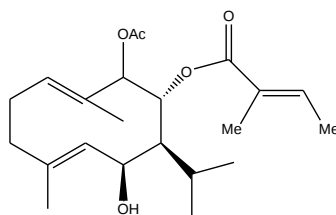
Figure I. 28 : Exemples de monoterpènes coumariniques isolés de *F. ferulago* et *F. diversivitata* [100]

➤ Autres types de sesquiterpènes

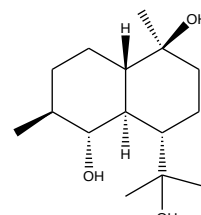
Les sesquiterpènes ayant un squelette de type germacrane, cadinane, humulene, et autres ont également été décrits dans ce genre. Le 9-*O*-acétyl-8-*O*-tigloyltovarol (**248**) et l'alloedycariol (**249**) ont été identifiés respectivement dans l'extrait hydrométhanolique des parties aériennes de *F. persica* var. *latisecta* [27] et dans la fraction chloroformique du latex de *F. communis* [69]. Le fractionnement de l'extrait acétonique des racines de cette dernière espèce a conduit par ailleurs à la caractérisation du cadinantriol (**250**) [95].



Allohedycariol (248)



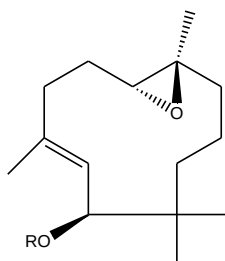
9-O-Acetyl-8-O-tigloyltovarol (249)



Cadinantriol (250)

Figure I.29 : Structures de quelques dérivés sesquiterpeniques isolés du genre *Ferula* [27, 69, 95]

Le 1 α ,10 β -époxy-6 β -anisoylhumul-4-ène (251) a été isolé des parties aériennes de *F. linkii*-TF par Gonzalez *et al.*, alors que le 1 α ,10 β -époxy-6 β -veratroylhumul-4-ène (252) a été mis en évidence dans *F. latipinna* natives de l'île Ténérife (îles Canaries) [72].



R = Anis (251)

R = Ver (252)

Figure I.30 : Structures du 6 β -anisoyl-1 α ,10 β -époxyhumul-4-ène et du 1 α ,10 β -époxy-6 β -veratroylhumul-4-ène [72]

Miski *et al.* ont montré que les racines de *F. haussknechtii* renfermaient également de nombreux sesquiterpènes de type humulène. Une dizaine de structures ont été signalées dans l'extrait au DCM. Nous citons le benzoylférvanol (253), le *p*-hydroxybenzoylférvanol (254), le vanilloylférvanol (255), le benzoylkurubaschaldéhyde (256), le vanilloylkurubaschaldéhyde (257), l'acide angéoylkurubaschique (258), l'acide benzoylkurubaschique (259), l'acide angéoyl-1 β ,10 α -époxykurubaschique (260), l'acide benzoyl-1 β ,10 α -époxykurubaschique (261) et l'acide benzoyl-1 α ,10 β -époxykurubaschique (262) [101].

R= Benz Benzoylférvanol (253) R= p-OHBenz <i>p</i> -Hydroxybenzoylférvanol (254) R= Van Vanilloylférvanol (255)	R= Benz Benzoylkurubabaschaldéhyde (256) R= Van vanilloylkurubabaschaldéhyde (257)
R= Ang Acide angéloylkurubaschique (258) R= Benz Acide benzoylkurubaschique (259)	R= Ang Acide angéloyl-1 β ,10 α -époxykurubaschique (260) R= Benz Acide benzoyl-1 β ,10 α -époxykurubaschique (261)
R= Benz Acide benzoyl-1 α ,10 β -époxykurubaschique (262)	
Figure I.31 : Exemples de sesquiterpènes de type humulène isolés de <i>F. haussknechtii</i> [101]	

Un sesquiterpène de type chromane, la férchromone (263) a été isolée de l'extrait à l'éther de pétrole des rhizomes de *F. communis* par Al-Yahya et al. [30]. Par ailleurs cette molécule a été identifiée simultanément avec son alcool, le férchromol (264) dans l'extrait benzénique des racines de la même espèce par Miski et Jakupovic [102].

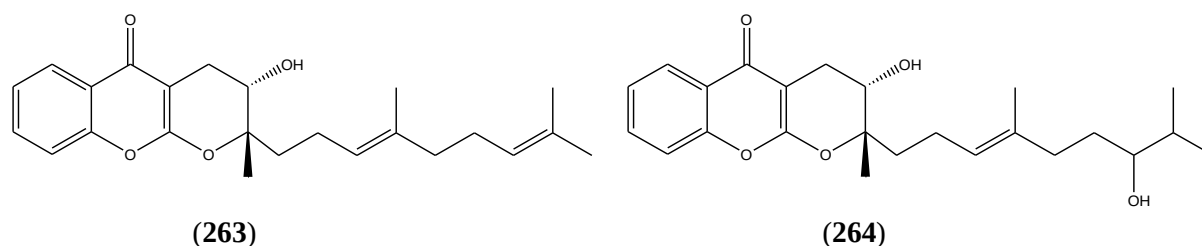


Figure I. 32 : Structures de la férchromone et du férchromol isolés de *F. communis* [102]

L'acide 3-farnésyl-*p*-hydroxybenzoïque (**265**), le kuhistanol A (**266**), le kuhistanol D (**267**) et le kuhistanol E (**268**) ont été isolés et caractérisés à partir des racines de *F. kuhistanica* par Tamemoto *et al.* [37].

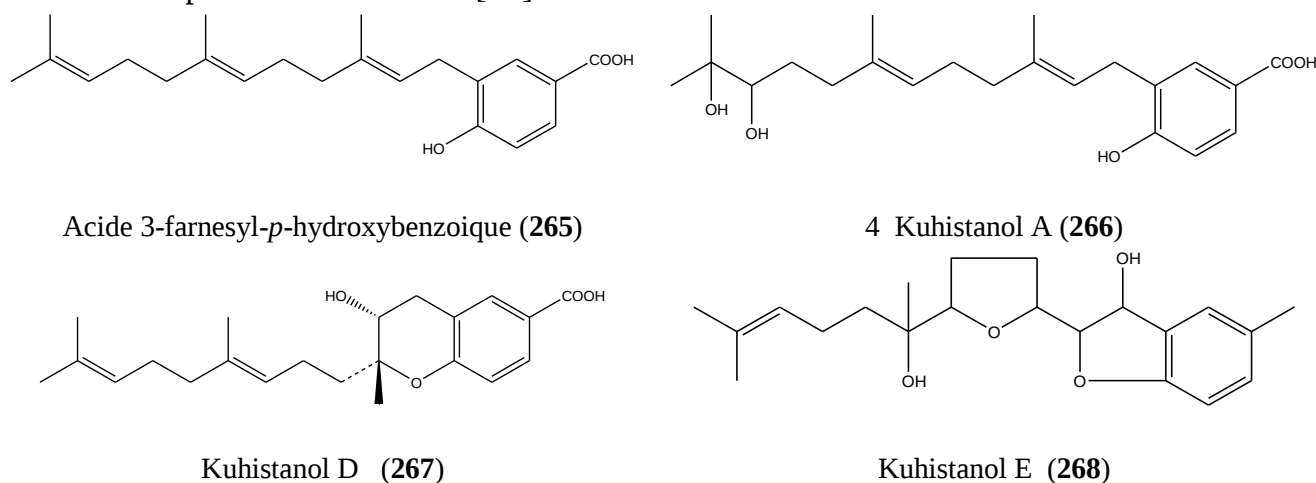
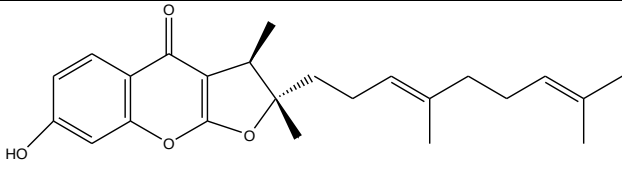
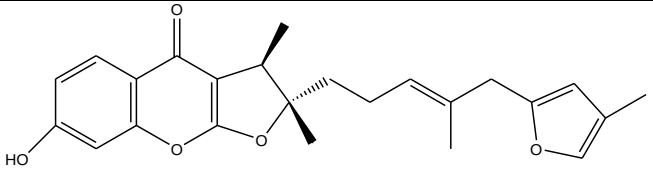
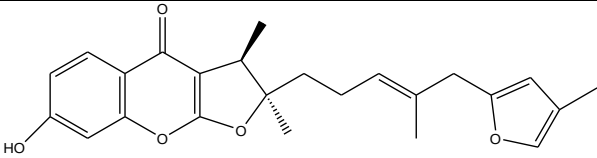


Figure I. 33 : Structures de quelques dérivés sesquiterpeniques isolés de *F. kuhistanica* [37]

Trois sesquiterpènes de type 2-prenyl-dihydrofurochromone : 2,3-dihydro-7-hydroxy-2*S**,3*R**-diméthyl-2-[4,8-diméthyl-3(*E*),7-nonadiényl]-furo[2,3-*b*]chromone (**269**), 2,3-dihydro-7-hydroxy-2*S**,3*R**-diméthyl-2-[4-méthyl-5-(4-méthyl-2-furyl)-3(*E*),7-pentényl]-furo[2,3-*b*]chromone (**270**) et le 2,3-dihydro-7-hydroxy-2*R**,3*R**-diméthyl-2-[4-méthyl-5-(4-méthyl-2-furyl)-3(*E*),7-pentényl]-furo[2,3-*b*]chromone (**271**), ont été identifiés pour la première fois dans les racines de *F. ferulaeoides* [98].

	
12,3-dihydro-7-hydroxy-2<i>S</i>*,3<i>R</i>*-diméthyl-2-[4,8-diméthyl-3(<i>E</i>),7-nonadiényl]-furo[2,3-<i>b</i>]chromone (269)	22,3-dihydro-7-hydroxy-2<i>S</i>*,3<i>R</i>*-diméthyl-2-[4-méthyl-5-(4-méthyl-2-furyl)-3(<i>E</i>),7-pentényl]-furo[2,3-<i>b</i>]chromone (270)
	
32,3-dihydro-7-hydroxy-2<i>R</i>*,3<i>R</i>*-diméthyl-2-[4-méthyl-5-(4-méthyl-2-furyl)-3(<i>E</i>),7-pentényl]-furo[2,3-<i>b</i>]chromone (271)	
Figure I.34 : Structures de quelques sesquiterpènes de type 2-prenyl-dihydrofurochromone identifiés dans <i>F. ferulaeoides</i> [98]	

➤ Les sesquiterpènes lactones

Les Apiaceae sont parmi les familles botaniques qui renferment de nombreux sesquiterpènes lactones. Plusieurs exemples ont été signalés dans le genre *Ferula*. Le fércolide (272) était le premier de type daucane qui a été isolé d'une fraction polaire de l'extrait benzénique des racines de *F. communis*.

Un seul analogue de ce composé a été précédemment identifié dans le genre *Hepaticaeae* (Apiaceae) et dans la famille des Asteraceae [80]. La féruginine (273) a été obtenue à partir de l'extrait à l'éther de pétrole des rhizomes de *F. jaeschkeana* par l'équipe de Gard [64]. Un sesquiterpène de type eudesmanolide, le 3 α ,4 β -dihydroxy-5 β H,11 α H-eudesman-6,12-olide (274) a été caractérisé par Ahmed *et al.* dans l'extrait au dichlorométhane-méthanol (1:1) des parties aériennes de *F. sinaica* [78].

Le produit majoritaire des racines de *F. arrigonii* récoltée en Sardaigne est le 7,11-dehydrogrilactone (275), un sesquiterpène lactone du type guaiane. Notons que d'après la littérature, ce type est plus plutôt commun aux espèces asiatiques [67].

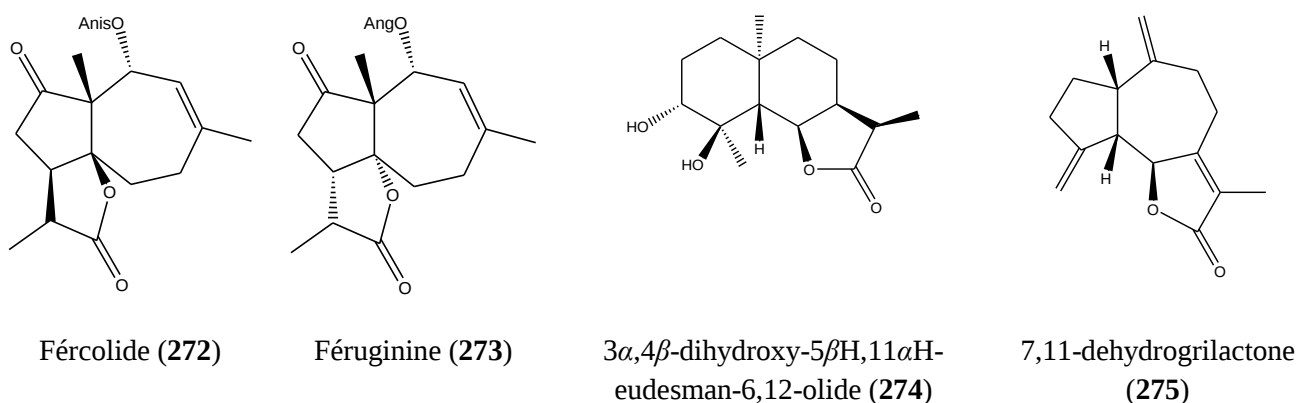


Figure I.35 : Exemples de sesquiterpènes lactones isolés du genre *Ferula* [80, 64, 78, 67]

L'investigation phytochimique de l'extrait méthanolique des racines *F. varia* par Suzuki *et al.* a fournis plusieurs sesquiterpènes lactones, dont 6 (non nommés) sont nouveaux (276-281). Les autres sont : la dehydrooopodine (282), l'oopodine (283), la férupennine (284). Leur pouvoir cytotoxique sur des cellules cancéreuses humaines sélectionnées a été évalué. Le composé (279) a particulièrement montré une cytotoxicité significative sur les cellules résistantes à de multiples drogues KB-C2, alors que l'activité des composés (276, 278, 280 et 283) sur les mêmes cellules s'est améliorée en présence de concentrations non toxiques de colchicine [42].

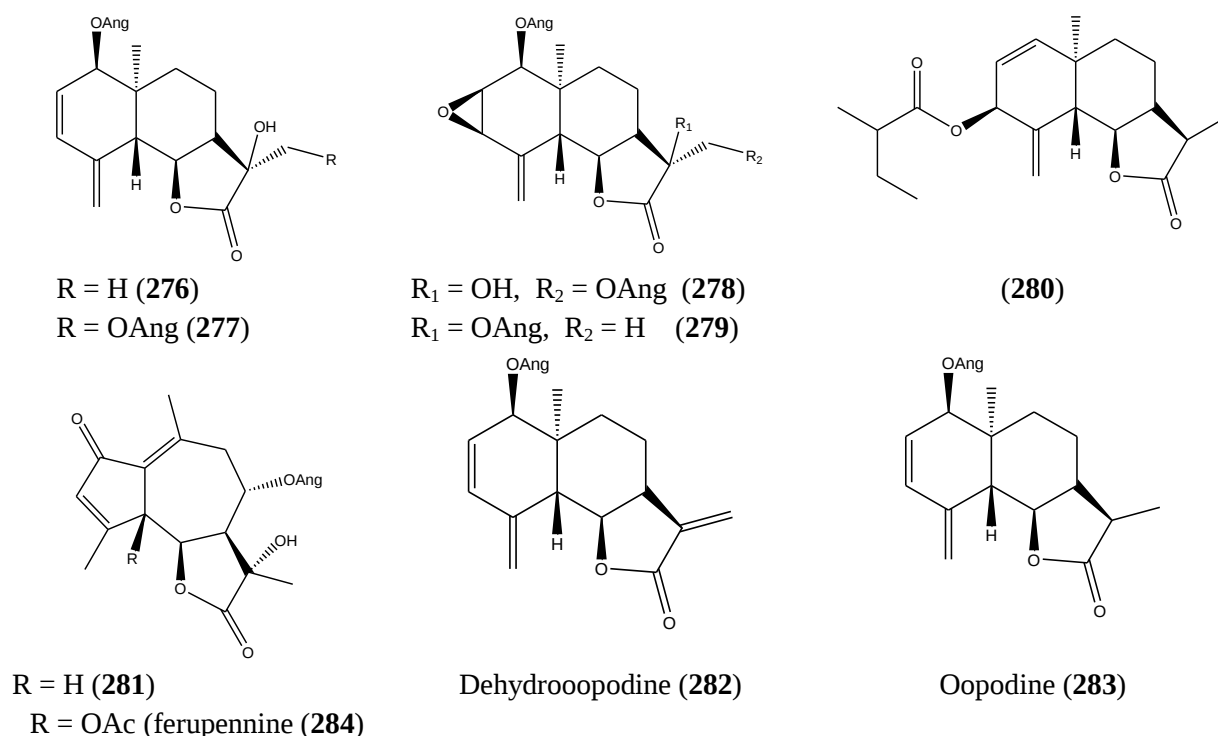


Figure I.36 : Structures de quelques sesquiterpènes lactones isolés *F. varia* [42]

Le fractionnement de l'extrait au DCM des racines de *F. diversivittata* a permis l'isolement de 7 nouveaux guaïanolides diversement estérifiés. Ils ont été nommés diversolide A, (285) B (286) C (287), D (288), E (289), F (290) et G (291). La majorité de ces composés ont montré des activités antibactériennes et antifongiques modérées *in vitro* avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 40 à 80 µg/mL [41].

Un guaïanolide inhabituel la taraxacine (292) a été identifié dans l'extrait acétonique de la gomme de *F. assa foetida* par Appendino . Ce composé a montré une activité inhibitrice modérée de l'activation monocytaire des NF-κB [94].

$R_1 = Ang, R_2 = Ang$ (285) $R_1 = Ang, R_2 = Sen$ (286) $R_1 = Benz, R_2 = Sen$ (287) $R_1 = Benz, R_2 = Ac$ (288) $R_1 = Ver, R_2 = Ang$ (289) $R_1 = Ver, R_2 = Sen$ (290) $R_1 = Ver, R_2 = Ac$ (291)	Taraxacine (292)

Figure I.37 : Exemples de sesquiterpènes lactones isolés de *F. diversivittata* [41]

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des racines de *F. penninervis* a permis l'isolement et la caractérisation d'une quinzaine de nouveaux sesquiterpènes lactones de type guaïane. Les férupennine A, H, I, L et O (293-297) sont des exemples de composés caractérisés. 2 eudesmanolides ont été également signalés. Il s'agit de la péninnervine (298) et du 1 α -hydroxy-2-oxo-5 α ,7 β -11 β H-eudesm-3-èn-6 α ,12-olide (299) [103].

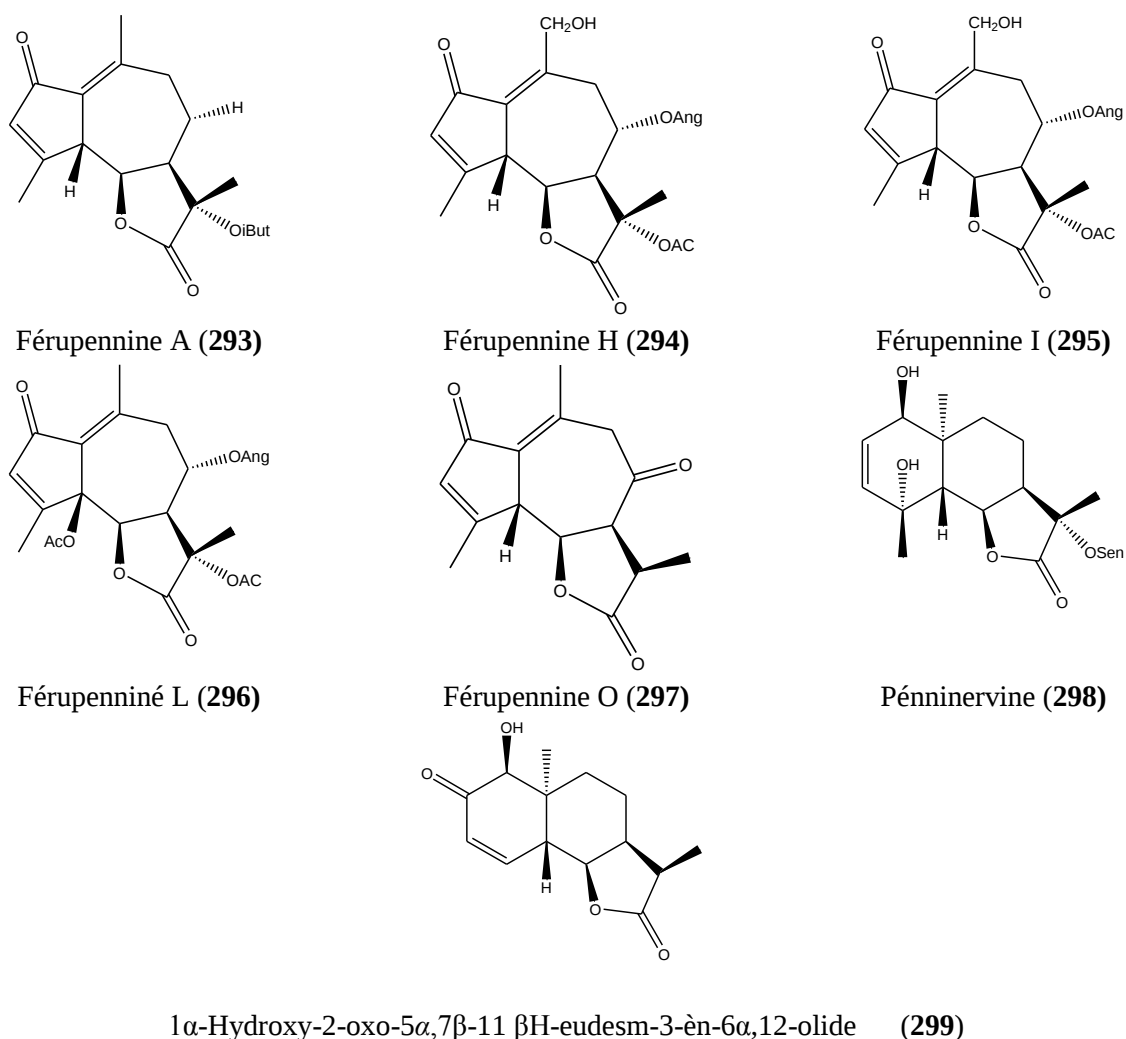


Figure I.38 : Structures de quelques sesquiterpènes lactones isolés de *F. penninervis* [103]

➤ Les phénylpropanoïdes

Plusieurs phénylpropanoïdes ont été isolés du genre *Ferula*. La lasérine (300) a été identifiée dans plusieurs *Ferula* : dans les parties aériennes de *Ferula linkii* [72, 79], dans les racines de *F. tingitana* [73] et de *F. arrigonii*. Ces racines contiennent également la latifolone (301) [67]. Le latex de *F. communis* renferme en plus de la lasérine, la 2-epielmanticine (302) [51]. Cette dernière se retrouve également dans les racines de *F. szowitsiana* [87].

L'hélmanticine (**303**) a été caractérisée d'une part, dans les parties aériennes de *F. linkii* [72, 79] et d'autre part dans de *Thapsia villosa* (Apiaceae) [104].

L'étude phytochimique de l'extrait benzénique des racines de *F. alaeochytris* a conduit à l'isolement entre autres du 3-hydroxy-4,5-méthylènedioxypropionphénone (**304**). Des structures similaires ont été mises en évidence dans quelques Piperaceae [33]. Miski et Jakupovic ont étudié l'extrait benzénique des racines de *F. communis*. Ils sont parvenus à identifier 2 phénylpropanoïdes : le 1-hydroxy-1-(3'-méthoxy-4',5'-méthylènedioxy)phénylpropane (**305**) et le 2-épihélmanticine [102].

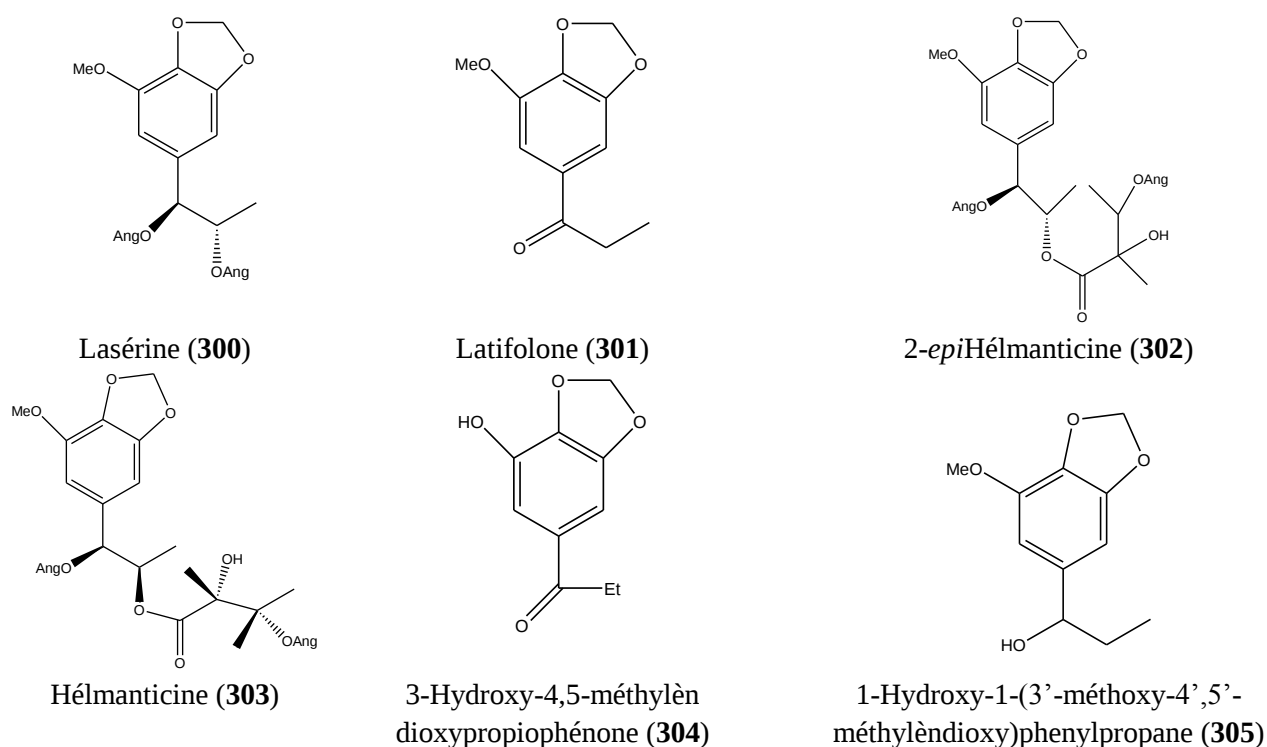


Figure I. 39 : Structures de quelques phenylpropanoïdes isolés du genre *Ferula*

➤ Autres dérivés terpéniques

L'étude phytochimique de l'extrait au DCM des racines de *F. sinaica* a abouti à l'identification de 2 monoterpènes : le 8-hydroxybornéol (**306**) et 2 α ,5 β -dihydroxybornane (**307**). La présence du bornane (**308**) et du 5-hydroxy-3,4-diméthoxy-*t*-cinnamyl alcool (**309**) a été signalée par la suite dans d'autres études sur la même espèce [68, 71].

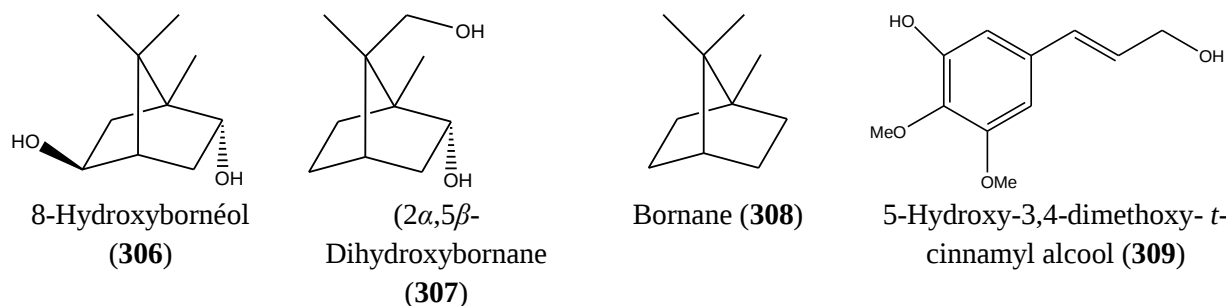


Figure I. 40: Exemples de monoterpènes isolés des racines de *F.sinaica* [68, 71]

L'extrait au DCM des racines de *F. diversivittata* renferme le stigmastérol (310). Ce dernier composé est retrouvé également dans les racines de *F.szowitsiana* à côté du β -sitostérol (311) [86].

Parmi les composés stéroïdiques mis en évidence dans le genre *Ferula* nous citons le 3-O- β -glucosylsitosterol (312) et le 3-O- β -glucosylstigmasterol (313) identifiés dans l'étude phytochimique réalisée sur *F. persica*, [27].

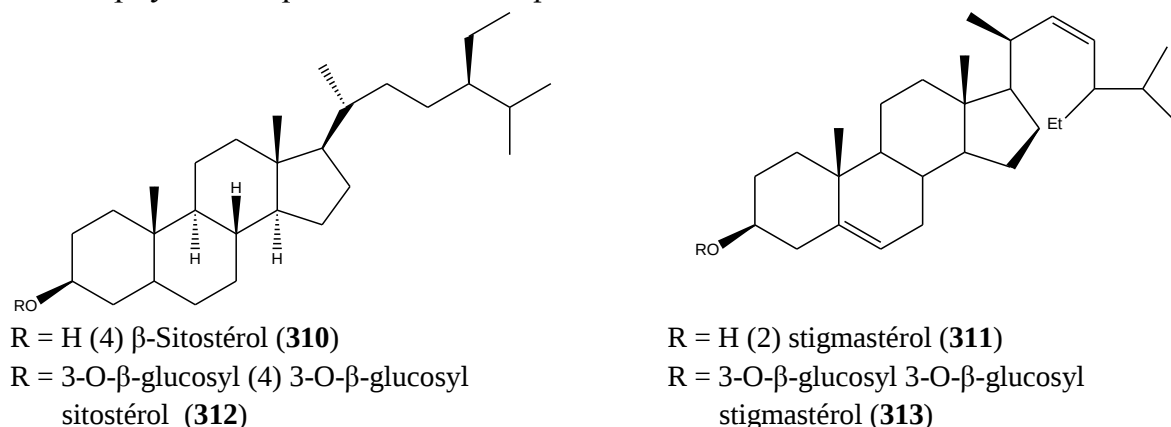


Figure I. 41: Structures de quelques triterpènes isolés du genre *Ferula*

L'investigation phytochimique des fruits de *F. linkii* a conduit à l'isolement de deux triterpènes le 3 β -acétoxy-oléan-9,12-diène (314) et le 3 β -acétoxy-6 β -hydroxy-oléan-9,12-diène (315) [105].

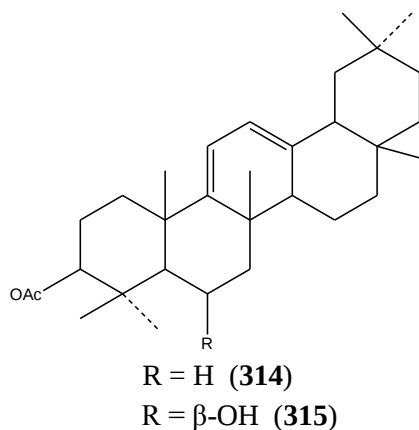


Figure I. 42: Structures du 3 β -acétoxy-oléan-9,12-diène et du 3 β -acétoxy-6 β -hydroxy-oléan-9,12-diène isolés de *F.linkii* [105]

Un acétophénone (4*E*,8*E*,12*Z*)-13-hydroxyméthylène-1-(2-hydroxyphényl)-5,9-diméthyl-4,8,12-décatriène-1-one (**316**) a été isolé à partir de l'extrait acétonique de la gomme de résine de *F. communis* var. *genuina* par Lamnaouer *et al* [32].

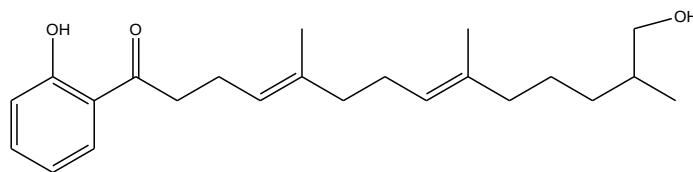
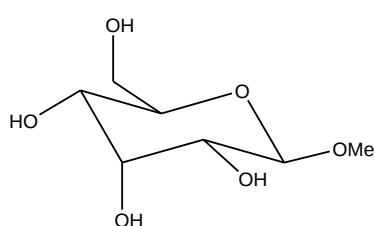


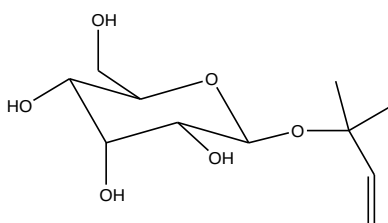
Figure I.43 : Structures de (4*E*,8*E*,12*Z*)-13-Hydroxyméthylényl-1-(2-hydroxyphényl)-5,9-diméthyl-4,8,12-décatriène-1-one (316**) [32]**

➤ Dérivés Osidiques

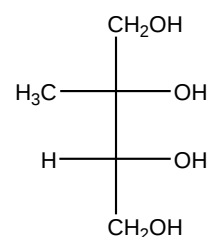
Des monomères de sucres ont été mentionnés dans quelques *Ferula*. Les racines de *F. sinaica* renferment un dérivé méthylé du glucose, il s'agit du 1-méthoxy-β-L-glucopyranoside (**317**) [25]. Le fractionnement de l'extrait au dichlorométhane-méthanol (1:1) des parties aériennes de la même espèce a également permis l'isolement de deux autres dérivés, le 1,1-diméthylprop-2-ényl-1-O-β-D-glucopyranoside (**318**) et le 2-C-méthyl-D-érythritol (**319**) [26].



1-Méthoxy-β-L-glucopyranoside (**317**)



1,1-Diméthylprop-2-ényl-1-O-β-D-glucopyranoside (**318**)



2-C-Méthyl-D-érythritol (**319**)

Figure I. 44: Structures de quelques dérivés glycosidiques identifiés dans *F.sinaica* [25,26]

➤ Composés phénoliques

Les Apiaceae peuvent se diviser en deux groupes, ceux qui contiennent des flavones ; le plus fréquemment de la lutéoline (**320**) et plus particulièrement son 7-O-glucoside (**321**) et ceux qui contiennent plutôt des flavonols particulièrement le kaempférol (**322**) et/ou la quercétine (**323**) sous forme de 3-O-glucoside (**324**, **325**) et 3-O-rutinoside (**326**, **327**) [106, 107].

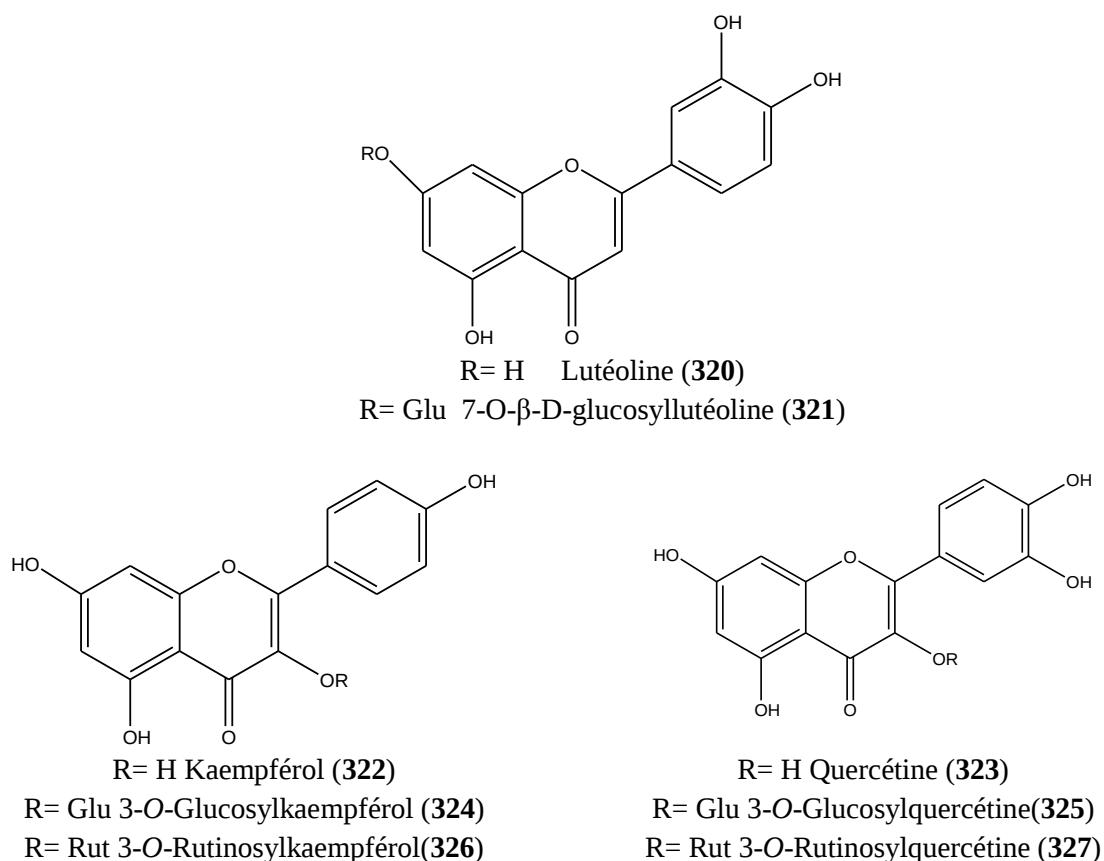


Figure I.45 : Structures de flavonoïdes communs aux Apiaceae

Les glycosides de la lutéoline sont cités comme marqueurs taxonomiques du genre *Ferula*. La 7-O-β-D-glucopyranosyllutéoline (321) est rencontrée dans les fruits de *F. assa foetida* ainsi que dans les parties aériennes de *F. varia* [108, 109]. Par ailleurs, elle a été isolée à partir de l'extrait éthanolique des graines de *F. samarcandica* aux côtés d'une flavone méthoxylée la 7-α-D-glucofuranosyloxy-3',5-dihydroxy-4'-méthoxyflavone (328) [110].

En Chine 13 sur les 16 espèces de *Ferula* qui ont été étudiées contiennent les glycosides les plus communs dans les Apiaceae, dont ceux du kaempférol, de l'apigénine et de la quercétine [111, 112]. Une seule C-glycosylflavone la 6,8-di-C-β-D-glucopyranosylapigénine (329) a été citée dans le genre *Ferula*. Cette flavone a été également retrouvée dans les Asteraceae [111].

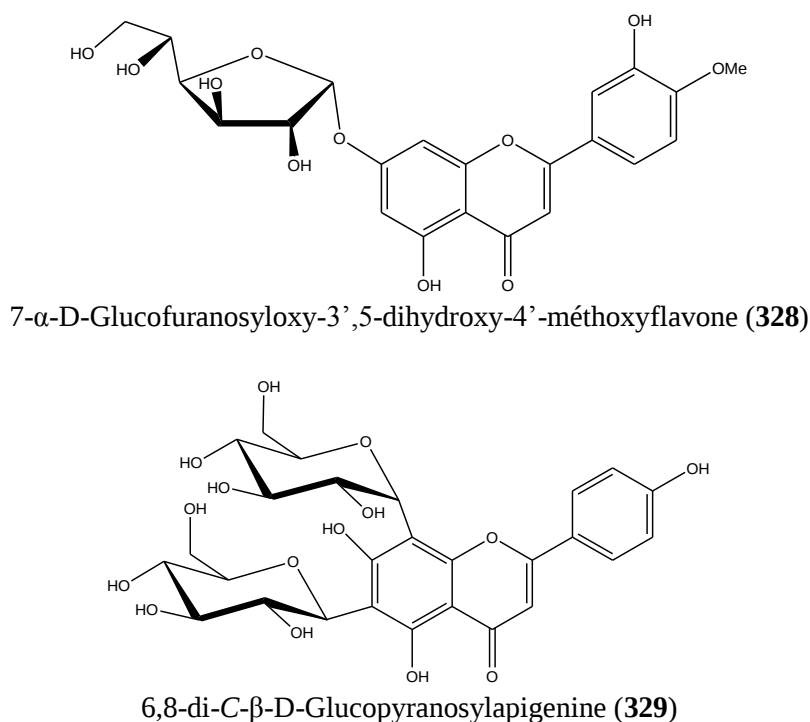


Figure I.46: Structures de quelques flavonoïdes isolés du genre *Ferula* [110, 111]

L'étude phytochimique de l'extrait méthanolique des racines de *F. alaeochytris* a abouti à l'isolement de deux acides phénoliques : l'acide 5-caféoylquinique (acide chlorogénique) (330) et l'acide 1,5-dicaféoylquinique (331) [62]. Il a été rapporté que les dérivés de l'acide cafféique s'accumulent aussi bien dans les Apiaceae que les Asteraceae [111].

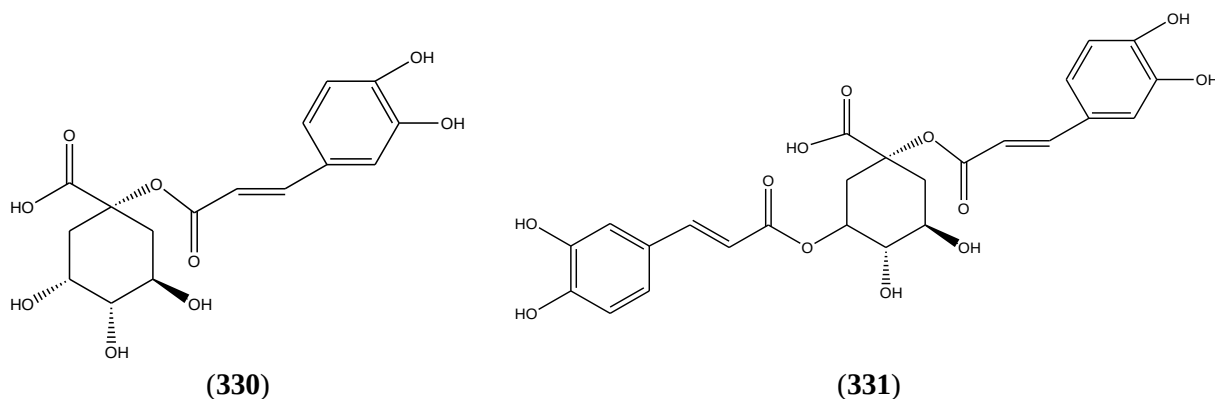


Figure I.47: Structure des acides chlorogénique et 1,5-dicaféoylquinique [62]

➤ Les huiles essentielles

Les Apiaceae se distinguent par de forts arômes et saveurs dus à la présence de canaux sécréteurs d'essences ou de gommés-résines. Les huiles essentielles des Apiaceae sont riches en dérivés phénylpropaniques tels que l'anéthole (332) et l'eugénol (333), et en terpènes comme le β -caryophyllène (334), le limonène (335) ou la carvone (336) [11].

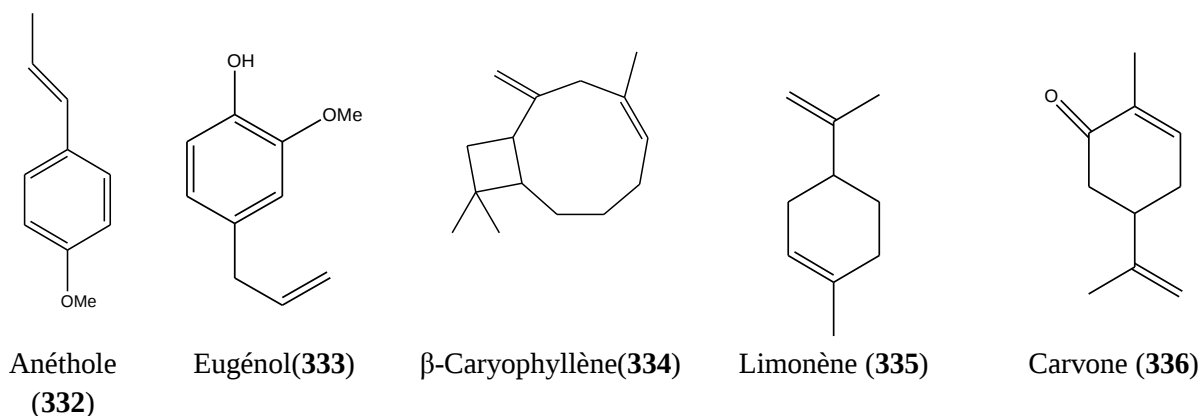


Figure I.48 : Exemples de composants majoritaires des huiles essentielles d'Apiaceae [11]

La composition de l'huile essentielle de quelques espèces du genre en question a été établie. Celle de *F. communis* poussant en Corse contient majoritairement du myrcène (337) (53%), de l'aristolène (338) (8.5%), de l' α -pinène (339) (6.6%) et du β -phellandrène (340) (4.2%). Cette étude a permis également de montrer qu'il existait 3 chémotypes pour cette espèce selon la prédominance des constituants : myrcène, myrcène/aristolène et aristolène/myrcène [113].

Concernant l'huile de *F. persica*, elle est composée de 57.3% de dill-apiole (341), de 5.6% d'élémicine (342) et de 4.4% de limonène [114]. Les constituants majoritaires rapportés pour l'huile essentielle de *F. arrigonii* sont le β -phellandrène (16.6%) et le linalool (343) (12.5%) [115].

L'analyse de l'huile essentielle de l'espèce *F. eleaocytris* a montré que celle-ci est composée essentiellement de n-nonane (344) (27,1%), d' α -pinène (12.7%) et de germacrène B (345) (10.3%) [116]. L'huile essentielle des fruits de *F. gummosa* Boiss. quant à elle, est constituée majoritairement de β -pinène (43.78%) (346), d' α -pinène (27.27%) et de myrcène (3.37%). Il a été signalé que cette huile inhibait remarquablement la croissance de 3 souches de bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermis* et *Bacillus subtilis*), 3 souches de bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, et *Pseudomonas aeruginosa*), ainsi que 2 souches de champignons (*Candida albicans* et *Candida kefir*) [117].

L'huile essentielle de *F. ferulaoides* renferme majoritairement le guaïol (347) (58.76%) aux côtés du (*E*)-nérolidol(348) (10.16%) et de l' α -eudesmol(350) (3.05%) [118]. *F. assafoetida* renferme exceptionnellement, une teneur très importante en E-1-propényl sec-butyldisulfide (350) (40%) [119]. Les monoterpènes (α -pinène, β -pinène, linalool, ...) représentent plus de 30% de la composition des huiles essentielles des espèces *F. gummosa* [120] et *F. szovitziana* [121]. Les sesquiterpènes représentent 20% des produits identifiés dans la majorité des espèces.

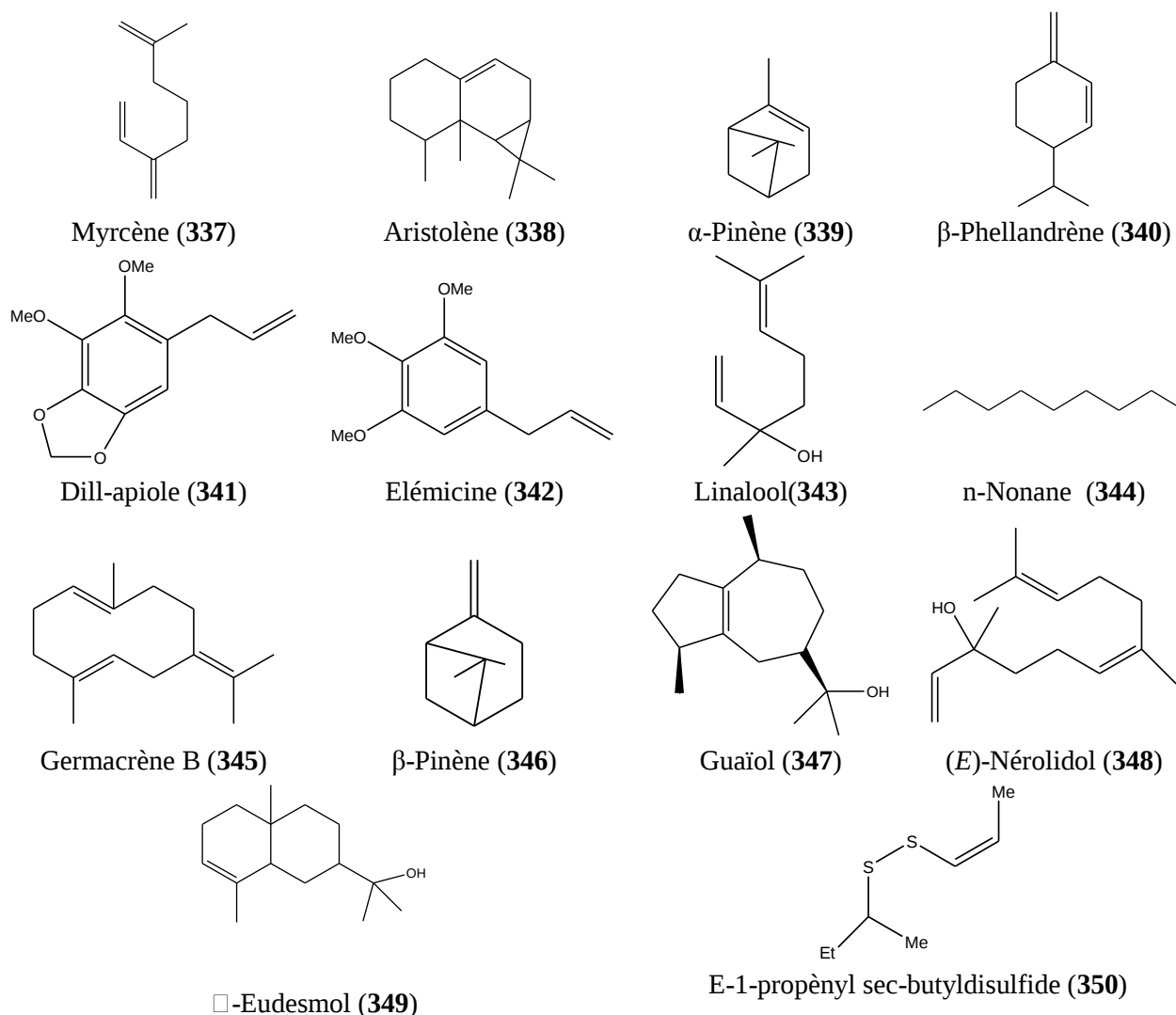


Figure I.49 : Composants majoritaires des huiles essentielles dans le genre *Ferula*

➤ Composés soufrés

Nous notons que ce type de composés a été rarement mis en évidence dans les racines des *Ferula*. Ce sont plutôt des constituants habituels de la famille des Brassicaceae.

Deux molécules ont été décrites dans les racines de *F. persica* par Iranshahi. Leurs structures les identifient comme étant le t-butyl 3-[(1-méthylpropyl)dithio]-2-propényle malonate (351) (appelé également le persicasulfide A) et le t-butyl 3-[(1-méthylthiopropyl) thio]-2-propényle malonate (352) [122]. Ce persicasulfide A (351) est également rencontré dans les racines de *F. szowitsiana* [86]. Par ailleurs l'asadisulphide (353) a été isolé de la gomme de *F. assa-foetida* par Kajimoto [24].

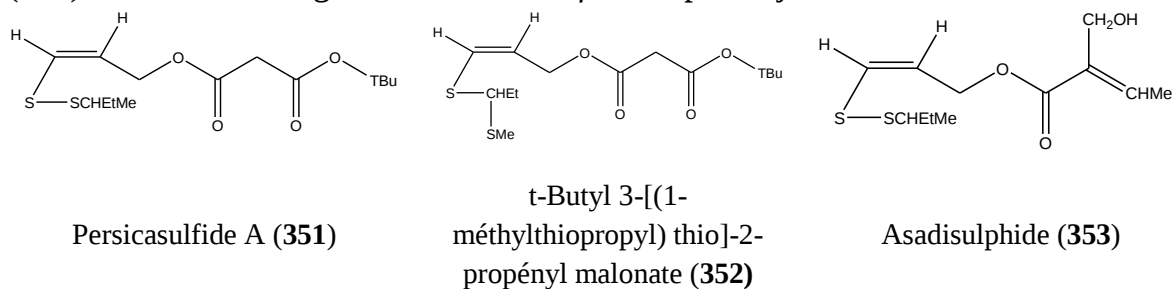


Figure I. 50 : Structures de dérivés soufrés isolés du genre *Ferula*

VI. CONCLUSION

L'utilisation des espèces du genre *Ferula* est très répandue, aussi bien dans le bassin méditerranéen qu'en Asie centrale. Les racines et les résines des espèces de ce genre sont les parties les plus souvent employées en médecine traditionnelle. Elles sont utilisées notamment pour leurs propriétés carminative, antiseptique des intestins, anti-morsure de scorpions, antihystérique, antiépileptique, expectorante, laxative et antidiabétique. Ces plantes sont également connues en tant que sources de gomme-oléorésines tels que le galbanum et l'ase fétide.

Les données phytochimiques du genre *Ferula* ont été rapidement développées pendant les vingt dernières années. Une centaine d'espèces de ce genre ont déjà été étudiées, pour aboutir à des centaines de composés identifiés, dont la majorité appartient aux terpénoïdes. Les daucanes et les sesquiterpènes coumariniques sont des métabolites secondaires caractéristiques du genre *Ferula*. Ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de ce genre. D'autres classes de sesquiterpènes tels que les sesquiterpènes à squelette germacrane, cadinane, humulène et les sesquiterpènes lactones sont également rencontrées.

Des activités biologiques intéressantes ont été rapportées pour les divers types de structures isolées à partir de ce genre. Les daucanes ont montré notamment des activités chimiopréventives ou cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cancéreuses, alors que les sesquiterpènes coumariniques sont décrits comme des agents révertants de la MDR.

Malgré l'intérêt que suscitent les espèces *Ferula*, seulement deux espèces poussant en Algérie (*F. communis* et *F. tingitana*) rencontrées sont bien exploitées au niveau des études phytochimiques et biologiques.

Bibliographie

- [1]- P. Quezel, S. Santa, Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris, 1963.
- [2]- M.G.Pimenov, M.V. Leonov, South African Journal of Botany, 70(3), 417-419, 2004.
- [3]- P. Ozenda, Flore et végétation du Sahara. In : CNRS (Ed.), Paris, 1991.
- [4]- V. H. Heywood, Les plantes à fleurs, 306 familles de la flore mondiale. Nathan. Paris.335, 1996.
- [5]- G. Deysson, Organisation et classification des plantes vasculaires. Tome II, Ed. SEDES, 390, 1979.
- [6]- S. R. Downie, M. F. Watson, K. Spalik, D. S. Katz-Downie, Can. J. Bot., 78, 506–528, 2000.
- [7]- R. E. Spichiger, V.V. Savolenene, M. Figeat, J. D. Monod, Botanique systématique des plantes à fleurs. 2^{ième} Ed. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes CH-1050, Lausanne, 2000.
- [8]- G.L. Guignard, Botanique, 8^e éd., MASSON. Paris, Rome, Barcelone, Bonn, 1993.
- [9]- C. R. Tirapelli, C. R. De Andrade, A. O. Cassano, F. A. De Souza, S. R. Ambrosio, F. B. Da Costa, A. M. De Oliveira, Journal of Ethnopharmacology, 110, 23-29, 2007.
- [10]- L. Chang-Shook, R.S. Downie, Can. J. Bot., 84, 453-468, 2006.
- [11]- J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. (3). Techniques et documentation, Paris, 1999.
- [12]- M.G. Pimenov, M.V. Leonov, Turk. J. Bot., 28, 139-145, 2004.
- [13]- J. Brugère- Picoux,. Maladies des moutons. 2^{ième} éd. France Agricole, 2004.
- [14]- A., M. Cauwet-Marc, F.Z. Elaloui-Fares, Acta. Bot., 45 189-198. Barcelone, 1998.
- [15]- M. G. Pimenov, Y. E. Sklyar, A. A. Savina, Y.U.V Baranova, Biochemical Systematics and Ecology, 10(2), 133-138, 1982.
- [16]- V. S. Shneyer, N. G. Kuttyavina, M.G. Pimenov, Plant Syst. Evol., 236: 175–194, 2003.
- [17]- R. Kurzyrna-Młynik, A. A. Oskolski, S.R. Downie, R. Kopacz, A. Wojewodzka K. Spalik. Plant Syst. Evol., 274, 47-66, 2008.
- [18]- H. Koerper A.L. Kolls, Economic Botany, 53, 133-144, 1999.
- [19]- M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, A. Ziyat. J. Diabetes & Metabolism, 10, 33-50, 2002.
- [20]- C.L. Lee, L. Chiang-Chai, L.H. Cheng, C.C. Liaw, M.H. Ab del-razek, F.R. Chang, J. Nat. Prod., 72(9), 1568-1572, 2009.
- [21]- J.H Lee, S. Choi, Y. Lee, H.J. Lee, K.H. Kim, K.S. Ahn, H. Bea, H.J. Lee, E.O. Lee, K.S. Ahn, S. Y. Ryu, J. Lü, S. H. Kim, Mol. Cancer Ther., 9, 389-399, 2010.
- [22]- M. Erat, H. Sakiroglu, O. I. Kufrevioglu, Food Chemistry, 95, 503–508, 2006.
- [23]- E.L. Ghisalberti, Phytochemistry, 37, 597-623, 1994.
- [24]- T. Kajimoto, K. Yahiro T. Nohara, Phytochemistry, 28, 1761-1763, 1989.
- [25]- A.A. Ahmed, M-E F. Hegazy, A. Zellagui, S. Rhouati, T.A. Mohamed, A.A. Sayed, M.A. Abdella, S. Ohta, T. Hirata, Phytochemistry, 68, 680-686, 2007.
- [26]- A.A. Ahmed, M. Abd El-Razek, E.A. Abu Mostafa, H.J. Williams, A.I. Scott, J.H. Reibenspies T. Mabry, J.Nat. Prod. 59, 1171-1173, 1996.

- [27]- M. Iranshahi, M. Mojarab, H. Sedeghian, M.Y. Hanafi-Bojd B. Schneider, *Phytochemistry*, 69, 473-478, 2008.
- [28]- M. Iranshahi, G. Amin, H. Jalalizaseh, A. Shafiee, *Pharmaceutical Biology*, 41, 431-433, 2003..
- [29]- M. Misky, J.T. Mabry, *Phytochemistry*, 24, 1735-1741, 1985.
- [30]- M. A. Al-Yahya, I. Muhammad, H. H. Mirza, *Phytother. Res.*, 12, 335-339, 1998.
- [31]- D. Lamnaouer, O. Fraigui, M.T. Martin, B. Bodo, *Phytochemistry*, 30, 2383-2386, 1991.
- [32]- D.Lamnaouer, F. Ben Khalti, M.T. Martin, B. Bodo, *Phytochemistry*, 36, 1079-1080, 1994.
- [33]- M. Misky, A. Ulubelen J.T. Mabry, *Phytochemistry*, 22, 2231-2233, 1983.
- [34]- N. Kartal, M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou A. Sokmen, *Food Chemistry*, 100, 584-589, 2007.
- [35]- E.K. Khalilova, A.I., Saidkhodzhaev, *Chemistry of Natural Compounds*, 34, 4, 1998.
- [36]- M. Ramezani, H.Hosseinzadeh, K. Mojtahedi, *J. of Ethnopharmacology*, 77, 71–75, 2001.
- [37]- K. Tamemoto, Y. Takaishi, B. Chen, K. Kawazoe, H. Shibata, T. Higuti, G. Honda, M. Ito, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, *Phytochemistry*, 58, 763-767, 2001.
- [38]- Y. Diab, R. Dolmazon, B. Fenet, *Flav. Fragr. J.*, 16, 397-400, 2001.
- [39]- A. Lhuillier, N. Fabre, E. Cheble, F. Oueida, S. Maurel, A. Valentin, I. Fourasté, *J. Nat Prod.*, 68, 468-471, 2005.
- [40]- J. Yang, Z. An, Z. Li, S. Jing, H. Qin, *Chem. Pharm. Bull.*, 54 (11), 1598-1598, 2006.
- [41]- M. Iranshahi, S.T. Hosseini, A.R. Shahverdi, K. Molazade, S.S. Khan, V.U. Ahmad *Phytochemistry*, 69, 2753-2757, 2008.
- [42]- K. Suzuki, M. Okasaka, Y. Kashiwada, Y. Takaishi, G. Honda, G. Ito, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, M. Sekia, Y. Ikeshiro, *J. Nat Prod.*, 70, 1915-1918, 2007.
- [43]- T. Motai, S. Kitanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 52(10), 1215-1218, 2004.
- [44]- P. Kumar, D.K. Singh, *Chemosphere*, 63, 1568-1574, 2006.
- [45]- H. Sadraei, G.R. Asghari, V. Hajhashemi, A. Kolagar, M. Ebrahimi, *Phytomedicine*, 8(5), 370–376, 2001.
- [46]- A. Mandegary, M. Sayyah, M.R. Heidari, *DARU*, 12 (2), 58-62, 2004.
- [47]- P. Zanolli, M. Zavatti, M. Rivasi, M. Baraldi, *Physiology & Behavior*, 86, 69-74, 2005.
- [48]- E. Aoun, J. Rimab, G. Chidiac, K. Hanna, *J. of Food Composition and Analysis* 18, 607–615, 2005.
- [49]- L. D. Kotenko, A.U. Mamatkhanov, M.T. Turakhozhaev, A.I. Saidkhodzhaev, *Chemistry of Natural Compounds*, 37, 2, 2001.
- [50]- L. Arnoldi, M. Ballero, N. Fuzzati, A. Maxia, E. Mercalli, L. Pagni, *Fitoterapia*, 75, 342- 354, 2004.
- [51]- F. Poli, G. Appendino, G.Sachetti, M. Ballero, N. Maggiano, F.O. Ranalett, *Phytother. Res.*, 19, 152-157, 2005.
- [52]- G. Appendino, P. Spagliardi, G. Cravotto, V. Pocock, S. Milligan, *J. Nat. Prod.*, 65, 1612-1615, 2002.
- [53]- C. T. Saizarbitoria, P. Boutros, A. Amesty, A. Bahsa, Y. Mathison, M. Del Rosario, M. Garrido, A. Israel, *Journal of Ethnopharmacology*, 106, 327–332, 2006.

- [54]- S. Gibbons, *Nat. Prod. Rep.*, 21, 263-277, 2004.
- [55]- B. Chen, R. Teranishi, K. Kawazoe, Y. Takaishi, G. Honda, M. Itoh, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, *Phytochemistry*, 54, 717-722, 2000.
- [56]- A.Y. Abramov, M.V. Zamaraeva, A.I. Hagelgans, R.R. Azimov O.V. Krasilnikov, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1512, 98-110, 2001.
- [57]- A. Macho, M. Blanco-Molina, P. Spagliardi, G. Appendino, P. Bremner, M. Heinrich, B.L. Fiebich, E. Munoz, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 875-883, 2004.
- [58]- T. Lu, F.J. Parodi, D. Vargas, L. Quijano, E.R. Mertoetomo, M.A. Hjorti, N.H. Fischer *Phytochemistry*, 33(1), 113-116, 1993.
- [59]- G. Appendino, J. Jakupovic, E. Bossio, *Phytochemistry*, 49(6), 1719-1722, 1998.
- [60]- A. I Saidkhodzhaev. A.U. Mamatkhanov. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(6)645-656, 1995.
- [61]- J.Cumanda, G. Marinoni, M. De Bernardi, G. Vidari, P. Vita Finzi, *J. Nat. Prod.*, 54, 460-465, 1991.
- [62]- R. Alkhatib, T. Hennebelle, S. Joha, T. Idziorek, C. Preudhomme, B. Quesnel, S. Sahpaz F. Bailleul, *Phytochemistry*, 69, 2979-2983, 2008.
- [63]- S.N. Gard Vishwapaul, S.N. Rastogi, *Phytochemistry*, 29(2), 531-533, 1990.
- [64]- S.N. Gard, L.N. Misra, S.K. Agarwal, V.P. Mahajan, S.N. Rastogi, *Phytochemistry*, 26(2), 449-450, 1987.
- [65]- G. Appendino, S. Tagliapietra, L. Paglino, G.M. Nano, D. Monti V. Picci, *Phytochemistry*, 29 (5), 1481-1484, 1990.
- [66]- B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, P. Gonzalez, M.G. Hernandez, L.C. Larruga, *Phytochemistry*, 24, 501-504, 1985.
- [67]- G. Appendino, J. Jakupovic, S. Alloati, M.V. Ballero, *Phytochemistry*, 45 (8), 1639-1643, 1997.
- [68]- A.A. Ahmed, *Phytochemistry*, 50, 109-112, 1999.
- [69]- M. G. Valle, G. Appendino, G.M. Nano, V. Picci, *Phytochemistry*, 26 (1), 253-256, 1987.
- [70]- J.G. Diaz, B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, M.G. Hernandez, *Phytochemistry*, 23(11), 2541-2544, 1984.
- [71]- A.A. Ahmed, *Phytochemistry* 30(4), 1207-1210, 1991.
- [72]- A.G. Gonzalez, J.G. Diaz, L.A. Lopez, E. Valencia, P.P. De Paz, J.B. Barrera, *Phytochemistry* 33(4), 863-866, 1993.
- [73]- M. Misky, J.T. Mabry, *J.Nat.Prod.*, 49 (4), 657-660, 1986.
- [74]- M. Misky, A. Ulubelen, J.T. Mabry, *Tetrahedron*, 40 (24), 5197-5201, 1984.
- [75]- A. U. Babekov, A.I. Saidkhodzhaev, B.M. Mirzubraimov, B.M. Keneshov, *Chemistry of Natural Compounds*, 37(2), 195, 2001.
- [76]- M.A. Hegazy, C. Kuwata, A. Matsushima, A.A. Ahmed, T. Hirata, *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, 39, 13-17, 2006.
- [77]- J.G. Diaz, B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, M.G. Hernandez, A. Perales, *Phytochemistry*, 25, 1661-1165, 1986.
- [78]- A.A. Ahmed, M. Abd El-Razek, M.I. Nassar, S. Izumi, S. Ohta, T. Hirata, *Phytochemistry*, 57, 513-515, 2001.
- [79]- B.M. Fraga, M.G. Hernandez, J.G. Diaz, *Phytochemistry*, 28 (6), 1649-1652, 1989.

- [80]- M. Misky, J.T. Mabry, *Phytochemistry*, 25 (7), 1673-1675, 1986.
- [81]- G. Appendino, H.C. Ozen, G.M. Nano, M. Cisero, *Phytochemistry*, 31 (12), 4223-4226, 1992.
- [82]- C. Barthomeuf, S. Lim, M. Iranshahi, P. Chollet, *Phytomedicine*, 15, 103-111, 2008.
- [83]- C. Barthomeuf, M. Demeule, J. Grassi, A. Saidkhodjaev R. Beliveau, *Planta Med.*, 72, 634-639, 2006.
- [84]- M. Lahouel, R. Zini, A. Zellagui, S. Rhouati, P.A. Carrupt, D. Morin, D., *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 355, 252-255, 2007.
- [85]- A.R. Shahverdi, R. Mirjani, G. Amin, A. Shafiee, M. Iranshahi, *J. Basic Microbiol.*, 45(6), 470-474, 2005.
- [86]- M. Iranshahi, P. Arfa, M. Ramezani, M.R. Jaafari, H. Sadeghian, C. Bassarello, S. Piacente, C. Pizza, *Phytochemistry*, 68, 554-561, 2007.
- [87]- A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, G. Zarrini, G. Dehghan, M. Iranshahi, *Pharmaceutical Society of Japan*, 30 (9), 1805-1807, 2007.
- [88]- A. A. Gohar, A.A. El-Bassuony, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 15(1), 33-37, 2007.
- [89]- M. Misky, A. Ulubelen, E. Lee, J.T. Mabry, *J. Nat. Prod.*, 48 (2), 326-327, 1985.
- [90]- M. Iranshahi, G. Amin, A. Shafiee, *Pharmaceutical Biology*, 42, 440-442, 2004.
- [91]- M.H. Abd El-Razek, S. Ohta, A.A. Ahmed, T. Hirata, *Phytochemistry*, 58, 1289-1295, 2001.
- [92]- K.A. Eshbakova, A.I. Saidkhodzhaev, *Chemistry of Natural Compounds*, 39 (2), 221-222, 2003.
- [93]- A. U. Babekov, A.I. Saidkhodzhaev, B.M. Keneshov, *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2), 220, 2000.
- [94]- G. Appendino, L. Maxia, M. Bascope, P.J. Houghton, G.S. Duffhues, E. Munoz, O. Sterner, *J. Nat. Prod.*, 69, 1101-1104, 2006.
- [95]- G. Appendino, G. Cravatto, O. Sterner M. Ballero, *J. Nat. Prod.*, 64, 393-395, 2001.
- [96]- P. Zhou, Y. Takaishi, H. Duan, B. Chen, G. Honda, M. Itoh, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, K.H. Lee, *Phytochemistry*, 53, 689-697, 2000.
- [97]- B. N. Su, Y. Takaishi, G. Honda, M. Itoh, Y.K. Takeda, O. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, *J. Nat. Prod.*, 63, 520-522, 2000.
- [98]- A. Nagatsu, K. Isaka, K. Kojima, P. Ondognii, O. Zecgeegiin, P. Gombosurengyin, K. Davgiin, B. Irfan, M.C. Iqbal, Y. Ogihara, *Chem. Pharm. Bull.*, 50 (5), 675-677, 2002.
- [99]- K. Isaka, A. Nagatsu, P. Ondognii, O. Zevgeegiin, P. Ombosurengyin, K. Davgiin, K. Kojima, Y. Ogihara, *Chem. Pharm. Bull.*, 49 (9), 1072-1076, 2001.
- [100]- M.H. Abd El-Razek, S. Ohta, A.A. Ahmed, T. Hirata, *Phytochemistry*, 57, 1201-1203, 2001.
- [101]- M. Misky, J.T. Mabry, O. Saya, *Phytochemistry*, 26 (6), 1733-1737, 1987.
- [102]- M. Miski, J. Jakupovic, *Phytochemistry*, 29(6), 1995-1998, 1990.
- [103]- Y. Shikishima, Y. Takaishi, M. Honda Ito, Y. Takeda, M. Tori, S. Takaoka, O.K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, *J. Nat. Prod.*, 65, 1897-1903, 2002.
- [104]- J. De Pascual Teresa, J.R. Moran, J.M. Hernández, M. Grande, *Phytochemistry*, 24(9), 2071-2074, 1985.

- [105]- J.D. Diaz, B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, M.G. Hernandez, J.M. Miranda, *Phytochemistry*, 23 (7), 1471-1473, 1984.
- [106]- R. Subban, A. Veerakumar, R. Manimaran, K.M. Hashim, I. Balachandran, *J. Nat. Med.*, 62, 369–373, 2008.
- [107]- J.C. Zech, *Brittonia*, 51, 415-421, 1999.
- [108]- T.T. Pangarova, G.G. Zapesochnaya, *Khimiya Prirodnikh Soedinenni* 6, 801-802, 1973.
- [109]- N.S. Maksumova, G.L. Genkina, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2, 217-220, 1993.
- [110]- E.K. Batirov, M.P. Yuldashev, G.A. Nezhinskaya, V.M. Malikov, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 5, 727-728. 1979.
- [111]- T. Zhang, J. Zhou, Q. Wang, *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 801-804, 2007.
- [112]- X.Y. Chen, Q.X. Liu, *Biochemical Systematics and Ecology*, 17(4), 309-310. 1989.
- [113]- B. Ferrari, F. Tomi, J. Casanova, *Flav. Fragr. J.*, 20, 180–185, 2005.
- [114]- K. Javidnia, R. Miri, M. Kamalinejad, N. Edraki, *Flav. Fragr. J.*, 20, 605–606, 2005.
- [115]- M.H. Filippini, F. Tomi, J. Casanova, *Flav. Fragr. J.*, 04, 084-087, 2000.
- [116]- K.H.C. Baser, T. Ozek, B. Demirci, M. Kurkçuoğlu, Z. Aytac, H. Duman, *Flav. Fragr.J.*, 40, 260-261, 1999.
- [117]- Y. Ghasemi, P. Faridi, I. Mehregan, A. Mohagheghzadeh, *Chemistry of Natural Compounds*. 41(3), 312-314, 2005.
- [118]- S. Shatar, *Chemistry of Natural Compounds*, 41(5), 607-608, 2005.
- [119]- M. Khajeh, Y. Yamini, N. Bahramifar, *Food Chemistry*, 91, 639–644. 2005.
- [120]- F. Eftekhari, M. Yousefzadi, K. Borhani, *Fitoterapia*, 75, 758–759. 2004.
- [121]- G. Dehghan, R. Solaimanian, A.R. Shahverdi, G. Amin, M. Abdollahi, A. Shafiee, *Flav. Fragr. J.*, 22, 224–227, 2007.
- [122]- M. Iranshahi, G.R. Amin, M. Amini, A. Shafiee, *Phytochemistry*, 63, 965–966, 2003.

CHAPITRE II- GENERALITES

I. ETUDE DES TERPENOIDES

I.1. Généralités

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes) [1 ; 2 ; 3].

Tout terpène est construit par un assemblage d'un nombre variable d'unités isopréniques C_5H_8 . La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques est basée sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette, ainsi on cite :

- les monoterpènes qui comptent deux unités isoprènes soit 10 atomes de carbone.
- les sesquiterpènes avec 3 unités isoprènes soit 15 atomes de carbone
- les diterpènes comportant 4 unités isoprènes soit 20 atomes de carbone
- les sesterpènes comptant 25 atomes de carbone
- les triterpènes comportant 30 atomes de carbone
- les tétraterpènes contiennent 40 atomes de carbone.

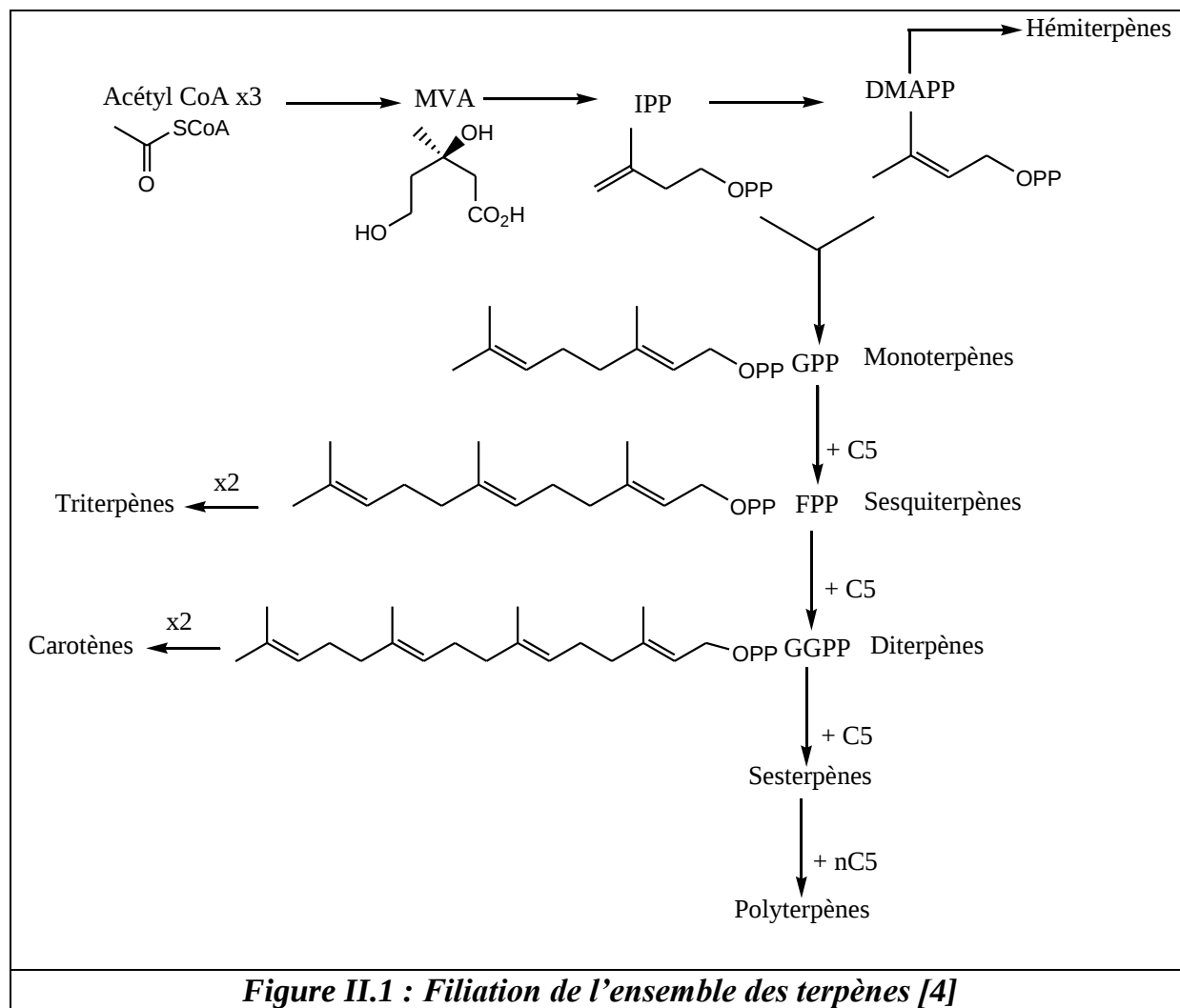
Certains groupes de molécules n'obéissent pas à cette règle et, parmi ceux-ci, les stéroïdes qui ne comptent que 27 carbones. Le nombre de répétitions de ce motif isoprénique, mais aussi, les réactions de cyclisation, les réarrangements et les diverses oxydations et réductions que peut subir le squelette carboné sont à l'origine de la grande diversité structurale de ces molécules [1].

I.2. Biosynthèse

La biosynthèse des terpènes est initialisée par la formation des unités à cinq atomes de carbones (C_5) ou isoprènes actifs, la formation de l'acéto-acétate et la condensation aldolique avec une molécule d'acétyl-coenzyme A (Figure II.1). La réaction se produit en présence du coenzyme A synthase (AcSCoA) et du CoA réductase, pour former l'acide 3R mévalonique (MVA). La conversion de MVA en structures hémiterpéniques est réalisée en trois phosphorylations successives, permettant d'introduire le groupe pyrophosphate, dont l'élimination conduit à la formation du pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et du pyrophosphate de diméthylallyle (DMAPP), deux isomères.

La condensation de ces deux unités aboutit à la formation du pyrophosphate de Géranyle (GPP), le précurseur des monoterpènes. La condensation du pyrophosphate de géranyle avec une molécule de pyrophosphate d'isopentényle permet d'obtenir le pyrophosphate de *trans* farnesyle (FPP), qui est le précurseur des sesquiterpènes.

Les réactions se terminent soit par formation d'hydrocarbures soit par addition d'un nucléophile tel que l'eau et donc formation d'un alcool. L'oxydation et l'estérification de ce dernier donnent naissance aux multiples cétones et acétates connus dans les terpénoïdes [1].



I.3. Rôle et activités

Faisant partie des constituants des huiles et des extraits, ils sont connus depuis l'Antiquité, comme ingrédients dans les savons, parfums, médicaments et pigments. Le camphre est l'exemple le plus courant et disponible à l'état solide. Il a été introduit d'Orient en Europe depuis environ onze siècles. De nos jours, ceux-ci sont commercialisés de façon importante, notamment dans l'industrie cosmétique, l'agro-alimentaire ou la parfumerie. Leurs activités sont extrêmement variées.

Ainsi, les monoterpènes et les sesquiterpènes peuvent intervenir dans les propriétés pharmacologiques attribuées aux fractions volatiles des extraits végétaux [1].

Les sesquiterpènes possèdent un large spectre d'activités biologiques. Parmi elles sont mentionnées des exemples d'agents naturels anti HIV, des insecticides, fongicides, antiappétants pour les insectes, antitumoraux ainsi que des agents modulateurs de la MDR. [5, 6, 7, 8]. Les sesquiterpènes lactones sont très répandus dans les Asteraceae. Les réactions allergiques et les phytodermatoses constatées au contact de ces espèces dans l'ouest de l'Europe leur sont d'ailleurs attribuées. Par ailleurs, ils sont connus comme des composés particulièrement actifs, notamment antifongiques, cytotoxiques, antibactériens et antitumoraux [9, 10]. Les sesquiterpènes lactones de type guaianolide présents dans les Apiaceae ont montré des activités anti-inflammatoires et cytotoxiques intéressantes [11 ; 12].

Les diterpènes possèdent de nombreuses propriétés biologiques notamment anti-hypertensives, abortives, antitumorales et anti-inflammatoires. Plusieurs drogues contenant des diterpènes font l'objet de formulations de phytothérapie ou entrent sous la forme de préparations galéniques. Parmi les diterpènes les plus intéressants en thérapeutique, on trouve les dérivés tricycliques des ifs tels que le taxol utilisé classiquement en chimiothérapie [1]. Un bon nombre de diterpènes macrocycliques isolés à partir des Euphorbiaceae se sont avérés être des modulateurs prometteurs de la MDR dans les cellules cancéreuses [13].

Enfin, les triterpènes possèdent des potentialités thérapeutiques dans de nombreux domaines : cytostatiques, antiviraux, insecticides, anti-inflammatoires, molluscides et analgésiques notamment. Il est important de signaler entre autres leur intérêt considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique particulièrement dans la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés contraceptives, anabolisantes, anti-inflammatoires [1 ; 14].

