



**HAL**  
open science

# Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacées)

Racha Alkhatib

► **To cite this version:**

Racha Alkhatib. Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacées). Chimie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT: . tel-00520891

**HAL Id: tel-00520891**

**<https://theses.hal.science/tel-00520891>**

Submitted on 24 Sep 2010

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

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

**ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ  
UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET  
BIOLOGIQUES**

**Thèse de Doctorat  
Sciences du médicament**

**Soutenue le 21 septembre 2010**

**par**

**Racha ALKHATIB**

**Étude phytochimique et activité cytotoxique des  
métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin  
et *Ferula lycia* Boiss. (Apiacées)**

Jury composé de :

Professeur	Sevsen SAHPAZ
Professeur	Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA
Professeur	Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS
Professeur	Murielle CUENDET
Docteur	Thierry IDZIOREK
Professeur	François BAILLEUL

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur



## **Étude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss. (Apiacées)**

Les plantes du genre *Ferula* (Apiacées) sont des herbacées vivaces répandues dans l'Asie centrale, la région méditerranéenne et l'Afrique du Nord. Des études récentes ont montré l'intérêt de certains composés isolés des espèces de ce genre comme agents chimiopréventifs ainsi que pour surmonter la résistance aux anticancéreux. Dans ce cadre deux plantes du genre *Ferula* récoltées dans deux régions différentes de la Turquie ont été choisies pour ce travail : *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss.

Vingt esters sesquiterpéniques dont sept structures nouvelles, deux acides phénoliques et un saponoside ont été isolés. Toutes ces structures ont été établies par méthodes spectrales (SM et RMN).

Sur le plan pharmacologique, toutes les molécules isolées ont été testées pour leurs activités cytotoxiques vis-à-vis des lignées cellulaires leucémiques résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase : K562R (imatinib-résistantes) et DA1-3b/M2 (imatinib et dasatinib-résistantes). L'élaeochytrine A (6-anthraniloyljaeschkeanadiol), s'est révélée être le composé le plus actif et le plus sélectif vis-à-vis des cellules tumorales avec des  $CI_{50}$  de l'ordre de 10  $\mu$ M.

## **Phytochemical and cytotoxic activity of *Ferula elaeochytris* Korovin and *Ferula lycia* Boiss. (Apiaceae)**

Plants of the genus *Ferula* (Apiaceae) are perennial herbs distributed in Central Asia, the Mediterranean region and North Africa. Recent studies have shown the interest of some compounds isolated from *Ferula* species as chemopreventive agents and to overcome resistance to cancer.

Thus, we have studied two Turkish plants of the genus *Ferula*: *Ferula elaeochytris* Korovin and *Ferula lycia* Boiss. Seven new sesquiterpene esters, along with thirteen known ones, two phenolic acids and a saponin were isolated. All structures were established by spectral methods, NMR, MS.

All isolated compounds were tested for their cytotoxic activities against two tyrosine kinase inhibitor-resistant leukemic cell lines: K562R (imatinib-resistant) and DA1-3b/M2 (dasatinib-resistant). Elaeochytrin A (6-anthraniloyljaeschkeanadiol) proved to be the most active and selective to tumor cells with  $IC_{50}$  around 10  $\mu$ M.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Lille Nord de France (Lille2), dirigé par Monsieur le Professeur **François Bailleul**.

Je tiens à remercier le Professeur **François Bailleul** de m'avoir chaleureusement accueillie au sein de l'équipe et d'avoir encadré ce travail. Ses compétences scientifiques, sa disponibilité, son soutien et sa gentillesse m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement :

Madame le Professeur **Sevsen Sahpaz** pour son soutien, son enthousiasme et son optimisme pour ce travail. Je lui adresse mes plus vifs remerciements de m'avoir permis de travailler sur des plantes turques. Je la remercie également d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame le Professeur **Marie-Geneviève Dijoux-Franca** qui m'a fait découvrir le monde de la pharmacognosie. Je lui suis également très reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier :

Madame le Professeur **Marie-Aleth Lacaille-Dubois**

d'avoir accepté de se consacrer à la lecture de ce manuscrit et d'en être le rapporteur.

Madame le Professeur **Murielle Cuendet**,

Monsieur le Docteur **Thierry Idziorek**,

de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Monsieur le Docteur **Thierry Hennebelle** d'avoir encadré ce travail avec rigueur et disponibilité. Je le remercie également pour ses conseils avisés et ses remarques pertinentes et enrichissantes qui m'ont été d'une grande aide pour l'aboutissement de ce travail.

Monsieur le Professeur **Bruno Quesnel** d'avoir accepté de réaliser les tests de cytotoxicité au sein de son unité.

Monsieur le Professeur **Francis Trotin** pour ses conseils scientifiques.

Madame le Docteur **Yelda Güzel** d'avoir récolté et identifié *Ferula lycia*.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

Merci aussi à tous mes collègues du laboratoire qui étaient au long de ces quatre années ma famille en France : **Isabelle, Mélanie, Murielle, Vincent, Jennifer, Nadine, Malika** et **Marie-Agnès**.

Je remercie tout particulièrement ma mère, mes sœurs, mon frère et mon oncle qui m'ont soutenue pendant toutes les étapes de ma vie.

Je remercie **Sami** et **Koussay**, qui m'ont donné le courage et l'esprit de vie pendant les moments les plus difficiles. Je remercie Sami d'avoir réalisé les tests biologiques.

*À la mémoire de mon cher père*  
*À la Syrie*

## Liste de publications

Alkhatib, R., Hennebelle, T., Joha, S., Idziorek, T., Preudhomme, C., Quesnel, B., Sahpaz, S. & Bailleul, F. Activity of elaeochytrin A from *Ferula elaeochytris* on leukemia cell lines. *Phytochemistry* 69, 2979-2983, (2008).

Alkhatib, R., Hennebelle, T., Roumy, V., Sahpaz, S., Süzgeç, S., Akalın, E., Meriçli, A.H. & Bailleul, F. Coumarins, caffeoyl derivatives and a monoterpenoid glycoside from *Ferulago asparagifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* 37, 230-233, (2009).

Alkhatib, R., Hennebelle, T., Joha, S., Roumy, V., Güzel, Y., Biabiany, M., Idziorek, T., Preudhomme, C., Quesnel, B., Sahpaz, S. & Bailleul, F. Humulane and Germacrane Sesquiterpenes from *Ferula lycia*. *Journal of Natural Products* 73, 780-783, (2010).



# Sommaire

Abréviations, Symboles et Structures d'Acyles.....	1
Introduction.....	3
<b>1. Généralités</b>	
1.1 Le Cancer.....	4
1.2 La leucémie.....	4
1.2.1 Les leucémies aiguës.....	5
1.2.2 Les leucémies chroniques.....	6
1.2.3 La leucémie myéloïde chronique.....	6
1.2.3.1 Définition.....	6
1.2.3.2 Evolution.....	7
1.2.3.3 Traitement.....	8
1.2.3.4 La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase.....	10
1.3 La leucémie et les produits naturels.....	11
1.4 La famille des Apiacées.....	13
1.5 Le genre <i>Ferula</i> .....	14
1.5.1 Morphologie des <i>Ferula</i> .....	15
1.5.2 Utilisation en médecine traditionnelle.....	18
1.6 Travaux antérieurs.....	21
1.6.1 Biogenèse des sesquiterpènes.....	21
1.6.2 Les métabolites secondaires.....	22
1.6.2.1 Les dérivés monoterpéniques.....	22
1.6.2.2 Les dérivés sesquiterpéniques.....	23
1.6.2.3 Les dérivés coumariniques.....	28
1.6.2.4 Les dérivés sulfuriques.....	32
1.6.2.5 Les propiophénones.....	33
1.6.3 <i>Ferula</i> et cancer.....	33
1.6.3.1 Propriétés antigénotoxique et chimiopréventive.....	34
1.6.3.2 Activité cytotoxique.....	34
1.6.4 <i>Ferula</i> et résistance aux médicaments anticancéreux.....	35
<b>2. Étude Phytochimique</b>	
2.1 <i>Ferula lycia</i> .....	38
2.1.1 Caractères morphologiques.....	38
2.1.2 Description de la poudre de <i>F. lycia</i> .....	39
2.1.3 Répartition géographique.....	39
2.1.4 Étude phytochimique.....	39
2.1.5 Isolement des composés.....	40
2.1.6 Identification des composés.....	41
Composé J5.....	42
Composé J1.....	49
Composé J2.....	52
Composé J3.....	55
Composé J4.....	57

Composé J6.....	60
Composé J7.....	62
Composé J8.....	65
Composé F1, F2 et F3.....	67
Composé G1.....	72
Composé G2.....	76
2.2 <i>Ferula elaeochytris</i> .....	78
2.2.1 Caractères morphologiques.....	78
2.2.2 Description de la poudre de <i>F. elaeochytris</i> .....	79
2.2.3 Répartition géographique.....	79
2.2.4 Étude phytochimique.....	80
2.2.5 Isolement des composés.....	80
2.2.6 Identification des composés.....	81
Composé E1.....	82
Composé E2.....	87
Composé E3.....	89
Composé E4.....	93
Composé E5.....	95
Composé E6.....	99
Composé E7.....	103
Composé E8.....	106
Composé E9.....	109
Composé E10.....	111
<b>3. Activité biologique</b>	
3.1 Activités cytotoxiques.....	116
Conclusion.....	121
<b>4. Matériel et Méthodes</b>	
4.1 Matériel végétal et extraction.....	123
4.2 Méthodes chromatographiques analytiques.....	123
4.2.1 Chromatographie sur couche mince.....	123
4.2.2 Chromatographie liquide haute performance.....	126
4.3 Méthodes chromatographiques préparatives.....	127
4.3.1 Chromatographie sur colonne ouverte.....	127
4.3.2 Chromatographie liquide à moyenne pression.....	128
4.3.3 Chromatographie liquide haute performance semi-préparative.....	128
4.4 Méthodes physico-chimiques.....	129
4.4.1 Spectrophotométrie UV-visible.....	129
4.4.2 Spectrométrie de masse.....	130
4.4.3 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.....	132
4.4.3.1 RMN du <sup>1</sup> H.....	132
4.4.3.2 RMN du <sup>13</sup> C.....	134
4.4.3.3 RMN bidimensionnelle.....	134
4.4.4 Spectrométrie infrarouge.....	135
4.4.5 Pouvoir rotatoire.....	136
4.5 Matériel et méthodes appliqués à la biologie.....	137
4.5.1 Les cellules.....	137
4.5.2 La culture <i>in vitro</i> .....	137

4.5.3 Test de viabilité.....	138
Bibliographie.....	139
Annexes	
Annexe 1 : Données physiques et spectrales des nouveaux composés....	146
Annexe 2 : Article de <i>Ferulago asparagifolia</i> .....	148

# Abréviations, Symboles et Structures d'Acyles

## Abréviations

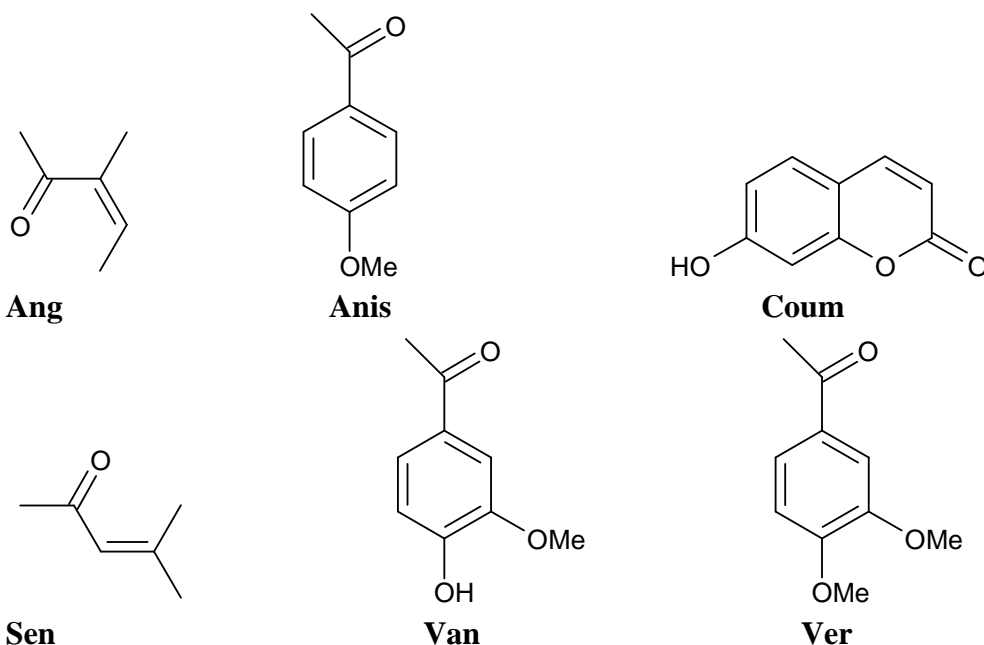
ABL	Abelson
Ac	acétyle
AcOEt	acétate d'éthyle
ADN	acide désoxyribonucléique
Ang	angéloyle
Anis	anisoyle (4-méthoxybenzoyle)
APG	Angiosperm Phylogeny Group
BCR	Break point Cluster Region
Bnz	benzoyle
ButOH	butanol
CC	chromatographie sur colonne ouverte
CCM	chromatographie sur couche mince
CI <sub>50</sub>	concentration inhibitrice de 50%
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CLMP	chromatographie liquide à moyenne pression
CD <sub>3</sub> OD	méthanol deutéré
CDCl <sub>3</sub>	chloroforme deutéré
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	dichlorométhane
CH <sub>3</sub> OH ou MeOH	méthanol
COSY	correlated spectroscopy
Coum	coumarine (7-hydroxyumbelliferone)
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet dédoublé
<i>ddd</i>	doublet dédoublé dédoublé
DI <sub>50</sub>	dose inhibitrice de croissance de 50%
<i>dt</i>	doublet de triplet
EP	éther de pétrole
FPP	farnésylpyrophosphate
Gal	galactose
Glu	glucose
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IM	imatinib
ITK	inibiteur de tyrosine kinase
IR	infra rouge
LMC	leucémie myéloïde chronique
LA	leucémie aiguë
MTT	tetrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)]
Na	sodium
PA	phase d'accélération
PB	phase blastique
PC	phase chronique
PEG	polyéthylène glycol
<i>p</i> -OH-Bnz	<i>p</i> -hydroxybenzoyle
<i>qd</i>	quadruplet
RMN	résonance magnétique nucléaire

RMN $^1\text{H}$	résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ( $J$ .modulé) $^{13}\text{C}$	résonance magnétique nucléaire du carbone 13 en $J$ modulé
ROESY	Rotational Overhauser enhancement spectroscopy
$s$	singulet
Sen	sencioyle
SM-ESI	spectrométrie de masse en mode electrospray
SM-IC	spectrométrie de masse par ionisation chimique
SM-IE	spectrométrie de masse par impact électronique
$t$	triplet
TYR	tyrosin
u.m.a.	unité de masse atomique
UV	ultraviolet
Van	vanilloyle
Ver	veratroyle

## Symboles

Hz	hertz
$J$	constante de couplage exprimée en Hz
$m/z$	masse/charge d'un ion
ppm	partie par million
$\delta$	déplacement chimique exprimé en ppm
$\lambda_{\text{max}}$	longueur d'onde d'absorption maximale
$\Delta\Psi\text{m}$	transmembranaire mitochondrial

## Structures d'Acyles



## INTRODUCTION

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passe notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules.

Le genre *Ferula* L. comprend environ 150 espèces répandues dans l'Asie centrale, la région méditerranéenne et l'Afrique du Nord [Pimenov *et al.*, 1993]. Plusieurs espèces sont connues en médecine traditionnelle pour traiter des troubles neurologiques, digestifs et de l'érection [Heywood, 1971]. En Asie centrale, *F. assa-foetida* est utilisée aussi pour le traitement du cancer [Lee *et al.*, 2010], alors que certaines variétés de *F. communis* sont connues pour leur toxicité [Rubiolo *et al.*, 2006].

En France, les cancers présentent la première cause de décès chez l'homme et la seconde chez la femme, après les maladies cardiovasculaires. Un nombre important de médicaments est utilisé pour traiter le cancer. Néanmoins la toxicité plus importante que prévue et la résistance justifient le souci de développement de nouvelles molécules, pouvant limiter les résistances aux traitements existant ou présentant une toxicité moindre.

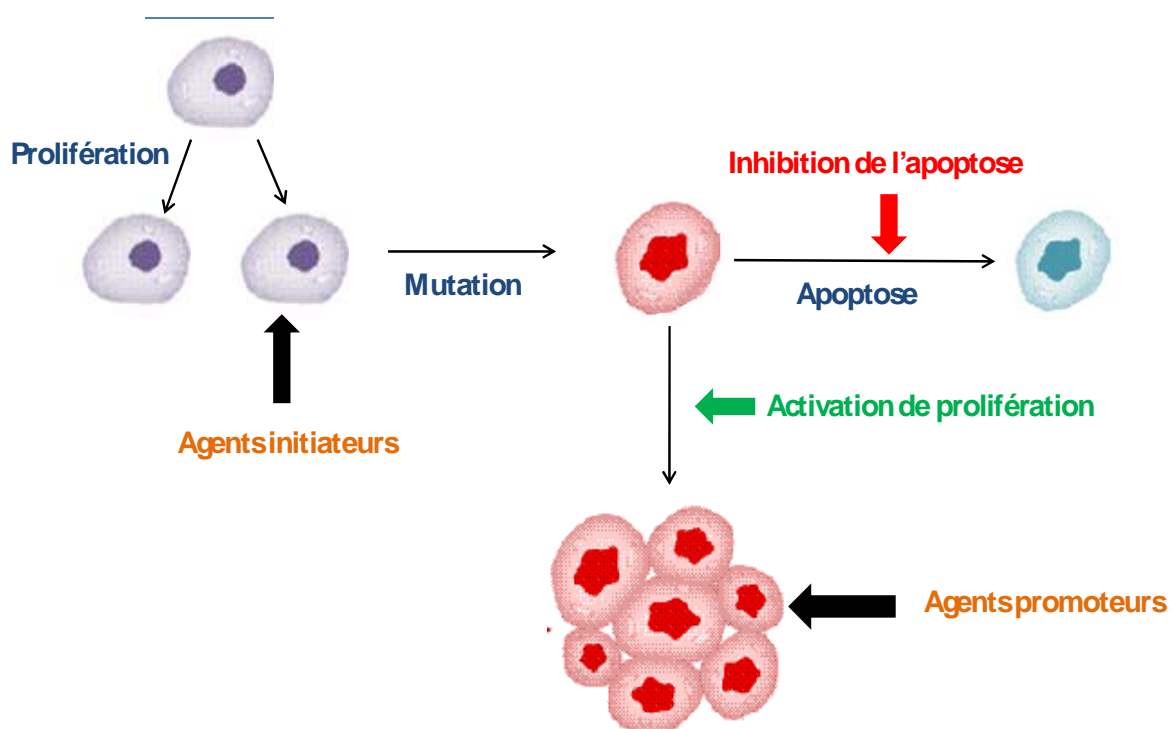
Dans ce cadre, ce travail est centré sur la recherche de substances naturelles anti-leucémiques de la famille des Apiacées. L'objectif principal est la recherche, l'isolement, l'identification de molécules et l'évaluation de leur cytotoxicité vis-à-vis de lignées cancéreuses de la leucémie myéloïde chronique. Nous avons choisi trois plantes appartenant à la flore turque : deux espèces de genre *Ferula* (*F. lycia* et *F. elaeochytris*) et une espèce du genre *Ferulago* (*F. asparagifolia*). Comme tous les composés isolés de *F. asparagifolia* (voir annexe 2) étaient complètement inactifs, nous ne détaillerons pas le travail sur cette plante.

En premier lieu, nous présenterons la leucémie myéloïde chronique et les thérapeutiques actuellement utilisées. En second lieu, nous nous intéresserons à la famille des Apiacées et au genre *Ferula*. La troisième partie sera consacrée à l'étude phytochimique de *F. lycia* et *F. elaeochytris*. Dans ce chapitre, nous détaillerons les étapes de purification et nous décrirons le processus d'identification et d'élucidation structurale des composés isolés. Une présentation des résultats biologiques obtenus *in vitro* sera détaillée ainsi que la discussion des résultats obtenus. Pour finir, nous présenterons la conclusion de ce travail de recherche.

# GÉNÉRALITÉS

## 1.1 Le Cancer

Le cancer est une maladie résultant d'altérations de l'ADN cellulaire. Les cellules atteintes par ces altérations (cellules malignes) ne suivent plus le processus normal de mort cellulaire programmée, l'apoptose, et deviennent immortelles (figure 1). Elles se nourrissent par formation de nouveaux vaisseaux sanguins ; on appelle ce processus l'angiogenèse. Ces cellules ont la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants. Le développement d'un cancer est le résultat d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de la prolifération cellulaire et, d'autre part, l'inhibition de signaux restreignant le potentiel prolifératif des cellules. Différents agents conduisent au développement d'un cancer. Classiquement, on distingue les agents initiateurs et les agents promoteurs. Les agents initiateurs sont des agents génotoxiques qui induisent une lésion définitive de l'ADN. Par contre, les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur [Coldiz *et al.*, 2006] (figure 1).



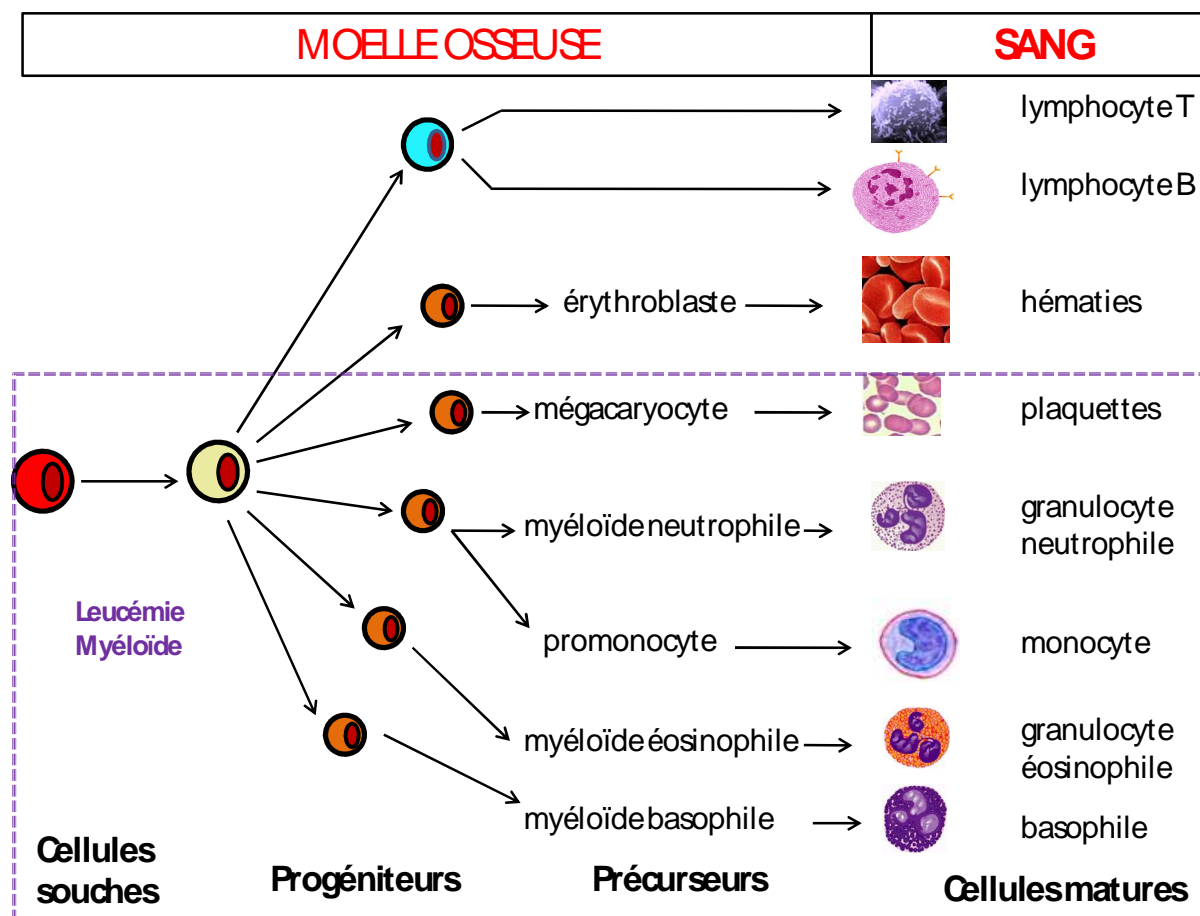
**Figure 1.** Processus de cancer : activation de la prolifération cellulaire et inhibition de l'apoptose : rôle des agents initiateurs et promoteurs.

## 1.2 La leucémie

Les leucémies sont des cancers caractérisés par une prolifération maligne des cellules de la moelle osseuse (cellules sanguines ou précurseurs de cellules sanguines) appelée également tumeur liquide, à distinguer des lymphomes qui sont aussi des tumeurs de cellules

## GÉNÉRALITÉS

du sang mais se développant dans les aires lymphoïdes secondaires. Chaque type de leucémie peut progresser différemment, mais généralement les cellules malignes prennent la place des cellules normales et empêchent leurs fonctions. Sans traitement efficace, les cellules leucémiques envahissent d'autres organes et aboutissent à une conséquence fatale. La leucémie est cliniquement et pathologiquement scindée en deux : leucémies aiguës et chroniques. Elle est aussi scindée en fonction de l'origine des cellules tumorales : cellules lymphoïdes et cellules myéloïdes [Burke *et al.*, 2008 ; Vardiman *et al.*, 2009] (figure 2).



**Figure 2.** Les compartiments de l'hématopoïèse et la leucémie myéloïde.

### 1.2.1 Les leucémies aiguës

Ce sont des leucémies caractérisées par la prolifération rapide de cellules immatures du sang, anormales histologiquement et inefficaces fonctionnellement. Les leucémies aiguës apparaissent chez l'enfant et le jeune adulte. Un traitement immédiat doit être effectué pour éviter la diffusion de ces cellules aux organes.



# GÉNÉRALITÉS

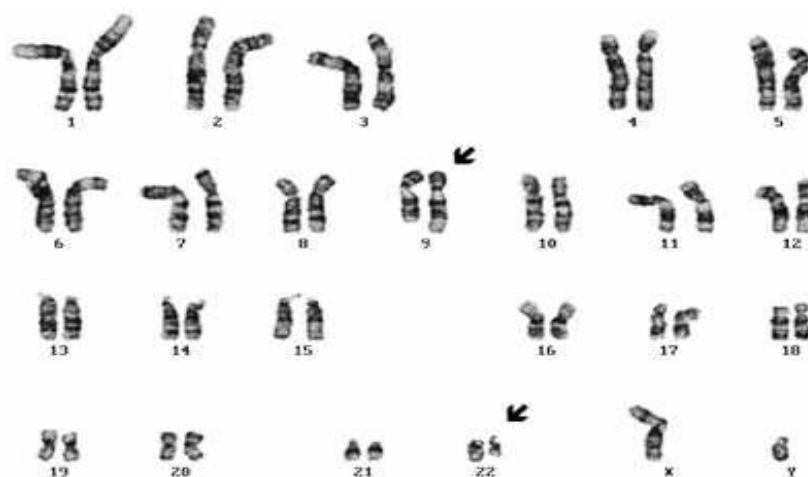
## 1.2.2 Les leucémies chroniques

Au contraire des leucémies aiguës, les cellules cancéreuses sont plus matures, bien que toujours anormales et passant dans le sang. Les cellules tumorales sont créées en plus grand nombre que la normale mais au début suffisamment faiblement pour ne pas entraîner le décès. Les leucémies chroniques arrivent principalement chez les personnes âgées.

## 1.2.3 La leucémie myéloïde chronique

### 1.2.3.1 Définition

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif clonal dû à la transformation d'une cellule souche pluripotente. Elle se caractérise entre autres, par la présence dans le sang du patient d'une augmentation considérable du nombre de globules blancs (hyperleucocytose) pouvant aller de 100 à 300 000. Cette pathologie est liée à une anomalie chromosomique dite chromosome Philadelphie qui correspond à un chromosome 22 raccourci, résultat de la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 :  $t(9;22)(q34;q11)$  (figures 3, 4). La biologie moléculaire a permis de démontrer que lors de la translocation, le proto-oncogène ABL (homogène du gène murin Abelson) est transloqué du chromosome 9 sur le chromosome 22 chez qui le point de cassure se produit dans une région courte appelée *Break point Cluster Region* ou BCR. Cette anomalie provoque la production d'une protéine chimère BCR-ABL (figure 4) dotée d'une forte activité tyrosine kinase dérégulée, responsable de la prolifération et de l'accumulation des cellules granuleuses [Goldman *et al.*, 2003 ; Leguay *et al.*, 2005].



**Figure 3.** Caryotype médullaire montrant un chromosome 22 raccourci correspondant au chromosome Philadelphie.

## GÉNÉRALITÉS

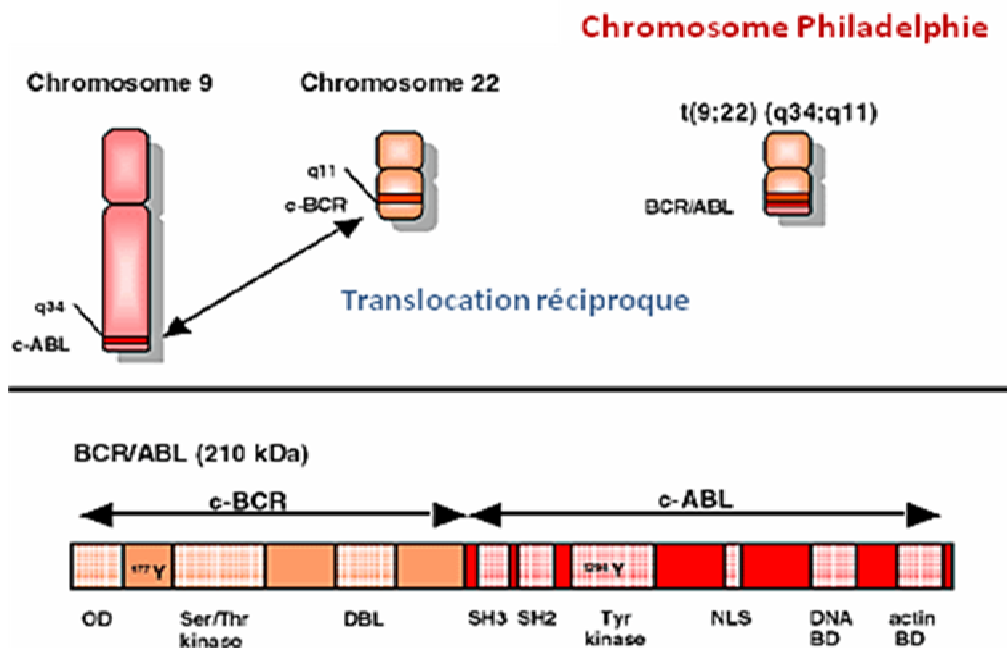


Figure 4. Mécanisme de la formation du chromosome Philadelphie.

### 1.2.3.2 Evolution

L'évolution de la leucémie myéloïde chronique se fait en trois phases. La première est une phase chronique (PC) suivie d'une phase d'accélération (PA) (10% des patients se présentent d'emblée à ce stade) et la troisième est une phase de transformation en leucémie aiguë ou phase blastique (LA ou PB) [Treuil, 2008].

1. *Phase chronique* : Dans cette phase, la cellule granuleuse prédomine dans la moelle osseuse et dans la myélémie. Environ 50% des patients ne présentent que peu ou pas de symptômes pendant cette phase précoce. La phase chronique peut durer de plusieurs mois à quelques années (durée moyenne de 5 à 6 ans), mais évoluera en définitive vers la phase suivante.

2. *Phase d'accélération* : Cette phase constitue une étape intermédiaire observée dans environ 75 % des cas, entre la phase chronique et la phase blastique. La durée moyenne de cette phase est de 6 à 9 mois.

3. *Phase blastique* : cette phase est marquée par tous les signes cliniques d'une leucémie aiguë : fièvre, amaigrissement, douleurs osseuses, anémie, thrombopénie, hyperleucocytose avec une population leucoblastique devenant rapidement prédominante, effaçant la polynucléose et la myélémie. L'espérance de vie après apparition des signes de l'acutisation est inférieure à 6 mois.

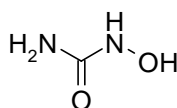
## GÉNÉRALITÉS

L'étiologie de la LMC est inconnue, mais dans 5% des cas, elle est secondaire à une exposition chronique au benzène ou aux radiations ionisantes. Le nombre de nouveaux cas par année est estimé entre 600 et 1000 en France. L'incidence augmente au fur et à mesure que l'âge avance et on constate, d'autre part, une très légère prédominance masculine.

### 1.2.3.3 Traitement

L'objectif thérapeutique de la LMC est la rémission hématologique ainsi que les rémissions cytogénétiques [Melo *et al.*, 2008 ; Tulliez, 2007].

*L'hydroxyurée* (Hydréa®) : C'est un antagoniste de la synthèse de l'ADN de faible toxicité qui permet d'obtenir une rémission hématologique dans environ 70% des cas, mais les rémissions cytogénétiques sont très rares.



### Hydroxyurée

*Interféron  $\alpha$*  : C'est le traitement standard depuis 1980 avec une rémission hématologique dans 80% des cas, mais les rémissions cytogénétiques ne sont obtenues que chez 10 à 20% des patients.

*Greffes* : Les allogreffes de moelle osseuse sont le traitement qui seul peut offrir une chance raisonnable de guérison du malade. L'indication est malheureusement limitée : âge inférieur à 45 ans et donneur HLA compatible dans la fratrie.

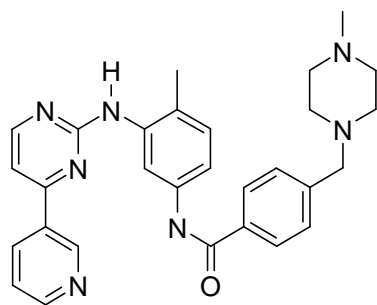
Il y a aussi l'autogreffe de moelle osseuse qui est une possibilité de greffe en cours d'étude.

*Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITKs)*

***Le mésilate d'imatinib (Glivec®) :***

L'imatinib (appelé aussi CGP57148B ou STI571) est un inhibiteur spécifique de la tyrosine kinase BCR-ABL. Il agit par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de la protéine kinase (figure 5). Glivec® est actuellement le traitement de référence indiqué chez les patients atteints d'une LMC en phase chronique. Cependant, une résistance est parfois observée. De plus, ce traitement peut être responsable d'effets secondaires imposant son arrêt [Tulliez, 2007 ; Treuil, 2008].

## GÉNÉRALITÉS



Imatinib

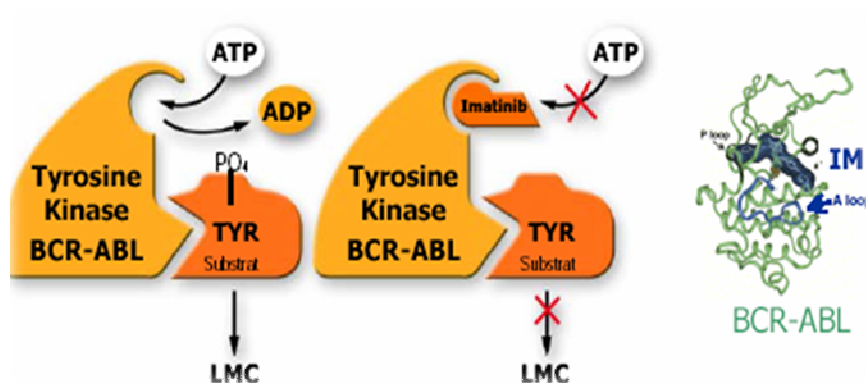
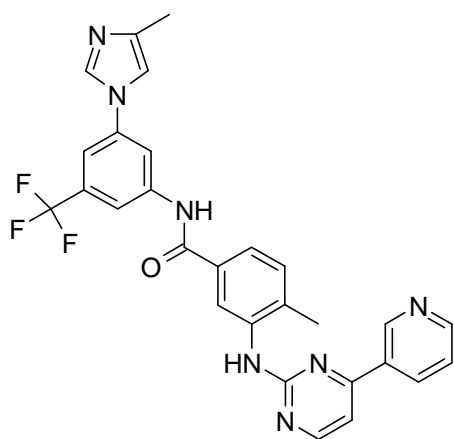


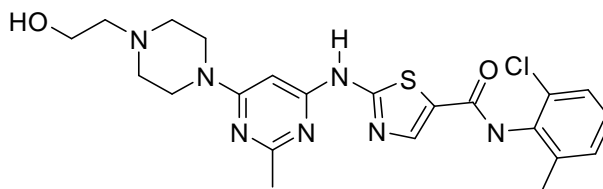
Figure 5. Mécanismes d'action de BCR-ABL et de son inhibition par l'imatinib.

### Le nilotinib (Tasigna®) :

*In vitro*, le nilotinib (AMN107) a 10 à 50 fois plus d'activité inhibitrice que l'imatinib sur BCR-ABL non muté et muté.



Nilotinib



Dasatinib

## GÉNÉRALITÉS

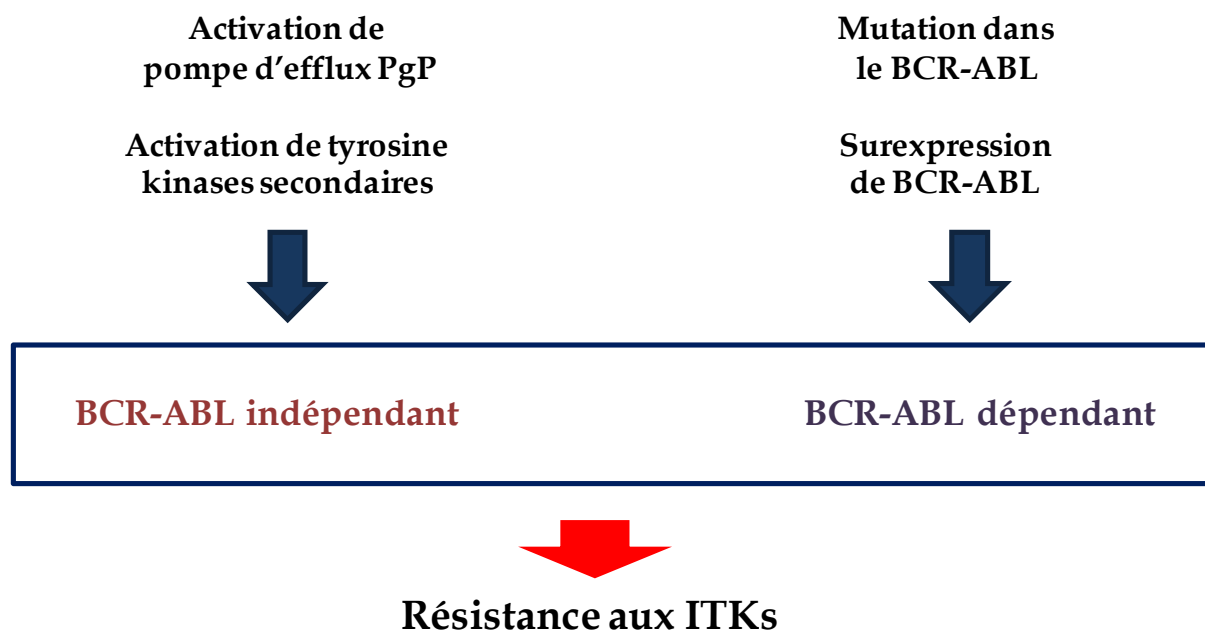
### *Le dasatinib (Sprycel®) :*

Le dasatinib (BMS-354825) est environ 400 fois plus actif que l'imatinib. Il a montré son efficacité *in vitro* et *in vivo* chez les souris sensibles ou résistantes à l'imatinib. Chez les malades résistants ou intolérants à l'imatinib, on a pu observer l'efficacité et la bonne tolérance du dasatinib.

#### 1.2.3.4 La résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase

Malgré l'efficacité et la sélectivité des inhibiteurs de tyrosine kinase, certains patients développent une résistance. Pour surmonter cette résistance, il fallait trouver ses mécanismes. Des études menées sur des lignées cellulaires rendues résistantes par des expositions à des doses croissantes des inhibiteurs de tyrosine kinase, ainsi que des études réalisées sur des prélèvements de cellules sanguines ou médullaires de patients atteints de LMC résistantes ont permis d'identifier plusieurs mécanismes impliqués dans la résistance.

Certains mécanismes sont dépendants de BCR-ABL (c'est le cas de modèles de cellules DA1-3b/M2) alors que les autres en sont indépendants, liés à la pompe d'efflux PgP, à la séquestration extracellulaire des inhibiteurs de tyrosine kinase, ou à l'activation d'autres tyrosines kinases (c'est le cas de modèles de cellules K562) [Tulliez, 2007] (schéma 1).



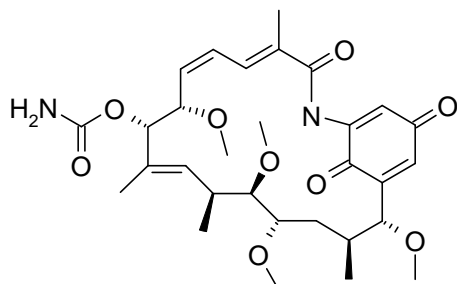
**Schéma 1.** Certains mécanismes de résistance aux ITKs.

De nouvelles molécules sont en cours d'évaluation clinique ou préclinique (ex. homoharringtonine, trioxyl d'arsenic, flavopiridol) afin de surmonter la résistance et éradiquer la maladie résiduelle.

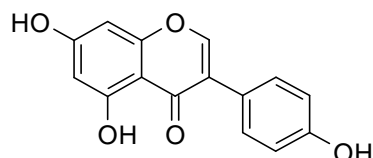
## GÉNÉRALITÉS

### 1.3 La leucémie et les produits naturels :

1. *L'herbimycine A et la génistéine* : Ce sont les premières molécules qui ont montré *in vitro* une inhibition sélective de tyrosine kinase dans des lignées cellulaires BCR-ABL<sup>+</sup> [Honma *et al.*, 1990].

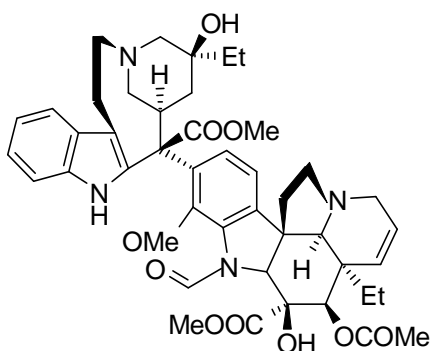


**Herbimycine A**



**Génistéine**

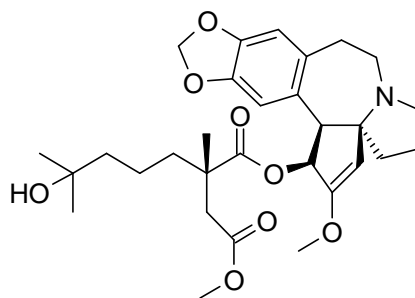
2. *La vincristine (Oncovin®)* : C'est un alcaloïde extrait de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). Ce produit se fixe sur les dimères de tubuline libre et empêche leur polymérisation en microtubules. Il est utilisé en association dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques [Bohannon *et al.*, 1963].



**Vincristine**

3. *L'homoharringtonine* : L'homoharringtonine (HHT) héli-synthétique est un alcaloïde présent à l'état de trace dans plusieurs espèces de conifères chinois rares et menacés, appartenant au genre *Cephalotaxus*. L'HHT est largement utilisée en Chine dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). L'HHT inhibe la synthèse protéique, induit l'apoptose et elle est synergique ou additive en combinaison à l'imatinib. L'HHT est actuellement en essais de phase cliniques II chez les patients résistants aux ITKs [Melo *et al.*, 2008].

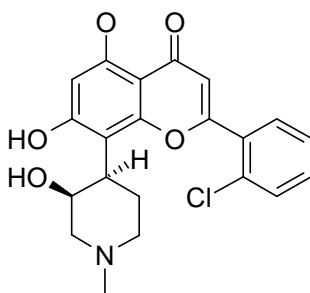
## GÉNÉRALITÉS



### Homoharringtonine

3. *Le trioxyde d'arsenic* : Il existe à l'état naturel sous le nom de *fleur d'arsenic*, sous l'aspect d'une poudre blanche inodore ou de cristaux transparents. On le trouve également dans les poisons. Le trioxyde d'arsenic ( $As_2O_3$ ) induit l'apoptose de cellules BCR-ABL<sup>+</sup> et diminue la prolifération des blastes de LMC en dégradant préférentiellement la protéine BCR-ABL. Des études récentes ont montré que le traitement par l'arsenic peut stimuler la division active des cellules souches de la LMC, les cellules devenant alors sensibles à l'imatinib. Un essai clinique de phase II sur un traitement combinant l'imatinib à l'arsenic est actuellement en cours [Melo *et al.*, 2008].

4. *Le flavopiridol* : Le traitement combinant l'imatinib au flavopiridol augmente le dommage mitochondrial, active les caspases et l'apoptose dans les lignées cellulaires de LMC mais pas dans les lignées leucémiques BCR-ABL négatives. Une étude clinique de phase I sur des leucémies BCR-ABL<sup>+</sup>, a montré que la combinaison imatinib/flavopiridol était tolérable et responsable de quatre réponses objectives, y compris deux réponses hématologiques complètes [Melo *et al.*, 2008].



### Flavopiridol

## GÉNÉRALITÉS

### 1.4 La famille des Apiacées

La famille des Apiacées est une famille de plantes appartenant à la classe des Magnoliopsida (Dicotylédones). Elle est composée de 1400 espèces réparties en 300 genres environ, répandues sur presque tout le globe, mais surtout dans les régions tempérées de l'hémisphère boréal. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle.

Il s'agit de plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois arbustives. Les feuilles sont alternes, composées, rarement simples. Souvent, les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige. La tige est souvent creuse. Les fleurs sont réunies en ombelles simples ou composées, munies de bractées appelées **involucelles** à la base. Elles comptent 5 pétales et 5 étamines et un ovaire à deux loges. Les fruits sont formés de 2 **méricarpes** accolés à un axe central, le **carpophore**, se séparant à maturité. Chaque méricarpe présente deux faces : commissurale (plane) et dorsale (convexe). La face dorsale porte au moins 5 côtes séparées par 4 **vallécules** contenant des canaux sécréteurs courts (**bandelettes**) [Coste *et al.*, 1998].

Les Apiacées contiennent des plantes alimentaires (la carotte, *Daucus carota*), des condiments (le cumin, *Cuminum cyminum*), des plantes médicinales (le khella, *Ammi visnaga* et le fenouil, *Foeniculum vulgare*) ainsi que des plantes toxiques (la grande ciguë, *Conium maculatum*) [Bruneton, 2009].



## GÉNÉRALITÉS

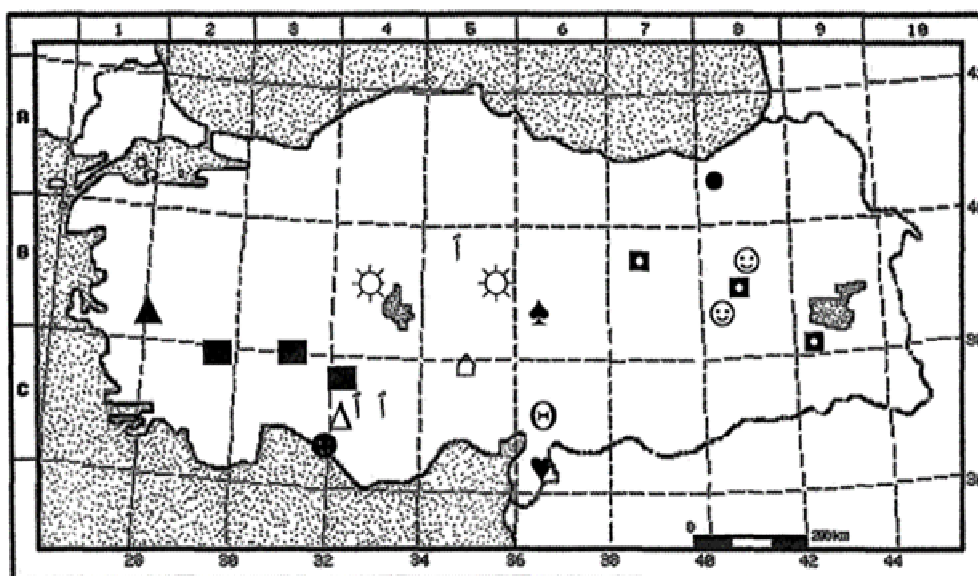
### 1.5 Le genre *Ferula* L.

Les plantes du genre *Ferula* L. croissent souvent dans les régions arides. Ce genre comporte environ 150 espèces présentes du bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie centrale [Pimenov *et al.*, 1993].

**Position systématique du genre *Ferula*** [la classification phylogénétique APG III 2009].

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Division</b>	Magnoliophyta (Angiospermes)
<b>Classe</b>	Magnoliopsida (Dicotylédones)
<b>Clade</b>	Campanulidées ou Euastéridées
<b>Ordre</b>	Apiales
<b>Famille</b>	Apiaceae
<b>Genre</b>	<i>Ferula</i> L.

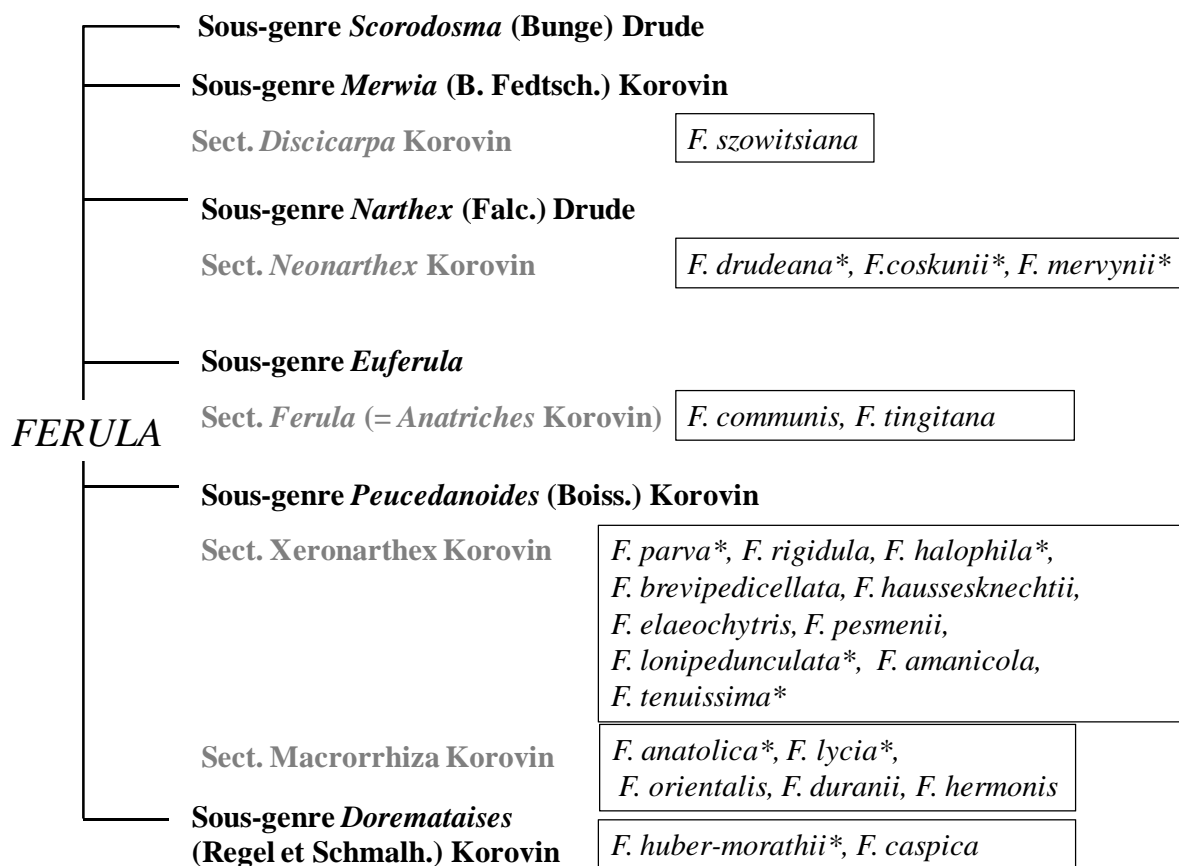
Le genre *Ferula* contient 6 sous-genres qui sont divisés aussi en sections. En Turquie, 17 espèces ont été observées dans les différentes régions (carte 1), parmi elles 10 sont endémiques (schéma 2) [Sağiroğlu, 2005].



▲ = *F. anatolica*, ■ = *F. lycia*, ☼ = *F. halohila*, ⊙ = *F. duranii*, △ = *F. pesmenii*, † = *F. parva*, △ = *F. drudeana*, ♣ = *F. longipedunculata*, ⊖ = *F. tenuissima*, ♥ = *F. coskunii*, ▣ = *F. brevipedicellata*, ⊕ = *F. huber-morathii*, ● = *F. mervynii*.

Carte 1. Distribution des espèces de *Ferula* en Turquie.

## GÉNÉRALITÉS



**Schéma 2.** Sous-genres de *Ferula* et position des espèces observées en Turquie.  
\*Espèces endémiques.

### 1.5.1 Morphologie des *Ferula*

Ce sont des plantes vivaces, à tige mesurant de 1-4 m, creuse, glabre, robuste, et à racines épaisses. Les feuilles sont toutes composées en lanières linéaires. Les fleurs sont jaunes, en ombelles à 5-40 rayons, les latérales plus petites que la centrale et souvent stériles et à involucre nulle ou à plusieurs folioles. Le calice a 5 dents ; les pétales sont ovales, acuminés, entiers, à pointe dressée ou courbée en dedans, les styles sont étalés ou réfléchis (figure 6).

Le fruit est ovale ou oblong, comprimé par le dos, glabre, entouré d'un rebord plan ; les méricarpes sont à 5 côtes, les trois dorsales filiformes, égales, les deux marginales dilatées en aile aplatie; les vallécules sont à plusieurs bandelettes, le carpophore est libre, bifide et les graines sont à face commissurale plane [Coste *et al.*, 1998].

## GÉNÉRALITÉS

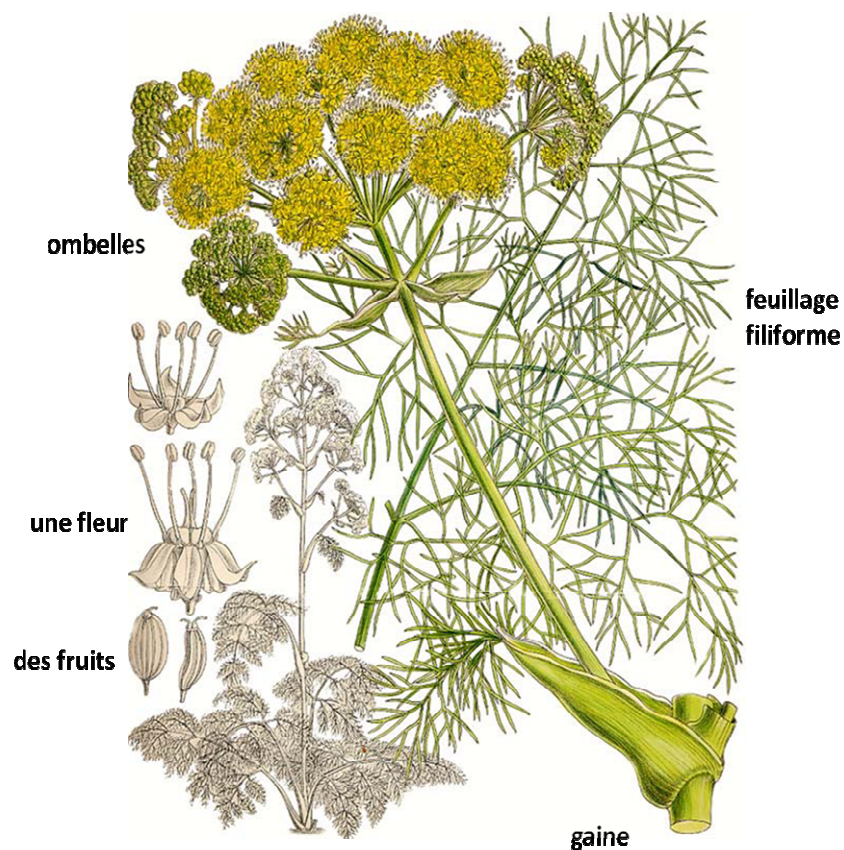


Figure 6. *Ferula communis*.

Les caractéristiques des fruits et des feuilles basales sont essentielles pour l'identification précise des *Ferula*. Voici des exemples de la systématique de l'identification de certaines espèces de la flore turque [Korovin, 1947], [Sağiroğlu, 2005].

**Tableau 1.** Exemples de la systématique de l'identification des *Ferula*.

**a** : feuilles basales, **b** : sections transversales et **c** : vues dorsales des méricarpes de quelques espèces de *Ferula*.

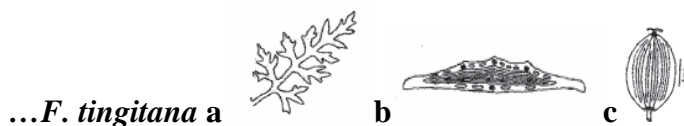
### 1. Feuilles complètement glabres.

#### 1.1 Ombelle à (15-) 20-30(-30) rayons.

- ✓ Feuilles linéaires filiformes, 10-50 mm, fruits oblongs 9-17×6-13 mm.



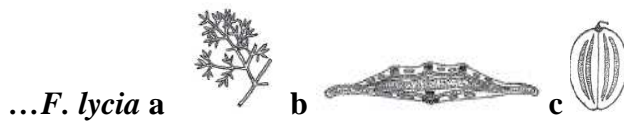
- ✓ Feuilles lancéolées ovales oblongues, 1-6 mm, fruits elliptiques oblongs 8-15×5-7 mm.



