



HAL
open science

Recherche d'inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1

Charlotte Geny

► **To cite this version:**

Charlotte Geny. Recherche d'inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA114833 . tel-01170624

HAL Id: tel-01170624

<https://theses.hal.science/tel-01170624>

Submitted on 2 Jul 2015

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

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

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

Chimie

ANNÉES 2011 – 2014

SÉRIE DOCTORAT N°1305

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 24/10/2014

par

Charlotte GENY

Recherche d'inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1

Directeur de thèse : Marc LITAUDON Ingénieur de recherche (ICSN)
Co-encadrant de thèse : Vincent DUMONTET Ingénieur de recherche (ICSN)

Composition du jury :

Rapporteurs : Elisabeth SEGUIN Professeur (Université de Rouen)
M-Geneviève DIJOUX-FRANCA Professeur (Université Lyon1)

Examineurs : Pierre CHAMPY Professeur (Université de Paris-Sud 11)
Pascal RICHOMME Professeur (Université d'Angers)
Olivier NOSJEAN Directeur de département (Institut de Recherche Servier)

"the secret of life is molecular recognition; the ability of one molecule to 'recognize' another through weak bonding interactions"

Linus Pauling

Résumé

Dans le but de rechercher des inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1, deux essais biologiques ont été mis au point sur Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF. Ces deux tests utilisent la polarisation de fluorescence et sont basés sur la liaison d'un peptide pro-apoptotique marqué à la fluorescéine (Bak-CF ou Bid-CF) avec une protéine anti-apoptotique (Bcl-xL ou Mcl-1). Au total, près de 600 extraits de plantes, provenant de diverses régions du monde, ont été criblés sur les deux protéines Bcl-xL et Mcl-1 permettant de sélectionner les extraits acétate d'éthyle des écorces de *Knema hookeriana* (Myristicaceae) et de *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (Annonaceae). L'analyse chimique des constituants des écorces de *K. hookeriana* a conduit à l'isolement de 12 lipides phénoliques dont 6 n'avaient jamais été isolés d'un organisme vivant. Seuls les acides anacardiques ont révélé de très fortes inhibitions de l'interaction Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF dans les essais par polarisation de fluorescence. Une étude plus approfondie des interactions entre le plus actif des produits et les protéines (Bcl-xL, Mcl-1, Bak et Bid) par RMN, a montré que la modulation des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid n'est pas liée à l'affinité de l'acide anacardique pour les protéines Bcl-xL et Mcl-1 mais à une forte affinité pour les peptides Bid et Bak. Le fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* a conduit à l'isolement d'une nouvelle chalcone prénylée, la (\pm)-écarlottone possédant une *dual* activité sur les protéines, Bcl-xL et Mcl-1. Par la suite, le fractionnement "RMN-guidé" a mené à l'isolement de 6 analogues.

Remerciements

Ces travaux de doctorat ont été menés au sein de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif sur Yvette. Je tiens à remercier les Professeurs David Crich et Max Malacria pour l'attribution d'une bourse de thèse et pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer mon doctorat au sein de l'ICSN.

Je remercie chaleureusement le Docteur Françoise Guéritte, que j'ai eu la chance de côtoyer lors de ses dernières années à l'Institut, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Je remercie sincèrement le Docteur Marc Litaudon, directeur de thèse et le Docteur Vincent Dumontet, co-encadrant de thèse, pour leur encadrement, leur présence et la confiance qu'ils m'ont accordée durant ces trois années de thèse. J'exprime ma reconnaissance au Docteur Fanny Roussi pour ses conseils, ses connaissances, sa sympathie et son soutien.

Je souhaite remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail :

Mme Marie-Geneviève Dijoux-Franca, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université de Lyon.

Mme Elisabeth Seguin, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université de Rouen.

M. Pierre Champy, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université de Paris Sud.

M. Pascal Richomme, Professeur à la faculté de Pharmacie de l'Université d'Angers. Je le remercie également pour avoir participé à mon comité de mi-thèse et pour m'avoir permise de débiter la phytochimie dans son équipe, encadrée par le Docteur Séverine Derbré avec qui j'ai appris les bases de la chimie des produits naturels.

M. Olivier Nosjean, Directeur de département à l'Institut de Recherche Servier. Je tiens à le remercier également pour avoir participé à mon comité de mi-thèse mais aussi pour ses conseils, pour m'avoir permis d'entrer à l'Institut de Recherche Servier. Il m'a également permise de rencontrer le Docteur William Cohen, que je remercie pour son aide importante et sa sympathie.

J'aimerais remercier les services de l'ICSN (HPLC, RMN, SM et informatique) mais surtout les personnes qui garantissent la qualité de ces services pour leurs connaissances, leurs conseils et aussi pour les nombreux moments de partage et d'échange. Je tiens tout particulièrement à remercier le Docteur Gwladys Rivière, membre de l'équipe du Docteur Eric Guittet à l'ICSN, pour ses analyses en RMN des protéines et Loetitia Favre, membre de l'équipe du Directeur de Recherche Joëlle Wiels de l'Institut de Gustave Roussy, pour avoir réalisé les essais *in cellulo*. Je remercie chaleureusement Mmes Geneviève Aubert, Laure Eloy, Maria Concepcion Garcia et Christine Lenoir pour les évaluations biologiques *in cellulo*.

Je remercie toutes les personnes que j'ai croisées à l'Institut, les membres de mon CEI et les membres de mon couloir avec qui les repas sont toujours de bons moments.

Un grand merci aux membres de mon équipe et quelle équipe ! Avec laquelle, j'ai beaucoup appris, aussi bien scientifiquement qu'humainement, que même les mauvais moments ne sont pas si "pires" quand on est bien entouré. Ni voyez ici, aucun ordre de préférence. Les anciens thésards, Mehdi et Mélanie, pour leurs nombreux conseils avérés. Olga, Jérémy, Florent et Louis-Félix. Les stagiaires (Alba, Aline, Héliciane, Mélissa, Estella...) et les gens de passages (Sophie, Dominique, Jane, Azmi, Fabio et Xavier). Je remercie aussi mes "collègues" de bureau, Tiphaine et Laure-Anne pour leur motivation et leur bonne humeur. Les anciennes du psn, Cécile et Erell, avec qui nous avons partagé beaucoup plus qu'une formation CLHP. Je tiens à remercier tout particulièrement Nina, *alias* La mère Corlay et mes deux chimistes préférés, Camille et Papa Sandy.

Merci à mes amis, ma famille, et plus particulièrement, à mes parents et mon frère, pour leur soutien, leur présence, leurs visites, leurs encouragements... Et Médo, qui a su m'écouter, me soutenir et me faire changer d'air tout au long de ces trois années.

Table des matières

Résumé	v
Remerciements	vii
Table des matières	ix
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xix
Liste des abréviations, sigles et acronymes	xxi
INTRODUCTION GENERALE	3
Introduction	3
PARTIE 1 : ETAT DES CONNAISSANCES ET PRESENTATION DU PROJET	9
Chapitre 1	11
Du cancer aux protéines Bcl-xL et Mcl-1	11
1. Le cancer	11
2. L'apoptose.....	13
3. Les champs d'investigation de la recherche.....	18
Chapitre 2	21
Les protéines de la famille Bcl-2	21
1. La découverte	21
2. Structure des protéines "Bcl-2" et rôles dans l'apoptose.....	22

TABLE DES MATIERES

2.1. Les protéines anti-apoptotiques	23
2.2. Les protéines pro-apoptotiques	25
3. Les stratégies de recherche et les inhibiteurs connus	28
3.1. Les inhibiteurs sélectifs'	30
3.2. Les inhibiteurs multiples.....	32
Chapitre 3	35
Présentation du projet et de son environnement	35
1. Le laboratoire d'accueil.....	35
2. Les résultats préliminaires	35
3. Description des principaux objectifs de ces travaux de thèse.....	38
Conclusion	39
PARTIE 2 : MISE EN PLACE DES ESSAIS BIOLOGIQUES SUR BCL-XL ET MCL-1	43
Chapitre 1	45
Les essais biologiques sur les protéines anti-apoptotiques	45
1. Les essais biologiques relatifs aux protéines de la famille des Bcl-2 dans la littérature..	45
1.1. L'ELISA.....	46
1.2. Le FRET et le BRET	47
1.3. Les billes magnétiques	48
1.4. La SPA	49
1.5. La cytométrie en flux en mode multiplexe	50
1.6. La polarisation de fluorescence.....	51
2. Choix des protéines.....	53
Chapitre 2	59
Mise au point des essais biologiques	59
1. K_d , CI_{50} et K_i	59
2. Le choix des conditions.....	61
2.1. Plan de plaque	61
2.2. Choix des concentrations en protéines et constantes de dissociation.....	64
2.3. Tolérance aux solvants	67
2.4. Température d'incubation	69
2.5. Fluorescence intrinsèque des produits et extraits.....	71
3. Composés de référence et contrôles positifs	72

4. Validation : Z' versus SSMD	76
5. Le criblage et le seuil de détermination d'un extrait actif ou hit.....	79
Chapitre 3	85
Le traitement des données et les premiers résultats biologiques	85
1. Conception d'un tableur Excel TM pour l'automatisation du traitement des données	85
2. Résultats biologiques des produits purs isolés ou synthétisés au sein de l'équipe	91
2.1. Les produits issus de la synthèse organique.....	91
2.2. Les produits issus de l'extraction de plantes.....	91
3. Bilan du criblage biologique d'une partie de l'extractothèque.....	95
Conclusion	98
PARTIE 3 : ETUDES PHYTOCHIMIQUES ET EVALUATIONS BIOLOGIQUES	101
Chapitre 1	105
<i>Knema hookeriana</i> (Hk. f. & Th) Warb.	105
1. Etude bibliographique.....	105
1.1. La famille des Myristicaceae	105
1.1.1. Répartition géographique.....	107
1.1.2. Intérêt économique et utilisations traditionnelles	107
1.2. Le genre <i>Knema</i> et l'espèce <i>Knema hookeriana</i>	109
1.2.1. Description botanique	109
1.2.2. Utilisations traditionnelles et activités biologiques.....	112
1.3. Composition chimique du genre <i>Knema</i>	113
2. Travaux personnels.....	117
2.1. Etude phytochimique de <i>Knema hookeriana</i>	117
2.1.1. Récolte.....	117
2.1.2. Déréplication.....	117
2.1.3. Purification	119
2.1.4. Caractérisation des composés isolés.....	125
2.2. Evaluation biologique.....	134
Conclusion	139
Chapitre 2	141
<i>Fissistigma latifolium</i> var. <i>ovoideum</i> (King) J. Sinclair	141
1. Etude bibliographique.....	141

1.1.	La famille des Annonaceae	141
1.1.1.	Répartition géographique	142
1.1.2.	Intérêt économique et utilisations traditionnelles	143
1.2.	Le genre <i>Fissistigma</i> et l'espèce <i>Fissistigma latifolium</i>	144
1.2.1.	Description botanique.....	144
1.2.2.	Utilisations traditionnelles et activités biologiques	146
1.3.	Composition chimique du genre <i>Fissistigma</i>	147
1.4.	Les chalconoïdes adduits de Diels-Alder naturels (<i>cf.</i> Annexe p. 296-297)	148
2.	Travaux personnels	151
2.1.	Etude phytochimique de <i>Fissistigma latifolium</i>	151
2.1.1.	Récolte	151
2.1.2.	Travaux préliminaires (<i>cf.</i> Figure 68).....	152
2.1.3.	Extraction et purification.....	154
2.1.4.	Caractérisation des composés isolés	162
2.2.	Modulation chimique du composé 75 et hémisynthèse	188
2.2.1.	Méthylation	189
2.2.2.	Acétylation	190
2.2.3.	Réaction de Diels-Alder.....	191
2.3.	Hydrodistillation des écorces.....	193
2.4.	Evaluation biologique	195
	Conclusion	197
	CONCLUSION GENERALE	201
	Conclusion générale	203
	PARTIE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE	209
	Chapitre 1	211
	Procédures générales	211
1.	Solvants et réactifs.....	211
2.	Techniques et appareils de biochimie	211
3.	Fractionnements, purifications et suivi des réactions.....	212
3.1.	Chromatographie sur couches minces et épaisses.....	212
3.2.	Chromatographie liquide moyenne pression.....	213
3.3.	Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	213
3.4.	Chromatographie ultra haute performance (UPLC)	214
3.5.	Chromatographie en phase supercritique (CPS).....	215
4.	Analyses physiques et spectrales des composés	215
4.1.	Pouvoir rotatoire	215
4.2.	Dichroïsme circulaire	215

4.3. Spectrométrie ultra-violet (UV)	215
4.4. Spectrométrie de masse (SM).....	215
4.5. Résonance magnétique nucléaire (RMN).....	216
Chapitre 2	217
Extraction et purification	217
1. <i>Knema bookeriana</i> (Hk. F. & Th) Warb.....	217
2. <i>Fissistigma latifolium</i> var. <i>ovoideum</i> (King) J. Sinclair	219
2.1. 1 ^{ère} extraction	219
2.2. 2 ^{ème} extraction	222
Chapitre 3	227
Caractéristiques physiques et spectrales des produits isolés	227
1. <i>Knema bookeriana</i> (Hk. F. & Th) Warb.....	228
2. <i>Fissistigma latifolium</i> var. <i>ovoideum</i> (King) J. Sinclair	242
BIBLIOGRAPHIE	255
Sitographie	257
Bibliographie	259
ANNEXES	277
PUBLICATIONS	321

Liste des figures

Partie 1

Figure 1 : Caractéristiques majeures d'une cellule tumorale. Schéma adapté de "Hallmarks of cancer".....	12
Figure 2 : Représentation morphologique schématique d'une cellule en cours d'apoptose.	14
Figure 3 : Rôles de l'apoptose pendant le développement.....	15
Figure 4 : Schéma des voies de signalisation de l'apoptose adapté de Gupta.....	16
Figure 5 : Mécanismes qui contribuent à l'échappement de l'apoptose et à la carcinogénèse.	18
Figure 6 : Structures par domaines des protéines apoptotiques.....	23
Figure 7 : Structures tridimensionnelles tronquées de Bcl-xL (gauche) et Mcl-1. (droite)...	24
Figure 8 : Structure tridimensionnelle de Bax en violet et noir (gauche) et de Bim en orange lié à Mcl-1 en bleu (droite).....	26
Figure 9 : Modèles d'activation du contrôle de l'apoptose par les Bcl-2.....	27
Figure 10 : Criblage haut débit HTS.....	29
Figure 11 : Criblage par fragments.....	29

Partie 2

Figure 12 : Principe de la méthode ELISA employée par Zhang et ses collaborateurs.	46
Figure 13 : Principe de la méthode BRET utilisée par Duy Vo et ses collaborateurs.	48
Figure 14 : Principe de la méthode utilisant des billes magnétiques développée par Pisoni et ses collaborateurs.....	49
Figure 15 : Principe de la méthode de SPA utilisée par Whitfield et ses collaborateurs.	50
Figure 16 : Principe de la méthode de la cytométrie en flux en mode multiplexe employée par Curpan et ses collaborateurs.	51
Figure 17 : Principe de la polarisation de fluorescence.....	52
Figure 18 : Gel SDS-PAGE du second lot de protéines Mcl-1 et Bcl-xL.....	56
Figure 19 : Interaction protéine-ligand.....	59
Figure 20 : Plan de plaque du protocole " CI_{50} ".	62
Figure 21 : Plan de plaque du protocole "criblage".	63
Figure 22 : Titrage de la protéine Bcl-xL en présence d'une concentration fixe de ligand Bak-CF.	64
Figure 23 : Titrage de la protéine Mcl-1 en présence d'une concentration fixe de ligand Noxa-CF.	65
Figure 24 : Titrage de la protéine Mcl-1 en présence d'une concentration fixe de ligand Bid- CF.....	66
Figure 25 : Tolérance du couple Bcl-xL/Bak-CF au DMSO.	68
Figure 26 : Tolérance du couple Mcl-1/Bid-CF au DMSO.	68
Figure 27 : Tolérance du couple Bcl-xL/Bak-CF à l'EtOH.	69

Figure 28 : Tolérance du couple Mcl-1/Bid-CF à l'EtOH.	69
Figure 29 : Fluorescence intrinsèque cas n°1.	71
Figure 30 : Fluorescence intrinsèque cas n°2.	71
Figure 31 : Plan de plaque du protocole "facteur Z".	77
Figure 32 : Répartition des pourcentages d'inhibition des extraits de plantes, testés sur Bcl-xL (■) et Mcl-1 (●) à 10 µg/mL, selon la loi normale avec n = 560.	79
Figure 33 : Répartition des pourcentages d'inhibition des extraits de plantes, testés sur Bcl-xL (■) et Mcl-1 (●) à 1 µg/mL, selon la loi normale avec n = 560.	80
Figure 34 : Répartition des pourcentages d'inhibition des extraits de plantes, testés sur Mcl-1 (●) à 0,5 µg/mL, selon la loi normale avec n = 560.	81
Figure 35 : Tableur Excel™, feuille "Calcul Ki (IC50)–Rep1" tronquée.	87
Figure 36 : Tableur Excel™, feuille "Bilan" tronquée.	89
Figure 37 : Représentation graphique du nombre d'extraits testés par famille botanique. ...	96

Partie 3

Figure 39 : Modèle de Massart.	106
Figure 40 : Sève rouge s'écoulant d'une entaille de l'écorce de <i>Knema bookeriana</i> . © botanytroopers.	106
Figure 41 : Schéma illustrant la diversité structurale des synandria des quatre plus gros genres des Myristicaceae, les anthères sont représentées en noir.	106
Figure 42 : Répartition mondiale des Myristicaceae.	107
Figure 43 : Fruits (drupe jaune pâle), macis (rouge) et noix de muscade entourée de sa coque (marron).	108
Figure 44 : Noix de muscade dépourvues de leur coque ligneuse.	108
Figure 45 : Bouton floral de <i>K. bookeriana</i> observé au microscope électronique à balayage.	110
Figure 46 : Jeune rameau de <i>K. bookeriana</i>	110
Figure 47 : Planche d'herbier de <i>K. bookeriana</i>	111
Figure 48 : Exemple de la biosynthèse des acides anacardiques et des alkyphénols, les enzymes sont indiquées en bleu (—) et les réactions en noir (—).	114
Figure 49 : Carte de la Malaisie, localisation du lieu de récolte à Gunung Bujang Melaka.	117
Figure 50 : Spectre RMN ¹ H de l'extrait OT-145 à 300 MHz dans le MeOD.	118
Figure 51 : Chromatogrammes détection UV (en bas) et DEDL (en haut) de l'extrait OT-145 obtenus par CLUP.	119
Figure 52 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces et tiges de <i>K. bookeriana</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.	121
Figure 53 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 46.	127
Figure 54 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 48.	130
Figure 55 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 50.	132
Figure 56 : Superposition des spectres RMN HSQC ¹ H– ¹⁵ N de la protéine Bcl-xL seule à 0,385 mM (bleu) et en présence de 1,5 équivalents du composé 52 (rouge) à 950 MHz dans le D ₂ O.	136
Figure 57 : Superposition des spectres RMN HSQC ¹ H– ¹⁵ N de la protéine Mcl-1 seule à 0,360 mM (bleu) et en présence de 1,5 équivalents du composé 52 (rouge) à 950 MHz dans le D ₂ O.	136

Figure 58 : Superposition des spectres RMN ^1H du peptide Bid seul (noir), de Bid en présence 0,25 équivalent (bleu), 0,5 équivalent (rose) et 1 équivalent (vert) du composé 52 à 950 MHz dans le D_2O	137
Figure 59 : Superposition des spectres RMN ^1H du peptide Bid seul (noir), de Bid en présence d'un équivalent (bleu) de l'analogue de la méiogynine A à 950 MHz dans le D_2O	138
Figure 60 : Répartition mondiale des Annonaceae.....	142
Figure 61 : Corossol (<i>A. muricata</i>).....	143
Figure 62 : Ylang-ylang (<i>C. odorata</i>).....	144
Figure 63 : Jeune rameau de <i>F. latifolium</i> var. <i>ovoideum</i> vu du dessus.....	145
Figure 64 : Jeune rameau de <i>F. latifolium</i> var. <i>ovoideum</i> vu du dessous.....	145
Figure 65 : Fruits de <i>F. latifolium</i> var. <i>ovoideum</i>	145
Figure 66 : Extrait de la voie de biosynthèse de la sanggenone R proposée par Hano et ses collaborateurs.	149
Figure 67 : Carte de la Malaisie, localisation du lieu de récolte à Dungun, province de Terengganu.	152
Figure 68 : Schéma de fractionnement préliminaire réalisé à partir de l'extrait AcOEt des écorces de <i>F. latifolium</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak Servier.....	152
Figure 69 : Chromatogrammes UV (en bas) et DEDL (en haut) obtenus par CLHP sans acide en phase inverse de l'extrait brut.....	153
Figure 70 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de <i>F. latifolium</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.....	154
Figure 71 : Chromatogramme UV (300 nm) de la séparation chirale obtenue par CPS en mode <i>stacking</i> du mélange racémique 75 – triangles rouge correspondent aux injections.	155
Figure 72 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de <i>F. latifolium</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.....	157
Figure 73 : Photographie de la CCM récapitulative du rassemblement des fractions (plaque de silice, CH_2Cl_2 : Heptane 50/50, révélation à la vanilline sulfurique).....	158
Figure 74 : Spectre RMN ^1H du composé 75 à 500 MHz dans l'acétonitrile deutéré.	159
Figure 75 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 72.....	163
Figure 76 : Structure proposée par Gu et ses collaborateurs et déplacements chimiques des carbones en ppm.	164
Figure 77 : Structure synthétisée par Khusnutdinov et ses collaborateurs et déplacements chimiques des carbones en ppm.	164
Figure 78 : Spectre RMN ^1H du composé 73 à 500 MHz dans le CDCl_3 à $t = 0$ et $t = 2$ jours, (O) correspond à la disparition des signaux et (→) au changement de déplacement chimique.	165
Figure 79 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 73b.....	166
Figure 80 : Spectres RMN ^1H du composé 75 à différentes températures à 600 MHz dans le CDCl_3	168
Figure 81 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 75.....	169
Figure 82 : Représentation ORTEP du composé 77.....	171
Figure 83 : Représentation tridimensionnelle des énantiomères (76 + 77) dans la maille. 171	

Figure 84 : Spectres de dichroïsme circulaires superposés des énantiomères 75, (-)-écarlottone (76) (en rouge) et (+)-écarlottone (77) (en bleu).....	172
Figure 85 : Sens horaire – Chiralité positive	173
Figure 86 : Sens antihoraire – Chiralité négative	173
Figure 87 : Spectres RMN ¹ H des composés 78 (en noir) et 79 (en rouge) à 500 MHz dans le CDCl ₃	175
Figure 88 : Spectres RMN ¹³ C des composés 78 (en noir) et 79 (en rouge) à 125 MHz dans le CDCl ₃	175
Figure 89 : Principales corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 78.....	177
Figure 90 : Principales corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 79.....	177
Figure 91 : Spectres RMN ¹³ C des composés 74 (en rouge) et le mélange 74 + 80 (en noir) à 500 MHz dans le CDCl ₃	179
Figure 92 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 81.....	181
Figure 93 : Structure R ₁ a.....	181
Figure 94 : Structure R ₁ b.....	181
Figure 95 : Structure R ₁ c.....	181
Figure 96 : Structure R ₁ d.....	181
Figure 97 : Hypothèse de formation du cycle à 5 (R ₁ d) à partir du cycle à 6 du composé 75.	182
Figure 98 : Spectres RMN ¹ H du composé 82 à 500 MHz dans le CDCl ₃ à t.a. (en noir) et dans le CDCl ₃ et la pyridine- <i>d</i> ₅ à t = -20 °C (en rouge).....	184
Figure 99 : Principales corrélations HMBC (→) et données HSQC du composé 82.....	186
Figure 100 : Hypothèse de biogenèse du composé 75.	187
Figure 101 : Hypothèse de biogenèse du composé 74.	187
Figure 102 : Chromatogrammes UV (en bas) et DEDL (en haut) obtenus par CLHP en phase inverse de la fraction F9, enrichie en composé 75, utilisée pour les modulations chimiques.	189
Figure 103 : CCM du myrcène (à gauche) et de l'huile essentielle obtenue des écorces de <i>F. latifolium</i> (à droite).....	194
Figure 104 : Courbes dose-réponse obtenues pour la (-)-écarlottone (76) sur Bcl-xL et Mcl-1.	195
Figure 105 : Courbes dose-réponse obtenues pour la (+)-écarlottone (77) sur Bcl-xL et Mcl-1.	195

Partie 4

Figure 106 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces et tiges de <i>K. hookeriana</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.....	218
Figure 107 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de <i>F. latifolium</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.....	221
Figure 108 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de <i>F. latifolium</i> – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.....	224

Liste des tableaux

Partie 1

Partie 2

Tableau 1 : Alignement de la séquence de Bcl-xL produite à l'ICSN avec celle de la protéine humaine par UniProt BLAST.	54
Tableau 2 : Alignement de la séquence de Mcl-1 produite à l'ICSN avec celle de la protéine de souris par UniProt BLAST.	55
Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques des protéines Bcl-xL et Mcl-1.	55
Tableau 4 : Alignement de la séquence de Bak produite par PolyPeptide avec celle du peptide humain par UniProt BLAST.	57
Tableau 5 : Alignement de la séquence de Bid produite par PolyPeptide avec celle du peptide humain par UniProt BLAST.	57
Tableau 6 : Récapitulatif des données obtenues par le titrage des protéines par les ligands-CF.	67
Tableau 7 : K_d obtenus à basse température ou à température ambiante.	70
Tableau 8 : Résultats biologiques des composés commerciaux (†) et isolés au laboratoire (§).	74
Tableau 9 : Facteurs Z' des essais Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF.	77
Tableau 10 : Récapitulatif des seuils et nombre de hit obtenus sur Bcl-xL et Mcl-1 en fonction de la concentration des 560 extraits.	82
Tableau 11 : Récapitulatif de données obtenues sur les essais Bcl-xL et Mcl-1.	83
Tableau 12 : Evaluation biologique des acides endiandriques de type A isolés d' <i>E. kingiana</i> et <i>B. ferruginea</i>	93
Tableau 13 : Evaluation biologique des acides endiandriques de type B isolés d' <i>E. kingiana</i> et <i>B. ferruginea</i>	94
Tableau 14 : Evaluation biologique des acides endiandriques de type C isolés d' <i>E. kingiana</i> et <i>B. ferruginea</i>	95
Tableau 15 : Bilan de l'évaluation biologique sur Bcl-xL et Mcl-1 de <i>K. bookeriana</i> et <i>F. latifolium</i>	97

Partie 3

Tableau 16 : Principales activités biologiques répertoriées dans le genre <i>Knema</i>	112
Tableau 17 : Rendements d'extraction globaux rapportés à l'extrait AcOEt de <i>K. bookeriana</i>	122
Tableau 18 : Données RMN du composé 46 (CDCl ₃ , 300 MHz)	127
Tableau 19 : Données RMN du composé 48 (CDCl ₃ , 500 MHz)	130
Tableau 20 : Données RMN du composé 50 (CDCl ₃ , 500 MHz)	132

Tableau 21 : Activité biologique des 12 produits isolés de <i>K. bookeriana</i> sur Bcl-xL et Mcl-1.	134
Tableau 22 : Principales activités biologiques répertoriées dans le genre <i>Fissistigma</i>	146
Tableau 23 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de plante sèche <i>F. latifolium</i>	155
Tableau 24 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de la plante sèche <i>F. latifolium</i>	158
Tableau 25 : Données RMN du composé 72 (MeOD, 600 MHz)	163
Tableau 26 : Données RMN du composé 73b (CDCl ₃ , 500 MHz)	166
Tableau 27 : Données RMN du composé 75 (CDCl ₃ , 600 MHz)	169
Tableau 28 : Données RMN des composés 78 et 79 (CDCl ₃ , 500 MHz)	176
Tableau 29 : Données RMN du composé 82 (CDCl ₃ /Pyr- <i>d</i> ₅ , 600 MHz)	185
Tableau 30 : Conditions des réactions de méthylation.	189
Tableau 31 : Conditions des réactions d'acétylation.	190
Tableau 32 : Conditions des réactions de Diels-Alder (myrcène + acide cinnamique).	191
Tableau 33 : Conditions des réactions de Diels-Alder (myrcène + méthyle cinnamate)...	192
Tableau 34 : Activité biologique des seuls produits actifs isolés de <i>F. latifolium</i> sur Bcl-xL et Mcl-1.	195

Partie 4

Tableau 35 : Composition du gel SDS-Page.	211
Tableau 36 : Poids des marqueurs constituant le PageRuler Prestained Protein Ladder.	212
Tableau 37 : Gradient psn.	214
Tableau 38 : Gradient UPLC.	214
Tableau 39 : Déplacements chimiques de référence des solvants deutérés.	216
Tableau 40 : Gradient <i>K. bookeriana</i>	217
Tableau 41 : Rendements d'extraction globaux rapportés à l'extrait AcOEt de <i>K. bookeriana</i>	219
Tableau 42 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de plante sèche <i>F. latifolium</i>	221
Tableau 43 : Gradient CPS 2-éthyl-pyridine.	223
Tableau 44 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de la plante sèche <i>F. latifolium</i>	225

Liste des abréviations, sigles et acronymes

AA : acides aminés	CLUP : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance
ACN : Acétonitrile	CoA : coenzymeA
AcOEt : Acétate d'éthyle	COSY : <i>Correlation Spectroscopy</i>
ADN : acide désoxyribonucléique	CPS : Chromatographie en Phase Supercritique
AIF : <i>Apoptosis-Inducing Factor</i>	CTI : Calorimétrie à titrage isotherme
Apaf-1 : <i>Apoptotic Protease Activating Factor</i>	CTLA-4 : <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4</i>
ARN : acide ribonucléique	DCM : dichlorométhane
ARNm : ARN messager	DD : <i>Death Domain</i>
ATP : adénosine triphosphate	DEDL : Détecteur Evaporatif à Diffusion de Lumière
Bcl-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i>	DMS : Sulfure de diméthyle
Bcl-xL : <i>B-Cell Lymphoma Extra Large</i>	DMSO : Diméthyl sulfoxyde
BH : <i>Bcl-2 homology</i>	DT : domaine transmembranaire
Bid : <i>BH3 interacting domain death agonist</i>	EDTA : Ethylène Diamine Tétracétique
BRET : <i>Bioluminescence Resonance Energy Transfer</i>	EGFR : <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
Caspase : <i>Cysteine-dependent ASpartate-cleaving proteASES</i>	ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
CCE : Chromatographie sur Couche Epaisse	ES : Electrospray
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	EtOH : éthanol
CDK : <i>Cyclin-Dependant Kinase</i>	Fas : <i>Apoptosis Stimulating Factor</i>
CF : CarboxylFluorescein	FasL : <i>Apoptosis Stimulating Factor Ligand</i>
CG : Chromatographie en phase Gazeuse	FBDD : <i>Fragment-Based Drug Discovery</i>
CI₅₀ : Concentration inhibitrice médiane	FDA : <i>Food Drug Administration</i>
CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance	FRET : <i>Förster Resonance Energy Transfer</i>
	GSH : Glutathion
	GSHT : Glutathione S-Transférase
	HER : <i>Human Epidermal Receptor</i>
	HGF : <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
	HMBC : <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
	Hz : Hertz
	HSQC : <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>

LISTE DES ABREVIATIONS

HTS : <i>High Throughput Screening</i>	PF_{min} : Polarisation de fluorescence minimale
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell	PM : poids moléculaire
i.e. : id est	ppm : parties par millions
IAPs : <i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>	RE : réticulum endoplasmique
ICSN : Institut de Chimie des Substances Naturelles	RMN : résonance magnétique nucléaire
IdRS : Institut de Recherche Servier	SDS-PAGE : <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
INCa : Institut National du Cancer	SM : Spectrométrie de Masse
inh. : Inhibition	SMBR : Spectrométrie de Masse Basse Résolution
I_p : Intensité perpendiculaire	SPA : <i>Scintillation Proximity Assay</i>
IPNI : <i>International Plant Names Index</i>	SSMD : <i>Strictly Standardized Mean Difference</i>
IR : Infra-Rouge	t : temps
I_s : Intensité parallèle	t.a. : température ambiante
IUCN : International Union for Conservation of nature	tBid : <i>truncated Bid</i>
K_a : Constante d'association	TDDFT : <i>Time-dependent density functional theory</i>
K_d : Constante de dissociation	TFA : Acide trifluoroacétique
K_{dapp} : Constante de dissociation apparent	TMB : 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine
K_i : Constante d'inhibition	TMS : Triméthylsilyl
mAb : <i>monoclonal Antibodies</i>	TNFR : <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
Mcl-1 : <i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>	TNFR1 : <i>Tumor Necrosis Factor Receptor 1</i>
MeOH : méthanol	TNF α : <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
MHz : MégaHertz	TR : <i>Time resolved</i>
MOMP : <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>	TRAIL : <i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
mP : milliPolarisation	TRAILR1 : <i>TNF Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1</i>
ORTEP : <i>Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot</i>	UPR : <i>Unfolded Protein Response</i>
Pan inhibiteur : inhibiteur multiple	UV : Ultra Violet
PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase 1	var. : variétés
PDB : <i>Protein Data Bank</i>	VEGF : <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PDGFR : <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor</i>	WT : Wild Type
PF_{max} : Polarisation de fluorescence maximale	

Intercalaire rouge

Introduction générale

Introduction

Historiquement, l'utilisation des plantes par les humains pour se soigner remonte à des dizaines de milliers d'années. L'étroite connexion entre l'homme et les plantes a laissé de nombreuses preuves. Suite à la découverte de pollen sur l'une des tombes présente sur le site préhistorique de Shanidar au Nord-Est de l'Iraq, certains auteurs comme Solecki, suggèrent que l'homme de Neandertal utilisait déjà les vertus médicinales des plantes il y a 60 000 ans.¹ Depuis, presque toutes les civilisations ont cumulé leurs expériences et leurs connaissances sur l'utilisation des produits naturels. En Mésopotamie (2 600 av. J.-C.), près de 1 000 substances naturelles et plantes ont été décrites sur des tablettes d'argile.³ Certaines de ces substances comme les huiles de cyprès (*Cupressus sempervirens*) ou de myrrhe (*Commiphora sp.*) sont encore utilisées pour le traitement de la toux, des rhumes et des inflammations.² Dans l'Égypte antique, l'un des plus anciens traités médicaux retrouvés, le Papyrus Ebers (1 500 av. J.-C.), recense près de 800 prescriptions et plus de 700 produits naturels. En Asie, en Inde, en Grèce, au Maghreb de nombreuses œuvres ont également été documentées comme la *materia medica* chinoise, le *De materia medica* de Discorides, le Canon de la médecine d'Avicenna...³

Avec le temps, l'efficacité de plantes médicinales spécifiques, utilisées de manière empirique pour le traitement de certaines maladies, a pu être établie scientifiquement. La science contemporaine a reconnu leur activité et a inclus dans la pharmacothérapie moderne, une gamme de médicaments d'origine végétale, connus par les civilisations anciennes et utilisés au cours des millénaires. Les plantes sont à l'origine de nombreux médicaments comme l'aspirine, dérivée de la salicyline isolée du saule blanc (*Salix alba*), la quinine, isolée des écorces de *Cinchona* spp ou encore la digitaline, extraite de la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*). Actuellement, près de 40 % des médicaments sont d'origine

¹ Solecki, R. S.; *Science* (1975); 190; 880-881.

² Newman, D. J., et al.; *Nat. Prod. Rep.* (2000); 17; 215-234.

³ Dias, D. A., et al.; *Metabolites* (2012); 2; 303-336.

naturelle ou dérivent de produits naturels alors que seulement 10 à 20 % de la biodiversité mondiale a été étudiée d'un point de vue chimique.⁴ Les produits naturels se sont avérés être la source la plus fructueuse de candidats médicaments jusqu'à présent. Cependant, à l'heure actuelle, on assiste à une perte d'intérêt pour ces composés pour plusieurs raisons.⁵ La première est liée à l'essor de la chimie combinatoire qui donne accès à des chimiothèques simples, en peu de temps avec une importante diversité chimique. Une autre des explications du manque d'engouement pour les produits naturels concerne l'évolution de la réglementation sur l'utilisation de la biodiversité impliquant beaucoup de contraintes administratives et juridiques, notamment. Une des dernière raisons est l'apparition du *High Throughput Screening* (HTS) ou criblage haut débit sur des cibles moléculaires bien définies. Les industries pharmaceutiques ont préféré se tourner vers des bibliothèques de composés synthétiques pour réaliser le HTS.

Bien que le HTS semblait très prometteur, le bilan, après quelques années, ne s'est pas avéré être à la hauteur de ce qui était attendu.⁶ Très peu de *hits* ont été obtenus à partir du HTS de chimiothèques synthétiques comparé au HTS de produits naturels. Ceci est, en partie, lié au manque d'hétérogénéité des molécules composant les chimiothèques. Les produits naturels fournissent une diversité structurale unique par rapport à la chimie combinatoire.^{7,8} De plus, les avancées en matière de biologie moléculaire, cellulaire et en génomique ont entraîné une augmentation considérable du nombre de cibles moléculaires réduisant, ainsi, le temps accordé à la découverte d'un futur médicament.

La recherche de composés anti-tumoraux dans les plantes a commencé dans les années 1940 avec l'isolement de la podophyllotoxine, à partir de rhizomes de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae). Par la suite, d'autres familles de molécules ont été isolées comme les vinca-alcaloïdes, isolés de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) et les taxanes isolés de l'If (*Taxus brevifolia*). La réalisation d'hémisynthèses d'analogues des vinca-alcaloïdes et des taxanes par les chercheurs de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) a contribué à sa renommée.^{9,10}

⁴ Newman, D. J. and Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* (2012); 75; 311-335.

⁵ Koehn, F. E. and Carter, G. T.; *Nat. Rev. Drug Discov.* (2005); 4; 206-220.

⁶ Gribbon, P. and Andreas, S.; *Drug Discov. Today* (2005); 10; 17-22.

⁷ Rosén, J., et al.; *J. Med. Chem.* (2009); 52; 1953-1962.

⁸ McLeod, M. C., et al.; *Nat. Chem.* (2014); 6; 133-140.

⁹ Mangatal, L., et al.; *Tetrahedron* (1989); 45; 4177-4190.

¹⁰ Potier, P., et al.; *J. Chem. Soc.* (1975); 670-671.

Le cancer est une des premières causes de mortalité dans le monde. Le nombre de personnes atteintes chaque année ne cesse d'augmenter, ce qui en fait un problème de santé publique majeur. Les premiers anti-cancéreux, isolés de plantes et ciblant la tubuline ou les topo-isomérases I et II, se sont avérés être très actifs sur les cellules tumorales mais également sur les cellules normales entraînant des effets secondaires importants. Les progrès scientifiques ont permis de mettre en évidence de nouvelles cibles du cancer telle que l'apoptose dans laquelle intervient une famille de protéines clés, les Bcl-2. La restauration de l'apoptose, en inhibant les protéines anti-apoptotiques de cette famille, est un des axes de recherche qu'a choisi de développer l'équipe du Dr. F. Roussi à l'ICSN.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette voie de recherche dont le contexte est présenté dans la première partie. Cette partie introductive présente également, le cancer, l'apoptose, les protéines de la famille Bcl-2 et plus particulièrement Bcl-xL et Mcl-1 ainsi que les molécules inhibitrices de ces deux protéines. La deuxième partie décrit les essais rapportés dans la littérature sur ces protéines et la mise au point des essais biologiques, utilisant la polarisation de fluorescence, nécessaire à la sélection des deux plantes à investiguer chimiquement, *Knema hookeriana* (Myristicaceae) et *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (Annonaceae). Dans la troisième partie, une description des plantes sélectionnées et des molécules isolées au cours de cette étude est réalisée. Pour finir, la quatrième partie, intitulée "partie expérimentale" détaille les expériences présentées dans ce manuscrit.

Intercalaire rouge

Partie 1 : Etat des connaissances et présentation du projet

Chapitre 1

Du cancer aux protéines Bcl-xL et Mcl-1

1. Le cancer

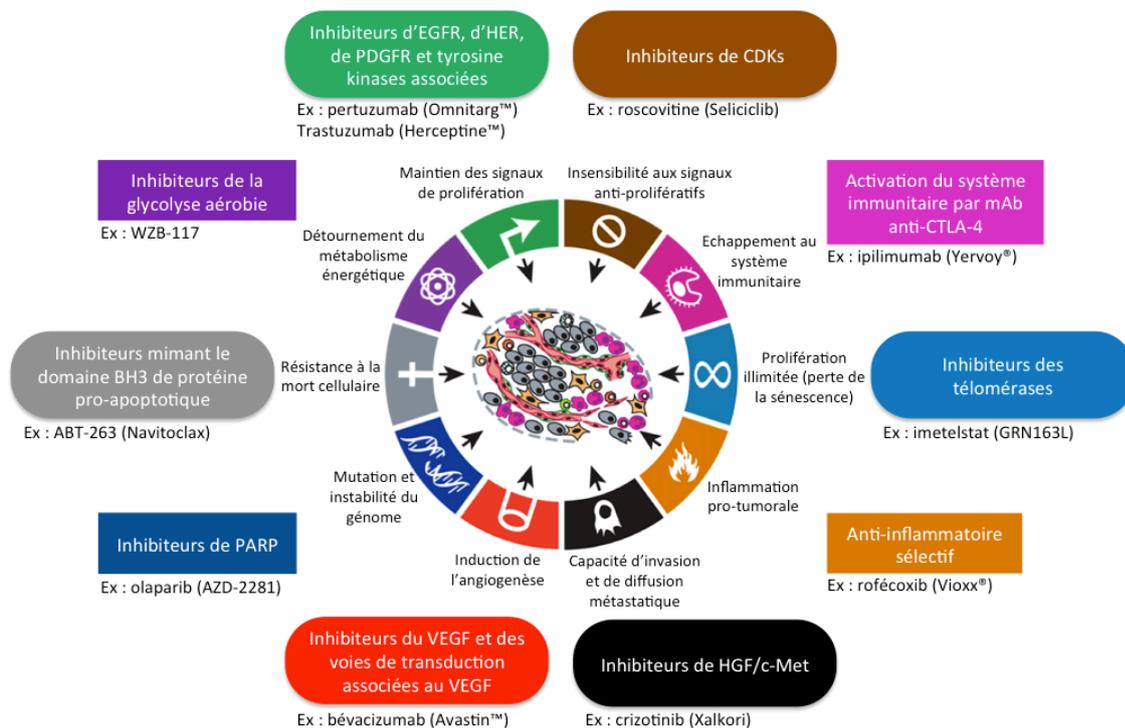
En 2012, 14,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été diagnostiqués dans le monde, 8,2 millions de personnes sont décédées à cause du cancer et près de 32,6 millions de personnes vivaient avec cette maladie.¹¹ Ces chiffres font de celle-ci une des premières causes de mortalité dans le monde. Les organes les plus fréquemment touchés par le cancer, hommes et femmes confondus, sont le poumon, le sein, le colon, la prostate et l'estomac.

L'objectif majeur de la recherche sur le cancer est de réduire la mortalité liée à cette maladie. A plus court terme, il est d'améliorer la qualité de vie des patients par des traitements plus efficaces et moins toxiques, d'où l'essor, depuis quelques années, des thérapies ciblées que l'on qualifie de traitement "sur mesure" ou encore de médecine personnalisée.

Selon le dictionnaire Larousse le cancer est un "ensemble de cellules indifférenciées qui, échappant au contrôle de l'organisme, se multiplient indéfiniment, envahissent les tissus voisins en les détruisant, et se répandent dans l'organisme en métastases". Actuellement, différentes approches thérapeutiques sont utilisées *via* deux types majeurs de traitement : les traitements dit locorégionaux qui incluent la radiothérapie et la chirurgie et les traitements dit systémiques telles que l'immunothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées. Plus la recherche avance dans ce domaine plus il ressort que le cancer est une maladie d'une redoutable complexité dont la multiplicité des

¹¹ http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (consulté le 16/07/2014)

déterminants appelle des réponses plus ciblées. Les cellules cancéreuses possèdent une dizaine de propriétés intrinsèques telles que l'échappement au système immunitaire, la résistance à la mort cellulaire ou encore l'induction de l'angiogénèse, sur lesquelles les chercheurs peuvent s'appuyer pour élaborer de nouvelles thérapies ciblées (cf. Figure 1). Entre 2004 et 2010, 30 nouvelles chimiothérapies ont été mises sur le marché en Europe dont 14 thérapies ciblées selon l'Institut National du Cancer (INCa).



PARP : Poly(ADP-Ribose) ; **EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ; **HER** (*Human Epidermal Receptor*) ; **PDGFR** (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*) ; **CDK** (*Cyclin-Dependant Kinase*) ; **mAb** (*monoclonal Antibodies*) ; **CTLA-4** (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) ; **HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*) ; **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*).

Figure 1 : Caractéristiques majeures d'une cellule tumorale. Schéma adapté de "Hallmarks of cancer".¹²

La Figure 1 met en évidence les dix principales voies de signalisation pour stopper ou faire régresser les tumeurs. Parmi elles, le détournement du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire font partie des axes émergents de recherche depuis 2011. L'inflammation pro-tumorale, les mutations et l'instabilité du génome font, elles, partie du "micro-environnement tumoral" favorable à l'établissement des autres propriétés

¹² Hanahan, D. and Weinberg, R. A.; *Cell* (2011); 144; 646-674.

du cancer. Associés à chacune de ces caractéristiques, sont présentés des exemples de cibles étudiées et la où les molécules interagissant avec ces cibles (petites molécules, anticorps monoclonaux etc.). Par exemple, le Navitoclax est un inhibiteur des protéines anti-apoptotiques, en phase clinique, mimant le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques. Il empêche la résistance à la mort cellulaire et par conséquent la croissance de la tumeur.

Le dérèglement de l'apoptose est une des causes principales de la prolifération anarchique des cellules tumorales et de l'apparition de résistances aux traitements par des agents anticancéreux. La restauration de l'apoptose pour lutter contre le cancer est une nouvelle approche thérapeutique apparue il y a une vingtaine d'années. C'est dans ce contexte que l'équipe de Dr Fanny Roussi se propose de développer un axe de recherche qui s'attache à découvrir de nouveaux inhibiteurs de protéines anti-apoptotiques.

2. L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Cette mort cellulaire implique un processus actif sous le contrôle d'un programme codé génétiquement par la cellule elle-même. C'est un processus biologique différent de la nécrose, de l'autophagie ou encore de la sénescence. Il permet de réguler finement l'équilibre entre naissance et disparition des cellules. L'apoptose a été décrite pour la première fois par Kerr et ses collaborateurs dans les années 1970. Le dérèglement de ce processus physiologique peut être à l'origine de cancers. Aujourd'hui, c'est un des événements biologiques les plus étudiés en recherche sur le cancer.¹³

Une cellule qui entre en apoptose est caractérisée par des modifications morphologiques spécifiques illustrées Figure 2.

¹³ Kerr, J. F., *et al.*; *Brit. J. Cancer* (1972); 26; 239-257.

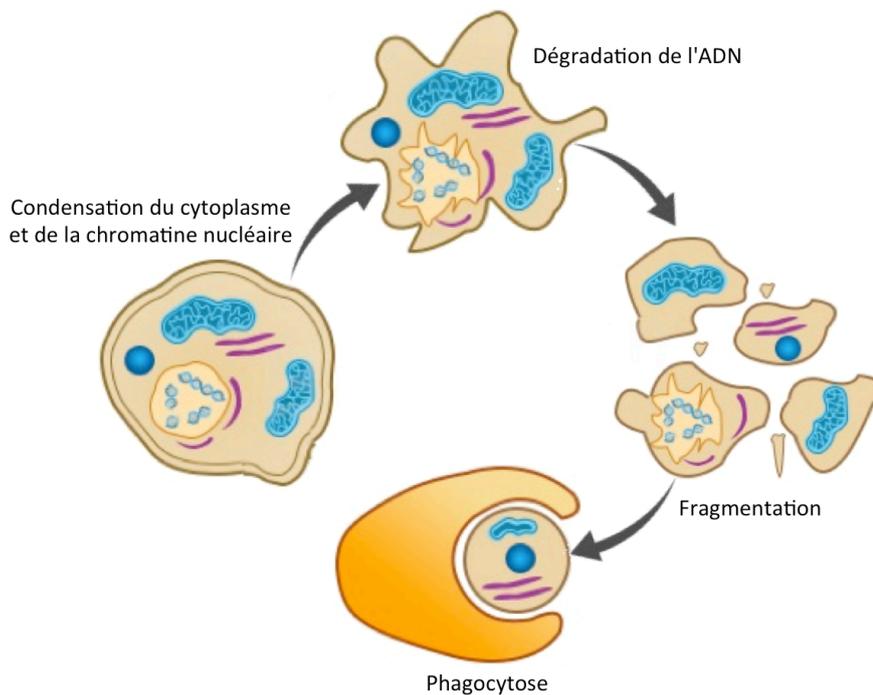


Figure 2 : Représentation morphologique schématique d'une cellule en cours d'apoptose.¹⁴

Lorsqu'une cellule entre en apoptose le cytoplasme et la chromatine nucléaire se condensent, et les membranes nucléaire et cytoplasmique convolutionnent jusqu'à bourgeonner. La cellule se fragmente en vésicules formant des corps apoptotiques et l'ADN se dégrade. Les corps apoptotiques sont ensuite phagocytés.¹⁵

La mort programmée des cellules joue un rôle fondamental dans le développement animal, l'homéostasie tissulaire et la défense contre les agents pathogènes.¹⁶ Elle a été étudiée chez des organismes très différents tels que le nématode *Caenorhabditis elegans*, la drosophile, le xénope, la poule, l'homme...

¹⁴ <http://www.buzzle.com/images/diagrams/apoptosis-morphological-changes.jpg> (consulté le 16/07/14)

¹⁵ Jacobson, M. D., *et al.*; *Cell* (1997); 88; 347-354.

¹⁶ Fuchs, Y. and Steller, H.; *Cell* (2011); 147; 742-758.

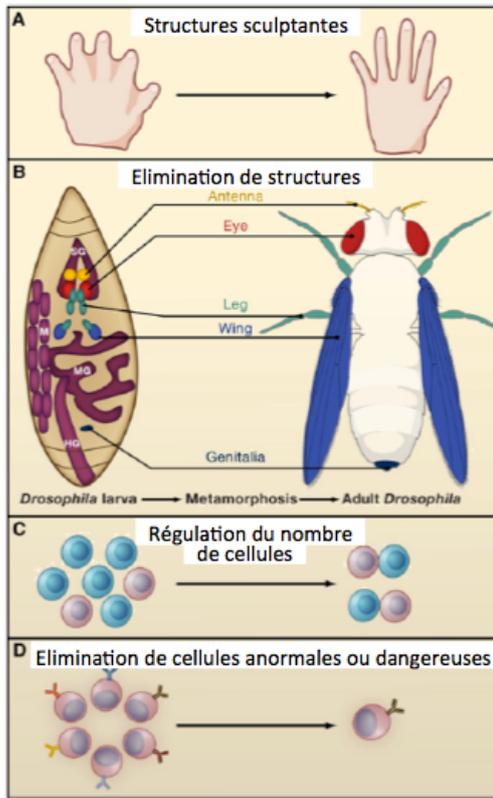


Figure 3 : Rôles de l'apoptose pendant le développement.¹⁶

L'apoptose joue de multiples rôles essentiels au développement et à la survie de l'organisme (cf. Figure 3) :

(A) dans l'organogenèse et le remodelage des tissus comme l'élimination des espaces interdigitaux lors de la formation des doigts,

(B) lors de la métamorphose de la drosophile où quasiment toutes les structures de la larve sont éliminées, et seules certaines d'entre elles vont croître,

(C) dans la régulation du nombre de cellules, où celles qui ne peuvent pas s'apparier par paire sont éliminées,

(D) lors du processus de mort cellulaire programmée où l'apoptose sert en quelque sorte de "contrôle qualité" des cellules. Par exemple, dans le système immunitaire humain, une sélection des lymphocytes défectueux, possédant un potentiel d'auto-immunité, s'opèrera par expression d'antigènes à la surface membranaire.

L'apoptose est un phénomène hautement régulé faisant intervenir plusieurs voies de signalisation (cf. Figure 4)

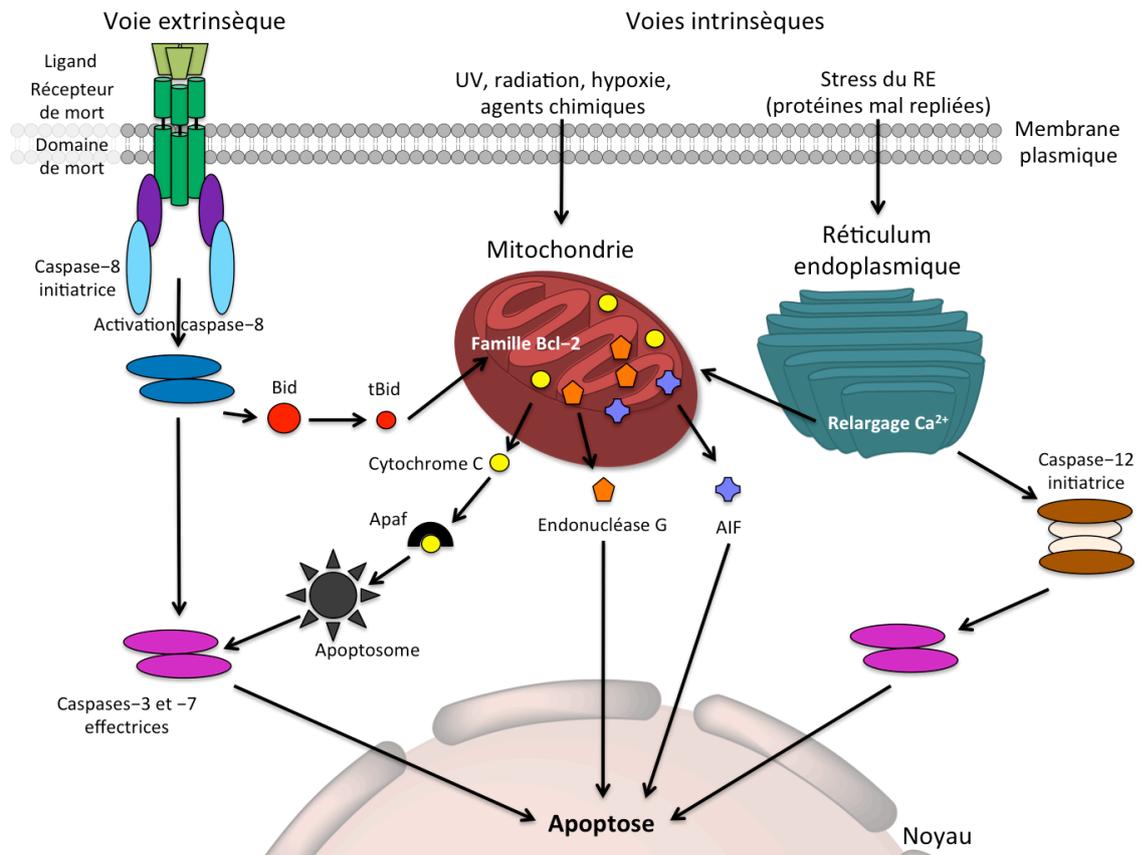


Figure 4 : Schéma des voies de signalisation de l'apoptose adapté de Gupta.¹⁷

Il y a la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort, la voie intrinsèque ou voie mitochondriale et la voie intrinsèque du réticulum endoplasmique qui est relativement peu connue.¹⁸

La voie extrinsèque est initiée à partir de signaux transmis par des récepteurs membranaires dit récepteurs de mort. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) et possèdent un domaine de mort ou DD (*Death Domain*) intracellulaire qui assure la transmission du signal. La liaison du ligand proapoptotique à son récepteur va entraîner des réactions en chaîne conduisant au processus de mort cellulaire.

La voie mitochondriale est, quant à elle, déclenchée suite à un stress cellulaire tels qu'un choc thermique ou osmotique, des radiations ionisantes, des dommages au niveau de l'ADN, des agents chimiothérapeutiques etc. A la suite de ces stimuli, on observe un accroissement de la perméabilité mitochondriale. Ainsi, certaines protéines situées dans les

¹⁷ Gupta, S.; *Discov. Med.* (2005); 5; 298-302.

¹⁸ Wong, R.; *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (2011); 30; 87.

espaces inter-membranaires comme le cytochrome c, l'AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*), et l'endonucléase G sont libérées dans le cytosol.¹⁹ Le relargage du cytochrome c est hautement régulé par les protéines clés de la voie mitochondriale, celles de la famille des Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) qui seront décrites plus en détail dans le chapitre suivant. Néanmoins, on distingue deux classes au sein de ces protéines, les protéines anti-apoptotiques qui bloquent l'efflux du cytochrome c vers le cytosol et les protéines pro-apoptotiques qui le promeuvent. C'est l'équilibre entre ces deux partenaires de la même famille Bcl-2 qui va faire pencher la balance vers l'apoptose ou non. Une fois relargué dans le cytosol et en présence d'ATP, le cytochrome c va former avec l'Apaf-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor*) et la procaspase-9, l'apoptosome.²⁰

La troisième voie de signalisation de l'apoptose est celle du réticulum endoplasmique (RE).²¹ En effet, le RE est responsable de la synthèse et du repliement fonctionnel des protéines. Il a besoin de protéines chaperonnes, de calcium, d'un environnement oxydant et surtout d'ATP pour remplir son rôle. Ainsi une perturbation du niveau d'énergie cellulaire peut entraîner un stress à l'origine de l'accumulation et de l'agrégation de protéines pas ou mal repliées qui sont toxiques pour la cellule. Les cellules vont alors déclencher une voie de signalisation particulière, l'UPR (*Unfolded Protein Response*), afin de rétablir les fonctions physiologiques du RE. Cependant, lorsque le stress est trop intense ou de trop longue durée, l'UPR entraîne l'apoptose.

Ces trois voies sont étroitement "connectées" par l'intermédiaire d'acteurs communs : les caspases. Comme illustré sur la Figure 4, les voies extrinsèque et intrinsèque ne sont pas indépendantes. En effet, la caspase-8 est capable d'activer la protéine pro-apoptotique Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) en tBid (*truncated Bid*) pour Bid tronqué, qui interagit avec les membres de la voie mitochondriale. Les caspases sont des protéases à cystéine qui ont un rôle majeur dans l'inflammation et l'apoptose. Elles sont présentes dans les cellules sous leur forme zymogène, c'est-à-dire de précurseur inactif.²² En réponse à un stimuli induisant la mort, les caspases sont activées par le clivage au niveau de résidus aspartate spécifiques conduisant à la formation d'une petite et d'une grande sous-unité.

¹⁹ Green, D. R. and Kroemer, G.; *Science* (2004); 305; 626-629.

²⁰ Kroemer, G., et al.; *Physiol. Rev.* (2007); 87; 99-163.

²¹ Logue, S., et al.; *Apoptosis* (2013); 18; 537-546.

²² Hengartner, M. O.; *Nature* (2000); 407; 770-776.

Les nombreux médiateurs qui composent les voies de signalisation de l'apoptose en font un domaine d'investigation très riche et très complexe pour la recherche. Ce sont autant de perspectives pour lutter contre le cancer.

3. Les champs d'investigation de la recherche

Différents mécanismes contribuent à l'échappement de l'apoptose et donc à la carcinogenèse. Il existe, notamment, cinq grands axes de recherche pour restaurer l'apoptose et ainsi trouver de nouveaux traitements contre le cancer (cf. Figure 5).

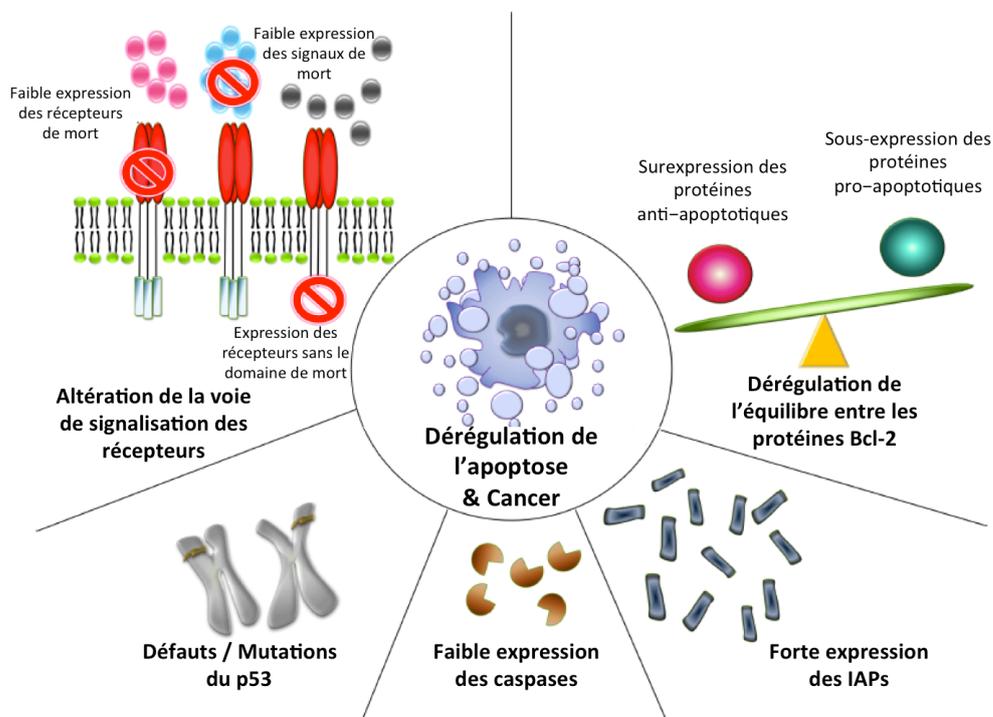


Figure 5 : Mécanismes qui contribuent à l'échappement de l'apoptose et à la carcinogenèse.¹⁸

Un des premiers axes développé se situe au niveau des récepteurs de mort. Parmi les plus étudiés, il y a les couples récepteur/ligand Fas/FasL (*Apoptosis Stimulating Factor*), TNFR1/TNF α (*Tumor Necrosis Factor*) ou encore TRAILR1/TRAIL (*TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*).²³ Il a été montré que la résistance au traitement de la leucémie était liée à une faible expression des récepteurs Fas.²⁴ La faible expression des signaux de mort ainsi

²³ Bremer, E.; *Oncology* (2013); 2013; 25.

²⁴ Friesen, C., et al.; *Leukemia* (1997); 11; 1833-1841.

que la présence de récepteur de mort sans le domaine de mort DD ont également un rôle dans le développement et la croissance de certains cancers.

Le second axe de recherche concerne la protéine suppresseur de tumeur 53 ou p53. Cette protéine a un rôle prépondérant dans le cancer, l'apoptose, la stabilité du génome et l'inhibition de l'angiogenèse. Dans plus de 50% des cancers chez l'Homme, le gène qui code pour p53 est muté.²⁵

Des chercheurs ont montré que l'expression des microARN de certaines caspases, notamment la caspase-3, était très faible voire inexistante dans des échantillons de tumeurs du sein, des ovaires ou du col de l'utérus.²⁶ De même, dans certains cas, une ou plusieurs caspases pouvaient être sous-exprimées contribuant ainsi au développement et à la croissance des cellules tumorales.¹⁸

L'avant dernier axe de recherche concerne les IAPs. Ce sont des protéines inhibitrices de l'apoptose qui régulent cette mort cellulaire, la transduction du signal et la cytokinèse.¹⁸ Ce sont des inhibiteurs endogènes des caspases. Ils inhibent leur activité en se liant à elle, en favorisant la dégradation des caspases actives ou en les gardant loin de leur substrat.²⁷ En effet, des chercheurs ont trouvé que les IAPs sont surexprimés dans divers cancers comme les leucémies et certains lymphomes etc.²⁷

Pour finir, c'est la dérégulation de l'équilibre entre les protéines de la famille des Bcl-2, les anti-apoptotiques et les pro-apoptotiques, qui est extrêmement importante dans l'initiation et la croissance de tumeurs. La recherche d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques dans le but de rétablir l'équilibre entre les différents membres de la famille Bcl-2 est l'objet de ce travail de thèse. C'est pourquoi cette famille de protéine ainsi que les inhibiteurs déjà connus vont être décrits plus en détail dans le chapitre suivant.

²⁵ Bai, L. and Zhu, W.-G.; *J. Cancer Mol.* (2006); 2; 141-153.

²⁶ Devarajan, E., *et al.*; *Oncogene* (2002); 21; 8843-8851.

²⁷ Smolewski, P. and Robak, T.; *Curr. Mol. Med.* (2011); 11; 633-649.

Chapitre 2

Les protéines de la famille Bcl-2

L'échappement de l'apoptose est considéré depuis longtemps comme étant une des caractéristiques majeure de la cellule cancéreuse. Ce phénomène est également souvent lié à la résistance aux chimiothérapies ainsi qu'à la récurrence tumorale. Comme nous avons pu le souligner précédemment, les protéines de la famille Bcl-2 font partie des médiateurs clés de la voie mitochondriale de l'apoptose. Lors de la description de ces protéines, nous focaliserons notre attention sur deux des membres de cette famille sur lesquelles porte notre étude : Bcl-xL et Mcl-1.

1. La découverte

C'est au milieu des années 1980 qu'a été découvert l'oncogène *Bcl-2* dans les lymphomes à cellules B d'où il tire son nom.²⁸ Ce gène diffère des autres oncogènes puisque au lieu d'induire la prolifération cellulaire, il induit la viabilité cellulaire. Suite à une translocation au niveau des chromosomes 14 et 18, le contrôle transcriptionnel du gène *Bcl-2* est modifié.²⁹ Il en résulte une surexpression de la protéine Bcl-2 bloquant ainsi l'apoptose. Ce réarrangement chromosomique est présent dans plus de 60 % des lymphomes folliculaires humains. De plus, il s'avère que Bcl-2 est surexprimée dans les

²⁸ Tsujimoto, Y., *et al.*; *Science* (1984); 226; 1097-1099.

²⁹ Kirkin, V., *et al.*; *Biochim. Biophys. Acta* (2004); 1644; 229-249.

carcinomes à petites cellules du poumon, les leucémies lymphocytaires chroniques, les mélanomes, les cancers de la prostate, des ovaires, de la vessie, du sein et du colon.³⁰

Par la suite, d'autres protéines très proches de Bcl-2 ont été découvertes telles que Bcl-xL pour *B-Cell Lymphoma Extra Large* et Mcl-1 pour *Myeloid Cell Leukemia 1*. Bcl-xL est surexprimée dans le cancer du pancréas, les carcinomes hépatocellulaire et rénal.³⁰ Il semblerait que Bcl-2 et Bcl-xL soient surexprimées dans plus de 50% des cancers.³¹ Mcl-1 est surexprimée dans le cancer de la prostate et les leucémies lymphocytaires chroniques à cellules B.³⁰

L'implication de cette famille de protéines dans ces divers cancers en fait donc une cible thérapeutique majeure.

2. Structure des protéines "Bcl-2" et rôles dans l'apoptose

L'élément critique qui conduit la cellule à la mort *via* l'apoptose est l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe ou MOMP (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*). En effet, c'est elle qui va permettre le relargage de molécules pro-apoptotiques dans le cytosol. La MOMP est contrôlée par les interactions protéine-protéine entre les membres de la famille "Bcl-2".³²

Toutes les protéines de cette famille possèdent un à quatre motifs conservés, appelés domaines d'homologie Bcl-2, BH1 à BH4. Ces domaines correspondent à des segments hélicoïdaux qui dictent la structure et la fonction des protéines.³³ Toutes les protéines de cette famille ont en commun le domaine BH3. Ce dernier est essentiel car il permet l'association des protéines en dimères. La famille des Bcl-2 contient une vingtaine de membres qui peuvent être classés dans deux groupes en fonction de leur activité et de leur structure (*cf.* Figure 6).

³⁰ Fesik, S. W.; *Nat Rev Cancer* (2005); 5; 876-885.

³¹ Juin, P., *et al.*; *Biochim. Biophys. Acta* (2004); 1644; 251-260.

³² Danial, N. N.; *Clin. Cancer Res.* (2007); 13; 7254-7263.

³³ Bajwa, N., *et al.*; *Expert. Opin. Ther. Pat.* (2012); 22; 37-55.

Protéines anti-apoptotiques multi-domaines



Protéines pro-apoptotiques

→ **multi-domaines**



→ **BH3-only**

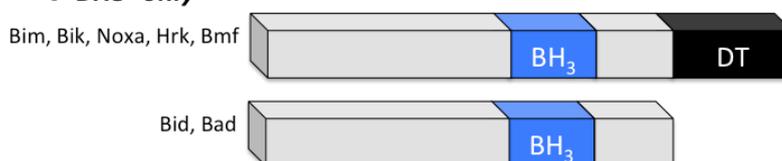


Figure 6 : Structures par domaines des protéines apoptotiques.

2.1. Les protéines anti-apoptotiques

Ces protéines sont composées des 6 membres suivants : Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-b et Bfl-1 (=A1). Elles possèdent toutes le domaine transmembranaire (DT) ainsi que les domaines BH1, BH2 et BH3. Ces trois domaines forment une poche ou sillon hydrophobe grâce auquel les protéines vont pouvoir s'homo ou s'hétérodimériser. Cette poche est stabilisée par le domaine BH4. Cependant une différence notable concerne Mcl-1 et Bfl-1 qui ne possèdent pas le domaine BH4 contrairement à Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-b et Bcl-2. Bien que BH4 soit manquant, le sillon hydrophobe de Mcl-1 a une conformation intermédiaire, par rapport aux autres membres anti-apoptotiques, entre la conformation dite ligand-lié et ligand-libre. Cette conformation est due au fait que des régions de potentiel électrostatique positif bordent le sillon.³⁴

La première structure publiée fut celle de la protéine humaine Bcl-xL, déterminée par cristallographie et résonance magnétique nucléaire (RMN) en 1996 par Muchmore et

³⁴ Day, C. L., *et al.*; *J. Biol. Chem.* (2005); 280; 4738-4744.

ses collaborateurs.³⁵ Celle de Mcl-1 n'a été publiée que 9 ans après pour la structure RMN³⁴ et 11 ans après pour la structure cristallographique.³⁶

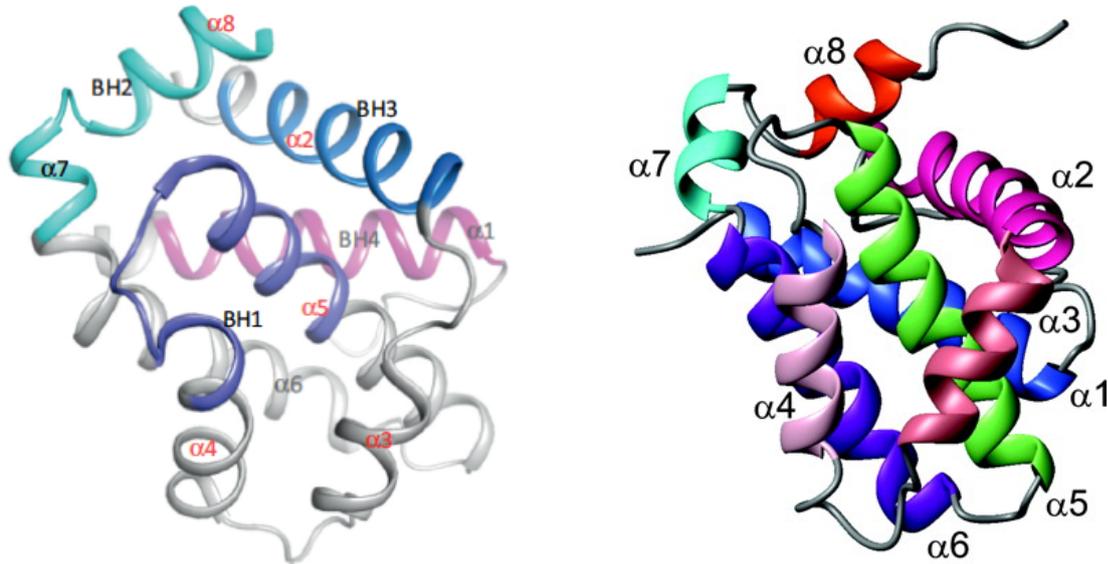


Figure 7 : Structures tridimensionnelles tronquées de Bcl-xL³⁷ (gauche) et Mcl-1.³⁴ (droite).

Cette famille de protéines anti-apoptotiques possède globalement la même structure tridimensionnelle de base appelée le noyau Bcl-2. Il consiste en un ensemble de 8 hélices α qui forment un sillon hydrophobe entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 5$ avec une courte hélice $\alpha 8$ à l'extrémité C-terminale.^{35,38} L'hélice $\alpha 9$, au niveau du domaine transmembranaire, tronquée sur la Figure 7, sert pour l'insertion des protéines dans la membrane externe de la mitochondrie.³⁷ Selon la PDB (*Protein Data Bank*), toutes ces protéines ont été cristallisées soit seule soit avec un membre des Bcl-2.

Les structures cristallographiques de Bcl-xL et Mcl-1 ont permis de mettre en évidence quelques acides aminés (AA) importants qui diffèrent entre les sillons de ces deux protéines.³⁶ Par exemple, l'équipe de Colman a noté pour Mcl-1, une occupation de l'espace du sillon par deux résidus (glycine et valine) au lieu d'un seul pour Bcl-xL entraînant la moindre exposition au solvant d'un résidu arginine important pour l'interaction avec le domaine BH3 de Bim.³⁶ Les différences observées entre Bcl-xL et Mcl-1 sont à l'origine de

³⁵ Muchmore, S. W., *et al.*; *Nature* (1996); 381; 335-341.

³⁶ Czabotar, P. E., *et al.*; *P. Natl. A. Sci.* (2007); 104; 6217-6222.

³⁷ Moldoveanu, T., *et al.*; *Trends Biochem. Sci.* (2014); 39; 101-111.

³⁸ Petros, A. M., *et al.*; *Biochim. Biophys. Acta* (2004); 1644; 83-94.

disparités au niveau de leur capacité à interagir avec les protéines pro-apoptotiques.³⁹ Les différences d'affinité des protéines anti-apoptotiques vis à vis des protéines pro-apoptotiques sont liées au mode de fixation avec Bcl-xL et Mcl-1.⁴⁰ Malgré tout, plusieurs études ont démontré que le sillon BH3 de ces membres anti-apoptotiques conservait une grande plasticité.⁴¹

2.2. Les protéines pro-apoptotiques

Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-groupes : les protéines pro-apoptotiques multi-domaines dites effectrices, Bok, Bak et Bax, qui possèdent tous les domaines BH et le domaine DT⁴² et les protéines pro-apoptotiques BH3 ou *BH3-only* qualifiées de protéines initiatrices, Bad, Bid, Bim, Noxa, etc., qui ne possèdent que le domaine BH3. BH3 étant le domaine minimal nécessaire à la formation d'une liaison avec les autres membres de la famille Bcl-2.

Ces protéines ont pu être cristallisées ce qui a permis de déterminer leur structure tridimensionnelle (*cf.* Figure 8). Les pro-apoptotiques multi-domaines possèdent quasiment la même structure tridimensionnelle que le noyau Bcl-2. En revanche, les *BH3-only*, à l'exception de Bid, se trouvent sous une forme désordonnée bien qu'au contact d'un partenaire Bcl-2 leur domaine BH3 devienne une hélice amphiphile.

³⁹ Chen, L., *et al.*; *Mol. Cell.* (2005); 17; 393-403.

⁴⁰ Liu, Q., *et al.*; *J. Biol. Chem.* (2010); 285; 19615-19624.

⁴¹ Lee, E. F., *et al.*; *J. Biol. Chem.* (2009); 284; 30508-30517.

⁴² Kvangsakul, M., *et al.*; *Cell Death Differ.* (2008); 15; 1564-1571.