I.4. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes constituent la partie la plus importante des terpénoides. Ils sont construits suite à un assemblage de trois unités isoprène ($3 \times C_5$). Les variations structurales dans cette série sont de même nature que pour les monoterpènes, carbures, alcools, cétones, avec tout de même une probabilité de cyclisation plus importante. Par conséquent, plus d'une centaine de squelettes sont connus. Ils découlent tous du précurseur farnesylpyrophosphate, offrant ainsi plus d'un millier de structures différentes.

Quelques exemples de structures communes sont mentionnés sur la figure II.2.

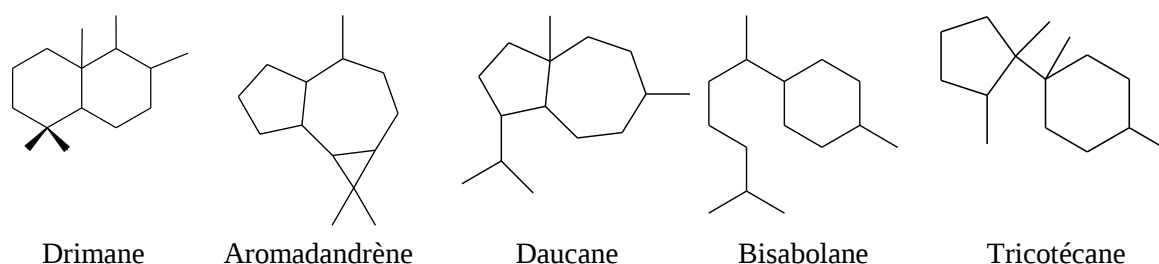


Figure II.2 : Quelques structures communes des sesquiterpènes

I.4.1. Les sesquiterpènes de type Daucane

Les sesquiterpènes, ayant un squelette daucane sont appelés également carotanes par certains auteurs. Les deux noms dérivent de *Daucus carota* [15]. Le nom carotane n'est pas très utilisé pour éviter la confusion entre carotanes et caroténoïdes. Ces composés ont été longtemps considérés comme constituants exclusifs de la famille des Apiaceae, avant d'être isolés dans d'autres familles botaniques notamment, les Asteraceae et les Rosaceae, ainsi que dans quelques champignons et organismes d'origine marine [16].

La majorité des composés ayant ce squelette ont été isolés entre 1950 et 1970. La laserpetine fut la première molécule isolée en 1865 à partir d'une Apiaceae : *Laserpitium latifolium*. Cependant sa structure n'a été élucidée qu'en 1970, après plusieurs études chimiques ayant au préalable permis l'identification des structures du daucol et du carotol dans l'extrait à l'éther des fruits de *Daucus carota* [17].

Ces structures comportent en général deux positions oxygénées ou plus, dont au moins une est estérifiée soit avec des groupements acides aliphatiques ou des acides aromatiques dont les structures numérotées ont été vues dans le chapitre I. La régularité observée dans les positions substituées s'explique par le fait que toutes ces structures dérivent du farnésol [15].

Les dérivés acétylés du jaeschkeanadiol constituent le groupe le plus commun de ces molécules dans les Apiaceae et particulièrement dans le genre *Ferula*. Néanmoins, d'autres structures originales ont été également mises en évidence dans d'autres familles de végétaux, notamment des peroxydes, dont nous citons le rugosal isolé de *Rosa rugosa* (Rosaceae). Les Asteraceae renferment à leur tour un nombre important de composés de ce type [18].

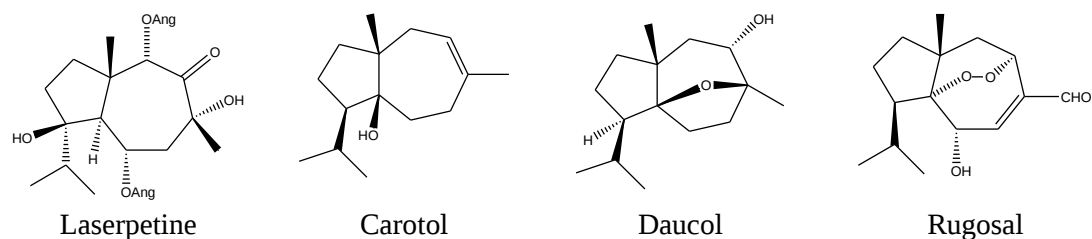


Figure II.3: Exemples de molécules daucanes isolées dans le règne végétal

Parmi les daucanes isolés des champignons, sont cités l'acide asperterrique, et la fulvoferrugine les quels sont isolés respectivement de *Aspergillus terreus* et *Marasmius fulvoferrugineus* [17 ; 19]. Reino et *al.* ont pu isoler 4 nouveaux daucanes à savoir les trichocaranes A–D à partir de *Trichoderma virens* [20].

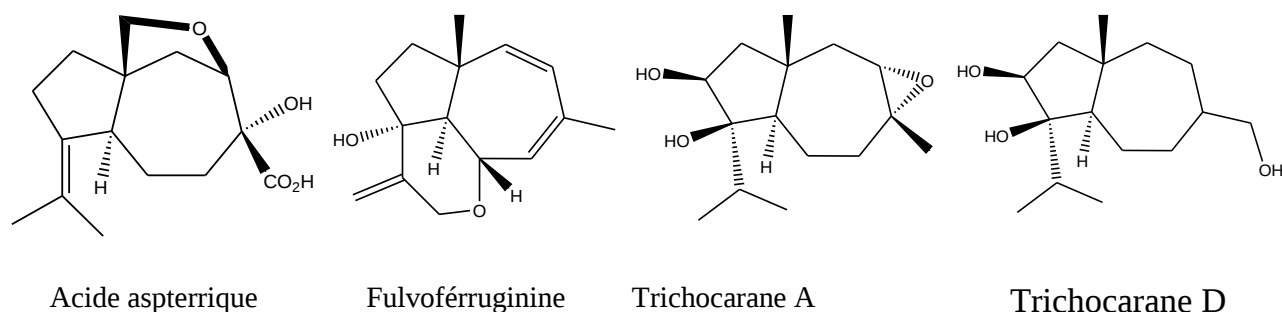


Figure II.4 : Exemples de daucanes identifiés dans les champignons

Ces composés sont également présents dans les éponges marines, le styxone B a été mentionné dans *Myrmekioderma styx* [21 ; 19].

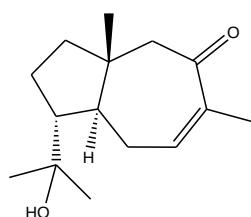


Figure II.5 : Structure du Styxone B

Une autre classe de sesquiterpènes présentant le même squelette que les daucanes à l'exception de la position du méthyle-14 qui est sur le C-7 au lieu du C-8 est nommée isodaucane. La première molécule isolée est la (-)-mintsulfide mise en évidence dans les huiles essentielles de la menthe poivrée (*Mentha piperita*) et de la sauge (*Salvia officinalis*) appartenant à la famille des Lamiaceae.

Par ailleurs, un isodaucane issu de l'espèce *Reneilimia cincinnata* (Zingiberaceae) a été mentionné. Il s'agit du 6,7,10-trihydroxyisodaucane [23]. Ces composés se trouvent aussi, dans les éponges marines dans lesquelles des dérivés isonitrile et isothiocyanate sont répertoriés, notamment dans l'espèce *Acanthella acuta*.

Du point de vue de leur biogenèse, selon Ghisalberthi, ces composés semblent ne pas avoir la même origine que les daucanes [17].

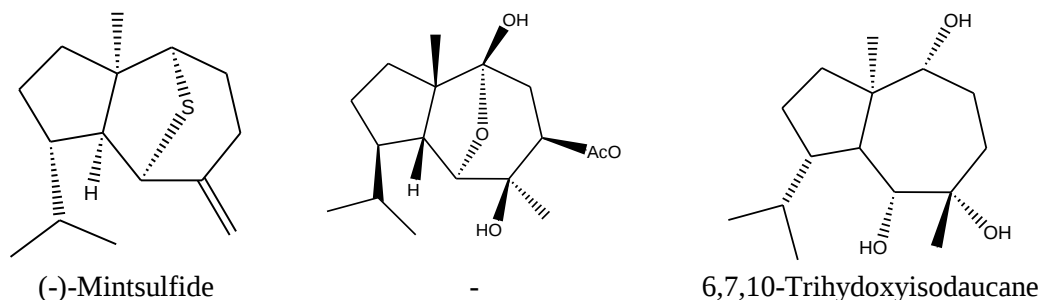


Figure II.6 : Exemples de molécules isodaucanes

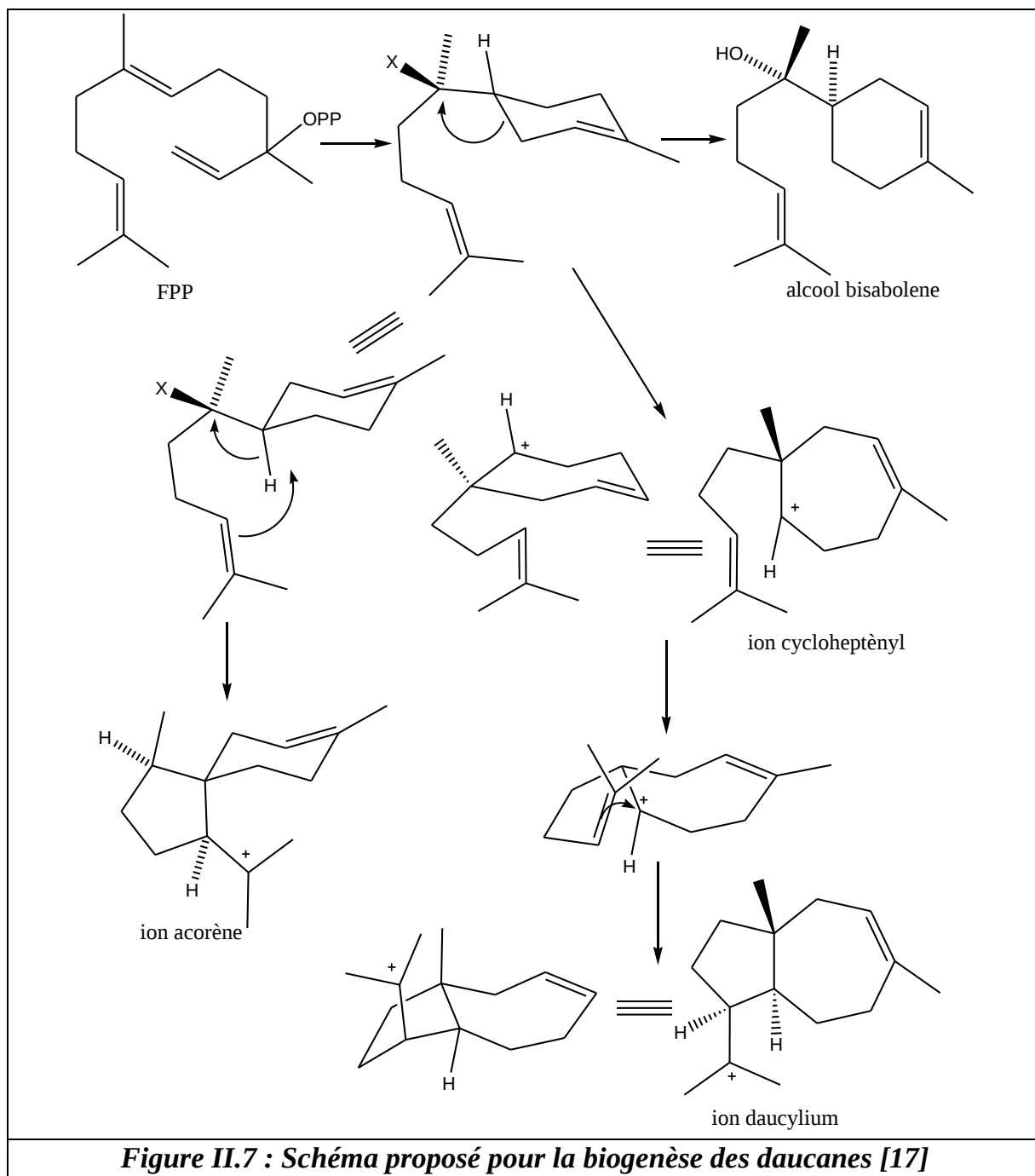
I.4.2. Biogenèse des daucanes

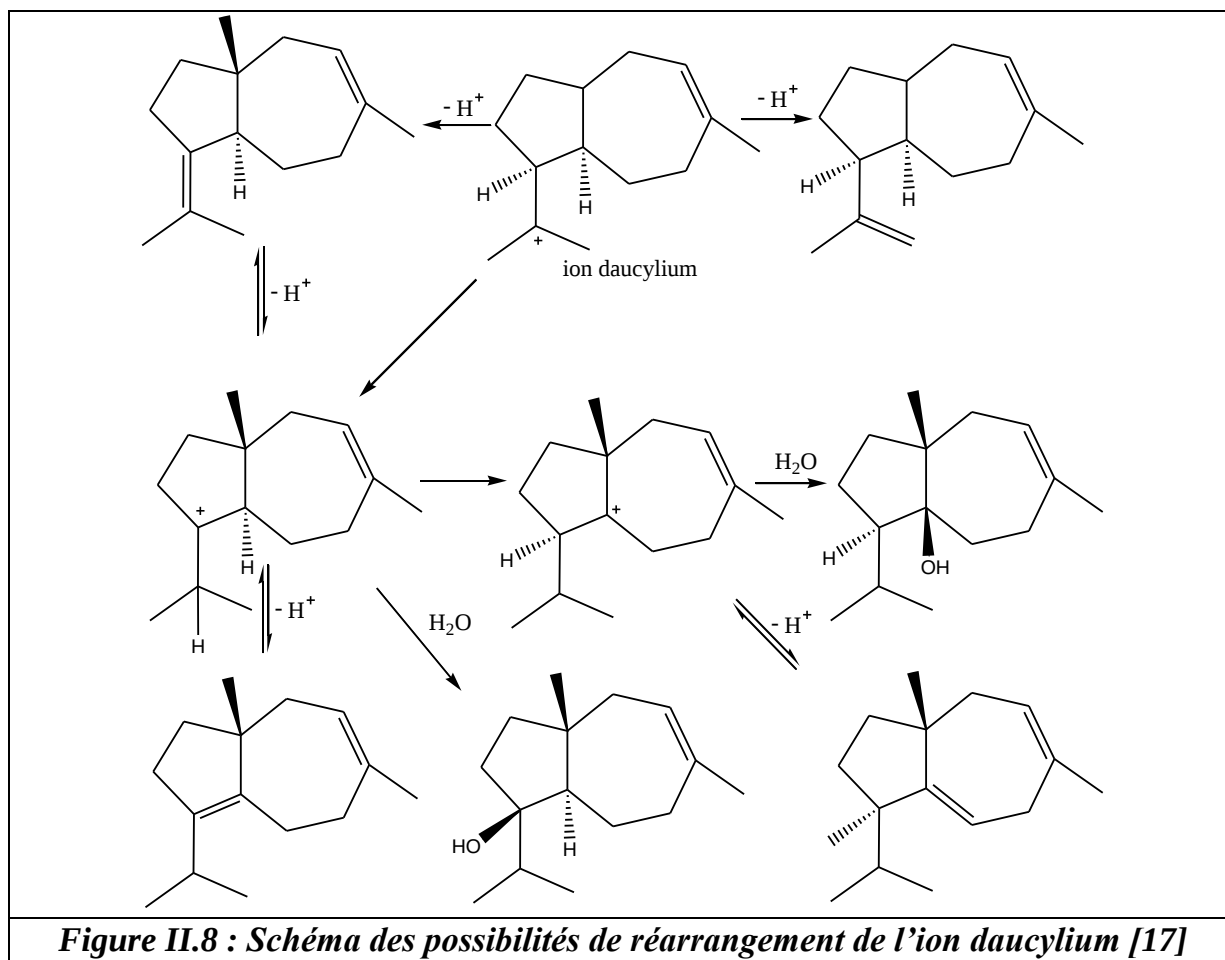
Après plusieurs études ayant tenté d'expliquer le chemin de la biogenèse de cette classe de produits, le schéma représenté sur la figure II.7 a été proposé. Le fait que d'autres sesquiterpènes ayant des squelettes différents, en l'occurrence les guaïanes, les himachalanes, les germacrane, les humulane et les sélina sont présents simultanément avec les daucanes, suppose un précurseur commun du cycle dihydroazulénique [17].

Par ailleurs, des corrélations biosynthétiques sont suggérées entre les bisabolane, les acorane et les daucane. Le chemin aboutissant à ces trois squelettes est développé dans la figure II.7.

L'entité intermédiaire stabilisée, obtenue par cyclisation du pyrophosphate tertiaire acyclique peut devenir un précurseur pour l'alcool bisabolène, l'ion acorène ainsi que l'ion cycloheptényle. Ce dernier peut être considéré comme le précurseur des daucanes. Au cours de la formation du cyclopentane, un ion tertiaire carbonium (daucylium) et la jonction *trans* entre les deux cycles sont générés.

Plusieurs possibilités sont envisagées pour la structure de l'ion daucylium en fonction de l'élimination d'un proton et de la neutralisation par une molécule d'eau (Figure II.8).





I.4.3. Les sesquiterpènes coumariniques

Ils constituent une classe de métabolites secondaires importante. Du fait de leur distribution très spécifique, ils présentent un intérêt chimiotaxonomique considérable. Ils sont répandus notamment dans les Apiaceae et plus particulièrement dans le genre *Ferula* ainsi que dans la famille des Asteraceae [23]. Les gommes et les racines des espèces *Ferula* connues pour leur large usage en médecine traditionnelle, constituent de meilleures sources pour les sesquiterpènes coumariniques comparativement aux parties aériennes [24].

Les diverses activités biologiques attribuées à cette classe de composés sont à l'origine des nombreuses études phytochimiques et pharmacologiques effectuées sur les espèces du genre *Ferula*. Ces molécules sont dotées notamment de propriétés antiprolifératives sur différentes cellules cancéreuses. Par ailleurs, elles sont reconnues comme de bons modulateurs des transporteurs ABC notamment la P-gp [25 - 27 ; 13].

De plus, cette classe de composés offre de nombreux agents antitumoraux naturels. Les études pharmacologiques réalisées ont laissé suggérer que dans les structures prénylées, le prényle joue un rôle important dans l'activité antitumorale comme dans le cas des xantones, des flavonoides, des coumarines et des phénylpropanoïdes [28].

Iranshahi *et al* ont mis en évidence dans une autre étude *in vivo* le rôle chemopréventif vis-à-vis du cancer de la diversine [29].

De nombreux dérivés du féruléol (4-hydroxy-3-farnésylcoumarine) sont décrits dans le genre *Ferula*, mais la structure la plus typique de ce genre est l'umbelliférone (7-hydroxycoumarine) 7-O-terpène éther. La partie sesquiterpénique est très souvent un squelette bicyclique drimane. De nombreuses molécules sont communes aux genres *Ferula* et *Heptaptera* (Apiaceae) [22].

Plusieurs dizaines d'exemples de structures identifiées dans le genre *Ferula* ont été mentionnées dans le premier chapitre.

Concernant les Asteraceae, parmi les genres qui renferment ces molécules, sont cités plus particulièrement *Achillea* et *Artemisia*. Plusieurs dérivés de l'isofraxidine (partie coumarinique) sont rencontrés notamment dans les espèces *Achillea depressa*, *Achillea ochroleuca*, *Artemisia pontica* L., *Artemisia alba* et *Artemisia abrotanum* L. Parmi les composés isolés nous citons le farnochrol (farnésylisofraxidine) et le drimartol B (hydroxydrimenylisofraxidine) [30 - 33].

De plus, des structures similaires ont été isolées à partir des racines d'autres Asteraceae comme *Tanacetum parthenium*, *Tanacetum heterotomum* et *Brocchia cinerea* [33 - 35].

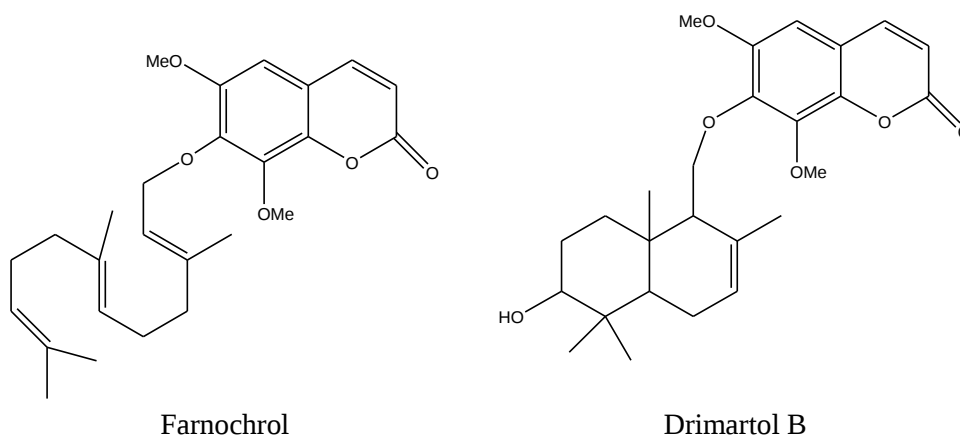


Figure II.9 : Structures du Farnochrol et du Drimartol

Exceptionnellement, nous avons relevé une seule molécule isolée à partir d'une espèce d'Euphorbiaceae, *Euphorbia portlandica* par Madureira et *al.* Il s'agit de la diportlandine [13].

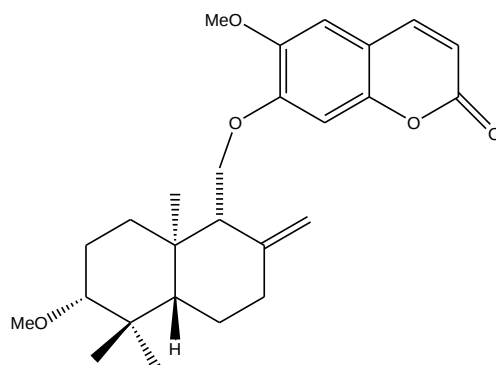


Figure II.10 : Structure de la diportlandine

I.4.4. Biogenèse des sesquiterpènes coumariniques

Le chemin de biogenèse des différents éthers de l'umbelliférone a été proposé par Pimenov *et al.* Selon ces auteurs, ils découlent tous de l'umbelliprénine laquelle apparaît suite à la prénylation de l'umbelliférone par le farnésylpyrophosphate (FPP). L'umbelliprénine subit diverses transformations telles que l'époxydation, la cyclisation et l'oxydation (Figure II.11).

Ils ont également noté que la stéréochimie identique des trois centres asymétriques dans le bicycle drimane révèle une origine commune pour ces différentes molécules. Des réarrangements ont lieu pour aboutir à des composés avec une partie sesquiterpénique aliphatique.

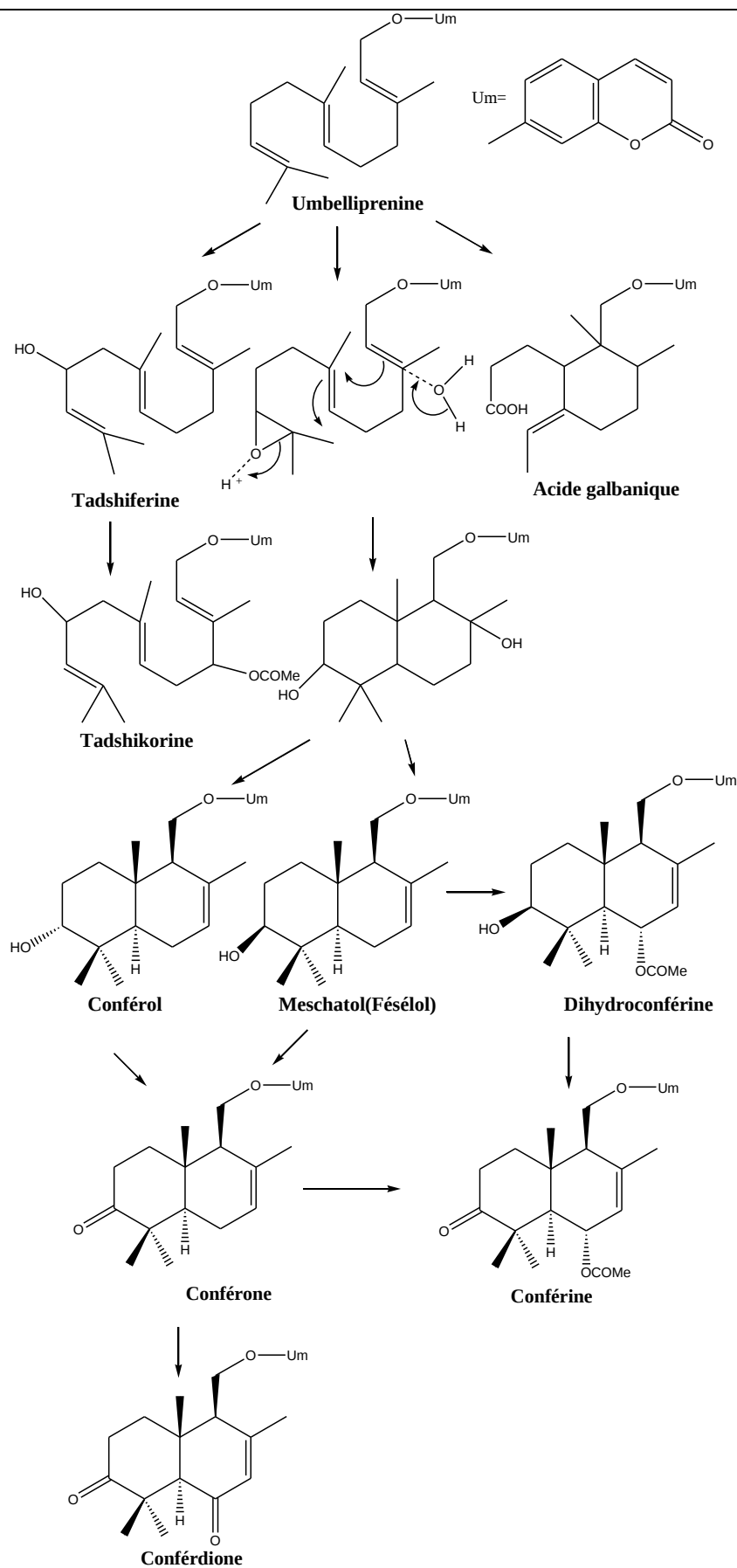


Figure II.12 : Schéma de la biogenèse des sesquiterpènes coumariniques [36]

II. ETUDE DES FLAVONOÏDES

II.1. Introduction

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. A ce jour, plus de 6500 flavonoïdes naturels ont été décrits [37]. Ce sont des pigments végétaux jaune orangés (leur nom venant du mot latin *flavus* : jaune). Ils sont formés par un squelette à 15 carbones, qui à au niveau le plus simple, est constitué par deux cycles phényles A et B, reliés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (figure II.13).

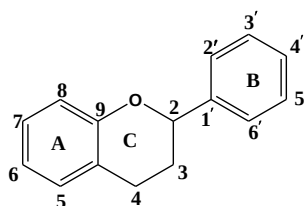


Figure II.13 : Structure de base des flavonoïdes

La cyclisation, le degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C conduisent aux diverses classes de flavonoïdes alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes nous citons les principales : anthocyanes, flavonols, flavones, flavanones, isoflavones et proanthocyanidols (Figure II.14) [37].

Les plantes ont la *quasi* exclusivité de la biosynthèse des flavonoïdes. Ils peuvent être présents dans toutes les parties des plantes. Leur présence a été rapportée chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes. Du fait de leur distribution large et régulière, ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de choix. De nombreuses études chimiotaxonomiques ciblant ces composés sont été menées afin de revoir les classifications végétales classiques [37 - 40].

A l'état naturel, on les trouve le plus souvent sous forme de glycosides. La partie du flavonoïde sans sucre attaché est appelée aglycone ou génine. Ils sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Ils sont également présents sous forme C- ou O-glycosylés. Ces derniers sont de loin les plus fréquents, ils portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8 [1].

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D-glucose est le monosaccharide le plus courant.

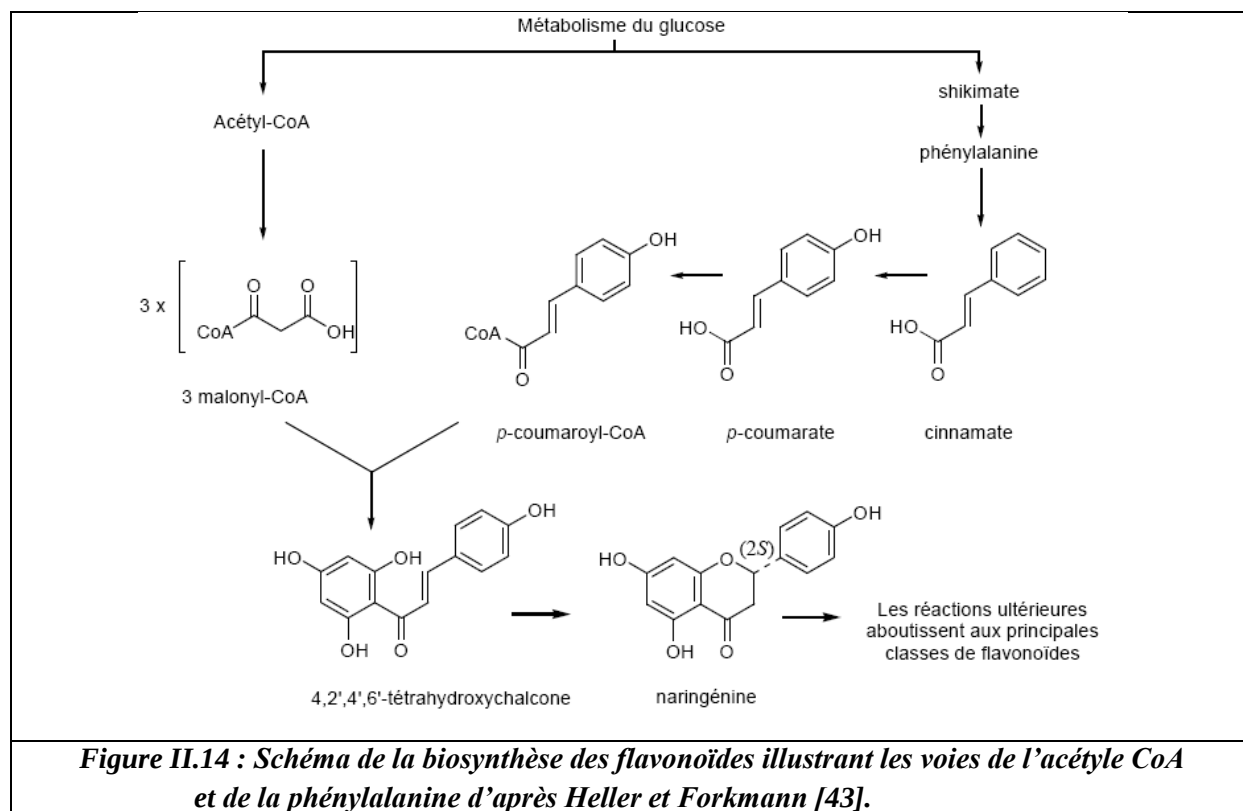
D'autres hexoses, le D-galactose et le D-mannose, ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apirose sont fréquents avec le L-rhamnose et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique). On trouve aussi des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate, l'acétate ou le *p*-coumarate [38 - 42].

II.2. Biogenèse

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issus du métabolisme du glucose.

Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate *via* la phénylalanine qui est convertie en *p*-coumarate puis en *p*-coumaroyl-CoA (Figure II .14).

Le *p*-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalconeisomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(*S*)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes [43].



Quelques exemples de structures de flavonoïdes sont représentés sur la figure II. 15.

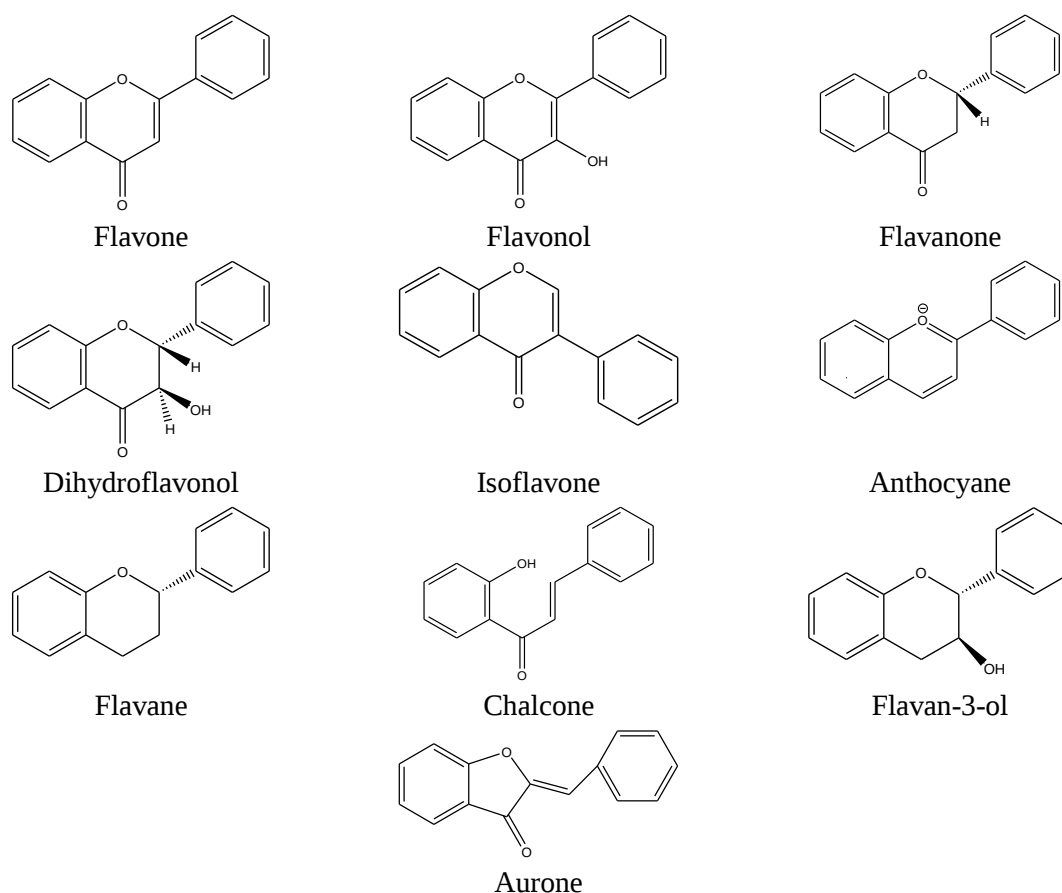


Figure II.15 : Structure des diverses classes de flavonoïdes

II.3. Rôle dans les plantes et activités biologiques

Les flavonoïdes sont des pigments colorés des fleurs. De ce fait, ils jouent un rôle important dans les interactions avec les insectes (attraction et rôle dans la pollinisation et la dispersion des fruits). Ils sont également impliqués dans les interactions plantes-microorganismes. Par ailleurs, ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes. Ils sont reconnus comme des inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus, ils sont impliqués entre autres dans la photosensibilisation, la photosynthèse, la protection contre les UV et la régulation des hormones de croissance des plantes [37].

Le caractère antioxydant des flavonoïdes est une de leurs propriétés fondamentales. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux. Ils inhibent notamment des enzymes impliqués dans la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que les cyclooxygénases ou encore la xanthine oxydase, source biologique importante du radical superoxyde ($O_2^{\bullet}$) [44].

Les flavonoïdes tels que la quercétine inhibent la formation du radical très toxique (OH[•]) par action de chélation du fer nécessaire à cette réaction [45].

En raison de leur faible potentiel redox, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres très oxydés (piégeage des radicaux) comme les superoxydes, les radicaux peroxydes ou les radicaux hydroxyles par transfert d'hydrogène. Ces radicaux seraient responsables d'altérations des acides nucléiques et des processus d'altérations et de cancérisation ainsi que des dégradations cellulaires. Ces dommages oxydatifs peuvent être impliqués dans de nombreuses affections dont les cancers, les inflammations chroniques ainsi que les maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives [44 - 48].

La principale propriété biologique initialement reconnue aux flavonoïdes est d'avoir une activité vitaminique P, c'est-à-dire qu'ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires et de renforcer leur résistance. Cette propriété est exploitée dans le traitement des maladies vasculaires : fragilité capillaire, sénescence cérébrale, crises hémorroïdaires, ulcères variqueux. Ils sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse, ils contribuent dans la préservation de l'intégrité vasculaire, l'amélioration de l'irrigation et la dilatation des artères et réguleraient ainsi la tension artérielle [49].

Par ailleurs, les isoflavones possèdent des potentialités oestrogéniques. On leur attribue globalement, des activités antifongique, antibactérienne et biocide.

Les propriétés anti-inflammatoires reconnues aux zest des *Citrus* sont attribuées aux méthoxyflavones [50; 51]. De plus, les flavonoïdes ont démontré des propriétés intéressantes sur toute une gamme d'activités pharmacologiques. Il s'agit principalement des propriétés antiprolifératives, immunomodulatrices, anti-hépatotoxiques, anti-ostéoporotiques, antimicrobiennes, gastro-protectrices, antivirales et anti-allergiques [38; 52 ; 53 ; 54].

III. ETUDES DES TRANSPORTEURS ABC

III.1. Introduction

La résistance des cellules cancéreuses à une large variété de drogues cytotoxiques, encore appelée MDR (*Multi-Drug Resistance*), représente un problème majeur dans le traitement chimiothérapeutique des cancers. Plusieurs facteurs semblent se partager la responsabilité de la MDR. En résumé, la contribution génétique est de favoriser la surexpression de protéines de transport membranaire lesquelles ont la responsabilité physique d'expulser les molécules exogènes de la cellule. Parmi ces protéines, les plus décrites sont la glycoprotéine-P (P-gp) et la protéine de résistance à la mitoxanthrone (BCRP).

Elles sont localisées dans la membrane cytoplasmique et diminuent la concentration intracellulaire des drogues cytotoxiques par un transport actif de celles-ci vers l'extérieur des cellules [55; 56; 57].

Le mécanisme moléculaire de transport des drogues, n'est pas connu à ce jour, ce qui rend la lutte contre ces systèmes d'efflux d'autant plus difficile. Actuellement, la modulation du phénotype MDR demeure l'un des axes privilégiés de la recherche contre le cancer afin de limiter les échecs de la chimiothérapie. La principale voie de recherche consiste à mettre au point des modulateurs, ou des agents chimio-sensibilisants, destinés à être administrés conjointement aux drogues cytotoxiques afin d'inhiber spécifiquement les pompes membranaires et diminuer l'efflux actif des médicaments, permettant ainsi de restaurer leur activité antitumorale.

Jusqu'à présent, aucune association avec ces agents chimio-sensibilisants n'a dépassé le stade des essais cliniques. La plupart des composés sont en effet reconnus et transportés par ces transporteurs, ce qui impliquerait la nécessité de les administrer à de fortes doses, générant en contrepartie des effets secondaires néfastes.

III.2. MDR, Transporteurs ABC et cancer

Les transporteurs membranaires permettent le passage de molécules à caractère hydrophile à travers la membrane cellulaire lipidique. Ces transporteurs sont des protéines intrinsèques de la membrane et sont divisés en deux groupes, les canaux et les transporteurs. Les transporteurs se différencient des canaux par le fait que ce n'est plus le gradient électrochimique des molécules qui assure le mouvement ionique mais le couplage du transport à une réaction enzymatique exergonique, comme l'hydrolyse de l'ATP (source d'énergie). Ce transport est dit actif. Parmi les principaux transporteurs, les transporteurs actifs primaires ABC (*ATP Binding Cassette*) sont les plus impliqués dans la MDR [58 ; 59].

La famille des transporteurs ABC est une large famille de gènes qui a été bien conservée au cours de l'évolution, de la bactérie à l'être humain, dont on peut trouver actuellement 48 représentants chez les êtres humains [60 ; 61].

La résistance à de multiples agents anticancéreux constitue un grand obstacle dans le traitement de plusieurs maladies malignes. Dans les cellules cancéreuses, la MDR est souvent associée à une diminution de l'accumulation cellulaire des drogues, dépendante de l'ATP. Ce phénomène a été originalement attribué à la surexpression d'une protéine transporteur ABC, la P-gp (codée par le gène ABCB1). Un autre transporteur de drogues a été caractérisé suite à la découverte d'une lignée cellulaire présentant un haut niveau de résistance à la mitoxanthrone et une faible résistance aux anthracyclines.

Ce transporteur, codé par le gène ABCG2, a été finalement identifié sous le nom de BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), ainsi que sous le nom de ABCP (*Placenta-specific ABC protein*), MXR (*Mitoxanthrone Resistance associated protein*) et ABCG2 [62 ; 63].

III.3. La glycoprotéine-P

✓ Structure

La P-gp fait partie d'une large sous-famille de transporteurs ABC : les MDR/TAP. Elle a été la première protéine ABC étudiée et reste la plus étudiée parmi les autres membres des familles des protéines ABC. C'est une phosphoglycoprotéine de 1280 acides aminés (170 kDa), constituée de deux moitiés fortement homologues, contenant chacune un domaine TMD transmembranaire hydrophobe et un domaine NBD ATPase intracellulaire, séparés par un polypeptide flexible *linker* L cytoplasmique qui peut être phosphorylé sur différents sites par la protéine kinase C [64].

Les deux domaines (TMD1 et TMD2) comptent chacun six hélices α prédites potentiellement membranaires, correspondants aux segments TM numérotés de 1 à 12 (Figure II.16). Ces segments transmembranaires sont reliés par des boucles extracellulaires parfois très courtes et par des boucles intracellulaires plus longues. Ils sont impliqués dans la reconnaissance, la fixation et le transport des drogues chimiothérapeutiques. Les domaines hydrophiles intracellulaires (NBD1 et NBD2) comportent les deux séquences consensus de liaison à l'ATP, ou motif A et motif B de Walker, ainsi que le motif C, signature des transporteurs ABC. Les NBD semblent être équivalents du point de vue fonctionnel et agissent de manière coopérative ; ils sont impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP [65].

✓ Expression et rôle

La P-gp est identifiée comme étant une pompe énergétiquement dépendante, conférant une résistance à des produits hydrophobes (toxines et xénobiotiques) et des drogues cytotoxiques pour les cellules cancéreuses. Elle est rencontrée notamment dans les membranes des cellules de certains organes (foie, intestin, pancréas, reins ...) [64 ; 66]. La P-gp a été également mise en évidence dans plusieurs types de cellules placentaires suggérant un rôle dans la protection fœtale vis-à-vis des xénobiotiques. Par ailleurs, elle a été caractérisée dans la barrière hémato-encéphalique, ce qui expliquerait en partie la faible perméabilité de cette membrane [64].

Des études antérieures ont démontré la surexpression de la P-gp, à haut niveau, principalement dans le cancer du colon, du rein, du foie, de l'ovaire, du poumon, dans les leucémies myéloïdes et lymphoïdes aiguës (LMA et LLA respectivement), alors qu'elle est exprimée en faible quantité dans le cancer du sein [67 - 68].

✓ Mécanisme d'action

De nombreuses études ont été menées pour éclaircir le mécanisme d'action des P-gp humaines, et plus particulièrement *via* des mutations. Ces mutations ont lieu sur les domaines transmembranaires, généralement sur les TM 5, 6, 11 et 12. Elles affectent le fonctionnement de la P-gp. Le remplacement d'un résidu par un autre peut selon le cas augmenter ou diminuer le niveau de résistance à une drogue cytotoxique.

De nombreuses études ont été menées pour éclaircir le mécanisme d'action des P-gp maines, et plus particulièrement *via* des mutations. Ces mutations ont lieu sur les maines transmembranaires, généralement sur les TM 5, 6, 11 et 12. Elles affectent le fonctionnement de la P-gp. Le remplacement d'un résidu par un autre peut selon le cas augmenter ou diminuer le niveau de résistance à une drogue cytotoxique.

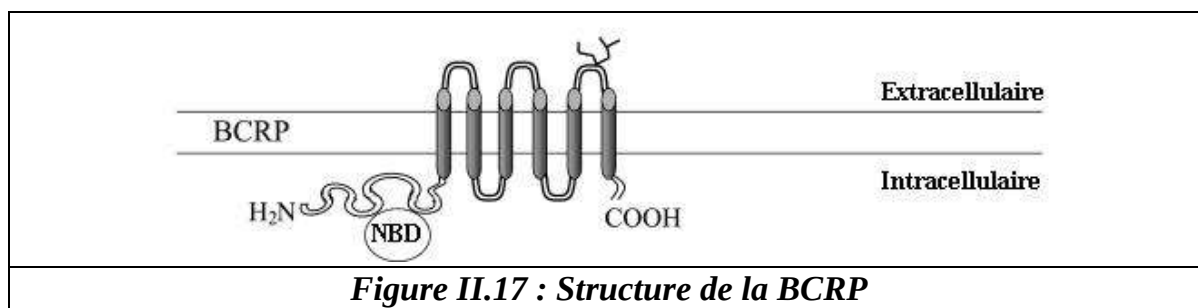
Figure II.16 : Structure de P-gp dont L = Région Linker, EC = boucle extracellulaire et IC = boucle intracellulaire

III.4. La protéine de résistance à la mitoxanthrone: BCRP(MXR, ABCPou ABCG2)

✓ Structure

La BCRP est un des transporteurs ABC qui a été découvert et isolé récemment des cellules du cancer du sein humain lesquelles sont sélectionnées avec la doxorubicine, laquelle agit entre autres comme drogue anti-tumorale. La BCRP est une protéine atypique monomérique de 655 acides aminés, d'une masse moléculaire de 72,1 KDa qui est constituée d'un domaine NBD N-terminal de liaison à l'ATP et d'une région transmembranaire TMD du côté C-terminal.

Cette dernière région est constituée de 6 hélices α membranaires prédites (Figure II. 17). Cette protéine est donc un *half*-transporteur car sa taille représente la moitié des autres transporteurs ABC [72 ; 73].



✓ Expression et rôle

Cette protéine est localisée dans la membrane plasmique de plusieurs lignées cellulaires tumorales. Une localisation plus faible dans les vésicules intracellulaires, correspondant probablement aux lysosomes, a été également mise en évidence. Quant à sa distribution tissulaire, l'expression de BCRP est faible. On la retrouve dans les poumons ; son rôle dans ce tissu n'est pas encore connu. Dans l'appareil gastro-intestinal, la BCRP est présente sur la surface apicale des cellules épithéliales de l'intestin, et joue un rôle dans la prévention et/ou la modulation du passage de certains xénobiotiques ou de leurs métabolites de l'intestin dans la circulation sanguine [65]. La BCRP est localisée dans tout l'intestin grêle et le colon. Par ailleurs, il a été mentionné qu'elle est également présente dans le foie, le cerveau, l'utérus, les testicules et le placenta [74 ; 75].

✓ Spécificité des substrats

La BCRP est capable de transporter une grande variété de substrats, qui recouvre dans certains cas ceux de la Glycoprotéine-P. Une grande résistance à la mitoxanthrone caractérise les cellules surexprimant ABCG2. De la même manière que les autres transporteurs, ABCG2 montre une activité ATPase induite par les substrats, et transporte des composés hydrophobes chargés positivement ou négativement.

La BCRP présente une résistance contre un nombre restreint et limité d'agents anticancéreux par rapport à P-gp. Les substrats de BCRP comprennent essentiellement les anthracyclines et la mitoxanthrone (Figure II.18). Comme la P-gp, elle montre une résistance vis-à-vis du méthotrexate [76]

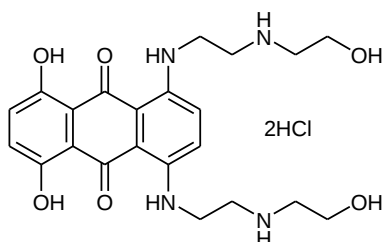


Figure II.18 : Structure de la mitoxanthrone

III.5. Les Modulateurs de la MDR

Par définition, la modulation (réversion), est la capacité de certains agents, non toxiques aux doses actives, à restaurer totalement ou partiellement l'activité antitumorale d'un agent cytotoxique sur une lignée cellulaire présentant le phénotype MDR. De tels agents sont appelés chimiosensibilisateurs, agents réversants, inhibiteurs ou modulateurs de la résistance à de multiples drogues. Le modulateur doit agir sans avoir des effets secondaires sur l'organisme, autrement dit, aucune toxicité. Cette importante condition a été à la base du développement de multiples agents réversants.

La première génération de modulateurs est constituée de composés déjà utilisés dans le traitement d'autres maladies et qui se sont révélés avoir une activité de réversion du phénotype MDR. Tsuruo *et al.* ont été les premiers à démontrer que le vérapamil, un inhibiteur des canaux calciques utilisé dans le traitement des dysfonctionnements cardiaques et de l'hypertension, était capable de la réversion de la MDR. En effet, le vérapamil permet d'augmenter l'accumulation de nombreuses drogues anticancéreuses comme la doxorubicine dans un grand nombre de lignées cellulaires [77].

Par la suite, de nombreux autres composés naturels ou synthétiques ont été testés afin d'évaluer leur capacité à moduler la MDR dont les inhibiteurs des canaux calciques comme la flétopine et l'isradipine. Les antagonistes de la calmoduline comme la chlorpromazine et la prochlorperazine sont également testés. Pour le cas de la cyclosporine A (Figure II.19), son utilisation a été limitée par son action immunosuppressive [78 ; 79].

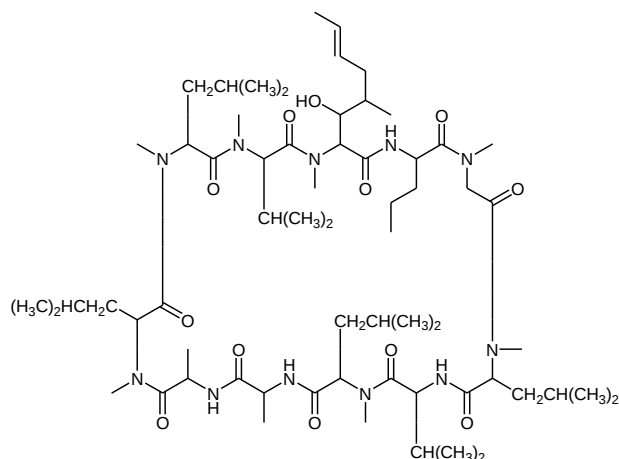


Figure II.19 : Structure de la Cyclosporine A

Au même titre, d'autres composés naturels ou synthétiques ont été testés, par exemple des hormones stéroïdiennes dont la progestérone et les anti-oestrogènes comme le tamoxifène [80]. L'inhibition visualisée par ces agents réversants *in vitro* n'avait pas été corrélée à un éventuel effet *in vivo*. D'autre part, la plupart de ces modulateurs de première génération sont transportés par la MRP1 et par la P-gp, ajouté à cela leur grande cytotoxicité et leurs effets secondaires. De ce fait, des modulateurs de deuxième génération sont apparus.

Ceux-ci sont majoritairement des analogues structuraux des modulateurs de la première génération. Ils ont été développés pour diminuer considérablement leur cytotoxicité et pour augmenter à la fois leur efficacité et leur spécificité en tant qu'agents réversants du phénotype MDR. Citons par exemple les analogues structuraux du vérapamil tels que le R-vérapamil, l'émopamil, le gallopamil, le Ro44-5912 (Figure II.20) [81].

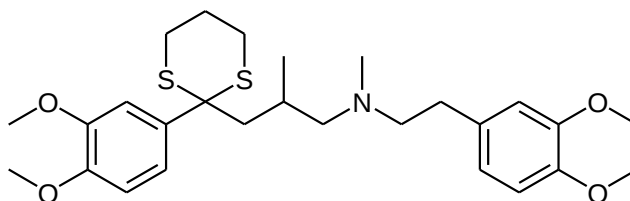


Figure II.20 : Structure du modulateur Ro44-5912

Ces agents se sont révélés beaucoup plus puissants mais n'ont malheureusement pas permis d'obtenir les résultats souhaités. En effet, ils se sont heurtés à des interactions pharmacocinétiques diminuant la dose d'agent chimiothérapeutique efficace. De plus, ces modulateurs de deuxième génération ont une concentration efficace encore trop importante, même s'ils ne présentent pas d'effets secondaires.

Les modulateurs de la troisième génération (produits naturels et de synthèse) sont apparus suite à des études structure-activité, ayant montré que, bien qu'aucune parenté structurale n'existe a priori entre les différents modulateurs précédemment décrits, certaines caractéristiques communes comme la lipophilie et la possibilité de formation de liaisons hydrogène, l'existence de deux cycles aromatiques coplanaires ainsi que l'existence d'un azote tertiaire seraient importantes. Parmi les inhibiteurs de troisième génération testés, le GF120918 (Figure II.21) : un dérivé du carboxamide d'acridone [82 ; 83].

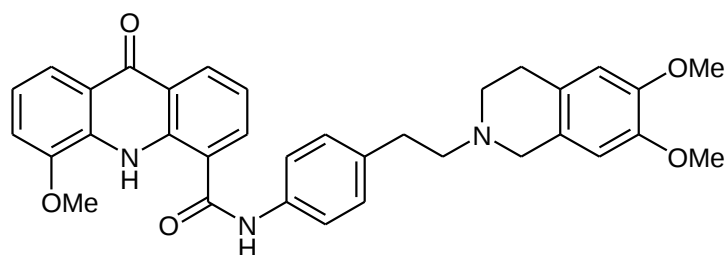


Figure II.21 : Structure du modulateur GF120918

III.6. Produits naturels et MDR

Le spectre des modulateurs de la MDR regroupe non seulement de nombreux composés d'origine synthétique, mais également des extraits végétaux et des molécules d'origine naturelle. Parmi ces derniers, certains semblent actifs, sans pour autant induire d'effets indésirables. Ils se fixent spécifiquement et durablement sur les transporteurs, inhibant ainsi leur action d'efflux des drogues à partir des cellules tumorales. Ces molécules constituent alors de potentiels inhibiteurs stables [84].

▪ Terpénoïdes et MDR

Un certain nombre de terpénoïdes se sont avérés être des agents modulateurs efficaces de la MDR. L'équipe de Kim *et al.* a extrait plusieurs esters sesquiterpéniques du type 1 β ,2 β -diacétoxy-6 α ,9 α -bis-benzoyloxy) dihydro- β -agofurane ou orbiculine A (Figure) de l'espèce *Celastrus orbiculatus* (Celastraceae) induisant une modulation partielle ou totale de la résistance à la vinblastine, à l'adriamycine et au taxol des lignées cellulaires du cancer épidermique oral humain KB-V1 et de celles du cancer du sein humain MCF7/ADR [85].

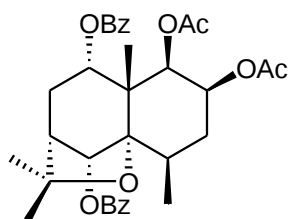


Figure II.22 : Structure de l'orbiculine A

L'évaluation de l'activité inhibitrice de la P-gp de plusieurs terpènes issus d'espèces d'Euphorbiaceae a montré que les molécules les plus actives sont deux diterpènes de type lathyrane [86]. Deux nouveaux terpènes naturels se sont avérés être des bons modulateurs de la P-gp, dont le jatrophone épieuphoscopine B qui s'est montré deux fois plus actif que la cyclosporine A [87].

La diportlandine (sesquiterpène coumarinique) isolée par Madureira et *al.* En 2004 à partir de l'espèce *Euphorbia portlandica*, a également montré un pouvoir inhibiteur satisfaisant de la P-gp [13]. La furanocoumarine (a) et la cyanidine (b) (Figure II.23) portant un groupement β , di(hydroxyisopropyl)-dihydrofurane en position C₇-C₈, ont montré une activité modulatrice très intéressante sur les lignées cellulaires du type MDCK-MDR1 [26].



Figure II.23 : Structures de la furanocoumarine (a) et de la cyanidine (b)

Un an plus tard, l'équipe de Barthomeuf a montré que la conférone (sesquiterpène coumarinique) isolée d'une espèce du genre *Ferula* est également un modulateur potentiel de la P-gp [88]. La mogoltacine (Figure II.24) appartenant également au même type de sesquiterpènes et issue de *Ferula badrakema* a fait l'objet d'une évaluation de son pouvoir inhibiteur de la P-gp dans l'efflux de la vincristine à partir des cellules cancéreuses transitionnelles humaines (TTC, *Human transitional cell carcinoma*). Une augmentation significative de la cytotoxicité de la vincristine a été rapportée [25].

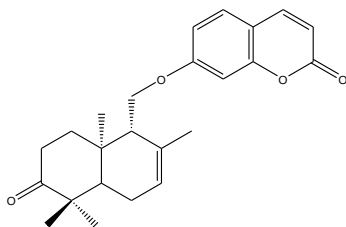


Figure II.24 : Structure de la mogoltacine

Raad et al. ont évalué le pouvoir inhibiteur de 32 coumarines naturelles et de synthèse sur les cellules leucémiques (K562/R7) surexprimant la P-gp. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence l'importance de certains groupements sur la P-gp, notamment le groupement phényle en position 4 de la coumarine.

Le motif prényle cyclisé sous sa forme [(hydroxyisopropyl)dihydrofurane], qu'il soit en position C₅-C₆ ou en position C₇-C₈, est également un facteur favorable pour l'activité inhibitrice de la P-gp.

Parmi les 27 coumarines naturelles testées sur les cellules humaines adhérentes transfectées par la BCRP mutée (T482), 14 coumarines sont considérées comme actives (activité supérieure à 50%) dont la plus active est l'isodisparinol A (Figure II.25) qui inhibe BCRP à 95% par rapport au GF 120918 de référence [55].

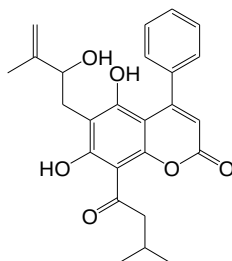


Figure II.25 : Structure de l'isodisparinol A

▪ Flavonoïdes et MDR

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle important que jouent les flavonoïdes dans la modulation de la MDR. En effet ces composés constituent des modulateurs potentiels des transporteurs impliqués dans la MDR. Parmi les travaux antérieurs, l'étude réalisée sur 25 flavonoïdes naturels a montré qu'ils inhibent potentiellement le transport de la mitoxanthrone par la BCRP dans les cellules MCF-7 MX100 d'une manière dépendante de la concentration en flavonoïdes, de leurs substitutions et du degré d'expression de la BCRP [55]. La 5,6,7,3',4'-pentaméthoxyflavone (sinensétine) a par ailleurs montré un pouvoir d'inhibition de la P-gp intéressant, c'est également le cas de l'isorhamnétine [90 ; 71].

De plus, les différentes classes de flavonoïdes agissent de manière spécifique sur les substances anticancéreuses. Les travaux réalisés sur 16 molécules d'anthocyanines ont montré que les molécules aglycones inhibent particulièrement la BCRP [91]. Parmi les flavonols inhibant notamment la BCRP, nous citons la quercétine, le kaempférol, la chrysine et la galangine [71].

Des chalcones méthoxylées et hydroxylées ont été testées sur la P-gp et la BCRP. Elles se sont avérées plutôt modulatrices de la BCRP [92 ; 93].

L'étude réalisée par Edwige et *al.* sur l'effet d'une vingtaine de produits naturels dont plusieurs flavonoïdes a souligné d'avantage l'importance de la lipophilie dans la modulation du transporteur BCRP par les flavonoïdes, dont les plus actifs sont les molécules prénylées. Cependant, les liaisons hydrogènes ne semblent pas être en faveur de cette activité [73].

Par ailleurs, des roténoïdes (boéravinones) ont été décrits comme des modulateurs potentiels de BCRP par Ahmed-Belkacem et *al.* [94].

▪ Autres composés naturels et MDR

D'autres classes de produits comme les xanthones ont également fait l'objet d'évaluations sur P-gp, l'interaction entre ces composés et la P-gp serait due à leur capacité à mimer la partie adénine de l'ATP. Cette affinité est accrue avec les substituants hydrophobes, en particulier les groupements prénylés [95]. Il faut noter que plusieurs études ont révélés l'importance de la prénylation dans cette activité [96 ; 97 ; 98].

Plusieurs molécules isolées à partir des *Citrus* ont manifesté un pouvoir inhibiteur important de la P-gp dans l'efflux de la Rhodamine 123 (Rho123) des cellules leucémiques humaines. Il s'agit particulièrement de la limonine [99 ; 100].

Les alcaloïdes ont également leur place parmi les modulateurs de la BCRP. Les travaux réalisés sur un métabolite secondaire fongique, la tryptostatine A (TPS-A) (Figure) ont montré que cette dernière dicétopipérazine inhibe potentiellement l'efflux de la mitoxanthrone dans la lignée cellulaire du cancer gastrique humain (EPG85-257RNOV) surexprimant la BCRP [101].

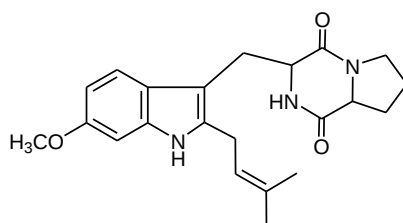


Figure II.26 : Structure de la tryptostatine A

IV. CONCLUSION

Les différents métabolites secondaires des plantes, notamment les polyphénols et les terpènes ne cessent d'offrir de nouvelles alternatives à la médecine moderne. En effet, de nombreuses propriétés biologiques très intéressantes leur sont attribuées. De plus, ils présentent généralement l'avantage d'être moins toxiques que leurs homologues d'origine synthétique.

L'utilisation des médicaments a entraîné l'émergence d'un phénomène aujourd'hui bien connu : la chimiorésistance. La résistance à de multiples drogues (MDR : MultiDrug Resistance) est un mécanisme qui a été mis en évidence sur différentes lignées de cellules cancéreuses. Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), tels que la Pgp et la BCRP sont impliqués dans ce mécanisme. La recherche de nouveaux inhibiteurs de ces transporteurs ABC s'étend aux produits naturels, dont plusieurs se sont avérés actifs.

Les terpénoïdes ont une place importante dans la modulation des deux transporteurs précédents. Les travaux réalisés sur les sesquiterpènes coumariniques, composés communs dans le genre *Ferula* les ont révélés comme de potentiels modulateurs de la P-gp.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]- J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. (3).
Techniques et documentation, Paris, 1999.
- [2]- P.M. Dey, J.B. Harborne, Methods in plant biochemistry: Terpenoids, Ed. Charwood
B.V and Banthorpe D.V. Academic Press Limited, vol.7, London, 1991.
- [3]- V.P. Emerenciano, S.A.V. Alvarenga, M.T. Scotti, M.J.P. Ferreira, R. Stefani, J.M.
Nuzillard, Analytica Chimica Acta, 579, 217-226, 2006.
- [4]- E. Breitmaier, Terpenes. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.
- [5]- H.-J. Zhang, G.T. Tan, V.D.Hoang, N.V. Hung, N.M. Cuong, D.D. Soejarto, J.M.
Pezzutoa, H.H.S. Fonga, Tetrahedron, 59, 141–148, 2003.
- [6]- Z. Jinbo, W. Mingan, W. Wenjuna, J. Zhiqinga, H. Zhaononga, Phytochemistry, 61, 699–
704, 2002.
- [7]- I.J. Misiak, J. Lipok, E.M. Nowakowska, P.P. Wieczorek, P.Kafarskia, Z. Naturforsch,
Journal of Biosciences, 59(11-12), 791-796, 2004.
- [8]- F. M.M. Martinez, P. Lu, F. Cortés-Selva, J.M. Pérez-Victoria, I.A. Jiménez, A.G. Ravelo
F.G. Sharom, F. Gamarro, S. Castanys, Cancer Research, 64, 7130–7138, 2004.
- [9]- B.B. Patel, T.G. Waddell, R.M. Pagnib, Fitoterapia, 72, 511-515, 2001.
- [10]- G.N. Krishna Kumari, S. Masilamani, M.R. Ganesh, S. Aravind, S.R. Sridhar,
Fitoterapia 74, 479–482, 2003.
- [11]- F. Hilmi, J. Gertsch, P. Bremner, S. Valovic, M. Heinrich, O. Stichera, J. Heilmann,
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11(17):3659-63, 2003.
- [12]- J.M. Scher, E.J. Burges, S.D. Lorimer, N.B. Perry, Tetrahedron, 58, 7875–7882, 2002.
- [13]- M.A. Madureira, A. Molnar, P.M. Abreu, J. Molnar, M.J.U. Ferreira, Planta Med., 70,
828-833, 2004.
- [14]- J.L. Rios, Journal of Ethnopharmacology, 128, 1–14, 2010.
- [15]- A. I. Saidkhodzhaev, A.U. Mamatkhanov, Chemistry of Natural Compounds, 31(6) 645-
656, 1995.
- [16]- Heywood, V.H., 1971, The Biology and Chemistry of the Umbelliferae, Academic
Press, Linnean Society of London.
- [17]- E.L. Ghisalberti, Phytochemistry, 37, 597- 623, 1994.
- [18]- J.Cumanda, G. Marinoni, M. De Bernardi, G. Vidari, P. Vita Finzi, J. Nat. Prod., 54,
460-465, 1991.
- [19]- B.M. Fraga B. M., Nat. Prod. Rep., 20, 392-413, 2003.
- [20]- J. L. Reino, R.F. Guerrero, R. Hernaéndez-Galan, I.G. Reino, Phytochem. Rev., 7, 89-
123, 2008.
- [21]- J. Peng, S.G. Franzblau, F. Zhang, M.T. Hamanna, Tetrahedron Letters, 43, 9699–9702,
2002.
- [22]- M.H.K. Tchendem, J.A. Mbah, A. Tsopmoa, J.F. Ayafor, O. Sterner, C.C. Okunji,
M.M. Iwu, B.M. Schuster, Phytochemistry, 52, 1095-1099, 1999.
- [23]- G. Appendino, H.C. Ozen, G.M. Nano, M. Cisero, Phytochemistry 31 (12), 4223-4226,
1992.
- [24]- A.A. Ahmed, M-E F. Hegazy, A. Zellagui, S. Rhouati, T.A. Mohamed, A.A. Sayed,
M.A. Abdella, S. Ohta, T. Hirata, Phytochemistry, 68, 680-686, 2007.

- [25]- F. Behnam Rassouli, M.M. Matin, M. Iranshahi, A.R. Bahrami, V. Neshati, S. Mollazadeh, Z. Neshati, *Phytomedicine*, 16, 181-187, 2009.
- [26]- C. Barthomeuf, J. Grassi, M. Demeule, C. Fournier, D. Boivin, R. Béliveau, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56, 173-181, 2005.
- [27]- C. Barthomeuf, S. Lim, M. Iranshahi, P. Chollet, *Phytomedicine*, 15, 103-111, 2008.
- [28]- M. Iranshahi, S.T. Hosseini, A.R. Shahverdi, K. Molazade, S.S. Khan, V.U. Ahmad, *Phytochemistry*, 69, 2753-2757, 2008.
- [29]- M. Iranshahi, A. Sahebkar, S.T. Hosseini, M. Takasaki, T. Konoshima, H. Tokuda, *Phytomedicine* 17, 269-273, 2010.
- [30]- H. Greger, O. Hofer, A. Nikiforov, *New J. Nat. Prod.*, 45, 445-461, 1982.
- [31]- H. Greger, O. Hofer, W. Robien, *J. Nat. Prod.*, 46, 510-51, 1983.
- [32]- O. Hofer, H. Greger, *Monatshefte für Chemie*, 115, 477-483, 1984.
- [33]- W. Kisiel, A. Stojakowska, *Phytochemistry*, 46 (3), 515-516, 1997.
- [34]- N. Gören, A. Ulubelen, S. Oksüz, *Phytochemistry*, 27, 1527-1529, 1988.
- [35]- H. Greger, O. Hofer, *Phytochemistry*, 24 (1), 85-88, 1985.
- [36]- M. G. Pimenov, E. Sklyar YU, A.A. Savina, Y.U.V. Baranova, *Biochemical Systematics and Ecology*, 10 (2), 133-138, 1982.
- [37]- J. B. Harborne, C.A. Williams, *Phytochemistry*, 55, 481-504, 2000.
- [38]- E. De Rijke, P. Out, W.M. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer, U.A. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 1112, 31-63, 2006.
- [39]- Y. Lu, L.Y. Foo, *Phytochemistry* 59, 17-140, 2002.
- [40]- O.M. Grace, M.S.J. Simmonds, G.F. Smith, A.E. Van Wyk, *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 57-62, 2010.
- [41]- A. Karioti, H. Skaltsa, J. Heilmann, O. Sticher, *Phytochemistry*, 64, 655-660, 2003.
- [42]- I. Uriarte-Pueyo, M.I. Calvo, *Food Chemistry*, 120, 679-683, 2010.
- [43]- W. Heller, G. Forkmann, *Biosynthesis of Flavonoids. In The Flavonoids: Advances in research since 1986. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London, 1993.*
- [44]- V.P. Androutsopoulos, A. Papakyriakou, D. Vourloumis, A.M. Tsatsakis, D.A. Spandidos, *Pharmacology & Therapeutics*, 126, 9-20, 2010.
- [45]- F. Cuyckens, M. Claeys, *Journal of Mass Spectrometry*, 39(4), 1-15, 2004.
- [46]- A.L. Miller, *Alternative Medicine Review*, 1 (2), 103-111, 1996.
- [47]- K.K. Adom, R.H. R. H. Liu, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6182-6187, 2002.
- [48]- A.C. De Queiroz, D.P. De Lira, F.D.T. De Lima Matos, E.T. De Souza, C.B.B. Da Matta, A.B. De Aquino, L.H.A. Cavalcante Silva, D.J.C. Da Silva, E.A.C. Mellaa, M. De Fatima Agra, J.M.B. Filho, J.X. De Araújo-Junior, B.V. De Oliveira Santos, *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 377-383, 2010.
- [49]- C.L. Chang, G.J. Wang, L. J. Zhang, W. J. Tsai, R.Y. Chen, Y.C. Wua, Y.H. Kuo, *Phytochemistry* 71, 271-279, 2010.
- [50]- Y.S. Huang, S.C. Ho, *Food Chemistry*, 119, 868-873, 2010.
- [51]- J. F. Zhang, G. Li, C.Y. Chan, C.L. Meng, M.C.M. Lin, Y.C. Chen, M.L.P Leunge, H.F. Kung, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314, 70-74, 2010.
- [52]- A.F. K. Waffo, P.H. Coombes, D.A. Mulholland, A.E. Nkengfack, Z.T. Fomum, *Phytochemistry*, 67, 459-463, 2006.

- [53]- A.G. Mercader, A.B. Pomilio, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 1724-1730, 2010.
- [54]- E.T. Arung, K. Yoshikawa, K. Shimizu, R. Kondo, *Fitoterapia*, 81, 120-123, 2010.
- [55]- I.Raad, R. Terreux, P. Richomme, E.I. Matera, C. Dumontet, J. Reynaud, D. Guilet, *Bioorg. Med. Chem.*, 14(20), 6979-6987, 2006.
- [56]- A. Koubeissi, I. Raad, L. Ettouati, D. Guilet, C. Dumontet, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 5700-5703, 2006.
- [57]- L.M. Aleksunes, L.M. Augustine, G.L. Scheffer, N.J. Cherrington, J.E. Manautou, *Toxicology* 250, 82-88, 2008.
- [58]- J.P. Gillet, T. Efferth, J. Remacle, *Biochimica and Biophysica Acta*, 1775, 237-262, 2007.
- [59]- C. Hegedus, G. Szakács, L. Homolya, T.I. Orban, A. Telbisz, M. Jani, B. Sarkadi, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 47-56, 2009.
- [60]- K. Linton, *Physiology*, 22, 122-130, 2007.
- [61]- H. Bark, H.D. Xu, S.H. Kim, J. Yun, C.H. Choi, *FEBS Letters*, 582, 2595-2600, 2008.
- [62]- L. A. Doyle, W. Yang, L.V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A.K. Rishi, D.D. Ross, *A Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95(26), 5665-5670, 1998.
- [63]- Y. Dong, S. Shao, J. Hu, P. Yang, *Oral Oncology*, 45, 991-997, 2009.
- [64]- W. Loscher, H. Potschka, *Neurorx.*, 2 (1), 86-98, 2005.
- [65]- E. M. Leslie, R.G. Deeley, S.P. Cole, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 204 (3), 216-37, 2005.
- [66]- E.M. Del Amo, A.T. Heikkinen, J. Monkkonen, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 200-211, 2009.
- [67]- S.E. Bates, R. Robey, K. Miyake, K. Rao, D.D. Ross, T. Litman, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33 (6), 503-511, 2001.
- [68]- R.W. Robey, K.K.K. To, O. Polgar, M. Dohse, P. Fetsch, M. Dean, S.E. Bates, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 3-13, 2009.
- [69]- A. Di Pietro, G. Conseil, J.M Pérez-Victoria, G. Dayan, H. Baubichon-Cortay, D. Trompier, E. Steinfelds, J.M. Jault, H. De Wet, M. Maitrejean, G. Comte, A. Boumendjel, A.M. Mariotte, C. Dumontet, D.B. McIntosh, A. Goffeau, S. Castanys, F. Gamarro, D. Barron. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 307-322, 2002.
- [70]- M.C. De Jong, J.W. Slootstra, G.L. Scheffer, A.B. Schroeijers, W.C. Puijk, R. Dinkelberg, M. Kool, H.J. Broxterman, R.H. Melen, R.J. Scheper, *Cancer Research*, 61, 2552-2557, 2001.
- [71]- G. Szakacs, A. Varadi, C. Ozvegy-Laczka, B. Sarkadi, *Drug Discovery Today*, 13, 379-393, 2008.
- [72]- J. Cervenak, H. Andrikovics, C. Ozvegy-Laczka, A. Tordai, K. Nemet, A. Varadi, B. Sarkadi, *Cancer Letters*, 234, 62-72, 2006.
- [73]- N. Edwige, J. Bocard, D. Guilet, M.G. Dijoux-Franca, F. Zelefac, S. Macalou, J. Grosselin, J. Schmidt, P.A. Carrupt, A. Di Pietro, A. Boumendjel, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38, 39-46, 2009.
- [74]- S. Zhang, X. Yang, M.E. Morris, *Mol. Pharmacol.*, 65, 1208-1216, 2004.
- [75]- M. Maliepaard, G.L. Scheffer, I.F. Faneyte, M.A. Van Gastelen, A.C.L.M. Pijnenborg, A.H. Schinkel, M.J. Van De Vijver, R.J. Scheper, J.H.M. Schellens, *Cancer Research*, 61, 3458-3464, 2001.

- [76]- D. Damiani, M. Tiribelli, A. Michelutti, A. Geromin, M. Cavallin, D. Fabbro, A. Pianta, M. Malagola, G. Damante, D.R. Russo Fanin, *Leukemia Research*, 34 (7), 942-5, 2010.
- [77]- T. Tsuruo, H. Iida, K. Naganuma, *Cancer Res.*, 43 (2): pp 808-13, 1983.
- [78]- P. R. Twentyman, *Biochem. Pharmacol.*, 43 (1), 109-17, 1992.
- [79]- M. Demeule, A. Laplante, A. Sepehr-Araé, E. Beaulieu, D. Averill-Bates, R.M. Wenger R. Béliveau, *Biochem. Cell. Biol.*, 77, 47-58. 1999.
- [80]- M. Neumann, A. Wilisch, H. Diddens, *Anticancer Res.*, 12 (6B), 2297-302, 1992.
- [81]- L. Kraus-Berthier, N. Guilbaud, J. L. Peglion, *Acta Oncol.*, 33 (6): pp 631-7, 1994.
- [82]- M. PajevaWiese, I.K Pajeva, *Current Medicinal Chemistry*, 8, 685-713, 2001.
- [83]- A.S.T., Planting, P. Sonneveld, A. Van Der Gaast, A. Sparreboom, M.E.L. Van Der Burg, G.P.M. Luyten, K. De Leeuw, M. De Boer-Dennert, P.S. Wissel, R.C. Jewell, E.M. Paul, J.N.B. Purvis, J. Verweij, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 55, 91-99, 2005.
- [84]- N. Romiti, G. Tramonti, A. Corti, E. Chieli, *Phytomedicine*, 16, 1095-1100, 2009.
- [85]- S.E. Kim, H. S. Kim, Y. S. Hong, *J. Nat. Prod.*, 62 (5), 697-700, 1999.
- [86]- H. Lage, N. Duarte, C. Coburger, A. Hilgeroth, M.J.U. Ferreira, *Phytomedicine*, 17 (6), 441-448, 2009.
- [87]- E. Barile, M. Borriello, A. Di Pietro, A. Doreau, C. Fattorusso, E. Fattorusso, V. Lanzotti, *Org. Biomol. Chem.*, 6, 1756-1762, 2008.
- [88]- C. Barthomeuf, M. Demeule, J. Grassi, A. Saidkhodjaev, R. Beliveau, *Planta Med.* 72, 634- 639, 2006.
- [89]- S. Zhang, X. Yang, R.A. Coburn, *Biochem. Pharmacol.*, 70 (4): pp 627-39, 2005.
- [90]- S.U. Choi, S. H. Park, K. H. Kim, *Anticancer Drugs*, 9 (3), 255-61, 1998.
- [91]- A. Dreiseitel, B. Oosterhuis, K.V. Vukman, P. Schreier, A. Oehme, S. Locher, G. Hajak, P. Sand, *British Journal of Pharmacology*, 158 (8), 1942-1950, 2009.
- [92]- Y. Han, M. Riwanto, M.L. Go, P.L.R. Lee, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 30-41, 2008.
- [93]- X.L. Liu, H.W. Tee, M.L. Go, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 171-180, 2008.
- [94]- A. Ahmed-Belkacem, S. Macalou, F. Borrelli, R. Capasso, E. Fattorusso, O. Taglialatela-Scafati, A. Di Pietro, *J. Med. Chem.*, 50, 1933-1938, 2007.
- [95]- G. Comte, J.B. Daskiewicz, C. Bayet, G. Conseil, A. Viorner-Vanier, C. Dumontet, A. Di Pietro, D. Barron, *J. Med. Chem.*, 44, 763-768, 2001.
- [96]- D. Nougoue Tchamo, M.G. Dijoux-Franca, A.M. Mariotte, E. Tsamo, J.B. Daskiewicz, C. Bayet, D. Barron, G. Conseil, A. Di Pietro, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10, 1343-1345, 2000.
- [97]- A. Boumendjel, H. Baubichon-Cortay, D. Trompier, T. Perrotton, A. Di Pietro, *Medicinal Research Reviews*, 25(4), 453-472, 2005.
- [98]- M.Z. El-Readi, D. Hamdan, N. Farrag, A. El-Shazly, M. Wink, *European Journal of Pharmacology* 626, 139-145, 2010.
- [99]- T. Nabekura, T. Yamaki, S. Kitagawa, *European Journal of Pharmacology*, 600, 45-49, 2008.
- [100]- G. Wu, J. Liu, L. Bi, M. Zhao, C. Wang, M. Baudy-Floch, J. Juc, S. Peng, *Tetrahedron* 63, 5510-5528, 2007.

Chapitre III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE

FERULA VESCERITENSIS COSS ET DURU (EX BATT. BARATTE)

I. RAPPELS BOTANIQUES

F. vesceritensis est appelée localement en arabe EL Kalkha. Ce même nom vernaculaire est donné à toutes les espèces *Ferula* poussant en Algérie. L'espèce *F. communis* est également désignée par ce nom en Arabie Saoudite [1] ainsi qu'au Maroc [2].

Elle est décrite dans la flore du Sahara comme plante vivace. Pouvant atteindre plus d'un mètre de haut, lorsque les conditions climatiques le permettent. En été, elle n'est représentée que par une rigide tige creuse (Figure III.1). Ses feuilles sont à divisions allongées et droites, les fleurs sont vertes à pétales larges portant des poils sur leur nervure dorsale, alors que les fruits sont ovales, à sommets pointus et portés par des pédoncules plus courts qu'eux [3].

L'espèce étudiée est endémique à l'Algérie, elle pousse dans les sols rocaillieux notamment dans la partie orientale de l'Atlas saharien et du Sahara septentrional et à Kerbous dans le sud tunisien [3].

A la différence de Ozenda P., Quezel P. et Santa S. l'ont décrite comme une sous espèce de *Ferula tingitana* [4]. Son classement dans la systématique dans la classification phytogénétique APG III 2009 [5] est comme suit :

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Clade	Campanulidées ou Euastéridées
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Ferula</i> L.
Espèce	<i>Ferula vesceritensis</i> Coss et Duru (ex Batt. Baratte)



Figure III.1 : Espèce *Ferula vesceritensis* Coss et Duru

II. UTILISATIONS EN MEDECINE TRADITIONNELLE

La partie aérienne de *Ferula vesceritensis*, notamment ses fruits sont utilisés par les populations locales en infusion pour le traitement des angines, des fièvres et des migraines.

Il a été également rapporté qu'elle utilisée pour augmenter aussi bien la fertilité de l'homme que celle du cheptel. Cependant ce dernier évite de la brouter.

III. TRAVAUX PHARMACOLOGIQUES ET PHYTOCHIMIQUES ANTERIEURS SUR L'ESPECE

Parallèlement à notre étude, cette espèce a fait l'objet de deux investigations phytochimiques, lesquelles ont ciblé les racines. Les travaux effectués par Zellagui A. ont permis de caractériser entre autres dix sesquiterpènes de type daucane connus (Figure III.2).