## GÉNÉRALITÉS

### 1.2 Ombelle à 6-15 rayons.

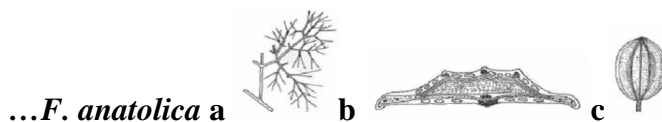
- ✓ Feuilles oblongues linéaires, 0,5-1 mm de largeur, fruits orbiculaires oblongs.



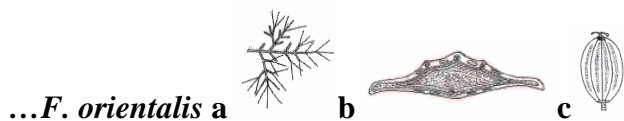
#### 1.2.1 Feuilles finement sétacées ou filiformes, si linéaires moins de 0,5 mm.

##### 1.2.1.1 Feuilles sétacées filiformes, 5-20 mm.

- ✓ Pédoncule d'ombelles centrales à 4-7 cm de longueur ; la face dorsale du méricarpe à 3 bandelettes par vallécule.



- ✓ Pédoncule d'ombelles centrales absent ou >0,5 cm de longueur ; la face dorsale du méricarpe à 1 bandelette par vallécule.



##### 1.2.1.2 Feuilles finement sétacées jusqu'à linéaires 1,5-3 (-4) mm

- ✓ Pétales blanchâtres verts, feuilles linéaires, 0,4 mm de largeur, fruits elliptiques oblongs.



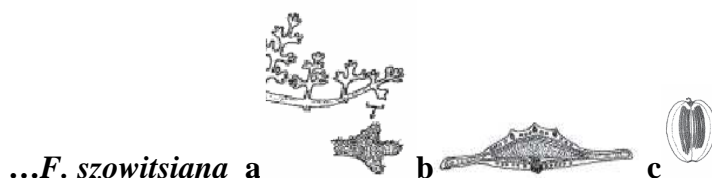
- ✓ Pétales jaunes, feuilles finement sétacées, 0,2 de mm largeur.



## 2. Feuilles peu poilues à sétuleuse ou pubérulent

- ✓ La face dorsale des pétales est sétacée setuleuse-pubérulente, la face dorsale du méricarpe à 4-6 bandelettes par vallécule.

## GÉNÉRALITÉS



### 2.1 Pétales complètement glabres, la face dorsale du méricarpe à une bandelette (ou 4-6 par vallécule).

- ✓ Toutes les ombelles fertiles.



- ✓ Inflorescence ramifiée ; 18-20 rayons par ombelle.



### 2.2 Inflorescence en panicule; 4-18 rayons par ombelle.

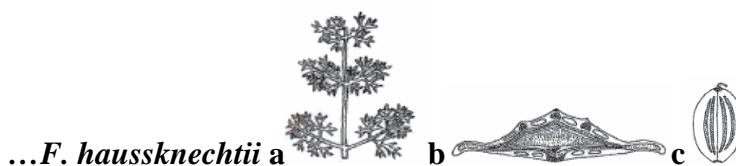
#### 2.2.1 Feuilles oblongues à linéaires lancéolées ou courtes sétacées 1 à 5-7 mm.

##### 2.2.1.1 Fruits ovales largement lancéolés 6-14×3-3,5 cm.

- ✓ Feuilles 1,5-2,5 cm × 0,5 mm, rigides, méricarpes 9-12 mm.



- ✓ Feuilles 1 à 5-7×0,8-1,2 mm, douces, méricarpes 13-16 mm.



#### 1.5.2 Utilisation en médecine traditionnelle.

De nombreuses espèces de *Ferula* sont connues depuis l'antiquité en tant que sources de gommés-oléorésines (des sécrétions obtenues par entailles répétées de la partie supérieure des racines) surtout le galbanum et l'ase fétide. L'ase fétide est réputée carminative et spasmolytique [Bruneton, 2009]. Elle est rarement toxique.

## GÉNÉRALITÉS

Les racines et les résines des espèces de *Ferula* sont souvent les parties utilisées en médecine traditionnelle (tableau 2).

**Tableau 2.** Utilisations traditionnelles de *Ferula* spp.

Noms d'espèces	Utilisation traditionnelle	
<i>F. alliacea</i> Boiss.	Source d'ase fétide. Traitement de l'épilepsie, de l'hystérie et de la piqûre de scorpion. Propriétés carminatives et antiseptiques intestinales.	[Heywood, 1971]
<i>F. assa-foetida</i> L.	Source d'ase fétide Arômes alimentaires. Propriétés expectorantes, carminatives, laxatives, stimulantes, antispasmodiques et anthelminthiques. Traitement de la grippe et du cancer.	[Heywood, 1971] [Lee <i>et al.</i> , 2009] [Lee <i>et al.</i> , 2010]
<i>F. badrakema</i> Kos. & Pol. syn. <i>F. gummosa</i>	Propriétés stimulantes. Traitement de l'épilepsie, de l'hystérie et des maux d'estomac.	[Heywood, 1971]
<i>F. communis</i> L. var. <i>breviedia</i> var. <i>communis</i>	Autrefois utilisée pour traiter l'hystérie et la dysenterie. Plante toxique pour les animaux et l'homme. Utilisée pour son latex, pour traiter les infections de la peau.	[Heywood, 1971] [Rubiolo <i>et al.</i> , 2006]
<i>F. diversivittata</i> Regel & Schmalh	Prévention des convulsions et de l'hystérie	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008c]
<i>F. elaeochytris</i> Korovin	Les parties aériennes sont utilisées pour augmenter la fertilité chez les animaux. Aphrodisiaque.	[Miski <i>et al.</i> , 1983]
<i>F. ferulaeoides</i> (Steud) Korovin syn. <i>F. feruloides</i>	Utilisée pour traiter les muscles raides.	[Nagatsu <i>et al.</i> , 2002]
<i>F. ferulago</i> L.	Antispasmodique	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2001]
<i>F. foetida</i> (Bunge) Regel	Source d'ase fétide Propriétés diurétiques, anthelminthiques, antirhumatismales et antispasmodiques.	[Heywood, 1971] [Duan <i>et al.</i> , 2002]
<i>F. galbaniflua</i> Boiss. & Buhse syn. <i>F. gummosa</i> Buhse	Source de galbanum. Utilisée dans la parfumerie et comme encens dans les églises. Propriétés antispasmodiques, expectorantes, carminatives et stimulantes. Traitement de l'aménorrhée et de l'hystérie.	[Heywood, 1971]
<i>F. hermonis</i> Boiss.	Utilisée au Moyen-Orient comme aphrodisiaque.	[Lhuillier <i>et al.</i> , 2005]
<i>F. jeaschkeana</i> Vatke	Traitement des maladies et problèmes de peau.	[Heywood, 1971]
<i>F. kuhistanica</i> Eug. & Kor.	Traitement des maladies et problèmes de peau.	[Tamemoto <i>et al.</i> , 2002]
<i>F. marmarica</i> Aschtaub	Source de gommés-oléorésines.	[Heywood, 1971]
<i>F. narthex</i> Boiss.	Source d'ase fétide.	[Heywood, 1971]
<i>F. orientalis</i> L.	Source de gommés-oléorésines.	[Miski <i>et al.</i> , 1987a]

## GÉNÉRALITÉS

<i>F. persica</i> Willd.	Source de gommés-oléorésines. Antidiabétique, utilisée aussi contre les douleurs dorsales et les rhumatismes.	[Heywood, 1971]
<i>F. suaveolens</i> Aitchison Hemsley	Peut-être source de gommés-oléorésines.	[Heywood, 1971]
<i>F. sumbul</i> Hook syn. <i>F. moschata</i> (Reinsch) Koso-Pol	Source de gommés-oléorésines. Propriétés antispasmodiques, stimulantes et carminatives. Pour traiter les problèmes de système nerveux.	[Heywood, 1971]
<i>F. szowitsiana</i> DC syn. <i>F. microloba</i> Boiss.	Source de gommés-oléorésines. Utilisée pour les rhumatismes.	[Heywood, 1971]
<i>F. teterrima</i> Kar. & Koro.	Utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour les rhumatismes et des maladies de l'estomac.	[Yang <i>et al.</i> , 2006]
<i>F. tingitana</i> L.	Source de gommés-oléorésines.	[Heywood, 1971]
<i>F. varia</i> Borszcz syn <i>F. schair</i>	Traitement contre la fièvre, les parasites intestinaux et pour rincer la bouche. Source de galbanum.	[Suzuki <i>et al.</i> , 2007]
<i>F. vesceritensis</i> Coss. & Dur. ex Batt.	La décoction de fruits est utilisée pour traiter les maux de tête, la fièvre et les infections de la gorge.	[Oughlissi-Dehak <i>et al.</i> , 2008]

# GÉNÉRALITÉS

## 1.6 Travaux antérieurs

Les données phytochimiques du genre *Ferula* ont été rapidement développées pendant les 20 dernières années. Une centaine d'espèces de ce genre ont déjà fait l'objet d'études, et des centaines de composés ont été identifiées dont la majorité appartient aux terpenoïdes, plus précisément aux dérivés sesquiterpéniques. Cependant, seulement trois espèces (*F. communis*, *F. orientalis* et *F. szowitsiana*), parmi celles rencontrées en Turquie, sont bien exploitées au niveau des études phytochimiques et biologiques.

Comme la majorité des produits isolés appartient au groupe des dérivés sesquiterpéniques, nous allons commencer par la biogenèse des sesquiterpènes avant de présenter des exemples des produits répandus dans le genre *Ferula*.

### 1.6.1 Biogenèse des sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des molécules dont le point commun est d'être formés de trois unités isoprènes. La cyclisation du précurseur, le farnésylpyrophosphate (FPP) donne une variété de squelette de 15 carbones qui peut contenir 1 à 2 cycles.

Le genre *Ferula* est connu pour les dérivés de daucane, germacrane, eudesmane, humulane et guaiane (schéma 3).

La cyclisation de FPP peut conduire à l'humulane et aussi au cation germacrandiényle, susceptible de donner naissance à de nombreux composés bicycliques (daucane, eudesmane, guaiane,...) [Drew *et al.* ; 2009, Bruneton, 2009].

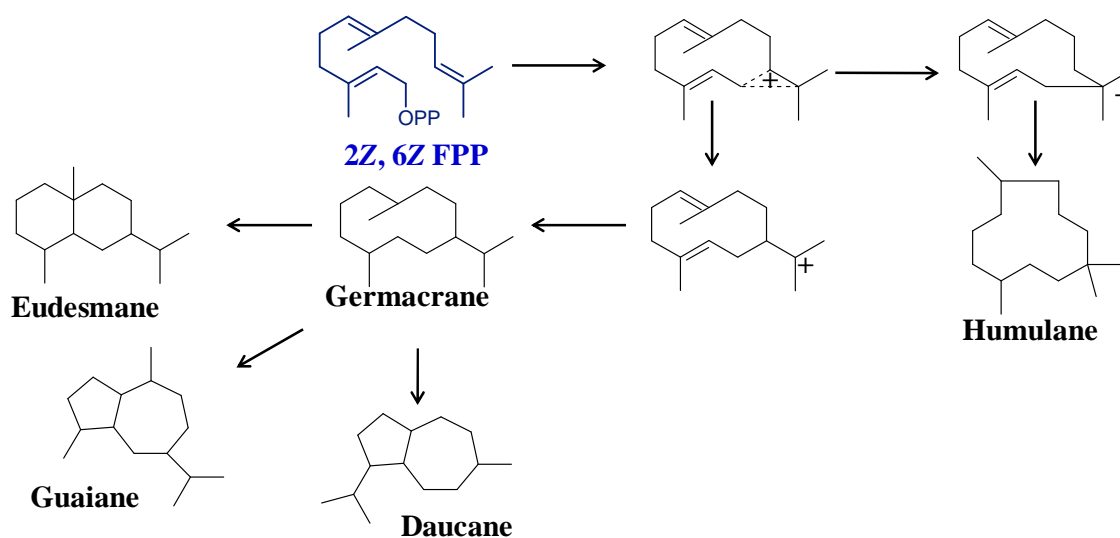


Schéma 3. Biogenèse des sesquiterpènes.



# GÉNÉRALITÉS

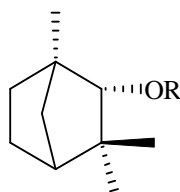
## 1.6.2 Les métabolites secondaires

### 1.6.2.1 Les dérivés monoterpéniques

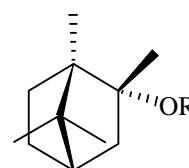
Dans les espèces de *Ferula*, ces composés sont représentés par des esters de bornéol (la chimigine et la chimganine) et de fenchol (stylosine) ou des monoterpénoïdes linéaires substitués par une coumarine (l'auraptène et la diversine). La chimigine et la chimganine sont répandues dans la section *Peucedanoïdes* (tableau 3).

**Tableau 3.** Source des dérivés monoterpéniques.

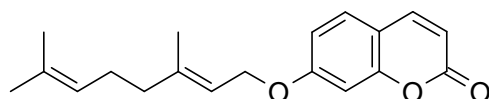
Composé	Source	Ref.
<b>Chimigine</b>	<i>F. angreni</i>	[Sagitdinova <i>et al.</i> , 1978a]
	<i>F. calcarea</i>	[Kerimov <i>et al.</i> , 1987]
	<i>F. dissecta</i>	[Bagirov <i>et al.</i> , 1984]
	<i>F. karategina</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. kyzylkumica</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. lapidosa</i>	[Borisov <i>et al.</i> , 1973]
	<i>F. nuratavica</i>	[Kobilov <i>et al.</i> , 1995b]
	<i>F. prangifolia</i>	[Kamilov <i>et al.</i> , 1972]
	<i>F. samarcandica</i>	[Eshbakova <i>et al.</i> , 2003]
<b>Chimganine</b>	<i>F. tschimganica</i>	[Kadyrov <i>et al.</i> , 1972]
	<i>F. calcarea</i>	[Kerimov <i>et al.</i> , 1987]
	<i>F. karategina</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. lapidosa</i>	[Borisov <i>et al.</i> , 1973]
	<i>F. stylosa</i>	[Bagirov <i>et al.</i> , 1980]
<b>Stylosine</b>	<i>F. stylosa</i>	[Bagirov <i>et al.</i> , 1980]
<b>Auraptène</b>	<i>F. szowitsiana</i> ( <i>F. microloba</i> )	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Diversine</b>	<i>F. diversivittata</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008c]



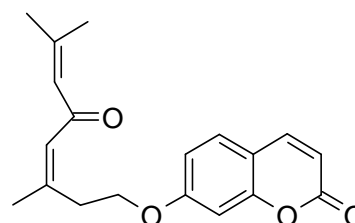
**Chimigine** R=*p*-OH-Bnz  
**Chimganine** R=Van



**Stylosine** R=Van



**Auraptène**



**Diversine**

## GÉNÉRALITÉS

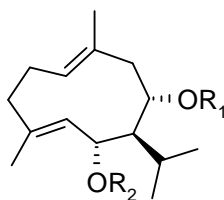
### 1.6.2.2 Les dérivés sesquiterpéniques

#### 1. Les germacrènes :

Les germacranolides sont les précurseurs de certains dérivés sesquiterpéniques [Bruneton, 2009]. Bien que les esters de germacrène soient relativement rares dans le règne végétal, la féroline et la chimganidine sont répandues dans la section *Xeronarthex* (sous-genre *Peucedanooides*) du genre *Ferula* (tableau 4).

**Tableau 4.** Source de la féroline et la chimganidine.

Composé	Source	Ref.
<b>Chimganidine</b>	<i>F. angrenii</i>	[Sagitdinova <i>et al.</i> , 1978a]
	<i>F. ferganensis</i>	[Kadyrov <i>et al.</i> , 1977]
	<i>F. karakalensis</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993b]
	<i>F. karategina</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. kyzylkumica</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. lapidosa</i>	[Borisov <i>et al.</i> , 1973]
	<i>F. pallida</i>	[Khasanov <i>et al.</i> , 1972]
	<i>F. tenuisecta</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
	<i>F. tschimganica</i>	[Kadyrov <i>et al.</i> , 1972]
<b>Féroline</b>	<i>F. angrenii</i>	[Sagitdinova <i>et al.</i> , 1978a]
	<i>F. calcarea</i>	[Kerimov <i>et al.</i> , 1987]
	<i>F. fedtschenkoana</i>	[Kamilov <i>et al.</i> , 1974]
	<i>F. ferganensis</i>	[Kadyrov <i>et al.</i> , 1977]
	<i>F. karakalensis</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993b]
	<i>F. karategina</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. kyzylkumica</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1993a]
	<i>F. lapidosa</i>	[Borisov <i>et al.</i> , 1973]
	<i>F. tenuisecta</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>Chimganidine</b>	<i>p</i> -OH-Bnz	H
<b>Féroline</b>	Van	H

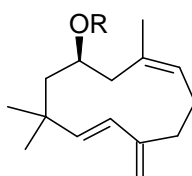
## GÉNÉRALITÉS

### 2. Les humulènes :

La férocine et la férocinine sont les plus répandues dans le genre *Ferula*. Elles ont été isolées de 6 espèces de la section *Xeronarthex* (tableau 5).

**Tableau 5.** Source de la férocine et la férocinine.

Composé	Source	Ref.
<b>Férocine</b>	<i>F. ceratophylla</i>	[Golovina <i>et al.</i> , 1977]
	<i>F. helenae</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
	<i>F. lapidosa</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
	<i>F. tatarica</i>	[Nazhimutdinova <i>et al.</i> , 1995]
	<i>F. tenuisecta</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
<b>Férocinine</b>	<i>F. ceratophylla</i>	[Golovina <i>et al.</i> , 1977]
	<i>F. helenae</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
	<i>F. lapidosa</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
	<i>F. tatarica</i>	[Nazhimutdinova <i>et al.</i> , 1995]
	<i>F. tenuisecta</i>	[Saidkhodzhaev <i>et al.</i> , 1985]
	<i>F. tschatcalensis</i>	[Sagitdinova <i>et al.</i> , 1983]



	R
<b>Férocine</b>	<i>p</i> -OH-Bnz
<b>Férocinine</b>	Van

### 1. Les lactones sesquiterpéniques :

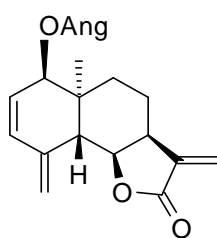
On peut distinguer deux types de lactones sesquiterpéniques : les dérivés d'eudesmane et ceux de guaiane. Voici des exemples de ces composés (tableau 6).

**Tableau 6.** Source de quelques lactones sesquiterpéniques.

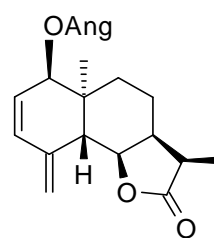
Composé	Source	Ref.
<b>Déhydroopodine</b>	<i>F. varia</i>	[Suzuki <i>et al.</i> , 2007]
	<i>F. oopoda</i>	[Serkerov, 1969]
<b>Oopodine</b>	<i>F. varia</i>	[Suzuki <i>et al.</i> , 2007]
	<i>F. oopoda</i>	[Serkerov, 1971]
<b>Féropodine</b>	<i>F. oopoda</i>	[Serkerov, 1971]
<b>Sémopodine</b>	<i>F. oopoda</i>	[Serkerov, 1976]
<b>8<math>\alpha</math>-angéloyloxy-10<math>\beta</math>-hydroxyguai-3-ène-6,12-olide</b>	<i>F. varia</i>	[Suzuki <i>et al.</i> , 2007]
<b>Diversolide A</b>	<i>F. diversittata</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008c]
<b>Diversolide D</b>	<i>F. diversittata</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008c]
<b>Diversolide G</b>	<i>F. diversittata</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008c]
<b>Diversolide F</b>	<i>F. diversittata</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008c]

# GÉNÉRALITÉS

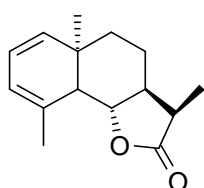
## Dérivés d'eudesmane



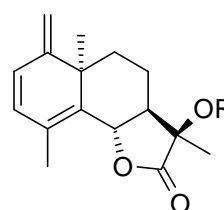
**Déhydroopodine**



**Oopodine**

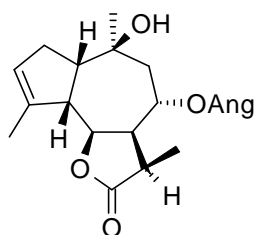


**Féropodine**

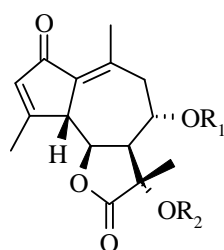


**Sémopodine**

## Dérivés de guaiane



**8 $\alpha$ -angéloyloxy-10 $\beta$ -hydroxyguaia-3-ène-6,12-olide**



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>Diversolide A</b>	Ang	Ang
<b>Diversolide D</b>	Ver	Ac
<b>Diversolide G</b>	Bnz	Ac
<b>Diversolide F</b>	Ver	Sen

## GÉNÉRALITÉS

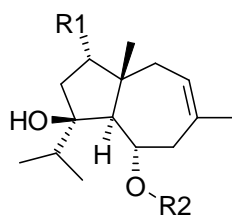
### 2. Les esters de daucane :

Plus de 150 dérivés de daucane ont été isolés du genre *Ferula*, surtout du sous-genre *Peucedanoides*. Les esters de jaeschkenadiol (la férutinine) sont très courants dans ces espèces (tableau 7).

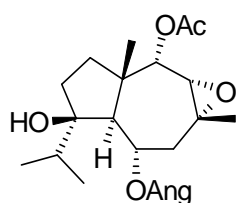
**Tableau 7.** Source des quelques dérivés de daucane.

Composé	Source	Ref.
<b>Jaeschkeanadiol</b>	<i>F. jaeschkeana</i> , <i>F. sinaica</i> , <i>F. communis</i>	[Ghisalberti, 1994]
<b>Férutinine</b>	<i>F. hermonis</i> <i>F. akitschkensis</i> , <i>F. communis</i> , <i>F. elaeochytris</i> , <i>F. jaeschkeana</i> <i>F. kuhistanica</i> , <i>F. lancerottensis</i> , <i>F. linkii</i> , <i>F. orientalis</i> , <i>F. ovina</i> , <i>F. soongorica</i>	[Galal <i>et al.</i> , 2001] [Ghisalberti, 1994]
<b>Férutidine</b>	<i>F. arrigonii</i> <i>F. communis</i> , <i>F. elaeochytris</i> , <i>F. kuhistanica</i> , <i>F. rigidula</i> , <i>F. sinaica</i>	[Appendino <i>et al.</i> , 1997] [Ghisalberti, 1994]
<b>2<math>\alpha</math>-Hydroxyférutidine</b>	<i>F. arrigonii</i>	[Poli <i>et al.</i> , 2005]
<b>Téférine</b>	<i>F. hermonis</i> <i>F. jaeschkeana</i> , <i>F. elaeochytris</i> , <i>F. kuhistanica</i> , <i>F. nuratavica</i> , <i>F. orientalis</i> , <i>F. rubroarenose</i> , <i>F. soongorica</i> , <i>F. tatarica</i> , <i>F. tenuisecta</i>	[Diab <i>et al.</i> , 2001] [Ghisalberti, 1994]
<b>Lapiférine</b>	<i>F. arrigonii</i> <i>F. lapidosa</i> , <i>F. latipinna</i> , <i>F. linkii</i>	[Appendino <i>et al.</i> , 1997] [Ghisalberti, 1994]
<b>Anisate de siol</b>	<i>F. arrigonii</i>	[Poli <i>et al.</i> , 2005]
<b>4<math>\beta</math>-hydroxy-5<math>\alpha</math>H-dauca-7-ène-6-one</b>	<i>F. hermonis</i>	[Lhuillier <i>et al.</i> , 2005]
<b>4<math>\beta</math>-hydroxy-5<math>\alpha</math>H-dauca-7-ène-6,9-dione</b>	<i>F. hermonis</i>	[Lhuillier <i>et al.</i> , 2005]
<b>3<math>\alpha</math>-éthoxy-8<math>\beta</math>-angéloyloxydauca-4-ène-9-one</b>	<i>F. hermonis</i>	[Lhuillier <i>et al.</i> , 2005]
<b>Tunetanine A</b>	<i>F. tunetana</i>	[Jubran <i>et al.</i> , 2010]
<b>Jaeschkenol</b>	<i>F. jaeschkeana</i>	[Ghisalberti, 1994]
<b>13-Vanilloxydaucol</b>	<i>F. linkii</i>	[Fraga <i>et al.</i> , 1989]

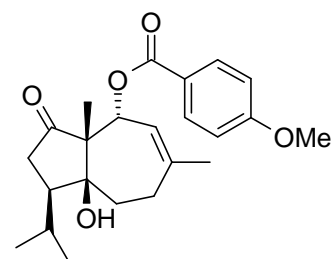
## GÉNÉRALITÉS



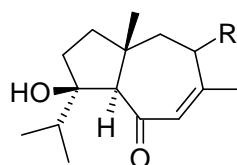
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>Jaeschkeanadiol</b>	H	H
<b>Férutinine</b>	H	<i>p</i> -OH-Bnz
<b>Férutidine</b>	H	Anis
<b>2<math>\alpha</math>-Hydroxyférutidine</b>	OH	Anis
<b>Téférine</b>	H	Van



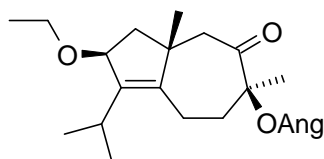
**Lapiférine**



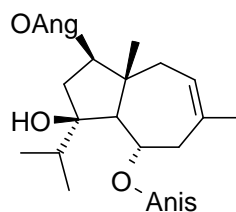
**Anisate de siol**



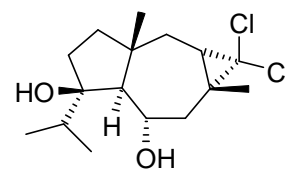
**4 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ H-dauca-7-ène-6-one** R=H<sub>2</sub>  
**4 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ H-dauca-7-ène-6,9-dione** R=O



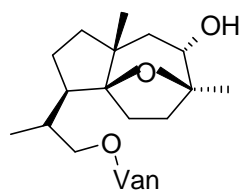
**3 $\alpha$ -éthoxy-8 $\beta$ -angeloyloxydauca-4-ène-9-one**



**Tunetanine A**



**Jaeschkenol**



13-Vanilloxydaucol

### 1.6.2.3 Les dérivés coumariniques

Les dérivés coumariniques sont très répandus dans le genre *Ferula*, surtout les éthers de coumarine-sesquiterpènes. Des farnésyle coumarines cycliques et des coumarines simples sont aussi isolées des différentes espèces de *Ferula* (tableau 8).

Tableau 8. Source des quelques dérivés coumariniques.

Composé	Source	Ref.
<b>Umbelliprénine</b>	<i>F. aitchisonii</i> , <i>F. arrigonii</i> , <i>F. assa-foetida</i> , <i>F. conocaula</i> , <i>F. eugenii</i> , <i>F. iliensis</i> , <i>F. linkii-TF</i> , <i>F. violaceae</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Persicaoside C</b>	<i>F. persica</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008a]
<b>Persicaoside D</b>	<i>F. persica</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2008a]
<b>Farnésiferol B</b>	<i>F. assa-foetida</i> , <i>F. kopetdagensis</i> , <i>F. szowitsiana</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Farnésiferol C</b>	<i>F. assa-foetida</i> , <i>F. caspica</i> , <i>F. kopetdagensis</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Acide galbanique</b>	<i>F. assa-foetida</i> , <i>F. kokanica</i> , <i>F. kopetdagensis</i> , <i>F. szowitsiana</i> , <i>F. violaceae</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Conférone</b>	<i>F. conocaula</i> , <i>F. foetidissima</i> , <i>F. inciso-serrata</i> , <i>F. iliensis</i> , <i>F. persica</i> , <i>F. sumbul</i> , <i>F. teterrima</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Conférol</b>	<i>F. assa-foetida</i> , <i>F. conocaula</i> , <i>F. foetidissima</i> , <i>F. inciso-serrata</i> , <i>F. iliensis</i> , <i>F. korshinskyi</i> , <i>F. lipskyi</i> , <i>F. moschata</i> , <i>F. pallida</i> , <i>F. persica</i> , <i>F. sumbul</i> , <i>F. tuberifera</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Mogotlactone</b>	<i>F. mogoltavica</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Fésérol</b>	<i>F. assa-foetida</i> , <i>F. diversivittata</i> , <i>F. iliensis</i> , <i>F. korshinskyi</i> , <i>F. moschata</i> , <i>F. pallida</i> , <i>F. pseudooreoselinum</i> , <i>F. sumbul</i> , <i>F. tingitana</i> , <i>F. vesceritensis</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003] [Oughlissi-Dehak <i>et al.</i> , 2008]
<b>13-Hydroxyfésérol</b>	<i>F. tunetana</i>	[Jubran <i>et al.</i> , 2010]
<b>Tunétacoumarine A</b>	<i>F. tunetana</i>	[Jubran <i>et al.</i> , 2010]
<b>Isosmarcandine</b>	<i>F. caucasica</i> , <i>F. gummosa</i> , <i>F. sinica</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]

## GÉNÉRALITÉS

<b>Farnésiferol A</b>	<i>F. assa-foetida</i> , <i>F. badrakema</i> , <i>F. caspica</i> , <i>F. kokanica</i> , <i>F. linczevskii</i> , <i>F. mogoltavica</i> , <i>F. samarcandica</i> <i>F. vesceritensis</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]  [Oughlissi-Dehak <i>et al.</i> , 2008]
<b>Coladine</b>	<i>F. arrigonii</i> <i>F. communis</i> , <i>F. linczevskii</i> , <i>F. linkii</i> , <i>F. sinica</i>	[Appendino <i>et al.</i> , 1997] [Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Coladonine</b>	<i>F. linczevskii</i> , <i>F. communis</i> , <i>F. tingitana</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Szowistsiacoumarine A</b>	<i>F. szowitsiana</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2007]
<b>Szowistsiacoumarine B</b>	<i>F. szowitsiana</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2007]
<b>Férulelénol</b>	<i>F. communis</i>	[Abd El-Razek <i>et al.</i> , 2003]
<b>Fésuhtuorine B</b>	<i>F. sumbul</i>	[Zhou <i>et al.</i> , 2000]
<b>Fésuhtuorine C</b>	<i>F. sumbul</i>	[Zhou <i>et al.</i> , 2000]
<b>Fésuhtuorine E</b>	<i>F. sumbul</i>	[Zhou <i>et al.</i> , 2000]

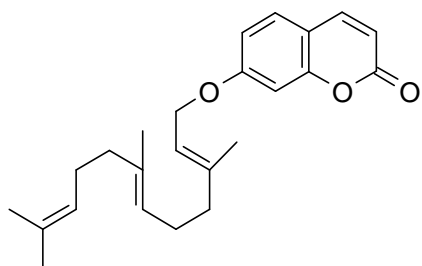
### 1. Les éthers de coumarine-sesquiterpènes:

Il s'agit souvent de coumarines substituées par des sesquiterpènes linéaires, monocycliques ou bicycliques.

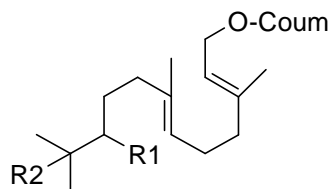
#### - Les coumarines substituées par des sesquiterpènes linéaires

L'umbelliprénine est courante dans ce genre. Elle a été isolée de 10 espèces.

Récemment, deux dérivés glucosidiques ont été isolés de l'extrait méthanolique des racines de *F. persica*, les persicaoside C et D.



**Umbelliprénine**



**Persicaoside C**  $R_1=OH$ ,  $R_2=O-\beta\text{Glu}-\beta\text{Glu}$

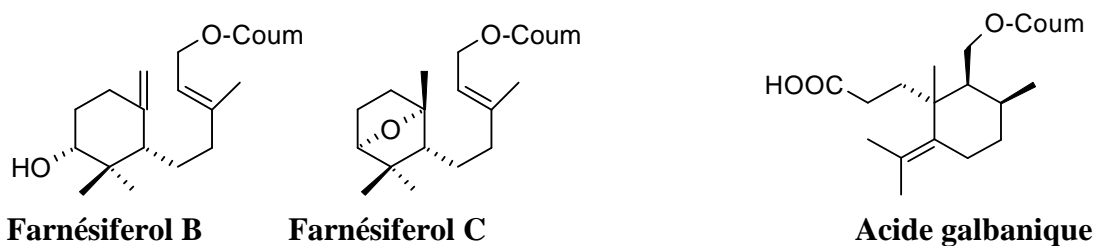
**Persicaoside D**  $R_1=O-\beta\text{Glu}-\beta\text{Glu}$ ,  $R_2=O-\beta\text{Glu}-\beta\text{Glu}$



## GÉNÉRALITÉS

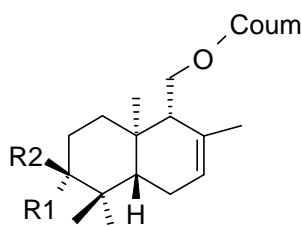
### - Les coumarines substituées par des sesquiterpènes monocycliques

L'acide galbanique est le constituant majeur de la résine de l'ase fétide et du galbanum.

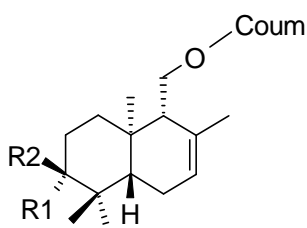


### - Les coumarines substituées par des sesquiterpènes bicycliques

Environ 74 molécules ont été isolées des sous-genres *Scorodosma*, *Merwia* et *Euferula*. La partie sesquiterpénique de ces composés est souvent de type drimane.

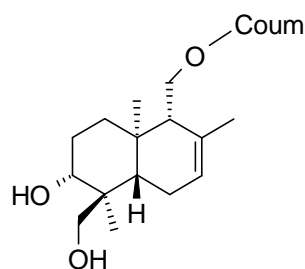


**Conférone**  $R_1, R_2 = O$     **Conférol**  $R_1 = H, R_2 = OH$

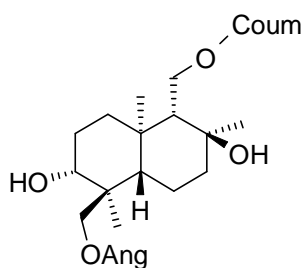


**Mogotlacine**  $R_1 = H, R_2 = OH$

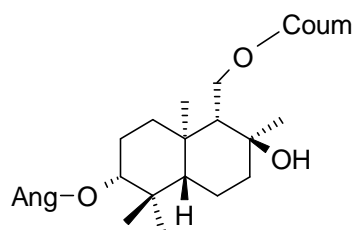
**Fésérol**  $R_1 = OH, R_2 = H$



**13-Hydroxyfésérol**

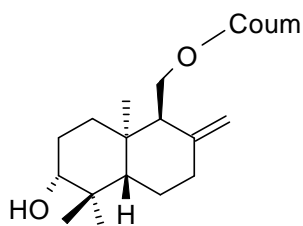


**Tunétacoumarine A**

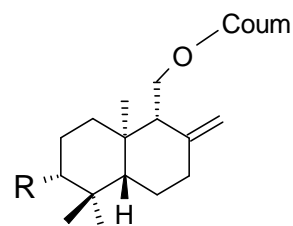


**Isosmarcandine**

## GÉNÉRALITÉS

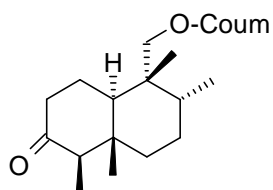


**Farnésiferol A**

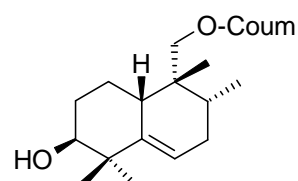


**Coladine** R= OAc

**Coladonine** R= OH



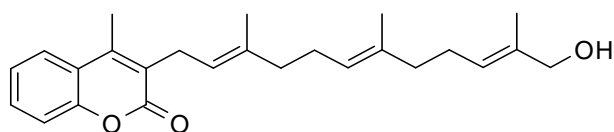
**Szowistsiacoumarine A**



**Szowistsiacoumarine B**

### 2. Les coumarines prénylées :

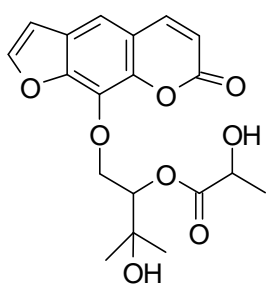
Le férulénol et ses dérivés sont responsables de la toxicité de l'espèce *F. communis* var. *breviedia* qui provoque une maladie hémorragique mortelle (ferulosis).



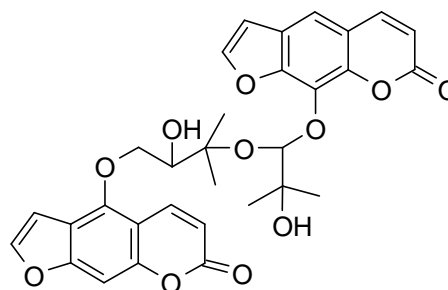
**Férulénol**

### 3. Les furanocoumarines:

La présence de ces composés est limitée à quelques espèces de *Ferula*, surtout *F. sumbul* qui contient 21 furanocoumarines.

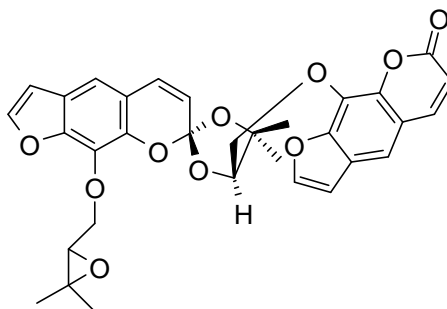


**Fésumtuorine B**



**Fésumtuorine C**

## GÉNÉRALITÉS



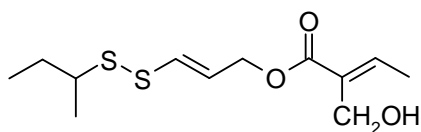
**Fésumtuorine E**

### 1.6.2.4 Les dérivés sulfuriques :

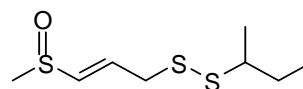
Les espèces du sous-genre *Scorodosma* (*F. foetida* et *F. assa-foetida*) sont riches en dérivés sulfuriques. Quelques composés sont aussi isolées de *F. persica* et *F. szowitsiana* (tableau 9).

**Tableau 9.** Source de quelques dérivés sulfuriques.

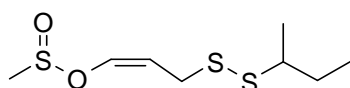
Composé	Source	Ref.
Asadisulphide	<i>F. assa-foetida</i>	[Kajimoto <i>et al.</i> , 1989]
Foetisulfide A	<i>F. foetida</i>	[Duan <i>et al.</i> , 2002]
Foetisulfide B	<i>F. foetida</i>	[Duan <i>et al.</i> , 2002]
Foetithiophène A	<i>F. foetida</i>	[Duan <i>et al.</i> , 2002]
Foetithiophène B	<i>F. foetida</i>	[Duan <i>et al.</i> , 2002]
Persicasulfide A	<i>F. persica</i> <i>F. szowitsiana</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2009] [Iranshahi <i>et al.</i> , 2007]
Persicasulfide B	<i>F. persica</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2009]
Persicasulfide C	<i>F. persica</i>	[Iranshahi <i>et al.</i> , 2009]



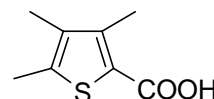
**Asadisulphide**



**Foetisulfide A**

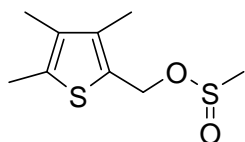


**Foetisulfide B**

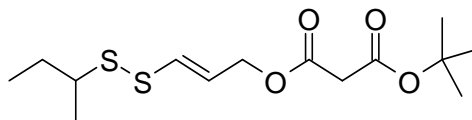


**Foetithiophène A**

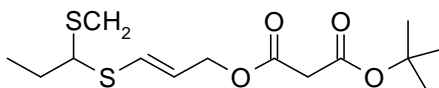
## GÉNÉRALITÉS



**Foetithiophène B**



**Persicasulfide A**



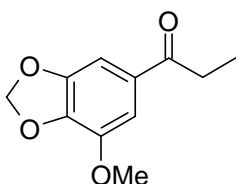
**Persicasulfide B**

### 1.6.2.5 Les propiophénones

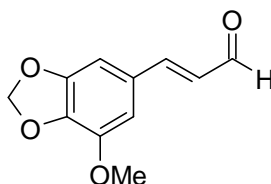
Quelques propiophénones ont aussi été isolées du genre *Ferula* (tableau 10).

**Tableau 10.** Source de quelques propiophénones.

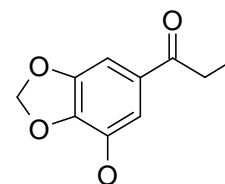
Composé	Source	Ref.
Crocatoine (latifolone)	<i>F. arrigonii</i>	[Appendino <i>et al.</i> , 1997]
Equisétine	<i>F. equisetacea</i>	[Bagirov, 1978]
Elémicine	<i>F. elaeochytris</i>	[Miski <i>et al.</i> , 1983]



**Crocatoine (latifolone)**



**Equisétine**



**Elémicine**

### 1.6.3 *Ferula* et cancer :

Des huiles essentielles, des extraits bruts et des produits purs obtenus de plantes du genre *Ferula* ont été testés pour plusieurs activités (antibactérienne, antivirale, estrogénique, anti-coagulante,...) [Maggi *et al.*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2000 ; Ikeda *et al.*, 2002 ; Kogure *et al.*, 2004].

Certains composés ont montré des activités chimiopréventives ou cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cancéreuses. Dans cette partie, nous présenterons les composés étudiés pour les activités chimiopréventive et cytotoxique.

## GÉNÉRALITÉS

### 1.6.3.1 Propriétés antigénotoxique et chimiopréventive

En 2001, Saleem *et al.* ont mis en évidence pour la première fois l'efficacité de la résine de l'ase fétide (*F. narthex*) riche en terpènes-coumarines, comme agent chimiopréventif contre les carcinogénèses cutanées chez les souris.

Le prétraitement des souris avec 300, 400 et 500 µg/200 µL acétone/animal a renversé tous les événements de carcinogénèses provoqués par le 12-O-tétradécanoyl 13-phorbol acétate (TPA).

De même, il a été démontré que l'extrait chloroformique des racines de *F. persica* inhibe l'activation de métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui jouent un rôle important dans l'invasion tumorale et les inflammations. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a conduit à l'isolement du persicasulphide B et de l'umbelliprénine qui semblent impliqués dans cette activité [Shahverdi *et al.*, 2006].

Des études plus récentes ont montré l'importance de l'auraptène, de l'umbelliprénine et de leur unité prényle dans la prévention du cancer, soit en empêchant les premières altérations au niveau de l'ADN soit en inhibant l'activation de l'antigène EA du virus d'Epstein-Barr (EBV-EA) responsable de la promotion du cancer [Iranshahi *et al.* 2008b ; Soltani *et al.* 2009 ; 2010].

Les lactones sesquiterpéniques, diversolides A (= talasin A), D (= malafine), F (= malafil) et G (= malafiline), et la coumarine, la diversine, isolées de *F. diversivittata* ont été également testées pour leurs activités inhibitrices de l'activation de l'antigène EBV-EA *in vitro*. Ensuite, le composé le plus actif, la diversine (CI<sub>50</sub> 7,7 nM), a aussi été testé *in vivo*. Ce produit a apporté une protection contre la propagation tumorale chez les souris, comparable à celle de la curcumine et de la quercétine [Iranshahi *et al.* 2008c, 2010]

### 1.6.3.2 Activité cytotoxique

La cytotoxicité et la relation structure-activité de certains esters de daucane ont été évalués sur des lignées cellulaires cancéreuses différentes, MCF-7 (lignée humaine de sein) [Lhuillier *et al.*, 2005; Gamal-Eldeen *et al.*, 2010], COLO 320HSR, LS-174T, WiDr, HCT 116, HT-29 (lignées humaines du colon) [Poli *et al.*, 2005] et Jurkat (lignées leucémiques humaines) [Macho *et al.*, 2004] (tableau 11).

## GÉNÉRALITÉS

Le composé le plus actif sur la majorité des cellules était la férutinine, alors que le jaeschkeanadiol s'est révélé le moins actif. Ces résultats ont montré l'importance de l'unité *p*-hydroxybenzoyl pour l'activité de ces sesquiterpènes.

Macho *et al.* ont démontré que les effets apoptotiques de la férutinine sont provoqués par une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) et par l'augmentation de la concentration intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène.

Les dérivés coumariniques ont aussi montré des activités antitumorales. L'umbelliprénine isolée de *F. szowitsiana* s'est révélée sélective sur le mélanome métastatique malin pigmenté (M4Beu) (CI<sub>50</sub> 12,4  $\mu$ M) [Barthomeuf *et al.*, 2008], tandis que le conférol était actif sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines du foie : HepG2, Hep3B et du sein MCF-7 avec des CI<sub>50</sub> 0,51, 2,6 et 3,4  $\mu$ g/mL, respectivement [Lee *et al.*, 2009].

La tunétacoumarine A, la coladine, la coladonine, l'isosmarcandine, le 13-hydroxyféséol et l'umbelliprénine isolés de *F. tunetana* ont été testés sur HCT 116 et HT-29. La coladine, la coladonine et le 13-hydroxyféséol se sont révélés actifs avec des CI<sub>50</sub> entre 3 et 36  $\mu$ M [Jabrane *et al.*, 2010].

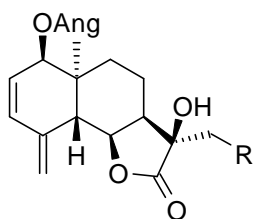
Par ailleurs, le farnésiférol C a montré des activités anti-angiogéniques *in vitro* et *in vivo* qui contribuent à l'efficacité anticancéreuse [Lee *et al.*, 2010].

### 1.6.4 *Ferula* et résistance aux médicaments anticancéreux

Des études récentes ont montré l'intérêt de certains dérivés coumariniques, la conférone (des racines de *F. schtschurowskiana*) [Neshati *et al.*, 2009], la mogotlacine (des fruits de *F. badrakema*) [Behnam-Rassouli *et al.*, 2009], le farnésiférol A et le féséol (des fruits de *F. vesceritensis*) [Oughlissi-Dehak *et al.*, 2008] pour surmonter la résistance aux agents anticancéreux en agissant sur la pompe d'efflux de la glycoprotéine P.

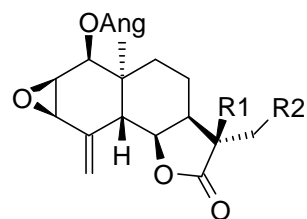
Les lactones sesquiterpéniques isolées de *F. varia* (1-6) ont ainsi montré un intérêt pour surmonter la résistance à la colchicine. Ces composés ont été testés pour leur activité cytotoxique contre le carcinome épidermoïde humain du nasopharynx résistant à la colchicine (KB-C2).

## GÉNÉRALITÉS



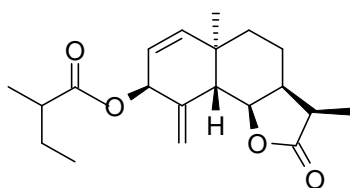
**1** R=H

**2** R=OAng

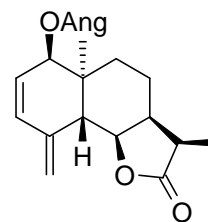


**3** R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub> = OAng

**4** R<sub>1</sub>= OAng, R<sub>2</sub>= H



**5**



**6**

Le composé 4 était sélectif contre les cellules KB-C2 (CI<sub>50</sub> 13,8 µg/ml), alors que les composés 1-3, 5-6 ont montré une activité modérée (CI<sub>50</sub> 25,4–67,8 µg/ml) en présence de concentrations non toxiques de colchicine (2,5 µM) [Suzuki *et al.*, 2007].

Tableau 11. Cytotoxicité des esters de daucane.

Composé	Lignées cellulaires						
	WiDr <sup>a</sup>	COLO320-HSR <sup>a</sup>	LS-174T <sup>a</sup>	Jurkat <sup>b</sup>	MCF-7	HT-29 <sup>a</sup>	HCT 116 <sup>a</sup>
<b>Férutine</b>	0,81±0,1	3,0±0,4	8,0±1,1	40,3%	-146,8 <sup>c</sup>		
<b>2<math>\alpha</math>-Hydroxyférutidine</b>	2,0±0,3	3,0±0,5	6,0±0,6	5,8%			
<b>Férutidine</b>	5,0±0,4	3,0±0,3	20,0±3,6	7,5%			
<b>Anisate de siol</b>	10,0±2,6	10,0±2,2	10,0±2,8	na			
<b>Lapiférine</b>	20,0±3,2	20,0±2,9	30,0±3,8	na	32,6 <sup>a</sup>		
<b>Jaeschkeanadiol</b>	60,0±6,8	16,0±3,6	40,0±5,6	na			
<b>Téférine</b>	na	na	na	22,8%			
<b>4<math>\beta</math>-Hydroxy-5<math>\alpha</math>H-dauca-7-ène-6-one</b>					181,4 <sup>c</sup>		
<b>4<math>\beta</math>-Hydroxy-5<math>\alpha</math>H-dauca-7-ène-6,9-dione</b>					-285,7 <sup>c</sup>		
<b>3<math>\alpha</math>-Ethoxy-8<math>\beta</math>-angéloyloxydauca-4-ène-9-one</b>					974,4 <sup>c</sup>		
<b>Tunétanine A</b>						na	na

*a* :  $\mu$ M, dose inhibitrice de croissance de 50% (DI<sub>50</sub>%) des cellules.

*b* : % apoptose des cellules Jurkat après un traitement de 50  $\mu$ M pendant 18h

*c* : % prolifération des cellules

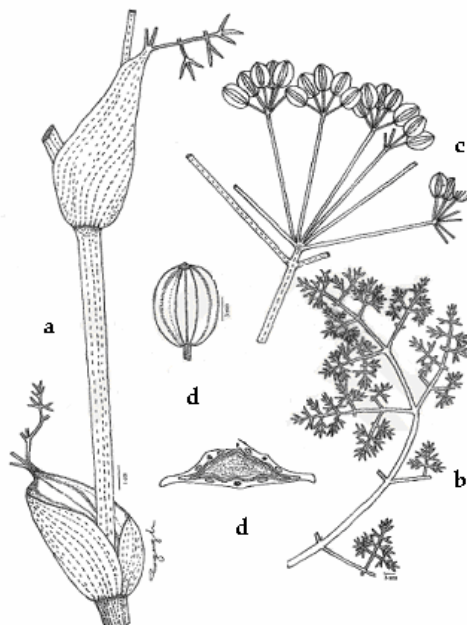
na : non actif



## 2.1 *Ferula lycia* (Boiss.)

### 2.1.1 Caractères morphologiques (figure 7):

C'est une plante vivace, à tige cylindrique de 50-170×0,4-1,5 cm, glabre, verte, parfois de couleur violette dans les parties inférieures (figure 8a). Les racines mesurent de 1-3,5 cm de diamètre, les feuilles sont glabres triangulaires-ovales et mesurent de 45-65×25-40 cm. Les feuilles inférieures sont décomposées oblongues-linéaires de taille de 0,5-1 mm de large et sont complètement glabres. Les fleurs sont en ombelles à 5-16 rayons de 3-5 cm de long, les ombellules portant 6-15 fleurs, les ombelles centrales sont courtes 0,5(-2)-4 cm, 6-15 fleurs par ombelle. Les fruits matures (figure 8b) sont oblongs. Ils mesurent de 6-14 mm ; dans les vallécules de la face dorsale du méricarpe, il y a 2-3 canaux de résine[Sağiroğlu, 2005].



**Figure 7.** *Ferula lycia* tige (a), feuilles (b), ombelles (c) et fruits (d).



**Figure 8.** Parties aériennes (a) et fruits (b) de *Ferula lycia*.

### 2.1.2 Description de la poudre de *F. lycia*

Une faible quantité de poudre de racines est déposée sur une lame de microscope puis recouverte d'une lamelle. Les éléments prédominants caractérisant la poudre de *F. lycia* sont : des fragments de vaisseaux réticulés, des cellules scléreuses, du suber et de la résine (figure 9).

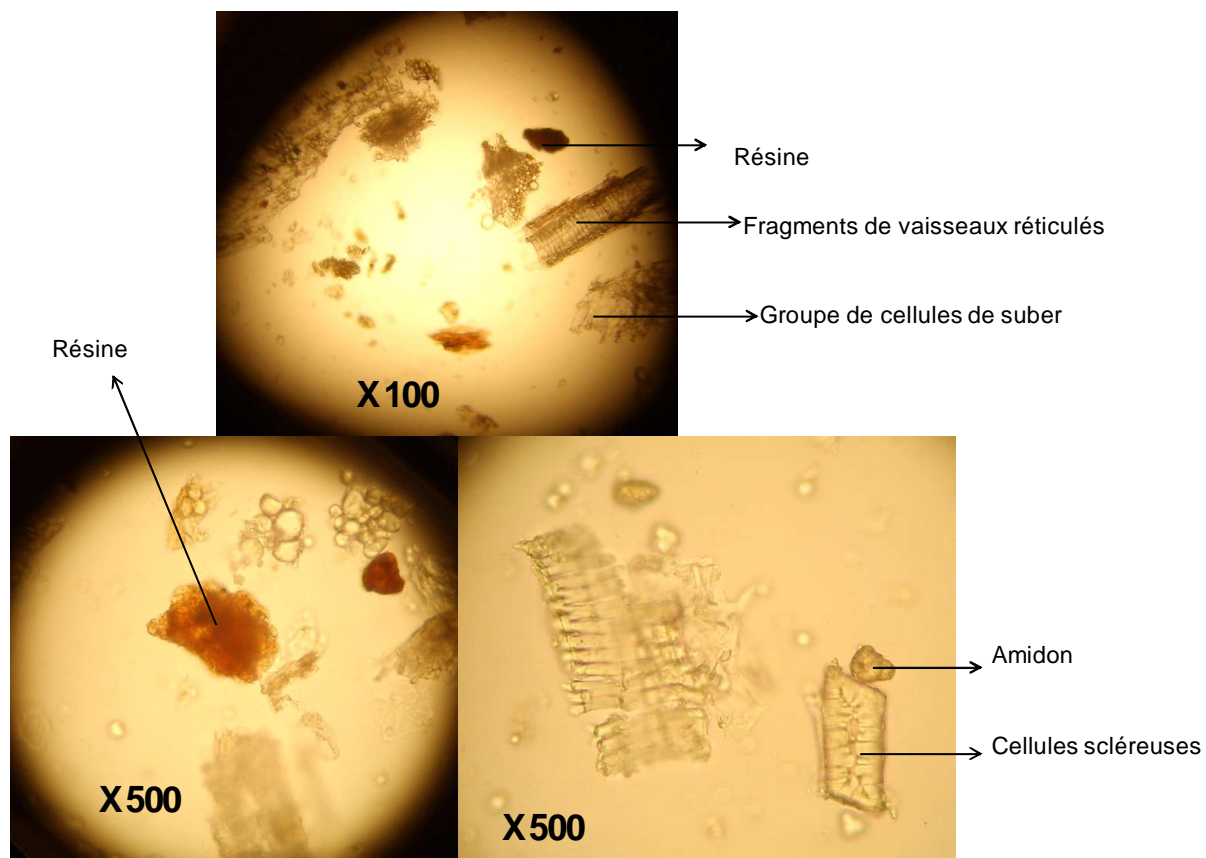


Figure 9. Eléments caractéristiques de la poudre des racines de *F. lycia*.

### 2.1.3 Répartition géographique

*F. lycia* est une plante endémique de la montagne de Lycia en Turquie [Sağiroğlu, 2005].

### 2.1.4 Étude phytochimique

*F. lycia* n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique, à notre connaissance. Les travaux présentés ici ont consisté en l'isolement et l'identification de treize composés des racines et fruits de *F. lycia*.

2.1.5 Isolement des composés

La première étape a été de broyer les racines séchées afin d’obtenir une poudre homogène. Comme le genre *Ferula* est connu pour être riche en sesquiterpènes, cette poudre a été extraite par de l’éther de pétrole sous agitation à température ambiante. L’analyse de cet extrait en chromatographie sur couche mince, après révélation au réactif à l’anisaldéhyde, a montré la présence de deux types de tâches : certaines de couleur bleu violet et d’autres de couleur verte. La purification de cet extrait a fourni onze composés purs : composés **J1-J8** et **F1-F3** (schéma 4).