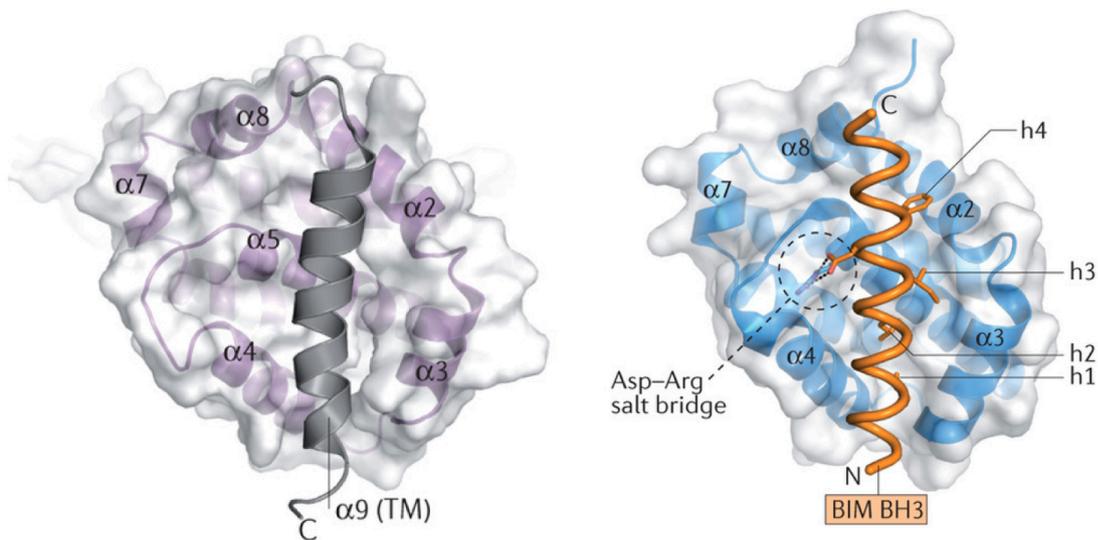


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de Bax en violet et noir (gauche) et de Bim en orange lié à Mcl-1 en bleu (droite).⁴³

Bid est un *BH3-only* particulier qui se trouve à l'interface entre la voie extrinsèque et intrinsèque sous une forme inactive (*cf.* Figure 4). Son clivage, par la caspase-8, va permettre son activation en tBid, contribuant à la transmission du signal de mort.

Les protéines anti- et pro-apoptotiques se situent dans le cytosol des cellules, à la périphérie, ou ancrées dans la membrane des mitochondries ou du réticulum endoplasmique.⁴⁴

Comme précisé précédemment, ces protéines ont un rôle prépondérant dans la régulation de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie ou MOMP. Les *BH3-only* vont capter le signal de mort pour le communiquer aux autres protéines multi-domaines. Les pro-apoptotiques multi-domaines vont s'oligomériser au niveau de la membrane mitochondriale pour permettre la MOMP. Le mécanisme par lequel Bak et Bax sont activés et s'oligomérisent n'est pas encore bien compris. Les protéines anti-apoptotiques vont, quant à elles, inhiber les deux types de protéines pro-apoptotiques en interagissant avec leur domaine BH3. La liaison entre les protéines pro- et anti-apoptotiques neutralise leur activité respective.

⁴³ Czabotar, P. E., *et al.*; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2014); 15; 49-63.

⁴⁴ Shamas-Din, A., *et al.*; *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* (2013); 5; a008714.

Pour expliquer la transmission du signal de mort depuis sa perception jusqu'à l'ouverture des pores mitochondriaux, deux hypothèses étaient jusqu'à présent évoquées⁴³ : la voie d'activation directe et la voie d'activation indirecte ou de déplacement (cf. Figure 9).

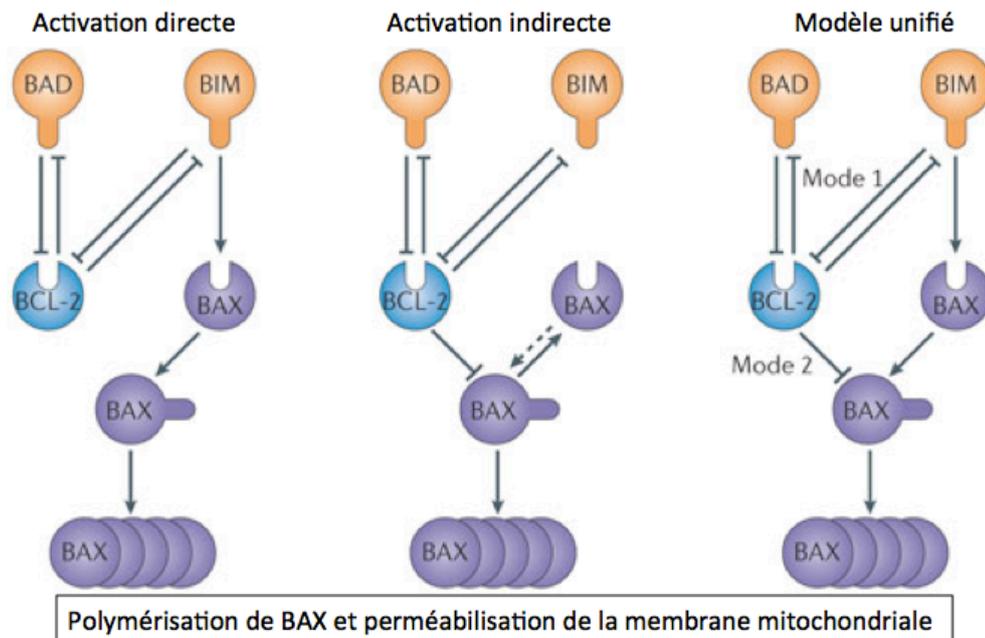


Figure 9 : Modèles d'activation du contrôle de l'apoptose par les Bcl-2.⁴³

Dans la voie directe, les protéines *BH3-only* se lieraient à la fois aux protéines pro- et anti-apoptotiques, permettant d'activer les premières et d'inhiber les secondes. Dans la voie indirecte, les *BH3-only* inhiberaient les protéines anti-apoptotiques en se liant uniquement à elles. Ainsi les protéines pro-apoptotiques pourraient effectuer leur changement conformationnel nécessaire à leur activation. Depuis lors, aucune de ces deux voies n'a été privilégiée mais un autre modèle a été proposé, réunissant les deux modèles évoqués précédemment. Dans ce modèle unifié, tous les membres Bcl-2 pourraient se lier entre eux en fonction du contexte biologique.^{43,44} Ces incertitudes concernant la transmission du signal de mort sont en partie dues au manque de connaissances concernant l'activation des protéines pro-apoptotiques multi-domaines.

Bien que ces protéines soient connues pour leur rôle dans l'apoptose, certaines d'entre elles possèdent d'autres fonctions notamment dans la réponse inflammatoire pour Bid ou dans la régulation du métabolisme du glucose pour Bad etc.^{43,44}

Au vue de leur implication dans le cancer, les protéines de la famille Bcl-2 sont toujours l'objet de nombreuses études dont le but est de mieux comprendre leur rôle au niveau cellulaire, ceci pour mieux les contrôler afin d'induire ou de restaurer l'apoptose.

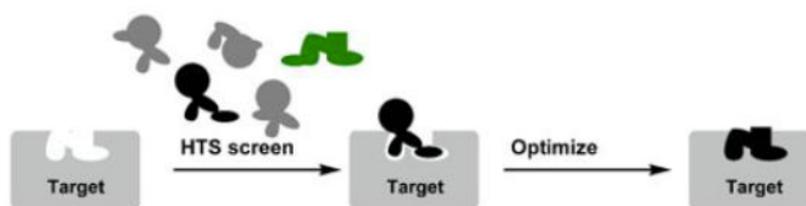
3. Les stratégies de recherche et les inhibiteurs connus

A l'heure actuelle, la recherche scientifique est principalement axée sur la découverte de nouveaux inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques, des BH3 mimétiques. Néanmoins, les avancées récentes concernant la compréhension du fonctionnement des protéines pro-apoptotiques multi-domaines (Bak et Bax) ont fait émerger de nouveaux axes de recherche.⁴⁸ Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur la recherche d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1. Seules les molécules les plus avancées dans les essais cliniques ou les plus récemment publiées seront décrites dans cette partie.

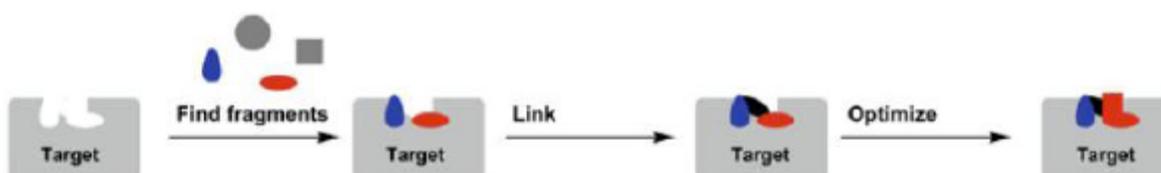
Deux grandes stratégies sont utilisées pour cibler les protéines antiapoptotiques.³³ La première vise à réduire le niveau d'expression des protéines Bcl-2. L'oblimersen (Genasense), développé par Genta, a pu ainsi être développé. Cet oligonucléotide antisens, se liant à l'ARN messager (ARNm) du gène *Bcl-2*, n'a pas reçu l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) pour sa commercialisation.

La deuxième stratégie consiste à utiliser des petites molécules mimant le motif BH3 des protéines pro-apoptotiques pour inhiber les anti-apoptotiques. Cette stratégie repose sur la recherche de peptides ou de petites molécules inhibitrices (PM < 800 Daltons). Différentes méthodes ont été mises au point pour découvrir de tels inhibiteurs.

La première méthode consiste à réaliser un criblage de chimiothèques synthétiques ou naturelles et d'extractothèques par HTS (*cf.* Figure 10).

Figure 10 : Criblage haut débit HTS.⁴⁵

La deuxième méthode consiste à faire un criblage de fragments moléculaires par une approche du type FBDD pour *Fragment-Based Drug Discovery* (cf. Figure 11). L'objectif est, ensuite, de relier les fragments interagissant avec les différents domaines par l'intermédiaire d'un linker pour former une molécule complexe beaucoup plus active.

Figure 11 : Criblage par fragments.⁴⁵

Ces criblages peuvent être réalisés sur des protéines ou des enzymes *in vitro* ou *in cellulo*. D'autres approches ont également été utilisées pour trouver de nouvelles familles de BH3 mimétiques : (1) criblages virtuels *in silico* notamment grâce aux structures cristallines de protéines anti-apoptotiques dont on veut moduler l'activité,⁴⁶ (2) criblages par RMN.⁴⁷

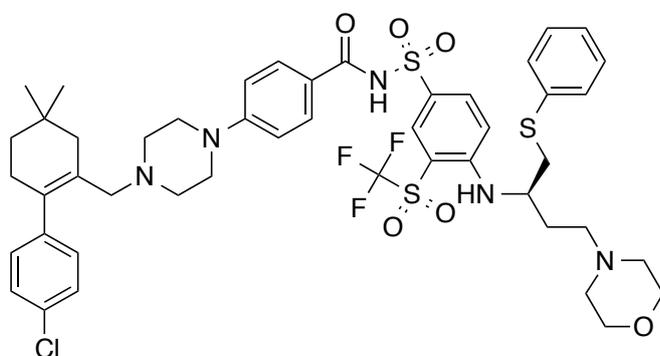
Ces différentes méthodes sont souvent utilisées en parallèle lors de la découverte de nouvelles molécules bioactives.

Deux écoles s'opposent dans la course à la recherche de petites molécules mimant le domaine BH3. On peut rechercher soit des inhibiteurs sélectifs des différentes protéines, soit des inhibiteurs multiples.

⁴⁵ Erlanson, D. A.; *Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography* (2012); 317; 1-32.

⁴⁶ Mukherjee, P., *et al.*; *J. Chem. Inf. Model.* (2010); 50; 906-923.

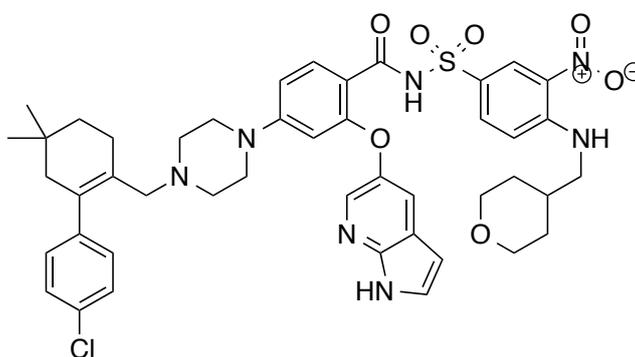
⁴⁷ Aguirre, C., *et al.*; *PLoS ONE* (2013); 8; e64400.

3.1. Les inhibiteurs sélectifs^{48,49}

ABT-263 (1)
Navitoclax
Bcl-xL : $K_i < 0,5$ nM
Bcl-2 : $K_i < 1$ nM
Bcl-w : $K_i < 1$ nM
Phase I/II

Les molécules développées par les laboratoires Abbott font partie des plus prometteuses à l'heure actuelle. C'est par le criblage RMN de fragments qu'a été conçu l'ABT-737.^{50,51} L'ABT-263⁵² ou Navitoclax, son équivalent administrable par voie orale a été élaboré dans un second temps. Ces composés présentent de très fortes affinités pour les protéines Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w. Cependant une toxicité importante sous forme de thrombocytopenie, due à l'inhibition de Bcl-xL, a été mise en évidence pour le Navitoclax. Ceci a conduit à l'élaboration d'un inhibiteur sélectif de Bcl-2 : l'ABT-199 actuellement en phase I.⁴⁸

ABT-199 (2)
Bcl-xL : $K_i = 50$ nM
Bcl-2 : $K_i < 0,01$ nM
Phase I



⁴⁸ Roy, M. J., *et al.*; *Brit. J. Pharmacol.* (2014); 171; 1973-1987.

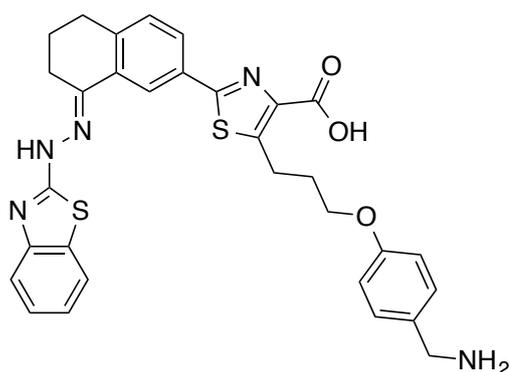
⁴⁹ Czabotar, P. E., *et al.*; *Cell* (2013); 152; 519-531.

⁵⁰ Shuker, S. B., *et al.*; *Science* (1996); 274; 1531-1534.

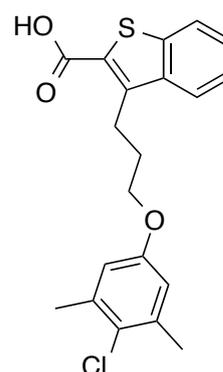
⁵¹ Petros, A. M., *et al.*; *J. Med. Chem.* (2005); 49; 656-663.

⁵² Tse, C., *et al.*; *Cancer Res.* (2008); 68; 3421-3428.

L'ABT-199 a peu d'effet sur les cellules cancéreuses sur-exprimant spécifiquement d'autres protéines anti-apoptotiques.⁵³ D'autres inhibiteurs sélectifs des protéines Bcl-xL et Mcl-1 ont été développés. WEHI-539 est un inhibiteur sélectif de Bcl-xL qui a été développé par Roy et ses collaborateurs en partenariat avec Genentech.⁵⁴ L'équipe de Friberg a décrit récemment un inhibiteur sélectif Mcl-1.⁵⁵



WEHI-539 (3)
Bcl-xL : $CI_{50} = 1 \text{ nM}$



(4)
Mcl-1 : $K_i = 350 \text{ nM}$

L'administration de molécules spécifiques de Mcl-1 ou de Bcl-xL comme l'ABT-263, a révélé une résistance des cellules tumorales au traitement due à la sur-expression de Mcl-1 dans ces cellules.⁵⁶ La solution qu'ont trouvée les cliniciens est d'employer ce type d'inhibiteur sélectif en poly-chimiothérapie.⁴³

Une autre solution pour palier à ces résistances est de trouver des inhibiteurs de Mcl-1 qui agissent également sur les autres protéines anti-apoptotiques, Bcl-xL, Bcl-2 et Bcl-w afin d'éviter les phénomènes d'échappement pouvant conduire à la résistance des cellules tumorales. D'autres inhibiteurs, appelés inhibiteurs multiples ou *pan* inhibiteurs, ont ainsi été conçus et sont en phase d'expérimentation pré-clinique ou clinique.

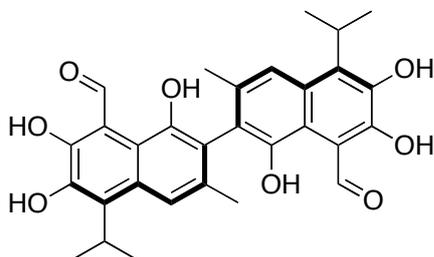
⁵³ Jeng, P. S. and Cheng, E. H.; *Nat. Chem. Biol.* (2013); 9; 351-352.

⁵⁴ Lessene, G., *et al.*; *Nat. Chem. Biol.* (2013); 9; 390-397.

⁵⁵ Friberg, A., *et al.*; *J. Med. Chem.* (2012); 56; 15-30.

⁵⁶ Tahir, S. K., *et al.*; *Cancer Res.* (2007); 67; 1176-1183.

3.2. Les inhibiteurs multiples



AT-101 (5)^{57,58}

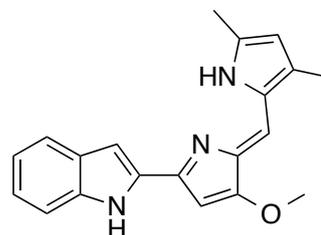
(-)-Gossypol

Bcl-xL : $CI_{50} = 480$ nM

Bcl-2 : $CI_{50} = 320$ nM

Mcl-1 : $CI_{50} = 180$ nM

Phase II/III



GX-15-070 (6)^{57,58}

Obatoclast

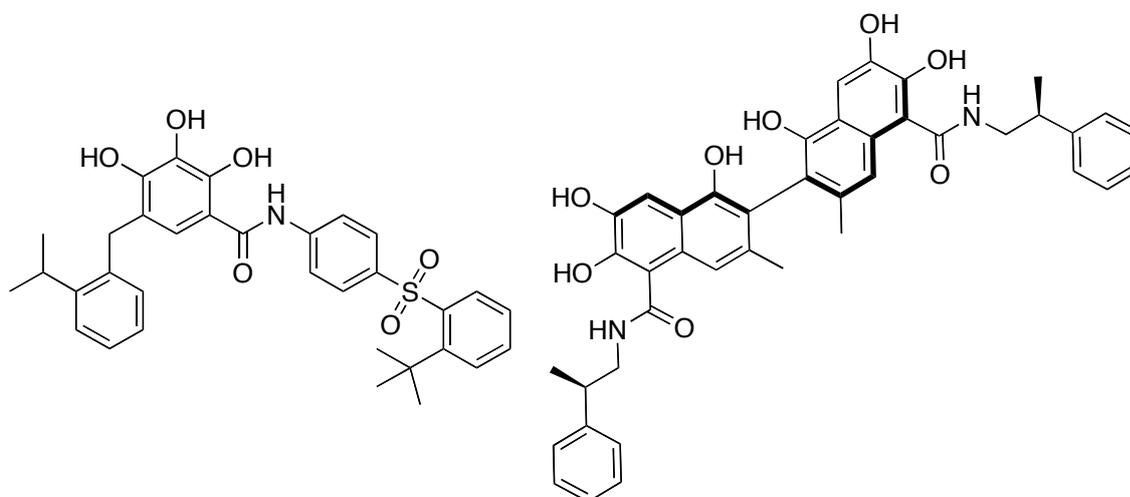
Bcl-xL : $CI_{50} = 4,7$ μ M

Bcl-2 : $CI_{50} = 1,1$ μ M

Bcl-w : $CI_{50} = 7,0$ μ M

Mcl-1 : $CI_{50} = 2,9$ μ M

Phase I/II⁴⁸



TW37 (7)^{57,58}

Bcl-xL : $K_i = 1,11$ μ M

Bcl-2 : $K_i = 0,29$ μ M

Mcl-1 : $K_i = 0,26$ μ M

Phase I/II⁵⁹

BI-97C1 (8)⁶⁰

Sabutoclast

Bcl-xL : $CI_{50} = 0,31$ μ M

Bcl-2 : $CI_{50} = 0,32$ μ M

Mcl-1 : $CI_{50} = 0,20$ μ M

Bfl-1 : $CI_{50} = 0,62$ μ M

Pré-clinique

⁵⁷ Lessene, G., *et al.*; *Nat. Rev. Drug Discov.* (2008); 7; 989-1000.

⁵⁸ Azmi, A. S. and Mohammad, R. M.; *J. Cell. Physiol.* (2009); 218; 13-21.

⁵⁹ Billard, C.; *Mol. Cancer Ther.* (2013); 12; 1691-1700.

⁶⁰ Wei, J., *et al.*; *J. Med. Chem.* (2010); 53; 4166-4176.

Parmi ces inhibiteurs, le plus connu est le (\pm)-gossypol. C'est un polyphénol naturel en mélange racémique isolé des graines de coton, *Gossypium sp.*. Ce composé est le premier inhibiteur des trois protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL et le premier à être entré en essai clinique.⁵⁸ Par la suite, son énantiomère (-) s'est avéré être plus actif. Des analogues du gossypol ont vu le jour, comme l'apogossypol, l'apogossypolone, le TW37 et plus récemment le sabutoclax.

L'obatoclax (GX-15-070), un dérivé de la prodigiosine, est également un inhibiteur de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL. Il a été isolé lors d'un criblage d'interaction protéine-protéine haut débit de différentes bibliothèques de produits naturels.

D'autres inhibiteurs ne sont pas présentés ici, bien que rapportés dans la littérature. Des études ont mis en évidence la toxicité de ces produits, les trop faibles propriétés pharmacologiques ou une trop faible affinité pour le domaine BH3 des protéines.⁵⁹

Dans ce manuscrit, nous avons montré par les différents exemples décrits précédemment et l'avancée de certains essais cliniques que la stratégie qui consiste à s'intéresser aux inhibiteurs mimant le domaine BH3 est pertinente et semble très prometteuse. La méthodologie employée par notre équipe pour trouver des inhibiteurs mixtes de Bcl-xL et Mcl-1 est décrite dans la partie suivante.

Chapitre 3

Présentation du projet et de son environnement

1. Le laboratoire d'accueil

L'ICSN, Institut de Chimie des Substances Naturelles, est l'un des plus importants laboratoires publics de chimie en France. Notre équipe, anciennement dirigée par le Dr Françoise Guéritte et actuellement dirigée par le Dr Fanny Roussi, développe des collaborations officielles avec différents pays tropicaux. Ces collaborations permettent de récolter des plantes endémiques de certaines régions du monde et par conséquent d'avoir accès à une grande biodiversité. Notre équipe a pu ainsi constituer une extractothèque de plus de 14 000 extraits provenant d'environ 6 000 plantes. Ces différents extraits ont ensuite été distribués dans des plaques multi-puits.

2. Les résultats préliminaires

Dans le cadre de la collaboration entre l'ICSN et l'Institut de Recherche Servier (IdRS), les premiers travaux se sont d'abord orientés vers la découverte de nouveaux inhibiteurs naturels de la protéine Bcl-xL. Un essai biologique sur Bcl-xL avait été mis au point et validé par l'IdRS. Bien plus tard, et cela a constitué l'un des axes de recherche développés au cours de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la recherche d'inhibiteurs "*dual*" de Bcl-xL et Mcl-1. Cette évolution dans le programme de recherche défini préalablement et l'arrêt de la collaboration avec l'IdRS sur la cible Bcl-xL a nécessité la mise en place et la validation de deux essais biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1 à l'ICSN.

Ces tests ont été robotisés et miniaturisés, permettant de sélectionner les extraits d'intérêt et d'évaluer les molécules les plus prometteuses.

Les études phytochimiques de plantes de diverses régions du monde (Malaisie, Vietnam, Nouvelle-Calédonie) entreprises à l'ICSN ont permis l'identification de nouvelles structures chimiques originales et variées possédant toutes de très bonnes activités inhibitrices de l'interaction Bcl-xL/Bak (*cf.* molécules présentées ci-après). Grâce à la collaboration avec l'IdRS, l'évaluation biologique sur Bcl-xL de ces molécules avait pu être réalisée.

De nombreux composés actifs ont été isolés à partir de :

- *Endiandra kingiana* (Lauraceae), des polycétides pentacycliques (**9**),⁶¹
- *Combretum sundaicum* (Combretaceae), des triterpènes pentacycliques (**10**),⁶²
- *Lantana camara* (Verbenaceae), des triterpènes pentacyclique (**11**),⁶²
- *Zygogynum baillonii* (Winteraceae), des drimanes sesquiterpènes.⁶³ Le composé (**12**) présent à l'échelle du gramme dans la plante a donné lieu à la synthèse d'analogues.
- *Meiogyne cylindrocarpa* (Annonaceae), méiogyne A (**13**),⁶⁴ un dimère de sesquiterpène. La synthèse totale⁶⁵, réalisée au laboratoire est le point de départ du projet "ANR APOMEIOA" porté par le Dr Fanny Roussi visant à synthétiser des analogues de la méiogyne A.

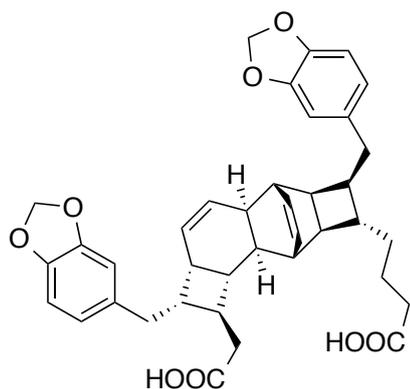
⁶¹ Leverrier, A., *et al.*; *Phytochemistry* (**2011**); 72; 1443-1452.

⁶² Litaudon, M., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (**2009**); 72; 1314-1320.

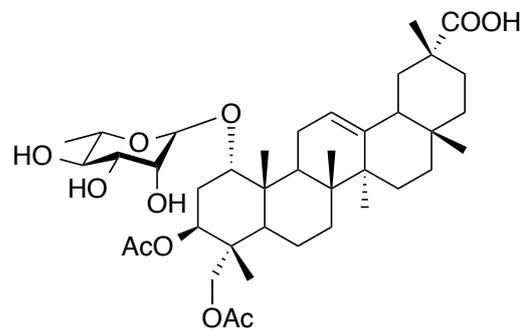
⁶³ Fomekong Fotsop, D., *et al.*; *Tetrahedron* (**2008**); 64; 2192-2197.

⁶⁴ Litaudon, M., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (**2009**); 72; 480-483.

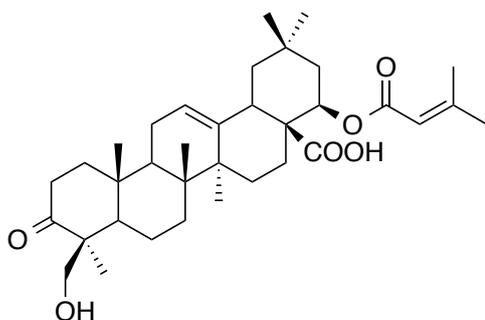
⁶⁵ Fotsop, D. F., *et al.*; *J. Org. Chem.* (**2010**); 75; 7412-7415.



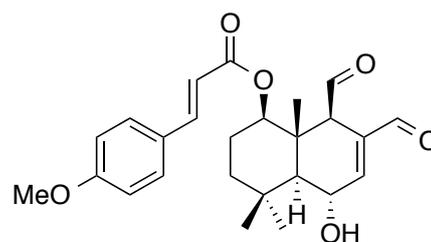
(-)-Kingianine G (9)
Endiandra kingiana
 $CI_{50} = 1 \mu M$



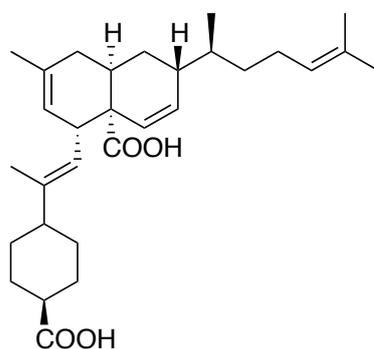
(10)
Combretum sundaicum
 $CI_{50} = 7 \mu M$



(11)
Lantana camara
 $CI_{50} = 5 \mu M$



Isodrimanial (12)
Zygogynum baillonii
 $CI_{50} = 18 \mu M$



Méiogynine A (13)
Meiogyne cylindrocarpa
 $CI_{50} = 8 \mu M$

3. Description des principaux objectifs de ces travaux de thèse

Mes travaux comportent deux volets, l'un à caractère biochimique et l'autre à caractère chimique.

Ils avaient pour objectifs, d'une part, le transfert à l'ICSN de l'essai biologique sur Bcl-xL initialement réalisé par l'Institut de Recherche Servier et à la mise au point et validation d'un second essai biologique sur la protéine anti-apoptotique Mcl-1, et d'autre part à l'étude phytochimique bioguidée de trois plantes malaisiennes appartenant aux genres *Fissistigma*, *Mitrephora* (Annonaceae) et *Litsea* (Lauraceae), pré-sélectionnées pour leur activité sur Bcl-xL.

Conclusion

L'un des thèmes de recherches en vogue à l'heure actuelle pour lutter contre le cancer, est de s'intéresser aux dysfonctionnements de l'apoptose, et notamment à la dérégulation de l'équilibre entre protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. Cette dérégulation semble jouer un rôle majeur dans l'initiation et la croissance de certaines tumeurs. Dans ce cadre, bien qu'aucun inhibiteur n'ait jusqu'à présent été validé par les agences du médicament aux Etats-Unis et en Europe, la stratégie consistant à découvrir de petites molécules mimant le domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques semble pertinente et très prometteuse.

Dans la partie suivante, la mise en place des essais biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1, les difficultés rencontrées ainsi que les résultats obtenus lors du criblage d'extraits de plantes et de produits purs sur ces deux protéines sont présentés.

La troisième partie est consacrée à la description de l'étude phytochimique de deux plantes malaisiennes, *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (Annonaceae) et *Knema hookeriana* (Myristicaceae). Le choix de ces plantes est guidé par les résultats du criblage sur Bcl-xL et Mcl-1.

Intercalaire rouge

**Partie 2 : Mise en place des essais
biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1**

Chapitre 1

Les essais biologiques sur les protéines anti-apoptotiques

Dans notre démarche visant à rechercher de petites molécules inhibant les protéines anti-apoptotiques à partir d'extraits complexes de plantes, le choix de la méthodologie permettant l'évaluation biologique est un facteur clé. L'essai biologique doit nous permettre de mesurer l'inhibition ou la modulation d'une interaction "protéine-protéine" qui, dans notre cas, concerne une protéine anti-apoptotique et une pro-apoptotique. Notons dans ce manuscrit, l'utilisation du terme "protéine" pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 et les termes "peptide ou ligand" pour les protéines pro-apoptotiques Bak, Noxa ou encore Bid.

1. Les essais biologiques relatifs aux protéines de la famille des Bcl-2 dans la littérature

Dans la littérature, de nombreux essais relatifs à l'étude des interactions protéine-protéine de la famille des Bcl-2 ont été reportés. Ces essais utilisent des techniques variées basées pour la plupart sur l'usage de la fluorescence.

1.1. L'ELISA

L'équipe de Zhang et ses collaborateurs utilise la technique ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).⁶⁶ La méthode employée par cette équipe (Figure 12) consiste à ajouter un complexe biotine-peptide BH3 (peptide pro-apoptotique) dans les puits d'une plaque recouverte avec de la streptavidine. La biotine, ayant une très forte affinité pour la streptavidine (de l'ordre de 1.10^{-15} M), va se lier à cette dernière. Les complexes biotine-peptide BH3 sont lavés, puis, un mélange comprenant le produit à tester et une protéine anti-apoptotique possédant un tag histidine est ajouté dans le puits. Si le produit a suffisamment d'affinité pour la protéine anti-apoptotique, ils vont se lier l'un à l'autre et seront éliminés au lavage. Dans le cas contraire, la protéine anti-apoptotique va se lier à la pro-apoptotique et seul le produit sera éliminé au lavage. La révélation de l'activité se fera par l'ajout d'un anticorps anti-tag histidine conjugué à une peroxydase, puis du peroxyde d'hydrogène et de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). La peroxydase va oxyder le TMB incolore en un produit de couleur bleue. Cette réaction peut être stoppée par l'ajout d'acide chlorhydrique ou sulfurique. La lecture des résultats se fait à 450 nm.

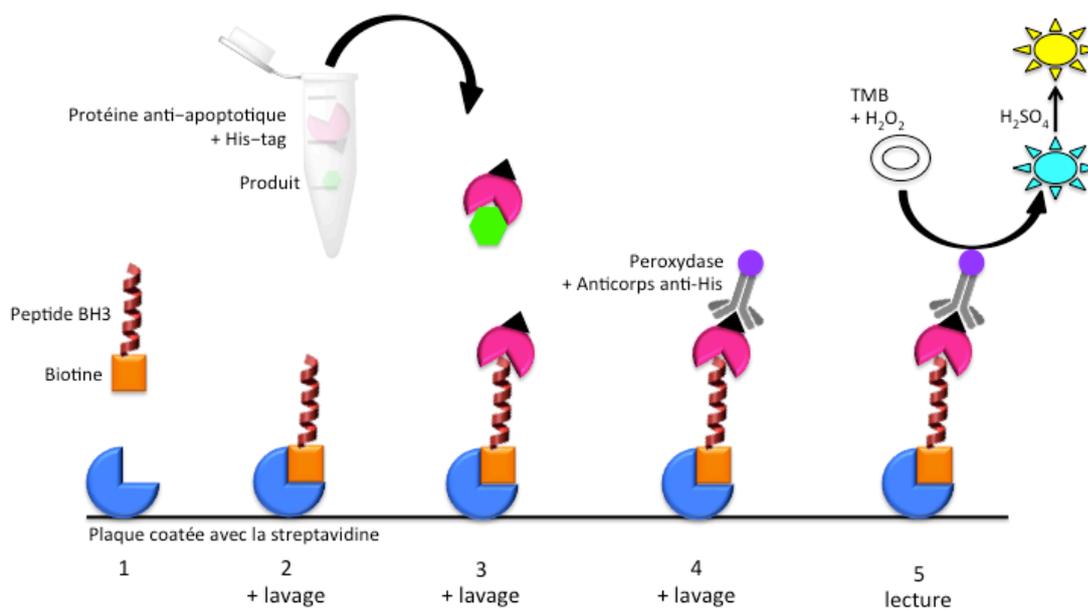


Figure 12 : Principe de la méthode ELISA employée par Zhang et ses collaborateurs.

⁶⁶ Zhang, Z., et al.; *J. Med. Chem.* (2011); 54; 1101-1105.

L'ELISA est la technique la plus utilisée en immunologie puisqu'elle peut être déclinée pour différentes applications pour des essais qualitatifs, quantitatifs, en sandwich ou par compétition. De plus, l'utilisation de l'ELISA est relativement peu coûteuse lorsque l'on utilise les kits vendus dans le commerce. En ce qui concerne les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, ce sont surtout des kits permettant de doser les protéines dans des lysats de cellules, du sérum ou dans le sang qui sont commercialisés.

Pour la mise en évidence d'inhibiteurs des protéines, Zhang et ses collaborateurs ont mis au point un essai utilisant des plaques coâtées dont le coût est élevé et qui implique plusieurs étapes de lavage, ce qui constitue deux inconvénients à prendre en considération. Cependant, l'avantage majeur de cette méthode est de pallier au problème d'auto-fluorescence des produits testés qui sont éliminés lors du lavage.

1.2. Le FRET et le BRET

D'autres équipes ont choisi le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes, FRET pour *Förster/Fluorecence Resonance Energy Transfer* ou BRET pour *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*.^{67,68} L'équipe de Duy Vo et ses collaborateurs utilise le BRET pour mettre en évidence des inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques. Ils transfectent des cellules avec un plasmide codant pour une protéine pro-apoptotique fusionnée à la luciférase de *Renilla* (RLuc) et pour une protéine anti-apoptotique fusionnée avec la protéine fluorescente jaune (YFP). Les cellules sont ensuite transférées dans des plaques multi-puits dans lesquelles sont ajoutés un produit et le substrat de la luciférase, la coelentérazine. Si le produit n'a pas d'affinité pour la protéine anti-apoptotique, le peptide pro-apoptotique va se lier à cette dernière. Suffisamment proche ($< 100 \text{ \AA}$) de la protéine YFP, la luciférase va permettre l'émission d'un photon suite à l'oxydation de la coelentérazine. La protéine YFP excitée par le photon va émettre de la lumière à 530 nm (*cf.* Figure 13).

⁶⁷ Vo, D. D., *et al.*; *Eur. J. Med. Chem.* (2012); 51; 286-293.

⁶⁸ Alexei, D., *et al.*; *Nat. Cell. Biol.* (2001); 3; 173-182.

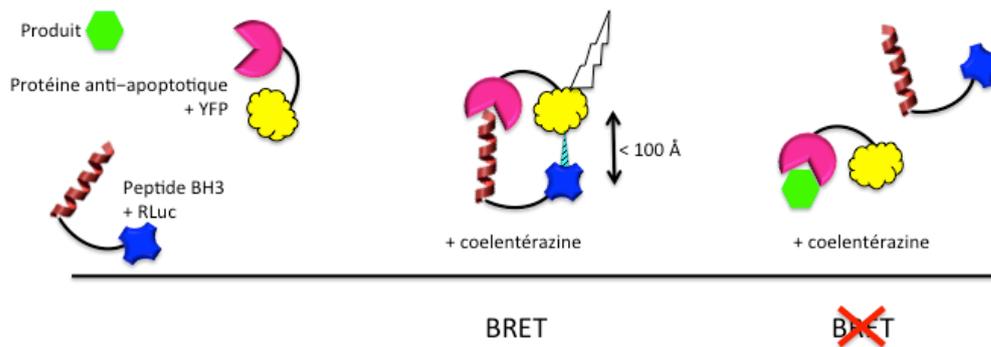


Figure 13 : Principe de la méthode BRET utilisée par Duy Vo et ses collaborateurs.

La technique du FRET est proche de celle du BRET mais les fluorophores employés sont différents, le transfert d'énergie ne se fait pas sous la forme d'émission de lumière, et c'est une lumière externe qui vient exciter le premier fluorophore. Cette technique a été largement utilisée pour étudier des interactions protéine-protéine aussi bien à la surface cellulaire que dans la cellule.

La faible sensibilité du FRET ainsi que des problèmes de recouvrement des spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés ont entraîné l'émergence d'une nouvelle technologie dite "en temps résolu ou TR pour *Time Resolved*" qui lui est souvent associée. Dans ce cas, le fluorophore est constitué d'un chromophore comme le cryptant et d'un cation lanthanide (*e.g.* europium, terbium...). Le complexe ainsi formé possède une durée de vie de luminescence plus longue que la plupart des fluorophores classiques. La lecture des résultats est obtenue en appliquant un délai entre l'excitation et la mesure de l'émission du signal. Elle permet de s'affranchir des fluorescences parasites à durée de vie courte.

Comme le FRET, la faible sensibilité du BRET ainsi que des problèmes de recouvrement des spectres d'émission de la RLuc et l'YFP ont entraîné l'utilisation d'autres molécules que la coelentérazine, telle que la coelentérazine 400a (DeepBlueC™).

1.3. Les billes magnétiques

L'équipe de Pisoni et ses collaborateurs a développé un essai utilisant des billes magnétiques afin de cribler une banque d'extraits microbiens.⁶⁹ Cet essai est basé sur le déplacement d'un peptide pro-apoptotique fluorescent du sillon hydrophobe d'une

⁶⁹ Pisoni, C., *et al.*; *Farmaco* (2005); 60; 938-943.

protéine anti-apoptotique. Cette technique présentée Figure 14 repose sur la présence d'un agent chélatant, l'acide nitriloacétique, immobilisé sur des billes d'agarose chargées avec des ions Ni^{2+} . Dans un premier temps, le produit à tester, la protéine anti-apoptotique et les billes sont incubés. Le peptide pro-apoptotique marqué à la fluorescéine est ensuite ajouté. Un lavage est effectué afin d'éliminer tout ce qui n'est pas lié aux billes magnétiques. Pour finir, la lecture est réalisée grâce à un fluorimètre. Si le produit est un inhibiteur, il va déplacer le peptide, et une diminution de la fluorescence sera observée. Dans le cas contraire, si l'inhibiteur n'est pas assez affiné pour la protéine anti-apoptotique, une forte fluorescence est observée.

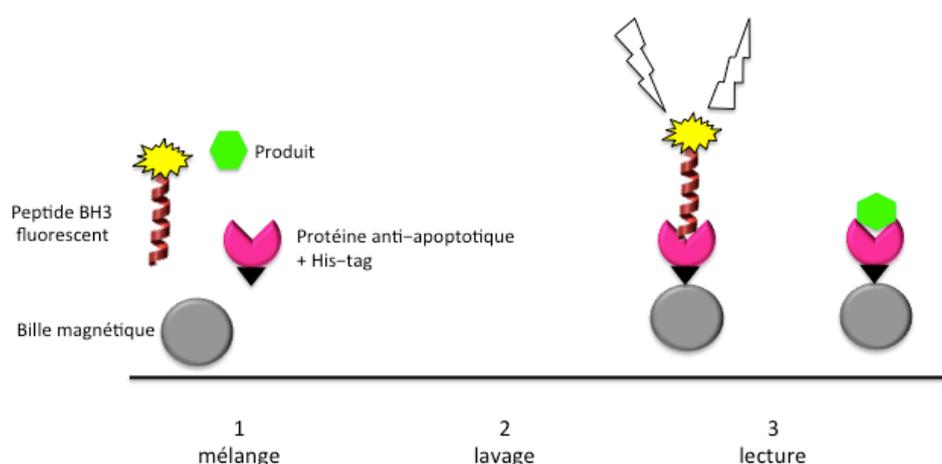


Figure 14 : Principe de la méthode utilisant des billes magnétiques développée par Pisoni et ses collaborateurs.

C'est un essai rapide, pouvant être automatisé et qui n'est pas sensible à l'auto-fluorescence des produits ou extraits.

1.4. La SPA

Whitfield et ses collaborateurs a choisi d'utiliser des billes mais avec l'emploi d'une méthodologie différente.⁷⁰ Ils utilisent la SPA pour *Scintillation Proximity Assay* qui est une technique nécessitant l'emploi d'un ligand radioactif (cf. Figure 15). Comme précédemment, les billes chélatées au Cu^{2+} se lient au tag histidine de la protéine anti-apoptotique, et la streptavidine marquée se lie au complexe biotine-peptide BH3. La liaison entre le peptide

⁷⁰ Whitfield, J., et al.; *Anal. Biochem.* (2003); 322; 170-178.

pro-apoptotique et la protéine anti-apoptotique permet le transfert d'un électron de la streptavidine marquée à la bille scintillante. Cette dernière émet alors un photon.

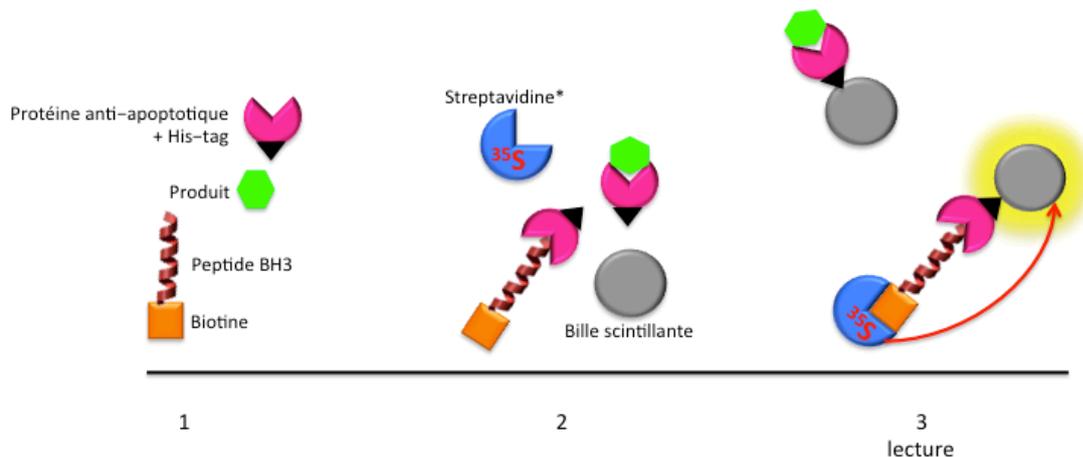


Figure 15 : Principe de la méthode de SPA utilisée par Whitfield et ses collaborateurs.

Cette technique ne nécessite pas d'étape de lavage ni de filtration. Elle n'est pas sensible à l'auto-fluorescence des produits ou extraits. Cependant, elle est relativement coûteuse et l'utilisation de radio-isotopes rend son emploi peu aisé.

1.5. La cytométrie en flux en mode multiplexe

La cytométrie en flux en mode multiplexe est la méthode employée par Curpan et ses collaborateurs (*cf.* Figure 16).⁷¹ La cytométrie en flux permet de caractériser individuellement, quantitativement et qualitativement des particules (molécules, cellules ...) en suspension dans un liquide. Le mode multiplexe confère la possibilité de tester un produit sur plusieurs protéines anti-apoptotiques dans un même puits. Des billes de polystyrène possédant des groupements amines à leur surface et présentant des intensités différentes de fluorescence dans le rouge sont coatées avec du glutathion (GSH). Différentes protéines anti-apoptotiques sont fusionnées avec la glutathion S-transférase (GST). Puis les protéines anti-apoptotiques sont mélangées, séparément, à des billes fluorescentes. Les complexes protéines anti-apoptotiques–billes avec une fluorescence donnée sont rassemblés dans un même puits afin d'y ajouter un peptide pro-apoptotique

⁷¹ Curpan, R. F., *et al.*; *Assay Drug Dev. Techn.* (2011); 9; 465-474.

marqué à la fluorescéine et un inhibiteur. La lecture des résultats est réalisée avec un cytomètre ayant un filtre pour la fluorescéine et un pour la fluorescence des billes.

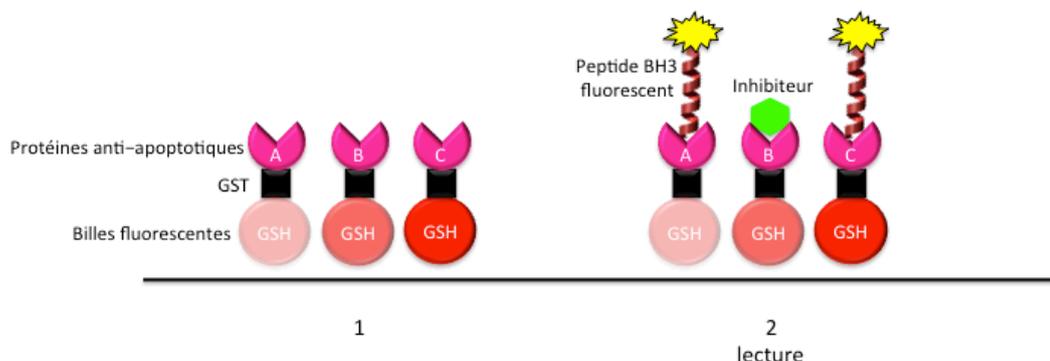


Figure 16 : Principe de la méthode de la cytométrie en flux en mode multiplexe employée par Curpan et ses collaborateurs.

Cette technique peut être utilisée pour faire du criblage haut débit tout en minimisant la quantité de produit à tester. De plus, elle permet directement de définir si l'inhibiteur est sélectif ou s'il est multiple. Cependant, elle semble être davantage adaptée au criblage de produits purs et moins au criblage d'extraits complexes.

1.6. La polarisation de fluorescence

Dans la recherche de nouveaux médicaments, la polarisation de fluorescence (*cf.* Figure 17) est une méthode largement utilisée pour l'étude des interactions protéine-protéine. C'est la méthode choisit par Qian, Zhang ou encore Degtrev pour rechercher des inhibiteur de l'interaction entre les protéines pro- et anti-apoptotiques.^{68,72,73} Ces essais reposent sur une théorie basée sur la fluorescence des molécules, développée par Perrin en 1926⁷⁴, théorie qui a été ensuite retravaillée et appliquée par Weber et Dandliker.⁷⁵ Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par une lumière polarisée, *i.e.* dans un plan, la lumière est émise dans le même plan à condition que la molécule reste immobile à travers l'état excitée (≈ 4 ns pour la fluorescéine).⁷⁶ En revanche, si la molécule tourne et sort hors du plan pendant l'état excité, la lumière sera émise dans un plan différent de celui dans le

⁷² Qian, J., *et al.*; *Anal. Biochem.* (2004); 328; 131-138.

⁷³ Zhang, H., *et al.*; *Anal. Biochem.* (2002); 307; 70-75.

⁷⁴ Perrin, F.; *J. Phys. Radium* (1926); 7; 390-401.

⁷⁵ Dandliker, W. B., *et al.*; *Methods in Enzymology* (1981); 74; 3-28.

⁷⁶ Guo, X.-Q., *et al.*; *Anal. Chem.* (1998); 70; 632-637.

lequel elle a été excitée. La différence d'intensité entre les deux plans est liée à la mobilité de la molécule marquée.

Dans un même puits sont mélangées une protéine anti-apoptotiques, un peptide pro-apoptotique marqué à la fluorescéine et le produit pur ou le mélange complexe à tester. Si le produit est un inhibiteur, il se lie à la protéine anti-apoptotique libérant ainsi dans le milieu la protéine pro-apoptotique qui émet de la fluorescence dans différents plans. Par contre, si le produit n'est pas assez affiné pour la protéine anti-apoptotique, cette dernière se lie à la protéine pro-apoptotique créant ainsi un gros complexe peu mobile émettant de la fluorescence dans le même plan que celui dans lequel il a été excité.

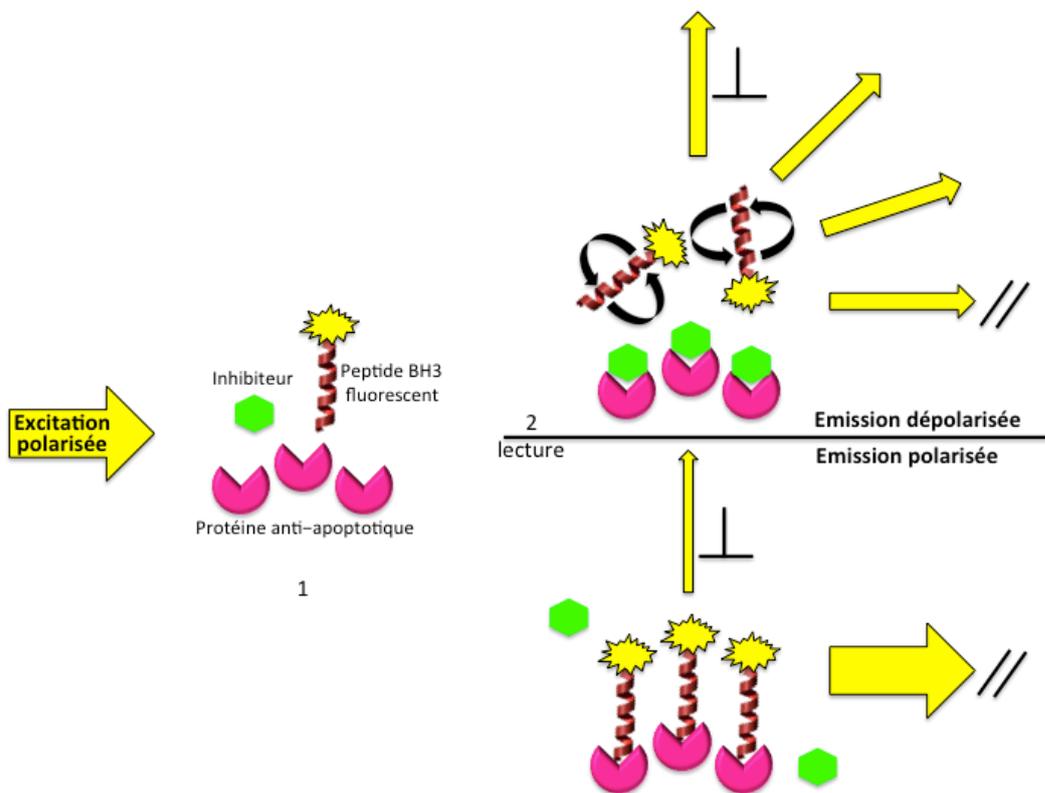


Figure 17 : Principe de la polarisation de fluorescence.

Les valeurs de la polarisation sont exprimées en unités de millipolarisation (mP) et sont calculées à partir de la formule suivante :

$$mP = 1000 * \left(\frac{I_s - I_p}{I_s + I_p} \right)$$

où I_s correspond à l'intensité parallèle et I_p à l'intensité perpendiculaire.

Avec cette technique, seul le ligand est marqué de manière à ne pas empêcher son interaction avec la protéine. De plus, sa taille ne doit pas être supérieure à 3 ou 4 kDa.⁷⁷ C'est cette technique que nous avons choisie dans notre étude en raison de sa forte sensibilité et de sa robustesse, et parce qu'elle est particulièrement bien adaptée au test de mélanges complexes. Cet essai a été mis en place en 2004 sur la protéine Bcl-xL. Récemment, la technique de la polarisation de fluorescence a été développée sur Bfl-1.⁷⁸ La polarisation de fluorescence peut également être réalisée en mode multiplexe (*cf.* 1.5 La cytométrie en mode multiplexe).⁷⁹

Il faut noter que dans la plupart des cas, les équipes de recherche combinent au moins deux essais utilisant des techniques différentes afin de confirmer les hits. Ainsi les faux positifs ou faux négatifs peuvent être mis en évidence et écartés. Par ailleurs, il existe d'autres techniques permettant d'étudier les interactions protéine-protéine mais toutes n'autorisent pas le criblage haut débit HTS. C'est par exemple le cas de la calorimétrie à titrage isotherme (CTI ou *ITC* en anglais) ou de la RMN. Ces méthodes sont souvent utilisées en complément afin de valider un hit et de mieux caractériser l'interaction avec les protéines.

2. Choix des protéines

Les protéines Bcl-xL et Mcl-1 ont été choisies pour les raisons qui ont été expliquées dans la première partie. Le choix des peptides associés s'est porté sur Bak pour Bcl-xL et Noxa pour Mcl-1. En effet, le but était d'avoir des affinités entre les protéines et leur peptide respectif comparables entre elles afin que les résultats du criblage sur les deux protéines soient eux aussi comparables. Par la suite, les difficultés de mise au point de

⁷⁷ Nosjean, O., *et al.*; *J. Biomol. Screen.* (2006); 11; 949-958.

⁷⁸ Zhai, D., *et al.*; *J. Biomol. Screen.* (2012); 17; 350-360.

⁷⁹ Blommel, P., *et al.*; *J. Biomol. Screen.* (2004); 9; 294-302.

l'essai sur Mcl-1 ont entraîné le remplacement de Noxa par Bid. Des précisions sur ce changement et leurs conséquences sont expliquées dans le chapitre suivant.

Les protéines ont été produites par les membres de l'équipe Guittet à l'ICSN à l'aide de plasmides recombinants. Une partie des protéines Bcl-xL et Mcl-1 a été produite pour leur utilisation dans les essais biologiques. La seconde partie a été marquée à l'azote 15 ou à l'azote 15 et au carbone 13, ou au deutérium, permettant d'entreprendre des études de RMN.

La séquence choisie pour Bcl-xL correspond à celle de la protéine humaine, amputée de 40 acides aminés (AA) situés entre les AA 44 et 85 et de 37 AA de la partie C-terminale (cf. Tableau 1).

Tableau 1 : Alignement de la séquence de Bcl-xL produite à l'ICSN avec celle de la protéine humaine par UniProt BLAST.

Bcl-xL (ICSN) → Bcl-xL → (<i>Homo sapiens</i>) Q07817	MHHHHHSSGLVPRGSEFMSQ SNRELVVDFLSYKLSQKGYSW SQFSDVEENRTEAPEGTE 60 -----MSQ SNRELVVDFLSYKLSQKGYSW SQFSDVEENRTEAPEGTE 42
	SE----- AVKQALREAGDEFELRYR 80 SEMETPSAINGNPSWHLADSPAVNGATGHSSSLDAREVIPMAA AVKQALREAGDEFELRYR 102
	RAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVNVNELFRDGVNWGRIVAFSFGGALCVESVYKEMQVL 140 RAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVNVNELFRDGVNWGRIVAFSFGGALCVESVDKEMQVL 162
	VSRIAAMATYLNHLEPWIQENGGWDTFVELYG ----- 174 VSRIAAMATYLNHLEPWIQENGGWDTFVELYGNNAAESRKGQER FNRWFLTGMTVAG 222
	----- VVLLGSLFSRK 233

→ domaine BH4
 → domaine BH3
 → domaine BH1
 → domaine BH2
 → domaine transmembranaire
 ----- → séquence manquante ou modifiée

La séquence choisie pour Mcl-1 correspond à celle de la protéine de souris qui ne comporte pas de cystéine contrairement à la protéine humaine (cf. Tableau 2). Les cystéines entraînent la formation de ponts disulfures qui rendent les études de RMN complexes. De plus ces cystéines peuvent être à l'origine de précipitations de la protéine.

Tableau 2 : Alignement de la séquence de Mcl-1 produite à l'ICSN avec celle de la protéine de souris par UniProt BLAST.

Mcl-1 (ICSN) → Mcl-1 → (<i>Mus musculus</i>) P97287	-----	
	MFGLRRNAVIGLNLYCGASLGAGGGSPAGARLVAEEAKARREGGGEAALLPGARVVARP	60

	PPVGAEDPDVTSASAERRLHKSPGLLAVPPEEMAASAAAIVSPEEELDGCEPEAIGKRPA	120
	-----MGSSHHHHSSGLVPRGSHMEDDLRQSLLEIISRYLREQATGSKDSKPL	50
	VLPLLERVSEAAKSSGADGSLPSTPPPEEEEDDLRQSLLEIISRYLREQATGSKDSKPL	180
	GEAGAAGRRAL ETLRRVGDGVQRN HETAFQGLMRKLDIKNEGDVKSFSRVMVHVFKDGV T GEAGAAGRRAL ETLRRVGDGVQRN HETAFQGLMRKLDIKNEGDVKSFSRVMVHVFKDGV T	110 240
NWGRIVTLISFGAFVAKHLKSVNQESFIEPLAETITDVLVRTKRDWLVKQRGWDGFVEFF NWGRIVTLISFGAFVAKHLKSVNQESFIEPLAETITDVLVRTKRDWLVKQRGWDGFVEFF	170 300	
HVQDLE----- 176 HVQDLEGGIRNVLLAFAGVAGVAGLAYLIR 331		

- domaine BH3
- domaine BH1
- domaine BH2
- domaine transmembranaire
- → séquence manquante ou modifiée

Les caractéristiques générales des deux protéines sont présentées dans le tableau suivant (cf. Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques des protéines Bcl-xL et Mcl-1.

	Bcl-xL séquence humaine (D45-84 et DC37, non clivée)	Mcl-1 séquence de souris (DN150 et DC25, non clivée)
Nombre d'acides aminés	174	176
Point isoélectrique	5,09	8,96
Poids moléculaire	20 002,16 Da	20 001,60 Da
Coefficient d'extinction molaire à 280 nm	37 930 M ⁻¹ .cm ⁻¹	19 480 M ⁻¹ .cm ⁻¹

Dans le but de faciliter leur purification, les protéines ont été produites sans leur domaine transmembranaire et avec un tag histidine qui ne sera pas clivé par la suite. Bcl-xL

et Mcl-1 sont solubilisées dans du tampon phosphate (pH 7,4) à des concentrations élevées et conservées à -80°C . Une vérification de la pureté des protéines ainsi que de leur concentration après décongélation est systématiquement réalisée par électrophorèse.

Des électrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate (SDS-PAGE) ont été effectuées afin de vérifier la pureté des protéines et confirmer leur poids moléculaire. Un premier lot de protéine a été écarté en raison d'un poids moléculaire trop élevé. De plus, le dosage au NanoDropTM, appareil permettant d'évaluer la concentration des protéines, a notamment permis de mettre en évidence une dégradation de près de 80% des protéines de ce premier lot par rapport aux indications données initialement par les biologistes. Un second lot de protéines a été analysé par électrophorèse (*cf.* Figure 18) confirmant une pureté satisfaisante des deux protéines dont le poids moléculaire se situe autour de 20 kDa comme attendu.

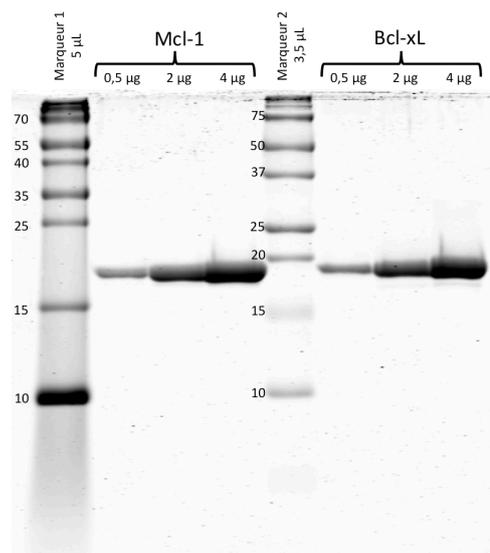


Figure 18 : Gel SDS-PAGE du second lot de protéines Mcl-1 et Bcl-xL.

Seulement 8% et 15% de dégradation pour les protéines Bcl-xL et Mcl-1 respectivement, ont été mesurés grâce au NanoDropTM. Dans le même temps, pour éviter les contaminations ou la dégradation des protéines suite à des cycles de congélation et décongélation successifs, des quantités aliquotes de 100 µL à 15 µM ont été réalisées.

Les peptides Bak, Noxa et Bid ont été synthétisés par les laboratoires PolyPeptide. Leur séquence est présentée dans les tableaux suivants (*cf.* Tableau 4 et Tableau 5).

Tableau 4 : Alignement de la séquence de Bak produite par PolyPeptide avec celle du peptide humain par UniProt BLAST.

Bak (PoliP) → Bak → (Homo sapiens) Q16611	-----	MASGQGPGRPQECGEPALPSASEEQVAQDTEEVFRSYVYFRHQEQEAEAGVAAPADPEM 60
	-----	----- GVGRQLAIGDDINR ----- 16
	-----	VTLPLQPSSTMGQ GVGRQLAIGDDINR YDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIAT SLFE 120
	-----	SGINWGRVVALLGFGY RLALHVVYQHGLTGFLGQVTRFVDFMLHHCIA RWIAQRGGWVAA 180
	-----	LNLGN GP ILNVLVVLGVVLLGQFVV RRFFKS 211

→ domaine BH3
 → domaine BH1
 → domaine BH2
 → domaine transmembranaire

Tableau 5 : Alignement de la séquence de Bid produite par PolyPeptide avec celle du peptide humain par UniProt BLAST.

Bid (PoliP) → Bid → (Homo sapiens) P55957	-----	MDCEVNNSSLRDECITNLLVFGFLQSCSDNSFRRELDALGHELPVLAPQWEGYDELQTD 60
	-----	----- EDIIRN IARHLAQVGDSMDR ----- 20
	-----	GNRSSHSRLGRIEADSESQEDIIRN IARHLAQVGDSMDRS IPPGLVNGLALQLRNTSRSE 120
	-----	EDRNRDLATALEQLLQAYPRDMEKEKTMVLVALLLAKKVASHTPSLLRDLVFHTTVNFINQ 180
	-----	NLRTYVRSLARNGMD 195

→ domaine BH3

Comme nous pouvons l'observer sur les alignements de séquence, les peptides utilisés dans les essais ne sont composés que du seul domaine BH3, domaine nécessaire pour l'interaction entre protéines apoptotiques. Une partie de ces peptides a été synthétisée avec cette séquence, auxquels la terminologie WT (*Wild Type*) leur a été associée (e.g. Bak-WT). Ces peptides sont utilisés comme référence interne. L'autre partie a été synthétisée avec cette même séquence mais a ensuite été fusionnée avec la carboxyfluorescéine en 5' pour répondre aux besoins des essais en polarisation de fluorescence.

La carboxyfluorescéine est un marqueur de fluorescence qui doit être excité à 492 nm pour émettre à 517 nm. Ces peptides marqués sont associés à la terminologie CF

(*CarboxyFluorescein*) (e.g. Bak-CF). Pour faciliter leur utilisation, des quantités aliquotes ont été préparées, 5 μ L à 10 mM pour les peptides WT et 50 μ L à 100 μ M pour les CF.

La polarisation de fluorescence est une technique très utilisée pour le criblage de molécules inhibitrices des protéines anti-apoptotiques. C'est une méthode robuste, sensible, rapide, relativement peu coûteuse qui ne nécessite pas d'étape de type lavage. Les couples de protéine–ligand-CF choisis pour l'évaluation biologique de nos molécules et extraits sont Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Noxa-CF. Dans le chapitre suivant la mise au point des essais biologiques sur les deux protéines est expliquée.

Chapitre 2

Mise au point des essais biologiques

La méthode de Qian⁷² est celle sur laquelle nous nous sommes très largement appuyée pour mettre au point les deux tests biologiques. La mise au point des essais biologiques a été réalisée en parallèle sur les deux protéines Bcl-xL et Mcl-1.

1. K_d , CI_{50} et K_i

Il faut noter que nos essais biologiques sont caractérisés par une interaction protéine–ligand présentée par la figure ci-dessous :

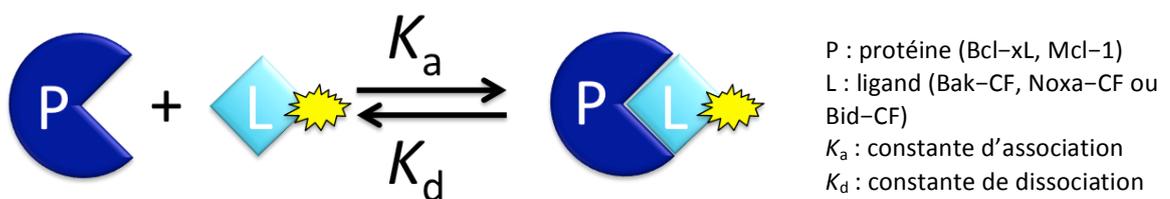


Figure 19 : Interaction protéine-ligand.

Le K_d correspond à la constante de dissociation à l'équilibre. Plus le K_d est faible, plus l'affinité est élevée. Cette constante est nécessaire pour définir un couple protéine–ligand.

Elle est égale à
$$K_d = \frac{[P]_{\text{éq}} * [L-CF]_{\text{éq}}}{[PL-CF]_{\text{éq}}}$$

où $[P]_{\text{eq}}$ correspond à la concentration en protéine libre à l'équilibre, $[L\text{-CF}]_{\text{eq}}$ à la concentration en peptide marqué libre à l'équilibre et $[PL\text{-CF}]_{\text{eq}}$ à la concentration en complexe protéine–ligand marqué à l'équilibre.

Le K_d dit réel peut être obtenu précisément par emploi de la calorimétrie à titrage isotherme. La polarisation de fluorescence ne permettant pas d'obtenir le K_d réel, il peut cependant être obtenu de manière approximative en réalisant un titrage de la protéine par le ligand-CF. On parle alors de K_d apparent ($K_{d\text{app}}$). Afin d'éviter toute ambiguïté dans la suite du manuscrit, le terme K_d sera employé au lieu de $K_{d\text{app}}$.

La CI_{50} est la concentration de ligand qui inhibe 50% de la liaison spécifique de ligand marqué (CF). Plus la CI_{50} est faible, plus l'affinité du ligand non marqué est grande. Ce paramètre dépend de la concentration et du K_d du ligand-CF. Cette valeur de CI_{50} peut être comparée à d'autres CI_{50} , seulement si les conditions expérimentales dans lesquelles elles ont été obtenues sont **strictement** identiques.

C'est pourquoi, le K_i est davantage employé pour comparer des données entre elles. Le K_i est la constante d'inhibition. C'est une valeur corrigée qui ne varie pas en fonction de la concentration et du K_d du ligand-CF contrairement à la CI_{50} . Le K_i est généralement obtenu à partir du calcul suivant :

$$\text{L'équation de Cheng et Prusoff}^{80} \quad K_i = \frac{CI_{50}}{1 + \frac{[L\text{-CF}]_{\text{libre}}}{K_d}}$$

Cependant, cette équation tient compte d'une approximation qui consiste, dans la plupart des cas, à affirmer que la quantité de ligand-CF totale est égale à la quantité de ligand-CF libre. Cette affirmation est vraie lorsque le ligand est ajouté en excès. Cette approximation ne peut pas s'appliquer avec nos essais en polarisation de fluorescence puisque le ligand n'est pas en excès. Dans le cas présent, le K_i est défini par l'équation suivante proposée par Kenakin et ses collaborateurs :⁸¹

⁸⁰ Cheng, Y. and Prusoff, W. H.; *Biochem. Pharmacol.* (1973); 22; 3099-3108.

⁸¹ Nikolovska-Coleska, Z., et al.; *Anal. Biochem.* (2004); 332; 261-273.

$$K_i = \frac{CI_{50} * (PL_0/2) * K_d}{(L_T * P_T) + (PL_0/2) ((PL_0) - P_T - L_T - K_d)}$$

$$\text{Avec } PL_0 = \frac{L_T + P_T + K_d - \sqrt{(L_T + P_T + K_d)^2 - 4L_T * P_T}}{2}$$

où PL_0 correspond au complexe protéine–ligand à $t = 0$, L_T au ligand total, P_T à la protéine totale.

Les dénominations K_d et K_i dépendent du protocole utilisé. Si une saturation du ligand-CF par la protéine est réalisée, le K_d est obtenu, alors que si une compétition entre le ligand-CF et un ligand est effectuée, il s'agit du K_i .

2. Le choix des conditions

Un tampon phosphate classique a été utilisé pour solubiliser les protéines et les peptides. Il est composé de 20 mM de Na_2HPO_4 , 50 mM de NaCl, 2 μ M d'EDTA et 0,05% d'acide pluronique. Le pH est fixé à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique. Le tampon est passé sur un filtre de 0,22 μ m de diamètre avant usage pour éviter les contaminations.

Le choix des plaques multi-puits 96 s'est imposé par l'utilisation de robots pipeteur diluteur 8 ou 96 canaux. Elles se composent de 12 colonnes (1 à 12) et 8 lignes (A à H). Un volume final réactionnel de 40 μ L/puits a été fixé. Les extraits de notre extractothèque sont stockés dans des plaques 96 puits.

2.1. Plan de plaque

Deux protocoles ont été établis. Le premier permet de réaliser des courbes dose–réponse que l'on nomme "protocole CI_{50} " (*cf.* Figure 20). Il consiste à faire une gamme de concentrations croissantes d'un inhibiteur potentiel afin d'en déterminer sa CI_{50} et par conséquent son K_i .

Protocole CI50	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ligand-WT	Ligand-WT									Blanc Protéine	Blanc Protéine
B	Ligand-WT	Ligand-WT									Blanc Protéine	Blanc Protéine
C	Ligand-WT	Ligand-WT									Vide	Vide
D	Ligand-WT	Ligand-WT									Vide	Vide
E	Ligand-WT	Ligand-WT									Ligand-CF 100% PF	Ligand-CF 100% PF
F	Ligand-WT	Ligand-WT									Ligand-CF 100% PF	Ligand-CF 100% PF
G	Ligand-WT 0% PF	Ligand-WT 0% PF									Blanc Ligand-CF	Blanc Ligand-CF
H	Ligand-WT 0% PF	Ligand-WT 0% PF									Blanc Ligand-CF	Blanc Ligand-CF

Tampon
 Ligand-CF
 Ligand-WT gamme
 Protéine
 DMSO/EtOH
 Produit gamme

Figure 20 : Plan de plaque du protocole "CI50".

La plaque peut être divisée en 6 parties distinctes :

- colonnes 1 et 2 → Deux gammes identiques de ligand-WT permettent de définir le K_i de cette référence interne et de définir le 0% de polarisation de fluorescence à leur plus haute concentration. **Ce 0% de polarisation indique également le 100% de liaison de l'inhibiteur avec la protéine.** L'inhibition de l'interaction protéine–ligand-CF est totale. Ces puits contiennent une gamme de concentration croissante, de la ligne A vers la H, de ligand-WT et des concentrations fixes de protéine et ligand-CF.
- colonnes 3 à 10 → Gammes de produits (1 produit/ligne) permettant de définir leur K_i . Ces puits contiennent une gamme de concentration de produits et des concentrations fixes de protéine et ligand-CF.
- A11, A12, B11 et B12 → Contrôle de la protéine seule. Ces puits ne contiennent que de la protéine.

- C11, C12, D11 et D12 → Contrôle de la plaque. Cela permet de mettre en évidence une éventuelle défaillance du lot de plaque utilisé. Ces puits sont vides.
- E11, E12, F11 et F12 → 100% de polarisation de fluorescence. **Ce 100% de polarisation indique également le 0% de liaison de l'inhibiteur avec la protéine.** Ces puits contiennent une concentration fixe en protéine et en ligand-CF ainsi qu'un certain pourcentage de DMSO.
- G11, G12, H11 et H12 → Contrôle du ligand-CF seul. Ces puits ne contiennent que le ligand-CF.

Le second protocole est utilisé pour effectuer du criblage *i.e.* ne tester qu'une seule concentration par extrait ou produit pur (*cf.* Figure 21).

Protocole Criblage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ligand-WT	Extrait	Blanc Protéine									
B	Ligand-WT	Extrait	Blanc Protéine									
C	Ligand-WT	Extrait	Vide									
D	Ligand-WT	Extrait	Vide									
E	Ligand-WT	Extrait	Ligand-CF 100% PF									
F	Ligand-WT	Extrait	Ligand-CF 100% PF									
G	Ligand-WT 0% PF	Extrait	Blanc Ligand-CF									
H	Ligand-WT 0% PF	Extrait	Blanc Ligand-CF									

Tampon
 Ligand-CF
 Ligand-WT gamme
 Protéine
 DMSO/EtOH
 Extrait

Figure 21 : Plan de plaque du protocole "criblage".

Cette plaque présente les mêmes caractéristiques que la précédente mais la gamme de ligand-WT a été réduite à la colonne 1, tout comme les contrôles et le 100% de polarisation réduits à la colonne 12. Ce motif de plaque est lié au motif des plaques contenues dans l'extractothèque.

La première étape de la mise au point consiste à déterminer les concentrations en protéine et en peptide marqué optimales.

2.2. Choix des concentrations en protéines et constantes de dissociation

Pour procéder à cette étape, une quantité fixe de peptide-CF est ajoutée à des quantités croissantes de protéine. Les courbes de ces titrages sont présentées Figure 22 et Figure 23.

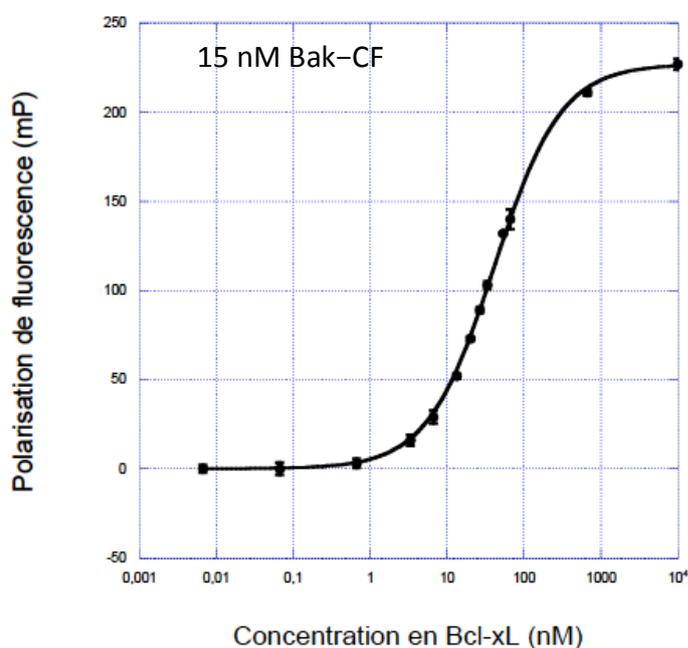


Figure 22 : Titrage de la protéine Bcl-xL en présence d'une concentration fixe de ligand Bak-CF.