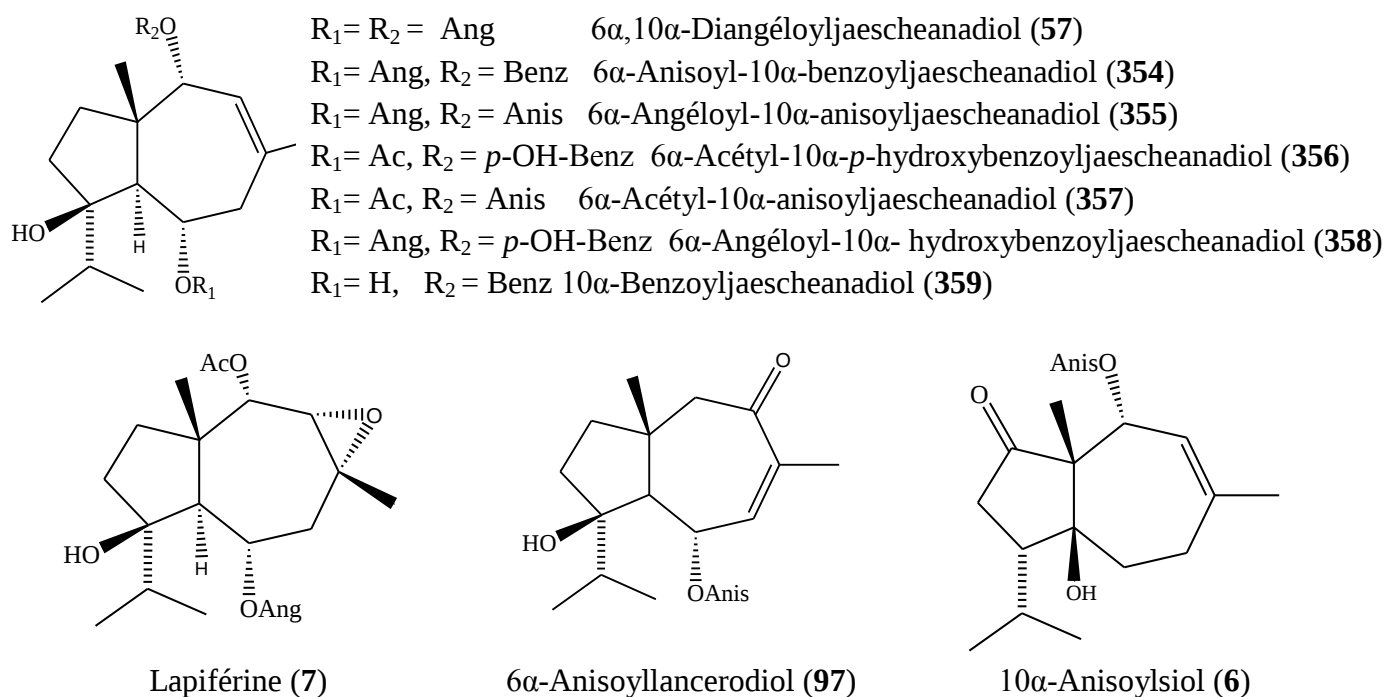


Figure III.2 : Sesquiterpènes daucanes identifiés dans les racines de *Ferula vesceritensis* [6]

Parmi les sesquiterpènes coumariniques mis en évidence dans la même étude, nous citons la coladine (187), la coladonine (186), l'umbelliprénine (167) et le féruléol (165) (Figure III.3).

La seconde étude effectuée par Ahmed *et al.* s'est soldée par l'isolement et l'identification de deux nouveaux sesquiterpènes coumariniques 3' α -angéoylcoladonine (360) et le 13-hydroxyféséol (361) [7].

Par ailleurs, l'effet du féruléol isolé à partir des racines de cette espèce sur les fonctions des mitochondries a été évalué pour son par Lhouel *et al.* Ils ont suggéré que le dysfonctionnement mitochondrial induit par cette molécule, représente un facteur déterminant dans la toxicité connue à quelques espèces du genre *Ferula* [8].

Plus tard, la lapiférine isolée à partir de la partie aérienne de cette espèce a fait l'objet d'une évaluation de son effet sur des lignées cellulaires de cancer de sein humain (MCF-7) par A. Gamal Eldine. Ces travaux ont révélé une prometteuse activité antiproliférative spécifique de la lapiférine (7) sur les cellules testées [9].

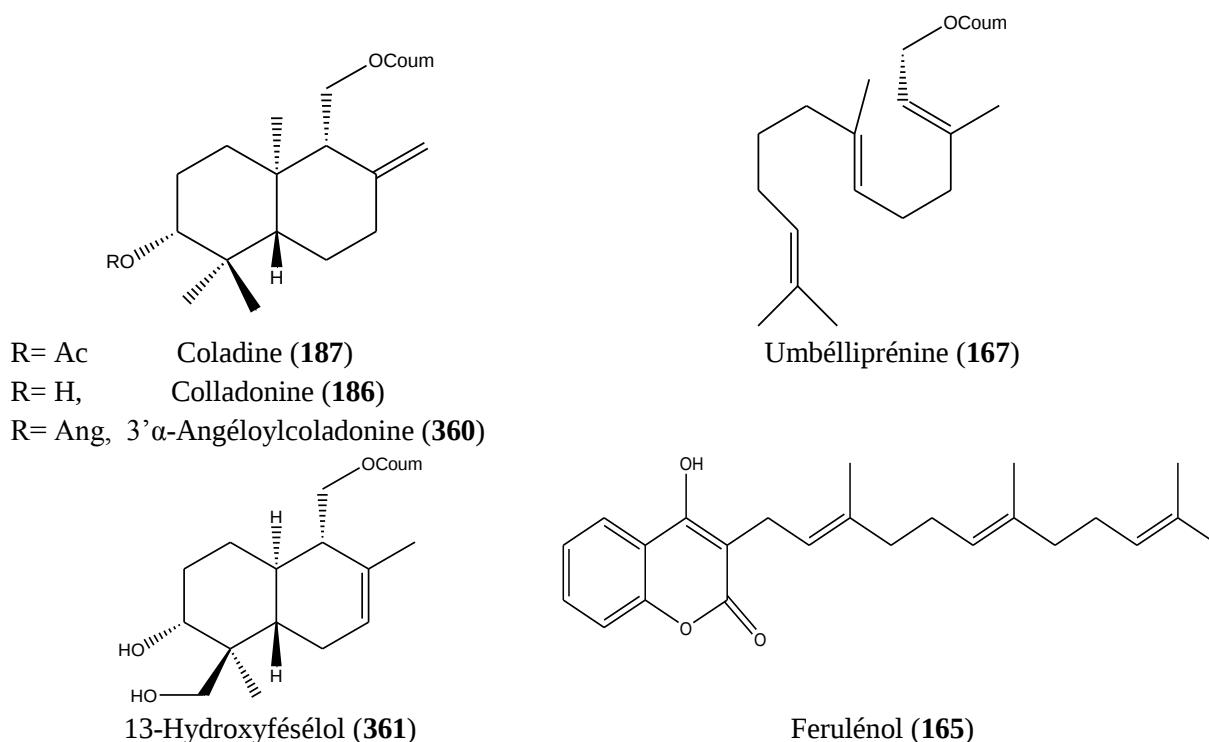


Figure III.3 : Sesquiterpènes coumariniques isolés des racines de *Ferula vesceritensis* [6]

IV. CHIMIE EXTRACTIVE

Nos travaux expérimentaux concernent principalement l'étude phytochimique de *Ferula vesceritensis*. L'objectif correspond, en effet, à l'isolement et à la détermination structurale des molécules naturelles de cette plante. A cet effet, nous avons procédé à l'extraction, au fractionnement et à la purification de différents phytoconstituants en utilisant diverses techniques de chromatographie (CLHP, CLMP, CCM, ...). Les métabolites secondaires isolés sont par la suite analysés et caractérisés par des techniques de spectrométrie de masse (SM) et de spectroscopie (UV, RMN monodimensionnelle, RMN bidimensionnelle homonucléaire et hétéronucléaire). Ces données sont complétées dans certains cas par la mesure de l'activité optique.

IV.1. Obtention des extraits

L'extraction a été effectuée sur 824 g de poudre de la plante, en utilisant des solvants de polarité croissante (Figure III.4) à commencer par une macération dans l'hexane (3 x 2 L). Les résidus de la première opération sont mis à macérer dans le dichlorométhane (3 x 2 L). Enfin les résidus de la deuxième extraction sont mis dans le méthanol (3 x 2 L). Le renouvellement du solvant s'est fait toute les 24 heures pour chacun. L'agitation mécanique était maintenue pendant toute la durée d'extraction.

Après évaporation à sec, trois extraits sont obtenus avec les rendements portés sur le Tableau III.1 suivant :

Tableau III.1 : Rendements d'extraction

Extraits	masse (g)	Rendement %
Hexane	21,36	2,59
Dichlorométhane	16,79	2,03
Méthanol	100,50	12,13

Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la figure III.4.

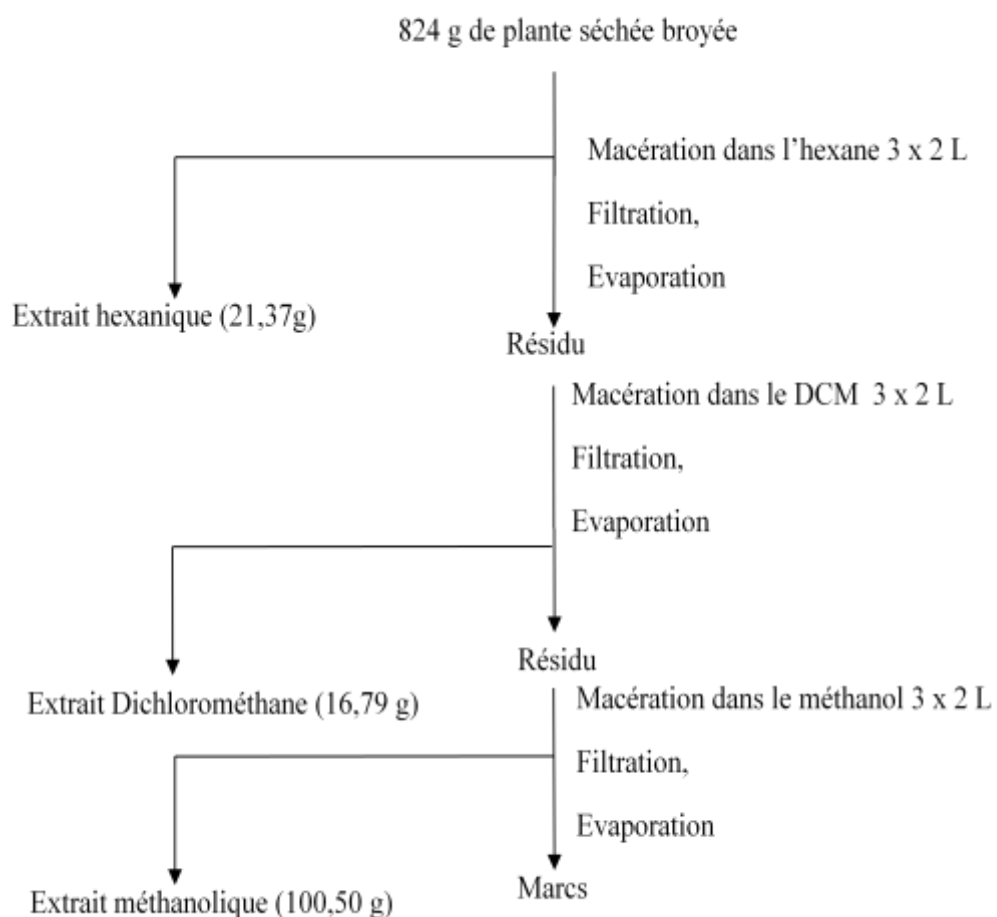


Figure III.4 : Schéma général d'obtention des extraits de *F.vesceritensis*

IV.2. Purification

Les extraits au dichlorométhane et au méthanol ont fait l'objet de fractionnement et de purification guidées par la présence de métabolites secondaires révélée par les profils obtenus par CCM des extraits sur quatre phases stationnaires (silice Si-60, silice greffée C-18, polyamide, cellulose). Les différents systèmes d'élution employés sont les mélanges hexane-acétate d'éthyle (50:50, 20:80 et 00:100), méthanol-eau (50:50 et 70:30), toluène-méthanol-méthyléthylcétone (4:3:3 et 3:4:3), eau- acide acétique (à 15%), butanol-eau-acide acétique (4:1:1).

L'extrait hexanique très riche en pigments apolaires, a fait l'objet d'analyses par les techniques couplées GC/MS et LC /MS.

Au cours des nombreuses opérations de purification, plusieurs techniques chromatographiques ont été employées, notamment la chromatographie sur colonne (CLMP de gel de silice normale, silice greffée C₁₈ et diol, Colonne ouverte (CC) sur sephadex LH-20) ainsi que la CCM sur plaques préparatives (CPP) et analytiques. La CLHP semi-préparative a été également utilisée dans des cas d'extrême difficulté de séparation.

L'étroite parenté structurale entre les composés présents dans l'extrait DCM a été à l'origine de l'échec de plusieurs tentatives d'isolement entreprises dans ce travail.

IV.3. Fractionnement de l'extrait au dichlorométhane

Dans un premier temps, une masse de 2,3 g de l'extrait au DCM préparé au préalable selon le même procédé avec 50 g du même matériel végétal, a été soumis à un fractionnement sur une colonne CLMP de silice en phase normale, éluee par un mélange d'hexane-acétate d'éthyle (100:0 à 0:100). Cette première étape a servi de test, les masses obtenues sont peu importantes, nous n'avons réussi à isoler que deux composés (**9** et **12**).

Par la suite, cette opération a été reprise avec une masse d'extrait beaucoup plus importante. 15,7 g obtenu avec les 824 g de poudre végétale sont séparés par CLMP pour aboutir à 140 fractions de 200 ml de volume. L'analyse par CCM de ces fractions et la révélation aux longueurs d'onde 254 et 366 nm, au réactif de Godin et/ou à la vanilline sulfurique ont permis de les regrouper en 15 fractions. Ces dernières sont soumises par la suite à leur tour, au fractionnement sur colonne MPLC en utilisant différents supports silice, diol et silice greffée C-18.

Après une série d'étapes de fractionnement et de purification, au cours desquelles l'évolution a été suivie par CCM, cet extrait nous a permis d'obtenir 12 molécules, dont trois sesquiterpènes coumariniques, neuf sesquiterpènes de type daucane ainsi que l'acide anisique (acide *p*-méthoxybenzoïque). La pureté des composés a été vérifiée par HPLC (conditions expérimentales décrites en partie expérimentale (page 217)). Les premières fractions susceptibles de contenir essentiellement des caroténoïdes et des acides gras n'ont pas été étudiées.

Les schémas résumant l'ensemble des purifications réalisées pour l'extrait DCM sont présentés aux Figures III.5 et III.6 L'ensemble de la procédure d'isolement est détaillé en partie expérimentale.

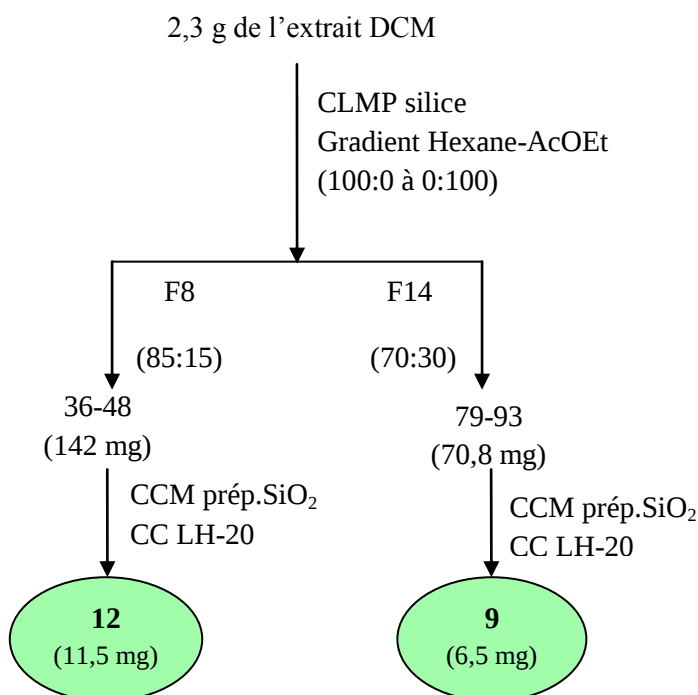


Figure III.5 : Schéma de l'isolement des composés 9 et 12 de l'extrait DCM

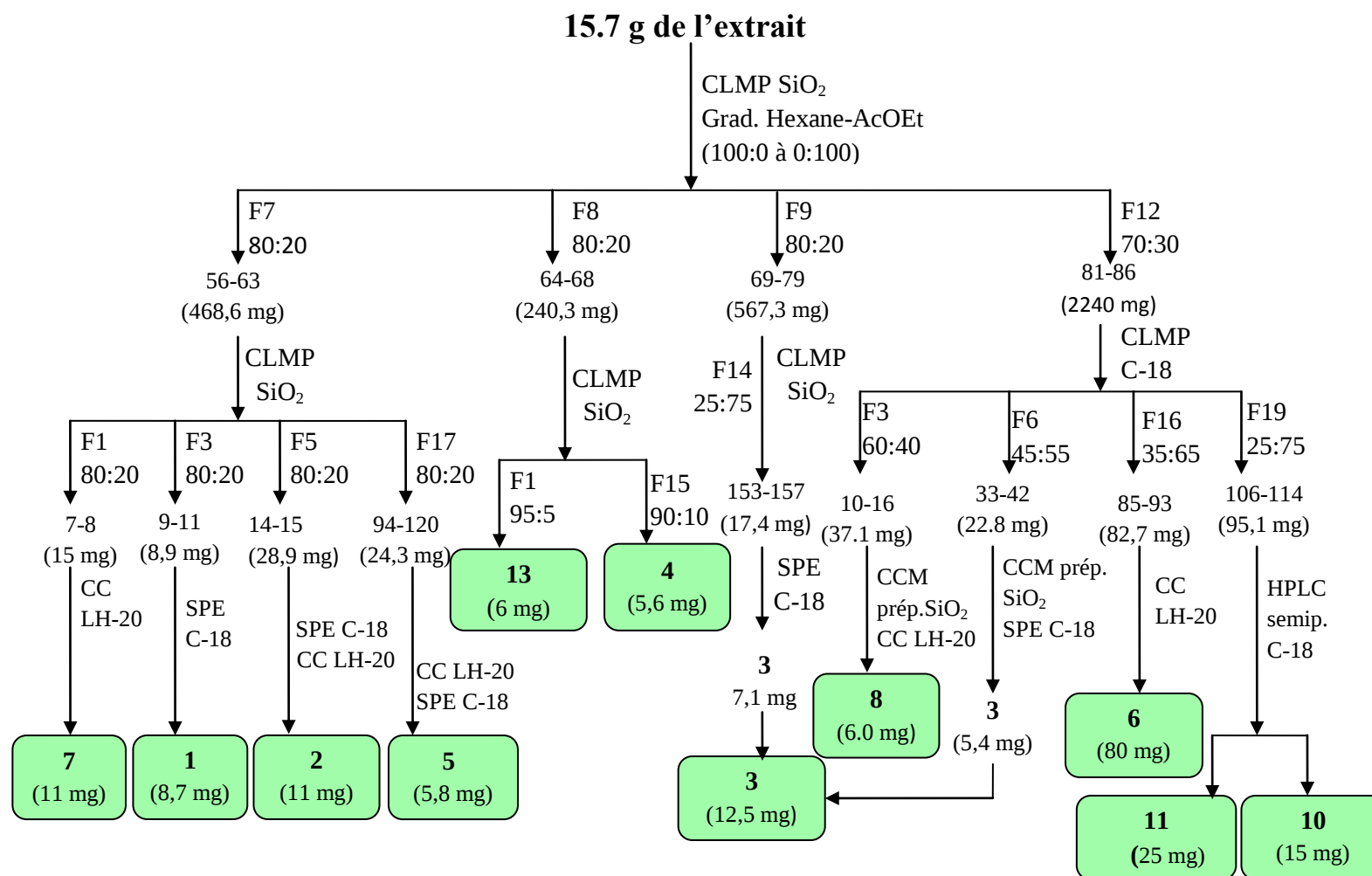


Figure III.6 : Schéma de l'isolement des onze autres composés identifiés dans l'extrait DCM

V. CARACTERISATION DES COMPOSES OBTENUS

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D (COSY H-H, DEPT, HSQC, HMBC, NOESY), UV, spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI/MS et HR-CI/MS, spectrométrie de masse à basse résolution HR-ESI/MS, par la mesure du pouvoir rotatoire et par comparaison avec les données de la littérature.

V.1. Composés nouveaux

Parmi les neuf sesquiterpènes-daucanes isolés et identifiés à partir de l'extrait DCM de la partie aérienne de l'espèce *Ferula vesceritensis*, cinq ont des structures originales, isolés dans cette étude pour la première fois dans le règne végétal (Figure III. 7).

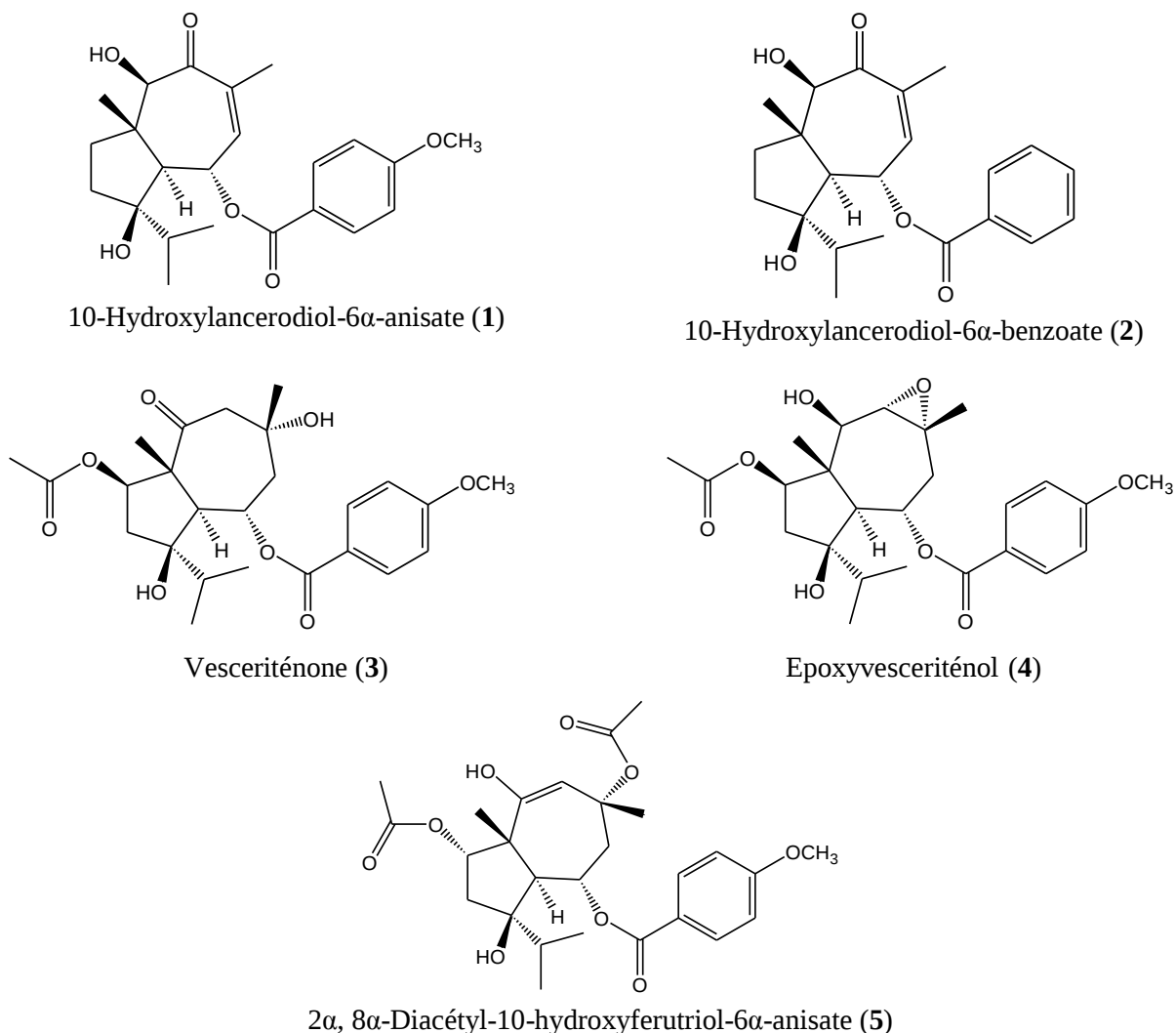
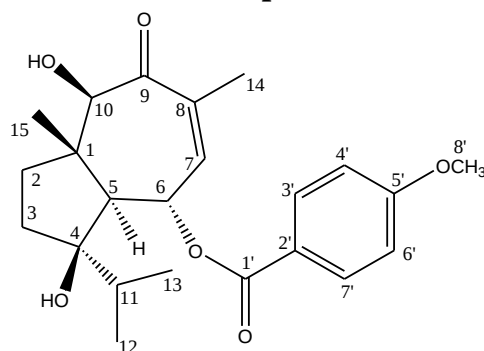


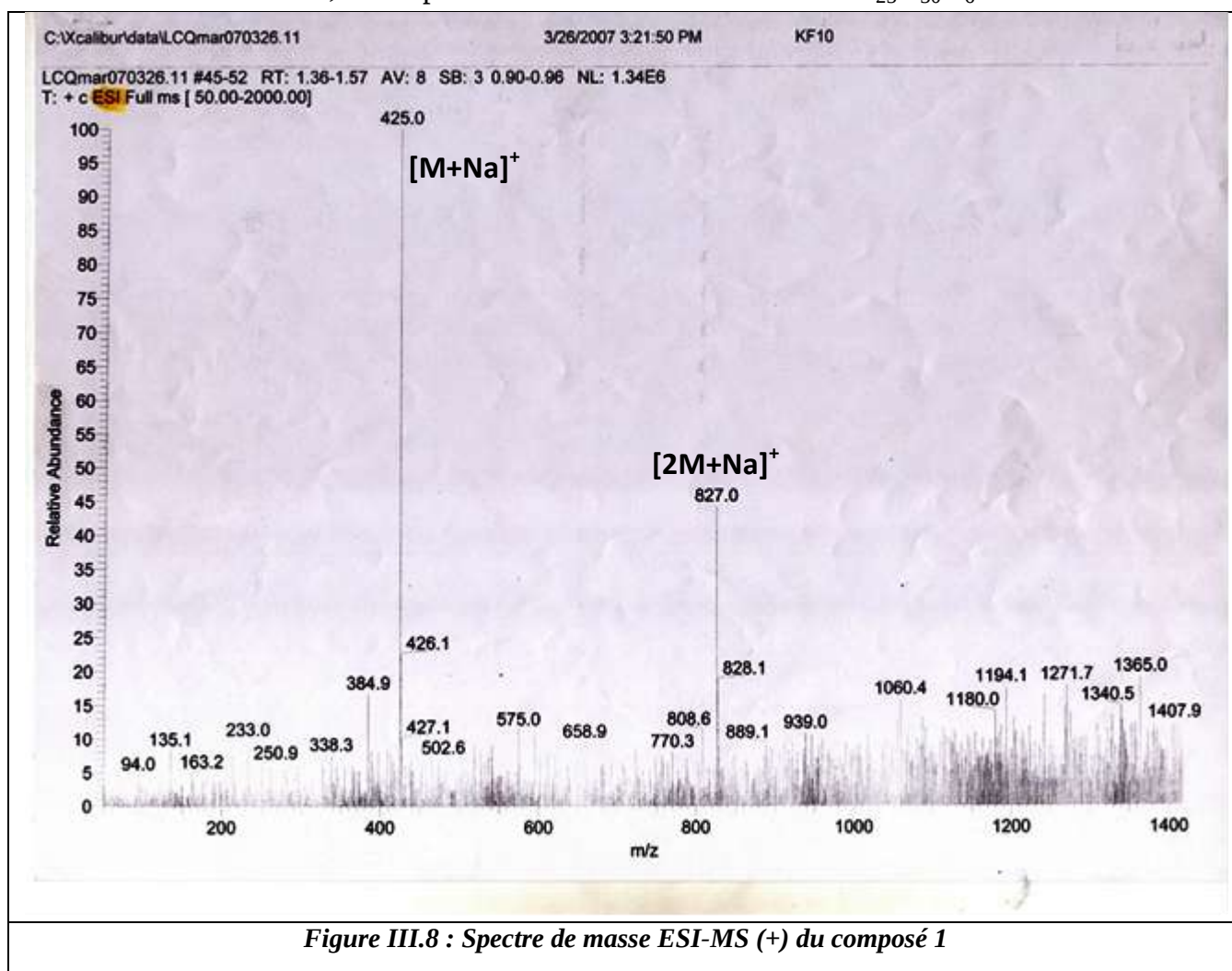
Figure III.7 : Structure des composés nouveaux (de 1 à 5) isolés à partir de l'extrait DCM de l'espèce *F. vesceritensis*

V.1.1.Elucidation structurale du composé 1



10β-Hydroxylancerodiol-6-anisate (**1**)

Le composé **1** est isolé sous forme de poudre blanche amorphe. Son spectre de masse réalisé à haute résolution HR-ESIMS montre un ion pseudomoléculaire ($[M+H]^+$ à m/z 403,2119 (calc. 403,2121 pour la formule moléculaire $C_{23}H_{30}O_6$). Son spectre de masse ESI-MS en mode positif présente à son tour un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 425$ $[M+Na]^+$ (Figure III.8), apportant ainsi la confirmation d'une masse moléculaire de 402 uma, correspondant à la formule moléculaire $C_{23}H_{30}O_6$.



Le spectre UV enregistré pour ce composé montre une absorption maximale à 259,5 nm, traduisant la présence d'un noyau aromatique.

Son spectre RMN ^1H (Figure III.9) révèle clairement la présence d'un groupement anisate caractérisé par les déplacements des protons aromatiques δ_{H} 8,01 (2H, d, 8,8 Hz, H-3'), 6,96 (2H, d, 8,8 Hz, H-4') et celui des protons du groupement méthoxyle à δ_{H} 3,89 (3H, s, H-8'). Le spectre ^{13}C -NMR (Figure III.10) présente 23 signaux parmi eux, d'une part, ceux caractérisant l'anisate (δ_{C} 165,9, C-1', 121,9 C-2', 131,9 C-3', 113,9 C-4', et 163,9 C-5') et d'autre part, les 15 signaux restants peuvent être attribués à une structure sesquiterpénique. Par ailleurs, l'examen du spectre RMN ^1H montre la présence d'un groupement isopropyle [δ_{H} 0,98 (3H, d, 6,7 Hz, H-12), 0,86 (3H, d, 6,7 Hz, H-13), et 1,91 (1H, m, H-11)] ainsi que deux méthyles [δ_{H} 1,07 (3H, s) H-15, 1,96 (3H, s) H-14]. Les données spectrales précédentes suggèrent que la sous-structure sesquiterpénique correspond aux «Daucanes». En effet, de nombreux constituants de cette sous-classe de sesquiterpènes ont été isolés à partir du genre *Ferula* [10 ; 7 ; 11 ; 12 ; 13].

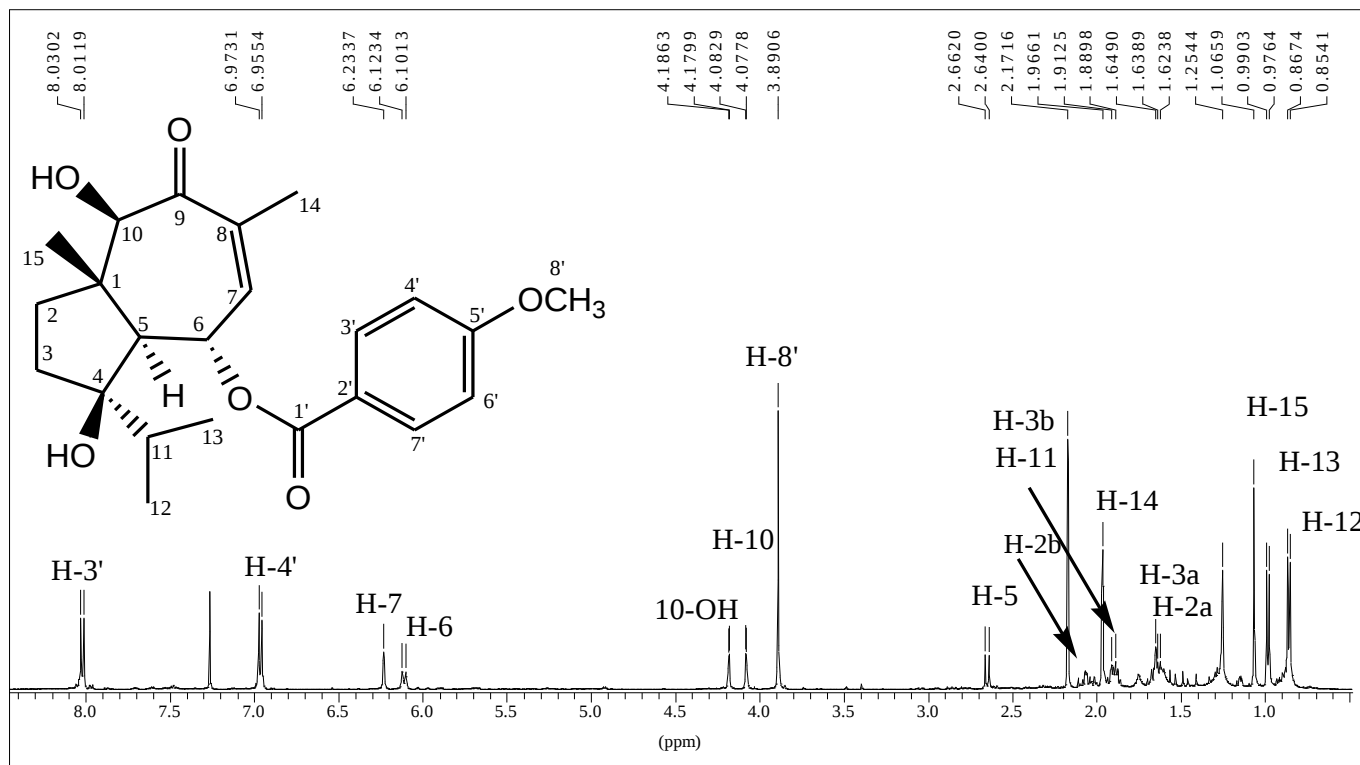


Figure III.9 : Spectre proton du composé 1

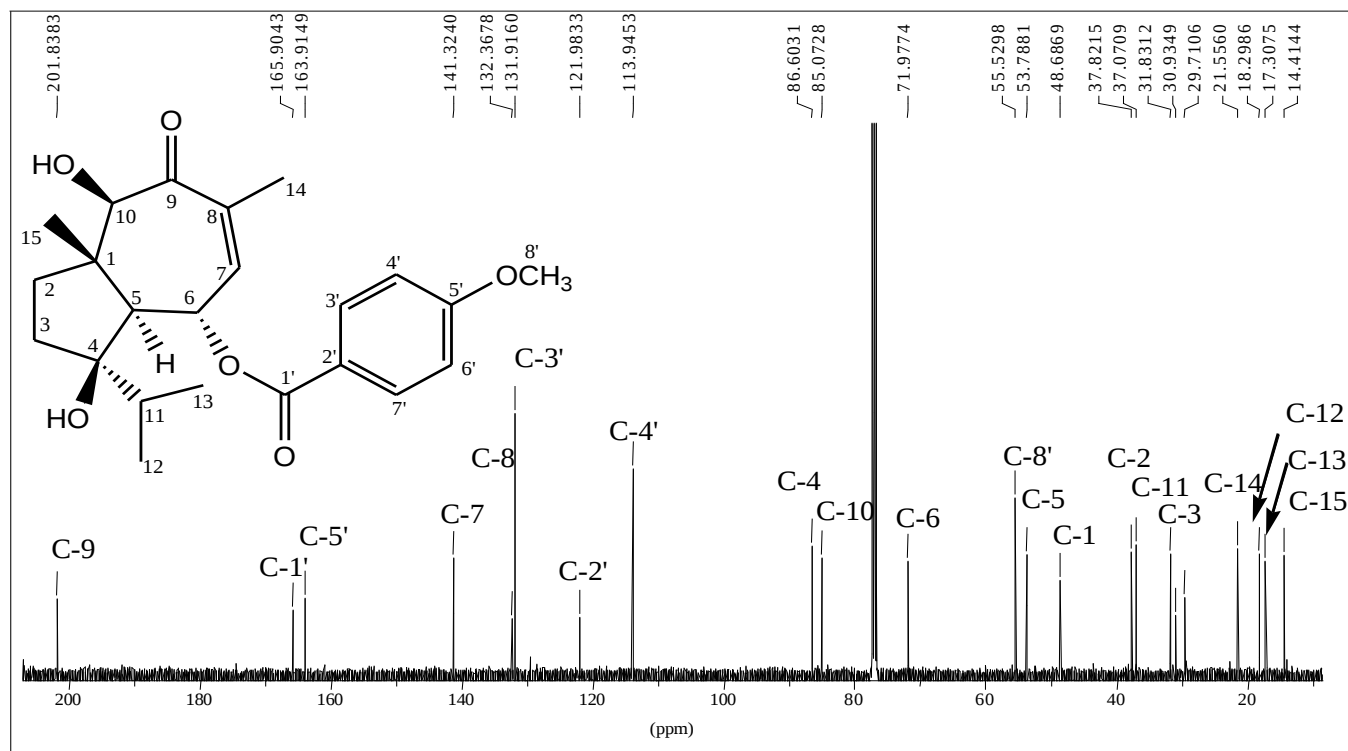


Figure III.10 : Spectre ^{13}C du composé 1

Les corrélations longues distances ^1H - ^{13}C (HMBC) qui associent le méthyle (δ_{H} 1,07, H-15) aux signaux des carbones à δ_{C} 37,8 (C-2), 48,7 (C-1), 53,8 (C-5) et 85,0 (C-10) (Figure III.11), permettent de placer ce méthyle en position C-15. De même, les corrélations HMBC observées pour les protons H-12 et H-13 indiquent la liaison entre le groupement isopropyle et le carbone C-4 résonant à 86,6 ppm. Le déblindage de cette valeur laisse supposer que ce carbone est oxygéné.

Le spectre DEPT montre clairement l'existence de deux méthylènes saturés au niveau de ce composé (Figure III.12). Le premier méthylène [δ_{H} 2,06 (1H, m, H-3b), 1,70 (1H, m, H-3a) et δ_{C} 31,8 (C-3)] a été attribué à l'aide du spectre HSQC. Le second se caractérise par les données δ_{H} 1,92 (1H, m, H-2b), 1,60 (1H, m, H-2a) et δ_{C} 31,8 ppm (C-3). Ce spectre HSQC a également permis l'attribution définitive des données protons et carbones des 4 groupes méthyles de la molécule (C-12, C-13, C-14 et C-15) (Figure III.13).

Les corrélations observées sur le spectre COSY (Figure III.14) entre les protons des deux méthylènes H-2 et H-3 aussi fournit la preuve qu'ils sont portés par deux carbones voisins.

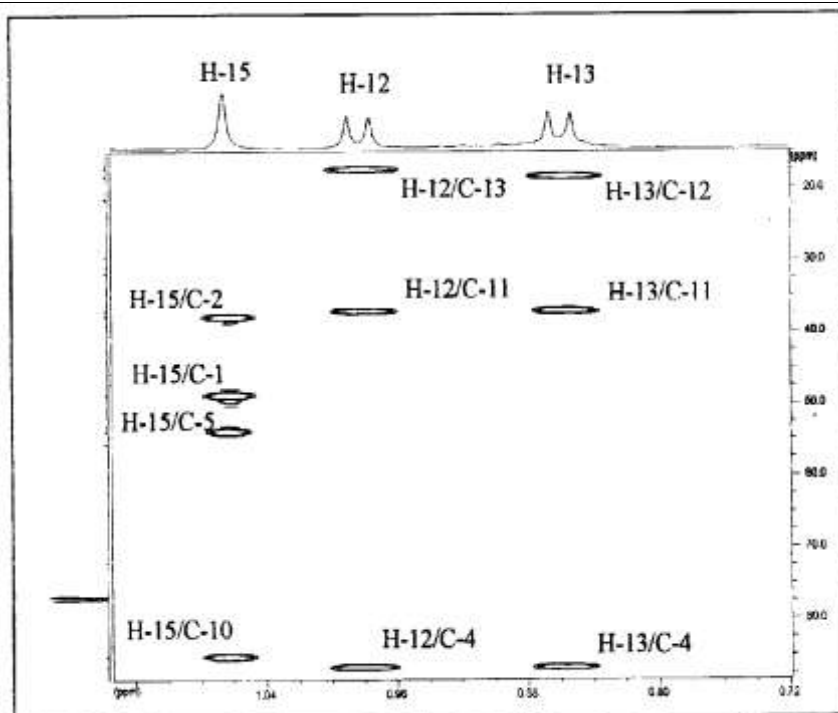


Figure III.11 : Agrandissement du spectre HMBC du composé 1

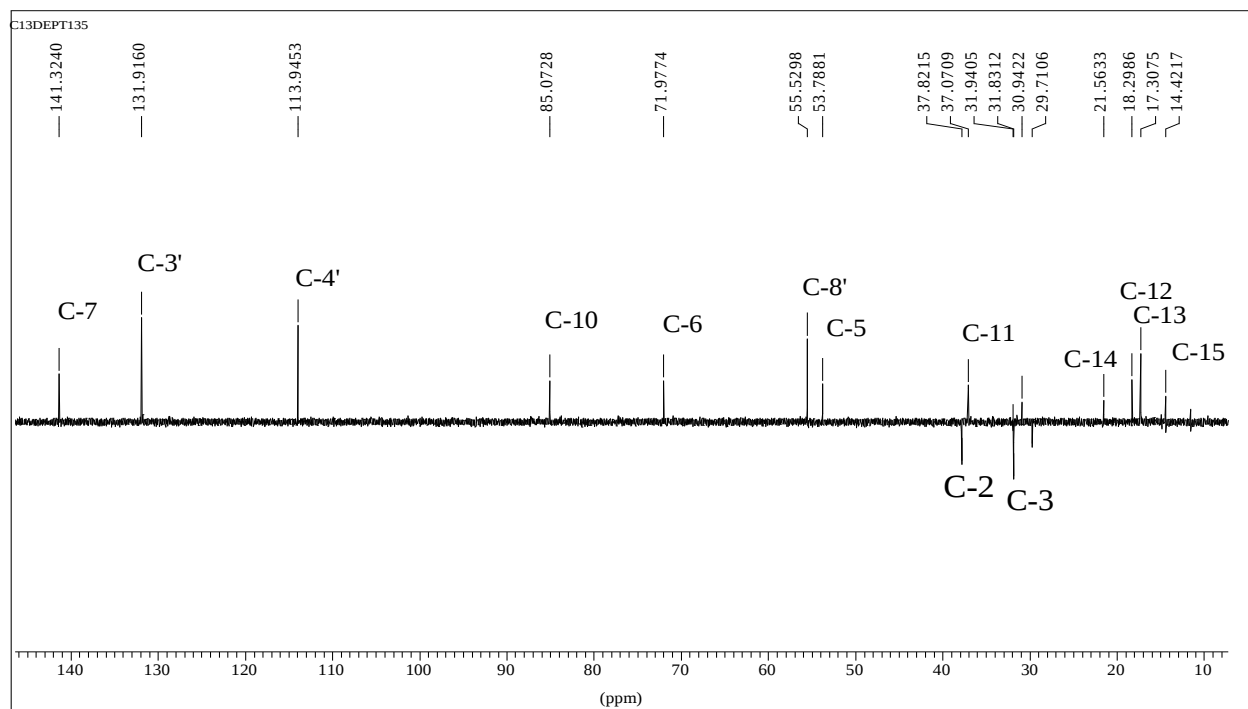


Figure III.12 : Spectre DEPT du composé 1

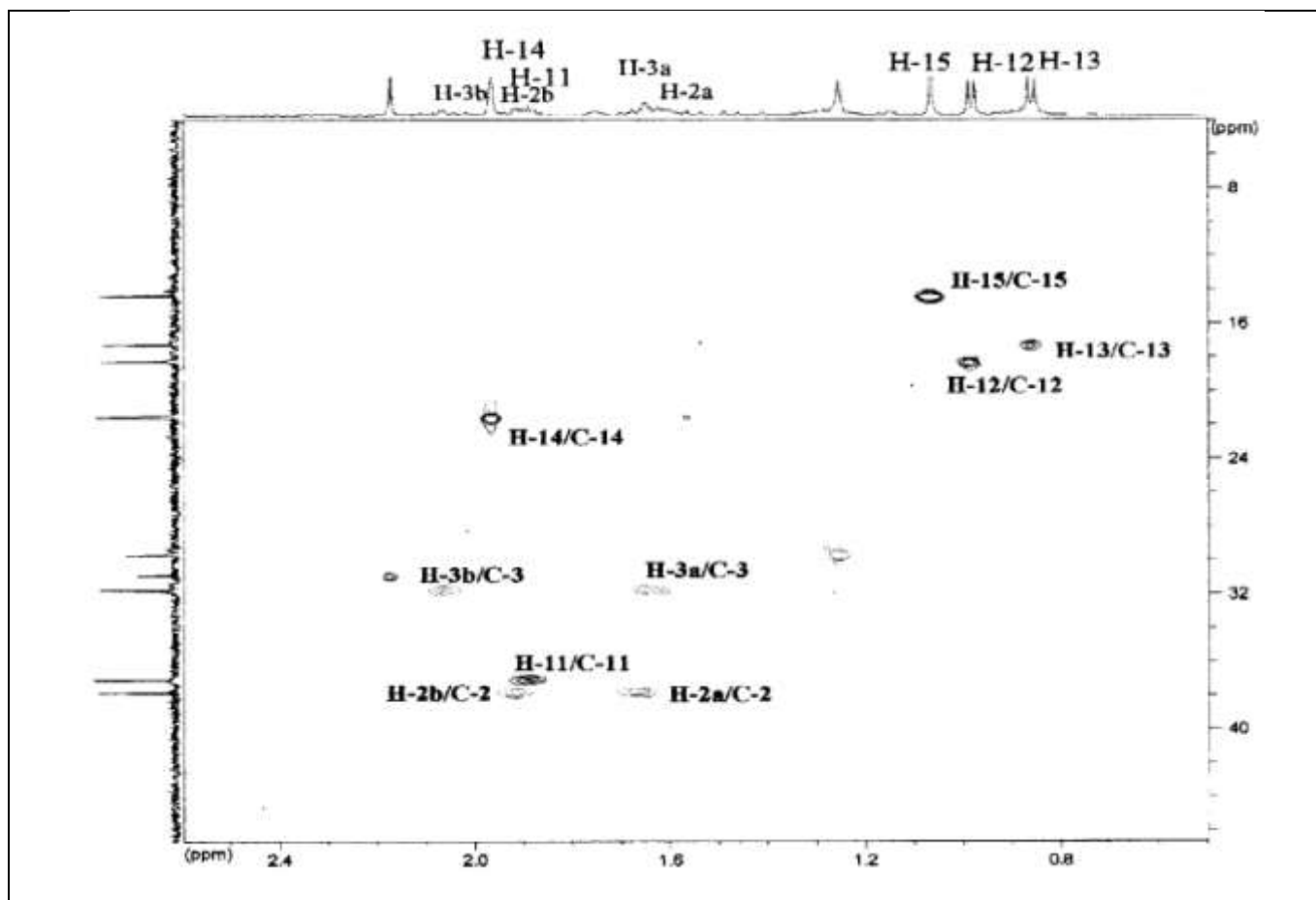


Figure III.13 : Agrandissement du spectre HSQC du composé 1

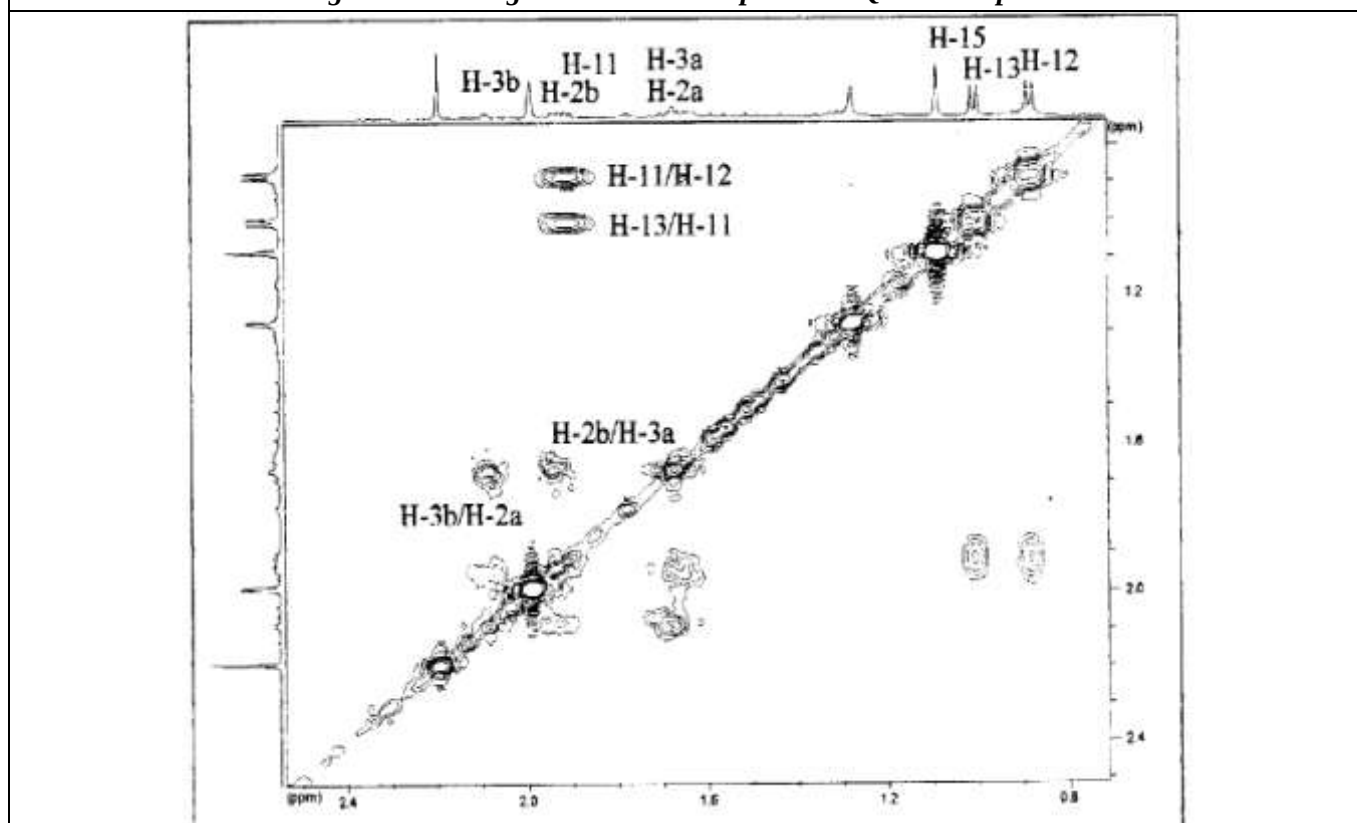


Figure III.14 : Agrandissement du spectre COSY du composé 1

Concernant le deuxième cycle, l'expérience HSQC a permis d'attribuer le proton oléfinique H-7 (δ_H 6,23, s), le proton du méthyle H-14 (δ_H 1,96, 3H, s) ainsi que ceux des deux méthines oxygénés H-10 (δ_H 4,08 (1H, d, 3,0 Hz) et H-6 (6,11 (1H, d, 11,0 Hz) respectivement aux signaux des carbones résonant à δ_C 141,3 (C-7), 21,6 (C-14), 85,0 (C-10) et 71,9 (C-6) (Figure III.15).

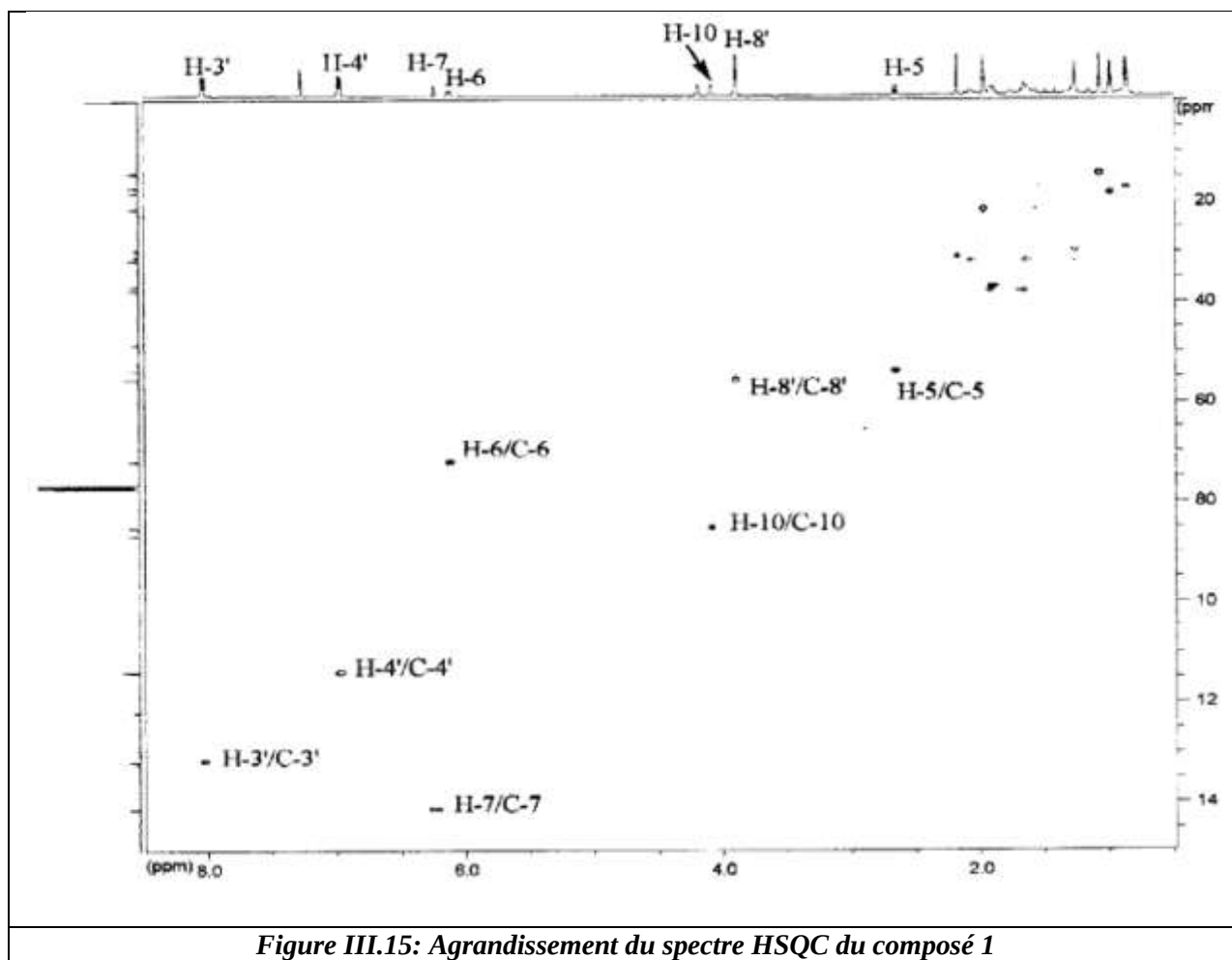


Figure III.15: Agrandissement du spectre HSQC du composé 1

Les corrélations Longues distances HMBC, notamment celles observées entre le proton de l'hydroxyle à δ_H 4,18 (10-OH) et les carbones à δ_C 48,7 (C-1), 85,5 (C-10) et le carbone du carbonyle à 201,8 (C-9), celles observées entre le proton du carbone porteur de la fonction hydroxyle à δ_H 4,08 (H-10) et les carbones C-15, C-1, C-2, et C-5 ainsi que celles des protons du méthyle à δ_H 1,96 (H-14) et les carbones à δ_C 132,3 (C-8), 141,3 (C-7) et le carbonyle (C-9) (Figure III.16) ont permis d'achever une partie de la structure de ce cycle.

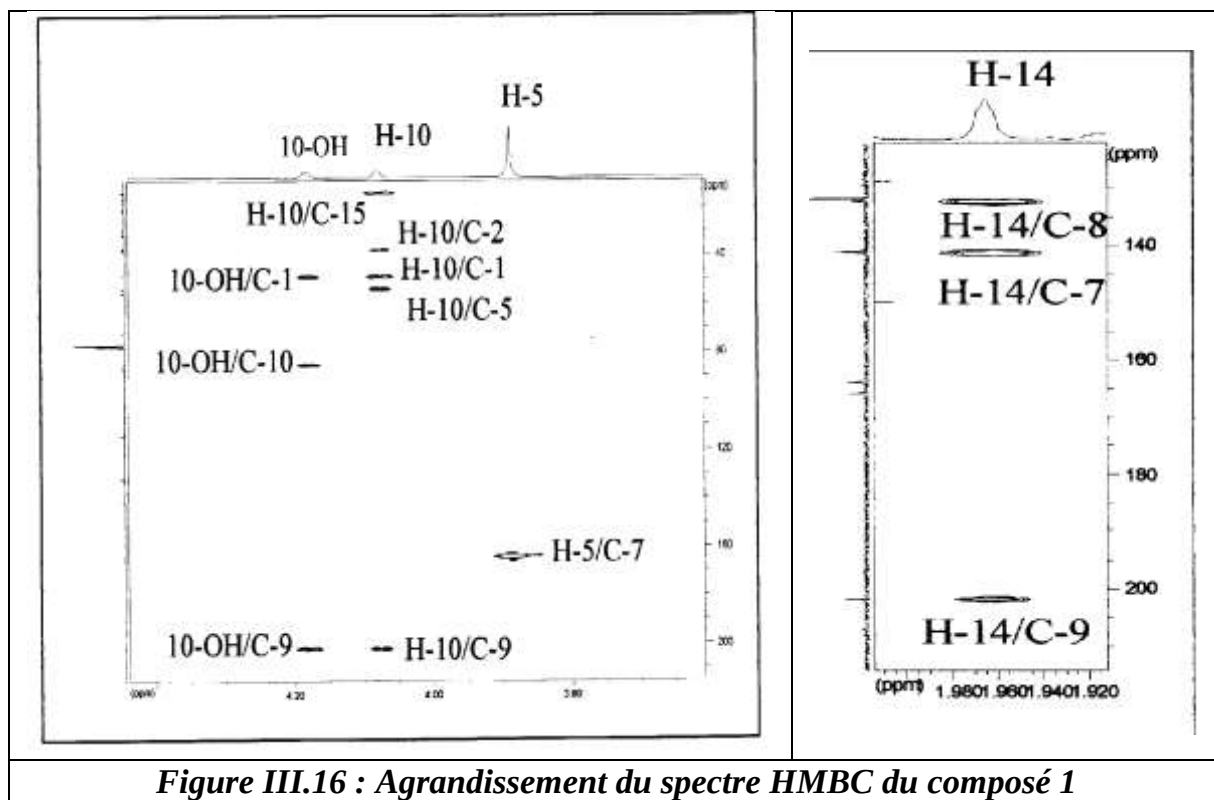


Figure III.16 : Agrandissement du spectre HMBC du composé 1

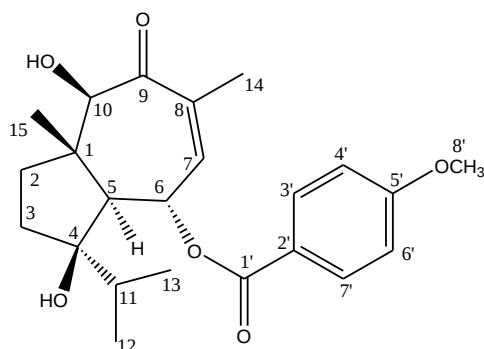
Enfin, la position du groupement anisate est déduite grâce à la corrélation HMBC observée entre le signal du proton H-6 et celui du carbone C-1'. La valeur du déplacement du carbone C-6 (à δ_C 71,9) suggère qu'il porte un atome d'oxygène, lequel estérifié par le groupement anisate.

La stéréochimie relative des centres asymétriques de la molécule a été déterminée grâce à l'analyse du spectre NOESY du composé **1**. Afin de ne pas alourdir le propos, cette analyse ne sera pas détaillée pour ce composé. Un exemple de détermination de la configuration relative de la molécule par analyse du spectre NOESY est présentée pour l'élucidation structurale du composé suivant (voir infra, p. 116) »

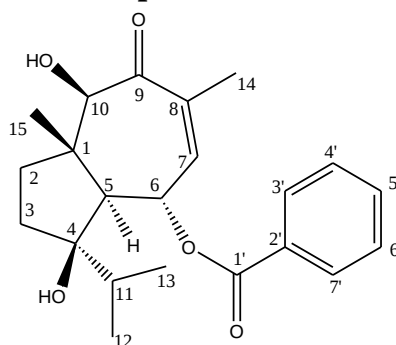
Les données résumées dans le tableau III.2 montrent qu'à l'exception de la substitution du C-10 cette structure est identique au 6-anisatelancerodiol précédemment isolé de *Ferula Lancerottensis* [12] et *Ferula linkii* [14]. Le composé nouveau **1** a été identifié au 10 β -hydroxylancerodiol-6-anisate.

Tableau III.2 : Valeurs des déplacements chimiques RMN ^1H , ^{13}C (500 MHz) et corrélations HSQC, COSY, HMBC et NOESY du composé 1 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	COSY	HMBC	NOESY
1	-	48,7		-	-
2 a	1,60 m	37,8	H-3b	-	H-15, H-2b
b	1,92 m		H-3a		
3 a	1,70 m	31,8	H-2b	-	-
b	2,06 m		H-2a		H-12, H-13
4	-	86,6	-	-	-
5	2,65 d (11,0)	53,8	H-6	C-15, C-11, C-1, C-6, C-10, C-4	H-13, H-2b, H-11
6	6,11 d (11,0)	71,9	H-5	C-8, C-7, C-1'	H-15
7	6,23 s	141,3	H-6, H-14	C-14, C-5, C-8, C-9	H-14
8	-	132,3	-	-	-
9	-	201,8	-	-	-
10	4,08 d (3,0)	85,0	H-15, H-2a	C-15, C-2, C-1, C-5, C-9, C-1, C-10,	H-2b, H-5
10-OH	4,18 d (3,0)				H-15
11	1,91 m	37,0	H-12, H-13	C-13, C-12, C-3, C-1, C-5, C-6, C-4	H-2b
12	0,98 d (6,7)	18,3	H-11	C-13, C-11, C-4	H-3b
13	0,86 d (6,7)	17,3	H-611	C-12, C-3, C-11, C-10, C-4	H-12, H-3b, H-2b
14	1,96 s	21,6	H-6, H-7	C-8, C-7, C-10, C-1, C-5	-
15	1,07 s	14,4	H-10, H-2a	C-2, C-1, C-5, C-10	H-11, H-2b
1'	-	165,9	-	-	-
2'	-	121,9	-	-	-
3', 7'	8,01 d (8,8)	131,9	H-4'	C-4', C-2', C-5', C-1'	H-14, H-4', H-5'
4', 6'	6,96 d (8,8)	113,9	H-3'	C-2', C-5', C-1'	H-3'
5'	-	163,9	-	-	-
8'	3,89 s	55,5	-	C-5'	-

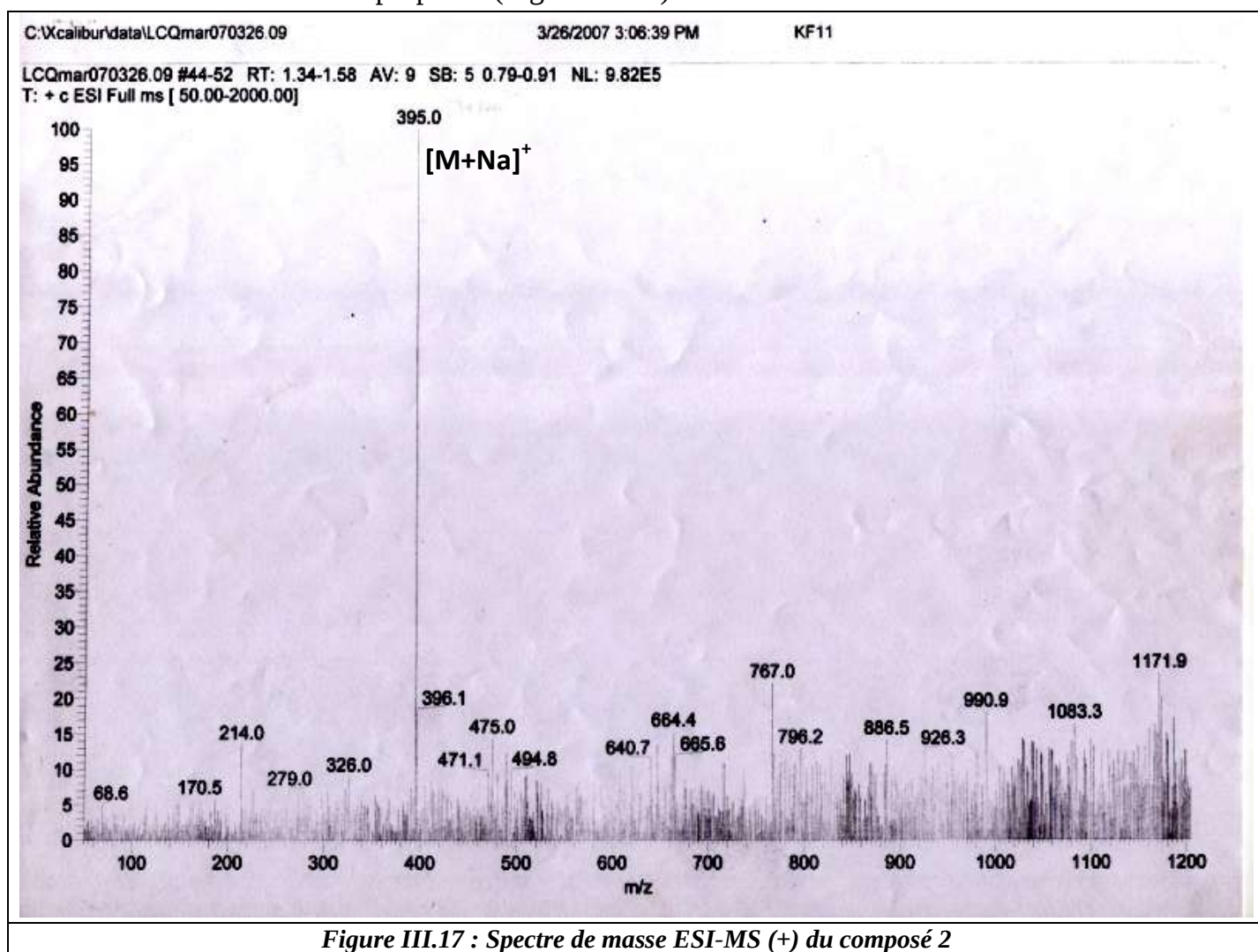


V.1.2. Elucidation structurale du composé 2



10 β -Hydroxylancerodiol-6-benzoate

Une formule brute de C₂₂H₂₈O₅ est attribuée à ce composé amorphe à l'issue de son analyse par spectrométrie de masse CI à haute résolution HR-CI/MS ($[M+H]^+$ m/z 373,20137 (calc. 373,2015), soit une masse moléculaire de 372 uma. Son spectre de masse ESI-MS en mode positif montre un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 395$ corroborant la formule proposée (Figure III.17).



Le spectre RMN ^1H de ce composé (Figure III.18) présente de très fortes similitudes avec celui du composé **1**. Il se distingue en l'occurrence par l'absence du signal dû au méthoxyle lié au groupement benzoate impliquant une variation du système de spin du noyau aromatique.

De plus, l'absence du signal du carbone du méthoxyle sur le spectre RNM ^{13}C de ce composé (Figure III.19) est également en faveur d'une structure monosubstituée du noyau benzénique. Les signaux attribués à la partie aromatique sont cette fois au nombre de trois résonant aux valeurs de δ_{H} : 8,07 (2H, t, 7,6 Hz, H-2'), 7,49 (2H, t, 7,6 Hz, H-3') et 7,61 (1H, t, 7,6 Hz, H-4'), confirmant une substitution du cycle hepténone par un benzoate. Par ailleurs, la différence de 30 u.m.a (perte d'un méthoxyle) observée entre les spectres de masse des deux composés corrobore cette hypothèse.

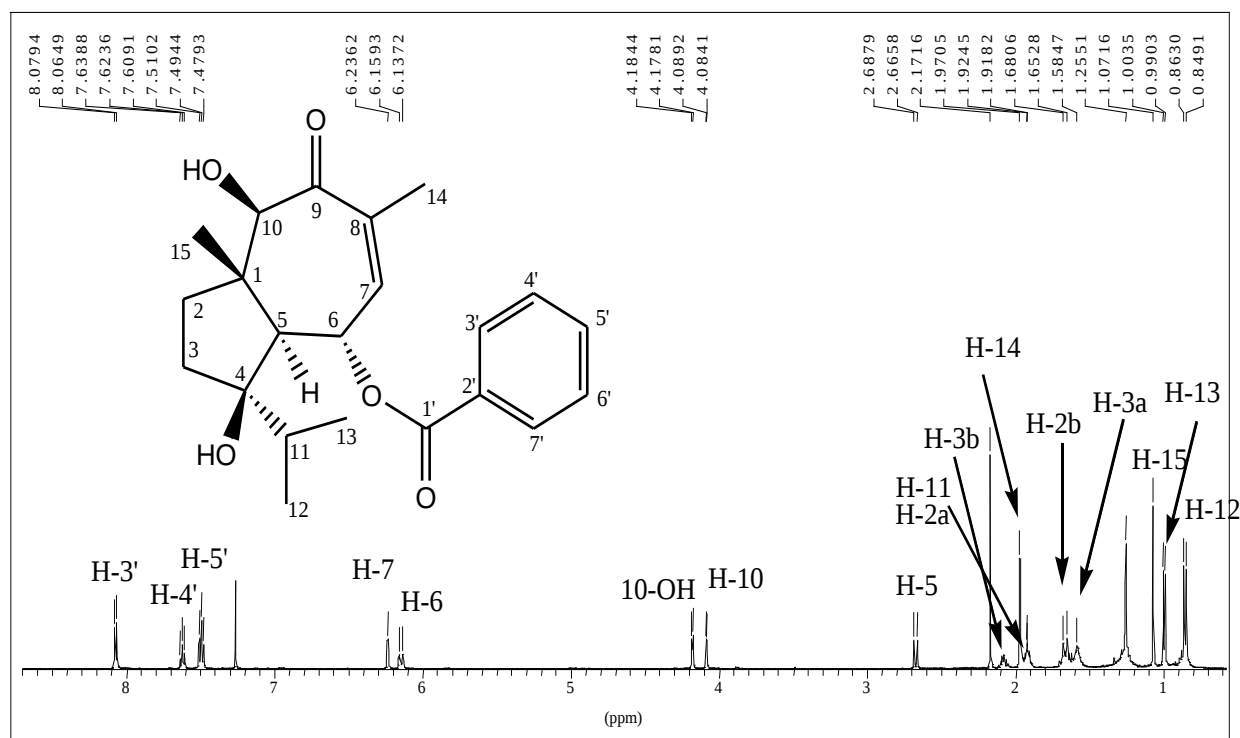
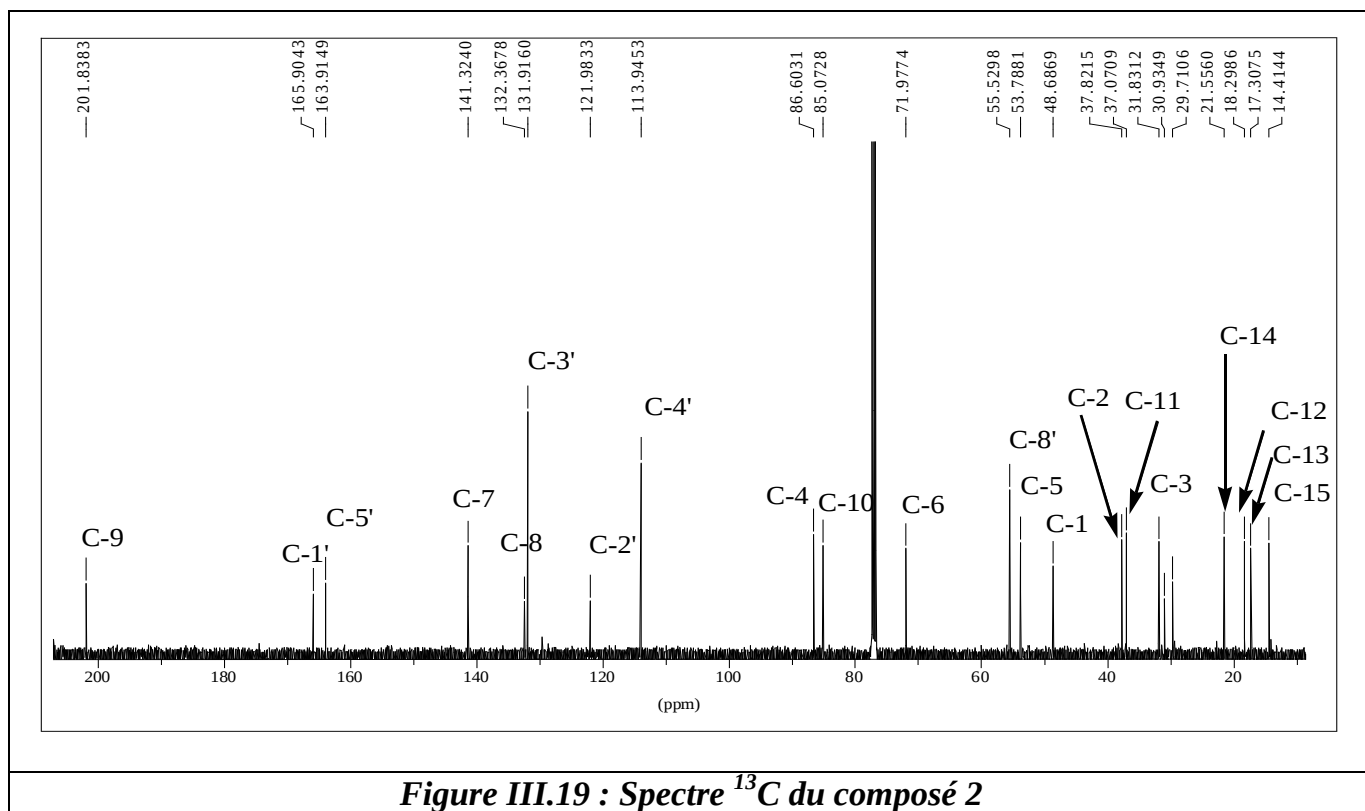


Figure III.18 : Spectre ^1H du composé 2



La stéréochimie relative de ce composé est établie sans ambiguïté à partir de son spectre NOESY. Les corrélations spatiales observées pour cette molécule sont comme suit :

- Les effets NOE entre les protons de l'isopropyle (H-11, H-12 et H-13) et les protons H-5, H-2b et H-3b d'une part et avec le proton aromatique de l'anisate H-3' d'une autre part (Figures III.20, III.21),
- Les corrélations entre le H-15 et les H-2a, H-3a, H-6 et 10-OH.
- Les corrélations entre le proton H-10 et les protons H-2b et H-5.

Les données précédentes (Figures III.20 et III.21) nous indiquent l'orientation α de l'isopropyle, de l'anisate, des protons H-5, H-10, H-2b et H-3b. En revanche, l'hydroxyle (10-OH) et les protons H-6, H-2a et H-3a ont une orientation β . L'analyse de l'ensemble des informations spectrales (Tableau III.3) de ce composé permet de l'identifier au 10 β -hydroxylancerodiol-6-benzoate identifié pour la première fois dans le règne végétal.

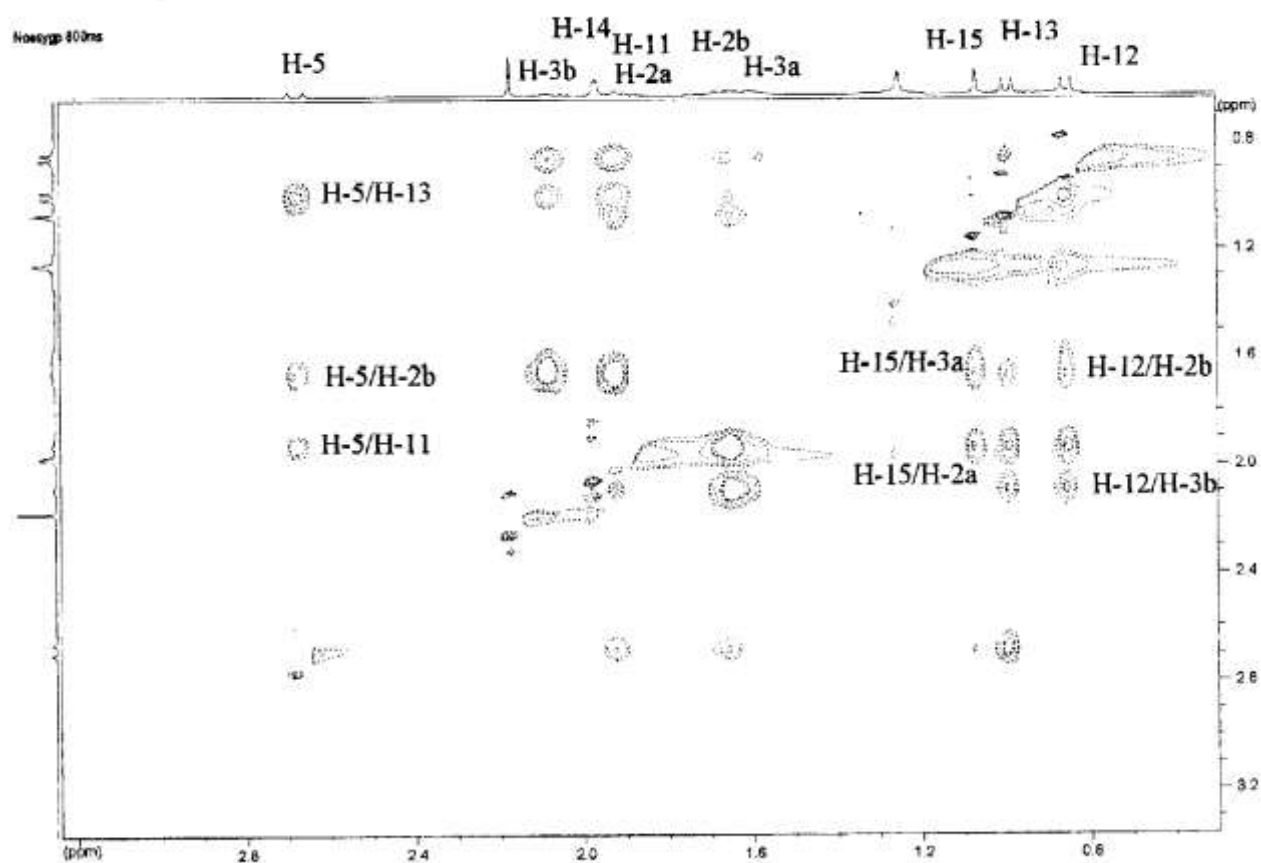


Figure III.20 : Agrandissement du spectre NOESY du composé 2

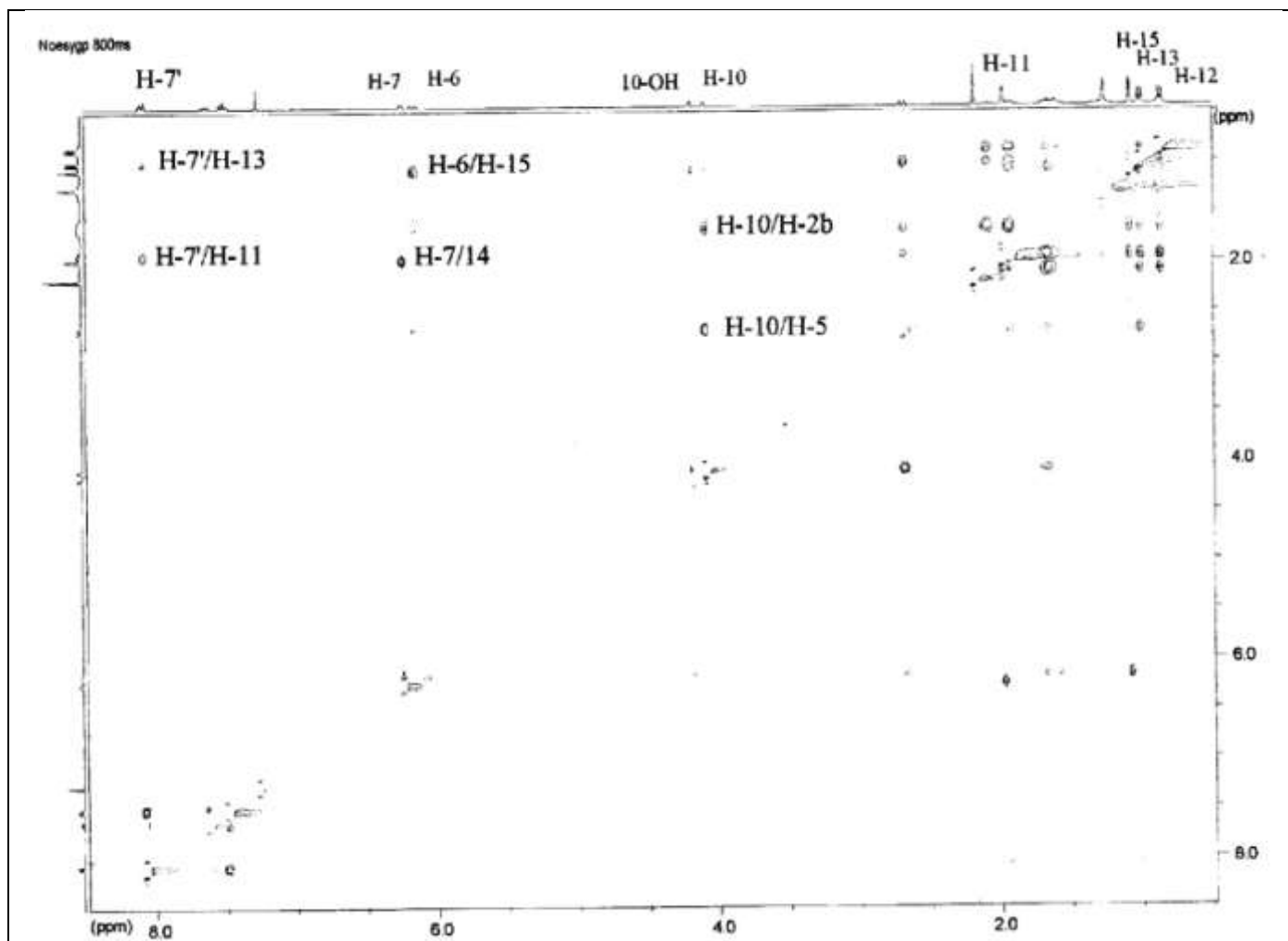
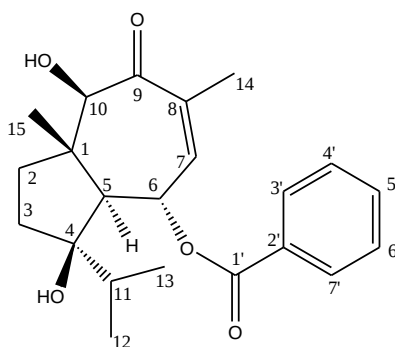


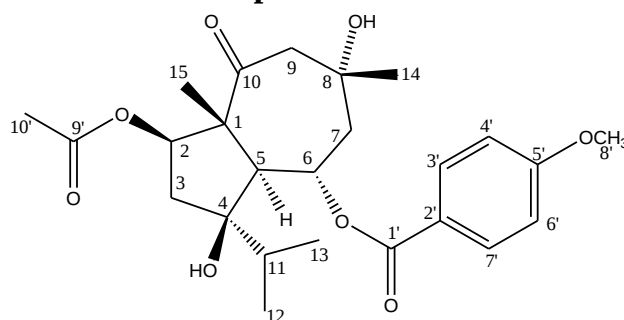
Figure III.21 : Spectre NOESY du composé 2

Tableau III.3: Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations COSY, HSQC, HMBC et NOESY du composé 2 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HSQC	COSY	HMBC	NOESY
1	-	48,7	-	-	-
2 a	1,91 m (β)	37,9	-	C-1, C-4	H-15, H-2b
b	1,66 m (α)				
3 a	1,64 m (β)	32,0	-	C-15, C-2	-
b	2,06 m (α)				H-12, H-13
4	-	86,5	-	-	-
5	2,68 d (11,0)	53,7	H-6	C-1, C-6, C-4, C-15, C-11	H-13, H-2b, H-11
6	6,15 d (11,0)	72,3	H-5	-	H-15
7	6,23 s	141,0	H-14	-	H-14
8	-	132,5	-	-	-
9	-	201,8	-	-	-
10	4,09 d (3,0)	85,0	H-15	C-1, C-15, C-10	H-2b, H-5
10-OH	4,19 d (3,0)				H-15
11	1,92 m	37,0	H-13, H-12	C-1, C-4	H-2b
12	0,85 d (6,7)	17,2	H-13, H-11	C-11, C-13, C-4	H-3b
13	0,99 d (6,7)	18,3	H-12, H-11	C-11, C-4, C-13	H-12, H-3b, H-2b
14	1,97 s	21,6	H-7	C-8, C-7, C-9	-
15	1,07 s	14,4	H-10	C-1, C-2, C-5, C-10	H-11, H-2b
1'	-	166,1	-	-	-
2'	-	129,7	-	-	-
3'	8,07 t (7,6)	129,8	H-4'	C-1', C-5', C-2'	H-14, H-4', H-5'
4', 6'	7,49 t (7,6)	128,7	H-3', H-5'	C-3'	H-3'
5', 7'	7,61 t (7,6)	133,6	H-4'	C-3'	-



V.1.3. Elucidation structurale du composé 3



Vesceriténone (3)

Le spectre de masse HR-CI/MS du composé **3** montre un ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 463,23315 (calculée 463,2332) lui révélant la formule brute $C_{25}H_{34}O_8$. Les deux ions aux m/z 485,2 ($[M+Na]^+$) et 947,1 ($[2M+Na]^+$) obtenus en ESI/MS en mode positif (figure III.22) confirment la formule proposée.