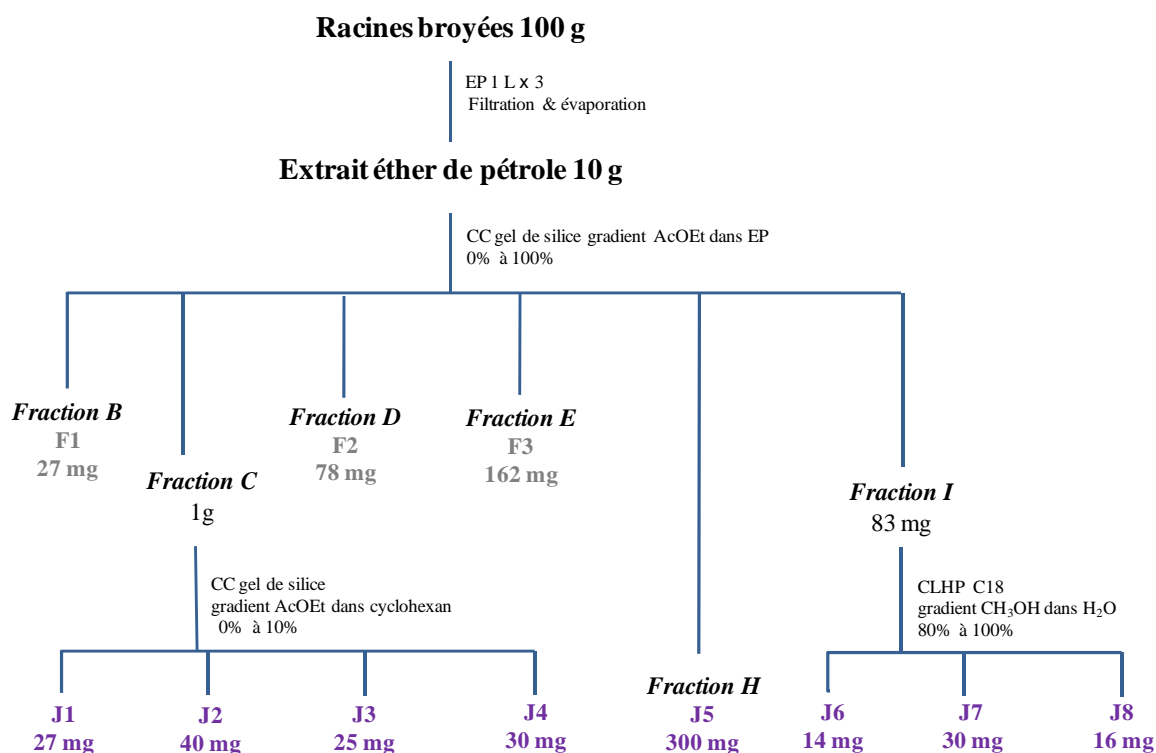


Schéma 4. Isolement des composés obtenus à partir des racines de *Ferula lycia*

Les fruits ont été aussi broyés mais ils ont été extraits par du méthanol pour éviter l’extraction des corps gras. L’extrait méthanolique a été évaporé puis mélangé à de l’eau et le mélange a été extrait par extraction liquide-liquide par le dichlorométhane. La fraction dichlorméthanique a été par la suite fractionnée au moyen de différentes méthodes chromatographiques sur colonne pour obtenir les mêmes composés que ceux isolés des racines, **J1-J8** et **F1-F3**, ainsi que deux autres produits **G1** et **G2** (schéma 5).

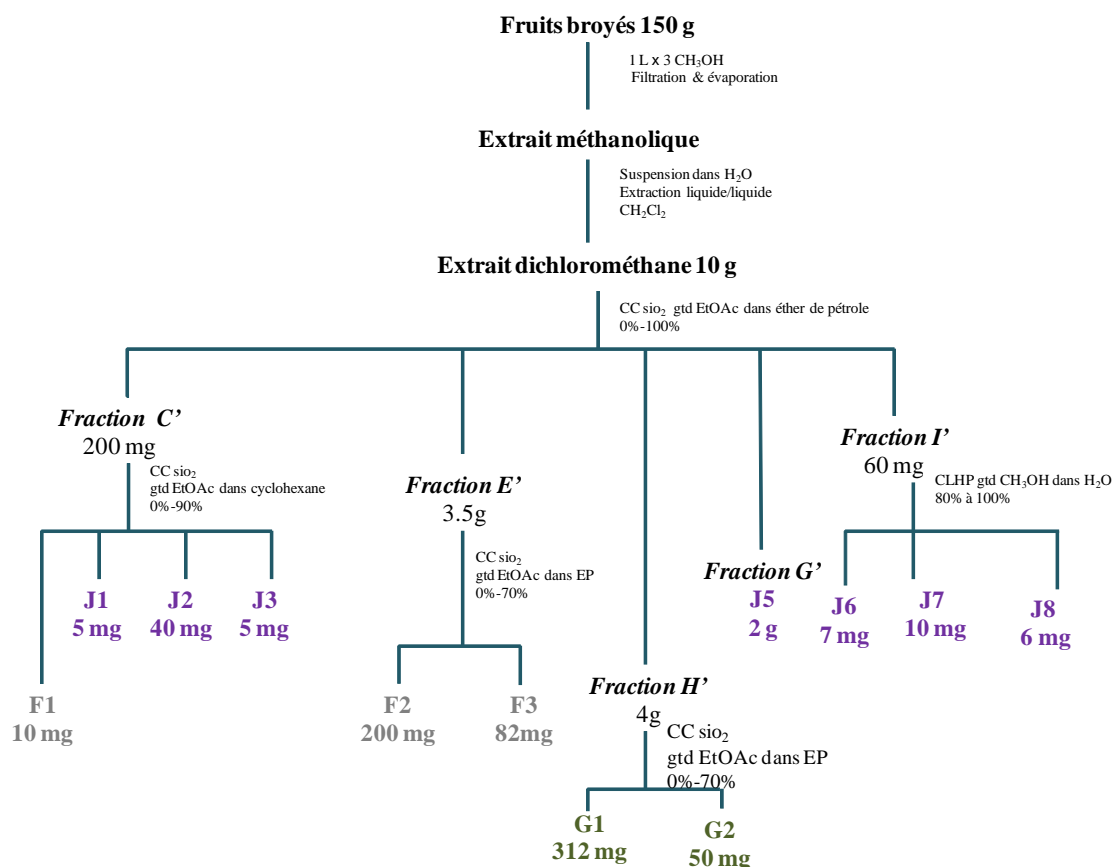


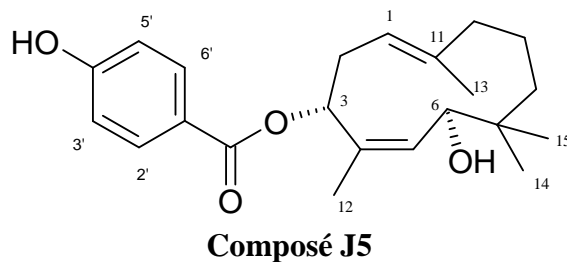
Schéma 5. Isolement des composés obtenus à partir des fruits de *Ferula lycia*

## 2.1.6 Identification des composés

### Les composés J1-J8

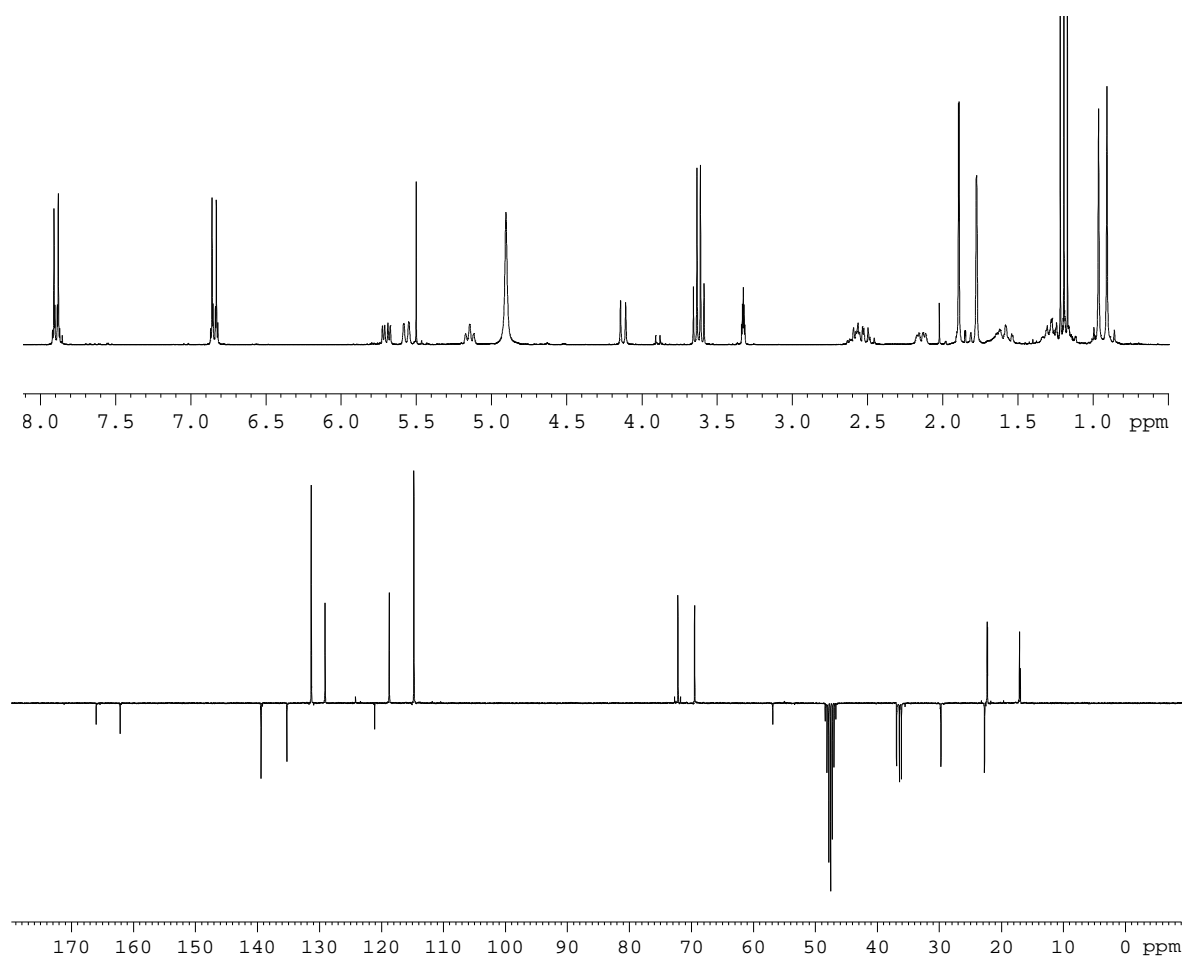
Les composés **J1-J8** ont été isolés sous la forme d'une huile ; ils absorbent tous en lumière UV à 254 nm, et sous l'effet du réactif à l'anisaldéhyde, ils montrent une couleur bleue violette en lumière du jour.

Le composé **J5** était majoritaire (schéma 4). On commence donc par l'identification de ce produit.

**Composé J5 :**

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ -*J*-modulé (figure 10) révèle la présence de 22 carbones ; parmi eux, un à 166,0 ppm indique la présence d'une fonction ester.

La partie acyle est facilement identifiée grâce au spectre de RMN du  $^1\text{H}$ . Sur ce spectre (figure 10), on constate deux doublets à 7,88 ppm (2H ; 8,7 Hz) et à 6,84 ppm (2H ; 8,7 Hz) indiquant la présence du groupement benzoyle substitué en *para*. La comparaison avec les données de la littérature permet d'identifier l'acyle comme étant le *p*-hydroxybenzoyle [Miski *et al.*, 1983].



**Figure 10.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé J5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz).

En ce qui concerne le reste de la molécule, il s'agit du squelette sesquiterpénique (à 15 carbones), dont le nombre de carbones peut être vérifié en soustrayant le nombre de carbones de l'acyle (7) du nombre total de carbones (22) dénombrés dans les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$ -*J*-modulé.

Les expériences de corrélation directe  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (figure 11) et de corrélation indirecte  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (figure 12) permettent d'identifier les caractéristiques de ce squelette :

- Deux doubles liaisons trisubstituées déduites de la présence des signaux de deux carbones quaternaires oléfiniques (139,6 et 135,1 ppm), de deux carbones tertiaires oléfiniques (129,3 et 118,9 ppm) portant les protons à 5,58 ppm (1H; *d* 10,3 Hz) et 5,14 ppm (1H; *t* 7,5 Hz) respectivement, ainsi que deux méthyles déblindés à 1,87 ppm (3H; *d* 1,5 Hz) et 1,77 ppm (3H; *s*) portés par les carbones oléfiniques quaternaires,

- Deux carbones tertiaires à 72,7 et à 69,8 ppm portant les protons à 5,70 ppm (1H; *dd* 11,5 et 4,6 Hz) et 4,10 ppm (1H; *d* 10,3 Hz) respectivement, indiquant la présence de deux fonctions alcooliques. Le déplacement chimique du proton à 5,70 ppm et sa corrélation en HMBC avec le carbone à 166,0 ppm montrent qu'il s'agit du proton d'acylation,

- Quatre méthylènes à 36,9 ; 36,5 ; 29,9 et 22,8 ppm,

- Deux méthyles sous forme singulets à 0,95 ppm et 0,90 ppm corrélant avec le même carbone quaternaire à 36,4 ppm.

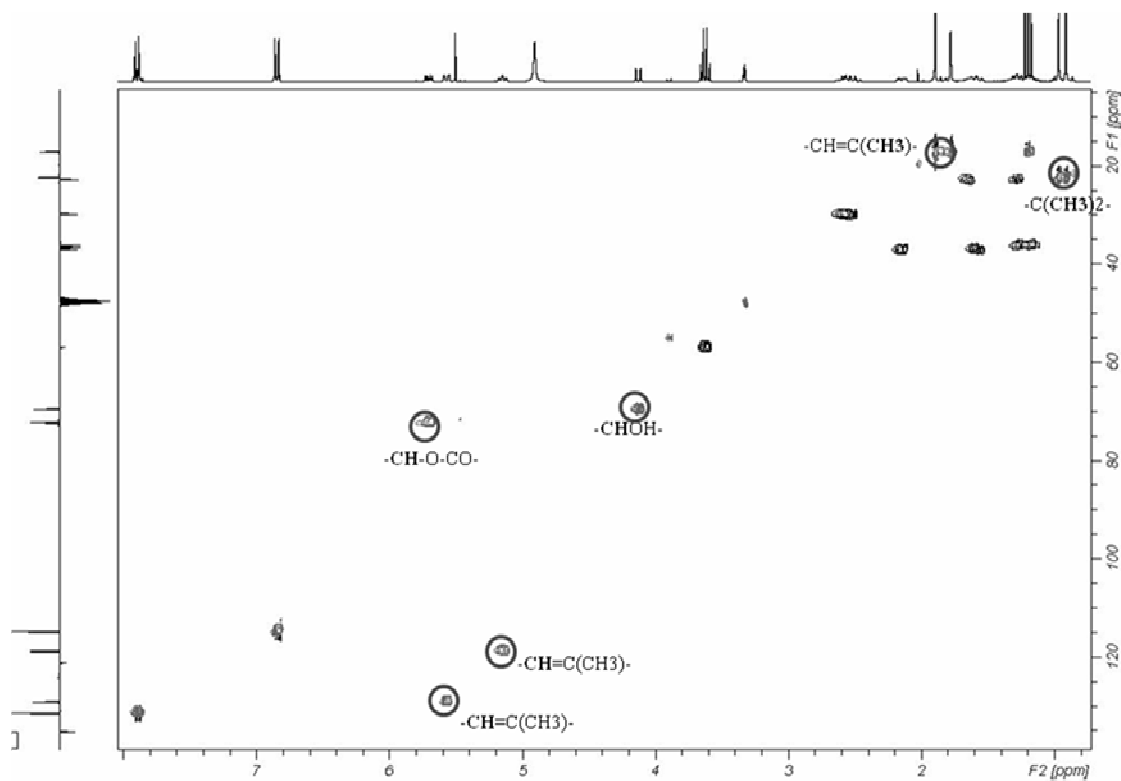


Figure 11. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC du composé J5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300/75 MHz).

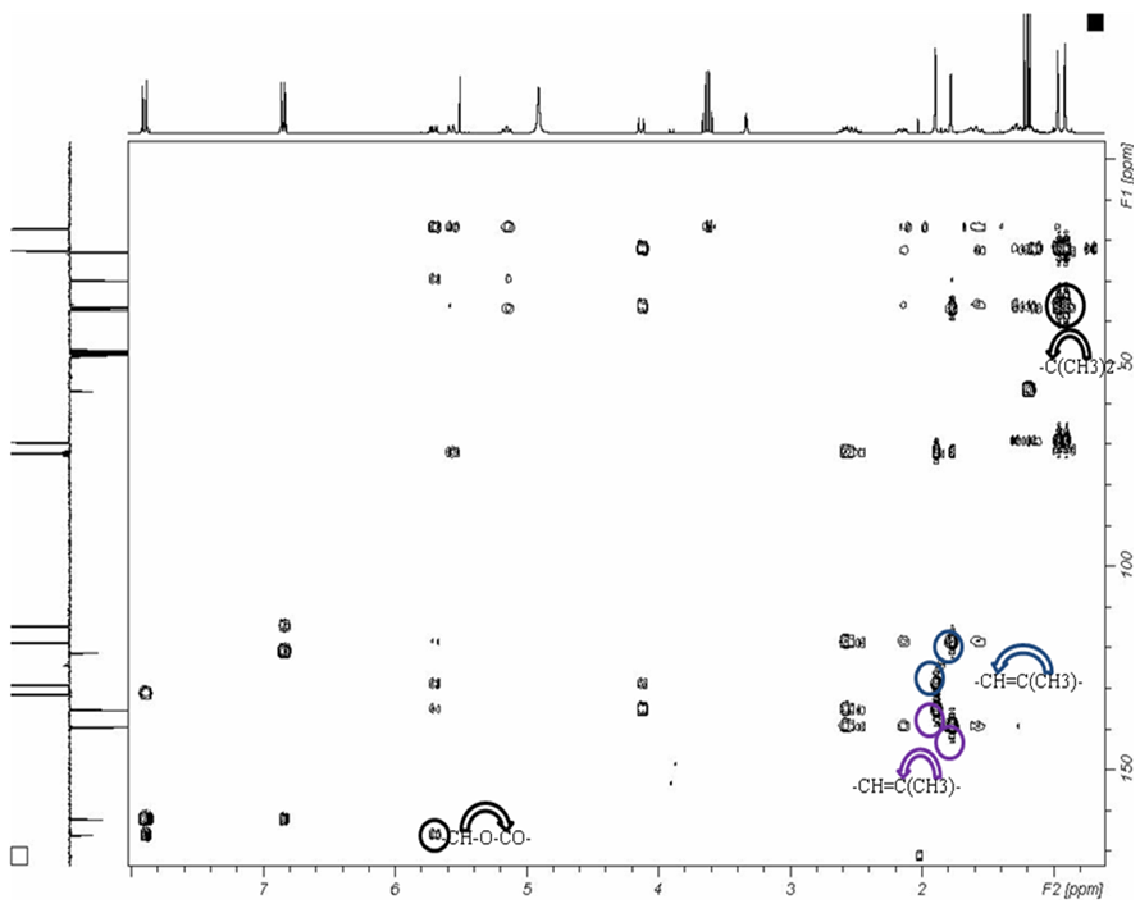


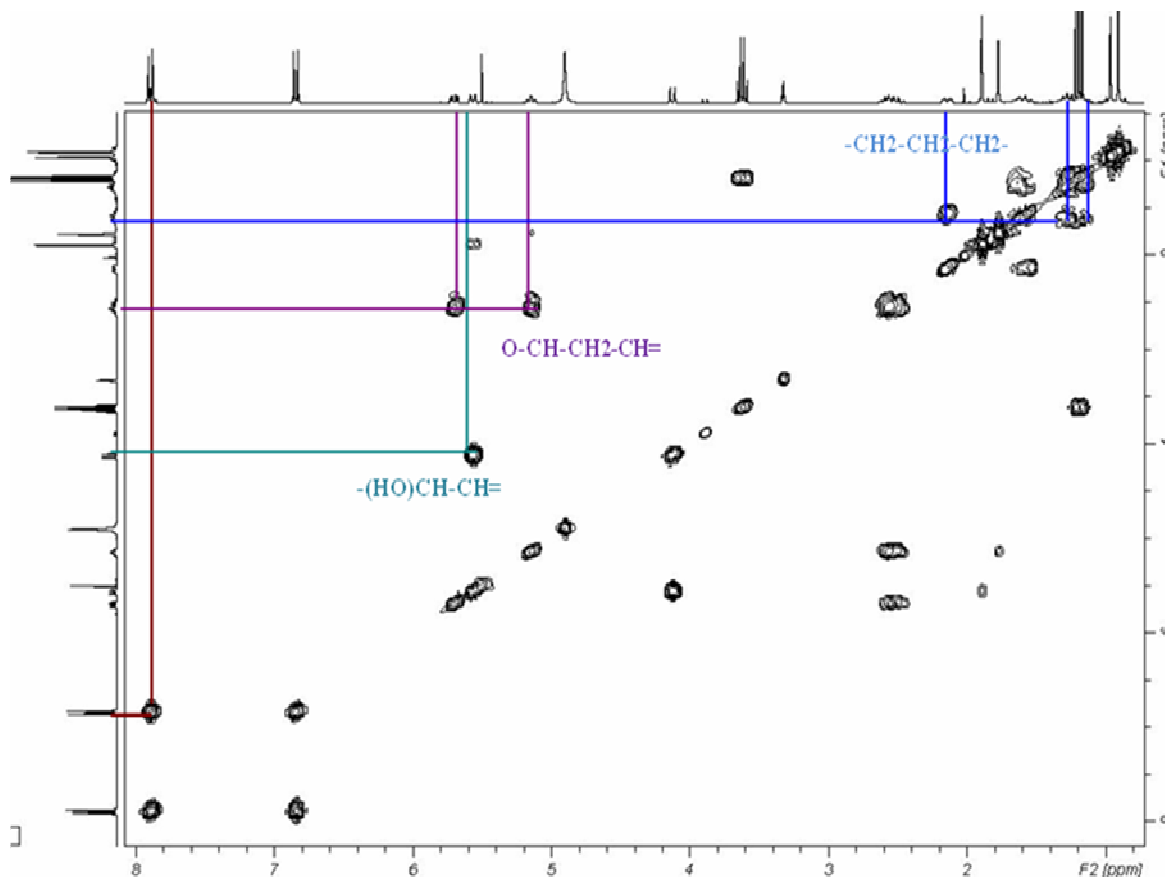
Figure 12. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC du composé J5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300/75 MHz).

A ce stade, l'ensemble des données obtenues permet de proposer un squelette macrocyclique pour ce composé.

A partir des corrélations observées sur le spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (figure 13) et celles qu'on a déjà vues précédemment, on déduit trois enchaînements:

(a)  $-(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{O}-\text{CO}-$ , (b)  $-(\text{CH}_3)\text{C}=\text{CH}-\text{CH}(\text{OH})-$ , et

(c)  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

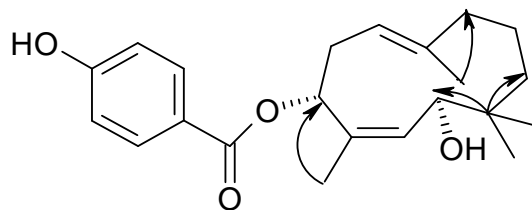


**Figure 13.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY du composé J5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz).

Ces trois fragments sont reliés entre eux grâce aux corrélations observées en  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (figure 14) :

- La corrélation entre le méthyle à 1,77 ppm et le carbone oxygéné à 72,7 ppm, reliant (a) et (b),
- Les corrélations entre le proton à 4,10 ppm, les deux protons geminaux à 1,15-1,25 ppm et le carbone quaternaire à 36,4 ppm reliant (b) et (c),
- Finalement, la corrélation entre le méthyle à 1,87 ppm et les deux protons geminés 1,56 m - 2,14 m ppm reliant (a) et (c).

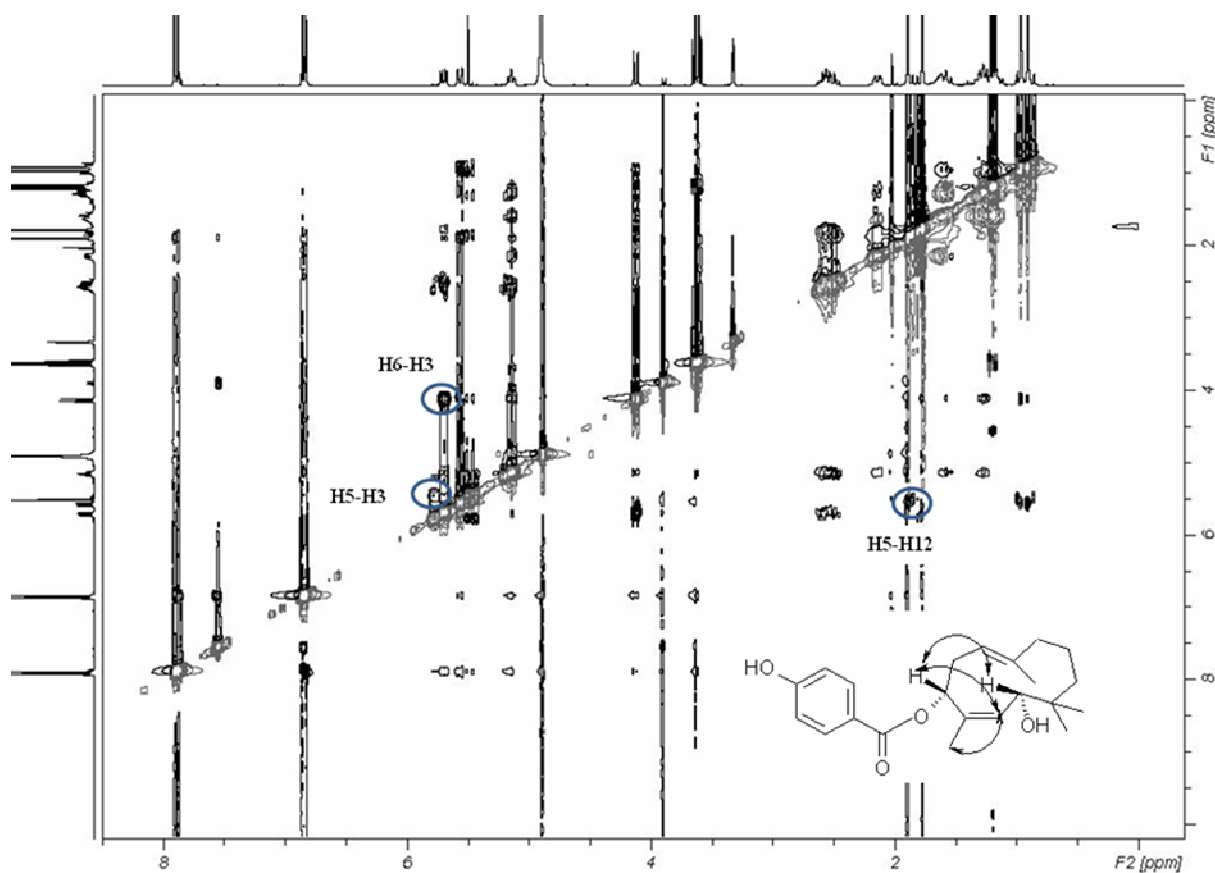




**Figure 14.** Corrélations HMBC (H→C) choisies du composé.

La configuration de cette structure a été établie grâce à une expérience  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (figure 15) [Miski *et al.*, 1987b].

La corrélation entre H<sub>3</sub>-12 et H-5 permet de déterminer une configuration *trans* de la double liaison C4-C5, alors qu'une absence de corrélation entre H<sub>3</sub>-13 et H-1 indique une configuration *cis*.



**Figure 15.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY du composé J5 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz).

L'analyse de ce composé par spectrométrie de masse (SM-IE) en mode positif révèle un ion pseudomoléculaire  $m/z$  358  $[\text{M}]^+$  indiquant la formule brute  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3$  (figure 16).

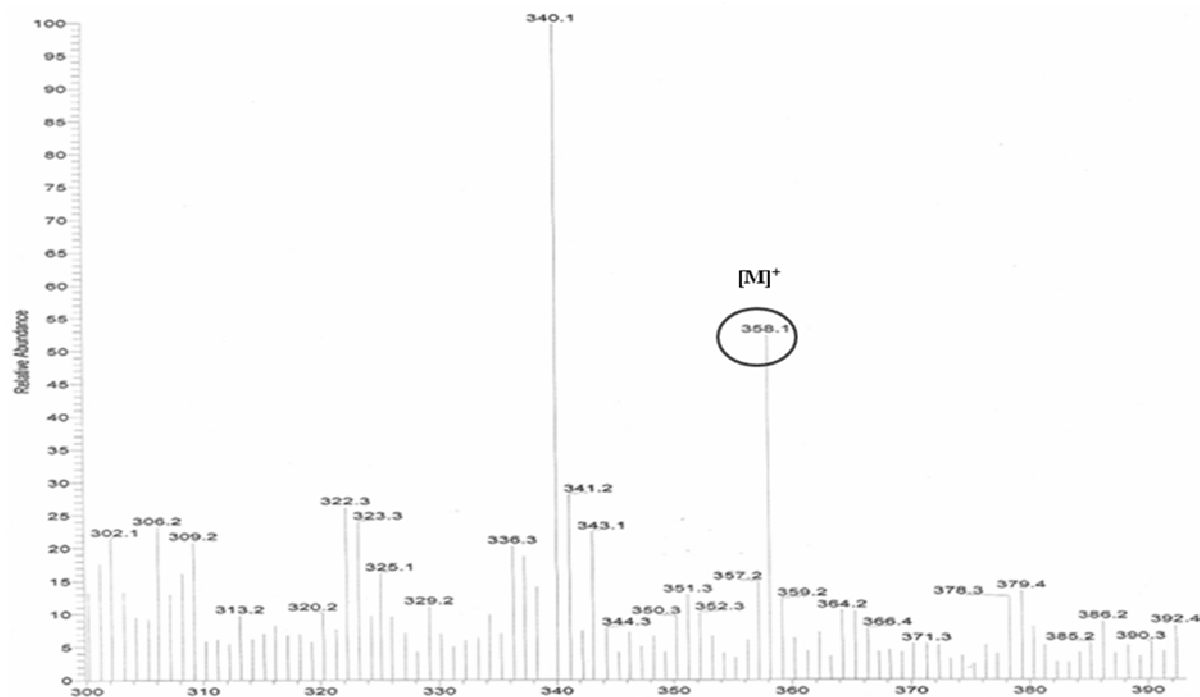


Figure 16. Spectre de masse du composé J5.

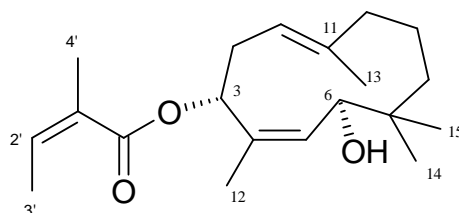
L'ensemble de ces données permettent d'identifier le composé **J5** au **3-*p*-hydroxybenzoyljuniférol (juniferdine)**.

Ce composé a été déjà isolé de *F. juniperina* [Sagitdinova *et al.*, 1978b]. La configuration de cette structure a été déterminée par les rayons X [Rekhlova *et al.*, 1990]. Les attributions de tous les signaux des spectres du proton et du carbone du composé **J5** sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12. RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J5** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$  et  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

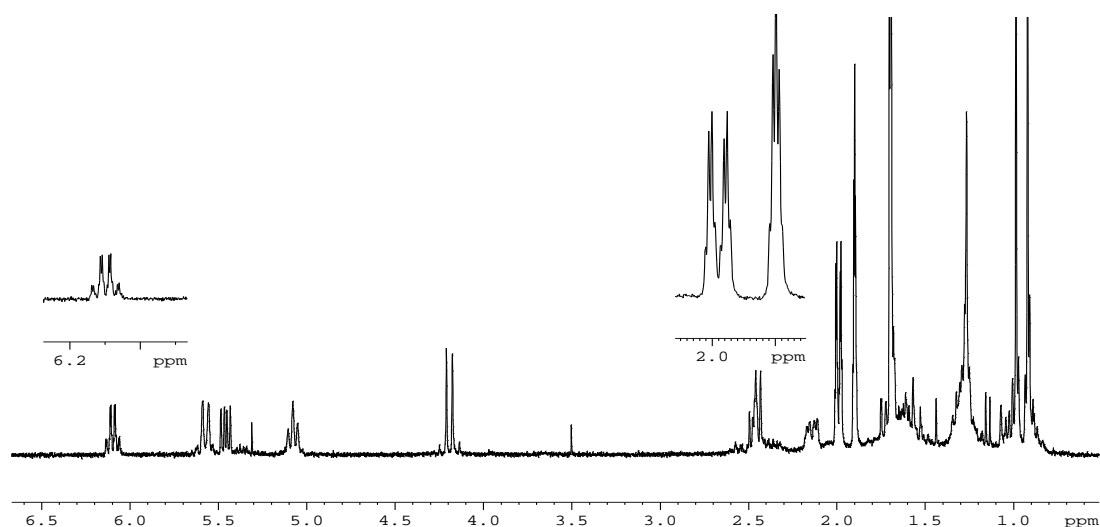
Position	$\text{CD}_3\text{OD}$		$\text{CDCl}_3$	
	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,14 <i>t</i> (7,5)	118,9	5,11 <i>t</i> (8,0)	119,4
2	2,55 <i>m</i> (2H)	29,9	2,54 <i>t</i> (2H, 8,0)	29,8
3	5,70 <i>dd</i> (11,5; 4,6)	72,7	5,60 <sup>a</sup>	72,4
4	-	135,1	-	135,6
5	5,58 <i>d</i> (10,3)	129,3	5,57 <sup>a</sup>	129,5
6	4,10 <i>d</i> (10,3)	69,8	4,26 <i>d</i> (10,3)	70,5
7	-	36,4	-	36,4
8	1,15 <i>m</i> - 1,25 <i>m</i>	36,5	1,15 <i>m</i> - 1,25 <i>m</i>	36,5
9	1,26 <i>m</i> - 1,64 <i>m</i>	22,8	1,26 <i>m</i> - 1,64 <i>m</i>	22,8
10	1,56 <i>m</i> - 2,14 <i>m</i>	36,9	1,56 <i>m</i> - 2,14 <i>m</i>	36,9
11	-	139,6	-	140,1
12	1,77 <i>s</i>	17,1	1,71 <i>s</i>	17,4
13	1,87 <i>d</i> (1,5)	17,2	1,72 <i>d</i> (1,3)	18,4
14	0,95 <i>s</i>	23,3	1,01 <i>s</i>	22,9
15	0,90 <i>s</i>	22,3	0,95 <i>s</i>	22,9
C=O	-	166,0	-	166,0
1'	-	121,3	-	122,3
2'	7,88 <i>d</i> (8,7)	131,3	7,88 <i>d</i> (8,7)	132,3
3'	6,84 <i>d</i> (8,7)	114,9	6,84 <i>d</i> (8,7)	115,7
4'	-	160,9	-	160,9
5'	6,84 <i>d</i> (8,7)	114,9	6,84 <i>d</i> (8,7)	115,7
6'	7,88 <i>d</i> (8,7)	131,3	7,88 <i>d</i> (8,7)	132,3

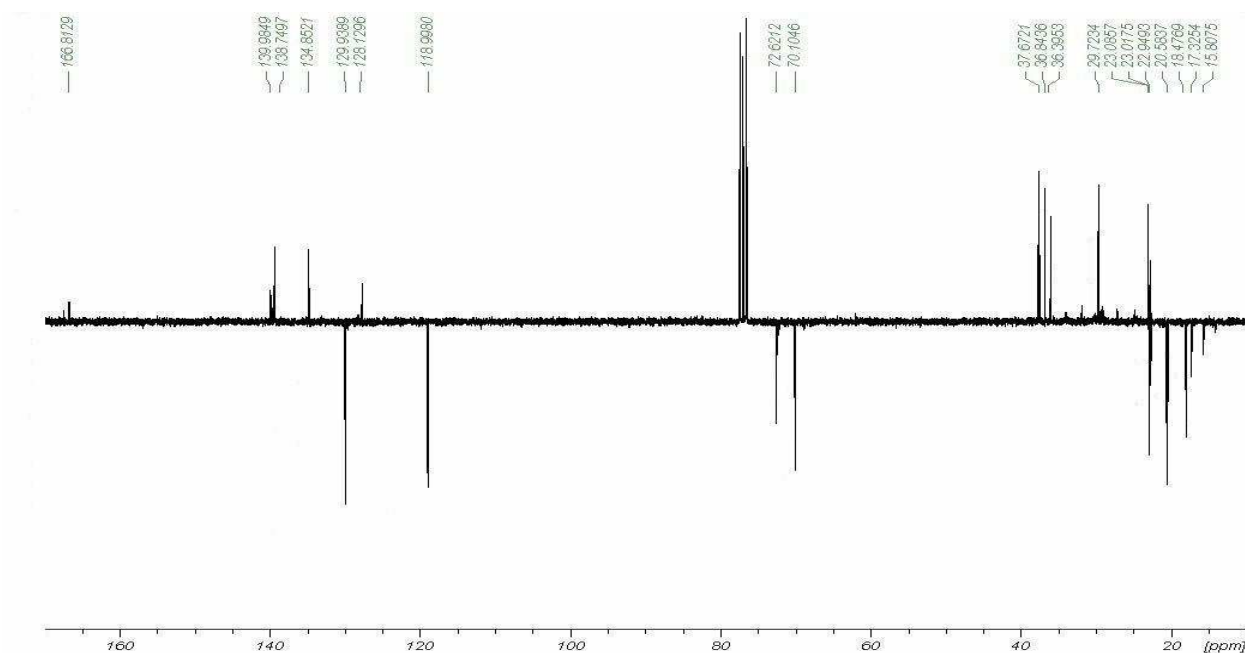
<sup>a</sup>: signaux superposés

**Composé J1 :****Composé J1**

Les spectres de RMN du composé **J1** présentent de grandes similitudes avec ceux du composé **J5** sauf pour la partie acylée. Sur le spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - (figure 17a), on constate l'absence de deux doublets caractéristiques d'un reste *p*-hydroxybenzoylé. En revanche, on observe l'apparition d'un proton oléfinique à 6,10 ppm (*qq*; 7,5 et 1,4 Hz) et de deux méthyles à 1,90 ppm (*q*; 7,5 Hz) et à 1,99 ppm (*dq*; 7,5 et 1,4 Hz).

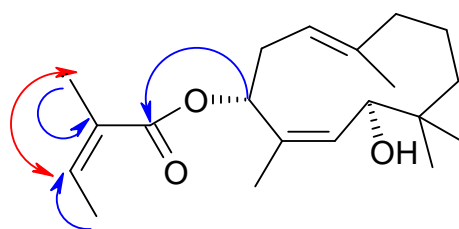
Sur le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ -*J*-modulé (figure 17b), on reconnaît facilement les signaux correspondant au juniférol (tableau 5). Ce spectre révèle aussi la présence de quatre signaux supplémentaires : deux carbones oléfiniques : un tertiaire à 138,7 ppm et un quaternaire à 128,4 ppm et deux carbones primaires à 20,6 ppm et 15,8 ppm.

**Figure 17a.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé J1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Figure 17b.** Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé J1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

La structure de l'acyle et sa position sont déduites des corrélations observées en  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC et  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (figure 18).



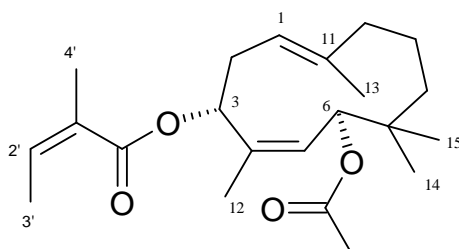
**Figure 18.** Corrélations ROESY ( $\text{H} \leftrightarrow \text{H}$ ) et HMBC ( $\text{H} \rightarrow \text{C}$ ) choisies du composé J1.

Sur le spectre de masse réalisé en électrospray (SM-ESI) en mode positif, on observe un ion quasi-moléculaire à  $m/z$  343  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  indiquant une formule brute de  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3$ .

L'ensemble de ces données permet d'identifier J1 comme étant le **3-angéloyljuniférol** nommé la **lyciférine A**. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J1** sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13. RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J1** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,09 <i>t</i> (8,0)	119,0
2	2,47 <i>m</i>	29,8
3	5,46 <i>dd</i> (11,0; 4,5)	72,2
4	-	134,8
5	5,54 <i>d</i> (10,2)	129,9
6	4,18 <i>d</i> (10,2)	70,1
7	-	36,9
8	1,19 <i>m</i> - 1,29 <i>m</i>	36,4
9	1,31 <i>m</i> - 1,67 <i>m</i>	23,1
10	1,59 <i>m</i> - 2,17 <i>m</i>	37,7
11	-	140,0
12	1,70 <i>d</i> (1,9)	17,3
13	1,69 <i>s</i>	18,5
14	0,98 <i>s</i>	23,0
15	0,92 <i>s</i>	23,1
C=O	-	168,3
1'	-	128,4
2'	6,10 <i>qq</i> (7,5; 1,4)	138,7
3'	1,99 <i>dq</i> (7,5; 1,4)	15,8
4'	1,90 <i>q</i> (7,5)	20,6

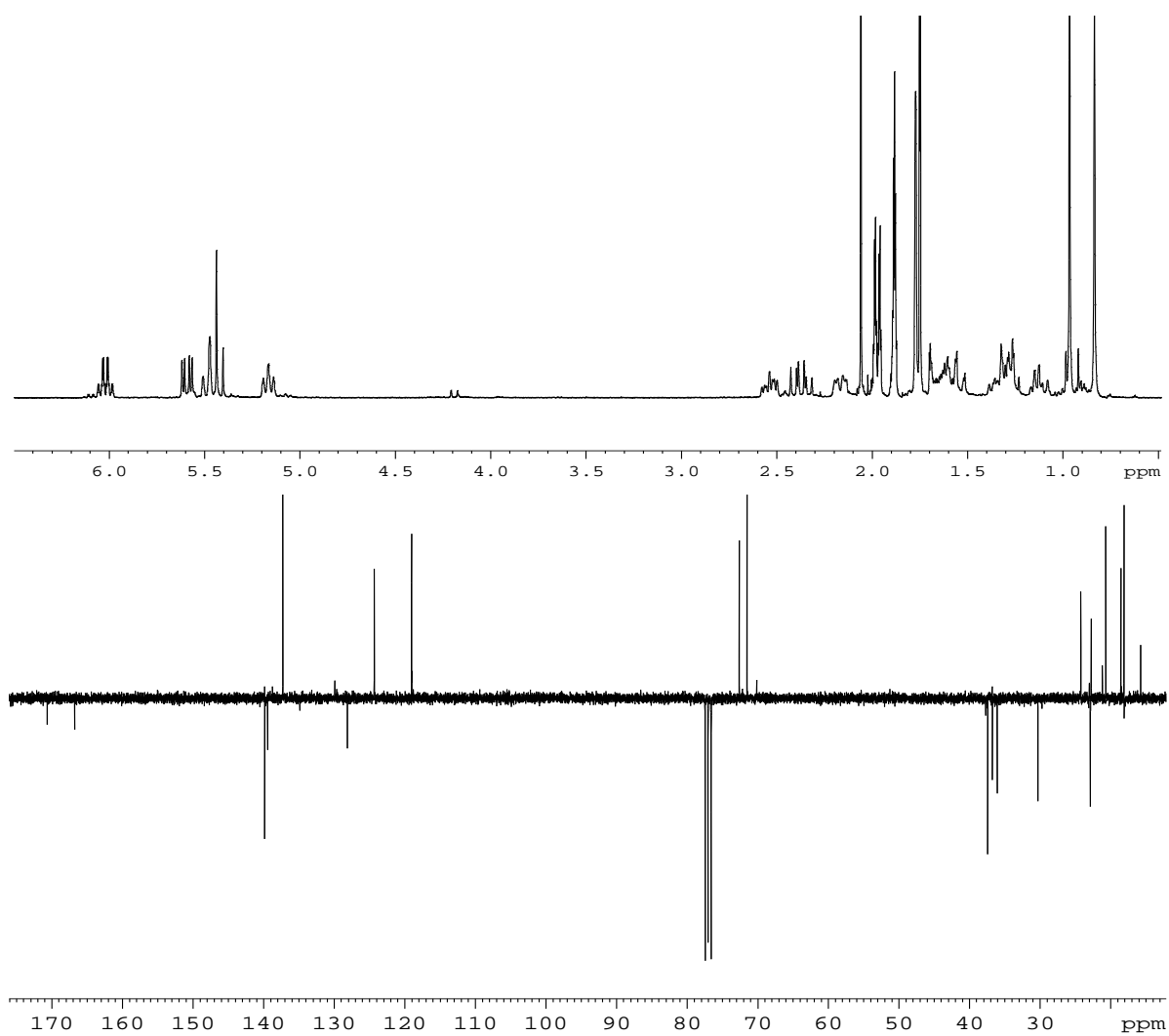
**Composé J2:****Composé J2**

Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  de composé **J2** (figure 19) diffère seulement de celui du composé **J1** par la présence d'un singulet à 2,06 ppm correspondant à un reste  $\text{CH}_3$  et par le déplacement de H-6 à 5,41 ppm. Le reste des données est très comparable avec celles du composé **J1**.

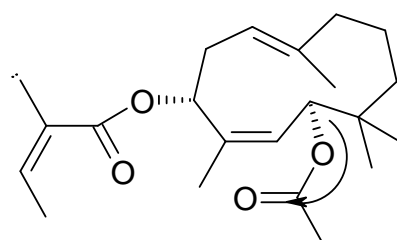
Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ -J-modulé (figure 19) révèle la présence de 22 carbones. 20 carbones sont identiques à ceux du composé **J1**. Les deux carbones restants sont un carbone quaternaire à 171,0 ppm et un méthyle à 21,1 ppm.

Ces signaux supplémentaires sont attribués au groupement acétyle. Le déplacement de H-6 et la corrélation entre le proton H-6 et le carbonyle à 171,0 ppm en HMBC (figure 20), ont permis de déterminer la position de l'acétyle en C-6.

La structure a été ainsi établie comme étant celle du **3-angéloyl-6-acétyljuniférol** nommé la **lyciférine B**. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres de RMN du proton et du carbone du composé **J2** sont présentées dans le tableau 14.



**Figure 19.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé J2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

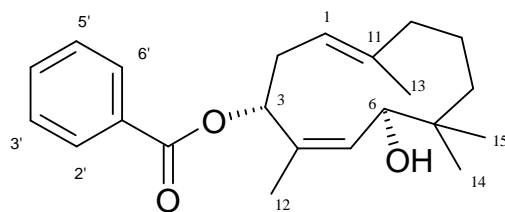


**Figure 20.** Corrélation HMBC ( $\text{H} \rightarrow \text{C}$ ) choisie du composé J2.



Tableau 14. RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J2** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,17 <i>t</i> (8,0)	119,0
2	2,54 <i>m</i> - 2,39 <i>m</i>	30,3
3	5,60 <i>dd</i> (11,0; 4,5)	72,6
4	-	139,8
5	5,49 <i>d</i> (10,2)	124,2
6	5,41 <i>d</i> (10,2)	71,5
7	-	36,7
8	1,19 <i>m</i> - 1,29 <i>m</i>	36,4
9	1,31 <i>m</i> - 1,67 <i>m</i>	22,1
10	1,59 <i>m</i> - 2,17 <i>m</i>	37,4
11	-	139,4
12	1,74 <i>d</i> (1,9)	18,1
13	1,77 <i>s</i>	18,5
14	0,96 <i>s</i>	24,2
15	0,83 <i>s</i>	22,7
<b>C=O</b>	-	167,5
1'	-	128,1
2'	6,03 <i>qq</i> (7,5; 1,4)	137,3
3'	1,97 <i>dq</i> (7,5; 1,4)	15,7
4'	1,87 <i>q</i> (7,5)	20,7
<b><u>COCH</u><sub>3</sub></b>	-	171,0
<b><u>COCH</u><sub>3</sub></b>	2,06 <i>s</i>	21,1

**Composé J3 :****Composé J3**

Sur le spectre de masse réalisé en électrospray (SM-ESI) en mode positif, on observe un ion quasi-moléculaire à  $m/z$  365  $[M+Na]^+$  indiquant une formule brute de  $C_{22}H_{30}O_3$ .

Le spectre de RMN du  $^1H$  de composé **J3** (figure 21) est très proche de celui du composé **J5** à la différence de la présence d'un doublet à 8,04 ppm (2H; 7,5 Hz) et de deux triplets à 7,45 ppm (2H; 7,5 Hz) et à 7,57 ppm (1H; 7,5 Hz) à la place de deux doublets. Ces signaux sont caractéristiques d'un groupement **benzoyle**. Le reste des données spectrales est très comparable avec les données du composé **J5**. La structure a été ainsi établie comme étant le **3-benzoyljuniférol** nommé la **lyciférine C**. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres de RMN du  $^1H$  et du  $^{13}C$  du composé **J3** sont présentées dans le tableau 15.

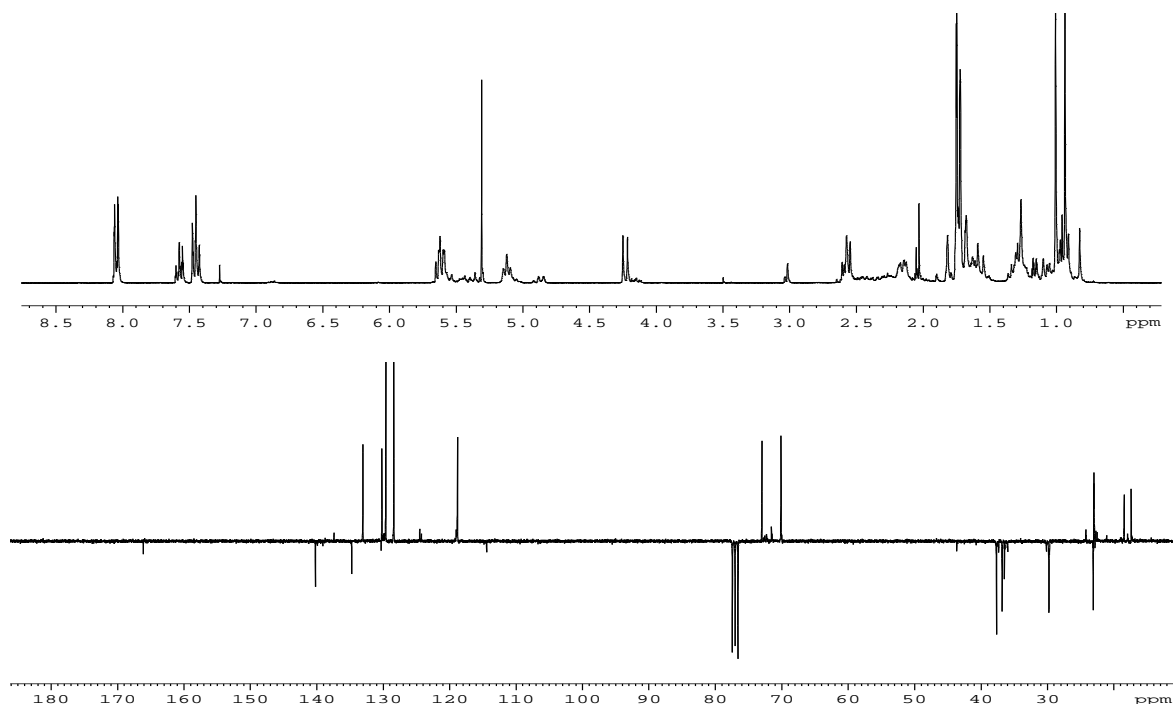
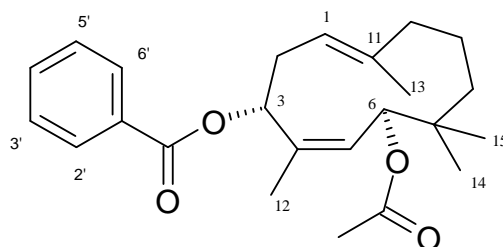
**Figure 21.** Spectres de RMN du  $^1H$  et du  $^{13}C$  du composé J3 ( $CDCl_3$ , 300 MHz).

Tableau 15. RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J3** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

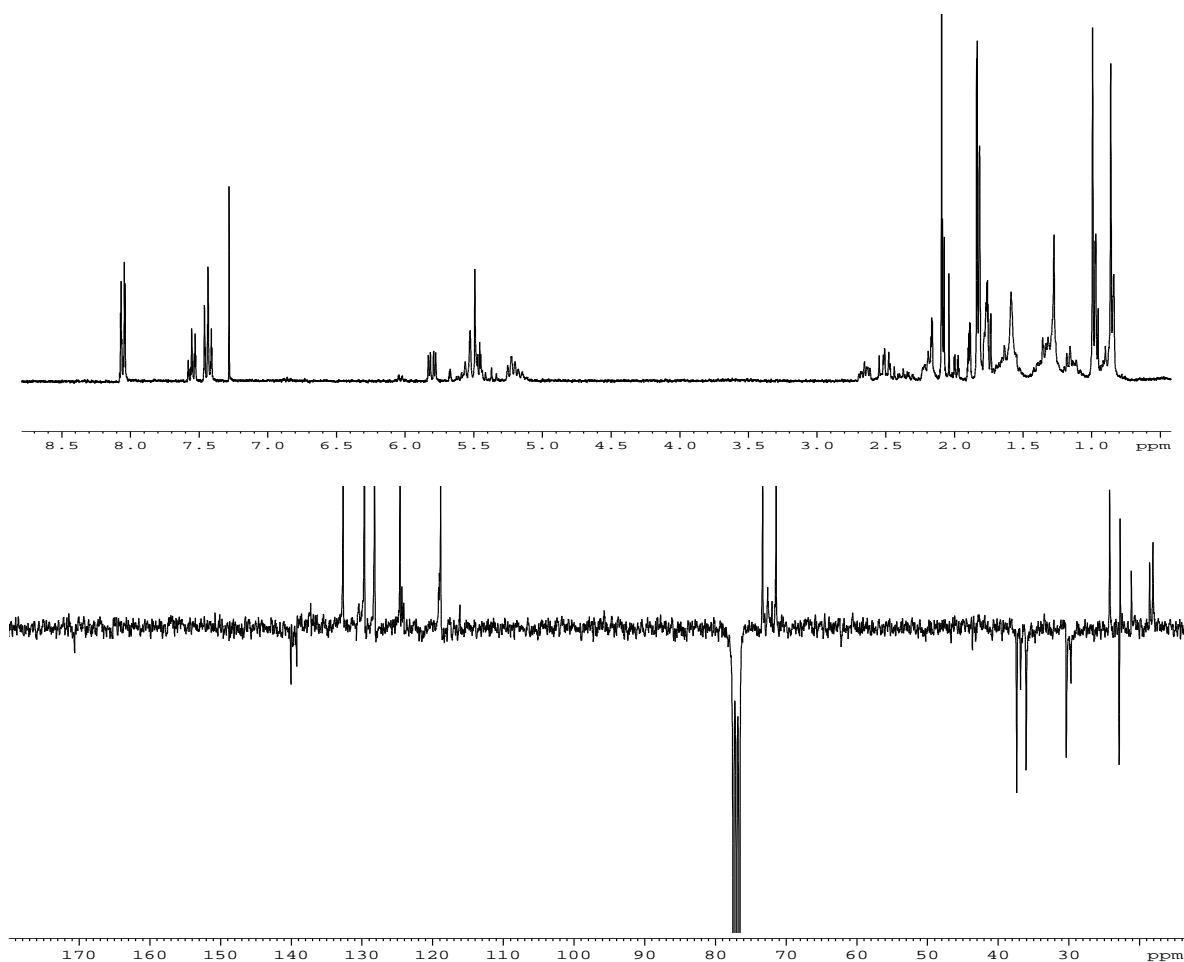
Position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,12 <i>t</i> (8,0)	118,8
2	2,56 <i>m</i>	29,8
3	5,61 <sup>a</sup>	73,0
4	-	134,7
5	5,62 <sup>a</sup>	130,2
6	4,23 <i>d</i> (10,5)	70,1
7	-	36,5
8	1,09 <i>m</i> -1,29 <i>m</i>	36,8
9	1,28 <i>m</i> -1,65 <i>m</i>	23,1
10	1,58 <i>m</i> -2,16 <i>m</i>	37,7
11	-	140,2
12	1,75 <i>d</i> (1,3)	17,4
13	1,72 <i>s</i>	18,5
14	1,0 <i>s</i>	23,0
15	0,94 <i>s</i>	22,9
<b>C=O</b>	-	166,3
1'	-	130,3
2'	8,04 <i>d</i> (7,5)	129,6
3'	7,45 <i>t</i> (7,5)	128,4
4'	7,57 <i>t</i> (7,5)	133,1
5'	7,45 <i>t</i> (7,5)	128,4
6'	8,04 <i>d</i> (7,5)	129,6

**Composé J4**



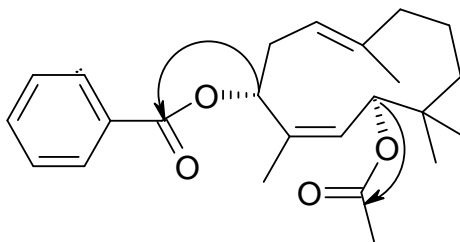
**Composé J4**

L'analyse des spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  (figure 22), indiquent la présence d'un reste **benzoyle**, d'un **acétyle** ainsi que du squelette du juniférol (voir tableau 16).



**Figure 22.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé J4 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

La position des groupements acyles a été déduite des corrélations en HMBC (figure 23).

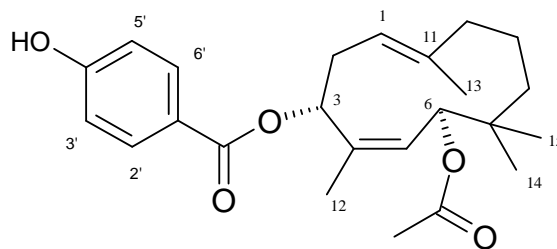


**Figure 23.** Corrélations HMBC (H→C) choisies du composé J4.

La structure a été ainsi établie comme étant le **3-benzoyl-6-acétyljuniférol** nommé **lyciférine C**. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres du proton et du carbone du composé **J4** sont présentées dans le tableau 16.