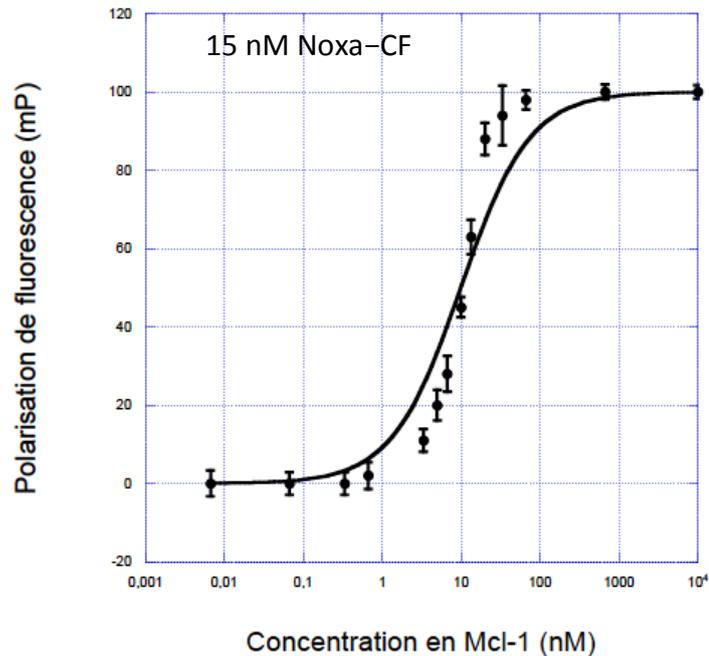


Figure 23 : Titrage de la protéine Mcl-1 en présence d'une concentration fixe de ligand Noxa-CF.

Ces courbes permettent, pour une quantité de ligand-CF donnée, de déterminer la concentration en protéine nécessaire pour observer un rapport signal sur bruit correct et une différence de polarisation entre les maxima et minima d'environ 100 mP. Pour le couple Bcl-xL/Bak-CF, 100 nM de Bcl-xL sont suffisants pour obtenir une amplitude du signal d'environ 160 mP avec un minimum de polarisation de 105 ± 2 mP. Concernant ce premier couple, 100 nM de Bcl-xL et 15 nM de Bak-CF donnent une amplitude du signal et un minimum de polarisation suffisamment importants pour assurer une bonne qualité de l'essai. Pour le couple Mcl-1/Noxa-CF, avec 100 nM de Mcl-1 et 15 nM de Noxa-CF, l'amplitude du signal est de 90 mP avec un minimum de polarisation à 100 ± 2 mP.

Afin d'appliquer le modèle mathématique, ci-dessous, qui permet de tracer la courbe sigmoïdale de titrage de Bcl-xL et ainsi de déterminer la constante de dissociation des couples protéine-ligand, le minimum de polarisation a été ramené à 0 mP sur les graphiques.

$$Y = \frac{PF_{\max}}{1 + \frac{K_d}{X}}$$

avec
$$K_d = \frac{PF_{\max} - PF_{\min}}{2}$$

où PF_{\max} correspond à la polarisation de fluorescence maximale et PF_{\min} à la polarisation de fluorescence minimale.

La courbe tracée par le modèle mathématique de détermination du K_d passe par tous les points pour Bcl-xL/Bak-CF. Le K_d de ce couple est de $41,1 \pm 0,6$ nM. En revanche, un décalage est observé entre la courbe et les points pour Mcl-1/Noxa-CF, ce qui traduit une interaction différente entre ces 2 protéines par rapport à ce qui est observé pour le couple précédent. N'ayant pas d'explication pour comprendre ce type d'interaction différent entre Mcl-1 et Noxa-CF, nous avons choisi un autre ligand marqué, Bid-CF. La même méthode a été suivie pour caractériser ce nouveau couple (*cf.* Figure 24).

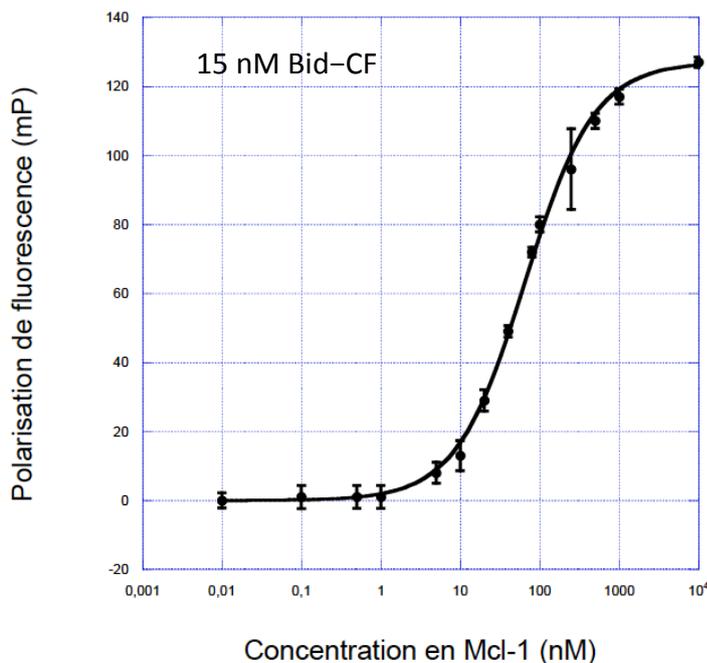


Figure 24 : Titration de la protéine Mcl-1 en présence d'une concentration fixe de ligand Bid-CF.

Pour le nouveau couple Mcl-1/Bid-CF, avec 100 nM de Mcl-1 et 15 nM de Bid-CF, l'amplitude du signal est de 80 mP avec un minimum de polarisation à 127 ± 3 mP. Le K_d de ce couple est $66,4 \pm 8,2$ nM. Bien que les K_d de nos deux couples Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF sont du même ordre de grandeur et que les concentrations utilisées sont les mêmes entre les deux couples, il existe une assez grande différence d'amplitude du signal entre les deux couples.

Tableau 6 : Récapitulatif des données obtenues par le titrage des protéines par les ligands-CF.

	Bcl-xL/Bak-CF	Mcl-1/Noxa-CF	Mcl-1/Bid-CF
Concentration en protéine (nM)	100	100	100
Concentration en ligand (nM)	15	15	15
Amplitude du signal (mP)	160	90	80
Minimum de polarisation de fluorescence (mP)	105	100	127
K_d (nM)	41,1 ± 0,6	–	66,4 ± 8,2

Ayant caractérisé les couples (*cf.* Tableau 6) nous permettant de rechercher des inhibiteurs de leur interaction, la seconde étape de la mise au point consiste à déterminer la tolérance des essais aux solvants organiques.

2.3. Tolérance aux solvants

Les substances naturelles ou obtenues par synthèse sont souvent peu solubles dans l'eau, ce qui rend leur dissolution dans le tampon difficile voire impossible. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol (EtOH) pour solubiliser les molécules pures ou les extraits lors de la réalisation des tests. De plus, les extraits de l'extractothèque sont stockés à 1 mg/mL dans du DMSO. La tolérance des essais à ces solvants est par conséquent essentielle pour déterminer leur concentration finale maximale dans les puits sans que la qualité du signal de polarisation ne soit altérée.

Des gammes de concentration croissante en DMSO et EtOH allant de 0% à 12,5% ont été réalisées sur le maximum et le minimum de polarisation de fluorescence. Pour le 100% de polarisation sont mélangés 100 nM de protéine, 15 nM de ligand-CF et une quantité X de DMSO ou d'EtOH, tandis que 100 nM de protéine, 15 nM de ligand-CF, une quantité X de DMSO ou d'EtOH et 100 μ M du ligand-WT sont utilisés pour le 0% de

polarisation. Le ligand-WT sert d'inhibiteur naturel déplaçant totalement le ligand-CF à cette concentration.

Les résultats de ces tolérances aux solvants ont été compilés dans les graphiques suivants (*cf.* Figure 25, Figure 26, Figure 27 et Figure 28). La courbe verte (—) correspond au 100% de polarisation de fluorescence et la courbe bleue (—) au 0%.

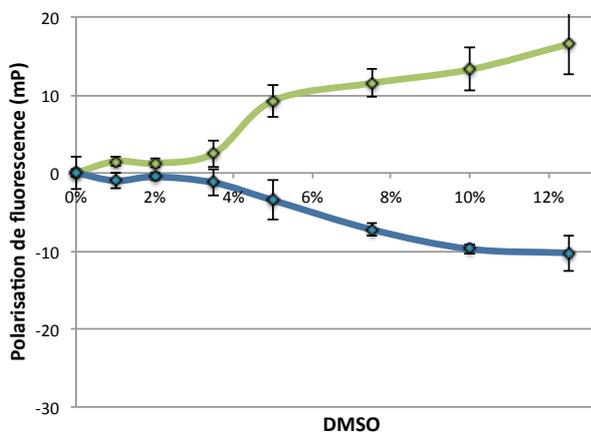


Figure 25 : Tolérance du couple Bcl-xL/Bak-CF au DMSO.

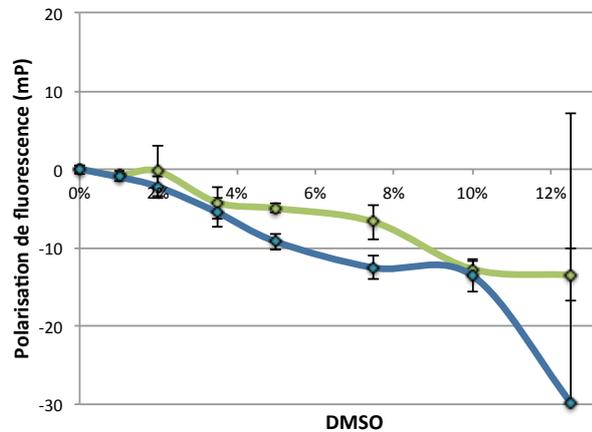


Figure 26 : Tolérance du couple Mcl-1/Bid-CF au DMSO.

Pour le couple Bcl-xL/Bak-CF, le DMSO a un effet opposé entre le 100 % de polarisation et le 0 %, l'un croît et l'autre décroît. Pour le couple Mcl-1/Bid-CF le DMSO entraîne une décroissance du signal de polarisation, que ce soit le 100 ou le 0 %. Ces graphiques mettent en évidence que les essais sur Bcl-xL et sur Mcl-1 sont relativement bien tolérants jusqu'à la concentration de 10 % en DMSO.

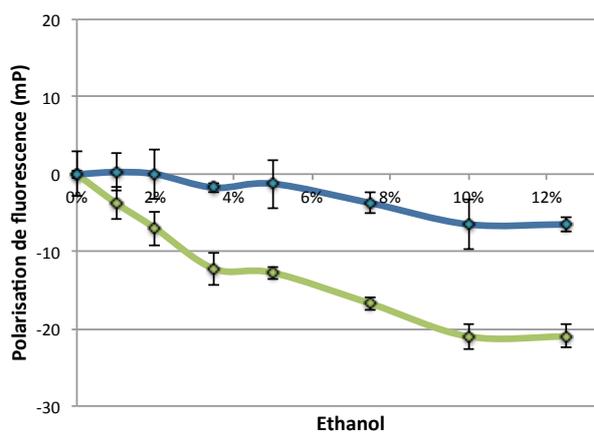


Figure 27 : Tolérance du couple Bcl-xL/Bak-CF à l'EtOH.

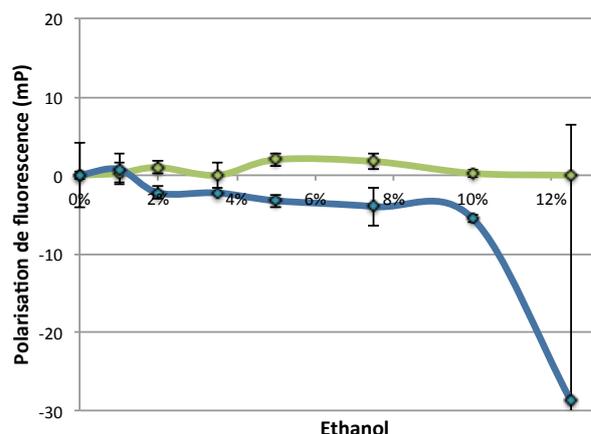


Figure 28 : Tolérance du couple Mcl-1/Bid-CF à l'EtOH.

L'EtOH conduit à une diminution du signal de polarisation pour Bcl-xL/Bak-CF, alors que pour Mcl-1/Bid-CF une concentration d'EtOH allant jusqu'à 10 % ne semble avoir aucun effet sur l'interaction. Comme précédemment, les essais sur Bcl-xL ou sur Mcl-1 sont donc relativement bien tolérants à l'EtOH jusqu'à 10 %.

Bien que les essais sur les deux protéines supportent jusqu'à 10 % de solvants organiques, une concentration maximale de 3,5 % de DMSO ou d'EtOH a été fixée, étant donné qu'elle est généralement la limite supérieure tolérée dans les tests cellulaires. Cette concentration permet de diluer la plupart des composés grâce à une cascade de dilutions appropriée.

Lors de la manipulation des protéines, nous nous sommes aperçus qu'elles étaient très sensibles à la température. C'est pourquoi, dans une troisième étape la température d'incubation a été étudiée.

2.4. Température d'incubation

Comme expliqué dans le paragraphe "Plan de plaque" de ce chapitre, chacune des plaques testées possède quelques puits permettant le contrôle de plusieurs paramètres et notamment le contrôle de la protéine. Normalement, dans ces puits qui ne contiennent que la protéine, aucune émission de fluorescence ni polarisation de fluorescence ne peut être observées. Or, de la polarisation de fluorescence a pu être mise en évidence dans ces puits de contrôle de manière aléatoire. Après avoir éliminé toutes les possibilités de

contamination par du ligand-CF, nous avons observé que la protéine, même seule, était en mesure de produire de la polarisation de fluorescence. Cette polarisation est artéfactuelle puisque la protéine n'est pas dotée de fluorophore. De plus, lors de la décongélation des différents lots de protéine, une forte dégradation de ces dernières, se traduisant par un dépôt blanchâtre au fond des tubes "eppendorf", a pu être observée. La décongélation des protéines est apparue comme étant un facteur critique. Elle peut être effectuée selon deux méthodes. La première consiste à laisser les protéines monter en température doucement dans la glace, la seconde à décongeler rapidement les protéines avec la chaleur de ses mains ou dans un bain-marie n'excédant pas 40 °C et de les conserver soit dans la glace, soit diluées dans le tampon. Alors qu'avec la première méthode, nous avons observé de la polarisation de fluorescence dans les contrôles de protéine, aucune polarisation n'a été engendrée par la seconde, qui a par conséquent été utilisée de façon systématique dans les essais.

La sensibilité des protéines vis à vis de la température nous a entraîné à étudier l'impact de la température sur l'incubation des plaques avant leur lecture. Des expériences de détermination du K_d ont été réalisées en conservant les plaques sur la glace ou à température ambiante après l'ajout des effecteurs de l'essai. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : K_d obtenus à basse température ou à température ambiante.

	Bcl-xL/Bak-CF	Mcl-1/Bid-CF
Température froide	32,0 ± 3,0 nM	61,4 ± 5,5 nM
Température ambiante	41,1 ± 0,6 nM	66,4 ± 8,2 nM

Le K_d est sensiblement plus élevé à température ambiante. Cependant, les différences entre la température froide et ambiante ne nous ont pas semblé suffisamment importantes pour que nous réalisions l'incubation des plaques sur la glace.

La température de manipulation des protéines est donc critique pour la décongélation mais pas pour l'incubation. Une des limites de l'utilisation de la polarisation de fluorescence est de tester des produits présentant une fluorescence intrinsèque, propriété, souvent présente dans les extraits naturels de plantes.

2.5. Fluorescence intrinsèque des produits et extraits

Les composés fluorescents peuvent interférer dans la lecture des résultats obtenus par polarisation de fluorescence. Il n'est pas possible de tester des composés qui sont fluorescents à la longueur d'onde à laquelle est excitée la carboxyfluorescéine. Deux scénarios peuvent être rencontrés. Dans le premier (*cf.* Figure 29), le produit émet de la lumière à la même ou à une longueur d'onde très proche de celle de la carboxyfluorescéine.

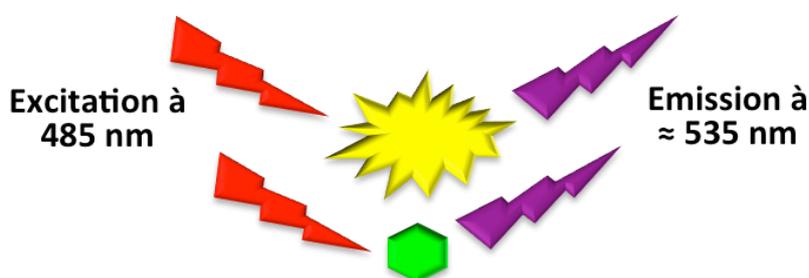


Figure 29 : Fluorescence intrinsèque cas n°1.

Dans le second (*cf.* Figure 30), le composé quenche la lumière émise par la carboxyfluorescéine. Le produit éteint la lumière émise par la carboxyfluorescéine en l'absorbant, et peut réémettre à une autre longueur d'onde.

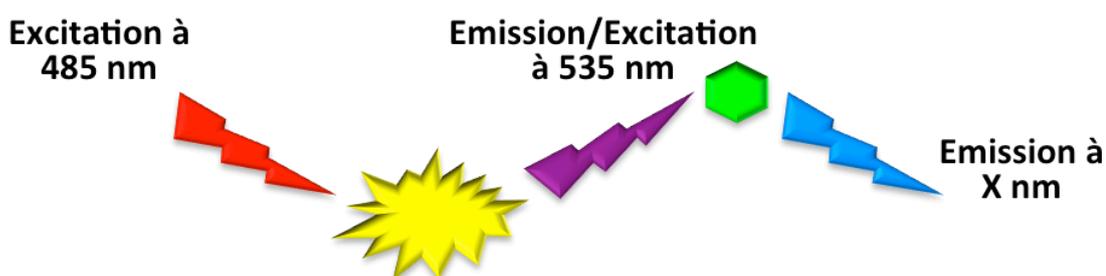


Figure 30 : Fluorescence intrinsèque cas n°2.

En polarisation de fluorescence, ce n'est pas une intensité de fluorescence qui est mesurée mais une mesure ratiométrique Ceci permet de réduire partiellement les

interférences. Le calcul de la valeur de l'intensité (I) de fluorescence peut être appliqué pour vérifier s'il y a des interférences au niveau de la fluorescence.⁸² Ce calcul est le suivant :

$$I = I_p + 2 * I_s$$

où I_s correspond à l'intensité parallèle et I_p à l'intensité perpendiculaire.

L'intensité (I) est calculée pour chaque plaque. Il faut noter que la même quantité de ligand-CF est ajoutée dans les puits et par conséquent, il doit y avoir normalement la même intensité de fluorescence dans tout les puits, à l'exception des puits contrôles des protéines et des puits vides. On considère que 100% correspond à la moyenne de toutes les intensités. Si dans un puits, l'intensité est supérieure à 120% ou inférieure à 80% alors le composé présent entraîne une interférence au niveau de la fluorescence.

Une fois que l'ensemble des paramètres permettant la réalisation des essais est fixé, il nous reste à déterminer les valeurs d'inhibition pour un certain nombre de composés de référence et de comparer ces valeurs aux données de la littérature.

3. Composés de référence et contrôles positifs

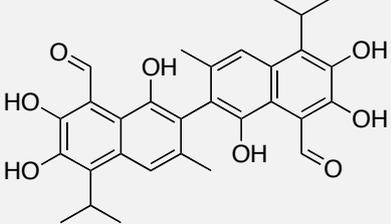
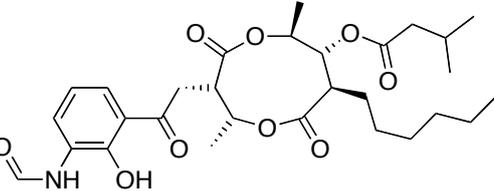
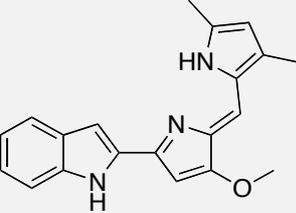
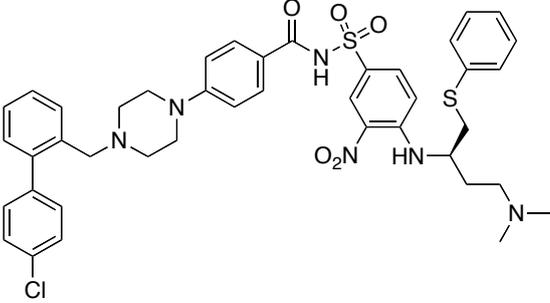
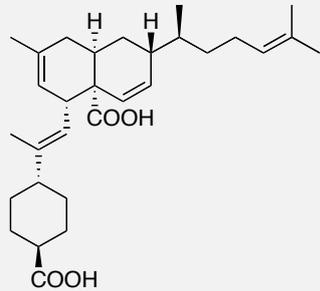
Bien que les différents contrôles mettent en évidence le bon fonctionnement des essais, il est nécessaire d'avoir des composés de référence ou contrôles positifs. C'est pourquoi, le K_i d'une référence interne est déterminé pour chaque plaque. Cette référence est constituée du ligand-WT. Ce ligand entre en compétition avec son homologue marqué. Pour les deux couples Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF, les K_i oscillent entre 10 et 50 nM pour Bak-WT et Bid-WT. Les gammes de concentration de ligand-WT ainsi que les dépôts dans les puits de quelques microlitres étant réalisés manuellement, ils entraînent cette approximation au niveau de la valeur de ces K_i .

Afin de comparer nos résultats par rapport à ceux de la littérature, des composés commerciaux ou isolés au laboratoire ont été choisis pour servir de références externes. Pour cela, 5 molécules ont été utilisées (cf. Tableau 8). L'ABT-737 nous a été gracieusement donné par l'IdRS. Ce sont volontairement les CI_{50} qui sont indiquées dans le tableau. En

⁸² Loomans, E. E., *et al.*; *Assay Drug Dev. Techn.* (2003); 1; 445-453.

effet, dans la littérature, peu de K_f sont déterminés avec la polarisation de fluorescence. Par conséquent, il ne faut tenir compte que de l'ordre de grandeur de ces valeurs.

Tableau 8 : Résultats biologiques des composés commerciaux (†) et isolés au laboratoire (§).

		CI ₅₀	
		Bcl-xL/Bak-CF Mcl-1/Bid-CF	ICSN
		Littérature ^{83,84,64}	
(±)-Gossypol† (14)		3 μM 2 μM	> 100 μM 2 μM
Antimycine A† (15)		3 μM 3 μM	> 100 μM > 100 μM
Obatoclax† (6)		5 μM 3 μM	I < 80% I < 80%
ABT-737† (16)		64 nM > 20 μM	57 nM 47 μM
Méiogynine A§ (13)		11 μM -	11 μM 25 μM

⁸³ Zhai, D., et al.; *Cell Death Differ.* (2006); 13; 1419-1421.⁸⁴ Chai, C. L. L., et al.; Brevet: *Biarylrhodanine and pyridylrhodanine compounds and their use* (2010).

Lorsque les résultats obtenus sur nos essais sont comparés avec ceux de la littérature, des divergences importantes sont observées. Néanmoins, les résultats de nos essais sont similaires quelque soit le solvant organique utilisé, le diméthylsulfoxyde ou l'éthanol, ainsi qu'en utilisant une cascade de dilutions avec de faibles paliers.

- Gossypol et antimycine A → Leurs valeurs ne coïncident pas du tout avec celles de la littérature, exceptée celle du gossypol avec Mcl-1. Aux plus fortes concentrations (100 μ M et plus) leurs solutions sont très troubles. Il semblerait que ces résultats s'expliquent par la précipitation de ces deux produits.

- Obatoclastax → Aucune valeur de polarisation de fluorescence ne peut être obtenue puisque ce composé interfère au niveau de la fluorescence. Aucune comparaison ne peut être exprimée quant aux résultats rapportés dans la littérature.

- ABT-737 → Les résultats obtenus sur les deux protéines sont corrélés à ceux de la littérature. Cette molécule a donc été choisie comme référence externe pour la publication des résultats obtenus avec ces deux essais.

- Méiogynine A → Sur la cible Bcl-xL, nous avons obtenu la même CI_{50} qu'à l'IdRS. L'activité sur Mcl-1 n'a pu être comparée à d'autres essais n'ayant jamais été testée sur cette protéine. Cette molécule, isolée en quantité importante au laboratoire, a donc été choisie comme contrôle positif dans tous les essais biologiques effectués à l'ICSN.

Bien que l'évaluation biologique sur Bcl-xL et Mcl-1 de ces différents produits commerciaux ne coïncide pas tout à fait avec les données de la littérature pour diverses raisons, l'ABT-737 et la méiogynine A peuvent être utilisés comme références externes en parallèle à l'utilisation du ligand-WT, la référence interne. Pour compléter la mise au point de ces deux essais biologiques, il est important de les valider.

4. Validation : Z' versus SSMD

Le but des essais étant de trouver un extrait ou un produit actif au sein d'une extractothèque ou d'une chimiothèque de façon sûre et rapide, il est nécessaire d'évaluer la qualité de notre essai, traduisant ainsi sa robustesse et sa fiabilité. La qualité d'un essai peut s'apprécier en calculant le facteur Z' , qui est un paramètre statistique simple.⁸⁵ Contrairement au facteur Z , il ne nécessite pas d'échantillon à tester.

Le facteur Z' est calculé à partir de l'équation suivante :

$$Z' = 1 - \frac{(3 \sigma_{c+} + 3 \sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

où σ correspond à l'écart type, μ à la moyenne, $c+$ au contrôle positif et $c-$ au contrôle négatif.

En terme de polarisation de fluorescence, cette équation peut être traduite par l'équation ci-après :

$$Z' = 1 - \frac{(3 \sigma_{100\% \text{ PF}} + 3 \sigma_{0\% \text{ PF}})}{|\mu_{100\% \text{ PF}} - \mu_{0\% \text{ PF}}|}$$

où σ correspond à l'écart type, μ à la moyenne, **100 % PF** au 100 % de polarisation de fluorescence et **0 % PF** au 0 % de polarisation de fluorescence.

La valeur du Z' renseigne sur la qualité de l'essai.

$Z' = 1$	L'essai est idéal
$0,75 \leq Z' > 1$	L'essai est excellent
$0,5 \leq Z' > 0,75$	L'essai est correct
$Z' < 0,5$	L'essai est médiocre

Pour calculer Z' , il faut suivre un protocole particulier présenté Figure 31. Il consiste à réaliser un damier en intercalant des puits correspondant au 100 % de

⁸⁵ Zhang, J.-H., *et al.*; *J. Biomol. Screen.* (1999); 4; 67-73.

polarisation de fluorescence et des puits correspondant au 0 % de polarisation. Dans les puits 100 % de PF, sont ajoutés la protéine et le ligand-CF, tandis que dans les puits 0 % de PF, est ajouté en plus, le ligand-WT.

Protocole Test Z	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0% PF	100% PF	0% PF	Blanc Protéine								
B	100% PF	0% PF	100% PF	Blanc Protéine								
C	0% PF	100% PF	0% PF	Vide								
D	100% PF	0% PF	100% PF	Vide								
E	0% PF	100% PF	0% PF	Ligand-CF 100% PF								
F	100% PF	0% PF	100% PF	Ligand-CF 100% PF								
G	0% PF	100% PF	0% PF	Blanc Ligand-CF								
H	100% PF	0% PF	100% PF	Blanc Ligand-CF								

Tampon
 Ligand-CF
 Ligand-WT
 Protéine
 DMSO 14% dans tampon

Figure 31 : Plan de plaque du protocole "facteur Z'".

Les plaques ont été lues après 1h, 24h et 48h d'incubation afin de vérifier la stabilité des essais dans le temps. Les facteurs Z' aux différents temps d'incubation sont exprimés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Facteurs Z' des essais Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF.

Durée d'incubation	1h	24h	48h
Bcl-xL/Bak-CF	0,87	0,84	0,80
Mcl-1/Bid-CF	0,76	0,73	0,70

Bien que le facteur Z' du couple Mcl-1/Bid-CF soit un peu plus faible que celui de Bcl-xL/Bak-CF quelle que soit la durée d'incubation, ils indiquent que la qualité des essais est excellente et relativement constante dans le temps.

Plus récemment, un autre indicateur de la qualité d'un essai a été proposé par Zhang, le *Strictly Standardized Mean Difference* ou SSMD.⁸⁶ Ce paramètre est utilisé dans les essais avec des ARN interférents. Le SSMD repose sur une base statistique considérée comme plus solide que celle du facteur Z'.

$$SSMD = \frac{\mu_{100\% \text{ PF}} - \mu_{0\% \text{ PF}}}{\sqrt{(\sigma^2_{100\% \text{ PF}} + \sigma^2_{0\% \text{ PF}})}}$$

où σ^2 correspond à la variance, μ à la moyenne, **100 % PF** au 100 % de polarisation de fluorescence et **0 % PF** au 0 % de polarisation de fluorescence.

Dans le cas de la polarisation de fluorescence, plus la valeur absolue du SSMD est grande, plus la différence en le maximum et le minimum de polarisation de fluorescence est grande. Lorsque l'on utilise un contrôle positif fort, le SSMD doit être supérieur à 6 pour indiquer la bonne qualité d'un essai. Dans le cas où un contrôle positif plus faible est utilisé, la bonne qualité est avérée à partir d'un SSMD supérieur à 3. Pour le couple Bcl-xL/Bak-CF, le SSMD est nettement supérieur à 6 puisqu'il est de 32. Il en est de même pour Mcl-1/Bid-CF ayant un SSMD de 17.

Quel que soit le paramètre utilisé pour définir la qualité d'un essai biologique, facteur Z' ou SSMD, nos essais peuvent être considérés comme étant de très bonne qualité. Les objectifs de la mise en place à l'ICSN de ces deux essais sont (1) de cribler des extraits de plantes pour détecter ceux qui présenteront une activité dite *dual*, (2) de guider les purifications des molécules actives par l'évaluation de toutes les fractions et sous-fractions obtenues au cours des différentes séparations chromatographiques, et (3) d'évaluer les K_i de tous les composés actifs isolés sur les deux protéines. Pour ce faire, il est essentiel de déterminer un seuil permettant de discriminer les hits des extraits, fractions ou molécules non actifs.

⁸⁶ Zhang, X. D.; *Genomics* (2007); 89; 552-561.

5. Le criblage et le seuil de détermination d'un extrait actif ou hit

Pour déterminer le seuil permettant de considérer si un extrait est actif ou non, il faut réaliser un criblage sur plusieurs centaines d'extraits choisis de manière aléatoire. Ceci permet de transposer les résultats sous la forme d'une courbe de Gauss et d'en définir la moyenne et l'écart-type, nécessaires à la détermination du seuil qui se détermine selon la règle des "3 écart-types" :

$$\text{Seuil} = \mu \pm 3 \cdot \sigma$$

où σ correspond à l'écart-type, μ à la moyenne

Nous avons par conséquent effectué le criblage de 560 extraits sur les 2 couples de protéines décrits précédemment en fixant leur concentration à $10 \mu\text{g/mL}$ pour la première expérience (*cf.* Figure 32).

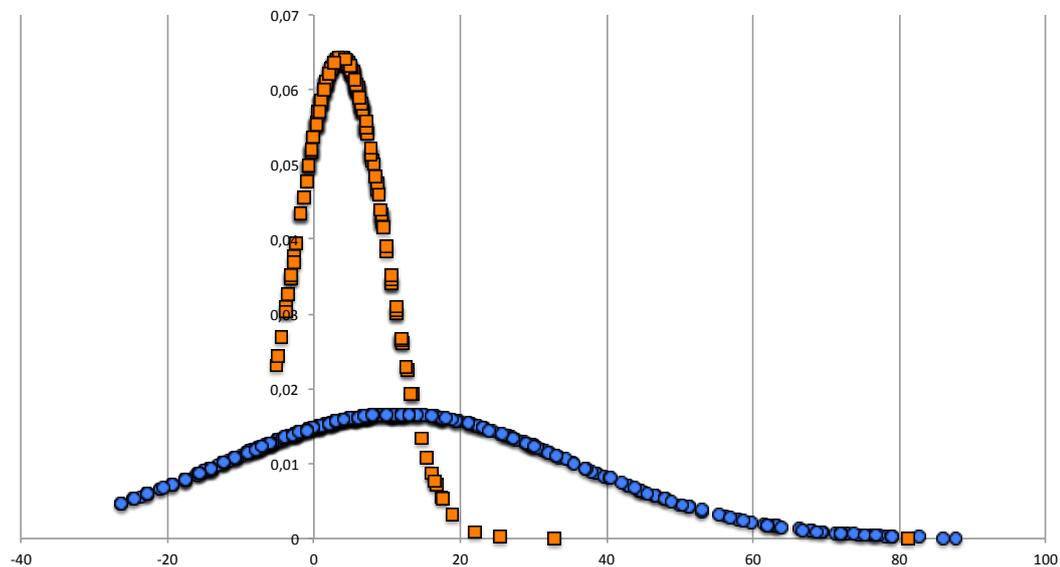


Figure 32 : Répartition des pourcentages d'inhibition des extraits de plantes, testés sur Bcl-xL (■) et Mcl-1 (●) à $10 \mu\text{g/mL}$, selon la loi normale avec $n = 560$.

Pour Bcl-xL, la répartition des données se trouve essentiellement autour du 0 % d'inhibition. C'est la répartition attendue d'un jeu de données sélectionné au hasard. A cette concentration, à partir de 22 % d'inhibition on considère qu'un extrait est actif sur cette

protéine. En revanche, pour Mcl-1, la répartition des données forme une gaussienne plus aplatie. Avec cette répartition, il semble plus difficile de discriminer de manière pertinente les extraits actifs des autres. Le seuil des hits se trouve à 83 % ce qui est très proche du maximum 100 %. La même expérience a été réalisée avec des concentrations de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (cf. Figure 33).

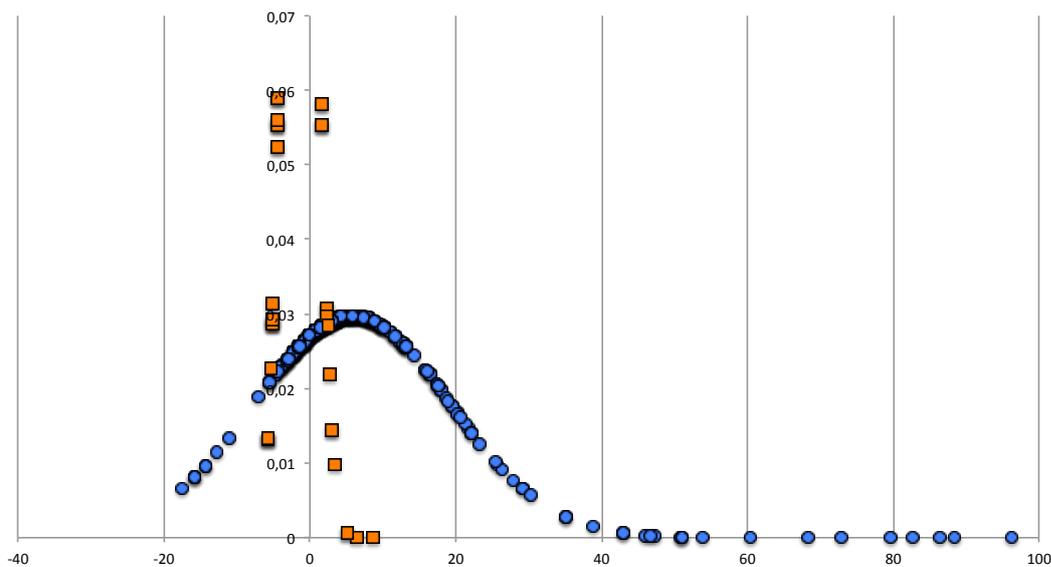


Figure 33 : Répartition des pourcentages d'inhibition des extraits de plantes, testés sur Bcl-xL (■) et Mcl-1 (●) à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, selon la loi normale avec $n = 560$.

A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, un nombre plus important de données sont réparties autour du 0 % d'inhibition pour Mcl-1. La répartition s'est nettement améliorée à cette concentration et la valeur du seuil a diminué de moitié puisqu'elle est de 46 %. En revanche, cette concentration semble trop faible pour la protéine Bcl-xL puisque la répartition des données ne forme plus de gaussienne et que le seuil calculé de 4 % se trouve trop près du 0 % d'inhibition. Une troisième concentration, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a donc été expérimentée sur l'essai avec Mcl-1 (cf. Figure 34).

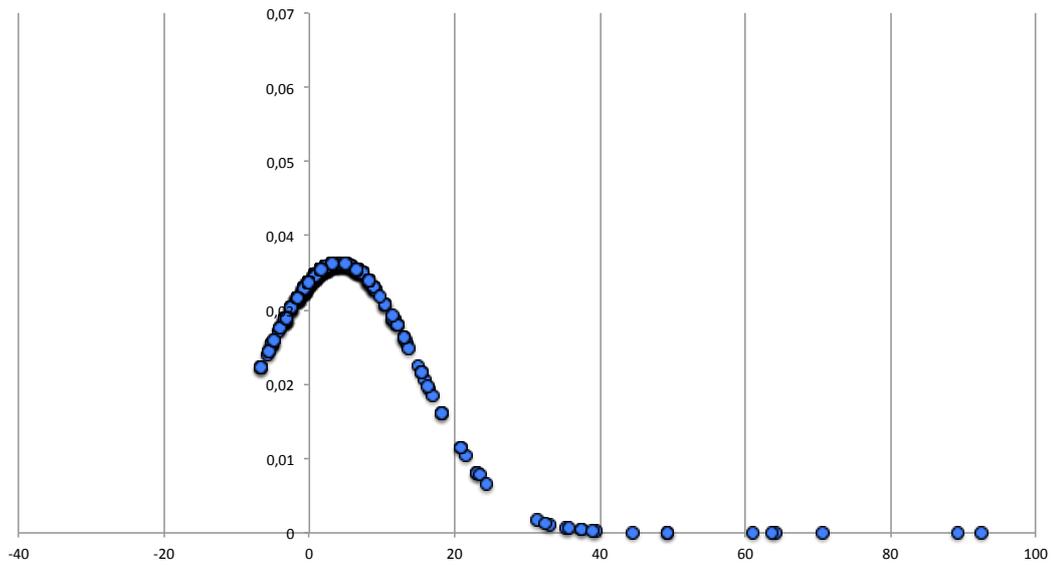


Figure 34 : Répartition des pourcentages d'inhibition des extraits de plantes, testés sur Mcl-1 (•) à 0,5 µg/mL, selon la loi normale avec n = 560.

Comme pour la concentration précédente, un nombre important des pourcentages d'inhibition des extraits sont répartis autour de 0. Le seuil de 37 % est relativement proche de celui obtenu avec la concentration de 1 µg/mL. Une concentration inférieure n'a pas été expérimentée.

Un bilan des différents seuils calculés en fonction des concentrations est présenté dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Récapitulatif des seuils et nombre de hit obtenus sur Bcl-xL et Mcl-1 en fonction de la concentration des 560 extraits.

		10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$
Bcl-xL/Bak-CF	Seuil (% d'inhibition)	22 %	4 %	–
	Nombre de hits	3	6	–
	Pourcentage de hits	0,53 %	1,07 %	–
Mcl-1/Bid-CF	Seuil (% d'inhibition)	83 %	46 %	37 %
	Nombre de hits	2	15	13
	Pourcentage de hits	0,35 %	2,68 %	2,32 %

Pour le couple Bcl-xL/Bak-CF, tous les extraits et fractions ont été testés à 10 $\mu\text{g/mL}$. En revanche, pour Mcl-1/Bid-CF, plusieurs concentrations ont parfois été testées et seront reportées dans ce manuscrit. Il faut noter que les seuils permettant de définir un hit ne constituent qu'un des critères de sélection des extraits. En effet, dans notre recherche d'inhibiteurs *dual* sur Bcl-xL et Mcl-1, plusieurs autres paramètres ont orienté le choix d'un extrait plutôt qu'un autre.

En conclusion, nous avons répertorié dans le Tableau 11, l'ensemble des paramètres qui ont été pris en compte pour la validation des deux essais sur Bcl-xL et Mcl-1.

Tableau 11 : Récapitulatif de données obtenues sur les essais Bcl-xL et Mcl-1.

	Bcl-xL/Bak-CF	Mcl-1/Bid-CF
Concentration en protéine (nM)	100	100
Concentration en ligand (nM)	15	15
K_d (nM)	41,1 ± 0,6	66,4 ± 8,2
Seuil de tolérance au DMSO et à l'EtOH	3,5%	3,5%
Température d'incubation	ambiante	ambiante
Intensité de fluorescence	80 % < I > 120 %	80 % < I > 120 %
Référence interne	Bak-WT 10 nM < K_i > 50 nM	Bid-WT 10 nM < K_i > 50 nM
Référence commerciale ABT-737	57 nM	47 μ M
Z'	0,86 (excellent)	0,76 (excellent)
SSMD	32 (bonne qualité)	17 (bonne qualité)
Seuil de détermination des hits	22 % d'inhibition à 10 μ g/mL	46 % d'inhibition à 1 μ g/mL

L'ensemble de cette étude a conduit à la rédaction d'un protocole permettant la réalisation des tests par d'autres étudiants ou techniciens (*cf.* Annexe p. 279). De plus, un tableur ExcelTM a été conçu dans le but de calculer automatiquement les quantités et les dilutions des réactifs nécessaires en fonction du nombre de plaque(s) à tester et du choix du mode, criblage ou courbe dose-réponse. Dans le chapitre suivant, est expliqué comment s'effectue le traitement des résultats grâce au tableur ExcelTM. Quelques résultats sur les molécules isolées au laboratoire ou sur le criblage sont également présentés.

Chapitre 3

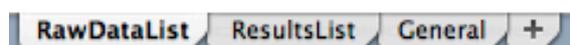
Le traitement des données et les premiers résultats biologiques

La réalisation des essais biologiques, généralement en *triplicata*, et par différents membres de l'équipe, entraîne un important flux de données. L'optimisation du traitement des données et de la gestion des résultats confèrent un gain de temps considérable et facilite le suivi des résultats.

L'obtention des résultats est réalisée par la lecture des plaques grâce à un lecteur de polarisation de fluorescence. Les données sont récupérées au format ExcelTM. La détermination des K_d est effectuée à l'aide du logiciel Kaleidagraph[®] alors que les K_i des produits purs sont obtenus par traitement des données avec ExcelTM qui est un logiciel plus simple d'utilisation. C'est pourquoi, un tableur ExcelTM a été confectionné pour le traitement des résultats.

1. Conception d'un tableur ExcelTM pour l'automatisation du traitement des données

Le fichier (fichier n°1) proposé par le logiciel du lecteur de plaque présente trois volets :



– Volet n°1 "RawDataList" → Ce volet affiche deux colonnes, l'une correspondant aux valeurs de l'intensité de fluorescence perpendiculaire et l'autre à celle

de l'intensité de fluorescence parallèle. Ces résultats sont utilisés pour calculer l'intensité totale afin de mettre en évidence les composés auto-fluorescents.

- Volet n°2 "ResultsList" → Les valeurs de polarisation de fluorescence sont indiquées.
- Volet n°3 "General" → Les données concernant les paramètres de lecture du lecteur sont inscrites dans ce volet.

Ce fichier n°1 permet de copier/coller les valeurs sur le tableur, nommé "fichier n°2", présenté ci-après dans lequel tous les calculs sont automatiques. Ce fichier est composé de la manière suivante dans le cas de la réalisation de courbe dose-réponse sur Bcl-xL :



- Volet n°1 à 3 "Calcul Ki (IC50)-Rep1/2/3" (cf. Figure 35)
 - Ces trois jeux de données (un par répétition) correspondent aux valeurs de polarisation de fluorescence. Il suffit d'y coller les données de polarisation du fichier n°1 dans la colonne B et d'indiquer le nom des composés testés dans le premier de ces volets. Sur chacune de ces feuilles, la courbe permettant la détermination du K_i de la référence interne (ligand-WT) est dessinée et les CI_{50} et K_i de chaque composé par répétition sont calculés à partir du K_d du couple protéine-ligand-CF.

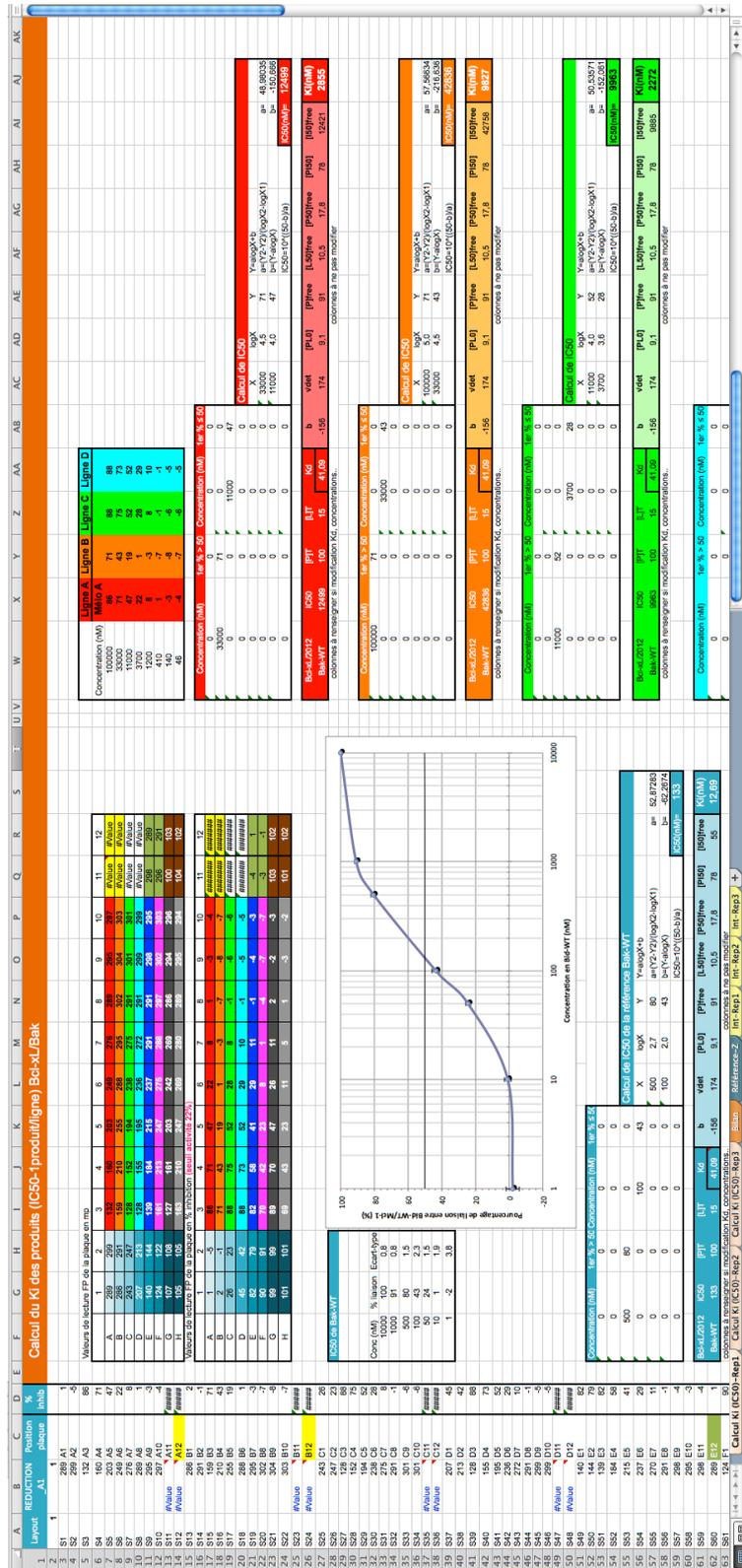


Figure 35 : Tableau Excel™, feuille "Calcul Ki (IC50)-Rep1" tronquée.



– Volet n°4 "Bilan" (*cf.* Figure 36)

→ Cette feuille de calcul permet de compiler les données obtenues sur les 3 premières feuilles afin d'en définir les moyennes et écart-types, et tracer les courbes dose-réponse de chaque produit.

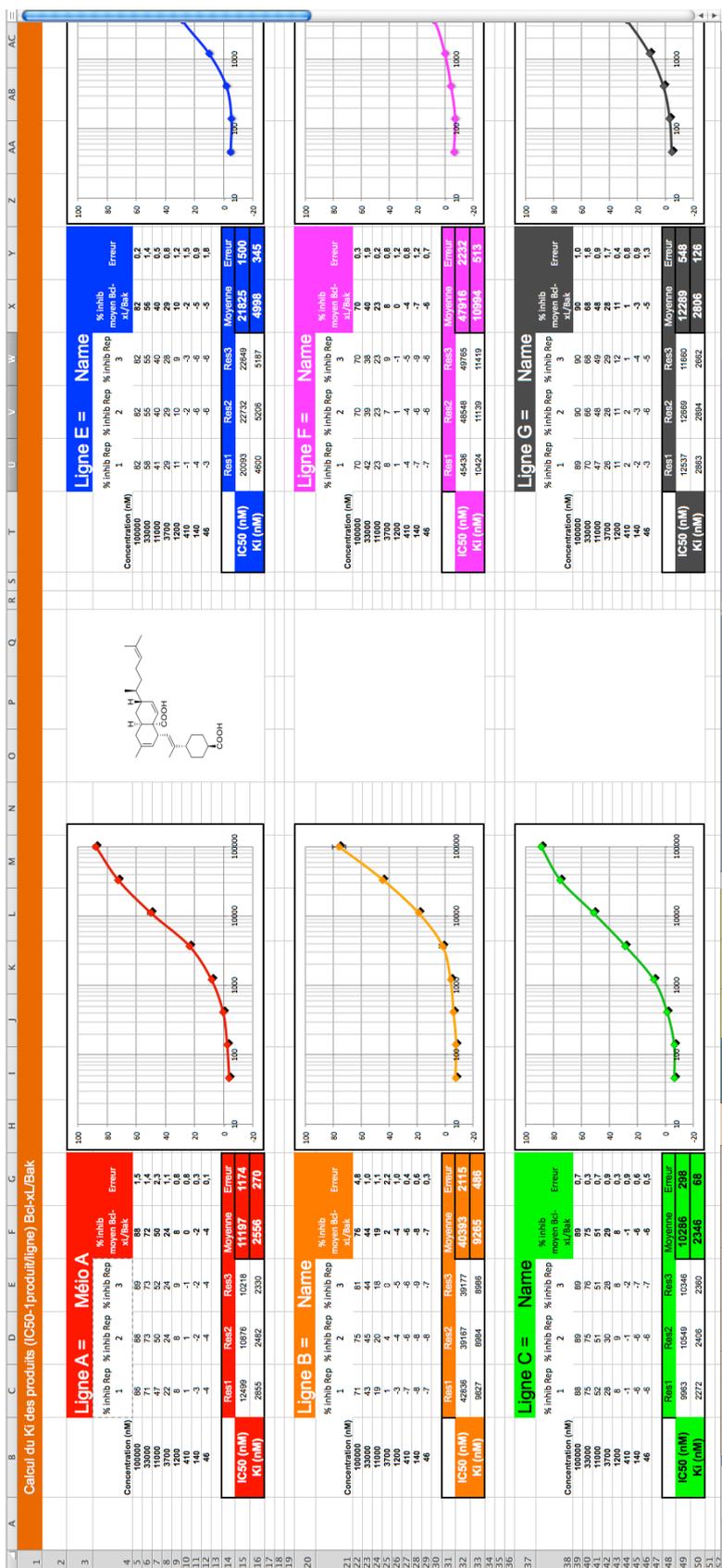


Figure 36 : Tableau Excel™, feuille "Bilan" tronquée.



– Volet n°5 "Référence-Z"

→ Ce volet permet le calcul du facteur Z' de chacune des plaques afin de suivre l'évolution de la qualité des essais sur une longue période.

– Volet n°6 à 8 "Int-Rep1/2/3"

→ Ces trois jeux de données (un par répétition) correspondent aux valeurs de l'intensité de la fluorescence. Les données d'intensité des plans perpendiculaire et parallèle du fichier n°1 doivent être collées dans les 2^{ème} et 3^{ème} colonne du fichier n°2. Un graphique met en évidence l'intensité de fluorescence dans chaque puits. Tandis qu'un tableau avec toutes les valeurs indique en rose les composés dont l'intensité est supérieure à 120 % et en bleu ceux dont l'intensité est inférieure à 80 %.

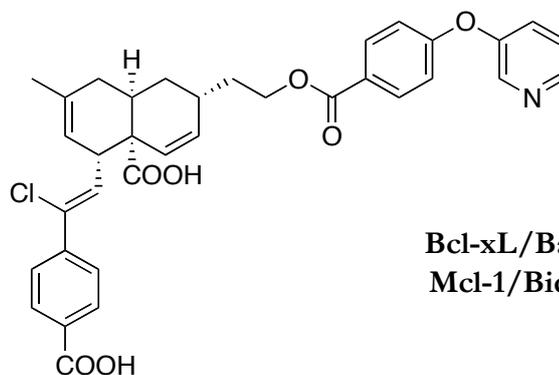
Il existe un tableur pour le criblage et un pour chaque protéine compte tenu du fait qu'elles n'ont pas le même K_i . Ces tableurs sont constitués de façon identique.

Les résultats du criblage sont exprimés en pourcentage d'inhibition à une concentration donnée. Plus ce pourcentage est élevé, plus l'affinité pour la cible est importante. Les résultats des produits purs sont présentés sous forme de pourcentage de liaison à la concentration fixe de 100 μ M ou sous forme de K_i . Dans le premier cas, on considère qu'un produit présente une bonne affinité dès lors que le pourcentage est supérieur à 50 % d'inhibition. Dans le second cas, plus la valeur de K_i est faible plus le produit possède une forte affinité pour la cible. Tous les résultats obtenus ont été compilés dans un seul et même fichier afin de faciliter la lisibilité et le suivi de la gestion des données. Les résultats référencés dans ce dernier fichier, concernent les extraits, les fractions mais également les produits purs issus de la synthèse et de l'extraction. Quelques uns de ces résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

2. Résultats biologiques des produits purs isolés ou synthétisés au sein de l'équipe

2.1. Les produits issus de la synthèse organique

De nombreux analogues de la méiogynine A ont été synthétisés au laboratoire par différents membres de l'équipe du Dr F. Roussi. Afin de valider l'interaction de certains analogues avec les protéines Bcl-xL et Mcl-1, des études de modélisation moléculaire ou de RMN à haut champ ont été réalisées. L'analogue A de la méiogynine A (17) est par exemple une des molécules ayant présenté la plus forte affinité pour les deux protéines (K_i de l'ordre du submicromolaire).⁸⁷



(17)

Bcl-xL/Bak : $K_i = 153 \pm 5$ nMMcl-1/Bid : $K_i = 106 \pm 10$ nM

2.2. Les produits issus de l'extraction de plantes

Dans l'équipe, deux projets ont été développés grâce aux résultats obtenus sur ces deux essais.

Le premier projet, conduit par Mohamad Nurul Azmi dans le cadre de ses travaux de thèse, avait pour objectif le fractionnement bioguidé d'un extrait méthanolique des écorces d'*Endiandra kingiana* (Lauraceae) possédant une activité inhibitrice de l'interaction Bcl-xL/Bak. Les travaux d'Azmi faisaient suite aux travaux d'une autre doctorante dans l'équipe, Aurélie Leverrier, qui avait isolé à partir de cette même plante, toute une série de polycétides originaux, les kingianines, inhibiteurs de l'interaction Bcl-xL/Bak. Parmi les

⁸⁷ Desrat, S., *et al.*; *Chem. Commun.* (2014); 50; 8593-8596.

molécules isolées, des acides endiandriques, nommés acides kingianiques, ont montré de faibles affinités pour les deux protéines.⁸⁸

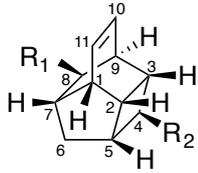
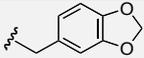
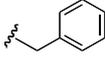
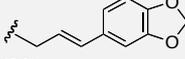
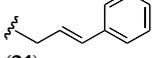
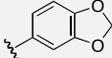
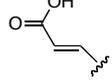
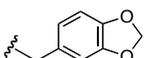
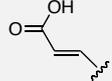
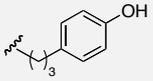
Dans le second projet conduit par Cécile Apel, il s'agissait de rechercher des composés de type acide endiandrique présentant des affinités plus fortes pour les deux protéines. Ces molécules étant exclusivement produites par des espèces appartenant aux genres *Beilschmiedia* et *Endiandra*, un criblage par RMN du ¹H puis par ¹H-¹³C HSQC d'extraits des plantes de ces deux genres a été réalisé afin de détecter ceux contenant des acides endiandriques. Ce criblage a conduit à la sélection de *Beilschmiedia ferruginea* pour une étude chimique approfondie. Onze nouveaux acides endiandriques, nommés acides ferruginéiques, ont ainsi été isolés à partir de l'extrait AcOEt des feuilles plus fleurs.⁸⁹

Une série de nouveaux acides endiandriques a ainsi pu être découverte et testée sur Bcl-xL et pour la première fois sur Mcl-1 (*cf.* Tableau 12, Tableau 13 et Tableau 14). Ces molécules, qui possèdent un squelette carboné tétracyclique particulier, ont été classées arbitrairement en trois types structuraux A, B et C (Tableaux ci-après). L'évaluation biologique réalisée sur l'ensemble des acides endiandriques issus des deux espèces, *Endiandra kingiana* et *Beilschmiedia ferruginea*, a permis de mettre en évidence des relations structure-activité, soulignant d'importantes variations selon le type du squelette tétracyclique carboné et de la longueur de la chaîne substituant le tétracycle en position 4 (type A) et 11 (types B et C).

⁸⁸ Azmi, M., *et al.*; *Molecules* (2014); 19; 1732-1747.

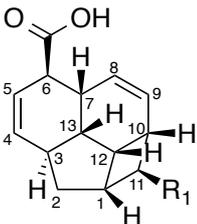
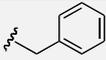
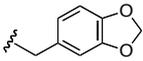
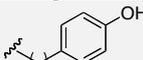
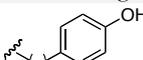
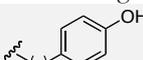
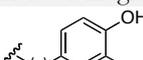
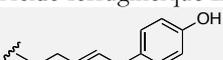
⁸⁹ Apel, C., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (2014); 77; 1430-1437.

Tableau 12 : Evaluation biologique des acides endiandriques de type A isolés d'*E. kingiana* et *B. ferruginea*.

	R ₁	R ₂	% d'inhibition à 100 μM	
			Bcl-xL	Mcl-1
 <p>Acide endiandrique de type A</p>	COOH		21 ± 2	36 ± 2
	COOH		—	—
	COOH		25 ± 2	75 ± 1
	COOH		—	—
		CH ₂ COOH	1 ± 1	8 ± 6
			10 ± 1	39 ± 1
			22 ± 3	0
	COOH			

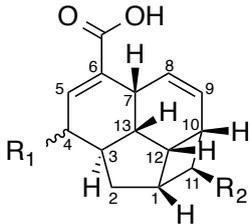
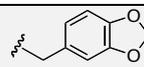
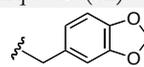
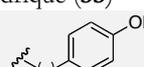
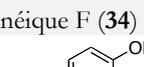
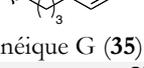
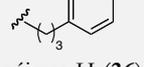
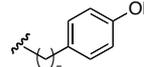
Les acides endiandriques présentant le motif structural de type A *i.e.* avec un noyau tétracyclique de 11 carbones, ne possèdent pas d'activité inhibitrice sur la protéine Bcl-xL et seul l'acide kingianique C a une activité sur la protéine Mcl-1.

Tableau 13 : Evaluation biologique des acides endiandriques de type B isolés d'*E. kingiana* et *B. ferruginea*.

	R ₁	% d'inhibition à 100 μM	
		Bcl-xL	Mcl-1
 <p>Acide endiandrique de type B</p>	 Acide kingianique F (25)	22 ± 3	80 ± 1
	 Tsangibeiline B (26)	26 ± 3	81 ± 2
	 Acide ferruginéique A (27)	22 ± 2	0
	 Acide ferruginéique B (28)	66 ± 6	85 ± 2
	 Acide ferruginéique C (29)	93 ± 3	82 ± 2
	 Acide ferruginéique D (30)	39 ± 3	82 ± 2
	 Acide ferruginéique E (31)	20 ± 1	14 ± 3

Le second type structural, caractérisé par un noyau tétracyclique de 13 carbones et deux doubles liaisons en positions 4,5 et 8,9, présente des affinités de liaison pour les deux protéines anti-apoptotiques. Les acides ferruginéiques B et C ont la meilleure activité. On peut en déduire que la longueur de la chaîne latérale en position 11, 5 ou 7 carbones, (acides ferruginéiques B et C *versus* A) associée à la présence de phénols sur le cycle aromatique en bout de chaîne soient déterminants pour l'affinité de liaison avec les deux protéines.

Tableau 14 : Evaluation biologique des acides endiandriques de type C isolés d'*E. kingiana* et *B. ferruginea*.

	R1	R2	% d'inhibition à 100 μ M	
			Bcl-xL	Mcl-1
 <p>Acide endiandrique de type C</p>	α -OH		19 \pm 2	47 \pm 3
	Acide kingianique G (32)			
	H		—	—
	Acide endiandrique (33)			
	α -OH		7 \pm 1	0
	Acide ferruginéique F (34)			
	β -OH		17 \pm 1	3 \pm 1
	Acide ferruginéique G (35)			
C=O		—	—	
Acide ferruginéique H (36)				
α -OH		35 \pm 1	7 \pm 2	
Acide ferruginéique I (37)				
β -OH		58 \pm 7	81 \pm 3	
Acide ferruginéique J (38)				

Le troisième groupe est caractérisé par le même noyau tétracyclique que le groupe B mais avec les doubles liaisons en positions 5,6 et 8,9. Seul l'acide ferruginéique J présente une affinité de liaison pour les deux protéines. L'orientation β de l'hydroxyle en 4 (acide ferruginéique J *versus* I) et la longueur de la chaîne latérale en 11 (acide ferruginéique J *versus* G) jouent par conséquent un rôle prépondérant pour l'activité.

3. Bilan du criblage biologique d'une partie de l'extractothèque

L'extractothèque renferme des extraits de différentes parties de plantes provenant essentiellement de Malaisie, de Nouvelle-Calédonie, du Vietnam, de la Guyane et de Madagascar. Ces extraits ont été mis en plaque 96 puits à 1 mg/mL dans du DMSO. Dans ces plaques, il y a des extraits méthanoliques, acétate éthyle, qu'ils soient bruts ou filtrés ou encore qu'ils aient déjà subi un premier fractionnement.

Les résultats du criblage des extraits de plantes sur les deux cibles ont été incorporés à la base de données du PSN-P accessible *via* l'intranet de l'ICSN.

Sur les 560 extraits criblés sur les deux protéines Bcl-xL et Mcl-1, seuls des extraits filtrés se sont avérés actifs. Bien que les plaques contenant ces extraits aient été sélectionnées au hasard, ce sont essentiellement des extraits de Nouvelle-Calédonie qui ont été testés. Parmi les plantes criblées, seulement deux ont montré des activités significatives sur les deux cibles. L'étude phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de l'une de ces plantes, *Callitris neocaledonica*, a été réalisée par une étudiante de master 2, Tiphaine Péresse. Des labdanes ainsi qu'un dimère de labdane ont pu être isolés. Cependant, les activités biologiques obtenues se sont avérées décevantes par rapport à l'activité trouvée initialement sur l'extrait brut. L'autre plante, une Myrsinaceae, active sur les deux cibles n'a, pour le moment, pas été travaillée.

Un second criblage a été effectué sur une quarantaine d'extraits de plantes qui avaient été sélectionnées suite à l'activité sur Bcl-xL décelée par l'IdRS. Parmi ces extraits, deux grandes familles sont plus largement représentées, les Annonaceae et les Meliaceae (*cf.* Figure 37).

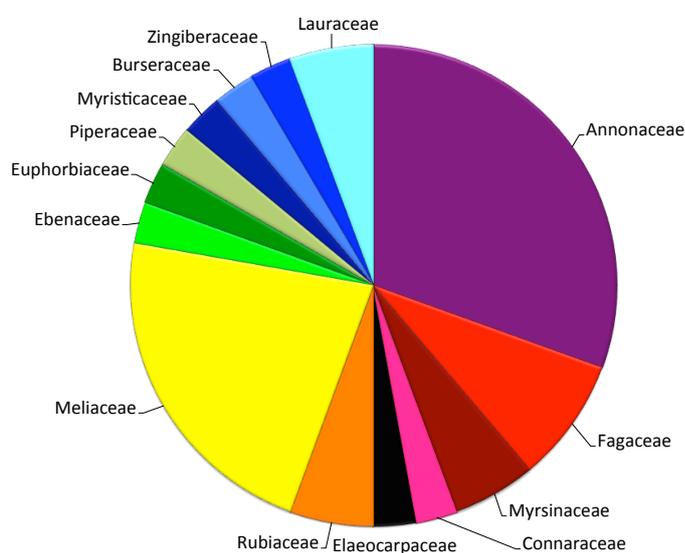


Figure 37 : Représentation graphique du nombre d'extraits testés par famille botanique.

Ces extraits ont fait l'objet d'études plus approfondies. Des profils de chromatographie sur couche mince (CCM) et de chromatographie liquide haute pression (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (SMBR) et des études

bibliographiques des genres et espèces des plantes ont été systématiquement réalisés. En complément, pour les extraits présentant les chromatogrammes bien résolus avec un faible nombre apparent de composés, un spectre RMN du proton dans le méthanol deutéré a été effectué. La sélection des plantes repose finalement sur les 5 critères suivants par ordre d'importance :

- 1 → activité sur les deux cibles Bcl-xL et Mcl-1,
- 2 → étude phytochimique de la plante jamais réalisée,
- 3 → accessibilité à la matière première (à l'ICSN ou à importer du pays d'origine)
- 4 → originalité des motifs structuraux rencontrés dans le genre ou l'espèce et comparaison avec les spectres ¹H RMN,
- 5 → complexité de l'extrait

Ainsi, *Knema hookeriana* (Myristicaceae) et *Fissistigma latifolium* (Annonaceae) ont été sélectionnées. Leurs activités sont présentées dans le tableau ci-dessous (cf. Tableau 15).

Tableau 15 : Bilan de l'évaluation biologique sur Bcl-xL et Mcl-1 de *K. hookeriana* et *F. latifolium*.

	Extrait	Partie de plante	Bcl-xL/Bak-CF % d'inhibition à 10 µg/mL	Mcl-1/Bid-CF % d'inhibition à 10 µg/mL
<i>Knema hookeriana</i>	AcOEt	Ecorce	97 %	92 %
<i>Fissistigma latifolium</i>	AcOEt	Ecorce	44 %	65 %

Ces deux plantes présentent de fortes activités sur les deux cibles et aucune interférence avec la fluorescence. L'étude phytochimique des extraits acétate d'éthyle d'écorce de ces deux plantes n'avait jamais été réalisée auparavant. Une partie de la poudre d'écorce séchée de *F. latifolium* était au laboratoire tandis que quelques grammes de l'extrait testé de *K. hookeriana* était dans l'extractothèque de l'ICSN. L'étude bibliographique des genres et espèces de ces deux plantes ainsi que leur étude phytochimique constituent la 3^{ème} partie de mes travaux de thèse.

Conclusion

Il est possible d'utiliser différentes méthodologies pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine. Concernant les protéines anti-apoptotiques, une des techniques les plus utilisées et la plus robuste est la polarisation de fluorescence. Bien que cette technique soit rapide et peu coûteuse, elle présente le désavantage de ne pas discriminer les composés présentant une fluorescence intrinsèque des inhibiteurs vrais.

Dans le cadre de mes travaux de thèse, la mise en place des essais a consisté à fixer plusieurs paramètres comme les concentrations en protéines, le pourcentage de DMSO, la température d'incubation etc. J'ai validé ces tests par la mesure du facteur Z' et du SSMD, dont les valeurs indiquent la qualité excellente des deux essais sur Bcl-xL et Mcl-1. L'ABT-737, molécule commerciale, et la méiogynine A, isolée au laboratoire, sont systématiquement utilisées comme composés de référence. L'élaboration d'un protocole, de fiches de dilutions et de tableurs ExcelTM pour le traitement des résultats rend ces essais réalisables, en routine, par tous les membres de l'équipe.

Au total, j'ai évalué l'activité de près de 850 extraits et fractions ainsi que 170 produits purs sur Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF, permettant de mettre en évidence de nombreux produits actifs. D'autre part, le criblage a permis de sélectionner les extraits acétate d'éthyle d'écorce de *Knema bookeriana* Warburg (Myristicaceae) et de *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinclair (Annonaceae), dont les études phytochimiques font l'objet de la partie III de ce manuscrit.

Intercalaire rouge

Partie 3 : Etudes phytochimiques et évaluations biologiques

Cette troisième partie est consacrée à l'étude phytochimique des deux plantes suivantes :

- *Knema hookeriana* (Hook f. et Thomson) Warburg. (Myristicaceae)
- *Fissistigma latifolium* var. *ovoidum* (King) J. Sinclair. (Annonaceae)

Dans ce manuscrit l'étude de chacune des plantes commence par une description sommaire de la famille, du genre et de l'espèce, puis les résultats de mes travaux personnels sont détaillés.

Les Annonaceae et les Myristicaceae font partie des angiospermes primitives et appartiennent à l'ordre des Magnoliales qui inclus 6 familles (cf. Figure 38).

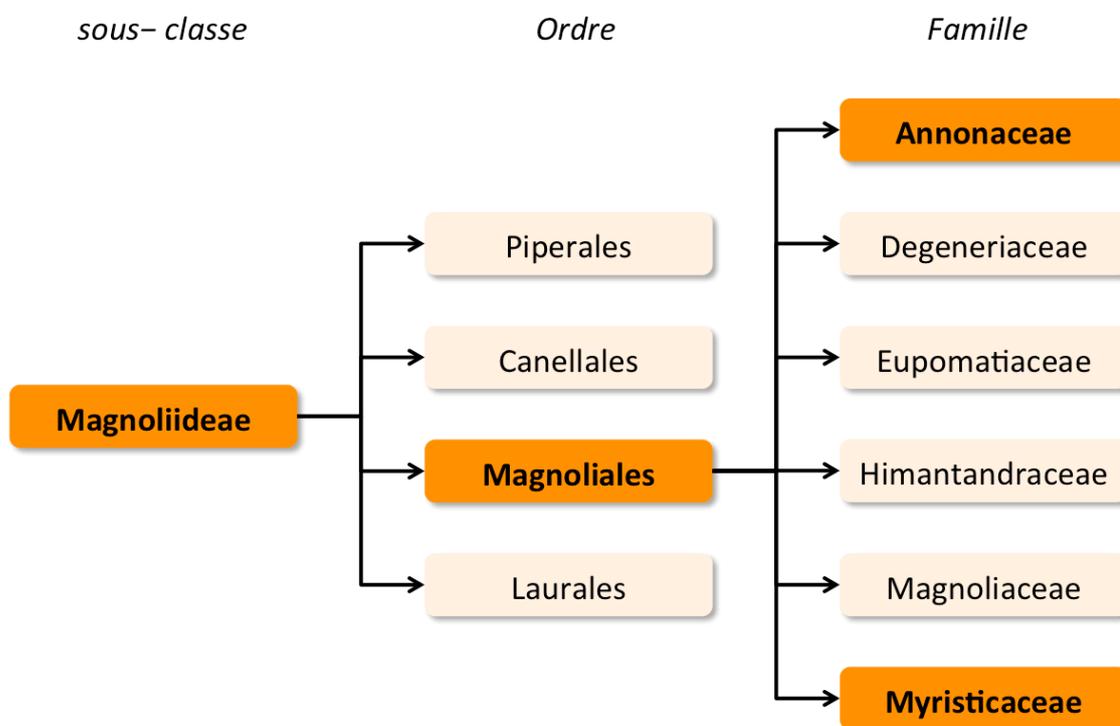


Figure 38 : Classification des Annonaceae et des Myristicaceae d'après l'APG III.

Les deux espèces, originaires de Malaisie, ont été sélectionnées pour leur forte activité sur les deux cibles, Bcl-xL et Mcl-1. A la suite des récoltes, les différentes parties des plantes sont séchées et broyées. Une petite partie de la récolte (≈ 100 g) est systématiquement extraite par l'acétate d'éthyle, l'extrait intégrera l'extractothèque de l'ICSN et sera stocké à +4 °C sous forme d'une poudre ou d'un produit plus ou moins pâteux, dont une quantité déterminée sera mise en plaque multi-puits, stockée à -20 °C. Un

second extrait méthanolique est également préparé pour épuiser la plante, il sera conservé à +4 °C. Le stock de poudre de plante sèche est conservé dans une salle déshumidifiée. Pour entreprendre l'étude phytochimique d'une plante préalablement sélectionnée, on peut, soit utiliser le stock d'extrait lorsqu'il est suffisant, soit démarrer une nouvelle extraction à partir du stock de matière première de la plante.

Chapitre 1

Knema hookeriana (Hk. f. & Th) Warb.

1. Etude bibliographique

1.1. La famille des Myristicaceae

La famille des Myristicaceae comprend une vingtaine de genres tels que *Virola*, *Horsfieldia*, *Knema*, *Myristica* ... et près de 500 espèces. Cette famille est principalement représentée par des arbres persistants poussant en milieux tropicaux. Les feuilles sont simples, entières, alternes souvent ponctuées de glandes sécrétant une huile aromatique.^{90,91} Deux grandes caractéristiques permettent de reconnaître les Myristicaceae des autres arbres : le port de l'arbre et la couleur de la sève.⁹² Les arbres de cette famille possèdent un port correspondant au modèle de Massart (*cf.* Figure 39) ainsi qu'une sève rouge (*cf.* Figure 40).

⁹⁰ http://www.plantes-botanique.org/genre_knema (consulté le 23/07/2014)

⁹¹ Spencer, G. F., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (1980); 43; 724-730.

⁹² Janovec, J. P. and García, R.; *Enc. Forest Sci.* (2004); 1762-1767.

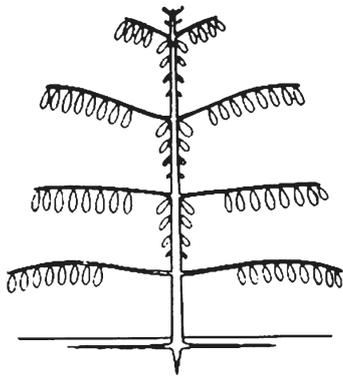


Figure 39 : Modèle de Massart.⁹²



Figure 40 : Sève rouge s'écoulant d'une entaille de l'écorce de *Knema bookeriana*.⁹³ © botanytroopers

Les membres de cette famille sont généralement dioïques, ils possèdent des feuilles avec des trichomes étoilés et de très petites fleurs discrètes sous forme d'inflorescences axillaires paniculées très parfumées. Les fleurs ne présentent pas de pétales mais un calice de 3 sépales partiellement soudés.⁹⁰ La fleur femelle possède un ovaire supère et uniloculaire contenant un ovule basal. La morphologie des fleurs mâles joue un rôle essentiel dans la définition des genres et représentent un des caractères clés pour leur identification (*cf.* Figure 41).⁹⁴ Dans toutes les fleurs mâles des Myristicaceae, les étamines sont fusionnées et forment un synandrium qui consiste en une colonne (stérile) avec entre 2 à 60 anthères plus ou moins fusionnées.

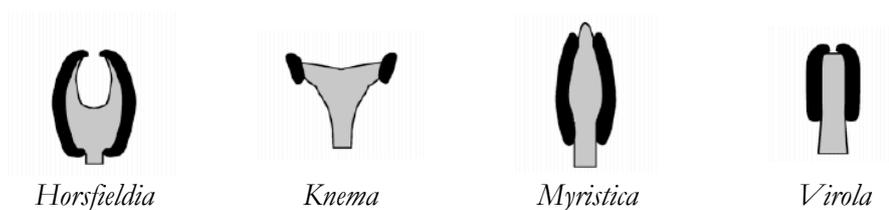


Figure 41 : Schéma illustrant la diversité structurale des synandria des quatre plus gros genres des Myristicaceae, les anthères sont représentées en noir.⁹⁴

Les fruits sont charnus, déhiscents ou indéhiscents et sont constitués d'une seule graine généralement recouverte d'une arille (tégument de la graine) rouge caractéristique.