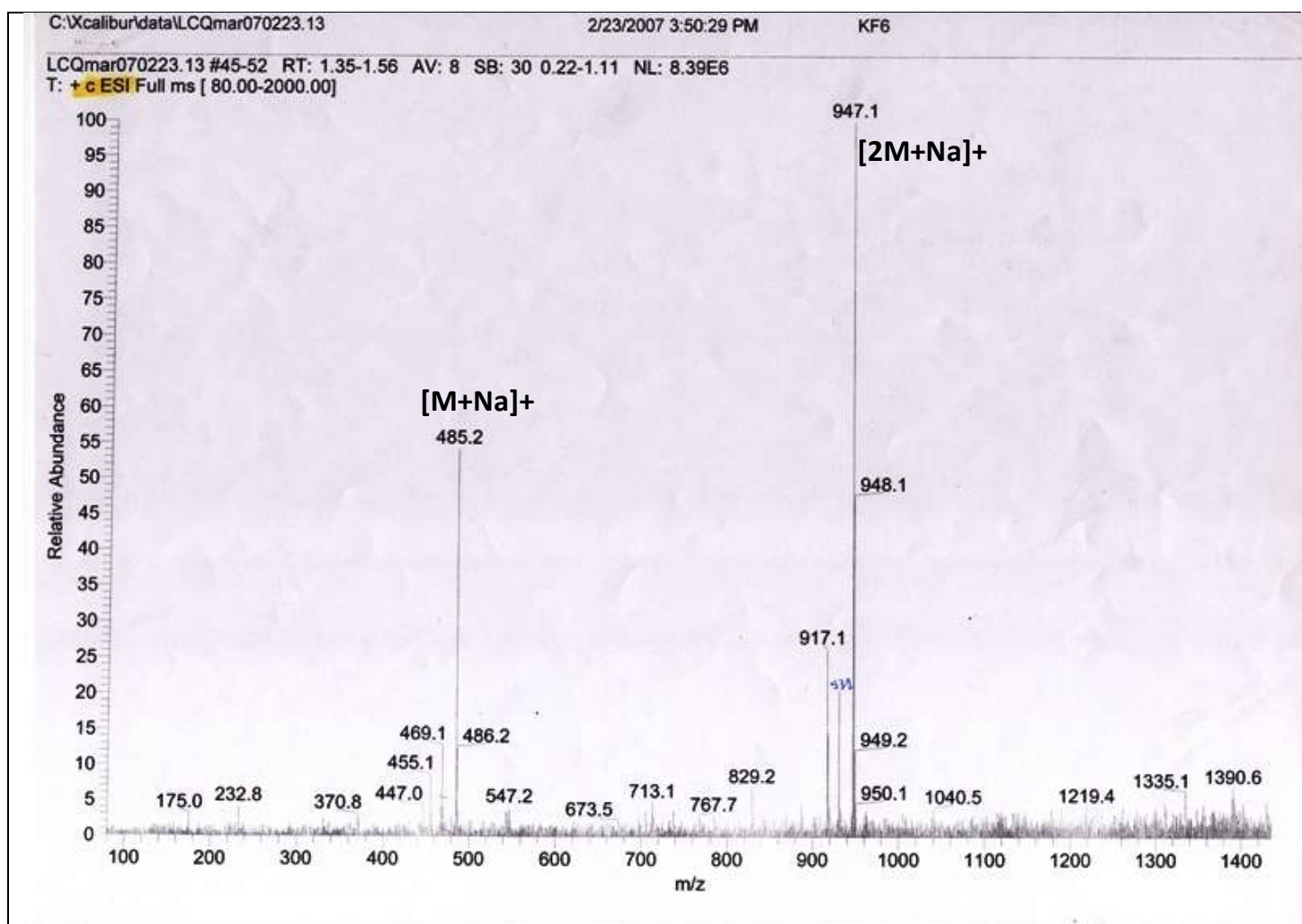
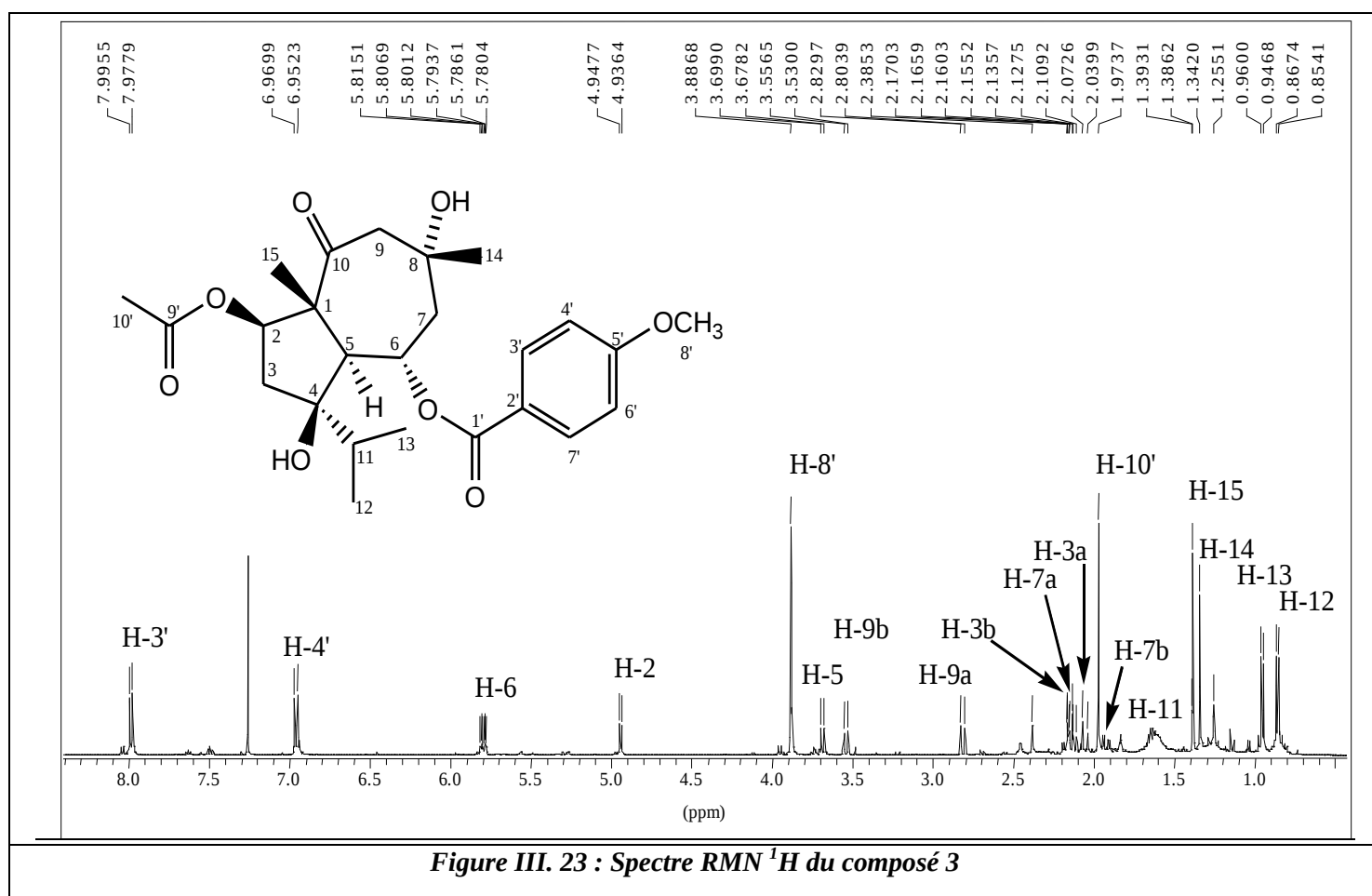


Figure III.22 : Spectre de masse ESI/MS (+) du composé 3

Le spectre UV de ce composé montre un maximum d'absorption à 257 nm suggérant la présence d'un substituant aromatique. L'analyse des spectres RMN ^1H (Figure III.23) et RMN- ^{13}C (figure III.24) indique que le composé **3** présente également une structure daucane, caractérisée entre autres par son groupement isopropyle [δ_{H} 0,98 (3H, d, 6,7 Hz, H-13), 0,86 (3H, d, 6,7 Hz, H-12), et 1,64 (1H, m, H-11)] ainsi que les deux méthyles [δ_{H} 1,38 (3H, s) H-15, 1,34 (3H, s) H-14].

Par ailleurs, nous avons constaté comme précédemment la présence d'une fonction ester identifiée comme étant un groupement anisate [δ_{H} 7,99 (2H, d, 8,8 Hz, H-3'), 6,96 (2H, d, 8,8 Hz, H-4'), δ_{H} 3,89 (3H, s, H-8')]. L'analyse des spectres ^1H et ^{13}C met en évidence des signaux supplémentaires par rapport aux deux composés précédents. Il s'agit de deux carbones, l'un résonant à un champ faible (δ_{C} 169,4, C-9') révélant une fonction ester supplémentaire, et l'autre très blindé (δ_{C} 21,0, C-10'). De plus, un signal intégrant pour trois protons δ_{H} 1,97 (3H, s, H-10'), correspondant à un méthyle est observable. La valeur caractéristique de son déplacement, prédit qu'il s'agit du méthyle d'un groupement acétyle.



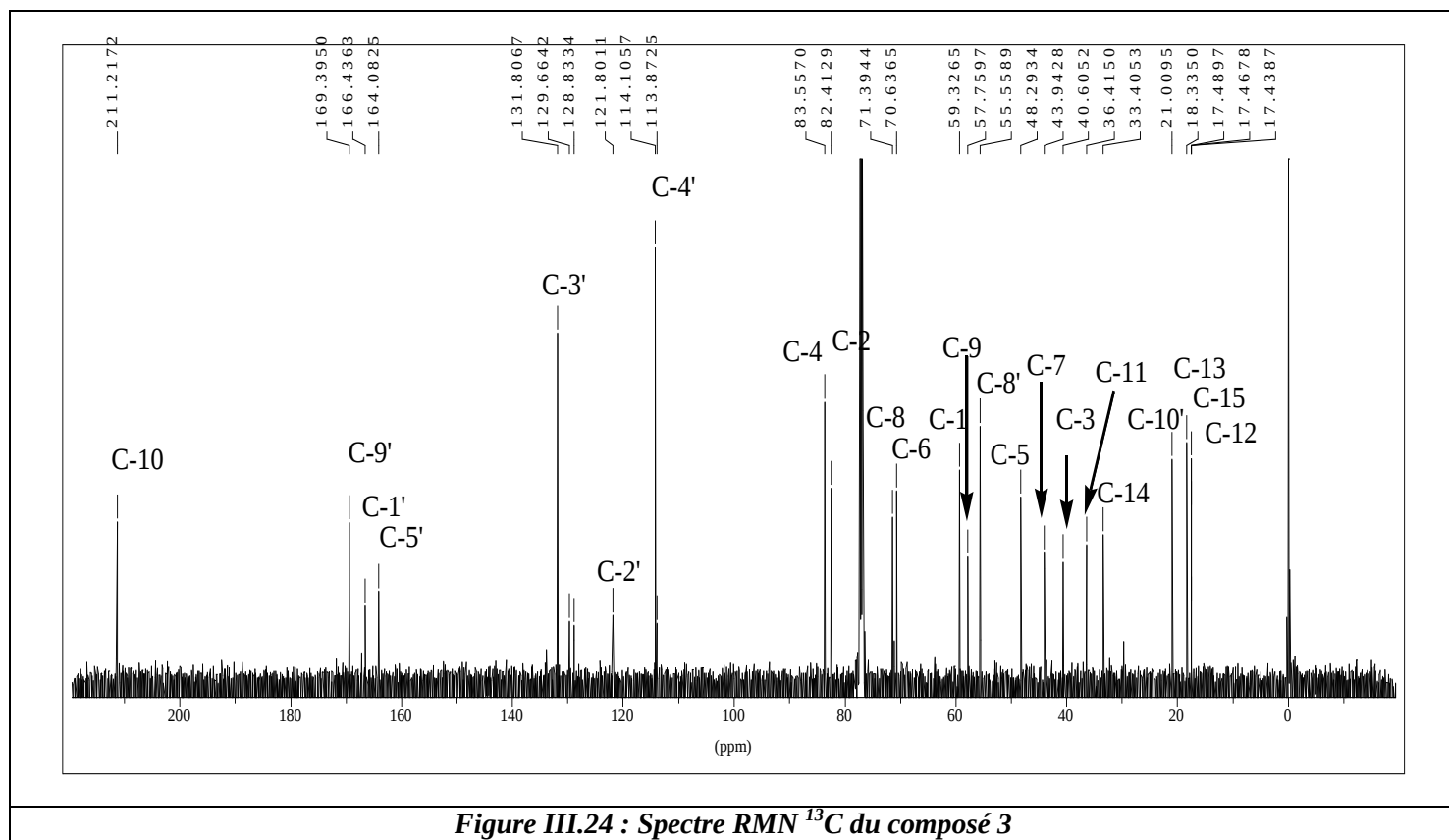


Figure III.24 : Spectre RMN ^{13}C du composé 3

Par ailleurs, le spectre DEPT de ce composé indique un nombre de trois méthylènes (Figure III.25). La disparition des signaux des deux carbones insaturés des méthines des composés **1** et **2** suggère que les deux cycles sont cette fois-ci complètement saturés. Le nombre de carbones saturés oxygénés est de quatre [(δ_c 82,4, C-2), (δ_c 83,6, C-4), (δ_c 70,6, C-6) et (δ_c 71,4, C-8)] (Figures III.24 et III.25).

L'expérience de corrélation HSQC a permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants, notamment ceux des trois méthylènes et ceux des quatre méthines (Tableau III.4).

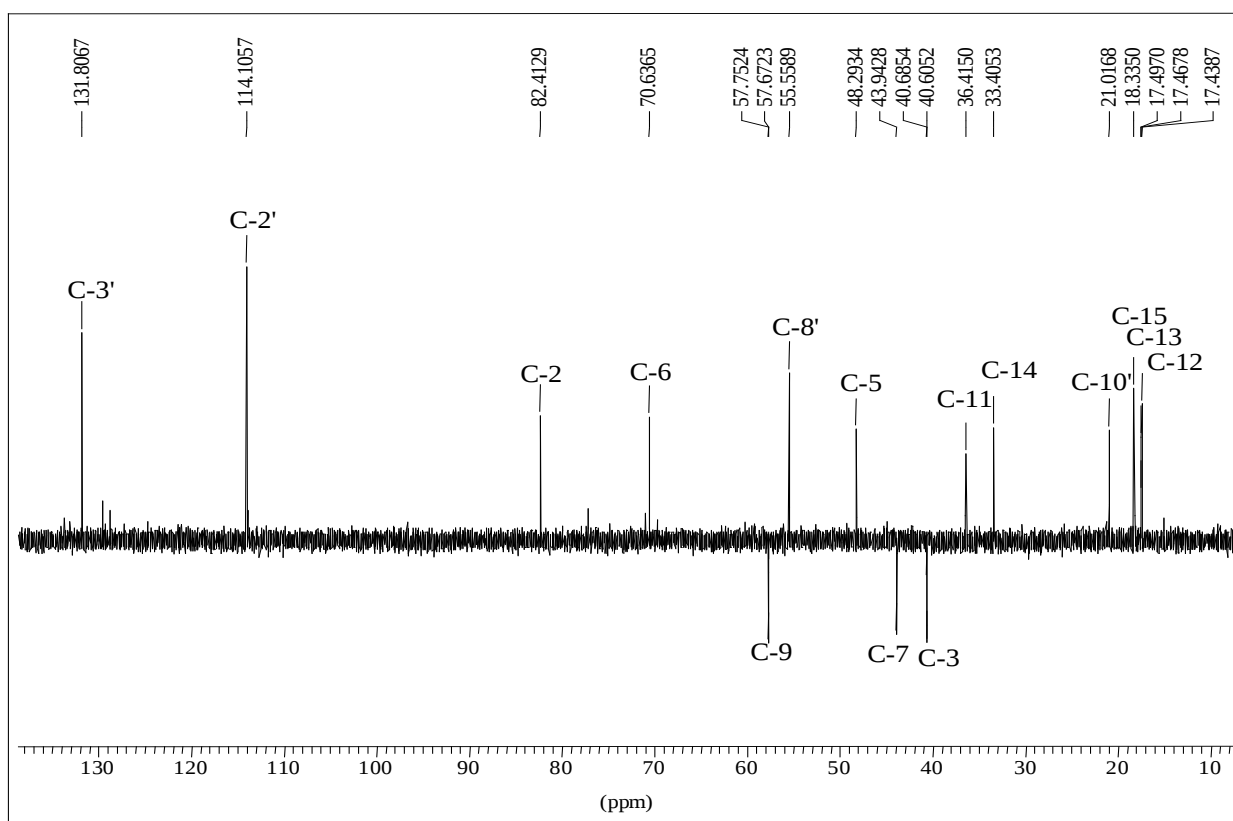


Figure III. 25 : Spectre DEPT du composé 3

Les corrélations longues distances observées sur le spectre HMBC entre le signal des protons du méthyle à δ_H 1,38 (C-15) et ceux des carbones à δ_C 48,3 (C-5), 59,3 (C-1), 82,4 (C-2) et 212,2 (C-10) révèle une variation de la substitution sur le squelette terpénique, comparé aux composés **1** et **2**. Sur le cycle à 7 sommets, les protons du méthyle à δ_H 1,34 (H-14) corrélient avec le carbone quaternaire oxygéné à δ_C 71,4 (C-8) ainsi qu'avec les deux méthylènes saturés à δ_C 43,9 (C-7) et à δ_C 57,8 (C-9). Ces deux derniers sont placés grâce aux corrélations HMBC observées d'une part, entre les protons H-9a et H-9b du méthylène (δ_H 2,82, 3,55 et δ_C 57,8) et le carbone du carbonyle (δ_C 212,2, C-10), d'autre part, entre le proton H-7 (δ_H 1,90, 2,14 et δ_C 43,9) et le carbone du méthine (δ_C 48,3, C-5).

Le groupement anisate est lui aussi placé sur la base des corrélations présentes entre le proton à δ_H 5,80 (m, H-6) et le carbone résonant à δ_C 166,4 (C-1') de la fonction ester. Les protons de l'acétyle à δ_H 1,97 (H-10') et celui du méthine à δ_H 4,94 (H-2) corrélient conjointement avec le carbone de la fonction ester à δ_C 169,4 (C-9') sur le spectre HMBC, ce qui nous permet de placer l'acétyle sur le carbone C-2 (figures III.26 et III.27).

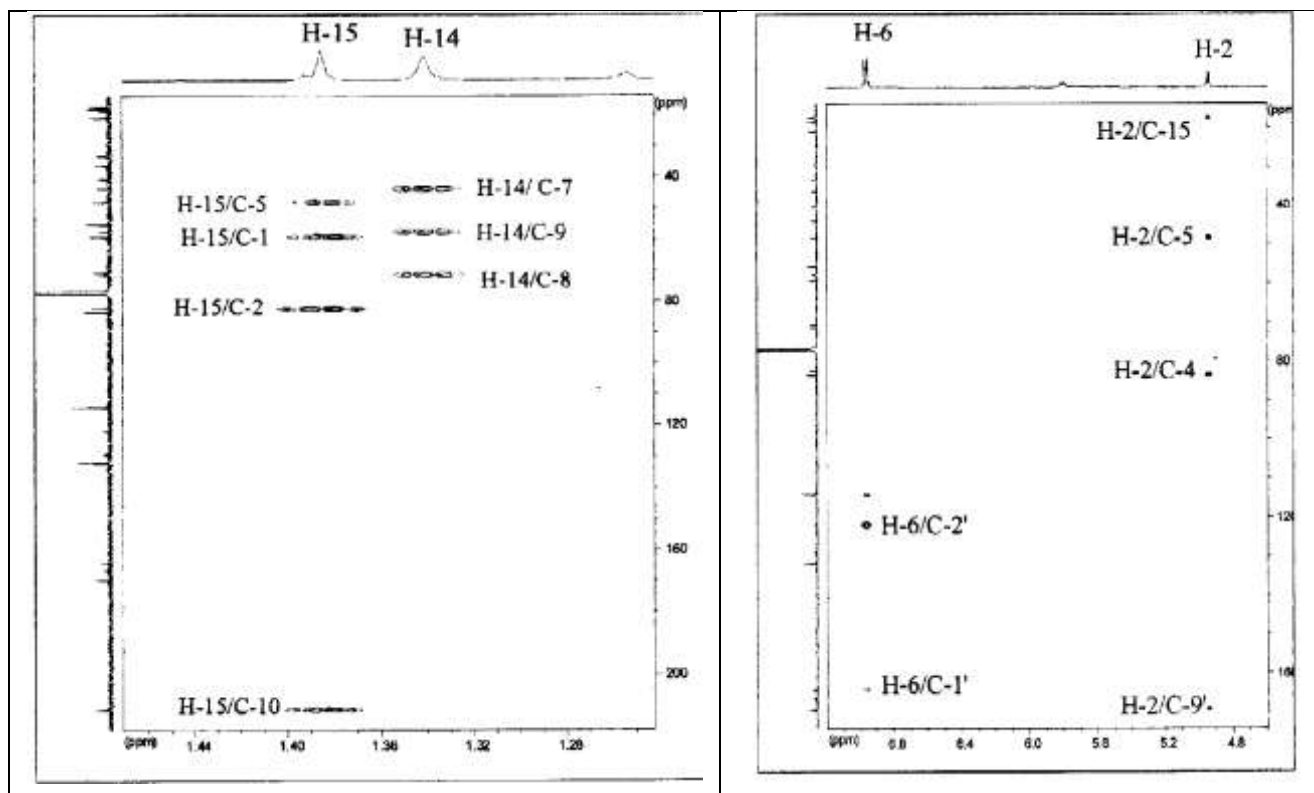


Figure III.26 : Agrandissements du Spectre HMBC du composé 3

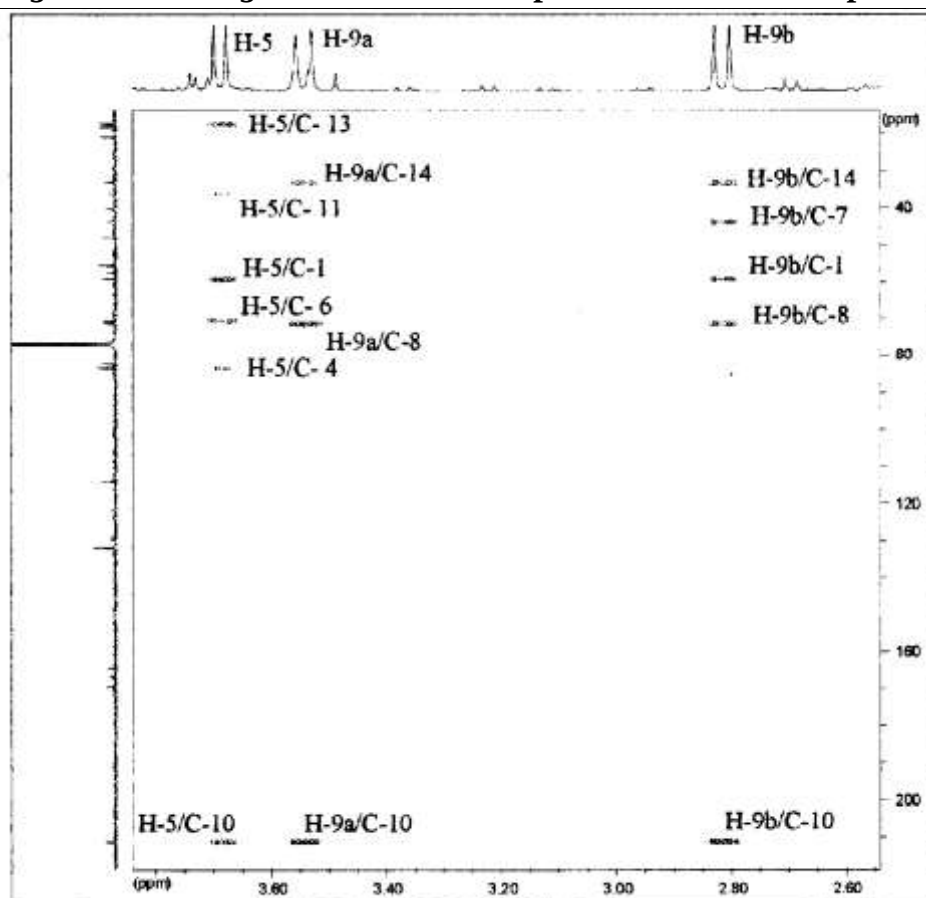


Figure III.27 : Agrandissement du Spectre HMBC du composé 3

La stéréochimie de ce composé est déterminée par l'analyse du spectre NOESY qui montre des corrélations spatiales entre les protons H-2, H-3a, H-5, H-7a, H-9a, les protons de l'isopropyle ainsi que ceux de la partie anisate, suggérant une orientation du même côté du plan de la molécule pour ces substituants. Un traitement analogue conduit à positionner les protons H-3b, H-6, H-7b, H-9b, ceux des méthyles (H-14 et H-15) et le signal de l'acétyle H-10' de l'autre côté du plan de la molécule (Figures III.28 et III.29).

Ce composé isolé ici pour la première fois dans le règne végétal est nommé Vesceriténone.

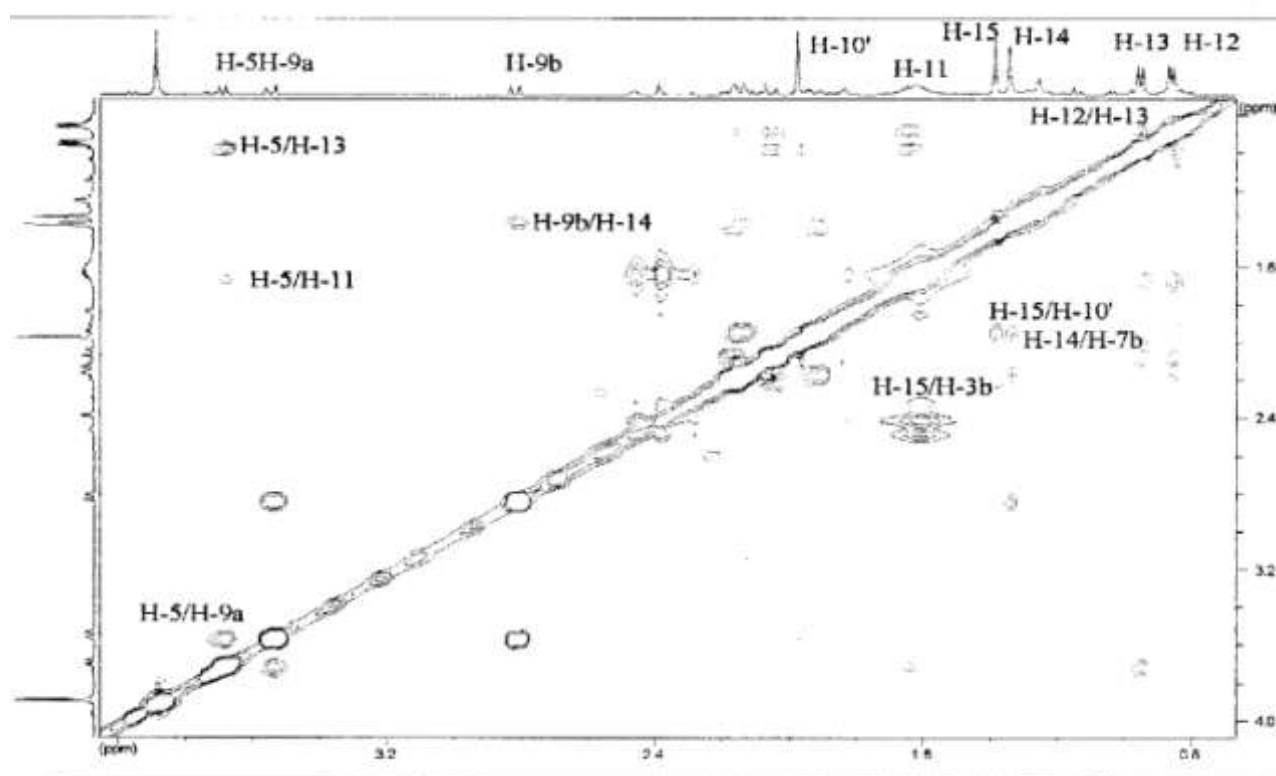


Figure III.28 : Agrandissement du Spectre NOESY du composé 3

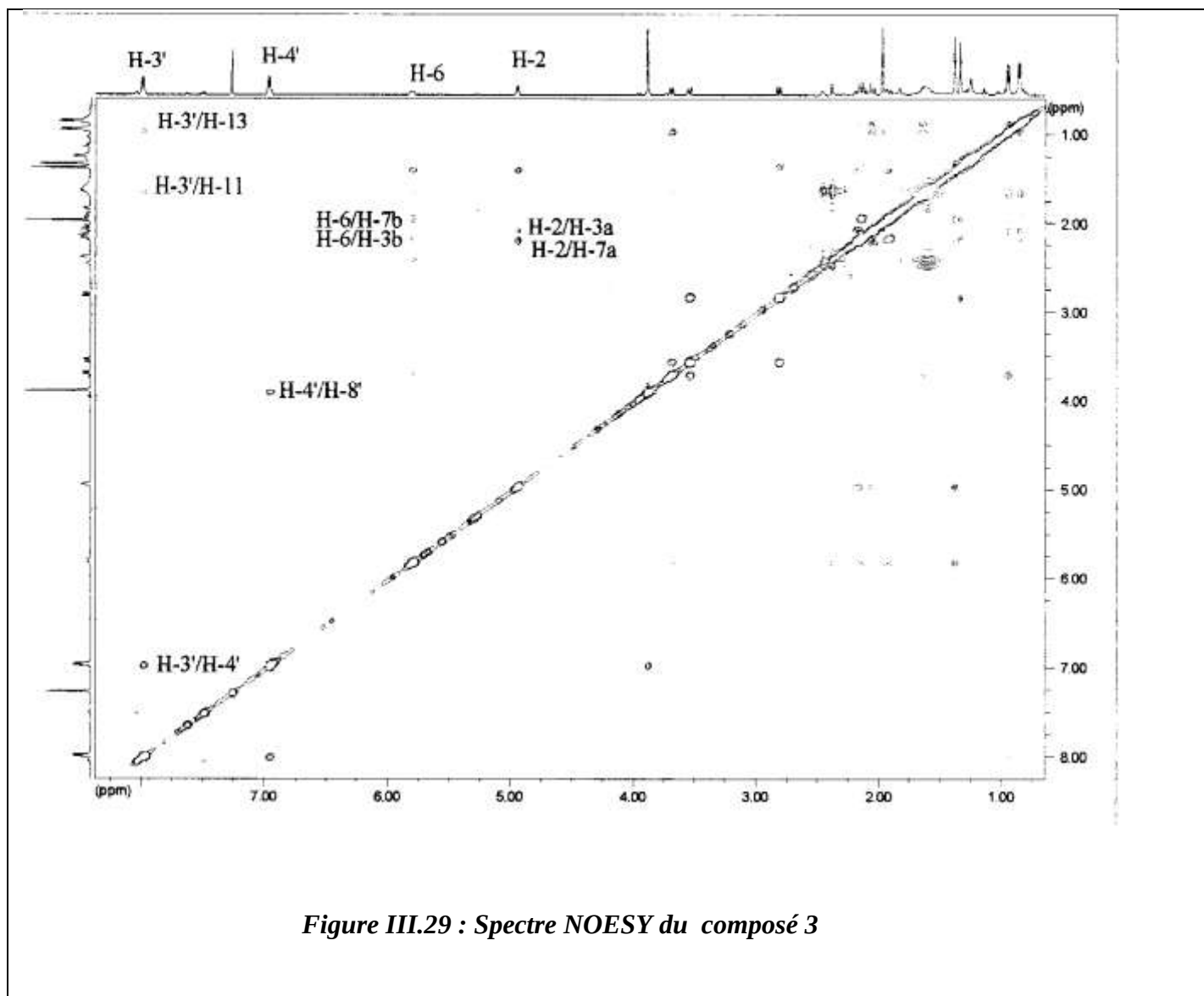
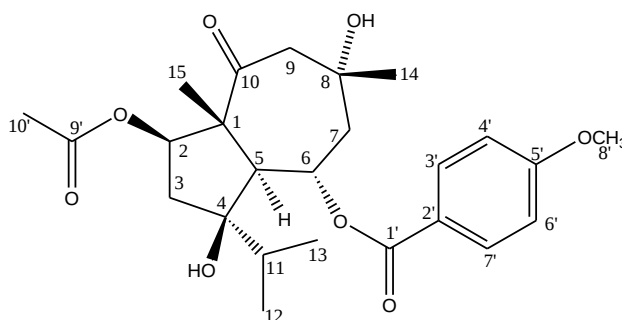


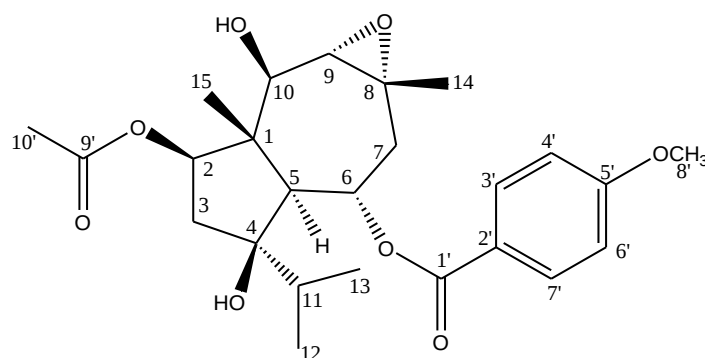
Figure III.29 : Spectre NOESY du composé 3

Tableau III.4 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations HSQC, HMBC et NOESY du composé 3 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HSQC	HMBC	NOESY
1	-	59,3	-	-
2	4,94 d (5,7)	82,4	C-9', C-14, C-5, C-4	H-3a, H-11, H-5
3 a b	2,05 m (α) 2,16 m (β)	40,6	-	-
4	-	83,6	-	-
5	3,69 d (10,1)	48,3	C-10, C-14, C-11, C-1, C-6, C-4	H-13, H-9b, H-11, H-3a, H-7b
6	5,80 m	70,6	-	H-15, H-7a, H-3b
7 a b	1,90 m (β) 2,14 m (α)	43,9	-	-
8	-	71,4	-	-
9 a b	2,82 d (12,9) (β) 3,55 d (12,9) (α)	57,8	C-10, C-15, C-8, C-1, C-7	H-14
10	-	212,2	-	-
11	1,64 m	36,4	C-4, C-3, C-14	-
12	0,86 d (6,7)	17,4	C-13, C-11, C-4	-
13	0,95 d (6,7)	18,3	C-12, C-11, C-4	-
14	1,34 s	17,5	C-7, C-9, C-8	H-7a, H-7b, H-9a
15	1,38 s	33,4	C-10, C-5, C-1, C-2	H-10', H-3b
1'	-	166,4	-	-
2'	-	121,8	-	-
3', 7'	6,96 d (8,8)	131,8	C-4', C-2'	H-5
4', 6'	7,99 d (8,8)	114,1	C-5', C-1', C-3'	H-3', H-13, H-11, H-5
5'	-	164,1	-	-
8'	3,89 s	55,6	C-5'	-
9'	-	169,4	-	-
10'	1,97 s	21,0	C-9'	-



V.1.4. Elucidation structurale du composé 4



Epoxyvesceritol (4)

Le composé **4** isolé sous forme amorphe, possède après analyse de son spectre de masse à haute résolution (CI) la formule brute $C_{25}H_{34}O_8$ ($[M+H]^+$ m/z 463,23315 (calc. 463,2332)). Les deux ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ (m/z 485,1) et $[2M+Na]^+$ (m/z 947,1) obtenus sur le spectre de masse en mode ESI positif (Figure III.30) ont permis de confirmer la formule proposée.

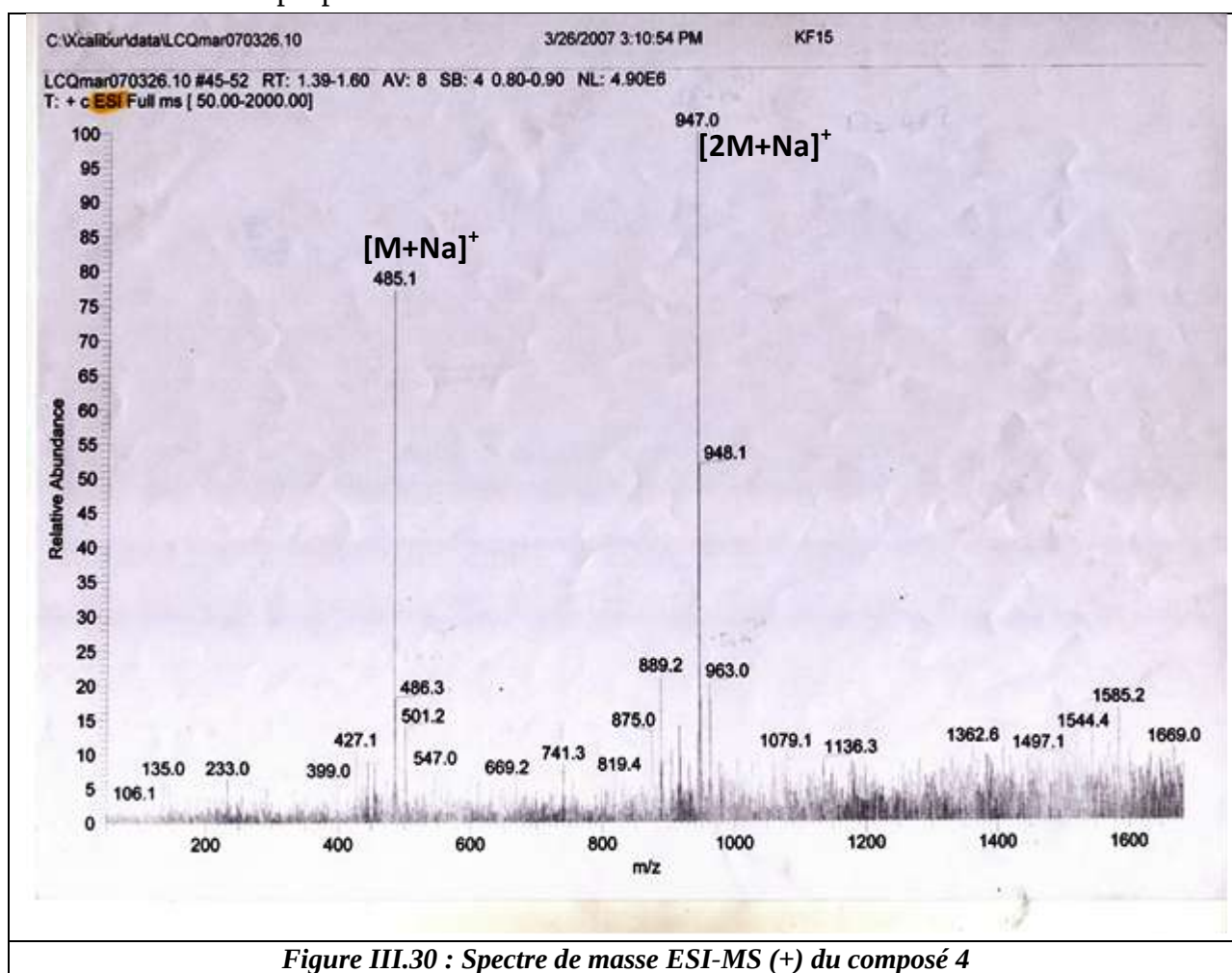


Figure III.30 : Spectre de masse ESI-MS (+) du composé 4

Son spectre UV possède un maximum à 258 nm, suggérant une substitution similaire à celle des composés précédents.

Par ailleurs, l'ensemble de ses données RMN montre clairement qu'il s'agit aussi d'un sesquiterpène de type daucane (Tableau III.5). Deux carbones carbonyliques sont relevés également pour ce composé. Leurs déplacements valent respectivement δ_C 166,1 (C-1') et 170,9 (C-9'). Cependant, par comparaison directe de son spectre RMN- 1H (Figure III.31) à ceux des composés précédents, quelques différences sont à noter. Il s'agit premièrement de la présence de deux méthines oxygénés supplémentaires [δ_H 2,88 (d, 5,0 Hz, H-9) et δ_C 66,7 (C-9), et δ_H 3,69 (d, 5,0 Hz, H-10) et δ_C 74,6 (C-10)]. Ces méthines ont été identifiés grâce aux expériences HSQC et DEPT (Tableau III.5). En second lieu, l'absence d'une fonction cétonique dans le cycle est indiquée par la disparition du signal très déblindé observé pour le composé **3** (Figure III.31).

La comparaison de nos données à celles de la littérature ont permis de mettre en évidence une fonction époxyde dans le cycle à sept sommets. La présence de la fonction époxyde est également corroborée par les données enregistrées en spectrométrie de masse qui confirme l'existence d'un cycle supplémentaire. De plus, ce genre de fonction est décrit pour plusieurs molécules de type daucanes dans le genre *Ferula* [15,16].

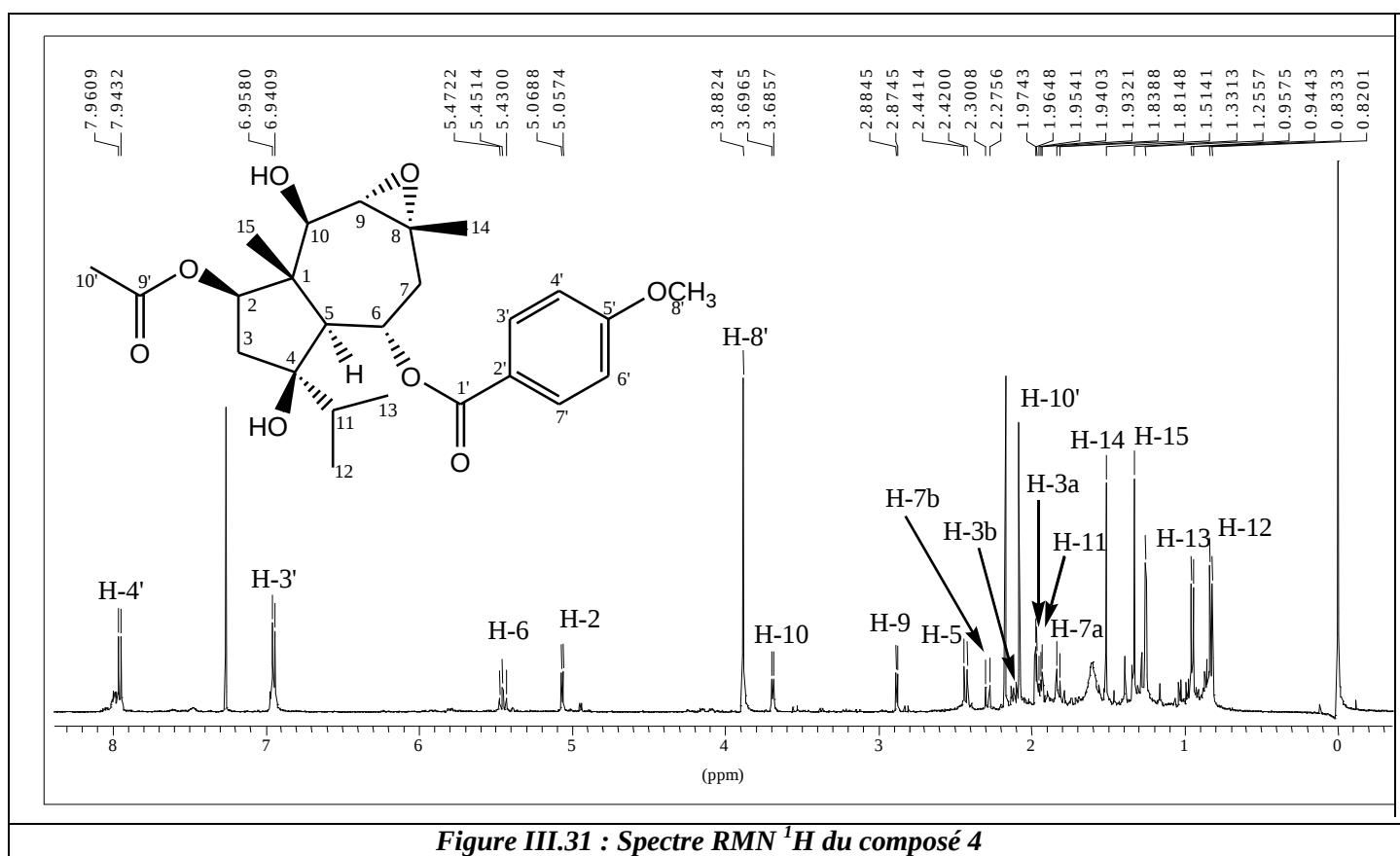


Figure III.31 : Spectre RMN 1H du composé **4**

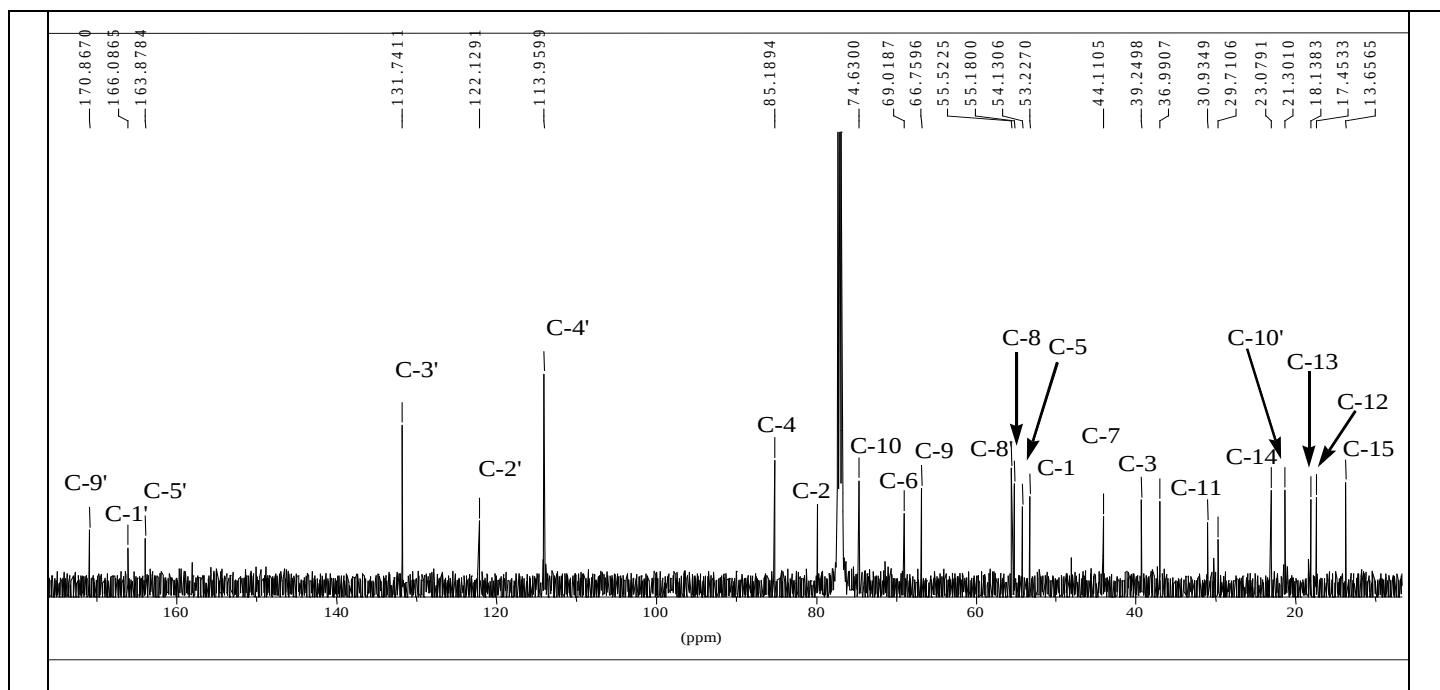


Figure III.32 : Spectre RMN ^{13}C du composé 4

Les positions des carbones carbonylés portant l'anisate (C-6) et l'acétyle (C-2) sont vérifiées grâce au spectre HMBC, notamment les corrélations des protons H-6 et H-2 illustrées par la figure III.37. Les deux méthines oxygénés ont été placés sur la base des corrélations longues distances, d'une part celle observée pour le signal des protons H-14 (δ_{H} 1,51) avec le carbone de l'oxyméthine (δ_{C} 66,7, C-9) et d'autre part, entre le signal des protons H-15 (δ_{H} 1,33) et le carbone de l'autre oxyméthine (δ_{C} 74,6, C-10) (Figure III.33).

L'expérience COSY (Tableau III.5) a permis de confirmer les positions des méthines oxygénés et par conséquent de placer le cycle époxyde en positions C-9/C-8 conformément aux données de la littérature.

L'analyse du spectre NOESY indique des corrélations spatiales notamment entre les protons H-15, H-9 et H-14 les plaçant d'un côté de la molécule et entre les protons H-10 et H-5 de l'autre côté. La stéréochimie relative des carbones C-8, C-9 et C-10 suggère une orientation- $\square$ du cycle époxyde (Figure III.34). Les données du composé **4** sont en parfait accord avec celles publiées pour des molécules analogues [17; 12]. Ce composé nouveau est nommé Epoxyvesceriténol.

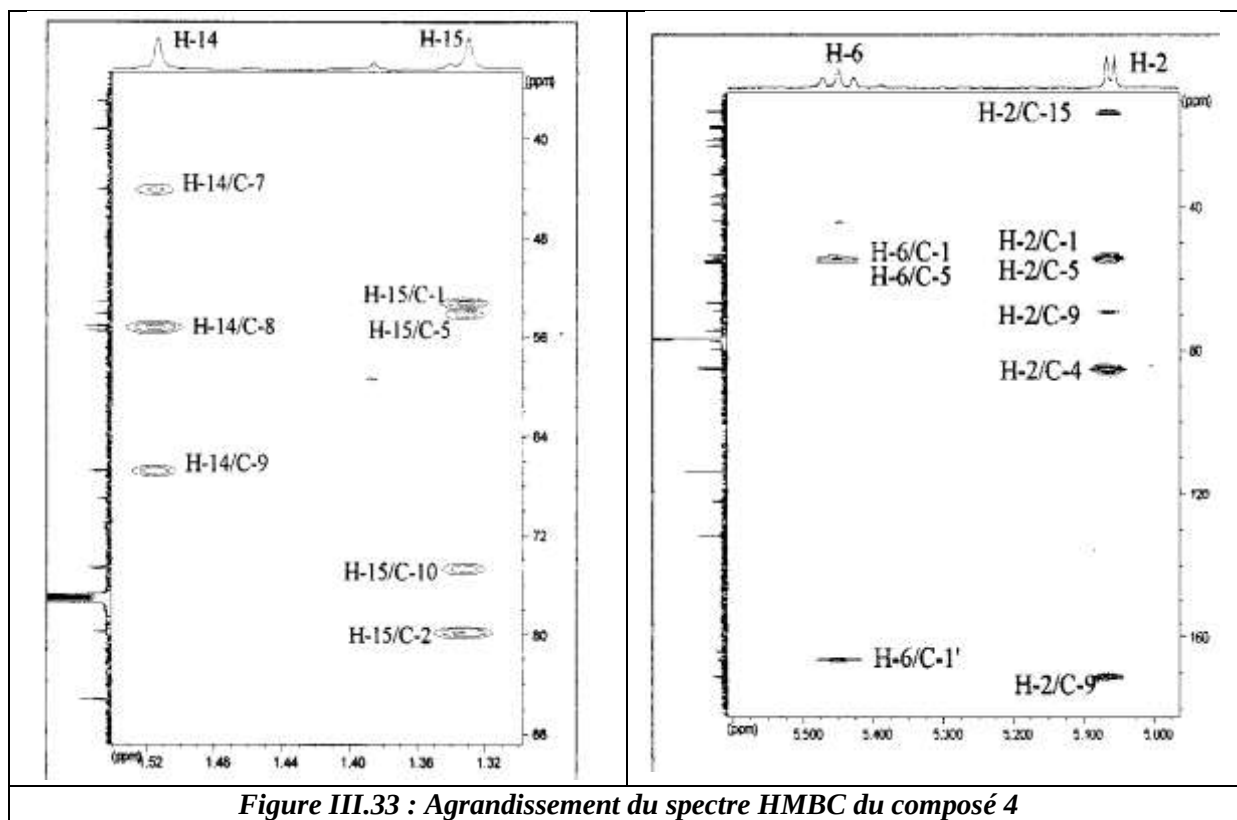


Figure III.33 : Agrandissement du spectre HMBC du composé 4

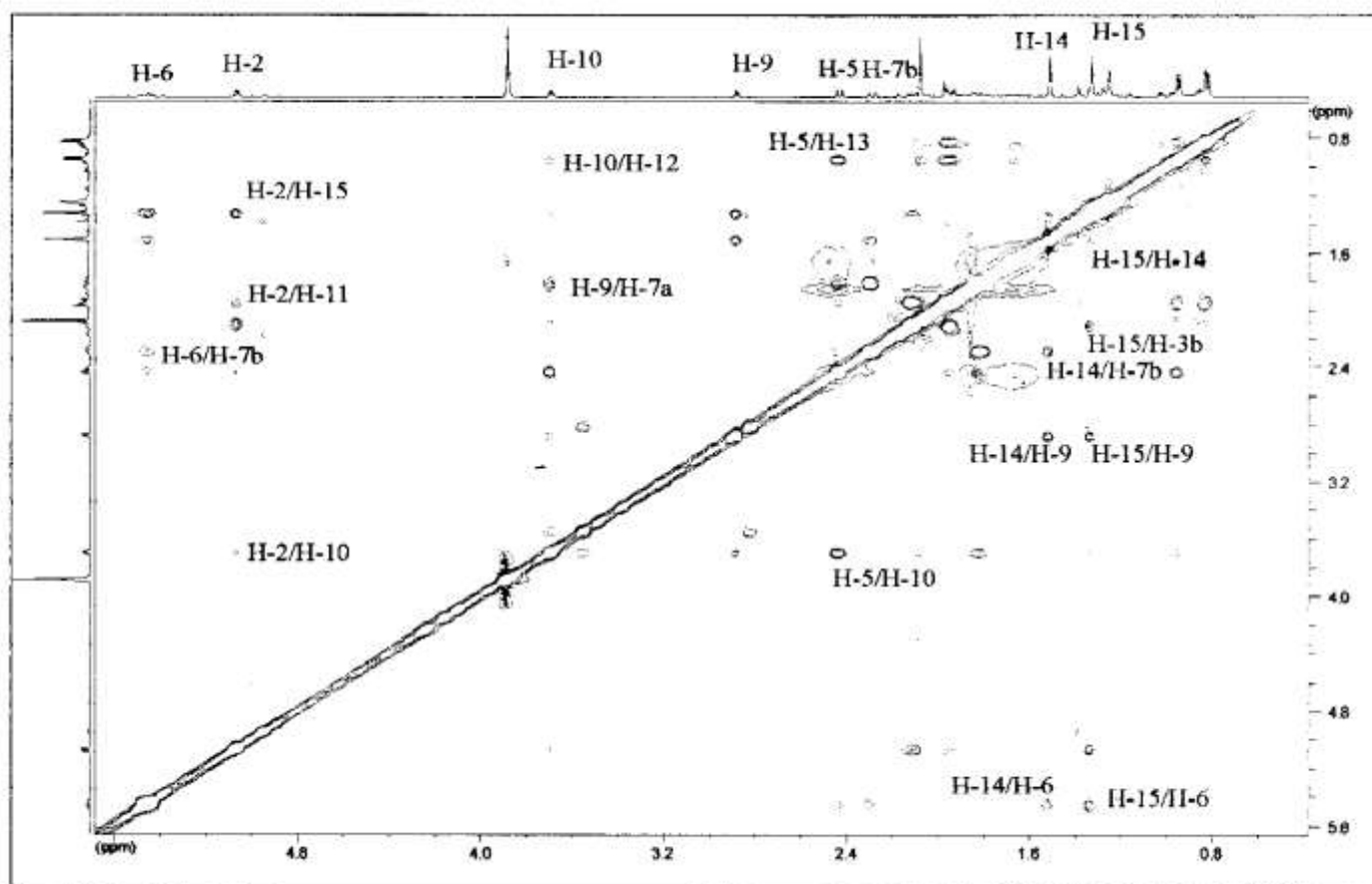
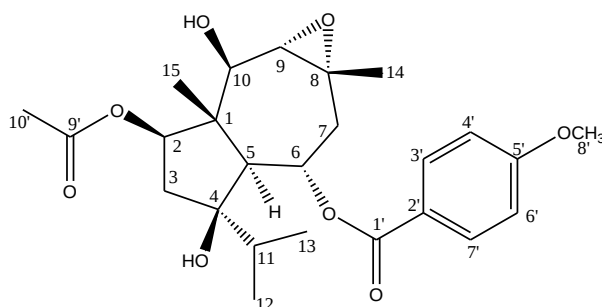


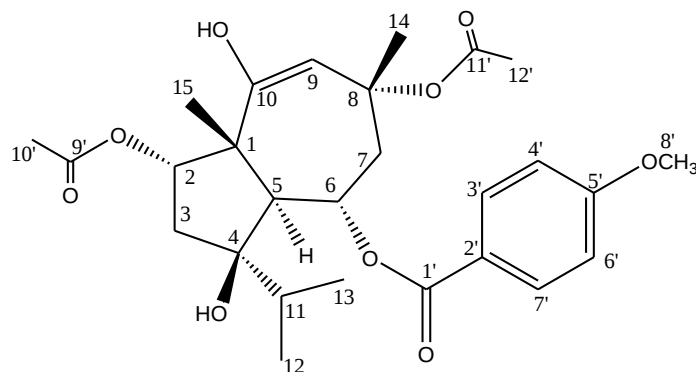
Figure III.34 : Spectre NOESY du composé 4

Tableau III.5 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et Corrélations HSQC, COSY, HMBC et NOESY du composé 4 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	COSY	HMBC	NOESY
1	-	53,2	-	-	-
2	5,06 d (5,7)	79,7	H-10'	C-1, C-9, C-5, C-15, C-10'	H-15, H-3b, H-10, H-5
3 a b	1,95 m (α) 2,09 m (β)	39,2	H-2	C-2, C-4, C-1	H-13
4	-	85,2	-	-	-
5	2,43 d (10,7)	54,1	H-6	C-1, C-6, C-4, C-15, C-7, C-10, C-11	H-13, H-7a, H-10
6	5,46 t (10,7)	69,0	H-5	C-5, C-8, C-1'	H-7b, H-5, H-14, H-15
7 a b	1,82 d (12,0) (α) 2,30 d (12,0) (β)	44,1	-	C-8, C-14, C-6, C-5 C-6, C-14, C-5, C-9	- H-14, H-7a
8	-	55,2	-	-	-
9	2,88 d (5,0)	66,7	H-10	C-8, C-14	H-15, H-14, H-10
10	3,69 d (5,0)	74,6	H-9	C-1, C-15, C-1, C-5, C-9	H-7a, H-5, H-9
11	1,97 m	36,9	H-12, H-13	C-3, C-1, C-2, C-4	H-3'
12	0,83 d (6,7)	17,4	H-13, H-11	C-13, C-11	
13	0,95 d (6,7)	18,1	H-12, H-11	C-12, C-11	H-3'
14	1,51 s	23,0	-	C-8, C-7, C-9, C-10	
15	1,33 s	13,6	-	C-1, C-5, C-10, C-2	H-14, H-3a, H-9
1'	-	166,1	-	-	-
2'	-	122,1	-	-	-
3', 7'	7,95 d (8,8)	131,7	H-4'	C-5', C-1'	H-11, H-13
4', 6'	6,95 d (8,5)	114,1	H-3'	C-2', C-5'	-
5'	-	163,8	-	-	-
8'	3,88 s	55,5	-	C-5'	-
9'	-	170,9	-	-	-
10'	2,07 s	21,3	H-2	C-9'	-

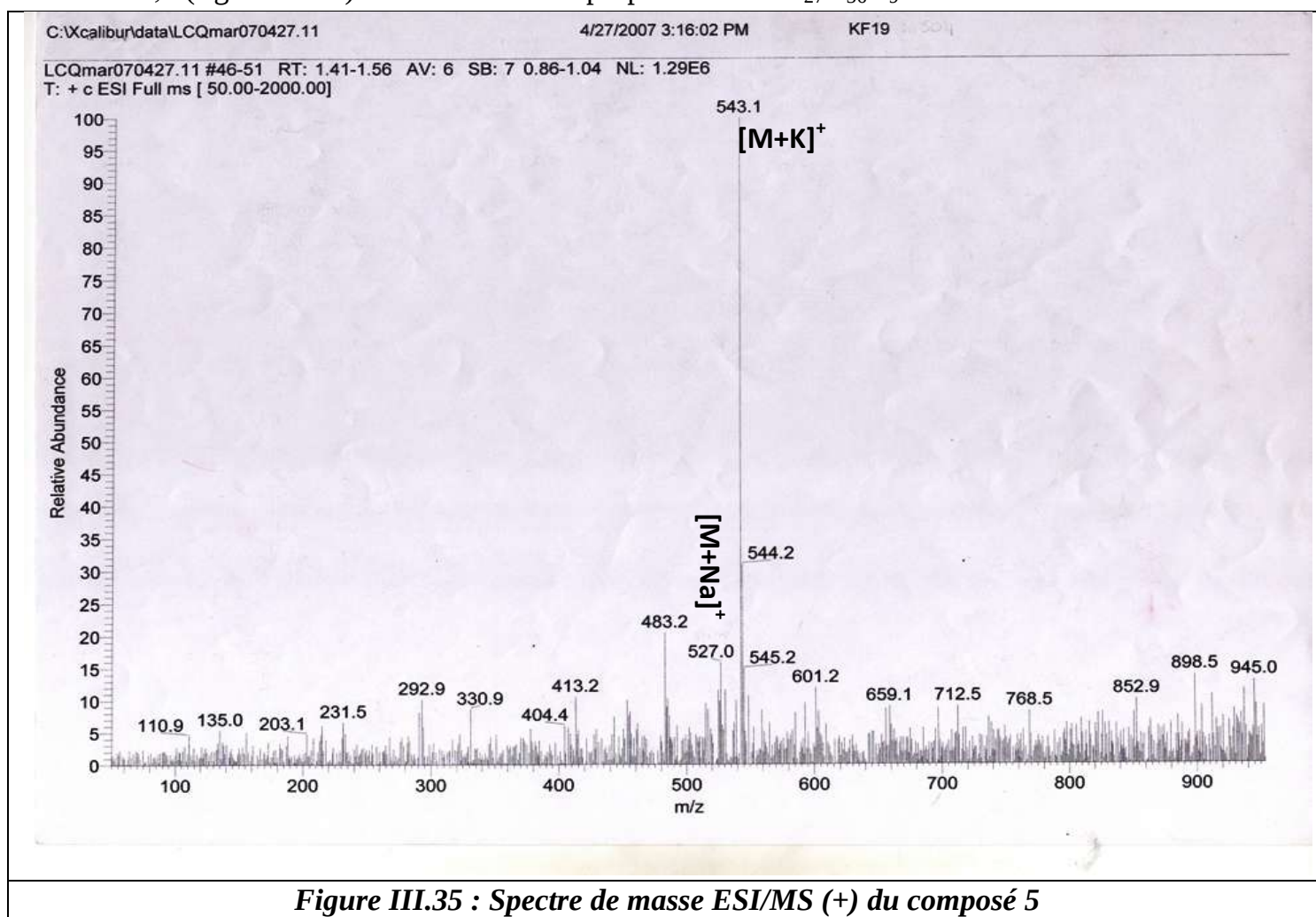


V.1.5. Elucidation structurale du composé 5



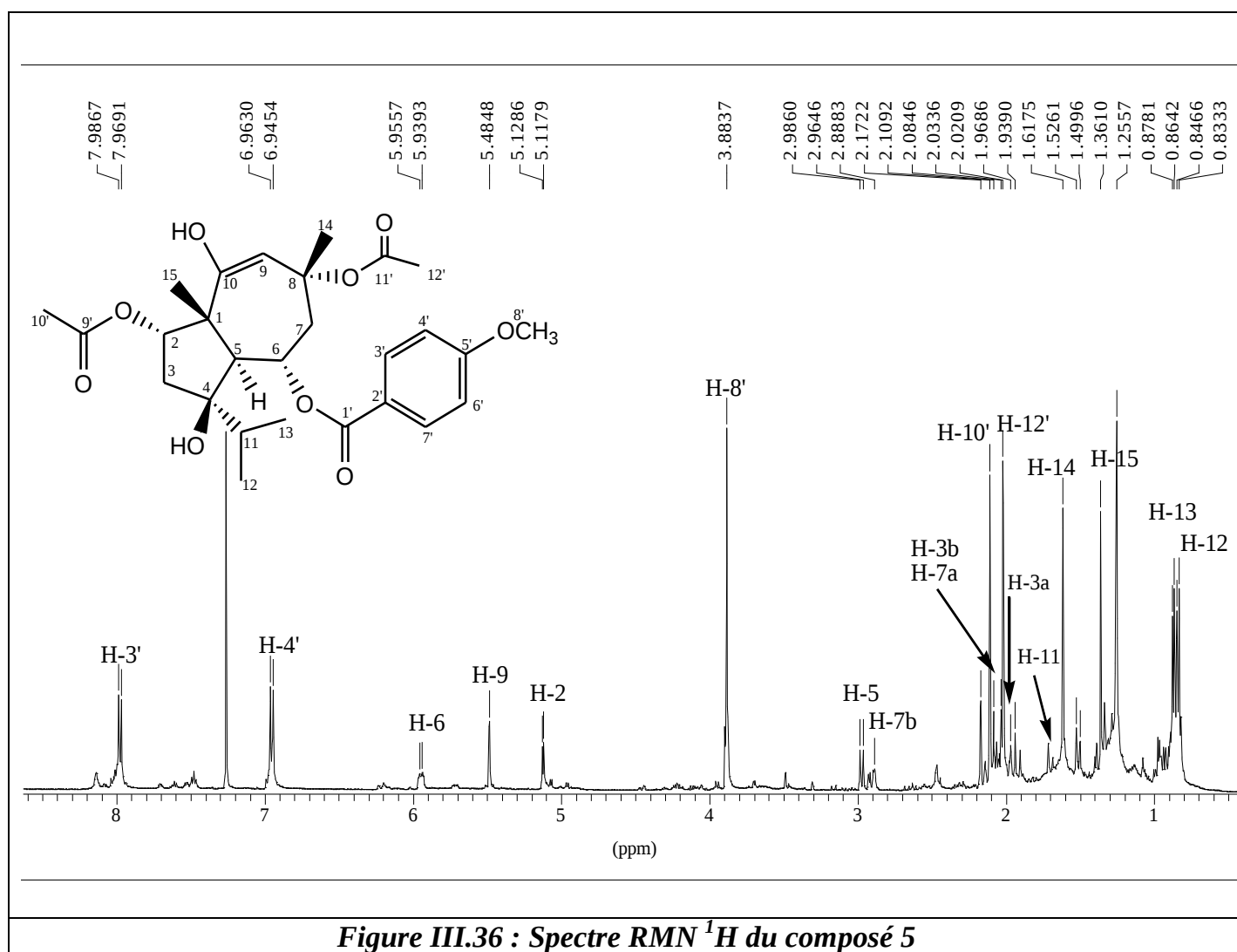
2 α , 8 α -Diacétyl-10-hydroxyféruatriol-6 α -anisate (5)

Ce composé est obtenu sous forme de poudre amorphe. Son analyse par HRESI-MS a révélé la présence d'un ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 527,22603 (calculée pour $C_{27}H_{36}O_9Na$ 527,2257) corroborant les résultats obtenus par ESI-MS (+), en l'occurrence les deux ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ à m/z 527,0 et $[M+K]^+$ à m/z 543,1 (figure III.35). La formule brute proposée est de $C_{27}H_{36}O_9$.



Les données RMN (^1H et ^{13}C) montrent que le composé **5** appartient à la même série de composés (daucanes) estérifiées également en position C-6 avec un groupement anisate (Figures 36 et 37), ce qui justifie son maximum d'absorption observé en UV à 257 nm.

La différence de masse moléculaire entre les composés **4** et **5** est de 42 unités, ce qui suggère un groupement acétyle supplémentaire pour le composé **5**. En effet, la présence de deux signaux intégrant chacun pour trois protons à δ_{H} 2,02 (3H, s, H-10') et 2,10 (3H, s, H-12') corrobore cette hypothèse. Les valeurs des déplacements des carbones observés vers les champs faibles indiquent la présence d'un carbonyle en plus, résonant à δ_{C} 169.4 ppm (C-11') ainsi qu'une insaturation dans le cycle à 7 chaînons.



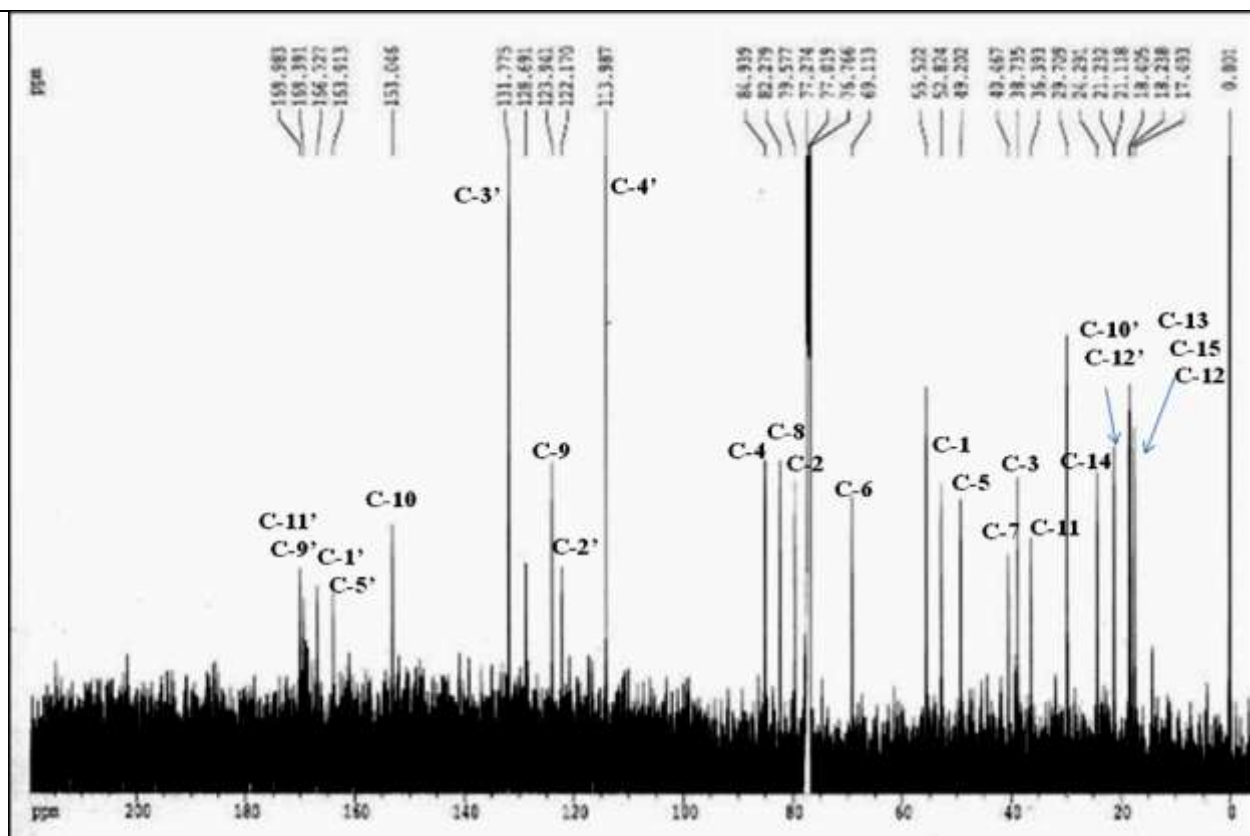


Figure III.37 : Spectre RMN ^{13}C du composé 5

Les deux expériences HSQC et DEPT nous ont permis d'attribuer les protons aux carbones correspondants. Par ailleurs, ils nous ont informés sur le nombre de chaque type de carbones. Nous avons relevé notamment deux méthylènes et quatre méthines dont deux sont oxygénés (Tableau III.6).

Les corrélations longues distances observées sur le spectre HMBC (Tableau III.6) entre les protons du méthyle H-15 (δ_{H} 1,38) avec les carbones voisins résonant à δ_{C} 49,2 (C-5), 52,8 (C-1), 79,6 (C-2) et 153,2 (C-10) révèlent que parmi les carbones oxygénés nous comptons le C-2 et le C-10.

Dans le cycle à 7 chaînons, le signal des protons du méthyle H-14 (δ_{H} 1,34) voit le signal du carbone quaternaire oxygéné (δ_{C} 82,2, C-8), celui du méthylène saturé (δ_{C} 40,6, C-7) et celui du carbone oléfinique (δ_{C} 123,9, C-9). Sur le même spectre, le signal du proton oléfinique H-9 (δ_{H} 5,48, s) corréle avec les carbones à δ_{C} 18,4 (C-15), 24,3 (C-14), 40,6 (C-7), 52,8 (C-1), 82,2 (C-8) et 153,2 (C-10), ce qui permet de localiser clairement l'insaturation suggérée dans ce cycle en C-9/C-10.

Concernant les positions des deux acétyles, elles ont été déduites grâce aux corrélations repérées entre le proton H-2 et le carbone résonant à 169,9 (C-9') pour le premier et entre le signal des protons H-12' et le carbone C-8 résonant à δ_{C} 82,2 ppm pour le deuxième acétyle (Figures III.38, III.39).

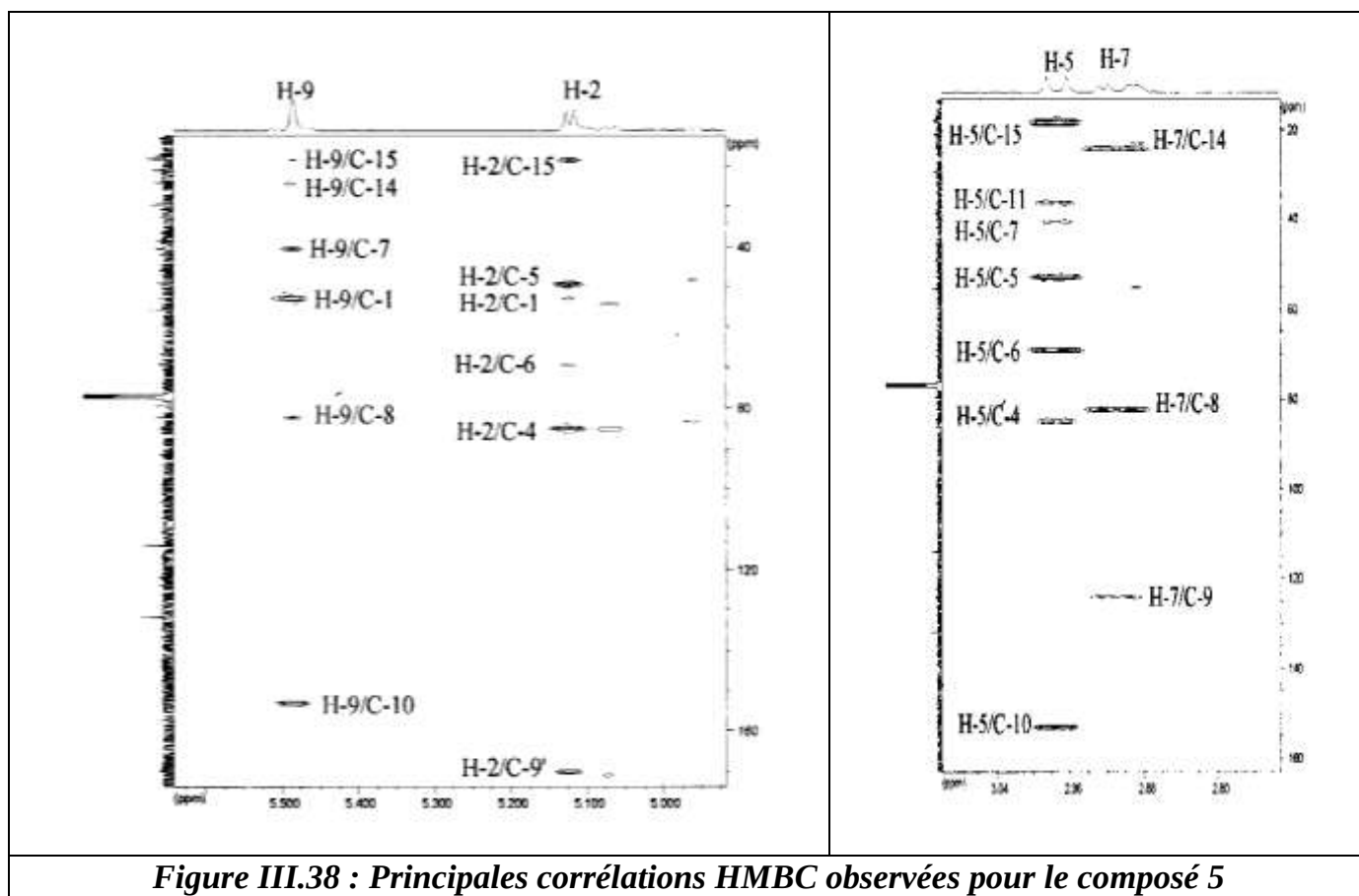


Figure III.38 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé 5

L'analyse du spectre NOESY a permis de déterminer la stéréochimie relative de ce composé en mettant en évidence les corrélations spatiales entre les protons H-2, H-3b, H-6, H-7b, 14-CH₃ et 15-CH₃ d'une part et entre les protons H-3a, H-11, H-5 et H-3' d'une autre part. La comparaison des données de ce composé à celles données dans la littérature pour le ferutriol [14] et le Kuhistanicaol G [17] nous a permis d'identifier le composé 5 au 2 α , 8 α -diacétyl-10-hydroxyferutriol-6 α -anisate.