**Tableau 16.** RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J4** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

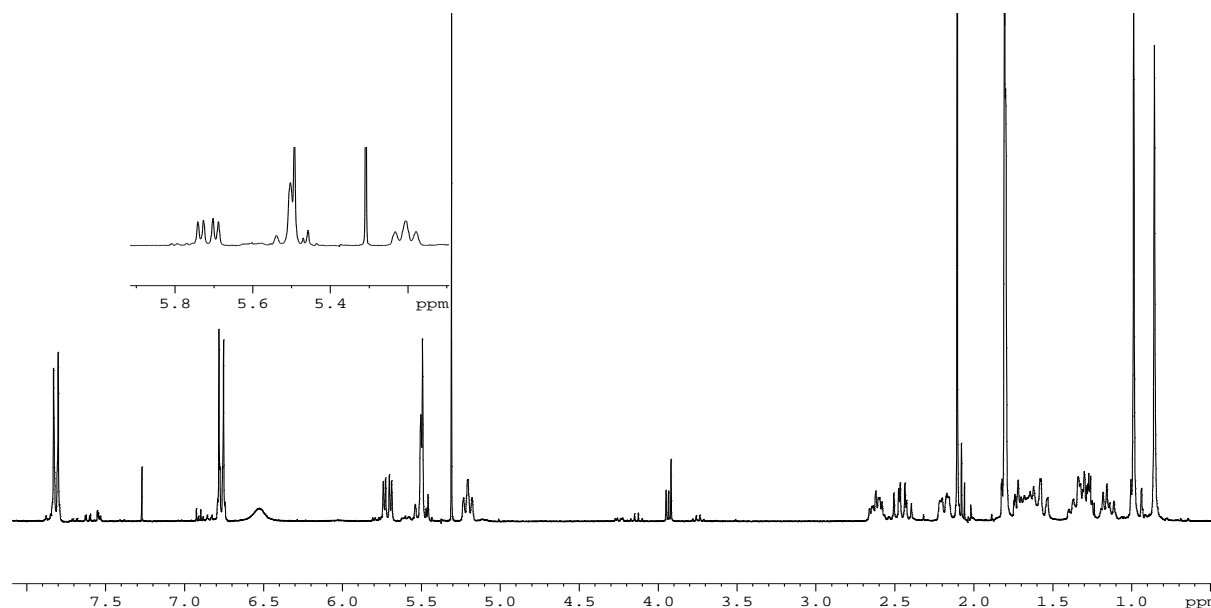
position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	5,23 <i>t</i> (8,0)	118,9
<b>2</b>	2,63 <i>m</i> - 2,47 <i>m</i>	30,4
<b>3</b>	5,80 <i>dd</i> (12,0; 4,5)	73,1
<b>4</b>	-	139,4
<b>5</b>	5,50 <i>d</i> (10,5)	124,7
<b>6</b>	5,47 <i>d</i> (10,5)	71,6
<b>7</b>	-	36,9
<b>8</b>	1,10 <i>m</i> - 1,27 <i>m</i>	36,8
<b>9</b>	1,31 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	22,9
<b>10</b>	1,55 <i>m</i> - 2,19 <i>m</i>	37,9
<b>11</b>	-	140,0
<b>12</b>	1,83 <i>d</i> (1,3)	18,6
<b>13</b>	1,82 <i>s</i>	18,3
<b>14</b>	0,99 <i>s</i>	24,3
<b>15</b>	0,86 <i>s</i>	22,8
<b>C=O</b>	-	165,9
<b>1'</b>	-	130,0
<b>2'</b>	8,03 <i>d</i> (7,5)	129,7
<b>3'</b>	7,44 <i>t</i> (7,5)	128,4
<b>4'</b>	7,55 <i>t</i> (7,5)	132,6
<b>5'</b>	7,44 <i>t</i> (7,5)	128,4
<b>6'</b>	8,05 <i>d</i> (7,5)	129,7
<b><u>COCH</u><sub>3</sub></b>	-	170,7
<b><u>COCH</u><sub>3</sub></b>	2,09 <i>s</i>	21,2

**Composé J6****Composé J6**

Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **J6** (figure 24) présente de fortes similitudes avec celui du composé **J5**. On retrouve les deux doublets caractéristiques du groupement ***p*-hydroxybenzoyl** à 7,83 ppm (2H ; 8,7 Hz) et à 6,80 ppm (2H ; 8,7 Hz). On observe également les signaux correspondant au juniférol (tableau 17). Cependant, il existe ici une différence notable : l'acétylation de l'hydroxyle en 6 déduite du déblindage du proton H-6 à 5,50 ppm et l'apparition d'un méthyle à 2,11 ppm.

Cette hypothèse est confirmée par les expériences bidimensionnelles de COSY et HMBC ainsi que par le spectre de MS.

La structure du composé **J6** a donc pu être établie comme étant le **3-*p*-hydroxybenzoyl-6-acetyljuniférol (juniférinine)**. Ce composé a été déjà isolé des racines de *F. juniperina* [Sagitdinova *et al.*, 1978b]. Les attributions de tous les signaux des spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J6** sont présentées dans le tableau 17.

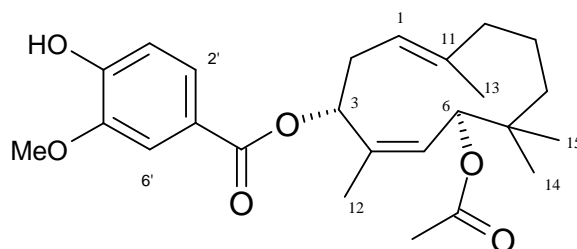


**Figure 24.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **J6** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

**Tableau 17.** RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J6** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

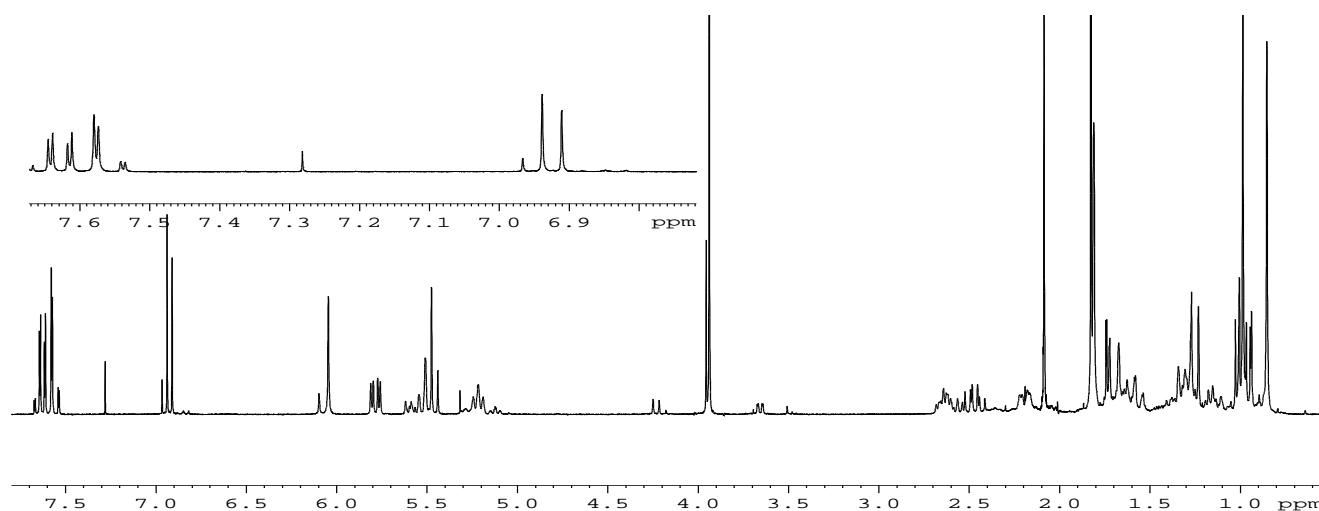
position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,20 <i>t</i> (8,0)	119,4
2	2,63 <i>m</i> -2,47 <i>m</i>	29,8
3	5,70 <i>dd</i> (12,0; 4,5)	72,4
4	-	139,4
5	5,50 <i>d</i> <sup>a</sup>	129,5
6	5,50 <i>d</i> <sup>a</sup>	71,6
7	-	36,4
8	1,10 <i>m</i> - 1,27 <i>m</i>	36,5
9	1,31 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	22,8
10	1,55 <i>m</i> - 2,19 <i>m</i>	36,9
11	-	140,1
12	1,80 <i>d</i> (1,5)	18,4
13	1,80 <i>s</i>	17,4
14	0,99 <i>s</i>	22,9
15	0,86 <i>s</i>	22,9
<b>C=O</b>	-	166,0
1'	-	122,3
2'	7,83 <i>d</i> (8,7)	132,3
3'	6,80 <i>d</i> (8,7)	115,7
4'	-	160,9
5'	6,80 <i>d</i> (8,7)	115,7
6'	7,83 <i>d</i> (8,7)	132,3
<u>CO</u> CH <sub>3</sub>	-	170,7
CO <u>CH</u> <sub>3</sub>	2,11 <i>s</i>	21,2



**Composé J7****Composé J7**

Dans le cas de cette molécule, il est évident qu'il s'agit également d'un ester de juniferol. Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 25) présente de fortes similitudes avec celui du composé **J6**. La principale différence se trouve au niveau de la région des aromatiques. Dans cette région, on observe trois protons à 6,92 ppm (1H; *d*; 8,3 Hz, H-3'), à 7,58 ppm (1H; *d*; 2,2 Hz, H-2') et à 7,63 ppm (1H; *dd*; 8,3 et 2,2 Hz, H-6') formant un système ABX. Ces signaux indiquent donc la présence d'un groupement benzoyle substitué en *para* et en *meta*. Il reste à déterminer les deux substituants. Sur le même spectre, on constate également le signal d'un méthyle déblindé à 3,94 ppm correspondant à un groupement méthoxy.

En observant les corrélations de ce méthyle en ROESY (figure 26), on constate qu'il ne corrèle qu'avec le doublet à 7,58 ppm. Le groupement méthoxy se trouve donc en position *meta*.

**Figure 25.** Spectre du RMN du  $^1\text{H}$  du composé J7 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

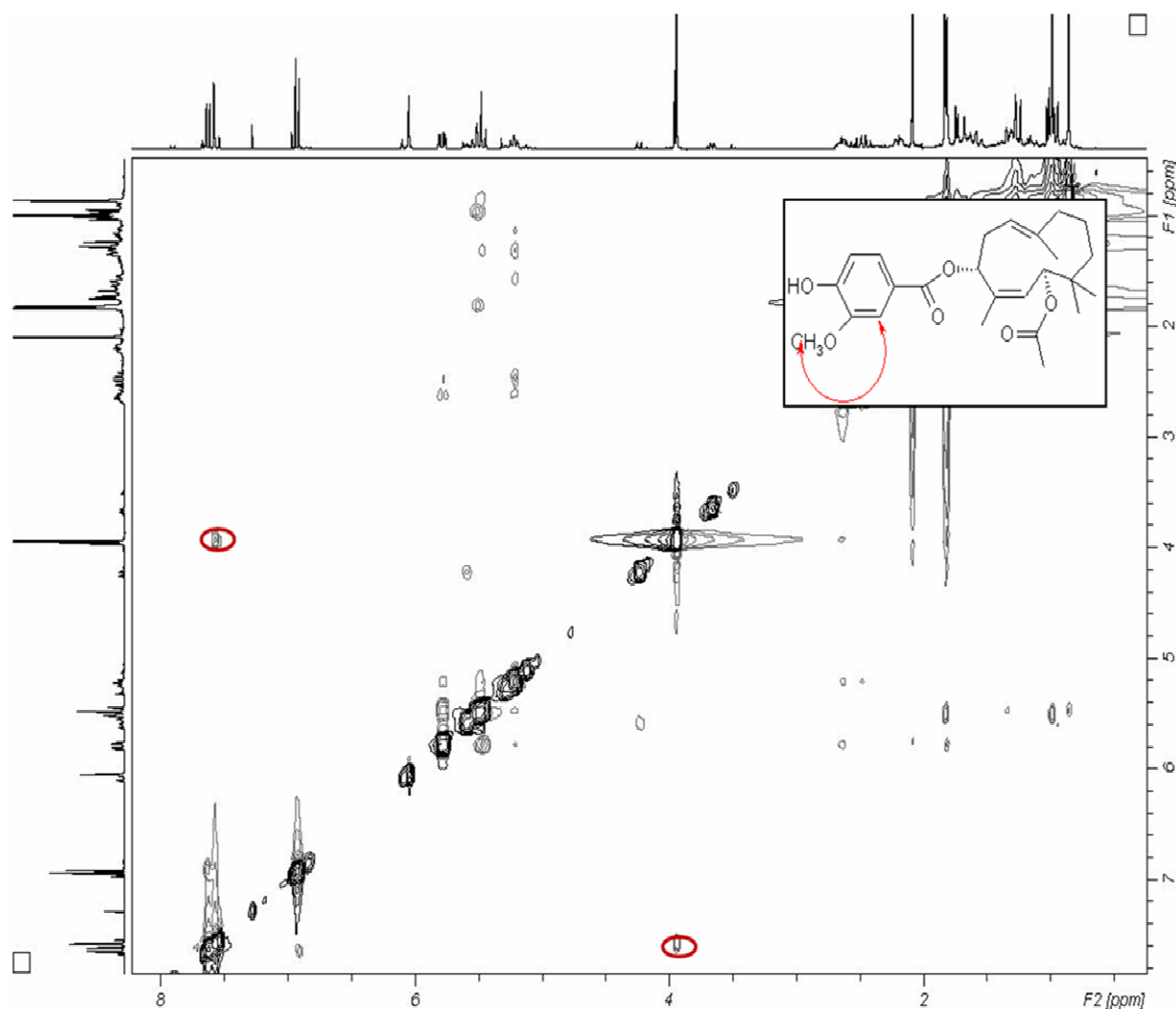


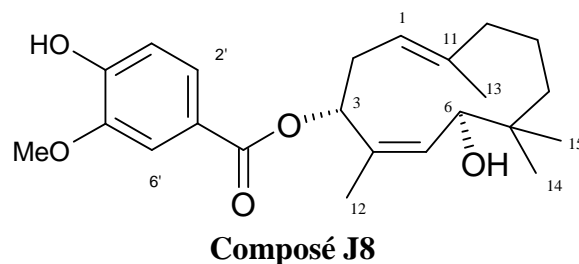
Figure 26. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY du composé J7 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

La présence d'un hydroxyle en *para* est déduite du spectre de masse. L'analyse de ce composé par spectrométrie de masse SM-ESI en mode positif révèle un ion moléculaire  $m/z$  445  $[\text{M}+\text{H}]^+$  indiquant la formule brute  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_6$ .

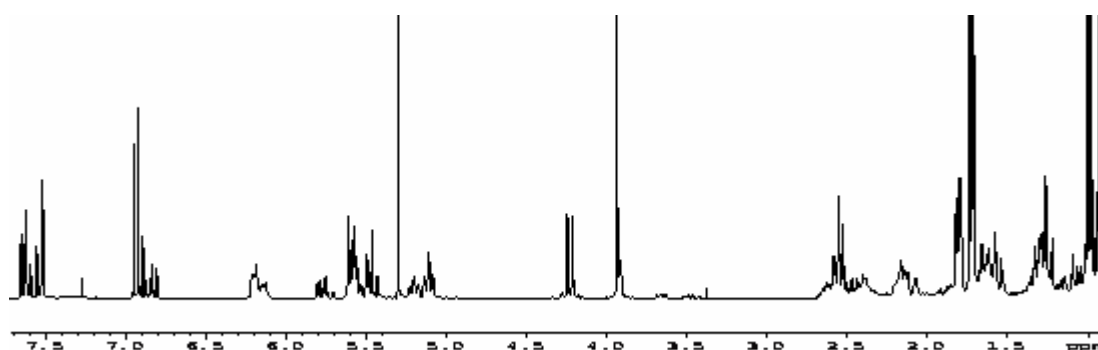
La structure du composé **J7** a donc pu être établie comme étant celle du **3-vanilloyl-6-acétyljuniférol** nommé la **lyciférine E**. A notre connaissance, ce composé n'a jamais été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J7** sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18. RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J7** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	5,21 <i>t</i> (8,0)	118,9
<b>2</b>	2,63 <i>m</i> - 2,47 <i>m</i>	30,4
<b>3</b>	5,78 <i>dd</i> (12,0; 4,5)	73,1
<b>4</b>	-	139,4
<b>5</b>	5,49 <i>d</i> (10,5)	124,7
<b>6</b>	5,46 <i>d</i> (10,5)	71,6
<b>7</b>	-	36,9
<b>8</b>	1,10 <i>m</i> - 1,27 <i>m</i>	36,8
<b>9</b>	1,31 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	22,9
<b>10</b>	1,55 <i>m</i> - 2,19 <i>m</i>	37,9
<b>11</b>	-	140,0
<b>12</b>	1,89 <i>d</i> (1,3)	18,6
<b>13</b>	1,81 <i>s</i>	18,3
<b>14</b>	0,98 <i>s</i>	24,3
<b>15</b>	0,84 <i>s</i>	22,8
<b>C=O</b>	-	165,9
<b>1'</b>	-	122,8
<b>2'</b>	7,58 <i>d</i> (2,2)	111,9
<b>3'</b>	6,92 <i>d</i> (8,3)	113,9
<b>4'</b>	-	146,0
<b>5'</b>	-	149,8
<b>6'</b>	7,63 <i>dd</i> (8,3; 2,2)	124,4
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,94 <i>s</i>	56,04
<b><u>CO</u>CH<sub>3</sub></b>	-	170,7
<b><u>CO</u><u>CH</u><sub>3</sub></b>	2,10 <i>s</i>	21,2

**Composé J8 :**

Comme pour le composé **J7**, le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 27) montre les signaux de trois protons à 6,96 ppm (1H;  $d$  8,2 Hz, H-3'), à 7,54 ppm (1H;  $d$  2,2 Hz, H-2') à 7,66 ppm (1H;  $dd$  8,2 et 2,2 Hz, H-6'), le signal d'un méthoxyle à 3,96 ppm indiquant la présence du groupement vanilloyle. On retrouve également les signaux caractéristiques du juniférol : les deux protons oléfiniques à 5,12 ppm et à 5,60 ppm, le proton d'acylation à 5,58 ppm, les deux méthyles déblindés à 1,74 ppm et 1,72 ppm et les deux méthyles géminés à 0,99 ppm et 0,93 ppm.



**Figure 27.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  de composé J8 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

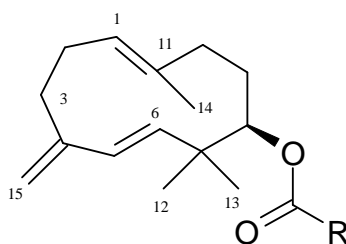
On constate également le signal du proton H-6 à 4,23 ppm et l'absence de signal dû à un méthyle correspondant à un acétyle ce qui indique l'absence de la fonction acétyle en H-6.

Cette hypothèse est confirmée par l'analyse de ce composé par SM-ESI qui donne un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  403  $[\text{M}+\text{H}]^+$  indiquant la formule brute  $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_5$ .

La structure du composé **J8** a donc pu être établie comme étant le **3-vanilloyljuniférol (juniférine)**. Ce composé a été déjà isolé des racines de *F. juniperina* [Sagitdinova *et al.*, 1978b]. Les attributions de tous les signaux des spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J8** sont présentées dans le tableau 19.

**Tableau 19.** RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **J8** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	5,12 <i>t</i> (8,0)	118,9
<b>2</b>	2,53 <i>m</i>	29,8
<b>3</b>	5,60 <sup>a</sup>	72,8
<b>4</b>	-	135,0
<b>5</b>	5,60 <sup>a</sup>	130,1
<b>6</b>	4,23 <i>d</i> (10,5)	70,3
<b>7</b>	-	36,5
<b>8</b>	1,10 <i>m</i> - 1,27 <i>m</i>	36,8
<b>9</b>	1,31 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	22,9
<b>10</b>	1,55 <i>m</i> - 2,19 <i>m</i>	37,9
<b>11</b>	-	140,1
<b>12</b>	1,74 <i>d</i> (1,3)	18,5
<b>13</b>	1,72 <i>s</i>	17,42
<b>14</b>	0,99 <i>s</i>	24,3
<b>15</b>	0,93 <i>s</i>	22,8
<b>C=O</b>	-	164,9
<b>1'</b>	-	122,3
<b>2'</b>	7,54 <i>d</i> (2,2)	111,8
<b>3'</b>	6,96 <i>d</i> (8,2)	113,9
<b>4'</b>	-	146,2
<b>5'</b>	-	150,0
<b>6'</b>	7,66 <i>dd</i> (8,2; 2,2)	124,2
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,96 <i>s</i>	56,04

**Composés F1, F2 et F3 :**

**Composé F1** R=Benzoyle

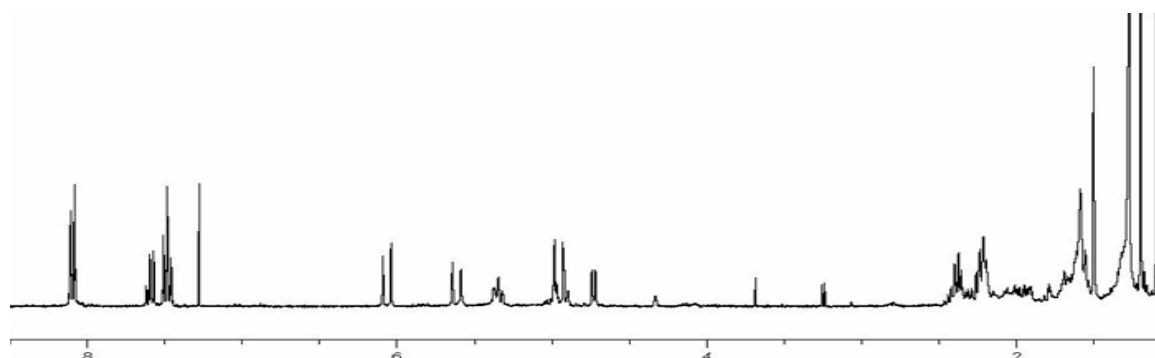
**Composé F2** R=*p*-Hydroxybenzoyle

**Composé F3** R=Vanilloyle

Les composés **F1-F3** ont été isolés sous la forme d'une huile, ils absorbent tous en lumière UV à 254 nm, et sous l'effet du réactif à l'anisaldéhyde, ils montrent une couleur vert foncé en lumière du jour.

L'analyse des composés **F1, F2 et F3** par electrospray en spectrométrie de masse (SM-ESI) en mode négatif montre des ions pseudomoléculaires à  $m/z$  323 [M-H]<sup>-</sup>, 341 [M-H]<sup>-</sup> et 369 [M-H]<sup>-</sup> ce qui est compatible avec les formules brutes C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub> et C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>, respectivement.

Les spectres de RMN du <sup>1</sup>H des composés **F1** (figure 28), **F2** (figure 29) et **F3** (figure 30) présentent de grandes similitudes entre eux sauf pour les groupements acyles qui sont facilement identifiés par analogie comme étant des restes **benzoyle**, ***p*-hydroxybenzoyle** et **vanilloyle**, respectivement.



**Figure 28.** Spectre de RMN du <sup>1</sup>H du composé F1 (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).

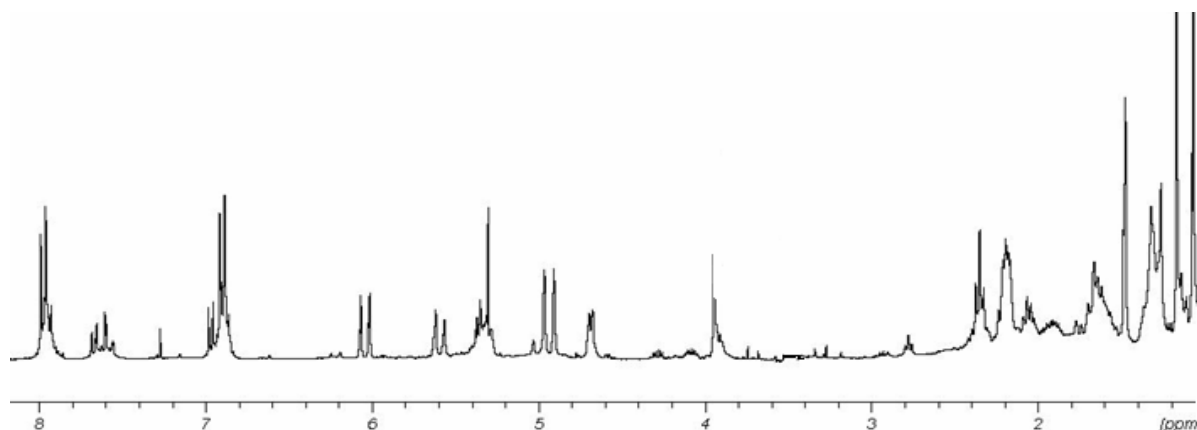


Figure 29. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé F2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

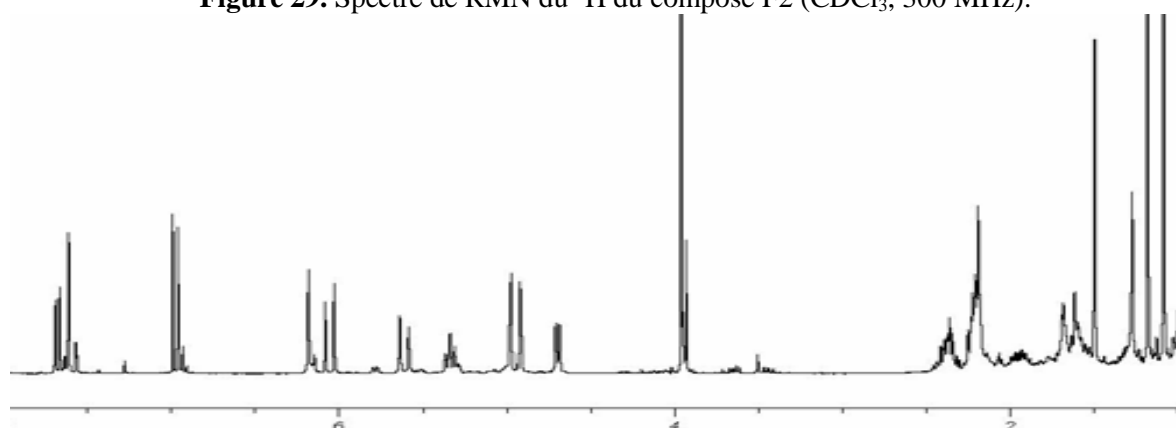


Figure 30. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé F3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

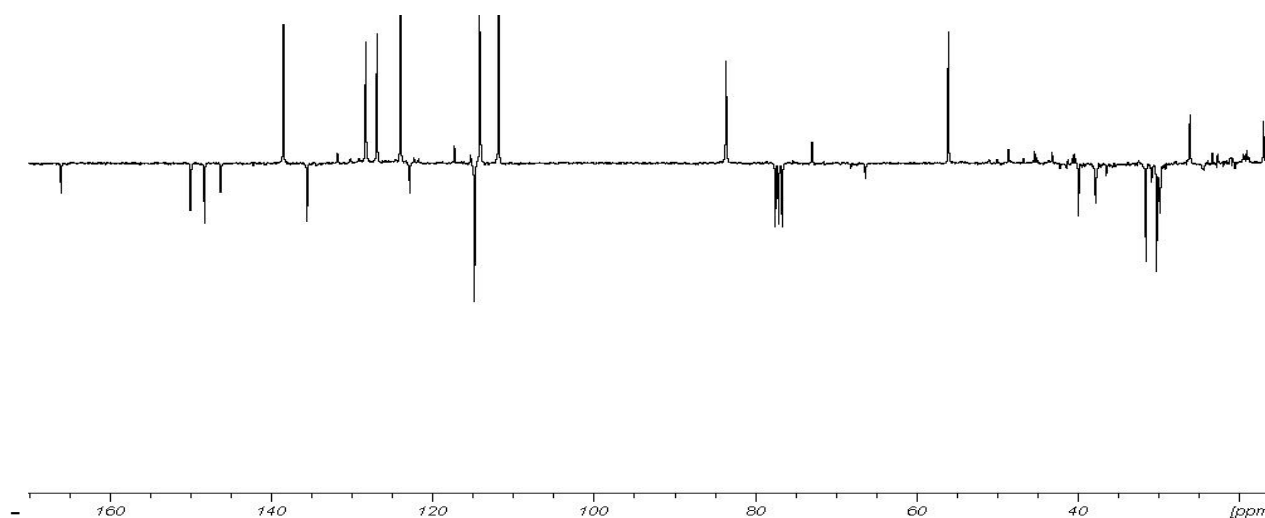
Tableau 20. RMN du  $^1\text{H}$  de l'acyle des composés F1-F3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	Benzoyle $\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	<i>p</i> -hydroxybenzoyle $\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	Vanilloyle $\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1'	-	-	-
2'	8,03 <i>dd</i> (2,8 ; 8,9)	7,99 <i>d</i> (8,8)	7,54 <i>d</i> (2,2)
3'	7,46 <i>dt</i> (2,0 ; 8,8)	6,91 <i>d</i> (8,8)	6,96 <i>d</i> (8,2)
4'	7,60 <i>dt</i> (2,0 ; 8,8)	-	-
5'	7,46 <i>dt</i> (2,0 ; 8,8)	6,91 <i>d</i> (8,8)	-
6'	8,03 <i>dd</i> (2,8 ; 8,9)	7,99 <i>d</i> (8,8)	7,66 <i>dd</i> (8,3 ; 2,2)
<b>OCH<sub>3</sub></b>	-	-	3,96 <i>s</i>

En ce qui concerne les parties non acyles des molécules, il s'agit d'un squelette sesquiterpénique. Les spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ -*J*-modulé (figure 31) ainsi que

l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC permettent de noter les caractéristiques de cette structure sous forme de signaux de:

- Deux doublets à 6,04 et 5,59 ppm d'une constante de couplage de 16 Hz indiquant la présence d'une double liaison disubstituée de configuration *trans*,
- Un proton oléfinique à 5,32 ppm (*br t*; 8,5 Hz), un méthyle vinylique à 1,48 ppm et un carbone quaternaire à 138,5 ppm pouvant être attribués à une double liaison trisubstituée,
- Deux protons sous forme de doublets à 4,96 et 4,90 ppm d'une constante de couplage de 2,1 Hz portés par le même carbone secondaire à 114,7 ppm ainsi qu'un carbone quaternaire à 148,3 ppm correspondant au méthylène exocyclique,
- Un doublet à 4,73 ppm (6,9 Hz) porté par un carbone tertiaire à 83,6 ppm correspondant au proton d'acylation en position  $\beta$ ,
- Deux méthyles sous forme de singulets à 1,20 et 1,11 ppm.



**Figure 31.** Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé F3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

A partir de l'expérience COSY (figure 32), on a pu établir deux enchaînements:

- (a)  $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  et (b)  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHOR}-$ .



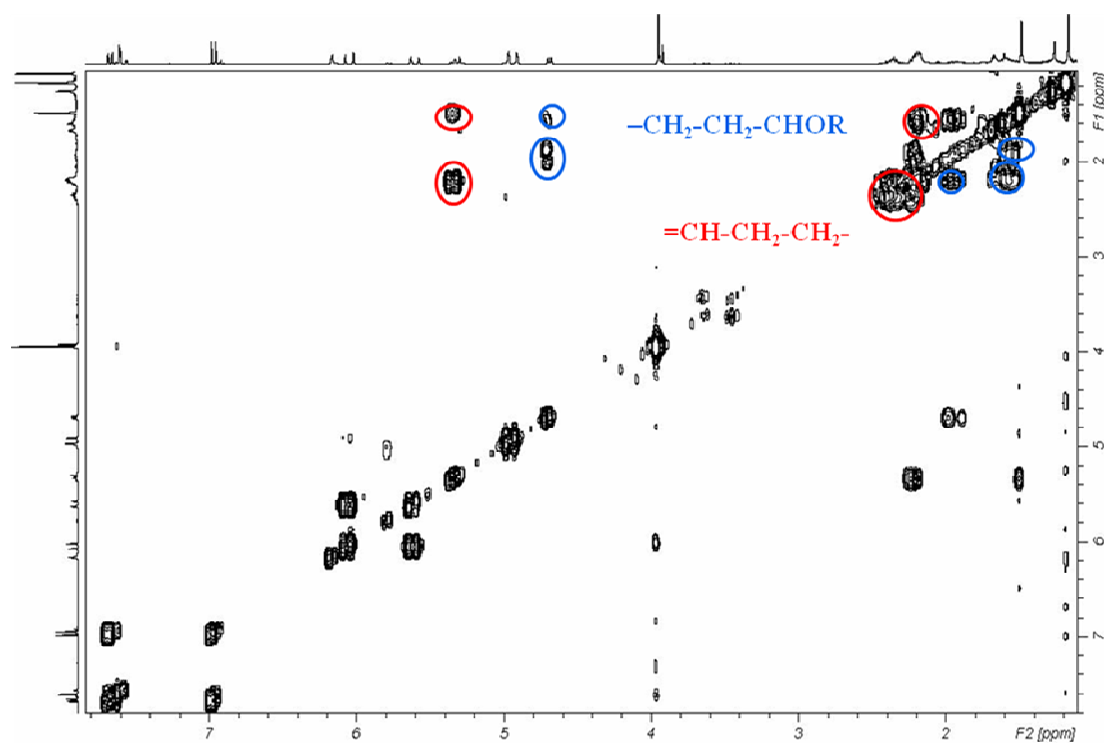


Figure 32. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY du composé F3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

La carte HMBC (figure 33) se montre encore une fois efficace pour relier les différents fragments.

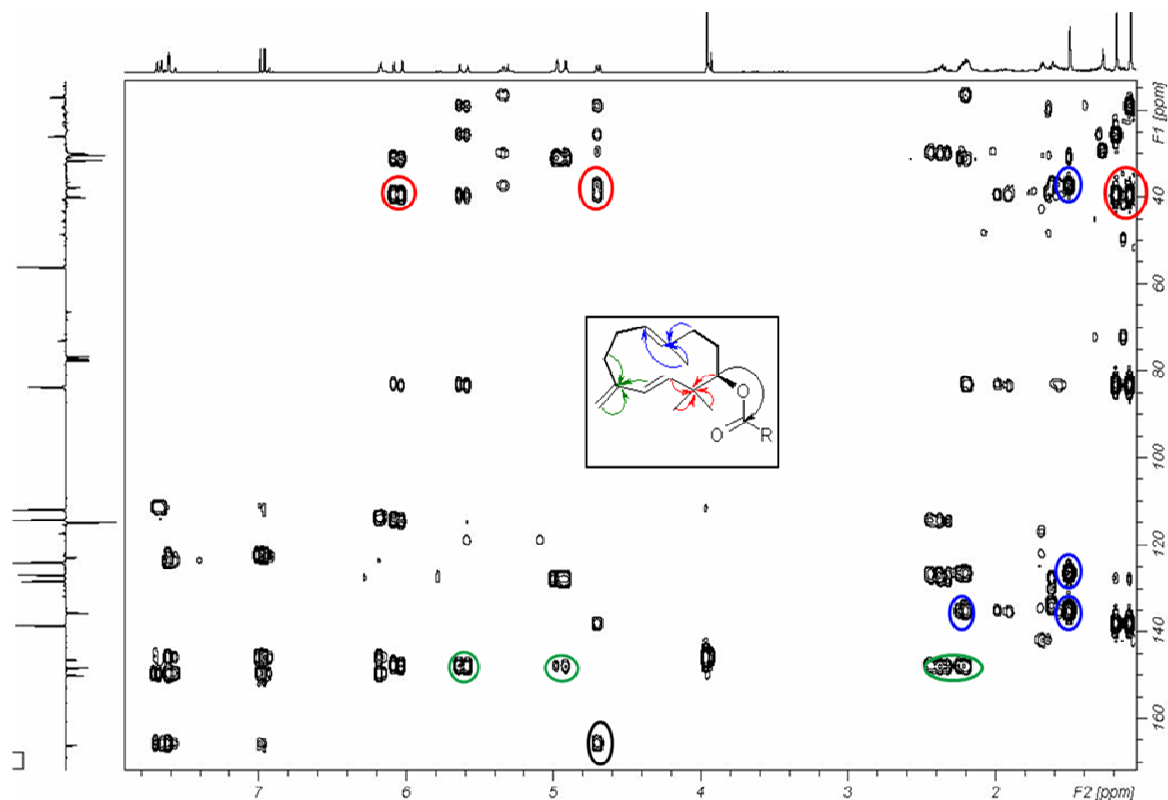
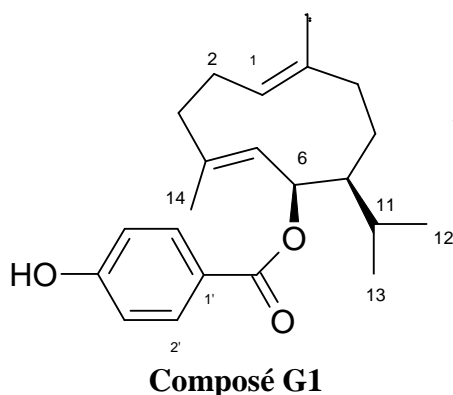


Figure 33. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC du composé F3 ( $\text{CDCl}_3$ , 300/75 MHz).

Les structures des composés F1, F2 et F3 ont donc pu être établies comme étant respectivement le **8-benzoylfervanol**, le **8-*p*-hydroxybenzoylfervanol** et le **8-*p*-vanilloylfervanol**. Ces composés ont été isolés de *F. hausskechti*, une plante endémique d'Anatolie en Turquie [Miski *et al.*, 1987b]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 21.

**Tableau 21.** RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  de la partie sesquiterpénique des composés **F1-F3** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

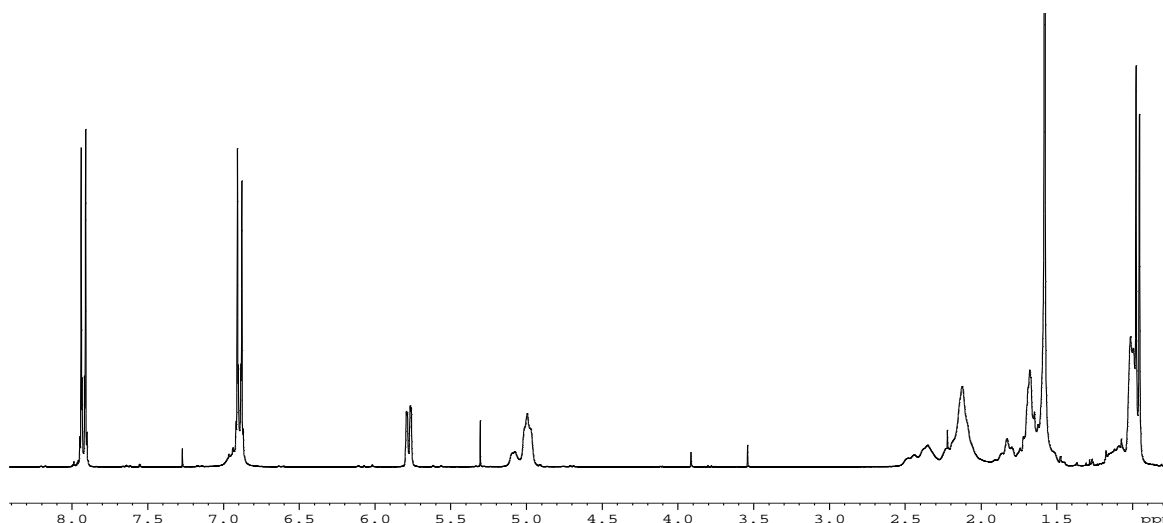
position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	5,32 <i>br t</i> (8,5)	126,8
2	2,22 <i>m</i> - 2,33 <i>m</i>	30,2
3	2,33 <i>m</i> - 2,38 <i>m</i>	31,5
4	-	148,3
5	6,04 <i>d</i> (16,0)	138,5
6	5,59 <i>d</i> (16,0)	128,5
7	-	37,7
8	4,73 <i>br d</i> (6,9)	83,6
9	1,91 <i>m</i> - 2,20 <i>m</i>	40,9
10	1,57 <i>m</i> - 2,17 <i>m</i>	40,9
11	-	135,5
12	1,20 <i>s</i>	26,0
13	1,11 <i>s</i>	26,0
14	1,48 <i>s</i>	17,0
15	4,90 <i>d</i> - 4,96 <i>d</i> (2,1)	114,7
C=O	-	166,0

**Composé G1:**

Le composé G1 a été isolé sous forme d'une huile. Il absorbe en lumière UV à 254 nm, et sous l'effet du réactif à l'anisaldéhyde, il présente une couleur grise en lumière du jour.

Sur le spectre de masse du composé **G1** réalisé en electrospray (SM-ESI) en mode négatif, on observe un ion moléculaire à  $m/z$  341  $[M-H]^-$  indiquant une formule brute de  $C_{22}H_{30}O_3$ .

Le spectre de RMN du  $^1H$  (figure 34) du composé G1 présente dans la zone des protons aromatiques deux doublets à 7,95 ppm (2H, 8,9 Hz) et à 6,89 ppm (2H, 8,9 Hz) similaires à ceux observés pour le composé **J5**. On a donc identifié la partie acyle comme étant un groupement *p*-OH-benzoyle.



**Figure 34.** Spectre de RMN du  $^1H$  du composé G1 ( $CDCl_3$ , 300 MHz).

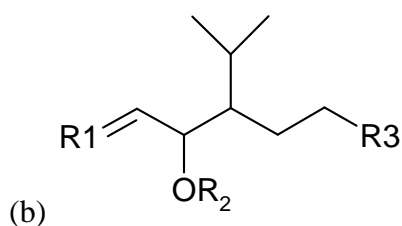
On constate également la présence d'un doublet à 0,97 (6H, 6,6 Hz) ppm et l'absence de signaux de deux méthyles géminaux observés sur les spectres protons des produits précédents. Ces observations indiquent que le squelette de la partie sesquiterpénique est différent.

Les données fournies par les spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ -*J*-modulé et l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC permettent d'identifier les caractéristiques de ce squelette à partir des signaux de:

- Deux doubles liaisons trisubstituées déduites de la présence de deux carbones quaternaires oléfiniques à 138,5 et 134,7 ppm de deux carbones tertiaires oléfiniques à 121,7 et 127,9 ppm portant les protons observés à 5,07 ppm (1H, *m*) et à 4,99 ppm (1H, *m*), ainsi que ceux de deux méthyles déblindés à 1,58 ppm (6H, *s*),
- Un proton d'acylation à 5,78 ppm (*dd*, 1,7 et 7,6 Hz) porté par le carbone tertiaire à 73,6 ppm,
- Quatre méthylènes à 51,0 ; 41,7 ; 37,2 et 24,3 ppm,
- Deux méthines à 32,5 et 26,0 ppm.

Les corrélations observées en  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (figure 35), permettent de déduire deux enchaînements :

(a) =CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>



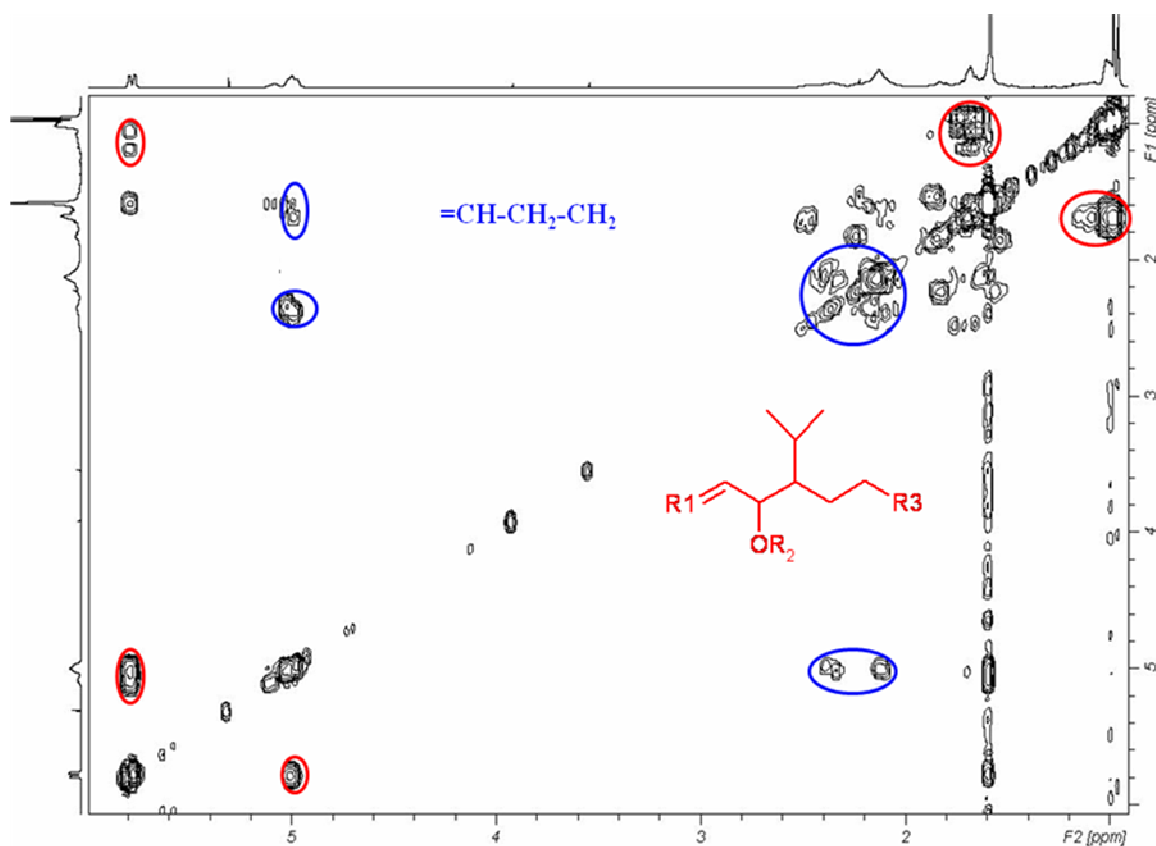


Figure 35. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY du composé G1 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

Comme pour les composés précédents, le lien entre les deux fragments a été établi grâce à l'expérience HMBC (figure 36).

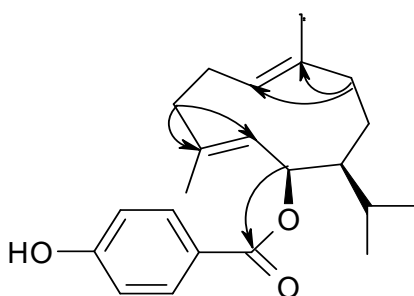
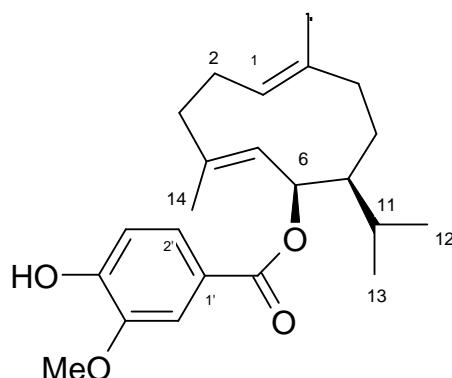


Figure 36. Corrélations HMBC ( $\text{H} \rightarrow \text{C}$ ) choisies du composé G1.

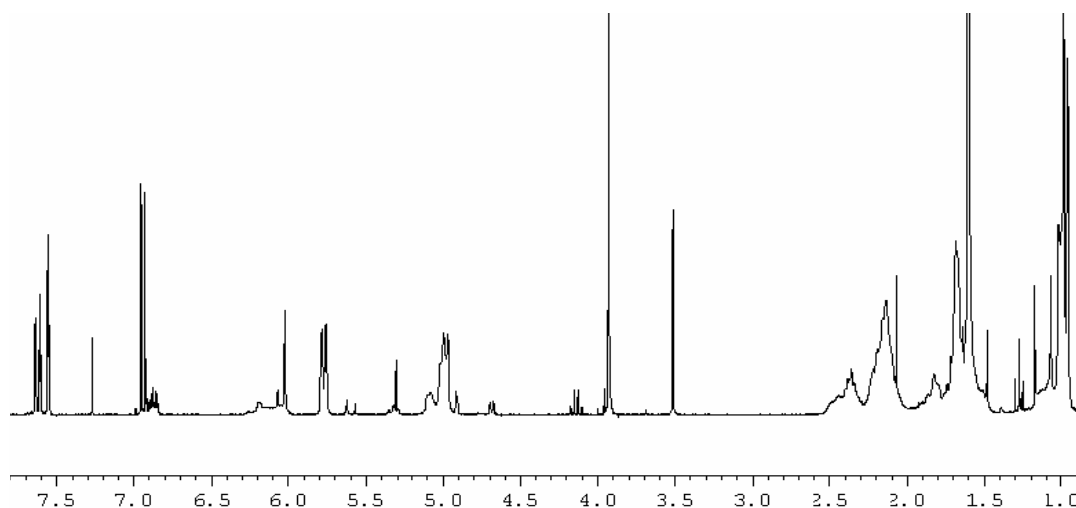
La structure du composé **G1** a donc pu être établie comme étant le **6- $\beta$ -p-hydroxybenzoyl-germacra-1(10),4-diène**. Ce composé a déjà été isolé de *F. orientalis* [Miski *et al.*, 1987a]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 22.

Tableau 22. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **G1** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	5,07 <i>m</i>	121,7
<b>2</b>	1,82 <i>m</i> - 2,23 <i>m</i>	41,7
<b>3</b>	2,16 <i>m</i>	37,2
<b>4</b>	-	134,7
<b>5</b>	4,99 <i>m</i>	127,9
<b>6</b>	5,78 <i>dd</i> (1,7; 7,6)	73,6
<b>7</b>	1,19 <i>m</i>	51,0
<b>8</b>	1,59 <i>m</i> - 1,89 <i>m</i>	26,0
<b>9</b>	2,15 <i>m</i> - 2,42 <i>m</i>	24,3
<b>10</b>	-	138,5
<b>11</b>	1,70 <i>m</i>	32,5
<b>12</b>	0,97 <i>d</i> (6,6)	20,8
<b>13</b>	0,97 <i>d</i> (6,6)	20,8
<b>14</b>	1,58 <i>s</i>	16,4
<b>15</b>	1,58 <i>s</i>	16,4
<b>C=O</b>	-	166,9
<b>1'</b>	-	122,9
<b>2'</b>	7,95 <i>d</i> (8,9)	132,4
<b>3'</b>	6,89 <i>d</i> (8,9)	115,7
<b>4'</b>	-	160,7
<b>5'</b>	6,89 <i>d</i> (8,9)	115,7
<b>6'</b>	7,95 <i>d</i> (8,9)	132,4

**Composé G2:****Composé G2**

Le spectre du RMN du  $^1\text{H}$  de ce composé (figure 37) présente de fortes similitudes avec celui de composé **G2**. La principale différence se trouve au niveau de la région des aromatiques. On observe trois protons à 6,92 ppm (1H;  $d$  8,3 Hz, H-3'), à 7,58 ppm (1H;  $d$  2,2 Hz, H-2'), à 7,68 ppm (1H;  $dd$  8,3 et 2,2 Hz, H-6') et un méthyle à 3,94 ppm indiquant la présence du groupement vanilloyle.



**Figure 37.** Spectre du RMN du  $^1\text{H}$  du composé G2 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

Le structure du composé G2 a donc pu être établie comme étant **6- $\beta$ -vanilloylgermacra-1(10),4-diène**. Ce composé a été isolé de *Ferula orientalis* [Miski *et al.*, 1987a]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 23.

Tableau 23. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de composé **G2** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	5,07 <i>m</i>	121,7
<b>2</b>	1,82 <i>m</i> - 2,23 <i>m</i>	41,7
<b>3</b>	2,16 <i>m</i>	37,2
<b>4</b>	-	134,7
<b>5</b>	4,99 <i>m</i>	127,9
<b>6</b>	5,78 <i>dd</i> (1,7; 7,6)	73,6
<b>7</b>	1,19 <i>m</i>	51,0
<b>8</b>	1,59 <i>m</i> - 1,89 <i>m</i>	26,0
<b>9</b>	2,15 <i>m</i> - 2,42 <i>m</i>	24,3
<b>10</b>	-	138,5
<b>11</b>	1,70 <i>m</i>	32,5
<b>12</b>	0,97 <i>d</i> (6,6)	20,8
<b>13</b>	0,97 <i>d</i> (6,6)	20,8
<b>14</b>	1,58 <i>s</i>	16,4
<b>15</b>	1,58 <i>s</i>	16,4
<b>C=O</b>	-	165,9
<b>1'</b>	-	122,8
<b>2'</b>	7,58 <i>d</i> (2,2)	111,9
<b>3'</b>	6,92 <i>d</i> (8,3)	113,9
<b>4'</b>	-	146,0
<b>5'</b>	-	149,8
<b>6'</b>	7,68 <i>dd</i> (8,3; 2,2)	124,4
<b>OCH<sub>3</sub></b>	3,94 <i>s</i>	56,04



## 2.2 *Ferula elaeochytris* (Korovin)

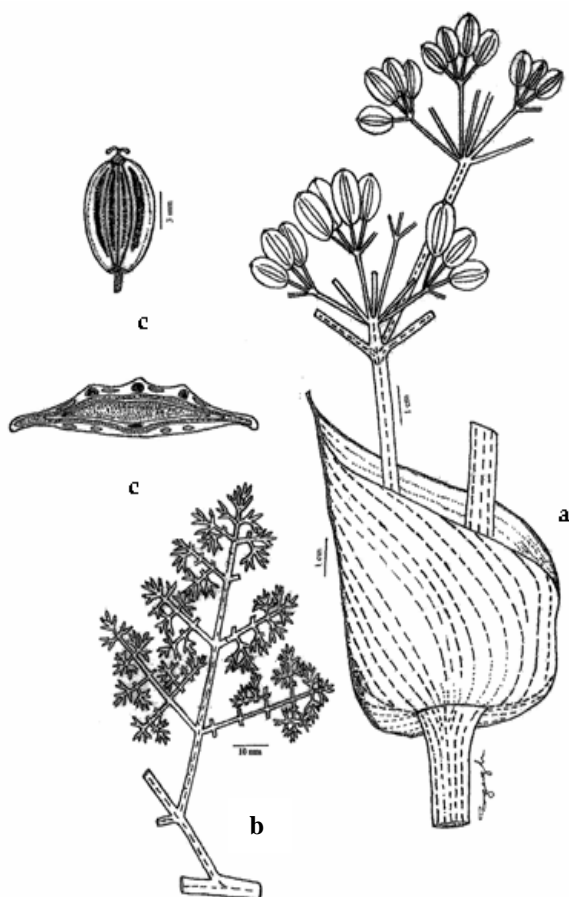
### 2.2.1 Caractères morphologiques

C'est une plante vivace, à tige cylindrique glabre mesurant de 70-230 cm de hauteur et 0,5-3 cm de diamètre (figure 38). Les racines cylindriques mesurent de 1-4 cm de diamètre (figure 39).

Les feuilles triangulaires-ovales mesurent de 25-60×15-45 cm. Les feuilles inférieures sont peu poilues décomposées linéaires-lancéolés de taille de 1-3(-7)×0,2-0,7 mm.

Les fleurs sont en ombelles à (6-)10-20 rayons et mesurent de 1,5-5 cm de long. Les ombellules portent 8-16-22 fleurs.

Les fruits matures sont elliptiques-oblongs mesurant de 7-15×4-7 mm. Dans les vallécules de face dorsale du méricarpe il y a 1-(2) canaux de résine [Sağiroğlu, 2005].



**Figure 38.** *Ferula elaeochytris* tige (a), feuilles (b) et fruits (c).



Figure 39. Les racines de *Ferula elaeochytris*.

### 2.2.2 Description de la poudre de *F. elaeochytris*

Une faible quantité de poudre de racines est déposée sur une lame de microscope puis recouverte d'une lamelle. On retrouve les mêmes éléments prédominants que ceux caractérisant la poudre de *F. lycia* : des fragments de vaisseaux réticulés et de la résine (figure 40).

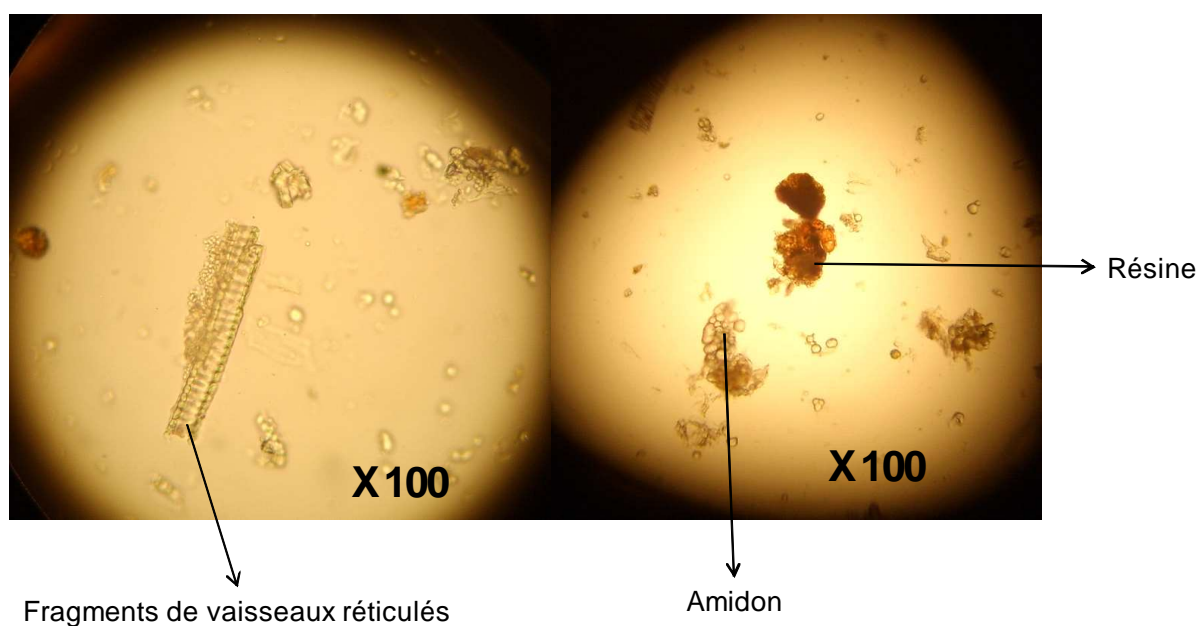


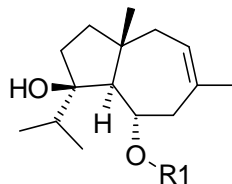
Figure 40. Eléments caractéristiques de la poudre de racines de *F. elaeochytris*.

### 2.2.3 Répartition géographique

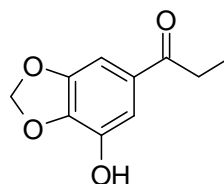
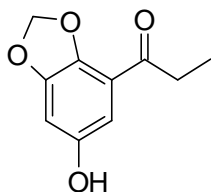
*F. elaeochytris* est observée dans la province de Hatay, en Turquie, ainsi qu'à Chypre [Sağiroğlu, 2005].