⁹³ <https://www.flickr.com/photos/24557638@N03/2339507073/in/photostream/> (consulté le 23/07/14)

⁹⁴ Sauquet, H.; *Am. J. Bot.* (2003); 90; 1293-1305.

Certaines plantes de cette famille est classé "vulnérable" ou "menacé" par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN).⁹⁵

1.1.1. Répartition géographique

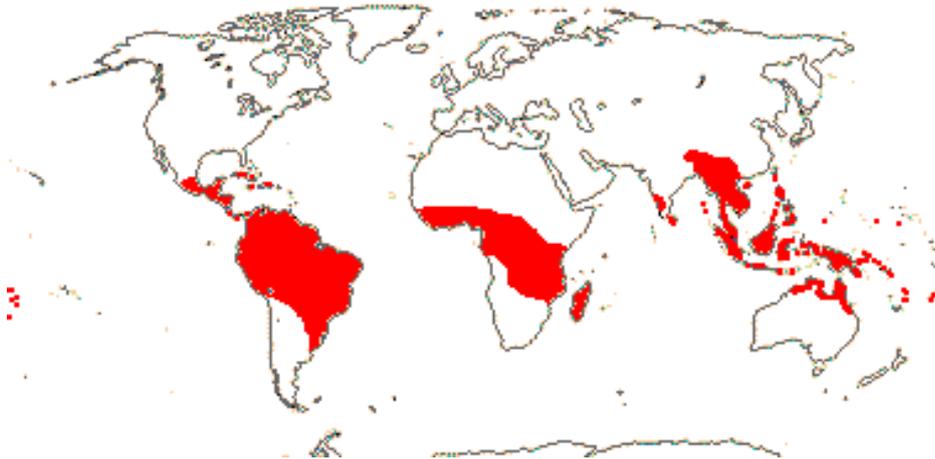


Figure 42 : Répartition mondiale des Myristicaceae.⁹⁶

Les Myristicaceae sont principalement rencontrées dans les zones tropicales, notamment en Amérique du Sud, en Afrique, à Madagascar, en Inde et en Asie (cf. Figure 42). Elles sont surtout localisées au niveau des forêts humides en plaine et sont très peu présentes en altitude.

1.1.2. Intérêt économique et utilisations traditionnelles

La Myristicaceae la plus connue est le muscadier (*Myristica fragrans*) dont on tire la noix de muscade (la graine) et le macis ou fleur de muscade (tégument ou arille de la noix de muscade) (cf. Figure 43 et Figure 44).

⁹⁵ <http://www.iucnredlist.org/details/37093/0> (consulté le 23/07/14)

⁹⁶ <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/maps/Myristicaceae.gif> (consulté le 18/07/14)



Figure 43 : Fruits (drupe jaune pâle), macis (rouge) et noix de muscade entourée de sa coque (marron).⁹⁷



Figure 44 : Noix de muscade dépourvues de leur coque ligneuse.⁹⁸

Ces deux épices sont essentiellement utilisées en cuisine. La muscade est également utilisée en médecine traditionnelle chinoise comme stomachique et antidiarrhéique.⁹⁹ L'huile essentielle de noix de muscade contient des carbures terpéniques (sabinène, limonène etc.), des alcénylbenzènes (myristicine, safrole, élémicine, eugénol) et des alcools.⁹⁹ L'eugénol possède des activités anti-agrégante et antibactérienne tandis que le safrole est hépatocancérogène et génotoxique.⁹⁹ Le muscadier, originaire de l'île d'Amboine (Moluques) fut introduit successivement à l'île Maurice en Malaisie, et plus tard au Sri Lanka, à Sumatra et dans les Caraïbes.⁹⁹ A l'heure actuelle, les principaux pays exportateurs de ces épices sont l'Indonésie, l'Inde, la Grenade (Antilles) et le Guatemala.

La poudre d'écorce et de sève séchée de certaines Myristicaceae du genre *Virola* est inhalée par les indiens d'Amazonie pour leurs propriétés hallucinogènes.⁹⁹ L'écorce de tronc et la sève contiennent des dérivés de la tryptamine.⁹⁹ Les indiens d'Amazonie utilisent également ces plantes comme poison pour les flèches.¹⁰⁰

Le bois de quelques Myristicaceae est également commercialisé comme bois d'œuvre, notamment dans l'industrie du contreplaqué.⁹²

⁹⁷ <http://www.marketmanila.com/archives/fresh-mace-nutmeg> (consulté le 18/07/14)

⁹⁸ <http://www.adjocom.com/content/385-muscade-circulation-sanguine-et-cheveux> (consulté le 18/07/14)

⁹⁹ Bruneton, J.; *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales* (2009); 4e Ed.; 675.

¹⁰⁰ Gottlieb, O. R.; *J. Ethnopharmacol.* (1979); 1; 309-323.

Les huiles essentielles de certaines espèces de différents genres sont aussi utilisées en parfumerie. Les graines de *Gymnacranthera farquhariana* et *Virola surinamensis* servent également à la réalisation de bougies.⁹²

1.2. Le genre *Knema* et l'espèce *Knema hookeriana*

Le genre *Knema* comprend 126 espèces réparties en Asie tropicale (Sumatra, péninsule Malaisienne, Singapour et Thaïlande) et seulement 10 noms d'espèce ont le statut "acceptée" selon l'IPNI.¹⁰¹

Knema hookeriana existe également sous le nom de *Myristica hookeriana*. Cette espèce a été classée "vulnérable" par l'IUCN.¹⁰² Le nom de cette espèce fait partie des noms classés "non résolu".¹⁰³

1.2.1. Description botanique¹⁰⁴

K. hookeriana est un arbre persistant d'une trentaine de mètres de hauteur à l'écorce noirâtre ou gris brunâtre et à la sève rouge (cf. Figure 40). Les feuilles font entre 30 et 36 cm de longueur et 10 à 13 cm de largeur. Elles sont lancéolées à oblancéolées, avec une base arrondie et un apex aigu (cf. Figure 46 et Figure 47). Les fleurs sont dioïques, les fleurs mâles possèdent entre 15 et 18 étamines (cf. Figure 45). Les fruits sont ellipsoïdes.

¹⁰¹ <http://www.theplantlist.org/browse/A/Myristicaceae/Knema/> (consulté le 20/08/2014)

¹⁰² <http://www.iucnredlist.org/details/34547/0> (consulté le 23/07/2014)

¹⁰³ <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2334949> (consulté le 20/08/2014)

¹⁰⁴ http://www.plantes-botanique.org/espece_knema_hookeriana (consulté le 20/08/2014)



Figure 45 : Bouton floral de *K. bookeriana* observé au microscope électronique à balayage.⁹⁴



Figure 46 : Jeune rameau de *K. bookeriana*.¹⁰⁵

¹⁰⁵ <https://www.flickr.com/photos/weefoong/7987765627/in/set-72157631544810651> (consulté le 23/07/14)



Figure 47 : Planche d'herbier de *K. hookeriana*.¹⁰⁶

¹⁰⁶ <http://apps.kew.org/herbcat/getImage.do?imageBarcode=K000854594> (consulté le 17/07/14)

1.2.2. Utilisations traditionnelles et activités biologiques

Les plantes du genre *Knema* ont été largement étudiées. En médecine traditionnelle, elles sont utilisées comme tonifiant ou pour traiter les plaies, les boutons, les rhumatismes, les infections de la peau et les cancers.^{107,108,109,110,111}

Les espèces du genre *Knema* ont fait l'objet de diverses évaluations biologiques qui sont représentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Principales activités biologiques répertoriées dans le genre *Knema*.

Nom botanique	Solvant d'extraction	Partie de plante	Activité biologique
<i>K. laurina</i>	méthanol	feuilles	Activité anti-inflammatoire et neuroprotectrice ¹¹²
	hexane dichlorométhane	écorce	Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase ¹¹³
<i>K. glomerata</i>	éthanol	écorce	Activité cytotoxique ¹⁰⁸
<i>K. furfuraceae</i>	éthanol	feuilles	Activité antibactérienne ¹¹⁴
<i>K. curtisii</i>	méthanol	feuilles	Activité photo-cytotoxique ¹¹⁵
<i>K. malayana</i>	méthanol	feuilles	Activité antimicrobienne ¹¹⁰
<i>K. attenuata</i>	chloroforme, éthanol	arille, noix	Activité larvicide sur <i>Aedes albopictus</i> (dengue, chikungunya) et <i>Anopheles stephensi</i> (malaria) ¹¹⁶
<i>K. elegans</i>	butanone	bois de tronc	Inhibition de ADN polymérase bêta ¹¹⁷ Clivage ADN
<i>K. bookeriana</i>	méthanol	écorce	Activité anti-nématode (<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>) ¹¹⁸
<i>K. angustifolia</i>	éthanol	–	Antioxydant ¹⁰⁹ Cytotoxique (NCI-H187) ¹⁰⁹
<i>K. glauca</i>	–	–	Activité antiparasitaire (<i>Plasmodium falciparum</i>) et antibactérienne (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) ¹¹⁹

¹⁰⁷ Kijjoa, A., et al.; *Planta Med.* (1991); 57; 575-577.

¹⁰⁸ Zeng, L., et al.; *J. Nat. Prod.* (1994); 57; 376-381.

¹⁰⁹ M., P., et al.; *J. Med. Plants Res.* (2010); 4; 1269-1272.

¹¹⁰ Wiart, C., et al.; *Fitoterapia* (2004); 75; 68-73.

¹¹¹ Pinto, M. M. M., et al.; *Phytochemistry* (1990); 29; 1985-1988.

¹¹² Häke, I., et al.; *J. Neuroimmunol.* (2009); 206; 91-99.

¹¹³ Akhtar, M. N., et al.; *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* (2011); 21; 4097-4103.

¹¹⁴ Zahir, A., et al.; *J. Nat. Prod.* (1993); 56; 1634-1637.

¹¹⁵ Ong, C. Y., et al.; *J. Photoch. Photobiol B* (2009); 96; 216-222.

¹¹⁶ Vinayachandra, et al.; *Parasitol. Res.* (2011); 109; 1671-1676.

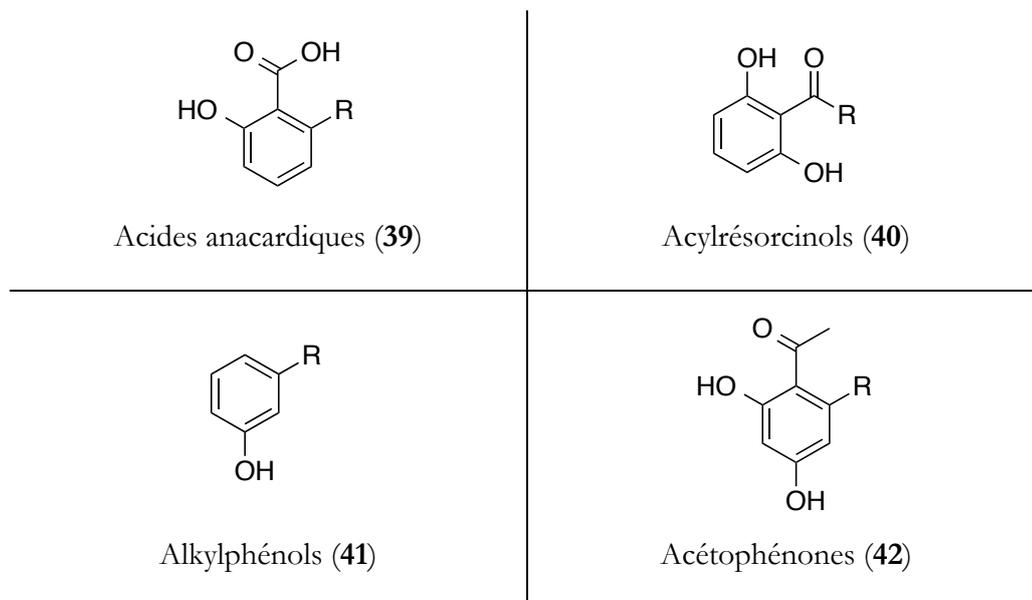
¹¹⁷ Deng, J.-Z., et al.; *J. Nat. Prod.* (2005); 68; 1625-1628.

¹¹⁸ Alen, Y., et al.; *Z. Naturforsch. C.* (2000); 55; 300-303.

¹¹⁹ Rangkaew, N., et al.; *Arch. Pharm. Res.* (2009); 32; 685-692.

1.3. Composition chimique du genre *Knema*

Les études phytochimiques des Myristicaceae ont mis en évidence la présence de composés de type stilbène, lignane, chalcone, dihydrochalcone, flavonoïde et de nombreux composés phénoliques. Le genre *Knema* se caractérise par la présence fréquente des acides anacardiques (39), des acylrésorcinols (40), des alkylphénols (41) et des acétophénones (42).



Le substituant R se présente sous la forme d'une chaîne aliphatique plus ou moins longue, avec ou sans insaturation et qui peut porter un cycle aromatique en position terminale.

Ces différents types de composés font partie de la grande classe des lipides phénoliques. Il est rare qu'un seul type soit produit par la plante, mais ce sont plutôt de nombreux analogues, appartenant à différents types, qui sont généralement isolés d'un même extrait. Ces composés ont été isolés dans de nombreux organismes tels que les plantes, les champignons et les bactéries. Dans les plantes, ils ont un rôle de défense.¹²⁰ La biosynthèse des lipides phénoliques a été étudiée grâce à des marquages au ¹⁴C ou au ¹³C détectés ensuite par RMN.^{99,121} Il est admis que les biosynthèses de ces composés sont très similaires. Plusieurs unités malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA) sont ajoutées à une unité de base ou *starter* (acétyl-S-CoA, acide gras-CoA, malonamido-S-CoA etc.), la molécule

¹²⁰ Kiat, T. S., *et al.*; *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* (2006); 16; 3337-3340.

¹²¹ Schultz, D. J., *et al.*; *J. Agric. Food Chem.* (2006); 54; 7522-7529.

ainsi formée se cyclise et subit d'autres transformations.⁹⁹ La diversité structurale résulte directement du nombre d'acétate du précurseur, du mode de cyclisation, de l'identité du *starter* et des transformations secondaires éventuelles : oxydations, réductions, alkylations, réarrangements, ouvertures de cycles, osylations.⁹⁹

Dans le cas des acide anacardiques et des alkyphénols, ces étapes sont catalysées par des enzymes, une polycétide synthase de type III (PKS III) et une réductase (cf. Figure 48).^{121,122}

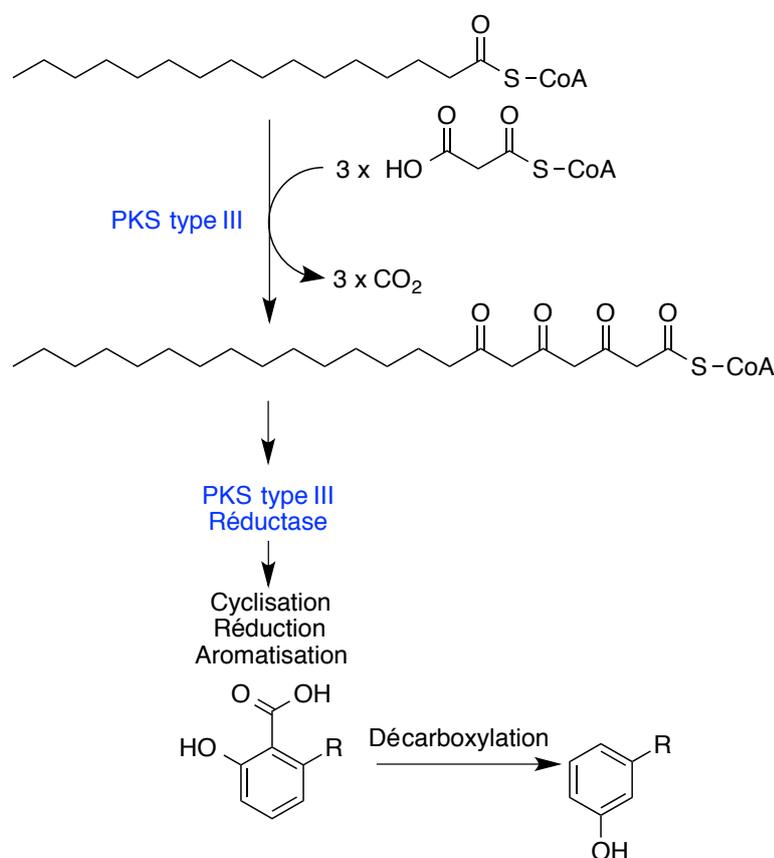


Figure 48 : Exemple de la biosynthèse des acides anacardiques et des alkyphénols, les enzymes sont indiquées en bleu (—) et les réactions en noir (—).¹²¹

A l'heure actuelle, les lipides phénoliques sont toujours très étudiés pour leurs activités biologiques et pour leur intérêt en chimie.¹²³ Les lipides phénoliques sont amphiphiles, ils peuvent s'incorporer aux membranes cellulaires et ainsi modifier les caractéristiques bio-physiques des membranes.¹²⁴ Ils perturbent la fluidité des membranes

¹²² Austin, M. B. and Noel, J. P.; *Nat. Prod. Rep.* (2003); 20; 79-110.

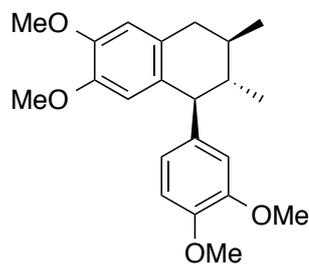
¹²³ Deb Majumdar, I., *et al.*; *Biochem. Bioph. Res. Co.* (2011); 416; 397-402.

¹²⁴ Stasiuk, M. and Kozubek, A.; *Cell Mol Life Sci* (2010); 67; 841-860.

ainsi que leur charge électrique en surface. Ils peuvent être utilisés comme sonde fluorescente puisque certaines molécules présentent une fluorescence intrinsèque.¹²⁴ Ils ont la capacité de former des micelles ou agrégats.¹²⁴ Ils possèdent également des activités antioxydante, cytotoxique et anti-microbienne.¹²⁴ De plus, certains de ces dérivés augmentent l'activité anti-tumorale de la bléomycine et du cisplatine et l'apoptose induite par des agents de chimiothérapie et le facteur de nécrose tumorale.¹²⁴ Il a également été démontré que certains composés affecteraient l'activité et la structure des protéines telles que l'acétylcholinestérase et les histone-acétyltransférases.¹²⁴ Bien que ces composés présentent des activités biologiques diverses, elles sont généralement non spécifiques et souvent liées à leur nature phénolique et amphiphile.¹²⁴

D'autres familles botaniques contiennent des lipides phénoliques telles que les Anacardiaceae, les Ginkgoaceae, les Geraniaceae... La résine phénolique ou baume de cajou, connue sous le nom de *Cashew Nut Shell Liquid* en anglais, contenue dans la coque de la noix de cajou, fruit de l'anacardier (*Anacardium occidentale*) est composée à 90 % d'acide anacardique et 10 % de cardol. Le cardanol, un des sous-produits de l'industrie du cajou, est obtenu à partir de l'acide anacardique. Il est utilisé pour la fabrication d'encres, de vernis de protection, d'insecticides ou dans l'industrie automobile.

Bon nombre d'espèces du genre *Knema* produisent également des composés fréquemment retrouvés dans le règne végétal tels que les lignanes (43),¹¹¹ les stilbènes (44)¹²⁵ et les flavonoïdes (45).¹¹⁷

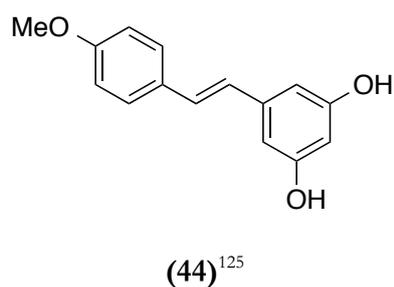
(43)¹¹¹

Les **lignanes** sont des dimères de phénylpropanoïdes. Ils présentent de nombreuses activités biologiques comme les activités anti-tumorale, anti-mitotique, anti-virale...¹²⁶ Ils sont classés en fonction de la façon dont sont incorporés les atomes d'oxygènes dans le squelette et le motif de cyclisation.¹²⁷ Les lignanes sont retrouvés en quantité importante au niveau du duramen chez les arbres.

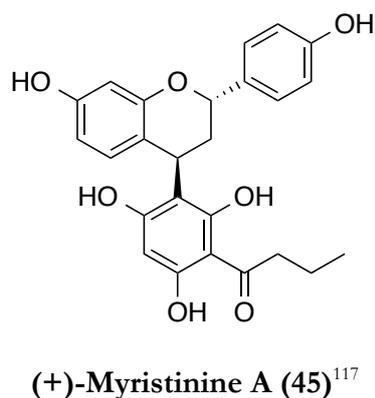
¹²⁵ González, M. J. T. G., et al.; *Phytochemistry* (1993); 32; 433-438.

¹²⁶ Chaurasia, O., et al.; *Indian J. Tradit. Know.* (2012); 11; 234-241.

¹²⁷ Bohlmann, F. and Abraham, W.-R.; *Phytochemistry* (1979); 18; 1754-1756.



Les **stilbènes** sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire et font partie des phytoalexines. Ils possèdent diverses activités biologiques telles que des activités anti-bactérienne, anti-fongique, anti-tumorale, cardioprotectrice etc.¹²⁸



Les **flavanoïdes** sont des composés phénoliques présentant deux cycles aromatiques séparés par trois carbones formant souvent un hétérocycle oxygéné.¹²⁹ Leurs activités sont diverses (anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-bactérienne, anti-cancéreuse, anti-virale etc.) et sont structure-dépendante.¹²⁹ L'activité d'une molécule va dépendre de son degré de polymérisation et d'hydroxylation, de la nature des substituants...¹²⁹

L'étude chimique de l'extrait acétate éthylique des écorces et tiges de *K. bookeriana* n'avait jamais été réalisée. D'autre part, si beaucoup de composés phénoliques ont été isolés du genre *Knema* et qu'ils présentent de nombreuses activités biologiques, leur potentiel inhibiteur des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 n'a jamais été évalué.

Cependant, la grande diversité et le nombre important de molécules déjà répertoriées dans la littérature nous ont incité à identifier les produits majoritaires par "déréplication" pour commencer.

¹²⁸ Chinembiri, T., et al.; *Molecules* (2014); 19; 11679-11721.

¹²⁹ Colegate, S. M. and Molyneux, R. J.; *Bioactive Natural Products : Detection, Isolation, and Structural Determination* (2008); 2nd Ed.; 508.

2. Travaux personnels

2.1. Etude phytochimique de *Knema hookeriana*

L'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) d'écorce et de tiges possède un pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak de 97 % et Mcl-1/Bid de 92 % à 10 $\mu\text{g/ml}$.¹³⁰

2.1.1. Récolte

Les écorces et les tiges de *Knema hookeriana* Warb. ont été collectées à Gunung Bujang Melaka, Perak, en Malaisie en Avril 1996 (cf. Figure 49). Cette espèce a été identifiée par T. Leong Eng de l'Université Malaya de Malaisie. Un échantillon de référence (KL-4584) a été déposé à l'herbier du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Malaya à Kuala Lumpur en Malaisie.



Figure 49 : Carte de la Malaisie, localisation du lieu de récolte à Gunung Bujang Melaka.

2.1.2. Déréplication

Quelques grammes de l'extrait AcOEt des écorces et tiges de *Knema hookeriana* (extrait OT-145) étaient présents dans l'extractothèque du laboratoire. Une petite quantité de cet extrait a été prélevée pour réaliser un spectre RMN ^1H (cf. Figure 50) et un chromatogramme CLUP-SM (cf. Figure 51).

¹³⁰ N.B. : ce travail a été réalisé en parallèle à la mise au point des tests sur Bcl-xL et Mcl-1, la concentration des extraits à tester n'avait pas encore été fixée à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ pour Mcl-1 au moment de la sélection de cette plante.

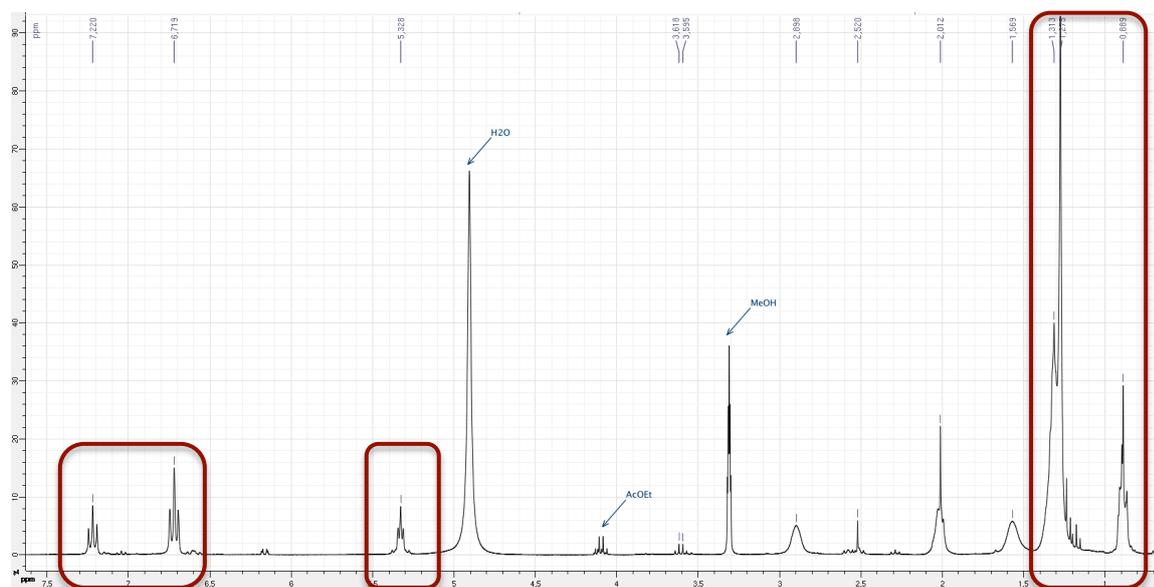


Figure 50 : Spectre RMN ^1H de l'extrait OT-145 à 300 MHz dans le MeOD.

Sur ce spectre RMN ^1H , relativement pauvre en signaux, on observe des signaux entre 6,5 et 7,5 ppm caractéristiques des protons aromatiques. On note la présence de signaux vers 5 ppm mettant en évidence des protons éthyléniques. Les signaux entre 0 et 1,5 ppm sont typiques d'une chaîne alkyle. L'analyse sommaire de ce spectre ainsi que les données chimiques sur le genre *Knema* indiquent que les composés majoritaires de cet extrait sont probablement des lipides phénoliques.

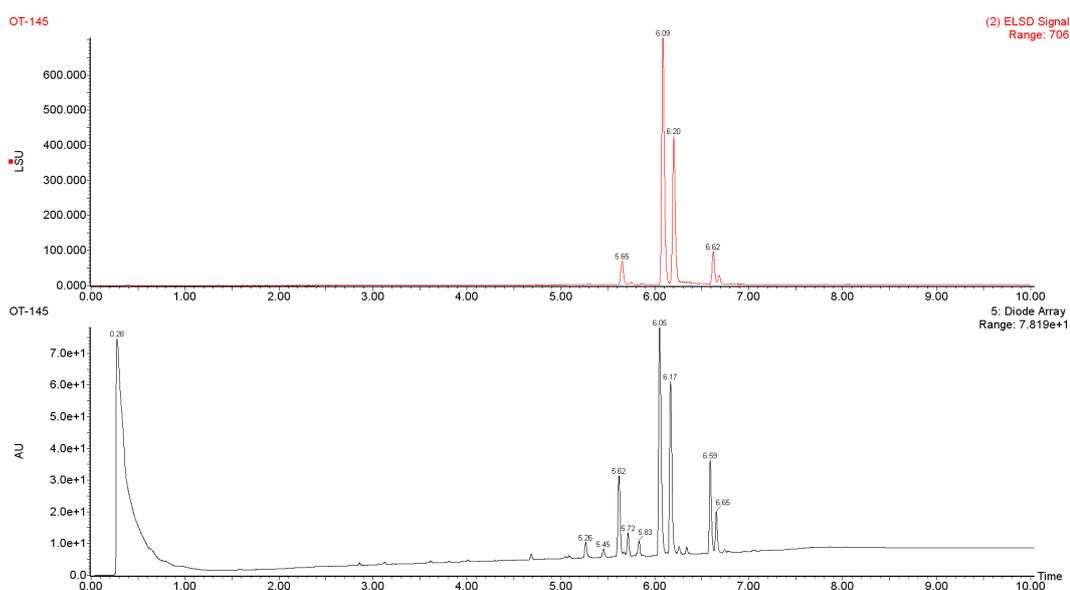


Figure 51 : Chromatogrammes détection UV (en bas) et DEDL (en haut) de l'extrait OT-145 obtenus par CLUP.

Sur le chromatogramme UV, une dizaine de pics est observée tandis que seuls quatre pics sont observés sur le chromatogramme DEDL indiquant que ceux-ci sont majoritaires dans l'extrait. L'analyse des spectres UV des produits majoritaires obtenus par le détecteur à barrette de diode révèle des maxima d'absorption à 310 et 230–240 nm. Ces données peuvent correspondre à la présence d'un cycle aromatique possiblement substitué par une fonction acide. De plus, l'analyse de l'extrait par spectrométrie de masse basse résolution nous a permis de déterminer les masses des composés majoritaires 290, 292, 318 et 320 pouvant correspondre à de nombreux lipides phénoliques par comparaison avec les données de la base Reaxys®.

Après optimisation du profil chromatographique de cet extrait en CLHP analytique en phase inverse, nous sommes passés sur colonne préparative sans filtrer ou fractionner l'extrait au préalable.

2.1.3. Purification

Le bilan de la purification des composés de *K. hookeriana* ainsi que les rendements d'extraction sont présentés dans la Figure 52 et le Tableau 17.

Sur les quelques grammes présents dans l'extractothèque, 350 mg ont été injectés directement en CLHP préparative en phase inverse. Cette chromatographie a permis l'isolement de 11 produits (46 – 56) dont deux d'entre eux en plus grosse quantité, 96 mg

pour le composé **51** et 74 mg pour **54**. Un douzième produit (**57**) a été purifié par chromatographie en couche épaisse (CCE). Les fractions **F1** et **F14** ne présentant pas d'activité, aucune purification n'a été entreprise par la suite. Les composés isolés sont tous des lipides phénoliques mais ils appartiennent à trois types différents : acétophénone, alkylphénol et acide anacardique. Ces travaux ont permis d'identifier cinq nouveaux composés (**46**, **47**, **53**, **56** et **57**) (*).

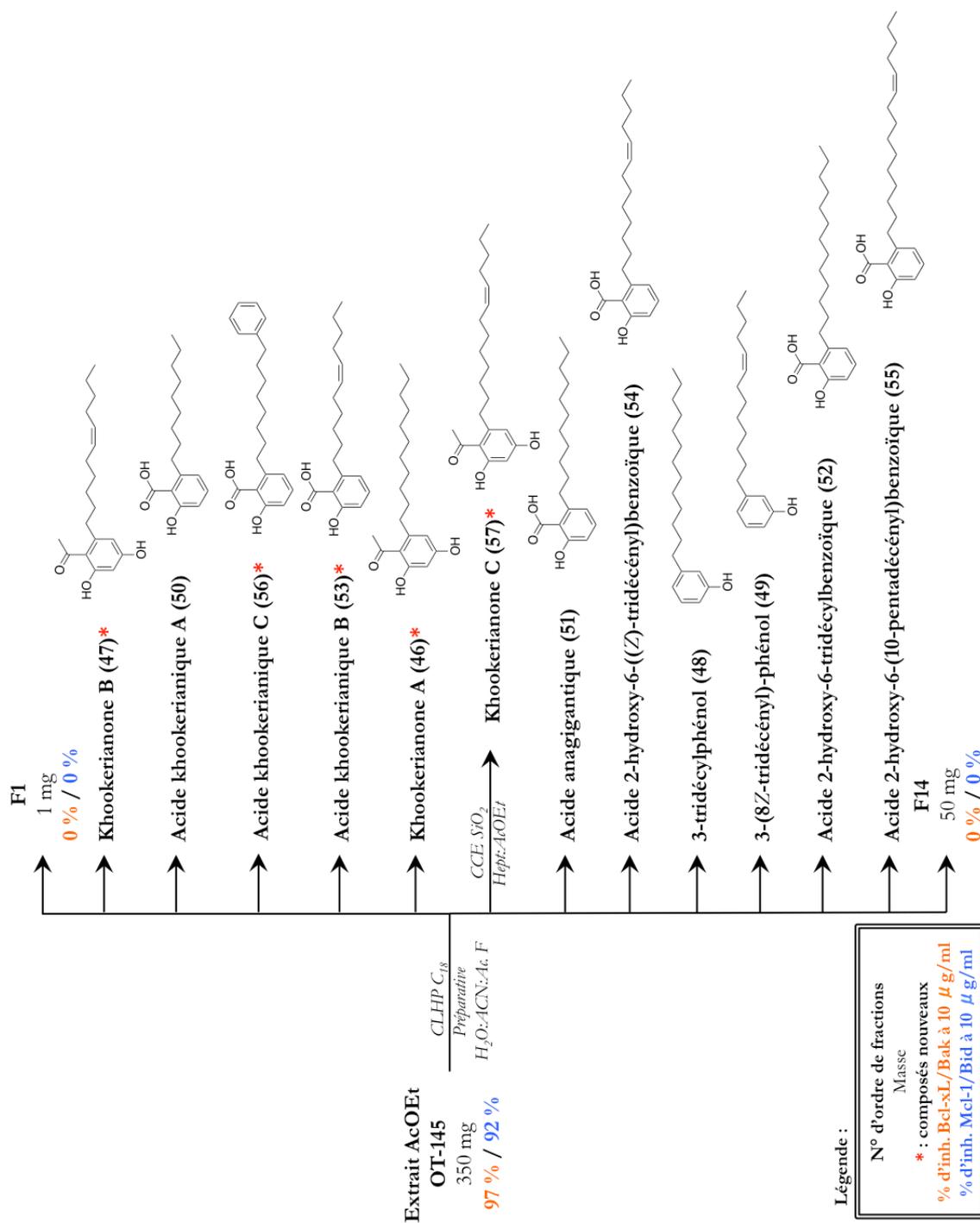


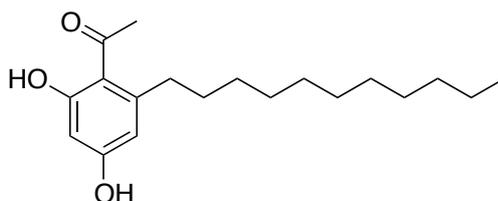
Figure 52 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces et tiges de *K. hookeriana* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.

Tableau 17 : Rendements d'extraction globaux rapportés à l'extrait AcOEt de *K. hookeriana*.

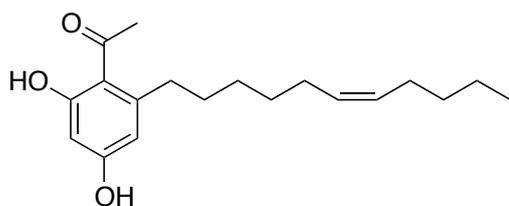
N° composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (%)
46	Khookerianone A*	6	1,71
47	Khookerianone B*	4	1,14
57	Khookerianone C*	3	0,86
48	3-tridécylphénol	4	1,14
49	3-(8Z-tridécényl)-phénol	3	0,86
50	Acide khookerianique A	2	0,57
51	Acide anagigantique	96	27,43
52	Acide 2-hydroxy-6-tridécylbenzoïque	31	8,86
53	Acide khookerianique B*	25	7,14
54	Acide 2-hydroxy-6-((Z)-tridécényl)benzoïque	74	21,14
55	Acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque	13	3,71
56	Acide khookerianique C*	3	0,86

Composés isolés des écorces et tiges de *Knema hookeriana* Warb. I/II

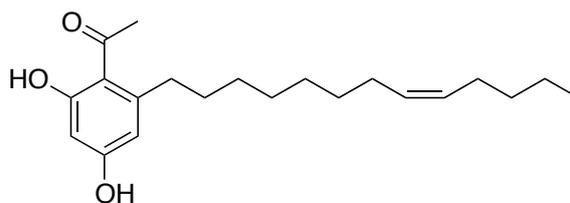
Type acétophénone



Khookerianone A (46)*

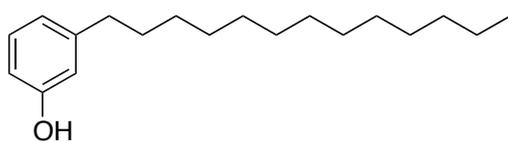


Khookerianone B (47)*

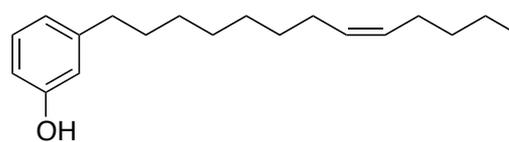


Khookerianone C (57)*

Type alkylphénol



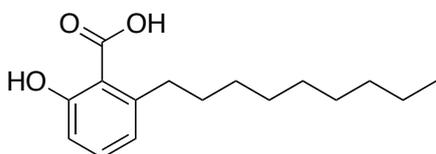
3-tridécylphénol (48)



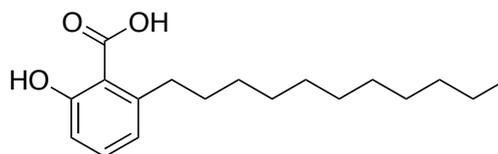
3-(8Z-tridécényl)-phénol (49)

Composés isolés des écorces et tiges de *Knema bookeriana* Warb. II/II

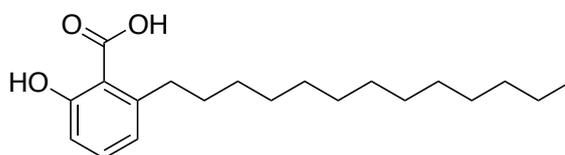
Type acide anacardique



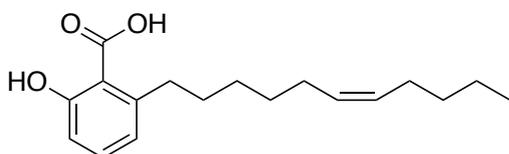
Acide khookerianique A (50)



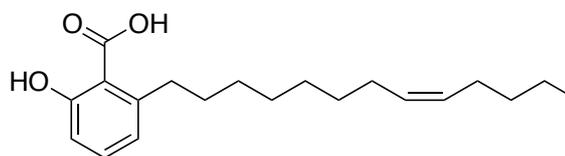
Acide anagigantique (51)



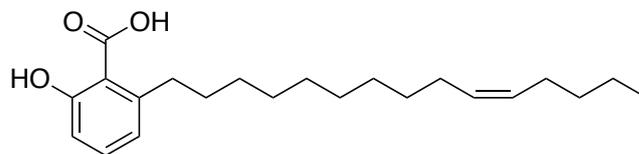
Acide 2-hydroxy-6-tridécylbenzoïque (52)



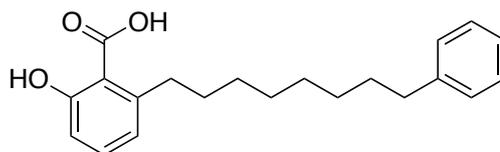
Acide khookerianique B (53)*



Acide 2-hydroxy-6-((Z)-tridécényl)benzoïque (54)



Acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque (55)

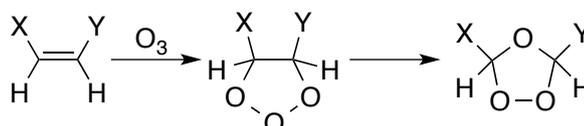


Acide khookerianique C (56)*

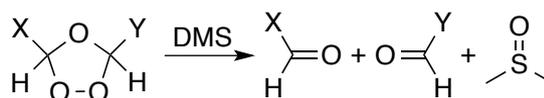
2.1.4. Caractérisation des composés isolés

Les composés isolés de *Knema bookeriana* ont été identifiés par l'analyse des données spectrométriques (IR, UV et SM), RMN et par comparaison avec les données de la littérature. Certains composés présentant une insaturation au centre de la chaîne latérale, des réactions d'ozonolyse ont été effectuées pour positionner la double liaison.

L'**ozonolyse** est une réaction faisant intervenir un alcène et l'ozone (O_3). Dans un premier temps on pratique l'ozonation qui conduit à la formation d'un molozonide, un produit instable, qui se réarrange en un autre composé, un ozonide.



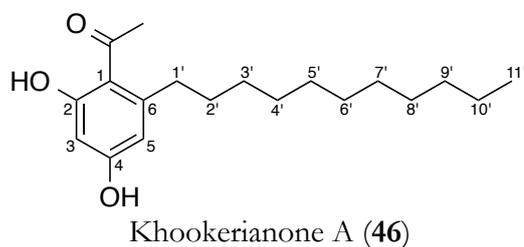
Ensuite, l'ozonide est réduit en utilisant par exemple le sulfure de diméthyle (DMS) entraînant la formation de deux produits carbonylés, deux aldéhydes en ce qui nous concerne.



Le brut réactionnel est injecté en CLUP-SM. On obtient ainsi la masse de chacun des deux produits formés et la position de l'insaturation peut en être déduite.

Dans cette partie, seule l'élucidation structurale d'une molécule de chaque type de squelette (acétophénone, alkylphénol et acide anacardique) est détaillée. Une description des différentes chaînes latérales est également effectuée. Les molécules isolées sont présentées p. 123-124, 228-229 et 289. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C des composés nouveaux **46**, **47**, **57**, **53** et **56** ont été placés en annexe p. 290.

Composés 46, 47 et 57 : type acétophénone



Le spectre de masse en électrospray (ES) haute résolution en mode positif montre un pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 307,2270 correspondant à la formule brute $C_{19}H_{30}O_3$ (masse calculée 307,2268) avec cinq degrés d'insaturation.

Le spectre RMN du proton présente deux groupements méthyle, l'un sous la forme d'un singulet déblindé vers 2,62 ppm, et l'autre sous la forme d'un triplet à 0,86 ppm, un multiplet large vers 1,24 ppm intégrant pour 16 protons et un multiplet à 1,57 ppm (2 H) et un triplet δ_H 2,81 (2 H). Les déplacements de ces protons indiquent la présence d'une chaîne alkyle. Dans la zone des aromatiques, deux doublets proches à δ_H 6,22 – 6,24 sont observés. Leur constante de 2,4 Hz précise leur position en *meta*. Deux signaux, un relativement large intégrant pour un proton à 5,55 ppm et un autre signal très déblindé autour de 13 ppm, sont également présents sur le spectre et s'échangent avec D_2O .

Le spectre RMN du carbone, analysé conjointement avec l'HSQC édité, indique la présence de cinq carbones quaternaires, dont un carbonyle à 204,5 ppm et deux carbones aromatiques liés à des groupements hydroxyles à 166,2 et 161,0 ppm, deux CH aromatiques et dix CH_2 aliphatiques et deux méthyles (*cf.* Tableau 18).

Tableau 18 : Données RMN du composé 46 (CDCl₃, 300 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (nombre de H, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
CO	204,5	—
COCH ₃	32,5	2,62 (3H, s)
1	115,5	—
2	166,2	—
3	101,9	6,22 (1H, d, 2,4 Hz)
4	161,0	—
5	110,8	6,24 (1H, d, 2,4 Hz)
6	148,1	—
1'	36,6	2,81 (2H, t, 7,8 Hz)
2'	32,4	1,57 (2H ; m)
3'–8'	29,8	1,24
9'	32,11	1,24
10'	22,90	1,24
11'	14,34	0,86 (3H ; t, 6,7 Hz)

Les corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC ont permis de proposer la structure du composé **46**. Ces corrélations sont présentées sur la Figure 53.

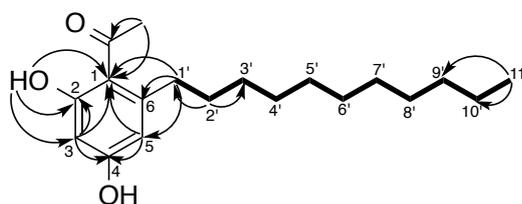
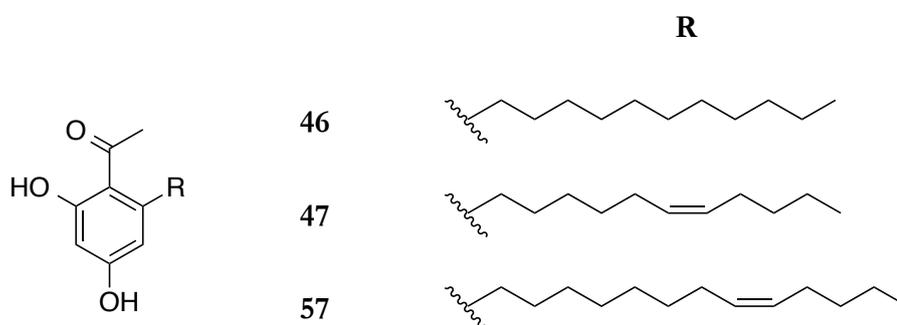


Figure 53 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 46.

Les corrélations homonucléaires COSY mettent en évidence le système de spins permettant de constituer la chaîne aliphatique tandis que l'enchaînement des atomes est principalement réalisé à l'aide des couplages hétéronucléaires HMBC. Les corrélations entre les protons du méthyle δ_H 2,62 avec le carbonyle et le carbone C-1 ont permis de placer le groupement méthyle cétone sur le cycle aromatique en position 1. L'hydroxyle en position 2 a pu être positionné, grâce aux corrélations observées entre celui-ci et les carbones C-1, C-2 et C-3. Les corrélations entre les protons aromatiques H-3 et H-5 avec le carbone C-4 ont permis de placer le second hydroxyle en 4. Pour finir, les corrélations entre les protons H-1' et les carbones C-1, C-6 et C-5 permettent de positionner la chaîne alkyle en 6.

L'ensemble de ces informations associé aux données de la littérature permettent d'affirmer que ce composé **46** est très proche de la kneglomeratanone B isolée de *K. glomerata* et qui possède une chaîne aliphatique de 13 carbones au lieu de 11.¹⁰⁸ Le composé **46** a ainsi été nommé khookerianone A en rapport avec le nom de la plante dans lequel il a été isolé.

Deux autres composés avec le motif acétophénone ont également été isolés. Ils diffèrent du composés **46** au niveau de la chaîne latérale.



Les spectres de masse (ES)⁺ de **47** et **57** montrent, respectivement, un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 305,2115 correspondant à la formule brute C₁₉H₂₈O₃ (masse calculée 305,2111) et à m/z 333,2421 pour C₂₁H₃₂O₃ (masse calculée 333,2424). Ces deux formules brutes suggèrent la présence d'une insaturation supplémentaire par rapport au composé **46**.

Sur les spectres RMN ¹H des composés **47** et **57**, deux multiplets supplémentaires par rapport au composé **46**, sont observés à δ_H 2,00 ppm (4 H) et à δ_H 5,33 ppm (2 H). Ces signaux suggèrent la présence d'une insaturation sur la chaîne alkyle mais il n'a pas été possible de définir la position et la configuration de cette double liaison grâce au spectre RMN ¹H. La présence d'une double liaison est confirmée par les spectres RMN ¹³C et notamment par la présence de deux carbones à δ_C 129,9 et 130,2. Ce sont les carbones en position allylique observés à 27,1 et 27,4 ppm qui indiquent la configuration (*Z*) de la double liaison.^{131,132} A ce stade de l'analyse, il n'est pas possible de définir la position de cette double liaison à l'aide des spectres RMN ¹H et ¹³C. La réaction d'ozonolyse réalisée

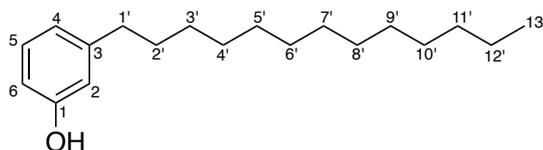
¹³¹ Vysotskii, M. V., *et al.*; *Tetrahedron Lett.* (1990); 31; 4367-4370.

¹³² Anderson, J. E., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (1992); 55; 71-83.

sur ces deux composés suivie d'une réduction par le DMS a entraîné la formation d'un aldéhyde détecté par LCUP-SM.

Les spectres de masse (ES)⁺ de la réaction d'ozonolyse des composés **47** et **57** montrent, respectivement, un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 251,1265 (masse calculée 251,1278) correspondant à la formule brute C₁₄H₁₉O₄ indiquant la présence de la double liaison en 6' et à m/z 279,1595 (masse calculée 279,1591) pour C₁₆H₂₃O₄ indiquant la présence de la double liaison en 8'. Ces deux composés, également très proches de la kneglomeratanone B, ont été nommés : khookerianone B (**47**) et khookerianone C (**57**).

Composés 48 et 49 : type alkylphénol



3-tridécylphénol (**48**)

Le spectre de masse (ES)⁺ montre un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 277,2530 (calculé pour C₁₉H₃₂O, 277,2526) correspondant à quatre degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ¹H du **48** est très proche de celui de la khookerianone A **46**. Les signaux dans la zone aliphatique sont les mêmes à l'exception du multiplet large vers 1,24 ppm intégrant pour 20 protons au lieu de 16 pour le composé **46**, indiquant que **48** possède la même chaîne alkyle avec deux CH₂ additionnels. Dans la zone des protons aromatiques, plusieurs signaux sont observés, un triplet dédoublé à δ_H 7,11 avec des constantes de couplage de 7,6 et 1,7 Hz indiquant la proximité d'au moins deux protons en position *ortho* et *para*, deux doublets dédoublés à δ_H 6,73 et δ_H 6,62 avec des constantes de couplage de 7,6 et 2,5 Hz indiquant la présence de protons en *ortho* et en *meta* et un autre doublet dédoublé large à 6,64 ppm. Le spectre RMN ¹H présente également un signal large à δ_H 4,66 indiquant la présence d'un hydroxyle.

Le spectre RMN ¹³C, en parallèle à l'HSQC édité, indique la présence de seulement deux carbones quaternaires, dont un lié à un groupement hydroxyle à 155,7 ppm, quatre CH aromatiques, 12 CH₂ aliphatiques et un méthyle (*cf.* Tableau 19).

Tableau 19 : Données RMN du composé 48 (CDCl₃, 500 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (nombre de H, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	155,7	–
2	115,5	6,64 (1H, br dd)
3	145,2	–
4	121,2	6,73 (1H, dd, 7,6 ; 2,5 Hz)
5	129,6	7,11 (1H, td, 7,6 ; 1,7 Hz)
6	112,7	6,62 (1H, dd, 7,9 ; 2,5 Hz)
1'	36,1	2,53 (2H, t, 7,4 Hz)
2'	32,2	1,57 (2H, m)
3'–10'	29,6 – 29,9	1,24
11'	31,5	1,24
12'	22,9	1,24
13'	14,3	0,86 (3H, t, 6,8 Hz)

Les corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC ainsi que les constantes de couplages entre les protons aromatiques ont permis de proposer la structure du composé **48**. Les corrélations sont présentées sur la Figure 54.

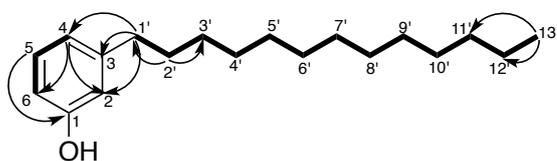


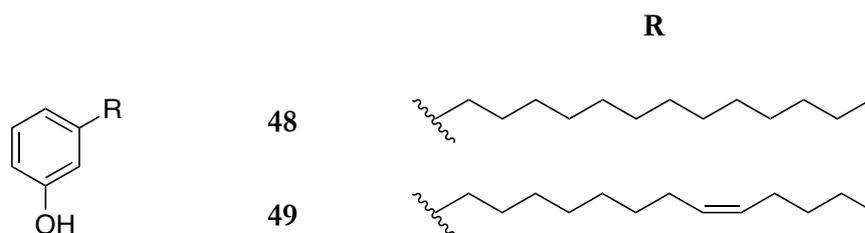
Figure 54 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 48.

Les corrélations COSY mettent en évidence le système de spins permettant de constituer une partie du cycle aromatique et la chaîne aliphatique. L'enchaînement des atomes est principalement réalisé à l'aide des couplages HMBC et des constantes de couplage observées sur le spectre RMN ¹H. La corrélation entre le proton aromatique H-5 avec le carbone C-1 a permis de placer l'hydroxyle en 1. Enfin, les corrélations entre les protons H-1' et les carbones C-3, C-4 et C-2 permettent de positionner la chaîne alkyle en 3.

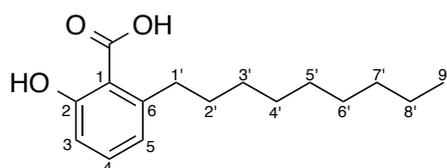
L'ensemble de ces informations, en accord avec la littérature, permet d'affirmer que le composé **48** est le 3-tridécylphénol isolé pour la première fois dans une algue brune *Caulocystis cephalornithos*.¹³³

¹³³ Kazlauskas, R., et al.; *Aust. J. Chem.* (1980); 33; 2097-2101.

Un autre composé **49** avec le motif alkylphénol a également été isolé. Il possède la même chaîne latérale que le composé **57**. De la même façon que pour les composés précédents, il a été identifié comme étant le 3-(8*Z*-tridécényl)-phénol (**49**) déjà isolé de *K. hookeriana*.¹¹⁸



Composés **50**, **51**, **52**, **53**, **54**, **55** et **56** : type acide anacardique



Acide khookerianique A (**50**)

Le spectre de masse (ES)⁺ montre un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 265,1812 (calculée pour C₁₆H₂₄O₃, 265,1798) correspondant à cinq degrés d'insaturation.

Le spectre RMN ¹H du **50** est également très proche de celui de la khookerianone A **46**. Il présente trois signaux dans la zone aromatique, deux doublets de doublet à 6,75 et 6,85 ppm ainsi qu'un triplet à 7,34 ppm. Le triplet possède une constante de couplage de 7,6 Hz en commun avec les deux doublets de doublet, lesquels couplent entre-eux avec une constante de couplage de 1,2 Hz suggérant la présence d'un noyau aromatique 1,2,3-trisubstitué. D'autre part, 19 protons aliphatiques constituent la chaîne latérale du composé **50**. Un singulet à 11 ppm est également observé suggérant la présence d'un hydroxyle proche d'une fonction cétone ou acide.

L'examen du spectre de RMN ¹³C, associé à l'HSQC édité, indique la présence de trois carbones quaternaires, dont un carbone lié à un groupement hydroxyle à 163,9 ppm et un carbone portant une fonction acide à 175,4 ppm, trois CH aromatiques, huit CH₂ aliphatiques et un méthyle (*cf.* Tableau 20).

Tableau 20 : Données RMN du composé 50 (CDCl₃, 500 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (nombre de H, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
COOH	175,4	—
1	110,6	—
2	163,9	—
3	116,1	6,85 (1H, dd, 7,6 ; 1,2 Hz)
4	135,6	7,34 (1H, t, 7,6 Hz)
5	122,9	6,75 (1H, dd, 7,6 ; 1,2 Hz)
6	147,9	—
1'	36,7	2,95 (2H, t, 7,7 Hz)
2'	32,3	1,58 (2H, m)
3'-6'	29,6 – 30,0	1,24
7'	32,1	1,24
8'	22,9	1,24
9'	14,3	0,85 (3H, t, 6,9 Hz)

Les corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC ainsi que les constantes de couplages entre les protons aromatiques ont permis de proposer la structure du composé **50**. Les corrélations sont présentées sur la Figure 55.

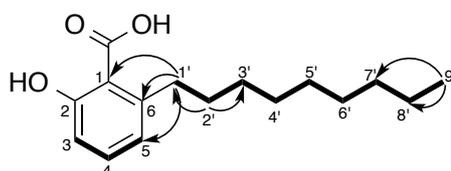


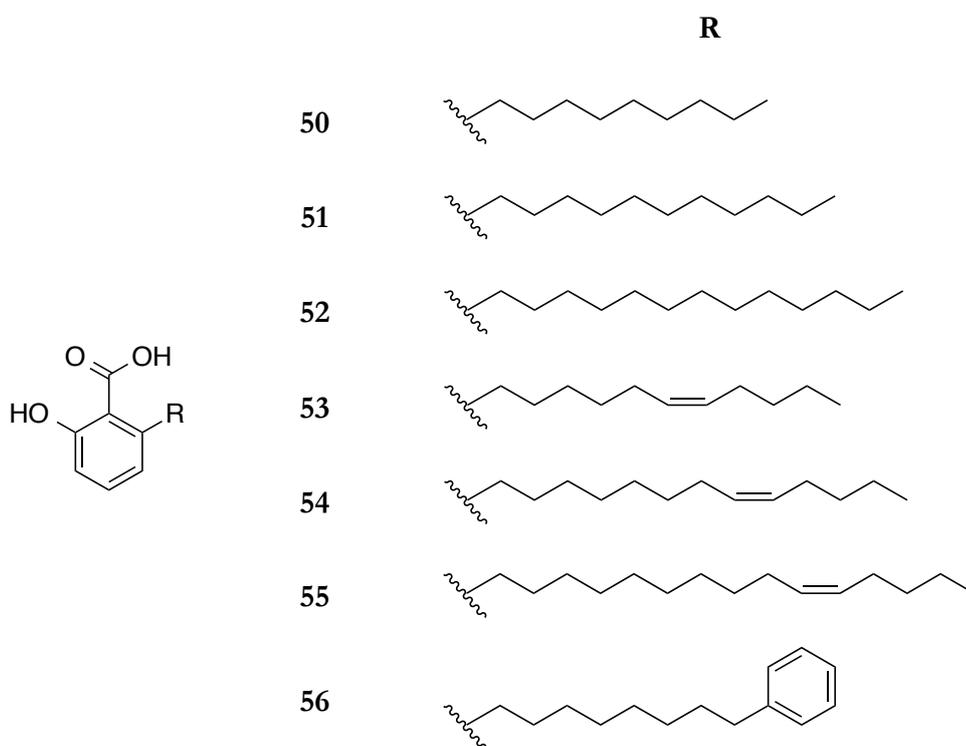
Figure 55 : Corrélations COSY (←) et HMBC (→) du composé 50.

Les corrélations COSY mettent en évidence le système de spins permettant de constituer une partie du cycle aromatique et la chaîne aliphatique. L'enchaînement des atomes est principalement réalisé à l'aide des couplages HMBC et des constantes de couplage observées sur le spectre RMN ¹H. Les corrélations entre les protons H-1' et les carbones C-1, C-6 et C-5 permettent de positionner la chaîne alkyle en 6.

En comparant ces données avec celles de la littérature, nous pouvons affirmer que le composé **50** a déjà été obtenu par synthèse mais il n'a jamais été isolé d'un organisme naturel.¹³⁴ Ce composé a été nommé acide khookerianique A.

¹³⁴ Pereira, J. M., *et al.*; *Bioorgan. Med. Chem.* (2008); 16; 8889-8895.

Au total, sept composés avec le squelette acide anacardique ont été isolés. Les composés **51**, **52**, **53** et **54** possèdent respectivement la même chaîne latérale que les composés **46**, **48**, **47** et **57**. De la même façon que pour les composés précédents, ils ont été identifiés comme étant l'acide anagigantique (**51**) isolé pour la première fois d'une hépatique *Schistochila appendiculata*,¹³⁵ l'acide 2-hydroxy-6-tridécylbenzoïque (**52**),¹³³ l'acide khookerianique B (**53**) jamais identifié auparavant, l'acide 2-hydroxy-6-((*Z*)-tridécényl)benzoïque (**54**)^{136, 137} et l'acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque (**55**).¹²¹ Le composé **56** diffère des autres composé par la présence d'un cycle aromatique au bout de sa chaîne latérale.



Le spectre de masse (ES)⁺ de **56** indique une formule brute de C₂₁H₂₆O₃ (masse calculée 327,1974) indiquant neuf insaturations. En comparant les données spectroscopiques de ce composé avec celles de deux composés (2a et 2b) isolés de *K*.

¹³⁵ Asakawa, Y., *et al.*; *Phytochemistry* (1987); 26; 735-738.

¹³⁶ Yalpani, M. and H.P. Tyman, J.; *Phytochemistry* (1983); 22; 2263-2266.

¹³⁷ Zehnter, R. and Gerlach, H.; *Liebigs Ann.* (1995); 1995; 2209-2220.

laurina,¹³⁸ **56** a pu être identifié comme ayant le même squelette biphényle mais avec une chaîne aliphatique comportant huit CH₂ au lieu de 10 ou 12 pour 2a et 2b respectivement. **56** a été nommée acide khookerianique C.

2.2. Evaluation biologique

Les deux fractions (**F1** et **F14**) ont été testées mais aucune activité n'a été détectée. Tous les composés isolés ont été testés *in vitro* pour évaluer leur activité inhibitrice de l'interaction protéine–ligand. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau 21 : Activité biologique des 12 produits isolés de *K. bookeriana* sur Bcl-xL et Mcl-1.

	K_i μ M	
	Bcl-xL/Bak-CF	Mcl-1/Bid-CF
46	> 23	> 33
47	> 23	> 33
57	> 23	> 33
48	> 23	> 33
49	> 23	> 33
50	18.1 \pm 0.31	17.7 \pm 3.12
51	1.2 \pm 0.03	0.7 \pm 0.04
52	0.2 \pm 0.02	0.2 \pm 0.03
53	3.2 \pm 0.12	5.8 \pm 0.37
54	0.3 \pm 0.01	0.2 \pm 0.01
55	5.7 \pm 0.65	1.2 \pm 0.92
56	16.3 \pm 0.51	3.7 \pm 2.02

Seuls les acides anacardiques présentent une activité sur les deux cibles alors que les molécules possédant le squelette acétophénone ou alkylphénone n'en présentent aucune. Il semble que la fonction acide soit indispensable pour induire une activité. Parmi les composés présentant une fonction acide, d'importantes différences sont observées au niveau des constantes d'inhibition en fonction de la longueur de la chaîne latérale. Les molécules avec une chaîne aliphatique composée de 13 carbones (**54** et **52**) sont actifs au nanomolaire alors que les molécules avec 9, 11 ou 15 carbones le sont au micromolaire. D'autre part, la présence d'une insaturation ne semble pas avoir influer sur l'activité tout

¹³⁸ Gonzalez, M. J. T. G., *et al.*; *Phytochemistry* (1996); 43; 1333-1337.

comme le phényle en bout de chaîne. Les activités des composés **54** et **52** étant très intéressantes, nous avons essayé de mieux comprendre et définir les interactions mises en jeu entre les protéines et nos composés.

En effet, l'évaluation *in vitro* des activités des composés par le test de polarisation de fluorescence permet de mettre en évidence une modulation de l'interaction entre la protéine et le ligand fluorescent mais en aucun cas, elle ne permet d'évaluer l'affinité des composés pour les protéines. Les analyses RMN permettent de définir de manière directe l'affinité d'un composé pour les protéines.

Des études de RMN à haut champ ont donc été mises en œuvre. Au laboratoire, plusieurs études RMN ont été réalisées pour définir et identifier le site de fixation de la méiogynine A (**13**), notre composé de référence, dans le sillon hydrophobe des protéines Bcl-xL et Mcl-1.¹³⁹ Ce travail a été effectué par l'équipe du Dr. E. Guittet à l'ICSN (Dr. G. Rivière, Dr. S. Nogaret, Dr. O. Serve et Dr. N. Birlirakis). Ces études ont été possibles grâce à l'attribution au préalable de chacun des acides aminés de Bcl-xL et Mcl-1. Sur des spectres RMN 2D ¹⁵N-¹H caractéristiques de la signature RMN d'une protéine. Chaque pic de corrélation observé sur ces cartes correspond à un acide aminé précis. Lorsqu'un ligand est ajouté à une protéine, les signaux de corrélation des acides aminés qui interagissent avec lui sont modifiés ce qui permet leur identification.

Etude des interactions protéiques par RMN

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction du composé le plus actif, l'acide anacardique **52** isolé en grande quantité, avec Bcl-xL et Mcl-1 (Figure 56 et Figure 57).

¹³⁹ Nogaret, S.; Thèse de Doctorat; Guittet and Birlirakis; *Etude par RMN de macromolécules biologiques : étude structurale de la protéine CGC-19 impliquée dans la biosynthèse d'un métabolite secondaire, la congocidine chez Streptomyces ambifaciens. Développement d'inhibiteurs des Bcl-2, protéines modulatrices de l'apoptose* (2011).

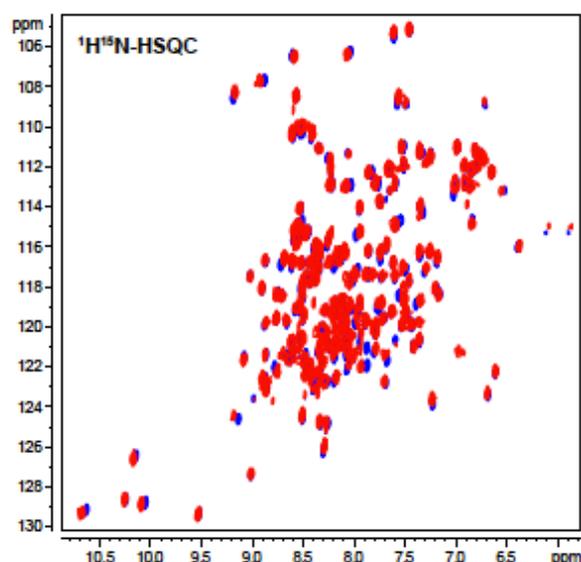


Figure 56 : Superposition des spectres RMN HSQC ^1H - ^{15}N de la protéine Bcl-xL seule à 0,385 mM (bleu) et en présence de 1,5 équivalents du composé 52 (rouge) à 950 MHz dans le D_2O .

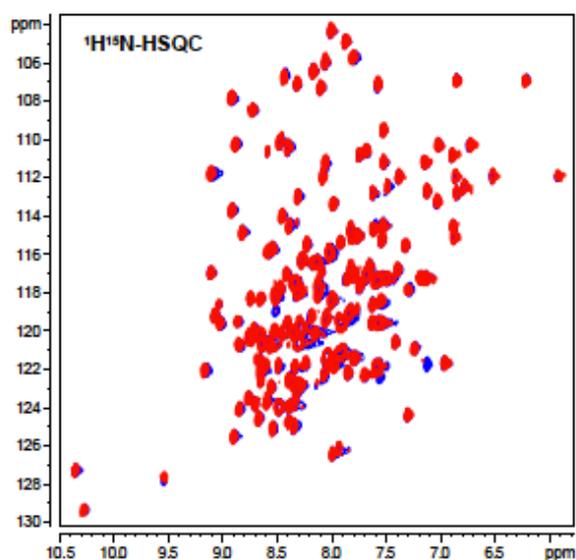


Figure 57 : Superposition des spectres RMN HSQC ^1H - ^{15}N de la protéine Mcl-1 seule à 0,360 mM (bleu) et en présence de 1,5 équivalents du composé 52 (rouge) à 950 MHz dans le D_2O .

Aucun changement significatif n'est observé entre les spectres de chacune des protéines seules et en présence de l'inhibiteur **52**, car les taches de corrélations sont quasiment superposables. Ces résultats ne confirment pas ceux obtenus par polarisation de fluorescence. Nous en avons déduit que l'activité inhibitrice de l'interactions entre Bcl-

xL/Bak et Mcl-1/Bid du composé **52** ne sont, à priori, pas dues aux interactions directes au niveau du sillon hydrophobe des protéines cibles Bcl-xL et Mcl-1.

Dans les essais réalisés par polarisation de fluorescence trois partenaires interviennent : une protéine, un peptide fluorescent et un produit. En l'absence d'interaction entre le produit et la protéine, nous avons émis l'hypothèse d'une éventuelle interaction entre le produit et les peptides Bid et Bak.

Si des études de l'interaction entre les composés actifs et les protéines anti-apoptotiques ont bien été effectuées par RMN dans le passé, en revanche, aucune étude de l'interaction des composés, trouvés actifs, avec les peptides Bak et Bid n'avait, jusqu'à présent, été réalisées au laboratoire. Nous avons décidé d'étudier l'interaction du composé **52** avec un des peptides, Bid, par RMN.

En l'absence d'attribution des acides aminés du peptide, seule des RMN ^1H ont été effectuées par le Dr. G. Rivière (Equipe d'E. Guittet, ICSN) en se basant sur le rationnel suivant. Si le composé ajouté au peptide possède une affinité pour celui-ci, les signaux du peptide devraient disparaître alors qu'en l'absence d'affinité ils devraient rester inchangés. Les spectres RMN ^1H du peptide seul et du peptide en présence de l'acide anacardique **52** sont présentés ci-après.

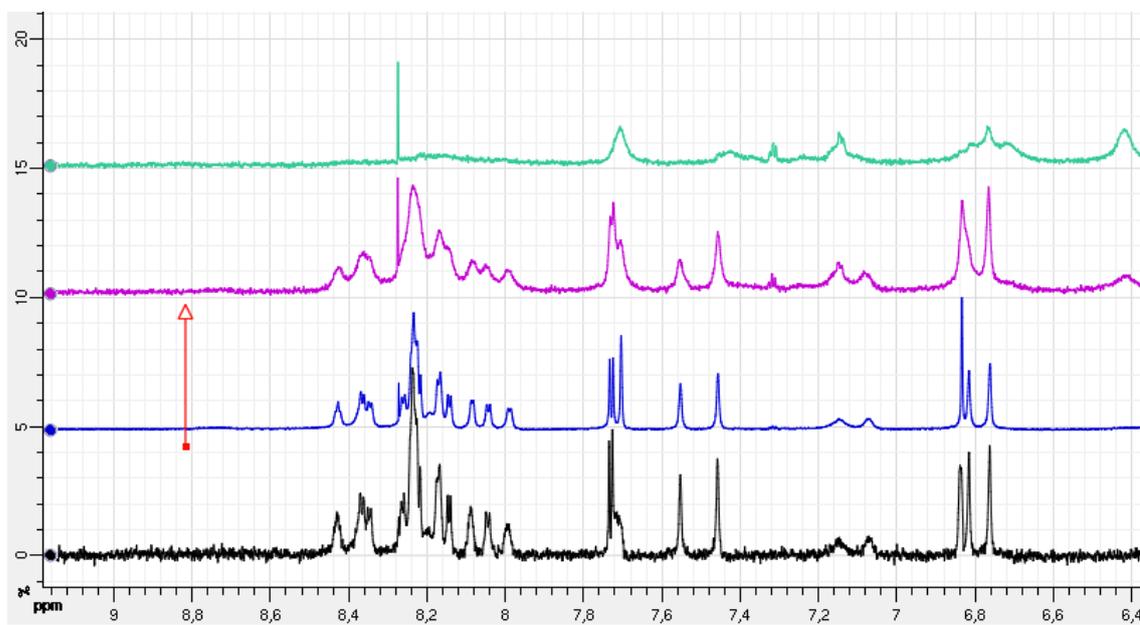


Figure 58 : Superposition des spectres RMN ^1H du peptide Bid seul (noir), de Bid en présence 0,25 équivalent (bleu), 0,5 équivalent (rose) et 1 équivalent (vert) du composé **52** à 950 MHz dans le D_2O .

Plus la quantité d'acide anacardique **52** est ajoutée dans le milieu est importante plus l'amplitude des signaux du peptide diminue jusqu'à une disparition totale à partir d'un équivalent de **52**. Ces observations indiquent que le composé interagit avec le peptide Bid. Pour valider ces résultats, un dérivé de la méiogynine A, présentant par RMN et en polarisation de fluorescence une forte affinité pour les protéines Bcl-xL et Mcl-1, a également été placé en présence du peptide Bid (*cf.* Figure 59).

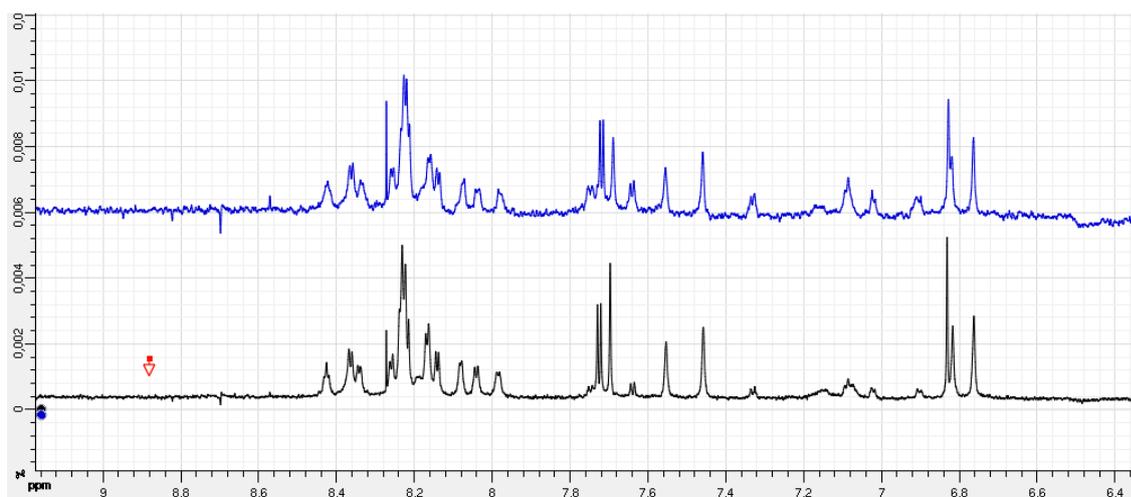


Figure 59 : Superposition des spectres RMN ^1H du peptide Bid seul (noir), de Bid en présence d'un équivalent (bleu) de l'analogue de la méiogynine A à 950 MHz dans le D_2O .

En présence d'un équivalent du composé, les signaux du peptide sont toujours observables confirmant la validité de l'expérience précédente.

Par conséquent, l'activité inhibitrice de l'interaction protéine–ligand du composé **52** est due, n'ont pas à son affinité pour les protéines Bcl-xL ou Mcl-1 mais à son affinité pour le peptide Bid.

Conclusion

En accord avec les données de la littérature et après avoir mené une étude de déréplication, l'étude phytochimique de l'extrait AcOEt des écorce et tige de *Knema hookeriana* Warb. a permis l'isolement de douze lipides phénoliques, dont trois acétophénones, deux alkylphénols et 7 acides anacardiques. L'identification de certaines de ces molécules présentant une insaturation a été précisée grâce à la réaction d'ozonolyse et à la spectrométrie de masse. Parmi les molécules isolées cinq ont été identifiées pour la première fois, les khookerianone A à C (**46**, **47** et **57**) et les acides khookerianiques B et C (**53** et **56**). Une sixième nommée acide khookerianique A (**50**) avait été synthétisée mais n'avait jamais été isolée d'un organisme vivant.

Le but de cette étude était de trouver des molécules présentant une affinité pour les protéines Bcl-xL ou Mcl-1, entraînant ainsi une inhibition de l'interaction protéine–ligand. Malgré la bonne activité observée pour cinq des composés isolés lors des essais *in vitro*, il ressort de l'étude réalisée sur le composé **52** que cette inhibition n'est pas due à l'affinité des composés pour les protéines Bcl-xL ou Mcl-1 mais plutôt d'une affinité pour le peptide partenaire. Ce résultat est sans doute généralisable à l'ensemble de la série chimique.

Ces résultats confirment que si l'évaluation biologique *in vitro* par polarisation de fluorescence est une méthode facile à mettre en œuvre, relativement peu coûteuse et qui permet de cribler de nombreux composés, la RMN est une technique indispensable pour confirmer des hits. L'ITC est également une technique qui nous aurait permis d'aboutir à la même conclusion que la RMN mais le manque d'hydrosolubilité des produits rend son utilisation impossible.

La structure amphiphile des acides anacardiques et les données de la littérature suggèrent que l'interaction du produit **52** avec le peptide n'est pas sélective.¹²⁴ Ce type de composé n'en reste pas moins intéressant puisqu'ils peuvent être utilisés pour leur capacité à agir comme un détergent. En effet, des études portent sur la compréhension du

comportement de la membrane mitochondriale lors de sa perméabilisation par l'ancrage d'oligomère de protéines pro-apoptotique Bak ou Bax. Des détergents sont utilisés pour mimer l'environnement membranaire et caractériser les changements conformationnels des complexes anti- et pro-apoptotiques.¹⁴⁰ Ces études permettent d'apporter des éléments supplémentaires pour la validation du mode d'activation (direct, indirect ou modèle unifié) des peptides BH3 multi-domaines. Les acides anacardiques pourraient être utilisés dans ce type d'étude.