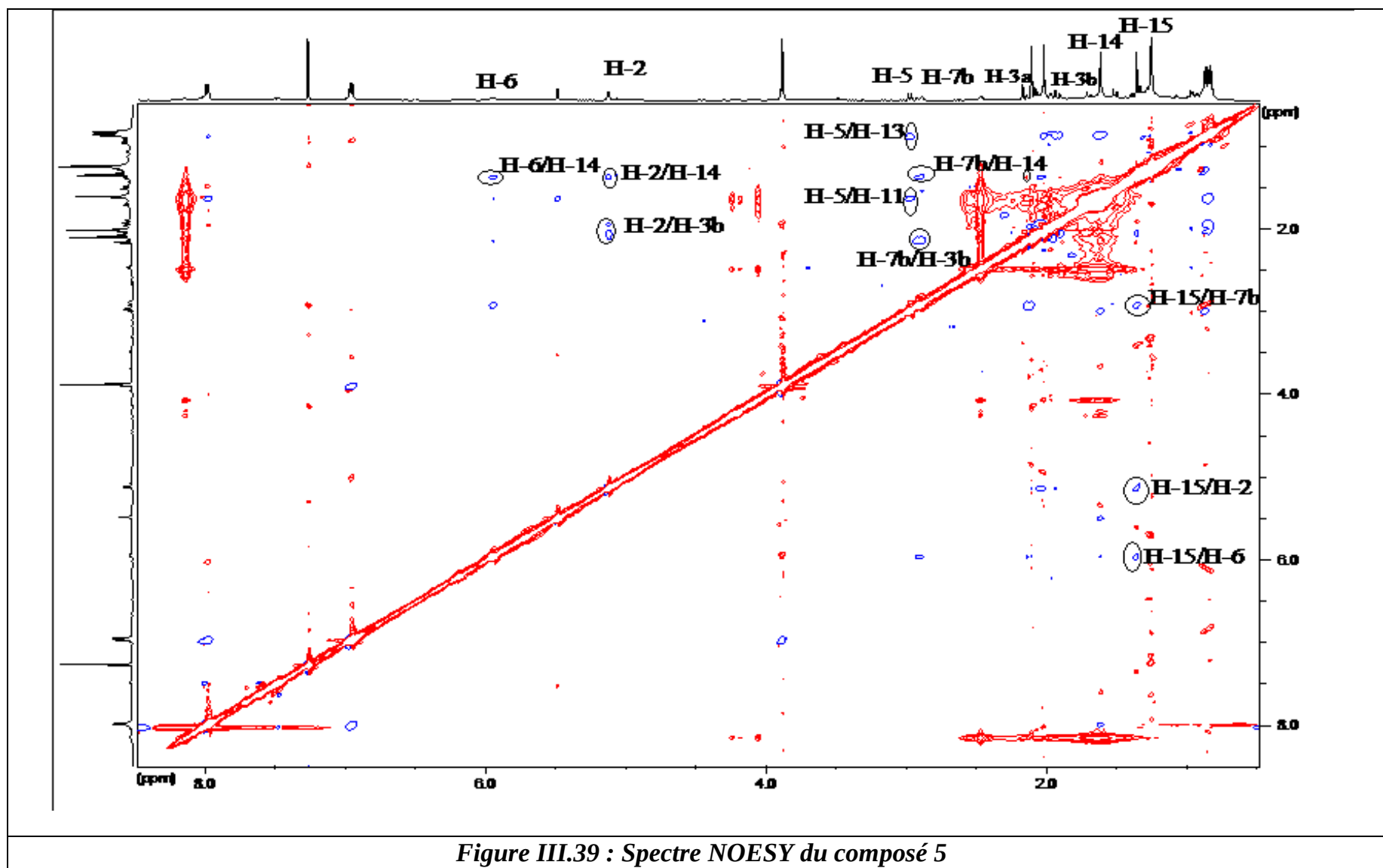
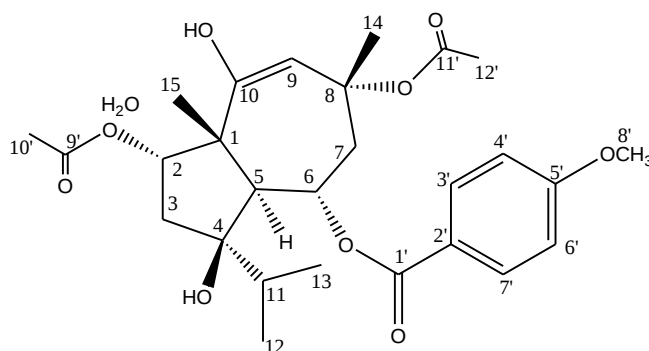


Figure III.39 : Spectre NOESY du composé 5

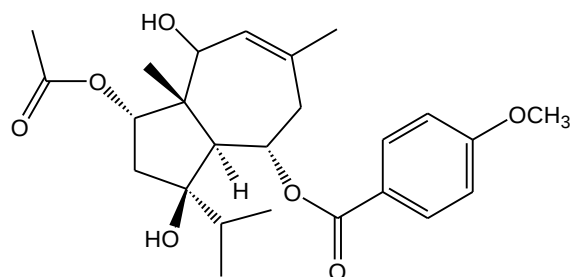
Tableau III.6 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations COSY, HSQC, HMBC et NOESY du composé 5 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	¹ H	¹³ C/HSQC	COSY	HMBC	NOESY
1	-	52,8	-	-	-
2	5,11d (5,5)	79,6	H-3a	C-1, H-15, C-5, C-6, C-4, C-11'	H-14, H-3b
3 a b	2,03 m (β) 1,92 m (α)	38,7	H-2	C-4	H-7a, H-2 H-6
4	-	84,9	-	-	-
5	2,97d(11,0)	49,2	H-6	C-6, C-4, C-7, H-15, C-10, C-11	H-13, H-11
6	5,94 m	69,1	H-5	C-1'	H-14
7 a b	2,89 m (β) 2,08 m (α)	40,5	- H-3b	-	- H-3b, H-14
8	-	82,3	-	-	-
9	5,48 s	123,9	-	C-8, C-7, C-14 C-1, C-10	-
10	-	153,2	-	-	-
11	1,62 m	36,4	H-12	C-12, C-3, C-4	H-3'
12	0,83 d (6,7)	17,5	H-11	C-13, C-11, C-4	-
13	0,97 d (6,7)	18,2	-	C-12, C-11, C-4	-
14	1,61 s	24,3	-	C-7, C-8, C-9	H-9, H-6
15	1,36 s	18,4	-	C-5, C-1, C-2, C-10	H-7b, H-2, H-6
1'	-	166,8	-	-	-
2'	-	122,2	-	-	-
3', 7'	7,97d (8,5)	131,8	H-4'	C-5', C-1'	-
4', 6'	6,95 d (8,5)	113,9	H-3'	C-2', C-5'	-
5'	-	164,2	-	-	-
8'	3,88 s	55,5	-	C-5'	-
9'	-	169,9	-	-	-
10'	2,02 s	21,2	-	C-11', C-2	-
11'	-	169,9	-	-	-
12'	2,10 s	22,1	-	C-8	-

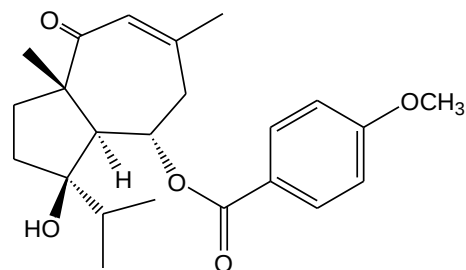


V.2. Produits connus

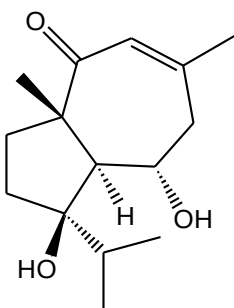
Les différentes étapes de fractionnement et de purification entreprises sur l'extrait DCM des parties aériennes de *Ferula vesceritensis* ont également permis d'isoler quatre sesquiterpènes de type daucane ainsi que trois sesquiterpènes coumariniques (Figure III. 40) précédemment isolés dans genre *Ferula* pour la plupart.



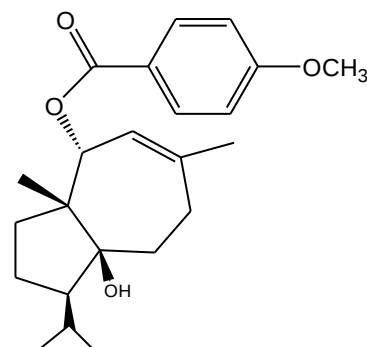
2 α -Acétyl-10 β -hydroxyjaescheanadiol-6 α -anisate (6)



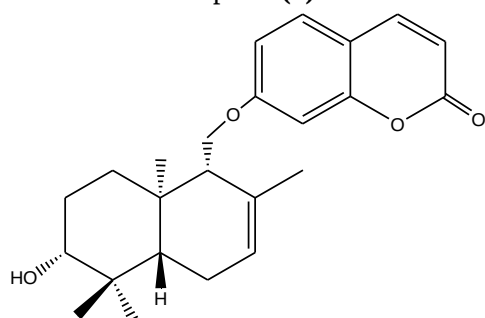
Lapidol-6 α -anisate (7)



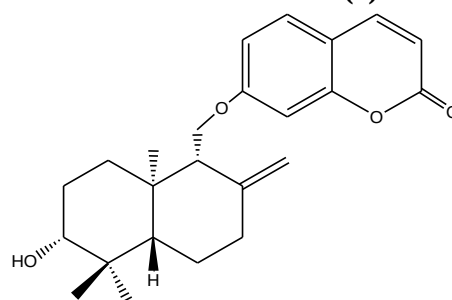
Lapidol (8)



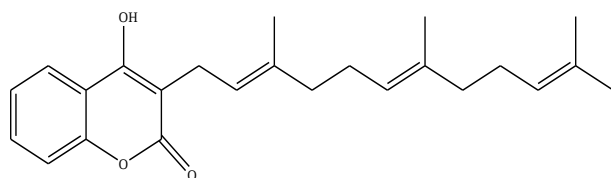
Lasidiol-10 α -anisate (9)



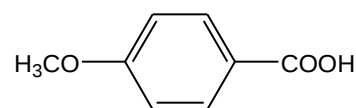
Féselol (10)



Coladonine (11)



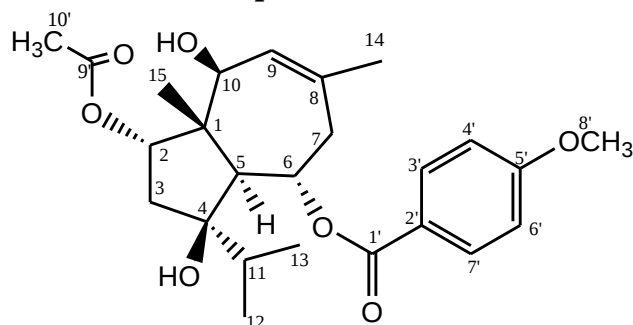
Féruénol (12)



Acide anisique (13)

Figure III. 40 : Structure des composés connus (de 6 à 13) isolés à partir de l'extrait DCM de l'espèce *F. vesceritensis*

V.2.1. Elucidation structurale du composé 6



2 α -Acétyl-10 β -hydroxyjaesceanadiol-6 α -anisate

Nous notons en premier lieu que ce composé représente le constituant majoritaire de cet extrait.

Le spectre UV de ce composé montre un maxima d'absorption à 256 nm, attestant de la substitution par un noyau aromatique, comme pour la majorité des composés décrits précédemment.

Par ailleurs on notera que ses spectres RMN ^1H et ^{13}C (Figures III.41 et III.42) sont semblables à ceux des composés nouveaux décrits précédemment (V.1.), ce qui indique qu'il s'agit encore d'un daucane. Les signaux qui apparaissent dans la zone des protons aromatiques mettent en évidence son estérification par un groupement anisate en position C-6. Cette dernière est d'ailleurs la position la plus fréquemment estérifiée dans ce type de molécules [10].

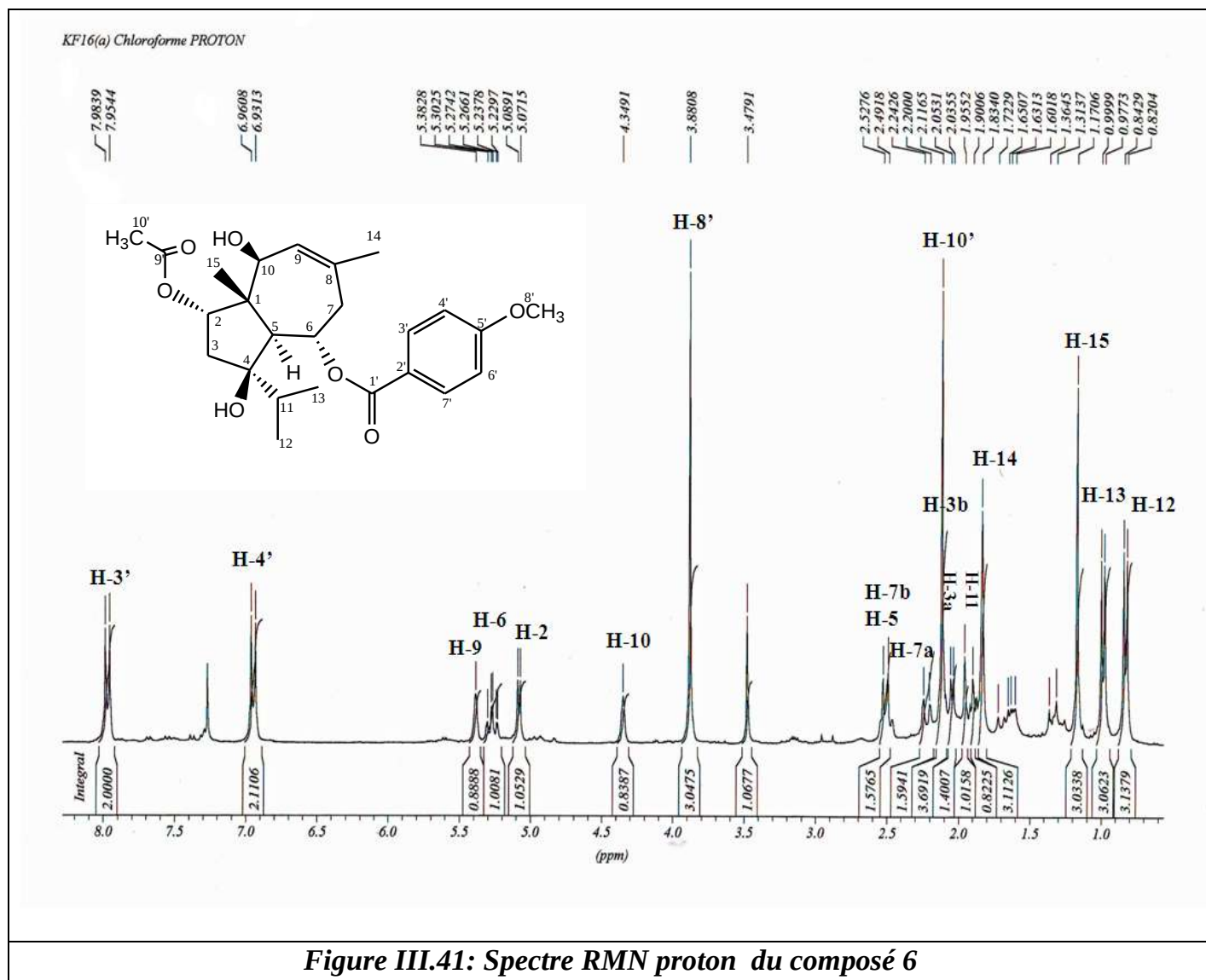


Figure III.41: Spectre RMN proton du composé 6

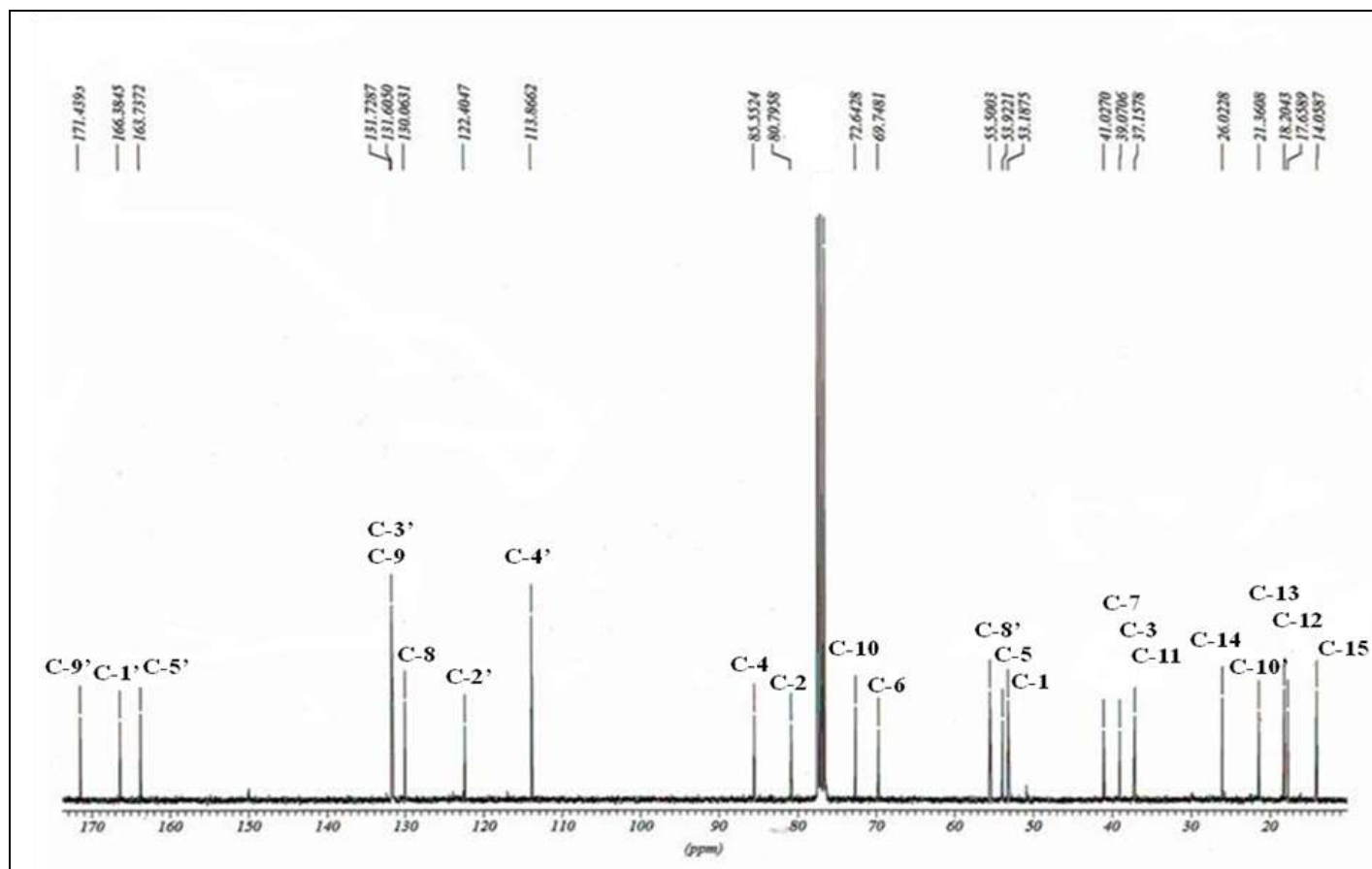


Figure III.42: Spectre RMN carbone du composé 6

L'expérience HMQC (Tableau III.7) a permis l'identification de deux méthylènes [δ_H 2,50 (1H, d), 2,22 (1H, d) et δ_C 41,0] et [δ_H 2,07 (1H, d), 1,93 (1H, d) et δ_C 39,1] et de cinq carbones oxygénés ; parmi eux le carbone du méthoxyle de la partie anisate à δ_C 55,3 (C-10'). Concernant les quatre restants, le carbone quaternaire oxygéné à δ_C 85,6 est attribué au C-4, alors que les trois autres sont des méthines oxygénés, identifiés comme suit : (δ_H 5,08, H-2 et δ_C 80,8, C-2), (δ_H 5,27, H-6 et δ_C 69,7, C-6) et (δ_H 4,35, H-10 et δ_C 72,6, C-10).

Le signal du proton résonnant à δ_H 5,38 ppm (H-9) suggère que celui-ci est un proton oléfinique, d'autant plus que le spectre HSQC montre qu'il est lié au carbone déblindé δ_C 131,6 (C-9).

Les données obtenues jusqu'ici sont en parfait accord avec celles données pour le composé nommé jaeschkeanadiol, structure de base de plusieurs daucanes isolés précédemment de plusieurs espèces du genre *Ferula* entre autres les racines de *F. vesceritensis*. De plus, les travaux antérieurs sur ce genre ont montré que cette molécule peut être diversement estérifiée notamment sur les positions C-6 α , C-10 α et C-2 α [18 ; 6].

A côté de l'estérification par le groupement anisate, une acétylation est également constatée. La corrélation hétéronucléaire courte distance entre le signal intégrant pour trois protons à δ_H 2,10 (H-10') et le carbone carbonyle résonant à δ_C 171,5 (C-9') confirme cette constatation.

Par ailleurs, l'analyse du spectre HMBC a permis de placer l'acétyle en position C-2, grâce aux corrélations observées entre le signal du proton H-2 (δ_H 5,08) et ceux des carbones dont les déplacements δ_C sont respectivement 14,1 (C-15), 85,6 (C-4), 171,5 (C-9') et 53,9 (C-5) (Figure III.43).

L'analyse du spectre des corrélations spatiales homonucléaires 1H - 1H (NOESY) (Figure III.44) a permis de déterminer la configuration relative de ce composé. Les corrélations observées entre le signal du méthyle H-15 et ceux des protons H-2, H-3b, H-7b, H-6 et H-10 indiquent leur orientation en α . Celles observées entre les protons H-13, H-5 et H-7a témoignent de leur orientation en β .

Les données de spectrométrie de masse en mode ESI (+) (Figure 45) obtenues pour ce composé à l'issue de l'analyse par LC/MS de l'extrait DCM révèle le pic de l'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 469,2 et celui du pic à m/z 429,2 correspondant à $[M+H-H_2O]^+$. Ce spectre de masse présente également les fragments à m/z 411,2, 371,2 et 217,0 correspondant respectivement aux ions $[M+H-2H_2O]^+$, $[M-\text{acide acétique-Me}]^+$ et $[M+H-H_2O-\text{acide anisique-acide acétique}]^+$.

L'ensemble des informations spectrales obtenues pour ce composé l'identifie au 2 α -acétyl-6 α -anisoyl-10 β -hydroxyjaescheanadiol caractérisé dans l'espèce *F.communis* [10].

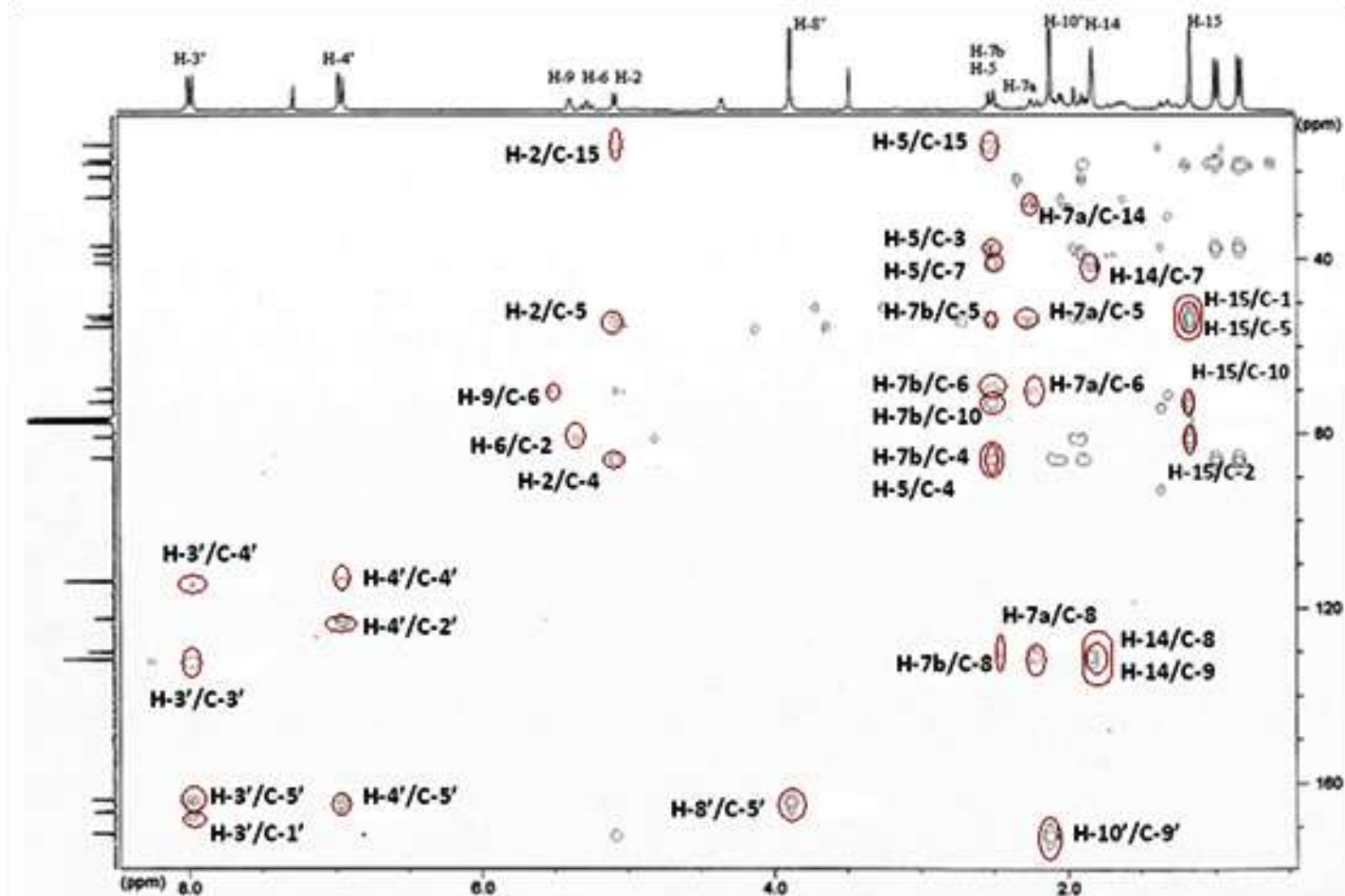


Figure III.43 : Spectre HMBC du composé 6

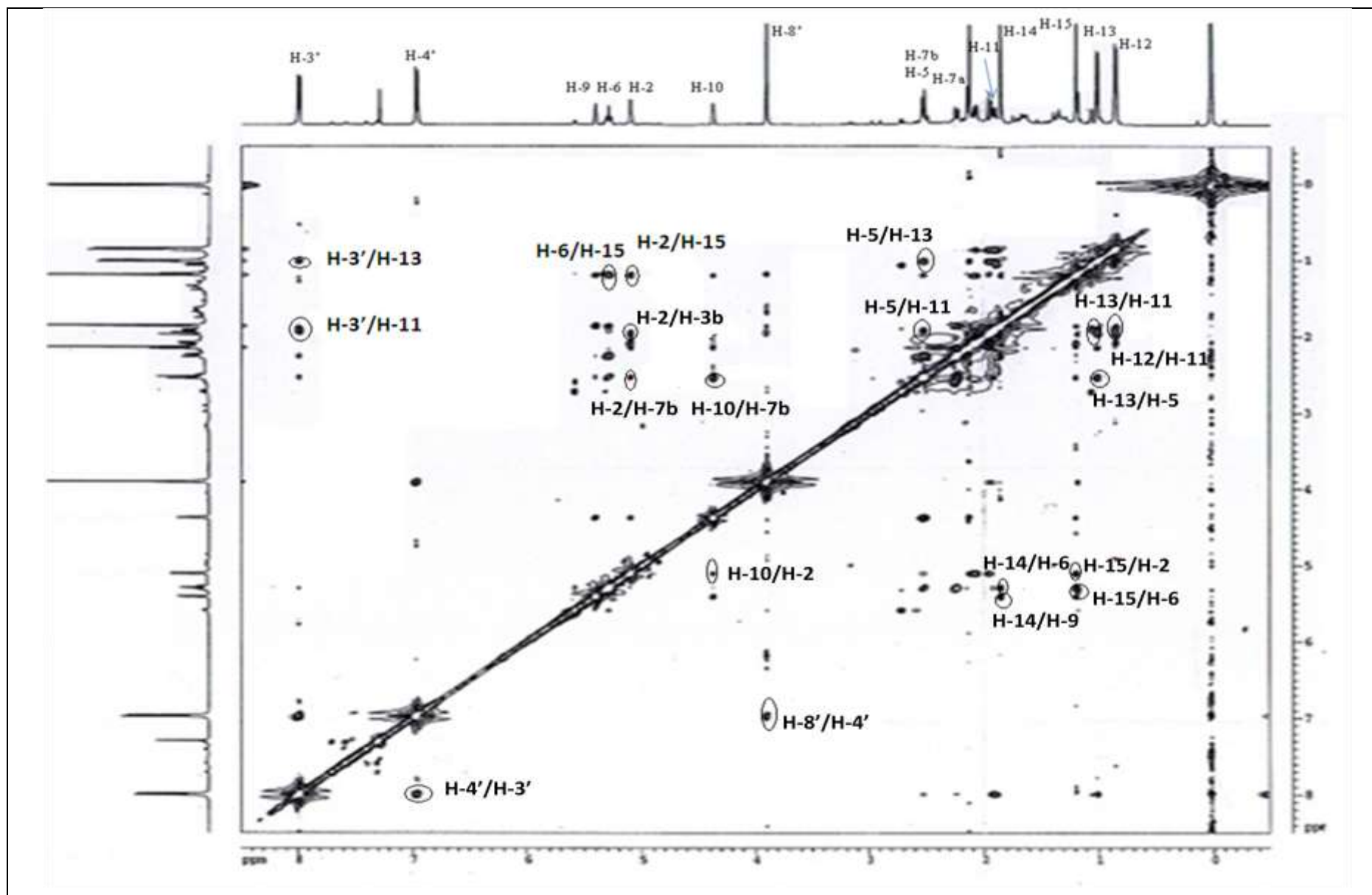


Figure III.44 : Spectre NOESY du composé 6

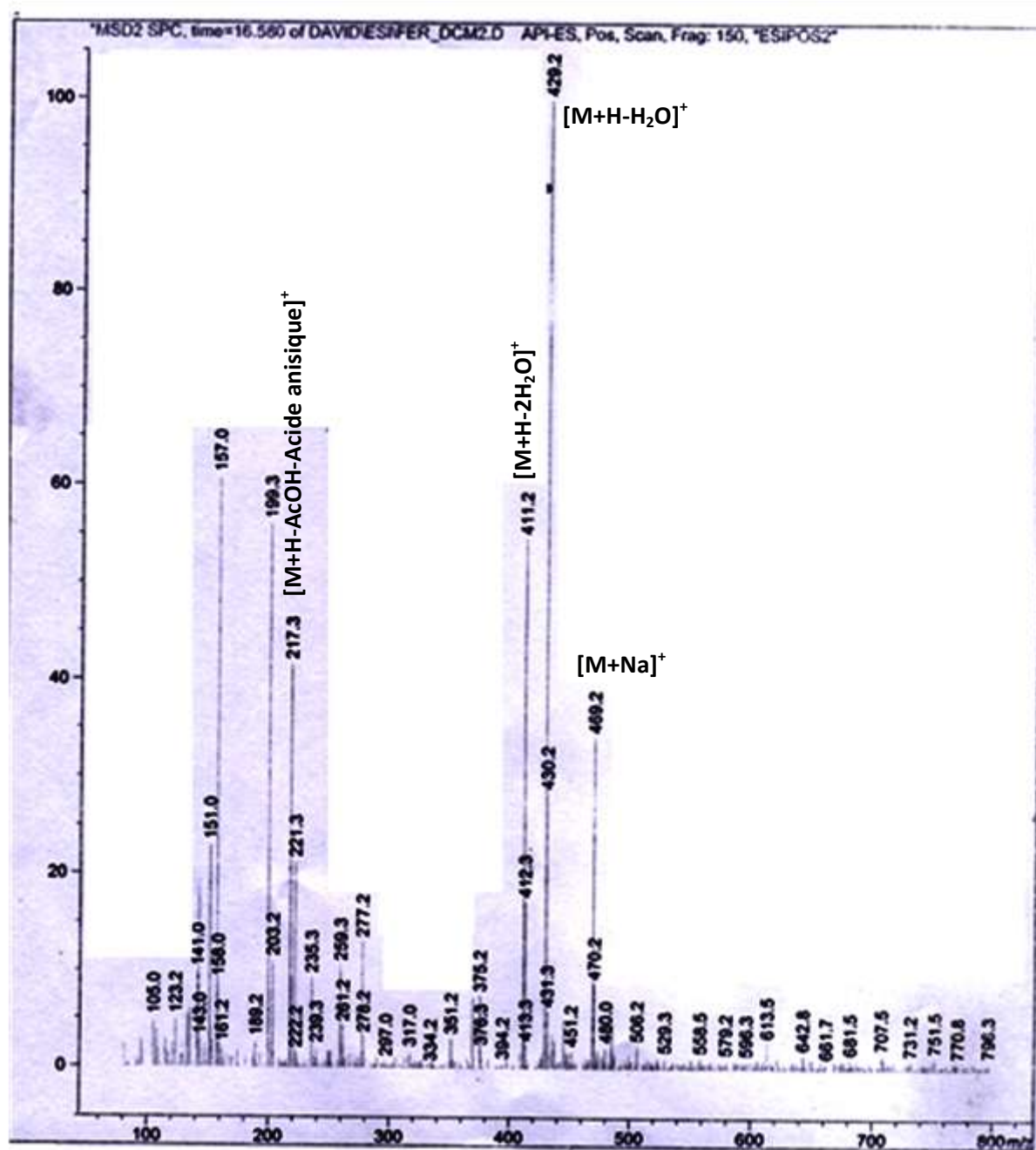
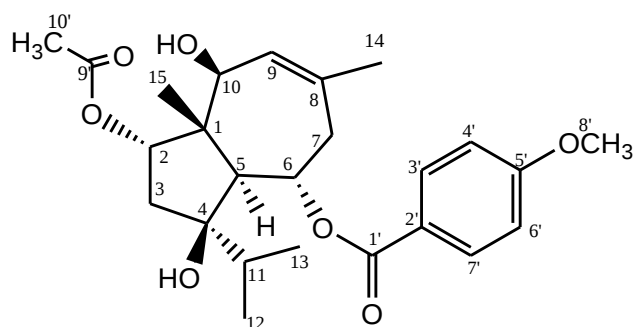


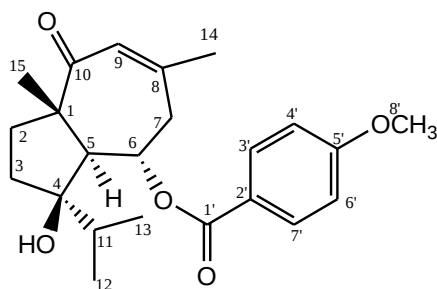
Figure III.45 : Spectre de masse ESI-MS (+) du composé 6

Tableau III.7 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations HSQC, HMBC et NOESY du composé 6 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HMQC	HMBC	NOESY
1	-	53.2	-	-
2	5.08 d (5.2)	80.8	C-15, C-4, C-9', C-5	H-10, H-15, H-3b, H-7b
3 a b	1.93 m (α) 2.07 m (β)	39.1	C-11, C-4	H-12 H-2
4	-	85.6	-	-
5	2.52 d (10.7)	53.9	C-8, C-15, C-7, C-1, C-6, C-4	H-13, H-7a
6	5.27 td (2.5, 9.5, 10.7)	69.7	C-2	H-7b, H-15
7 a b	2.22 m (α) 2.50 m (β)	41.0	C-14, C-5, C-6, C-8 C-1, C-6, C-4, C-9	H-5 H-15, H-10
8	-	130.1	-	-
9	5.38 s	131.6	C-6	H-15, H-10', H-10
10	4.35 s	72.6	-	H-15, H-7b, H-2
11	1.89 m	37.2	-	H-13, H-12
12	0.83 d (7.0)	17.7	C-13, C-11, C-4	H-11
13	0.99 d (7.0)	18.2	C-12, C-11, C-4	H-11
14	1.83 s	26.0	C-8, C-7, C-9	H-6, H-9
15	1.16 s	14.1	C-1, C-10, C-2, C-5	H-2, H-6, H-10
1'	-	166.4	-	-
2'	-	122.4	-	-
3', 7'	7.97 d (8.8)	131.7	C-3', C-5', C-1', C-4'	H-4', H-11
4', 6'	6.94 d (8.8)	113.9	C-4', C-2', C-5'	H-3', H-8'
5'	-	163.7	-	-
8'	3.88 s	55.3	C-5'	H-4'
9'	-	171.4	-	-
10'	2.10 s	21.4	C-9'	H-2, H-10, H-15



V.2.2. Elucidation structurale du composé 7



Lapidol-6 α -anisate

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre amorphe de pureté moyenne. A première vue de ses spectres RMN proton et carbone (Figures III.46 et III.47) il appartient à la même série de composés précédents d'une part. D'autre part la présence d'un groupement anisate est mise en évidence.

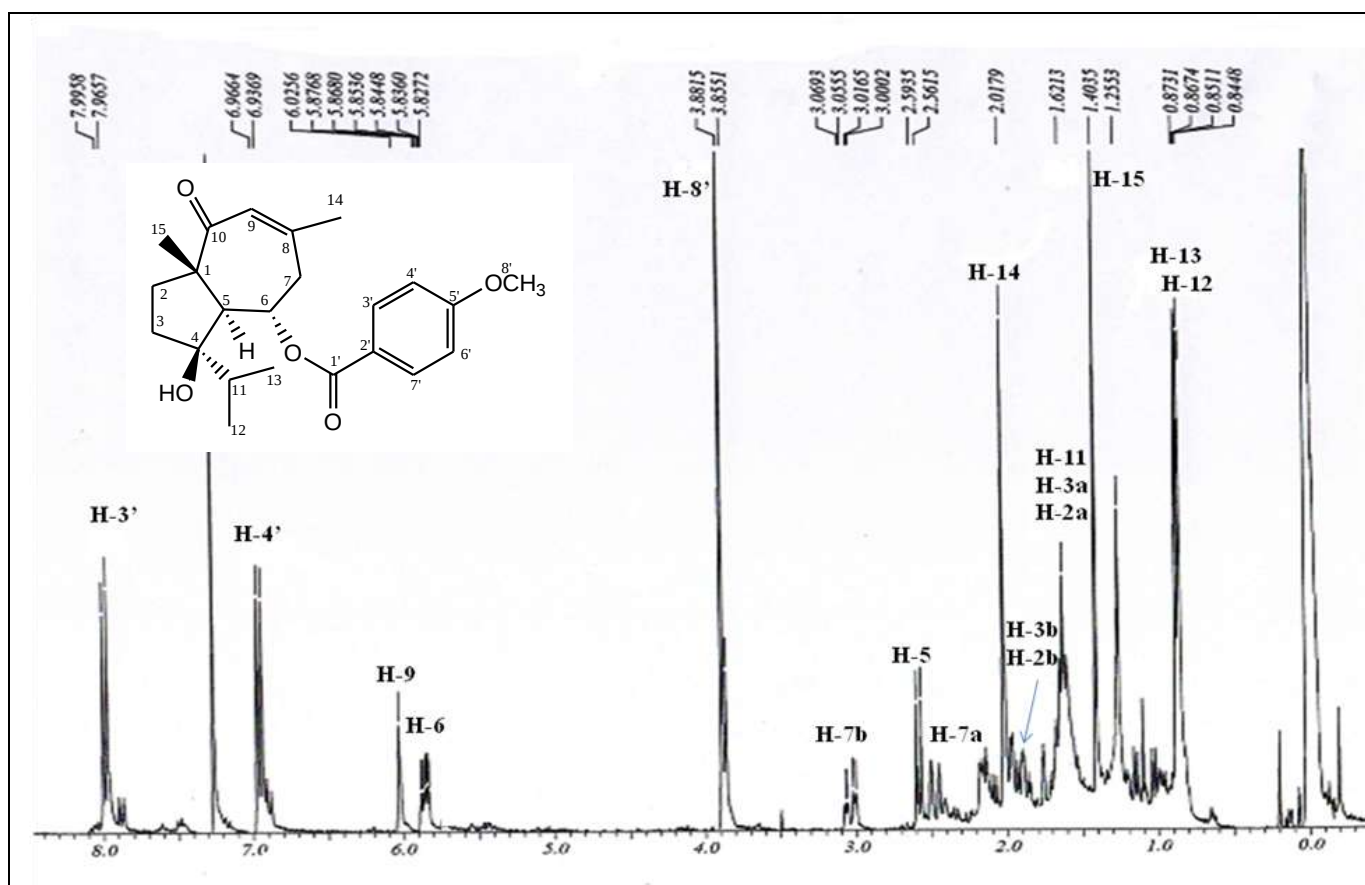


Figure III.46: Spectre RMN proton du composé 7

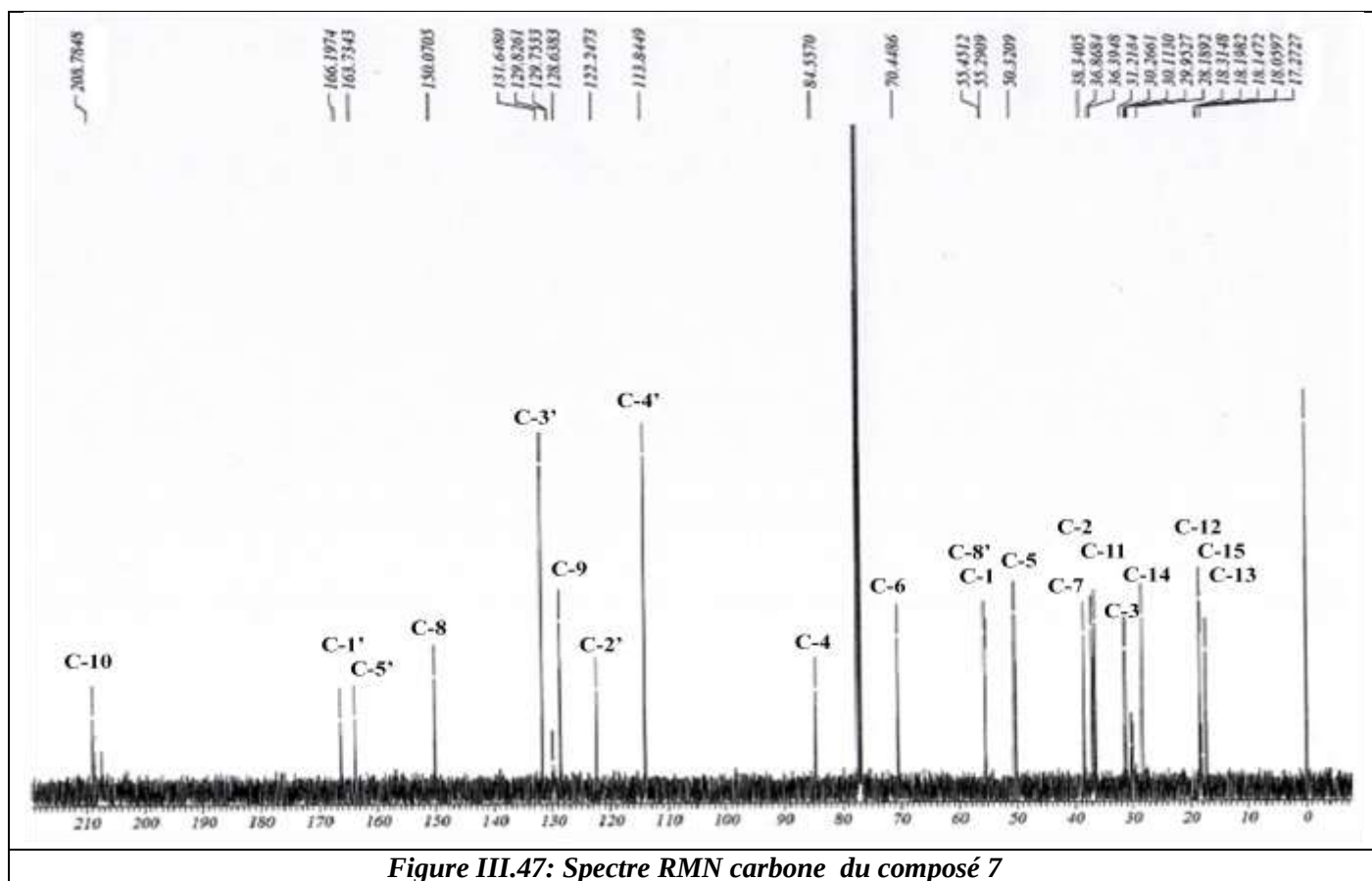


Figure III.47: Spectre RMN carbone du composé 7

A la différence du composé précédent, un signal de carbone très déblindé résonant à δ_C 208,8 (C-10) est apparu, ce qui laisse penser à la présence d'un carbonyle sur l'un des deux cycles.

Sur le spectre DEPT on distingue trois méthylènes (Tableau III.8) et quatre méthines dont deux sont oxygénés. En soustrayant ceux de l'anisate, il nous restera celui à δ_C 128,6 (C-9) lequel est forcément oléfinique. Il montre d'ailleurs une corrélation avec le proton déblindé H-9 (δ_H 6,02) sur le spectre HSQC.

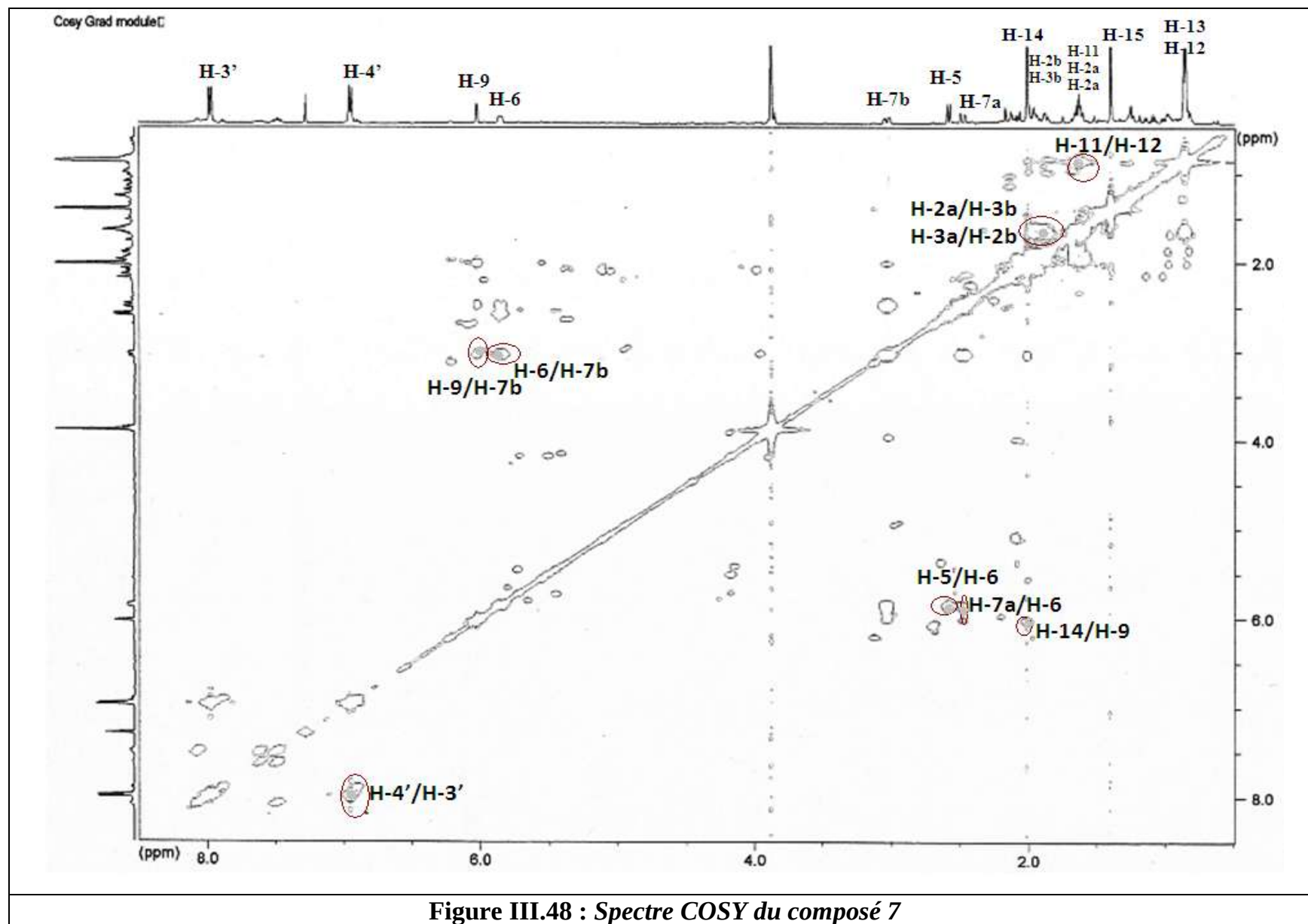
Les corrélations observées sur ce dernier spectre ont permis d'attribuer les protons aux carbones qui les portent (Tableau III.8). L'analyse du spectre COSY a montré que les deux méthylènes [δ_H 1,63 (H-2 α), 1,88 (H-2 β) et δ_C 36,8] et [δ_H 1,97 (H-3 α), 1,64 (H-3 β) et δ_C 31,2] étaient adjacents, alors que le troisième [δ_H 2,48 (H-7 α), 3,03 (H-7 β) et δ_C 36,8] était isolé. Les signaux de ce dernier corrélant avec les protons déblindés H-9 (δ_H 6,02) et H-6 (δ_H 5,84) le placent dans le voisinage d'un méthine oxygéné et d'une double liaison (Figures III.48).

Par ailleurs, les corrélations hétéronucléaires longues distances 1H - ^{13}C indiquent que les protons du méthyle H-15 (δ_H 1,40) corrélaient avec les carbones à δ_C 36,8 (C-2), 50,3 (C-5), 55,3 (C-1) et 208,8 (C-10), ainsi nous avons pu placer le carbonyle.

Concernant les protons du méthyle H-14 (δ_H 2,01), ils montrent à leur tour des corrélations avec les carbones résonant aux valeurs de δ_C 38,3 (C-7), 70,4 (C-6), 128,6 (C-9), 150,0 (C-8) et 208,8 (C-10). Sur la base de ces corrélations nous pouvons localiser la double liaison entre les carbones C-8 et C-9. Les informations précédentes ont été confirmées par les corrélations des protons H-7a (δ_H 2,48), H-5 (δ_H 2,58) et H-7b (δ_H 3,03) illustrées par la Figure III.49. Les données spectrales obtenues à ce stade sont conformes à celles obtenues pour le lapidol-6 α -anisate isolé à partir des espèces *F.linki* et *F. communis* [19 ; 20].

Nous avons tout de même entrepris une expérience NOESY pour confirmer sa configuration relative. Les corrélations spatiales observées ont mis en évidence la conservation de l'orientation classique dans ce type de molécules, notamment l'orientation α pour les groupements anisate et isopropyle (Tableau III.8).

Le spectre de masse en mode ESI (+) enregistré pour ce composé a montré deux ions pseudomoléculaires $[M+Na]^+$ et $[2M+Na]^+$ observés respectivement aux valeurs de m/z 409,1 et 795,1 (Figure III.50) corroborant l'identification de ce composé.



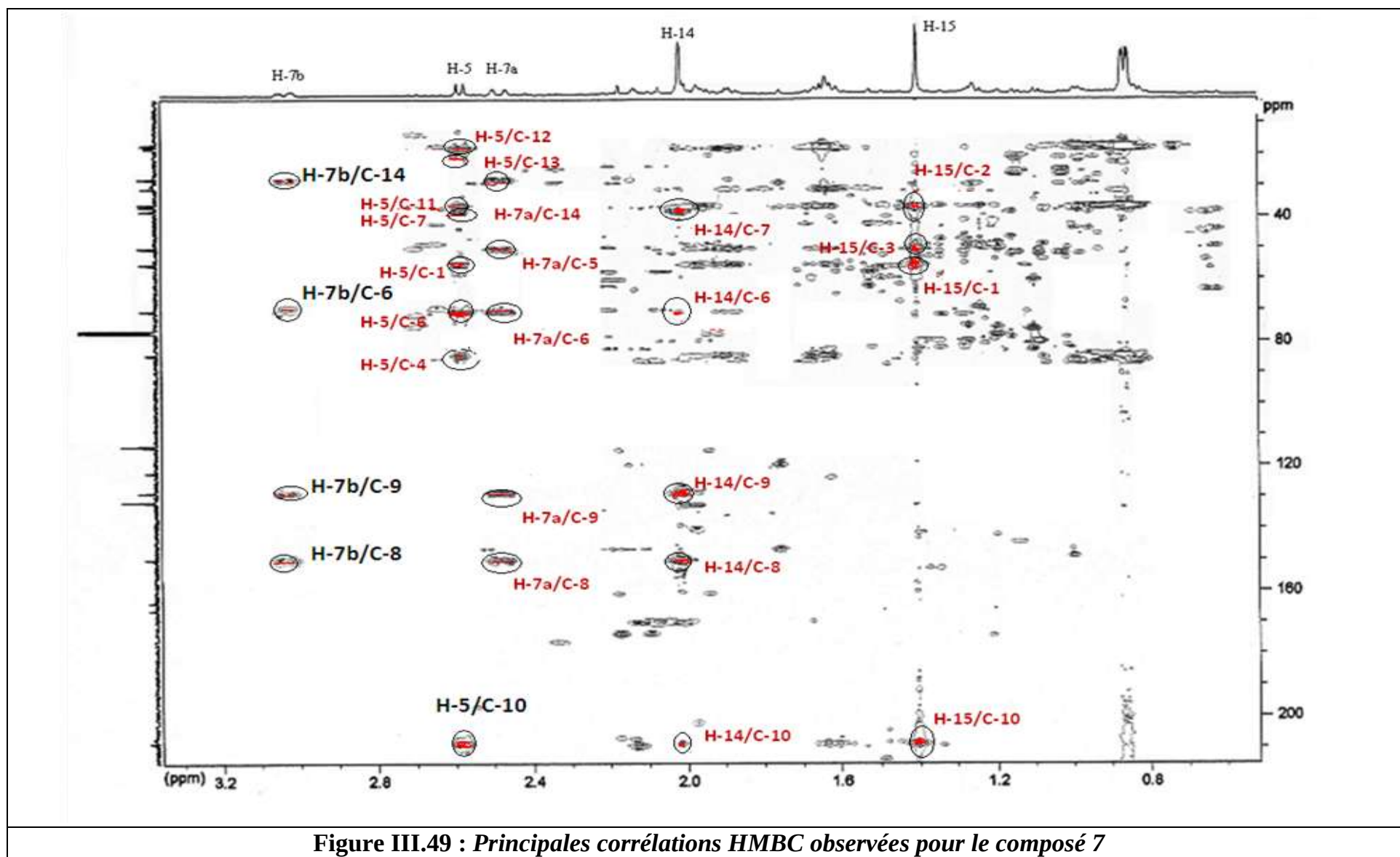


Figure III.49 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé 7

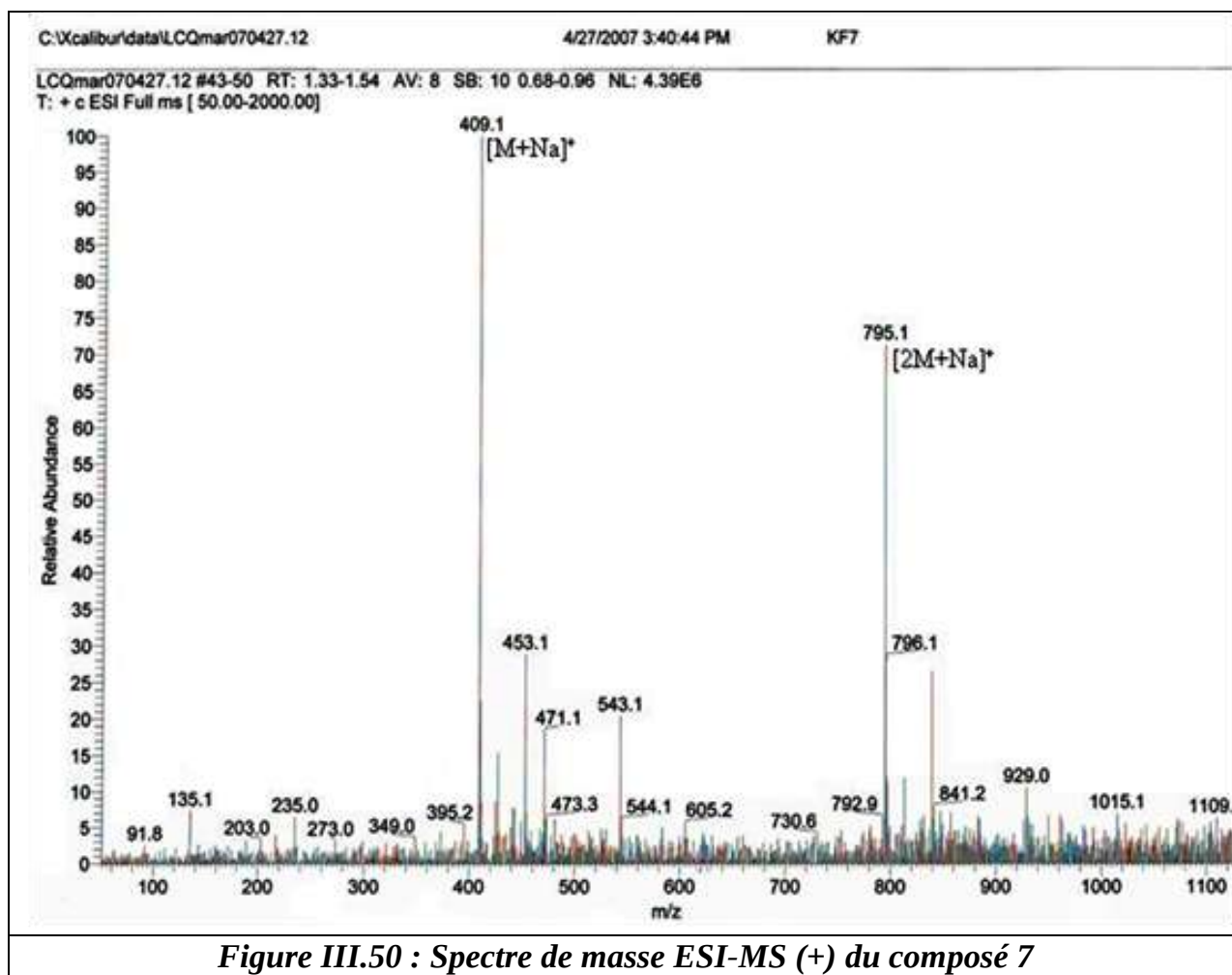
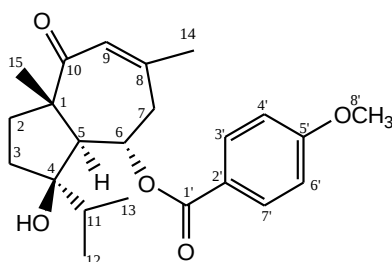


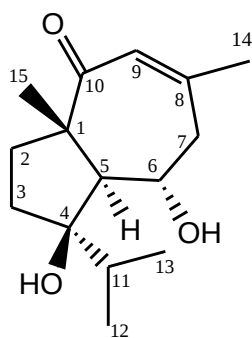
Figure III.50 : Spectre de masse ESI-MS (+) du composé 7

Tableau III.8 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations HSQC, COSY, HMBC et NOESY du composé 7 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HSQC	COSY	HMBC	NOESY
1	-	55.3	-	-	-
2 a	1.63 m (α)	36.8	H-3b	C-15, C-3, C-5,	-
b	1.88 m (β)		H-3a	C-1, C-6, C-4	H-15
3 a	1.64 m (β)	31.2	H-2b	C-11, C-5, C-1,	-
b	1.97 m (α)		H-2a	C-4	H-13
4	-	84.5	-	-	-
5	2.58 d (9.7)	50.3	H-6	C-13, C-15, C-11, C-7, C-1, C-6, C-4, C-10	H-12, H-11
6	5.84 ddd (9.7, 5.4, 2.5)	70.4	H-7a, H-5, H-7b	C-7, C-5, C-4, C-8, C-1'	H-15, H-7b
7 a	2.48 dd (16.0, 1.6) (α)	38.3		C-14, C-5, C-6,	-
b	3.03 dd (16.0, 4.1) (β)		H-6	C-9, C-8, C-10	H-15, H-6
8	-	150.0	-	-	-
9	6.02 s	128.6	H-14	C-14, C-7, C-1, C-8	H-14
10	-	208.8	-	-	-
11	1.63 m	36.4	H-12	C-13, C-12, C-3, C-2, C-5, C-1, C-4	-
12	0.86 d (6.7)	18.3	H-11	C-13, C-11, C-4	H-3', H-4'
13	0.89 d (6.7)	17.2	H-11	C-12, C-11, C-4	-
14	2.01 s	28.3	H-7b	C-7, C-6, C-8, C-9, C-10	H-9
15	1.40 s	18.1	-	C-2, C-5, C-1, C-10	H-2b, H-3a, H-6
1'	-	166.2	-	-	-
2'	-	122.2	-	-	-
3', 7'	7.97 d (9.2)	131.6	H-4'	C-4', C-2', C-5', C-1'	H-4'
4', 6'	6.94 d (9.2)	113.8	H-3'	C-2', C-3', C-5', C-1'	H-12, H-8'
5'	-	163.7	-	-	-
8'	3.88 s	55.4	-	C-5'	-



V.2 .3. Elucidation structurale du composé 8



Lapidol (8)

La comparaison des spectres RMN proton et carbone de ce composé (Figures III.51 et III.52) à ceux du composé précédent, laisse apparaître clairement la disparition totale des signaux de la partie aromatique, suggérant l'absence d'une estérification par un noyau aromatique. Cependant, les déplacements des protons et des carbones restent proches entre les deux molécules.

L'absence de l'estérification a affecté principalement le signal du proton H-6 (δ_H 4,46) lequel s'est montré moins déblindé. Les données RMN (1D et 2D) résumées dans le Tableau III.9 nous ont conduit à conclure que ce composé correspond au Lapidol isolé antérieurement à partir des espèces *F.linki* et *F.sinaica* [10 ; 21].

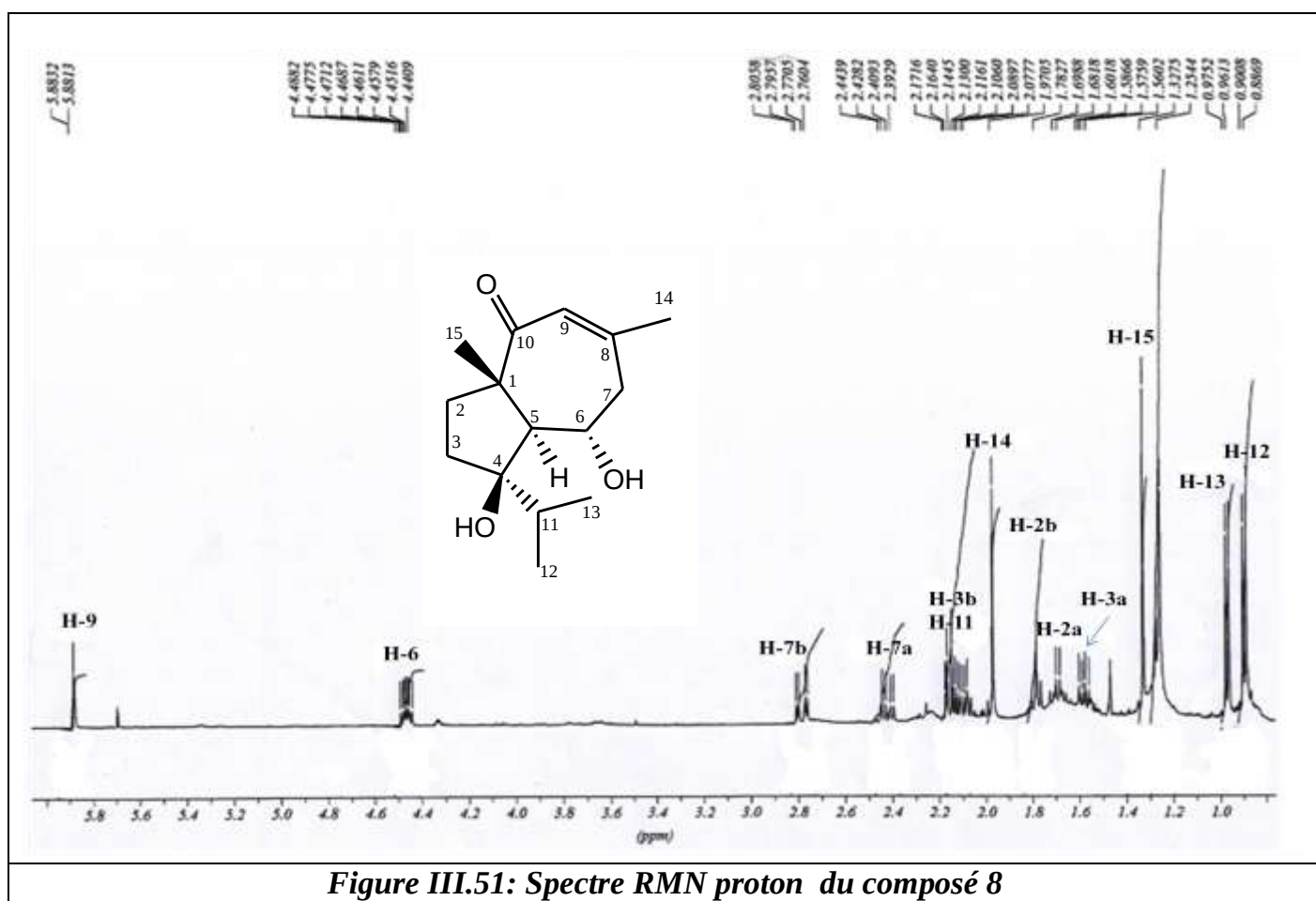


Figure III.51: Spectre RMN proton du composé 8

C13CPD

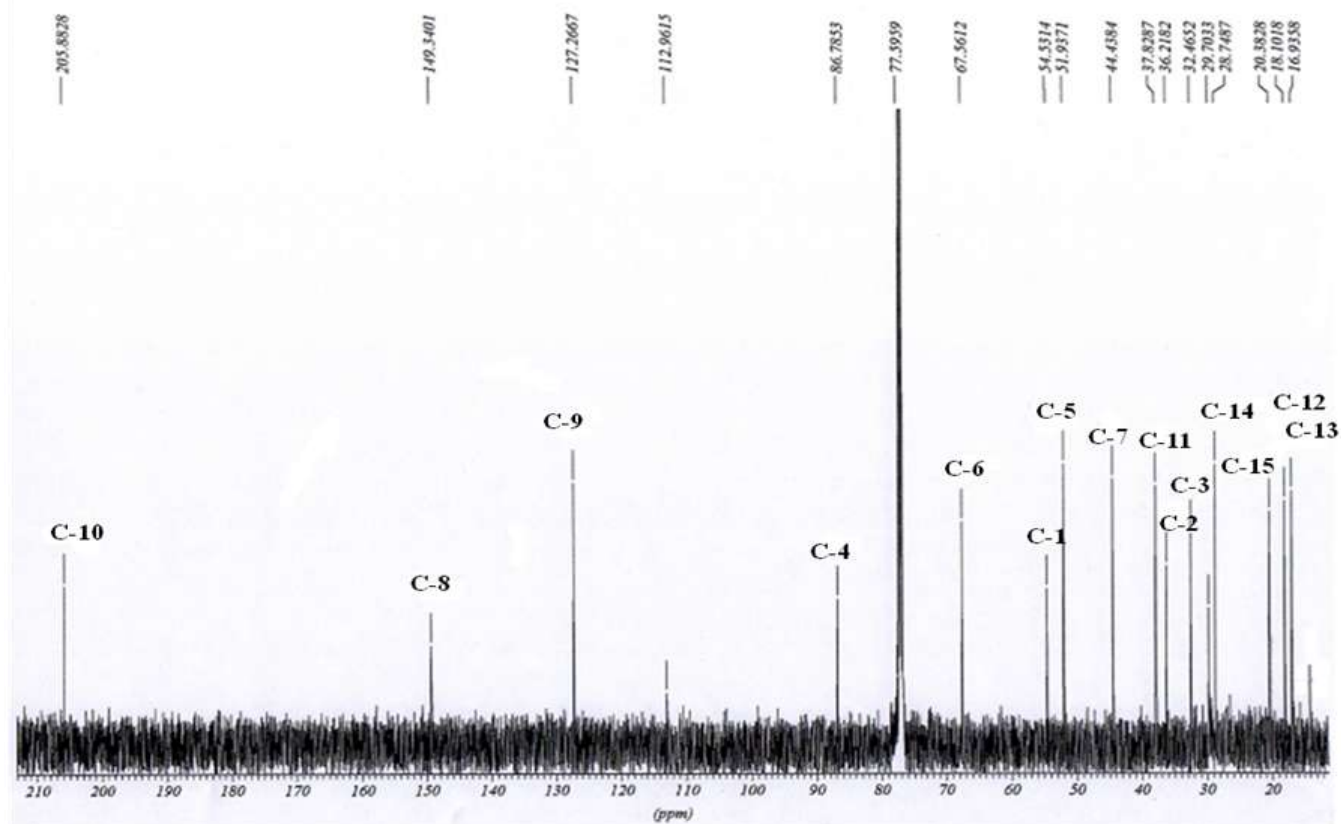
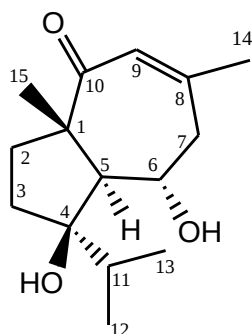


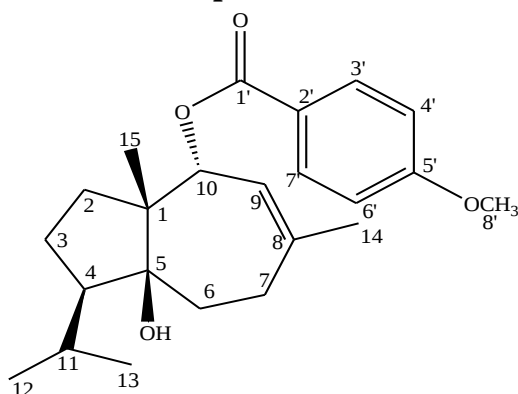
Figure III.52 : Spectre RMN carbone du composé 8

Tableau III.8: Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations HSQC, HMBC et NOESY du composé 8 dans CDCl_3/TMS (δ ppm; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HSQC	HMBC	NOESY
1	-	54.5	-	-
2 a	1.68 m (α)	36.2	C-15, C-3, C-1, C-10	H-3b
b	1.78 m (β)		C-3, C-15, C-4, C-1, C-5	-
3 a	1.57 m (β)	32.5	C-2, C-4	H-15
b	2.12 m (α)		C-2, C-5, C-1, C-4	-
4	-	86.8	-	-
5	2.16 d (9.7)	51.9	C-15, C-7, C-1, C-1, C-10	H-12, H-13
6	4.46 m	67.6	C-8	H-7b, H-15
7 a	2.41dd (17.5, 6.9) (α)	44.4	C-8, C-9, C-6, C-5, C-14	-
b	2.78 dd (17.5, 7.9) (β)		C-14, C-5, C-6, C-9, C-8	H-14, H-6
8	-	149.3	-	-
9	5.88 s	127.3	C-14, C-2, C-1	H-14
10	-	205.9	-	-
11	2.14 m	37.8	C-12, C-13, C-3, C-4, C-6	-
12	0.89 d (6.9)	18.1	C-11, C-4, C-13	H-11
13	0.97 d (6.9)	16.9	C-11, C-4, C-12	H-11
14	1.97 s	28.7	C-9, C-8, C-7	-
15	1.33 s	20.4	C-2, C-5, C-1, C-10	H-3a, H-2b, H-6



V.2.4. Elucidation structurale du composé 9



Lasidiol-10-anisate

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C (Figures III.53 et III.54) font apparaitre les signaux caractéristiques des daucanes estérifiés par un groupement anisate. Par ailleurs, les spectres Carbone et DEPT ont montré quatre méthylènes, deux carbones quaternaires et deux méthines. Un seul carbone est oxygéné pour chacun de ces deux derniers types (Tableau III.10).

Le couplage constaté entre les signaux des deux protons à δ_{H} 5,45 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-10) et 5,72 (1H, d, $J = 7,7$ Hz, H-9) suggère qu'ils sont portés par deux carbones voisins. Ces deux carbones ont été identifiés grâce aux corrélations courtes distances, au carbone oxygéné (δ_{C} 76,0 ppm, C-10) pour le premier et au carbone du système vinylique (δ_{C} 119,5 ppm, C-9) pour le deuxième (Tableau III.10).

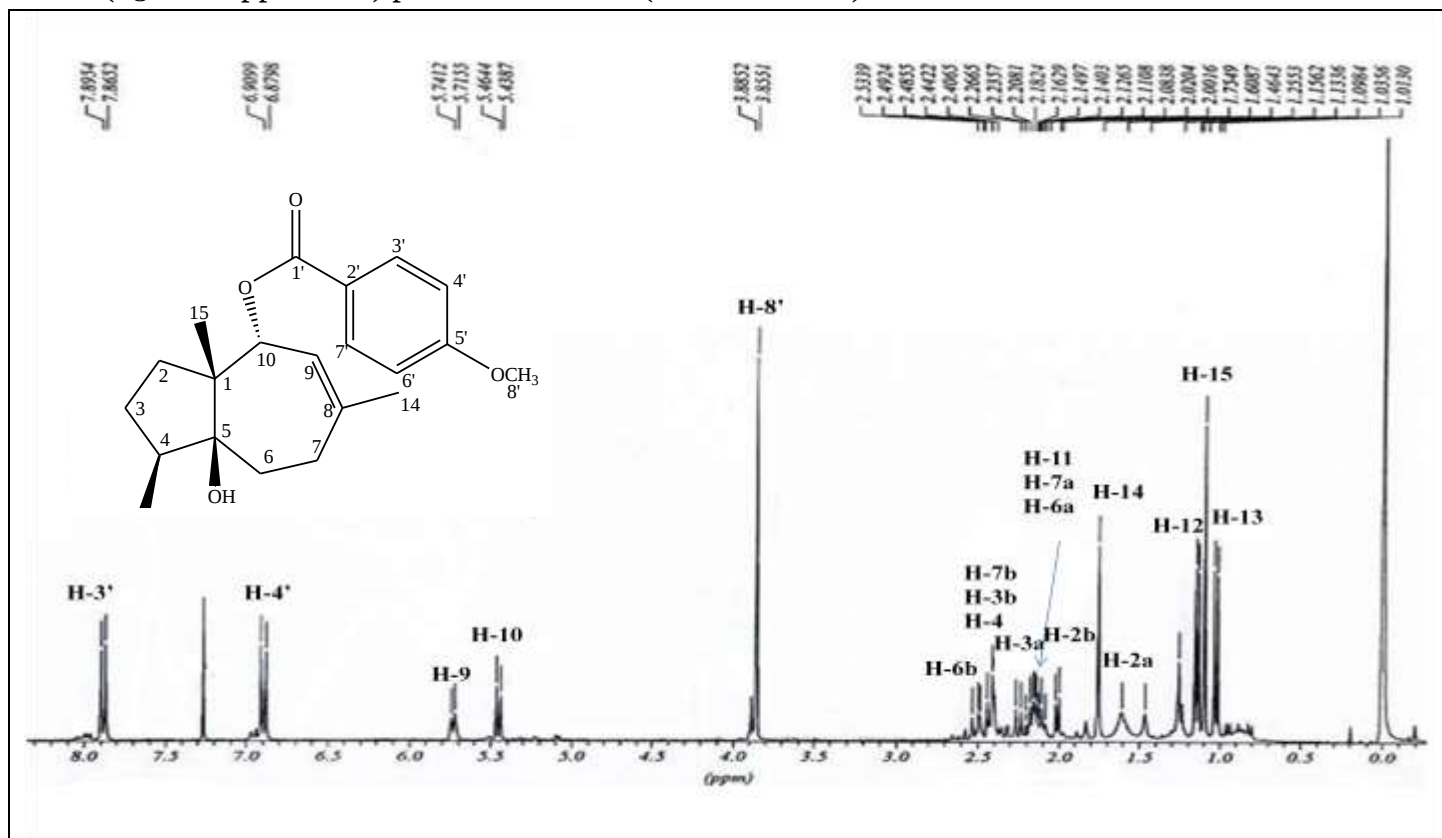


Figure III.53: Spectre RMN proton du composé 9

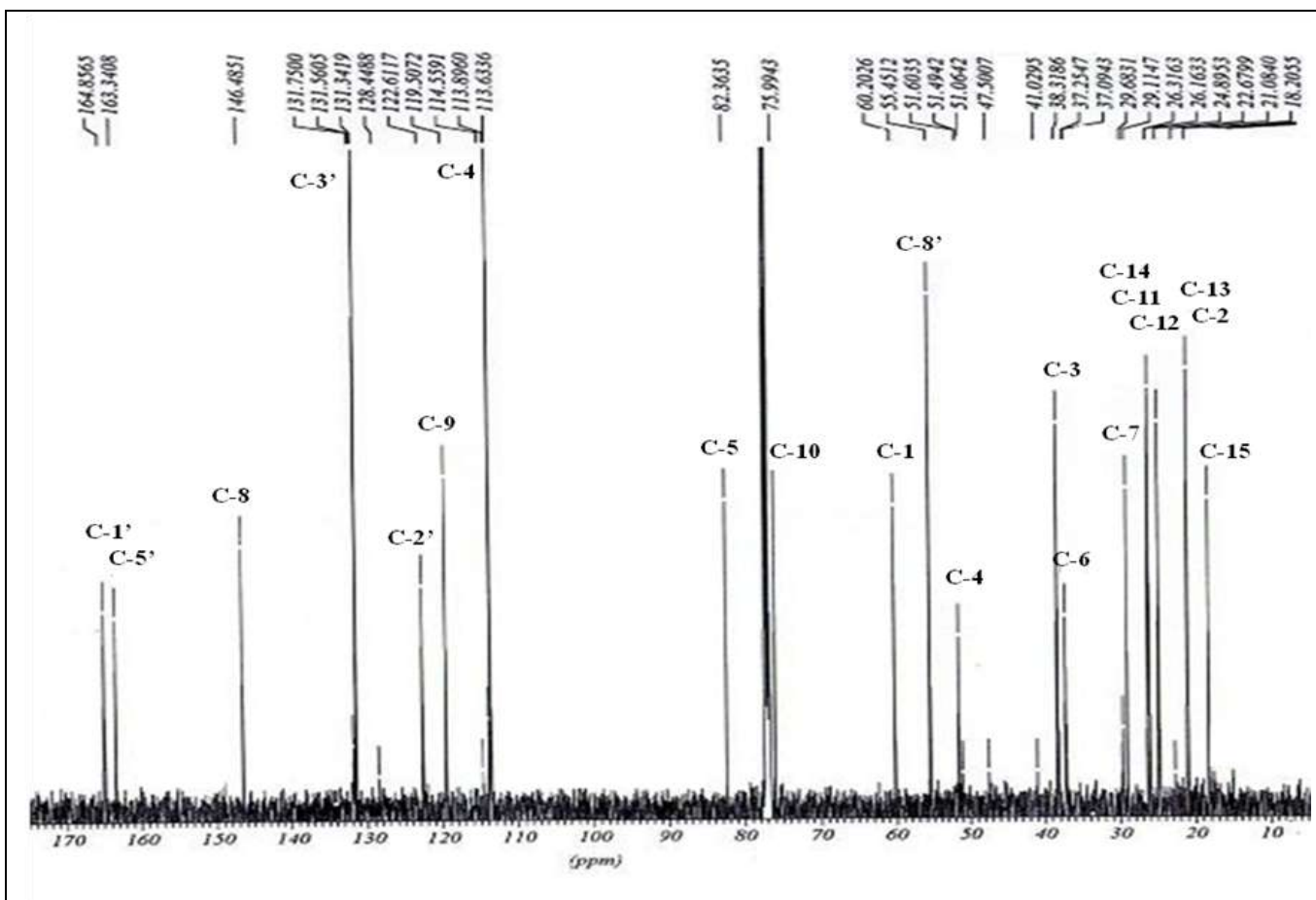


Figure III.54 : Spectre RMN carbone du composé 9

Les corrélations longues distances ont permis par la suite de situer les autres carbones, notamment celles observées pour les signaux des protons des deux méthyles H-14 et H-15. Le premier corrèle avec les carbones C-7 (δ_C 29,3), C-9 (δ_C 119,5) et C-8 (δ_C 146,5) alors que le second corrèle avec les carbones C-2 (δ_C 21,0), C-1 (δ_C 60,2), C-10 (δ_C 76,0), C-5 (δ_C 82,4). Le signal du proton à δ_H 5,45 (H-10) pour sa part, voit les carbones C-2 (δ_C 21,0), C-1 (δ_C 60,2), C-5 (δ_C 82,4) C-2' (δ_C 122,6), C-8 (δ_C 146,5) et C-1' (δ_C 164,9) sur le même spectre (Figure III.55). Ces informations nous apportent la preuve que l'anisate est cette fois-ci portée par le carbone C-10. De plus ce composé se distingue des autres par l'hydroxylation en position C-5 au lieu du C-4.