2.2.4 Étude phytochimique

Une étude préalable sur cette espèce a démontré la présence d'esters de **jaeschkeanadiol**, ainsi que de deux **propiophénones** [Miski *et al.*, 1983].



	R <sub>1</sub>
<b>6-Angélyoljaeschkeanadiol</b>	Ang
<b><i>o</i>-Hydroxybenzoyljaeschkenadiol</b>	<i>o</i> -OHBnz
<b>Téféridine</b>	Bnz
<b>Férutinine</b>	<i>p</i> -OHBnz
<b>Férutidine</b>	Anis
<b>Téférine</b>	Van



**3-Hydroxy-5,6-méthylènedioxypropiophénone**

**3-Hydroxy-4,5-méthylènedioxypropiophénone**

2.2.5 Isolement des composés

Pour les racines de *F. elaeochytris*, on a suivi le protocole d'extraction utilisé pour les fruits de *F. lycia* (p. 41). Les racines ont été broyées puis extraites par du méthanol. L'extrait méthanolique a été évaporé puis mélangé à de l'eau et le mélange a été extrait par du dichlorométhane puis du *n*-butanol. Les analyses en chromatographie sur couche mince révélées à l'anisaldéhyde ont montré la présence de composés terpéniques dans les fractions dichlorométhanique et *n*-butanolique (schéma 6).

5 g de la fraction dichlorométhanique ont été par la suite fractionnés pour obtenir sept produits purs **E1-E7**, alors que trois composés ont été isolés de la fraction *n*-butanolique **E8 et E10** (schéma 6).

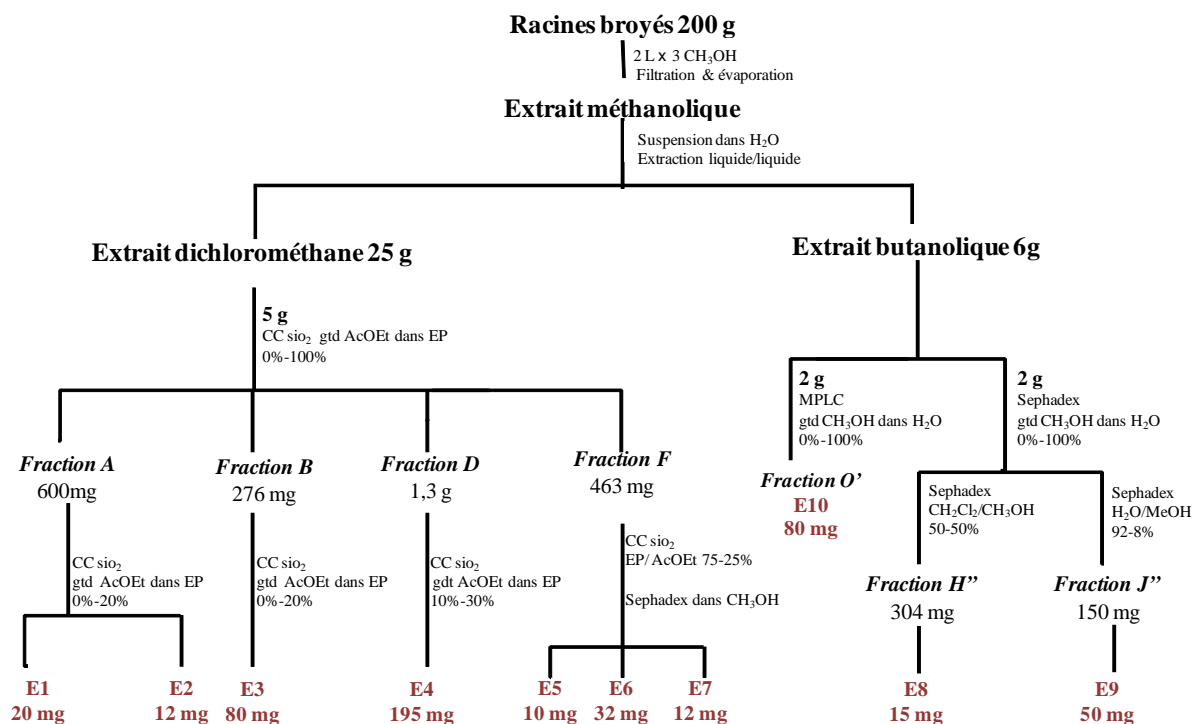
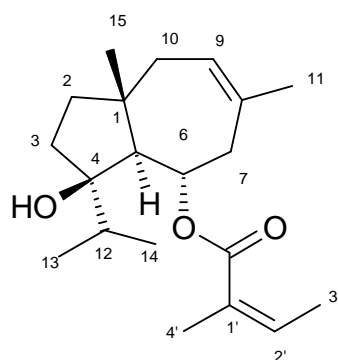


Schéma 6. Extraction des racines de *Ferula elaeochytris* et isolement des composés.

## 2.2.6 Identification des composés

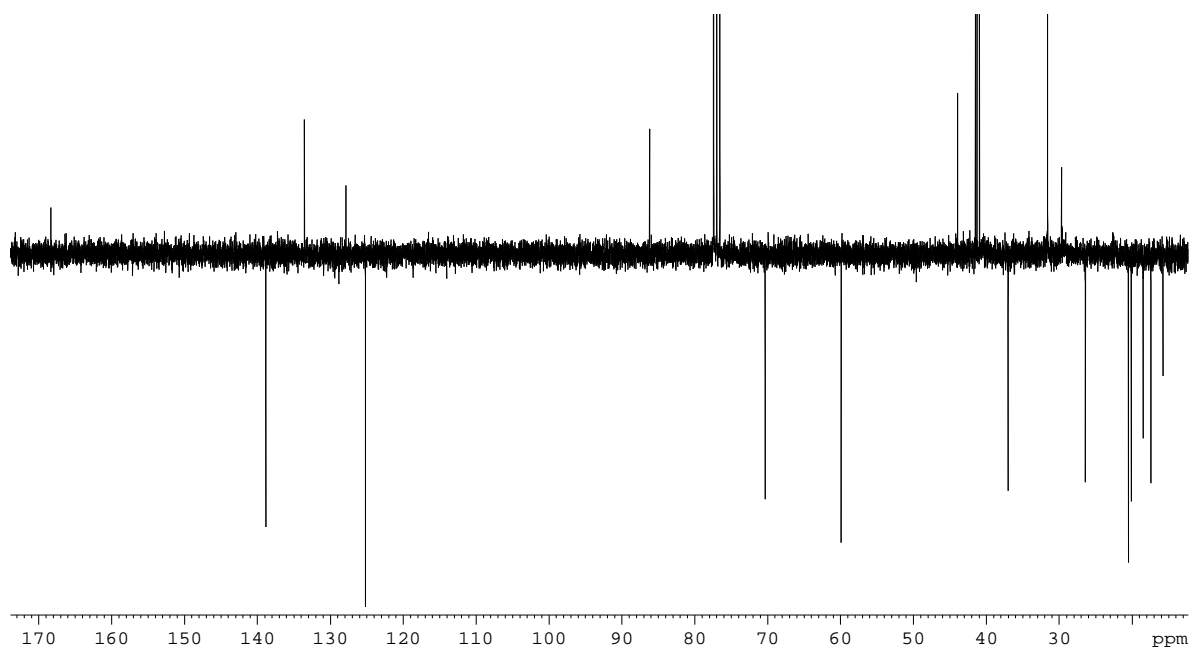
### Les composés E1-E7 :

Les composés E1-E7 ont été isolés sous la forme d'une huile. Ils absorbent en lumière UV à 254 nm. Le composé E3 absorbe également à 365 nm. Tous ces composés réagissent en CCM avec le réactif à l'anisaldéhyde.

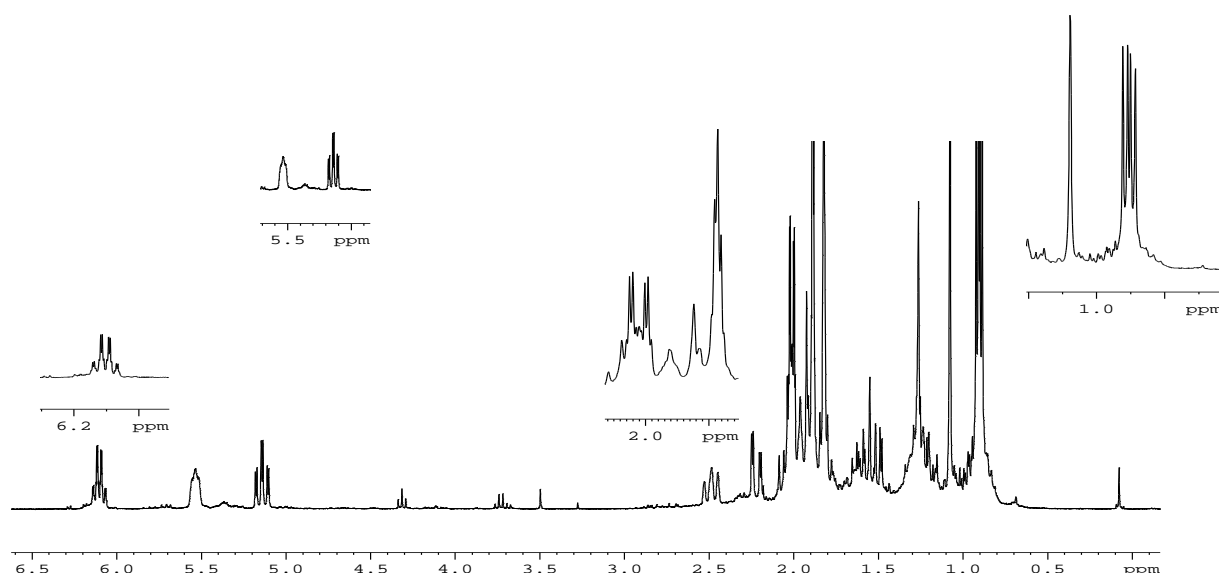
**Composé E1****Composé E1**

Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé E1 (figure 41a) révéla la présence de 20 carbones dont un à 168,3 ppm indiquant l'existence d'une fonction ester.

Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 41b) permet d'identifier rapidement la partie acyle. La présence du proton à 6,11 ppm ( $qq$  7,2 et 1,4 Hz) ppm et des deux méthyles à 2,02 ppm ( $dq$  7,2 et 1,4 Hz) et à 1,89 ( $q$  1,4 Hz) ppm permettent de l'identifier à un groupement **2-méthylbuténoyle**. Les 15 carbones restant pourraient donc correspondre au squelette sesquiterpénique.



**Figure 41a.** Spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé E1 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figure 41b.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  du composé E1 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Les informations fournies par l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (figure 42), permettent de noter les caractéristiques suivantes:

- Le proton oléfinique à 5,57 ppm porté par le carbone tertiaire à 125,3 ppm, le carbone quaternaire à 133,5 ppm ainsi que le méthyle déblindé à 1,82 ppm témoignent de la présence d'une double liaison trisubstituée,
- Un proton d'acylation à 5,29 ppm (*dt* ; 10,2 et 3,1 Hz),
- Un carbone quaternaire oxygéné à 86,4 ppm,
- Un méthyle angulaire sous forme de singulet à 1,11 ppm indique la présence de deux cycles,
- Deux méthyles sous forme de doublets à 0,87 (*d* 6,7 Hz) et 0,97 (*d* 6,7 Hz) correspondent au groupement isopropyle.

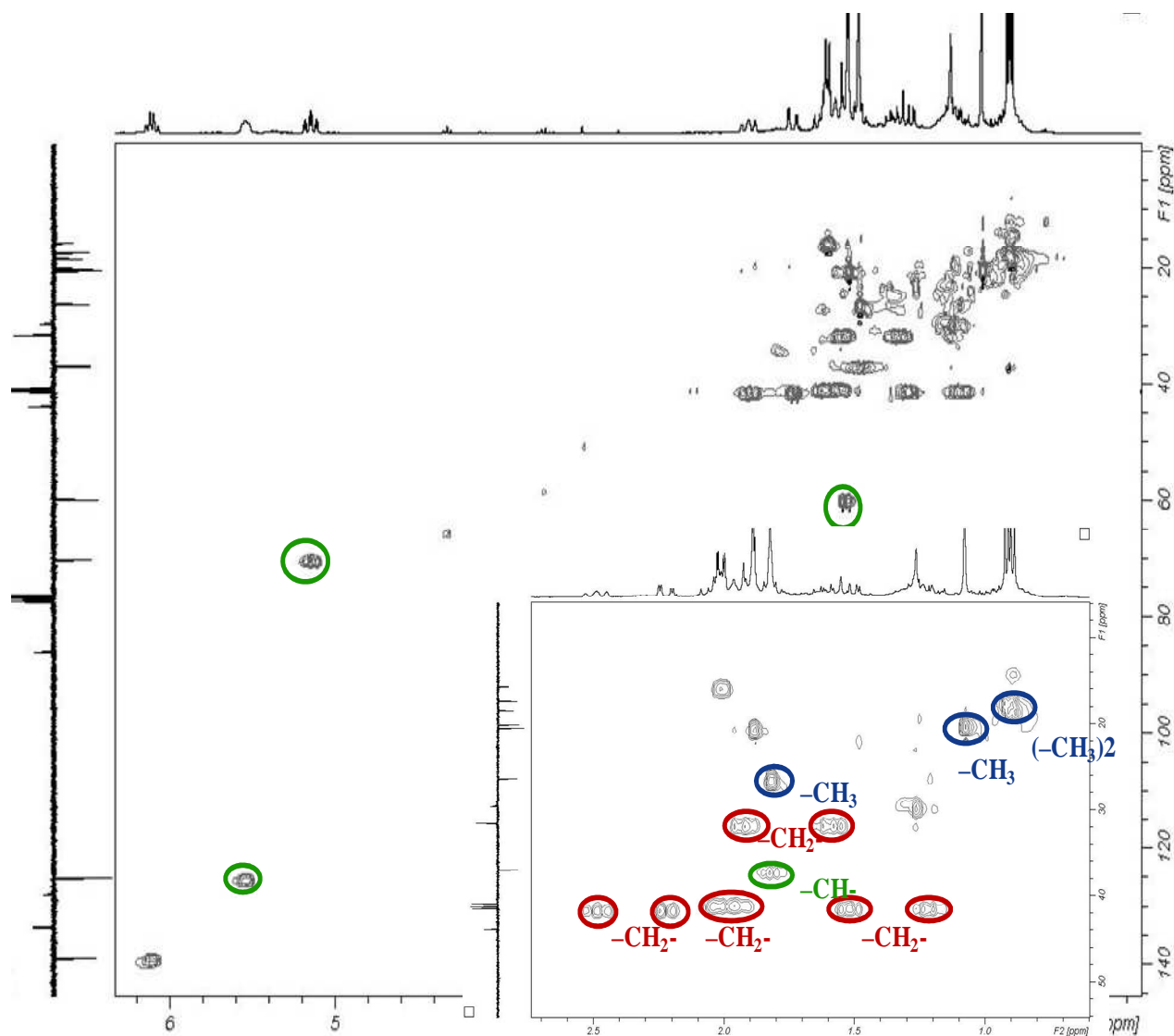


Figure 42. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC du composé E1 (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

La structure exacte du composé E1 est déterminée par les expériences  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (figure 43) et correspond au **6-angélyoljaeschkeanadiol** qui avait déjà été isolé de la même plante [Miski *et al.*, 1983]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 24.

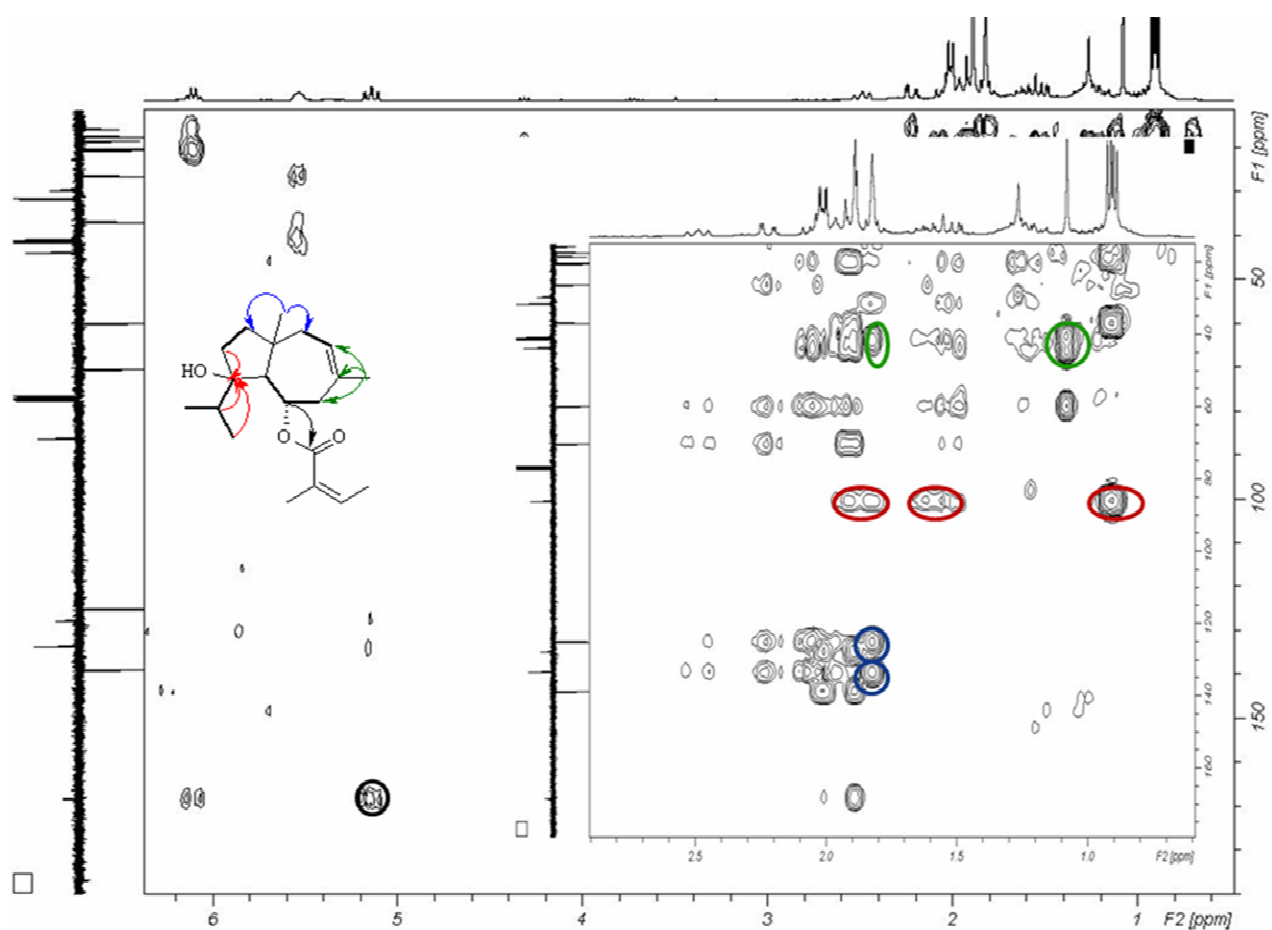
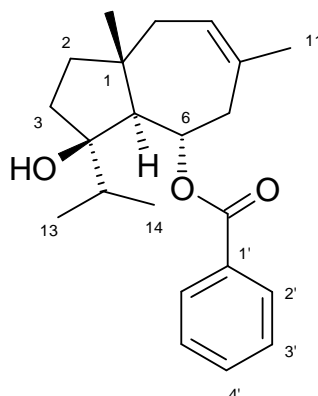


Figure 43. Spectre de RMN du <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC du composé E1 (300/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

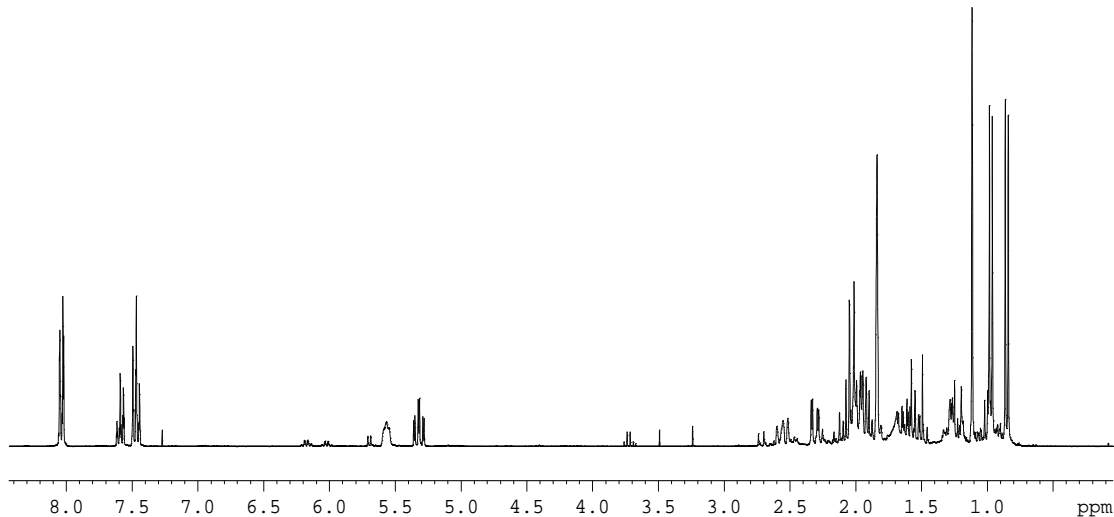


Tableau 24. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de composé **E1** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	44,0
2	1,25 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	41,3
3	1,60 <i>m</i> - 1,95 <i>m</i>	31,8
4	-	86,4
5	2,02 <i>d</i> (10,9)	60,1
6	5,29 <i>dt</i> (10,2; 3,1)	71,2
7	2,29 <i>dd</i> (13,2; 2,7) 2,56 <i>br t</i> (12,3)	41,4
8	-	133,5
9	5,57 <i>br t</i> (12,3)	125,3
10	1,95 <i>m</i> - 2,01 <i>m</i>	41,0
11	1,82 <i>s</i>	26,7
12	1,85 <i>m</i>	37,2
13	0,87 <i>d</i> (6,7)	17,5
14	0,97 <i>d</i> (6,7)	18,5
15	1,11 <i>s</i>	20,2
C=O	-	168,3
1'	-	127,9
2'	6,11 <i>qq</i> (7,2 ; 1,4)	138,9
3'	1,89 <i>q</i> (1,4)	15,8
4'	2,02 <i>dq</i> (7,2 ; 1,4)	20,6

**Composé E2****Composé E2**

Au niveau du spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 44), on retrouve les mêmes caractéristiques majeures que pour le squelette sesquiterpenique du composé **E1** : le proton oléfinique H-9 à 5,57 ppm (*br t* 12,3 Hz), le proton d'acylation H-6 à 5,29 ppm, le méthyle vinylique à 1,82 ppm, le méthyle angulaire à 1,11 ppm et les deux méthyles doublets à 0,97 et 0,87 ppm correspondant au jaeschkeanadiol.



**Figure 44.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé E2 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

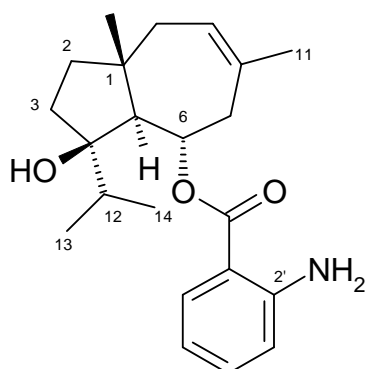
En revanche, les signaux de la partie acyle sont différents. On constate l'existence d'un doublet à 8,04 ppm (2H; 7,5 Hz) et de deux triplets à 7,45 ppm (2H; 7,5 Hz) et à 7,57 ppm (1H; *t* 7,5 Hz) attribuables à un groupement benzoyle.

La structure exacte du composé E2 est déterminée par les expériences  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC et correspond à **6-benzoyljaeschkeanadiol (téféridine)** qui avait déjà été

isolée de la même plante [Miski *et al.*, 1983]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 25.

**Tableau 25.** RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E2** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	44,0
2	1,25 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	41,3
3	1,60 <i>m</i> - 1,95 <i>m</i>	31,8
4	-	86,4
5	2,02 <i>d</i> (10,9)	60,1
6	5,29 <i>dt</i> (10,2; 3,1)	71,2
7	2,29 <i>dd</i> (13,2; 2,7) 2,56 <i>br t</i> (12,3)	41,4
8	-	133,5
9	5,57 <i>br t</i> (12,3)	125,3
10	1,95 <i>m</i> - 2,01 <i>m</i>	41,0
11	1,82 <i>s</i>	26,7
12	1,85 <i>m</i>	37,2
13	0,87 <i>d</i> (6,7)	17,5
14	0,97 <i>d</i> (6,7)	18,5
15	1,11 <i>s</i>	20,2
C=O	-	168,3
1'	-	130,3
2'	8,04 <i>d</i> (7,5)	129,6
3'	7,45 <i>t</i> (7,5)	128,4
4'	7,57 <i>t</i> (7,5)	133,1
5'	7,45 <i>t</i> (7,5)	128,4
6'	8,04 <i>d</i> (7,5)	129,6

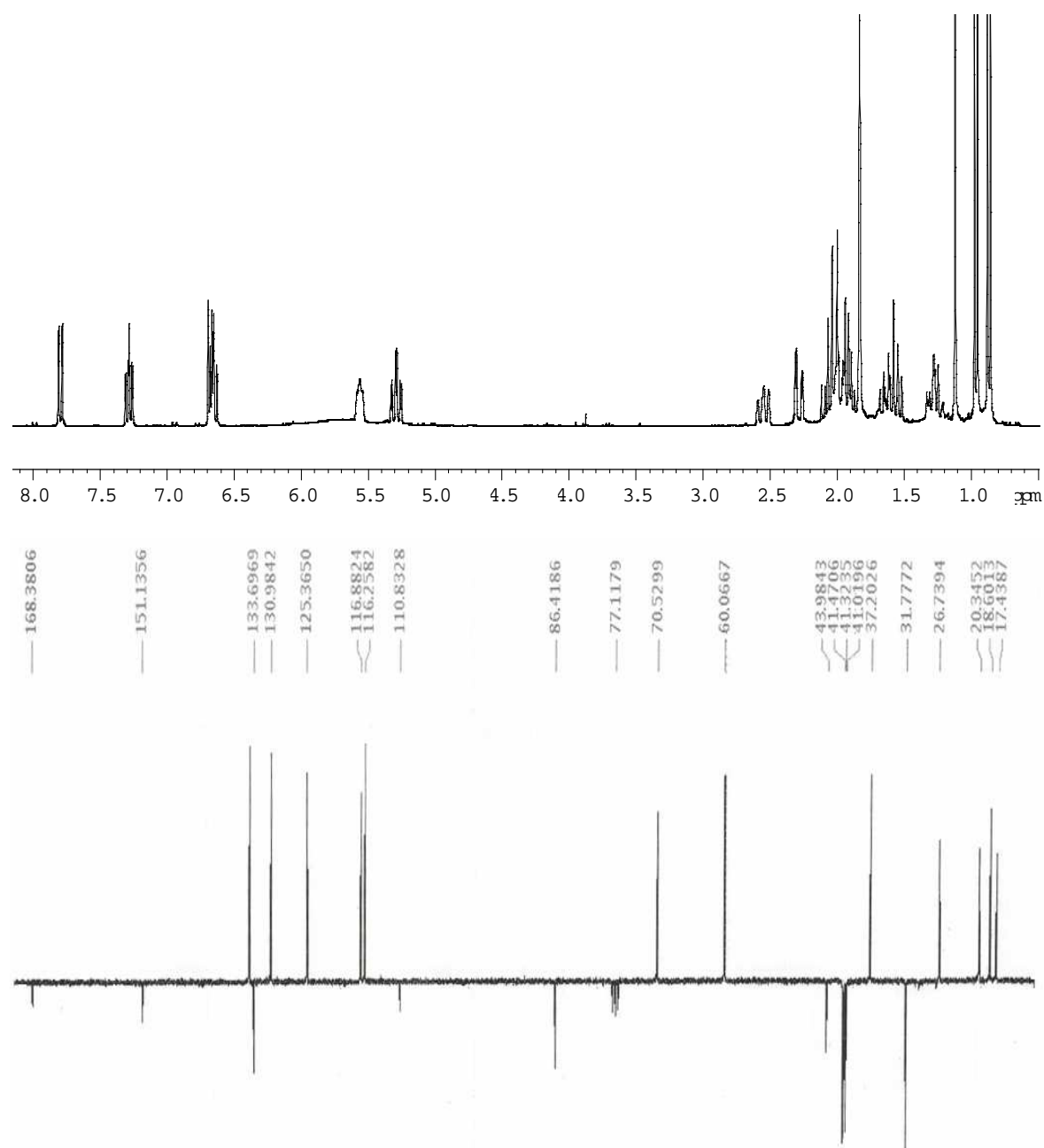
**Composé E3****Composé E3**

Pour ce composé les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (figure 45) montrent une parenté évidente de cette molécule avec les composés **E1** et **E2** tout au moins au niveau du squelette sesquiterpénique.

Dans la zone des aromatiques, on observe néanmoins quatre signaux qui différencient ce composé des précédents : 6,65 ppm (1H ; *ddd* 8,1; 7,1 et 1,0 Hz), 6,68 ppm (1H; *dd* 8,2 et 1,0 Hz), 7,28 ppm (1H; *ddd* 8,5; 7,2 et 1,6 Hz) et 7,80 ppm (1H; *dd* 8,0 et 1,6 Hz). Les déplacements chimiques et les constantes des couplages de ces quatre protons suggèrent l'existence d'un groupement benzoyle substitué en *ortho*.

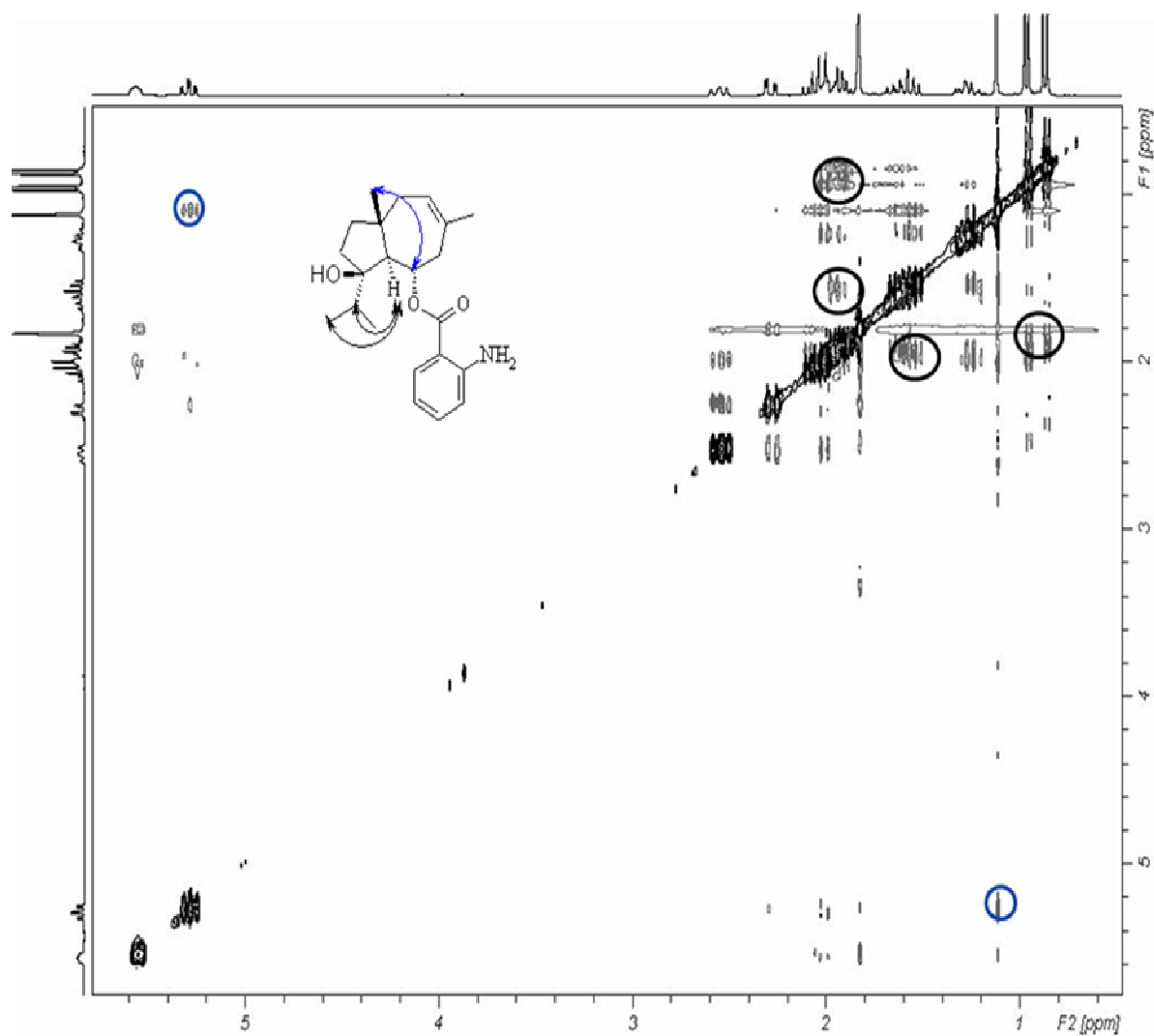
La comparaison avec les données du *o*-hydroxybenzoyl]jaeschkenadiol [Miski *et al.*, 1983] montre qu'il ne s'agit pas d'un *ortho*-hydroxybenzoyle.

L'analyse du composé E3 par electrospray-ionspray en spectrométrie de masse (SM-ESI) montre un ion pseudomoléculaire  $[\text{M}+\text{H}]$  ayant un  $m/z$  de 358, ce qui est compatible avec la formule brute  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}$ . A partir de cette formule, on déduit la structure de la partie acyle comme étant un *ortho*-aminobenzoyle. Cette hypothèse est confirmée par l'hydrolyse du composé E3 et la comparaison en CCM des produits d'hydrolyse avec l'acide anthranilique comme témoin.



**Figure 45.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé E3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

La configuration relative de cette structure est confirmée grâce à l'expérience  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (figure 46).

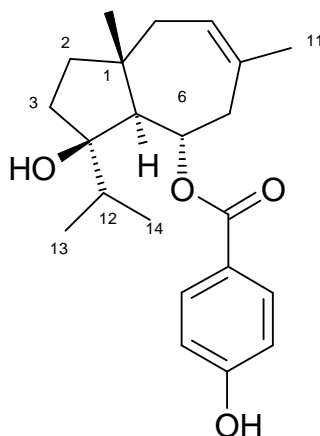


**Figure 46.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY du composé E3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

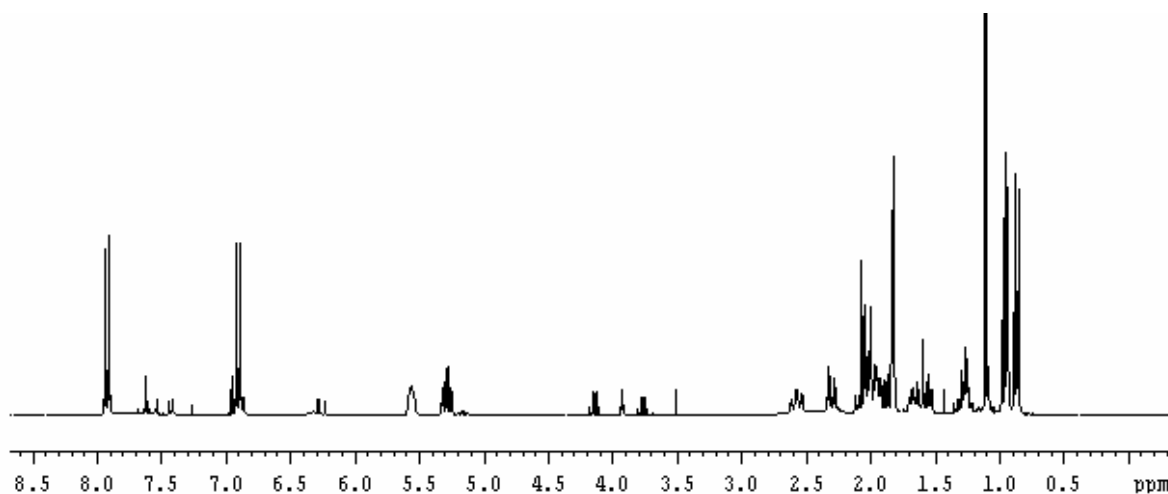
L'ensemble des données permettent d'identifier E3 comme étant l'**anthranilyljaeschkeanadiol** nommé **élaeochytrine A**. A notre connaissance, ce composé n'avait jusqu'à présent pas été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé E3 sont présentées dans le tableau 26.

Tableau 26. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E3** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	44,0
2	1,25 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	41,3
3	1,60 <i>m</i> - 1,95 <i>m</i>	31,8
4	-	86,4
5	2,02 <i>d</i> (10,9)	60,1
6	5,29 <i>dt</i> (10,2 ; 3,1)	71,2
7	2,29 <i>dd</i> (13,2 ; 2,7) 2,56 <i>br t</i> (12,3)	41,4
8	-	133,5
9	5,57 <i>br t</i> (12,3)	125,3
10	1,95 <i>m</i> - 2,01 <i>m</i>	41,0
11	1,82 <i>s</i>	26,7
12	1,85 <i>m</i>	37,2
13	0,87 <i>d</i> (6,7)	17,5
14	0,97 <i>d</i> (6,7)	18,5
15	1,11 <i>s</i>	20,2
C=O	-	168,3
1'	-	110,8
2'	-	151,4
3'	6,68 <i>dd</i> (8,2 ; 1,0)	116,9
4'	7,28 <i>ddd</i> (8,5 ; 7,2 ; 1,6)	133,6
5'	6,65 <i>ddd</i> (8,1 ; 7,1 ; 1,0)	116,9
6'	7,80 <i>dd</i> (8,0 ; 1,6)	131,1

**Composé E4****Composé E4**

Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **E4** (figure 47) présente de grandes similitudes avec celui du composé **E3** sauf pour la partie acyle. Les deux doublets observés dans la zone des protons aromatiques sont très comparables à ceux du groupement *p*-hydroxybenzoyle.

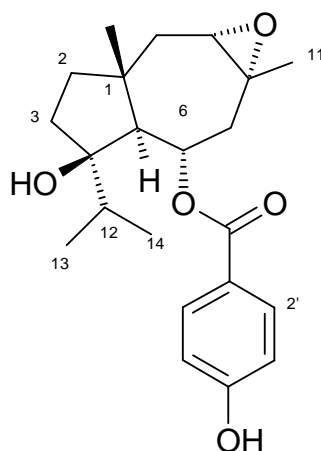
**Figure 47.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé E4 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

La structure exacte du composé est déterminée par les expériences  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC et correspond au **6-*p*-hydroxybenzoyljaeschkeanadiol (férutinine)** qui avait déjà été isolé de la même plante [Miski *et al.*, 1983]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 27.



Tableau 27. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de composé **E4** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

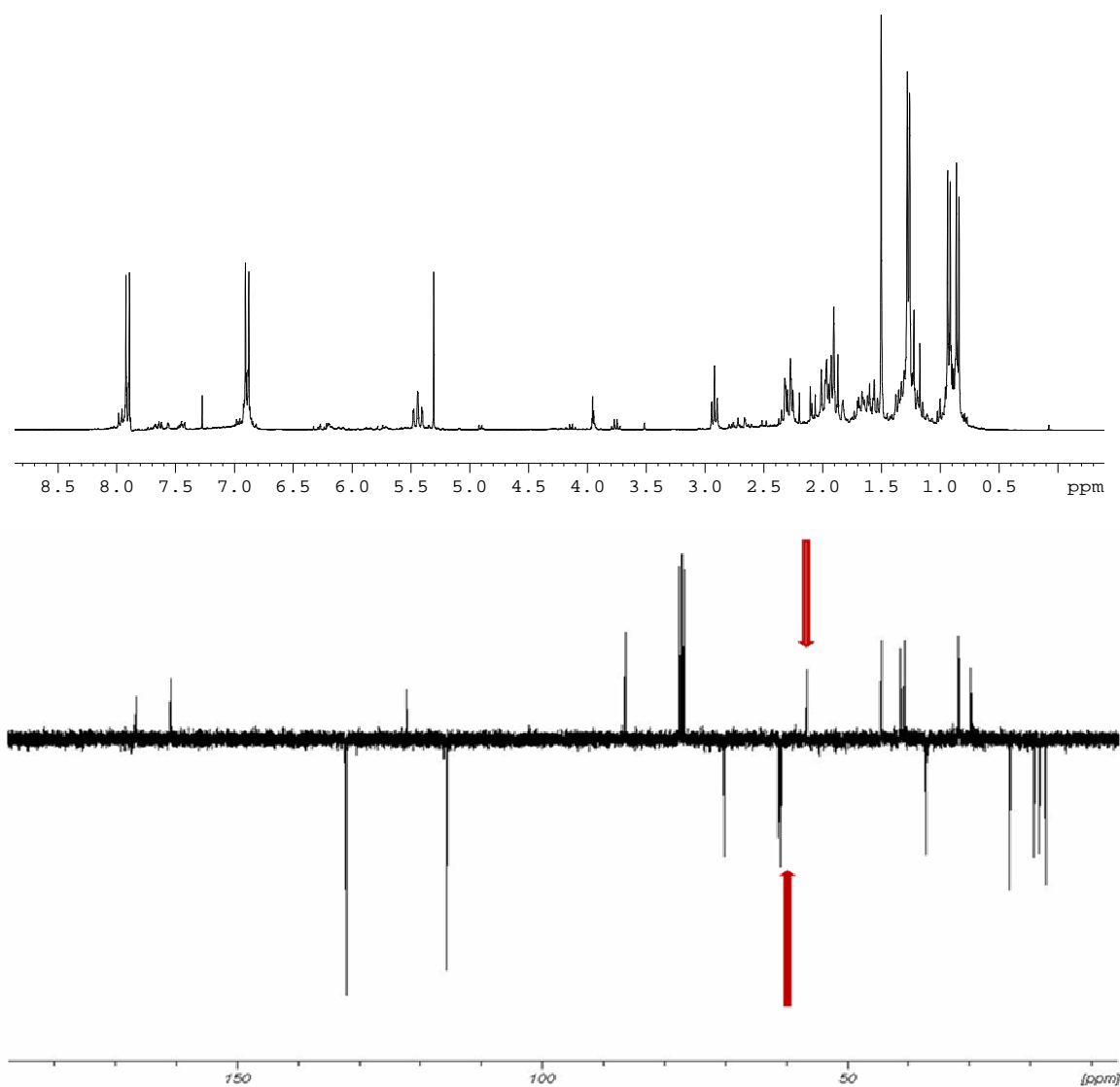
position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	44,0
2	1,25 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	41,3
3	1,60 <i>m</i> - 1,95 <i>m</i>	31,8
4	-	86,4
5	2,02 <i>d</i> (10,9)	60,1
6	5,29 <i>dt</i> (10,2; 3,1)	71,2
7	2,29 <i>dd</i> (13,2; 2,7) 2,56 <i>br t</i> (12,3)	41,4
8	-	133,5
9	5,57 <i>br t</i> (12,3)	125,3
10	1,95 <i>m</i> - 2,01 <i>m</i>	41,0
11	1,82 <i>s</i>	26,7
12	1,85 <i>m</i>	37,2
13	0,87 <i>d</i> (6,7)	17,5
14	0,97 <i>d</i> (6,7)	18,5
15	1,11 <i>s</i>	20,2
C=O	-	168,3
1'	-	122,3
2'	7,88 <i>d</i> (8,6)	132,3
3'	6,84 <i>d</i> (8,6)	115,7
4'	-	160,9
5'	6,84 <i>d</i> (8,6)	115,7
6'	7,88 <i>d</i> (8,6)	132,3

Composé E5**Composé E5**

L'aspect marquant du spectre de RMN du  $^1\text{H}$  de ce composé (figure 48) est sa ressemblance avec celui du composé **E4**. On observe :

- Les deux doublets à 7,90 ppm et à 6,89 ppm correspondant au ***p*-hydroxybenzoyle**.
- Le proton à 5,44 ppm attribuable au proton d'acylation,
- Le méthyle  $\text{CH}_3$ -15 à 1,28 ppm,
- Le groupement isopropyle à 0,92 ppm (3H;  $d$  6,7 Hz), 0,83 ppm (3H;  $d$  6,7Hz) et à 1,94 ppm (1H;  $m$ ).

En revanche, on constate l'absence du proton oléfinique et le blindage du méthyle  $\text{CH}_3$ -11 à 1,50 ppm.



**Figure 48.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé E5 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Au niveau du spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ -*J*-modulé (figure 48), on observe l'absence des signaux correspondant à la double liaison, et l'apparition de deux carbones oxygénés à 61,3 ppm et 56,6 ppm.

Le spectre de masse (SM-ESI) de ce composé indique un ion moléculaire ayant un  $m/z$  de 374, ce qui est compatible avec la formule brute  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5$ .

L'ensemble de ces données indiquent la présence d'un groupement époxy en position C-8, C-9.

La configuration de l'époxy a été confirmée par l'expérience  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (figure 49).

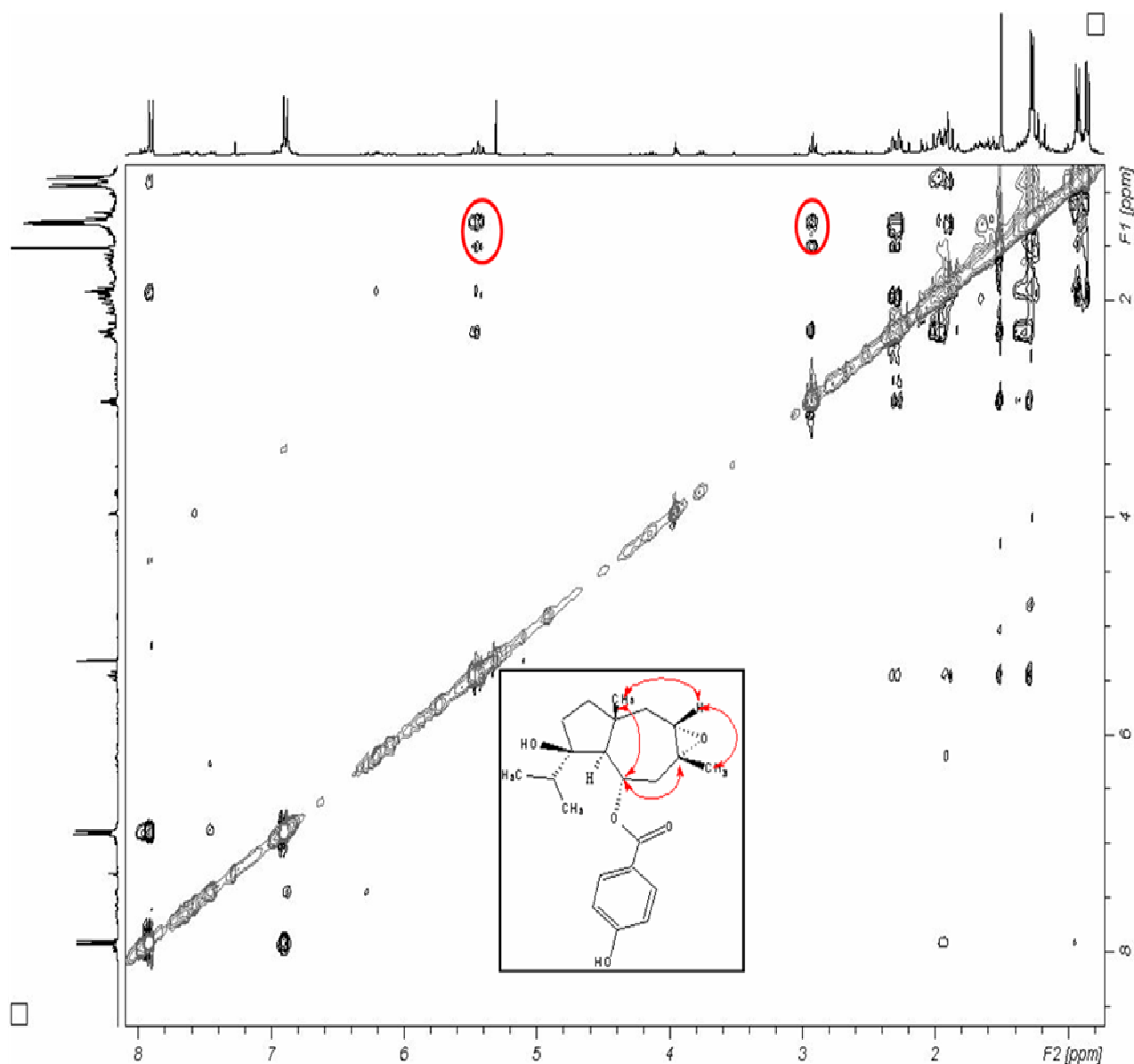
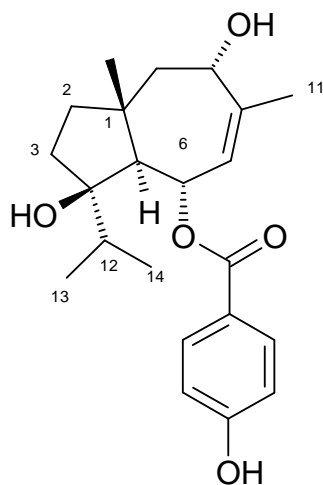


Figure 49. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY du composé E5 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

La structure exacte du composé est déterminée par les expériences  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY et  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC et correspond au **6-*p*-hydroxybenzoylépoxyjaeschkeanadiol (jaeskénine)** qui avait déjà été isolé de *F. kuhistanica* [Chen *et al.*, 2000]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 28.

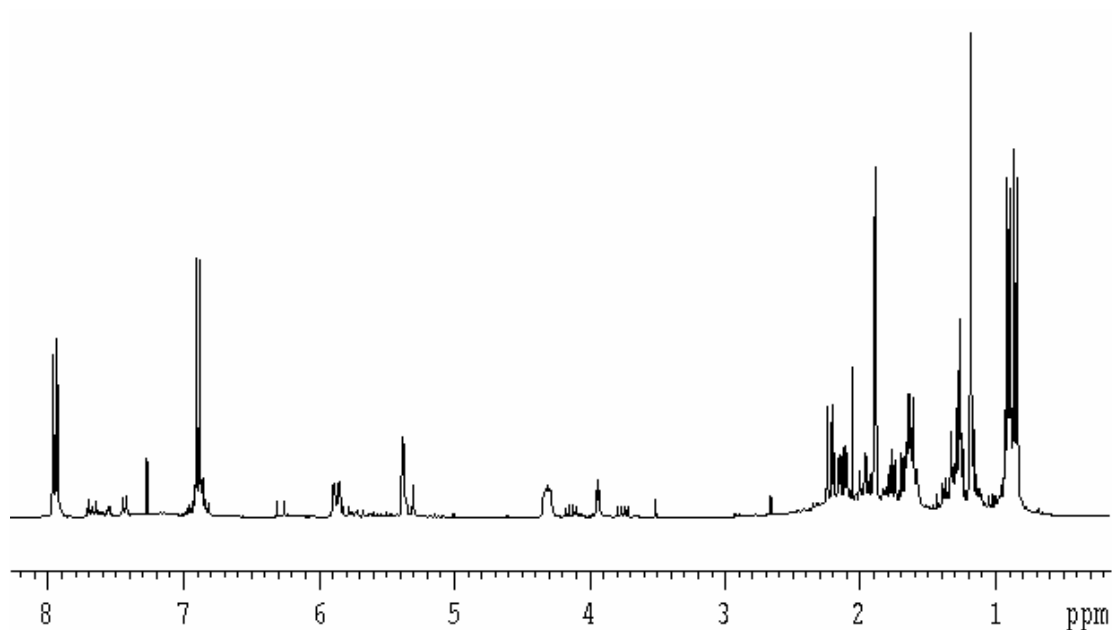
Tableau 28. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E5** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	44,4
<b>2</b>	1,20 <i>m</i> - 1,53 <i>m</i>	40,5
<b>3</b>	1,64 <i>m</i> - 1,97 <i>m</i>	31,6
<b>4</b>	-	86,8
<b>5</b>	1,87 <i>m</i>	60,9
<b>6</b>	5,44 <i>dd</i> (10,2; 3,1)	70,1
<b>7</b>	2,28 <i>m</i> - 1,96 <i>m</i>	44,3
<b>8</b>	-	56,6
<b>9</b>	2,93 <i>m</i>	61,3
<b>10</b>	1,29 <i>m</i> - 2,25 <i>m</i>	41,2
<b>11</b>	1,50 <i>s</i>	23,3
<b>12</b>	1,94 <i>m</i>	37,0
<b>13</b>	0,92 <i>d</i> (6,7)	18,3
<b>14</b>	0,83 <i>d</i> (6,7)	17,3
<b>15</b>	1,28 <i>s</i>	19,4
<b>C=O</b>	-	166,6
<b>1'</b>	-	121,9
<b>2'</b>	7,90 <i>d</i> (8,6)	132,2
<b>3'</b>	6,89 <i>d</i> (8,6)	115,6
<b>4'</b>	-	161,3
<b>5'</b>	6,89 <i>d</i> (8,6)	115,6
<b>6'</b>	7,90 <i>d</i> (8,6)	132,2

Composé E6**Composé E6**

L'observation du spectre RMN du  $^1\text{H}$  du composé **E6** (figure 50) révèle une grande parenté avec le composé **E5**. On note la présence de :

- Deux doublets à 7,95 ppm et à 6,90 ppm correspondants au *p*-hydroxybenzoyle,
- Un proton à 5,85 ppm attribuable au proton d'acylation,
- Un méthyle  $\text{CH}_3$ -11 à 1,88 ppm,
- Un méthyle  $\text{CH}_3$ -15 à 1,18 ppm.
- Les protons du groupement isopropyle à 0,93 (3H; *d* 6,7 Hz), 0,83 (3H; *d* 6,7 Hz) et à 1,94 ppm (1H ; *m*).



**Figure 50.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé E6 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Toutefois, ce spectre présente des signaux différents entre 4 et 6 ppm. En effet, on constate l'existence de trois protons à 5,85 ppm (*d* 11,0 Hz), 5,40 ppm (*br s*) et 4,31 (*m*) ppm.

Les corrélations observées en HSQC montrent que le proton à 4,31 ppm est porté par un carbon oxygéné observé en RMN du  $^{13}\text{C}$  à 69,7 ppm, le signal à 5,85 ppm est le proton d'acylation (porté par le carbone à 72,8 ppm), alors que le signal à 5,40 ppm est le proton oléfinique (porté par le carbon oléfinique à 126,3 ppm).

Les corrélations observées en COSY (figure 51) et en HMBC (figure 52) révèlent la position de double liaison en C7-C8 et la présence d'un hydroxyle en C-9.

La structure exacte du composé E6 ainsi déterminée correspond à **6-*p*-hydroxybenzoyllancérotriol**, qui avait déjà été isolée du *F. lancerottensis* [Fraga *et al.*, 1989]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 29.