¹⁴⁰ Liu, Q. and Gehring, K.; *J. Biol. Chem.* (2010); 285; 41202-41210.

Chapitre 2

Fissistigma latifolium var. *ovoideum* (King) J. Sinclair

1. Etude bibliographique

1.1. La famille des Annonaceae

Les Annonaceae sont composées de plus de 2100 espèces tropicales réparties dans 128 genres.¹⁴¹ La famille des Annonaceae, plus communément appelée *Custard Apple family* ou encore *Annona family* en anglais est représentée par des arbres, arbustes et plus rarement par des buissons sarmenteux ou lianes.¹⁴²

Près de 38 genres sont représentés en Malaisie dont 26 sont des arbres.¹⁴³ Les Annonaceae malaisiennes sont divisées en deux groupes, les plantes grimpantes et les non-grimpantes.¹⁴⁴

Les Annonaceae sont des plantes ligneuses souvent sempervirentes et aromatiques.¹⁴⁴ Les feuilles sont simples, alternes, distiques, entières, sans stipules et font entre 5 et 7,5 cm. Elles présentent des nervures saillantes sur la face inférieure. Les fleurs, souvent odorantes, sont solitaires ou en inflorescence pauciflore et peuvent être présentes sur les branches et le tronc. Les inflorescences sont axillaires ou opposées aux feuilles. Les fleurs sont hermaphrodites à l'exception des espèces du genre *Uvariopsis*. Le périanthe est constitué d'un calice de trois sépales de petite taille, libres ou partiellement unis et d'une

¹⁴¹ <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Annonaceae/> (consulté le 23/08/2014)

¹⁴² Heywood, V. H. and F., B.; *Les plantes à fleurs; 306 familles de la flore mondiale* (1996).

¹⁴³ Forest Research Institutun, K.; *Tree flora of Malaya* (1972); 61-99.

¹⁴⁴ Spichiger, R. E., et al.; *Botanique systématique des plantes à fleurs* (2004); 3ème Ed.

corolle de six pétales regroupés en deux cycles alternes. Les étamines sont très nombreuses, généralement libres et sont disposées en spirales autour des carpelles. L'organisation des carpelles induit trois types de fruits, apocarpiques, pseudosyncarpiques ou parasyncarpiques. Les graines des Annonaceae sont généralement petites et lisses avec un tégument dur et luisant.

L'importante homogénéité de la famille des Annonaceae rend sa classification interne compliquée. Les Annonaceae sont classées en deux sous-familles en fonction du degré d'évolution du gynécée.¹⁴² La sous-famille des *Monodorideae*, comprenant deux genres africains, présente des carpelles soudés en un ovaire uniloculaire avec une placentation pariétale des ovules. La sous-famille des *Annonoideae*, qui comprend 120 genres, présente des carpelles libres ou accolés dans la fleur et dans le fruit, avec des ovules insérés latéralement à la soudure carpellaire, en un ou plusieurs rangs. Des divergences dans la classification proposée par différents auteurs apparaissent au niveau de la division en tribus et en groupes inférieurs de la sous-famille des *Annonoideae*. Cette classification a été révisée par Chatrou et ses collaborateurs en 2012 grâce à des analyses phylogénétiques moléculaires.¹⁴⁵

1.1.1. Répartition géographique

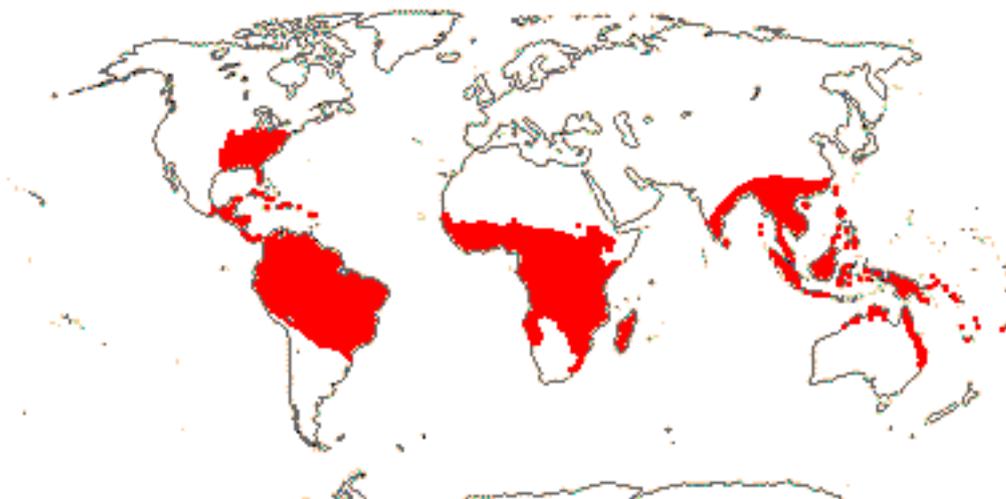


Figure 60 : Répartition mondiale des Annonaceae.¹⁴⁶

¹⁴⁵ Chatrou, L. W., et al.; *Bot. J. Linn. Soc.* (2012); 169; 5-40.

¹⁴⁶ <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/magnolialesweb.htm> (consulté le 15/08/14)

Les Annonaceae sont principalement rencontrées au niveau des zones tropicales, à l'exception de deux genres nord-américains *Asimina* et *Deeringothamnus* (cf. Figure 60).¹⁴⁷ Les plantes de cette famille sont caractérisées par un endémisme continental important.¹⁴⁷ Elles sont fréquentes dans les forêts de basse altitude.¹⁴³

1.1.2. Intérêt économique et utilisations traditionnelles

Les Annonaceae sont surtout connues pour leurs fruits comestibles tels que le chérimolier (*Annona cherimola*), le corossol (*A. muricata*) (cf. Figure 61) ou la pomme-cannelle (*A. squamosa*)...¹⁴⁸



Figure 61 : Corossol (*A. muricata*)¹⁴⁹

Il faut cependant noter que, concernant le genre *Annona*, des études épidémiologiques et toxicologiques ont démontré que la consommation des fruits de certaines espèces, comme *Annona muricata* dans les régions tropicales serait liée à l'apparition sporadique de problèmes parkinsoniens atypiques.¹⁵⁰ La pathologie serait provoquée par la présence des acétogénines telle que l'annonacine.¹⁵⁰

Les fruits épicés de l'espèce ouest-africaine *Xylopia aethiopica* servent de condiment, et ceux de *Monodora myristica* de la même région remplacent la noix de muscade.

¹⁴⁷ Thomas, A. L. and Doyle, J. A.; *Implications d'une analyse cladistique dans l'histoire géographique des Annonaceae : famille d'Angiospermes primitives* (1996).

¹⁴⁸ Bruneton, J.; *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales* (2009); 4e Ed.; 209.

¹⁴⁹ http://fr.wikipedia.org/wiki/Corossol#mediaviewer/Fichier:Soursop_fruit.jpg (consulté le 15/08/14)

¹⁵⁰ Champy, P., et al.; *Movement. Disord.* (2005); 20; 1629-1633.

Certaines huiles essentielles sont également utilisées en parfumerie ou en cosmétique comme celle extraite des fleurs fraîches du *Cananga odorata*, l'ylang-ylang (cf. Figure 62).



Figure 62 : Ylang-ylang (*C. odorata*)¹⁵¹

Quelques espèces sont également utilisées comme bois d'œuvre (*Oxandra lanceolata*) ou pour la fabrication de lances flexibles (*Xylopia*). Le bois reste de faible valeur.

1.2. Le genre *Fissistigma* et l'espèce *Fissistigma latifolium*

Le genre *Fissistigma* comprend environ 66 espèces réparties de l'Est de l'Inde au Nord-Est de l'Australie.^{152,153} Il a été longtemps confondu avec le genre *Melodorum*.

Fissistigma latifolium (Dunal) Merrill est le nom utilisé pour cette espèce qui possède, cependant de nombreux synonymes : *Annona rufa* C. Presl, *Fissistigma rufum* (C. Presl) Merr., *Melodorum latifolium* (Dunal) Hook. f. et Thomson, *Uvaria latifolia* (Dunal) Blume, *Unona latifolia* Dunal ...¹⁵⁴

1.2.1. Description botanique¹⁵⁵

Fissistigma latifolium est une espèce grimpante pouvant atteindre jusqu'à 30 mètres de hauteur avec une circonférence allant de 4 à 15 cm. Les jeunes rameaux sont pubescents et de couleur rouille puis ils deviennent glabres et brun foncé avec de nombreuses lenticelles

¹⁵¹ <http://www.cosmetiquesdumonde.fr/blog/actu/tout-savoir-sur-huile-essentielle-ylang-ylang-bio-270> (consulté le 15/08/14)

¹⁵² <http://www.theplantlist.org/browse/A/Annonaceae/Fissistigma/> (consulté le 23/08/2014)

¹⁵³ Sinclair, J.; *Gard. Bull. Singapore* (1955); 14; 149-516.

¹⁵⁴ <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2813110> (consulté le 23/08/2014)

¹⁵⁵ Irawan, B.; (2005).

noirâtres. Les feuilles sont ellipsoïdes à oblongues avec une base arrondie et un apex légèrement aiguë et font entre 15 à 24 cm de longueur. Elles sont vert foncé dessus (*cf.* Figure 63) et plus clair en-dessous (*cf.* Figure 64). L'inflorescence est une cyme en position terminale, axillaire ou opposée aux feuilles.

Cette espèce comprend deux variétés. La première, la variété *latifolium* présente des feuilles chartacées, des fruits uniques et globuleux et la bractée se trouve en position médiane tandis que la variété *ovoideum* (King) J. Sinclair possède des feuilles coriaces, des fruits uniques et ovoïdes (*cf.* Figure 65) et la bractée se trouve en position basale. *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinclair est distribuée au niveau de la péninsule Malaisienne et on la rencontre principalement en lisière de forêt, sur les bords des routes entre 100 et 200 mètres d'altitude. Cette variété est également nommée *buldo* ou *akar pisang-piang bukit* en malaisien.



Figure 63 : Jeune rameau de *F. latifolium* var. *ovoideum* vu du dessus.¹⁵⁶



Figure 64 : Jeune rameau de *F. latifolium* var. *ovoideum* vu du dessous.¹⁵⁶



Figure 65 : Fruits de *F. latifolium* var. *ovoideum*.¹⁵⁷

¹⁵⁶ <https://www.flickr.com/photos/loupok/sets/72157635645119545/> (consulté le 15/07/2014)

¹⁵⁷ base de données psn

1.2.2. Utilisations traditionnelles et activités biologiques

Le genre *Fissistigma* est utilisé en médecine traditionnelle chinoise pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde,^{158,159} des plaies, des fractures, des hémorragies, des infections, des problèmes de circulation sanguine,¹⁶⁰ des maladies inflammatoires¹⁶¹ et de la tuberculose.¹⁶²

Les espèces du genre *Fissistigma* ont fait l'objet de diverses évaluations biologiques qui sont indiquées dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Principales activités biologiques répertoriées dans le genre *Fissistigma*.

Nom botanique	Solvant d'extraction	Partie de plante	Activité biologique
<i>F. poilanei</i>	Acétate d'éthyle	–	Cytotoxique (KB, Hep-G2, MCF-7, LU) ¹⁶³ Antimicrobienne contre <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus subtilis</i> . ¹⁶³
<i>F. oldhamii</i>	Ethanol Méthanol Ethanol	Tiges Tiges Rameaux	Immunosuppressive ¹⁶⁴ Anti-inflammatoire ^{159,165} Inhibition agrégation des plaquettes ¹⁶⁶
<i>F. bracteolatum</i>	Méthanol	Tiges	Anti-inflammatoire ^{167,168}
<i>F. glaucescens</i>	–	–	Bronchodilatatrice ¹⁶⁹
<i>F. cavaleriei</i>	Méthanol/Eau	Racines	Anti-angiogénique et anti-tumorale ¹⁶² Inhibition de β -lactamase ¹⁷⁰
<i>F. lanuginosum</i>	Acétate d'éthyle	Feuilles	Antimitotique ¹⁷¹ Cytotoxique sur KB ¹⁷¹
<i>F. balansae</i>	Ethanol	Rameaux	Inhibition agrégation des plaquettes ¹⁶⁶
<i>F. latifolium</i>	Méthanol	–	Cytotoxique sur lignée du cancer du sein (MDA-MB-231) ¹⁷²

¹⁵⁸ Hu, X.-D., et al.; *Life Sci.* (2007); 81; 1677-1684.

¹⁵⁹ Hwang, T.-L., et al.; *Free Radical Bio. Med.* (2009); 46; 520-528.

¹⁶⁰ Lien, T. P., et al.; *Phytochemistry* (2000); 53; 991-995.

¹⁶¹ Hongping, Z., et al.; *J. Med.* (2010); 25; 226-234.

¹⁶² Yang, Z., et al.; *Phytomedicine* (2012); 19; 301-305.

¹⁶³ Thuy, T. T., et al.; *Nat. Prod. Res.* (2012); 26; 1296-1302.

¹⁶⁴ Zhang, Y.-N., et al.; *Bioorgan. Med. Chem.* (2007); 15; 988-996.

¹⁶⁵ Ge, Y.-W., et al.; *Phytochemistry* (2013); 86; 201-207.

¹⁶⁶ Chia, Y. C., et al.; *J. Nat. Prod.* (2000); 63; 1160-1163.

¹⁶⁷ Lan, Y.-H., et al.; *Helv. Chim. Acta* (2005); 88; 905-909.

¹⁶⁸ Wu, Y.-C., et al.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (2013); 266; 399-407.

¹⁶⁹ Lin, C.-H., et al.; *Eur. J. Pharmacol.* (1993); 237; 109-116.

¹⁷⁰ Yang, Z., et al.; *Phytomedicine* (2010); 17; 139-141.

¹⁷¹ Alias, Y., et al.; *J. Nat. Prod.* (1995); 58; 1160-1166.

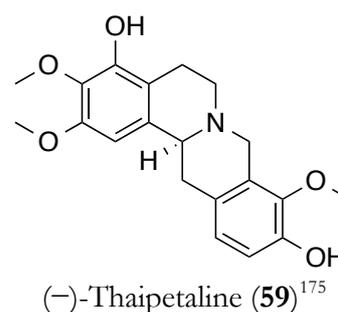
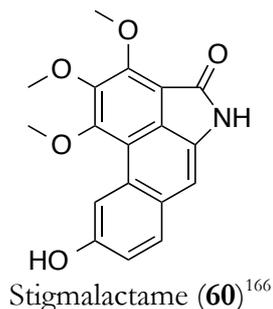
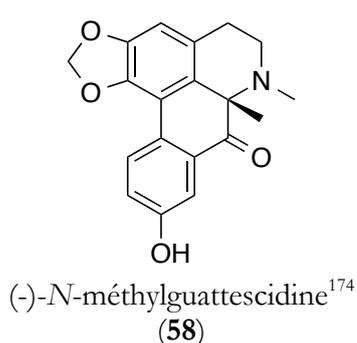
¹⁷² Lan, Y. H., et al.; *Planta Med.* (2011); 77; 2019-2022.

1.3. Composition chimique du genre *Fissistigma*

La famille des Annonaceae a été largement étudiée d'un point de vue chimique. Les principales familles chimiques rencontrées chez les Annonaceae sont des alcaloïdes, des tetrahydrofuranes, des flavonoïdes, des acétogénines, des terpènes et des phénanthrènes.^{168,173}

Le genre *Fissistigma* est une source très riche de composés bioactifs. Près d'une vingtaine d'espèces de ce genre a été investiguée chimiquement. Ces investigations ont permis de mettre en évidence différentes familles de molécules.

- Un grand nombre d'alcaloïdes aporphiniques (**58**), oxoaporphiniques, des protoberbérines (**59**), des phénanthrènes, des aristolactames (**60**)...

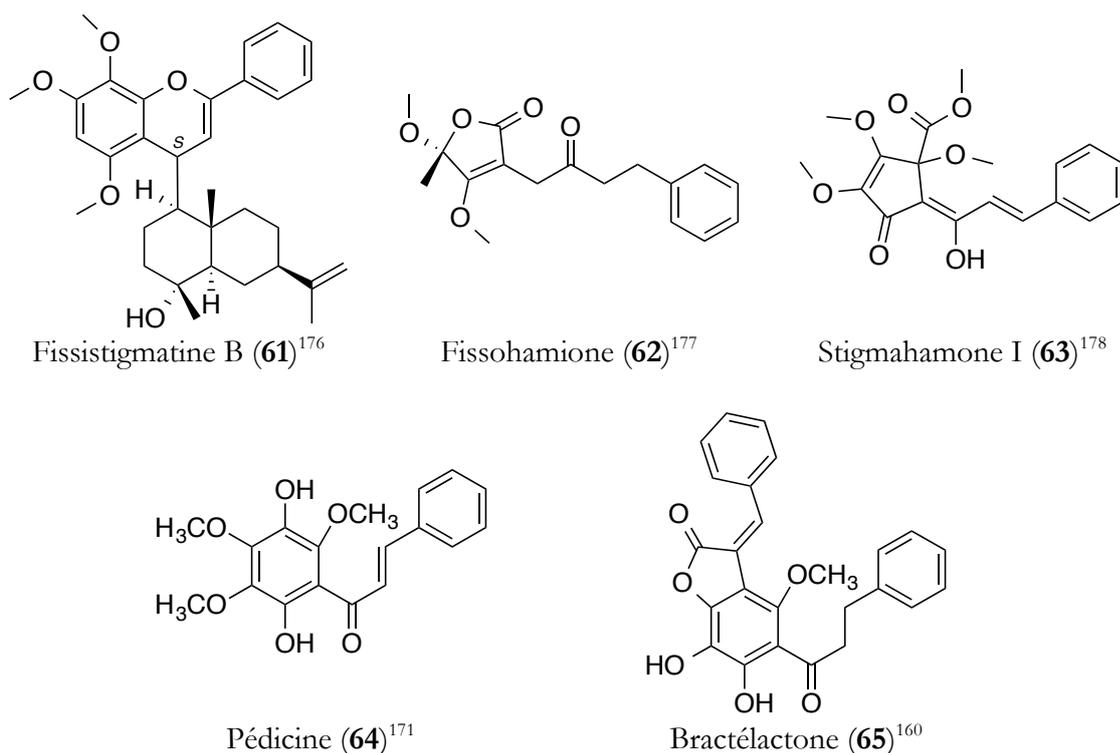


- Diverses flavonoïdes : des hybrides sesquiterpène-flavonoïdes (**61**), des furanones (**62**), des cyclopenténones (**63**), des chalconoïdes (**64**, **65**)...

¹⁷³ Leboeuf, M., *et al.*; *Phytochemistry* (**1980**); 21; 2783-2813.

¹⁷⁴ Alias, A., *et al.*; *Molecules* (**2010**); 15; 4583-4588.

¹⁷⁵ Jongbunprasert, V., *et al.*; *ScienceAsia* (**1999**); 25; 31-33.



La famille des Annonaceae et le genre *Fissistigma* sont également connus pour renfermer des adduits de Diels-Alder issus de chalcones sur lesquelles nous nous focaliserons pour la suite de cette étude.

1.4. Les chalconoïdes adduits de Diels-Alder naturels (*cf.* Annexe p. 296-297)

Une des caractéristiques structurales des chalcones est leur capacité à agir comme diénophile dans les réactions de Diels-Alder catalysées par des enzymes.¹⁷⁹ Les diènes qui participent à la formation de ces adduits de Diels-Alder sont des composés isoprène ou monoterpène (*cf.* Figure 66).

¹⁷⁶ Porzel, A., *et al.*; *Tetrahedron* (2000); 56; 865-872.

¹⁷⁷ Chia, Y.-C., *et al.*; *Tetrahedron Lett.* (1999); 40; 7513-7514.

¹⁷⁸ Chia, Y.-C., *et al.*; *Tetrahedron Lett.* (2000); 41; 2199-2201.

¹⁷⁹ Andersen, Ø. M. and Markham, K. R.; *Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications* (2006); Taylor & Francis Group, LLC; 30-31.

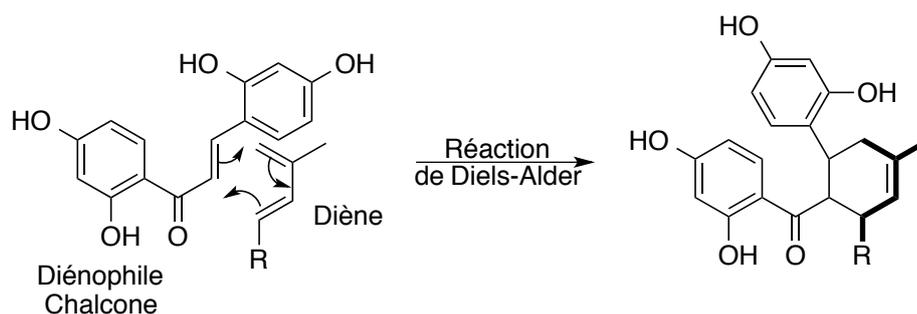
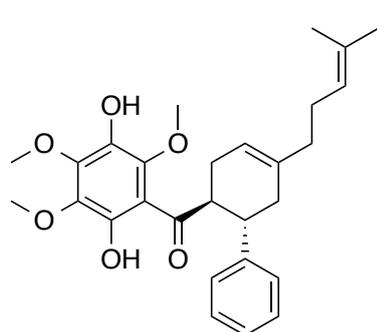
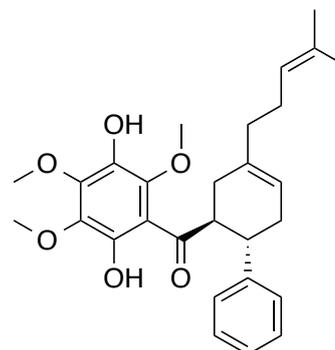


Figure 66 : Extrait de la voie de biosynthèse de la sanggenone R proposée par Hano et ses collaborateurs.¹⁸⁰

Bon nombre de ces adduits ont été isolés des Moraceae, des Zingiberaceae (*Kaempferia pandurata*,¹⁸¹ *Boesenbergia pandurata*,¹⁸² *Renalmia nicolaioides*,¹⁸³ *Boesenbergia rotunda*¹⁸⁴) et des Annonaceae, notamment dans les genres *Fissistigma*¹⁷¹ (**66** et **67**), *Cyathocalyx*¹⁸⁵ (les crinatusines) et *Uvaria*¹⁸⁶ (**68** et **69**).



Fissistine (**66**)



Isofissistine (**67**)

¹⁸⁰ Hano, Y., *et al.*; *Heterocycles* (**1995**); *40*; 953-965.

¹⁸¹ Yun, J. M., *et al.*; *Planta Med.* (**2003**); *69*; 1102-1108.

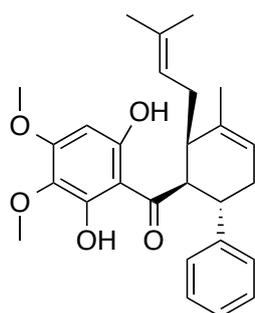
¹⁸² Tuchinda, P., *et al.*; *Phytochemistry* (**2002**); *59*; 169-173.

¹⁸³ Gu, J.-Q., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (**2002**); *65*; 1616-1620.

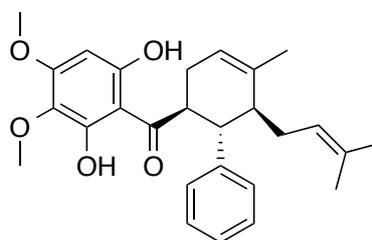
¹⁸⁴ Morikawa, T., *et al.*; *Chem. Pharm. Bull.* (**2008**); *56*; 956-962.

¹⁸⁵ Shibata, K., *et al.*; *Tetrahedron* (**2000**); *56*; 8821-8824.

¹⁸⁶ Nkunya, M. H. H., *et al.*; *Phytochemistry* (**1990**); *29*; 1261-1264.

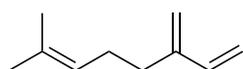


Schefflerine (68)

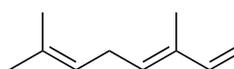


Isoschefflerine (69)

Parmi les molécules isolées des Zingiberaceae et Annonaceae, elles peuvent être classées en deux groupes distincts en fonction du diène d'origine, le myrcène (70) ou le β -ocimène (71).



Myrcène (70)

 β -ocimène (71)

Pour les molécules du type fissionine ou isofissionine, le diène serait le myrcène tandis que pour les molécules du type schefflerine et isoschefflerine, le diène serait le β -ocimène.¹⁷⁹ Ces composés sont généralement obtenus par paire de régioisomères et en mélange racémique.

En cancérologie, l'intérêt de ce type de composé a été mis en évidence par plusieurs études. En effet, certaines de ces molécules, comme la panduratine A, induisent la phase II de la quinone réductase qui intervient dans le mécanisme de protection contre l'initiation des tumeurs.¹⁸³ D'autre part, elles sont cytotoxiques sur cellules KB¹⁷¹ (carcinome oral humain), HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), et inhibent la cytotoxicité induite par le TNF- α sur les lignées L929.¹⁸⁴ De plus, elles induisent la mort cellulaire chez HT-29 par apoptose.¹⁸¹

La découverte du potentiel biologique de ces molécules a incité de nombreux auteurs à élaborer des voies de synthèse, en utilisant notamment des réactions de Diels-Alder.^{187,188,189,190,191,192,193}

¹⁸⁷ Chee, C. F., *et al.*; *Tetrahedron Lett.* (2010); 51; 495-498.

Fissistigma latifolium a déjà fait l'objet de plusieurs études chimiques, lesquelles n'ont cependant concerné que les extraits méthanoliques.^{172,174,194}

2. Travaux personnels

2.1. Etude phytochimique de *Fissistigma latifolium*

Rappelons que l'étude de cette plante a été entreprise suite aux fortes activités inhibitrices des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1, respectivement de 44 et 65 % à 10 µg/ml, trouvées pour l'extrait acétate d'éthyle des écorces.

2.1.1. Récolte

Les écorces de *F. latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinc. ont été collectées à Dungun, province de Terengganu, (Malaisie) en Octobre 1995 (*cf.* Figure 67). Cette plante a été identifiée par un botaniste de l'Université de Malaisie, T. Leong Eng, suivant les caractéristiques botaniques de l'espèce décrite précédemment. Un échantillon de référence (KL-4426) a été déposé à l'herbier du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Malaya à Kuala Lumpur en Malaisie.

¹⁸⁸ Corbett, J. L. and Weavers, R. T.; *Synthetic. Commun.* (2008); 38; 489-498.

¹⁸⁹ Pasfield, L. A., *et al.*; *Asian J. Org. Chem.* (2013); 2; 60-63.

¹⁹⁰ Cong, H., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (2008); 130; 9214-9215.

¹⁹¹ Cong, H., *et al.*; *J. Am. Chem. Soc.* (2010); 132; 7514-7518.

¹⁹² Bañuelos, P., *et al.*; *J. Org. Chem.* (2010); 75; 1458-1473.

¹⁹³ E.M., J. and Y.R., L.; *Bull. Korean Chem. Soc.* (2008); 29; 6.

¹⁹⁴ Lan, Y.-H., *et al.*; *Chem. Pharm. Bull.* (2012); 60; 280-282.



Figure 67 : Carte de la Malaisie, localisation du lieu de récolte à Dungun, province de Terengganu.

2.1.2. Travaux préliminaires (cf. Figure 68)

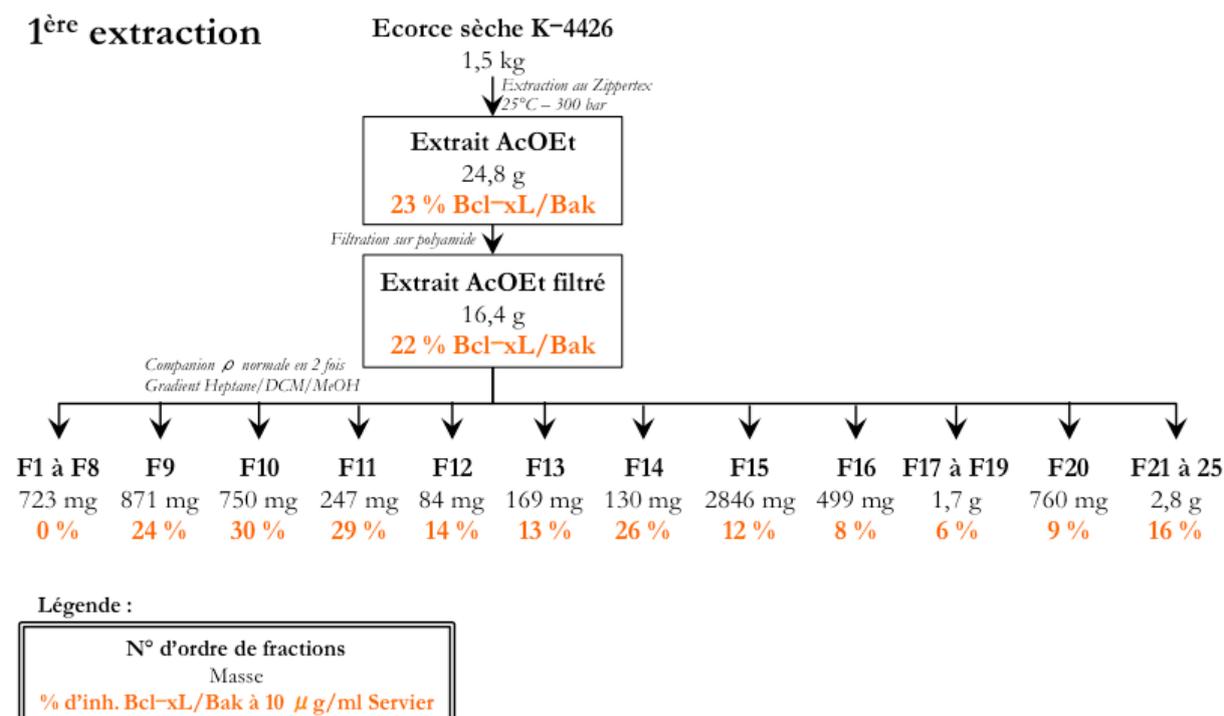


Figure 68 : Schéma de fractionnement préliminaire réalisé à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak Servier.

L'évaluation biologique de l'extrait AcOEt d'écorces de *Fissistigma latifolium* sur l'interaction Bcl-xL/Bak avait déjà été réalisée par l'Institut de Recherche Servier mettant

en évidence une activité significative de l'extrait. En 2007, Aurélie Leverrier, étudiante en thèse, avait commencé l'extraction et le fractionnement de cette plante mais elle n'avait pas poursuivi son étude phytochimique. Un kilogramme et demi d'écorces de *Fissistigma latifolium* (récolte KL-4426) ont été extraits par l'AcOEt puis par le MeOH, conduisant à 25 g ($\rho = 1,6 \%$ p/p) et 47 g ($\rho = 3,2 \%$) d'extraits, respectivement. Une filtration sur polyamide a ensuite été réalisée sur l'extrait AcOEt entraînant une perte de 34 % de l'extrait. Afin d'avoir un aperçu de la richesse de l'extrait brut filtré, une CLHP en phase inverse sans acide a été effectuée (cf. Figure 69). Contrairement aux chromatogrammes obtenus pour l'extrait brut de *Knema bookeriana*, les chromatogrammes de *Fissistigma latifolium* ne montrent pas la présence de composés majoritaires mais plutôt un grand nombre de composés de polarité variable. Par la suite, un premier fractionnement par chromatographie flash a été effectué en deux fois permettant d'obtenir 25 fractions. L'évaluation biologique sur l'interaction Bcl-xL/Bak avait été réalisée au sein de l'Institut de Recherche Servier et d'intéressantes activités avaient pu être décelées notamment pour les fractions **F9** à **F11** et **F14**.

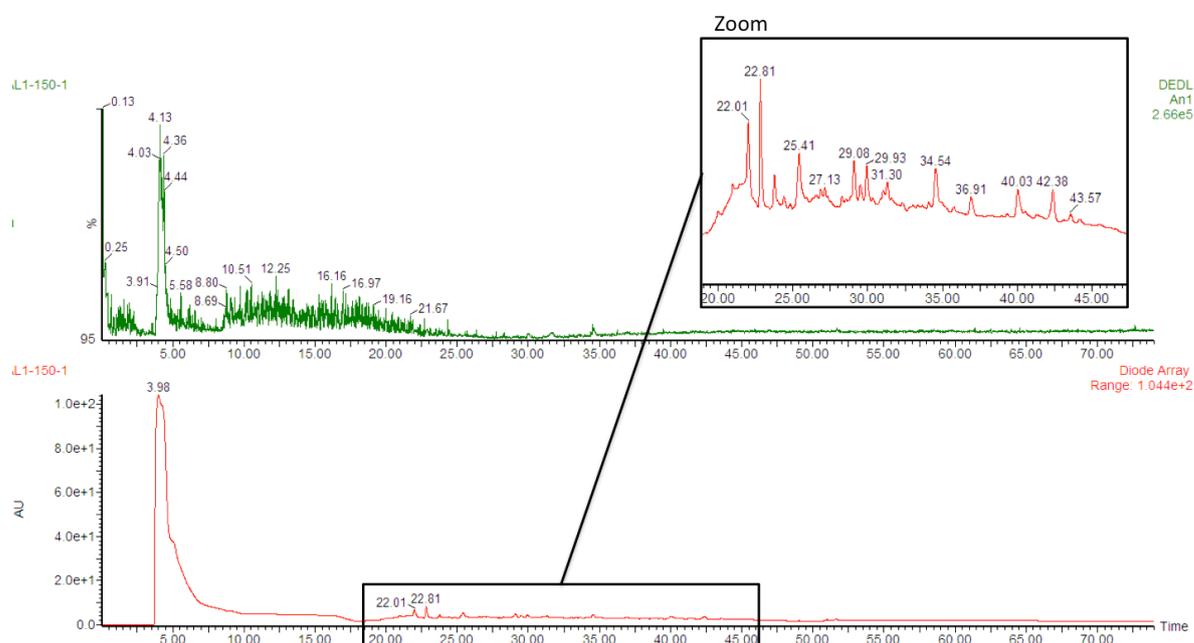


Figure 69 : Chromatogrammes UV (en bas) et DEDL (en haut) obtenus par CLHP sans acide en phase inverse de l'extrait brut.

2.1.3. Extraction et purification

Dans un premier temps, ce sont les fractions obtenues lors des travaux préliminaires qui ont été étudiées (*cf.* Figure 70 et Tableau 23). L'évaluation biologique de ces fractions a été re-testée à l'ICSN, en utilisant nos essais sur Bcl-xL et Mcl-1. L'évaluation biologique de ces fractions a permis de mettre en évidence plusieurs fractions actives sur les deux cibles **F9**, **F10**, **F14**, **F15** et de **F17** à **F19**.

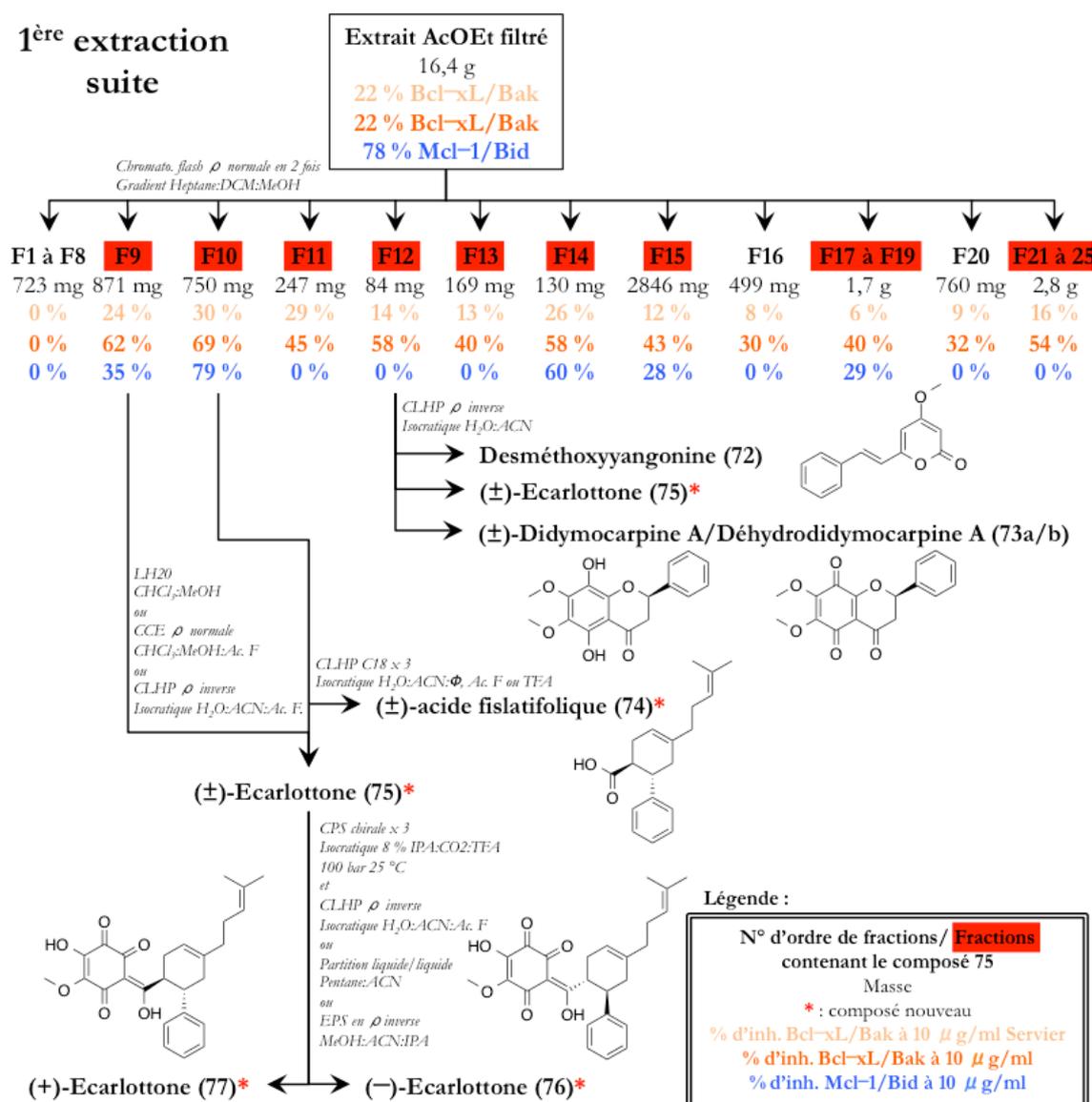
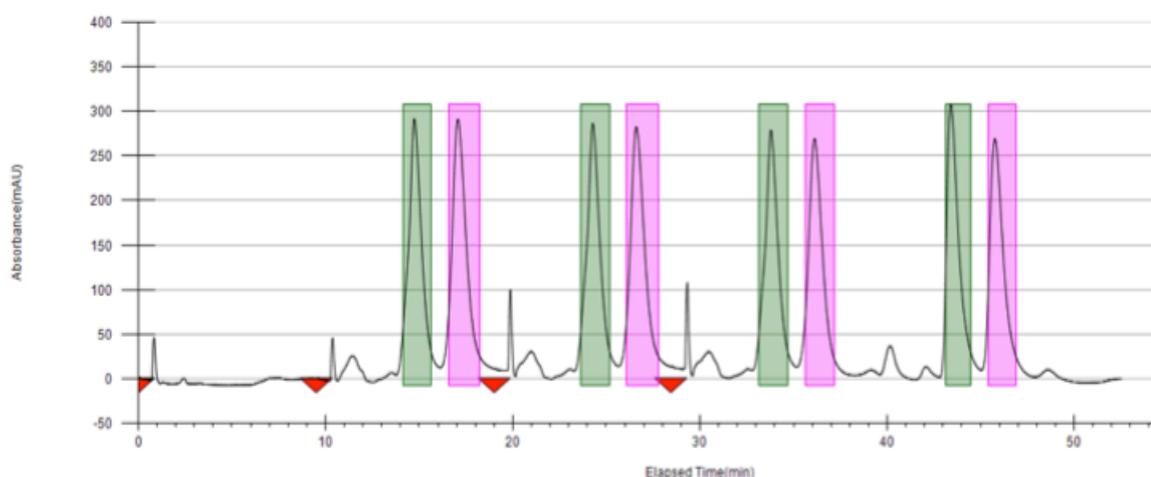


Figure 70 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.

Tableau 23 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de plante sèche *F. latifolium*.

N° composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (%)
72	Desméthoxyyangonine	1,5	$1,5 \cdot 10^{-4}$
73a/b	(±) Didymocarpine A/ Déhydrodidymocarpine A	1	$1,0 \cdot 10^{-4}$
74	(±) Acide flatifolique*	15	$1,5 \cdot 10^{-3}$
75	(±)-Ecarlottone*	230	$1,5 \cdot 10^{-2}$
76	(-)-Ecarlottone*	2	$2,0 \cdot 10^{-4}$
77	(+)-Ecarlottone*	3	$3,0 \cdot 10^{-4}$

Le fractionnement bio-guidé de deux des fractions les plus actives **F9** et **F10** a conduit à l'isolement de deux composés nouveaux **74** (15 mg) et **75** (230 mg), sous forme de mélanges racémiques et présentant une partie de leur squelette carboné en commun. Une troisième fraction **F12** a également été purifiée permettant l'isolement de deux composés connus, **72** et **73a/b** et du composé **75**. L'évaluation biologique des composés isolés a permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice du composé **75** ($17 \mu\text{M}$ Bcl-xL et $3 \mu\text{M}$ Mcl-1). Le composé **75** étant présent sous forme de mélange racémique, la séparation des énantiomères a donc été envisagée. Près de 35 conditions ont été testées par CLHP, avec ou non l'utilisation de phase supercritique (CPS). Au final, 30 mg du mélange racémique **75** ont été purifiés par CPS sur une colonne analytique chirale en cumulant les injections toutes les 10 minutes, réduisant ainsi la durée totale de l'ensemble des *run* (cf. Figure 71).

Figure 71 : Chromatogramme UV (300 nm) de la séparation chirale obtenue par CPS en mode *stacking* du mélange racémique 75 – triangles rouge correspondent aux injections.

Malheureusement, malgré l'emploi de solvants ultra purs, la répétition d'un grand nombre d'injections a généré la contamination des énantiomères correctement séparés par des phtalates. Cette contamination proviendrait des tubulures du système CPS, Il a donc été nécessaire de repurifier par une ultime chromatographie chacun des produits. Finalement, 2 et 3 mg ont été obtenus pour les énantiomère (-)-(76) et (+)-(77), respectivement.

Ce composé **75** a été détecté, en quantité plus ou moins importante, grâce à une analyse CLUP-SM dans quasiment toutes les fractions présentant une activité inhibitrice sur Bcl-xL et Mcl-1. Les quinones sont des espèces très réactives pouvant être le résultat de réactions d'oxydation. La présence de quinones comme le composé **75** associée aux faibles rendements et aux difficultés rencontrées lors de la purification des composés, nous ont conduit à émettre une hypothèse sur l'éventuelle oxydation des composés lors du stockage. Les fractions issues du fractionnement préliminaire ont été stockées pendant six ans et conservées à sec à -4°C .

Nous avons donc décidé de réaliser une nouvelle extraction à partir du même lot de matière première (KL-4426) menant, respectivement, à 22 g ($\rho = 2,3\% \text{ p/p}$) et 34 g ($\rho = 3,7\% \text{ p/p}$) d'extraits AcOEt et MeOH à partir de 917 g d'écorces sèches (cf. Figure 72 et Tableau 24). La filtration sur polyamide a entraîné une perte de près des deux tiers de l'extrait de départ. Au cours de l'extraction précédente, la perte n'était que d'un tiers. Cette différence s'explique par la différence de protocole employé entre la première et la seconde extraction. Néanmoins, les activités de 22 % sur Bcl-xL et 78 % sur Mcl-1, identiques à la première extraction, ont été conservées.

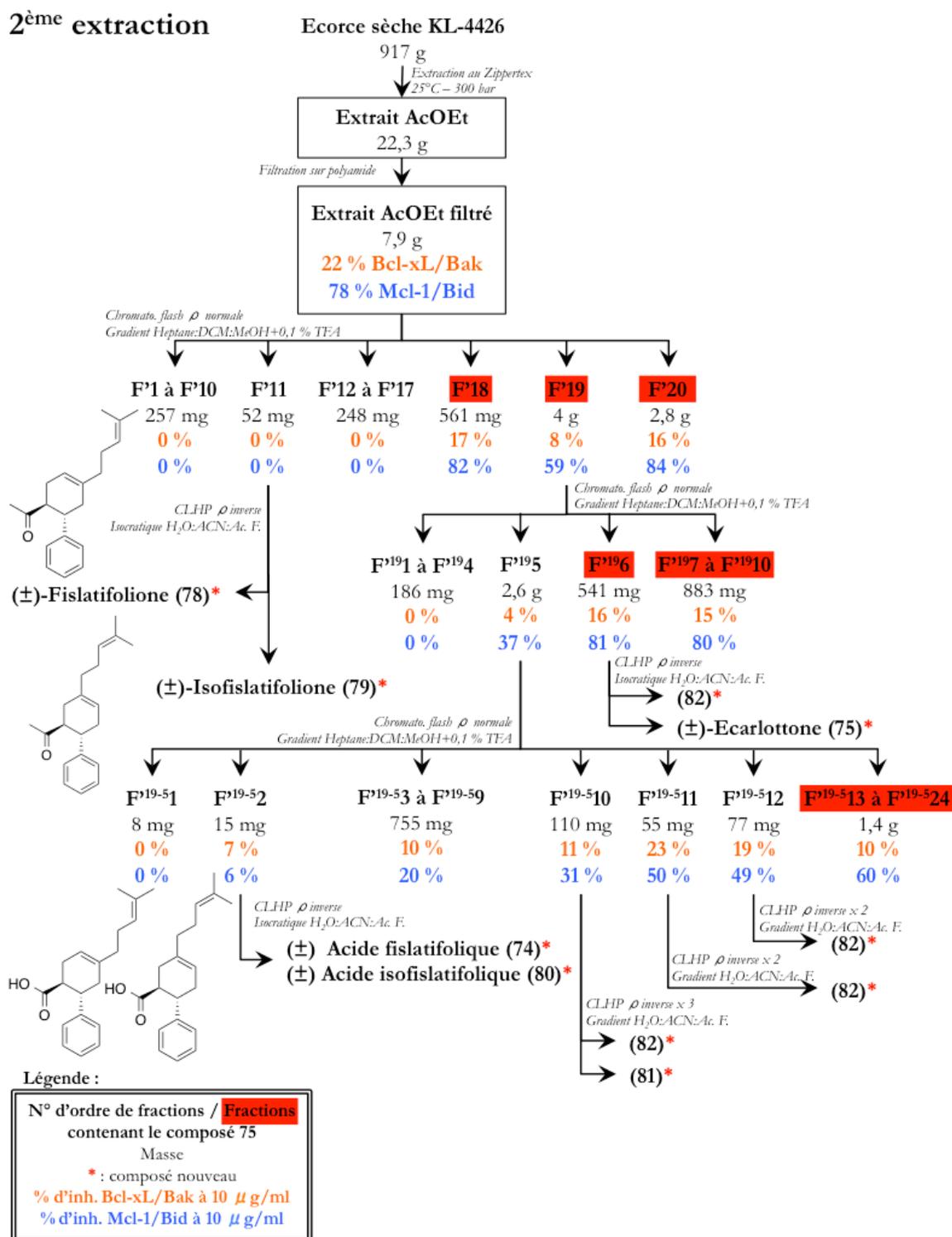


Figure 72 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.

Tableau 24 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de la plante sèche *F. latifolium*.

N° composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (%)
75	(±)-Ecarlottone*	70	$7,6 \cdot 10^{-3}$
78	(±)-Fislatifolione*	5	$5,5 \cdot 10^{-4}$
79	(±)-Isofislatifolione*	2	$2,2 \cdot 10^{-4}$
82	—*	0,5	$5,5 \cdot 10^{-5}$
74	(±) Acide fislatifolique*	2	$2,2 \cdot 10^{-4}$
80	(±)-Isofislatifolique*	2	$2,2 \cdot 10^{-4}$
81	—*	8	$8,7 \cdot 10^{-4}$

Une chromatographie flash été effectuée sur les 7,9 g d'extrait AcOEt filtré permettant d'obtenir 20 fractions nommée **F'** pour cette deuxième extraction (cf. Figure 73).

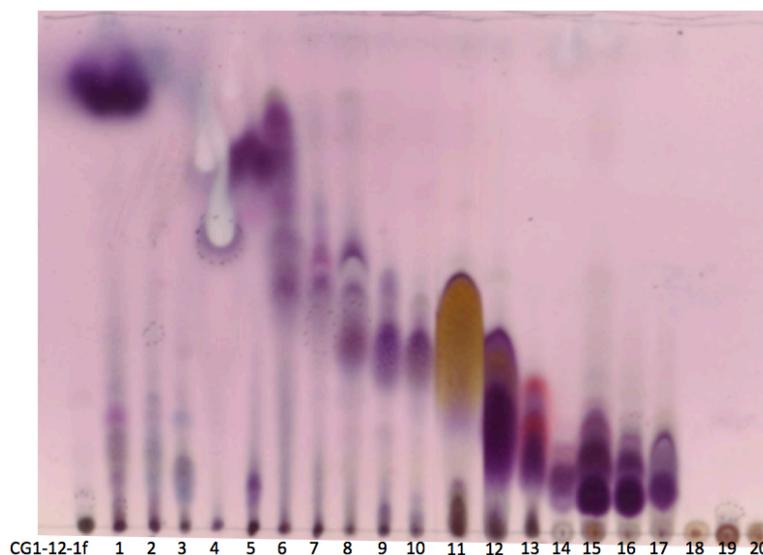


Figure 73 : Photographie de la CCM récapitulative du rassemblement des fractions (plaque de silice, CH_2Cl_2 : Heptane 50/50, révélation à la vanilline sulfurique)

La masse des fractions **F'1** à **F'17** ne représente que 557 mg sur 7,9 g. Il a été nécessaire d'employer 1% d'acide formique (**F'18**) puis 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA) (**F'19** et **F'20**) pour récupérer une grande partie de l'extrait (7,3 g). L'évaluation biologique effectuée sur les deux protéines anti-apoptotiques révèle la forte activité des 3 dernières fractions, obtenues après addition d'acides formique et trifluoroacétique (**F'18** à **F'20**). Comme pour le premier extrait, le criblage des fractions par CLUP-SM a permis de mettre en évidence le composé **75** dans ces dernières fractions. La relation entre l'activité

biologique et la présence du produit **75** dans les fractions les plus polaires conforte l'hypothèse que ce dernier est sans doute le principal responsable de l'activité détectée dans l'extrait AcOEt. Avec l'objectif de trouver d'autres molécules présentant un squelette similaire pour étayer les relations structure-activité, nous avons poursuivi les purifications des autres fractions présentant des profils de RMN ^1H , proches de celui du composé **75** (cf. Figure 74).

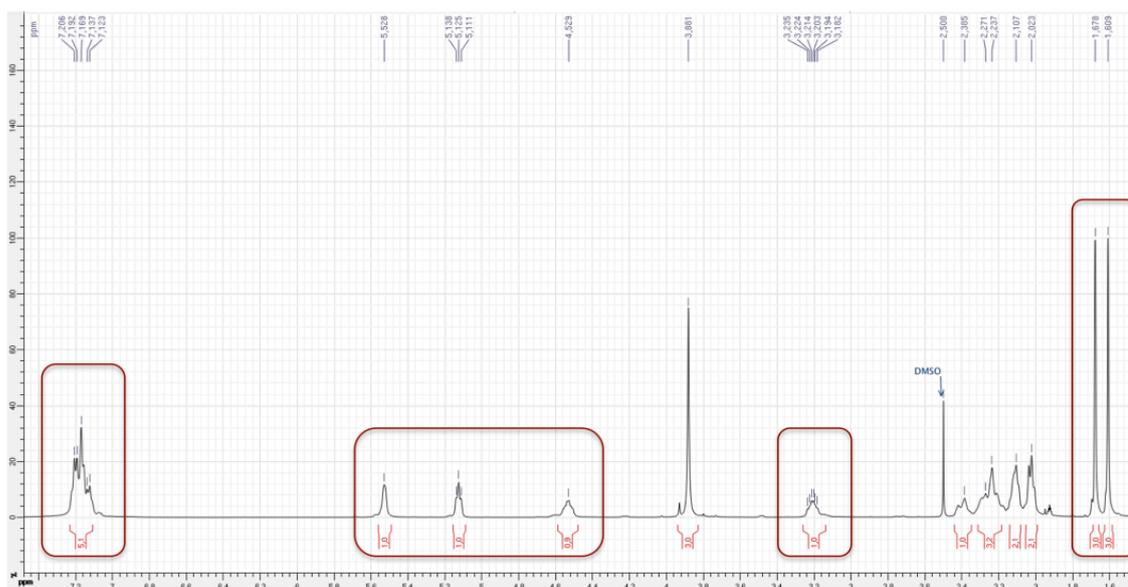


Figure 74 : Spectre RMN ^1H du composé **75** à 500 MHz dans l'acétonitrile deutéré.

Le spectre RMN ^1H des molécules recherchées doit présenter principalement deux méthyles, quatre méthines dont deux oléfines et des signaux de protons aromatiques.

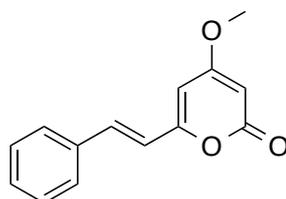
Faisant suite à ce "RMN-guidage", la purification de **F'11** par CLHP en phase inverse, a conduit à deux nouveaux régioisomères, **78** et **79**, isolés chacun en mélange racémique. La RMN ^1H de la fraction **F'19** montre des signaux caractéristiques de composés de la même famille que **75**, molécule présente en grande quantité dans la fraction. Une première chromatographie flash en phase normale de cette dernière a permis de séparer une partie du **75** et de mettre en évidence le composé **82**. Une seconde chromatographie flash en phase normale sur la sous-fraction **F'195** a été nécessaire pour isoler d'autres composés ayant les motifs RMN requis. Les fractions **F'192**, **F'1910** à **F'1912** ont ensuite été purifiées par CLHP en phase inverse pour fournir le mélange des

régioisomères, **80** et **74** (F¹⁹2), et le composé **81** en mélange avec d'autres composés (F¹⁹10) et le composé **82** (F¹⁹10 à F¹⁹12).

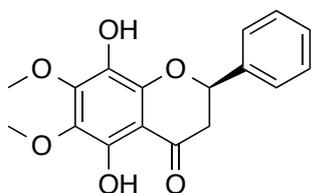
Plusieurs conditions ont été essayées pour séparer les mélanges de régioisomères. Les meilleures conditions ont été obtenues avec la CPS mais la contamination par des phtalates lors des purifications précédentes nous a incité à utiliser une colonne PFP (pentafluorophénylpropyl) en CLHP classique qui a donné également de bons résultats. Cependant, la dégradation des composés **74** et **80**, du mélange contenant **81** et du composé **82** au cours des analyses spectroscopiques n'a pas permis leur séparation ou leur identification complète.

De nombreuses purifications ont été nécessaires à l'obtention des différents composés (voir Partie expérimentale p. 219), en raison de la dégradation des produits et de la prépondérance du composé **75**.

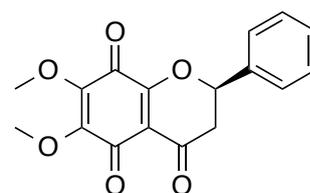
Composés isolés des écorces de *Fissistigma latifolium* (King) J. Sinclair.



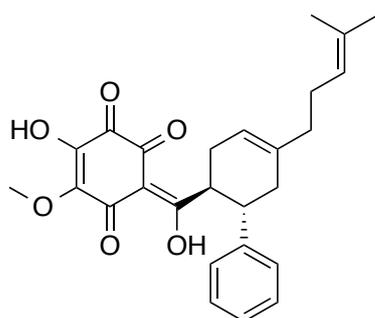
Desméthoxyyangonine (72)



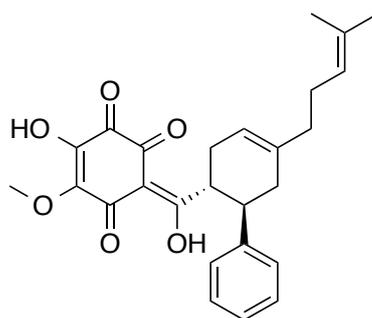
(±)-didymocarpine A (73a)



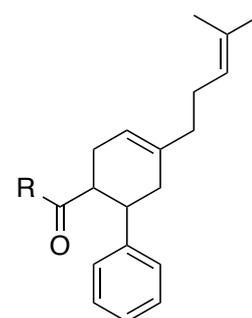
(±)-déhydrodidymocarpine A (73b)



(-)-écarlottone (76)*

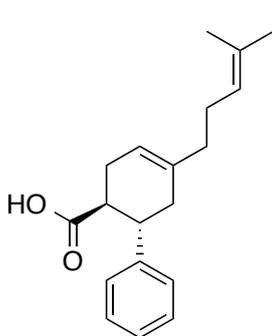


(+)-écarlottone (77)*

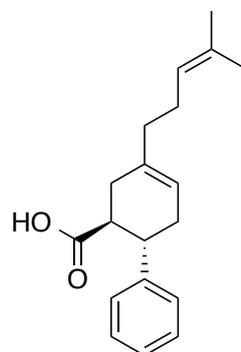


(±)-écarlottone (75)*

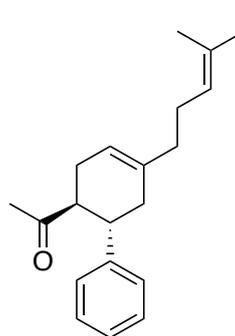
R₁ (81)*
R₂ (82)*



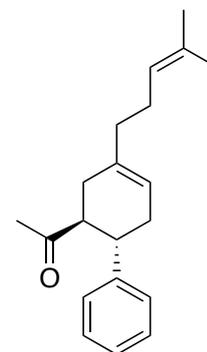
(±)-acide fislatifolique (74)*



(±)-acide isofislatifolique (80)*



(±)-fislatifolone (78)*



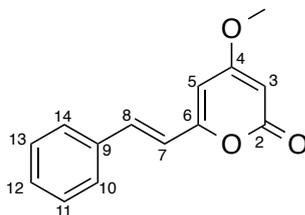
(±)-isofislatifolone (79)*

2.1.4. Caractérisation des composés isolés

Les composés isolés de *Fissistigma latifolium* ont été identifiés par l'analyse des données spectrométriques (IR, UV, SM et dichroïsme circulaire), RMN et par comparaison avec les données de la littérature.

Dans un premier temps, l'analyse structurale des composés **72** et **73a/b** est réalisée succinctement étant donné que ces composés sont déjà connus dans la littérature. Par contre, l'élucidation structurale des énantiomères **76** et **77** est décrite plus en détail. L'analyse des autres composés, présentant une partie de leur squelette carboné en commun, mettra l'accent sur les différences observées par comparaison avec les deux premiers composés. Pour finir, des hypothèses structurales sont émises concernant les composés **81** et **82**. Les molécules isolées sont présentées p. 161, 242 et 299. Les spectres RMN 1D et 2D des composés nouveaux (**74**, **75**, **78**, **79**, **80**, **81** et **82**) sont placés en Annexe à partir de la p. 300.

Composé 72



Desméthoxyyangonine (**72**)

Un pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 229,0865 correspondant à la formule brute $C_{14}H_{12}O_3$ (masse calculée 229,0859) avec 9 degrés d'insaturation est obtenu par l'analyse du spectre de masse (ES)⁺.

L'analyse conjointe des spectres RMN 1H , ^{13}C et HSQC (éditée), a permis d'obtenir les déplacements et attributions de chacun des carbones et protons constituant cette molécule (cf. Tableau 25).

Tableau 25 : Données RMN du composé 72 (MeOD, 600 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (nombre de H, multiplicité, J en Hz)
2	166,8	—
3	89,6	5,62 (1H, d, 2 Hz)
4	173,8	—
5	102,9	6,24 (1H, d, 2 Hz)
6	160,5	—
7	120,2	6,86 (1H, d, 16 Hz)
8	136,8	7,43 (1H, d, 16 Hz)
9	136,9	—
10/14	128,8	7,59 (2H, m)
11/13	130,1	7,39 (2H, m)
12	130,7	7,34 (1H, m)
4-OMe	57,2	3,88 (3H, s)

Les corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC ainsi que les constantes de couplages entre les protons éthyléniques ont permis de proposer la structure du composé **72**. Les corrélations sont présentées sur la Figure 75.

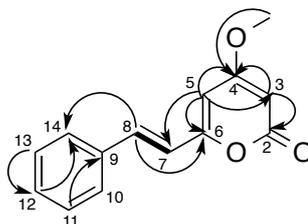


Figure 75 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 72.

Les corrélations COSY mettent en évidence le système de spins permettant de constituer une double liaison. La configuration *trans* de cette double liaison a été défini par la constante de couplage de 16 Hz entre les protons constituant cette insaturation. Les corrélations HMBC entre le proton H-8 et les carbones C-10 et C-14 et C-6 ont permis de placer le cycle aromatique et l'hétérocycle près de la double liaison portée par les carbones C-7 et C-8. Le spectre HMBC a également permis de placer le groupe méthoxyle sur le carbone quaternaire C-4 très déblindé à 173,8 ppm suggérant la présence d'une insaturation sur ce carbone. Les corrélations entre H-5 avec C-3, C-4, C-6 et C-7, nous ont orienté sur la position centrale de C-5. La corrélation, de faible intensité, de H-3 avec C-2 a entraîné le positionnement de C-3 près du carbonyle C-2.

La présence d'une pyran-2-one a été déduite par la formule brute et le degré d'insaturation de la molécule. De plus, la structure de cet hétérocycle lactone insaturé est confirmée par les valeurs des déplacements chimiques des carbones et protons par rapport aux tables de RMN et par la constante de couplage de 2 Hz entre H-3 et H-5 suggérant leur position relative en *meta* l'un par rapport à l'autre dans ce type de système.

En comparant l'ensemble de ces données avec celles de la littérature, deux structures possédant les mêmes déplacements chimiques ont déjà été répertoriées. La première, identique à la nôtre, isolée de plusieurs Zingiberaceae^{184,195} et Piperaceae^{196,197} et la seconde (**83**), isolée de *Renealmia nicolaioides* (Piperaceae), présentée Figure 76.¹⁸³

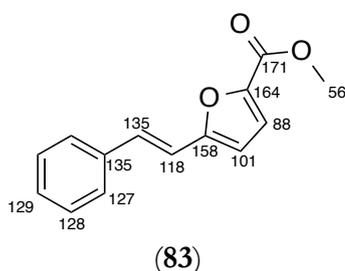


Figure 76 : Structure proposée par Gu et ses collaborateurs et déplacements chimiques des carbones en ppm.¹⁸³

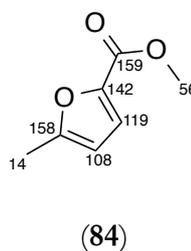


Figure 77 : Structure synthétisée par Khusnutdinov et ses collaborateurs et déplacements chimiques des carbones en ppm.¹⁹⁸

Dans la publication de Gu,¹⁸³ très peu de données sont expliquées sur les corrélations COSY et HMBC permettant de positionner les carbones. De plus, la présence du cycle furanique est uniquement déduite de la formule brute et du nombre d'insaturations. Si l'on compare les déplacements chimiques des carbones de cette molécule, simulés par le logiciel ACD/Labs ou d'une molécule proche synthétisée (**84**) présentant le même furane substitué par un ester méthylique, il s'avère que les déplacements ne concordent pas (*cf.* Figure 77). Par conséquent, il est probable que la structure proposée par Gu soit erronée.

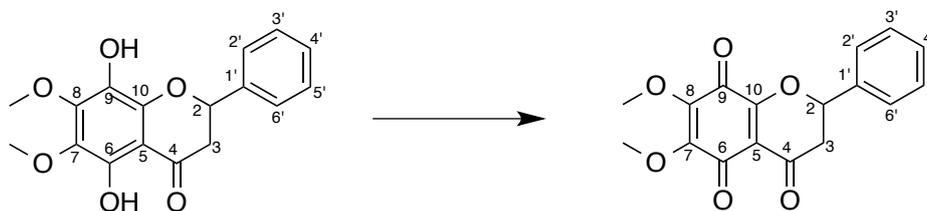
¹⁹⁵ Itokawa, H., *et al.*; *Phytochemistry* (1981); 20; 2503-2506.

¹⁹⁶ Ranjith W. Dharmaratne, H., *et al.*; *Phytochemistry* (2002); 59; 429-433.

¹⁹⁷ Hirata, N., *et al.*; *Biol. Pharm. Bull.* (2007); 30; 2402-2405.

¹⁹⁸ Khusnutdinov, R. I., *et al.*; *Russ. Chem. Bull.* (2013); 62; 93-97.

Composés 73a/b

Didymocarpine A (**73a**)Déhydrodidymocarpine A (**73b**)

Le spectre de masse (ES)⁺, réalisé avant les analyses RMN révèle un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 317,1025 correspondant à la formule brute C₁₇H₁₆O₆ (masse calculée 317,1020) avec 10 insaturations. Ce produit s'est oxydé au cours des analyses de RMN. En effet, un ion pseudomoléculaire [M+H]⁺ à m/z 315,0871 correspondant à C₁₇H₁₄O₆ (masse calculée 315,0863) a été observé sur le spectre de masse de ce produit à l'issue des analyses spectroscopiques. On peut en déduire 11 degrés d'insaturation, avec perte de deux hydrogènes.

Entre le premier spectre de RMN ¹H et le second réalisé deux jours plus tard, on dénote un certain nombre de changements (*cf.* Figure 78) caractérisés par le léger déplacement vers les bas champs de H-2 et du groupe méthoxyle, et vers les hauts champs des signaux alkyles.

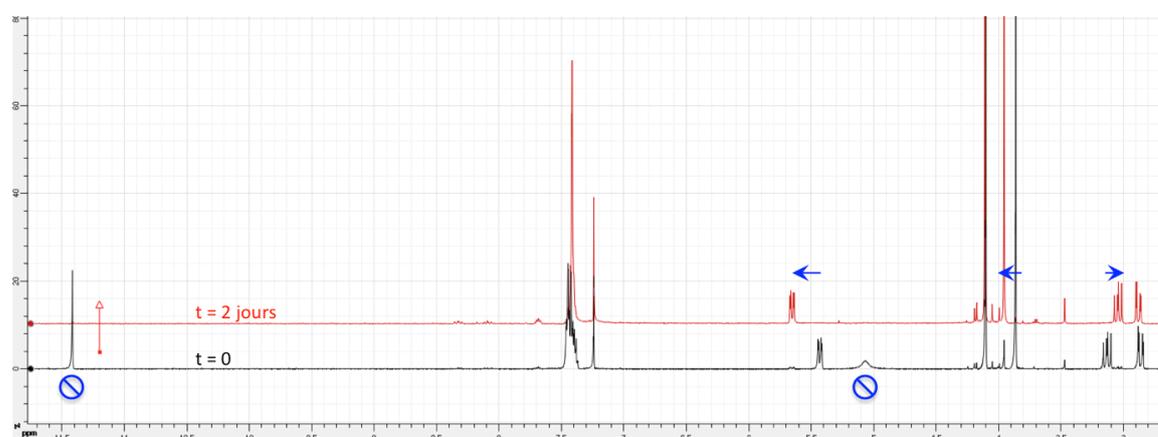


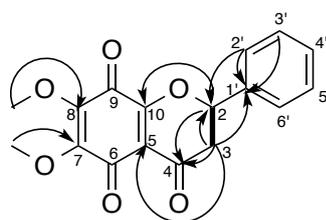
Figure 78 : Spectre RMN ¹H du composé 73 à 500 MHz dans le CDCl₃ à t = 0 et t = 2 jours, (⊘) correspond à la disparition des signaux et (→) au changement de déplacement chimique.

La suite des analyses RMN a été réalisée sur le composé oxydé (**73b**). L'analyse conjointe des spectres RMN ^1H , ^{13}C et HSQC (éditée), a permis d'obtenir les déplacements et attributions de chacun des carbones et protons (cf. Tableau 26).

Tableau 26 : Données RMN du composé **73b** (CDCl_3 , 500 MHz)

C	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (nombre de H, multiplicité, J en Hz)
2	82,5	5,65 (1H, dd, 13,0 ; 3,9 Hz)
3a	43,4	2,88 (1H, dd, 16,5 ; 3,9 Hz)
3b		3,04 (1H, dd, 16,5 ; 13,0 Hz)
4	187,7	—
5	110,7	—
6	178,8	—
7	146,2	—
8	144,0	—
9	178,1	—
10	162,3	—
7-OMe	61,9	4,10 (3H, s)
8-OMe	61,6	3,95 (3H, s)
1'	135,8	—
2'/3'/4'/5'/6'	126,6	7,40–7,44 (5H, m)

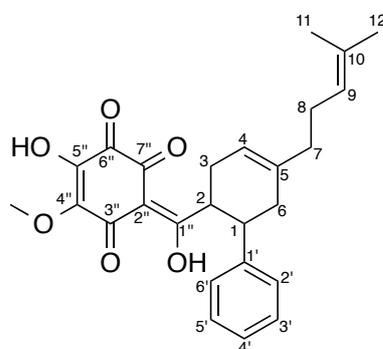
Les corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC et la formule brute ont permis de proposer la structure du composé **73b**. Les corrélations sont présentées sur la Figure 79.

Figure 79 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé **73b**.

La configuration relative des protons H-2 et H-3 a été obtenue grâce à la constante de couplage de 13,0 Hz entre H-2 et H-3b indiquant qu'ils sont positionnés en *trans* alors que la constante de 3,9 Hz entre H-2 et H-3a indique qu'ils sont en *cis*. La valeur du pouvoir rotatoire étant de 0, ce composé a donc été isolé sous forme d'un mélange racémique.

Les caractéristiques (formule brute, masse, RMN ^1H) de la molécule **73a** correspondent la didymocarpine A isolée de *Didymocarpus pedicellata*¹⁹⁹ (Gesneriaceae) et également de plusieurs espèces de *Fissistigma*.^{171,175} Les données spectrales de **73b** correspondent à la forme oxydée de la didymocarpine A, nommée déhydrodidymocarpine A, qui a été synthétisée à plusieurs reprises mais dont aucune donnée de RMN du proton n'a été rapportée jusqu'à présent.²⁰⁰ La didymocarpine A (**73a**) s'est probablement oxydée au cours des analyses, pour conduire à la déhydrodidymocarpine A (**73b**).

Composé 75



(±)-Ecarlottone (**75**)

Un pic pseudo-moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 437,1962 correspondant à la formule brute $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_6$ (masse calculée 437,1959) avec 13 degrés d'insaturation est obtenu par l'analyse du spectre de masse (ES)⁺. Le spectre IR révèle une bande large à 3033 cm^{-1} indiquant la présence d'hydroxyle, des bandes entre 2850 et 2920 cm^{-1} correspondant à des CH et plusieurs bandes à 1622 , 1596 et 1538 suggérant la présence de carbonyles simples avec des équilibres céto-énoliques. En spectrométrie UV, ce composé possède un maximum d'absorption à 304 nm , il doit donc posséder une structure avec système conjugué.

Les spectres RMN ont été réalisés à basse température (*cf.* Figure 80).

¹⁹⁹ Bose, P. C. and Adityachaudhury, N.; *Phytochemistry* (**1978**); *17*; 587-588.

²⁰⁰ Nath, S., *et al.*; *J. Indian Chem. Soc.* (**1983**); *60*; 709-710.

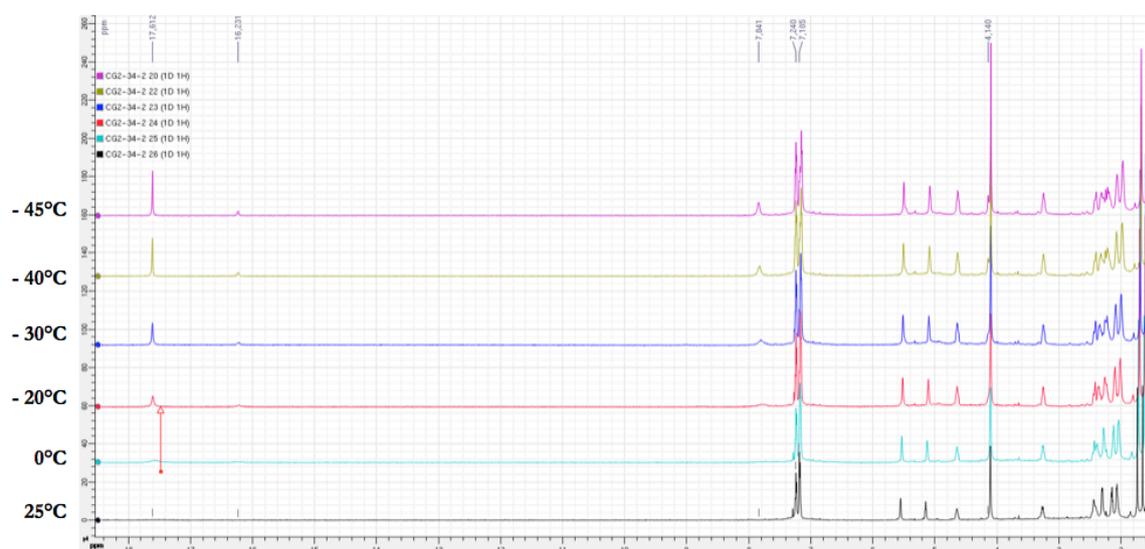


Figure 80 : Spectres RMN ^1H du composé **75** à différentes températures à 600 MHz dans le CDCl_3 .

Quelle que soit la température, le spectre RMN ^1H présente deux méthyles, un méthoxy, 8 protons aliphatiques, quatre méthines dont deux oléfines et cinq aromatiques. En diminuant la température, des signaux apparaissent, notamment un singulet à 17,6 ppm suggérant la présence d'un hydroxyle énolique "chélaté". Par la suite, l'ensemble des analyses RMN a été réalisé à 243 °K (-30 °C).

Le spectre RMN ^{13}C du composé **75** analysé conjointement à l'HSQC éditée, révèle la présence de 10 carbones quaternaires dont quatre très déblindés à 204,8, 179,7, 178,6 et 175,4 ppm suggérant la présence de plusieurs carbonyles. Dans le tableau suivant sont indiquées les valeurs de déplacements et les attributions de chacun des carbones et protons de **75** (*cf.* Tableau 27).

Tableau 27 : Données RMN du composé 75 (CDCl₃, 600 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (nombre de H, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	42,2	3,22 (1H, ddd, 11,2 ; 9,6 ; 6,2 Hz)
2	45,0	4,55 (1H, ddd, 11,1 ; 9,6 ; 6,2 Hz)
3	30,8	2,29 (1H, m) 2,42 (1H, m)
4	117,9	5,54 (1H, br s)
5	137,9	—
6	37,8	2,22 (2H, m)
7	37,2	1,98 (2H, m)
8	29,9	2,07 (2H, m)
9	123,8	5,14 (1H, t, 7,0 Hz)
10	132,3	—
11	17,9	1,58 (3H, s)
12	26,1	1,68 (3H, s)
1'	143,8	—
2'/6'	127,1	7,16 (2H, m)
3'/5'	128,8	7,24 (2H, m)
4'	126,9	7,16 (1H, m)
1''	204,8	—
2''	108,4	—
3''	179,7	—
4''	139,3	—
COCH ₃	60,8	3,90 (3H, s)
5''	143,9	—
6''	178,6	—
7''	175,4	—

Les corrélations observées sur les spectres COSY et HMBC et la formule brute ont permis de proposer la structure la plus probable du composé **75**. Les corrélations sont présentées sur la Figure 81.