Les données de ce composé sont en parfait accord avec celles décrites pour le lasidiol-10-anisate identifié dans une Asteraceae (*Xanthium catharticum*) par Cumanda *et al* [22]. Il faut noter que cette molécule est identifiée pour la première fois dans le genre *Ferula*. Cependant, deux composés analogues le lasidiol-10-acétate et le lasidiol-10-vératrate ont également été isolés chez *Ferula linkii* [10]. D'autre part, une molécule présentant cette même hydroxylation en C-5 et l'estérification en C-10 mais porteuse d'une fonction cétonique sur le cycle à 5 sommets est isolée des racines de *F. vesceritensis* étudiées par Zellagui [6].

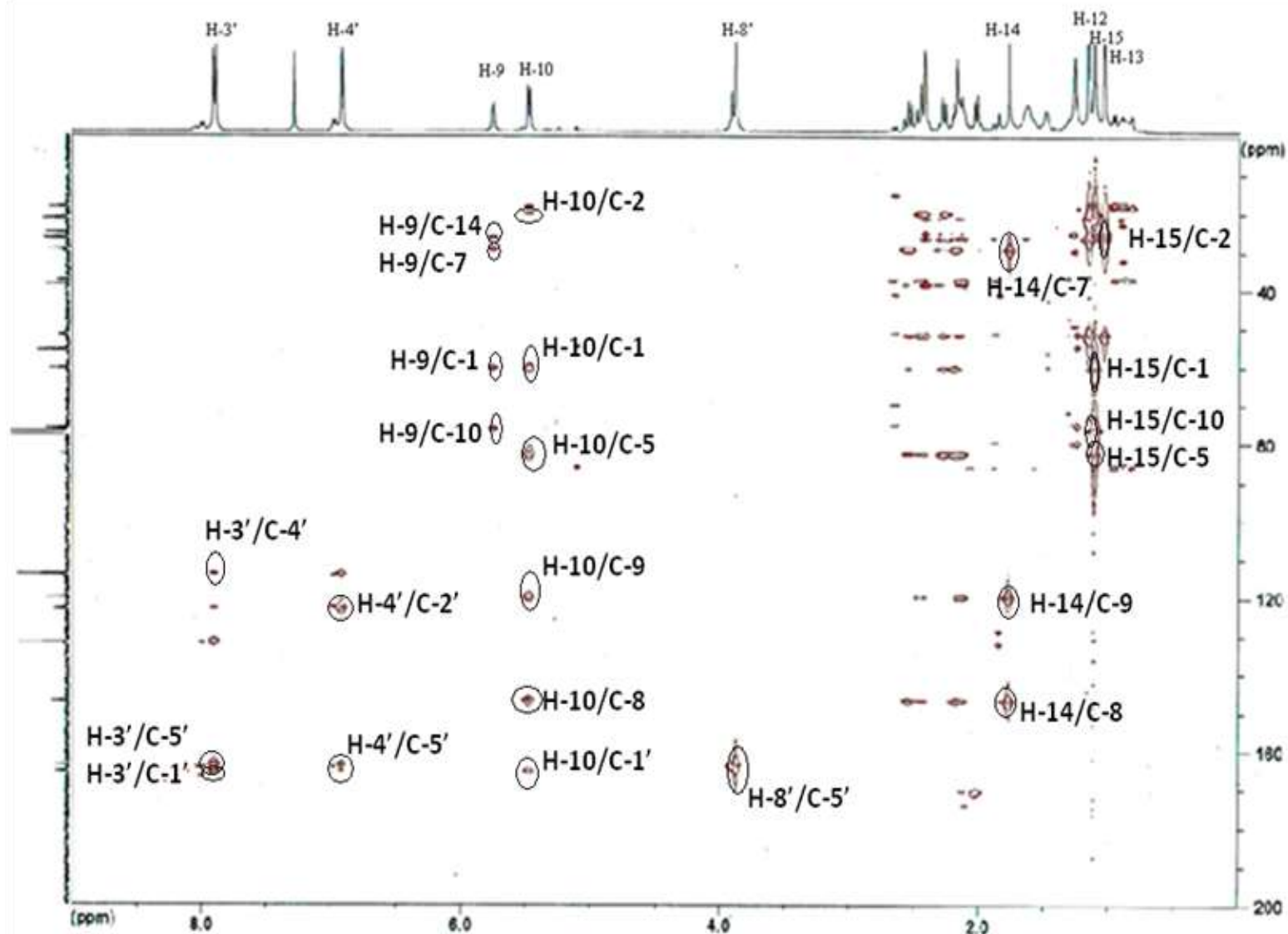


Figure III.55 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé 9

Le spectre de masse enregistré pour ce composé en mode d'ionisation ESI positif a mis en évidence deux ions pseudomoléculaires $[M+K]^+$ et $[2M+K]^+$ dont les valeurs de m/z sont respectivement de 409,0 et 795,0 (Figure III.56) confirmant également l'identité ce composé.

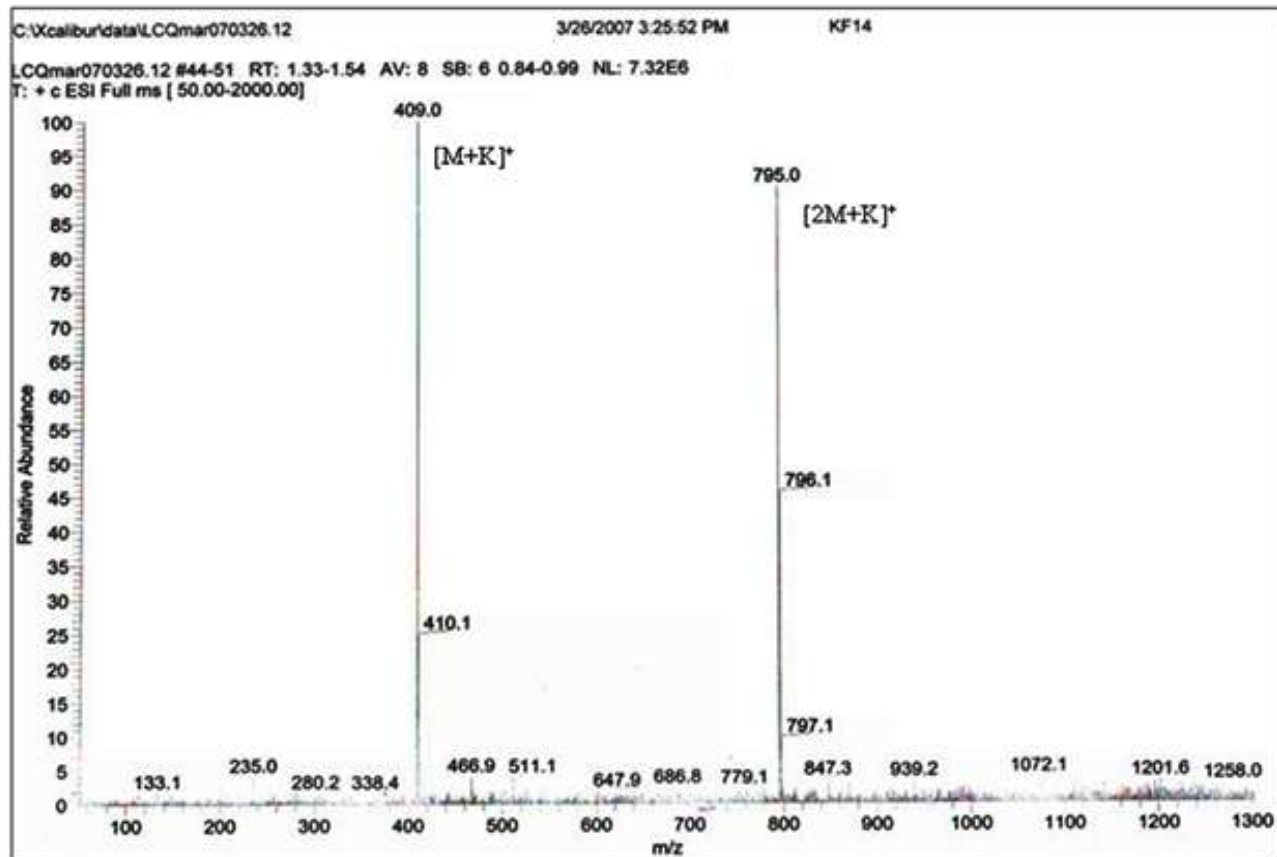
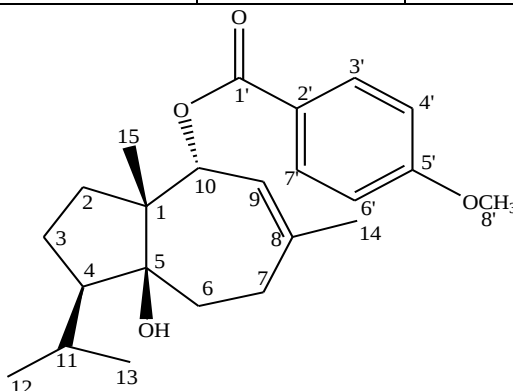


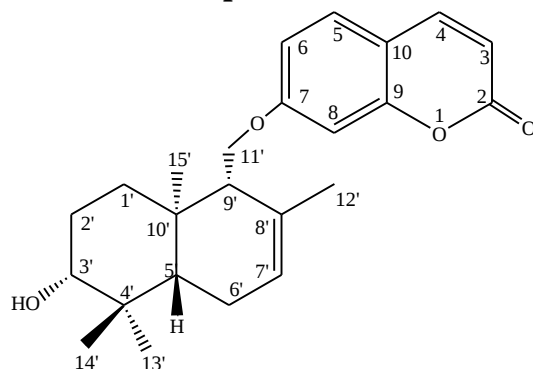
Figure III.56 : Spectre ESI-MS (+) du composé 9

Tableau III.10: Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations HSQC, COSY et HMBC du composé 9 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	HMBC
1	-	60.2	-
2	1.60 m 2.01 d (5.6)	21.0	C-11
3	2.25 m 2.43 m	38.3	C-5, C-1,
4	2.41 m	51.5	C-2, C-3, C-8, C-5
5	-	82.4	
6	2.19 m 2.50 m	37.3	C-8, C-5, C-7
7	2.15 m 2.45 m	29.1	C-8, C-9, C-5
8	-	146.5	-
9	5.72 d (7.7)	119.5	C-11, C-7, C-1, C-10
10	5.45 d (7.7)	76.0	C-5, C-9, C-8, C-1', C-1, C-2, C-15
11	2.11 m	26.3	C-4, C-13,
12	1.14 d (6.7)	24.9	C-13, C-11, C-4
13	1.02 d (6.7)	21.1	C-12, C-11, C-4
14	1.75 s	26.2	C-9, C-8, C-7
15	1.10 s	18.2	C-2, C-1, C-10, C-5
1'	-	164.9	-
2'	-	122.6	-
3'	7.88 d (9.0)	131.8	C-5', C-1', C-4'
4'	6.89 d (9.0)	113.6	C-2', C-5', C-3'
5'	-	163.3	-
6'	6.89 d (9.0)	113.6	C-2', C-5', C-3'
7'	7.88 d (9.0)	131.8	C-5', C-1', C-4'
8'	3.85 s	55.4	C-5'



V.2.5. Elucidation structurale du composé 10



Fésélol

L'étude du spectre RMN proton de ce composé (Figure III.57) montre clairement cinq signaux caractéristiques des protons de l'umbelliférone. Il s'agit des signaux résonants à δ_H 6,26 (H-3), 7,64 (H-4), 7,36 (H-5), 6,81 (H-6) et 6,84 (H-8).

Pour la seconde partie de la molécule nous avons relevé les signaux des protons suivants :

- Un proton oléfinique résonant à δ_H 5,56 (H-7')
- Un méthyle oléfinique résonant à δ_H 1,69 (H-12')
- Trois méthyles résonant à δ_H 0,89 (H-13'), 0,90 (H-15') et 1,00 (H-14')
- Un méthine oxygéné résonant à δ_H 3,29 (H-3')
- Un méthylène oxygéné résonant à δ_H 4,08 et 4,17 (H-11'a et H-11'b)

Le spectre carbone montre (Figure III.58) quant à lui, vingt quatre signaux, dont neuf sont attribués à l'umbelliférone et les quinze restants sont ceux de la partie sesquiterpénique. Les expériences DEPT et HSQC ont permis d'affecter les protons aux carbones qui les portent (Tableau III.11).

La comparaison des données spectrales obtenues avec celles de la littérature pour des composés apparentés connus a permis de proposer une structure d'éther de sesquiterpène et de coumarine pour ce composé. Toutefois l'enregistrement des spectres HMBC et NOESY semblait incontournable pour confirmer l'identité de cette molécule.

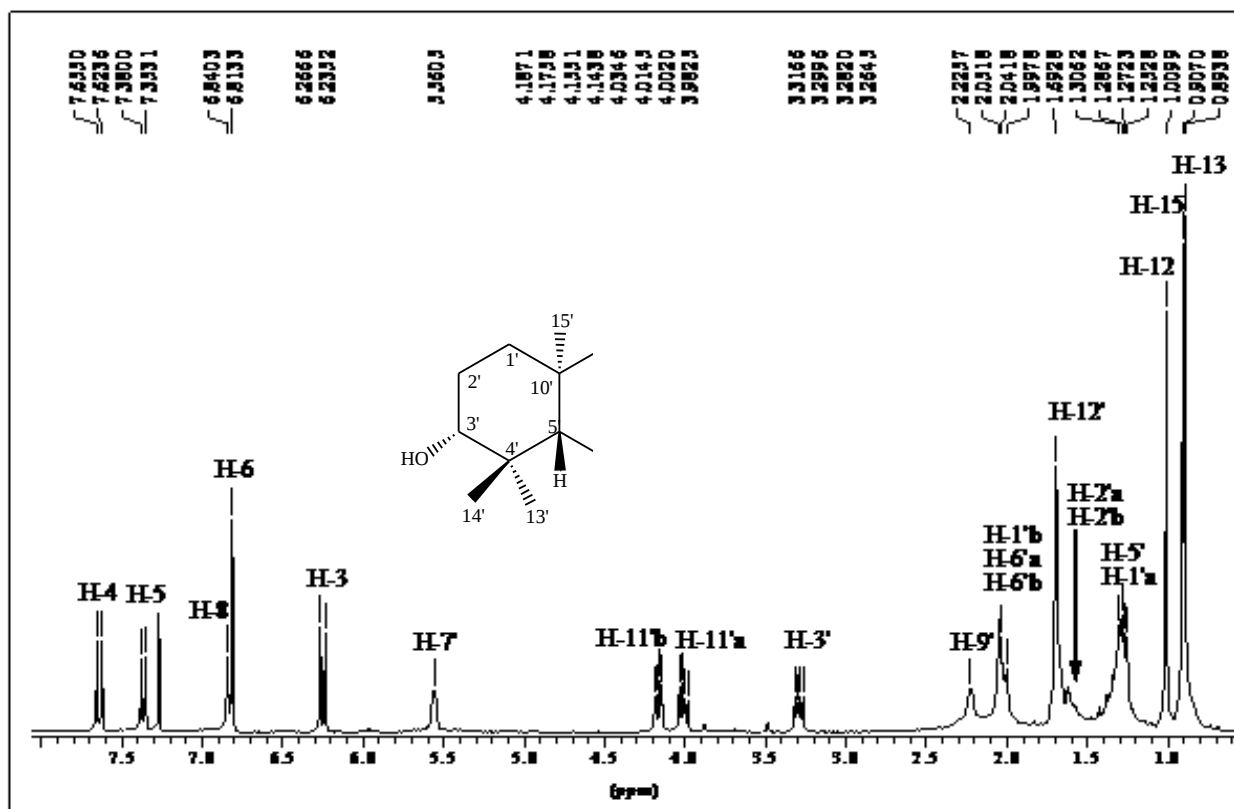


Figure III.57 : Spectre proton du composé 10

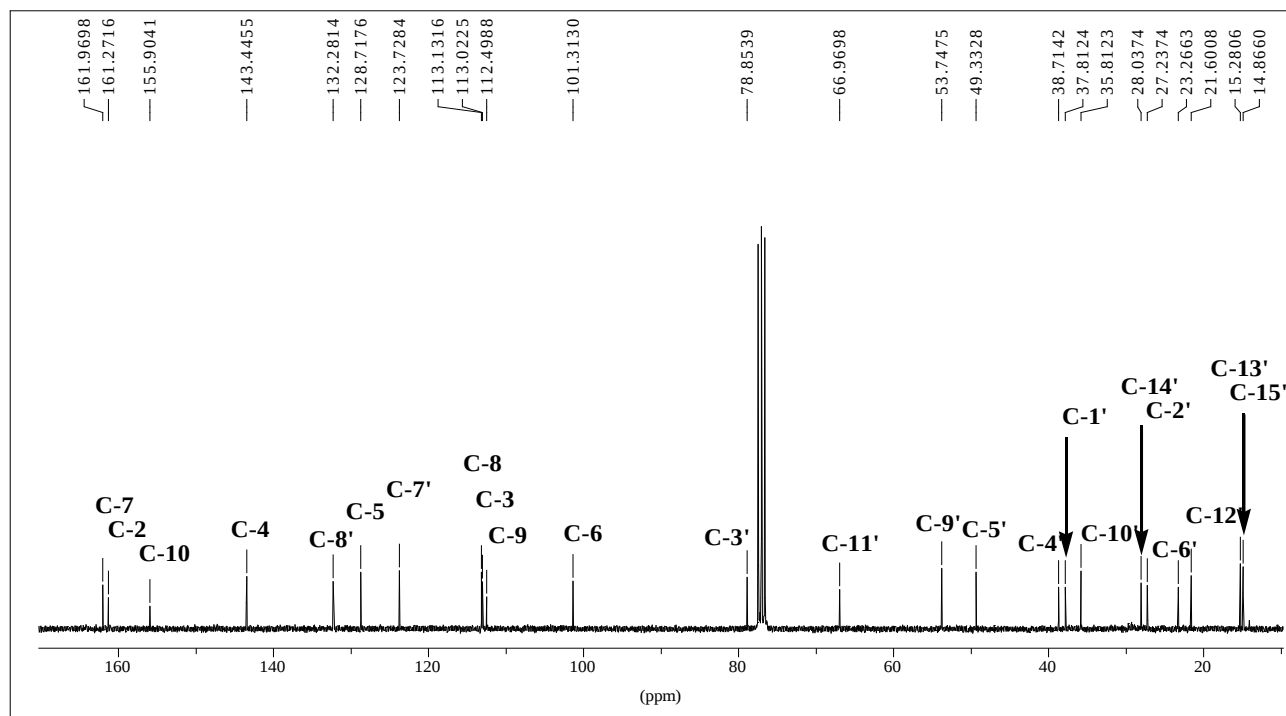
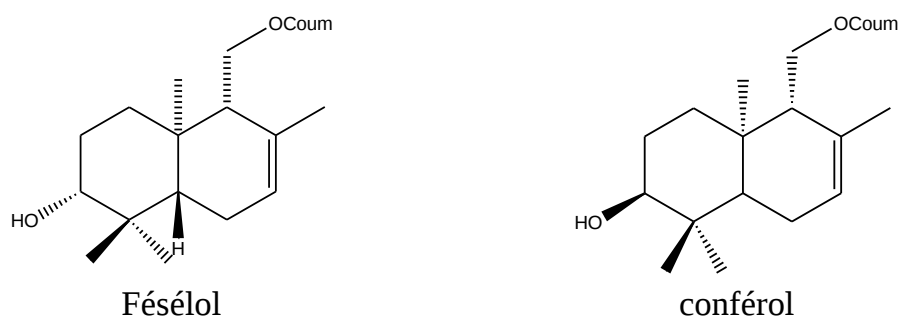


Figure III.58 : Spectre ¹³C du composé 10

Les corrélations longues distances, entre autres celles observées entre le proton H-3' (δ_H 3,29) et les carbones C-13' et C-14' confirme que l'hydroxyle est bien porté par le carbone C-3'. Le proton H-12' (δ_H 1,69) corrèle à son tour avec les carbones résonants à δ_C 123,7 (C-7'), 132,3 (C-8') et 53,7 (C-9') prouvant ainsi que les carbones C-7' et C-8' sont liés par une double liaison. Par ailleurs, la présence de la corrélation entre les deux protons H-11'a et H-11'b (δ_H 4,08 et 4,17) et le carbone C-7 (δ_C 162,0) montre clairement que la partie sesquiterpénique est liée à l'umbelliférone par le carbone C-7 (Figure III.59).

A ce stade, ce composé peut être identifié à l'une des deux molécules fesélol ou conférol, différentes juste par l'orientation de l'hydroxyle en position 3'. A cet effet le spectre NOESY a été enregistré.



Les corrélations spatiales observées entre les paires de protons H-14'/H-3', H-3'/H-5', H-5'/H-9', H-14'/H-5' indiquent une orientation β pour les protons H-14', H-3', H-5' et H-9'. D'une autre part les corrélations entre les protons H-11'/H-15', H-15'/H-13' montrent que le H-13' et le H-15' ont une orientation α (Tableaux III.11).

Les données spatiales précédentes identifient ce composé au fesélol dans lequel l'hydroxyle en C-3' a une orientation α . Cette molécule a été caractérisée dans plusieurs espèces du genre *Ferula* dont nous citons *F. tingitana*, *F. communis* et *F. sinaica* [23 ; 24 ; 7]. Le spectre de masse enregistré par électrospray en mode positif ESI-MS (+), montre deux pics d'ions à m/z 383,3 et 405,2 correspondant respectivement à l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ et l'ion $[M+Na]^+$ (Figure III.60) corrobore l'identification de cette molécule.

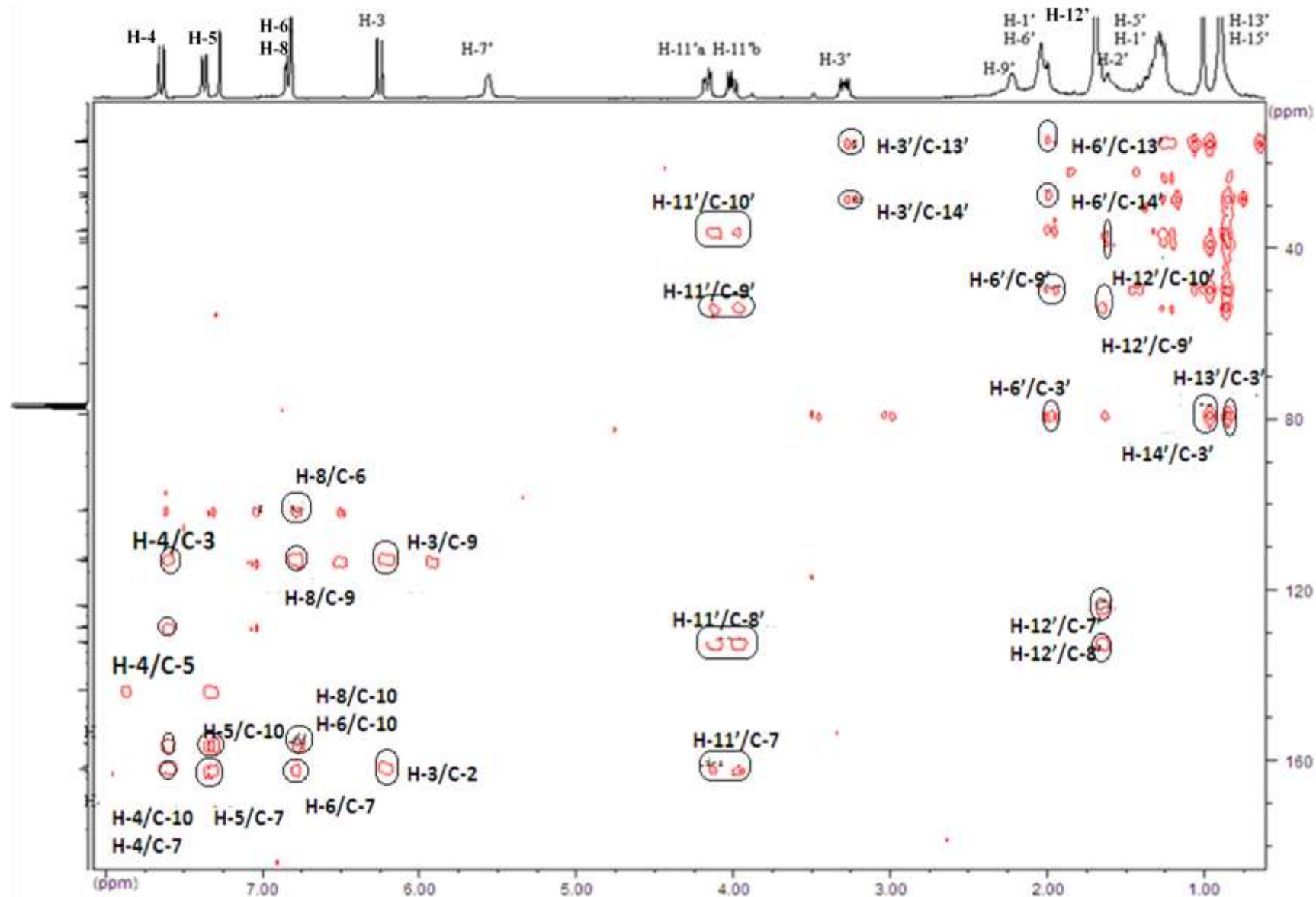


Figure III.59 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé 10

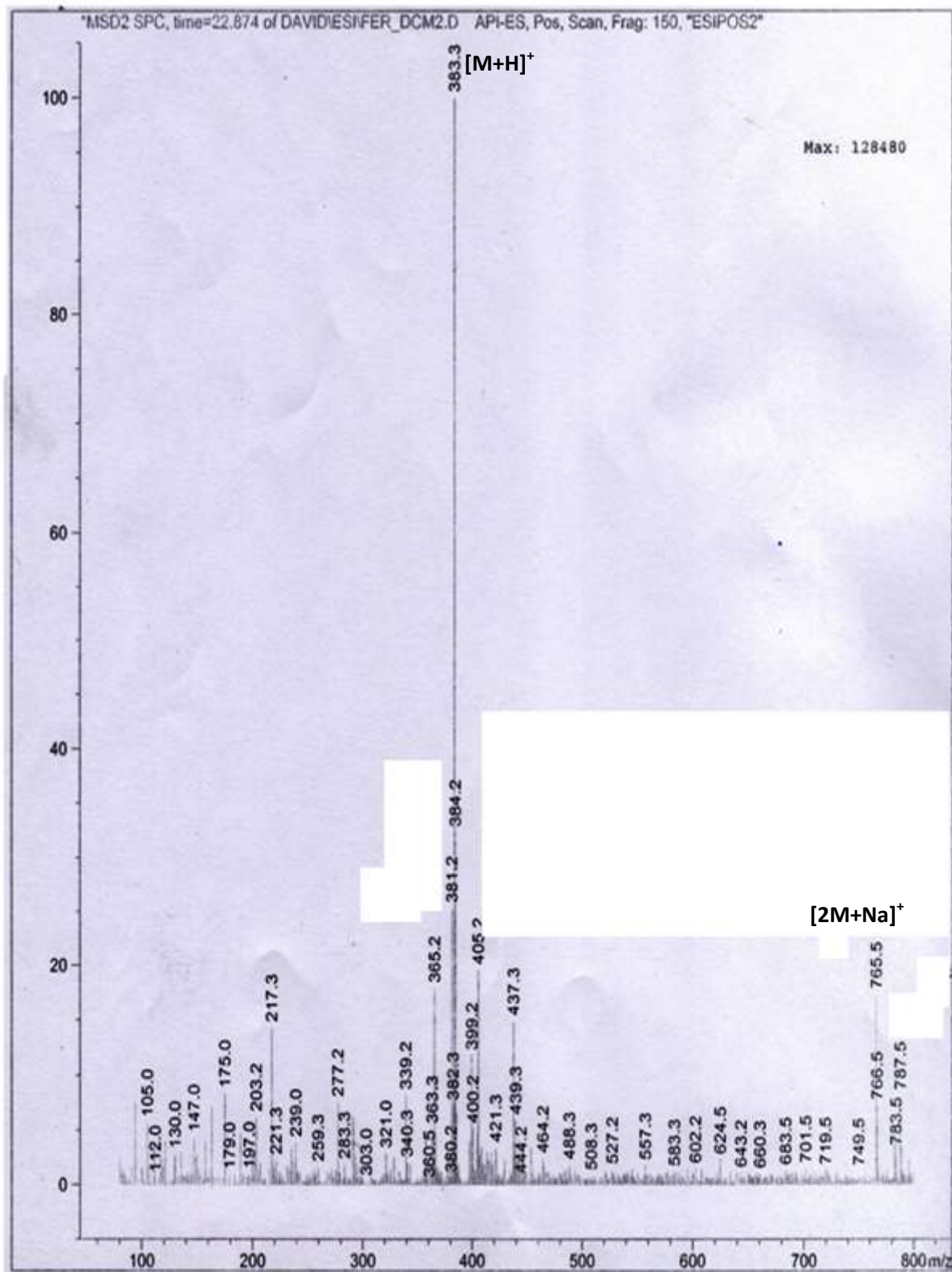
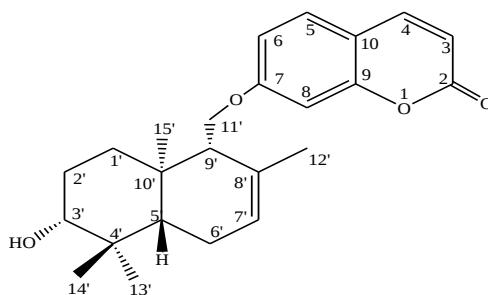


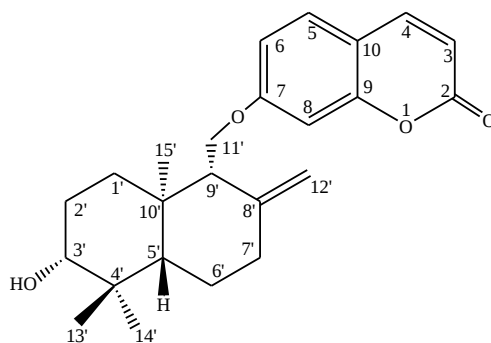
Figure III.60 : Spectre de masse ESI-MS (+) du composé 10

Tableau III.11: Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (500MHz)) et Corrélations HSQC, HMBC et NOESY du composé 10 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	HMBC	NOESY
1	-	-	-	-
2	-	161.3	-	-
3	6.26 d (9.5)	113.0	C-2, C-9	H-4
4	7.64 d (9.5)	143.6	C-2, C-10, C-5, C-3	H-3, H-5
5	7.36 d (8.5)	128.7	C-7, C-10	H-4, H-6
6	6.81 s	101.3	C-7, C-10	H-11'a, H-11'b H-5
7	-	162.0	-	-
8	6.84 d (2.5)	113.1	C-10, C-9	-
9	-	112.5	-	-
10	-	155.9	-	-
1'	1.33 m (β) 2.03 m (α)	37.8	-	H-3', H-9' H-13'
2'	1.69 m 1.61 m	27.2	C-3', C-4', C-10'	-
3'	3.29 dd (10.5, 5.3)	78.8	C-13', C-14'	H-5', H-14'
4'	-	38.7	-	-
5'	1.27 dd (10.0, 5.9)	49.3	C-14', C-10', C-13', C-4'	H-3', H-9'
6'	2.04 m 2.00 m	23.4	C-14', C-13', C-5', C-3'	-
7'	5.56 m	123.7	-	-
8'	-	132.3	-	-
9'	2.23 m	53.7	-	H-11'a, H-11'b H-5, H-1'a
10'	-	35.8	-	-
11'	4.17 dd (10.0, 3.4) 4.08 dd (10.0, 5.8)	67.0	C-7, C-9', C-8', C-10'	H-9', H-15'
12'	1.69 s	21.6	C-8', C-7', C-9'	H-7', H-8, H-11'a H-11'b, H-3'
13'	0.89 s	15.3	C-3', C-4', C-14', C-5'	H-15', H-11'a, H-11'b, H-1'b
14'	1.06 s	28.0	C-13', C-5', C-3', C-4'	H-5', H-6'a, H-3'
15'	0.91 s	14.9	C-10', C-9', C-5', C-1'	H-13'



V.2.6. Elucidation structurale du composé 11



Coladonine (**11**)

Les données de la RMN (Figures III.61 et III.62) montrent qu'il s'agit encore d'un sesquiterpène coumarinique. Nous retrouvons d'ailleurs les signaux de la partie umbelliférone identiques à ceux du composé précédent. La différence entre les deux structures réside dans la partie sesquiterpénique. Nous avons relevé notamment la disparition du singlet intégrant pour trois protons du méthyle H-12' et l'apparition de deux autres singlets intégrant chacun pour un proton dans la région des protons oléfiniques (δ_H 4,54, H-12'a et 4,92, H-12').

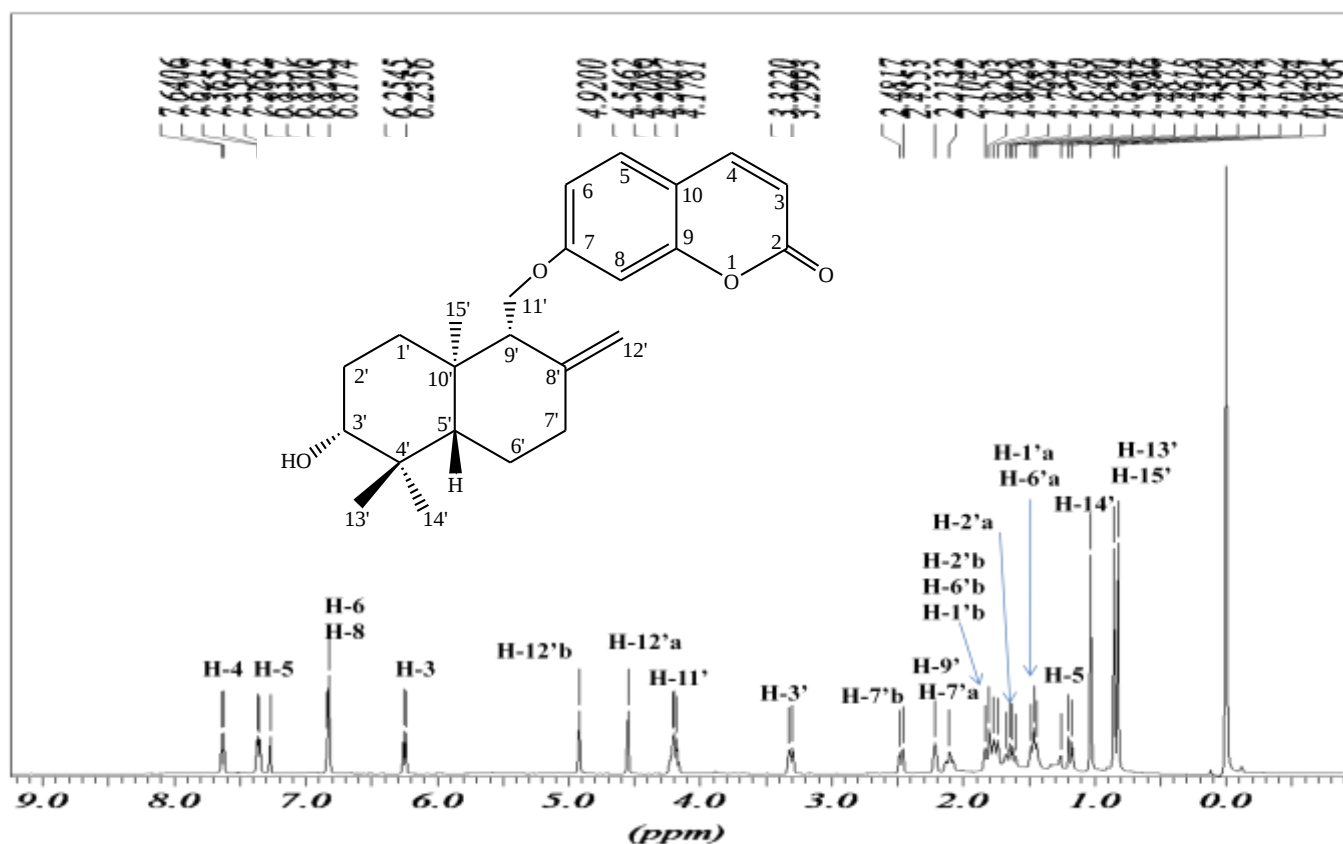


Figure III.61: Spectre RMN Proton du composé 11

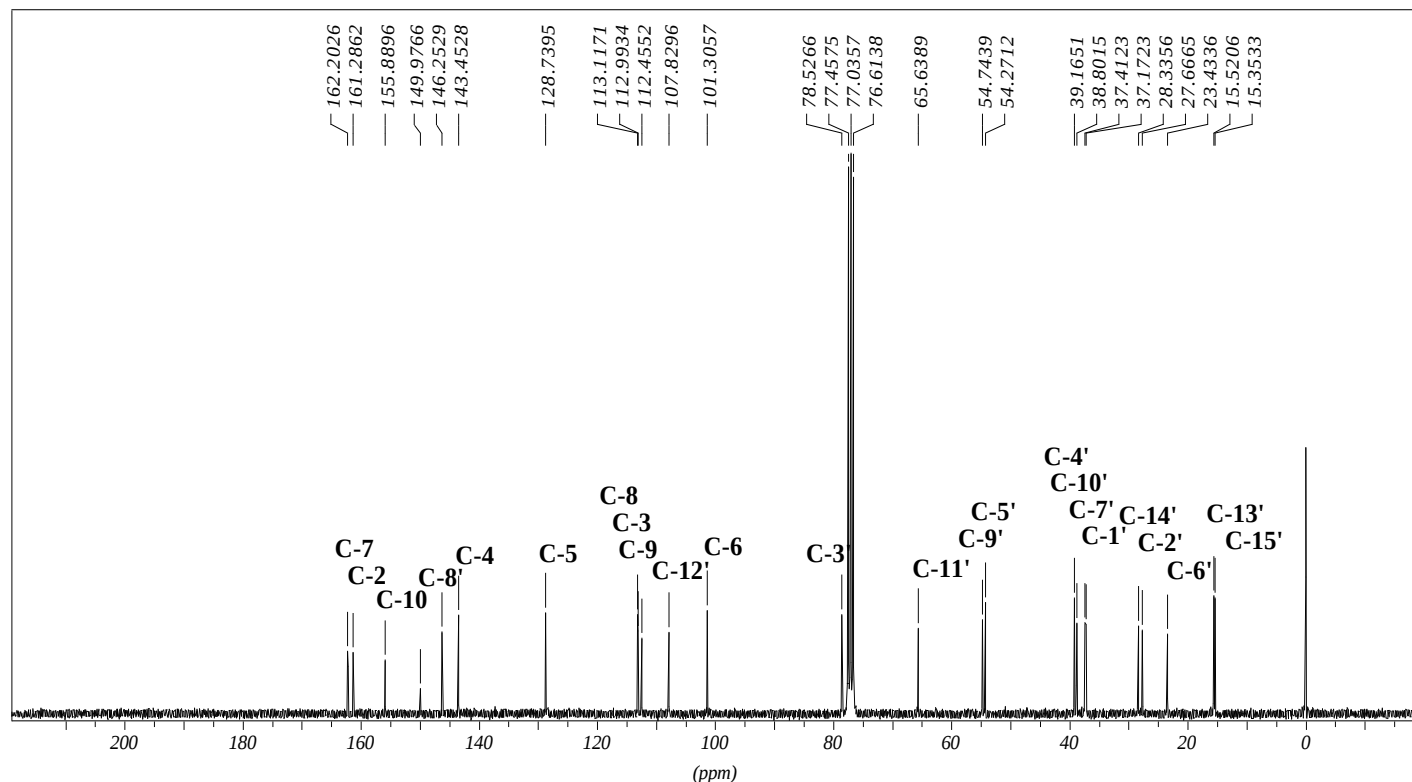


Figure III.62: Spectre RMN Carbone du composé 11

Par ailleurs, l'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC (Tableau III.12) nous a permis d'attribuer les deux protons oléfiniques précédents au carbone résonant à δ_C 107,8 ppm (C-12'), suggérant qu'à la différence de la molécule précédente, la double liaison est cette fois-ci exocyclique.

Les corrélations longues distances observées pour le proton H-9' notamment avec le C-12' corrobore la suggestion précédente (Figure III.63). Une expérience NOESY a été également réalisée pour confirmer la configuration spatiale relative de ce composé. Nous avons déduit une configuration identique à celle du composé précédent (Figure III.64).

La comparaison de l'ensemble de ces données à celles de la littérature nous a permis de proposer la structure de la coladonine pour ce composé. Cette molécule a déjà été caractérisée dans l'échantillon de l'espèce *F.vesceritensis* étudiée par Zellagui ainsi que dans plusieurs autres espèces du genre *Ferula* [6; 25].

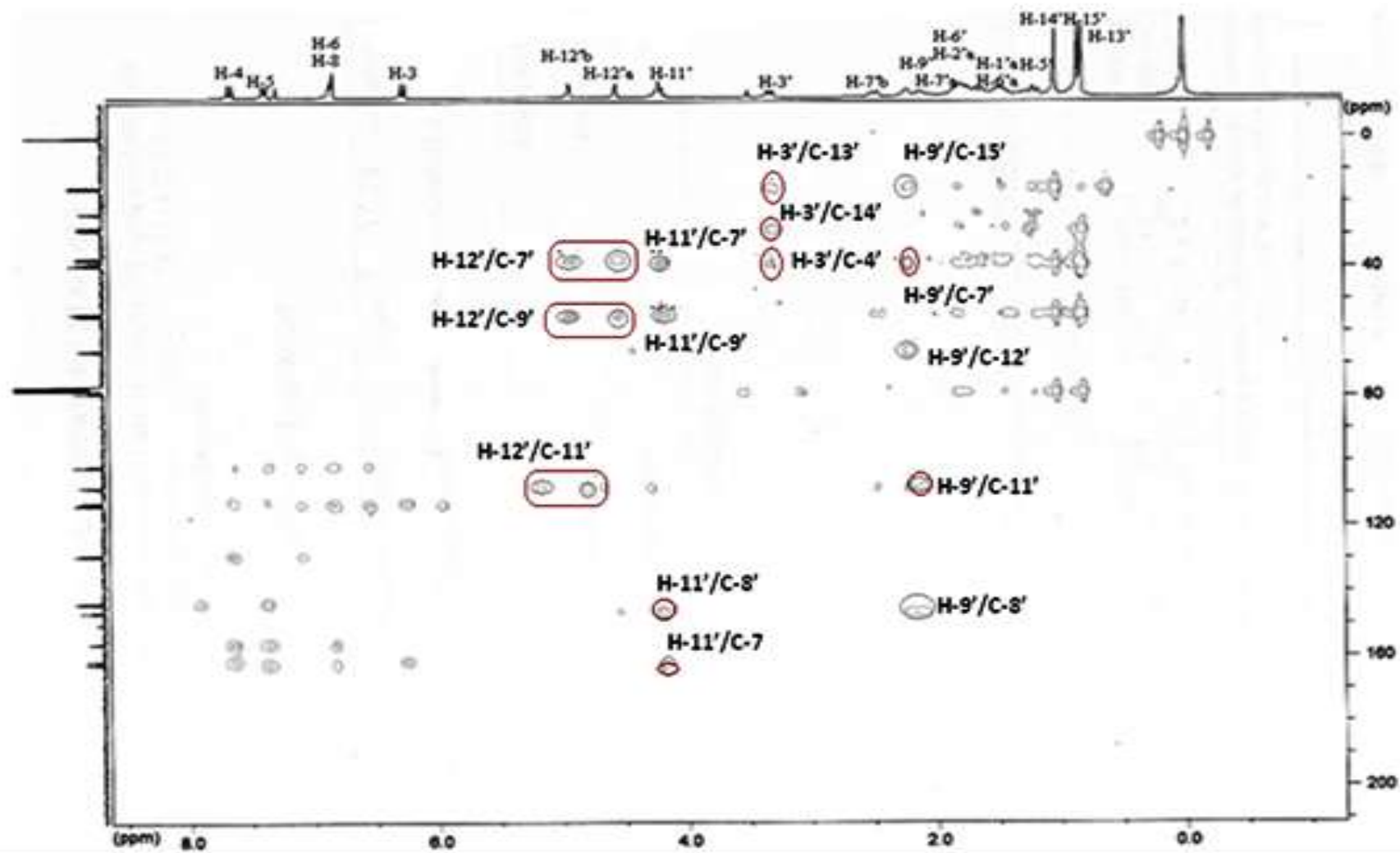
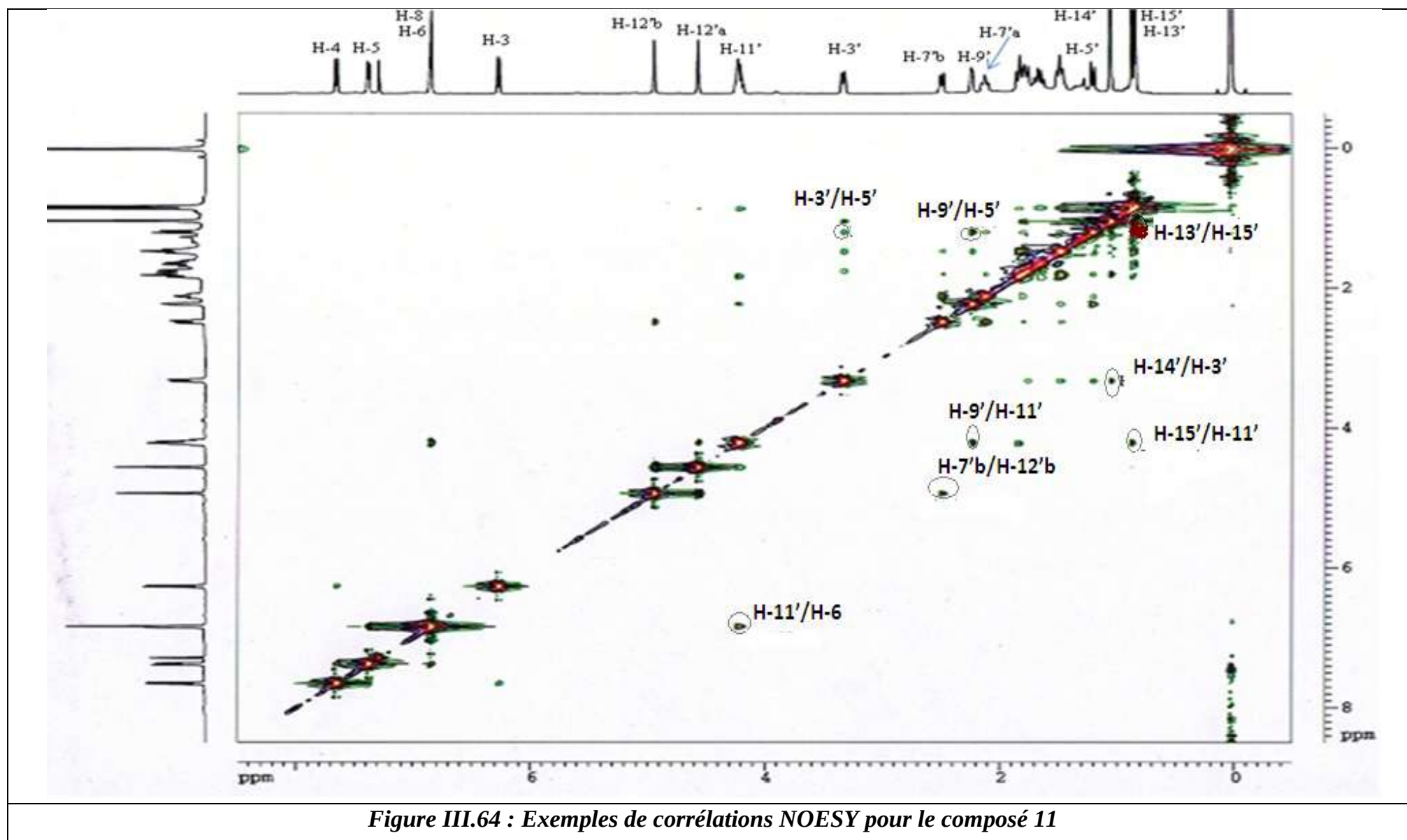


Figure III.63 : Exemples de corrélations HMBC pour le composé 11



Le spectre de masse APCI-MS de ce composé enregistré en mode négatif (Figure III.65), montre le pic de l'ion pseudomoléculaire à m/z 381,5 $[M-H]^-$, confirmant la structure proposée.

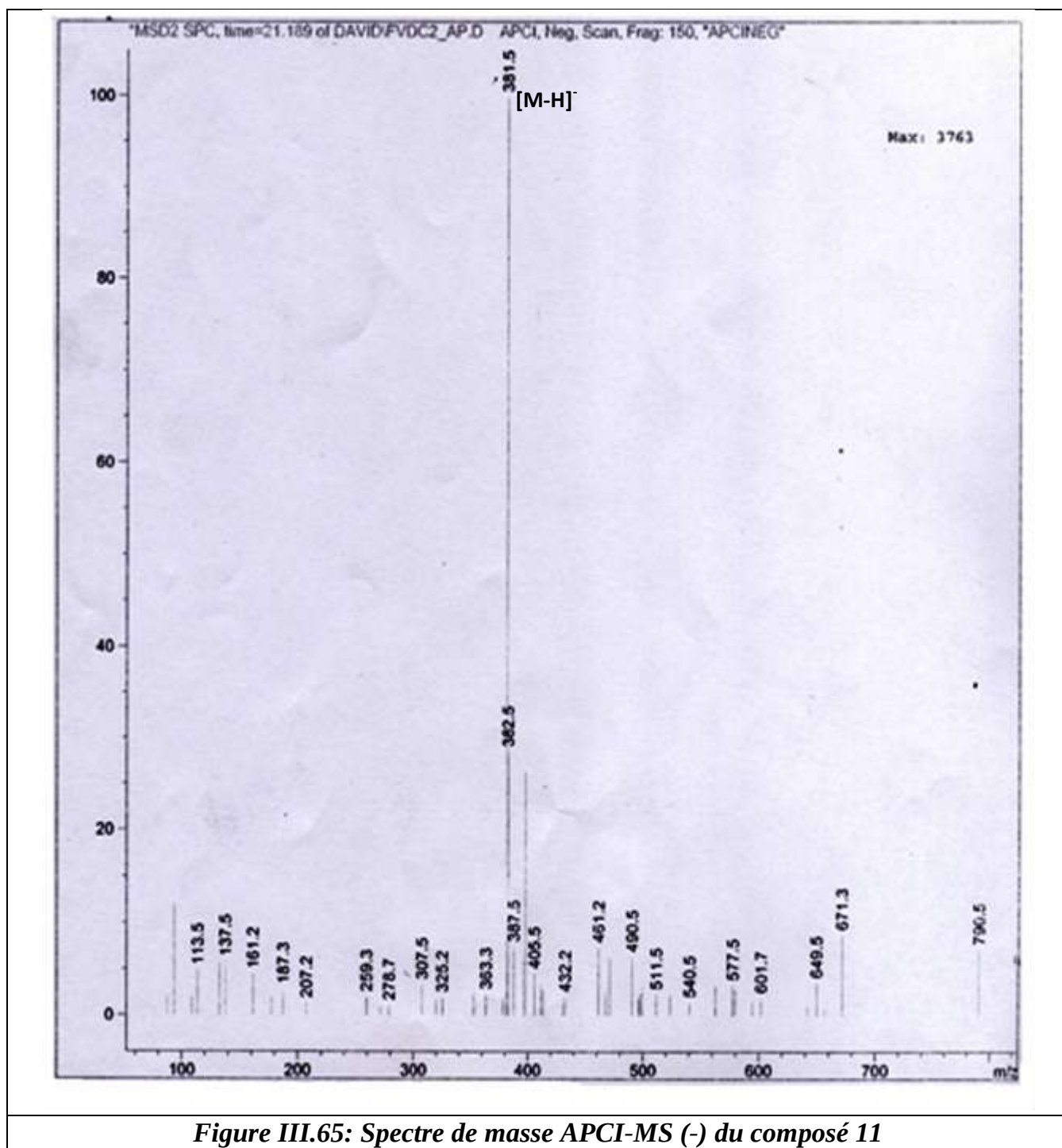
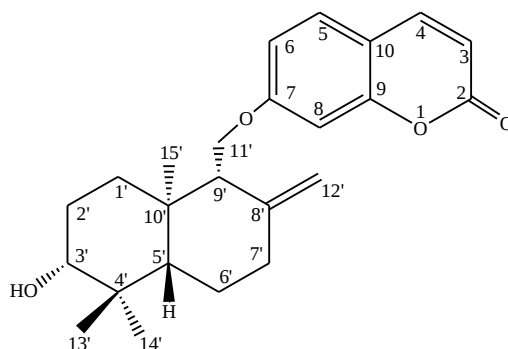


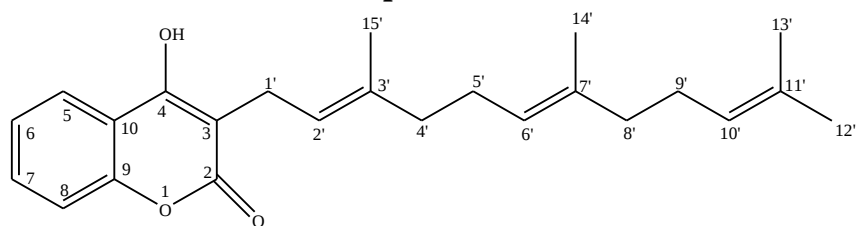
Figure III.65: Spectre de masse APCI-MS (-) du composé 11

Tableau III.12 : Valeurs des déplacements chimiques RMN ^1H , ^{13}C (500MHz)) et corrélations HSQC, HMBC et NOESY du composé 11 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	$^{13}\text{C}/\text{HSQC}$	HMBC	NOESY
1	-	-	-	-
2	-	161.3	-	-
3	6.24 d (9.5)	113.0	C-2, C-9	H-4
4	7.62 d (9.5)	143.5	C-2, C-10, C-5, C-3, C-6	H-3, H-5
5	7.35 d (9.2)	128.7	C-7, C-10, C-6, C-4	H-4, H-6
6	6.81 dd (9.2, 2.5)	101.3	C-7, C-10	H-11', H-5
7	-	162.2	-	-
8	6.83 s	113.1	C-10, C-9, C-6	-
9	-	112.5	-	-
10	-	155.9	-	-
1' a	1.82 m (β)	37.2	-	H-3', H-9', H-13'
b	1.48 m (α)			
2' a	1.73 m (β)	27.7	C-10', C-4'	H-14'
b	1.63 m (α)			-
3'	3.30 dd (11.0, 4.4)	78.5	C-13', C-14', C-4'	H-5', H-14'
4'	-	39.2	-	
5'	1.18 dd (12.6, 2.5)	54.3	C-14', C-15', C-10', C-13', C-7', C-9'	H-3', H-9'
6' a	1.79 m (β)	23.4	C-14', C-13', C-4', C-10', C-5', C-3'	-
b	1.46 m (α)			
7' a	2.47 m (α)	37.4	C-12', C-8', C-5'	H-12'b
b	2.10 m (β)			H-5'
8'	-	146.3	-	-
9'	2.21 m	54.7	C-15', C-7', C-8', C-12', C-11'	H-11', H-5', H-1'a
10'	-	38.8		-
11'	4.20 m	65.6	C-8', C-7, C-9', C-10'	H-6, H-12'b, H-9', H-15'
12' a	4.92 s	107.8	C-7', C-9', C-12', C-8'	H-11'
b	4.54 s			H7'-b
13'	0.82 s	15.5	C-3', C-4', C-14', C-5'	H-15', H-11'
14'	1.03 s	28.3	C-13', C-5', C-3', C-4'	H-5', H-3'
15'	0.85 s	15.3	C-10', C-9', C-5', C-1'	H-13', H-6'a



V.2.7. Elucidation structurale du composé 12



Férulénol

Les bandes de maxima d'absorption présentes sur le spectre UV de ce composé à 213, 278 et 305 nm sont caractéristiques d'un sesquiterpène coumarinique [26].

Le spectre RMN proton de ce composé montre des signaux dans la zone des protons aromatiques caractéristiques du noyau coumarinique disubstitué. Les quatre singulets intégrants chacun pour trois protons et résonant à des champs plus ou moins faibles (δ_H 1,58, 1,62, 1,67 et 1,82 ppm) indiquent la présence de quatre méthyles oléfiniques (Figure III.66, Tableau III.13). Le spectre obtenu pour ce composé est identique à celui du férulénol, un sesquiterpène coumarinique fréquemment isolé dans le genre *Ferula* et déjà répertorié dans l'espèce *F. vesceritensis* [27 ; 28 ; 6].

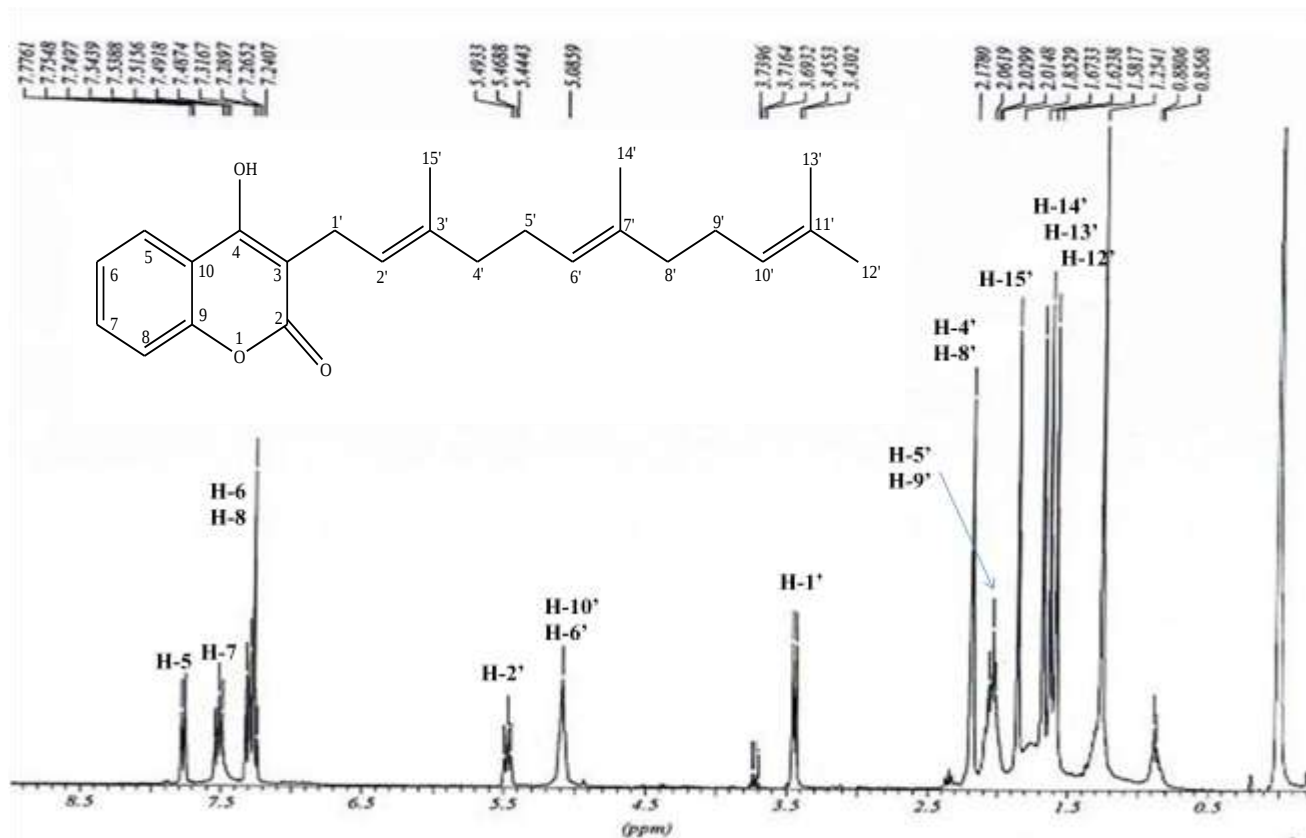
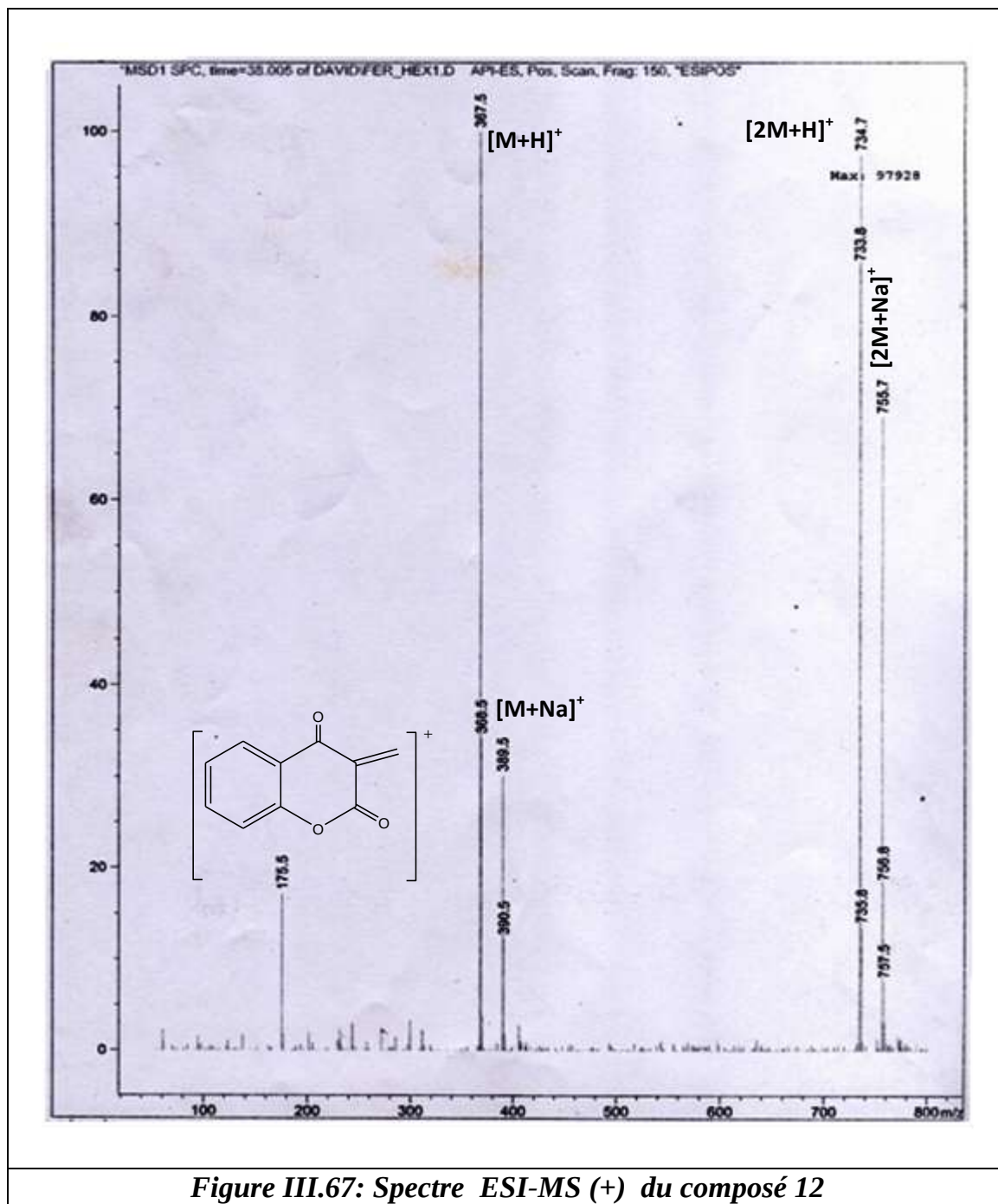


Figure III.66 : Spectre RMN Proton du composé 12

Par ailleurs, les ions fragments obtenus sur les spectres de masse en modes ESI et APCI positif et négatif notamment les ions à m/z 367,3, 389,2 et 365,5 correspondants respectivement à $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M-H]^-$ confirment la structure proposée (Figures III.67 et III.68).



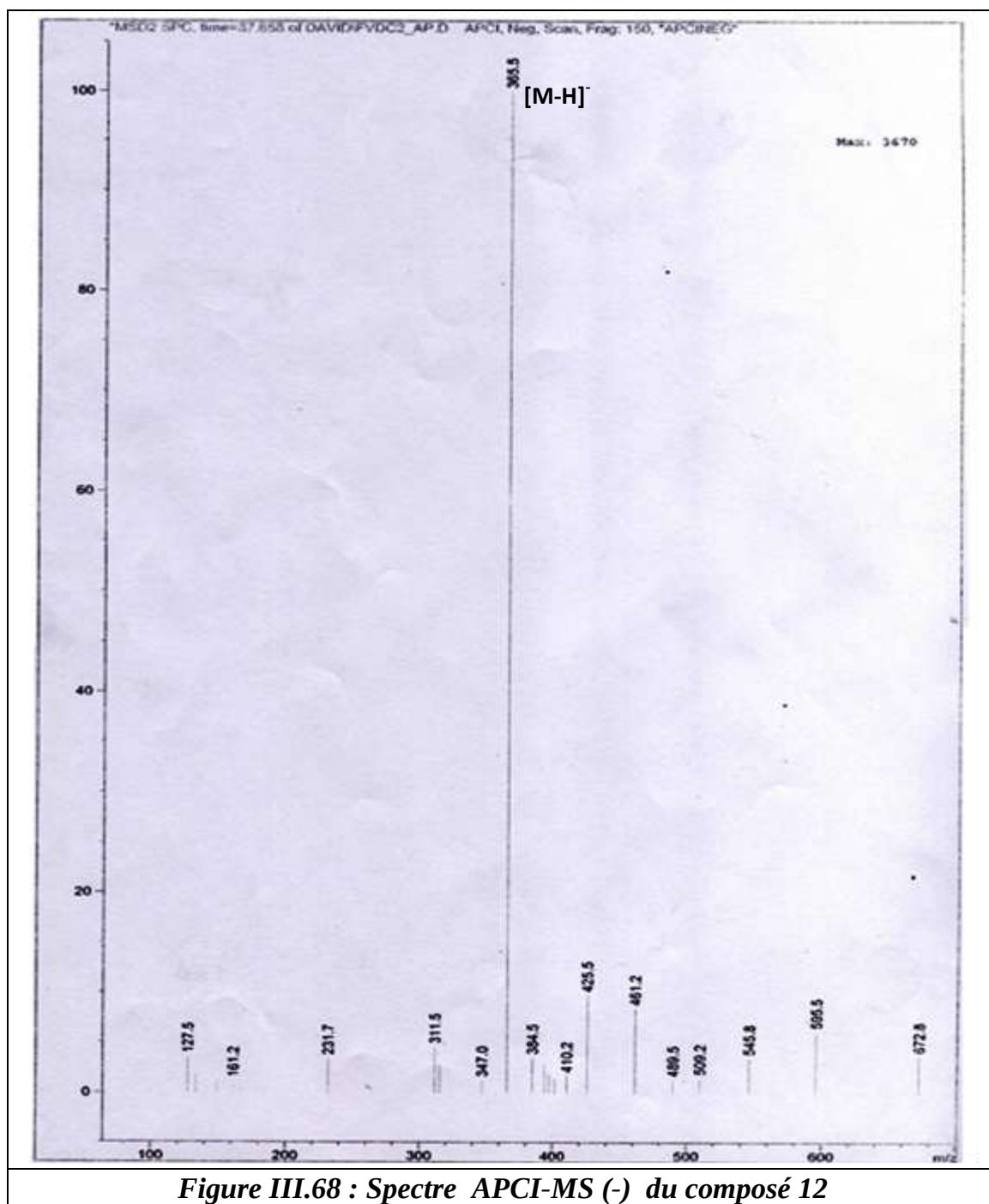
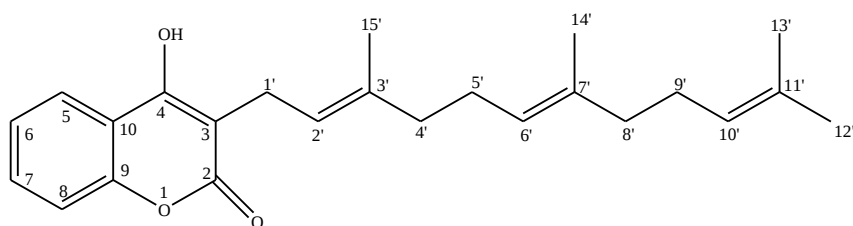


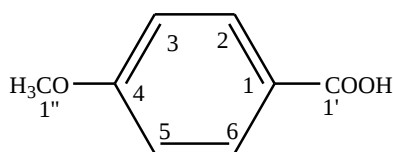
Figure III.68 : Spectre APCI-MS (-) du composé 12

Tableau III.13 : Valeurs des déplacements chimiques RMN ^1H (300 MHz) du composé 12 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H
1, 2, 3, 4	-
5	7.76 dd (7.9, 1.5)
6, 7	6.52 td (8.4, 1.3)
8	7.30 d (8.1)
9, 10	-
1'	3.45 d (7.3)
2'	5.47 t (7.3)
3', 7', 11'	-
4', 5', 8', 9'	2.01-2.17 m
12'	1.58 s
13'	1.62 s
14'	1.67 s
15'	1.85 s



V.2.8. Elucidation structurale du composé 13



Acide anisique

Ce composé est obtenu sous forme de cristaux blancs (Aiguilles). Son spectre RMN ^1H est d'une grande simplicité (Figure III.69, Tableau III.14). Les signaux observés sont en nombre de trois, deux résonant dans la zone des champs très faibles et intégrant chacun pour deux protons. Ces informations témoignent d'une structure aromatique disubstituée. Le signal sortant à δ_{H} 3,88 ppm suggère qu'un des groupements substituants est un méthoxyle. Le second est forcément un groupement attracteur tel qu'un carbonyle, vu son effet déblindant sur le déplacement des protons H-2 et H-6 (δ_{H} 8,08 ppm). Nous sommes parvenus à son identification par la comparaison des données obtenues à celles de la littérature comme étant une fonction carboxylique. La molécule proposée est par conséquent l'acide anisique (acide *p*-méthoxybenzoïque). Nous notons que ce composé est mis en jeu dans la biogénèse de plusieurs daucanes isolés de l'extrait DCM [29]. Par ailleurs, cet acide a été identifié dans l'extrait hexanique à l'issue de son analyse par GC/MS.

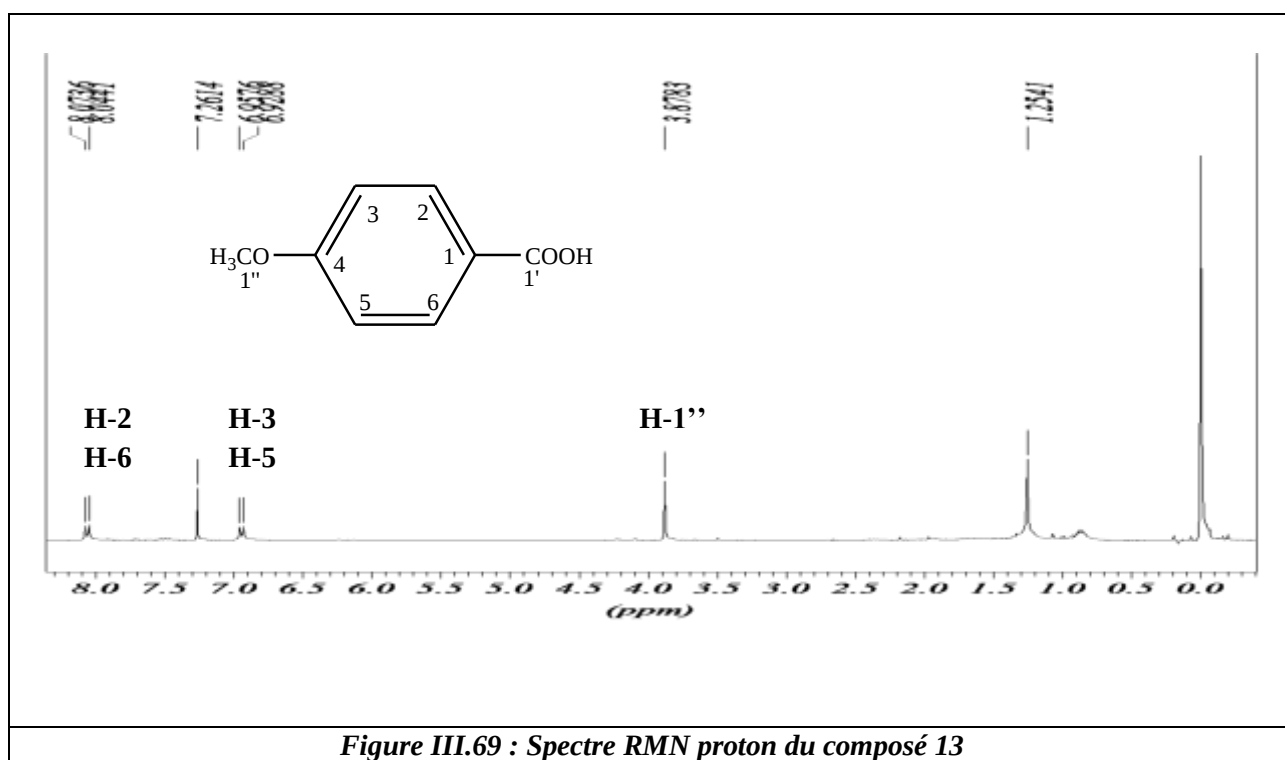
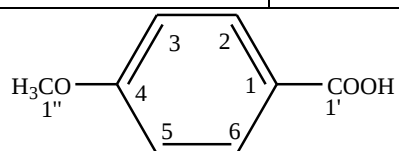


Tableau III.14 : Valeurs des déplacements chimiques RMN ^1H (300 MHz) du composé 13 dans CDCl_3/TMS (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H
1, 4	-
2, 6	8.05 d (8.7)
3, 5	6.94 d (8.7)
1''	3.88 s



V1. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE

Une masse de 20 g de l'extrait méthanolique est fractionnée au préalable par une VLC en utilisant une silice normale. L'élution a été réalisée par un mélange DCM-méthanol (de 100:0 à 0:100). Les fractions les plus polaires sont regroupées (10 g) pour subir une séparation sur une colonne CLMP de silice en phase inverse C-18. Un mélange méthanol-eau (de 5:95 à 50:50) est employé pour l'élution. L'analyse CCM des fractions obtenues (125) aux longueurs d'onde 254 et 366 nm et la révélation au réactif DBA, ont permis de les regrouper en 20 fractions.

Le schéma représenté sur la figure III.70 illustre les étapes de purifications réalisées sur l'extrait méthanolique. De plus amples détails seront donnés ultérieurement en partie expérimentale.

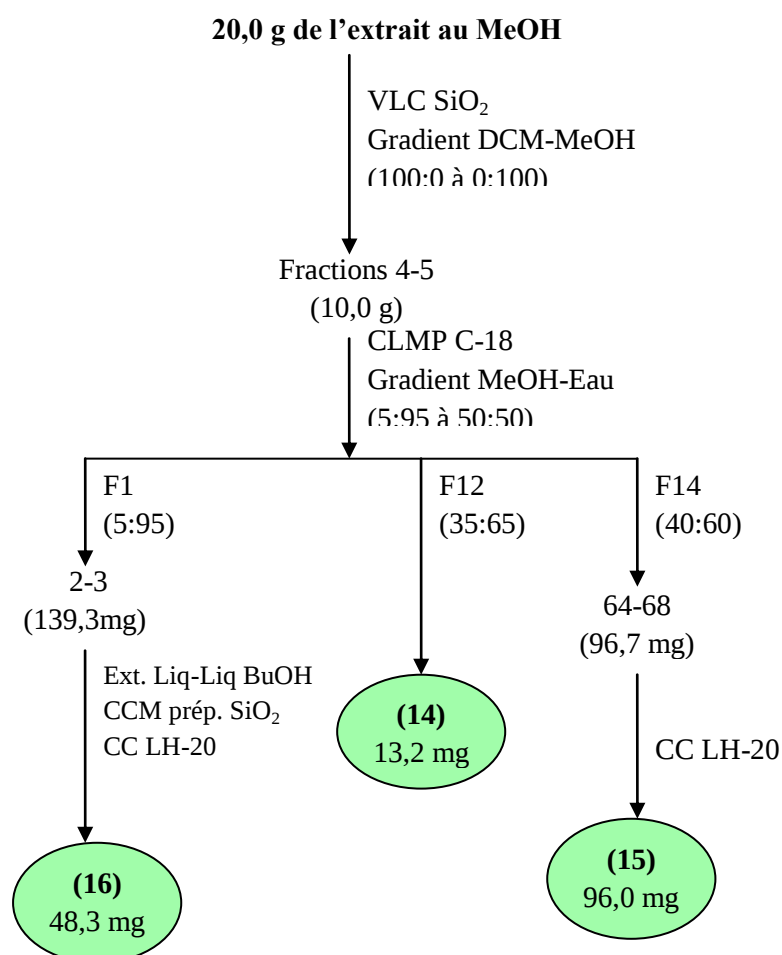


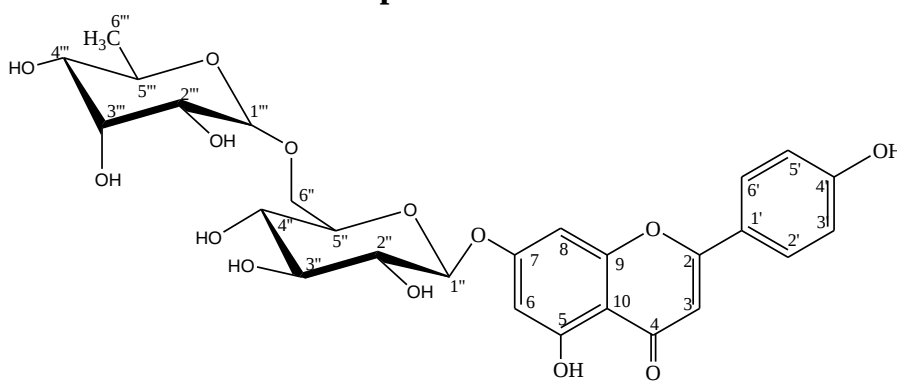
Figure III.70 : Schéma récapitulatif de l'isolement des composés de 14 à 16 de l'extrait méthanolique

VII. CARACTERISATION DES COMPOSES OBTENUS

L'investigation de la partie polaire de la composition chimique de l'espèce *F.vesceritensis* n'a fait l'objet d'aucune étude auparavant. Deux flavonoïdes représentant les deux produits majoritaires de cet extrait et un sucre, tous connus ont pu être isolés à l'issue de notre étude.

Les produits isolés ont été caractérisés par les diverses méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D (^1H et ^{13}C), RMN 2D (COSY H-H, DEPT, HSQC et HMBC) UV, spectrométrie de masse à basse résolution ESI/MS et par comparaison avec les données de la littérature.

VII.1 Elucidation structurale du composé 14



7-O- β -D-glucopyranosyl(1-6)- α -L-rhamnopyranoside apigénine (**14**)

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre de couleur marron (96,0 mg). Sur CCM, l'apparence de son spot présente toutes les caractéristiques d'une flavone, notamment une couleur violette à 366 nm, révélatrice d'une position libre en C-3 (absence de OH). Cette couleur devient orangée après pulvérisation par le DBA.

La structure flavonique est également confirmée par le spectre UV qui indique une absorbance à λ_{max} 326 nm pour la bande I et λ_{max} 268 nm de la bande II dans le méthanol. De plus, le déplacement bathochromique de la bande I de 13 nm après ajout d' AlCl_3 , indique la monosubstitution du noyau B, ce qui est par ailleurs traduit par les effets hyperchrome et bathochrome (17 nm) de la même bande dans la soude [30].

Le spectre de masse Electrospray en mode positif montre deux ions pseudo-moléculaires à m/z 579 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et à m/z 601 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ainsi que les ions fragments à m/z 433 $[\text{M}-146+\text{H}]^+$ et à m/z 271 $[\text{M}-146-162+\text{H}]^+$ correspondants à la perte de deux hexoses. En mode négatif un ion pseudo-moléculaire à m/z 577 $[\text{M}-\text{H}]^-$ est également observé (Figure III.71et III.72). A ce stade, nous pouvons déduire que nous sommes en présence d'une flavone diglycosylée et dihydroxylée, l'un des hydroxyles étant porté par le noyau B.