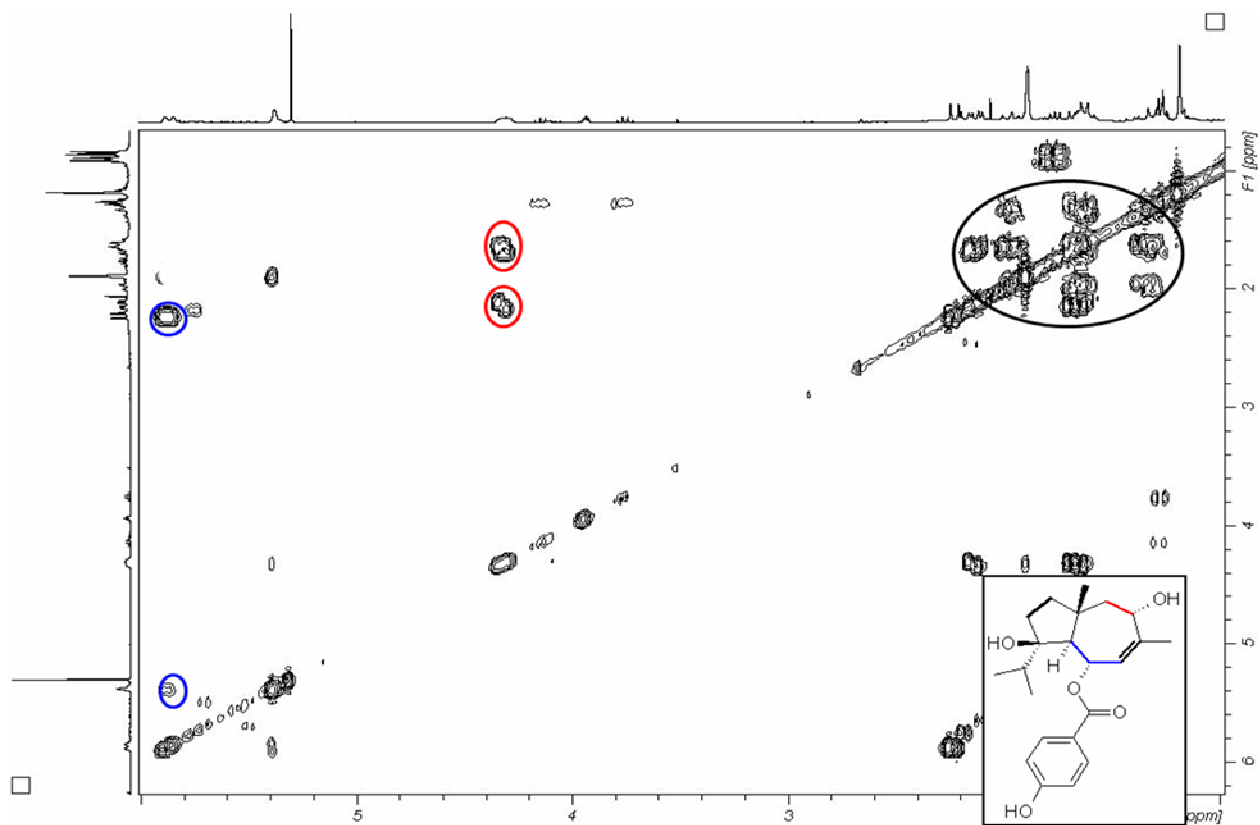


Figure 51. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY du composé E6 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

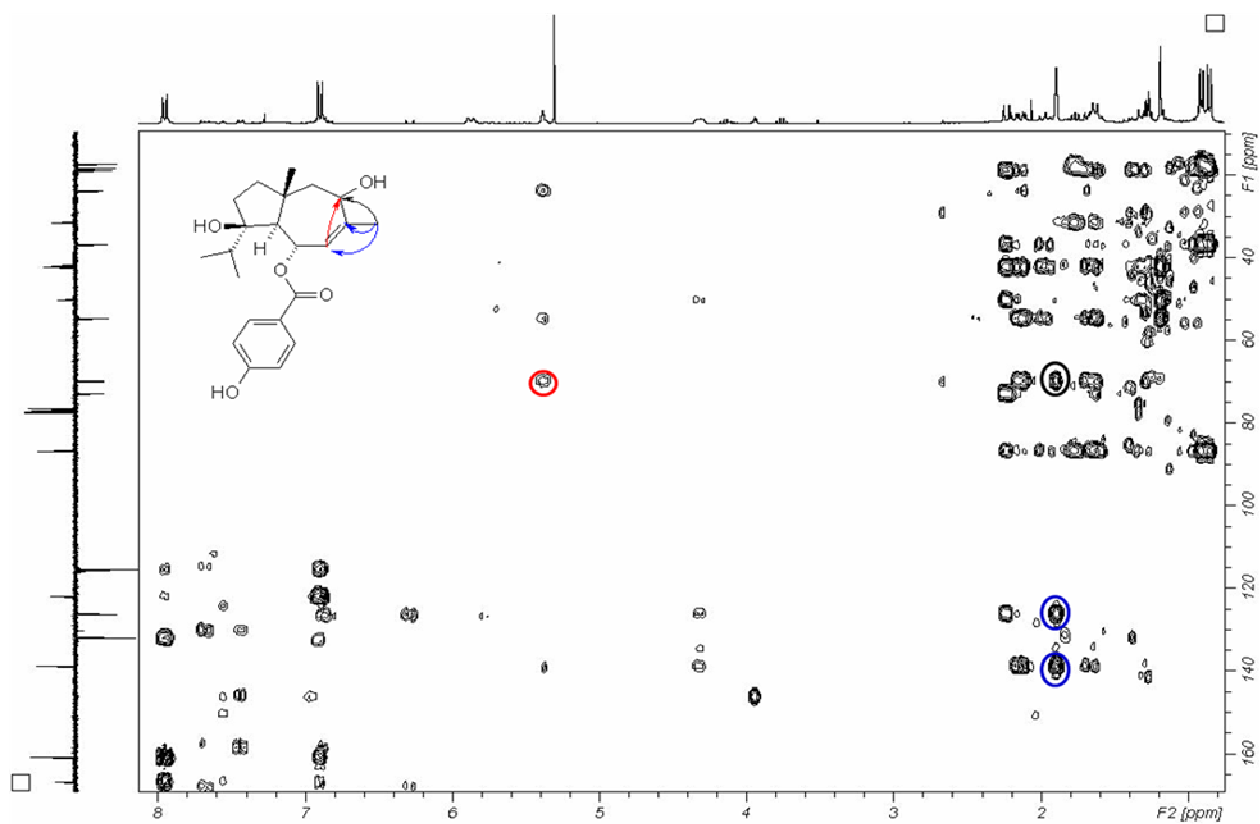
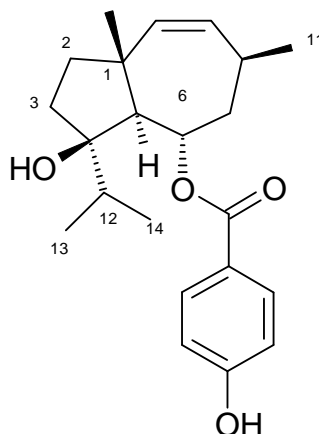


Figure 52. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC du composé E6 (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



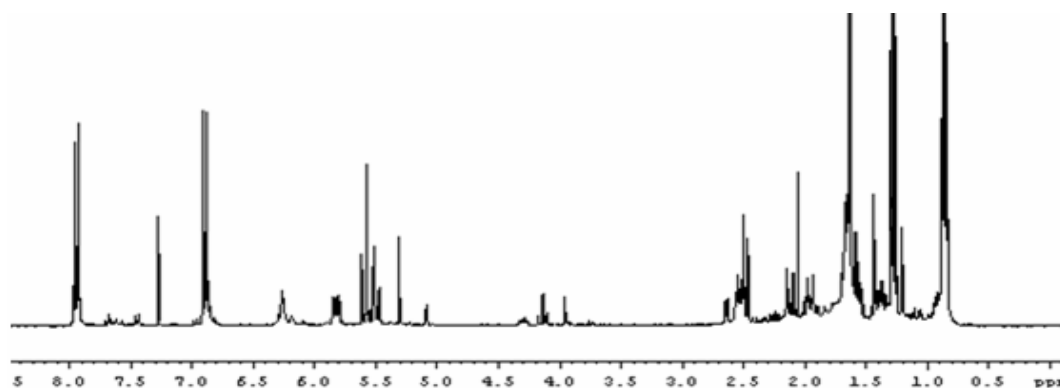
Tableau 29. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E6** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	42,5
2	1,25 <i>m</i> - 1,65 <i>m</i>	42,2
3	1,60 <i>m</i> - 1,95 <i>m</i>	31,69
4	-	86,8
5	2,05 <i>m</i>	54,6
6	5,85 <i>d</i> (10,0)	72,8
7	5,40 <i>s</i>	126,3
8	-	138,9
9	4,31 <i>m</i>	69,7
10	-	50,4
11	1,88 <i>s</i>	24,0
12	1,94 <i>m</i>	37,0
13	0,93 <i>d</i> (6,7)	18,3
14	0,83 <i>d</i> (6,7)	17,5
15	1,18 <i>s</i>	19,0
C=O	-	166,9
1'	-	122,0
2'	7,95 <i>d</i> (8,6)	132,1
3'	6,90 <i>d</i> (8,6)	115,6
4'	-	161,0
5	6,90 <i>d</i> (8,6)	115,6
6'	7,95 <i>d</i> (8,6)	132,1

**Composé E7****Composé E7**

Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 53) du composé **E7** rappelle sans ambiguïté celui de **E4**. On remarque rapidement la présence du groupement *p*-hydroxybenzoyle dont les protons sont observés à 7,89 ppm (2H; *d* 8,6 Hz) et à 6,85 ppm (2H; *d* 8,6 Hz), le proton d'acylation à 5,78 ppm (*dd* 10,2 et 4,1 Hz), ainsi que les deux méthyles de l'isopropyle à 0,83 ppm (*d* 6,4 Hz) et à 0,82 ppm (*d* 6,4 Hz).

En revanche, on observe que le méthyle  $\text{CH}_3$ -11 se présente sous forme d'un doublet de doublet à 1,24 ppm (*dd* 3,7 et 2,0 Hz) ce qui suggère l'absence de double liaison entre C-8 et C-9. On constate aussi la présence de deux protons à 5,46 ppm (*dd* 11,7 et 1,7 Hz) et à 5,56 ppm (*t* 11,7 Hz) indiquant une double liaison entre C-2 et C-3 ou C-9 et C-10.



**Figure 53.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé E7 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Les corrélations observées en  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (figure 54) entre les  $\text{CH}_3$ -15,  $\text{CH}_3$ -11 et les carbones oléfiniques à 134,5 ppm et à 138,2 ppm permettent de déduire la position de la double liaison entre C-9 et C-10.

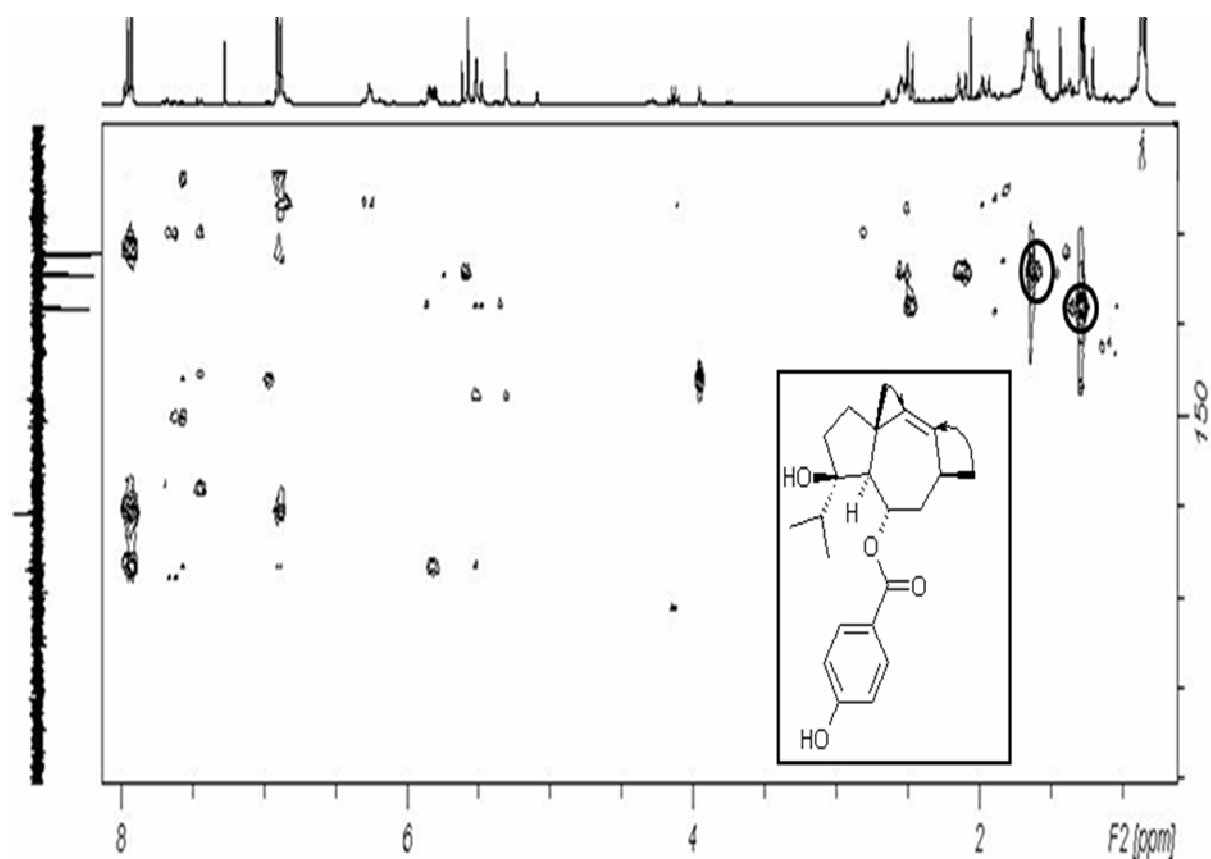


Figure 54. Spectre de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC du composé E7 (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

La configuration de  $\text{CH}_3$ -11 en  $\beta$  est confirmée grâce à l'expérience  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (figure 55).

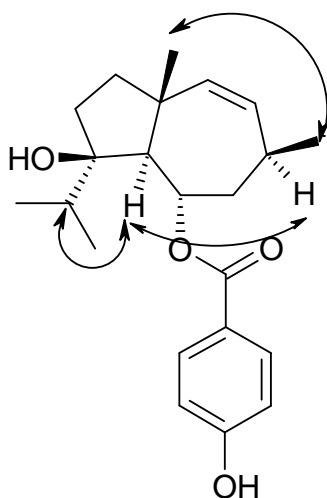


Figure 55. Corrélations ROESY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) choisies du composé E7.

L'ensemble de ces données permet d'identifier ce composé comme étant le **4 $\beta$ -hydroxy-6 $\alpha$ -(*p*-hydroxybenzoyloxy)dauc-9-ène** que nous avons nommé **élaeochytrine B**. A

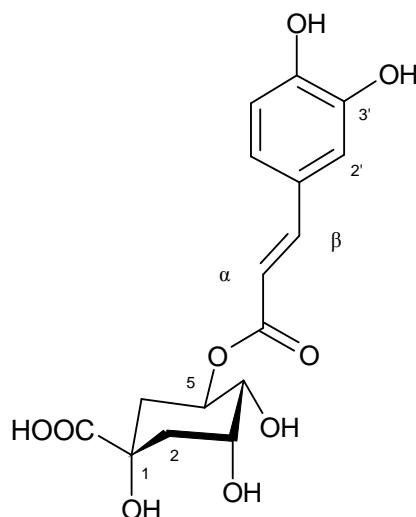
notre connaissance, ce composé n'a jusqu'à présent jamais été décrit dans le règne végétal. Les attributions de tous les signaux des spectres du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé **E7** sont présentées dans le tableau 30.

**Tableau 30.** RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E7** (300/75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	45,8
<b>2</b>	1,35 <i>m</i> - 1,60 <i>m</i>	41,5
<b>3</b>	1,55 <i>m</i> - 1,92 <i>m</i>	30,9
<b>4</b>	-	85,5
<b>5</b>	2,45 <i>d</i> (10,5)	52,3
<b>6</b>	5,78 <i>dd</i> (10,2 ; 4,1)	70,5
<b>7</b>	2,08 <i>m</i> - 2,50 <i>m</i>	46,1
<b>8</b>	2,08 <i>d</i> (11,3)	21,2
<b>9</b>	5,56 <i>t</i> (11,7)	138,2
<b>10</b>	5,46 <i>dd</i> (11,7; 1,7)	134,5
<b>11</b>	1,24 <i>dd</i> (3,7; 2,0)	21,3
<b>12</b>	1,56 <i>sept</i> (6,5)	36,5
<b>13</b>	0,83 <i>d</i> (6,4)	17,4
<b>14</b>	0,82 <i>d</i> (6,4)	18,4
<b>15</b>	1,60 <i>s</i>	28,9
<b>C=O</b>	-	167,0
<b>1'</b>	-	122,4
<b>2'</b>	7,89 <i>d</i> (8,6)	132,0
<b>3'</b>	6,85 <i>d</i> (8,6)	115,5
<b>4'</b>	-	160,8
<b>5</b>	6,85 <i>d</i> (8,6)	115,5
<b>6'</b>	7,89 <i>d</i> (8,6)	132,0

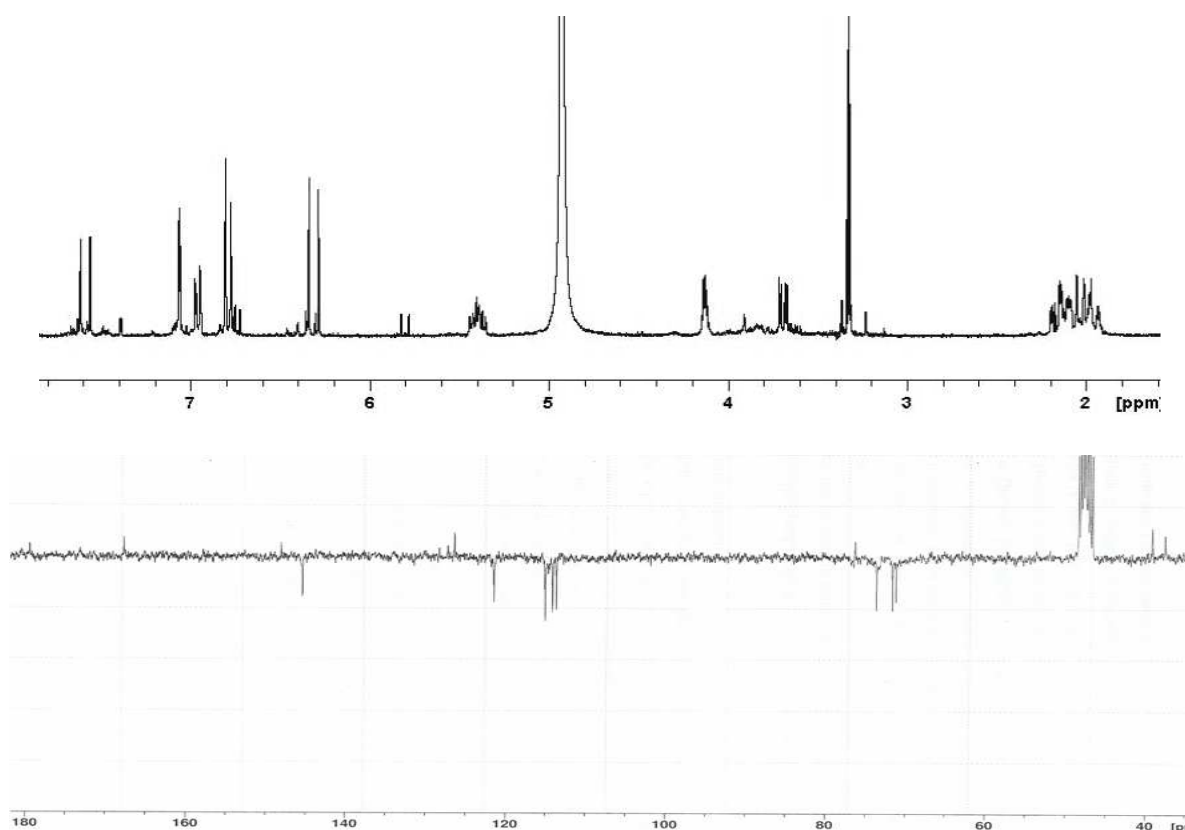
**Les composés E8 et E9 :**

Les composés E8 et E9 ont été isolés sous la forme d'une poudre jaune. Ils absorbent en lumière UV à 254 nm et à 365 nm. Ces composés réagissent en CCM avec le réactif de Neu (diphénylborate d'éthanolamine).

**Composé E8****Composé E8**

Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 56) présente un aspect différent de celui des spectres précédents.

On constate deux doublets à 7,59 ppm (1H;  $d$  16,0 Hz) et à 6,31 ppm (1H;  $d$  16,0 Hz) correspondant à une double liaison en configuration *trans*, ainsi que trois protons aromatiques à 7,07 ppm (1H ;  $d$  2,0 Hz), 6,96 ppm (1H ;  $dd$  9,0 et 2,0 Hz) et à 6,79 ppm (1H ;  $d$  9,0 Hz). L'ensemble de ces signaux sont caractéristiques d'un groupement **(E)-caféoyl(3,4-dihydroxycinnamoyle)**.



**Figure 56.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé E8 (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

On observe également trois protons adjacents aux fonctions alcooliques à 5,39 ppm, 4,13 ppm et à 3,68 ppm ainsi que quatre protons superposés entre 2,20 et 2,01 ppm.

A partir du spectre  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY on déduit l'enchaînement de ces protons :

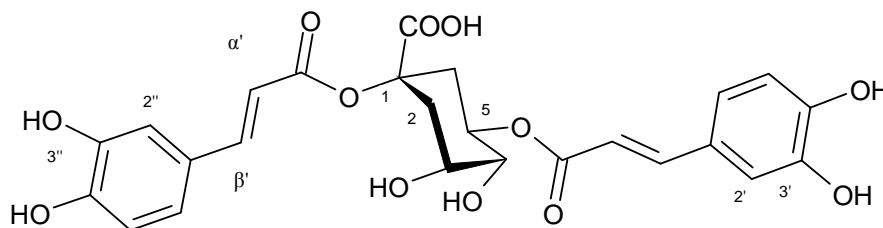


Le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$ - $J$ -modulé permet d'identifier 16 carbones dont 9 appartiennent au reste (*E*)-cafféoyle. Parmi les 7 carbones restants on observe un carbone carboxylique à 178,1 ppm et un carbone quaternaire à 77,8 ppm.

La comparaison avec les données de la littérature permet d'identifier le composé **E8** comme étant l'**acide 5-cafféoylquinique (acide chlorogénique)** [Pauli *et al.*, 1998]. Ce composé avait déjà été isolé du fenu grec : *Foeniculum vulgare* (Apiacées) [Parejo *et al.*, 2004b]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 31.

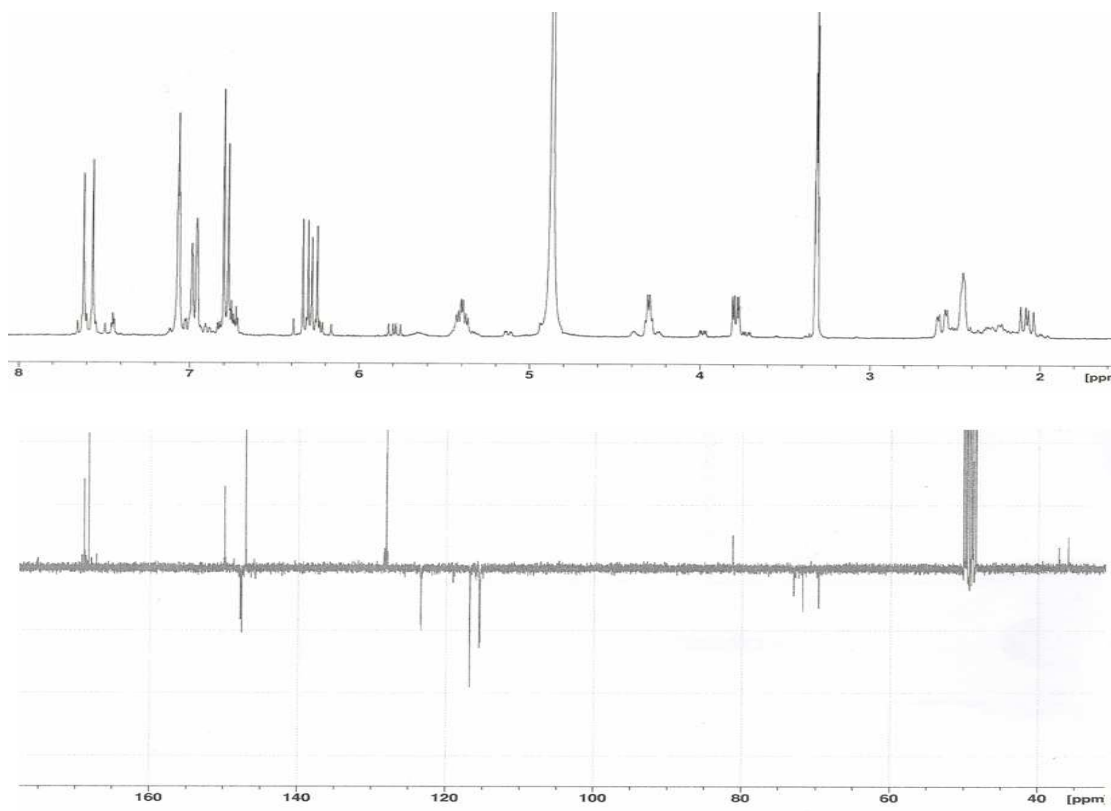
Tableau 31. RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E8** (300/75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	77,8
<b>2ax</b>	2,18 <i>dd</i> (14,0; 3,0)	39,1
<b>2eq</b>	2,01 <i>ddd</i> (14,0; 5,0; 2,5)	
<b>3</b>	4,13 <i>dt</i> (5,0; 3,0)	73,1
<b>4</b>	3,68 <i>dd</i> (9,0; 3,0)	75,1
<b>5</b>	5,39 <i>dd</i> (10,0; 9,0; 4,2)	72,6
<b>6ax</b>	2,08 <i>dd</i> (14,0; 10,0)	40,6
<b>6eq</b>	2,20 <i>ddd</i> (14,0; 4,2; 2,5)	
<b>COOH</b>	-	178,1
<b><math>\alpha</math></b>	6,31 <i>d</i> (16,0)	115,6
<b><math>\beta</math></b>	7,59 <i>d</i> (16,0)	146,8
<b>1'</b>	-	127,8
<b>2'</b>	7,07 <i>d</i> (2,0)	115,0
<b>3'</b>	-	146,8
<b>4'</b>	-	149,4
<b>5'</b>	6,79 <i>d</i> (9,0)	115,5
<b>6'</b>	6,96 <i>dd</i> (9,0; 2,0)	122,9
<b>C=O</b>	-	169,2

**Composé E9****Composé E9**

Au niveau du spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du composé **E9** (figure 57), on retrouve les mêmes caractéristiques majeures que pour le composé **E8**.

En revanche, on observe la présence de deux groupements (*E*)-cafféoyle : trois doublets à 7,59 ppm (2H; 16,0 Hz), 6,31 ppm (1H; 16,0 Hz) et à 6,31 ppm (1H; 16,0 Hz), correspondant aux deux doubles liaisons en configuration *trans* et six protons aromatiques à 7,08 ppm (2H; *d* 2,0), 6,96 ppm (2H; *dd* 9,0 et 2,0 Hz) et à 6,79 ppm (2H; *d* 9,0 Hz).



**Figure 57.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  du composé E9 (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

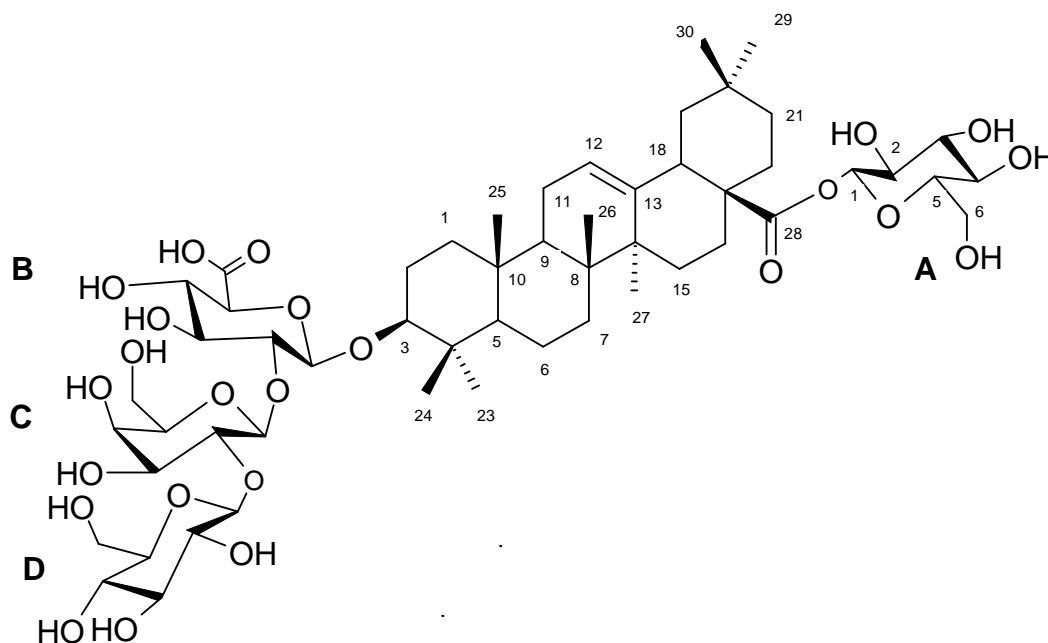
La comparaison avec les données de la littérature permet d'identifier le composé **E9** comme étant l'acide **1,5-dicafféoylquinique** [Maruta *et al.*, 1995]. Ce composé avait déjà été



isolé du fenu grec : *Foeniculum vulgare* (Apiacées) [Parejo *et al.*, 2004a]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 32.

**Tableau 32.** RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **E9** (300/75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

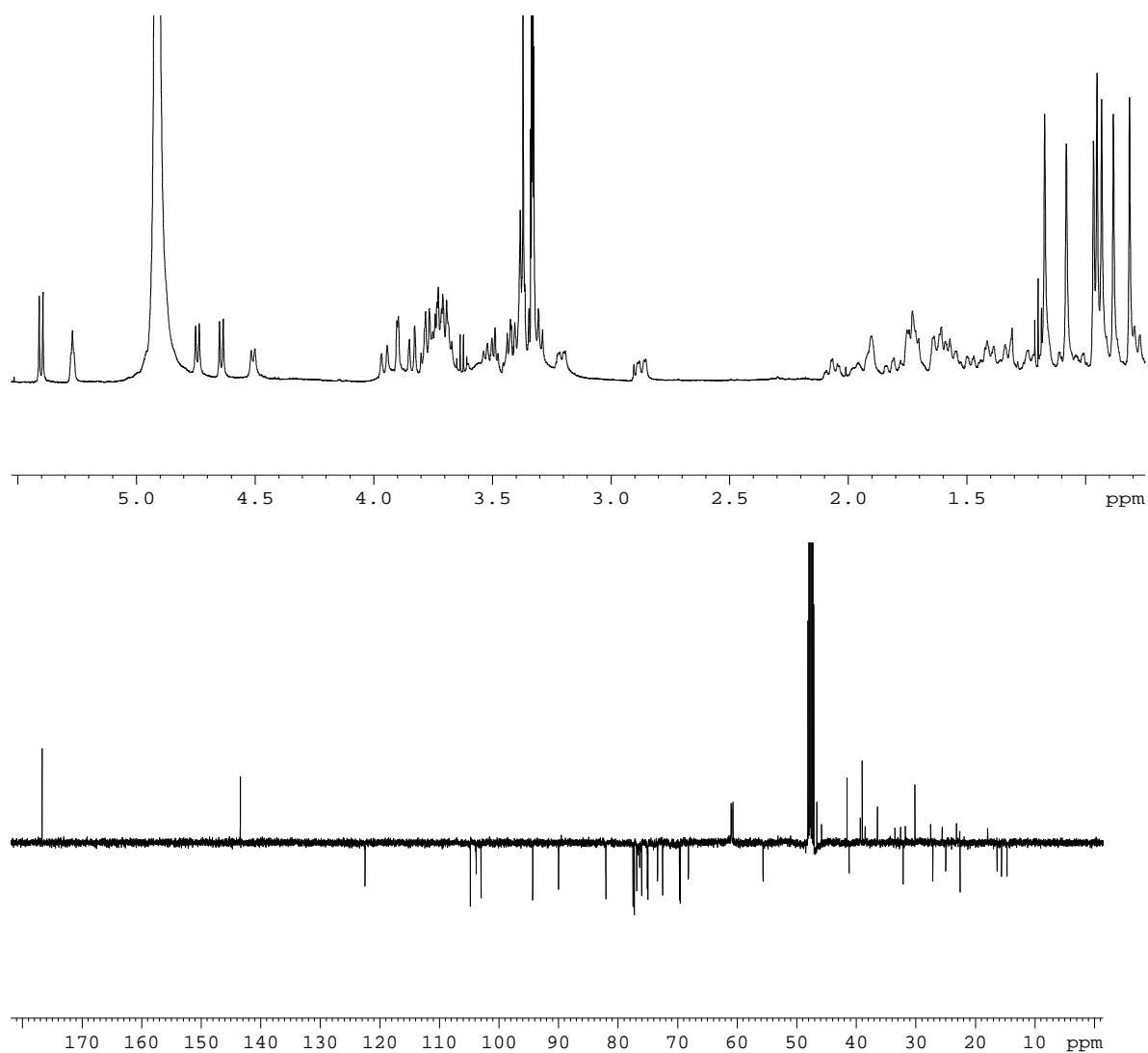
position	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$
<b>1</b>	-	81,0
<b>2ax</b>	2,30 <i>dd</i> (14,0; 3,5)	36,5
<b>2eq</b>	2,11 <i>ddd</i> (14,0; 7,0;1,5)	36,5
<b>3</b>	5,54 <i>dt</i> (7,0; 3,5)	71,7
<b>4</b>	3,91 <i>dd</i> (10,0; 3,5)	72,2
<b>5</b>	5,39 <i>dd</i> (10,0; 7,5; 4,2)	73,6
<b>6ax</b>	2,18 <i>dd</i> (14,0; 7,5)	39,9
<b>6eq</b>	2,25 <i>ddd</i> (14,0; 4,2; 1,5)	39,9
<b>COOH</b>	-	178,1
$\alpha'$	6,42 <i>d</i> (16,0)	115,1
$\beta'$	7,61 <i>d</i> (16,0)	146,4
<b>1'</b>	-	128,1
<b>2'</b>	7,08 <i>d</i> (2,0)	114,2
<b>3'</b>	-	145,5
<b>4'</b>	-	148,3
<b>5'</b>	6,79 <i>d</i> (9,0)	115,6
<b>6'</b>	6,96 <i>dd</i> (9,0; 2,0)	122,1
<b>C=O</b>	-	168,1
$\alpha''$	6,31 <i>d</i> (16,0)	115,1
$\beta''$	7,59 <i>d</i> (16,0)	146,4
<b>1''</b>	-	128,1
<b>2''</b>	7,07 <i>d</i> (2,0)	114,3
<b>3''</b>	-	148,3
<b>4''</b>	-	148,3
<b>5''</b>	6,78 <i>d</i> (9,0)	115,6
<b>6''</b>	6,95 <i>d</i> (9,0; 2,0)	122,1
<b>C=O</b>	-	167,7

**Composé E10****Composé E10**

Le composé E10 a été isolé sous la forme d'une poudre blanche. Il n'absorbe pas en lumière UV. Ce composé réagit en CCM avec le réactif à l'anisaldéhyde.

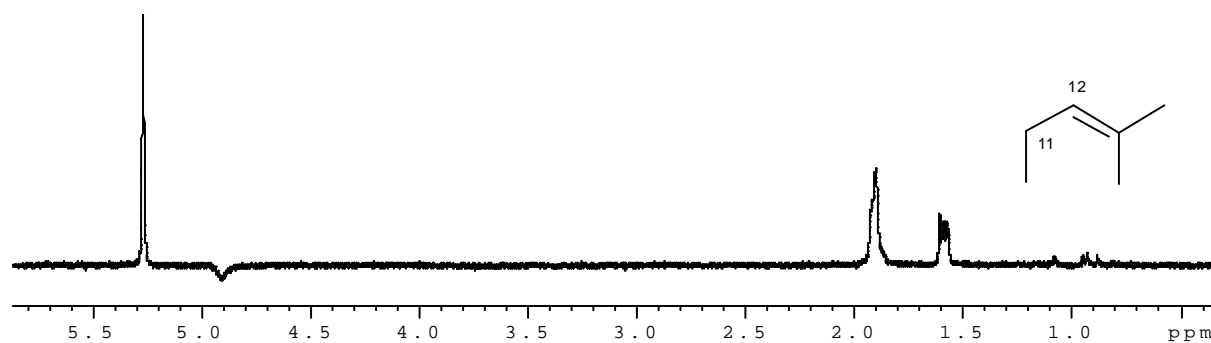
Le spectre de RMN du  $^1\text{H}$  (figure 58) présente un aspect plus complexe que les spectres précédents. On observe en particulier des massifs de protons entre 4,0 et 3,0 ppm.

Les éléments caractéristiques de ce composé sont le proton à 5,24 ppm ( $t$  3,2 Hz) ainsi que les sept groupements méthyles singulets à 1,14, 1,05, 0,94, 0,92, 0,90, 0,79 et à 0,85 ppm. Ces signaux sont typiques des protons de l'acide oléanolique. On observe également quatre doublets à 5,37, 4,71, 4,62, et 4,46 ppm. Ces signaux ainsi que ceux entre 4 et 3 ppm suggèrent la présence de quatre unités d'oses.

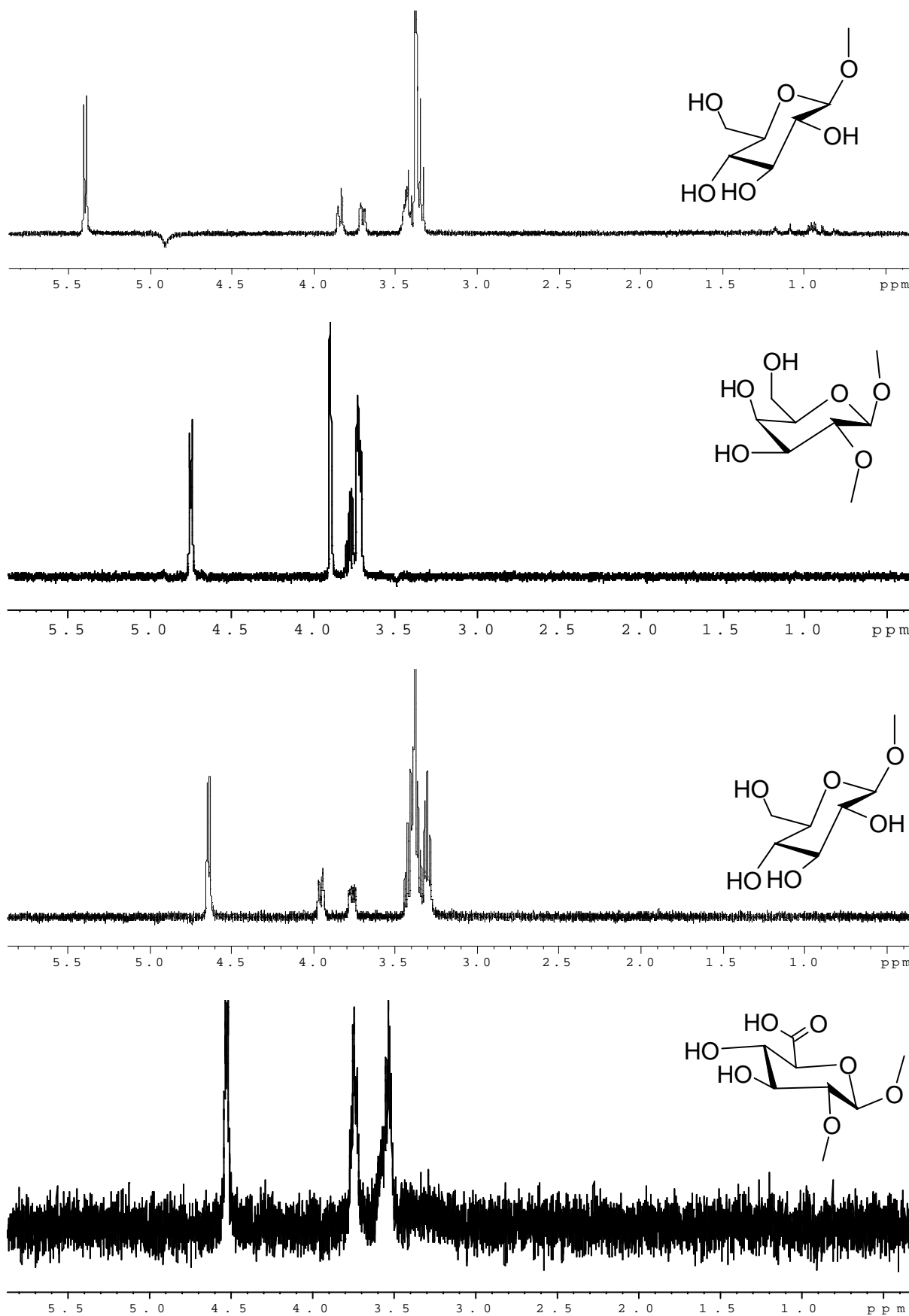


**Figure 58.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé E10 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

L'expérience  $^1\text{H}$  TOCSY spécifique des protons entre 5,5 ppm et 4,4 ppm ainsi les constantes de couplage de ces protons étaient utiles pour déterminer la nature des oses. Il s'agit d'un  $\beta$  acide glucuronopyranose (B), d'un  $\beta$ -galactopyranose (C) et de deux  $\beta$ -glucopyranose (A et D) (figure 59, 60).

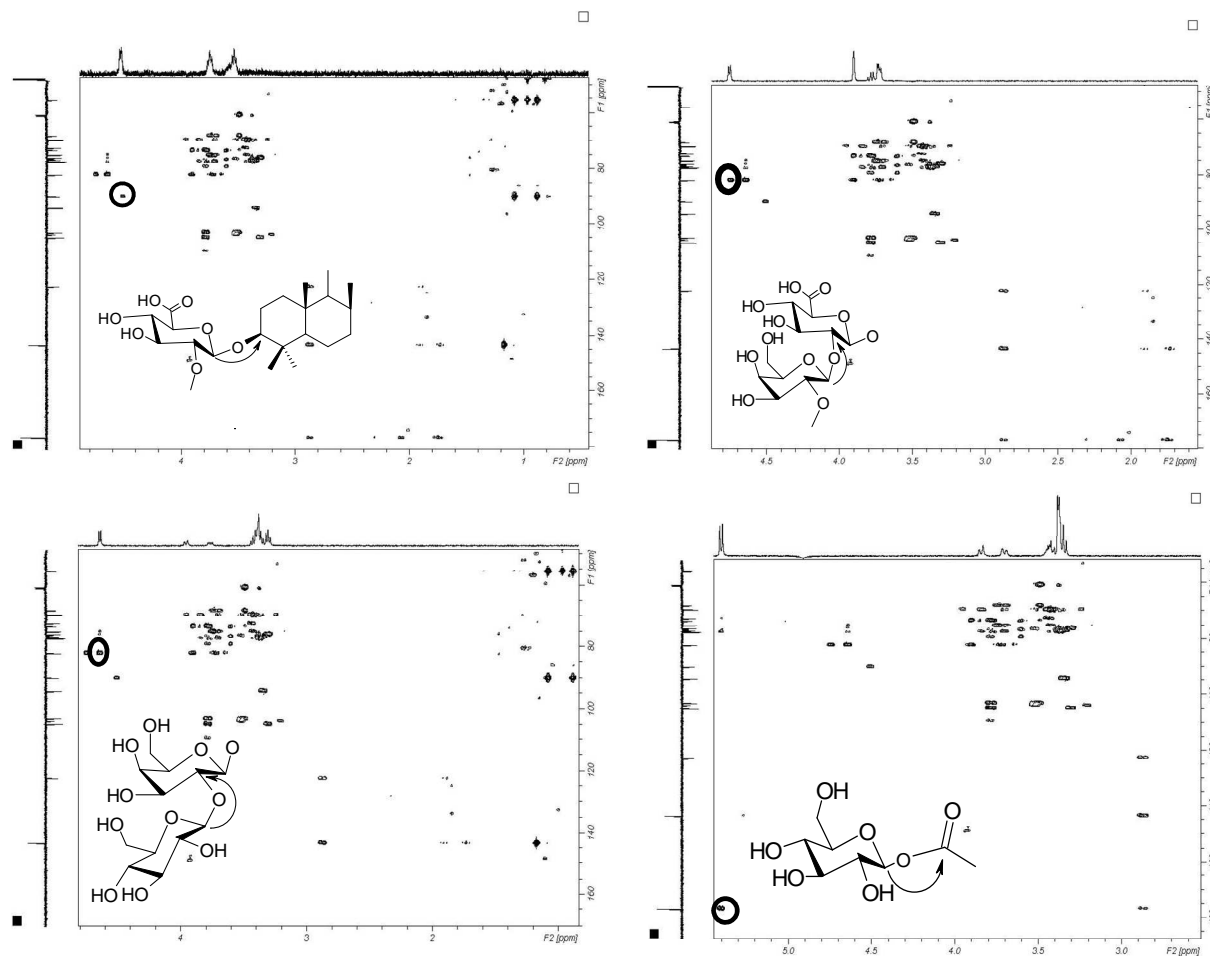


**Figure 59.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$  TOCSY spécifique du proton à 5,24 ppm du composé E10 (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Figure 60.** Spectres de RMN du <sup>1</sup>H TOCSY spécifique des protons à 5,37 ; 4,71 ; 4,62 et 4,46 ppm du composé E10 (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

L'expérience  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC a permis d'établir la position des unités osidiques (figure 61).



**Figure 61.** Spectres de RMN du  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC du composé E10 (500/75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

La structure exacte du composé **E10** ainsi déterminée correspond au **3-O-[ $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -glucuronopyranosyl]acide oléanolique 28-O- $\beta$ -glucopyranoside (sandrosaponine IX) qui avait déjà été isolée du *Bupleurum rigidum* (Apiacées) [Sánchez-Contreras *et al.*, 2000]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont présentés dans le tableau 33.**

Tableau 33. RMN du <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé **E10** (500/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

position	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$	position	$\delta_H$ (J en Hz)	$\delta_C$
1	0,98 <i>m</i> - 1,59 <i>m</i>	39,9	<b>Glucose</b>		
			<b>A</b>		
2	1,69 <i>m</i> - 1,64 <i>m</i>	26,9	1	5,37 <i>d</i> (8,0)	95,7
3	3,18 <i>dd</i> (12,1; 4,1)	91,4	2	3,31 <i>m</i>	73,9
4	-	40,4	3	3,40 <i>m</i>	78,3
5	0,75 <i>m</i>	57,0	4	3,34 <i>m</i>	71,1
6	1,38 <i>m</i> - 15,2 <i>m</i>	19,3	5	3,34 <i>m</i>	78,7
7	1,30 <i>m</i> - 1,47 <i>m</i>	34,0	6	3,68 <i>m</i> - 3,81 <i>br d</i> (11,8)	62,4
8	-	40,7	<b>Glucose</b>		
			<b>D</b>		
9	1,56 <i>m</i>	49,0	1	4,62 <i>d</i> (7,7)	105,2
10	-	37,8	2	3,29 <i>m</i>	83,5
11	1,88 <i>m</i>	24,5	3	3,39 <i>m</i>	77,8
12	5,24 <i>t</i> (3,2)	123,9	4	3,36 <i>m</i>	70,9
13	-	144,8	5	3,38 <i>m</i>	78,8
14	-	42,9	6	3,74 <i>m</i> - 3,92 <i>br d</i> (11,7)	62,2
15	1,78 <i>m</i>	28,9	<b>Galactose</b>		
			<b>C</b>		
16	1,72 <i>m</i> - 2,04 <i>m</i>	24,0	1	4,71 <i>d</i> (6,8)	106,2
17	-	48,0	2	3,76 <i>m</i>	76,0
18	2,84 <i>dd</i> (13,7; 3,8)	42,5	3	3,70 <i>m</i>	77,9
19	1,14 <i>m</i> - 1,70 <i>m</i>	47,2	4	3,88 <i>m</i>	71,2
20	-	31,5	5	3,46 <i>m</i>	79,0
21	1,20 <i>m</i> - 1,39 <i>m</i>	34,9	6	3,66 <i>m</i> - 3,71 <i>m</i>	62,5
22	1,60 <i>m</i> - 1,70 <i>m</i>	33,1	<b>Ac. Glucuronique</b>		
			<b>B</b>		
23	1,05 <i>s</i>	28,5	1	4,46 <i>d</i> (7,5)	105,4
24	0,85 <i>s</i>	17,0	2	3,48 <i>m</i>	83,4
25	0,94 <i>s</i>	16,0	3	3,75 <i>m</i>	77,7
26	0,79 <i>s</i>	17,7	4	3,53 <i>m</i>	72,5
27	1,14 <i>s</i>	26,3	5	3,64 <i>m</i>	76,5
28(CO)	-	178,1	<b>COOH</b>	-	178,1
29	0,90 <i>s</i>	33,5			
30	0,92 <i>s</i>	23,9			

## ACTIVITE BIOLOGIQUE

### 3.1 Activités cytotoxiques

Les lignées principales utilisées pour évaluer l'activité cytotoxique sont :

- La lignée humaine leucémique myéloïde chronique **K562R** résistante à l'imatinib.
- La lignée murine leucémique myéloïde chronique **DA1-3b/M2** résistante au dasatinib et à l'imatinib.

Ces deux lignées présentent deux mécanismes différents de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase. La résistance de la lignée DA1-3b/M2 est dépendante de BCR-ABL alors que celle de K562R est indépendante.

Une fois les molécules isolées et caractérisées, elles sont testées pour leurs activités cytotoxiques vis-à-vis des deux lignées à l'aide de la technique colorimétrique du MTT [Gosland *et al.*, 1989].

#### *Les esters de juniférol*

Parmi ces esters, la **juniférinine** et la **lyciférine E** se sont révélées être les composés les plus actifs avec des  $CI_{50}$  comprises entre 18  $\mu$ M et 40  $\mu$ M. Le plus actif est la juniférinine (**J6**) avec des  $CI_{50}$  respectives de 18,6  $\mu$ M et 33,0  $\mu$ M vis-à-vis des lignées cellulaires DA1-3b/M2 et K562R. En revanche, la lyciférine A est totalement inactive (tableau 34).

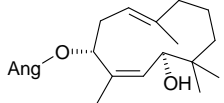
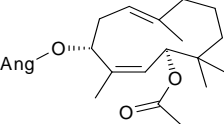
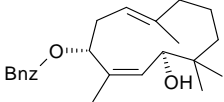
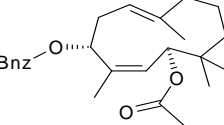
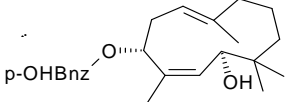
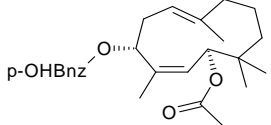
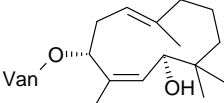
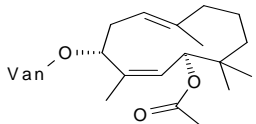
On constate à partir de ce tableau que l'estérification des deux fonctions hydroxyles du juniférol par un résidu *p*-OH benzoylé (acide *p*-OH benzoïque ou acide vanillique) et un groupement acétyle pourraient être nécessaires à l'activité cytotoxique.

Ensuite, la cytotoxicité de la juniférinine a été évaluée vis-à-vis des cellules RAJI (une lignée lymphoïde cancéreuse) et vis-à-vis des cellules de moelle de sujets sains. Ce composé s'est révélé aussi toxique vis-à-vis des cellules RAJI et vis-à-vis des cellules de moelle saines ( $CI_{50}$  13,0  $\pm$  2,1 et 30,7  $\pm$  2,3  $\mu$ M respectivement).

Ces résultats montrent que l'activité de la juniférinine n'est pas sélective des cellules cancéreuses.

## ACTIVITE BIOLOGIQUE

**Tableau 34.** Activités des esters de juniférol sur les lignées DA1-3b/M2 et K562R.

	Molécule	DA1-3b/M2	K562R	
		IC <sub>50</sub> μM	IC <sub>50</sub> μM	
<b>J1</b>		<b>Lyciférine A</b>	>100	>100
<b>J2</b>		<b>Lyciférine B</b>	45,0 ± 1,9	>100
<b>J3</b>		<b>Lyciférine C</b>	70,0 ± 2,0	>100
<b>J4</b>		<b>Lyciférine D</b>	45,0 ± 1,9	>100
<b>J5</b>		<b>Juniferdine</b>	23,7 ± 1,1	61,0 ± 0,9
<b>J6</b>		<b>Juniférinine</b>	18,6 ± 1,2	33,0 ± 1,1
<b>J7</b>		<b>Juniférine</b>	29,0 ± 0,9	68,1 ± 1,2
<b>J8</b>		<b>Lyciférine E</b>	20,1 ± 1,1	41,5 ± 1,2
	<b>Camptothecine</b>	30,0 ± 0,5 nM	2,0 ± 0,2nM	

### *Les esters de fervanol :*

Les trois esters de fervanol se sont révélés être totalement inactifs. On constate que la partie sesquiterpénique joue un rôle important pour l'activité surtout la position de la double liaison par rapport à la fonction ester.



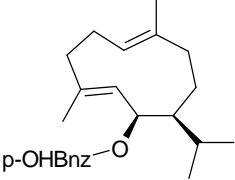
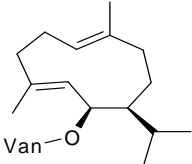
## ACTIVITE BIOLOGIQUE

### *Les esters de germacrane:*

Les composés G1 et G2 montrent des activités vis-à-vis des deux lignées cellulaires DA1-3b/M2 et K562R (tableau 35). Le dérivé estérifié par un *p*-OH benzoyle s'est révélé trois fois plus actif que celui estérifié par un reste vanilloyle.

La sélectivité du composé G1 a été aussi étudiée vis-à-vis des cellules RAJI et vis-à-vis des cellules de moelle de sujets sains. Ce composé s'est révélé toxique sur les cellules cancéreuses et sur les cellules de moelle saines même s'il était trois fois plus actif sur les cellules cancéreuses ( $CI_{50} 21,0 \pm 1$  et  $57,7 \pm 1 \mu\text{M}$  respectivement).

**Tableau 35.** Activités des esters de germacrane sur les lignées DA1-3b/M2 et K562R.

Molécule	DA1-3b/M2	K562R
	$IC_{50} \mu\text{M}$	$IC_{50} \mu\text{M}$
<b>G1</b> 	$24,7 \pm 0,8$	$25,3 \pm 1,0$
<b>G2</b> 	$67,0 \pm 1,2$	$82,2 \pm 0,9$

### *Les esters de daucane :*

Tous les esters de jaeschkeanadiol ont montré des activités cytotoxiques avec des valeurs de  $CI_{50}$  comprises entre 7,8 et 64,1  $\mu\text{M}$  (tableau 36), le plus actif étant l'**élaeoxytrine A** avec des  $CI_{50}$  respectives de 7,8  $\mu\text{M}$  et 12,4  $\mu\text{M}$  vis-à-vis des lignées cellulaires DA1-3b/M2 et K562R. Comme les esters de juniférol, le jaeschkeanadiol esterifié par un reste angéloyl était le moins actif.

Parmi les esters de daucane restants, seul l'élaeoxytrine B a montré un faible effet cytotoxique vis-à-vis de DA1-3b/M2 ( $CI_{50} = 65,0 \mu\text{M}$ ), alors qu'elle est inactive vis-à-vis des cellules K562R. Les composés E5 et E6 étaient complètement inactifs.

Ces données montrent que la présence d'un groupement anthranilique est utile pour l'activité cytotoxique, comme suggéré par Krief *et al.*, 2005, même si elle n'est pas

## ACTIVITE BIOLOGIQUE

absolument nécessaire pour les esters de jaeschkeanadiol, comme la férutinine qui possède des activités cytotoxiques.

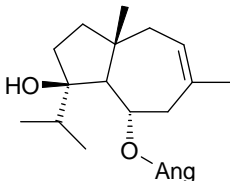
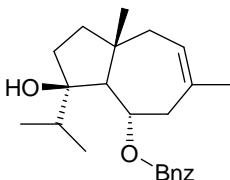
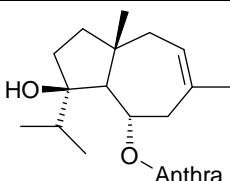
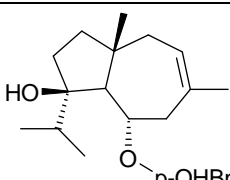
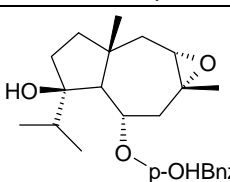
En revanche, la présence de la double liaison C8/C9 semble primordiale, toutes modifications à ce niveau diminuant l'activité.

L'activité sélective de l'**élaeochytrine A** a été aussi étudiée vis-à-vis de la lignée leucémique promyélocytaire HL60 et des cellules mononuclées issues du sang périphérique (PBMCs) de sujets sains.

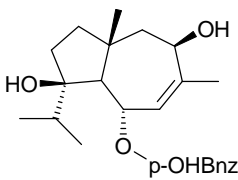
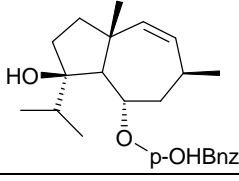
Ce composé s'est révélé toxique vis-à-vis des cellules HL60 ( $CI_{50} = 13,1 \pm 1,0 \mu M$ ), alors qu'il n'était pas toxique jusqu'à  $100 \mu M$  vis-à-vis des cellules saines.

Ces résultats démontrent que l'**élaeochytrine A** a une activité sélective contre les cellules cancéreuses.

**Tableau 36.** Activités des esters de daucane sur les lignées DA1-3b/M2 et K562R.

	Molécule	DA1-3b/M2	K562R
		IC <sub>50</sub> $\mu M$	IC <sub>50</sub> $\mu M$
<b>E1</b>		$39,2 \pm 1,2$	$64,1 \pm 1,0$
<b>E2</b>	 <b>Téféridine</b>	$29,5 \pm 1,5$	$55,1 \pm 1,0$
<b>E3</b>	 <b>Elaeochytrine A</b>	$7,8 \pm 1,2$	$12,4 \pm 2,6$
<b>E4</b>	 <b>Férutinine</b>	$29,1 \pm 1,0$	$25,3 \pm 0,5$
<b>E5</b>		>100	>100

## ACTIVITE BIOLOGIQUE

<b>E6</b>			>100	>100
<b>E7</b>		<b>Elaeochytrine B</b>	65,0 ± 1,0	>100

### *Composés non sesquiterpéniques :*

Parmi les autres composés non sesquiterpéniques, tels que l'acide 5-caféylquinique, l'acide 1,5-dicafféoylquinique et la sandrosaponine IX, aucun n'a montré d'activité vis-à-vis des deux lignées cellulaires.

## CONCLUSION

L'étude phytochimique des fruits et des racines de *Ferula lycia* ainsi que des racines de *Ferula elaeochytris* a permis d'identifier vingt esters sesquiterpéniques dont sept correspondant à des nouvelles structures, un saponoside et deux acides phénoliques. La détermination de structure de ces composés a été réalisée à l'aide de méthodes spectroscopiques de RMN mono- et bidimensionnelles, homo- et hétéronucléaires et de spectrométrie de masse. La majorité des composés isolés des deux plantes appartient aux esters sesquiterpéniques.

➤ Les racines de *F. lycia* étaient riches en dérivés de l'humulane (esters de juniférol et de fervanol). Les fruits étaient aussi riches en esters de juniférol, alors qu'on constate l'absence d'esters de fervanol et la présence des dérivés de germacrane. Il est à noter que la présence d'esters de l'humulane et du germacrane dans la même espèce de *Ferula* est rare. Elle n'a été déjà constatée jusqu'à présent que dans les racines de *F. lapidosa* et *F. tenuisecta* [Saidkhodzhaev *et al.*, 1985].