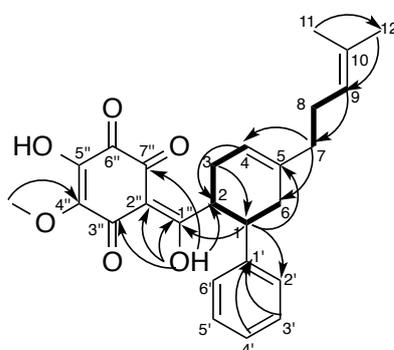


Figure 81 : Corrélations COSY (—) et HMBC (→) du composé 75.

Le spectre COSY permet de mettre en exergue deux systèmes de spins 7, 8, 9 et 6, 1, 2, 3, 4. Sur le spectre HMBC, les corrélations entre H-7 et C-4 et C-6 ont permis de placer la chaîne prénylé en C-5 tandis que le cycle aromatique a pu être positionner en C-1 grâce à la corrélation entre H-1 et C-2'/6'. Les couplages HMBC entre l'hydroxyle à 17,6 ppm et les carbones ont été déterminants. En effet, cet hydroxyle corrèle avec C-2, C-1'', C-2'', C-3'' et C-7'' indiquant qu'il possède une position centrale. C'est la corrélation entre H-1 et C-1'' qui a permis de positionner C-1''. La structure du motif substituant le cyclohexène en C-2 a été déduite de la formule brute, du degré d'insaturation, de la valeur des déplacements chimiques des carbones et des données cristallographiques.

La configuration relative peut être déduite des constantes de couplage observées pour les protons H-1 et H-2. A la température de 243 °K, il ne nous a pas été possible de définir les constantes de couplage des protons H-1 et H-2. Cependant, à température ambiante, les signaux de ces protons se trouvent sous la forme d'un doublet de doublet de doublet (ddd) avec des constantes de l'ordre de 11, 10 et 6 Hz (voir spectre proton de **75** p. 300 en annexe). La valeur élevée de ces constantes de couplage suppose une relation *trans*-diaxiale pour les protons vicinaux H-1 et H-2.

Ces deux composés sont très proches des chalcones prénylées décrites dans la première partie de ce chapitre, mais aucune ne possède ce motif *ortho-para* quinone substitué, jamais décrit dans la littérature. C'est molécule ont été nommée écarlottone en rapport avec leur couleur écarlate et les groupements cétone qu'elle comporte. Le motif *ortho-para* quinone n'a été décrit que quatre fois seulement dans la littérature : l'islandoquinone isolée d'un lichen *Cetraria islandica*²⁰¹, la déhydro- α -lapachone isolée de *Dolichandrone crista* (Bignoniaceae),²⁰² l'élisaptérosine D isolée du corail *Pseudopterogorgia elisabethae*²⁰³ et la Frédéricamycine E isolée de la bactérie *Streptomyces griseus*.²⁰⁴

²⁰¹ Stepanenko, L. S., *et al.*; *Phytochemistry* (1997); 46; 565-568.

²⁰² Prakash, L. and Singh, R.; *Pharmazie* (1980); 35; 122-123.

²⁰³ Shi, Y.-P., *et al.*; *Tetrahedron Lett.* (2003); 44; 3249-3253.

²⁰⁴ Chen, Y., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (2008); 71; 431-437.

Données cristallographiques

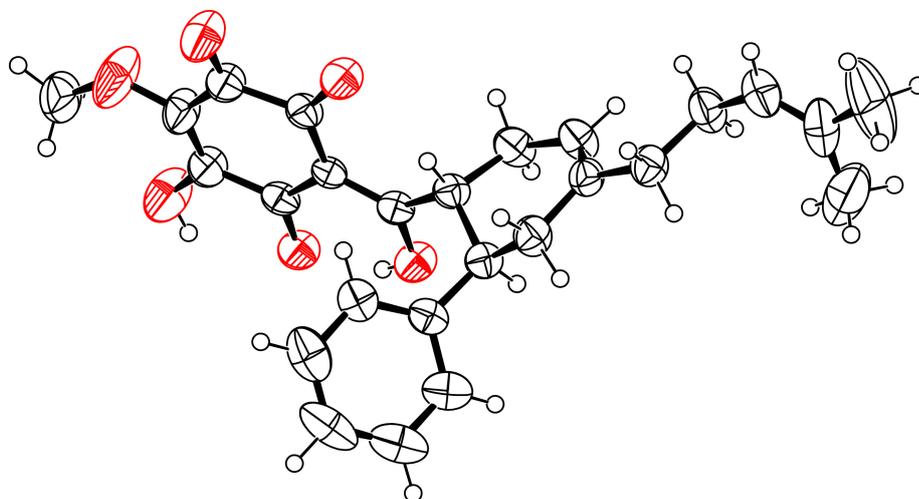


Figure 82 : Représentation ORTEP du composé 77.

Le mélange racémique **75** a cristallisé à température ambiante dans le chloroforme. Les données cristallographiques ont permis de déterminer la structure du substituant en C-2 et la configuration relative proposées (*cf.* Figure 82). La maille est constituée des deux énantiomères positionnés "tête-bêche" (*cf.* Figure 83). Les paramètres de maille ($\alpha = 90^\circ$, $\beta = 108^\circ$, $\gamma = 90^\circ$) correspondent à un système réticulaire monoclinique.

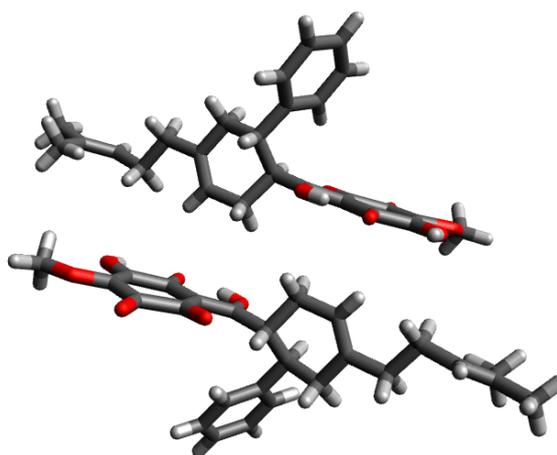


Figure 83 : Représentation tridimensionnelle des énantiomères (76 + 77) dans la maille.

Configuration absolue des énantiomères 75

La séparation des énantiomères, réalisée par CPS, a permis d'obtenir les énantiomères et de réaliser les spectres de dichroïsme circulaire (DC) de chacun d'eux (cf. Figure 84).

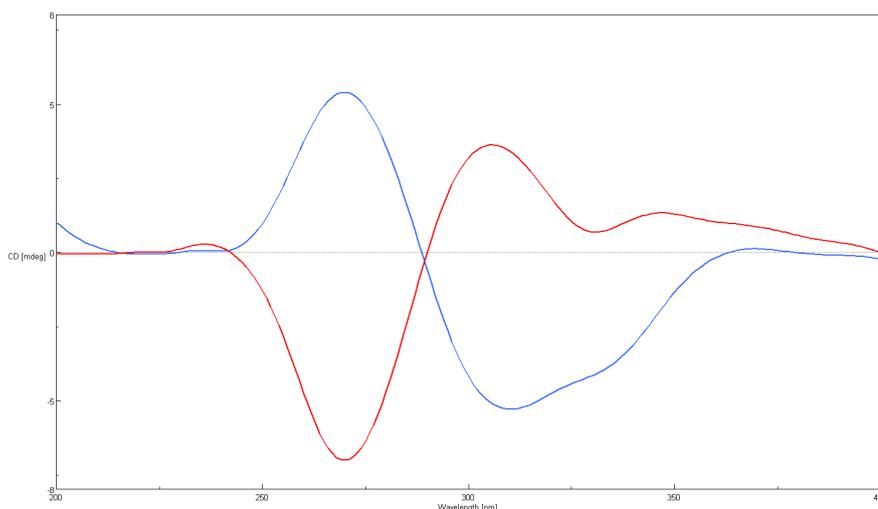


Figure 84 : Spectres de dichroïsme circulaire superposés des énantiomères 75, (-)-écarlottone (76) (en rouge) et (+)-écarlottone (77) (en bleu).

L'interprétation des spectres de DC peut se faire soit par comparaison des données chiroptiques de composés connus relativement proches structuralement, soit par comparaison avec des spectres simulés obtenus par les méthodes TDDFT (Time-dependant Density Functional Theory ou théorie de la fonctionnelle de densité dépendant du temps) après modélisation moléculaire, ou encore par analyse directe des spectres lorsque les molécules analysées remplissent un cahier des charges permettant d'appliquer certaines méthodes spécifiques comme l'*exciton chirality*. L'*exciton chirality* est une méthode non empirique permettant de déterminer la configuration absolue d'une molécule, lorsque celle-ci possède des chromophores, adjacents aux centres chiraux. L'interaction électronique entre les 2 chromophores, phénomène qui se traduit par la séparation en 2 niveaux de l'état excité du système, appelé encore "split de Davydov", est indispensable à l'obtention de courbes de DC.²⁰⁵ Grâce à cette méthode, il est possible de corréler le signe des effets Cotton, observés sur le spectre de DC d'une molécule, à la position spatiale

²⁰⁵ Steven, C. and Russel, M.; *Bioactive Natural Products : Detection, Isolation, and Structural Determination* (2008); 2nd Ed.; 191.

relative de chacun des chromophores et donc d'en déduire sa configuration absolue. Selon Harada et Nakanishi, lorsque le spectre présente un effet Cotton positif suivi d'un effet Cotton négatif des grandes vers les basses longueurs d'onde, nous avons une chiralité positive, et inversement pour la chiralité négative.²⁰⁶ Dans le cas de la chiralité positive, les chromophores sont agencés dans le sens horaires, tandis qu'ils sont agencés dans le sens antihoraire dans le cas de la chiralité négative.

Les énantiomères du mélange **75** sont des molécules dont la structure se prête au DC et à l'application de la méthode de l'*exciton chirality*. Ainsi, l'énantiomère possédant un pouvoir rotatoire négatif (**76**) présente une chiralité positive (cf. Figure 85) tandis que celui ayant un pouvoir rotatoire positif (**77**) présente une chiralité négative (cf. Figure 86).

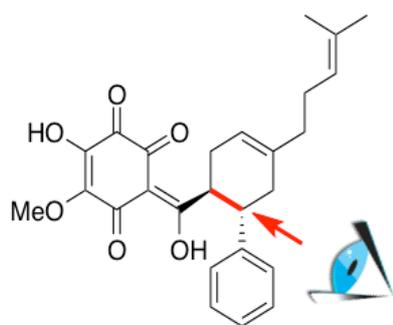
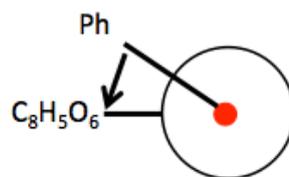
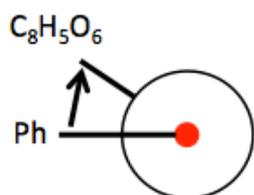


Figure 85 : Sens horaire – Chiralité positive

(-)-écarlottone (**76**)

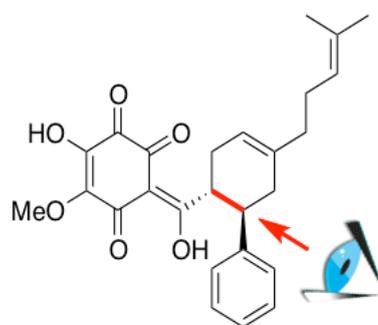


Figure 86 : Sens antihoraire – Chiralité négative

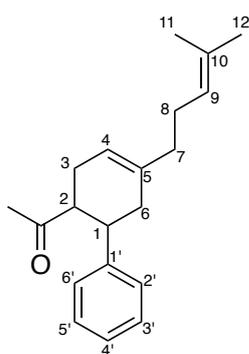
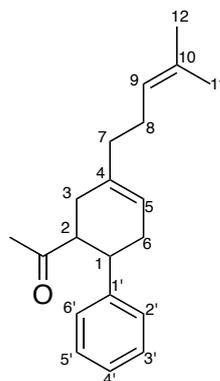
(+)-écarlottone (**77**)

Ces molécules ont, ainsi, été nommées (+)- écarlottone et (-)-écarlottone.

²⁰⁶ Harada, N. and Nakanishi, K.; *Acc. Chem. Res.* (1972); 5; 257-263.

Composés 78 et 79

L'analyse structurale de ces 2 composés se fera simultanément afin de mettre en évidence leurs caractéristiques communes et opposables.

(±)-Fislatifolione (**78**)(±)-Isofislatifolione (**79**)

Les spectres de masse (ES)⁺ révèlent un même pic pseudo-moléculaire [M+NH₄]⁺ à m/z 300,2325 correspondant à la formule brute C₂₀H₂₆O (masse calculée 300,2322) avec 8 degrés d'insaturation indiquant que ces deux composés sont des isomères. Ils ont 6 carbones, deux hydrogènes et 5 oxygènes de moins que le **75**, ce qui suggère l'absence du motif "ortho-para-quinone". De plus, leur spectre IR n'indiquent la présence que d'un carbonyle (1709 cm⁻¹) au lieu de trois pour **75**.

Les spectres RMN ¹H (*cf.* Figure 87) et ¹³C (*cf.* Figure 88) de ces deux molécules sont très similaires.



Figure 87 : Spectres RMN ^1H des composés **78** (en noir) et **79** (en rouge) à 500 MHz dans le CDCl_3 .

Les spectres RMN ^1H révèlent la présence de trois méthyles, 8 protons aliphatiques, quatre méthines dont deux oléfines, et cinq aromatiques. Par rapport au **75** décrit précédemment, il y a un méthyle en plus et pas de groupe méthoxyle. Deux des trois méthyles, à 1,73 et 1,65 ppm et les deux protons éthyléniques sont plus blindés pour le composé **78**. Les signaux des deux protons présents vers 3 ppm se superposent chez **78** alors qu'ils sont distincts chez **79**.

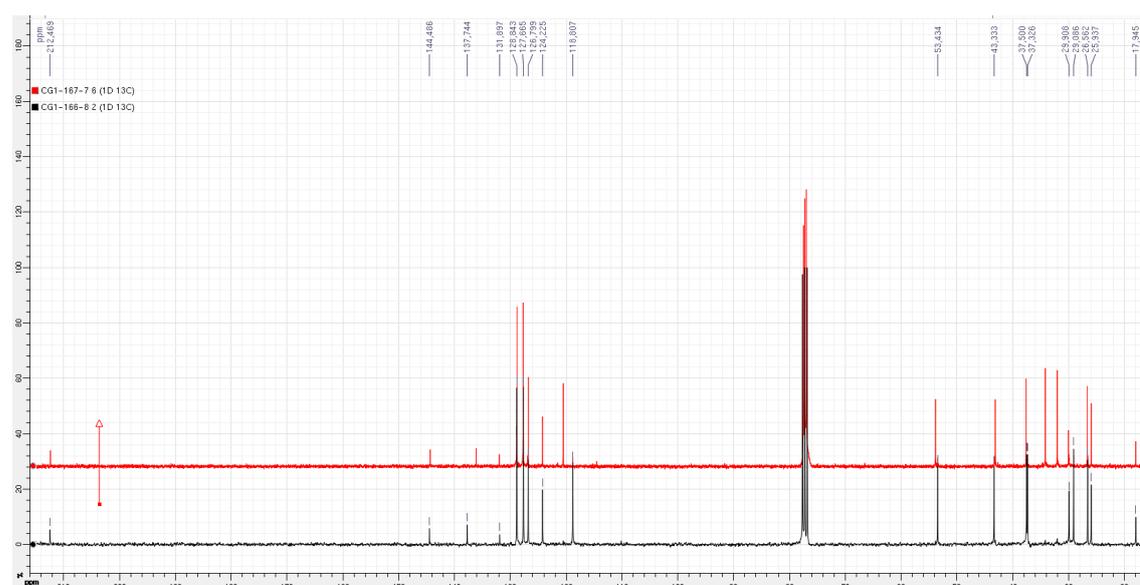


Figure 88 : Spectres RMN ^{13}C des composés **78** (en noir) et **79** (en rouge) à 125 MHz dans le CDCl_3 .

Les spectres RMN ^{13}C , analysés conjointement à l'HSQC, indiquent la présence de quatre carbones quaternaires, dont un carbonyle à 212 ppm (confirmé par le spectre IR), 9 méthines dont cinq aromatiques et deux éthyléniques, quatre méthylènes et trois méthyles. Les différences majeures entre les deux molécules sont retrouvées au niveau des déplacements chimiques de quatre carbones. Les attributions et déplacements chimiques des carbones et protons sont présentés dans le tableau suivant. Les différences notables entre les deux molécules sont indiquées en rouge.

Tableau 28 : Données RMN des composés 78 et 79 (CDCl_3 , 500 MHz)

C	78		79	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (nombre de H, multiplicité, J en Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm) (nombre de H, multiplicité, J en Hz)
CO	212,5	–	212,4	–
COCH ₃	29,9	1,88 (3H, s)	30,0	1,81 (3H, s)
1	43,3	3,06 (1H, ddd, 11,2 ; 9,6 ; 6,2 Hz)	43,1	2,93 (1H, ddd, 11,0, 10,7; 5,6 Hz)
2	53,4	3,00 (1H, ddd, 11,1 ; 9,2 ; 6,2 Hz)	53,8	3,01 (1H, ddd, 10,8 ; 10,6 ; 5,2 Hz)
3	29,1	2,31 (2H, m)	32,0	2,09 (2H, m)
4	118,8	5,53 (1H, s)	136,1	–
5	137,7	–	120,5	5,48 (1H, s)
6	33,3	2,25 (2H, m)	34,2	2,23 – 2,30 (2H, m)
7	37,5	2,04 (2H, m)	37,6	2,01 (2H, m)
8	26,6	2,12 (2H, m)	26,6	2,09 (2H, m)
9	124,2	5,13 (1H, m)	124,2	5,09 (1H, m)
10	131,9	–	131,9	–
11	17,9	1,64 (3H, s)	17,9	1,60 (3H, s)
12	25,9	1,73 (3H, s)	25,9	1,68 (3H, s)
1'	144,5	–	144,3	–
2'/6'	127,7	7,23 (2H, m)	127,7	7,17 (2H, m)
3'/5'	128,8	7,30 (2H, m)	128,8	7,25 (2H, m)
4'	126,8	7,23 (1H, m)	127,2	7,17 (1H, m)

Ce tableau permet de mettre en évidence les différences au niveau des déplacements des carbones C-4 et C-5 à 118,8 et 137,7 ppm (**78**) et à 136,1 et 120,5 ppm (**79**) et au niveau des déplacements des carbones adjacents C-3 et C-6.

Les corrélations homonucléaires COSY, représentées Figure 89 et Figure 90 mettent en évidence plusieurs systèmes de spins 9-8-7 et 4-3-2-1-6 pour **78** et 9-8-7 et 3-2-1-6-5 pour **79**. L'enchaînement des atomes des différents systèmes a été réalisé grâce aux corrélations hétéronucléaires obtenues par les spectres HMBC permettant de proposer les structures ci-après, régioisomères l'une de l'autre.

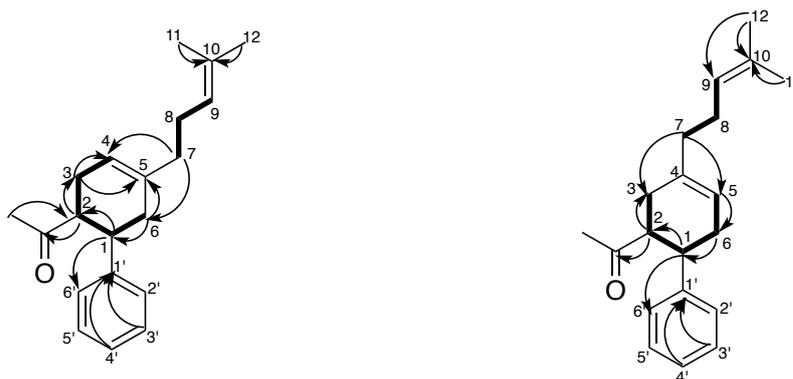


Figure 89 : Principales corrélations COSY (—) et HMBC (---) du composé **78**. Figure 90 : Principales corrélations COSY (—) et HMBC (---) du composé **79**.

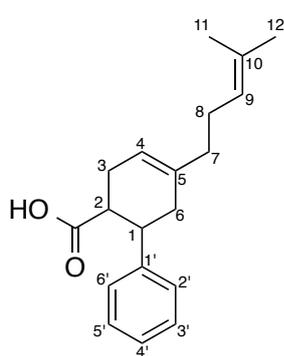
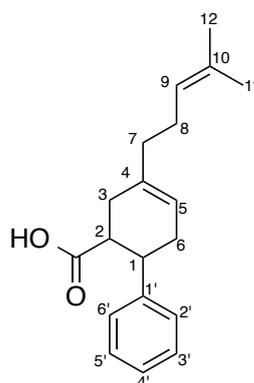
Pour **78**, les corrélations de H-7 avec C-4, C-5 et C-6 ont permis de lier la chaîne prénylée au cyclohexène en C-5 tandis que la chaîne prénylée est positionnée en C-4 pour **79** grâce aux corrélations entre H-7 et C-3, C-4 et C-5. D'autre part, le cyclohexène est substitué par un groupement méthyl-cétone en 2, corrélations entre H-2 et CO, et entre les protons du méthyle à 1,8 ppm avec C-2.

La configuration relative des 2 composés peut être déduite des constantes de couplage observées pour les protons H-1 et H-2. En effet, sur le spectre de RMN ^1H de **78** et **79**, ces 2 protons apparaissent sous la forme d'un doublet de doublet de doublet (ddd) avec les constantes de couplage de l'ordre de 11, 10 et 6 Hz pour H-1 et H-2 (voir spectres protons de **78** et **79** p. 303 et 304 en annexe) suggérant comme précédemment la configuration *trans*-diaxiale de ces deux protons vicinaux. Comme pour le composé précédent **75**, **78** et **79** ont été isolés sous forme de mélanges racémiques ($[\alpha]_D = 0$).

Ces 2 composés sont nouveaux mais, s'ils n'ont jamais été décrits dans la littérature, leur squelette est connu puisqu'il correspond à celui des chalcones prénylées présentées dans la première partie de ce chapitre. Les données spectrales et RMN de ces chalcones

prénylées, plus particulièrement celles de la fissistine et de l'isofissistine ont permis de valider les structures des composés **78** et **79**, que nous avons nommées (\pm)-fislatifolione et (\pm)-isofislatifolione en rapport avec le nom de la plante dans laquelle elles ont été isolées et la fonction cétone qu'elles portent.

Composés **74** et **80**

Acide (\pm)-fislatifolique (**74**)Acide (\pm)-Isofislatifolique (**80**)

Le composé **74** a été obtenu pur lors de la première extraction alors que **80** a été isolé en mélange avec le composé **74** lors de la seconde extraction. Si l'analyse structurale de **74** s'est appuyée sur l'examen de l'ensemble des spectres de RMN 1D et 2D, celle de **80** a été déduite du spectre de masse haute résolution d'un échantillon pur (et par CL-HRESISM du mélange) et du seul spectre du proton du mélange. En effet, ces molécules sont extrêmement instables et des dégradations rapides ont été observées après la purification du mélange **74** + **80**, ne permettant pas d'obtenir de spectres RMN convenables pour ce dernier.

Comme pour le couple de molécules précédent, les spectres de masse (ES)⁺ de **74** et **80** présentent un même pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 285,1850 correspondant à la formule brute C₁₉H₂₄O₂ (masse calculée 285,1849) avec 8 degrés d'insaturation indiquant que ces deux composés sont des isomères. Ils diffèrent des composés précédents par la présence d'un oxygène supplémentaire et par l'absence d'un carbone et de deux hydrogènes.

Lorsque l'on compare les données obtenues pour le composé **74** et celles du composé **78**, très peu de modifications sont observées. Les spectres ^1H et ^{13}C , et les corrélations homonucléaires ^1H - ^1H et hétéronucléaires HSQC et HMBC de **74** sont très similaires à celles de **78** et **79**. L'absence d'un méthyle à 1,8 ppm et le déplacement chimique du carbonyle à 179 au lieu de 212 ppm dans le cas précédent, suggère le remplacement de la méthyl-cétone par un acide carboxylique pour le composé **74**. Comme précédemment, la configuration *trans*-diaxiale des protons H-1 et H-2 a été déduite des grandes valeurs de constantes de couplage observées sur le spectre de RMN ^1H de ces deux protons. Cette molécule a également été isolée en mélange racémique.

En ce qui concerne le mélange **74/80**, le spectre de RMN ^1H est très semblable à celui de **74** seul (*cf.* Figure 91), ce qui implique que **80** possède une structure très proche de celle de **74**. On distingue nettement le dédoublement des deux méthyles et celui du proton éthylénique du cyclohexène avec des intensités comparables, ce qui suppose que les 2 composés sont présents en quantité équivalente.

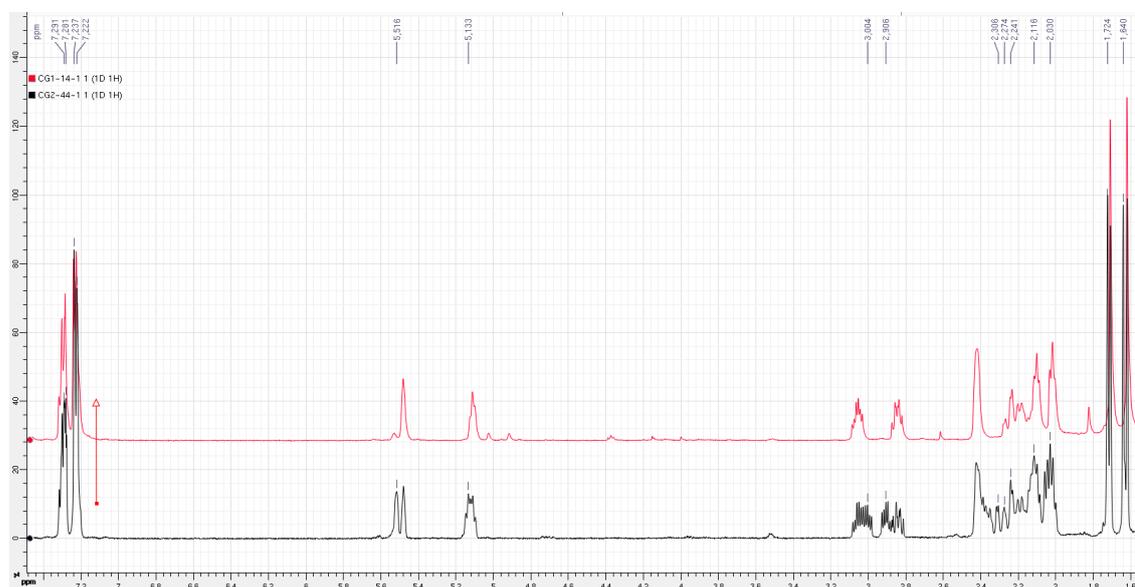


Figure 91 : Spectres RMN ^{13}C des composés **74** (en rouge) et le mélange **74 + 80** (en noir) à 500 MHz dans le CDCl_3 .

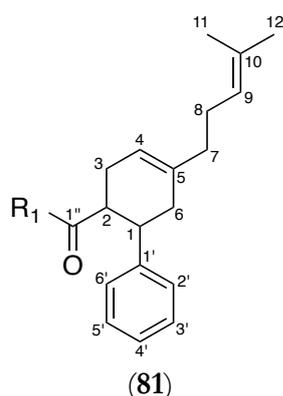
Les faibles variations observées au niveau des déplacements chimiques des deux méthyles, du proton éthylénique du cyclohexène et des protons portés par les carbones asymétriques, suggèrent, par analogie avec les données de RMN des composés **78** et **79**, que le mélange est composé de la molécule **74** et de son régioisomère, la chaîne isoprénique

étant positionnée en C-4 pour ce dernier au lieu de C-5 pour **74**. Des analyses complémentaires auraient été nécessaires pour confirmer la structure du composé **80**.

Ces deux composés n'ont jamais été décrits dans la littérature et ont été nommés les acides (\pm)-fislatifolique (**74**) et (\pm)-isofislatifolique (**80**).

Composé 81

Bien que ce composé ait été isolé en mélange avec un autre composé de la même série en proportion 3 pour 1, il nous a tout de même été possible de réaliser l'identification de ce composé par comparaison avec les spectres RMN des autres composés décrits précédemment. Cependant, certaines analyses n'ont pas pu être effectuées tels que l'IR et le pouvoir rotatoire. L'instabilité de ce composé et la faible quantité isolée n'ont pas permis de séparer les isomères de ce mélange.



Le spectre de masse (ES)⁺ montre un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 427,2116 correspondant à la formule brute C₂₅H₃₀O₆ (masse calculée 427,2115). Ce composé présente un carbone de moins, deux protons de plus et le même nombre d'oxygène que le composé **75**. De plus, il possède 11 insaturations, c'est à dire deux de moins que **75**.

Les spectres RMN sont très similaires à ceux du produits **75** puisque ces deux composés possèdent une partie de leur squelette carboné en commun. Sur le spectre du ¹³C, il n'y a que deux carbones au-delà de 175 ppm au lieu de quatre pour le **75**. Sur le spectre du proton, on peut observer un signal additionnel à 5,24 ppm qui présente plusieurs corrélations visibles sur le spectre HMBC (*cf.* Figure 92).

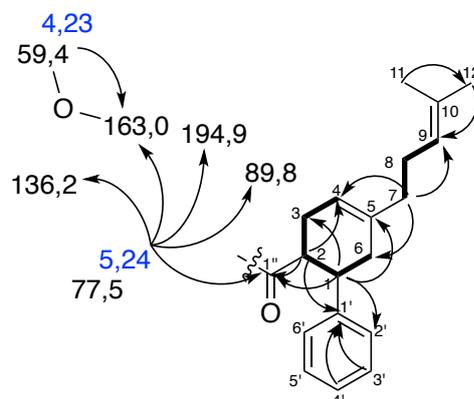


Figure 92 : Corrélations COSY (—) et HMBC (---) du composé 81.

Ces corrélations nous permettent de proposer quatre hypothèses pour le substituant en C-2. Ces structures sont proposées ci-après associées au déplacement chimique des carbones simulés sur le logiciel ACD/Lab.

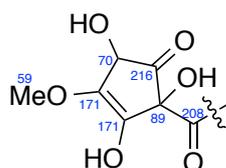


Figure 93 : Structure R_{1a}.

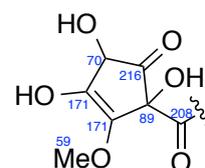


Figure 94 : Structure R_{1b}.

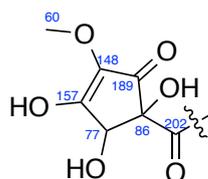


Figure 95 : Structure R_{1c}.

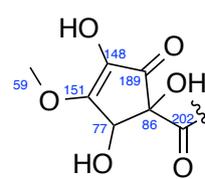


Figure 96 : Structure R_{1d}.

Compte tenu de la valeur du déplacement du carbonyle de la lactone à 194 ppm, nous en avons déduit que cette valeur n'est pas en faveur d'un système non conjugué (216 ppm) permettant d'exclure les structures R_{1a} et R_{1b}. Nos valeurs de déplacement du carbone à 163 ppm portant le méthoxy et du carbone portant l'hydroxyle à 136 ppm ne nous permettent pas de entre R_{1c} et R_{1d}. Plusieurs essais de cristallisation ont été réalisés mais ils ont été infructueux.

Bien qu'aucune constante de couplage n'ait pu être précisément déterminée au niveau des protons H-1 et H-2, la largeur du multiplet du proton H-2 mesurée sur le spectre du proton est d'environ 25 Hz, ce qui suggère la présence de 2 grandes constante

de couplage et d'une plus faible, comme c'est le cas pour les membre de la série. Il est probable que la configuration relative au niveau des carbones C-1 et C-2 soit *trans*-diaxiale.

Cette structure n'a jamais été décrite dans la littérature. Pour expliquer la présence de ce motif penténone oxydé, et compte tenu de la forte teneur dans l'extrait du composé **75**, nous pouvons émettre l'hypothèse que la formation de ce motif résulterait d'un réarrangement du motif quinonique de **75** selon le mécanisme présenté Figure 97.

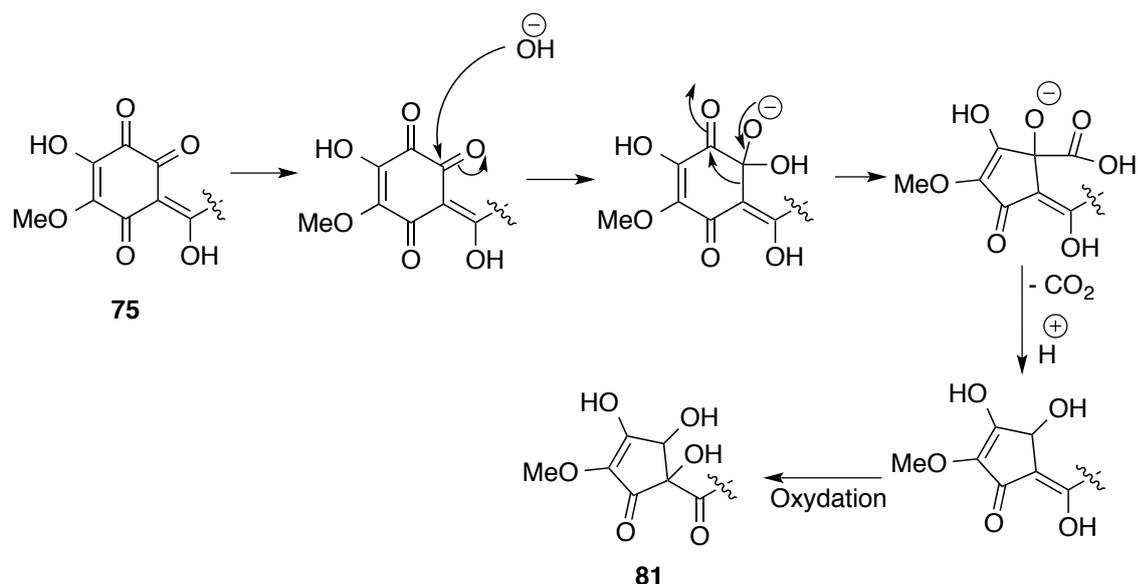
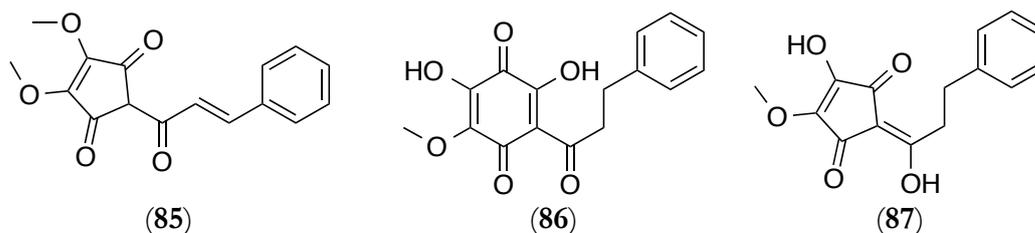


Figure 97 : Hypothèse de formation du cycle à 5 (R1d) à partir du cycle à 6 du composé **75**.

Après addition nucléophile d'un hydroxyle sur le carbonyle en C-7", un réarrangement permettrait la formation du cycle à 5 carbones, lequel subirait une décarboxylation suivie d'une oxydation de l'énol exocyclique pour conduire au composé **81**.

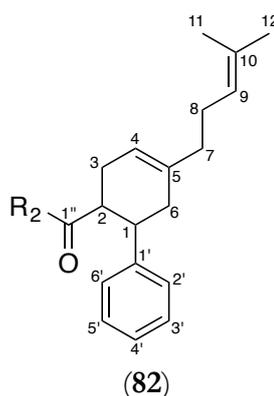
L'hypothèse selon laquelle le cycle à 5 carbones est issu du cycle à 6 carbones est appuyée par la synthèse de la lindérone (**85**), isolée de *Lindera pipericarpa*, qui débute par le réarrangement de la 1,4-quinone (**86**) en demethyldihydrolindérone (**87**).²⁰⁷



²⁰⁷ Bennett, G. J. and Lee, H.-H.; *J. Chem. Soc.* (1986); 633-638.

Composé 82

Le composé **82** a été isolé en très faible quantité à partir d'un mélange d'isomères. Son analyse structurale s'est avérée extrêmement complexe par le faible nombre de protons sur le motif substituant C-2, et donc de l'absence d'éléments objectifs pour conclure définitivement. Nous donnons par conséquent ci-après une hypothèse de structure qu'il faudrait confirmer par des analyses complémentaires.



Le spectre de masse (ES)⁺ montre un pic pseudo-moléculaire [M+H]⁺ à m/z 425,1955 correspondant à la formule brute C₂₅H₂₈O₆ (masse calculée 425,1959). La formule de ce composé diffère du composé **75** uniquement par l'absence d'un carbone. De plus, il possède 12 degrés d'insaturation, soit une de moins que le composé **75**.

Le spectre IR présente principalement trois bandes à 1744, 1694 et 1650 cm⁻¹ suggérant la présence de trois carbonyles et une autre à 2924 cm⁻¹ indiquant la présence de CH aromatiques.

Un premier spectre RMN ¹H réalisé dans le chloroforme deutéré à température ambiante puis un second effectué avec l'ajout de 2 μL de pyridine deutérée à 253 °K (-20 °C) a montré la présence possible d'une tautomérie céto-énolique (*cf.* Figure 98).

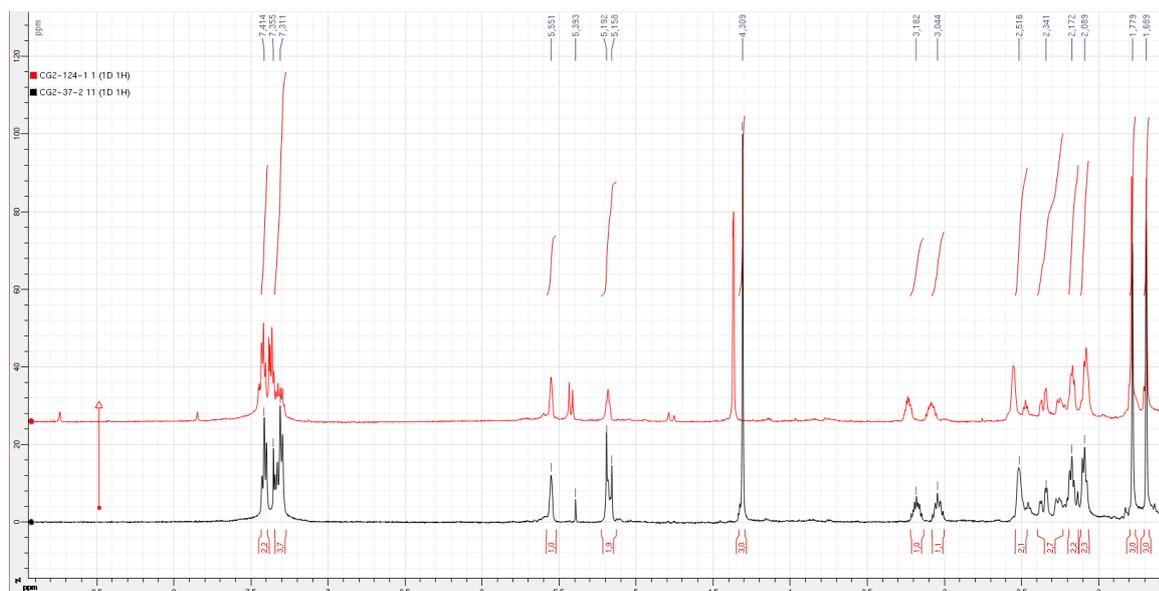


Figure 98 : Spectres RMN ^1H du composé **82** à 500 MHz dans le CDCl_3 à t.a. (en noir) et dans le CDCl_3 et la pyridine- d_5 à $t = -20^\circ\text{C}$ (en rouge).

En présence de pyridine à froid, on observe un dédoublement du groupement méthoxyle, une simplification du signal à 5,2 ppm et l'apparition d'un doublet à 5,4 ppm.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C , conjointement à l'HSQC s'est avérée très délicate à cause de la faible quantité du composé **82** isolée et du dédoublement de certains carbones (*cf.* Tableau 29).

Tableau 29 : Données RMN du composé 82 (CDCl₃/Pyr-*d*₅, 600 MHz)

C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm) (nombre de H, multiplicité, <i>J</i> en Hz)
1	42,2 et 42,4	3,23 (1H, m)
2	45,1 et 45,2	3,08 (1H, m)
3	29,2 et 29,3	2,55 (2H, m)
4	118,4	5,55 (1H, br s)
5	137,2	–
6	36,5 et 36,6	2,24 2,34 (2H, m)
7	37,4	2,07 (2H, m)
8	26,2	2,17 (2H, m)
9	124,0	5,18 (1H, t, 7,0 Hz)
10	131,9	–
11	17,9	1,69 (3H, s)
12	26,0	1,76 (3H, s)
1'	143,9	–
2'/6'	127,4 et 127,6	
3'/5'	128,5 et 128,6	7,37 – 7,42 (5H, m)
4'	126,5 et 126,6	
1''	212,1	–
COCH ₃	59,4	4,37 (1,5 H, br s) 4,38 (1,5 H, br s)
	149,7	–
	174,4	–
	186,8	–
	192,3	–
	69,5 et 69,6	5,41 (0,5 H, s) 5,44 (0,5 H, s)

Le signal à 5,4 ppm ne se trouve pas être un doublet mais deux singulets distincts, intégrant chacun pour 0,5 proton, portés par deux carbones différents. Il semble que deux formes de ce produit, en quantité équivalente, soient présentes suggérant la présence de deux formes tautomériques.

Les corrélations COSY et HMBC ont permis de construire la partie correspondant au squelette commun de cette série (*cf.* Figure 99). Cependant, il n'a pas été possible de déterminer la structure du substituant en C-2.

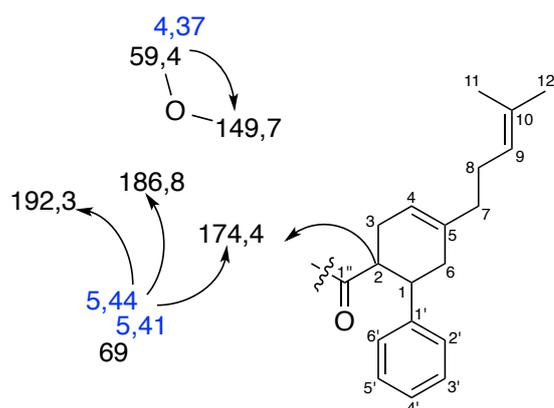


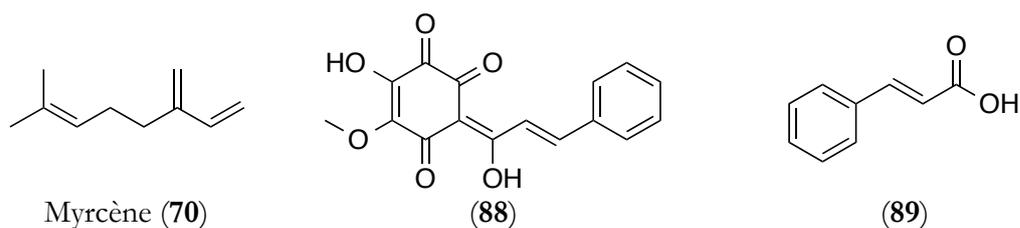
Figure 99 : Principales corrélations HMBC (→) et données HSQC du composé 82.

Ces corrélations associées à la formule brute et au nombre d'insaturations nous ont permis de proposer une liste de substituants possibles présentés p. 315-317. Parmi ces structures certaines peuvent être éliminées à cause de certains déplacements et de la présence d'un proton sur le carbone portant de groupement méthoxy. Plusieurs structures sont donc envisageables, il est donc difficile de choisir préférentiellement une structure.

La faible quantité de produit n'a malheureusement pas permis d'obtenir des spectres RMN suffisamment précis et certaines corrélations semblent manquantes. Des cristaux de ce composé seraient nécessaires pour la détermination structurale. Les essais de cristallisation ont, là encore, été infructueux.

Hypothèse de biogenèse

Comme pour la plupart des chalcones prénylées présentées dans la première partie de ce chapitre, nous avons émis l'hypothèse d'une réaction de Diels-Alder entre un monoterpène, comme le myrcène (70) et une molécule de type quinochalcone, tel que le composé 88 pour le composé 75 ou l'acide cinnamique (89) pour le composé 74.



Les réactions s'effectueraient selon les schéma suivants :

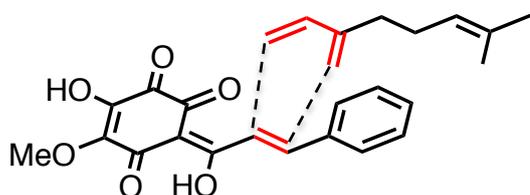


Figure 100 : Hypothèse de biogenèse du composé 75.

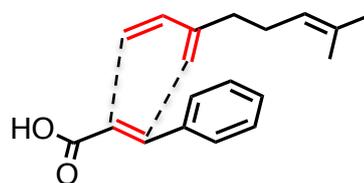
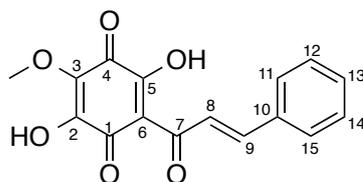


Figure 101 : Hypothèse de biogenèse du composé 74.

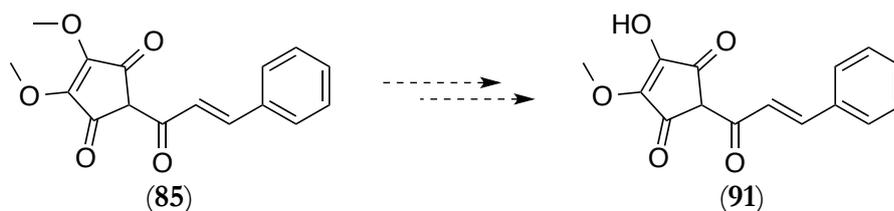
Lors du fractionnement bio-guidé et "RMN-guidé" de l'extrait AcOEt de *F. latifolium*, ni l'acide cinnamique ni aucune chalcone n'a été isolé. Cependant, dans la littérature, on trouve des chalcones qui pourraient correspondre aux produits de départ, lesquelles, en réagissant avec le myrcène, donneraient nos composés. Parmi ces molécules, on peut citer la pédicinine (**90**), obtenue lors d'études portant sur l'oxydation de chalcones de la famille de la pédicelline isolée de *Didymocarpus pedicellata*.²⁰⁸



(90)

La seule différence avec le composé **88** réside dans l'inversement de la position du groupement méthoxyle en 3 et de l'hydroxyle en 2.

Il y a également la 2-cinnamoyl-4-hydroxy-5-methoxycyclopent-4-ene-1,3-dione (**91**) obtenue à partir de la déméthylation de la lindérone (**85**).²⁰⁹



²⁰⁸ Seshadri, T. R.; *P. Indian Acad. Sci. A* (1949); 30; 333-341.

²⁰⁹ Kiang, A. K., et al.; *J. Chem. Soc.* (1962); 4338-4345.

Cette déméthylation est obtenue simplement en chauffant la lindérone en présence d'acides chlorhydrique et acétique pendant une heure. Il est possible que cette réaction ait pu se produire sur nos composés lors de l'évaporation des solvants utilisés dans les étapes de chromatographie. En effet, une augmentation de la concentration en acide dans le ballon contenant le produit est généralement observée au cours de l'évaporation des solvants à l'évaporateur rotatif.

Peu de composés de cette série ont été isolés. Des essais de modulations chimiques sur le composé **75** ont été réalisés avec l'objectif de mieux appréhender les relations structure-activité dans cette série.

2.2. Modulation chimique du composé 75 et hémisynthèse

Nous avons cherché à préparer des analogues du composé le plus actif (**75**) en réalisant la méthylation ou l'acétylation des différents hydroxyles.

Pour réaliser ces modulations, une fraction enrichie en composé **75** a été utilisée (*cf.* Figure 102).

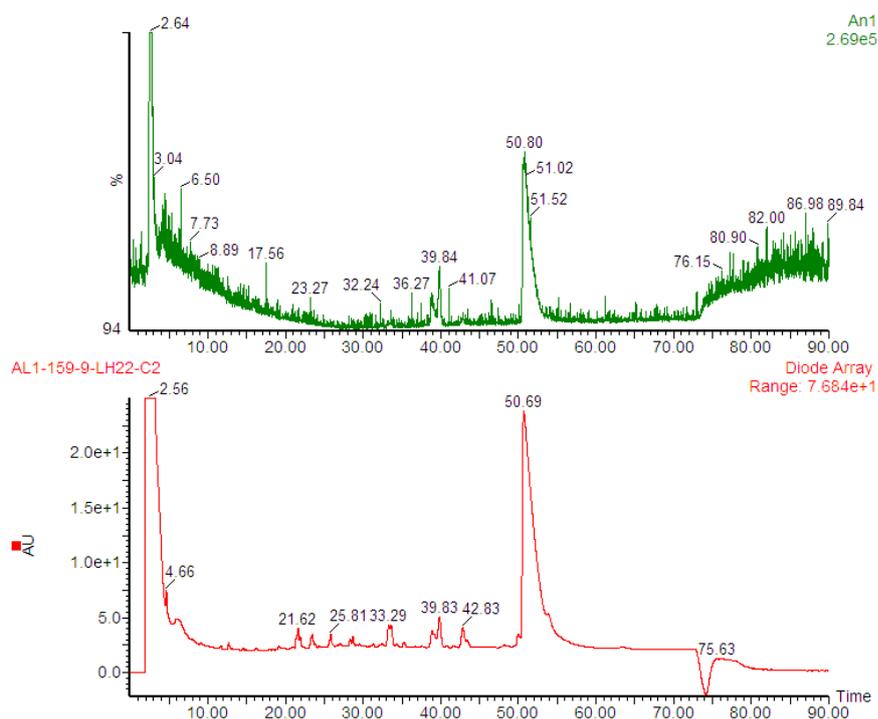


Figure 102 : Chromatogrammes UV (en bas) et DEDL (en haut) obtenus par CLHP en phase inverse de la fraction F9, enrichie en composé 75, utilisée pour les modulations chimiques.

2.2.1. Méthylation

Deux réactions de méthylation ont été tentées, une avec le sulfate de diméthyle et l'autre avec le triméthylsilyldiazométhane, moins toxique et moins dangereux que le diazométhane selon les conditions présentées dans le Tableau 30.

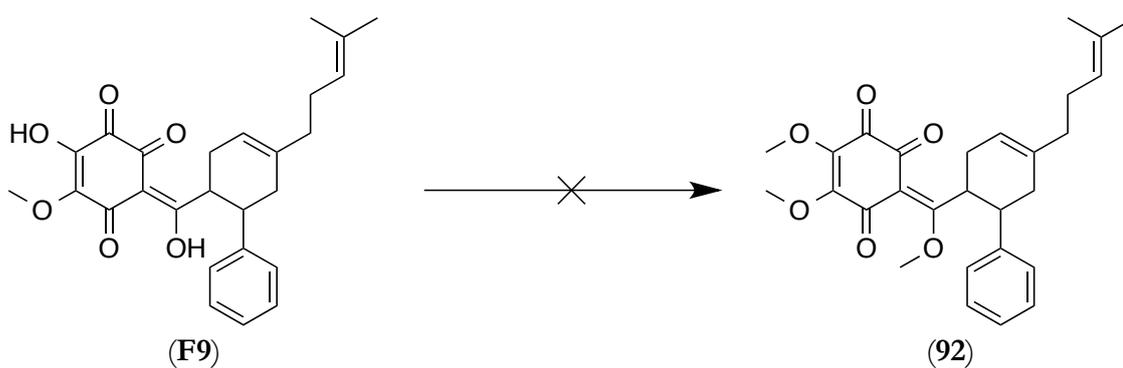


Tableau 30 : Conditions des réactions de méthylation.

N° de réaction	Conditions
1	Acétone, K_2CO_3 , Me_2SO_4 , t. a., 1 j.
2	CH_2Cl_2 , MeOH, TMS-diazométhane, atm. N_2 , 40 °C, 1 h

Le brut réactionnel a été analysé par CLUP-SM et RMN. Bien que le composé **75** ait complètement disparu, le composé **92** ne semble pas s'être formé. En revanche, un mélange complexe, qui n'a pas pu être séparé, a été obtenu.

2.2.2. Acétylation

Une réaction d'acétylation a été testée avec l'anhydride acétique à température ambiante et à 40 °C (*cf.* protocole ci-dessous).

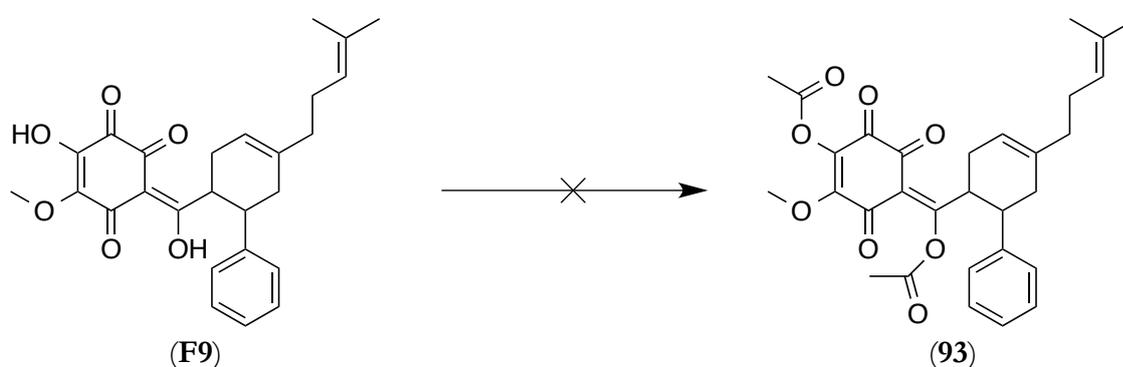


Tableau 31 : Conditions des réactions d'acétylation.

N° de réaction	Conditions
1	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, anhydrique acétique, t. a., 5 h
2	CH ₂ Cl ₂ , Et ₃ N, anhydrique acétique, 40 °C, 5 h

L'analyse du brut réactionnel a permis d'identifier un composé **75** mono-acétylé en très faible quantité. Malheureusement, ce composé, instable, s'est dégradé au cours de sa purification par chromatographie.

Ces réactions n'ayant pas permis d'obtenir des analogues du composé **75**, nous avons cherché une autre façon d'obtenir des analogues de chalcones prénylées sans utiliser le composé **75**.

2.2.3. Réaction de Diels-Alder

La réaction de Diels-Alder, réaction de cycloaddition entre un diénophile et un diène, est fréquemment utilisée en chimie organique.²¹⁰ Elle permet d'obtenir des cycles à 6 chaînons structurellement plus contraints, et de créer, éventuellement de manière contrôlée, plusieurs centres asymétriques.²¹¹ Elle peut être effectuée dans des conditions très variées, souvent par voie thermique ou à l'aide d'un catalyseur de type acide de Lewis.

Pour réaliser nos analogues, nous avons choisi le myrcène comme diène et différents diénophiles simples tels que l'acide cinnamique (**89**) et le méthyle cinnamate (**94**) en utilisant différentes conditions. Les essais ont été effectués dans le toluène ou le dichlorométhane, à température ambiante ou à reflux, en tube scellé ou encore avec du trifluoroéthérate de bore comme acide de Lewis.

Myrcène et acide cinnamique

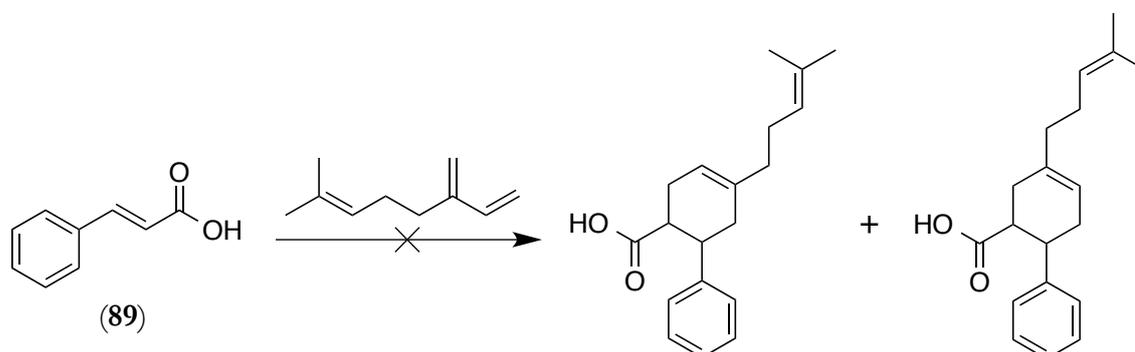


Tableau 32 : Conditions des réactions de Diels-Alder (myrcène + acide cinnamique).

N° de réaction	Conditions
1	Toluène, 115 °C, 7 j.
2	Toluène, tube scellé, 160 °C, 7 j.
3	CH ₂ Cl ₂ , BF ₃ : OEt ₂ , t. a., 2 j.

²¹⁰ Bruckner, R. and Oppolzer, W.; *Advanced organic chemistry : reaction mechanisms* (2002); 315.

²¹¹ Oikawa, H. and Tokiwano, T.; *Nat. Prod. Rep.* (2004); 21; 321-352.

Myrcène et méthyle cinnamate

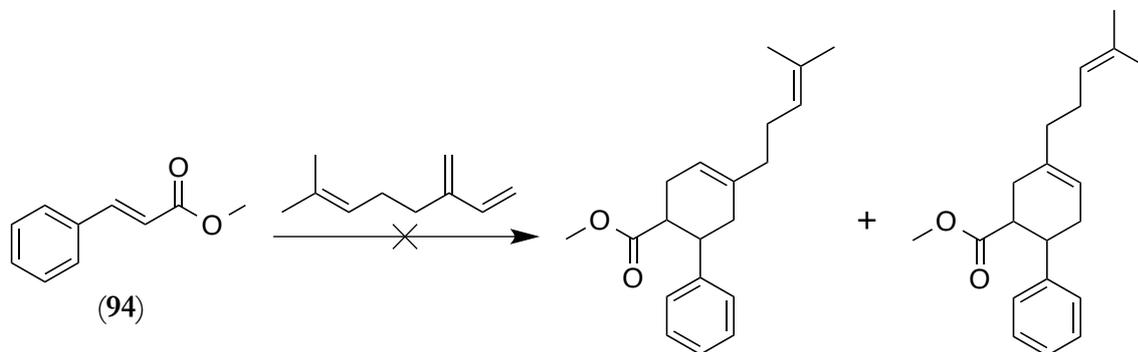


Tableau 33 : Conditions des réactions de Diels-Alder (myrcène + méthyle cinnamate).

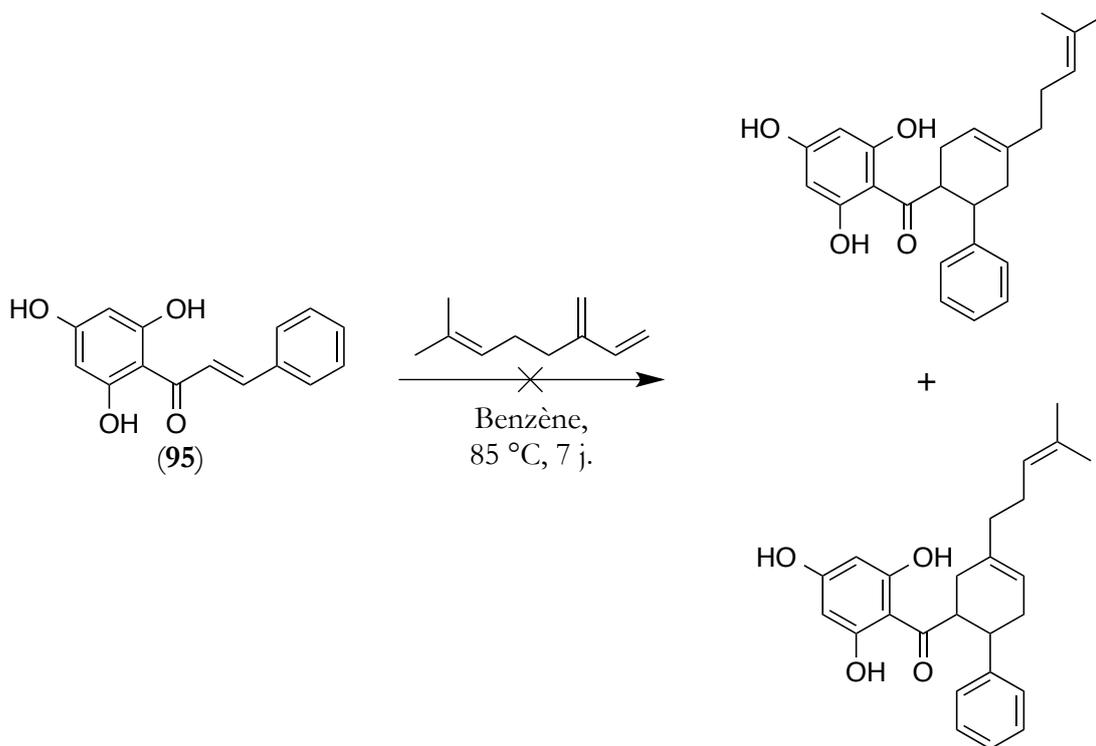
N° de réaction	Conditions
1	Toluène, 115 °C, 7 j.
2	Toluène, tube scellé, 160 °C, 7 j.
3	CH ₂ Cl ₂ , BF ₃ : OEt ₂ , t. a., 2 j.

Quelles que soient les conditions utilisées, aucun produit de cycloaddition n'a été formé. Seuls des résidus de polymérisation du myrcène ont été obtenus.

La même réaction a été effectuée en utilisant la 2',4',6'-trihydroxychalcone (**95**) comme diénophile (chalcone isolée de *Cryptocarya obovata* par le Dr Dumontet²¹²), en utilisant les conditions développées par Shibata¹⁸⁵ pour la synthèse des crinatusines A₁ et A₂.

²¹² Dumontet, V., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (2004); 67; 858-862.

Myrcène et 2',4',6'-trihydroxychalcone



Après 7 jours d'agitation des réactifs au reflux du benzène, nous n'avons pas observé, contrairement aux travaux de Shibata et ses collaborateurs, la formation des produits de cycloaddition désirés. Faute de temps, les essais de réactions de Diels-Alder n'ont pas pu être poursuivis. Une analyse plus approfondie de la littérature semble montrer qu'il est nécessaire d'appliquer des conditions particulières ou plus drastiques. En effet, les diénophiles telle que la chalcone **95** sont très riches en électrons qui sont peu favorables pour les réactions de cycloaddition de Diels-Alder. Par analogie avec les travaux déjà publiés sur des composés proches, nous pourrions envisager de chauffer les réactifs entre 120 et 220 °C en tube scellé^{187,193} ou d'utiliser des nanoparticules d'argent¹⁹¹ ou d'aluminium¹⁸⁸.

2.3. Hydrodistillation des écorces

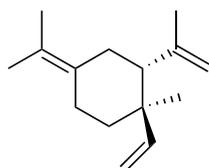
Pour étayer l'hypothèse selon laquelle les molécules prénylées isolées de *F. latifolium* seraient issues d'une réaction de Diels-Alder (possiblement catalysée par une Diels-Aldérase) entre un diène type myrcène et une chalcone ou un simple diénophile de type acide cinnamique, nous avons recherché les monoterpènes dans l'huile essentielle obtenue

par hydrodistillation des écorces de *F. latifolium*. Seules quelques dizaines de microlitres d'huile essentielle ont été obtenues à partir de 19 g d'écorces sèches. Cette faible quantité nous a permis d'effectuer une CCM (cf. Figure 103) ainsi que des analyses en CG-SM (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).



Figure 103 : CCM du myrcène (à gauche) et de l'huile essentielle obtenue des écorces de *F. latifolium* (à droite).

Sur la CCM, nous n'avons pas observé de tache correspondant au myrcène (témoin disponible au laboratoire) mais plusieurs autres composés ont été détectés (travaux en cours). Les analyses en CG-SM n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de tels monoterpènes dans notre échantillon. A ce stade de l'étude, il n'est malheureusement pas possible d'apporter des éléments permettant d'étayer l'hypothèse de formation de ces composés. Récemment, une étude sur la composition des huiles essentielles des écorces et des feuilles d'un *Fissistigma latifolium* provenant du Vietnam, analysé par CG-SM, a été publiée.²¹³ La très faible teneur en myrcène et l'abondance du γ -élémente (96) a été mise en évidence de ces huiles.



γ -élémente (96)

²¹³ Thang, T. D., et al.; *Nat. Prod. Res.* (2014); 28; 174-184.

2.4. Evaluation biologique

Seul le mélange racémique **75**, parmi toutes les molécules testées, a montré une inhibition de l'interaction Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid. L'évaluation biologique réalisée sur les énantiomères a permis de mettre en évidence une forte activité inhibitrice de l'interaction entre les deux protéines et leur peptide respectif par l'isomère dextrogyre, la (+)-écarlottone, alors qu'une inhibition plus faible n'est observée que sur la protéine Mcl-1 pour l'isomère lévogyre (cf. Tableau 34).

Tableau 34 : Activité biologique des seuls produits actifs isolés de *F. latifolium* sur Bcl-xL et Mcl-1.

	K_i , μM	
	Bcl-xL/Bak-CF	Mcl-1/Bid-CF
(\pm)-écarlottone	$17,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$	$3,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$
(-)-écarlottone	$> 23 \mu\text{M}$	$7,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$
(+)-écarlottone	$4,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$	$2,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$

Les courbes reflétant les interactions protéine-ligand pour chaque énantiomère sont présentées ci-après (cf. Figure 104 et Figure 105).

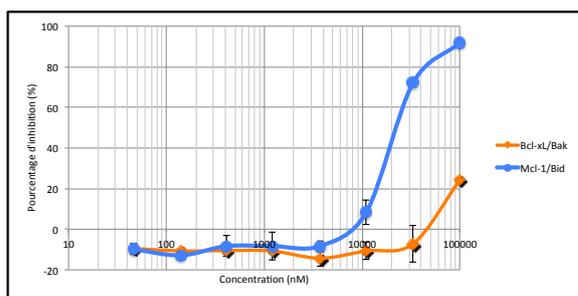


Figure 104 : Courbes dose-réponse obtenues pour la (-)-écarlottone (76) sur Bcl-xL et Mcl-1.

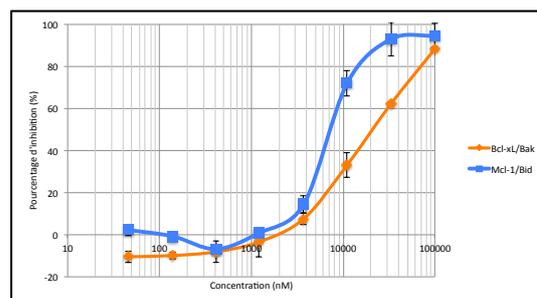


Figure 105 : Courbes dose-réponse obtenues pour la (+)-écarlottone (77) sur Bcl-xL et Mcl-1.

L'évaluation biologique a été poursuivie sur le mélange racémique **75** afin de mettre en évidence une cytotoxicité éventuelle des molécules sur cellules HUVEC, KB et plusieurs lignées cellulaires sur-exprimant Bcl-xL et/ou Mcl-1 (BL2, BL2/B95, BL28, LY47, RPMI8866, IARC211, Ramos, Ramos-Bcl-2). Aucune CI_{50} inférieure à $10 \mu\text{M}$ n'a été

mesurée sur le mélange racémique. Ce résultat nous permet de conclure qu'aucun énantiomère ne présente une activité cytotoxique significative sur ces lignées. L'absence de cytotoxicité des composés pourrait s'expliquer par un défaut de pénétration au niveau des membranes cellulaires en raison de leur caractère très hydrophile.

Conclusion

Le fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt des écorces de *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* a permis l'isolement du mélange racémique **75** conduisant à la caractérisation de la (+)-écarlottone, composé le plus actif. D'autre part, le "RMN-guidage" a permis l'isolement d'analogues pouvant être classés en deux groupes: (1) le premier présente le cyclohexène substitué par une chaîne prénylée, un cycle aromatique et une méthyle-cétone ou un acide carboxylique; (2) le second comprend des molécules avec un cycle additionnel à la place de la fonction carbonylée. Des interrogations se posent sur la présence originelle de certains composés dans la plante, notamment le composé **81**.

La présence d'isomères combinée à la dégradation des composés ont également été des facteurs limitant pour l'obtention d'analogues du **75**. Bien que les composés aient été traités avec précaution, *i.e.* évaporation des fractions au lyophilisateur, conservation sous argon à $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ et à l'abri de la lumière, nous n'avons pas été en mesure de trouver les conditions adéquates pour limiter la dégradation.

Aux problèmes de dégradations se sont ajoutés des problèmes de détermination structurale liés à la présence de tautomérie céto-énolique et à des squelettes déficients en protons au niveau du troisième cycle. La réalisation des RMN à basse température avec une faible quantité de pyridine deutérée a été déterminante pour l'élucidation structurale. Le déplacement chimique du proton à 17,6 ppm est représentatif de signaux correspondants à des hydroxyles énoliques "chélatés", présents notamment chez d'autres quinochalcones.²¹⁴

Dans le but d'appuyer l'hypothèse de biosynthèse de la formation du composé **75** à partir d'une quino-chalcone et du myrcène, il aurait été intéressant de rechercher, en plus du myrcène, la chalcone précurseur à l'origine de la formation de l'écarlottone.

Les modulations chimiques et l'hémisynthèse n'ont pas permis d'obtenir d'analogues du **75**. Dans la littérature, très peu d'exemples de réaction de cycloaddition sans

²¹⁴ Feng, Z.-M., *et al.*; *J. Nat. Prod.* (2013); 76; 270-274.

catayseur sur des chalcones ont été rapportées. Les réactions qui ont fonctionnées sont celles qui utilisent des conditions forcées¹⁸⁸ nécessitant l'emploi de catalyseurs, souvent difficiles à préparer. Il serait tout de même intéressant d'étudier de façon approfondie ces réactions de cycloadditon avec d'autres catalyseurs afin d'accéder à un plus large panel d'analogues de ces dérivés. Ceci permettrait de mieux appréhender les relations de structure–activité dans cette série.

Intercalaire rouge

Conclusion générale

Conclusion générale

Il est maintenant clairement établi que la sur-expression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL et Mcl-1 joue un rôle important dans le développement de cancers et qu'elles peuvent être corrélées à des résistances aux traitements chimiothérapeutiques. Ces protéines sont donc considérées comme des cibles potentiellement intéressantes pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux. Toutefois, l'inhibition stricte de Bcl-xL peut aboutir à l'échappement de l'apoptose *via* la voie de Mcl-1. La recherche d'inhibiteur *dual* est, par conséquent, essentielle pour restaurer le processus d'apoptose.

Ces travaux de thèse font suite à la collaboration établie entre l'Institut de Recherche Servier et notre équipe. Elle a permis de cribler une grande partie de l'extractothèque de l'ICSN sur Bcl-xL et de mettre en évidence de nouveaux inhibiteurs naturels avec des squelettes moléculaires particuliers comme la méiogynine A et les kingianines.

La mise au point des essais biologiques sur Bcl-xL et Mcl-1 et leur validation au cours de ces 3 années de doctorat ont permis à notre équipe d'acquérir une certaine autonomie dans la réalisation quotidienne de l'évaluation biologique sur les protéines cibles Bcl-xL et Mcl-1. D'autre part, ces travaux ont apporté un outil complémentaire (essai sur Mcl-1) nécessaire à la recherche de *dual* inhibiteurs. Ces deux tests employant la polarisation de fluorescence sont des tests *in vitro* facile à utiliser, relativement peu coûteux et qui permettent de cribler de nombreux composés et extraits. Cependant, je pense qu'il serait nécessaire de combiner nos essais par polarisation de fluorescence avec une autre technologie comme le BRET pour laquelle la longueur d'onde d'excitation des réactifs (*e.g.* DeepBlueCTM – 395 nm) serait différente de celle de la carboxyfluorescéine (485 nm) pour faire ressortir les extraits et composés auto-fluorescents et éviter les faux-positifs et faux-négatifs. De plus, l'utilisation d'un outil, comme la diffusion dynamique de la lumière ou *dynamic light scattering* en anglais (DLS) permettant de mettre en évidence l'agrégation de

particules, telles que des amas de protéines, aurait été un avantage. Cet appareil aurait pu nous apporter des informations concernant le premier couple employé dans l'essai, Mcl-1/Noxa, à savoir l'éventuelle association de plusieurs peptides Noxa-CF avec la protéine Mcl-1. L'agrégation des protéines entre elles lors de leur décongélation à température ambiante aurait également pu être démontrée grâce à la DLS. Pour finir, cet outil nous aurait probablement permis de mettre en exergue l'affinité de l'extrait AcOEt des écorces et tiges de *Knema hookeriana* pour les peptides Bid et Bak et ainsi nous aurait évité d'isoler des composés n'ayant pas d'affinité pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1.

Parmi les trois plantes sélectionnées au départ sur Bcl-xL pour ces travaux de thèse, *Litsea robusta* (Lauraceae) n'a pas été retenue à cause de l'auto-fluorescence de l'extrait et *Mitrephora maingayi* (Annonaceae) n'a pas révélé d'activité *dual* sur les deux cibles. Grâce aux deux essais sur Bcl-xL et Mcl-1, j'ai criblé près de 600 extraits qui m'ont permis de mettre en évidence plusieurs extraits actifs. Le choix des extraits de plantes à investiguer chimiquement a été effectué suite à l'étude bibliographique et spectrale des extraits les plus actifs.

L'activité de l'extrait AcOEt de *Knema hookeriana* (Myristicaceae) étant très élevée sur les deux protéines, Bcl-xL et Mcl-1 ($\approx 90\%$ d'inhibition), elle nous est apparue suspecte. Cependant, l'étude chimique de l'extrait AcOEt de cette plante n'avait jamais été réalisée et pouvait donc conduire à de nouvelles structures. 12 composés ont été isolés dont 5 ont été isolés pour la première fois (**46**, **47**, **53**, **56** et **57**). Parmi les acétophénones, les alkylphénols et les acides anacardiques isolés, seuls ces derniers (**50** à **56**) présentent de bonnes activités inhibitrices des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid avec les tests de polarisation de fluorescence. Ceci suggérerait que la fonction acide aurait une importance pour induire l'activité. L'analyse par RMN, réalisée par le Dr. G. Rivière de l'ICSN (équipe Dr. E. Guittet), a permis de mettre en évidence l'affinité du composé **52** pour le peptide Bid mais pas pour les protéines Bcl-xL et Mcl-1. Les composés purifiés ne possèdent pas l'activité inhibitrice *dual* sur Bcl-xL et Mcl-1 que nous recherchons.

Le fractionnement bioguidé de la seconde plante, *Fissistigma latifolium* (Annonaceae), nous a conduit à un composé nouveau et actif sur les deux cibles (Bcl-xL : $K_i = 4,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ et Mcl-1 : $K_i = 2,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$), baptisé (+)-écarlottone (**77**). Ce résultat valide notre méthodologie visant à rechercher des inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 à partir d'extraits de plante. Le "RMN-guidage" a permis l'isolement d'analogues, nouveaux, du composé **77**. La détermination structurale de certaines de ces

molécules a été clairement établie (**74**, **80**, **78** et **79**) alors que pour les produits **81** et **82**, elle reste incertaine. Les problèmes de détermination structurale liés à la faible densité de proton dans certaines parties des molécules et aux échanges céto-énoliques ainsi qu'à leur dégradation non pas pu être résolus. D'autre part, je pense qu'il aurait été judicieux de réfléchir à des techniques moins répandues comme la chromatographie de partage centrifuge ou les solvants eutectiques profonds (NADES) qui sont une alternative aux phases classiques telle que la silice. Ces techniques aurait probablement permis de purifier d'avantage du composé **77** ayant une forte affinité pour la silice. Les travaux effectués visant à élaborer des analogues hémi-synthétiques du composé actif, n'ont pas abouti aux résultats attendus mais ils nécessitent d'être approfondi. Des études RMN de la molécule **77**, identiques à celles réalisées sur l'acide anacardique **52**, doivent être réalisées. Elles confirmeraient l'affinité de ce composé pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1 puisque l'évaluation biologique du mélange racémique **75** *in cellulo* n'a pas décelé d'activité. Il est possible que ce composé ne traverse pas les membranes. D'un point de vue structural, les composés isolés sont très simples et leur biogenèse semble quasiment établie. Cependant, leur synthèse est à priori plus complexe que ce que l'on pouvait s'imaginer au départ. Ceci illustre l'intérêt de continuer utiliser la nature comme source de diversité chimique.