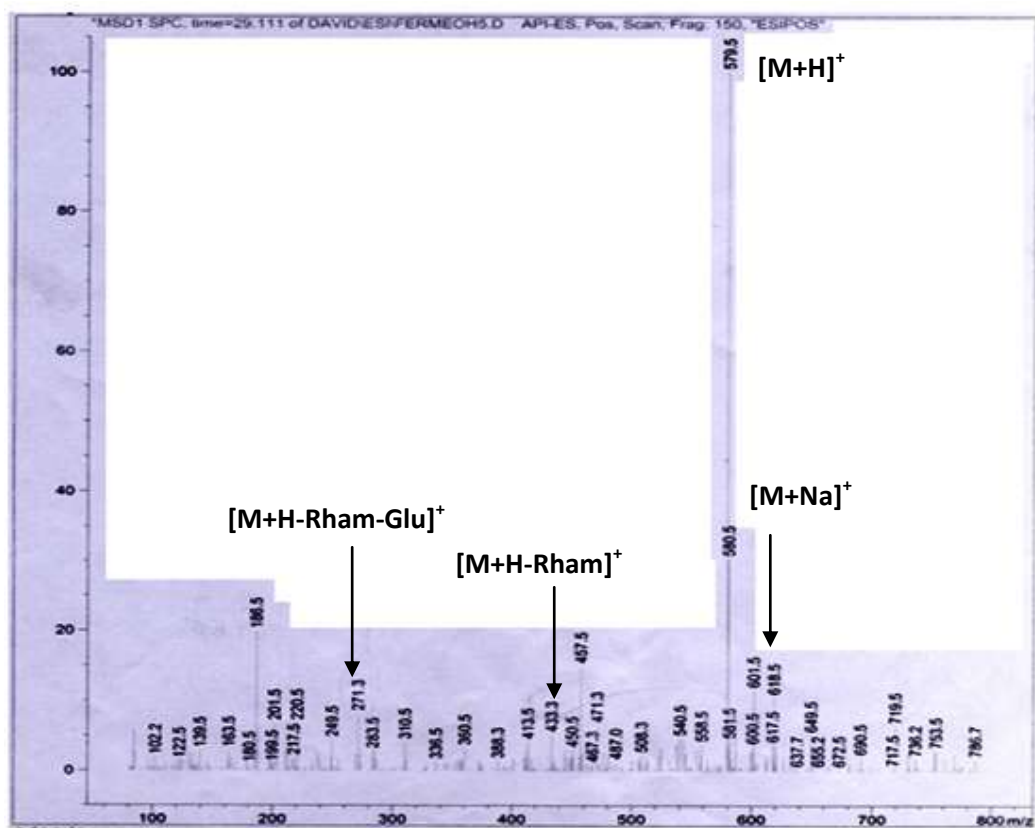


Figure III.71 : Spectre de masse ESI- MS en mode positif du composé 14

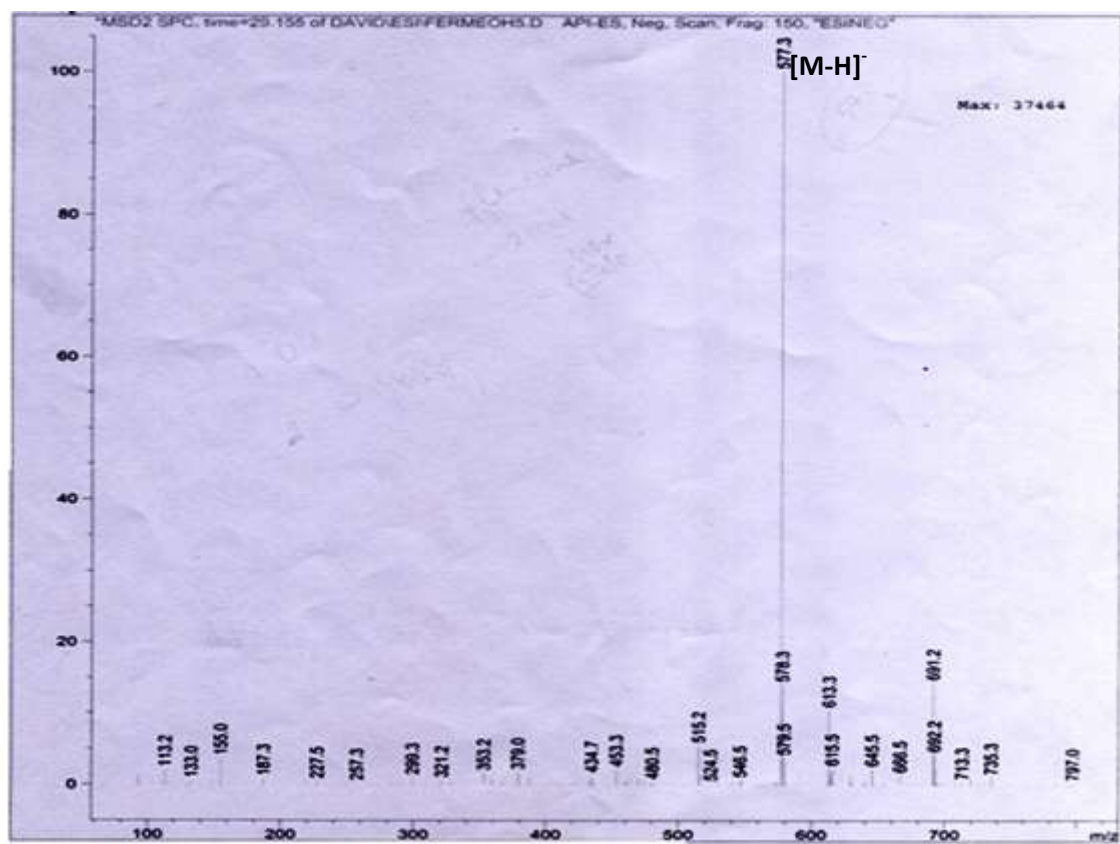
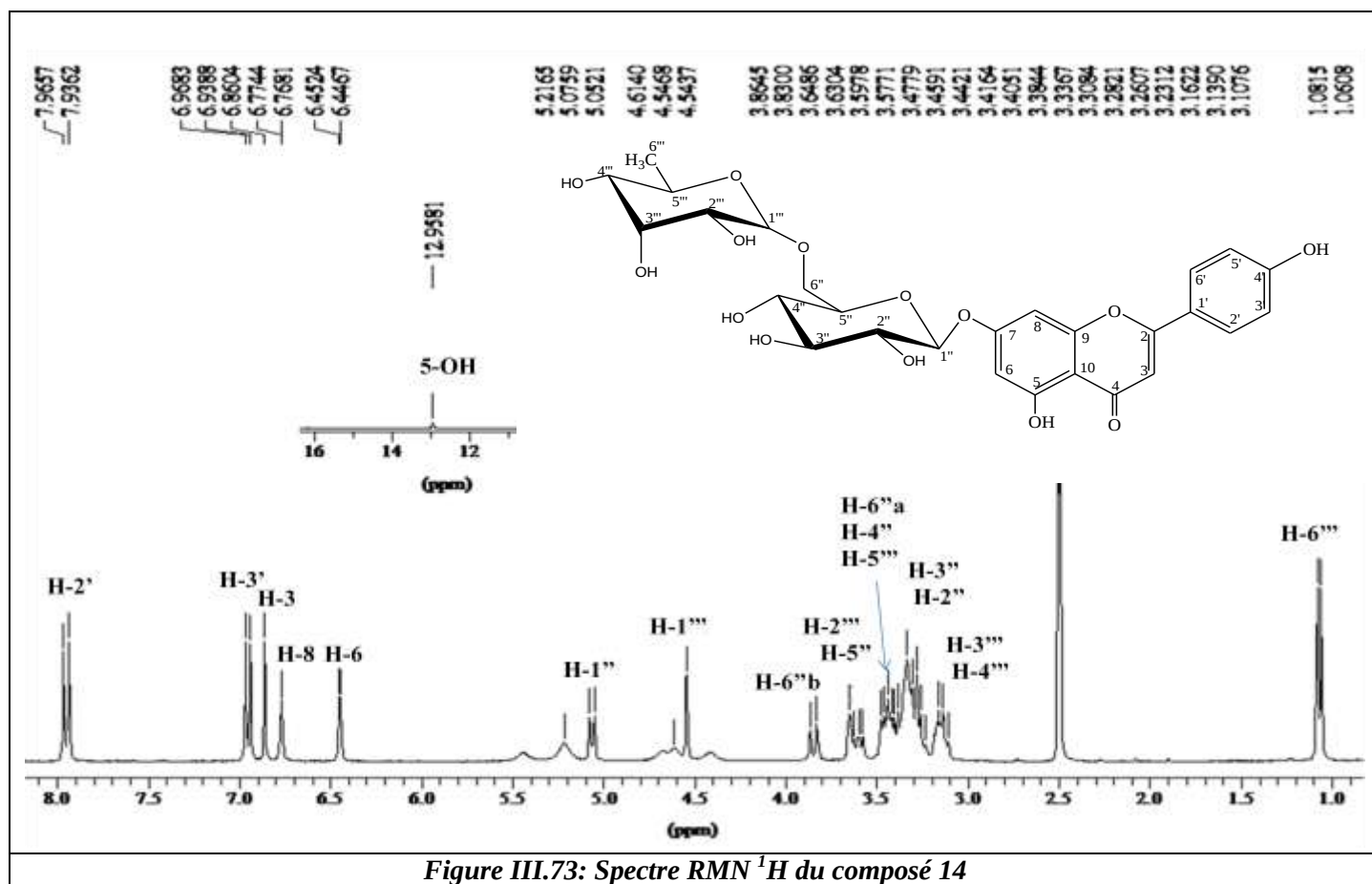


Figure III.72 : Spectre de masse ESI-MS (-) du composé 14

Le spectre ^1H de ce composé montre la présence de deux noyaux aromatiques différents (Figure III.73). Les protons aromatiques du cycle A d'un flavonoïde résonnent habituellement entre 6 et 6,5 ppm. Dans cette zone nous avons relevé deux protons aromatiques couplant entre eux en montrant deux doublets respectivement à 6,45 ppm (H-6) et 6,77 ppm (H-8) ($J=1,89$ Hz). Cette valeur de la constante de couplage est typique d'un couplage en *méta* sur un cycle aromatique. Ces signaux sont caractéristiques d'un cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7 [31 ; 32].

Concernant le cycle B, ses protons résonnent généralement entre 6,7 et 7,9 ppm [33]. Sur le présent spectre nous observons deux signaux intégrant chacun pour deux protons identiques à 7,95 ppm (H-2' et H-6', d, $J= 8,85$ Hz) et à 6,95 ppm (H-3' et H-5', d, $J= 8,85$ Hz). La valeur de la constante de couplage indique un couplage en *ortho* sur ce cycle, lequel est sans doute monosubstitué.

Le signal très déblindé sortant à 12,96 ppm, est attribué au proton chélaté (5-OH). Après l'examen du spectre RMN ^{13}C (Figure III.74), et sa comparaison aux données de la littérature [34] l'apigénine est proposée comme génine pour ce composé.



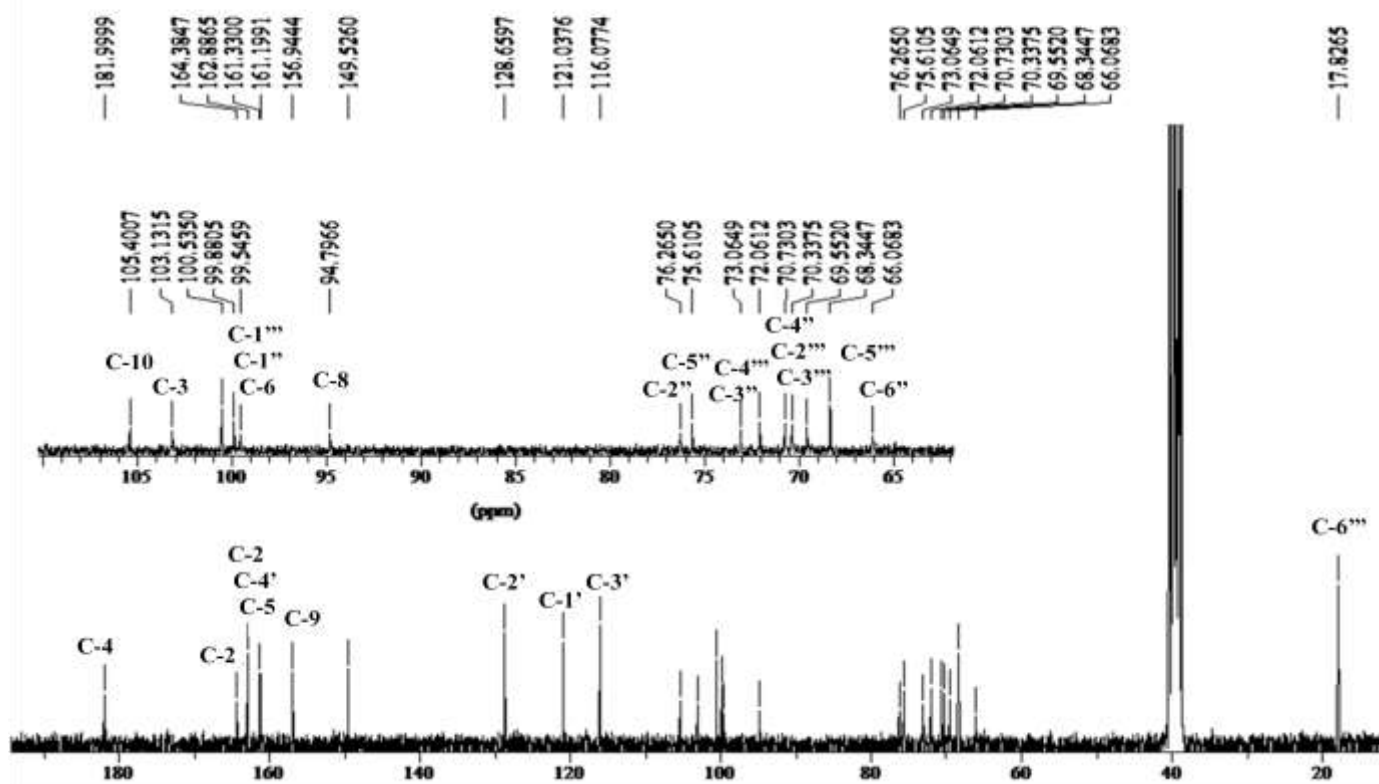


Figure III.74 : Spectre RMN ^{13}C du composé 14

La présence d'une partie osidique est clairement notée, confirmée notamment avec les deux protons anomériques à 5,06 ppm et à 4,54 ppm. Plusieurs autres signaux sont observés entre 3 et 4 ppm correspondant sans doute aux protons de la partie osidique. Le doublet relevé à 1,07 ppm dans la partie osidique lui est attribuable à un méthyle du rhamnose suggéré au préalable par la perte du fragment 146 uma sur le spectre de masse de cette molécule (Figure III.71).

La comparaison des données RMN ^1H et ^{13}C de cette partie osidique aux données de la littérature [31; 34 ; 35] a permis de l'identifier au β -D-glucopyranosyl(1-6)- α -L-rhamnopyranoside.

L'unité glucose se caractérise en RMN ^1H par les signaux δ_{H} 5,06 (H-1''), 3,30 (H-2''), 3,27 (H-3''), 3,44 (H-4''), 3,60 (H-5), 3,45 (H-6_A) et 3,83 (H-6_B). L'unité rhamnose correspond aux signaux 4,54 (H-1), 3,65 (H-2), 3,15 (H-3), 3,13 (H-4), 3,40 (H-5) et 1,07 (H-6) (Tableau III.15). L'analyse du spectre RMN ^{13}C a permis par ailleurs de définir la liaison interglycosidique (C1''-C-6''') par le déblindage ($\Delta\delta + 7$) des deux carbones concernés.

Les corrélations longues distances HMBC, entre le C-1''' du rhamnose et le proton H-6''a du glucose d'une part, et le H-1''' du rhamnose et le C-6'' du glucose d'autre part, confirment cette liaison interglycosidique. Ces corrélations permettent également de confirmer la liaison de la partie osidique sur la position C-7 de la flavone, grâce à la corrélation observée entre le proton anomérique H-1'' du glucose et le carbone C-7 (Figure III.75) L'orientation β du glucopyranosyle est déduite de la valeur de la constante de couplage de son proton anomérique $J = 7,14$ Hz [35 ; 32].

Ainsi ce composé est identifié au 7-O- β -D-glucopyranosyl(1-6)- α -L-rhamnopyranoside apigénine décrit ici pour la première fois dans l'espèce étudiée. Nous signalons que les 7-O- glycosides de l'apigénine sont des flavones communes dans le genre *Ferula* et même dans la famille des Apiaceae [36].

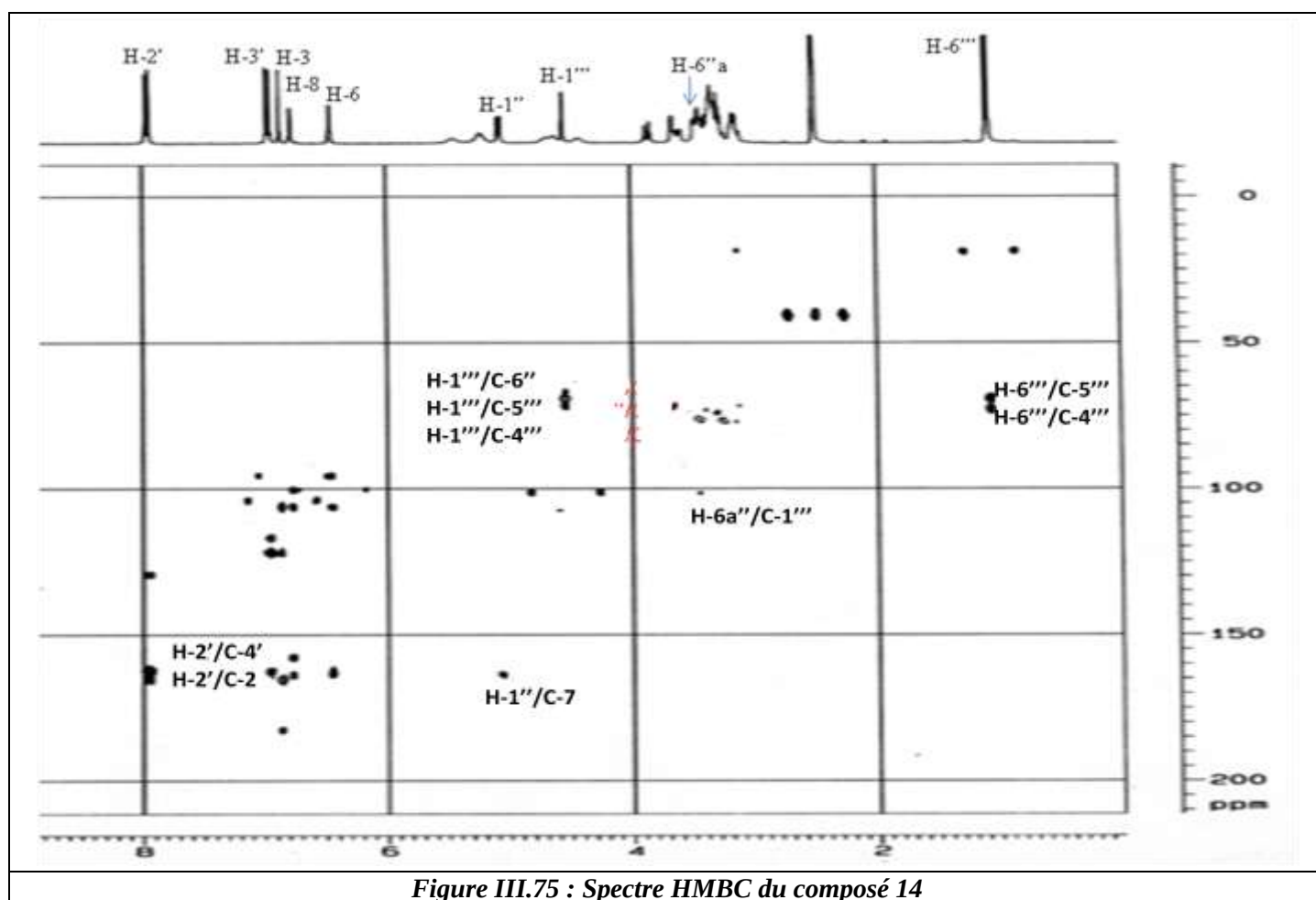
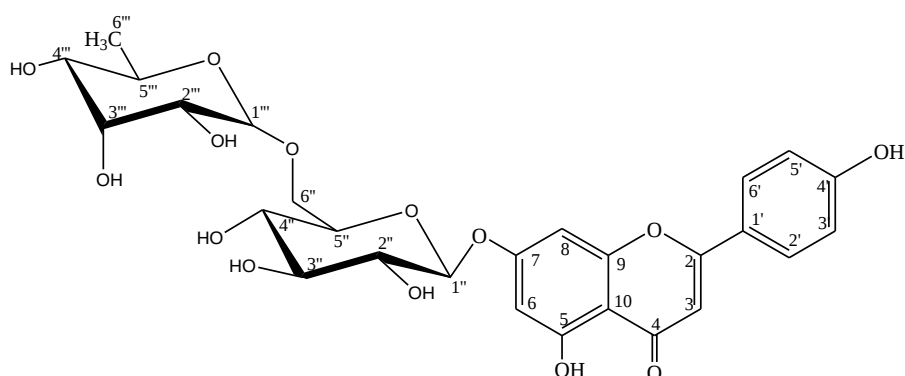


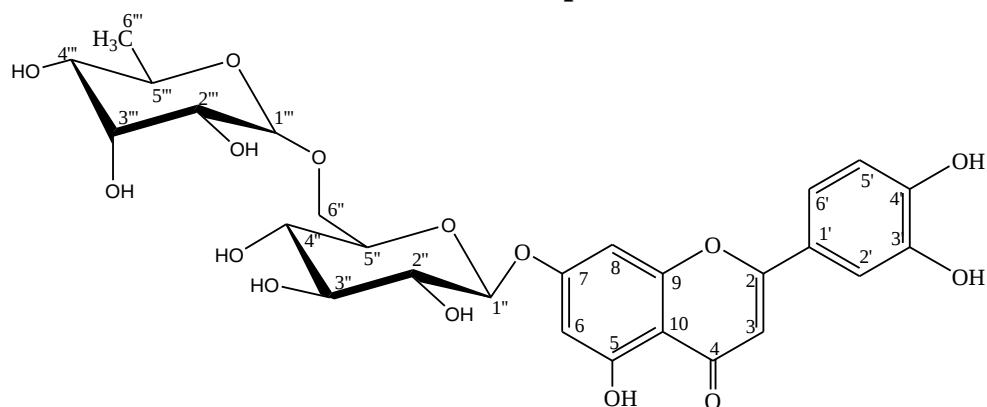
Figure III.75 : Spectre HMBC du composé 14

Tableau III.15 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (300MHz)) et corrélations HSQC et HMBC du composé 14 dans le DMSO (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HSQC	HMBC
2	-	164.4	-
3	6.86 s	103.1	C-10, C-1', C-4, C-2
4	-	182.0	-
5	-	161.2	-
6	6.45 d (1.89)	99.8	C-8, C-10
7	-	162.9	-
8	6.77 d (1.89)	94.8	C-6, C-10, C-9, C-7
9	-	156.9	-
10	-	105.4	-
1'	-	121.0	-
2', 6'	7.95 d (8.85)	128.7	C-2'', C-4'', C-2
3', 5'	6.95 d (8.85)	116.1	C-3'', C-1'', C-4'
4'	-	161.3	-
5-OH	12.96 s	-	-
Glucose			
1''	5.06 d (7.14)	99.9	C-7
2''	3.30 m	76.3	C-3''
3''	3.27 m	73.1	C-2'', C-5''
4''	3.44 m	70.7	C-5''
5''	3.60 m	75.6	C-1'', C-6''
6''	3.85 d (10.35) 3.45 m	66.0	C-1''', C-5''
Rhamnose			
1'''	4.54 m	100.5	C-5''', C-6'', C-2'''
2'''	3.65 m	70.3	-
3'''	3.15 m	69.5	-
4'''	3.13 m	72.1	C-5''', C-2''', C-6'''
5'''	3.40 m	68.3	C-4'''
6'''	1.07 d (6.21)	17.8	C-5''', C-4'''



VII.2. Elucidation structurale du composé 15



7-O- β -D-glucopyranosyl(1-6)- α -L-rhamnopyranoside lutéoline (**15**)

Ce composé est isolé sous forme de poudre de couleur marron (12,6 mg) de l'extrait méthanolique. Il présente à son tour les caractéristiques d'une flavone aussi bien sur CCM qu'en spectrophotométrie UV-Vis. Sa couleur est violette sous une lumière UV à 366 nm, révélant comme pour le composé précédent une position libre en C-3. [30]. Elle devient orangée sous UV après sa pulvérisation par le DBA.

Le spectre UV de ce composé présente une bande I avec une absorbance à $\lambda_{\max}$ 345 nm pour la bande I et $\lambda_{\max}$ 254 nm de la bande II dans le méthanol. Après ajout d' AlCl_3 , un déplacement bathochromique de la bande I de 81 nm, indique la présence de deux substituants sur le noyau B. L'effet hypsochrome également constaté après addition de HCl indique un système *orthodihydroxylé* sur le noyau B (3' et 4'). Le spectre enregistré dans la soude montre un effet hyperchrome confirmant une position C-4' hydroxylée.

Le spectre de masse enregistré en électrospray en mode positif montre deux ions pseudo-moléculaires à m/z 595 $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 619 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ainsi que deux ions fragments à m/z 449 et à m/z 287, attribués respectivement à la perte d'un déoxyhexose $[\text{M}-146+\text{H}]^+$ suivie de la perte du second hexose $[\text{M}-162-146+\text{H}]^+$. Par ailleurs un ion pseudo-moléculaire à m/z 593 $[\text{M}-\text{H}]^-$ est observé sur le spectre réalisé en mode négatif (Figures III.76 et III.77). Une différence de 16 uma est constatée par rapport au composé **14**, ce qui suggère que la génine du composé **15** possède un hydroxyle en plus, alors que la partie osidique est apparemment conservée dans les deux composés.

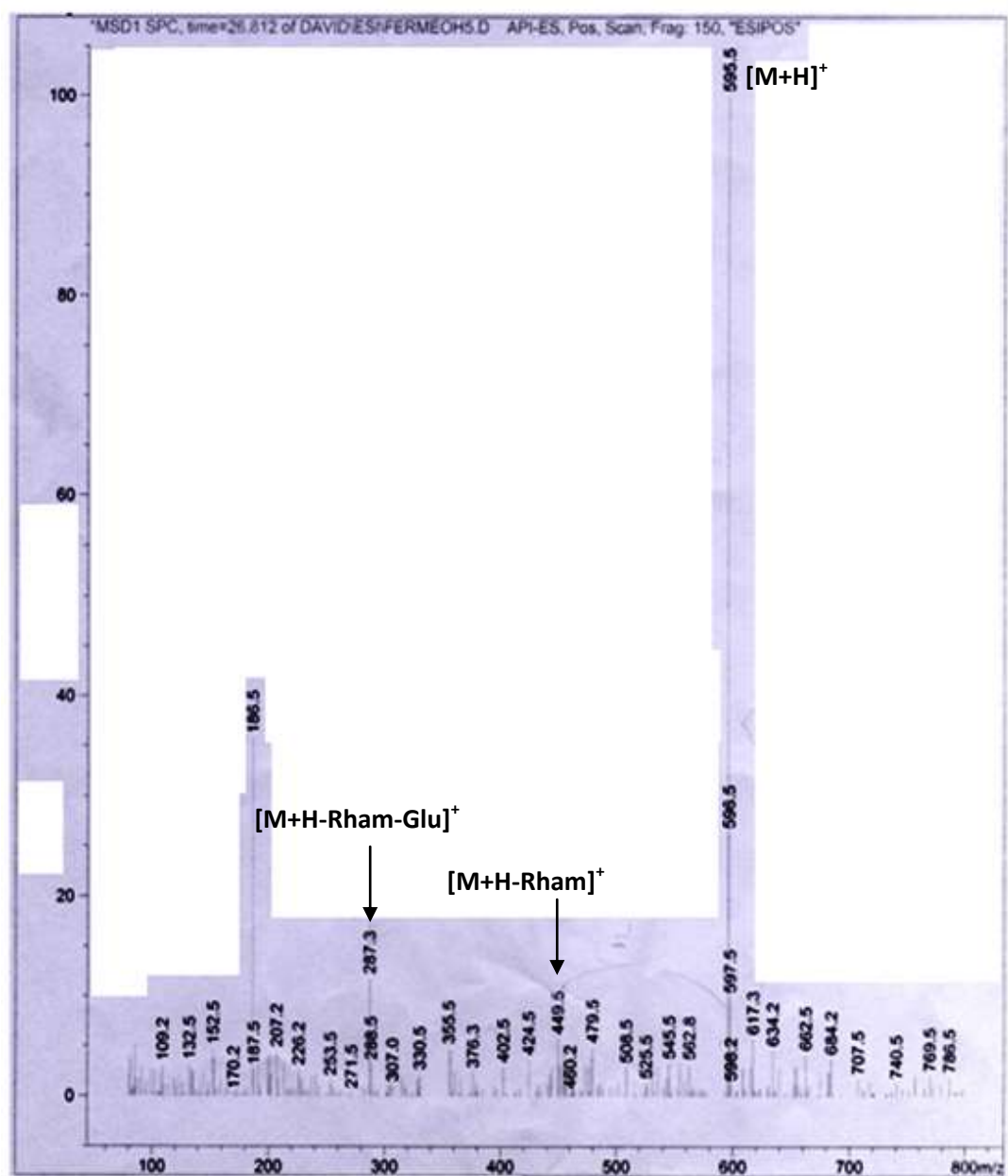


Figure III.76 : Spectre de masse ESI-MS en mode (+) du composé 15

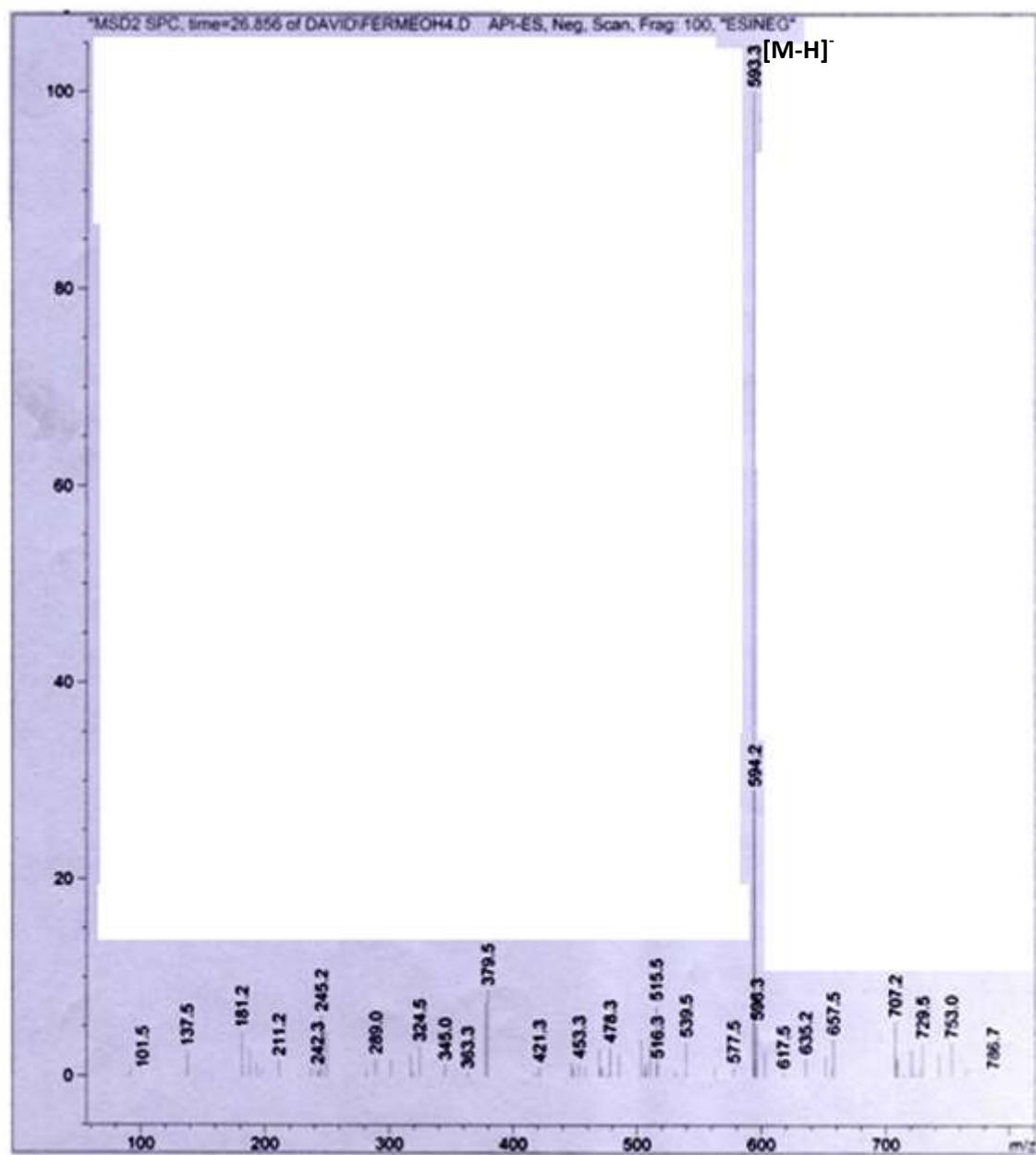


Figure III.77 : Spectre de masse ESI-MS en mode (-) du composé 15

L'examen des spectres RMN ^1H et ^{13}C révèle une étroite parenté entre les deux composés, toutefois une différence est notée au niveau de la partie aromatique concernant le cycle B. Les deux protons aromatiques du cycle A couplés en *mé*ta sont repérés respectivement à 6,71 ppm (H-6, d, $J=1,89$ Hz) et 6,50 ppm (H-8 d, $J=1,89$ Hz). Quant au cycle B, deux signaux intégrant respectivement pour un et deux protons sont observés, notons que ce dernier correspond à la superposition de deux signaux à 7,38 ppm (H-2' et H-6') et l'autre à 6,91 ppm correspond au proton H-5' couplé. Sa forme en doublet (d, $J=8,85$) montre qu'il couple en *ortho* avec le H-5'. Les données précédentes indiquent que le cycle B est 1', 3' et 4' trisubstitué. La lutéoline est proposée sans ambiguïté comme génine pour ce composé.

Concernant la partie osidique, l'analyse conjointe des spectres proton et carbone (Figures III.78 et III.79) a permis de confirmer qu'elle est bien identique à celle du composé **14**.

Toutes les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones ont été attribuées d'après les expériences de RMN 2D HSQC et HMBC (Tableau III.16), ainsi qu'en comparant ces données avec celles de la littérature [37 ; 34].

Les corrélations longues distances HMBC observées entre le C-1''' du rhamnose et le H-6''a du glucose d'une part, et le H-1''' du rhamnose et le C-6'' du glucose d'autre part, confirment que la liaison interglycosidique est entre C-1'' et C-6''.

L'observation de la corrélation entre le proton anomérique H-1'' du glucose et le carbone C-7, confirme par ailleurs la position de la partie osidique sur le carbone C-7 de la flavone (Tableau III.16). Compte tenu des informations précédentes, ce composé a été identifié à la lutéoline 7-O- β -D-glucopyranosyl(1-6)- α -L-rhamnopyranoside). Les 7-O-glycosides de la lutéoline sont également cités comme des marqueurs taxonomiques du genre *Ferula* [36].

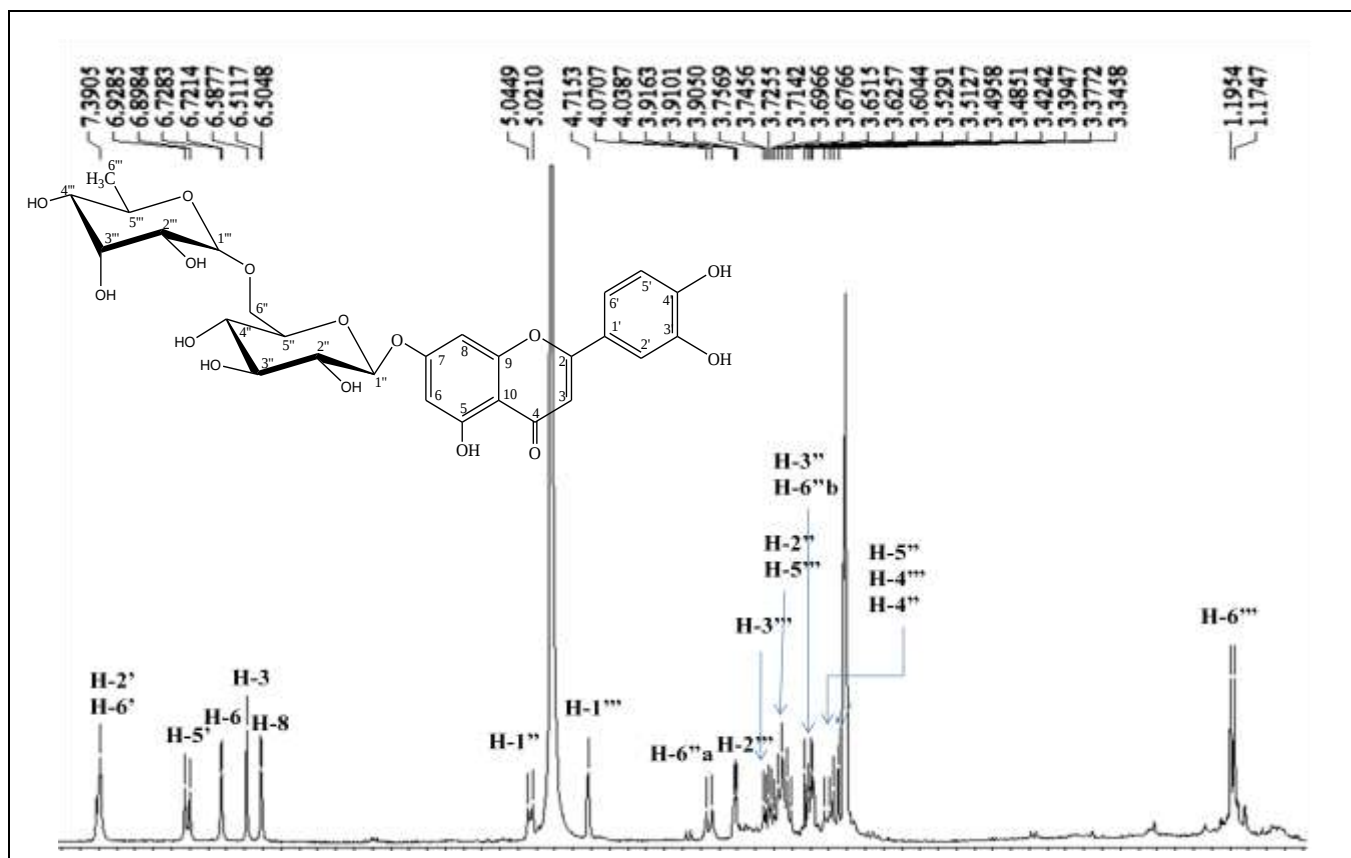


Figure III.78 : Spectre RMN proton du composé 14

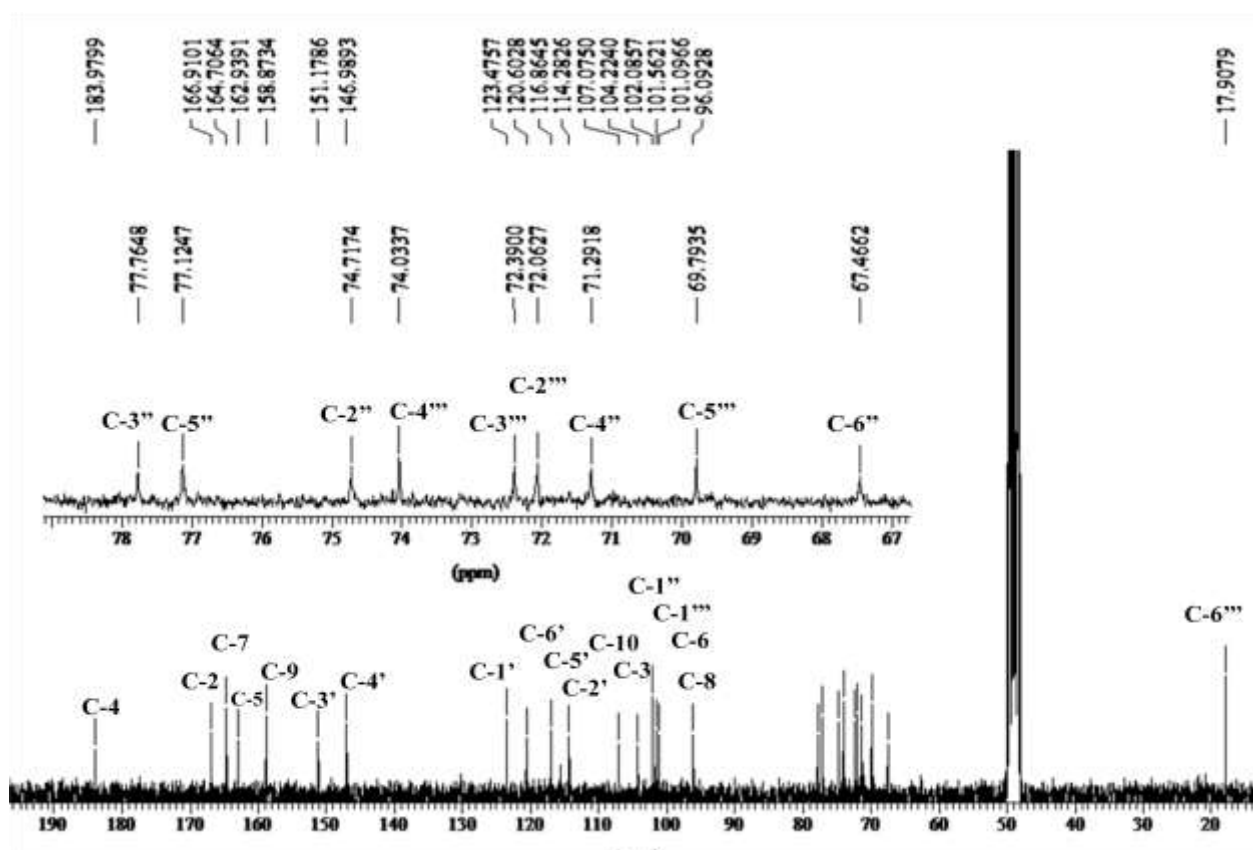
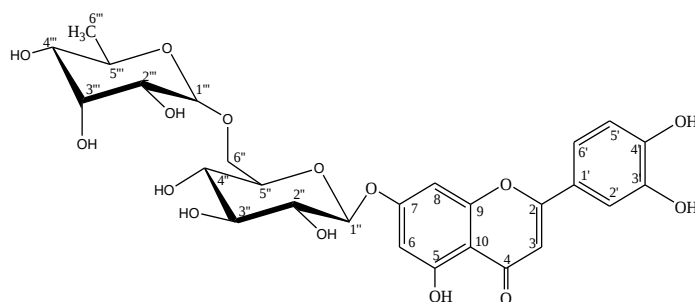


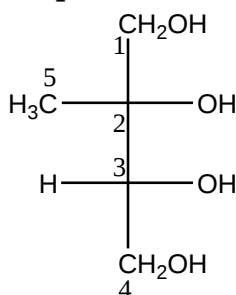
Figure III.79 : Spectre RMN carbone du composé 14

Tableau III.16 : Valeurs des déplacements chimiques RMN (^1H , ^{13}C (300MHz)) et corrélations HSQC et HMBC du composé 15 dans le CD_3OD (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C /HSQC	HMBC
2	-	166.9	-
3	6.58 s	107.1	C-10, C-1', C-4, C-2
4	-	183.9	-
5	-	162.9	-
6	6.71 d (1.89)	101.1	C-8, C-10, C-7
7	-	164.7	-
8	6.50 d (1.89)	96.1	C-6, C-10, C-9, C-7
9	-	158.9	-
10	-	114.3	-
1'	-	123.5	-
2'	7.38 m*	115.5	C-2'', C-3''
3'	-	151.2	-
4'	-	147.0	-
5'	6.91 d (8.8)	116.9	C-4'', C-1''
6'	7.38 m*	120.6	-
Glucose			
1''	5.02 d (7.2)	104.2	C-7
2''	3.66	74.7	C-3''
3''	3.51	77.8	C-2'', C-5''
4''	3.33	71.3	C-5''
5''	3.41	77.1	C-1'', C-6''
6''	4.05 d (9.6) 3.48 m	67.5	C-1'', C-5''
Rhamnose			
1'''	4.70 s	102.1	C-5''', C-6'', C-2'''
2'''	3.90 m	72.1	-
3'''	3.72	72.4	-
4'''	3.37	74.0	C-5''', C-2''', C-6'''
5'''	3.63	69.8	C-4'''
6'''	1.18 d (6.0)	17.9	C-5''', C-4'''
* Signaux superposés			



VII.3. Elucidation structurale du composé 16



2-C-Méthyl-D-érythritol (**16**)

Ce composé est obtenu sous forme d'une gomme incolore soluble dans l'eau. En CCM, il est révélé grâce à sa réaction avec l'acide sulfurique alors qu'une absence totale de l'absorption en UV lui est observée.

L'analyse des spectres RMN proton et carbone (Figures III.80 et III.81) montrent clairement qu'il s'agit d'une structure relativement simple. Le spectre proton présente de nombreux signaux dans la zone des protons osidiques entre 3,4 et 3,8 ppm. De plus un signal sous forme de singulet, résonant à 1,25 ppm et intégrant pour trois protons témoigne de l'existence d'un méthyle sur la structure.

D'autre part, parmi les cinq signaux présents sur le spectre ¹³C de ce composé, quatre sont caractéristiques des carbones osidiques (résonants entre 63 et 76 ppm). Le signal restant est lui attribué au groupement méthyle sur la base de sa valeur de déplacement (δ_C 19,34 ppm).

La comparaison des données précédentes avec celles de la littérature [38 ; 39 ; 40] identifie cette molécule au 2-C-méthyl-D-érythritol, un ose caractérisé antérieurement dans les racines de l'espèce *Ferula sinaica*, ainsi que dans *Liriodendron tulipifera* (Magnoliaceae) et *Phlox subulata* (Polemoniaceae) [39 ; 40 ; 41]. Par ailleurs, les glycosides de cet ose ont été mentionnés comme des composés communs dans les Apiaceae, notamment dans l'anis (*Pimpinella anisum*), la coriandre (*Coriandrum sativum*) et le cumin (*Cuminum cyminum*) [42].

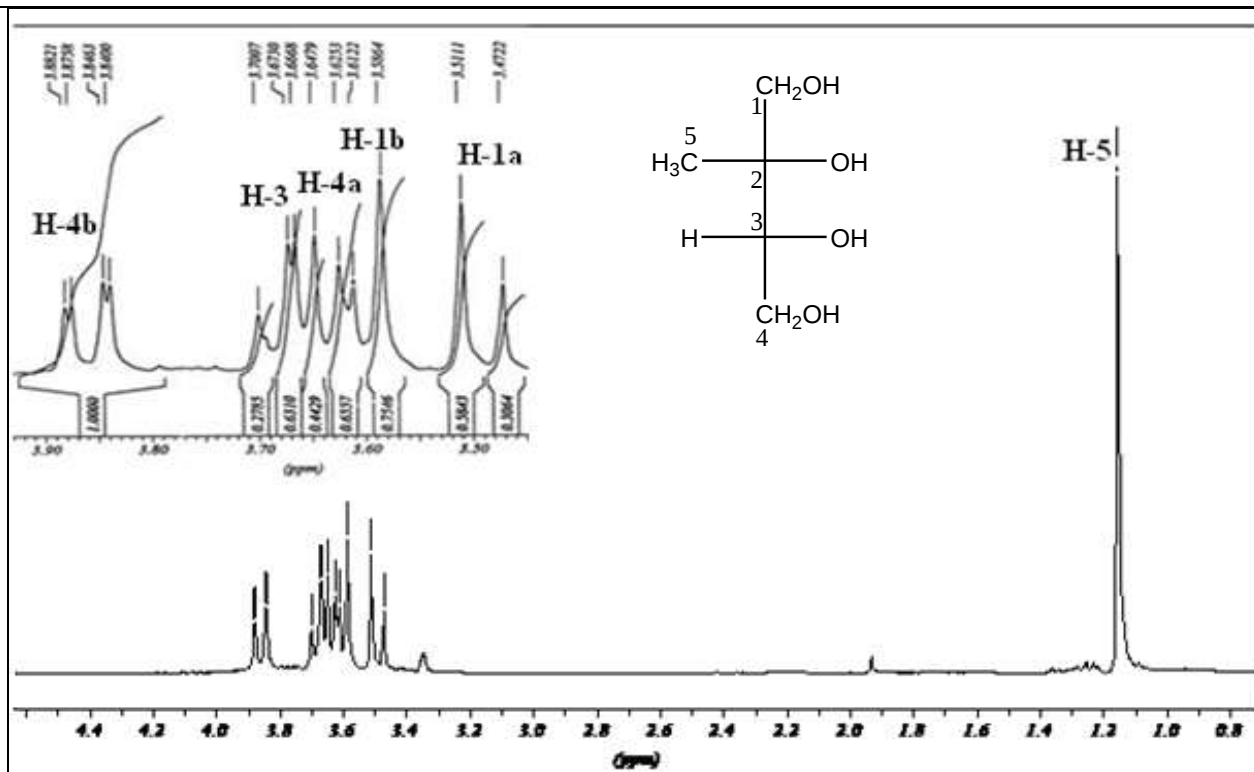


Figure III.80 : Spectre RMN proton du composé 16

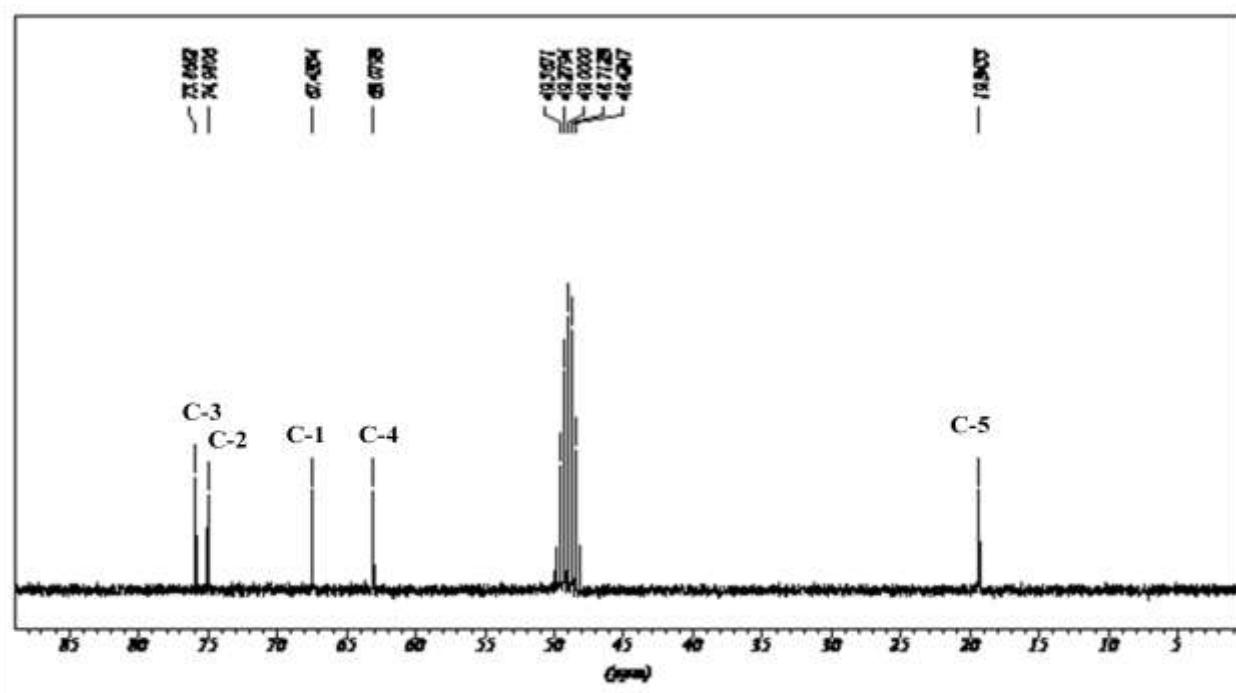
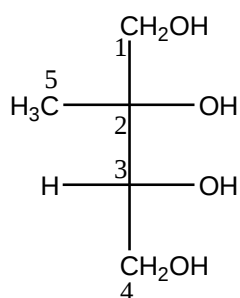


Figure III.81 : Spectre RMN carbone du composé 16

Tableau III.17: Valeurs des déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C (300 MHz) du composé 16 dans (MeOD+D₂O) (δ ppm ; J Hz)

Position	^1H	^{13}C
1 a b	3.49, d (11.7) 3.59, m	67.4
2	-	74.9
3	3.68 dd (1.9, 8.3)	75.8
4 a b	3.62 m 3.86 dd (1.9, 10.7)	63.0
5	1.25 s	19.3



VIII. ETUDE DE L'EXTRAIT HEXANIQUE PAR LES TECHNIQUES COUPLEES CLHP-UV-DAD, CL-SM ET CG-SM

VIII.1. Etude de l'extrait hexanique par CL-UV et CL-SM

Les profils CCM obtenus pour l'extrait à l'hexane des parties aériennes de *F.vesceritensis* ont révélé qu'il était d'une part, très riche en composés apolaires; d'une autre part, une similarité apparente est constatée entre ces profils et ceux obtenus pour l'extrait DCM déjà étudié.

Afin d'obtenir des informations préliminaires sur la nature des principaux constituants de cet extrait hexanique, celui-ci a été analysé par CLHP couplée en premier lieu à un détecteur UV à barrette de diodes puis en second lieu à un spectromètre de masse équipé de deux sources d'ionisation APCI et ESI, en maintenant les mêmes conditions opératoires que celles utilisées dans l'analyse de l'extrait DCM.

Dans le couplage CLHP-UV-DAD, nous disposons du spectre UV correspondant à chaque pic du chromatogramme, alors que le couplage CLHP-MS fourni, en fonction du type du mode d'ionisation employé, divers éléments relatifs à la masse moléculaire de chaque constituant d'un mélange. Les informations découlant du comportement en CLHP (temps de rétention en fonction du type de colonne) sont également comparées.

L'utilisation combinée de ces deux techniques permet des comparaisons avec des standards ou des données préalablement acquises. C'est la technique de choix pour caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels.

L'analyse par CLHP-UV-DAD dont le chromatogramme est présenté dans la figure III.82 a permis de fournir les différentes valeurs de maximas d'absorption sur les spectres UV de la majorité des pics. Celles comprises entre 253 et 258 nm sont attribuées aux daucanes estérifiés par des groupements aromatiques identifiés également grâce à la comparaison des temps de rétention des pics 1, 2, 3 et 8 à ceux de l'extrait DCM.

La présence des sesquiterpènes coumariniques est quant à elle, indiquée par les valeurs caractéristiques des λ_{max} , observées notamment à 213, 278 et 305 nm comme dans le cas du pic majoritaire 13. Les valeurs observées aux longueurs d'ondes beaucoup plus courtes (de 209 à 229 nm) sont attribuables à des molécules dépourvues de noyau aromatique dont nous n'avons pas pu avoir d'autres informations structurales.

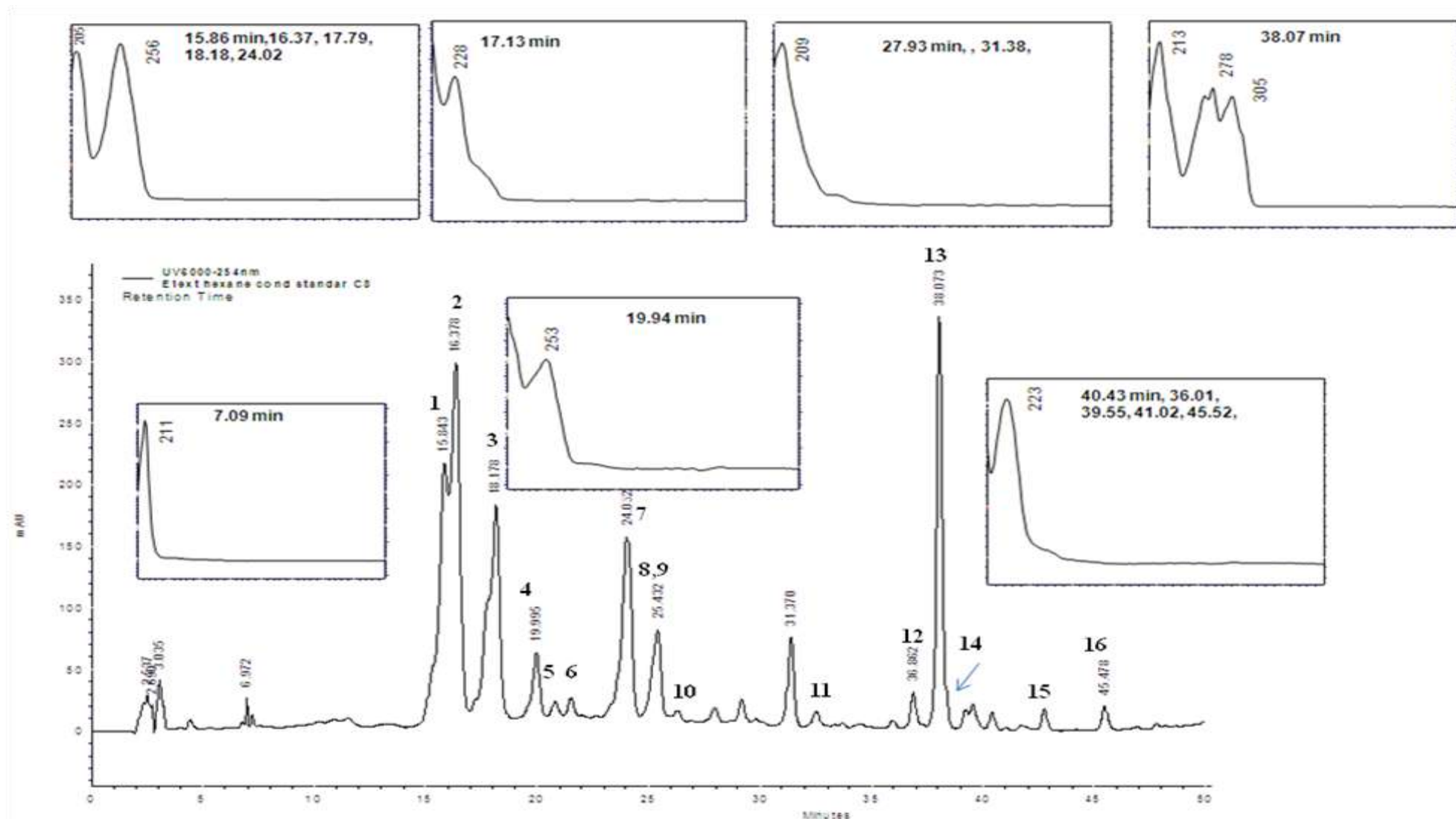


Figure III.82 : Analyse de l'extrait à l'hexane par LC-UV (détection à 254nm)

L'analyse par LC-MS a permis de fournir plus d'informations sur les structures présentes dans cet extrait. En effet, quelques molécules isolées et caractérisées au préalable à partir de l'extrait DCM ont été retrouvées dans cet extrait. Le pic majoritaire (13) sur le chromatogramme a été identifié au férulénol, alors qu'aux deux autres sesquiterpènes du même type (pics 5 et 6) sont attribuées respectivement les structures de fésélol et coladonine. L'identification s'est basée sur la comparaison des données relatives aux trois pics à celles des composés analogues isolés de l'extrait DCM.

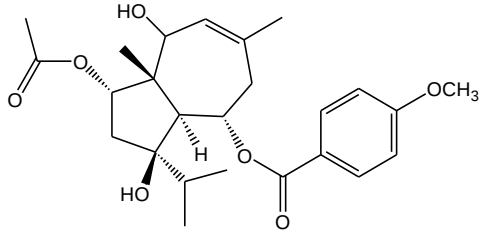
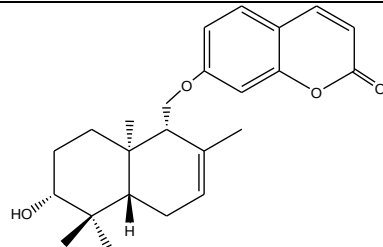
Les données de la spectrométrie de masse pour les quatre pics 1, 2, 3 et 8 confirment qu'ils correspondent à des sesquiterpènes de type daucane, d'une part. D'autre part, elles révèlent que le composé majoritaire représentant cette classe dans cet extrait (pic 2) est lui-même le composé majoritaire de l'extrait DCM. Il s'agit du 2 α -Acétyl-10 β -hydroxyjaescheanadiol-6 α -anisate.

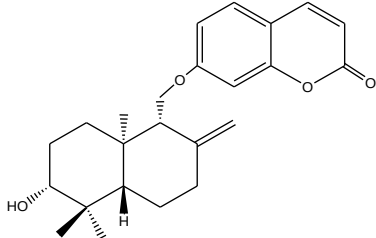
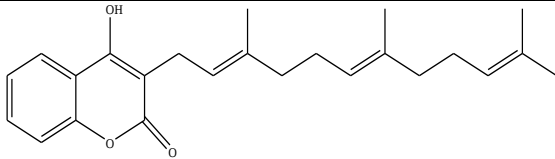
Les deux autres (pics 1 et 3) présentent les ions des fragments caractéristiques de daucanes estérifiés par un anisate et une acétyle : $[M+H-\text{Acide anisique}]^+$, $[M+H-H_2O-\text{Acide anisique}-\text{AcOH}]^+$, $[\text{Anisoyl}]^+$ et $[M-\text{AcOH}+H]^+$.

En revanche une seule molécule correspondant au pic 8 est estérifiée uniquement par un anisate compte tenu de la valeur de sa masse moléculaire (386 uma) déduite à partir des ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ respectivement à $m/z = 387$ et 385 obtenus dans les différents modes d'ionisation ESI et APCI positifs et négatifs.

La présence des fragments aux correspondant aux ions $m/z = 235$ $[M+H-\text{Acide anisique}]^+$ et $m/z = 135$ $[\text{Anisoyl}]^+$ confirment cette hypothèse. Un nombre de structures demeurent non élucidées. L'ensemble des informations apportées par cette étude non exhaustive est résumé dans le tableau III.18.

Tableau III.18: Résultats des analyses par CLHP-UV-DAD et LC-MS de l'extrait hexanique et structures proposées

Pic	t _R (mn)	λ _{max} (nm)	M	ESI (+)/(-) m/z	APCI (+) /(-) m/z	Structure proposée
1	15,79	257	428	ESI (+) <u>429</u> [M+H] ⁺ , 411[M-H ₂ O+H] ⁺ , 235, 217, 143, 101	APCI (+) <u>217</u> [M+H-H ₂ O-Acide anisique-AcOH] ⁺ 411[M-H ₂ O+H] ⁺ 369 [M-AcOH+H] ⁺ , 235[M+H- AcOH-Anisoyl] ⁺ , 259, , 203, 199, 189, 157	Daucane diestérifié (acétyle, anisate)
2	16,46	256	446	ESI (+) <u>429</u> [M+H-H ₂ O] ⁺ , 447[M+H] ⁺ , 430, 371[M-AcOH-Me] ⁺ , 217, 143, 101, 387, 371, 277,	APCI (+) <u>217</u> [M+H-2H ₂ O-Acide anisique-AcOH] ⁺ , 411[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 199, 429, 135[Anisoyl] ⁺	 2α-Acétyle-10β-hydroxyjaescheanadiol-6α-anisate (6)
3	18,16	256	444	ESI (+) 467[M+Na] ⁺ , 445[M+H] ⁺ , 293, 217	APCI (+) 369[M+H-AcOH] ⁺ , 293[M+H - Acide anisique] ⁺ , 217 [M+H- H ₂ O-AcOH-Acide anisique] ⁺	Daucane di-estérifié (acétyle, anisate)
4	19,95	254	-	ESI (+) <u>369</u> , 409, 385, 277, 235, 217,	APCI (+) <u>235</u> , 385, 369, 217, 199, 138	-
5	22,10	322	382	ESI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 405[M+Na] ⁺ , 365[M+H-H ₂ O] ⁺ , 217, 235, 175 ESI (-) <u>381</u> [M-H] ⁻	APCI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 365[M+H-H ₂ O] ⁺ APCI (-) <u>381</u> [M-H] ⁻ , 363 [M-H-H ₂ O] ⁻	 Fésélol (10)

6	23,29	316	382	ESI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 405 [M+Na] ⁺ , 323, 189, 199, 175, 157 ESI (-) <u>381</u> [M-H] ⁻	APCI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 235, 189, 175 APCI (-) <u>381</u> [M-H] ⁻ , 161, 311, 223, 197, 413	 Coladonine (11)
8	25,43	256	386	ESI (+) <u>387</u> [M+H] ⁺ , 235 [M+H-Acide anisique] ⁺ , 135 [Anisoyl] ⁺ , 105, 143, ESI (-) <u>385</u> [M-H] ⁻ , 217, 135	APCI (+) <u>387</u> [M+H] ⁺ , 379, 429, 271, 109 APCI (-) <u>385</u> [M-H] ⁻ , 135	Daucane estérifié (anisate)
9	25,70	-	398	ESI (+) <u>399</u> [M+H] ⁺ , 796 [2M+H] ⁺ , ESI (-) <u>397</u> [M-H] ⁻ , 795 [2M-H] ⁺	APCI (-) <u>397</u> [M-H] ⁻ , 379 [M-H-H ₂ O] ⁺	-
11	32,72	-	382	ESI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 405 [M+Na] ⁺ , 765 [2M+H] ⁺ , 787 [2M+Na] ⁺ ,	APCI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 353, 291 APCI (-) <u>381</u> [M-H] ⁻ , 370, 326, 300, 231,	-
12	36,98	-	382	-	APCI (+) <u>383</u> [M+H] ⁺ , 365 [M+H-H ₂ O] ⁺ APCI (-) <u>381</u> [M-H] ⁻	-
13	37,96	213, 278, 305	366	ESI (+) <u>367</u> [M+H] ⁺ , 389, 229, 201, 175, 149 ESI (-) <u>365</u> [M-H] ⁻ 731 [2M-H] ⁻ 426, 311	APCI (+) <u>367</u> [M+H] ⁺ APCI (-) <u>365</u> [M-H] ⁻	 Féculénol (12)
15	43,61	-	414	ESI (+) <u>415</u> [M+H] ⁺ , 437 [M+Na] ⁺ , 205	APCI (+) <u>415</u> [M+H] ⁺ APCI (-) <u>413</u> [M-H] ⁻	-
16	45,09	-	364	ESI (+) <u>365</u> [M+H] ⁺ , 387 [M+Na] ⁺ 729 [2M+H] ⁺ , 751 [2M+Na] ⁺ ,	APCI (+) <u>365</u> [M+H] ⁺	-

VIII.2. Analyse de l'extrait hexanique par GC/MS

Dans le but d'identifier les constituants volatils de cet extrait, nous avons entrepris d'abord une analyse par chromatographie en phase gazeuse liée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) sur une colonne capillaire apolaire (HP5-MS). Une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est ensuite réalisée en utilisant la colonne précédente.

Les conditions opératoires sont détaillées dans la partie expérimentale. Le tableau III.19 donne, selon l'ordre d'élution les composés identifiés dans cet extrait. Notons que l'identification a été faite d'une part grâce à la comparaison des indices de Kovats calculés à ceux de la littérature [43 ; 44, 45 ; 46 ; 47]. D'autre part, le dépouillement des spectres de masse obtenus et leur comparaison aux spectres de référence donnés dans les bibliothèques Nist 2, Wiley 275.L et CNRS.L et Adams [43] sont également effectués à cet effet. Le chromatogramme de l'extrait à l'hexane de *F.vesceritensis* est présenté à la figure III.83.

Vingt et un composés sont identifiés sur l'ensemble des composés décelés. A première vue, l'absence totale des monoterpènes est remarquable. Dans la première partie, les hydrocarbures volatils sont représentés exclusivement par le xylène et l'éthylbenzène. La partie médiane semble beaucoup plus riche, avec une prédominance d'hydrocarbures sesquiterpéniques à titre d'exemple l'aristolène, le δ -cadinène, le α -sélinène, le bicyclogermacrène et le D-germacrène. Deux isomères du cadinol représentent les sesquiterpènes oxygénés identifiés. Par ailleurs, les acides anisique, hexadécanoïque, oléique et linoléique ont été également mis en évidence dans cet extrait.

Notons que l'absence des teneurs obtenues en GC-FID pour la majorité des pics identifiés, ne nous a pas permis d'aborder l'aspect semiquantitatif de cette analyse.

Tableau III.19 : Identification de la composition chimique de l'extrait hexanique par GC/MS

N°	Composés	t _R	IR (HP5-MS)	% TIC
1	Xylène	8.30	-	0.87 (3.82)*
2	Ethylbenzène	9.50	-	0.38 /2.65
3	Aristolène	44.26	1411.7	1.83
4	Calarène	45.08	1422.6	0.45
5	Acide 4-méthoxybenzoïque (acide anisique)	45.87	1434.1	2.67
6	γ -Muuroène	47.98	1468.5	0.66
7	D-Germacrène	48.16	1470.9	0.46
8	α -Muuroène	49.45	1486.4	0.97
9	α -Sélinène	49.85	1501.0	0.90/7.03
10	γ - Cadinène	50.18	1506.4	1.96 (4.07)*
11	Bicyclogermacrène	50.50	1510.2	1.19
12	δ - Cadinène	50.83	1518	5.52
13	Cadina-1,4-diene (trans)	51.25	1522.9	0.47
14	α - Cadinène	51.55	1527.7	0.35
15	epi- α -Cadinol	57.40	1633.8	2.95
16	α -Cadinol	58.14	1648.2	1.31
17	Cadalène	59.81	1675.8	0.61
18	Néophytadiène	68.12	1835.4	0.92
19	Acide hexadécanoïque	74.35	1964.0	3.59
20	Acide linoléique	81.94	2132.6	1.73
21	Acide oléique	82.33	2141.4	5.01

*(% FID)

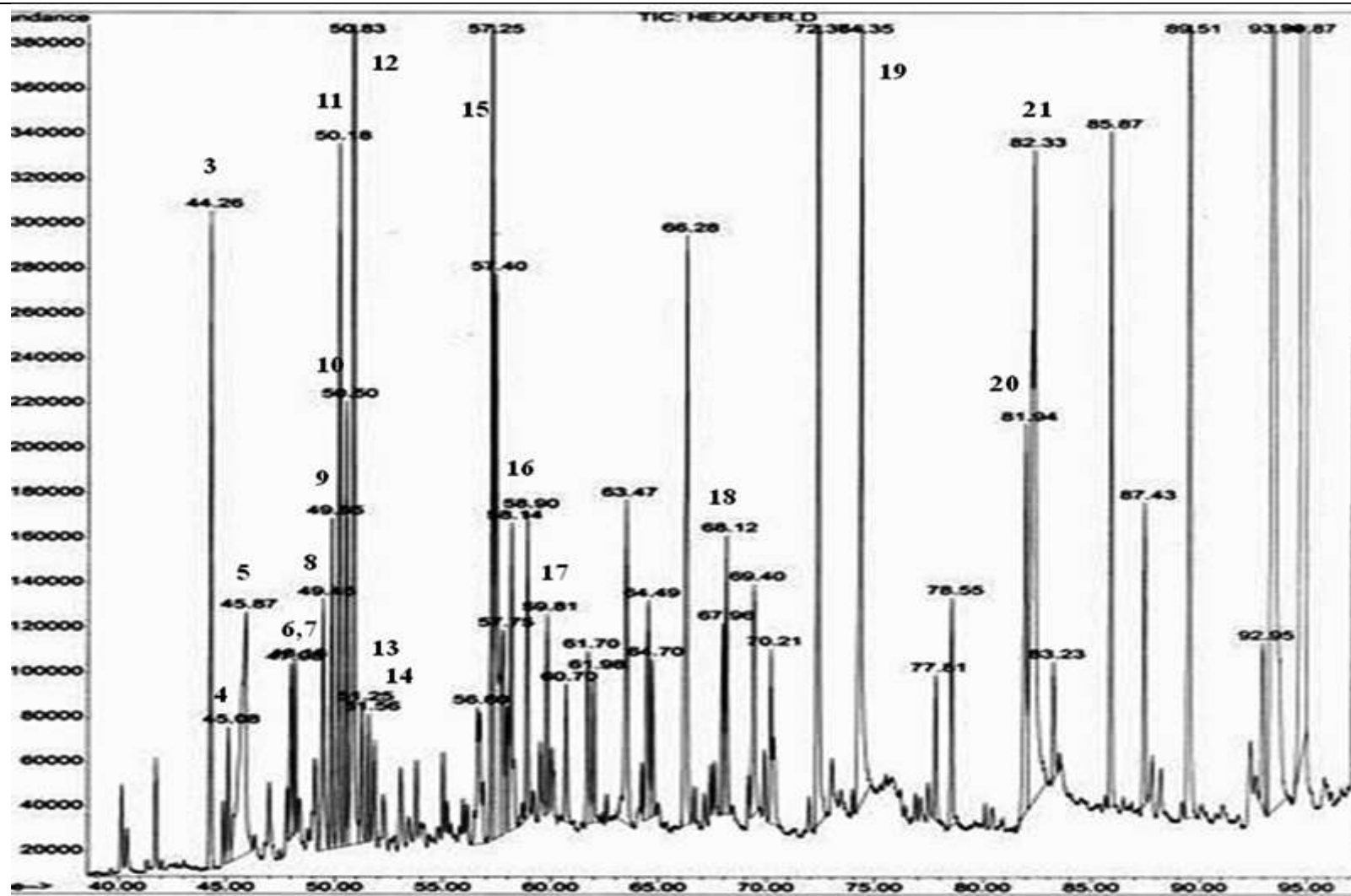


Figure III. 83 : Chromatogramme de l'extract hexanique de *F.vesca* obtenu par GC/MS

Bibliographie

- [1]- M. A. Al-Yahya, I. Muhammad, H.H. Mirza, *Phytother. Res.*, 12, 335-339, 1998.
- [2]- M. Bnouham, H. Mekhfi, A. Legssyer, A. Ziyat. *J. Diabetes & Metabolism*, 10, 33-50, 2002.
- [3]- P. Ozenda, *Flore et végétation du Sahara*. In : CNRS (Ed.), Paris, 1991.
- [4]- P. Quezel, S. Santa, *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales*. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris, 1963.
- [5]- E. Haston, J.E., Richardson, P.F. Chase, D.J. Harris, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 128-131, 2009.
- [6]- A. Zellagui, *Thèse de Doctorat ès Sciences, Université Mentouri-Constantine, Spécialité Phytochimie*, 2006.
- [7]- A.A. Ahmed, M-E F. Hegazy, A. Zellagui, S. Rhouati, T.A. Mohamed, A.A. Sayed, M.A. Abdella, S. Ohta, T. Hirata, *Phytochemistry*, 68, 680-686, 2007.
- [8]- M. Lahouel, R. Zini, A. Zellagui, S. Rhouati, P.A. Carrupt, D. Morin, *Res. Commun.*, 355, 252-255, 2007.
- [9]- A. M. Gamal-Eldeen, M.E.F. Hegazy, *Natural Product Research*, 24 (3), 246–257, 2010.
- [10]- E.L. Ghisalberti, *Phytochemistry*, 37, 597- 623, 1994.
- [11]- M. Misky, J.T. Mabry, *J. Nat. Prod.* 49 (4), 657-660, 1986.
- [12]- B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, P. Gonzalez, M.G. Hernandez, L.C. Larruga, *Phytochemistry*, 24, 501-504, 1985.
- [13]- G. Appendino, J. Jakupovic, S. Alloati, M.V. Ballero, *Phytochemistry*, 45 (8), 1639-1643, 1997.
- [14]- J.G. Diaz, B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, M.G. Hernandez, A. Perales, *Phytochemistry*, 25, 1661-1165, 1986.
- [15]- J.G. Diaz, B.M. Fraga, A.G. Gonzalez, M.G. Hernandez, *Phytochemistry*, 23(11), 2541-2544, 1984.
- [16]- Y. Diab, R. Dolmazon, B. Fenet, *Flav. Fragr. J.*, 16, 397-400, 2001.
- [17]- B. Chen, R. Teranishi, K. Kawazoe, Y. Takaishi, G. Honda, M. Itoh, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, *Phytochemistry*, 54, 717-722, 2000.
- [18]- M. Misky, A. Ulubelen, J.T. Mabry, *Phytochemistry*, 22, 2231-2233, 1983.
- [19]- A.G. Gonzalez, J.G. Diaz, L.A. Lopez, E. Valencia, P.P. De Paz, J.B. Barrera J.B., *Phytochemistry*, 33 (4), 863-866, 1993.
- [20]- G. Appendino, S. Tagliapietra, L. Paglino, G.M. Nano, D. Monti, V. Picci, *Phytochemistry* 29 (5), 1481-1484, 1990.
- [21]- A.A. Ahmed, *Phytochemistry*, 30 (4), 1207-1210, 1991.
- [22]- J. Cumanda, G. Marinoni, M. De Bernardi, G. Vidari, P. Vita Finzi, *J. Nat. Prod.*, 54, 460-465, 1991.
- [23]- M. Misky, A. Ulubelen, E. Lee J.T. Mabry, *J. Nat. Prod.*, 48 (2), 326-327, 1985.
- [24]- G. Appendino, G. Cravatto, O. Sterner, M. Ballero, *J. Nat. Prod.* 64, 393-395, 2001.
- [25]- M. Pinar, B. Rodriguez, *Phytochemistry*, 16, 1987-1989, 1977.
- [26]- L. Arnoldi, M. Ballero, N. Fuzzati, A. Maxia, E. Mercalli, L. Pagni, *Fitoterapia*, 75, 342- 354, 2004.

- [27]- D. Lamnaouer, O. Fraigui, M.T. Martin, B. Bodo, *Phytochemistry*, 30, 2383-2386, 1991.
- [28]- M. G. Valle, G. Appendino, G.M. Nano, V. Picci, *Phytochemistry* 26 (1), 253-256, 1987.
- [29]- M. G. Pimenov, Y. E. Sklyar, A. A. Savina, Y.U.V Baranova, *Biochemical Systematics and Ecology*, 10 (2), 133-138, 1982.
- [30]- B. Voirin, *Phytochemistry*, 22 (10), 2107-2145, 1983.
- [31]- K.R. Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press. London. 1982.
- [32]- A. Lhuillier, Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Spécialité : Sciences des Agroressources, 2007.
- [33]- J.T. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag. Berlin, 1970.
- [34]- M. Kassem, S. Mosharrafa, N. Saleh, *Fitoterapia*, 71, 649–654, 2000.
- [35]- J.H. Wang, F.C. Lou, Y.L. Wang, Y.P. Tang, *Phytochemistry*, 63, 463-465, 2003.
- [36]- X.Y. Chen, Q.X. Liu, *Biochemical Systematics and Ecology*, 17 (4), 309-310, 1989.
- [37]- Y. Champavier, P. D. Allais, A. J. Chulia, M. Kaouadji, *Chem. Pharm. Bull.*, 48 (2) 281- 282, 2000.
- [38]- K. Kiss, J. Wungsintaweeikul, W. Eisenreich, M.H. Zenk, A. Bacher, *J. Org. Chem.*, 65, 587-592, 2000.
- [39]- P. Dittrich, S.J. Angyal, *Phytochemistry*, 27(3), 935. 1988.
- [40]- H. Enomoto, K. Kohata, M. Nakayama, Y. Yamaguchi, K. Ichimura, *Journal of Plant Physiology*, 161, 977–980, 2004.
- [41]- A.A. Ahmed, M. Abd El-Razek, E.A. Abu Mostafa, H.J. Williams, A.I. Scott, J.H. Reibenspies, J.T. Mabry, *J. Nat. Prod.*, 59, 1171-1173, 1996.
- [42]- J. Kitajima, T. Ishikawa, E. Fujimatu, K. Kondho, T. Takayanagi, *Phytochemistry* 62, 115–120, 2003.
- [43]- R.P. Adams, *Identification of essential oils compounds by gas chromatography/mass spectroscopy*, 4TH edition Allured Publishing Corporation, Illinois. 9-29, 1989,
- [44]- B. Ferrari, F. Tomi, J. Casanova, *Flav. Fragr. J.*, 20, 180–185, 2005.
- [45]- K. Javidnia, R. Miri, M. Kamalinejad, N. Edraki, *Flav. Fragr. J.*, 20, 605–606, 2005.
- [46]- Y. Ghasemi, P. Faridi, I. Mehregan, A. Mohagheghzadeh, *Chemistry of Natural Compounds.*, 41 (3), 312-314, 2005.
- [47]- M. Khajeh, Y. Yamini, N. Bahramifar, *Food Chemistry*, 91, 639–644. 2005.
- [48]- G. Dehghan, R. Solaimanian, A.R. Shahverdi, G. Amin, M. Abdollahi, A. Shafiee, *Flav. Fragr. J.*, 22, 224–227, 2007.

Chapitre IV

EVALUATIONS BIOLOGIQUES DES EXTRAITS ET DES MOLECULES ISOLEES SUR LA PGP ET LA BCRP

La thématique de l'équipe de recherche à laquelle appartient le laboratoire d'accueil (UMR 5557 CNRS, Ecologie Microbienne, ISPB, Université de Lyon-1, 69373, Lyon, France) porte essentiellement sur la recherche de molécules naturelles ou de synthèse inhibitrices de deux transporteurs ABC impliqués dans les mécanismes de la MDR : Pgp et BCRP.

Le criblage des divers extraits issus de 4 plantes médicinales (*Ferula vesceritensis* (Apiaceae), *Retama retam* (Fabaceae), *Zygophyllum album* (Zygophyllaceae) et *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) sur le transporteur Pgp, a contribué à la sélection de la plante étudiée. La majorité des sesquiterpènes isolés de l'extrait DCM de cette espèce ont fait l'objet d'évaluations biologiques à leur tour, sur les deux transporteurs ABC précédents.