➤ Sept dérivés sesquiterpéniques ont été aussi isolés de la fraction dichlorométhanolique de l'extrait méthanolique des racines de *F. elaeochytris*. Il s'agit d'esters de daucane dont la majorité est des esters de jaeschkeadiol. Parmi ces composés, on note la présence d'un ester de l'acide anthranilique, plutôt rare dans le règne végétal. Deux acides phénoliques et un saponoside ont été identifiés dans la fraction butanolique du même extrait.

Toutes ces molécules isolées ont été testées pour leurs activités cytotoxiques vis-à-vis de la lignée humaine leucémique myéloïde chronique K562R résistante à l'imatinib et de la lignée murine leucémique myéloïde chronique DA1-3b/M2 résistante au dasatinib et à l'imatinib, à l'aide de la technique colorimétrique du MTT. Les esters de jaeschkeadiol, de germacrane et certains esters de juniférol ont montré des activités cytotoxiques intéressantes vis-à-vis les deux lignées cancéreuses.

Ensuite la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses des trois composés les plus actifs : le 6-anthranyljäschkeadiol (élaeochytrine A), le 3-*p*-hydroxybenzoyl-6-acétyljuniférol (juniférine) et le 6-β-*p*-hydroxybenzoyl-germacra-1(10),4-diène a été étudiée. Seul l'élaeochytrine A n'a pas montré de toxicité vis-à-vis des cellules saines, tandis que les dérivés de l'humulane et du germacrane ont montré des cytotoxicités.

## CONCLUSION

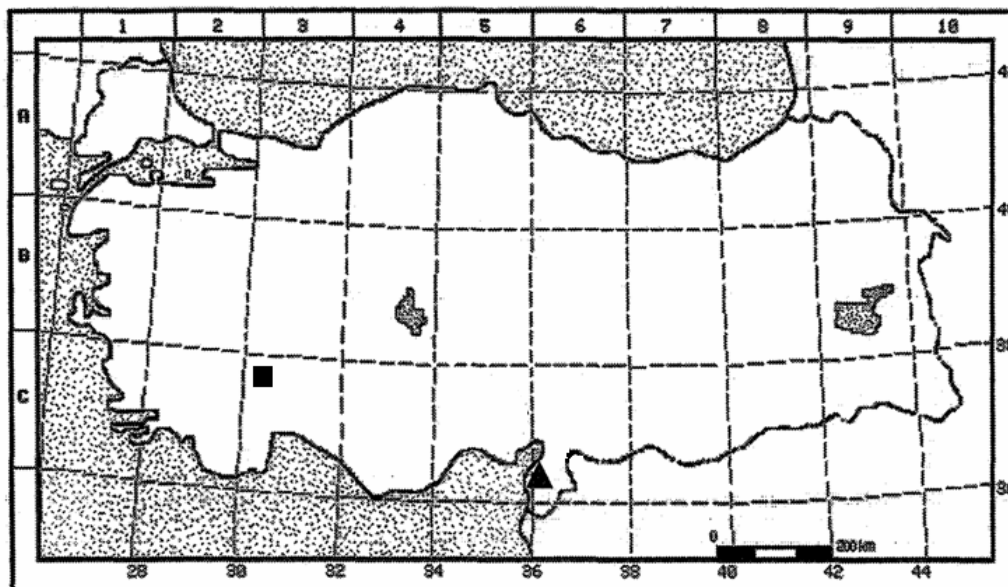
Même si l'activité de l'élaeochytrine A est modérée, elle pourrait être un candidat intéressant pour le développement de nouvelles molécules actives sur la leucémie résistante aux inhibiteurs de la tyrosine kinase ou pour prévenir la résistance.

L'ensemble de ces résultats montre que les sources naturelles peuvent être un véritable réservoir de molécules originales susceptibles d'être proposées comme modèle pour des travaux de chimie médicinale. Le champ de recherche est donc particulièrement étendu et prometteur.

## MATERIEL ET METHODE

### 4.1 Matériel végétal et extraction

*F. lycia* a été récoltée en août 2008, entre les deux villages de Karabayir et Kovali et *F. elaeochytris* a été récolté en août 2005 près de Yayladağı en Turquie (carte 2).



**Carte 2.** Carte de la Turquie comportant la localisation approximative de site de récolte de ■ *F. lycia* et ▲ *F. elaeochytris*.

Les drogues séchées et broyées ont été extraites par une méthode d'extraction de routine. La poudre est mise en contact avec le solvant. Après 24 h d'agitation à température ambiante, le mélange est filtré sur papier et le résidu est à nouveau extrait deux fois dans les mêmes conditions. Les filtrats sont réunis et évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor) à la température maximale de 40°C.

Les extraits secs obtenus sont ensuite stockés à température ambiante, à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

### 4.2 Méthodes chromatographiques analytiques

#### 4.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince sont employées dans le suivi des purifications et permettent de vérifier la présence et le degré de pureté des produits étudiés.

Une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) se compose d'un support en aluminium ou en verre, sur lequel est fixée une fine couche d'un milieu de sorption (silice, cellulose, alumine, polyamide...) comme phase stationnaire.

## MATERIEL ET METHODE

Le développement de la plaque s'effectue dans la cuve en verre contenant l'éluant approprié.

On la place en position verticale ou légèrement inclinée dans une cuve en verre ; elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile, qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants, et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par appositions successives au moyen d'une micropipette en verre et éventuellement séché par ventilation sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire. La CCM est généralement considérée comme une technique de chromatographie par adsorption, mais le partage peut intervenir, dans le cas de l'utilisation d'une phase stationnaire liquide sous forme de film.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son  $R_f$  (*Rate factor* ou Rapport frontal) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) et qui peut donc être compris entre 0 et 1.

Nous utilisons essentiellement des plaques de Silicagel 60 F<sub>254</sub> prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck). Elles sont imprégnées d'un réactif permettant une meilleure visibilité des molécules absorbant à 254 nm. Les systèmes de solvant les plus couramment employés avec ces plaques sont les suivants :

- Extraits apolaires : éther de pétrole/acétate d'éthyle (1:1)
- Extraits polaires : acétate d'éthyle/acide acétique/acide formique/eau (100:11:11:27)

Ces compositions ne sont bien sûr qu'indicatives et peuvent être adaptées aux besoins spécifiques d'une analyse.

Les CCM sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs vaporisés sur les plaques de chromatographie sur couche mince après élution, permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes, d'obtenir des renseignements supplémentaires sur le type d'une molécule (cas de réactifs spécifiques), et éventuellement permettre de localiser certains composés, invisibles sans dérivatisation

## MATERIEL ET METHODE

chimique (c'est le cas du saponoside isolé lors de ce travail). Les principaux réactifs utilisés sont dans tableau 37.

**Tableau 37.** Principaux réactifs utilisés pour la révélation des CCM.

Réactif	Substances révélées	Mode d'utilisation
<b>Anisaldéhyde (Deleu-Quettier 2000)</b>	réactif polyvalent	Préparer une solution de <i>p</i> -anisaldéhyde à 0,5% dans un mélange CH <sub>3</sub> OH/AcOH/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (85:10:5).  Pulvériser sur la plaque. Après chauffage intense, les composés organiques apparaissent sous forme de taches colorées en lumière du jour.
<b>Neu (Wagner 1983)</b>	flavonoïdes acides phénoliques	Préparer une solution de diphenylborate d'éthanolamine à 1% dans le méthanol et ajouter 5% de PEG 4000.  Vaporiser sur la plaque. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes orange, jaunes, bleues et vertes à 365 nm.



## MATERIEL ET METHODE

### 4.2.2 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La CLHP repose sur les mêmes principes de base que la CCM. Elle est plus complexe d'utilisation, nécessite davantage de précautions mais permet surtout une amélioration très importante dans de nombreux domaines, dont deux principaux : le seuil de détection et la résolution. Un système de CLHP classique comprend les éléments suivants :

- Un système de pompage (simple ou multiple) pour déplacer la phase mobile à haute pression (200-300 bars),
- Un injecteur (manuel ou automatique) pour introduire, dans le système à haute pression, l'échantillon solubilisé dans un solvant adéquat et exempt de particules en suspension (risque de colonne bouchée),
- Une colonne contenant la phase stationnaire. Celle-ci est de granulométrie très fine, c'est d'ailleurs ce qui permet le gain de résolution mentionné plus haut. Ceci explique la nécessité de recourir à des pressions très importantes (et à des matériaux résistant à ces pressions !) pour « forcer » le passage de la phase mobile à travers ce solide finement poreux en un temps raisonnable,
- Un détecteur à ultraviolets,
- Une interface permettant de visualiser les signaux enregistrés par le détecteur (intégrateur ou logiciel informatique).

Le laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille est équipé d'un système de marque Shimadzu composé de deux pompes LC-10AS, d'un détecteur UV SPD-10A à deux longueurs d'onde et d'un module de contrôle SCL-10A<sub>vp</sub>. Le tout est piloté *via* le logiciel LC solutions. Un dégazeur Alltech est placé entre les flacons de solvant et les pompes, afin d'éviter les perturbations dans la détection, provoquées par la présence de bulles d'air dans la phase mobile. Un four est utilisé pour limiter les variations de conditions d'analyse dues à un changement de température dans la pièce.

Nous avons travaillé avec plusieurs colonnes, toutes de type C18 (phase inverse), c'est-à-dire rendues hydrophobes par greffage de résidus octadécyliques sur les groupes silanols.

## MATERIEL ET METHODE

Que ce soit pour des analyses isocratiques (composition du mélange identique pendant toute l'analyse) ou en gradient, nous avons toujours travaillé avec des mélanges méthanol/eau ou acétonitrile/eau, éventuellement.

Les analyses ont été réalisées sur colonne Interchim RP-18 (250×4,6 mm, 5 µm). Les solvants A et B sont respectivement l'eau et l'acétonitrile ou le méthanol. La phase éluante était un gradient 80% (B) à 100% (B) pendant 20 min. Le débit était de 1 ml/min.

### 4.3 Méthodes chromatographiques préparatives

Les supports les plus utilisés sont des silices en phase normale (parfois inversée).

#### 4.3.1 Chromatographie sur colonne ouverte

Plusieurs types de phases ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de phase stationnaire utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner peut être déposé en phase liquide concentrée (dans un solvant peu éluant) ou en phase solide (adsorption sur silice).

La gravité étant la seule force de migration, ce type de chromatographie est long et employé pour des phases stationnaires de type Sephadex LH 20 (chromatographie d'exclusion) ou parfois pour de la silice (SDS 60 Å 70-200 µm).

#### *Filtration sur gel*

La filtration sur gel, ou chromatographie d'exclusion, repose sur la séparation de constituants en mélange en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure spatiale. La colonne est remplie d'un gel constitué de billes de polymère. Cette technique a été initialement développée pour des séparations en chimie des polymères et le principe en était simple : plus la molécule est grosse et plus elle est éluée rapidement (elle « tombe » à travers le gel), plus elle est petite et plus elle sera ralentie par l'entrelacs des fibres de la phase stationnaire. Ici, la phase mobile ne joue donc que le rôle de véhicule. En pratique, il semblerait que dans le cas de la séparation de petites molécules, on ne puisse exclure l'existence d'interactions de type adsorption – forces électrostatiques, et l'utilisation de gradients présente un réel intérêt [Hamilton *et al.*, 1977].

Le mélange à séparer est introduit par voie liquide et l'élution est assez rapide sans pression extérieure.

## **MATERIEL ET METHODE**

Nous utilisons un gel de dextran hydroxypropylé réticulé, le Sephadex LH-20 (Pharmacia) pour le dégrossissage d'extrait ou la purification de produits. Le Sephadex est très facilement réutilisable et est compatible avec l'utilisation de solvants organiques (le dichlorométhane est par exemple utilisable en mélange avec le méthanol s'il n'excède pas 50% du mélange). Il est utile pour éliminer les chlorophylles ou fractionner un extrait dans lequel des molécules de tailles très différentes sont présentes.

### **4.3.2 Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP)**

Comme son nom l'indique, cette technique est à mi-chemin entre la basse et la haute pression. La CLMP permet de réaliser des séparations de bonne résolution avec un débit élevé.

Un dispositif de CLMP reprend en fait toute l'organisation d'une chaîne de CLHP (système d'introduction de l'échantillon, progression de la phase mobile assurée par une ou plusieurs pompes, possibilité de programmer un gradient...) mais on travaille à des pressions inférieures (maximum 50 bars).

Nous avons utilisé pour ce travail un système Büchi composé d'une pompe C-605 et d'un contrôleur de pression C-615. Les colonnes, d'une longueur de 460 mm et d'un diamètre interne de 15, 25 ou 35 mm ont été conditionnées selon la procédure standard du constructeur avec de la silice RP-18, 15-25  $\mu\text{m}$  ou 25-40  $\mu\text{m}$  (Merck). L'élution était réalisée par des mélanges méthanol/eau.

### **4.3.3 Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (CLHP semi-préparative)**

Les séparations ont été réalisées sur colonne Interchim RP-18 (250×10 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Les solvants A et B étaient respectivement l'eau et le méthanol. La phase éluante était un gradient 80% (B) à 100% (B) pendant 20 min. Le débit était de 5 ml/min.

## MATERIEL ET METHODE

### 4.4 Méthodes physico-chimiques

#### 4.4.1 Spectrophotométrie UV-visible

L'absorption moléculaire dans le spectre ultraviolet et visible dépend de la structure de la molécule. L'absorption d'énergie est quantifiée et résulte du passage des électrons d'orbitales de l'état fondamental vers des orbitales d'un état excité d'énergie supérieure. La structure particulière d'une molécule est liée à une absorption plus ou moins importante à chaque longueur d'onde observable (UV de 200 à 400 nm ; visible de 400 à 800 nm).

L'absorption dans le domaine du visible est courante et se traduit par une coloration de l'échantillon ; la spectrométrie UV se limite, elle, généralement aux systèmes conjugués. Cette sélectivité peut présenter un avantage : des groupes caractéristiques peuvent être reconnus dans des molécules de complexité très variable.

La spectrophotométrie UV-visible permettra donc :

- De reconnaître des groupements chimiques particuliers, surtout s'ils comportent des doubles liaisons, *a fortiori* conjuguées. L'interprétation d'un spectre ultraviolet est plus aisée que celle d'un spectre visible,
- En mesurant, à une longueur d'onde précise (la longueur d'onde d'absorption maximale de la molécule ou du complexe qu'elle forme avec un réactif,  $\lambda_{\max}$ ), l'intensité de cette absorption (densité optique, DO) par rapport à un témoin de concentration connue, de déterminer la quantité de la molécule présente dans un échantillon.

Au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille, nous utilisons un appareil Biochrom WPA Lightwave II UV-visible pour réaliser les spectres d'absorption des molécules isolées.

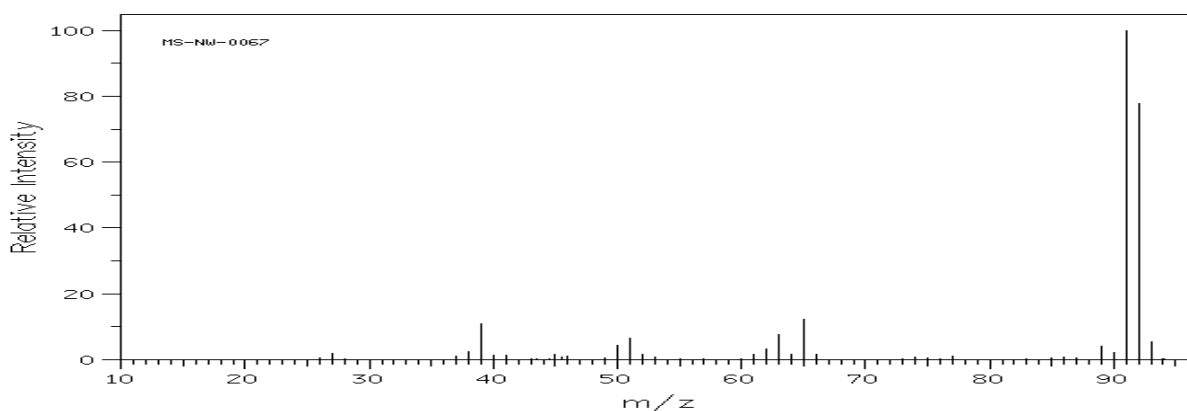
## MATERIEL ET METHODE

### 4.4.2 Spectrométrie de masse

Cette technique repose sur deux éléments fondamentaux :

- La possibilité, par différentes méthodes, de fragmenter une molécule en différents ions, positifs ou négatifs, de rapports  $m/z$  (masse/nombre de charges élémentaires) différents ; le lieu de fragmentation s'appelle la source et de son type dépend l'interprétation des résultats ;
- La détection de ces fragments. Là encore, différentes techniques existent (déflexion par champ magnétique, filtre de masse quadripolaire, trappe ionique, temps de vol) mais leur nature influe essentiellement sur la précision des résultats.

Chaque molécule peut être caractérisée par un profil de fragmentation pour une technique de fragmentation donnée. De plus, il est possible qu'il se forme un ion moléculaire ( $M^+$ , par exemple) ou pseudomoléculaire ( $[M+H]^+$ ), indiquant la masse de la molécule étudiée. La figure 62 montre l'exemple du spectre du toluène par impact électronique, où l'on observe essentiellement l'ion moléculaire à  $m/z$  92 et le fragment issu de la perte d'un hydrogène à  $m/z$  91.



**Figure 62.** Spectre de masse du toluène par technique d'impact électronique (75 eV) (SDBS)

Nous avons utilisé plusieurs techniques d'ionisation :

- L'impact électronique (SM-IE) : la molécule est bombardée par un flux d'électrons émis par un filament auquel est appliquée une énergie variable (généralement 70 eV) (figure 62).
- L'ionisation chimique (SM-IC) : un gaz sous pression (ammoniac, méthane) est utilisé pour générer des ions positifs. Cette technique permet de détecter plus facilement l'ion moléculaire, qui est d'ailleurs souvent très majoritaire.

## MATERIEL ET METHODE

Ces deux techniques ont souvent été utilisées en à l'aide d'un spectromètre 55Q710 Finnigan mat, au Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA) de l'Université de Lille Nord de France.

➤ L'électrospray-ionspray (SM-ESI) : La solution contenant la substance à analyser est introduite dans la source *via* un capillaire à la sortie duquel un champ électrique intense est appliqué, ce qui entraîne la nébulisation de la solution à pression atmosphérique.

Les gouttelettes produites dans ces conditions sont hautement chargées, et les charges sont déterminées par la polarité du champ appliqué sur le capillaire. Ce processus, appelé *electrospray* peut être assisté par un flux coaxial de gaz nébulisant. Cette variante, appelée *ionspray*, permet de prendre en charge des débits d'introduction d'échantillon supérieurs. La désolvation des gouttelettes est assurée par un flux d'azote chaud à contre-courant [Montaudo *et al.*, 2002].

Cette technique, développée pour les polymères, est particulièrement utile pour les molécules de masse moléculaire élevée (>500 Da). L'ion moléculaire n'est pas observé, mais on détecte des adduits classiques ( $[M+H]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ). Nous avons utilisé, pour plusieurs produits, un spectromètre API3000 (Perkin-Elmer Sciex) à triple quadripôle au Laboratoire d'Application de Spectrométrie de Masse de l'Université de Lille Nord de France (figure 63). Cet appareil permet en outre d'utiliser le mode SM-SM (ou SM<sup>2</sup>), qui consiste en la refragmentation de fragments sélectionnés, pour une analyse plus fine.



**Figure 63.** Spectromètre de masse API 3000

## MATERIEL ET METHODE

### *Spectrométrie de masse haute résolution :*

Le spectre de masse de haute résolution permet de mesurer la masse exacte des molécules.

Les spectres des nouveaux composés ont été enregistrés sur un Thermo Scientific Orbitrap spectromètre de masse Exactive™ (Brême, Allemagne), en utilisant l'électrospray (HESI-II). Ces analyses ont été effectuées au CUMA, Université de Lille Nord de France.

### **4.4.3 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La RMN repose sur la propriété qu'ont certains atomes, possédant un moment de spin  $I$  non nul (c'est-à-dire un nombre de masse  $A$  et/ou un numéro atomique  $Z$  impairs), de pouvoir prendre plusieurs orientations bien définies, auxquelles correspondent des niveaux d'énergie distincts, quand ils sont placés dans un champ magnétique  $B_0$ . En pratique, les atomes les plus faciles à étudier sont ceux possédant un moment de spin  $I=1/2$ , or la plupart des atomes couramment retrouvés dans des molécules, qu'elles soient d'origine synthétique ou naturelle ont au moins un isotope qui se trouve dans ce cas de figure ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ...). L'orientation de ces atomes peut être modifiée par leur soumission à une radiation électromagnétique supplémentaire, dans le domaine des radiofréquences ( $\lambda = 3.10^7$  à  $10^{11}$  nm, contre 10 à 800 pour le domaine UV-visible), et la mesure de la fréquence de précession autour de  $B_0$  lors du retour à la position d'équilibre sera différente en fonction de l'environnement moléculaire précis de chaque atome.

En phytochimie, les deux atomes les plus étudiés sont l'hydrogène (proton)  $^1\text{H}$  et le carbone 13,  $^{13}\text{C}$ . Nous allons rappeler ici les caractéristiques essentielles des techniques utilisées.

#### **4.4.3.1 RMN du $^1\text{H}$**

La réalisation d'un spectre de RMN du  $^1\text{H}$  est une étape fondamentale dans la détermination structurale d'une molécule. De plus, elle ne nécessite que quelques minutes, depuis l'avènement de la RMN à transformée de Fourier.

En RMN du  $^1\text{H}$ , trois informations sont importantes :

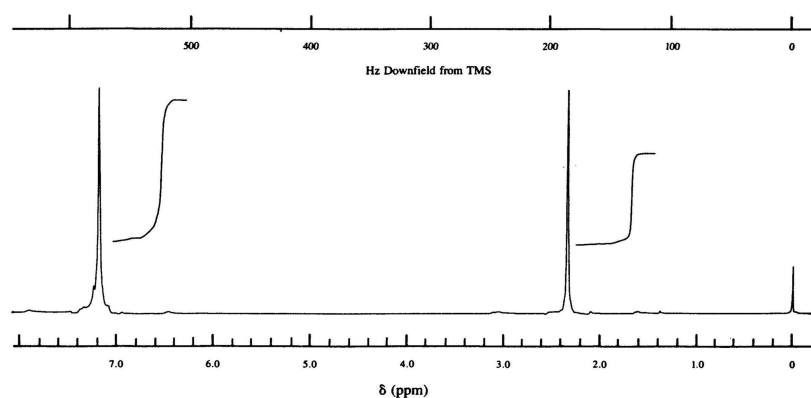
##### ➤ **Le déplacement chimique ( $\delta$ ) :**

C'est une fréquence exprimable en Hertz (Hz), qui est en pratique toujours présentée sous la forme d'une échelle de ppm (rapport de la fréquence de résonance sur celle du champ magnétique  $B_0$ ), qui a l'avantage d'être la même quelle que soit la puissance de l'appareil.

## MATERIEL ET METHODE

Elle donne une indication sur la nature des groupements chimiques présents. Par exemple, dans la molécule de toluène, un groupement méthyle ne résonne pas à la même fréquence que le cycle aromatique qu'il substitue (figure 64) [Canet *et al.*, 2002].

En fonction de la force du champ magnétique  $B_0$ , qui est synonyme de puissance de l'appareil, on peut distinguer plus ou moins finement des différences de  $\delta$  infimes. Par exemple, on n'observe que deux pics, alors que quatre types de protons sont présents dans la molécule de toluène.



**Figure 64.** Spectre de RMN du  $^1\text{H}$  du toluène enregistré à 80 MHz. En haut, la fréquence de résonance en Hz, en bas l'échelle conventionnelle exprimée en ppm [Macomber 2002].

### ➤ L'intégration :

L'aire sous la courbe de chaque pic est proportionnelle au nombre d'atomes d'hydrogène équivalents concernés. Par exemple, dans la figure 64, la surface du pic à  $\delta$  2,4 représente  $3/8^{\text{èmes}}$  (trois protons sur huit) de la surface totale des deux pics. La prise en compte de l'intégration nécessite souvent la connaissance de la masse totale de la molécule (cf. spectrométrie de masse).

### ➤ Le couplage :

Chaque proton est couplé avec ses voisins immédiats non équivalents dans la molécule. Ceci se traduit par un changement de forme des signaux observés. Le signal d'un proton indique le nombre de protons avec lesquels il est couplé ( $n+1$  raies pour  $n$  voisins) et peut même donner des renseignements d'ordre structural, *via* l'écartement de ces raies, mesuré en Hz et appelé constante de couplage ( $J$ ).



## MATERIEL ET METHODE

### 4.4.3.2 RMN du $^{13}\text{C}$

L'isotope  $^{13}\text{C}$  ne représente qu'1% des atomes de carbone existant. La sensibilité de cette expérience n'est donc pas excellente, ce qui oblige à multiplier le nombre des expériences (*scans*) sur plusieurs heures afin d'obtenir un spectre de bonne qualité. Ceci est particulièrement handicapant pour les substances naturelles qui sont souvent isolées en faible quantité par rapport aux produits de la chimie de synthèse. En revanche, la résolution obtenue est très supérieure à celle des spectres du  $^1\text{H}$ , pour un même appareil : les déplacements chimiques s'échelonnent généralement sur plus de 200 ppm, contre 10 ou 15 pour le proton !

Il existe des couplages en RMN du  $^{13}\text{C}$ , mais on utilise aujourd'hui majoritairement des expériences dites «  $^1\text{H}$ -découplées », qui permettent un gain appréciable de sensibilité.

Plusieurs expériences permettent, au moyen de séquences d'impulsions particulières de conserver une partie des informations qu'aurait apporté le couplage  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , tout en bénéficiant du gain de sensibilité procuré par le découplage. Il s'agit d'expériences de spin-écho *J*-modulé (APT : *Attached Proton Test* encore appelé *Jmod*) pouvant impliquer un transfert de polarisation (DEPT : *Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*). Nous avons toujours utilisé le *Jmod* pour ce travail. Il permet la différenciation dans le spectre des pics correspondant à des carbones portant un nombre pair d'hydrogènes (secondaires ou quaternaires) de ceux correspondant à des carbones portant un nombre impair d'hydrogènes (primaires ou tertiaires).

### 4.4.3.3 RMN bidimensionnelle

Certaines techniques permettent la visualisation, sous forme de carte, des corrélations existant entre différents signaux, qu'ils appartiennent au même spectre ou non. Des tâches, qui sont en fait une vue « de dessus », sous la forme de courbes de niveau, des pics de corrélation, matérialisent l'existence d'un lien quelconque entre deux atomes (liaison chimique, proximité dans l'espace...). Les spectres monodimensionnels concernés peuvent, pour une lecture plus facile, être reportés sur les axes des abscisses et des ordonnées.

Plusieurs expériences ont été utilisées [Croasmun, 1987 ; Lambert, 2003] :

- COSY (*CORrelation SpectroscopY*) : visualisation du voisinage immédiat des atomes d'hydrogène, par interactions scalaires (à travers les liaisons chimiques). L'intérêt n'est pas énorme *a priori* par rapport au simple spectre du  $^1\text{H}$ , mais il apporte un gain certain de clarté et permet de distinguer différents signaux dans un massif pour les attribuer précisément.

## MATERIEL ET METHODE

- TOCSY (*T*otal *C*orrelation *S*pectroscop*Y*): indique, en plus des voisins immédiats, les voisins plus éloignés ce qui permet de reconstituer plus facilement l'enchaînement des protons sur le squelette carboné.

- ROESY (*R*otational nuclear *O*verhauser *E*ffect *S*pectroscop*Y*): met en évidence les interactions dipolaires de deux atomes d'hydrogène. C'est donc une technique intéressante en terme de stéréochimie.

- HSQC (*H*eteronuclear *S*ingle *Q*uantum *C*oherence): indique quel proton est directement lié à quel carbone.

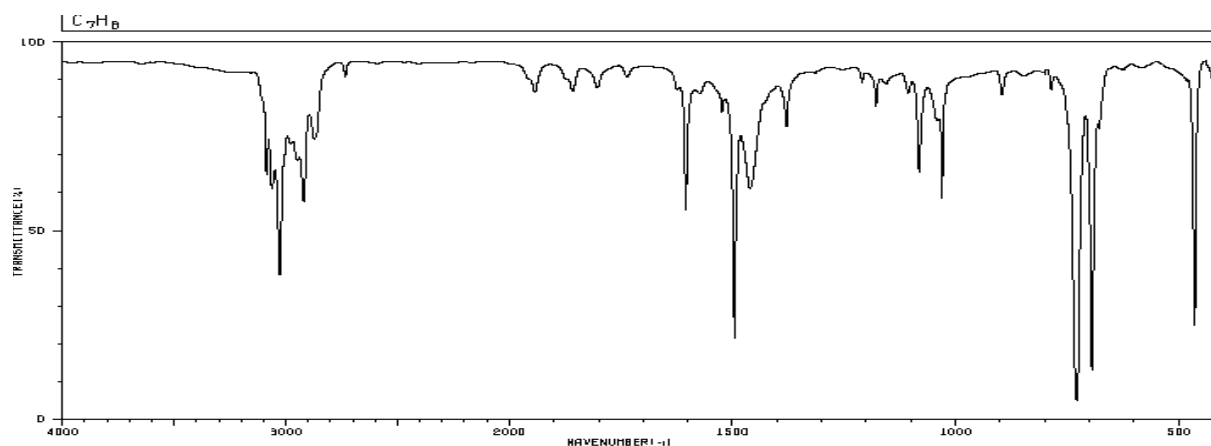
- HMBC (*H*eteronuclear *M*ultiple *B*ond *C*oherence): montre la corrélation entre un atome de carbone et un proton situés à plusieurs liaisons de distance (typiquement trois). Cette technique complète très bien le COSY pour l'établissement de l'enchaînement des atomes d'une molécule.

Les spectres de RMN présentés ou évoqués dans ce mémoire ont été réalisés sur des spectromètres Bruker Avance 300 et 500 au Laboratoire d'Application de RMN (LARMN) de l'Université de Lille Nord de France et traités principalement avec les logiciels Topspin (Bruker) et MestReC (Mestrelab Research).

### 4.4.4 Spectrométrie infrarouge

Les radiations infrarouges se situent dans la partie du spectre électromagnétique comprise entre la région visible et celle des micro-ondes. La région la plus utile pour l'analyse de molécules organiques est celle située entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ . L'absorption de ces radiations par un composé provoque une variation de l'énergie de rotation et de vibration des liaisons chimiques de ce composé, qui peut être détectée (détecteur à thermocouple). On observe ainsi au niveau du spectre une série de bandes rotato-vibratoires dont le nombre d'onde  $\bar{\nu}$ , inverse d'une longueur d'onde et exprimé en  $\text{cm}^{-1}$ , dépend des masses relatives des atomes, de la constante de force des liaisons ainsi que de la géométrie des atomes. Le spectre du toluène est donné en guise d'exemple dans la figure 65.

## MATERIEL ET METHODE



**Figure 65.** Spectre infrarouge (film liquide) du toluène (SDBS)

Les appareils anciens, à monochromateur, procèdent par balayage et enregistrements successifs dans la gamme de nombres d'onde à analyser. Les systèmes plus récents sont des spectromètres infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), où la gamme complète des radiations passe simultanément à travers l'échantillon. Le résultat est un interférogramme, qui est converti mathématiquement en spectre classique infrarouge. Cette technique permet à la fois un temps d'analyse court, une excellente résolution et l'obtention de résultats faciles à traiter [Silverstein *et al.*, 1998]. Elle peut également permettre de travailler sur des quantités plus restreintes de produit.

L'appareil utilisé pour ce travail est un Thermo Nicolet Avatar 320 FT-IR.

### 4.4.5 Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D$

Le pouvoir rotatoire des molécules isolées est mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) dans une cuve de 10 cm à température ambiante.

## MATERIEL ET METHODE

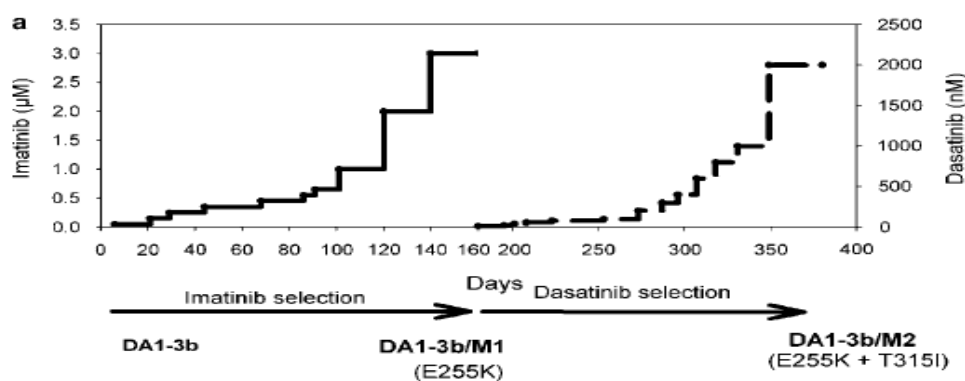
### 4.5 Matériel et méthodes appliqués à la biologie

#### 4.5.1 Les cellules

- Les lignées leucémiques myéloïde chronique BCR-ABL<sup>+</sup> :

La lignée cellulaire humaine de leucémie myéloïde chronique BCR-ABL<sup>+</sup> résistante à l'imatinib K562R et la lignée cellulaire murine DA1-3b/M2 résistante au dasatinib ont été préparées à partir des lignées sensibles à l'imatinib et au dasatinib K562 et DA1-3b (figure 66).

Les lignées sensibles ont été cultivées dans des milieux contenant des doses progressivement croissantes de l'imatinib (K562) [Mahon *et al.*, 2000] et de l'imatinib puis le dasatinib (DA1-3b/M2) (figure 66) [Liu *et al.*, 2008].



**Figure 66.** Préparation de la lignée DA1-3b/M2

- Les cellules cancéreuses BCR-ABL<sup>-</sup> :

Il s'agit de la lignée cellulaire humaine de la leucémie promyélocytaire HL-60 et les cellules RAJI (dérivée d'un lymphome de Burkitt) (ATCC, Manassas, VA).

- Les cellules saines :

Les cellules saines sanguines (cellules mononucléées sanguines périphériques) et les cellules de moelle ont été obtenues à partir de volontaires sains et ont été utilisés comme contrôle.

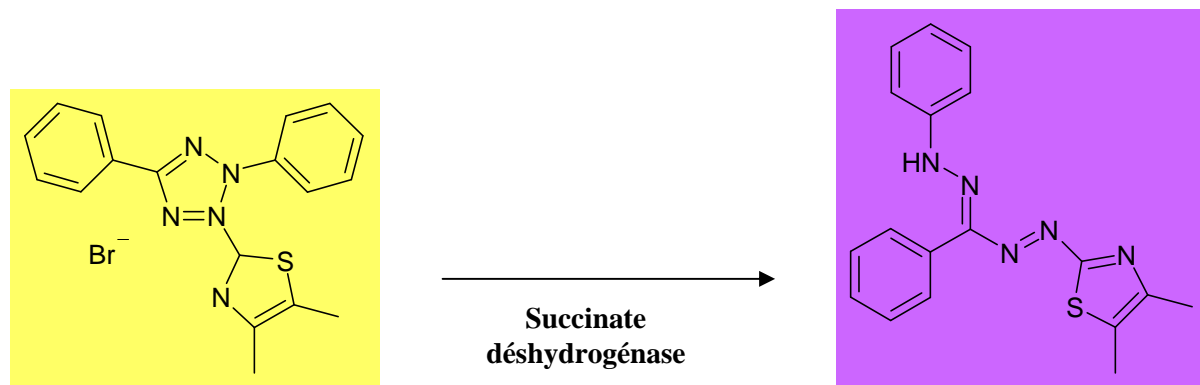
#### 4.5.2 La culture *in vitro* :

Toutes les cellules ont été cultivées en milieu RPMI1640 avec 1% de glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (Gibco/BRL, Eggenstein, Allemagne).

## MATERIEL ET METHODE

### 4.5.3 Test de viabilité :

Le test est basé sur la transformation d'un sel de tétrazolium [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)] (MTT) en formazan par réduction enzymatique [Gosland *et al.*, 1989].



**Tétrazolium [3-(4,5- diméthylthiazol-2-yl)]**

**Formazan**

En bref, le cycle tétrazolique, que le MTT contient, est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu violacé. L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test mais aussi à leur activité métabolique.

La toxicité cellulaire a été étudiée en utilisant un kit MTT (Promega, Madison, WI, USA). Les cellules ont été cultivées à une densité de  $10^4$  cellules par puit, dans une plaque de 96 puits, puis traitées soit par des concentrations croissantes de composé ou par le DMSO (excipient). Le MTT (10  $\mu$ l) a été ajouté à chaque puit dans les dernières 4 heures des 48 heures de culture. L'absorbance a été mesurée à 490 nm en utilisant le spectrophotomètre SpectraMaxPlus 384. Trois essais ont été réalisés pour chaque concentration. La camptothécine a été utilisée comme témoin positif.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abd El-Razek, M.H., Ohta, S., Ahmed, A.A. & Hirata, T. Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 58, 1289-1295 (2001).
- Abd El-Razek, M., Hirata, T., H. & Ohta, S. Terpenoid Coumarins of the Genus *Ferula*. *Heterocycles* 60, 689 (2003).
- Appendino, G., Jakupovic, J., Alloatti, S. & Ballero, M. Daucane esters from *Ferula arrigonii*. *Phytochemistry* 45, 1639-1643 (1997).
- Bagirov, V. An aromatic aldehyde from *Ferula equisetacea*. *Chemistry of Natural Compounds* 14, 559 (1978).
- Bagirov, V., Sheichenko, V., Aliev, G. & Pimenov, M. Esters from *Ferula stylosa*. *Chemistry of Natural Compounds* 16, 562-563 (1980).
- Bagirov, V.Y., Serkerov, S.V., Mir-Babaev, N.F. & Pimenov, M.G. Aromatic esters of the roots of *Ferula dissecta*. *Chemistry of Natural Compounds* 20, 111-112 (1984).
- Barthomeuf, C., Lim, S., Iranshahi, M. & Chollet, P. Umbelliprenin from *Ferula szowitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. *Phytomedicine* 15, 103-111 (2008).
- Behnam Rassouli, F., Matin, M.M., Iranshahi, M., Bahrami, A.R., Neshati, V., Mollazadeh, S. & Neshati, Z. Mogoltacin enhances vincristine cytotoxicity in human transitional cell carcinoma (TCC) cell line. *Phytomedicine* 16, 181-187 (2009).
- Bohannon, R.A., Miller, D.G. & Diamond, H.D. Vincristine in the treatment of lymphomas and leukemias. *Cancer Res.* 23, 613-621 (1963).
- Borisov, V., Ban'kovskii, A., Sheichenko, V. & Pimenov, M. Chingin from *Ferula lapidosa*. *Chemistry of Natural Compounds* 9, 646 (1973).
- Bruneton, J. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. (Tec & Doc, Lavoisier. 2009).
- Burke, V.P. & Startzell, J.M. The leukemias. *Oral Maxillofac Surg. Clin. North. Am.* 20, 597-608 (2008).
- Canet, D., Boubel, J.C. & Canet-Soulas, E. La RMN-concepts, méthodes et applications. Deuxième édition. (Sunod, Paris. 2002).
- Chen, B., Teranishi, R., Kawazoe, K., Takaishi, Y. Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y. & Kodzhimatov, O.K. Sesquiterpenoids from *Ferula kuhistanica*. *Phytochemistry* 54, 717-722 (2000).
- Colditz, G.A., Sellers, T.A. & Trapido, E. Epidemiology identifying the causes and preventability of cancer? *Nat. Rev. Cancer.* 6, 75-83 (2006).
- Crosmun, W.R. & Carlson R.M.K. 1987 *TWO-dimensional NMR spectroscopy applications for chemists and biochemists*. ( VCH, New-York.1987).
- Coste, H., & Flahault CH. Flore Description et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Tome II (Librairie scientifique et technique, Paris. 1998)
- Deleu-Quettier, C., Les polyphénols bioactifs de l'aubépine (*Crataegus monogyna*) et du sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) : obtention in vivo et in vitro. Mémoire de doctorat. Université des Sciences de Technologie de Lille (2000).

## BIBLIOGRAPHIE

- Diab, Y., Dolmazon, R. & Bessièrè, J. Daucane aryl esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* Boiss. (zallooh root). *Flavour and Fragrance Journal* 16, 120-122 (2001).
- Drew, D., Krichau, N., Reichwald, K. & Simonsen, H. Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* 8, 581-599 (2009).
- Duan, H., Takaishi, Y., Tori, M., Takaoka, S., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., Kodzhimatov, K. & Ashurmetov, O. Polysulfide derivatives from *Ferula foetida*. *Journal of Natural Products* 65, 1667-1669 (2002).
- Fraga, B.M., Hernández, M. & Diaz, J.G. Carotdiol esters from *Ferula linkii*. *Phytochemistry* 28, 1649-1652 (1989).
- Galal, A.M., Abourashed, E. A., Ross, S. A., ElSohly, M. A., Al-Said, M. S. & El-Feraly F. S. Daucane Sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of Natural Products* 64, 399-400 (2001).
- Gamal-Eldeen, A.M. & Hegazy, M.F. A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Natural Product Research* 24, 246-257 (2010).
- Goldman, J.M. & Melo, J.V. Chronic Myeloid Leukemia Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N. Engl. J. Med.* 349, 1451-1464 (2003).
- Golovina, L.A., Saidkhodzhaev, A.I. & Malikov, V.M. Esters of *Ferula rubroarenose*. *Chemistry of Natural Compounds* 14, 606-608 (1978).
- Golovina, L. & Nikonov, G. Esters of *Ferula ceratophylla*. *Chemistry of Natural Compounds* 13, 591-592 (1977).
- Gosland, M.P., Lum, B.L. & Sikic, B.I. Reversal by cefoperazone of resistance to etoposide, doxorubicin, and vinblastine in multidrug resistant human sarcoma cells. *Cancer Res* 49, 6901-6905 (1989).
- Hamilton, R.J. & Sewell, P. A. Introduction to high performance liquid chromatography. (Edition Chapman & Hall, New York. 1977).
- Heywood, V.H. *The biology and chemistry of the Umbelliferae*. (Academic Press, London. 1971).
- Honma, Y., Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Hozumi, M. & Umezawa, K. Inhibition of abl oncogene tyrosine kinase induces erythroid differentiation of human myelogenous leukemia K562 cells. *Jpn. J. Cancer Res* 81, 1132-1136 (1990).
- Ikeda, K., Arao, Y., Otsuka, H., Nomoto, S., Horiguchi, H., Kato, S. & Kayama, F., Terpenoids found in the umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER(alpha) and ERbeta: differential transcription activity between ferutinine-liganded ER(alpha) and ERbeta. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 291, 354-360 (2002).
- Iranshahi, M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M. R., Sadeghian, H., Bassarello, C., Piacente, S. & Pizza, C. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry* 68, 554-561 (2007).
- Iranshahi, M., Mojarab, M., Sadeghian, H., Hanafi-Bojd, M.Y. & Schneider, B. Polar secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochemistry* 69, 473-478 (2008a).

## BIBLIOGRAPHIE

- Iranshahi, M. et al. Cancer chemopreventive activity of terpenoid coumarins from *Ferula* species. *Planta Med.* 74, 147-150 (2008b).
- Iranshahi, M., Hosseini, S.T., Shahverdi, A.R., Molazade, K., Khan, S.S. & Ahmad V.U. Diversolides A-G, guaianolides from the roots of *Ferula diversivittata*. *Phytochemistry* 69, 2753-2757 (2008c).
- Iranshahi, M., Noroozi, S., Behravan, J., Karimi, G. & Schneider, B. Persicasulphide C, a new sulphur-containing derivative from *Ferula persica*. *Nat. Prod. Res* 23, 1584-1588 (2009).
- Iranshahi, M., Sahebkar, A., Hosseini, S.T., Takasaki, M., Konoshima, T. & Tokuda, H. Cancer chemopreventive activity of diversin from *Ferula diversivittata* in vitro and in vivo. *Phytomedicine* 17, 269-273 (2010).
- Jabrane, A., Ben Jannet, H., Mighri, Z., Mirjolet, J.F., Duchamp, O., Harzallah-Skhiri, F. & Lacialle-Dubois, M. A. Two new sesquiterpene derivatives from the Tunisian endemic *Ferula tunetana* Pom. *Chem. Biodivers.* 7, 392-399 (2010).
- Kadyrov, A., Khasanov, T., Saidkhodzhaev, A. & Nikonov, G. New phenolic compounds of the roots of *Ferula tschimganica*. *Chemistry of Natural Compounds* 8, 796-797 (1972).
- Kadyrov, A., Saidkhodzhaev, A., Nikonov, G. & Melibaev, S. Coumarins and esters of *Ferula foliosa* and *F. ferganensis*. *Chemistry of Natural Compounds* 13, 587-588 (1977).
- Kajimoto, T., Yahiro, K. & Nohara, T. Sesquiterpenoid and disulphide derivatives from *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry* 28, 1761-1763 (1989).
- Kamilov, K. & Nikonov, G. Phenols of *Ferula prangifolia*. *Chemistry of Natural Compounds* 8, 702-703 (1972).
- Kamilov, K., Nikonov, G. & Sharakhimov, N. Esters of the roots of *Ferula fedtschenkoana*. *Chemistry of Natural Compounds* 10, 540 (1974).
- Krief, S., Thoison, O., Sévenet, T., Wrangham, R.W. & Lavaud, C. Triterpenoid Saponin Anthranilates from *Albizia grandibracteata* Leaves Ingested by Primates in Uganda. *Journal of Natural Products* 68, 897-903 (2005).
- Kerimov, S., Saidkhodzhaev, A. & Malikov, V. Esters of *Ferula calcarea*. *Chemistry of Natural Compounds* 23, 641 (1987).
- Khasanov, T., Saidkhodzhaev, A. & Nikonov, G. Components of the roots of *Ferula pallida*. *Chemistry of Natural Compounds* 8, 794-795 (1972).
- Kobilov, M.N., Saidkhodzhaev, A.I. & Abdullaev, N.D. Esters of *Ferula leucographa* structure of leucoferin. *Chemistry of Natural Compounds* 31, 530-531 (1995 a).
- Kobilov, M.N., Saidkhodzhaev, A.I. & Abdullaev, N.D. Esters of *Ferula nuratavica*. *Chemistry of Natural Compounds* 31, 273 (1995 b).
- Kogure, K., Yamauchi, I., Tokumura, A., Kondou K., Tanaka, N., Takaishi, Y. & Fukuzawa, K. Novel antioxidants isolated from plants of the genera *Ferula*, *Inula*, *Prangos* and *Rheum* collected in Uzbekistan. *Phytomedicine* 11, 645-651 (2004).
- Korovin, E.P. *Generis Ferula (Tourn.) L. Monographia Illustrata. Taschkent Graz.* (Academiae Scientiarum URSS, 1947).
- Lambert, J.B. & Mazzola, E.P. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy –An Introduction To Principles, Applications And Experimental Methods. (Upper Saddle River, New Jersey. 2003)



## BIBLIOGRAPHIE

- Lee, C., Chiang, L., Cheng, L., Liaw, C. Abd El-Razek, M. H. Chang F. & Wu, Y. Influenza A H1N1 antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products* 72, 1568-1572 (2009).
- Lee, J.H. Choi S., Lee, Y. Lee H. J., Kim, K. H. Ahn K. S., Bea H., Lee H. J., Lee E. O., Ahn K. S., Ryu S. Y., Lü J. & Kim S. H. Herbal compound farnesiferol C exerts antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades. *Mol. Cancer Ther.* 9, 389-399 (2010).
- Leguay, T., Desplat, V., Marit, G. & Mahon, F. D276G mutation is associated with a poor prognosis in imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 19, 2332-2333 (2005).
- Lhuillier, A., Fabre, N., Cheble, E., Oueida, F., Maurel, S., Valentin, A., Fourasté, I. & Moulis, C. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of Natural Products* 68, 468-471 (2005).
- Liu, J., Joha, S., Idziorek, T., Corm, S., Hetuin, D., Philippe, N., Preudhomme, C. & Quesnel, B. BCR-ABL mutants spread resistance to non-mutated cells through a paracrine mechanism. *Leukemia* 22, 791-799 (2008).
- Macomber, R. S. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. (Wiley Interscience, New York. 2002).
- Macho, A. et al. Calcium ionophoretic and apoptotic effects of ferutinin in the human Jurkat T-cell line. *Biochem. Pharmacol* 68, 875-883 (2004).
- Mahon, F.X., Deininger, M.W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M. & Melo, J.V. Selection and characterization of BCRABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96, 1070-1079 (2000).
- Maggi, F. Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M.M., Tirillini, B., Sagratini, G. & Papa, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy). *Fitoterapia* 80, 68-72 (2009).
- Maruta, Y., Kawabata, J. & Niki, R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 43, 2592-2595 (1995).
- Melo, J.V. & Chuah, C. Novel agents in CML therapy: tyrosine kinase inhibitors and beyond. *Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 427-435 (2008).
- Miski, M., Ulubelen, A. & Mabry, T.J. Six sesquiterpene alcohol esters from *Ferula elaeochytris*. *Phytochemistry* 22, 2231-2233 (1983).
- Miski, M., Ulubelen, A., Lee, E. & Mabry, T.J. Sesquiterpene-coumarin ethers of *Ferula tingitana*. *Journal of Natural Products* 48, 326-327 (1985).
- Miski, M., Mabry, T.J. & Saya, Ö. New Daucane and Germacrane Esters from *Ferula orientalis* var. *orientalis*. *Journal of Natural Products* 50, 829-834 (1987a).
- Miski, M., Mabry, T.J. & Saya, Ö. Apiene esters from *Ferula haussknechtii*. *Phytochemistry* 26, 1733-1737 (1987b).
- Nagatsu, A., Isaka, K., Kojima, K., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgiin, K., Irfan, B., Iqbal, C.M. & Ogihara, Y. New sesquiterpenes from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korovin. VI. Isolation and identification of three new dihydrofuro[2,3-b]chromones. *Chem. Pharm. Bull.* 50, 675-677 (2002).

## BIBLIOGRAPHIE

- Nazhimutdinova, N.N., Saidkhodzhaev, A.I. & Malikov, V.M. Esters of *Ferula tatarica*. *Chemistry of Natural Compounds* 31, 263 (1995).
- Montaudo, G. & Lattimer, R.P. Mass spectrometry of polymers. (CRC Press, Boca Raton. 2002).
- Neshati, V., Matin, M.M., Iranshahi, M., Bahrami, A.R., Behravan, J., Mollazadeh, S. & Rassouli, F.B. Cytotoxicity of vincristine on the 5637 cell line is enhanced by combination with conferone. *Z. Naturforsch., C, J. Biosci* 64, 317-322 (2009).
- Oughlissi-Dehak, K., Lawton, P., Michalet, S., Bayet, C., Darbour, N., Hadj-Mahammed, M., Badjah-Hadj-Ahmed, Y.A., Dijoux-Franca, M.-G. & Guilet, D. Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*. *Phytochemistry* 69, 1933-1938 (2008).
- Pauli, G.F., Poetsch, F. & Nahrstedt, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Analysis* 9, 177-185 (1998).
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Schmeda-Hirschmann, G., Burillo, J. & Codina, C. Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculul vulgare* Mill). *Waste. J. Agric. Food Chem.* 52, 1890-1897 (2004a).
- Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J. & Codina, C. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculul vulgare* ) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3679-3687 (2004b).
- Pimenov, M.G. & Leonov, M.V. The genera of the Umbelliferae: a nomenclator. (Royal Botanical Garden, Kew. 1993).
- Poli, F., Appendino, G., Sacchetti, G., Ballero, M., Maggiano, N. & Ranelletti, F.O. Antiproliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *F. arrigonii* on human colon cancer cell lines. *Phytother. Res.* 19, 152-157 (2005).
- Rekhlova, O., Tashkhodzhaev, B., Andrianov, V., Saidkhodzhaev, A., Sagitdinova, G. & Furmanova N. Crystal and molecular structure of the sesquiterpene humulane alcohol juniferol. *Chemistry of Natural Compounds* 26, 643-647 (1990).
- Rubiolo, P., Matteodo, M., Riccio, G., Ballero, M., Christen, P., Fleury-Souverain, S., Veuthey, J. L. & Bicchi, C. J. Analytical discrimination of poisonous and nonpoisonous chemotypes of giant fennel (*Ferula communis* L.) through their biologically active and volatile fractions. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7556-7563 (2006).
- Sağiroğlu, M. Türkiye *Ferula* L. (Umbelliferae) cinsi'nin revisyonu. Doktora tezi (biyoloji), Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara (2005).
- Sagitdinova, G.V., Saidkhodzhaev, A.I., Malikov, V.M. & Melibaev, S. Esters of *Ferula angrenii*. *Chemistry of Natural Compounds* 14, 692 (1978a).
- Sagitdinova, G.V., Saidkhodzhaev, A.I. & Malikov, V.M. The structures of juferin and juniferidin. *Chemistry of Natural Compounds* 14, 693-694 (1978b).
- Sagitdinova, G., Saidkhodzhaev, A. & Malikov, V. Components of the roots of *Ferula tschatcalensis*. *Chemistry of Natural Compounds* 19, 685-687 (1983).
- Saidkhodzhaev, A.I., Golovina, L.A., Malikov, V.M., Melibaev, S. & Rakhmankulov, U. Esters of three species of *Ferula*. *Chemistry of Natural Compounds* 21, 388-389 (1985).

## BIBLIOGRAPHIE

- Saidkhodzhaev, A.I., Malikov, V.M., Pimenov, M.G. & Melibaev, S. Esters from the roots of *Ferula kzylykumica* and *F. karategina*. *Chemistry of Natural Compounds* 29, 253-254 (1993a).
- Saidkhodzhaev, A.I., Malikov, V.M. & Pimenov, M.G. Esters of *Ferula karakalensis*. Structure and stereochemistry of karaferin and karaferinin. *Chemistry of Natural Compounds* 29, 187-190 (1993b).
- Saleem, M., Alam, A. & Sultana, S. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. *Life Sci* 68, 1913-1921 (2001). Saleem, M., Alam, A. & Sultana, S. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. *Life Sci* 68, 1913-1921 (2001).
- Sánchez-Contreras, S., Díaz-Lanza, A.M. & Bernabé, M. Four new triterpenoid saponins from the roots of *Bupleurum rigidum*. *Journal of Natural Products* 63, 1479-1482 (2000).
- Serkerov, S. 11,13-Dehydro-oopodin from the roots of *Ferula oopoda*. *Chemistry of Natural Compounds* 5, 410-413 (1969).
- Serkerov, S. A new sesquiterpene hydroxylactone from *Ferula oopoda*. *Chemistry of Natural Compounds* 7, 817-818 (1971).
- Serkerov, S. The structure of semopodin and a hydroxylactone from *Ferula oopoda*. *Chemistry of Natural Compounds* 12, 343-344 (1976).
- Shahverdi, A.R., Saadat, F., Khorramizadeh, M.R., Iranshahi, M. & Khoshayand, M.R. Two matrix metalloproteinases inhibitors from *Ferula persica* var. *persica*. *Phytomedicine* 13, 712-717 (2006).
- Silverstein R.M., Basler, G. C. & Morill, T.C. Identification spectrométrique de composés organiques. (De Boeck université, Paris, Bruxelles.1998).
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghghi, F. & Behravan, J. Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell Biol. Toxicol* 25, 291-296 (2009).
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghghi, F. & Behravan, J. Auraptene from *Ferula szowitsiana* protects human peripheral lymphocytes against oxidative stress. *Phytotherapy Research* 24, 85-89 (2010).
- Suzuki, K., Okasaka, M., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., Ashurmetov, O., Sekiya, M. & Ikeshiro Y. Sesquiterpene Lactones from the Roots of *Ferula varia* and Their Cytotoxic Activity. *Journal of Natural Products* 70, 1915-1918 (2007).
- Tamemoto, K. Takaishi Y., Kawazoe K., Honda G., Ito M., Kiuchi F. Takeda Y., Kodzhimatov O. K., Ashurmetov O., Shimizu K., Nagasawa H., Uto Y., Hori H. O., An unusual sesquiterpene derivative from *Ferula kuhistanica*. *Journal of Natural Product* 65, 1323-1324 (2002).
- Treuil, P. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. *Actualités Pharmaceutiques* 47, 25-30 (2008).
- Tulliez, M. Traitement de la leucémie myéloïde chronique en 2007. *Revue Francophone des Laboratoires*, 25-29 (2007).
- Vardiman, J.W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951 (2009).

## BIBLIOGRAPHIE

Wagner, H., Bladt, S., Zagajski, E.M. Drogenanalyse–Dünnschicht-Chromatographische Analyse Von Arzneidrogen. (Springer-Verlag, Berlin. 1983)

Yang, J., An, Z., Li, Z., Jing, S. & Qina, H. Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula sinkiangensis* and *Ferula teterrima*. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 1595-1598 (2006).

Zhou, P. et al. Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* 53, 689-697 (2000).

## ANNEXE 1

### Données physiques et spectrales des nouveaux composés :

**Lyciférine A** : Huile,  $[\alpha]_D^{(21^\circ)}$  -24,0 (*c* 0,5 ; EtOH) ;  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (tableau 13) ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3457, 2925, 1716, 1632, 1384, 1239, 1159, 1041, 1016, 963  $\text{cm}^{-1}$  ; SM-ESI  $m/z$  343  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ; SM-HR-ESI  $m/z$  343,2239  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{Na}$ , 343,2249).

**Lyciférine B** : Huile;  $[\alpha]_D^{(21^\circ)}$  -39,4 (*c* 0,5 ; EtOH) ;  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (tableau 14) ; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  2928, 1736, 1716, 1456, 1383, 1236, 1159, 1041, 1016, 963  $\text{cm}^{-1}$  ; SM-ESI  $m/z$  385  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ; MS-HR-ESI  $m/z$  385,2340  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Na}$ , 385,2349).

**Lyciférine C** : Huile;  $[\alpha]_D^{(21^\circ)}$  -3,2 (*c* 0,2; EtOH) ;  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (tableau 15) ; UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \varepsilon$ ) 227 (3,92) nm, IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  3457, 2924, 2853, 1717, 1709, 1642, 1462, 1384, 1239, 1159, 1041, 1016, 963  $\text{cm}^{-1}$  ; SM-ESI  $m/z$  343  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ; SM-HR-ESI  $m/z$  365,2081  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Na}$ , 365,2093).