Personnellement, la réalisation de mes propres essais biologiques m'a beaucoup apporté et m'a permis d'avoir une grande autonomie dans la gestion de mon temps. J'ai pu mieux cerner les limites des essais utilisant la polarisation de fluorescence. Grâce aux essais sur Bcl-xL et Mcl-1, j'ai pu participer à d'autres projets de l'équipe qui ont ouvert mon esprit à l'analyse spectrale de d'autres squelettes moléculaires et à d'autres domaines que la chimie, la modélisation moléculaire et la RMN des protéines. La réalisation de l'évaluation biologique par soi-même n'a pas que des avantages. Elle prend beaucoup de temps et nécessite de répondre aux attentes des collègues qui vous confient leurs produits.

En ce qui concerne l'étude de la composition chimique de deux plantes, j'ai rencontré, majoritairement, deux types de squelettes différents. J'ai dû faire face à de nombreux problèmes de purification/dégradation et de détermination structurale que je n'ai pas pu résoudre. Cependant, l'étude phytochimique de *F. latifolium* s'est avérée bien plus enrichissante que celle de *K. bookeriana* à tout point de vue.

Intercalaire rouge

Partie 4 : Partie expérimentale

Chapitre 1

Procédures générales

1. Solvants et réactifs

Des solvants (SDS) de pureté 99% ont été utilisés pour les extractions et les premiers fractionnements, puis des solvants de qualité CLHP ou 100% (SDS) pour les séparations ultérieures. L'eau employée lors des séparations CLHP est de l'eau milliQ re-filtrée le jour de la manipulation au laboratoire avec l'appareil Millipore® Simplicity 185.

2. Techniques et appareils de biochimie

La mesure de la concentration en protéine a été réalisée par le NanoDrop 1000® Thermo Scientific en utilisant le logiciel ND1000 version 3.8.1.

La pureté des protéines a été vérifiée en réalisant un gel SDS-PAGE dont la composition pour 2 gels de 1 mm est la suivante :

Tableau 35 : Composition du gel SDS-Page.

	<i>Resolving gel 16%</i>	<i>Stacking gel</i>
Eau	6 ml	2,5 mL
Tampon Tris pH 8,8	4,5 ml	
Tampon Tris pH 6,8		1 mL
Acrylamide	7,5 ml	0,5 mL
APS	150 uL	75 uL
TEMED	5 uL	5 uL

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine

APS : ammonium persulfate

Le mélange de marqueurs PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific de 10 à 170 KDa a été utilisé pour évaluer le poids des protéines.

Tableau 36 : Poids des marqueurs constituant le PageRuler Prestained Protein Ladder.

Poids moléculaire des marqueurs (KDa)	Couleur
170	bleu
130	bleu
100	bleu
70	rouge
55	bleu
40	bleu
35	bleu
25	bleu
15	bleu
10	vert

Deux robots Beckman Coulter ont été utilisés pour distribuer les solutions dans les plaques 96 puits noir en polystyrène à fond plat (VWR 734-1622) : un BiomekNX (x8) et un Biomek3000 (x96). La polarisation de fluorescence (unité de millipolarisation) a été mesurée à l'aide d'un lecteur Beckman Coulter Paradigm[®] avec une cassette FP-carboxyfluorescein (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nm). Le temps d'exposition par canal est de 300 ms. Les données ont été collectées à l'aide du logiciel Biomek et ont été analysées avec le logiciel Microsoft Excel[®] 2010.

Les protocoles permettant la réalisation des deux essais biologiques sont présentés en Annexe.

3. Fractionnements, purifications et suivi des réactions

3.1. Chromatographie sur couches minces et épaisses

Les fractions issues des différentes séparations chromatographiques et les réactions ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de gel de silice 60 F₂₅₄ de 0,2 mm d'épaisseur sur un support d'aluminium (SDS). Les plaques ont été visualisées dans un premier temps sous UV (à 254 366 nm) avant d'être révélées par

pulvérisation d'un révélateur puis chauffage. Deux révélateurs ont été principalement employés :

- Réactif à l'acide sulfomolybdique (10 g de molybdate d'ammonium dans 900 mL d'eau + 100 mL d'acide sulfurique)
- Réactif à la vanilline sulfurique (10 g de vanilline dans 1L de EtOH + 20 mL d'acide sulfurique)

Les purifications par chromatographie sur couche épaisse (CCE) ont été réalisées avec des plaques préparatives de gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck) d'épaisseur 0,5, 1 ou 2 mm en fonction de la quantité à purifier.

3.2. Chromatographie liquide moyenne pression

Les filtrations sur polyamide ont été réalisées sur Büchner sous vide avec la MN-polyamide-DC-6 Macherey-Nagel. Une colonne de LH20 Sephadex[®] a été réalisée en utilisant une colonne de verre en poussant l'éluant par de l'air comprimé (3 bar).

Les chromatographies flash ont été effectuées sur un appareil CombiFlash[®] Rf 200i Teledyne Isco en utilisant des colonnes prépackées en phase normale RediSep[®] Teledyne Isco (120 g) ou Interchim puriFlash (120 g).

Les échantillons ont été injectés par dépôt solide en les adsorbants sur de la célite (Clarcel, SDS).

3.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les chromatographies haute performance ont été réalisées sur trois appareils :

- une chaîne Alliance Waters 2695 et une chaîne Waters *autopurification system* (Waters 2767 Sample Manager) équipée d'une pompe binaire (Waters 2525). Ces deux appareils sont munis d'un détecteur à barrette de diode (190-600 nm, Waters 2996) et d'un détecteur à diffusion de lumière DEDL (Polymer Laboratoire PL-ELS 1000), et sont pilotés par le logiciel MassLynx.

- une chaîne Dionex, équipée d'une pompe Thermo Scientific UltiMate HPG-3200BX, d'un injecteur Gilson 215, d'un détecteur à barrette de diode Dionex UVD340U et à diffusion de lumière DEDL (Polymer Laboratoire PL-ELS 1000), et est pilotée par le logiciel Chromeleon.

Le gradient générique utilisé est le suivant :

Tableau 37 : Gradient psn.

Temps (mn)	ACN	H ₂ O
	+ 0,1 % HCOOH (%)	+ 0,1 % HCOOH (%)
0	20	80
11	20	80
24	80	20
43	100	100
74	100	100
78	80	20
94	80	20

Quatre colonnes ont été employées avec cet appareil :

- analytique C₁₈ Thermohypersil Kromasil® (5 µm, 4,6 x 250 mm) avec un débit 1 ml.mn⁻¹
- semi-preparative C₁₈ Thermohypersil Kromasil® (5 µm, 10 x 250 mm) avec un débit 4,7 ml.mn⁻¹
- preparative C₁₈ Thermohypersil Kromasil® (5 µm, 21,2 x 250 mm) avec un débit 21 ml.mn⁻¹
- analytique PFP Nucléodur® (5 µm, 4,6 x 250 mm) avec un débit 1 ml.mn⁻¹

3.4. Chromatographie ultra haute performance (UPLC)

Les chromatographies UPLC-SM sont réalisées sur un système Acquity Waters avec un détecteur PDA (210 à 410 nm). Les séparations sont obtenues sur une colonne BEH C₁₈ (1,7 µm, 2.1 mm × 50 mm) avec un débit de 0,6 ml.mn⁻¹ selon le gradient suivant :

Tableau 38 : Gradient UPLC.

Temps (mn)	ACN	H ₂ O
	+ 0,1 % HCOOH (%)	+ 0,1 % HCOOH (%)
0	5	95
2,25	5	95
5,5	100	0
7	100	0

Le système est couplé à un spectromètre de masse.

3.5. Chromatographie en phase supercritique (CPS)

Les purifications par CPS ont été effectuées sur un appareil Thar® SFC, muni d'un four Analytical-2-prep Oven, d'une pompe à quatre voies, d'un collecteur et de deux détecteurs : détecteurs Waters 2998 (Photodiode Array) et 2424 (ELS). L'appareil est piloté par le logiciel Chroméléon.

Deux colonnes ont été employées avec cet appareil :

- chirale analytique AD-H Chiralpak® (5 μm , 4,6 x 150 mm)
- 2-éthyl-pyridine Princeton® (5 μm , 4,6 x 150 mm)

4. Analyses physiques et spectrales des composés

4.1. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Anton Paar MCP200. La source lumineuse monochromatique est la raie D du sodium. Les expériences ont été réalisées avec une cuve de 1 cm.

4.2. Dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco J-810 (logiciel Spectro Manager). Les expériences ont été réalisées dans une cuve en quartz de 1 cm à température ambiante.

4.3. Spectrométrie ultra-violet (UV)

Les spectres d'absorption UV ont été mesurés dans une cuve en quartz de 1 cm, avec un spectromètre Varian Cary 100 Scan équipé du logiciel CaryWing (programme Scan).

4.4. Spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse est un appareil Waters LCT Premier XE équipé d'une source d'ionisation électrospray. L'ionisation est réalisée en mode positif ou négatif entre m/z 80 et 1500.

4.5. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées sur des appareils Brüker Avance 300, 500, 600 ou 950 MHz en utilisant le chloroforme- d , la pyridine- d_5 ou l'eau- d_2 .

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (partie par million) et calibrés par rapport au solvant pris comme référence interne. Les valeurs des δ des solvants sont celles publiées par Cambridge Isotope Laboratories, Inc. et rapportées dans le tableau ci-après.

Tableau 39 : Déplacements chimiques de référence des solvants deutérés.

Solvant	C (ppm) (multiplicité)	H (ppm) (multiplicité)
CDCl ₃	77,23 (3)	7,24 (1)
Pyr- d_5	123,9 (3)	7,22 (1)
	135,9 (3)	7,58 (1)
	150,3 (3)	8,74 (1)
D ₂ O		4,80 (1)

Les constantes de couplage sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet) et br pour large (*broad*). L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D ¹H, ¹³C, associées aux expériences 2D ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC et ¹H-¹H NOESY ou ROESY, en utilisant le logiciel NoteBook.

Chapitre 2

Extraction et purification

1. *Knema hookeriana* (Hk. F. & Th) Warb.

350 mg d'extrait AcOEt ont été soumis à une CLHP préparative sur une C₁₈ Kromasil® à 21 mL.mn⁻¹, en utilisant le gradient suivant :

Tableau 40 : Gradient *K. hookeriana*.

Temps (mn)	ACN	H ₂ O
	+ 0,1 % HCOOH (%)	+ 0,1 % HCOOH (%)
0	80	20
40	80	20
60	90	10
70	90	10

Cette purification a permis d'obtenir trois fractions (**F1**, **F7**, **F14**) et les khookerianones A (**46**) (6 mg) et B (**47**) (4 mg), les acides khookerianique A (**50**) (2 mg), B (**53**) (25 mg) et C (**56**) (3mg), le 3-tridécylphénol (**48**) (4mg), le 3-(*Z*-tridécényl)-phénol (**49**) (3mg), l'acide anagigantique (**51**) (96 mg), l'acide 2-hydroxy-6-tridécylbenzoïque (**52**) (31 mg), l'acide 2-hydroxy-6-((*Z*)-tridécényl)benzoïque (**54**) (74 mg) et l'acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque (**55**) (13 mg).

La fraction **F7** (5 mg) a été soumise à une CCE en phase normale éluée avec n-heptanes : AcOEt (80 : 20). La silice a été grattée, placée sous agitation dans de l'isopropanol (IPA) puis filtrée conduisant à la khookerianone C (**57**) (3 mg).

Une réaction d'ozonolyse a été réalisée sur les composés **47**, **53**, **57**, **54**, **49** et **55**. Le composé est solubilisé dans le DCM dans un ballon bicol placé dans un bain de carboglace avec de l'acétone ($-78\text{ }^{\circ}\text{C}$) sous agitation et sous atmosphère N_2 . Un flux d' O_3 est ajouté dans la solution. Lorsqu'elle devient bleue, le ballon est remplacé dans une atmosphère de N_2 . Du sulfure de diméthyle est ajouté en excès à la solution. Après évaporation, le brut réactionnel est injecté en CLUP-SM.

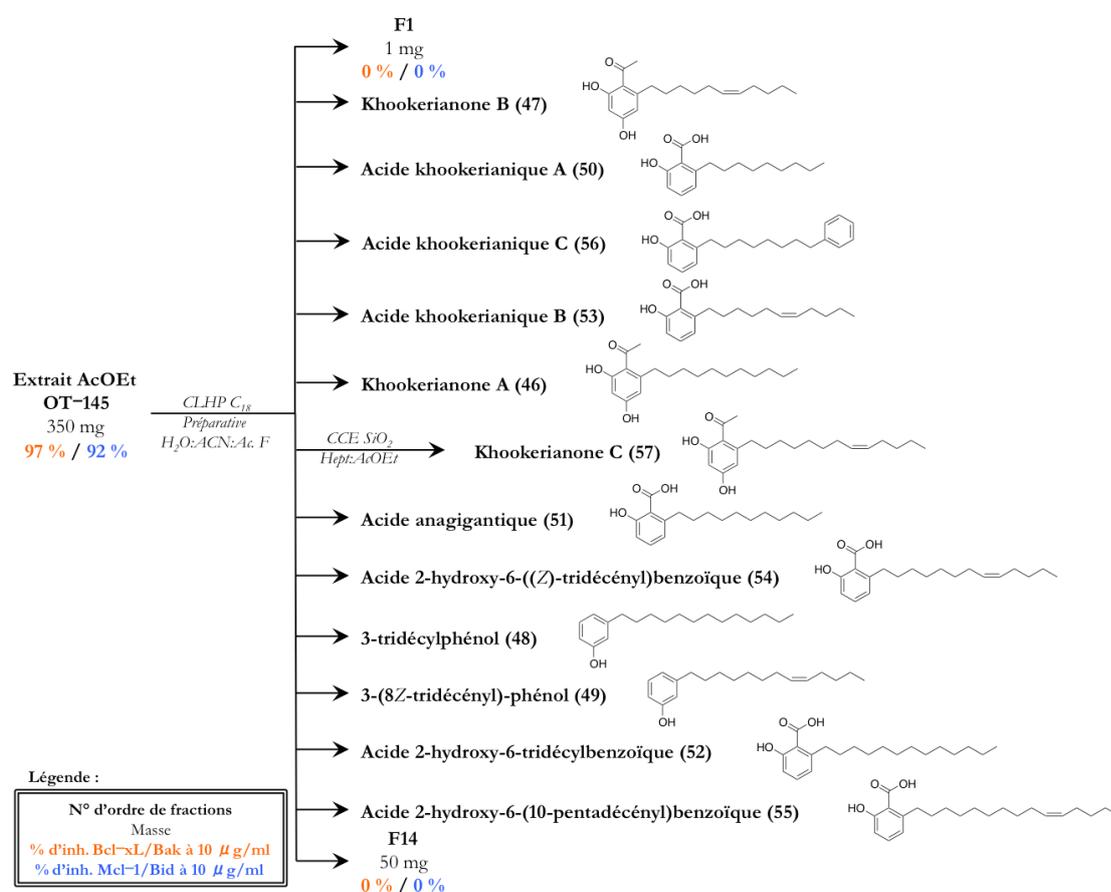


Figure 106 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces et tiges de *K. hookeriana* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.

Tableau 41 : Rendements d'extraction globaux rapportés à l'extrait AcOEt de *K. hookeriana*.

N° composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (%)
46	Khookerianone A	6	1,71
47	Khookerianone B	4	1,14
57	Khookerianone C	3	0,86
48	3-tridécylphénol	4	1,14
49	3-(8Z-tridécényl)-phénol	3	0,86
50	Acide khookerianique A	2	0,57
51	Acide anagigantique	96	27,43
52	Acide 2-hydroxy-6-tridécylbenzoïque	31	8,86
53	Acide khookerianique B	25	7,14
54	Acide 2-hydroxy-6-((Z)-tridécényl)benzoïque	74	21,14
55	Acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque	13	3,71
56	Acide khookerianique C	3	0,86

2. *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinclair

2.1. 1^{ère} extraction

L'écorce broyée et séchée (1,5 kg) de *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinclair (récolte KL-4426) a été extraite par l'AcOEt (3 x 3 L) et par le MeOH (3 x 3 L) à 40 °C et 100 bars, en utilisant l'extracteur automatique Zippertex[®] de l'Atelier-Pilote de l'ICSN-CNRS, à Gif sur Yvette. Les deux extraits bruts ont été concentrés sous vide à -40 °C permettant d'obtenir 24,6 g et 47,3 g.

24 g d'extrait AcOEt ont été filtrés sur polyamide menant à 16,4 g d'extrait brut filtrés qui ont été soumis à une chromatographie flash en phase normale. Cette chromatographie a été réalisée sur une colonne RediSep[®] Teledyn Isco (120 g) en suivant le gradient n-Heptanes:DCM (100:0 à 0:100), DCM:MeOH (100:0 à 80:20), conduisant ainsi à 25 fractions notées **F1** à **F25**, rassemblées sur la base de leurs profils CCM.

L'injection de la fraction **F12** en CLHP préparative sur colonne C₁₈ Kromasil[®] en utilisant un isocratique H₂O:ACN (50:50) a permis l'obtention de la desméthoxyyangonine (**72**) (1,5 mg) et de la (±)-didymocarpine (**73a**) (1 mg). Le très faible rendement total de cette purification ($\rho = 50 \%$) nous a conduit à effectuer un rinçage de la colonne. Il a été

réalisé avec un mélange IPA:DCM (50:50) conduisant à la récupération de composés des CLHP précédentes, des autres manipulateurs, et de la (±)-écarlottone (**75**) non purifiée.

La purification de 50 mg de **F10** par CLHP C₁₈ Kromasil[®] préparative en isocratique H₂O:ACN (35:65) a permis d'isoler 2 mg de l'acide (±)-fislatifolique (**74**). Le rendement de cette purification étant de 50 %, une seconde purification a été entreprise en utilisant les mêmes conditions CLHP mais en ajoutant de l'acide formique. La purification de 200 mg de **F10** avec un rendement total de 70 %, a conduit à l'acide (±)-fislatifolique (**74**) (13 mg) et à la (±)-écarlottone (**75**) (20 mg). Afin d'améliorer encore le rendement total de la purification, une troisième CLHP a été entreprise sur 500 mg mais en remplaçant l'acide formique par de l'acide trifluoroacétique. Le rendement a été augmenté de 20 % soit un rendement total de 90 %. Cependant, cette purification n'a permis l'isolement que de la (±)-écarlottone (**75**) (60 mg) car l'acide (±)-fislatifolique semble s'être dégradé lors de l'évaporation des solvants d'extraction.

Les problèmes rencontrés lors des purifications précédentes, nous ont entraîné à tester plusieurs techniques de purification sur la fraction **F9**. 200 mg ont tout d'abord été soumis à une colonne ouverte de LH20 Sephadex[®] avec un mélange MeOH:CHCl₃ (2:1) conduisant à des fractions enrichies en (±)-écarlottone (**75**) avec un bon rendement totale de 95 %. Une CCE en phase normale éluée avec CHCl₃:MeOH:Ac. F. a également été réalisée mais le composé **75** n'a pas pu être séparé de la silice. Pour finir, une CLHP du reste de la fraction **F9** en C₁₈ Kromasil[®] préparative utilisant un isocratique H₂O:ACN: + 0,1 % Ac. F. (35:65) s'est avérée être la technique la plus efficace pour d'obtenir la (±)-écarlottone pure (150 mg).

30 mg du mélange racémique **75**, solubilisés dans l'IPA, ont été soumis à une CPS sur colonne chirale analytique AD-H Chiralpak[®] à 100 bars à 25 °C en isocratique en utilisant CO₂:IPA + 0,2 % TFA (92:8). Les énantiomères ont du être repurifiés suite à une contamination par des phtalates. Parmi les trois techniques utilisées : CLHP C₁₈ Kromasil[®], partition liquide-liquide pentane:ACN (50:50) et extraction sur cartouche de phase C₁₈, la plus efficace en terme de rendement et pureté est l'extraction sur cartouche. Respectivement, 2 et 3 mg de (-) et (+)-écarlottone ont été purifiés.

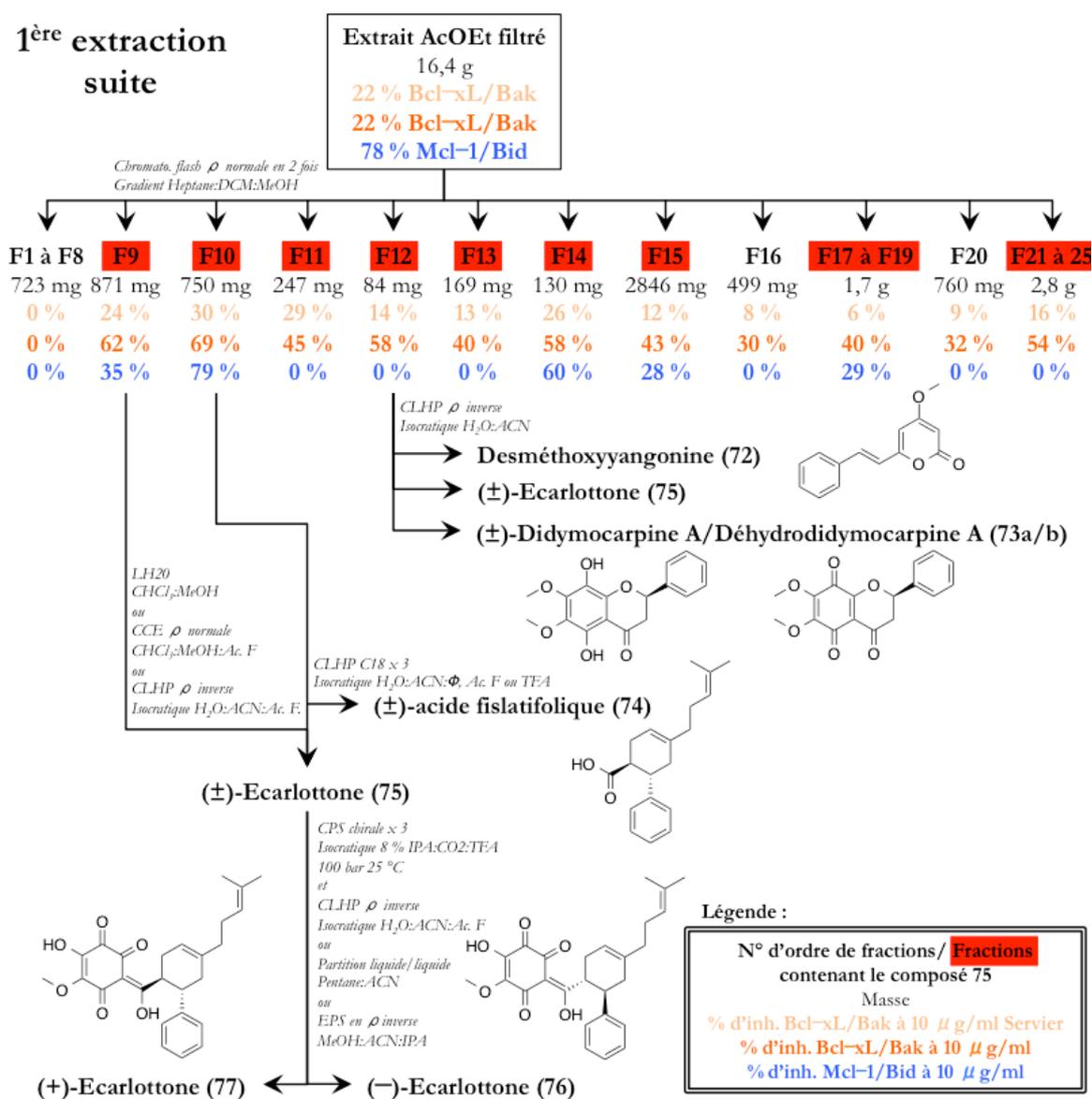


Figure 107 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.

Tableau 42 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de plante sèche *F. latifolium*.

N° composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (%)
72	Desméthoxyyangonine	1,5	$1,5 \cdot 10^{-4}$
73a/b	(±) Didymocarpine A/ Déhydrodidymocarpine A	1	$1,0 \cdot 10^{-4}$
74	(±) Acide flatifolique	15	$1,5 \cdot 10^{-3}$
75	(±)-Ecarlottone	230	$1,5 \cdot 10^{-2}$
76	(-)-Ecarlottone	2	$2,0 \cdot 10^{-4}$
77	(+)-Ecarlottone	3	$3,0 \cdot 10^{-4}$

2.2. 2^{ème} extraction

L'écorce broyée et séchée (917 g) de *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinclair (récolte KL-4426) a été extraite par l'AcOEt (3 x 4,5 L) et par le MeOH (3 x 3,5 L) à 40 °C et 100 bars, en utilisant l'extracteur automatique Zippertex[®] de l'Atelier-Pilote de l'ICSN-CNRS, à Gif sur Yvette. Les deux extraits bruts ont été concentrés sous vide à -40 °C permettant d'obtenir 22,3 g et 34,2 g.

Les 22,3 g d'extrait AcOEt ont été filtrés sur polyamide menant à 7,9 g d'extrait brut filtrés qui ont été soumis à une chromatographie flash en phase normale. Cette chromatographie a été réalisée sur une colonne Interchim puriFlash (120 g) en suivant le gradient n-Heptanes:DCM (100:0 à 0:100), DCM:MeOH (100:0 à 50:50), DCM:MeOH:TFA (50:50:0,1) conduisant ainsi à 20 fractions notées **F'1** à **F'20**, rassemblées sur la base de leurs profils CCM.

L'injection de **F'11** (52 mg) en CLHP semi-préparative sur colonne C₁₈ Kromasil[®] en utilisant un isocratique H₂O:ACN + 0,1 % Ac. F. (30:70) a conduit à l'obtention des (±)-fislatifolione (**78**) (5 mg) et (±)-isofislatifolione (**79**) (2 mg).

La fraction **F'19** (4 g) a été soumise à une chromatographie flash en phase normale sur une colonne Interchim puriFlash (120 g) en suivant le gradient n-Heptane:DCM (50:50 à 0:100), DCM:MeOH (100:0 à 80:20), DCM:MeOH:TFA (80:20:0,1 à 50:50:0,1) conduisant ainsi à 10 fractions notées **F'191** à **F'1910**, rassemblées sur la base de leurs profils CCM et CLHP C₁₈ Kromasil[®] analytique en utilisant le gradient psn.

La fraction **F'196** (540 mg) a été injectée en CLHP préparative sur colonne C₁₈ Kromasil[®] en utilisant un isocratique H₂O:ACN + 0,1 % Ac. F. (20:80) a permis l'obtention des composés **82** (4 mg) et (±)-écarlottone (**75**) (70 mg).

La fraction **F'195** (2,6 g) a été soumise à une chromatographie Flash en phase normale sur une colonne Interchim puriFlash (120 g) en suivant le gradient DCM:MeOH:TFA (100:0:0,1 à 70:30:0,1) conduisant ainsi à 24 fractions notées **F'19-51** à **F'19-524**, rassemblées sur la base de leurs profils CCM et CLHP C₁₈ analytique en utilisant le gradient psn.

La purification de **F'19-52** en CLHP C₁₈ Kromasil[®] semi-préparative en utilisant un isocratique H₂O:ACN + 0,1 % Ac. F. (30:70) a conduit à l'obtention des composés régioisomères **74** et **80** en mélange 1:1 (2 mg). Une séparation de ces isomères est réalisable

en CLHP avec la colonne analytique PFP Nucléodur[®] en 30 mn dans les conditions H₂O:ACN + 0,1 % Ac. F. (55:45).

L'injection de **F¹⁹⁻⁵10** (110 mg) en CLHP semi-préparative sur colonne C₁₈ Kromasil[®] en utilisant un isocratique H₂O:ACN + 0,1 % Ac. F. (20:80) a conduit aux composés **82** (7 mg) et au mélange contenant **81** (8 mg). Il est possible de séparer les composés de ce mélange par CPS en utilisant la colonne 2-éthyl-pyridine Princeton[®] à 150 bars et à 40 °C en mode gradient :

Tableau 43 : Gradient CPS 2-éthyl-pyridine.

Temps (mn)	MeOH + 0,1 % TFA (%)	CO ₂ (%)
0	15	85
8	15	85
10	30	70
12	30	70

Le composé **82** a été isolé à partir des fractions **F¹⁹⁻⁵11** (55 mg) et **F¹⁹⁻⁵12** (77 mg) en mélange avec son régioisomère en proportion 3/1 dans **F¹⁹⁻⁵11** (3 mg) et 1/1 dans **F¹⁹⁻⁵12** (3,5 mg) par CLHP C₁₈ Kromasil[®] préparative en utilisant un isocratique H₂O:ACN + 0,1 % Ac. F. (50:50). Le composé **82** peut être séparé de son régioisomère par CLHP avec la colonne analytique PFP Nucléodur[®] en 50 mn dans les conditions H₂O:ACN:MeOH + 0,1 % Ac. F. (40:30:30). Suite à la dégradation partielle du composé **82**, il a été re-purifié 7 fois en utilisant les mêmes conditions que celles utilisées pour la purification de **F¹⁹⁻⁵10**.

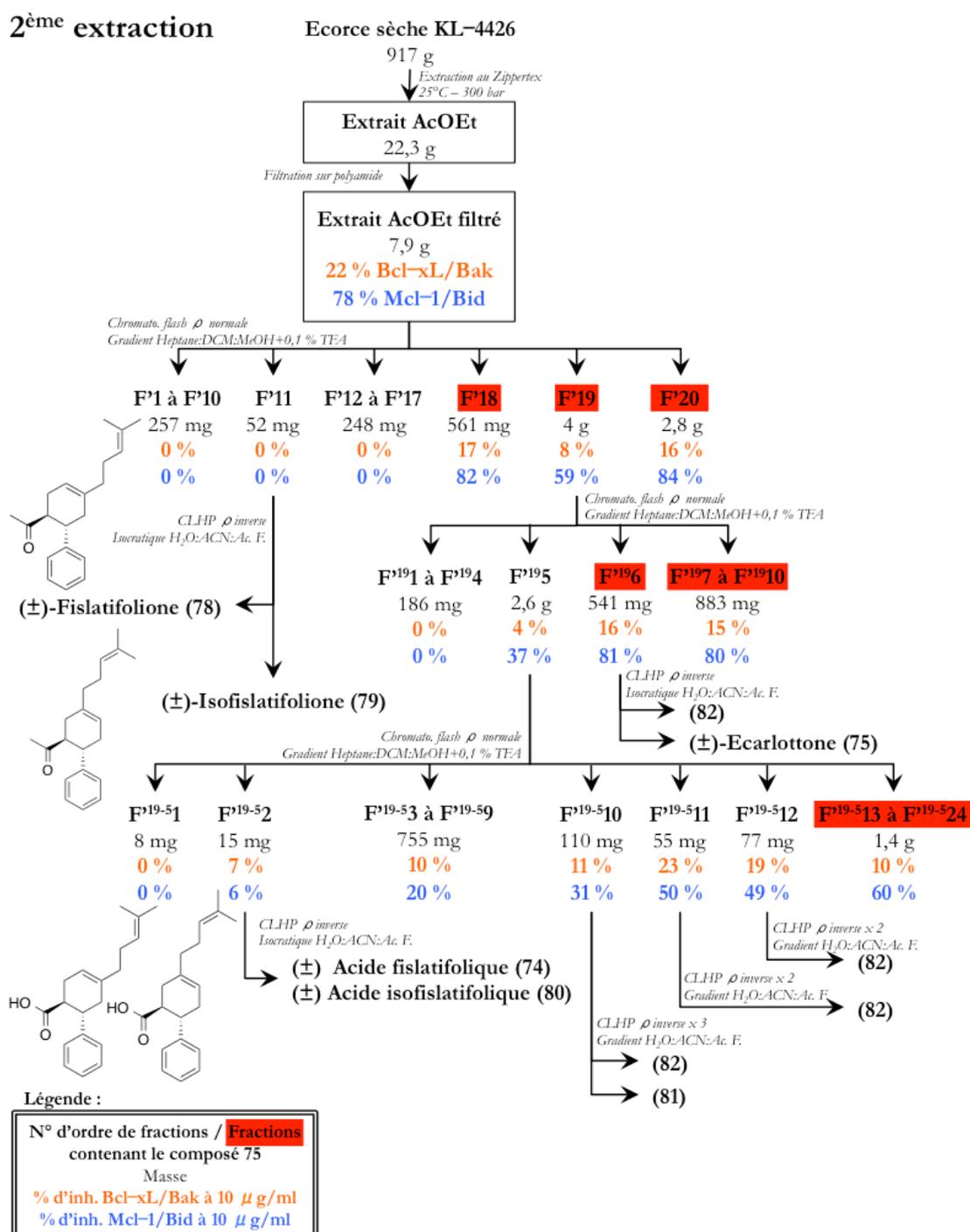


Figure 108 : Schéma de purification des composés à partir de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* – activités biologiques exprimées en pourcentage d'inhibition des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid.

Tableau 44 : Rendements d'extraction globaux rapportés au poids de la plante sèche *F. latifolium*.

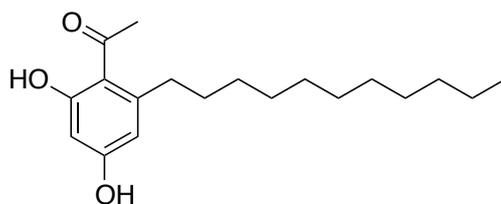
N° composé	Nom	Masse (mg)	Rendement (%)
75	(±)-Ecarlottone	70	$7,6 \cdot 10^{-3}$
78	(±)-Fislatifolione	5	$5,5 \cdot 10^{-4}$
79	(±)-Isofislatifolione	2	$2,2 \cdot 10^{-4}$
82	—	0,5	$5,5 \cdot 10^{-5}$
74	(±) Acide fislatifolique	2	$2,2 \cdot 10^{-4}$
80	(±)-Acide isofislatifolique	2	$2,2 \cdot 10^{-4}$
81	—	8	$8,7 \cdot 10^{-4}$

Chapitre 3

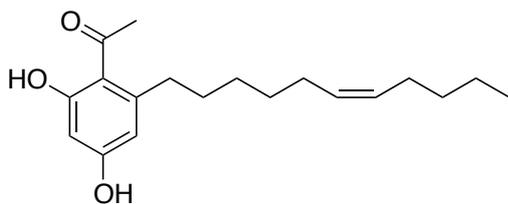
Caractéristiques physiques et spectrales des produits isolés

1. *Knema bookeriana* (Hk. F. & Th) Warb.

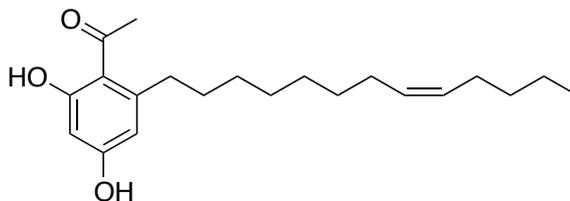
Type acétophénone



Khookerianone A (46)

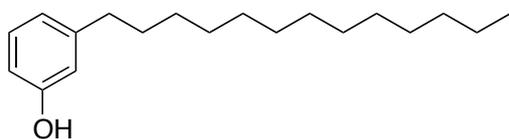


Khookerianone B (47)

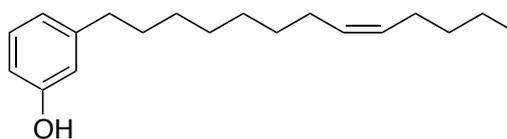


Khookerianone C (57)

Type alkylphénol

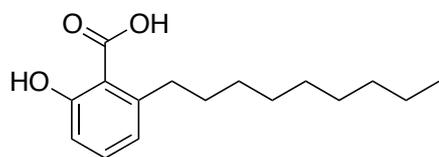


3-tridécylphénol (48)

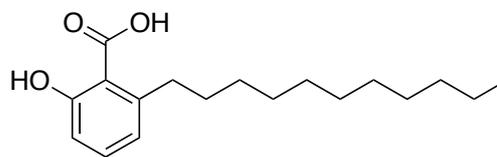


3-(8Z-tridécényl)-phénol (49)

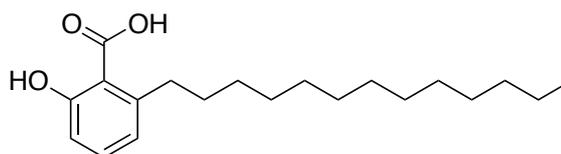
Type acide anacardique



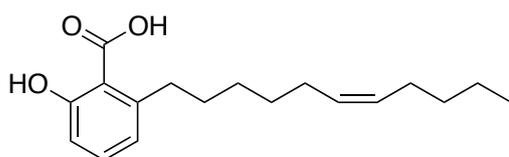
Acide khookerianique A (50)



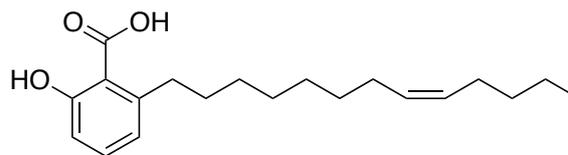
Acide anagigantique (51)



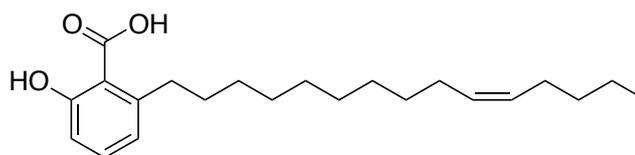
Acide 2-hydroxy-6-tridécybenzoïque (52)



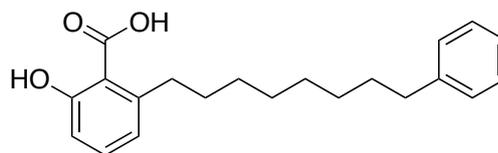
Acide khookerianique B (53)



Acide 2-hydroxy-6-((Z)-tridécényl)benzoïque (54)

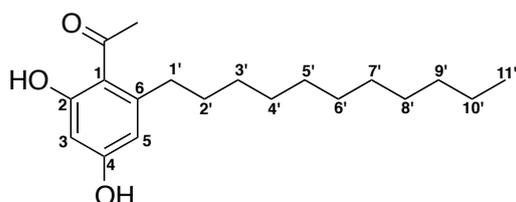


Acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque (55)



Acide khookerianique C (56)

Khookerianone A (46)



$C_{19}H_{30}O_3$
 $M = 306,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana

$\rho = 1,71 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$

Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : solide marron pâle

Temps de rétention : $T_r = 40,25 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z \approx 307,2270$ (calculée pour $C_{19}H_{31}O_3$, 307,2268)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 292 nm (3,65)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 3315 ; 2922 ; 2853 ; 1615 ; 1588 ; 1454 ; 1360 ; 1259 ; 1160

RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) :

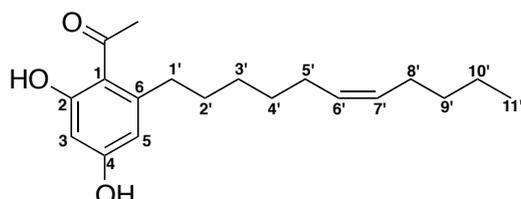
δ (ppm) : 2,62 (3H, s, $COCH_3$) ; 13,00 (1H, s, 2-OH) ; 6,22 (1H, d, 2,4 Hz, H-3) ; 5,55 (1H, br s, 4-OH) ; 6,24 (1H, d, 2,4 Hz, H-5) ; 2,81 (2H, t, 7,4 Hz, H-1') ; 1,57 (2H, m, H-2') ; 1,24 (16H, m, H-3' – H-10') ; 0,86 (3H, t, 6,7 Hz, H-11')

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 32,5 ($COCH_3$) ; 204,5 (CO) ; 115,5 (C-1) ; 166,2 (C-2) ; 101,9 (C-3) ; 161,0 (C-4) ; 110,8 (C-5) ; 148,1 (C-6) ; 36,6 (C-1') ; 32,4 (C-2') ; 29,5 – 29,9 (C-3 – C-8') ; 32,1 (C-9') ; 22,9 (C-10') ; 14,3 (C-11')

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-6

Khookerianone B (47)



$C_{19}H_{28}O_3$
 $M = 304,4 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :
 Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 1,14 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques
 Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \text{ }\mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \text{ }\mu\text{M}$

Aspect : huile jaunâtre

Temps de rétention : $Tr = 35,53 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 305,2115 (calculée pour $C_{19}H_{29}O_3$, 305.2111)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 294 nm (3,60)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 3335 ; 2915 ; 2850 ; 1617 ; 1590

RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$) :

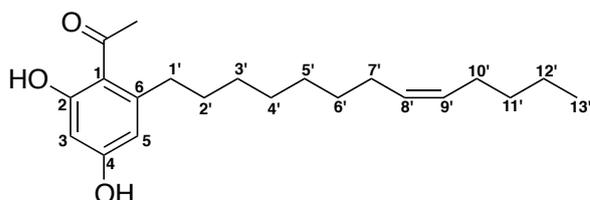
δ (ppm) : 2,62 (3H, s, $COCH_3$) ; 12,96 (1H, s, 2-OH) ; 6,22 (1H, d, 2,5 Hz, H-3) ; 5,70 (1H, br s, 4-OH) ; 6,23 (1H, d, 2,5 Hz, H-5) ; 2,81 (2H, t, 8,0 Hz, H-1') ; 1,57 (2H, m, H-2') ; 1,29 (8H, m, H-3', H-4', H-9', H-10') ; 2,00 (2H, m, H-5', H-8') ; 5,33 (2H, m, H-6', H-7') ; 0,87 (3H, t, 7,1 Hz, H-11')

RMN ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 32,5 ($COCH_3$) ; 204,5 (CO) ; 115,6 (C-1) ; 166,3 (C-2) ; 101,9 (C-3) ; 161,0 (C-4) ; 110,7 (C-5) ; 147,9 (C-6) ; 36,5 (C-1') ; 32,4 (C-2') ; 29,6 – 29,9 (C-3', C-4') ; 27,2 – 27,3 (C-5', C-8') ; 129,5 – 130,5 (C-6', C-7') ; 32,1 (C-9') ; 22,6 (C-10') ; 14,2 (C-11')

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-2

Khookerianone C (57)



$C_{21}H_{32}O_3$
 $M = 332,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 0,86 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \text{ }\mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \text{ }\mu\text{M}$

Aspect : huile jaunâtre

Temps de rétention : $T_r = 40,95 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z \approx 333,2421$ (calculée pour $C_{21}H_{33}O_3$, 333,2424)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 294 nm (3,75)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 3330 ; 2920 ; 2853 ; 1619 ; 1588

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 2,81 (3H, s, $COCH_3$) ; 12,99 (1H, s, 2-OH) ; 6,23 (2H, d, 2,5 Hz, H-3, H-5) ; 5,55 (1H, br s, 4-OH) ; 6,23 (1H, m, H-5) ; 2,81 (2H, t, 7,7 Hz, H-1') ; 1,58 (2H, m, H-2') ; 1,29 – 1,30 (12H, m, H-3' – H-6', H-11', H-12') ; 1,98 – 2,00 (2H, m, H-7', H-10') ; 5,33 (2H, m, H-8', H-9') ; 0,87 (3H, t, 7,1 Hz, H-13')

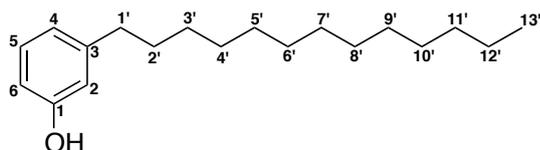
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 32,5 ($COCH_3$) ; 204,4 (CO) ; 115,5 (C-1) ; 166,2 (C-2) ; 101,9 (C-3) ; 161,1 (C-4) ; 110,8 (C-5) ; 148,0 (C-6) ; 36,6 (C-1') ; 32,4 (C-2') ; 29,2 – 29,9 (C-3' – C-6') ; 27,1 – 27,4 (C-7', C-10') ; 129,9 – 130,2 (C-8', C-9') ; 32,2 (C-11') ; 22,6 (C-12') ; 14,2 (C-13')

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-7

3-tridecylphenol (48)

Synonyme(s) : aucun synonyme rapporté dans la littérature



$C_{19}H_{32}O$

$M = 276,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana

$\rho = 1,14 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \text{ }\mu\text{M}$

Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \text{ }\mu\text{M}$ (40 ± 10
% à $100 \text{ }\mu\text{M}$)

Aspect : huile jaunâtre

Temps de rétention : $Tr = 46,62 \text{ min}$

(gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 277,2530 (calculée pour $C_{19}H_{33}O$, 277,2526)

UV, (MeOH) λ_{max} : littérature

275 nm ; 280 nm

IR, ν_{max} en cm^{-1} : littérature

3350 ; 2920 ; 2850 ; 1580 ; 1460 ; 1360 ; 1260 ; 1145

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 4,66 (1H, s, OH-1) ; 6,64 (1H, br dd, H-2) ; 6,73 (1H, dd, $J = 7,6 ; 2,5 \text{ Hz}$, H-4) ; 7,11 (1H, td, $J = 7,6 ; 1,7 \text{ Hz}$, H-5) ; 6,62 (1H, dd, $J = 7,9 ; 2,5 \text{ Hz}$, H-6) ; 2,53 (2H, t, 7,4 Hz, H_2-1') ; 1,57 (2H, m, H_2-2') ; 1,24 – 1,29 (20H, br m, $H_2-3' - H_2-12'$) ; 0,86 (3H, t, 6,8 Hz, H-13')

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :

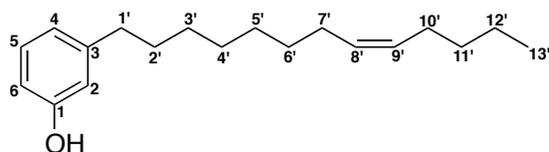
δ (ppm) : 155,7 (C-1) ; 115,5 (C-2) ; 145,2 (C-3) ; 121,2 (C-4) ; 129,6 (C-5) ; 112,7 (C-6) ; 36,1 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,6 – 29,9 (C-3' – C-10') ; 31,5 (C-11') ; 22,9 (C-12') ; 14,3 (C-13')

Référence : Composé n°5, Kazlauskas *et al.*, *Aust. J. Chem.*, **1980**, 33, 2097–101.

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-10

3-(8Z-tridecenyl)-phenol (49)

Synonyme(s) : aucun synonyme rapporté dans la littérature



$C_{19}H_{30}O$
 $M = 274,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :
 Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 0,86 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques
 Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \text{ }\mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \text{ }\mu\text{M}$

Aspect : huile jaunâtre

Temps de rétention : $T_r = 46,70 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 275,2376 (calculée pour $C_{19}H_{31}O$, 275,2369)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) : littérature
 217 (3,72) ; 273 nm (3,21) ; 280 nm (3,14)

IR, ν_{max} en cm^{-1} : littérature
 3455 ; 2926 ; 2855 ; 1589 ; 1264 ; 1156 ; 693

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 4,64 (1H, s, OH-1) ; 6,64 (1H, br dd, H-2) ; 6,73 (1H, dd, $J = 7,6 ; 2,5 \text{ Hz}$, H-4) ; 7,12 (1H, td, $J = 7,6 ; 1,7 \text{ Hz}$, H-5) ; 6,62 (1H, dd, $J = 8,0 ; 2,5 \text{ Hz}$, H-6) ; 2,53 (2H, t, 7,8 Hz, H_2-1') ; 1,57 (2H, m, H_2-2') ; 1,24 – 1,29 (12H, br m, $H_2-3' - H_2-6'$, H-11', H-12') ; 1,99 (4H, m, H-7', H-10') ; 5,33 (2H, m, H-8', H-9') ; 0,87 (3H, t, 7,0 Hz, H-13')

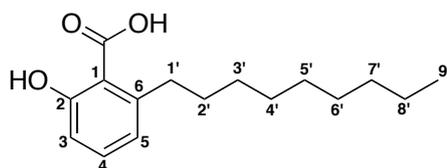
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 155,6 (C-1) ; 115,5 (C-2) ; 145,2 (C-3) ; 121,2 (C-4) ; 129,6 (C-5) ; 112,6 (C-6) ; 36,0 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,6 – 29,9 (C-3' – C-6') ; 27,1 – 27,4 (C-7', C-10') ; 130,0 – 130,1 (C-8', C-9') ; 31,5 (C-11') ; 22,6 (C-12') ; 14,2 (C-13')

Référence : Composé n°2, Alen *et al.*, *Z. Naturforsch.*, **2000**, 55c, 300–303.
 Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-11

Acide khookerianique A (50)

Synonyme(s) : acide 2-nonyl-6-oxidanyl-benzoïque


 $C_{16}H_{24}O_3$
 $M = 264,4 \text{ g.mol}^{-1}$
Obtention :

 Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 0,57 \text{ \% p/e}$
Activités biologiques

 Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$ ($18 \pm 0,3 \text{ \%}$ à $100 \mu\text{M}$)

 Mcl-1/Bid : $K_i = 17,7 \pm 3,1 \mu\text{M}$
Aspect : huile

Temps de rétention : $Tr = 38,14 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}
SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 265,1812 (calculée pour $C_{16}H_{25}O_3$, 265,1798)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} (log ϵ) :
 310 nm (3,60) ; 240 nm (3,70)

IR, ν_{max} en cm^{-1} : littérature
 3429 ; 3056 ; 2923 ; 2854 ; 2596 ; 1652 ; 1606 ; 1450 ; 1301 ; 1245 ; 1211 ; 707

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) :
 δ (ppm) : 10,98 (1H, s, OH-2) ; 6,85 (1H, dd, $J = 7,6 ; 1,2 \text{ Hz}$, H-3) ; 7,34 (1H, t, $J = 7,6 \text{ Hz}$, H-4) ; 6,75 (1H, dd, $J = 7,6 ; 1,2 \text{ Hz}$, H-5) ; 2,95 (2H, t, 7,7 Hz, H_2-1') ; 1,58 (2H, m, H_2-2') ; 1,24 (12H, br m, $H_2-3' - H_2-8'$) ; 0,85 (3H, t, 6,9 Hz, H-9')

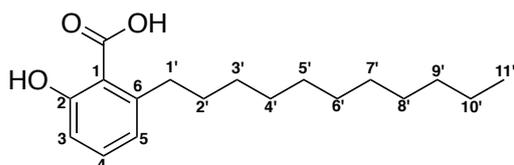
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :
 δ (ppm) : 175,4 (COOH) ; 110,6 (C-1) ; 163,9 (C-2) ; 116,1 (C-3) ; 135,6 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,9 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,3 (C-2') ; 29,6 – 30,0 (C-3' – C-6') ; 32,1 (C-7') ; 22,9 (C-8') ; 14,3 (C-9')

Référence : Composé n°10d, Pereira *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, 16(9), 8889–8895.

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-3

Acide 2-hydroxy-6-benzoïque (51)

Synonyme(s) : acide anagigantique



$C_{18}H_{28}O_3$

$M = 292,4 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana

$\rho = 27,43 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i = 1,2 \pm 0,0 \text{ }\mu\text{M}$

Mcl-1/Bid : $K_i = 0,7 \pm 0,0 \text{ }\mu\text{M}$

Aspect : solide cristallin incolore

Temps de rétention : $Tr = 44,40 \text{ min}$

(gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 293,2121 (calculée pour $C_{18}H_{29}O_3$, 293,2111)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) : littérature

213 nm (4,17) ; 242 nm (3,62) ; 309 nm (3,43)

IR, ν_{max} (KBr) en cm^{-1} : littérature

3300 ; 2400 ; 1660 ; 1605 ; 1446 ; 1303 ; 1242 ; 1212

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 11,0 (1H, s, OH-2) ; 6,85 (1H, dd, $J = 8,4 ; 1,1 \text{ Hz}$, H-3) ; 7,34 (1H, t, $J = 7,9 \text{ Hz}$, H-4) ; 6,76 (1H, dd, $J = 7,6 ; 1,1 \text{ Hz}$, H-5) ; 2,95 (2H, t, 7,8 Hz, H_2-1') ; 1,57 (2H, m, H_2-2') ; 1,24 (16H, br m, $H_2-3' - H_2-10'$) ; 0,85 (3H, t, 6,8 Hz, H-11')

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) :

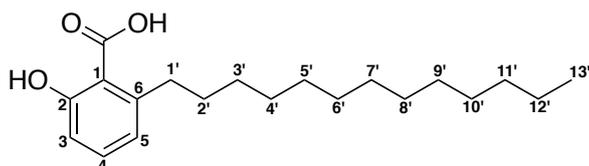
δ (ppm) : 175,6 (COOH) ; 110,4 (C-1) ; 163,8 (C-2) ; 116,0 (C-3) ; 135,6 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,9 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,6 – 30,0 (C-3' – C-8') ; 32,1 (C-9') ; 22,9 (C-10') ; 14,3 (C-11')

Référence : Composé n°2, Asakawa *et al.*, *Phytochemistry*, **1987**, 26 (3), 735–738.

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-8

Acide 2-hydroxy-6-tridecylbenzoïque (52)

Synonyme(s) : acide 6-n-tridecylsalicylique, acide 6-tridecyl anacardique, acide ginkgolique C13:0.



$C_{20}H_{32}O_3$
 $M = 320,5 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 8,86 \%$ p/e

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i = 0,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 0,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$

Aspect : poudre blanche

Temps de rétention : Tr = 51,78 min
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C₁₈

SMHR (ES⁺) [M + H]⁺ m/z 321,2431 (calculée pour C₂₀H₃₃O₃, 321,2424)

UV, (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) : littérature
 308 nm (3,49) ; 244 nm (3,70)

IR, ν_{max} (CCl₄) en cm⁻¹ : littérature
 3505 ; 3200 ; 2920 ; 2840 ; 1640 ; 1605 ; 1445

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 11,02 (1H, s, OH-2) ; 6,85 (1H, dd, J = 8,3 ; 1,0 Hz, H-3) ; 7,34 (1H, t, J = 7,6 Hz, H-4) ; 6,75 (1H, dd, J = 7,6 ; 0,9 Hz, H-5) ; 2,95 (2H, t, 7,6 Hz, H₂-1') ; 1,57 (2H, m, H₂-2') ; 1,23 (20H, br m, H₂-3' – H₂-12') ; 0,85 (3H, t, 6,5 Hz, H-13')

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) :

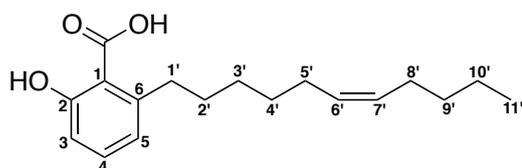
δ (ppm) : 174,9 (COOH) ; 110,4 (C-1) ; 163,8 (C-2) ; 116,0 (C-3) ; 135,5 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,8 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,5 – 30,0 (C-3' – C-10') ; 32,1 (C-11') ; 22,9 (C-12') ; 14,3 (C-13')

Références : Composé n°4, Kazlauskas *et al.*, *Aust. J. Chem.*, **1980**, 33, 2097–101.

Composé n°2, Zehnter *et al.*, *Liebigs Ann.*, **1995**, 2209–2220.

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-12

Acide khookerianique B (53)



$C_{18}H_{26}O_3$
 $M = 290,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :
 Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 7,14 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques
 Bcl-xL/Bak : $K_i = 3,2 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 5,8 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{M}$

Aspect : solide marron pâle

Temps de rétention : $T_r = 39,25 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 291,1958 (calculée pour $C_{18}H_{27}O_3$, 291,1955)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 311 nm (3,55) ; 243 nm (3,70)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 2923 ; 2851 ; 1647 ; 1603 ; 1576 ; 1444 ; 1297 ; 1216

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 10,61 (1H, s, 2-OH) ; 6,85 (1H, dd, $J = 7,9 \text{ MHz}, 1,1 \text{ MHz}$, H-3) ; 7,34 (1H, t, $J = 7,9 \text{ MHz}$, H-4) ; 6,75 (1H, dd, $J = 7,9 \text{ MHz}, 1,1 \text{ MHz}$, H-5) ; 2,96 (2H, t, 8,0 Hz, H-1') ; 1,59 (2H, m, H-2') ; 1,36 (8H, m, H-3', H-4', H-9', H-10') ; 2,00 (2H, m, H-5', H-8') ; 5,35 (2H, m, H-6', H-7') ; 0,86 (3H, t, 6,9 Hz, H-11')

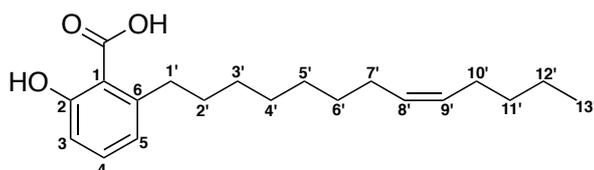
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 175,9 (COOH) ; 110,7 (C-1) ; 163,8 (C-2) ; 116,1 (C-3) ; 135,6 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,9 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,6 – 29,8 (C-3', C-4') ; 27,1 – 27,4 (C-5', C-8') ; 129,9 – 130,2 (C-6', C-7') ; 32,1 (C-9') ; 22,6 (C-10') ; 14,2 (C-11')

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-5

Acide 2-hydroxy-6-((Z)-tridecenyl)benzoïque (54)

Synonyme(s) : aucun synonyme rapporté dans la littérature



$C_{20}H_{30}O_3$
 $M = 318,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 21,14 \%$ p/e

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i = 0,3 \pm 0,0 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 0,2 \pm 0,0 \mu\text{M}$

Aspect : solide marron pâle

Temps de rétention : $Tr = 45,09 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 319,2277 (calculée pour $C_{20}H_{31}O_3$, 319,2268)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} :
 311 nm (3,60) ; 243 nm (3,70)

IR, ν_{max} (CCl_4) en cm^{-1} : littérature
 3505 ; 3200 ; 3000 ; 2920 ; 2850 ; 1640 ; 1605 ; 1445

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 10,99 (1H, s, OH-2) ; 6,85 (1H, dd, $J = 8,1 ; 1,1 \text{ Hz}$, H-3) ; 7,34 (1H, t, $J = 7,9 \text{ Hz}$, H-4) ; 6,76 (1H, dd, $J = 7,7 ; 1,1 \text{ Hz}$, H-5) ; 2,95 (2H, t, 7,5 Hz, H_2-1') ; 1,58 (2H, m, H_2-2') ; 1,29 (12H, br m, $H_2-3' - H_2-6'$, H_2-11' , H_2-12') ; 1,98 – 2,00 (4H, m, H_2-7' , H_2-10') ; 5,32 (2H, m, H-8', H-9') ; 0,87 (3H, t, 7,1 Hz, H-13')

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 175,8 (COOH) ; 110,5 (C-1) ; 163,8 (C-2) ; 116,0 (C-3) ; 135,6 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,9 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,4 – 29,9 (C-3' – C-6') ; 27,1 – 27,4 (C-7', C-10') ; 130,0 – 130,1 (C-8', C-9') ; 32,1 (C-11') ; 22,5 (C-12') ; 14,2 (C-13')

Références : Composé n°3, Yalpani *et al.*, *Phytochemistry*, **1983**, 22 (10), 2263–2266.

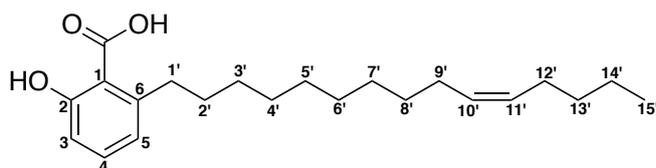
Composé n°5, Zehnter *et al.*, *Liebigs Ann.*, **1995**, 2209–2220.

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-9

Acide 2-hydroxy-6-(10-pentadecenyl)benzoïque (55)

Synonyme(s) : acide 2-hydroxy-6-pentadec-10'(Z)-enylbenzoïque

$C_{22}H_{34}O_3$
M = 346,5 g.mol⁻¹



Obtention :
 Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 3,71 \%$ p/e

Activités biologiques
 Bcl-xL/Bak : $K_i = 5,7 \pm 0,6 \mu M$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 1,2 \pm 0,9 \mu M$

Aspect : huile jaunâtre

SMHR (ES⁺) [M + H]⁺ $m/z \approx 347,2583$ (calculée pour $C_{22}H_{35}O_3$, 347,2581)

UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ) :
 311 nm (3,55) ; 243 nm (3,70)

IR, ν_{max} (CCl₄) en cm⁻¹ : littérature
 3500 ; 3200 ; 3000 ; 2920 ; 2850 ; 1640 ; 1605 ; 1445

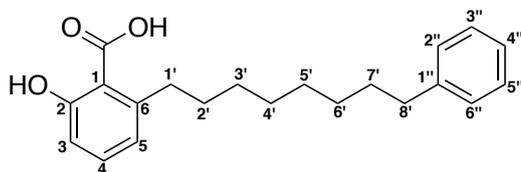
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 10,98 (1H, s, OH-2) ; 6,85 (1H, dd, J = 8,2 ; 1,2 Hz, H-3) ; 7,34 (1H, t, J = 8,0 Hz, H-4) ; 6,76 (1H, dd, J = 7,8 ; 1,2 Hz, H-5) ; 2,96 (2H, t, 7,8 Hz, H₂-1') ; 1,58 (2H, m, H₂-2') ; 1,27 (16H, br m, H₂-3' – H₂-8', H₂-13', H₂-14') ; 1,98 – 1,99 (4H, m, H₂-9', H₂-12') ; 5,32 (2H, m, H-10', H-11') ; 0,86 (3H, t, 7,1 Hz, H-15')

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 176,0 (COOH) ; 110,6 (C-1) ; 163,8 (C-2) ; 116,1 (C-3) ; 135,6 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,9 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,2 (C-2') ; 29,5 – 30,0 (C-3' – C-8') ; 27,1 – 27,4 (C-9', C-12') ; 130,0 – 130,1 (C-10', C-11') ; 32,1 (C-13') ; 22,6 (C-14') ; 14,2 (C-15')

Référence : Composé n°8, Zehnter *et al.*, Liebigs Ann., **1995**, 2209–2220.
 Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-13

Acide khookerianique C (56)


$C_{21}H_{26}O_3$
 $M = 326,4 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de
Knema bookeriana
 $\rho = 0,86 \text{ \% p/e}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i = 16,3 \pm 0,5 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 3,7 \pm 2,0 \mu\text{M}$

Aspect : solide blanc

Temps de rétention : $Tr = 38,54 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 327,1974 (calculée pour $C_{21}H_{27}O_3$, 327,1955)

UV, (MeOH) λ_{max} (log ϵ) :
 308 nm (3,46) ; 242 nm (3,6)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 3450 ; 2920 ; 2850 ; 1651 ; 1600 ; 1590

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) :

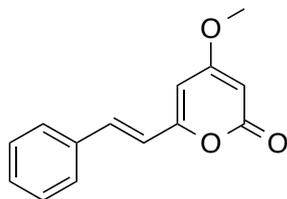
δ (ppm) : 10,01 (1H, s, OH-2) ; 6,89 (1H, dd, $J = 7,8 ; 1,0 \text{ Hz}$, H-3) ; 7,37 (1H, t, $J = 7,8 \text{ Hz}$, H-4) ; 6,79 (1H, dd, $J = 7,8 ; 1,0 \text{ Hz}$, H-5) ; 2,98 (2H, t, 7,6 Hz, H_2-1') ; 1,62 (4H, m, H_2-2' , H_2-7') ; 1,35 (8H, m, $H_2-3' - H_2-6'$) ; 2,62 (2H, t, 7,6 Hz, H_2-8') ; 7,29 (2H, m, H_2-2'' , H_2-6'') ; 7,20 (3H, m, $H_2-3'' - H_2-5''$)

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) :

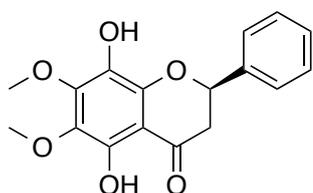
δ (ppm) : 174,9 (COOH) ; 110,5 (C-1) ; 163,9 (C-2) ; 116,1 (C-3) ; 135,6 (C-4) ; 122,9 (C-5) ; 147,8 (C-6) ; 36,7 (C-1') ; 32,3 (C-2') ; 29,5 – 30,0 (C-3' – C-6') ; 31,7 (C-7') ; 36,2 (C-8') ; 143,1 (C-1'') ; 128,4 (C-2'', C-6'') ; 128,6 (C-3'', C-5'') ; 125,8 (C-4'')

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-130-4

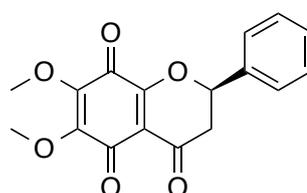
2. *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (King) J. Sinclair



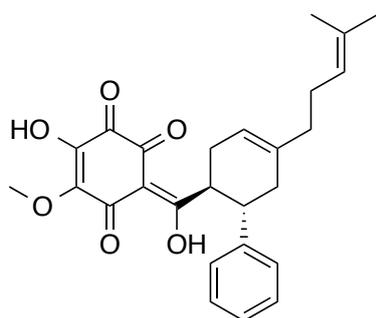
Desméthoxyyangonine (72)



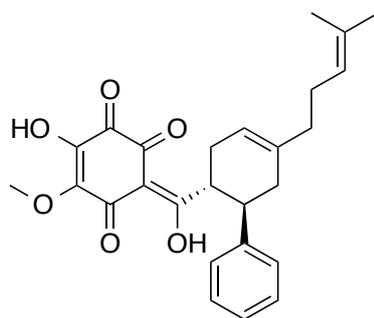
(±)-didymocarpine A (73a)



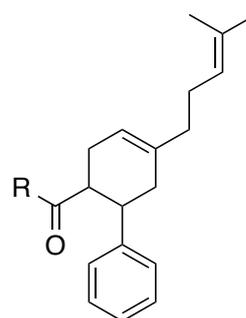
(±)-déhydrodidymocarpine A (73b)



(-)-écarlottone (76)



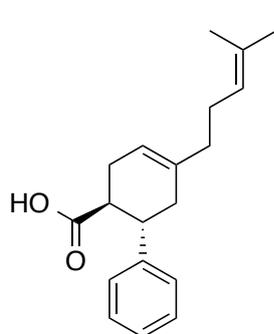
(+)-écarlottone (77)



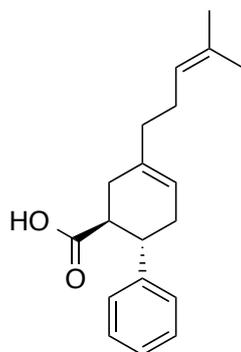
R₁ (81)

R₂ (82)

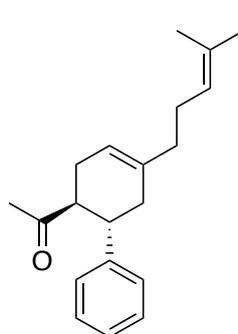
(±)-écarlottone (75)



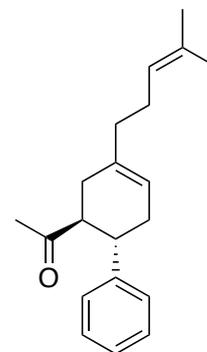
(±)-acide fislatifolique (74)



(±)-acide isofislatifolique (80)



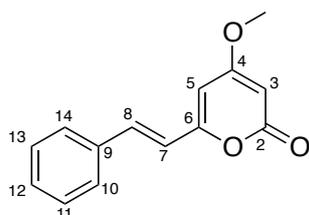
(±)-fislatifolione (78)



(±)-isofislatifolione (79)

Desmethoxyyangonine (72)

Synonyme(s) : 5,6-Dehydrokawain, desmethoxyyangonin, demethoxyyangonin, (E)-4-methoxy-6-styryl-2H-pyran-2-one, 5,6-dehydrokawain, dehydrokawain.



$C_{14}H_{12}O_3$
 $M = 228,2 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 1,5 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : huile

Temps de rétention : $Tr = 27,14 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES⁺) $[M + H]^+ m/z$ 229,0865 (calculée pour $C_{14}H_{13}O_3$, 229,0859)

UV, (EtOH) λ_{max} (log ϵ) : littérature
 220 (4,20) ; 228 nm (4,20) ; 252 nm (4,13) ; 342 nm (4,39)

IR, ν_{max} en cm^{-1} : littérature
 3040 ; 1740 ; 1610 ; 705

RMN ^1H (600 MHz, MeOD) :

δ (ppm) : 5,62 (1H, d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, H-3) ; 3,88 (3H, s, OCH_3) ; 6,24 (1H, d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, H-5) ; 6,86 (1H, d, $J = 16,0 \text{ Hz}$, H-7) ; 7,43 (1H, d, $J = 16,1$, H-8) ; 7,59 (2H, m, H-10, H-14) ; 7,39 (2H, m, H-11, H-13) ; 7,34 (1H, m, H-12)

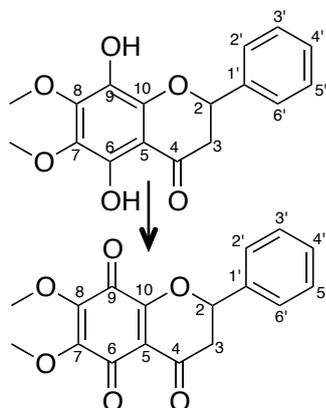
RMN ^{13}C (150 MHz, MeOD) :

δ (ppm) : 166,8 (C-2) ; 89,6 (C-3) ; 173,8 (C-4) ; 57,2 (OCH_3) ; 102,9 (C-5) ; 160,5 (C-6) ; 120,2 (C-7) ; 136,8 (C-8) ; 136,9 (C-9) ; 128,8 (C-10, C-14) ; 130,1 (C-11, C-13) ; 130,7 (C-12)

Référence : Composé n°5, Itokawa *et al.*, *Phytochemistry*, **1981**, 20(11), 2503–2506.
 Numérotation cahier de laboratoire : CG1-13-2

Didymocarpine A (73a) / Dehydrodidymocarpine A (73b)

Synonyme(s) :

**Didymocarpine A** $C_{17}H_{16}O_6$ $M = 316,3 \text{ g.mol}^{-1}$ **Obtention :**Isolement de l'extrait AcOEt
de *Fissistigma latifolium* $\rho = 1,0 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$ **Déhydrodidymocarpine A** $C_{17}H_{14}O_6$ $M = 314,3 \text{ g.mol}^{-1}$ **Activités biologiques**Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$ Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : huile

Didymocarpine ATemps de rétention : $T_r = 26,62 \text{ min}$ (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18} SMHR (ES⁺) $[M + H]^+ m/z \approx 317,1025$ (calculée pour $C_{17}H_{17}O_6$, 317,1020)**Déhydrodidymocarpine A**SMHR (ES⁺) $[M + H]^+ m/z \approx 315,0871$ (calculée pour $C_{17}H_{15}O_6$, 315,0863)UV, (EtOH) λ_{max} (log ϵ) :

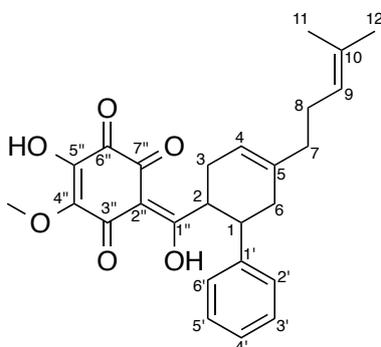
300 (3,50) ; 255 nm (3,00)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :

2950 ; 1705 ; 1690 ; 1670

RMN ¹H (600 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 5,65 (1H, dd, $J = 13,0 \text{ Hz}$; $J = 3,9 \text{ Hz}$, H-2) ; 2,88 (1H, dd, $J = 16,5 \text{ Hz}$; $J = 3,9 \text{ Hz}$, H-3) ; 3,04 (1H, dd, $J = 16,5 \text{ Hz}$; $J = 13,0 \text{ Hz}$, H-3) ; 4,10 (3H, s, OCH_3 -7) ; 3,95 (3H, s, OCH_3 -8) ; 7,30 (2H, m, H-11, H-13) ; 7,34 – 7,44 (5H, m, H-2' – H-6')RMN ¹³C (150 MHz, MeOD) : δ (ppm) : 82,5 (C-2) ; 43,4 (C-3) ; 187,7 (C-4) ; 110,7 (C-5) ; 178,8 (C-6) ; 143,2 (C-7) ; 61,9 (OCH_3 -7) ; 144,0 (C-8) ; 61,6 (OCH_3 -8) ; 178,1 (C-9) ; 162,3 (C-10) ; 135,8 (C-1') ; 126,6 (C-2' – C-6')Référence : Composé n°8 et 9, Patra *et al.*, *Org. Magn. Resonance*, **1982**, 18(4), 241–242.