I. CRIBLAGE SUR LA PGP (cellules sélectionnées)

Des cellules leucémiques chimio-résistantes (lignée de cellules K562/R7) en phase exponentielle de croissance sont mises en présence d'un modulateur et de la daunorubicine (DNR). Ce dernier composé est un substrat fluorescent de la Pgp dont l'accumulation intracellulaire peut être quantifiée par cytométrie de flux. Parallèlement, des témoins négatifs sont inclus dans chaque expérience (cellules sans DNR et cellules avec DNR seule) afin de connaître respectivement l'autofluorescence des cellules et la fluorescence de la DNR en absence de modulateur.

De plus, un témoin positif est aussi réalisé (cellules + DNR + Cyclosporine A (CsA) utilisée comme modulateur de référence de la Pgp).

La fluorescence des cellules représente une bonne évaluation de la quantité de DNR intracellulaire. En l'absence de modulateur de Pgp, les cellules K562/R7 expulsent une forte proportion de la drogue; elles accumulent peu de DNR; et sont donc peu fluorescentes. En présence d'un modulateur comme la CsA, la Pgp est inhibée et la quantité de DNR accumulée dans les cellules augmente. Les cellules sont alors plus intensément fluorescentes.

L'effet modulateur de nos produits est évalué en effectuant le rapport suivant :

$$(A) \text{ Activité} = \frac{F_{(DNR+\text{produit})}^a - F_{DNR}^b}{F_{(DNR+CsA)}^c - F_{DNR}^b} \times 100 \quad [1]$$

^a $F_{(DNR+\text{produit})}$ = fluorescence de la DNR en présence du produit à tester.

^b F_{DNR} = fluorescence en présence de la DNR seule (témoin négatif).

^c $F_{(DNR+CsA)}$ = fluorescence de la daunorubicine en présence du CsA (témoin positif).

Si l'activité est égale à 100%, l'effet du composé testé est équivalent à celui de la CsA.

L'activité inhibitrice de l'efflux de la daunorubicine par Pgp est évaluée pour les extraits de 4 plantes ainsi que les neuf sesquiterpènes isolés de *F.vesceritensis*. Les extraits bruts et les molécules sont testés à une concentration de 10 µg, sur des cellules K562/R7 (surexprimant Pgp) analysées par cytométrie de flux sur FACS-II. Les résultats présentés sur les figures IV.1 et IV.2 sont exprimés en comparant l'augmentation de la fluorescence de la daunorubicine induite par les extraits par rapport à celle observée avec la cyclosporine A grâce à la relation (A).

➤ Résultats et discussion

▪ Extraits

Les extraits des trois plantes (*Retama retam*, *Zygophyllum album* et *Pergularia tomentosa*) n'ont pas révélé une activité inhibitrice significative de Pgp. Cependant, les résultats obtenus pour les extraits hexanique et au DCM de *F.vesceritensis* sont similaires à ceux du modulateur de référence. L'extrait méthanolique de la même espèce apparaît remarquablement moins actif, alors que son huile essentielle s'avère être la plus active avec une inhibition environ deux fois plus importante par rapport à celle de la Cyclosporine A (Figure IV.1).

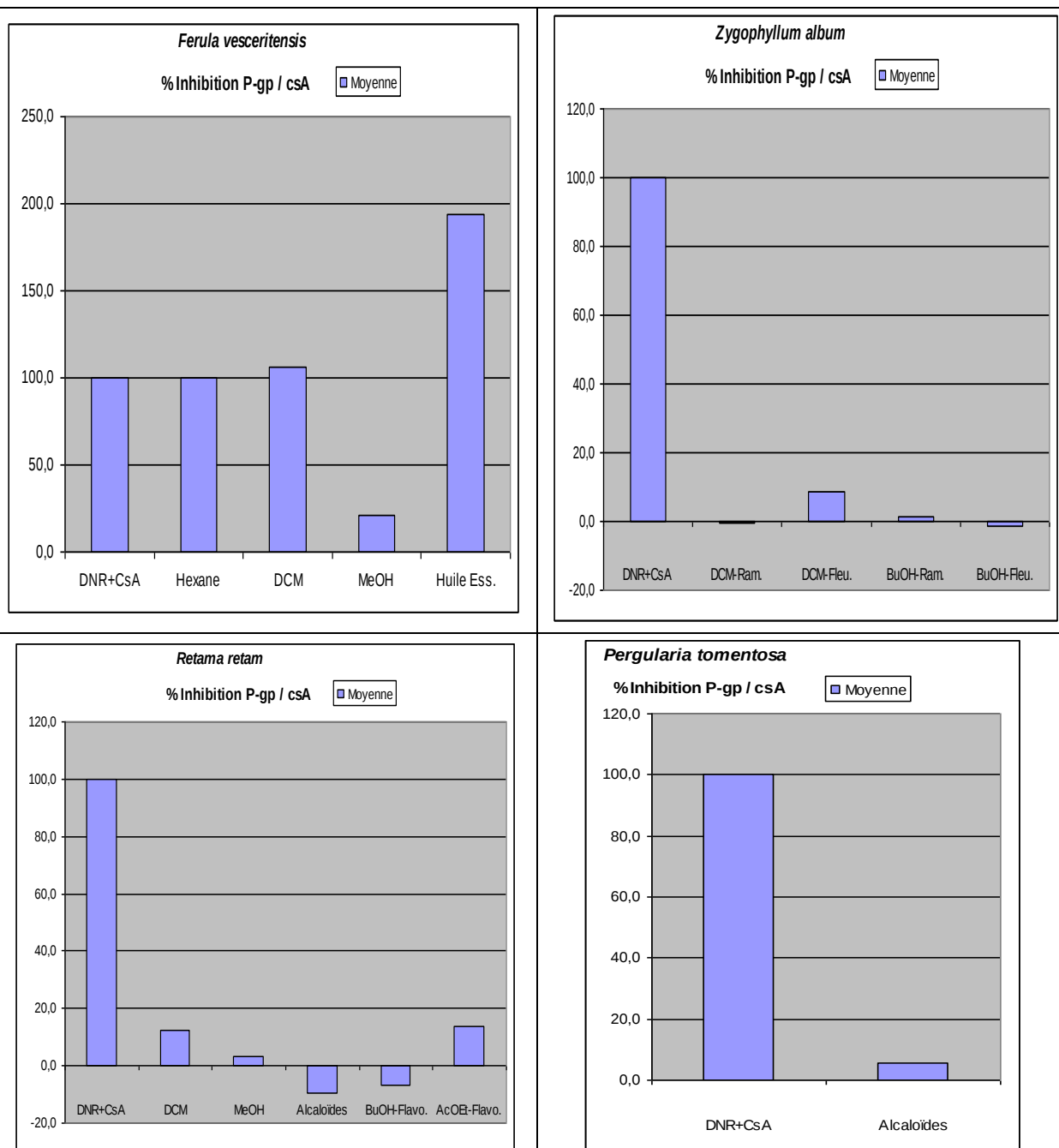
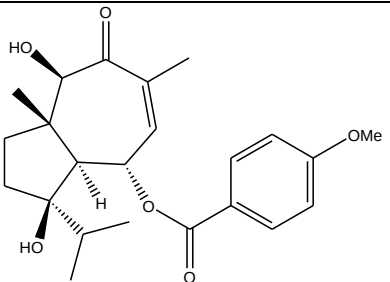
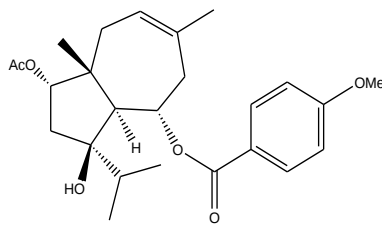
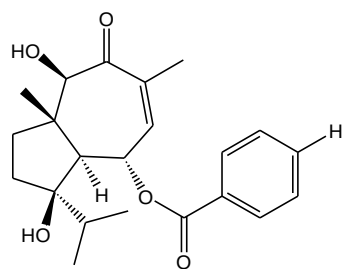
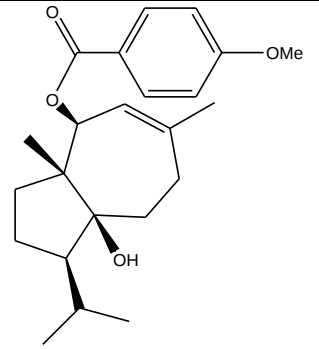
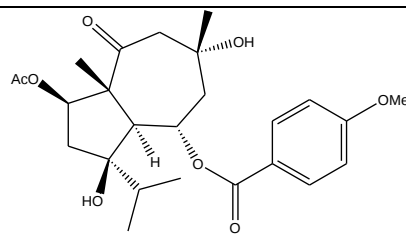
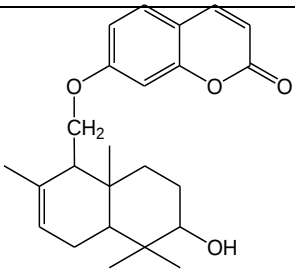
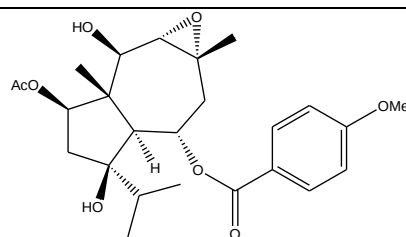
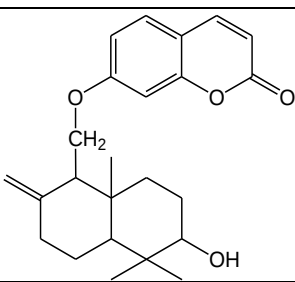
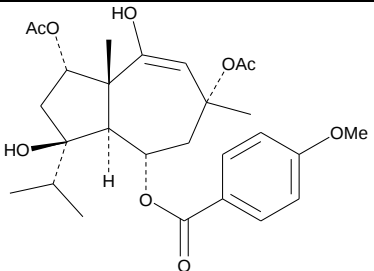


Figure IV.1 : Criblage des extraits des 4 plantes : *Ferula vesceritensis*, *Retama retam*, *Zygophyllum album* et *Pergularia tomentosa* sur Pgp

▪ Sesquiterpènes de *F.vesceritensis*

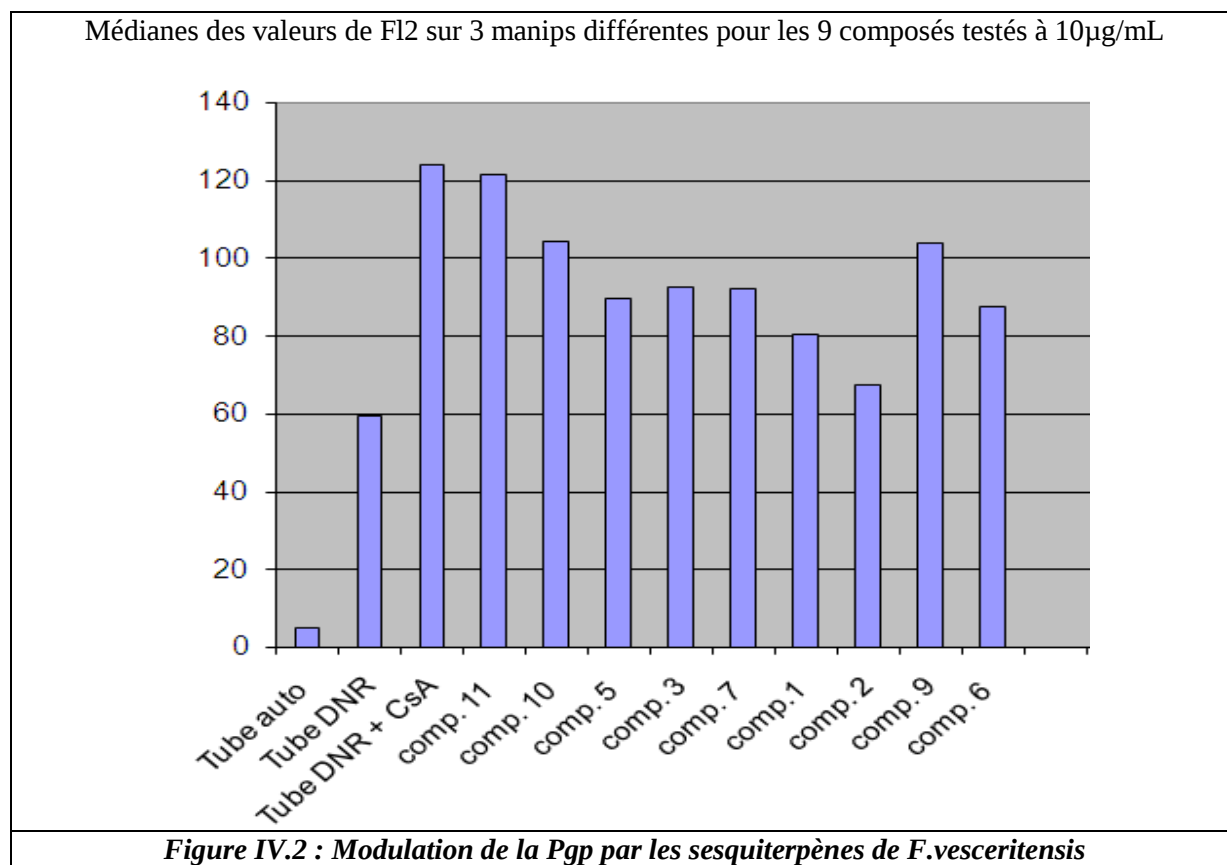
Tableau IV.1: Résultats de l'effet modulateur de *Pgp* par les sesquiterpènes de *F. vesceritensis*

Composé	Structure	Cel. MDR K562/R7 Inhibition à 10 µg/ml (%)	Composé	Structure	Cel. MDR K562/R7 Inhibition à 10 µg/ml (%)
1		35	6		59
2		11	9		88
3		60	10		89
4		68	11		104
5		52			

Les résultats regroupés dans le tableau IV.1 obtenus pour les neuf sesquiterpènes indiquent clairement que le composé **11** est le seul à montrer une activité modulatrice supérieure à 100%. Le composé **10** possédant une structure très proche du précédent, vient en seconde position avec un taux d'inhibition de 89%. Ces deux molécules sont incontestablement les plus actives. Dans la littérature, les résultats obtenus pour la conférone de structure très apparentée des composés **10** et **11** sur le même transporteur, ont montré qu'elle était également très efficace sur Pgp [2].

La deuxième classe de sesquiterpènes est représentée par le composé **9**, lequel s'est montré nettement plus actif que tous les autres composés de type daucanes (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** et **6**). En effet, son taux d'inhibition est équivalent à celui du composé **10** d'après à la fois le tableau IV.1 et la figure IV.2 illustrant les médianes des valeurs de 3 différents essais pour les différentes molécules.

La position du groupement anisate en C-10 (face nord) et la disponibilité du groupement isopropyle sont les facteurs le distinguant des autres daucanes, par conséquent ils peuvent être mis en cause dans son activité. L'acétylation ne semble pas influencer l'activité inhibitrice, compte tenu de la faible différence d'activité constatée entre le composé **6** ayant un acétyle et le composé **5** présentant deux acétyles. La présence du méthoxyle sur la partie benzoyle augmente apparemment le caractère modulateur de Pgp, ce que nous avons pu observer entre les composés **1** et **2**.



II. CRIBLAGE SUR BCRP ET PGP (cellules transfectées)

Des cellules cancéreuses de sein humain (MDA-MB-231 ou HEK-293) transfectées soit avec le transporteur ABCG2 (BCRP) soit avec le transporteur ABCB1 (Pgp) sont incubées en présence d'une drogue fluorescente, substrat des deux transporteurs : la mitoxantrone utilisée à une concentration de 5 μ M.

Six sesquiterpènes de *F.vesceritensis* sont testés à une concentration fixe de 5 μ M chacun. La réaction est bloquée, et la quantité de drogue résiduelle accumulée dans les cellules est titrée par fluorescence. Des contrôles sont réalisés, d'une part, en absence d'inhibiteur et, d'autre part, en présence d'un inhibiteur de référence (GF 120918). Les taux d'inhibition sont calculés avec la relation (A) (page 194).

➤ Résultats et discussion

Le tableau IV.2 regroupant les résultats de ce criblage, montre que le composé **9** est le plus actif tant sur Pgp que sur BCRP. La position de l'anisate en C-10 et la disponibilité de l'isopropyle apparaissent plus favorables à l'activité inhibitrice de BCRP. En effet, le composé **6** présente un taux d'inhibition de BCRP de 20% inférieur à celui du composé **9**. En revanche, leurs activités sur Pgp dans ce test sont du même ordre de grandeur. Nous avons également remarqué que la présence de l'anisate en position C-6 n'avait pas une influence significative sur la modulation de BCRP, compte tenu de l'écart observé entre les valeurs des taux d'inhibition des composés **8** et **3**. L'absence de la double liaison dans le cycle à sept du composé **3** pourrait être à l'origine de sa faible activité sur BCRP. Cependant, son activité sur Pgp ne semble pas en être affectée.

Les deux sesquiterpènes coumariniques (**10** et **11**) ont présenté une activité inhibitrice plus importante sur Pgp par rapport à BCRP. Le composé **11** reste toutefois plus actif que son homologue **10**. A la différence du test précédent, son taux d'inhibition est au deçà des 50% sur Pgp.

Tableau IV.2 : Modulation de Pgp et de BCRP par les sesquiterpènes de *F. vesceritensis*

Composé	Structure	ABCB1(Pgp) inhibition à 5 μ M (%)	ABCG2(BCRP) Inhibition à 5 μ M (%)
Référence GF 120918 Elacridar	-	100	94
8		24	7
6		42	31
3		43	6,5
9		<u>49</u>	<u>51,1</u>
11		38	19
10		46	17

III. CRIBLAGE SUR CpABC3

Les cryptosporidies sont des protozoaires, parasites unicellulaires pathogènes pour l'homme, du genre *Cryptosporidium*, de l'embranchement *Apicomplexa*, capables de provoquer des diarrhées appelées cryptosporidioses chez plusieurs espèces de vertébrés dont l'homme. Ils peuvent également causer des maladies sévères, dont des pancréatites. Chez les enfants en bas âge et chez des adultes immunodéprimés ou infectés par le VIH, il provoque une malnutrition secondaire pouvant être mortelle. Ce protozoaire est caractérisé par son importante résistance intrinsèque à de nombreuses molécules antiparasitaires, apparemment due à la surexpression des drogues par les transporteurs ABC (MDR) dont la Pgp [2 ; 3].

La H6-NBD1 est une protéine recombinante produite par *E. coli*, possédant 6 histidines en position N-terminale et qui comprend le domaine NBD1. Elle est d'origine parasitaire (*Cryptosporidium parvum*) mais elle sert de modèle pour tester des molécules potentiellement actives sur les transporteurs ABC. Pour voir si ces molécules se lient au domaine NBD1, on mesure l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de la protéine recombinante causée par la fixation du substrat sur le ou les sites spécifiques de l'ATP et/ou des stéroïdes.

L'ATP se lie au site catalytique et provoque une baisse de la fluorescence intrinsèque. Cette fluorescence des protéines est due aux groupements fluorophores constitués par les chaînes latérales des trois acides aminés aromatiques : le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Les études antérieures ont montré que la progestérone et la quercétine se lient sur le site stéroïde mais provoquent le même effet que la fixation de l'ATP. Il n'est possible d'identifier le site de fixation, que lorsqu'il n'y a pas d'inhibition en dosant l'activité ATPase que la protéine a conservée. Dans ce cas, la molécule ne se fixe pas sur le site catalytique.

➤ Test de l'affinité vis-à-vis de la H6-NBD1

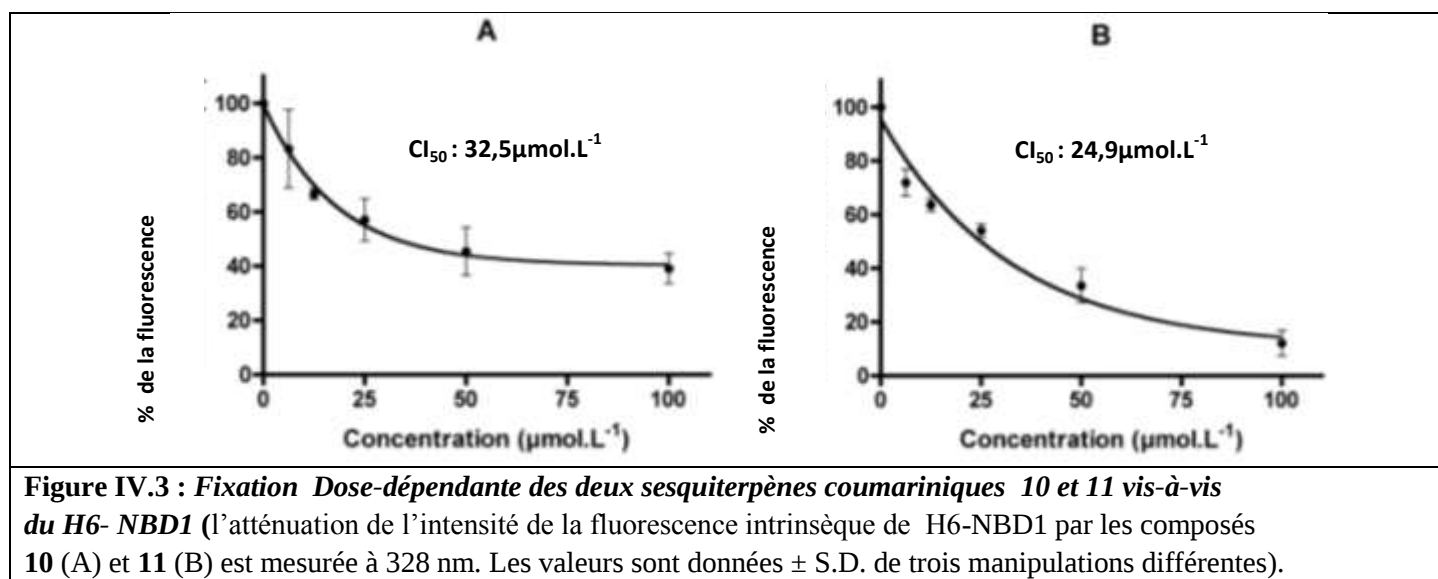
Ce test est effectué avec la partie NBD1 du transporteur ABC : CpABC3 du parasite *Cryptosporidium parvum* [51]. La fluorescence est mesurée pour trois manipulations différentes pour chaque test sur un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS-3B ; La H6-NBD1 est diluée à une concentration de 0.25 μ M en solution Tris 50 mM : pH 7.3, 100 mM, KCl, 0.02% HECAMEG. Le composé testé est ajouté (10 μ l) et le mélange est incubé pendant 30 min à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. La fluorescence intrinsèque est mesurée à 328 nm (sous une excitation à 295 nm, ciblant uniquement les résidus tryptophanes). Les tests sont effectués dans les mêmes conditions (Zéro contre le dernier bain de dialyse).

Pour supprimer toute interférence due à l'imidazole utilisé au cours de la purification, le composé est dissout pour aboutir à des concentrations stock des 40 mM dans le DMSO puis dilué jusqu'à une concentration finale en DMSO de 0.25%. Les statistiques et les courbes (1 et 2) illustrées sur la figure III.86 sont réalisés avec le logiciel Prism 4 software (program from GraphPad (San Diego, CA)).

➤ Résultats et discussion

Parmi la série de neuf composés testés, seulement les deux éthers de sesquiterpène et de coumarine **10** et **11** montrent une importante affinité vis-à-vis du NBD1 du CpABC3, fonctionnant comme une pompe active de *C. parvum*.

Le composé **11** s'est montré plus actif avec une atténuation de la fluorescence intrinsèque plus intense que le composé **10** (Figure IV.3). Les valeurs d'atténuation sont de plus de 80 % pour le composé **11** et de 60 % pour le composé **10**. Ces résultats confirment l'hypothèse que ces molécules se fixent plutôt sur le site stéroïde, comme c'est le cas pour la quercétine. De plus, les valeurs des CI_{50} calculées dans cette étude sont comparables à celles de l'inhibiteur TNP-ATP et de la quercétine testés auparavant par Lawton *et al* [2]. Ces résultats mettent en évidence le potentiel inhibiteur intéressant de ces deux composés, ce qui est conforme aux résultats de la littérature [2 - 5].



BIBLIOGRAPHIE

- [1]- I.Raad, R. Terreux, P. Richomme, E.I. Matera, C. Dumontet, J. Reynaud, D. Guilet, *Bioorg. Med. Chem.*, 14(20), 6979-6987, 2006.
- [2]- C. Barthomeuf, M. Demeule, J. Grassi, A. Saidkhodjaev, R. Beliveau, *Planta Med.* 72, 634- 639, 2006.
- [3]- P. Lawton, M. Pélandakis, A.F. Pétavy, N. Walchshofer, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 152, 101-107. 2007.
- [4]- M.T. Bonafonte, P.A. Romagnoli, N. Mc Nair, A. Shaw, M. Scanlon, G.J. Leitch, J.R. Mead, *Experimental Parasitology*, 106, 126-134, 2004.
- [5]- A.M. Madureira, A. Molnar, P.M. Abreu, M. Molnar, M.J.U. Ferreira, *Planta Med.*, 70, 828-833, 2004.

CHAPITRE V : PARTIE EXPERIMENTALE

I. MATERIELS ET APPAREILLAGE

I.1. Récolte de la plante *Ferula vesceritensis*

Les parties aériennes de *Ferula vesceritensis*, qui ont servi ans cette étude ont été récoltées en période de floraison, dans la région Oued Sebseb en avril 2005, avec l'aide de Mr Ouled Belkheir, botaniste du département des Sciences agronomiques de l'Université Kasdi Merbah de Ouargla.

Après séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière (environ 15 jours), la plante a été grossièrement broyée puis conservée.

I.2. Chimie extractive

I. 2.1. Méthodes chromatographiques analytiques

▪ **Chromatographie sur couche mince (CCM) :** Les analyses sur couche mince sont réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes de phases de diverses natures, silice 60 F₂₅₄ (Merck) et gel de silice greffée RP-18 F₂₅₄ (Merck). Des plaques de verre recouvertes de diol (DIOL-F_{254S} 10 x 10 cm, Merck) et de polyamide F₂₅₄ (Merck) sont également employées. L'observation des CCM s'effectue sous la lumière UV (254 et 365 nm) suivie d'une révélation par les réactifs appropriés. Les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants :

- Réactif de Godin (révélateur universel) : mélange composé de vanilline à 1% (m/v) dans l'éthanol (solution A) et d'une solution à 3% (m/v) d'acide perchlorique (solution B). Le mélange de A et B (1 :1) est pulvérisé puis une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10% (m/v) est également pulvérisée. La plaque est ensuite chauffée à 110°C pendant 10 minutes environ.
- Réactif à la vanilline sulfurique (révélateur universel) : solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et d'éthanol à 95% (compléter jusqu'à 100 mL). Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.
- Réactif au DBA (réactif spécifique des flavonoïdes) : 1 g de 2-aminoéthoxydiphénylborane (98%) est dissous dans 100 mL d'éthanol et 5 mL de polyéthylène glycole. Le mélange est agité puis pulvérisé sur la plaque. Après séchage, les plaques sont examinées sous UV à 365 nm.

▪ Chromatographie liquide haute performance

- ✓ **Analyse par CLHP/DAD (Détecteur à barrette de Diode)** : elle a été menée sur une chaîne HPLC « *Thermo Separation Products* » équipée d'une pompe quaternaire P-4000 et d'un détecteur DPA de modèle UV-6000LP (*Photodiode Array Detector*). Les colonnes analytiques utilisées sont d'une part une colonne Zorbax XDB C-8 (250 x 4.6 mm; 5µm; 100 Å) pour les extraits à l'hexane et au DCM ainsi que pour toutes les fractions et les composés issus de ce deuxième extrait ; d'autre part une colonne C-18 (125 x 4 mm ; 5 µm ; 100 Å) pour l'extrait méthanolique ainsi que toutes les fractions et composés issus de cet extrait. La détection se fait entre 200 et 400 nm.

Conditions chromatographiques : les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 1 mL.min⁻¹. Toutes les analyses sont réalisées avec un gradient d'élution.

Colonne C-8: TFA à 0.01% (v/v) (solvant A) et TFA à 0.01% (v/v) dans l'acétonitrile (Solvant B) : 45% de B pendant 5 min puis un gradient linéaire de 45 % à 90 % de B en 40 min est appliqué.

Colonne C-18: eau (solvant A) et méthanol (solvant B) : gradient linéaire de 5 % à 50 % de B en 30 min.

- ✓ **Analyse par CLHP/SM** : la chaîne CLHP utilisée est une HP Series 1100 munie d'une pompe binaire G 1312 A, d'un dégazeur G1322 A et d'un auto injecteur ALS G1313 A. Ce chromatographe est couplé à un spectromètre de masse HP series MSD équipé de deux sources d'ionisation : Electrospray et APCI.

Les colonnes et les conditions chromatographiques de séparation sont identiques à celles utilisées dans l'analyse par CLHP/DAD à l'exception de l'acide trifluoroacétique à 0.01% qui est remplacé par l'acide formique à 0.4 %.

En règle générale, pour les deux analyses des extraits bruts, des solutions de 10 mg/ml ont été utilisées. Les extraits analysés par LC/MS ont été préalablement purifiés par SPE. Le volume d'injection est soit de 20 ou de 10 µL en fonction de la solution injectée.

▪ Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

- Les indices de rétention utilisés dans l'identification des composés volatils de l'extrait hexanique I_r , sont calculés selon l'équation de Van Den Dool et Kratz [1 ; 2] par rapport à la série des *n*-alcane :

$$I_r = 100. z + 100[(t_r(s)-t_r(z)) / (t_r(z+1)-t_r(z))]$$

$t_r(s)$: temps de rétention absolu du soluté obtenu en GC/FID

$t_r(z)$ et $t_r(z+1)$: temps de rétention absolus des alcanes respectivement à *z* et *z+1* atomes de carbones encadrant le soluté S.

- Les spectres de masse enregistrés sont comparés à ceux d'une bibliothèque de référence comportant les banques de spectres suivantes :
 - ✓ CNRS.L
 - ✓ Wiley 275.L
 - ✓ Nist 02 .L

Conditions opératoires GC/FID et GC/MS

L'extrait à l'hexane a été analysé sur un chromatographe HP 6890 couplé à spectromètre de masse Hewlet Packard série 5973 MSD (mode d'ionisation électronique EI, 70 eV, HP, Palo Alto, CA) selon les conditions résumées dans le Tableau V.I. Ce CG est équipé de deux colonnes capillaires identiques.

Tableau V.I : Conditions opératoires des analyses par GC/FID et GC/MS

Paramètres de l'analyse	GC/FID	GC/MS
Colonne capillaire	HP-5MS (HP 19091J-433)	HP-5MS (HP 19091J-433)
Longueur	30 m	30 m
Diamètre interne	0,25 mm	0,25 mm
Epaisseur de phase	0,25 µm	0,25 µm
Gaz vecteur	He	He
Débit	1 mL/min	1 mL/min
Température de l'injecteur	250 °C	250 °C
Température du détecteur	290°C	290°C
Programmation de la température du four	40 °C pendant 5 min 2 °C/min de 40 à 200°C 10 °C/min de 200 à 260°C 260 °C pendant 5 min	40 °C pendant 5 min 2 °C/min de 40 à 200°C 10 °C/min de 200 à 260°C 260 °C pendant 5 min
Température de la source	-	290 °C
Concentration de l'extrait	1 mg dans 1 mL d'hexane	1 mg dans 1 mL d'hexane
Quantité injectée	1 µL	1 µL
Mode d'injection	Split 1: 40	Split 1: 40

I. 2.2. Méthodes chromatographiques semi-préparatives ou préparatives

▪ Chromatographie préparative sur couche mince (CCM)

Certaines étapes de séparation ont été effectuées sur des plaques (20 x 20 cm) de silice : 60 F₂₅₄ Merck d'épaisseur 2, 1 et 0.5 mm. Des plaques préparées au laboratoire sont également utilisées (silice 60 F₂₅₄ Merck, épaisseur 0.25 mm).

▪ **Chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

Afin de purifier les composés isolés, la dernière étape s'est faite dans la majorité des cas par chromatographie d'exclusion en utilisant du sephadex LH-20 Pharmacia (environ 40 fois la masse à purifier). Les dimensions des colonnes employées sont choisies en fonction de la masse de la fraction à purifier.

▪ **Chromatographie liquide sous vide (CLV)**

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle a l'avantage d'être rapide et de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographie classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 μm) est mise dans un entonnoir de Büchner (verre fritté n° 4).

▪ **Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP)**

Cette technique permet la séparation d'extraits de masses pouvant aller jusqu'à quelques dizaines de grammes et de mélanges de composition parfois très complexe avec une résolution satisfaisante.

La pression de travail peut aller de 15 à 20 bars. Des colonnes Büchi de tailles variées (460 x 26 mm, 230 x 26 mm et 460 x 36 mm) sont utilisées. L'échantillon est adsorbé à la phase stationnaire solide puis mis dans une colonne d'introduction ou pré-colonne (il est parfois nécessaire de compléter avec du sable). Celle-ci est montée soit directement sur la colonne principale ou liée à celle-ci par une tubulaire.

L'élution nécessite l'utilisation de pompe à moyenne pression, dans notre cas les pompes à gradient utilisées sont soit une Gilson 305 ou une Büchi borosilicat 3.3. La détection est réalisée grâce à un détecteur TSP, Spectra System, UV 2000 fonctionnant à deux longueurs d'ondes sélectionnées (généralement 254 et 366 nm). Un collecteur automatique Büchi C-660 est quant à lui utilisé pour récolter les fractions.

Les phases remplissant les colonnes utilisées étaient les suivantes :

- silice, Merck Lichroprep® (43 - 60 μm)
- silice, Merck, Geduran Si-60 (0,063 – 0,200 μm)
- silice greffée, Merck Lichroprep® RP-18 (43 - 60 μm)
- silice greffée, Merck Lichroprep® diol (43 - 60 μm)

Le débit varie entre 7 et 15 mL/min selon la taille de la colonne utilisée.

- **Chromatographie liquide semi-préparative à haute pression (HPLC semi-prép.)**

La chromatographie liquide semi-préparative à haute pression est une technique largement répandue pour les étapes finales de purification; elle est utilisée pour la séparation de mélanges de 1 à 100 mg. Par convention, elle correspond aux colonnes comportant un diamètre interne de 8 à 25 mm, et des particules de diamètre de 5 à 10 μm . Dans le présent travail. Cette séparation par chromatographie en phase inverse semi-préparative a été réalisée sur une colonne Merck Purospher® STAR RP18e ((5 μ), 100 x 25 mm. Deux pompes Waters Millipore® 510 sont employées pour réaliser le gradient d'élution souhaité et un débit de 6 mL/min.

La détection a été réalisée grâce à un détecteur UV Waters 490 à deux longueurs différentes 254 et 280 nm. La récolte des fractions a été effectuée manuellement.

- **Chromatographie sur cartouches de silice C18 (VAC ELUT®) ou Extraction sur phase solide (SPE)**

Les colonnes prêtes à l'emploi Analytichem MEGA BOND ELUT™ (VARIAN) utilisées sont remplies de silice greffée C18. Ces cartouches, associées à une unité de filtration sous vide Vac Elut® SPS 24 (Analytichem International), rendent possible un réglage de débit précis à l'aide d'une molette et d'un manomètre.

Ces cartouches peuvent être non seulement être utilisées pour séparer les constituants d'un mélange mais également dans l'extraction sur phase solide (SPE). En effet, elles permettent une purification préliminaire d'un échantillon; elles sont particulièrement adaptées pour la préparation d'échantillons destinés à être analysés par spectrométrie de masse (SM).

Ces cartouches Sep-Pak® (Waters Corporation, Milford, Mass, USA) nécessitent au préalable un conditionnement qui consiste à mouiller la phase avec un solvant organique comme le méthanol. L'excédent de ce solvant est ensuite éliminé en rinçant la cartouche avec le solvant de l'échantillon (étape d'équilibration). L'échantillon est ensuite déposé (sa masse est d'environ 5% de celui de la phase), un ou plusieurs lavages avec un solvant judicieusement choisis sont effectués; cette étape permet l'élution de composés indésirables de l'échantillon tout en maintenant les métabolites d'intérêt adsorbés. L'élution de ces derniers est alors réalisée par un autre solvant adéquat ou un système de solvants approprié.

Cette technique a été utilisée d'une part, dans la séparation chromatographique visant à purifier certaines fractions et d'autre part dans la préparation des extraits à analyser par LC/MS.

I. 3. Méthodes physico-chimiques

I. 3.1. Spectroscopie RMN

Cette méthode constitue la technique de choix dans l'identification des composés naturels isolés. Les spectres de RMN sont enregistrés sur des spectromètres BRUKER DRX-500 et/ou DRX-300 selon la masse du composé à analyser. Le logiciel de traitement XWIN-NMR a permis le traitement des spectres. Les solvants deutérés utilisés pour solubiliser les produits à analyser sont précisés à chaque fois. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés soit à 500 ou à 300 MHz.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm (par rapport au tétraméthylsilane (TMS)); les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Des mesures complémentaires, dites « bidimensionnelles » sont nécessaires pour mettre en évidence des corrélations homo- et hétéronucléaires entre les atomes de carbone et d'hydrogène au sein des molécules analysées. Il s'agit des expériences citées ci-dessous, réalisées grâce à des programmes de séquences d'impulsions, fournis par BRUKER :

Corrélations homonucléaires

- **COSY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$ *Correlated Spectroscopy*): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires 2J et 3J (protons séparés par deux ou trois liaisons).
- **NOESY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$ *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) : cette technique permet d'observer, dans l'espace (distance inférieure à 5 Å), les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** ($^1J \text{H}-\text{C}$ *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) : cette expérience permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons qui leur sont directement liés.
- **HMBC** ($^2J \text{H}-\text{C}$, $^3J \text{H}-\text{C}$ *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*) : cette technique permet la détection des couplages longue distance entre protons et carbones.

I.3.2. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse des composés isolés ont été obtenus selon trois modes d'ionisation :

- ✓ Ionisation par Electrospray (*Electro Spray Ionisation*): ESI
- ✓ Ionisation chimique à pression atmosphérique (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) : APCI
- ✓ Ionisation chimique (*Chemical Ionization*): CI.

Concernant les composés connus, les spectres ont été enregistrés à basse résolution (en ESI ou en APCI), soit en introduction directe (en infusion) soit par analyse CLHP/MS dans les conditions d'analyse utilisées pour l'extrait d'origine. Le spectromètre de masse est celui décrit dans le paragraphe I.2.1 (page 217).

Les spectres de masse à haute résolution HR-ESI-MS et HR-CI-MS enregistrés pour les composés nouveaux sont obtenus respectivement sur un spectromètre Thermo LCQ Advantage, à trappe d'ion et sur un appareil Thermo Finnigan Mat 95XL.

I.3.3. Spectrométrie UV-Vis

Les spectres UV des composés ont été obtenus dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu mini 1240. Les mesures sont faites dans des cuves en quartz à trajet optique de 1 cm.

I.3.4. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 à 25 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm). La cuve employée a un volume de 2 mL et une longueur de 10 cm. Le solvant utilisé et la concentration sont indiqués dans chaque cas. Le pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D^T$, exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D^T = 100 \times \alpha / (l \times c)$$

(T : température, α : angle de rotation en degré lu sur le polarimètre, l : longueur en dm de la cuve de mesure, c : concentration de la molécule en solution en g/L).

II. ETUDE DE L'ESPECE *FERULA VESCERITENSIS*

II.1. Extraction des parties aériennes de *F.vesceritensis*

Une masse de 824 g de poudre de la plante est extraite en utilisant des solvants de polarité croissante : hexane, dichlorométhane et méthanol. Les masses d'extraits obtenues sont respectivement de 21,36 ; 16,79 et 100,50 g.

II.2. Fractionnement et purification de l'extrait DCM de l'espèce *F.vesceritensis*

Une masse de 2,3 g de l'extrait au DCM préparé selon le même procédé d'extraction décrit en IV.2.1 avec 50 g de parties aériennes pulvérisées, a été soumis à un fractionnement sur une colonne CLMP de silice en phase normale (Geduran Si-60, 0,063-0,200 μ m). L'élution est réalisée par un gradient d'hexane dans l'acétate d'éthyle (100:0 à 0:100). Le nombre de fractions de 50 mL recueillies est de 126, regroupées en 37 fractions sur la base des profils CCM obtenus sur silice et un système d'élution hexane/acétate d'éthyle 50 : 50. La révélation est effectuée sous lumière ultraviolette (254 et 366 nm) et par la pulvérisation du réactif du Godin. Cette première étape a servi de test, les masses obtenues sont peu importantes, néanmoins le travail mené sur les fractions F8 et F14 éluées respectivement avec les mélanges hexane/acétate d'éthyle 85:15 et 30:70 a abouti à l'isolement de deux composés.

La fraction F8 (142 mg) est séparée par CCM préparative en phase normale en utilisant pour l'élution un système de solvant hexane-acétate d'éthyle 80 : 20. La sous-fraction contenant un seul composé est purifiée sur une petite colonne de sephadex-LH 20, avec un mélange chloroforme/acétone 70 : 30 pour obtenir le composé **12** (11,5 mg). Une purification de la la fraction F14 (70,8 mg) sur plaques préparatives en phase normale dans le solvant toluène /acétate d'éthyle 80 : 20. Comme pour le composé **12**, une purification sur une colonne sephadex-LH 20 a conduit au composé **9** (6,5 mg).

Le fractionnement de l'extrait DCM a été repris avec une masse beaucoup plus importante. En effet, 15,7 g de cet extrait sont soumis à une CLMP dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent pour aboutir à 140 fractions de 200 mL. L'analyse par CCM de ces fractions et la révélation aux longueurs d'onde 254 et 366 nm, au réactif de Godin et/ou à la vanilline sulfurique ont permis de les regrouper en 15 fractions (Tableau V.2).

Tableau V.2 : Fractionnement de l'extrait au DCM de l'espèce *F.vesceritensis*

Eluant hexane/acétate d'éthyle	Fractions collectées	Masses (en mg)
90 : 10	F1	819
	F2	1183,2
	F3	461,8
	F4	568,4
	F5	802,7
	F6	394,4
80 : 20	F7	468,6
	F8	240,3
	F9	567,3
	F10	448,9
70 : 30	F11	171,5
	F12	2240,6
60 : 40	F13	199,1
50 : 50	F14	505,3
40 : 60	F15	624,8
30 : 70, 20 : 80	F16	780,5
00 : 100	F17	1125,9

Plusieurs fractions sont soumises à leur tour au fractionnement par CLMP. La purification des fractions F3 et F4 n'a pas permis une bonne séparation de composés, alors qu'à l'issue des MPLC sur les fractions F7, F8, F9 et F12, onze molécules ont été isolées.

La fraction F7 (468,6 mg) est chromatographiée sur colonne MPLC en utilisant la silice 60 (40-63 μ m) comme phase stationnaire. L'éluant correspond à un mélange hexane-acétate d'éthyle de 95 : 5 à 55 : 45. Les quatre sous-fractions de la F7 purifiées sont toutes éluées avec un mélange 80 : 20. La sous-fraction F1 (15 mg) a juste nécessité une purification sur colonne de sephadex LH-20 éluée avec un système de solvant chloroforme/acétone 70 : 30, pour donner le composé **7** à un état de pureté satisfaisante (11,0 mg). Les sous-fractions F3 (8,9 mg), F5 (28,9 mg) et F17 (24,3 mg) ont été soumises à une séparation sur des cartouches C-18 de SPE, éluées avec mélange de méthanol et d'eau (95 : 5) en isocratique.

Le composé **1** (8,7 mg) a été obtenu directement par SPE de la sous-fraction F3, alors que l'obtention des composés **2** (11,0 mg) et **5** (5,8 mg) a nécessité une autre étape

de purification sur deux colonnes de Sephadex LH-20 éluées par le mélange chloroforme/acétone 70 : 30.

La fraction F8 (240,3 mg) a fait l'objet, à son tour d'une purification par MPLC dans des conditions opératoires identiques à celles de la fraction précédente (F7). Deux sous-fractions F1 (6,0 mg) et F15 (5,6 mg) éluées respectivement avec les proportions du mélange hexane-acétate d'éthyle (95 : 05) et (90 : 10) sont révélées contenir des composés purs, respectivement **13** (6,0 mg) et **4** (5,6 mg).

Le fractionnement par CLMP en phase normale de la fraction F9 (567.3 mg) a aboutit à une quinzaine de sous-fractions, une seule parmi elle a pu être exploitée. La sous-fraction 14 (17.4 mg) a été séparée sur une cartouche SPE de C-18. L'élution réalisée avec les mélanges méthanol/eau de proportions allant de 30 : 70 à 90 : 10, a donné le composé **3** (7,1 mg) dans la fraction éluee par le dernier mélange.

La fraction F12 la plus importante en masse (2240,6 mg) a subi un premier fractionnement par chromatographie en phase inverse (C18) à moyenne pression (CLMP) à l'aide d'un gradient eau/méthanol allant de 70 : 30 à 00 : 100, pour donner 24 fractions. La sous-fraction F3 éluee avec un mélange 60 : 40 a été chromatographiée sur CCM préparatives en utilisant un système d'élution chloroforme/acétate d'éthyle (85 : 15). Une seule fraction contient un produit majoritaire obtenu après purification par chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex, élué par un mélange chloroforme/méthanol, il s'agit du composé **8** (KF3 ; 6,0 mg). La sous-fraction éluee F6 (22,8 mg ; éluant : 45 : 55) a subi une séparation sur CCM préparatives en utilisant le mélange chloroforme/acétate d'éthyle 90 : 10 comme éluant. Une étape de purification sur cartouche C-18 (SPE) a conduit au composé **3** (5,4 mg) déjà isolé de la fraction F9. La sous-fraction F16 (82,7 mg ; éluant : 35 : 65) contient un composé majoritaire, lequel a été purifié sur une colonne Sephadex avec le même système d'élution que pour les composés précédents ; il s'agit du composé **6** (80,0 mg).

Enfin la sous-fraction F19 (95,1 mg) éluee avec un mélange eau/méthanol (25 : 75), contenant deux produits majoritaires mal résolus en CCM est fractionnée par CLHP semi-préparative en phase inverse. L'élution est réalisée avec un gradient linéaire de méthanol dans l'eau en partant d'un mélange eau/méthanol 20 : 80 à 80 : 20 en 70 x min. Les deux composés **10** (15,0 mg) et **11** (25,0 mg) sont isolés. La pureté des composés a été vérifiée par HPLC dans les conditions expérimentales décrites pour l'extrait DCM.

II.3. Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique de l'espèce *F.vesceritensis*

20,0 g de l'extrait méthanolique sont fractionnés grossièrement au préalable par une VLC en utilisant un gel de silice. L'élution a été réalisée par un mélange DCM-méthanol (de 100:0 à 0:100). Les fractions les plus polaires sont regroupées (10,0 g) pour subir une séparation sur une colonne CLMP de silice en phase inverse C-18. Un mélange eau/méthanol (de 95 :5 à 50:50) est employé pour l'élution.

L'analyse CCM des fractions obtenues (125 fractions de 50 mL) est réalisée en phase normale en utilisant le système d'élution suivant :

Acétate d'éthyle/ acide formique/acide acétique/eau : 100 : 11 : 11 : 26

L'examen aux longueurs d'onde 254 et 365 nm et la révélation au réactif DBA des chromatogrammes a permis leur regroupement en 19 fractions.

Tableau V.3 : Fractionnement de l'extrait méthanolique de l'espèce *F.vesceritensis*

Eluant eau/méthanol	Fractions collectées	Masses (en mg)
95 : 05 à 90 : 10	F1	139,3
	F2	84,9
	F3	9,0
	F4	5,1
	F5	27,4
	F6	11,4
90 : 10 à 80 : 20	F7	63,7
	F8	17,5
	F9	96,6
80 : 20 à 70 : 30	F10	145,8
	F11	137,7
70 : 30 à 60 : 40	F12	13,2
	F13	27,2
	F14	96,7
	F15	780,5
60 : 40 à 50 : 50	F16	93,6
50 : 50	F17	38,7
	F18	125,2
	F19	187,2

La fraction F1 (139,3 mg) éluée avec le mélange eau/méthanol (95 : 5), contient majoritairement des composés transparents en UV, dont la révélation a été faite par l'acide sulfurique. Une extraction liquide-liquide eau/*n*-butanol est entreprise sur la fraction afin de séparer éventuellement les sucres présents des autres composés minoritaires. La CCM de la phase butanolique a montré un composé majoritaire que nous n'avons pas réussi à obtenir à l'état pur par CCM préparatives éluées avec le système de solvants : Acétate d'éthyle/méthanol/eau 100 : 13.5 : 100.

Le composé **16** (48,3 mg) est enfin purifié par chromatographie d'exclusion, l'élution étant réalisée avec un mélange méthanol/eau 50 : 50.

La purification de la fraction F12 (13,2 mg) éluée avec un mélange méthanol/eau (75 : 35) a permis d'obtenir un unique produit, il s'agit du composé **14**.

Par ailleurs, la fraction F14 (96,7 mg) éluée grâce au mélange méthanol/eau 60 : 40 contient un produit majoritaire, lequel a été purifié sur une colonne de sephadex éluée par un système de solvants méthanol/eau 50 : 50. Le composé **15** (96,0 mg) est finalement obtenu à l'état pur.

III. DONNEES SPECTRALES ET CONSTANTES PHYSIQUES DES COMPOSES ISOLÉS DE L'ESPECE *FERULA VESCERITENSIS*

❖ Composés isolés de l'extrait DCM

✓ Composé 1

10β-Hydroxylancerodiol-6-anisate

Formule brute : $C_{23}H_{30}O_6$

$[\alpha]_D^{20} + 81.7$ (c 0.08, CH_2Cl_2)

UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) 259.5 (4.30).

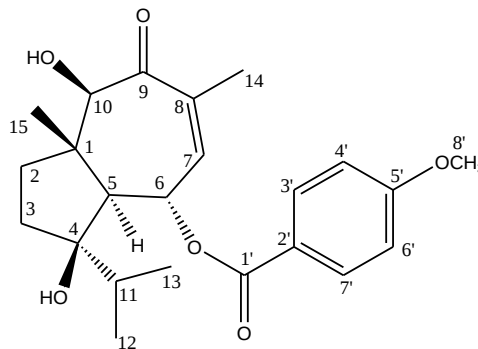
Données RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C

(500 MHz) dans ($CDCl_3$) cf. Tableau III.2, page 112.

SM : HRCI/MS $[M+H]^+$ m/z 403.21195

(masse calculée 403.2121).

ESI/MS $[M+Na]^+$ m/z 425, $[2M+Na]^+$ m/z 827.2



✓ Composé 2

10β-Hydroxylancerodiol-6-benzoate

Formule brute : $C_{22}H_{28}O_5$

$[\alpha]_D^{20} + 87.7$ (c 0.075, CH_2Cl_2);

UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) 232 (3.92).

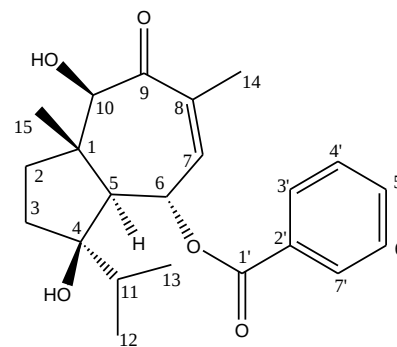
Données RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C

(500 MHz) dans ($CDCl_3$) cf. Tableau III.3, page 118.

SM : HRCI/MS $[M+H]^+$ m/z 373.20137

(masse calculée 373.2015).

ESI/MS $[M+Na]^+$ m/z 395.2



✓ Composé 3

Vesceriténone

Formule brute : $C_{25}H_{34}O_8$

$[\alpha]_D^{25} -239.2^\circ$ (CH_2Cl_2 ; c 0.125);

UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) 257 (3.78).

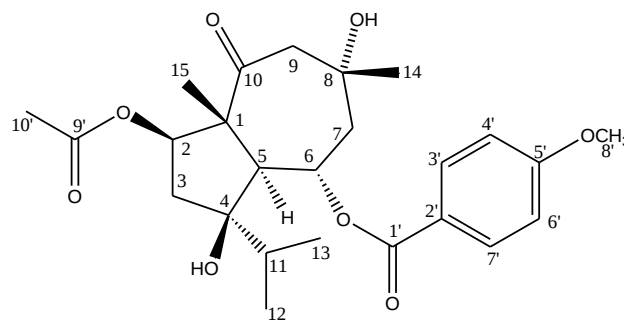
Données RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C

(500 MHz) dans ($CDCl_3$) cf. Tableau III.4, page 126.

SM : HRCIMS $[M+H]^+$ m/z 463.23315

(masse calculée 463.2332).

ESI/MS $[M+Na]^+$ m/z 485.2, $[2M+Na]^+$ m/z 947.1



✓ **Composé 4**

Epoxyvesceritéanol

Formule brute: C₂₅H₃₄O₈

[α]_D²⁰ +27.5 (c 0.17, CH₂Cl₂);

UV (MeOH) λ_{max} nm (logε) 258 (4.23).

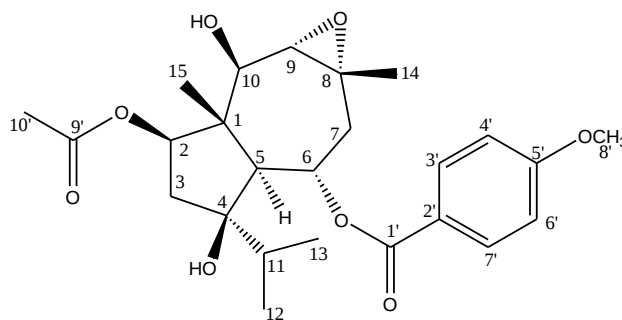
Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.5, page 131.

SM : HRCI/MS [M+H]⁺ m/z 463.23303

(masse calculée 463.2332).

ESI/MS [M+Na]⁺ m/z 485.1, [2M+Na]⁺ m/z 947.1



✓ **Composé 5**

2α, 8α-Diacétyl-10-hydroxyferutriol-6α-anisate

Formule brute : C₂₇H₃₆O₉

[α]_D²⁰ +13.68 (c 0.24, CH₂Cl₂);

UV (MeOH) λ_{max} nm (logε) 257 (3.82).

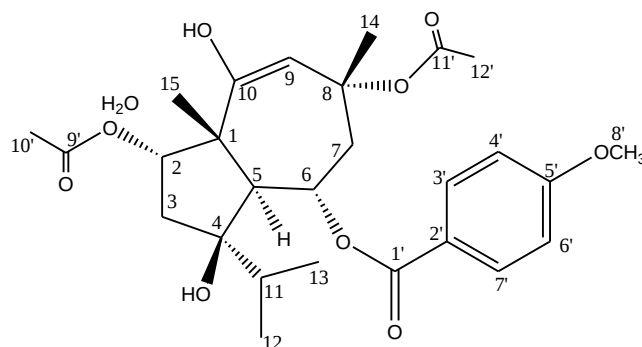
Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.6, page 137.

SM : HRMS-ESI [M+Na]⁺ m/z 527.22603

(masse calculée 527.2257).

ESI-MS [M+Na]⁺ m/z 527, [M+K]⁺ m/z 543.1



✓ **Composé 6**

2α-Acétyl-10β-hydroxyjaescheanadiol-6α-anisate

Formule brute : C₂₅H₃₄O₇ (M = 446 g/mol)

[α]_D²⁰ - 44.5 (c 0.665, CH₂Cl₂)

UV (MeOH) λ_{max} nm 256.

Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

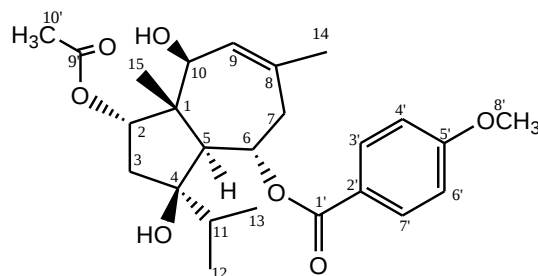
(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.7, page 146.

SM : ESI/MS [M+Na]⁺ m/z 469.2, [M+H-H₂O]⁺ m/z 429.2,

[M+H-2H₂O]⁺ m/z 411.2,

[M-acide acétique-Me]⁺ m/z 371.2,

[M+H-H₂O-acide anisique-acide acétique]⁺ m/z 217.0



✓ **Composé 7**

Lapidol-6α-anisate

Formule brute : C₂₃H₃₀O₅ (M = 386 g/mol)

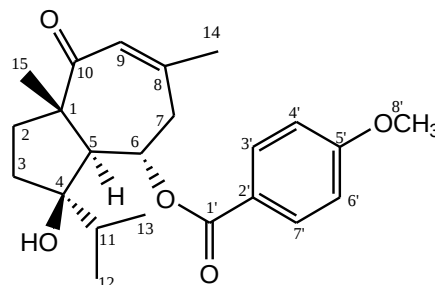
[α]_D²⁰ + 81.7 (c 0.08, CH₂Cl₂)

UV (MeOH) λ_{max} nm 256.

Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.8, page 153.

SM : ESI/MS [M+Na]⁺ m/z 409.1, [2M+Na]⁺ m/z 795.1



✓ Composé 8

Lapidol

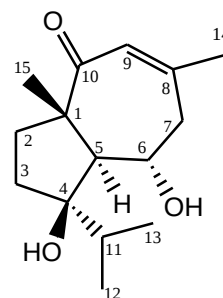
$[\alpha]_D^{20}$ -550 (c 0.060, CH₂Cl₂)

Formule brute : C₁₅H₂₄O₃ (M = 252 g/mol)

$[\alpha]_D^{20}$ + 81.7 (c 0.08, CH₂Cl₂)

Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.9, page 156.



✓ Composé 9

Lasidiol-10-anisate

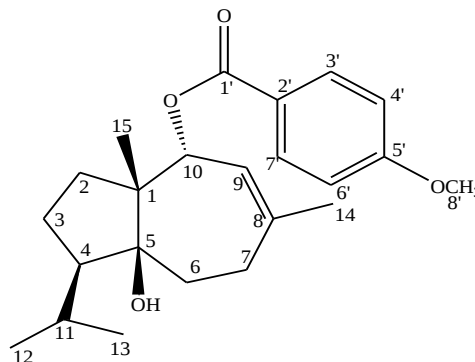
Formule brute : C₂₃H₃₂O₄ (M = 372 g/mol)

$[\alpha]_D^{20}$ -362.5 (c 0.155, CH₂Cl₂)

Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.10, page 161.

SM : ESI/MS [M+K]⁺ m/z 409.0, [2M+K]⁺ m/z 795.0



✓ Composé 10

Féséol

Formule brute : C₂₃H₃₀O₄ (M = 282 g/mol)

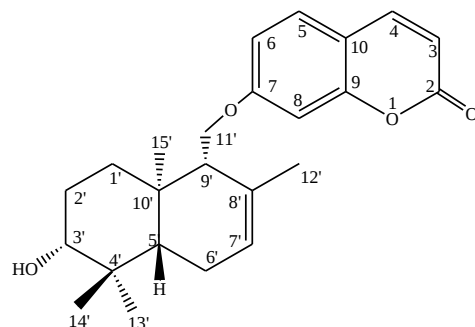
$[\alpha]_D^{20}$ -185 (c 0.240, CH₂Cl₂)

UV (MeOH) λ_{max} nm 322.

Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.11, page 167.

SM : ESI/MS [M+H]⁺ m/z 383.3 [M+Na]⁺ m/z 405.2



✓ Composé 11

Coladonine

Formule brute : C₂₃H₃₀O₄ (M = 282 g/mol)

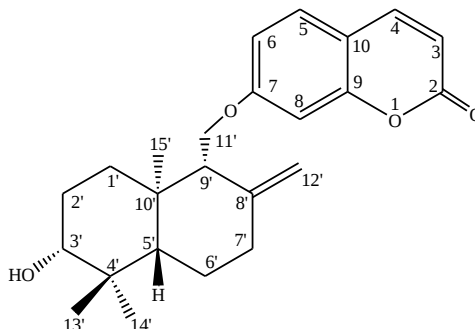
$[\alpha]_D^{20}$ -144 (c 0.325, CH₂Cl₂)

UV (MeOH) λ_{max} nm 316.

Données RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C

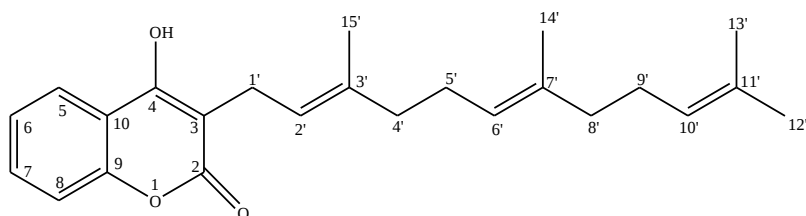
(500 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.12, page 173.

SM : APCI/MS (-) [M-H]⁻ m/z 381.5



✓ Composé 12

Féruénol



Formule brute : C₂₄H₃₀O₃ (M = 366 g/mol)

UV (MeOH) λ_{max} nm 213, 278 et 305.

Données RMN ¹H (300 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.13, page 178.

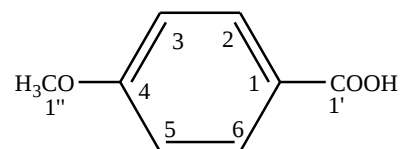
SM : ESI/MS(+) [M+H]⁺ m/z 367.3, [M+Na]⁺ m/z 389.2, APCI/MS (-) [M-H]⁻ m/z 365.5

✓ **Composé 13**

Acide anisique

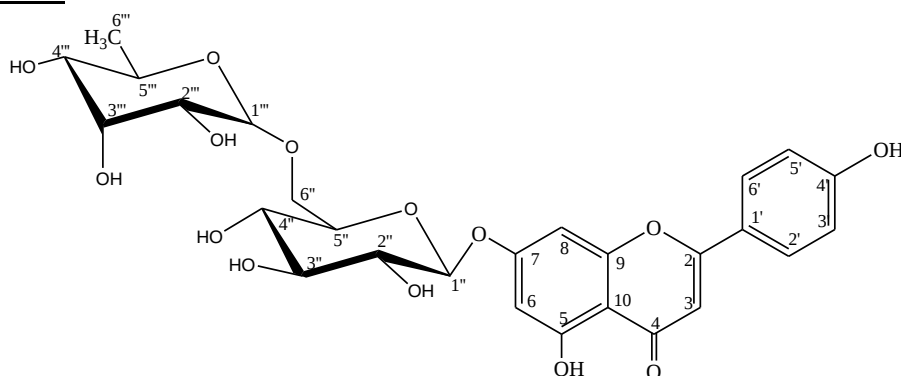
Formule brute : $C_8H_8O_3$. (M = 152 g/mol)

Données RMN 1H (300 MHz) dans (CDCl₃) cf. Tableau III.13, page 180.



❖ **Composés isolés de l'extrait méthanolique**

➤ **Composé 14**



7-O-β-D-glucopyranosyl(1-6)-α-L-rhamnopyranoside apigénine

Formule brute : $C_{27}H_{30}O_{14}$ (M = 578 g/mol)

UV :

Solvant-Réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)
MeOH	268, 326
MeOH + AlCl ₃	275, 290, 345, 384
MeOH + AlCl ₃ + HCl	276, 298, 341, 384
MeOH + NaOH	273, 388
MeOH + NaOH (après 5 min)	273, 388
MeOH + NaOAc	267, 342

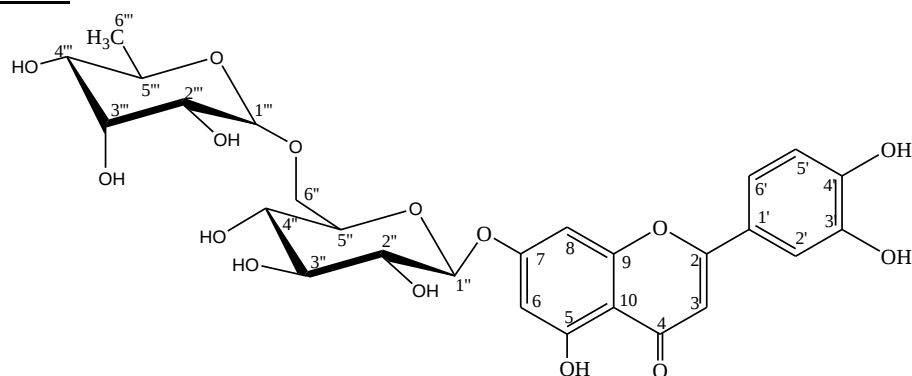
Données RMN 1H (300 MHz) et ^{13}C (300 MHz) dans (DMSO) cf. tableau III.15, page 186.

SM : ESI/MS(+) $[M+H]^+$ m/z 579, $[M+Na]^+$ m/z 601, $[M-146+H]^+$ m/z 433;

$[M-146-162+H]^+$ m/z 271

ESI/MS (-) $[M-H]^-$ m/z 577.

➤ **Composé 15**



7-O- β -D-glucopyranosyl(1-6)- α -L-rhamnopyranoside lutéoline

Formule brute : $C_{27}H_{30}O_{15}$ ($M = 594$ g/mol)

UV :

Solvant-Réactifs	$\lambda_{\max}$ (nm)
MeOH	254, 345
MeOH + $AlCl_3$	273, 330, 426
MeOH + $AlCl_3$ + HCl	273, 357, 389
MeOH + NaOH	273, 488
MeOH + NaOH (après 5 min)	273, 488
MeOH + NaOAc	257, 351
MeOH + NaOAc + H_3BO_3	259, 372

Données RMN 1H (300 MHz) et ^{13}C (300 MHz) dans (CD_3OD) cf. tableau III.16, page 192.

SM : ESI/MS(+) [$M+H$] $^+$ m/z 595, [$M+Na$] $^+$ m/z 619, [$M-146+H$] $^+$ m/z 449;

[$M-146-162+H$] $^+$ m/z 287.

ESI/MS (-) [$M-H$] $^-$ m/z 593 ;

➤ **Composé 16**

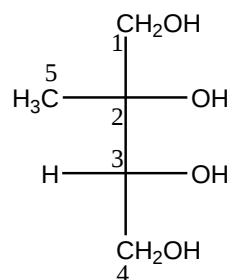
2-C-Méthyl-D-érythritol

Formule brute : $C_5H_{12}O_4$ ($M = 136$ g/mol)

$[\alpha]_D^{20}$ -8.60(c 0.725, MeOH)

Données RMN 1H (300 MHz) et ^{13}C (300 MHz) dans

($CD_3OD + D_2O$) cf. tableau III.17, page 195.



IV. PARTIE BIOLOGIQUE

IV.1 .Test de criblage sur la Pgp (cellules sélectionnées)

a) Culture cellulaire

Ce test a été réalisé au laboratoire de Cytologie Analytique (Centre Léon Bérard - Lyon1). La lignée cellulaire parentale K562 dérive de cellules leucémiques myéloïdes en transformation aiguë sur un mode érythroïde. La lignée résistante K562/R7 a été sélectionnée par une exposition prolongée de K562 à des doses progressivement croissantes de doxorubicine.

La lignée cellulaire MDR K562/R7 est cultivée dans un milieu RPMI 1640 supplémenté en sérum de veau fœtal (10%), glutamine (2 mM), pénicilline (200 unités/mL) et streptomycine (100 µg/mL) et maintenue à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

b) Principe du test

Le principe du test consiste à mesurer par cytométrie de flux la fluorescence d'un substrat de la Pgp accumulé dans la lignée K562/R7. En présence d'une molécule qui inhibe (ou « module ») la fonction d'efflux de la Pgp, on observera une forte rétention du substrat fluorescent par la lignée surexprimant la Pgp, et donc une plus forte fluorescence (figure V.1). Le substrat utilisé dans ce cas est la daunorubicine (**DNR**) qui possède un fluorophore.

Après avoir vérifié l'absence de fluorescence intrinsèque du modulateur étudié, on comparera la fluorescence de la lignée K562/R7 incubée avec le substrat fluorescent, en présence ou en absence du modulateur à l'essai.

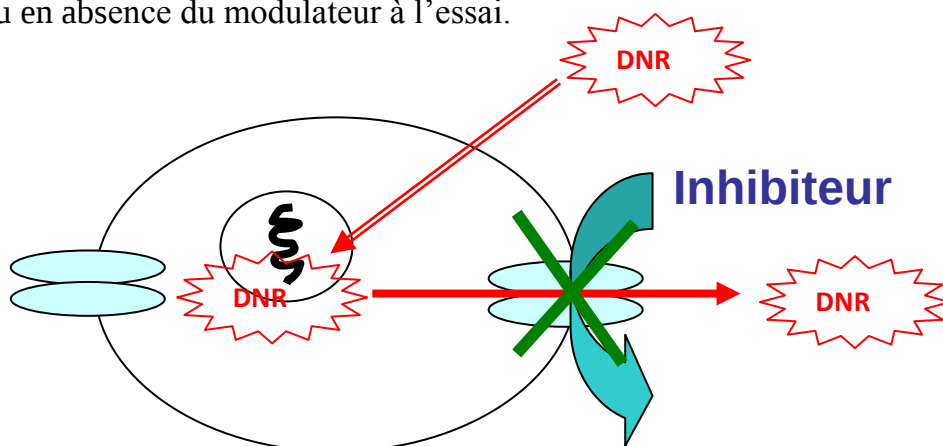


Figure V.1 : Principe du test de criblage de la Pgp [3]

c) Protocole du test

1.10^6 cellules K562/R7 sont incubées à 37°C pendant 1 heure dans 1 mL du milieu RPMI 1640 contenant une concentration finale de 10 μ M de daunorubicine, en présence ou non de modulateur. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) à 4°C, puis maintenues dans la glace jusqu'à leur analyse par cytométrie de flux sur FACS-II (Becton-Dickinson Corp., Mountain View, CA) (Figure V.2).

Deux essais sont effectués pour chaque test. La cyclosporine A, un modulateur de la Pgp, est utilisée comme témoin positif avec une concentration finale de 2 μ M. Les extraits et composés purs sont testés à une concentration de 10 μ g/mL. Les résultats sont exprimés en comparant l'augmentation de la fluorescence induite par les produits testés par rapport à celle observée avec la cyclosporine A.

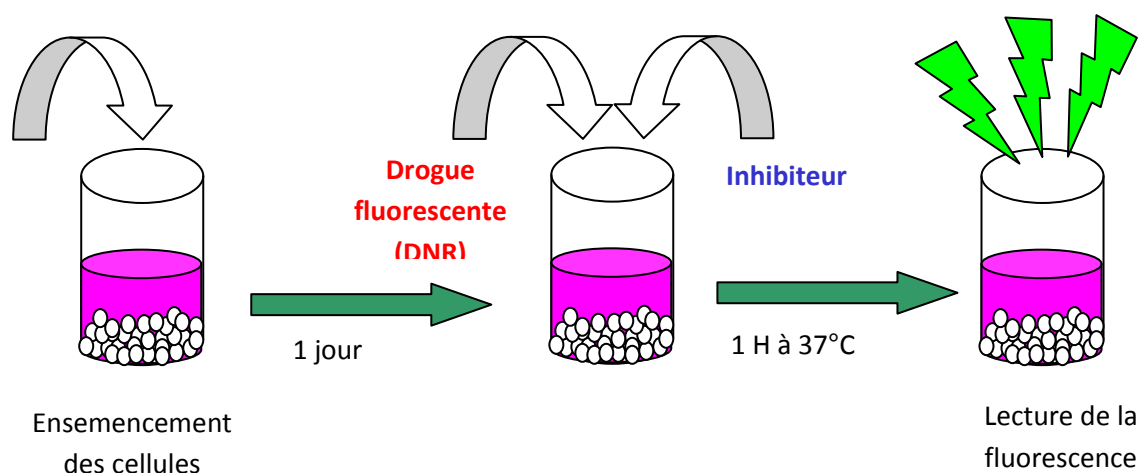


Figure V.2 : Protocole du test de criblage sur la Pgp [1]

IV.2 .Test de criblage sur Pgp et BCRP (cellules transfectées)

a) Marquage cellulaire

Ce test a été réalisé par l'équipe du Dr. Attilio Di Pietro (Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP) – Lyon – France). Afin d'être triées, les cellules HEK-293-T482 ou MDA-MB-231 (cellules cancéreuses de sein humain) sont marquées à l'aide d'un composé fluorescent, la mitoxantrone substrat à la fois de la Pgp et de la BCRP. Les cellules sont ensemencées deux jours auparavant. Une fois la confluence atteinte, un volume suffisant de milieu (recouvrant les cellules), contenant 5 μ M de mitoxantrone est ajouté.

Les cellules sont mises à incuber pendant 30 min à 37°C, puis elles sont lavées deux fois avec du PBS et remises à incuber à 37°C pendant 1 heure dans du milieu de culture. Une fois détachées du support à l'aide de trypsine, puis centrifugées (5 min à 1500 RPM), les cellules sont reprises dans du PBS à une concentration entre 1 et 5 millions de cellules/mL. Il s'avère que ces cellules (HEK-293) sont très adhérentes.

Afin de minimiser le colmatage des capillaires du trieur, il convient donc d'ajouter quelques gouttes de trypsine dans la solution cellulaire. Le tri cellulaire a été réalisé à l'aide d'un FACS Diva Vantage dont les caractéristiques des lasers sont :

Laser COHERENT® Entreprise™ IIC : (émission 488 nm et UV de 351 à 364 nm)

Laser rouge (émission 633 nm)

b) Mesure de l'inhibition de l'accumulation des drogues

Les cellules,ensemencées deux jours auparavant, sont incubées pendant 30 min en présence du substrat fluorescent transporté par BCRP et PgP (la mitoxantrone à 5 µM), pendant 30 minutes à 37°C en présence de 5µM du composé inhibiteur testé, celui-ci étant mis en solution dans le DMSO. Cette étape constitue la phase d'accumulation intracellulaire du substrat fluorescent.

Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS puis mises à incuber en présence de l'agent inhibiteur, mais en absence de substrat fluorescent, pendant 1 heure à 37°C (phase d'efflux du substrat fluorescent). Les cellules sont alors détachées du support à l'aide de trypsine et remises en suspension dans un volume de 300 µL de PBS afin d'être analysées par cytométrie de flux.

Des contrôles sont réalisés, d'une part, en absence d'inhibiteur et, d'autre part, en présence d'un inhibiteur de référence (GF 120918 ou Elacridar). Les taux d'inhibition sont calculés avec la relation (A) (page 207). Le cytomètre utilisé est un FACS Diva Vantage équipé d'un laser UV 351 à 364 nm (lecture en UV).

IV.3 Criblage sur CpABC3

Le criblage sur la H6-NBD1 a été réalisé au laboratoire de parasitologie (ISPB, Faculté de pharmacie, UCBL - Lyon1) par le Dr. Philippe Lawton. La H6-NBD1 est une protéine recombinante (45 kDa) d'origine parasitaire obtenue par surexpression puis purification à partir du parasite *Cryptospridium parvum* [4].

Trois mesures de fluorescence sont réalisées pour chaque test en utilisant des microcuves en quartz de 1 cm sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer LS-3B. La H6-NBD1 est diluée à une concentration de 0.25 μ M dans 390 μ L d'une solution Tris 50 mM : pH 7,3, KCl 100 mM et HECAMEG (détergent) 0.02%.

Les composés à tester sont ajoutés (10 μ l) et le mélange est incubé pendant 30 min à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. La fluorescence intrinsèque est mesurée à 328 nm (sous une excitation à 295 nm, ciblant uniquement les résidus tryptophanes).

Les contrôles sont effectués dans les mêmes conditions en utilisant le dernier bain de dialyse au lieu de H6-NBD1 pour supprimer toute interférence due à l'imidazole qui a été utilisé au cours de la purification de la protéine H6-NBD1. Les composés testés sont dissous pour aboutir à des concentrations stock de 40 mM dans le DMSO puis dilués jusqu'à une concentration finale en DMSO de 0.25%.

Pour voir si ces molécules se lient au domaine NBD1, on mesure l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de la protéine recombinante causée par la fixation du substrat sur le ou les sites spécifiques de l'ATP et/ou des stéroïdes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]- H.Van Den Dool, P. D. Kratz, J. Chromatogr., 11, 463 - 471. 1963.
- [2]- H.Van Den Dool, thèse de Doctorat, Standardisation of GLC of Essentiel Oils, Université de Groningen, 1974.
- [3]- I.Raad, thèse de Doctorat, Coumarines naturelles et de synthèse inhibitrices de transporteurs ABC impliqués dans le phénomène de chimiorésistance, UCBL lyon 1, 2006.
- [4]- P. Lawton, M. Pélandakis, A.F. Pétavy, N. Walchshofer, Mol. Biochem. Parasitol., 152, 101-107. 2007.

CONCLUSION GENERALE

Parmi les espèces *Ferula* rencontrées en Algérie, seulement deux espèces (*F. communis* et *F. tingitana*) sont bien exploitées au niveau des études phytochimiques et biologiques. Des activités biologiques intéressantes ont été rapportées pour les divers types de structures isolées à partir de ce genre. Certains composés ont montré notamment des activités chimiopréventives ou cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cancéreuses.

L'étude phytochimique réalisée, dans ce travail, sur les parties aériennes de l'espèce *F. vesceritensis* (plante endémique à l'Algérie) a permis de renforcer sa connaissance phytochimique. En effet, seize composés ont été isolés et identifiés dans cette espèce grâce à l'utilisation combinée de différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques ainsi que les données de la littérature. Les points les plus importants à faire ressortir de ce travail peuvent être résumés comme suit :

- L'étude de l'extrait au dichlorométhane (DCM) s'est soldée par l'isolement de treize composés, dont douze appartiennent à la famille des sesquiterpènes (9 sesquiterpènes de type daucane et 3 de type coumarinique). La prédominance des daucanes par rapport au sesquiterpènes coumariniques constatée est en accord avec la classification interne proposée dans le genre *Ferula* [29]. Ces molécules sont estérifiées le plus souvent sur leurs positions dans l'ordre décroissant C-6, C-10 et C-2. Notons que le groupement le plus fréquent était l'anisate suivi de l'acétyle puis le benzoate représenté par une seule molécule. A la différence de l'étude menée sur les racines de la même espèce par Zellagui [6], aucune molécule estérifiée par un angélate n'est identifiée. Le composé **9** (Lasidiol-10 α -anisate) est quant à lui identifié pour la première fois dans le genre *Ferula*.
- Le composé **13** correspond à l'acide anisique. Il est mis en jeu dans l'esterification des sesquiterpènes daucanes au cours de leur biogénèse.
- Le travail entrepris sur l'extrait méthanolique a abouti à l'isolement de deux flavonoïdes (de type flavone diglycosylée) communs au genre *Ferula* et à la famille des Apiaceae ainsi qu'un ose connu, il s'agit du 2-C-méthyl-érythritol.
- L'étude menée sur de l'extrait hexanique par LC-UV et LC-MS à son tour, a conduit à l'identification de quelques constituants communs de cet extrait et celui au DCM. Ces composés sont représentés par les composés **6**, **10**, **11** et **12**. Par ailleurs, son analyse par GC/MS a permis de proposer une vingtaine de composés volatils.

- Le criblage des extraits obtenus à partir des 4 différentes plantes sur Pgp, ont mis en évidence le pouvoir inhibiteur important de ceux issus de l'espèce *F.vesceritensis*.
- La majorité des sesquiterpènes isolés de l'extrait DCM ont fait à leur tour l'objet de tests sur Pgp et BCRP. Nous avons noté que huit sur les neuf composés évalués sur Pgp en utilisant des cellules sélectionnées, ont une activité supérieure à 30%, avec des taux particulièrement élevés pour les éthers de sesquiterpène et coumarine. En effet, ces composés sont décrits dans la littérature comme étant de bons modulateurs de Pgp [50, 53]. Ils ont montré des activités inhibitrices semblables à celle de la Cyclosporine A utilisée comme référence.
- Les sesquiterpènes daucanes ont été évalués dans cette étude, pour la première fois sur Pgp et BCRP. Le composé **9** (lasidiol-10-anisate) s'est montré nettement plus actif que tous les autres composés de la même classe sur les deux protéines utilisées et ceci dans les deux tests effectués. La position du groupement anisate semble être le facteur déterminant dans le cas des deux transporteurs ABC. L'activité modulatrice de Pgp ne semble pas dépendre de l'acétylation, alors que la présence du méthoxyle sur la partie benzoyle est en sa faveur. Il est cependant difficile de tirer des conclusions quant aux relations structure-activité, d'autres investigations sur une série homologue doit être menée à cet effet.
- Les taux d'inhibition de BCRP obtenus n'étaient supérieurs à 30% que pour les composés **9** et **6**. Ils étaient respectivement de 51% et 31%. Les valeurs des pouvoirs d'inhibition pour les 6 composés testés en utilisant des cellules transfectées sur Pgp et BCRP, avec une concentration de 5µM, ne sont pas comparables à celles de l'inhibiteur de référence (GF 120918). Nous retenons que les deux sesquiterpènes coumariniques ont été moins actifs sur Pgp dans le second test.
- Le troisième test a permis de montrer que seulement les deux sesquiterpènes coumariniques **10** et **11** possèdent une importante affinité vis-à-vis du domaine H-6 NBD1 d'origine parasitaire de la Pgp. Ces résultats ont laissé suggérer, que ces composés se lient à la protéine plutôt au niveau du site stéroïde.

Bien que cette étude ait révélé les potentialités que possèdent les sesquiterpènes à restaurer l'activité cytotoxique de quelques agents anticancéreux dans des lignées cellulaires résistantes, ces premiers résultats doivent être confirmés par d'autres tests avec une plus large gamme de composés. La cytotoxicité de ces composés doit être également étudiée.