**Lyciférine D** : Huile;  $[\alpha]_D^{(21^\circ)}$  +1,3 (*c* 0,2; EtOH) ;  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (tableau 16) ; UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \varepsilon$ ) 227 (3,93) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  2924, 2853, 1717, 1709, 1642, 1462, 1384, 1239, 1159, 1041, 1016, 963  $\text{cm}^{-1}$  ; SM-ESI  $m/z$  385  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ; SM-HR-ESI  $m/z$  407,2185  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Na}$ , 407,2193).

**Lyciférine E** : Huile;  $[\alpha]_D^{(21^\circ)}$  +24,6 (*c* 0,5; EtOH) ;  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (tableau 18) ; UV ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\log \varepsilon$ ) 262 (4,29), 292 (3,83) nm; IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  2938, 2853, 1719, 1683, 1610, 1444, 1277, 1234, 1100, 975, 961  $\text{cm}^{-1}$  ; SM-ESI  $m/z$  453  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  , SM-HR-ESI  $m/z$  453,2236  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd. for  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Na}$ , 453,2248).

## ANNEXE 1

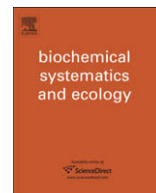
**Elaeochytrine A** : Huile;  $[\alpha]_D^{(20^\circ)}$  +27,6 (*c* 0,5; CH<sub>3</sub>OH) ; <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (tableau 26) ; UV (CH<sub>3</sub>OH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 217 (4,29), 249 (1,70), 340 (0,85) nm ; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3482, 3372, 2969, 2922, 1678, 1610, 1579, 1448, 1239, 1093, 753 cm<sup>-1</sup>; SM-ESI *m/z* 358 [M+H]<sup>+</sup>, SM-HR-ESI *m/z* 380,2191 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>3</sub>Na, 380,2202)

**Elaeochytrine B** : Huile;  $[\alpha]_D^{(20^\circ)}$  +29 (*c* 0,5 ; CH<sub>3</sub>OH) ; <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (tableau 30) ; UV (CH<sub>3</sub>OH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) 259 (4,1) nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3430, 2959, 2912, 2844, 1694, 1605, 1291, 1166 cm<sup>-1</sup>; SM-IC *m/z* 358 [M]<sup>+</sup>, SM-HR-ESI *m/z* 381,2052 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>Na, 381,2041)

**Coumarins, caffeoyl derivatives and a monoterpenoid  
glycoside from *Ferulago asparagifolia***

Biochemical Systematics and Ecology, 37, 230–233(2009)

Article et les données supplémentaires



## Coumarins, caffeoyl derivatives and a monoterpenoid glycoside from *Ferulago asparagifolia*

R. Alkhatib<sup>a</sup>, T. Hennebelle<sup>a,\*</sup>, V. Roumy<sup>a</sup>, S. Sahpaz<sup>a</sup>, S. Süzgeç<sup>b</sup>, E. Akalın<sup>c</sup>,  
A.H. Meriçli<sup>b</sup>, F. Bailleul<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Pharmacognosie, EA 1043, Faculté de Pharmacie, Université Lille Nord de France (Lille 2), 3 rue du Professeur Laguesse, 59000 Lille, France

<sup>b</sup>Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34116 Istanbul, Turkey

<sup>c</sup>Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34116 Istanbul, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 November 2008

Accepted 15 March 2009

#### Keywords:

*Ferulago asparagifolia*

Apiaceae

Corsicarin

Pyranocoumarin

Furanocoumarin

Monoterpenoid glycoside

### 1. Subject and source

*Ferulago asparagifolia* Boiss. (Apiaceae), a species growing in Turkey (Peşmen, 1972; Davis et al., 1988), was collected from Sultan Yaylası, Sipil Dağı (Manisa) in June 2007, and identified by Dr. Emine Akalın. A voucher specimen (no. 72415) is deposited in the Herbarium of Faculty of Pharmacy, Istanbul University (ISTE).

### 2. Previous works

Five compounds have previously been isolated from the aerial parts of *F. asparagifolia* (the name was misspelled *Ferulago asperigifolia*). These were two coumarins, ostenol and prantschimgin (2''-seneciolylmarmesin), and three flavonoids, rhamnetin, isorhamnetin-3-galactoside and rutin (Doğanca et al., 1992).

Moreover, the composition of the essential oil of fruits from two Turkish samples of *F. asparagifolia* has been studied. From a sample collected near Antalya and prepared by hydrodistillation, 2,3,6-trimethylbenzaldehyde (38.9%) and myrcene (18.2%) were isolated as the major compounds (Demirci et al., 2000). From another sample collected near Ephesus and prepared by microdistillation, 2,3,6-trimethylbenzaldehyde (42.0%),  $\alpha$ -pinene (11.4%) and *trans*-chrysanthenyl acetate (5.2%) were isolated (Başer et al., 2002).

\* Corresponding author. Tel./fax: +33 3 2096 4039.

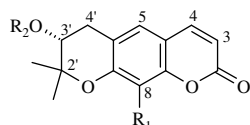
E-mail address: [thierry.hennebelle@univ-lille2.fr](mailto:thierry.hennebelle@univ-lille2.fr) (T. Hennebelle).



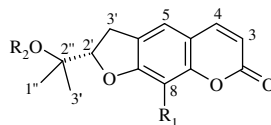
### 3. Present study

The roots of *F. asparagifolia* (500 g) were dried, powdered and extracted successively with light petroleum, EtOAc and MeOH at room temperature. Extracts were then evaporated and lyophilised. The EtOAc extract (4.0 g) was chromatographed over silica gel columns. The MeOH extract (17.7 g) was submitted to reverse phase medium pressure liquid chromatography (RP-MPLC) and compounds were purified on Sephadex LH-20 columns. Eleven compounds were isolated and identified by NMR, mass spectrometry, optical rotation and by comparison with data already published. Six of them were isolated from the EtOAc extract and they were all known compounds: aegelinol **1**, 3'-seneciolyaegelinol (=grandivittin) **2**, a 2:1 mixture of grandivittin and 3'-angeloylaegelinol (=agasyllin) **3** (Erdelmeier and Sticher, 1985), prantschimgin **4** (Khalighi-Sigaroodi et al., 2006), 8-methylpsoralen **5** (Duddeck and Kaiser, 1982), and umbelliferone **6** (Khalighi-Sigaroodi et al., 2006). The other compounds **7–11** were isolated from the MeOH extract. With the exception of the compound **7** the others were all known: rutarin **8** (Okuyama et al., 1989), 5-(*E*)-caffeoylquinic acid (=chlorogenic acid) **9**, 3,5-di-(*E,E*)-caffeoylquinic acid **10** (Pauli et al., 1998), (–)-angelicoidenol-2-*O*-β-apiofuranosyl-(1 → 6)-β-glucopyranoside **11** (Kitajima et al., 1998; Takeuchi et al., 2004; Sahpaz et al., 2002).

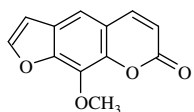
The structure of compound **7** (Table 1) was determined by comparing its data with that available. It shared spectral characteristics with rutarin (**8**): presence of a glucose moiety, which was shown by HMBC to be linked to the coumarin aglycone through a hydroxyl group on C-8. Nevertheless, NMR signals of the saturated part of the aglycone differed from rutarin, showing that it was not a dihydrofuranocoumarin but rather a dihydropyranocoumarin. Published data strongly suggest that, although compounds such as marmesin and decursinol have the same molecular formula and share spectral features for their saturated part (due to five carbons: two primary, one secondary, one hydroxyl-attached tertiary and one quaternary, all of which are easily seen in a jmod <sup>13</sup>C NMR experiment), signals of the tertiary carbon and its linked hydrogen are easily distinguished in NMR: ca δ<sub>H</sub> 4.7 and δ<sub>C</sub> 85–90 for 2'-(2-hydroxyisopropyl)dihydrofuranocoumarins (in our case, δ<sub>H</sub> 4.79 and δ<sub>C</sub> 91.4 for position C-2' of rutarin, **8**); ca δ<sub>H</sub> 3.9 and δ<sub>C</sub> 70 for 3'-hydroxydihydropyranocoumarins (in our case, δ<sub>H</sub> 3.85 and δ<sub>C</sub> 67.9 for position C-3' of **7**) (Chatterjee et al., 1978; Duddeck and Kaiser, 1982; Ishii and Hosoya, 1972; Jiménez et al., 2000; Lemmich, 1995; Nemoto et al., 2003). According to the literature, the 3'-epimer of compound **7** had been reported as a new compound isolated from *Ruta corsica* DC (Rutaceae) and named corsicarin (Bertrand et al., 2004). The published data do not agree with our findings or with the chemical shift data in published works cited above. The fact that the NMR data for position C-3' are δ<sub>H</sub> 4.68 and δ<sub>C</sub> 91.3 leads us to think that corsicarin is not a 3'-hydroxydihydropyranocoumarin as described, but may be the corresponding 2'-(2-hydroxyisopropyl)dihydrofuranocoumarin, i.e. rutarin (Malikov and Saidkhodzhaev, 1998; Okuyama et al., 1989). Moreover, the <sup>1</sup>H NMR chemical shift of position C-3' of arnottianin, in the paper that was cited in support of the structural determination of corsicarin, was δ<sub>H</sub> 3.86 (Ishii and Hosoya, 1972), which was consistent with a dihydropyranocoumarin but clearly differed from the chemical shift of the proton at the corresponding position in corsicarin (δ<sub>H</sub> 4.68). We consequently consider compound **7** to be new and have named it asparagifolin. The absolute configuration



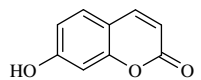
- 1 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H
- 2 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = senecioyl
- 3 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = angeloyl
- 7 R<sub>1</sub> = O-β-glucose, R<sub>2</sub> = H



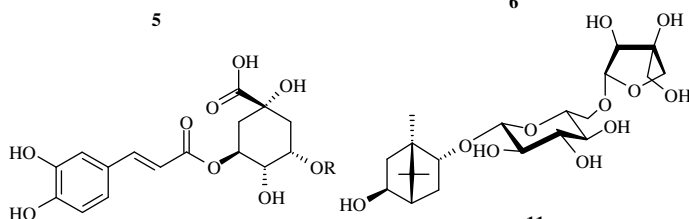
- 4 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = senecioyl
- 8 R<sub>1</sub> = O-β-glucose, R<sub>2</sub> = H



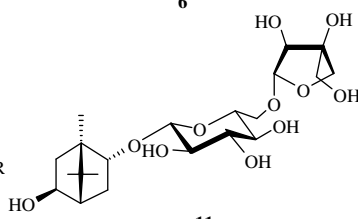
5



6



- 9 R = H
- 10 R = (*E*)-caffeoyl



11

**Table 1**<sup>1</sup>H (500 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (125 MHz) data of compound **7** in CD<sub>3</sub>OD.

	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	–	161.8
<b>3</b>	6.25 d (9.5)	111.9
<b>4</b>	7.84 d (9.5)	144.7
<b>5</b>	7.17 s	123.7
<b>6</b>	–	118.4
<b>7</b>	–	149.2
<b>8</b>	–	131.6
<b>9</b>	–	146.1
<b>10</b>	–	112.9
<b>2'</b>	–	78.9
<b>3'</b>	3.85 dd (6.2, 4.9)	67.9
<b>4'a</b>	3.15 dd (16.9, 4.8)	30.4
<b>4'b</b>	2.84 dd (16.9, 6.3)	
<b>CH<sub>2</sub></b>	1.43 s	24.4
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.41 s	20.7
<b>1''</b>	5.13 d (7.3)	103.3
<b>2''</b>	3.58 dd (7.3, 9.6)	74.5
<b>3''</b>	3.46 t (9.4)	76.3
<b>4''</b>	3.44 t (9.4)	70.1
<b>5''</b>	3.26 ddd (9.2, 5.4, 2.1)	77.1
<b>6''a</b>	3.79 dd (12.0, 2.7)	61.6
<b>6''b</b>	3.68 dd (12.0, 5.7)	

Assignments were confirmed by H–H COSY, HSQC, HMBC, selective TOCSY and NOESY.

of C-3' could not be determined because spectral data of  $\alpha$  and  $\beta$  epimers do not significantly differ. Optical rotation of all the other dihydropyranocoumarins reported corresponded to an  $\alpha$  configuration, so **7** was tentatively assigned the  $\alpha$  configuration as well.

Compound **7** (asparagifolin): white powder,  $[\alpha]_D^{20}$   $-22^\circ$  (c 0.5, MeOH), UV  $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 217 (6.47), 328 (6.49); IR (KBr)  $\nu_{\max}$ : 3400, 2359, 1704, 1619, 1409, 1062, 826  $\text{cm}^{-1}$ . NMR: see Table 1. ESIMS  $m/z$ : positive mode 447 [M + Na]<sup>+</sup>, 425 [M + H]<sup>+</sup>, MS/MS (425) 263 [M – 162]<sup>+</sup>, 245 [M – 162 – 18]<sup>+</sup>. HR-ESIMS  $m/z$ : 447.1190 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>Na, 447.1261).

#### 4. Chemotaxonomic significance

Linear furanocoumarins are one of the major phytochemical groups in plants belonging to the genus *Ferulago*. Prant-schimgin **4** occurs in several *Ferulago* species: *Ferulago bernardii* L. Tomkovich & M. Pimenov (Khalighi-Sigaroodi et al., 2006), *Ferulago syriaca* Boiss., *Ferulago isaurica* Peşmen (Erdurak Kılıç and Coşkun, 2006), *Ferulago capillaris* Cout., *Ferulago brachyloba* Boiss. & Reut. ex Boiss. (Jiménez et al., 2000), *Ferulago aucheri* Boiss. (Doğanca et al., 1991), *Ferulago pauciflora* K. Koch (= *Ferulago sylvatica* Rchb.) (Sklyar et al., 1982), *Ferulago granatensis* Boiss. (De Pascual et al., 1979), *Ferulago meoides* Boiss. (= *Ferulago confusa* Velen.) (Ognyanov and Bocheva, 1969). It has however been isolated from other genera in the Apiaceae family, such as *Cachrys* (Komissarenko, 1969) and *Prangos* (Kuznetsova and Belenovskaya, 1966). In contrast, the dihydropyranocoumarins identified here seem to be uncommon in the genus *Ferulago*. Only one pyranocoumarin has been reported in *Ferulago nodosa* (L.) Boiss. (Ruberto et al., 1994) whereas compounds **1–3** were reported in the genera *Eryngium*, *Seseli* and *Agasyllis* of the Apiaceae family (Erdelmeier and Sticher, 1985). Although monoterpenes were isolated from *F. nodosa* (L.) Boiss. (Ruberto et al., 1994), *F. pauciflora* K. Koch (Sklyar et al., 1982) and *Ferulago antiochia* Saya & Miski (Miski et al., 1990), this is the first report of a monoterpenoid glycoside such as compound **11** in the genus *Ferulago*.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Alexandra Mascret for her participation in this work and Pr. Nathalie Azaroual, of the Laboratoire d'Application de Résonance Magnétique Nucléaire (LARMN), University of Lille 2, for her help in the management of selective NMR experiments.

#### Supplementary data

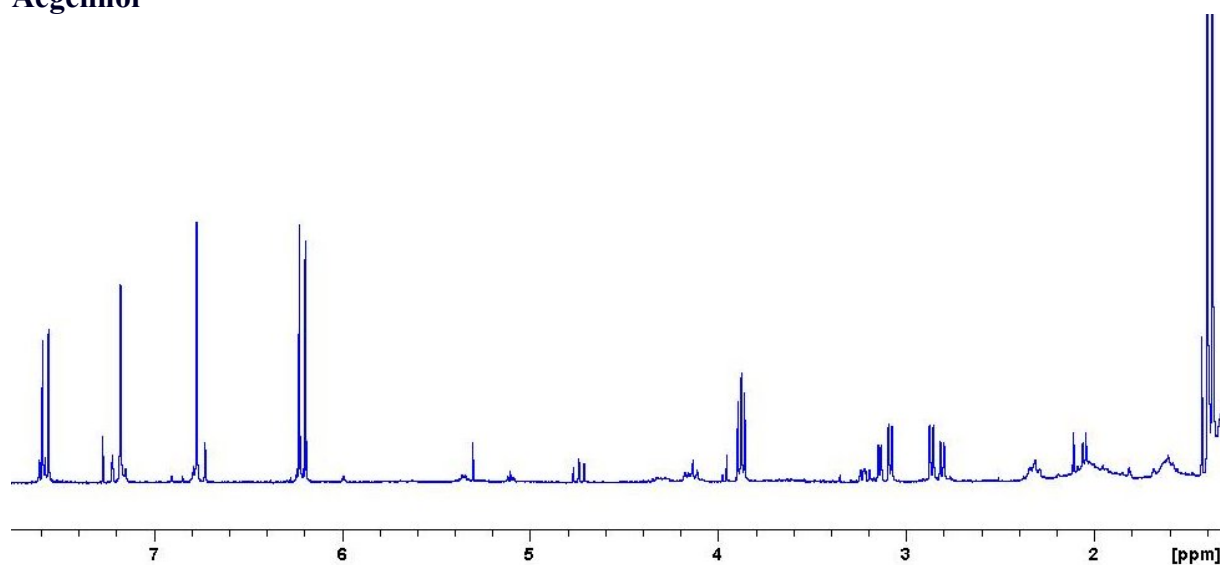
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bse.2009.03.003.

#### References

- Başer, K.H.C., Demirci, B., Özek, T., Akalın, E., Özhatay, N., 2002. Pharm. Biol. 40, 466.
- Bertrand, C., Fabre, N., Moulis, C., 2004. Fitoterapia 75, 242.
- Chatterjee, A., Sen, R., Ganguly, D., 1978. Phytochemistry 17, 328.
- Davis, P.H., Mill, R.R., Tan, K. (Eds.), 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 10. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 152–153.

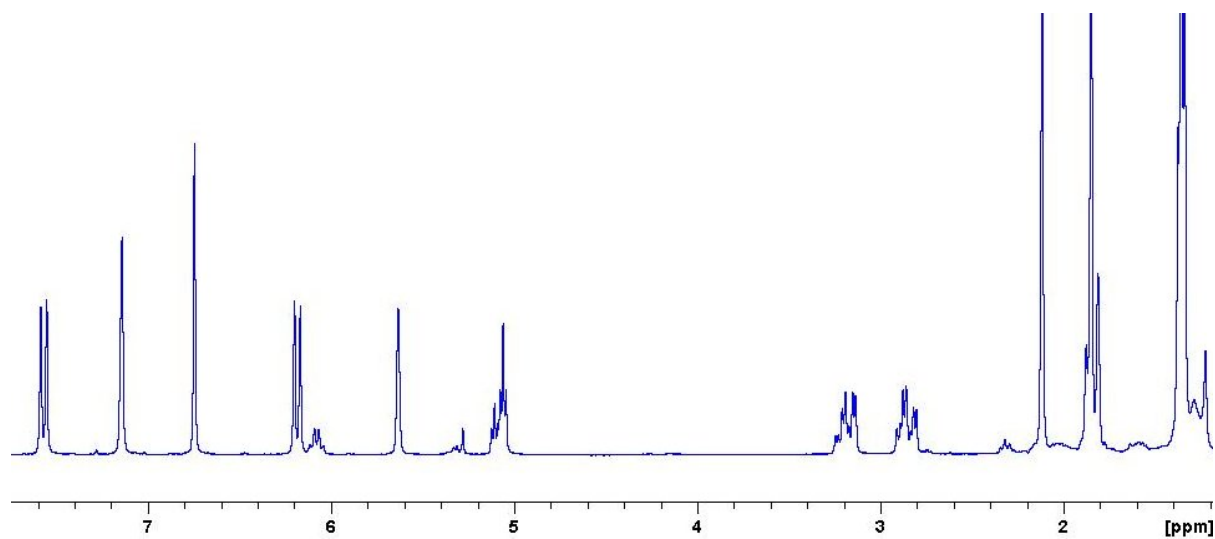
- Demirci, F., İřcan, G., Güven, K., Kırımer, N., Demirci, B., Bařer, K.H.C., 2000. Z. Naturforsch. C 55, 886.
- De Pascual, T.J., Jiméneş, B., Corrales, B., Grande, M., 1979. An. Quim. 75, 175.
- Doęanca, S., Tuzlacı, E., Ulubelen, A., 1992. Fitoterapia 63, 552.
- Doęanca, S., Ulubelen, A., Tuzlacı, E., 1991. Phytochemistry 30, 2803.
- Duddeck, H., Kaiser, M., 1982. Org. Magn. Reson. 20, 55.
- Erdelmeier, C.A.J., Sticher, O., 1985. Planta Med. 51, 407.
- Erdurak Kılıç, C.S., Cořkun, M., 2006. Chem. Nat. Compd. 42, 351.
- Ishii, H., Hosoya, K., 1972. Chem. Pharm. Bull. 20, 860.
- Jiméneş, B., Grande, M.C., Anaya, J., Torres, P., Grande, M., 2000. Phytochemistry 53, 1025.
- Khalighi-Sigaroodi, F., Hadjiakhoondi, A., Shafiee, A., Mozaffarian, V.A., Shahverdi, A.R., Alavi, S.H.R., 2006. DARU 14, 214.
- Kitajima, J., Okamura, C., Ishikawa, T., Tanaka, Y., 1998. Chem. Pharm. Bull. 46, 1595.
- Komissarenko, N.F., 1969. Chem. Nat. Compd. 5, 177.
- Kuznetsova, G.A., Belenovskaya, L.M., 1966. Chem. Nat. Compd. 2, 235.
- Lemmich, J., 1995. Phytochemistry 38, 427.
- Malikov, V.M., Saidkhodzhaev, A.I., 1998. Chem. Nat. Compd. 34, 517.
- Miski, M., Moubasher, H.A., Mabry, T.J., 1990. Phytochemistry 29, 881.
- Nemoto, T., Ohshima, T., Shibasaki, M., 2003. Tetrahedron 59, 6889.
- Ognyanov, I., Bocheva, D., 1969. Planta Med. 17, 65.
- Okuyama, T., Takata, M., Shibata, S., 1989. Planta Med. 55, 64.
- Pauli, G.F., Poetsch, F., Nahrstedt, A., 1998. Phytochem. Anal. 9, 177.
- Peřmen, H., 1972. *Ferulago* W. Koch. In: Davis, P.H. (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 4. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 453–471.
- Ruberto, G., Cannizzo, S., Amico, V., Bizzini, M., Piatelli, M., 1994. J. Nat. Prod. 57, 1731.
- Sahpaz, S., Hennebelle, T., Bailleul, F., 2002. Nat. Prod. Lett. 16, 195.
- Sklyar, Y.E., Andrianova, V.B., Pimenov, M.G., 1982. Chem. Nat. Compd. 18, 488.
- Takeuchi, H., Lu, Z.G., Fujita, T., 2004. Biosci. Biotech. Biochem. 68, 1131.

**NMR of Compound 1 (300 MHz/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  
**Aegelinol**



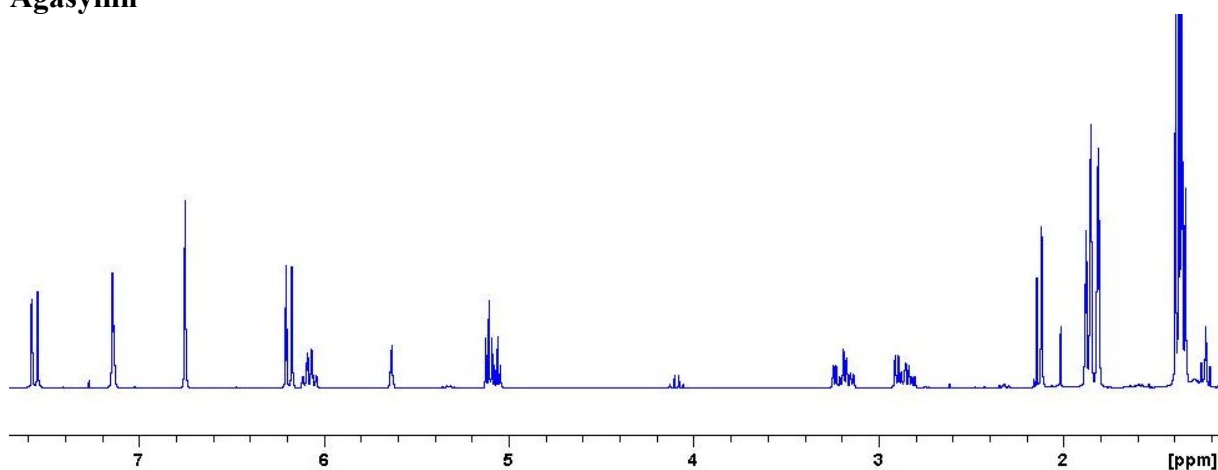
Compound 1		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	161.3
<b>3</b>	6.21 d (9.5)	113.3
<b>4</b>	7.58 d (9.5)	143.3
<b>5</b>	7.18 s	129.1
<b>6</b>	-	116.5
<b>7</b>	-	156.5
<b>8</b>	6.77 s	104.7
<b>9</b>	-	154.1
<b>10</b>	-	112.9
<b>2'</b>	-	78.3
<b>3'</b>	3.88 dd (5.8, 4.9)	69.0
<b>4'a</b>	2.84 dd (17.0, 5.8)	30.7
<b>4'b</b>	3.12 dd (17.0, 4.9)	
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.34 s	22.3
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.37 s	25.0

**NMR of Compound 2 (300 MHz/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
Grandivittin**



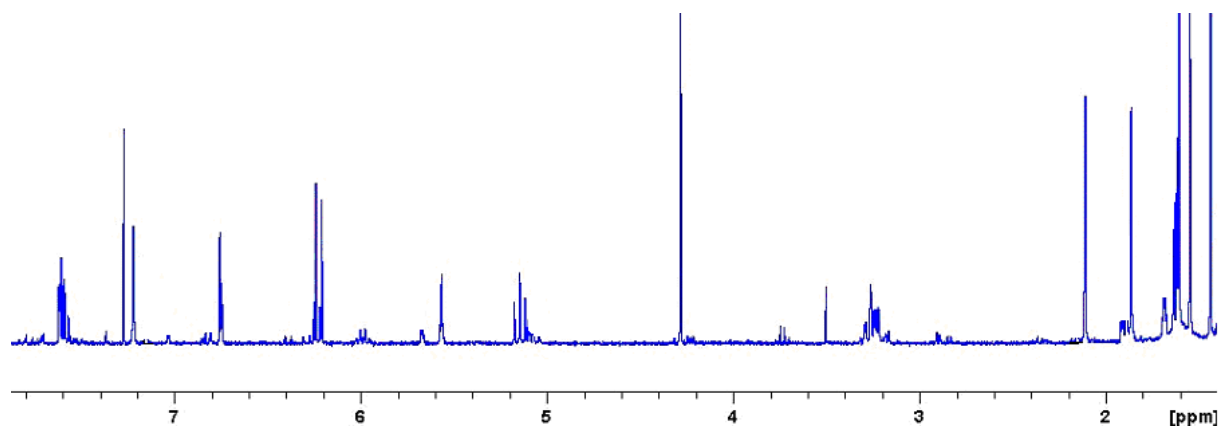
Compound 2		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	161.1
<b>3</b>	6.18 d (9.5)	113.5
<b>4</b>	7.58 d (9.5)	143.4
<b>5</b>	7.14 s	128.7
<b>6</b>	-	116.0
<b>7</b>	-	156.5
<b>8</b>	6.74 s	104.6
<b>9</b>	-	154.2
<b>10</b>	-	112.8
<b>2'</b>	-	76.7
<b>3'</b>	5.06 dd like t (4.8, 4.5)	70.0
<b>4'a</b>	2.84 dd (17.1, 4.8)	27.9
<b>4'b</b>	3.17 dd (17.1, 4.5)	
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.34 s	23.2
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.35 s	25.1
<b>1''</b>	-	167.1
<b>2''</b>	5.63 s	115.8
<b>3''</b>	-	158.5
<b>4''</b>	2.12 s	20.6
<b>5''</b>	1.85 s	27.6

**NMR of Compound 3 (300 MHz/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  
**Agasyllin**



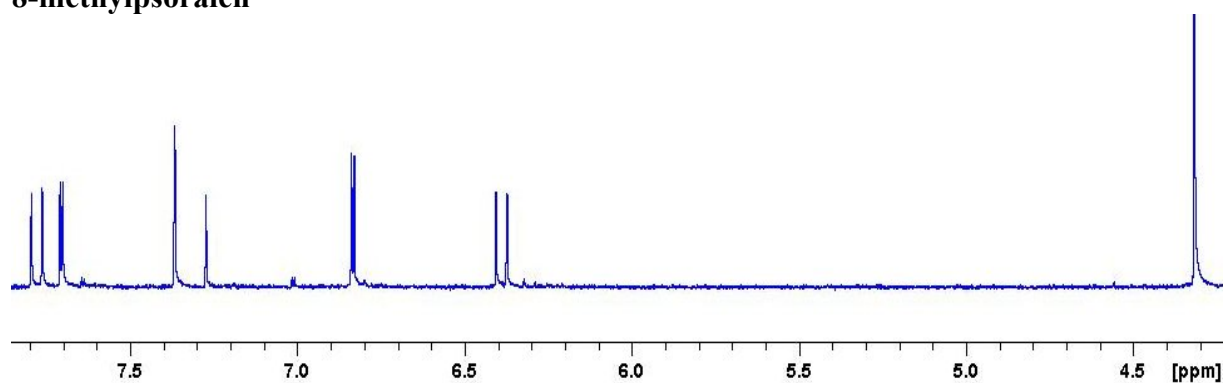
<b>Compound 3</b>		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	161.1
<b>3</b>	6.18 d (9.5)	113.5
<b>4</b>	7.58 d (9.5)	143.4
<b>5</b>	7.14 s	128.7
<b>6</b>	-	116.0
<b>7</b>	-	156.5
<b>8</b>	6.74 s	104.6
<b>9</b>	-	154.2
<b>10</b>	-	112.8
<b>2'</b>	-	76.7
<b>3'</b>	5.06 dd like t (4.8, 4.5)	70.0
<b>4'a</b>	2.84 dd (17.1, 4.8)	27.9
<b>4'b</b>	3.17 dd (17.1, 4.5)	
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.34 s	23.2
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.35 s	25.1
<b>Ang</b>		
<b>1''</b>	-	166.9
<b>2''</b>	-	127.4
<b>3''</b>	6.08 m	139.4
<b>4''</b>	1.89 d (7.2)	15.7
<b>5''</b>	1.81 s	20.5

**NMR of Compound 4 (300 MHz/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  
**Prantschimgin**



Compound 4		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	161.6
<b>3</b>	6.20 d (9.5)	112.9
<b>4</b>	7.61 d (9.5)	143.5
<b>5</b>	7.21 s	123.6
<b>6</b>	-	124.9
<b>7</b>	-	163.9
<b>8</b>	6.76 s	98.5
<b>9</b>	-	155.6
<b>10</b>	-	112.8
<b>2'</b>	5.13 dd (8.0, 1.8)	88.9
<b>3'</b>	3.26 m	30.1
<b>1'''</b>	-	81.3
<b>2'''</b>	1.60 s	22.4
<b>3'''</b>	1.34 s	21.1
<b>1''</b>	-	166.5
<b>2''</b>	5.56 s	117.4
<b>3''</b>	-	156.5
<b>4''</b>	2.12 s	27.4
<b>5''</b>	1.85 s	20.6

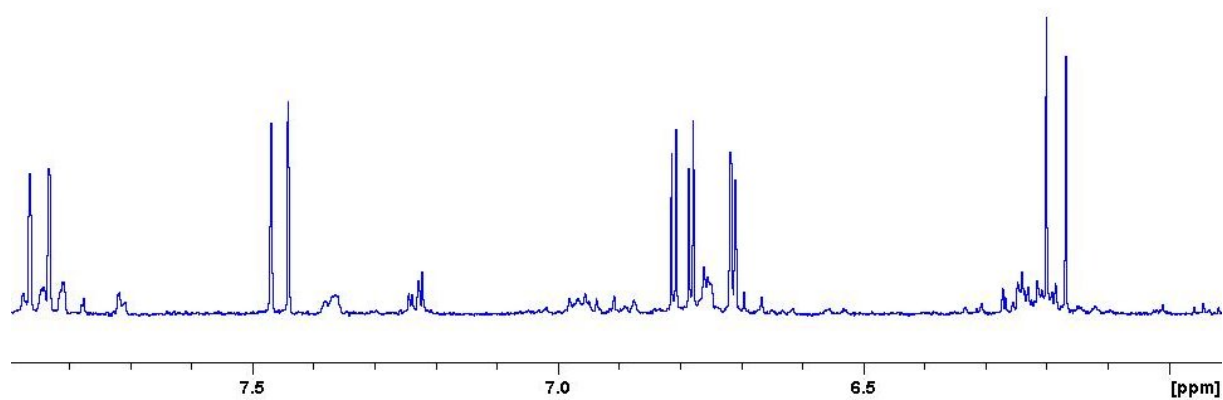
**NMR of Compound 5 (300 MHz/75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  
**8-methylpsoralen**



Compound 5		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	160.5
<b>3</b>	6.38 d (9.4)	115.3
<b>4</b>	7.78 d (9.4)	144.2
<b>5</b>	7.36 s	113.5
<b>6</b>	-	126.1
<b>7</b>	-	147.8
<b>8</b>	-	133.0
<b>9</b>	-	142.7
<b>10</b>	-	116.0
<b>2'</b>	7.71 d (2.2)	147.3
<b>3'</b>	6.83 d (2.2)	106.9
<b>OCH<sub>3</sub></b>	4.31 s	61.7

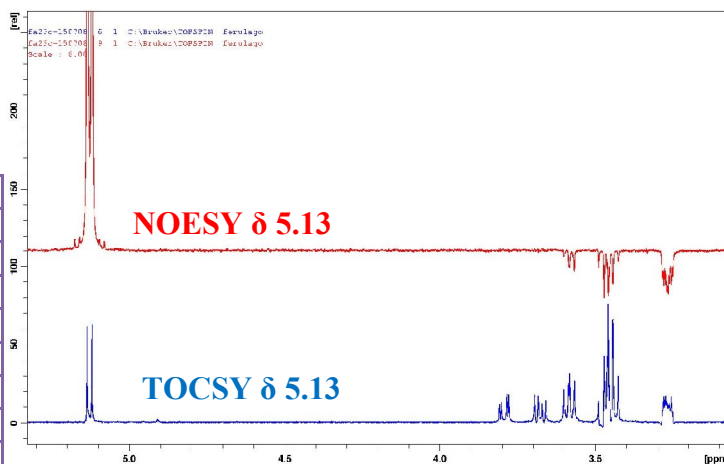
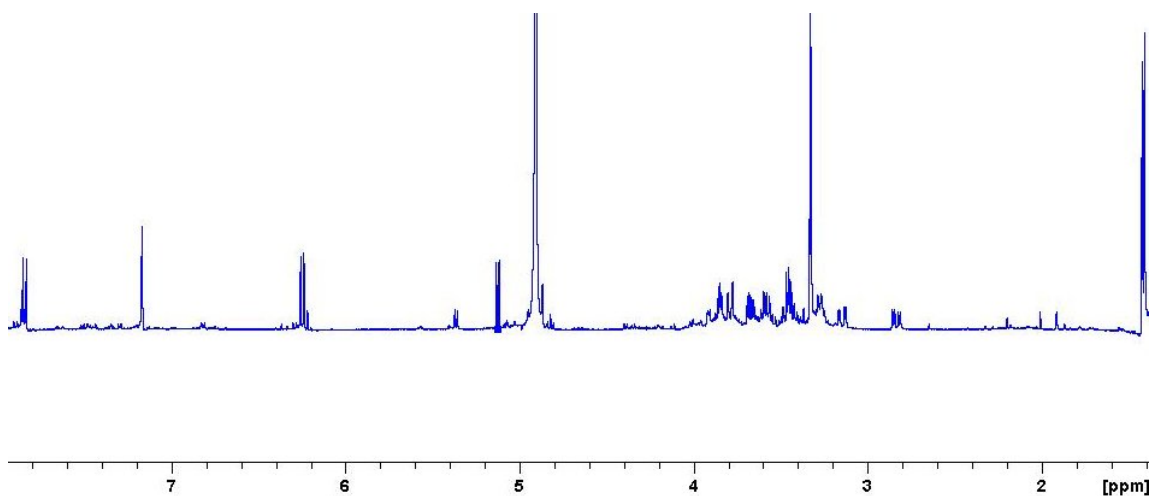


**NMR of Compound 6 (300 MHz/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  
**Umbelliferone**



Compound 6		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	161.8
<b>3</b>	6.19 d (9.5)	111.7
<b>4</b>	7.85 d (9.5)	145.0
<b>5</b>	7.46 d (9.5)	130.2
<b>6</b>	6.78 dd (9.5, 1.5)	113.7
<b>7</b>	-	160.9
<b>8</b>	6.71 d (1.5)	102.7
<b>9</b>	-	156.0
<b>4a</b>	-	111.7

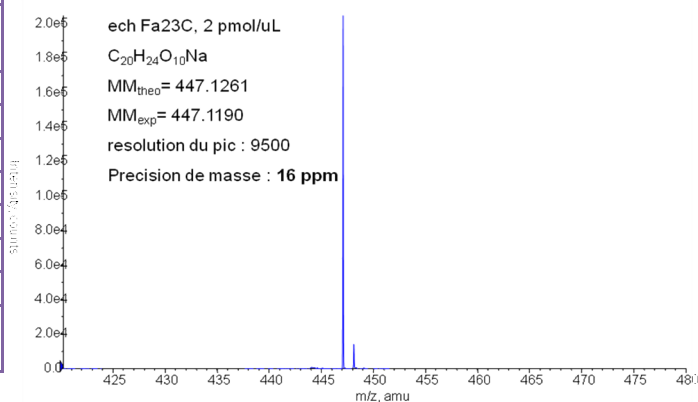
**NMR of Compound 7 (500 MHz/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  
Asparagifolin**

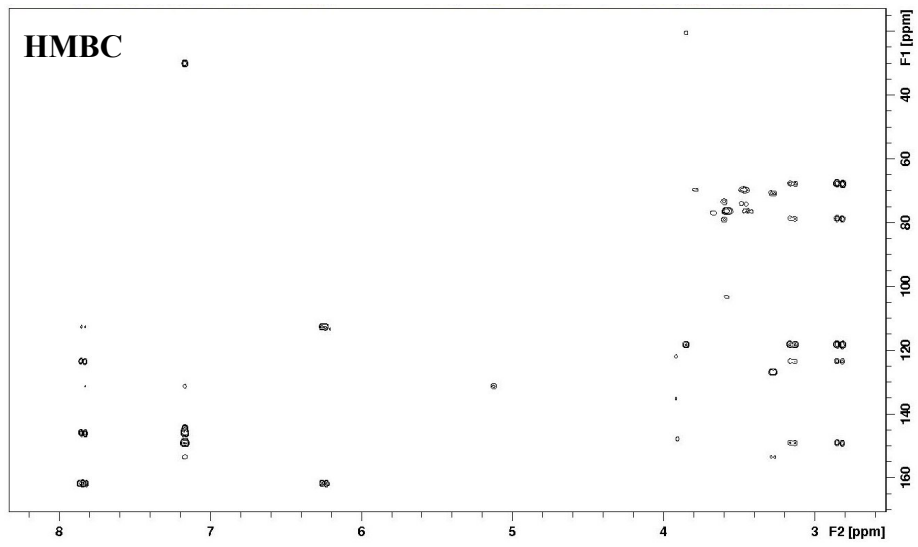
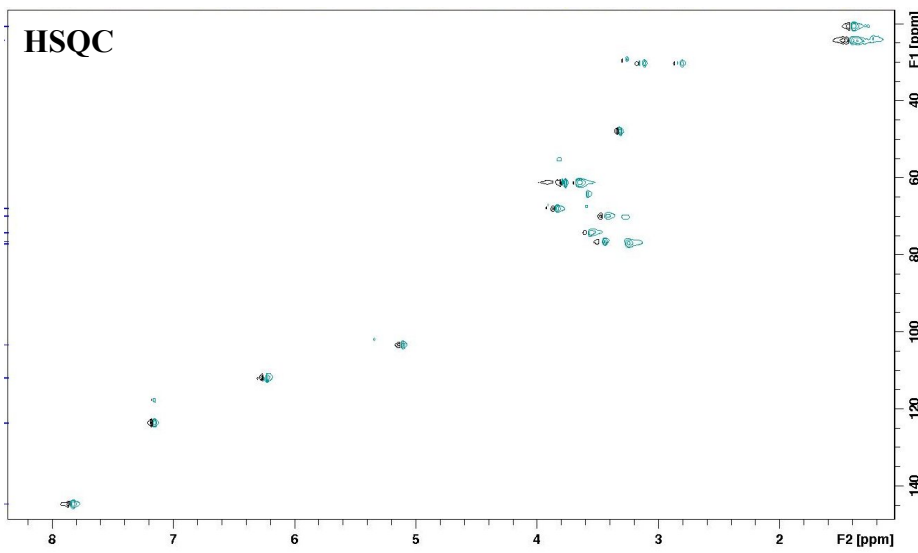
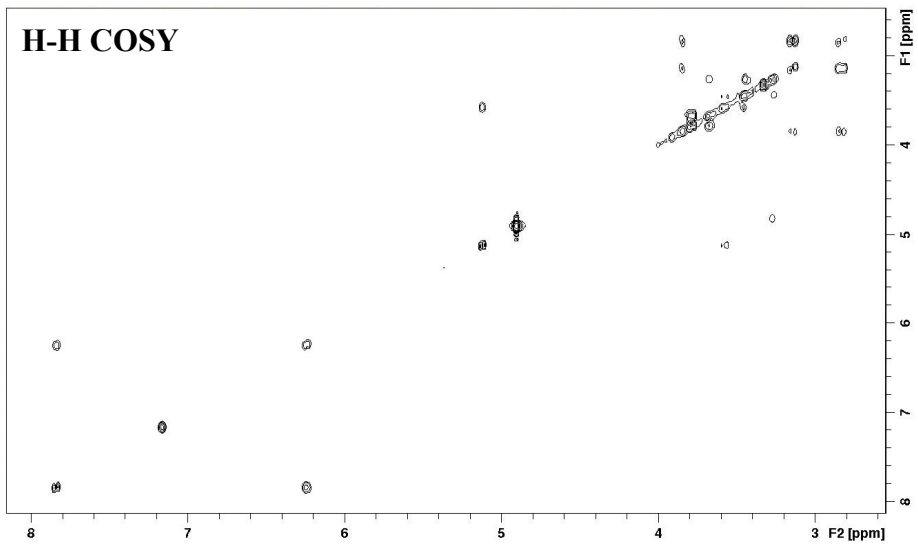


Compound 7		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
2	-	161.8
3	6.25 d (9.5)	111.9
4	7.84 d (9.5)	144.7
5	7.17 s	123.7
6	-	118.4
7	-	149.2
8	-	131.6
9	-	146.1
10	-	112.9
2'	-	78.9
3'	3.85 dd (6.2, 4.9)	67.9
4'a	3.15 dd (16.9, 4.8)	30.4
4'b	2.84 dd (16.9, 6.3)	
CH <sub>3</sub>	1.43 s	24.4
CH <sub>3</sub>	1.41 s	20.7
1''	5.13 d (7.3)	103.3
2''	3.58 dd (7.3, 9.6)	74.5
3''	3.46 t (9.4)	76.3
4''	3.44 t (9.4)	70.1
5''	3.26 ddd (9.2, 5.4, 2.1)	77.1
6''a	3.79 dd (12.0, 2.7)	61.6
6''b	3.68 dd (12.0, 5.7)	

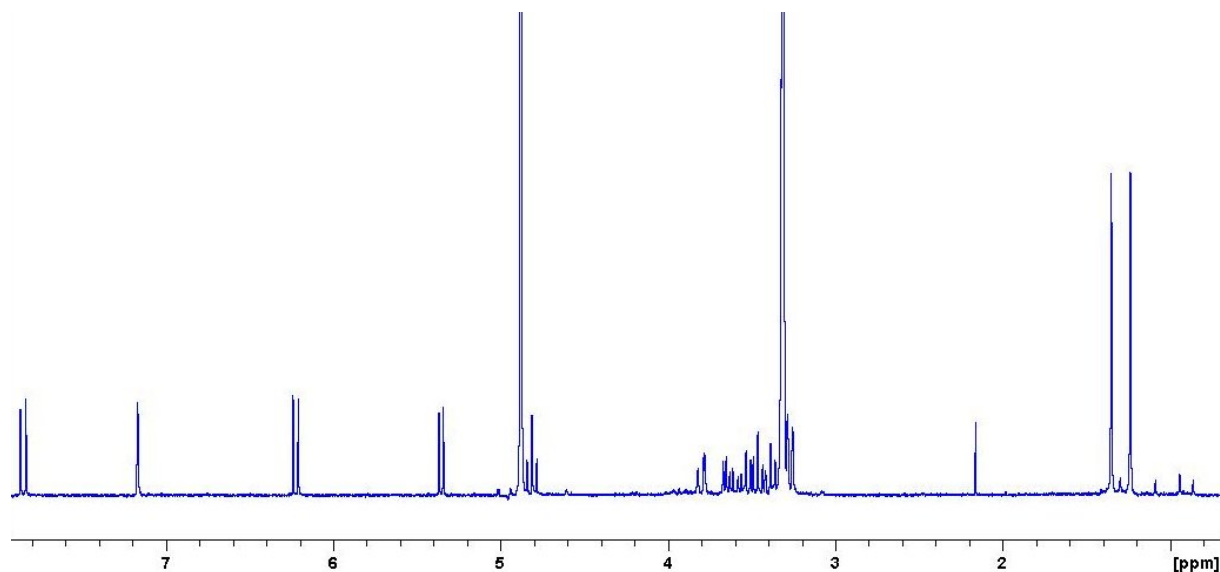
+TOF MS: 30 MCA scans from 09091708-2-BailleuIFa23C.wiff  
a=3.55995973585775110e-004,t0=5.89809285469746100e+001

Max. 2.0e5 counts



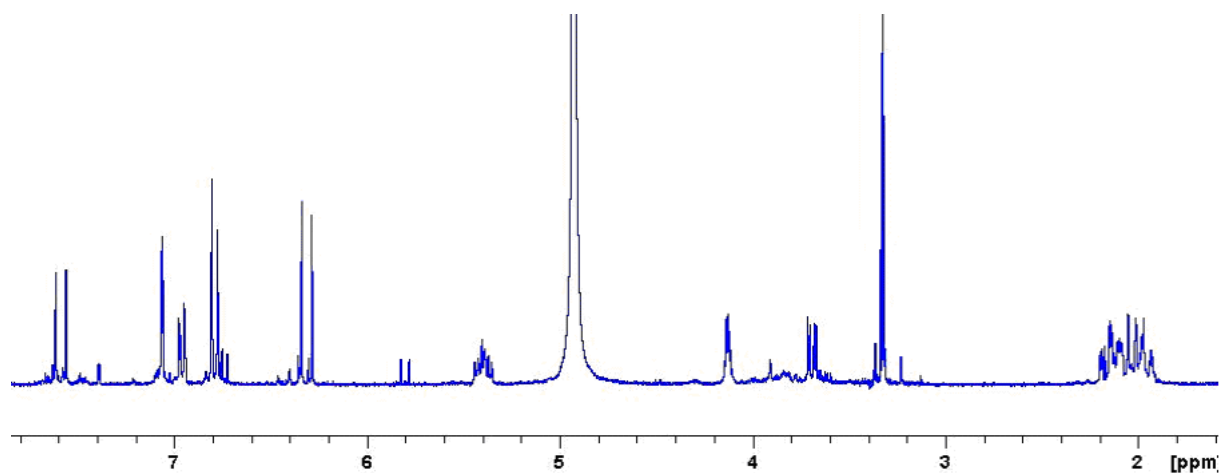


**NMR of Compound 8 (300 MHz/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  
**Rutarin**



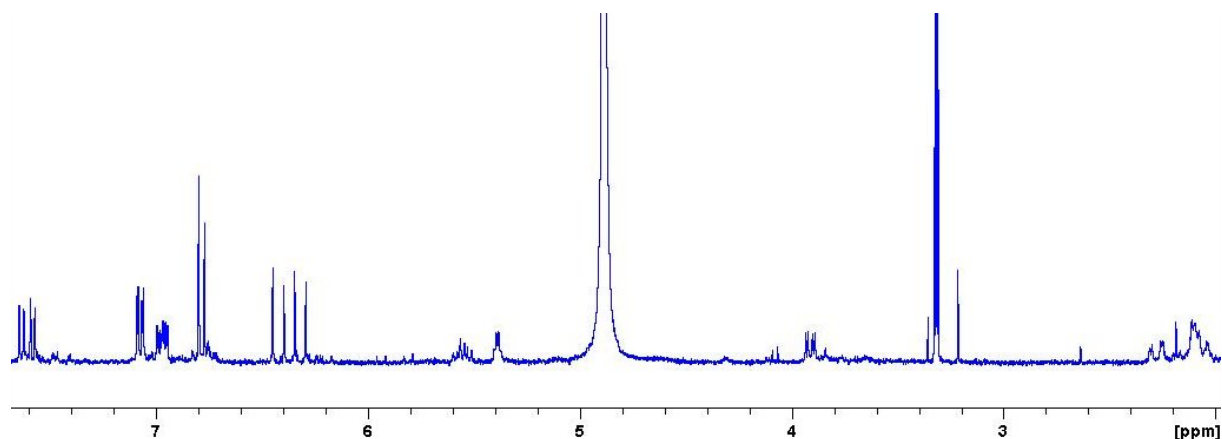
Compound 8		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>2</b>	-	161.8
<b>3</b>	6.22 d (9.5)	111.4
<b>4</b>	7.85 d (9.5)	145.8
<b>5</b>	7.17 s	117.7
<b>6</b>	-	126.7
<b>7</b>	-	153.7
<b>8</b>	-	127.2
<b>9</b>	-	146.8
<b>10</b>	-	113.8
<b>2'</b>	4.79 t (8.5)	91.4
<b>3'</b>	3.27 dd (8.5, 1.2)	29.5
<b>1''</b>	-	71.2
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.35 s	24.1
<b>CH<sub>3</sub></b>	1.23 s	23.5
<b>1'''</b>	5.35 d (7.5)	102.0
<b>2'''</b>	3.54 dd (7.6, 9.4)	74.5
<b>3'''</b>	3.48 t (9.5)	76.4
<b>4'''</b>	3.41 dd (9.5, 9.5)	70.0
<b>5'''</b>	3.32 m	77.1
<b>6'''a</b>	3.82 dd (12.0, 2.7)	61.0
<b>6'''b</b>	3.65 dd (12.0, 5.7)	

**NMR of Compound 9 (300 MHz/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  
**5-(*E*)-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)**



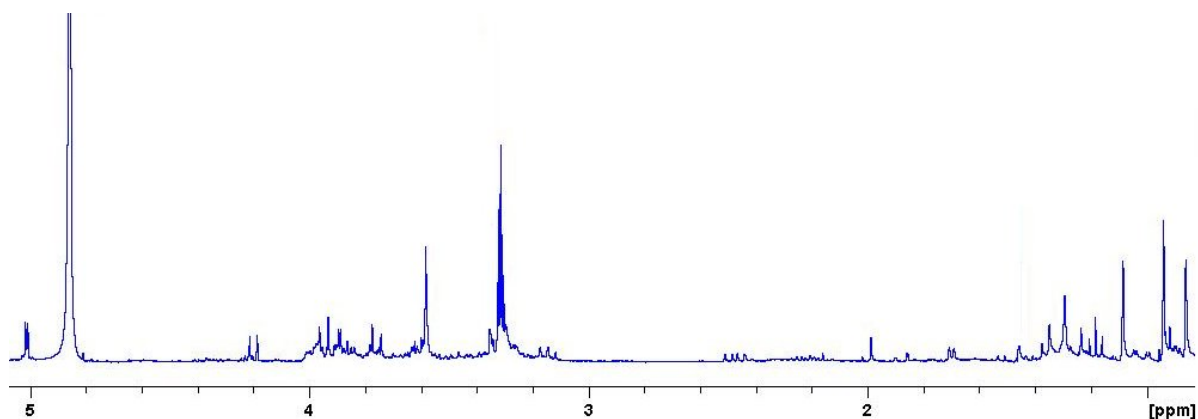
Compound 9		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>1</b>	-	77.8
<b>2ax</b>	2.18 dd (14.0, 3.0)	39.1
<b>2eq</b>	2.01 ddd (14.0, 5.0, 2.5)	
<b>3</b>	4.13 dt (5.0, 3.0)	73.1
<b>4</b>	3.68 dd (9.0, 3.0)	75.1
<b>5</b>	5.39 dd (10.0, 9.0, 4.2)	72.6
<b>6ax</b>	2.08 dd (14.0, 10)	40.6
<b>6eq</b>	2.20 ddd (14.0, 4.2, 2.5)	
<b>COOH</b>	-	178.1
<b>α</b>	6.31 d (16.0)	115.6
<b>β</b>	7.59 d (16.0)	146.8
<b>1'</b>	-	127.8
<b>2'</b>	7.07 d (2.0)	115.0
<b>3'</b>	-	146.8
<b>4'</b>	-	149.4
<b>5'</b>	6.79 d (9.0)	115.5
<b>6'</b>	6.96 dd (9.0, 2.0)	122.9
<b>CO</b>	-	169.2

**NMR of Compound 10 (300 MHz/75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  
**3,5-di(*E,E*)-caffeoylquinic acid**



Compound 10		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>1</b>	-	81.0
<b>2ax</b>	2.30 dd (14.0, 3.5)	36.5
<b>2eq</b>	2.11 ddd (14.0, 7.0, 1.5)	
<b>3</b>	5.54 dt (7.0, 3.5)	71.7
<b>4</b>	3.91 dd (10.0, 3.5)	72.2
<b>5</b>	5.39 dd (10.0, 7.5, 4.2)	73.6
<b>6ax</b>	2.18 dd (14.0, 7.5)	39.9
<b>6eq</b>	2.25 ddd (14.0, 4.2, 1.5)	
<b>COOH</b>	-	178.1
<b>α'</b>	6.42 d (16.0)	115.1
<b>β'</b>	7.61 d (16.0)	146.4
<b>1'</b>	-	128.1
<b>2'</b>	7.08 d (2.0)	114.2
<b>3'</b>	-	145.5
<b>4'</b>	-	148.3
<b>5'</b>	6.79 d (9.0)	115.6
<b>6'</b>	6.96 dd (9.0, 2.0)	122.1
<b>CO</b>	-	168.1
<b>α''</b>	6.31 d (16.0 Hz)	115.1
<b>β''</b>	7.59 d (16.0 Hz)	146.4
<b>1''</b>	-	128.1
<b>2''</b>	7.07 d (2.0)	114.3
<b>3''</b>	-	148.3
<b>4''</b>	-	148.3
<b>5''</b>	6.78 d (9.0)	115.6
<b>6''</b>	6.95 d (9.0, 2.0)	122.1
<b>CO</b>	-	167.7

**NMR of Compound 11 (500 MHz/125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**  
**(-) angelicoidenol-*O*-2-β-D-apiofuranosyl-(1-6)-β-D-glucopyranoside**



Compound 11		
	<sup>1</sup> H (J in Hz)	<sup>13</sup> C
<b>1</b>	-	49.7
<b>2a</b>	3.99 dd (3.1, 9.5)	82.1
<b>3a</b>	1.02 dd (3.1, 13.7)	33.0
<b>3b</b>	2.17 ddd (5.0, 9.5, 13.7)	
<b>4</b>	1.70 d (5.0)	52.1
<b>5</b>	3.89 dd (2.7, 8.0)	74.5
<b>6a</b>	2.47 dd (8.0, 13.0)	38.3
<b>6b</b>	1.34 d (13.0)	
<b>7</b>	-	47.0
<b>8</b>	1.09 s	20.0
<b>9</b>	0.87 s	19.0
<b>10</b>	0.94 s	12.0
<b>1'</b>	4.20 d (7.8)	101.7
<b>2'</b>	3.16 m	74.2
<b>3'</b>	3.28 m	77.0
<b>4'</b>	3.33 m	70.4
<b>5'</b>	3.37 m	77.2
<b>6'a</b>	3.96 (2.4, 11.6)	67.3
<b>6'b</b>	3.61 (5.5, 11.6)	
<b>1''</b>	5.01 d (2.4)	109.4
<b>2''</b>	3.91 d (3.1)	77.8
<b>3''</b>	-	79.5
<b>4''a</b>	3.71 d (9.5)	74.7
<b>4''b</b>	3.93 m	
<b>5''</b>	3.58 s	65.1

### References used for identification of known compounds:

**Compound 1-3:** Erdelmeier, C.A.J., Sticher, O., 1985. *Planta Med.* 51, 407.

**Compound 4:** Khalighi-Sigaroodi, F., Hadjiakhoondi, A., Shafiee A., Mozaffarian, V.A., Shahverdi, A.R., Alavi, S.H.R., 2006. *DARU.* 14, 214.

**Compound 5:** Duddeck, H., Kaiser, M., 1982. *Organic Magnetic Resonance* 20, 55.

**Compound 6:** Khalighi-Sigaroodi, F., Hadjiakhoondi, A., Shafiee A., Mozaffarian, V.A., Shahverdi, A.R., Alavi, S.H.R., 2006. *DARU.* 14, 214.

**Compound 8:** Okuyama, T., Takata, M., Shibata, S., 1989. *Planta Med.* 55, 64.

**Compound 9-10:** Pauli, G.F., Poetsch, F., Nahrstedt, A., 1998. *Phytochem. Anal.* 9, 177.

**Compound 11:** <sup>1</sup>Takeuchi, H., Lu, Z. G., Fujita, T., 2004. *Biosci. Biotech. Biochem.* 68, 1131.

<sup>2</sup>Sahpaz, S., Hennebelle, T., Bailleul, F., 2002. *Nat. Prod. Lett.* 16, 195.