Numérotation cahier de laboratoire : CG1-13-1

(±)-Ecarlottone (75)


$C_{26}H_{28}O_6$
 $M = 436,50 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 1,5 \cdot 10^{-2} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i = 17,5 \pm 0,2$
 μM
 Mcl-1/Bid : $K_i = 3,1 \pm 0,1$
 μM

Aspect : poudre écarlate

Temps de rétention : Tr = 50,69 min
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C₁₈

SMHR (ES⁺) [M + H]⁺ m/z 437,1962 (calculée pour C₂₆H₂₉O₆, 437,1959)

UV, (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) :
 304 nm (4,7)

IR, ν_{max} en cm⁻¹ :
 3303 ; 2914 ; 2853 ; 1622 ; 1596 ; 1538 ; 1448 ; 1323 ; 1241 ; 1188 ; 1082 ; 1011

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$: 0° (c 0,1 ; CHCl₃)

RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 3,22 (1H, ddd, J = 11,2 ; 9,6 ; 6,2 Hz, H-1) ; 4,55 (1H, ddd, J = 11,1 ; 9,6 ; 6,2 Hz, H-2) ; 2,32 – 2,40 (2H, m, H₂-3) ; 5,54 (1H, br s, H-4) ; 2,22 (2H, m, H₂-6) ; 1,98 (2H, m, H₂-7) ; 2,07 (2H, m, H₂-8) ; 5,14 (1H, t, J = 7,0 Hz, H-9) ; 1,58 (3H, s, CH₃-11) ; 1,68 (3H, s, CH₃-12) ; 7,16 (3H, m, H-2', H-4', H6') ; 7,24 (2H, m, H-3', H-5') ; 17,63 (OH-1'') ; 3,90 (OCH₃)

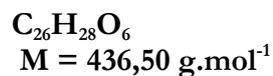
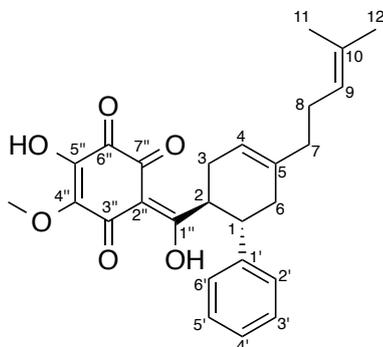
RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 42,2 (C-1) ; 45,0 (C-2) ; 30,8 (C-3) ; 117,9 (C-4) ; 137,9 (C-5) ; 37,8 (C-6) ; 37,2 (C-7) ; 29,9 (C-8) ; 123,8 (C-9) ; 132,3 (C-10) ; 17,9 (C-11) ; 26,1 (C-12) ; 143,8 (C-1'') ; 127,1 (C-2', C6') ; 128,8 (C-3', C5') ; 126,9 (C4') ; 204,8 (C-1'') ; 108,4 (C-2'') ; 179,7 (C-3'') ; 139,3 (C-4'') ; 60,8 (OCH₃) ; 143,9 (C-5'') ; 178,6 (C-6'') ; 175,4 (C-7'')

Référence :

Numérotation cahier de laboratoire : CG1-125-5 / CG2-34-2

(-)-Ecarlottone (76)



Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 2,0 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 7,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$

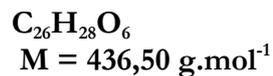
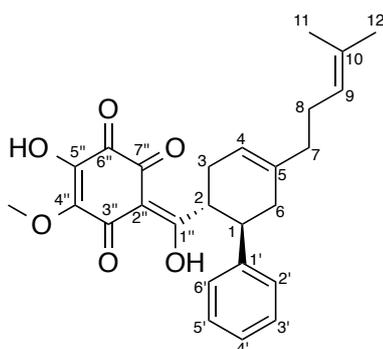
Aspect : huile orange foncé

$[\alpha]_D^{23} : -32^\circ$ (c 0,1 ; CHCl_3)

Référence :

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-160-3

(+)-Ecarlottone (77)



Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 3,0 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i = 4,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i = 2,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$

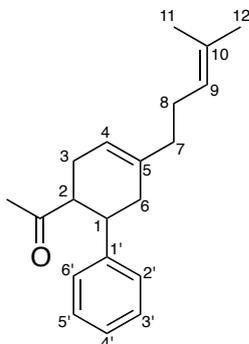
Aspect : huile orange foncé

$[\alpha]_D^{23} : +35^\circ$ (c 0,1 ; CHCl_3)

Référence :

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-168-2

(±)-Fislatifolione (78)



$C_{20}H_{26}O$
 $M = 282,4 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 5,5 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : huile

Temps de rétention : $T_r = 39,81 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 283,2062 (calculée pour $C_{20}H_{26}O$, 283,2056)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} (log ϵ) :
 260 (2,5)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 2916 ; 1709 ; 1356 ; 1159 ; 758 ; 700

$[\alpha]_D^{23} : 0^\circ$ (c 0,1 ; $CHCl_3$)

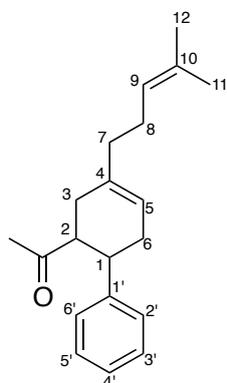
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 3,06 (1H, m, H-1) ; 3,00 (1H, m, H-2) ; 1,88 (3H, s, $COCH_3$) ; 2,31 (2H, br s, H_2 -3) ; 5,53 (1H, s, H-4) ; 2,25 (2H, m, H_2 -6) ; 2,04 (2H, m, H_2 -7) ; 2,12 (2H, m, H_2 -8) ; 5,13 (1H, m, H-9) ; 1,64 (3H, s, H_3 -11) ; 1,73 (3H, s, H_3 -12) ; 7,23 (3H, m, H-2'', H-4'', H-6'') ; 7,30 (2H, m, H-3'', H-5'')

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 43,3 (C-1) ; 53,4 (C-2) ; 212,5 (CO) ; 29,9 ($COCH_3$) ; 29,1 (C-3) ; 118,8 (C-4) ; 137,7 (C-5) ; 33,3 (C-6) ; 37,5 (C-7) ; 26,6 (C-8) ; 124,2 (C-9) ; 131,9 (C-10) ; 17,9 (C-11) ; 25,9 (C-12) ; 144,5 (C-1'') ; 127,7 (C-2'', C-6'') ; 128,8 (C-3'', C-5'') ; 126,8 (C-4'')

Numérotation cahier de laboratoire : CG1-166-8 / CG1-167-6

(±)-Isophysalton (79)

$C_{20}H_{26}O$
 $M = 282,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :
 Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 2,2 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques
 Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : huile

Temps de rétention : $T_r = 39,81 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z \approx 283,2062$ (calculée pour $C_{20}H_{26}O$, 283,2056)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 260 (2,5)

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 2916 ; 1709 ; 1356 ; 1159 ; 758 ; 700

$[\alpha]_D^{23} : 0^\circ$ (c 0,1 ; $CHCl_3$)

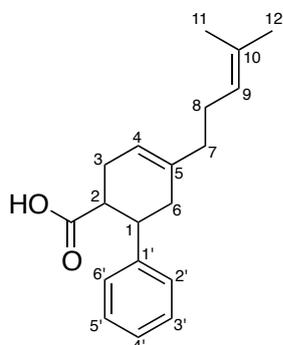
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 2,93 (1H, ddd, $J = 10,7 ; 11,0 ; 5,6 \text{ Hz}$, H-1) ; 3,01 (1H, ddd, $J = 10,8 ; 10,6 ; 5,2 \text{ Hz}$, H-2) ; 1,81 (3H, s, $COCH_3$) ; 2,09 (2H, br s, H_2 -3) ; 5,48 (1H, s, H-5) ; 2,23 – 2,30 (2H, m, H_2 -6) ; 2,01 (2H, m, H_2 -7) ; 2,09 (2H, m, H_2 -8) ; 5,09 (1H, m, H-9) ; 1,60 (3H, s, H_3 -11) ; 1,68 (3H, s, H_3 -12) ; 7,17 (3H, m, H-2'', H-4'', H-6'') ; 7,25 (2H, m, H-3'', H-5'')

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 43,1 (C-1) ; 53,8 (C-2) ; 212,4 (CO) ; 30,0 ($COCH_3$) ; 32,0 (C-3) ; 136,1 (C-4) ; 120,5 (C-5) ; 34,2 (C-6) ; 37,6 (C-7) ; 26,6 (C-8) ; 124,2 (C-9) ; 131,9 (C-10) ; 17,9 (C-11) ; 25,9 (C-12) ; 144,3 (C-1'') ; 127,7 (C-2'', C-6'') ; 128,8 (C-3'', C-5'') ; 127,2 (C-4'')

Numérotation cahier de laboratoire : CG1-167-7

Acide (\pm)-fislatifolique (74)


$C_{19}H_{24}O_2$
 $M = 284,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 1,5 \cdot 10^{-3} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : huile jaunâtre

Temps de rétention : $T_r = 34,37 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C₁₈

SMHR (ES⁺) $[M + H]^+ m/z$ 285,1850 (calculée pour C₁₉H₂₅O₂, 285,1849)

UV, (CHCl₃) λ_{max} (log ϵ) :
 259 (2,7)

IR, ν_{max} en cm⁻¹ :
 3030 ; 2914 ; 2846 ; 1703 ; 1494 ; 1435 ; 1289 ; 1231 ; 1201 ; 943 ; 759 ; 698

$[\alpha]_D^{23}$: 0° (c 0,1 ; CHCl₃)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) :

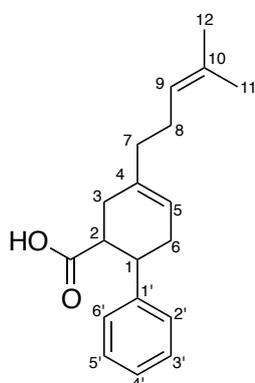
δ (ppm) : 3,05 (1H, td, J = 10,7 ; 5,4 Hz, H-1) ; 2,86 (1H, td, J = 8,0 ; 10,5 Hz, H-2) ; 2,42 (2H, br s, H₂-3) ; 5,48 (1H, s, H-4) ; 2,24 (2H, td, J = 17,5 ; 5,5 Hz, H₂-6) ; 2,02 (2H, m, H₂-7) ; 2,10 (2H, m, H₂-8) ; 5,11 (1H, m, H-9) ; 1,61 (3H, s, H₃-11) ; 1,71 (3H, s, H₃-12) ; 7,23 (3H, m, H-2'', H-4'', H-6'') ; 7,30 (2H, m, H-3'', H-5'')

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) :

δ (ppm) : 42,9 (C-1) ; 45,7 (C-2) ; 179,0 (COOH) ; 29,4 (C-3) ; 118,5 (C-4) ; 137,7 (C-5) ; 36,9 (C-6) ; 37,5 (C-7) ; 26,5 (C-8) ; 124,2 (C-9) ; 131,9 (C-10) ; 17,9 (C-11) ; 25,9 (C-12) ; 144,2 (C-1'') ; 127,6 (C-2'', C-6'') ; 128,7 (C-3'', C-5'') ; 126,8 (C-4'')

Numérotation cahier de laboratoire : CG1-14-1 / CG2-44-1 (mélange) / CG1-43-6 / CG1-125-2/3

Acide (\pm)-isofislatifolique (80) (en mélange avec 74)



$C_{19}H_{24}O_2$
 $M = 284,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 2,2 \cdot 10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

Bcl-xL/Bak : $K_i > 23 \mu\text{M}$
 Mcl-1/Bid : $K_i > 33 \mu\text{M}$

Aspect : huile

Temps de rétention : $T_r = 34,37 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z \approx 285,1850$ (calculée pour $C_{19}H_{25}O_2$, 285,1849)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 N.D.

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 N.D.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) :

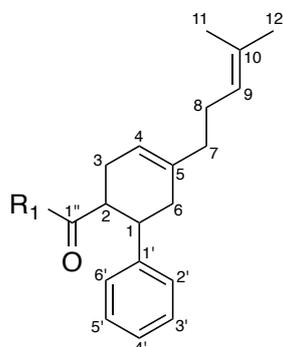
δ (ppm) : 2,91 (1H, m, H-1) ; 3,00 (1H, m, H-2) ; 2,03 (2H, br s, H_2 -3) ; 5,51 (1H, s, H-5) ;
 2,24 – 2,31 (2H, m, H_2 -6) ; 2,03 (2H, m, H_2 -7) ; 2,11 (2H, m, H_2 -8) ; 5,13 (1H, m, H-9) ;
 1,64 (3H, s, H_3 -11) ; 1,72 (3H, s, H_3 -12) ; 7,23 (3H, m, H-2'', H-4'', H-6'') ; 7,29 (2H, m, H-3'', H-5'')

RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : dégradation

Numérotation cahier de laboratoire : CG1-43-7 / CG2-44-1

(81)



$C_{25}H_{30}O_6$
 $M = 426,51 \text{ g.mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 8,7.10^{-4} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

N.D.

Aspect : huile

Temps de rétention : $Tr = 30,04 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 427,2116 (calculée pour $C_{25}H_{31}O_6$, 427,2115)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} (log ϵ) :
 N.D.

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 N.D.

$[\alpha]_D^{23}$: N.D.

RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 3,69 (1H, m, H-1) ; 4,32 (1H, m, H-2) ; 2,53 – 2,86 (2H, m, H_2 -3) ; 5,56 (1H, br s, H-4) ; 2,22 – 2,54 (2H, m, H_2 -6) ; 2,05 (2H, m, H_2 -7) ; 2,16 (2H, m, H_2 -8) ; 5,22 (1H, m, H-9) ; 1,57 (3H, s, CH_3 -11) ; 1,68 (3H, s, CH_3 -12) ; 5,24 (1H, s, H-3'') ; 7,56 (2H, m, H-2', H-6') ; 7,31 (2H, m, H-3', H-5') ; 7,19 (1H, m, H-4') ; 4,23 (OCH_3)

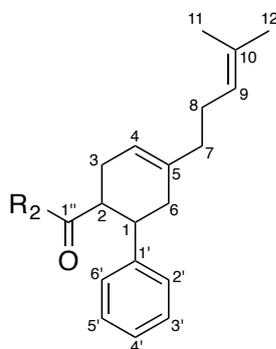
RMN ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 40,9 (C-1) ; 48,1 (C-2) ; 27,4 (C-3) ; 120,2 (C-4) ; 137,3 (C-5) ; 35,1 (C-6) ; 38,3 (C-7) ; 27,1 (C-8) ; 125,4 (C-9) ; 131,7 (C-10) ; 18,2 (C-11) ; 26,2 (C-12) ; 146,8 (C-1') ; 128,7 (C-2', C6') ; 129,1 (C-3', C5') ; 126,7 (C4') ; 212,2 (C-1'') ; 89,8 (C-2'') ; 77,5 (C-3'') ; 136,2 (C-4/5'') ; 163,0 (C-4/5'') ; 59,4 (OCH_3) ; 143,9 (C-5'') ; 194,9 (C-6'')

Référence :

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-17-5/ CG2-16-1/CG2-38-3/CG2-39-1

(82)



$C_{25}H_{28}O_6$
 $M = 424,49 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Obtention :

Isolement de l'extrait AcOEt
 de *Fissistigma latifolium*
 $\rho = 5,5 \cdot 10^{-5} \% \text{ p/p}$

Activités biologiques

N.D.

Aspect : huile

Temps de rétention : $T_r = 35,72 \text{ min}$
 (gradient ACN + 0,1% HCOOH) Kromasil C_{18}

SMHR (ES^+) $[M + H]^+ m/z$ 425,1955 (calculée pour $C_{25}H_{29}O_6$, 425,1959)

UV, ($CHCl_3$) λ_{max} ($\log \epsilon$) :
 N.D.

IR, ν_{max} en cm^{-1} :
 3250 ; 2924 ; 1744 ; 1694 ; 1650 ; 1454 ; 1349

$[\alpha]_D^{23}$: N.D.

RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 3,23 (1H, m, H-1) ; 3,08 (1H, m, H-2) ; 2,55 (2H, m, H_2 -3) ; 5,55 (1H, br s, H-4) ; 2,24 – 2,34 (2H, m, H_2 -6) ; 2,07 (2H, m, H_2 -7) ; 2,17 (2H, m, H_2 -8) ; 5,18 (1H, t, $J = 7,0$ Hz, H-9) ; 1,69 (3H, s, CH_3 -11) ; 1,76 n(3H, s, CH_3 -12) ; 7,37 – 7,42 (5H, m, H-2' – H-6') ; 4,37 – 4,38 (OCH_3) ; 5,41 (0,5 H, s) ; 5,44 (0,5 H, s)

RMN ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) :

δ (ppm) : 42,2 – 42,4 (C-1) ; 45,1 – 45,2 (C-2) ; 29,2 – 29,3 (C-3) ; 118,4 (C-4) ; 137,2 (C-5) ; 36,5 – 36,6 (C-6) ; 37,4 (C-7) ; 26,2 (C-8) ; 124,0 (C-9) ; 131,9 (C-10) ; 17,9 (C-11) ; 26,0 (C-12) ; 143,9 (C-1') ; 127,4 – 127,6 (C-2', C6') ; 128,5 – 128,6 (C-3', C5') ; 126,5 – 126,6 (C4') ; 212,1 (C-1'') ; 59,4 (OCH_3) ; 149,7 (C'') ; 174,4 (C'') ; 186,8 (C'') ; 192,3 (C'') ; 69,5 – 69,6 (C'')

Référence :

Numérotation cahier de laboratoire : CG2-17-9/CG2-35-2/CG2-37-2/CG2-125-1/CG2-126-1/CG2-124-1

Intercalaire rouge

Bibliographie

Sitographie

- http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx (consulté le 16/07/2014)
- <http://www.buzzle.com/images/diagrams/apoptosis-morphological-changes.jpg> (consulté le 16/07/2014)
- http://www.plantes-botanique.org/genre_knema (consulté le 23/07/2014)
- <https://www.flickr.com/photos/24557638@N03/2339507073/in/photostream/> (consulté le 23/07/14)
- <http://www.iucnredlist.org/details/37093/0> (consulté le 23/07/14)
- <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/maps/Myristicaceae.gif> (consulté le 18/07/14)
- <http://www.marketmanila.com/archives/fresh-mace-nutmeg> (consulté le 18/07/14)
- <http://www.adjocom.com/content/385-muscade-circulation-sanguine-et-cheveux> (consulté le 18/07/14)
- <http://www.theplantlist.org/browse/A/Myristicaceae/Knema/> (consulté le 20/08/2014)
- <http://www.iucnredlist.org/details/34547/0> (consulté le 23/07/2014)
- <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2334949> (consulté le 20/08/2014)
- http://www.plantes-botanique.org/espece_knema_hookeriana (consulté le 20/08/2014)
- <https://www.flickr.com/photos/weefoong/7987765627/in/set-72157631544810651> (consulté le 23/07/14)
- <http://apps.kew.org/herbcat/getImage.do?imageBarcode=K000854594> (consulté le 17/07/14)
- <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Annonaceae/> (consulté le 23/08/2014)
- <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/orders/magnolialesweb.htm> (consulté le 15/08/14)
- http://fr.wikipedia.org/wiki/Corossol#mediaviewer/Fichier:Soursop_fruit.jpg (consulté le 15/08/14)
- <http://www.cosmetiquesdumonde.fr/blog/actu/tout-savoir-sur-huile-essentielle-ylang-ylang-bio-270> (consulté le 15/08/14)

BIBLIOGRAPHIE

<http://www.theplantlist.org/browse/A/Annonaceae/Fissistigma/> (consulté le 23/08/2014)

<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2813110> (consulté le 23/08/2014)

<https://www.flickr.com/photos/loupok/sets/72157635645119545/> (consulté le 15/07/2014)

Bibliographie

- Aguirre, C., ten Brink, T., Walker, O., Guillière, F., Davesne, D. and Krimm, I.; *PLoS ONE*; Bcl-xL Conformational Changes upon Fragment Binding Revealed by NMR (2013); 8; e64400.
- Akhtar, M. N., Lam, K. W., Abas, F., Maulidiani, Ahmad, S., Shah, S. A. A., Atta ur, R., Choudhary, M. I. and Lajis, N. H.; *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*; New class of acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Knema laurina* and their structural insights (2011); 21; 4097-4103.
- Alen, Y., Nakajima, S., Nitoda, T., Baba, N., Kanzaki, H. and Kawazu, K.; *Z. Naturforsch. C*; Two antinematodal phenolics from *Knema bookeriana*, a Sumatran rainforest plant (2000); 55; 300-303.
- Alexei, D., Alexey, L., Michael, C., Bradley, M., Gerhard, W., Timothy, M. and Junying, Y.; *Nat. Cell. Biol.*; Identification of small-molecule inhibitors of interaction between the BH3 domain and Bcl-xL (2001); 3; 173-182.
- Alias, A., Hazni, H., Mohd Jaafar, F., Awang, K. and Hadiani Ismail, N.; *Molecules*; Alkaloids from *Fissistigma latifolium* (Dunal) Merr (2010); 15; 4583-4588.
- Alias, Y., Awang, K., Hadi, A. H. A., Thoison, O., Sévenet, T. and País, M.; *J. Nat. Prod.*; An Antimitotic and Cytotoxic Chalcone from *Fissistigma lanuginosum* (1995); 58; 1160-1166.
- Andersen, Ø. M. and Markham, K. R.; *Flavonoids : chemistry, biochemistry and applications* (2006); 1212.
- Anderson, J. E., Ma, W., Smith, D. L., Chang, C.-J. and McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.*; Biologically Active γ -Lactones and Methylketoalkenes from *Lindera benzoin* (1992); 55; 71-83.
- Apel, C., Gény, C., Dumontet, V., Birlirakis, N., Roussi, F., Pham, V. C., Doan Thi Mai, H., Nguyen, V. H., Chau, V. M. and Litaudon, M.; *J. Nat. Prod.*; Endiandric Acid Analogues from *Beilschmiedia ferruginea* as Dual Inhibitors of Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid Interactions (2014); 77; 1430-1437.
- Asakawa, Y., Masuya, T., Tori, M. and Campbell, E. O.; *Phytochemistry*; Long chain alkyl phenols from the liverwort *Schistochila appendiculata* (1987); 26; 735-738.

- Austin, M. B. and Noel, J. P.; *Nat. Prod. Rep.*; The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases **(2003)**; *20*; 79-110.
- Azmi, A. S. and Mohammad, R. M.; *J. Cell. Physiol.*; Non-Peptidic Small Molecule Inhibitors Against Bcl-2 for Cancer Therapy **(2009)**; *218*; 13-21.
- Azmi, M., Gény, C., Leverrier, A., Litaudon, M., Dumontet, V., Birlirakis, N., Guéritte, F., Leong, K., Halim, S., Mohamad, K. and Awang, K.; *Molecules*; Kingianic Acids A-G, Endiandric Acid Analogues from *Endiandra kingiana* **(2014)**; *19*; 1732-1747.
- Bai, L. and Zhu, W.-G.; *J. Cancer Mol.*; p53: Structure, Function and Therapeutic Applications **(2006)**; *2*; 141-153.
- Bajwa, N., Liao, C. and Nikolovska-Coleska, Z.; *Expert. Opin. Ther. Pat.*; Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review **(2012)**; *22*; 37-55.
- Bañuelos, P., García, J. M., Gómez-Bengoa, E., Herrero, A., Odriozola, J. M., Oiarbide, M., Palomo, C. and Razkin, J.; *J. Org. Chem.*; (1R)-(+)-Camphor and Acetone Derived α '-Hydroxy Enones in Asymmetric Diels–Alder Reaction: Catalytic Activation by Lewis and Brønsted Acids, Substrate Scope, Applications in Syntheses, and Mechanistic Studies **(2010)**; *75*; 1458-1473.
- Bennett, G. J. and Lee, H.-H.; *J. Chem. Soc.*; Oxidative rearrangement of quinochalcones. Part 2. A facile synthesis of linderone **(1986)**; 633-638.
- Billard, C.; *Mol. Cancer Ther.*; BH3 Mimetics: Status of the Field and New Developments **(2013)**; *12*; 1691-1700.
- Blommel, P., Hanson, G. T. and Vogel, K. W.; *J. Biomol. Screen.*; Multiplexing fluorescence polarization assays to increase information content per screen: applications for screening steroid hormone receptors **(2004)**; *9*; 294-302.
- Bohlmann, F. and Abraham, W.-R.; *Phytochemistry*; Neue diterpene aus *Helichrysum acutatum* **(1979)**; *18*; 1754-1756.
- Bose, P. C. and Adityachaudhury, N.; *Phytochemistry*; Didymocarpin, a new flavanone from *Didymocarpus pedicellata* **(1978)**; *17*; 587-588.
- Bremer, E.; *Oncology*; Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy **(2013)**; *2013*; 25.
- Bruckner, R. and Oppolzer, W.; *Advanced organic chemistry : reaction mechanisms* **(2002)**.
- Bruneton, J.; *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales* **(2009)**; 1268.
- Bruneton, J.; *Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales* **(2009)**; 1268.
- Chai, C. L. L., Bernardo, P. H., Xu, J., Yu, V. C., Wan, K. F., Mok, H. Y. K., Sivaraman, T. and Kjrishnamoorthy, J.; Biaryl-rhodanine and pyridyl-rhodanine compounds and their use **(2010)**.

- Champy, P., Melot, A., Guerineau Eng, V., Gleye, C., Fall, D., Hoglinger, G. U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprevote, O., Laurens, A. and Hocquemiller, R.; *Movement. Disord.*; Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe **(2005)**; *20*; 1629-1633.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H. J., Couvreur, T. L. P., Neubig, K. M., Abbott, J. R., Mols, J. B., Maas, J. W., Saunders, R. M. K. and Chase, M. W.; *Bot. J. Linn. Soc.*; A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics **(2012)**; *169*; 5-40.
- Chaurasia, O., Ballabh, B., Tayade, A., Kumar, R., Kumar, G. P. and Singh, S.; *Indian J. Tradit. Know.*; Podophyllum L.: An endangered and anticancerous medicinal plant—An overview **(2012)**; *11*; 234-241.
- Chee, C. F., Abdullah, I., Buckle, M. J. C. and Rahman, N. A.; *Tetrahedron Lett.*; An efficient synthesis of (\pm)-panduratin A and (\pm)-isopanduratin A, inhibitors of dengue-2 viral activity **(2010)**; *51*; 495-498.
- Chen, L., Willis, S. N., Wei, A., Smith, B. J., Fletcher, J. I., Hinds, M. G., Colman, P. M., Day, C. L., Adams, J. M. and Huang, D. C.; *Mol. Cell.*; Differential targeting of pro-survival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function **(2005)**; *17*; 393-403.
- Chen, Y., Luo, Y., Ju, J., Wendt-Pienkowski, E., Rajski, S. R. and Shen, B.; *J. Nat. Prod.*; Identification of Fredericamycin E from *Streptomyces griseus*: Insights into Fredericamycin A Biosynthesis Highlighting Carbapicrocycle Formation **(2008)**; *71*; 431-437.
- Cheng, Y. and Prusoff, W. H.; *Biochem. Pharmacol.*; Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction **(1973)**; *22*; 3099-3108.
- Chia, Y.-C., Chang, F.-R. and Wu, Y.-C.; *Tetrahedron Lett.*; Fissohamione, a novel furanone from *Fissistigma oldhamii* **(1999)**; *40*; 7513-7514.
- Chia, Y.-C., Wu, J.-B. and Wu, Y.-C.; *Tetrahedron Lett.*; Two novel cyclopentenones from *Fissistigma oldhamii* **(2000)**; *41*; 2199-2201.
- Chia, Y. C., Chang, F. R., Teng, C. M. and Wu, Y. C.; *J. Nat. Prod.*; Aristolactams and dioxoaporphines from *Fissistigma balansae* and *Fissistigma oldhamii* **(2000)**; *63*; 1160-1163.
- Chinembiri, T., du Plessis, L., Gerber, M., Hamman, J. and du Plessis, J.; *Molecules*; Review of Natural Compounds for Potential Skin Cancer Treatment **(2014)**; *19*; 11679-11721.
- Colegate, S. M. and Molyneux, R. J.; *Bioactive Natural Products : Detection, Isolation, and Structural Determination* **(2008)**.

- Cong, H., Becker, C. F., Elliott, S. J., Grinstaff, M. W. and Porco, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; Silver Nanoparticle-Catalyzed Diels-Alder Cycloadditions of 2'-Hydroxychalcones **(2010)**; *132*; 7514-7518.
- Cong, H., Ledbetter, D., Rowe, G. T., Caradonna, J. P. and Porco, J. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; Electron Transfer-Initiated Diels-Alder Cycloadditions of 2'-Hydroxychalcones **(2008)**; *130*; 9214-9215.
- Corbett, J. L. and Weavers, R. T.; *Synthetic. Commun.*; Aluminosilicate Catalysis of Chalcone Diels-Alder Reactions **(2008)**; *38*; 489-498.
- Curpan, R. F., Simons, P. C., Zhai, D., Young, S. M., Carter, M. B., Bologna, C. G., Oprea, T. I., Satterthwait, A. C., Reed, J. C., Edwards, B. S. and Sklar, L. A.; *Assay Drug Dev. Techn.*; High-throughput screen for the chemical inhibitors of antiapoptotic bcl-2 family proteins by multiplex flow cytometry **(2011)**; *9*; 465-474.
- Czabotar, P. E., Lee, E. F., van Delft, M. F., Day, C. L., Smith, B. J., Huang, D. C. S., Fairlie, W. D., Hinds, M. G. and Colman, P. M.; *P. Natl. A. Sci.*; Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains **(2007)**; *104*; 6217-6222.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. and Adams, J. M.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy **(2014)**; *15*; 49-63.
- Czabotar, P. E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W. D., Lee, E. F., Yao, S., Robin, A. Y., Smith, B. J., Huang, D. C. S., Kluck, R. M., Adams, J. M. and Colman, P. M.; *Cell*; Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis **(2013)**; *152*; 519-531.
- Dandliker, W. B., Hsu, M.-L., Levin, J. and Ramanath Rao, B.; *Methods in Enzymology*; [1] Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization **(1981)**; *74*; 3-28.
- Danial, N. N.; *Clin. Cancer Res.*; BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death **(2007)**; *13*; 7254-7263.
- Day, C. L., Chen, L., Richardson, S. J., Harrison, P. J., Huang, D. C. and Hinds, M. G.; *J. Biol. Chem.*; Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands **(2005)**; *280*; 4738-4744.
- Deb Majumdar, I., Devanabanda, A., Fox, B., Schwartzman, J., Cong, H., Porco Jr, J. A. and Weber, H. C.; *Biochem. Bioph. Res. Co.*; Synthetic cyclohexenyl chalcone natural products possess cytotoxic activities against prostate cancer cells and inhibit cysteine cathepsins *in vitro* **(2011)**; *416*; 397-402.
- Deng, J.-Z., Starck, S. R., Li, S. and Hecht, S. M.; *J. Nat. Prod.*; (+)-Myristinins A and D from *Knema elegans*, which Inhibit DNA Polymerase β and Cleave DNA **(2005)**; *68*; 1625-1628.

- Desrat, S., Remeur, C., Gény, C., Riviere, G., Colas, C., Dumontet, V., Birlirakis, N., Iorga, B. I. and Roussi, F.; *Chem. Commun.*; From meiogynin A to the synthesis of dual inhibitors of Bcl-xL and Mcl-1 anti-apoptotic proteins **(2014)**; *50*; 8593-8596.
- Devarajan, E., Sahin, A. A., Chen, J. S., Krishnamurthy, R. R., Aggarwal, N., Brun, A. M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X. H., Tora, A. D. and Mehta, K.; *Oncogene*; Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance **(2002)**; *21*; 8843-8851.
- Dias, D. A., Urban, S. and Roessner, U.; *Metabolites*; A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery **(2012)**; *2*; 303-336.
- Dumontet, V., Van Hung, N., Adeline, M. T., Riche, C., Chiaroni, A., Sévenet, T. and Guéritte, F.; *J. Nat. Prod.*; Cytotoxic flavonoids and alpha-pyrone from *Cryptocarya obovata* **(2004)**; *67*; 858-862.
- E.M., J. and Y.R., L.; *Bull. Korean Chem. Soc.*; First Concise Total Syntheses of Biologically Interesting Nicolaoidesin C, Crinatusin C[1], and Crinatusin C[2] **(2008)**; *29*; 6.
- Erlanson, D. A.; *Fragment-Based Drug Discovery and X-Ray Crystallography*; Introduction to Fragment-Based Drug Discovery **(2012)**; *317*; 1-32.
- Feng, Z.-M., He, J., Jiang, J.-S., Chen, Z., Yang, Y.-N. and Zhang, P.-C.; *J. Nat. Prod.*; NMR Solution Structure Study of the Representative Component Hydroxysafflor Yellow A and Other Quinochalcone C-Glycosides from *Carthamus tinctorius* **(2013)**; *76*; 270-274.
- Fesik, S. W.; *Nat Rev Cancer*; Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery **(2005)**; *5*; 876-885.
- Fomekong Fotsop, D., Roussi, F., Le Callonec, C., Bousserouel, H., Litaudon, M. and Guéritte, F.; *Tetrahedron*; Isolation and characterization of two new drimanes from *Zygogynum baillonii* and synthesis of analogues **(2008)**; *64*; 2192-2197.
- Forest Research Institutent, K.; *Malayan forest records*; Tree flora of Malaya **(1972)**; *1*.
- Fotsop, D. F., Roussi, F., Leverrier, A., Bretéché, A. and Guéritte, F.; *J. Org. Chem.*; Biomimetic Total Synthesis of Meiogynin A, an Inhibitor of Bcl-xL and Bak Interaction **(2010)**; *75*; 7412-7415.
- Friberg, A., Vigil, D., Zhao, B., Daniels, R. N., Burke, J. P., Garcia-Barrantes, P. M., Camper, D., Chauder, B. A., Lee, T., Olejniczak, E. T. and Fesik, S. W.; *J. Med. Chem.*; Discovery of Potent Myeloid Cell Leukemia 1 (Mcl-1) Inhibitors Using Fragment-Based Methods and Structure-Based Design **(2012)**; *56*; 15-30.
- Friesen, C., Fulda, S. and Debatin, K. M.; *Leukemia*; Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells **(1997)**; *11*; 1833-1841.
- Fuchs, Y. and Steller, H.; *Cell*; Programmed Cell Death in Animal Development and Disease **(2011)**; *147*; 742-758.

- Ge, Y.-W., Zhu, S., Shang, M.-Y., Zang, X.-Y., Wang, X., Bai, Y.-J., Li, L., Komatsu, K. and Cai, S.-Q.; *Phytochemistry*; Aristolactams and aporphines from the stems of *Fissistigma oldhamii* (Annonaceae) **(2013)**; *86*; 201-207.
- Gonzalez, M. J. T. G., DeOliveira, C. J. C., Fernandes, J. O., Kijjoo, A. and Herz, W.; *Phytochemistry*; Further alkyl and alkenylphenols of *Knema laurina* and *Knema austrosiamensis*: location of the double bond in the alkenyl side chains **(1996)**; *43*; 1333-1337.
- González, M. J. T. G., Pinto, M. M. M., Kijjoo, A., Anantachoke, C. and Herz, W.; *Phytochemistry*; Stilbenes and other constituents of *Knema austrosiamensis* **(1993)**; *32*; 433-438.
- Gottlieb, O. R.; *J. Ethnopharmacol.*; Chemical studies on medicinal Myristicaceae from Amazonia **(1979)**; *1*; 309-323.
- Green, D. R. and Kroemer, G.; *Science*; The pathophysiology of mitochondrial cell death **(2004)**; *305*; 626-629.
- Gribbon, P. and Andreas, S.; *Drug Discov. Today*; High-throughput drug discovery: What can we expect from HTS? **(2005)**; *10*; 17-22.
- Gu, J.-Q., Park, E. J., Vigo, J. S., Graham, J. G., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M. and Kinghorn, A. D.; *J. Nat. Prod.*; Activity-Guided Isolation of Constituents of *Renealmia nicolaioides* with the Potential to Induce the Phase II Enzyme Quinone Reductase **(2002)**; *65*; 1616-1620.
- Guo, X.-Q., Castellano, F. N., Li and Lakowicz, J. R.; *Anal. Chem.*; Use of a Long-Lifetime Re(I) Complex in Fluorescence Polarization Immunoassays of High-Molecular-Weight Analytes **(1998)**; *70*; 632-637.
- Gupta, S.; *Discov. Med.*; Death of lymphocytes: A clue to immune deficiency in human aging **(2005)**; *5*; 298-302.
- Häke, I., Schönenberger, S., Neumann, J., Franke, K., Paulsen-Merker, K., Reymann, K., Ismail, G., bin Din, L., Said, I. M., Latiff, A., Wessjohann, L., Zipp, F. and Ullrich, O.; *J. Neuroimmunol.*; Neuroprotection and enhanced neurogenesis by extract from the tropical plant *Knema laurina* after inflammatory damage in living brain tissue **(2009)**; *206*; 91-99.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A.; *Cell*; Hallmarks of Cancer: The Next Generation **(2011)**; *144*; 646-674.
- Hano, Y., Ichikawa, K., Okuyama, M., Yamanaka, J., Miyoshi, T. and Nomura, T.; *Heterocycles*; Sanggenons R, S, and T, Three New Isoprenylated Phenoles from the Chinese Crude Drug **(1995)**; *40*; 953-965.
- Harada, N. and Nakanishi, K.; *Acc. Chem. Res.*; Exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products **(1972)**; *5*; 257-263.

- Hengartner, M. O.; *Nature*; The biochemistry of apoptosis **(2000)**; *407*; 770-776.
- Heywood, V. H. and F., B.; *Les plantes à fleurs; 306 familles de la flore mondiale* **(1996)**; 336.
- Hirata, N., Tokunaga, M., Naruto, S., Iinuma, M. and Matsuda, H.; *Biol. Pharm. Bull.*; Testosterone 5 α -Reductase Inhibitory Active Constituents of *Piper nigrum* Leaf **(2007)**; *30*; 2402-2405.
- Hongping, Z., Xiaoling, L., Xiaohong, S., Qiangzhi, X. and Binghua, J.; *J. Med.* ; Dihydrochalcones and phenanthrene derivatives from *Fissistigma bracteolatum* **(2010)**; *25*; 226-234.
- Hu, X.-D., Zhong, X.-G., Zhang, X.-H., Zhang, Y.-N., Zheng, Z.-P., Zhou, Y., Tang, W., Yang, Y., Yang, Y.-F., Hu, L.-H. and Zuo, J.-P.; *Life Sci.*; 7'-(3',4'-dihydroxyphenyl)-N-[4-methoxyphenyl]ethyl]propenamide (Z23), an effective compound from the Chinese herb medicine *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr, suppresses T cell-mediated immunity in vitro and in vivo **(2007)**; *81*; 1677-1684.
- Hwang, T.-L., Li, G.-L., Lan, Y.-H., Chia, Y.-C., Hsieh, P.-W., Wu, Y.-H. and Wu, Y.-C.; *Free Radical Bio. Med.*; Potent inhibition of superoxide anion production in activated human neutrophils by isopedicin, a bioactive component of the Chinese medicinal herb *Fissistigma oldhamii* **(2009)**; *46*; 520-528.
- Irawan, B.; Malesian species of *Fissistigma* (Annonaceae) Jenis-Jenis *Fissistigma* (Annonaceae) di Malesia **(2005)**.
- Itokawa, H., Morita, M. and Mihashi, S.; *Phytochemistry*; Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa* **(1981)**; *20*; 2503-2506.
- Jacobson, M. D., Weil, M. and Raff, M. C.; *Cell*; Programmed cell death in animal development **(1997)**; *88*; 347-354.
- Janovec, J. P. and García, R.; *Enc. Forest Sci.*; TROPICAL FORESTS Myristicaceae **(2004)**; 1762-1767.
- Jeng, P. S. and Cheng, E. H.; *Nat. Chem. Biol.*; Cancer therapeutics: Pulling the plug on BCL-XL **(2013)**; *9*; 351-352.
- Jongbunprasert, V., Bavovada, R., Theraratchailert, P., Rungserichai, R. and Likhitwitayawuid, K.; *ScienceAsia*; Chemical Constituents of *Fissistigma polyanthoides* **(1999)**; *25*; 31-33.
- Juin, P., Geneste, O., Raimbaud, E. and Hickman, J. A.; *Biochim. Biophys. Acta*; Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug targets for cancer **(2004)**; *1644*; 251-260.
- Kazlauskas, R., Mulder, J., Murphy, P. and Wells, R.; *Aust. J. Chem.*; New metabolites from the brown alga *Caulocystis cephalornithos* **(1980)**; *33*; 2097-2101.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R.; *Brit. J. Cancer*; Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics **(1972)**; *26*; 239-257.

- Khusnutdinov, R. I., Bayguzina, A. R. and Mukminov, R. R.; *Russ. Chem. Bull.*; Synthesis of methyl furan-2-carboxylate and dimethyl furan-2,5-dicarboxylate by copper-catalyzed reactions of furans with CCl₄ and MeOH **(2013)**; 62; 93-97.
- Kiang, A. K., Lee, H. H. and Sim, K. Y.; *J. Chem. Soc.*; The structure of linderone and methyl-linderone **(1962)**; 4338-4345.
- Kiat, T. S., Phippen, R., Yusof, R., Ibrahim, H., Khalid, N. and Rahman, N. A.; *Bioorgan. Med. Chem. Lett.*; Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease **(2006)**; 16; 3337-3340.
- Kijjoo, A., Gonzalez, M. J., Pinto, M. M., Monanondra, I. O. and Herz, W.; *Planta Med.*; Constituents of *Knema laurina* and *Knema tenuinervis* ssp. *setosa* **(1991)**; 57; 575-577.
- Kirkin, V., Joos, S. and Zörnig, M.; *Biochim. Biophys. Acta*; The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis **(2004)**; 1644; 229-249.
- Koehn, F. E. and Carter, G. T.; *Nat. Rev. Drug Discov.*; The evolving role of natural products in drug discovery **(2005)**; 4; 206-220.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C.; *Physiol. Rev.*; Mitochondrial membrane permeabilization in cell death **(2007)**; 87; 99-163.
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C. and Colman, P. M.; *Cell Death Differ.*; Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands **(2008)**; 15; 1564-1571.
- Lan, Y.-H., Chia, Y.-C., Chang, F.-R., Hwang, T.-L., Liaw, C.-C. and Wu, Y.-C.; *Helv. Chim. Acta*; Potential Anti-Inflammatory Activities of Bractelactone and other Compounds Isolated from *Fissistigma bracteolatum* **(2005)**; 88; 905-909.
- Lan, Y.-H., Peng, Y.-T., Thang, T.-D., Hwang, T.-L., Dai, D.-N., Leu, Y.-L., Lai, W.-C. and Wu, Y.-C.; *Chem. Pharm. Bull.*; New Flavan and Benzil Isolated from *Fissistigma latifolium* **(2012)**; 60; 280-282.
- Lan, Y. H., Leu, Y. L., Peng, Y. T., Thang, T. D., Lin, C. C. and Bao, B. Y.; *Planta Med.*; The first bis-retrochalcone from *Fissistigma latifolium* **(2011)**; 77; 2019-2022.
- Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B. and Mukherjee, R.; *Phytochemistry*; The phytochemistry of the Annonaceae **(1980)**; 21; 2783-2813.
- Lee, E. F., Czabotar, P. E., Yang, H., Sleeb, B. E., Lessene, G., Colman, P. M., Smith, B. J. and Fairlie, W. D.; *J. Biol. Chem.*; Conformational Changes in Bcl-2 Pro-survival Proteins Determine Their Capacity to Bind Ligands **(2009)**; 284; 30508-30517.
- Lessene, G., Czabotar, P. E. and Colman, P. M.; *Nat. Rev. Drug Discov.*; BCL-2 family antagonists for cancer therapy **(2008)**; 7; 989-1000.

- Lessene, G., Czabotar, P. E., Sleebs, B. E., Zobel, K., Lowes, K. N., Adams, J. M., Baell, J. B., Colman, P. M., Deshayes, K., Fairbrother, W. J., Flygare, J. A., Gibbons, P., Kersten, W. J. A., Kulasegaram, S., Moss, R. M., Parisot, J. P., Smith, B. J., Street, I. P., Yang, H., Huang, D. C. S. and Watson, K. G.; *Nat. Chem. Biol.*; Structure-guided design of a selective BCL-XL inhibitor **(2013)**; *9*; 390-397.
- Leverrier, A., Awang, K., Guéritte, F. and Litaudon, M.; *Phytochemistry*; Pentacyclic polyketides from *Endiandra kingiana* as inhibitors of the Bcl-xL/Bak interaction **(2011)**; *72*; 1443-1452.
- Lien, T. P., Porzel, A., Schmidt, J., Van Sung, T. and Adam, G.; *Phytochemistry*; Chalconoids from *Fissistigma bracteolatum* **(2000)**; *53*; 991-995.
- Lin, C.-H., Ko, F.-N., Wu, Y.-C., Lu, S.-T. and Teng, C.-M.; *Eur. J. Pharmacol.*; The relaxant actions on guinea-pig trachealis of atherosperminine isolated from *Fissistigma glaucescens* **(1993)**; *237*; 109-116.
- Litaudon, M., Bousserouel, H., Awang, K., Nosjean, O., Martin, M.-T., Dau, M. E. T. H., Hadi, H. A., Boutin, J. A., Sévenet, T. and Guéritte, F.; *J. Nat. Prod.*; A Dimeric Sesquiterpenoid from a Malaysian *Meiogyne* as a New Inhibitor of Bcl-xL/BakBH3 Domain Peptide Interaction **(2009)**; *72*; 480-483.
- Litaudon, M., Jolly, C., Le Callonec, C., Cuong, D. D., Retailleau, P., Nosjean, O., Nguyen, V. H., Pfeiffer, B., Boutin, J. A. and Guéritte, F.; *J. Nat. Prod.*; Cytotoxic Pentacyclic Triterpenoids from *Combretum sundaicum* and *Lantana camara* as Inhibitors of Bcl-xL/BakBH3 Domain Peptide Interaction **(2009)**; *72*; 1314-1320.
- Liu, Q. and Gehring, K.; *J. Biol. Chem.*; Heterodimerization of BAK and MCL-1 activated by detergent micelles **(2010)**; *285*; 41202-41210.
- Liu, Q., Moldoveanu, T., Sprules, T., Matta-Camacho, E., Mansur-Azzam, N. and Gehring, K.; *J. Biol. Chem.*; Apoptotic Regulation by MCL-1 through Heterodimerization **(2010)**; *285*; 19615-19624.
- Logue, S., Cleary, P., Saveljeva, S. and Samali, A.; *Apoptosis*; New directions in ER stress-induced cell death **(2013)**; *18*; 537-546.
- Loomans, E. E., van Doornmalen, A. M., Wat, J. W. and Zaman, G. J.; *Assay Drug Dev. Techn.*; High-throughput screening with immobilized metal ion affinity-based fluorescence polarization detection, a homogeneous assay for protein kinases **(2003)**; *1*; 445-453.
- M., P., R., R. and S., R.; *J. Med. Plants Res.*; Phytochemical screening, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activities of *Knema angustifolia* extracts **(2010)**; *4*; 1269-1272.
- Mangatal, L., Adeline, M. T., Guénard, D., Guéritte-Voegelein, F. and Potier, P.; *Tetrahedron*; Application of the vicinal oxyamination reaction with asymmetric induction to the hemisynthesis of taxol and analogues **(1989)**; *45*; 4177-4190.

- McLeod, M. C., Singh, G., Plampin Iii, J. N., Rane, D., Wang, J. L., Day, V. W. and Aubrey, J.; *Nat. Chem.*; Probing chemical space with alkaloid-inspired libraries (2014); 6; 133-140.
- Moldoveanu, T., Follis, A. V., Kriwacki, R. W. and Green, D. R.; *Trends Biochem. Sci.*; Many players in BCL-2 family affairs (2014); 39; 101-111.
- Morikawa, T., Funakoshi, K., Ninomiya, K., Yasuda, D., Miyagawa, K., Matsuda, H. and Yoshikawa, M.; *Chem. Pharm. Bull.*; Medicinal Foodstuffs. XXXIV. Structures of New Prenylchalcones and Prenylflavanones with TNF- α and Aminopeptidase N Inhibitory Activities from *Boesenbergia rotunda* (2008); 56; 956-962.
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. and Fesik, S. W.; *Nature*; X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death (1996); 381; 335-341.
- Mukherjee, P., Desai, P., Zhou, Y.-D. and Avery, M.; *J. Chem. Inf. Model.*; Targeting the BH3 Domain Mediated Protein-Protein Interaction of Bcl-xL through Virtual Screening (2010); 50; 906-923.
- Nath, S., Bhattacharyya, A. and Sengupta, P. K.; *J. Indian Chem. Soc.*; Synthesis of Didymocarpin-A (1983); 60; 709-710.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.*; Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010 (2012); 75; 311-335.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M.; *Nat. Prod. Rep.*; The influence of natural products upon drug discovery (2000); 17; 215-234.
- Nikolovska-Coleska, Z., Wang, R., Fang, X., Pan, H., Tomita, Y., Li, P., Roller, P. P., Krajewski, K., Saito, N. G., Stuckey, J. A. and Wang, S.; *Anal. Biochem.*; Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization (2004); 332; 261-273.
- Nkunya, M. H. H., Achenbach, H., Renner, C., Waibel, R. and Weenen, H.; *Phytochemistry*; Schefflerin and isoschefflerin: Prenylated chalcones and other constituents of *Uvaria scheffleri* (1990); 29; 1261-1264.
- Nogaret, S.; *Thèse de Doctorat de l'Université Paris Sud*; Etude par RMN de macromolécules biologiques : étude structurale de la protéine CGC-19 impliquée dans la biosynthèse d'un métabolite secondaire, la congocidine chez *Streptomyces ambofaciens*. Développement d'inhibiteurs des Bcl-2, protéines modulatrices de l'apoptose (2011); *Thèse de Doctorat*.
- Nosjean, O., Souchaud, S., Deniau, C., Geneste, O., Cauquil, N. and Boutin, J. A.; *J. Biomol. Screen.*; A simple theoretical model for fluorescence polarization binding assay development (2006); 11; 949-958.

- Oikawa, H. and Tokiwano, T.; *Nat. Prod. Rep.*; Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products (2004); 21; 321-352.
- Ong, C. Y., Ling, S. K., Ali, R. M., Chee, C. F., Samah, Z. A., Ho, A. S. H., Teo, S. H. and Lee, H. B.; *J. Photoch. Photobio B*; Systematic analysis of in vitro photo-cytotoxic activity in extracts from terrestrial plants in Peninsula Malaysia for photodynamic therapy (2009); 96; 216-222.
- Pasfield, L. A., de la Cruz, L., Ho, J., Coote, M. L., Otting, G. and McLeod, M. D.; *Asian J. Org. Chem.*; Synthesis of (\pm)-Panduratin A and Related Natural Products Using the High Pressure Diels-Alder Reaction (2013); 2; 60-63.
- Pereira, J. M., Severino, R. P., Vieira, P. C., Fernandes, J. o. B., da Silva, M. F. G. F., Zottis, A., Andricopulo, A. D., Oliva, G. and Corrêa, A. G.; *Bioorgan. Med. Chem.*; Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* (2008); 16; 8889-8895.
- Perrin, F.; *J. Phys. Radium*; Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité (1926); 7; 390-401.
- Petros, A. M., Dinges, J., Augeri, D. J., Baumeister, S. A., Betebenner, D. A., Bures, M. G., Elmore, S. W., Hajduk, P. J., Joseph, M. K., Landis, S. K., Nettlesheim, D. G., Rosenberg, S. H., Shen, W., Thomas, S., Wang, X., Zanze, I., Zhang, H. and Fesik, S. W.; *J. Med. Chem.*; Discovery of a Potent Inhibitor of the Antiapoptotic Protein Bcl-xL from NMR and Parallel Synthesis (2005); 49; 656-663.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T. and Fesik, S. W.; *Biochim. Biophys. Acta*; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins (2004); 1644; 83-94.
- Pinto, M. M. M., Kijjoa, A., Mondranondra, I.-o., Gutiérrez, A. B. and Herz, W.; *Phytochemistry*; Lignans and other constituents of *Knema furfuracea* (1990); 29; 1985-1988.
- Pisoni, C., Cimoli, G., Resconi, A., Losi, D., Lorenzetti, R., Parodi, S. and Carrano, L.; *Farmaco*; A new assay for the discovery of Bcl-XL inhibitors (2005); 60; 938-943.
- Porzel, A., Phuong Lien, T., Schmidt, J., Drosihn, S., Wagner, C., Merzweiler, K., Van Sung, T. and Adam, G.; *Tetrahedron*; Fissistigmatins A-D: Novel Type Natural Products with Flavonoid-Sesquiterpene Hybrid Structure from *Fissistigma bracteolatum* (2000); 56; 865-872.
- Potier, P., Langlois, N., Langlois, Y. and Gueritte, F.; *J. Chem. Soc.*; Partial synthesis of vinblastine-type alkaloids (1975); 670-671.
- Prakash, L. and Singh, R.; *Pharmazie*; Chemical constituents of the stem bark and stem heartwood of *Dolichandrone crispata* Seem. (1980); 35; 122-123.
- Qian, J., Voorbach, M. J., Huth, J. R., Coen, M. L., Zhang, H., Ng, S.-C., Comess, K. M., Petros, A. M., Rosenberg, S. H., Warrior, U. and Burns, D. J.; *Anal. Biochem.*; Discovery of novel inhibitors of Bcl-xL using multiple high-throughput screening platforms (2004); 328; 131-138.

- Rangkaew, N., Suttisri, R., Moriyasu, M. and Kawanishi, K.; *Arch. Pharm. Res.*; A new acyclic diterpene acid and bioactive compounds from *Knema glauca* (2009); 32; 685-692.
- Ranjith W. Dharmaratne, H., Dhammika Nanayakkara, N. P. and Khan, I. A.; *Phytochemistry*; Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses (2002); 59; 429-433.
- Rosén, J., Gottfries, J., Muresan, S., Backlund, A. and Oprea, T. I.; *J. Med. Chem.*; Novel Chemical Space Exploration via Natural Products (2009); 52; 1953-1962.
- Roy, M. J., Vom, A., Czabotar, P. E. and Lessene, G.; *Brit. J. Pharmacol.*; Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway (2014); 171; 1973-1987.
- Sauquet, H.; *Am. J. Bot.*; Androecium diversity and evolution in Myristicaceae (Magnoliales), with a description of a new *Malagasy* genus, *Doyleanthus* gen. nov (2003); 90; 1293-1305.
- Schultz, D. J., Olsen, C., Cobbs, G. A., Stolowich, N. J. and Parrott, M. M.; *J. Agric. Food Chem.*; Bioactivity of Anacardic Acid against Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) Larvae (2006); 54; 7522-7529.
- Seshadri, T. R.; *P. Indian Acad. Sci. A*; Nuclear oxidation in flavones and related compounds (1949); 30; 333-341.
- Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. and Andrews, D. W.; *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*; Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins (2013); 5; a008714.
- Shi, Y.-P., Rodríguez, I. I. and Rodríguez, A. D.; *Tetrahedron Lett.*; Elisapterosins D and E: complex polycyclic diterpenes of the rare elisapterane class of natural products from the Caribbean sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* (Bayer) (2003); 44; 3249-3253.
- Shibata, K., Tatsukawa, A., Umeoka, K.-i., Lee, H. S. and Ochi, M.; *Tetrahedron*; Crinatusins, Bioactive Diels–Alder Adducts from *Cyathocalyx crinatus* (2000); 56; 8821-8824.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. and Fesik, S. W.; *Science*; Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR (1996); 274; 1531-1534.
- Sinclair, J.; *Gard. Bull. Singapore*; A revision of the Malayan Annonaceae (1955); 14; 149-516.
- Smolewski, P. and Robak, T.; *Curr. Mol. Med.*; Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) as potential molecular targets for therapy of hematological malignancies (2011); 11; 633-649.
- Solecki, R. S.; *Science*; Shanidar IV, a Neanderthal Flower Burial in Northern Iraq (1975); 190; 880-881.
- Spencer, G. F., Tjarks, L. W. and Kleiman, R.; *J. Nat. Prod.*; Alkyl and Phenylalkyl Anacardic Acids From *Knema elegans* Seed Oil (1980); 43; 724-730.

- Spichiger, R. E., Savolainen, V., Figeat, M. and Jeanmonod, D.; *Botanique systématique des plantes à fleurs* (2004).
- Stasiuk, M. and Kozubek, A.; *Cell Mol Life Sci*; Biological activity of phenolic lipids (2010); 67; 841-860.
- Stepanenko, L. S., Krivoshechkova, O. E., Dmitrenok, P. S. and Maximov, O. B.; *Phytochemistry*; Quinones of *Cetraria islandica* (1997); 46; 565-568.
- Steven, C. and Russel, M.; *Bioactive Natural Products : Detection, Isolation, and Structural Determination* (2008); 608.
- Tahir, S. K., Yang, X., Anderson, M. G., Morgan-Lappe, S. E., Sarthy, A. V., Chen, J., Warner, R. B., Ng, S. C., Fesik, S. W., Elmore, S. W., Rosenberg, S. H. and Tse, C.; *Cancer Res.*; Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737 (2007); 67; 1176-1183.
- Thang, T. D., Luu, H. V., Dung, V. C., Tuan, N. N., Hung, N. H., Dai, D. N. and Ogunwande, I. A.; *Nat. Prod. Res.*; Chemical constituents of essential oils from the leaves and stem barks of four Vietnamese species of *Fissistigma* (Annonaceae) (2014); 28; 174-184.
- Thomas, A. L. and Doyle, J. A.; *Implications d'une analyse cladistique dans l'histoire géographique des Annonaceae : famille d'Angiospermes primitives* (1996).
- Thuy, T. T., Quan, T. D., Anh, N. T. and Sung, T. V.; *Nat. Prod. Res.*; Cytotoxic and antimicrobial aporphine alkaloids from *Fissistigma poilanei* (Annonaceae) collected in Vietnam (2012); 26; 1296-1302.
- Tse, C., Shoemaker, A. R., Adickes, J., Anderson, M. G., Chen, J., Jin, S., Johnson, E. F., Marsh, K. C., Mitten, M. J., Nimmer, P., Roberts, L., Tahir, S. K., Xiao, Y., Yang, X., Zhang, H., Fesik, S., Rosenberg, S. H. and Elmore, S. W.; *Cancer Res.*; ABT-263: A Potent and Orally Bioavailable Bcl-2 Family Inhibitor (2008); 68; 3421-3428.
- Tsujimoto, Y., Finger, L., Yunis, J., Nowell, P. and Croce, C.; *Science*; Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation (1984); 226; 1097-1099.
- Tuchinda, P., Reutrakul, V., Claeson, P., Pongprayoon, U., Sematong, T., Santisuk, T. and Taylor, W. C.; *Phytochemistry*; Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata* (2002); 59; 169-173.
- Vinayachandra, Shwetha, R. and Chandrashekar, K. R.; *Parasitol. Res.*; Larvicidal activities of *Knema attenuata* (Hook. f. & Thomson) Warb. (Myristicaceae) extracts against *Aedes albopictus* Skuse and *Anopheles stephensi* Liston (2011); 109; 1671-1676.
- Vo, D. D., Gautier, F., Juin, P. and Gree, R.; *Eur. J. Med. Chem.*; Structure-activity relationship of selected polyphenol derivatives as inhibitors of Bax/Bcl-xL interaction (2012); 57; 286-293.

- Vysotskii, M. V., Imbs, A. B., Popkov, A. A., Latyshev, N. A. and Svetashev, V. I.; *Tetrahedron Lett.*; Trans-olefinic very-long-chain fatty acid (26:3 Δ 5c,9c,19t) in lipids of fresh-water sponges of lake baikal **(1990)**; *31*; 4367-4370.
- Wei, J., Stebbins, J. L., Kitada, S., Dash, R., Placzek, W., Rega, M. F., Wu, B., Cellitti, J., Zhai, D., Yang, L., Dahl, R., Fisher, P. B., Reed, J. C. and Pellecchia, M.; *J. Med. Chem.*; BI-97C1, an Optically Pure Apogossypol Derivative as Pan-Active Inhibitor of Antiapoptotic B-Cell Lymphoma/Leukemia-2 (Bcl-2) Family Proteins **(2010)**; *53*; 4166-4176.
- Whitfield, J., Harada, K., Bardelle, C. and Staddon, J. M.; *Anal. Biochem.*; High-throughput methods to detect dimerization of Bcl-2 family proteins **(2003)**; *322*; 170-178.
- Wiar, C., Mogana, S., Khalifah, S., Mahan, M., Ismail, S., Buckle, M., Narayana, A. K. and Sulaiman, M.; *Fitoterapia*; Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia **(2004)**; *75*; 68-73.
- Wong, R.; *J. Exp. Clin. Cancer Res.*; Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment **(2011)**; *30*; 87.
- Wu, Y.-C., Sureshbabu, M., Fang, Y.-C., Wu, Y.-H., Lan, Y.-H., Chang, F.-R., Chang, Y.-W. and Hwang, T.-L.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; Potent inhibition of human neutrophil activations by bractelactone, a novel chalcone from *Fissistigma bracteolatum* **(2013)**; *266*; 399-407.
- Yalpani, M. and H.P. Tyman, J.; *Phytochemistry*; The phenolic acids of *Pistachia vera* **(1983)**; *22*; 2263-2266.
- Yang, Z., Lu, W., Ma, X. and Song, D.; *Phytomedicine*; Bioassay-guided isolation of an alkaloid with antiangiogenic and antitumor activities from the extract of *Fissistigma cavaleriei* root **(2012)**; *19*; 301-305.
- Yang, Z., Niu, Y., Le, Y., Ma, X. and Qiao, C.; *Phytomedicine*; Beta-lactamase inhibitory component from the roots of *Fissistigma cavaleriei* **(2010)**; *17*; 139-141.
- Yun, J. M., Kwon, H. and Hwang, J. K.; *Planta Med.*; In vitro anti-inflammatory activity of panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in RAW264.7 cells **(2003)**; *69*; 1102-1108.
- Zahir, A., Jossang, A., Bodo, B., Hadi, H. A., Schaller, H. and Sevenet, T.; *J. Nat. Prod.*; Knerachelins A and B, Antibacterial Phenylacylphenols from *Knema furfuracea* **(1993)**; *56*; 1634-1637.
- Zehnter, R. and Gerlach, H.; *Liebigs Ann.*; Synthesis of anacardic acids **(1995)**; *1995*; 2209-2220.
- Zeng, L., Gu, Z.-M., Fang, X.-P. and McLaughlin, J. L.; *J. Nat. Prod.*; Kneglomeratanol, Kneglomeratanones A and B, and Related Bioactive Compounds from *Knema glomerata* **(1994)**; *57*; 376-381.

- Zhai, D., Godoi, P., Sergienko, E., Dahl, R., Chan, X., Brown, B., Rascon, J., Hurder, A., Su, Y., Chung, T. D., Jin, C., Diaz, P. and Reed, J. C.; *J. Biomol. Screen.*; High-throughput fluorescence polarization assay for chemical library screening against anti-apoptotic Bcl-2 family member Bfl-1 **(2012)**; *17*; 350-360.
- Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A. C. and Reed, J. C.; *Cell Death Differ.*; Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins **(2006)**; *13*; 1419-1421.
- Zhang, H., Nimmer, P., Rosenberg, S. H., Ng, S. C. and Joseph, M.; *Anal. Biochem.*; Development of a high-throughput fluorescence polarization assay for Bcl-xL **(2002)**; *307*; 70-75.
- Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y. and Oldenburg, K. R.; *J. Biomol. Screen.*; A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays **(1999)**; *4*; 67-73.
- Zhang, X. D.; *Genomics*; A pair of new statistical parameters for quality control in RNA interference high-throughput screening assays **(2007)**; *89*; 552-561.
- Zhang, Y.-N., Zhong, X.-G., Zheng, Z.-P., Hu, X.-D., Zuo, J.-P. and Hu, L.-H.; *Bioorgan. Med. Chem.*; Discovery and synthesis of new immunosuppressive alkaloids from the stem of *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr **(2007)**; *15*; 988-996.
- Zhang, Z., Wu, G., Xie, F., Song, T. and Chang, X.; *J. Med. Chem.*; 3-Thiomorpholin-8-oxo-8H-acenaphtho[1,2-b]pyrrole-9-carbonitrile (S1) based molecules as potent, dual inhibitors of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and myeloid cell leukemia sequence 1 (Mcl-1): structure-based design and structure-activity relationship studies **(2011)**; *54*; 1101-1105.

Intercalaire rouge

Annexes

Protocole des tests

Les objectifs

Deux objectifs sont possibles. Dans le premier cas, on veut simplement savoir si un extrait de plantes ou un produit possède une activité. On réalise alors un **criblage** en duplicata. Dans le second cas, un produit est actif mais on veut connaître précisément à partir de quelle concentration il inhibe l'activité de la protéine. On détermine l'**IC50** en triplicata, concentration à laquelle 50 % de l'efficacité de la protéine est inhibée, qui permettra de calculer la constante d'inhibition (K_i).

Matériels et méthodes



Précautions

- Travailler en conditions le plus stérilement possible (*i.e.* laver la paillasse, les propipettes, les contenants à l'éthanol, utiliser des gants) en faisant attention aux contaminations externes telles que la salive.
- Les pesées doivent être réalisées sur une balance très précise pour minimiser les erreurs.
- Vérifier que les protéines ne précipitent pas en décongelant.
- Calculer le nombre précis d'aliquots nécessaires à la manipulation.
- Inscrire sur la fiche d'état des stocks le nombre d'aliquots restants.
- Indiquer à l'aide d'une étiquette sur chacune des plaques utilisées la date, vos initiales, votre référence, criblage ou IC_{50} et Bcl-xL ou Mcl-1.

Présentation du matériel et des solutions (prendre la clé de la ciblithèque)

Produits et matériels	Localisation
<ul style="list-style-type: none"> • Na₂HPO₄ (Sigma, S0876-500g) • NaCl (Sigma, S9625-1Kg) 	Placard de la ciblithèque
<ul style="list-style-type: none"> • EDTA 1mM (Sigma, E7889-100 mL) préparée le 21/04/11 par V.D. • HCl 1 N préparée le 21/04/11 par V.D. • Acide pluronique F-68 à 10 % (Sigma, P5556) • Eppendorf 0,5 et 1,5 mL • Feuilles adhésifs en aluminium • Filtre millipore 0,2 µM • Ruban adhésif bleu • Ruban adhésif pour autoclavage 	Placard de la ciblithèque
<ul style="list-style-type: none"> • Plaques 96 puits à fond noir (=plaque test) • Plaques 96 puits transparentes (=plaque transfert) • Tube Falcon 15 et 50 mL transparents • Robots X8 (Steril-Antares) • Robots X96 (Beckman-Coulter) 	Ciblithèque (Boîtes VD) Réserver les robots à l'avance sur http://resa.icsn.cnrs-gif.fr/
<ul style="list-style-type: none"> • Propipettes (que pour les tests biologiques et ne pas les laisser à trainer) 	Bac polystyrène de la ciblithèque
<ul style="list-style-type: none"> • DMSO pur • Cônes • Eau autoclavée (voir O.Pamlard) • Bouteille Schott 1 L • Bouteilles Schott 250 mL • Tube Falcon 50 mL opaque / transparent 	Equipe 45
<p>Ligands de référence à 10 mM x 5µL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-xL → Bak-WT G-16-R (PolyPeptide Group, SP970859I) lot VD20110428 • Mcl-1 → Bid-WT M-20-A (PolyPeptide Group) <p>Ligands fluorescents à 100 µM x 50 µL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-xL → Bak-CF 5-carboxyfluorescein-G-16-R (PolyPeptide Group, SP021369F) lot VD20110428 • Mcl-1 → Bid-CF 5-FAM-M-20-A (PolyPeptide Group) 	Congélateurs PSN, Bak → couloir, tiroir du bas. Bid → labo 216, tiroir du haut
<p>Protéines à X µM x 100 µL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bcl-xL 2012 production et purification par N. Birlirakis (Eq Guittet, ICSN) → 13,8 µM • Mcl-1 2012 production et purification par N. Birlirakis (Eq Guittet, ICSN) → 15 µM 	Congélateur -80°C, tiroir du milieu
<ul style="list-style-type: none"> • Lecteur de plaques en polarisation de fluorescence (SpectraMax[®] Paradigm[®]) 	Bât 23, contacter M. Cresteil et Mme Eloy

Méthodes

Préparation du tampon

	1L de tampon	500 mL de tampon	250 mL de tampon
Na ₂ HPO ₄	2,84 g	1,42 g	0,71 g
NaCl	2,92 g	1,46 g	0,73 g
Eau autoclavée	qsp 1L	qsp 500 mL	qsp 250 mL
EDTA 1 mM	2 mL	1 mL	0,5 mL
HCl 1N	qsp pH 7,4	qsp pH 7,4	qsp pH 7,4
Filtrer sur filtre millipore (réutilisation du même filtre, quand trop friper le changer).			
Le tampon doit être acidifié à 0,05 % juste avant son utilisation.			
acide pluronique F-68 à 10 %.	500 µL	250 µL	125 µL

Préparer le tampon dans une bouteille (celles réservées pour les tests).

Ajouter les produits dans l'ordre indiqué et bien solubiliser l'ensemble.

Pour ajuster le pH, utiliser un agitateur magnétique, la mesure du pH est réalisée dans l'équipe Dubois, suivre le mode opératoire pour utiliser le pH-mètre.

Le tampon peut être préparé à l'avance s'il n'a pas été acidifié. Il doit être stocké à 4°C et au maximum 3 mois (bien indiquer la date de préparation sur la bouteille).

Protéines



Sortir les aliquotes de protéines, les réchauffer entre ses mains, les diluer puis les conserver dans la glace avec les ligands fluo et ligands de référence. Ne décongeler que la quantité nécessaire pour le test et ne pas utiliser le bain à ultrasons ou le vortex. → fichier excel pour dilution « Fiche dilution V3 »

LOT 2012	Protéine Bcl-xL	Bak-CF	Récepteur		
			Bak-WT*	Produit*	Extrait*
Conc origine	150 µM dans Tp	Sec	Sec	Sec	10 mg/mL dans DMSO pur
facteur dilution	1/9,55	1 mg dans 4,8 mL	1 mg dans 58 µL		
Masse Molaire	20002,16	2083,3	1724,9	variable	---
Conc stockage	13,8 µM dans Tp à -20°C	100 µM dans DMSO pur à -20°C	14,2 mM dans DMSO pur à -20°C	10 mM dans DMSO pur	1 mg/mL dans DMSO pur à -20°C
Volume aliquots	100 µL	50 µL	5 µL		
facteur dilution	1/52	1/2500	1/7,5	1/25	1/25
Conc initiale test	267 nM dans Tp	40 nM dans Tp	400 µM dans Tp	0,4 mM dans DMSO 10%	40 µg/mL dans DMSO 10%
Volume prélevé/puit	15 µL	15 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Conc finale test (40 µL volume total)	100 nM	15 nM	100 µM	0,1 mM	10 µg/mL

LOT 2012	Protéine Mcl-1	Bid-CF	Récepteur		
			Bid-WT*	Produit*	Extrait*
Conc origine	150 µM dans Tp	Sec	Sec	Sec	10 mg/mL dans DMSO pur
facteur dilution	1/9,55	1 mg dans 4,8 mL	1 mg dans 58 µL		
Masse Molaire	20001,6	2803	2444	variable	---
Conc stockage	15 µM dans Tp à -20°C	100 µM dans DMSO pur à -20°C	10 mM dans DMSO pur à -20°C	10 mM dans DMSO pur	1 mg/mL dans DMSO pur à -20°C
Volume aliquots	100 µL	50 µL	5 µL		
facteur dilution	1/56	1/2500	1/25	1/25	1/25
Conc initiale test	267 nM dans Tp	40 nM dans Tp	400 µM dans Tp	0,4 mM dans DMSO 10%	40 µg/mL dans DMSO 10%
Volume prélevé/puit	15 µL	15 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Conc finale test (40 µL volume total)	100 nM	15 nM	100 µM	0,1 mM	10 µg/mL

Mise en route des robots

Réserver les robots à l'avance sur le site de réservation des appareils (appareils en commun).

X 8 → *Steril-Antares*

1. Allumer l'appareil → tourner la clé sur I et appuyer sur la lumière (1^{er} bouton) et sur le courant (3^{ème} bouton)
2. Ouvrir le logiciel → Biomek Software
3. Ouvrir le projet → project → open → Bcl-xL/Mcl-1
4. Calibrer l'appareil → Instrument → home all axes

X 96 → *Beckman-Coulter*

1. Allumer l'appareil → côté droit au fond
2. Allumer le compresseur → tourner le bouton noir sur I
2. Ouvrir le logiciel → Biomek Software
3. Ouvrir le projet → project → open → Bcl-xL/Mcl-1
4. Calibrer l'appareil → Instrument → home all axes

les robots sont ready...

Pour chaque méthode utilisée,

- ❖ Mettre les bons éléments (plaques, boîtes de cônes, réservoirs) comme indiqué sur le « dock » (=plan)
- ❖ Pour indiquer au robot le nombre de cônes restant dans les boîtes
Cliquer sur :
 - Instrument Setup
 - boîte de cônes
 - Show tips available
 - En bleu : plein
 - En blanc : vide

Pour la suite du protocole se référer à la partie qui correspond à l'objectif à atteindre.

Criblage

Protocole Criblage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ligand-WT 10 ⁻⁸ M	Extrait 10 µg/mL	Blanc Protéine									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 25 15
B	Ligand-WT 10 ⁻⁷ M	Extrait 10 µg/mL	Blanc Protéine									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 25 15
C	Ligand-WT 5.10 ⁻⁷ M	Extrait 10 µg/mL	Vide									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	
D	Ligand-WT 10 ⁻⁶ M	Extrait 10 µg/mL	Vide									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	
E	Ligand-WT 5.10 ⁻⁶ M	Extrait 10 µg/mL	BI DMSO 100%									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 15 10
F	Ligand-WT 10 ⁻⁵ M	Extrait 10 µg/mL	BI DMSO 100%									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 15 10
G	BI Ligand- WT 10 ⁻⁴ M	Extrait 10 µg/mL	Blanc Ligand-CF									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 25 15
H	BI Ligand- WT 10 ⁻⁴ M	Extrait 10 µg/mL	Blanc Ligand-CF									
		15 10 15	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 10 10	15 15 25 15

Tampon

Ligand-CF 40 nM

Ligand-WT gamme

Protéine 267 nM

DMSO 14% dans tampon

Extrait (40 µg/mL)

Aliquots disponibles

Tous les produits et extraits doivent avoir été solubilisés dans du DMSO pur à la concentration de 10 mM pour les produit et 1 mg/mL pour les extraits.

Dépôt des extraits manuellement

Distribuer 40 µL de produit ou extrait à 1 mg/mL dans les colonnes 2 à 11 d'une plaque de transfert mère (plaque transparente). Attention aux bulles d'air au fond des puits, les éliminer avec un cône ou en centrifugeant (équilibrer appareil et mettre film sur les plaques).

DISTRIBUTION DE LA PROTEINE AU ROBOT X8

→ File → Open → distribution Prot-Tp ac-DMSO 14% criblage
(≈10mn/pl)



Dilution des extraits au 1/25 au robot X96

→ File → Open → Transfert X
Retirer cônes des colonnes 1 et 12

Criblage d'extraits	Criblage d'extraits + produits purs	Pour éviter la précipitation des produits dans le DMSO 10%
DMSO 10% dans un couvercle de boîte Plaque transparente vide	DMSO pur dans un couvercle de boîte Plaque transparente vide	
→ Transfert 120 x 2	→ Transfert 24	
Plaque mère Plaque transparente avec DMSO 10%	Plaque mère Plaque transparente avec DMSO	
→ Transfert produit criblage	→ Transfert produit criblage	
	Tampon dans un couvercle de boîte Plaque transparente DSMO/extrait → Transfert 108 x 2	

Transfert des extraits dilués dans une plaque test au robot X96

→ File → Open → Transfert produit criblage
Retirer cônes des colonnes 1 et 12
Plaque transparente finale + plaque test

Distribution du ligand de référence manuellement (colonne 1)

Diluer dans du tampon acidifié et distribuer le ligand de référence comme sur le plan criblage dans la plaque test.

Distribution du ligand fluorescent au robot X96 (dans l'obscurité)

→ File → Open → Transfert Bak-CF criblage
Retirer les cônes A12, B12, C12 et D12
Préparer du ligand fluorescent à 40 nM dans un tube Falcon de 50 mL recouvert de papier aluminium.
Remplir un couvercle de boîte avec le ligand fluo à 40 nM
Placer la plaque de test.

Fermer la plaque hermétiquement à l'aide d'un feuillet adhésif en aluminium.

Lecture des résultats

Chez Thierry Cresteil au bât 23,
Centrifuger avant lecture.
Faire attention en retirant le film aluminium afin qu'aucune goutte ne sorte des puits.

Exporter les données *via* les transferts publics
run → \\icsn

Traitement des résultats

Les résultats sont récupérés sous format Excel.
Le traitement des données → cf fichier excel

1. valider le bon déroulement du test et détecter les molécules ou extraits qui interfèrent avec le test.
 - Sur le premier volet du fichier de données, traiter l'intensité de fluorescence
2. Obtenir les résultats
 - Sur le second volet du fichier de données, traiter les résultats de FP.

**Merci de mettre à jour le fichier bilan des molécules et extraits testés
→ « Tests Bcl-xL Mcl-1 Date »**

IC50

Protocole IC50	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ligand-WT 10 ⁻⁸ M	Ligand-WT 10 ⁻⁸ M	Meioyinine A								Blanc Protéine	Blanc Protéine
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 25 15
B	Ligand-WT 10 ⁻⁷ M	Ligand-WT 10 ⁻⁷ M									Blanc Protéine	Blanc Protéine
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 25 15
C	Ligand-WT 5.10 ⁻⁷ M	Ligand-WT 5.10 ⁻⁷ M									Vide	Vide
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10
D	Ligand-WT 10 ⁻⁹ M	Ligand-WT 10 ⁻⁹ M									Vide	Vide
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10
E	Ligand-WT 5.10 ⁻⁶ M	Ligand-WT 5.10 ⁻⁶ M									BI DMSO 100%	BI DMSO 100%
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10
F	Ligand-WT 10 ⁻⁵ M	Ligand-WT 10 ⁻⁵ M									BI DMSO 100%	BI DMSO 100%
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10
G	BI Ligand- WT 10 ⁻⁴ M	BI Ligand- WT 10 ⁻⁴ M									Blanc Ligand-CF	Blanc Ligand-CF
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 25 15	15 25 15
H	BI Ligand- WT 10 ⁻⁴ M	BI Ligand- WT 10 ⁻⁴ M									Blanc Ligand-CF	Blanc Ligand-CF
		15 10 15	15 10 15	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 15 10	15 25 15	15 25 15

Tampon
 Ligand-CF 40 nM
 Ligand-WT gamme
 Protéine 267 nM
 DMSO 1,4% dans tampon
 Produit (10 mM)
 Aliquots disponibles

Aliquot de 50 µL Ligand-CF 100 µM
 Stockage -20°C congélio PSN couloir

Aliquots de 5 µL de ligand-WT 10 mM Bid et 14 mM Bak
 Stockage -20°C congélio PSN labo216 ou couloir

Aliquots de 100 µL de MeCl-1 2012.15 µM et 13.8 µM Bcl-xL
 Stockage -80°C congélio PSN

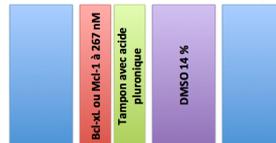


Volume réactionnel par puits = 40 µL

Tous les produits purs doivent avoir été solubilisés dans du DMSO pur à la concentration de 10 mM.

Distribution de la protéine au robot X8 (≈10 min/plaques)

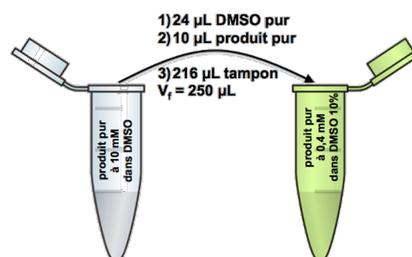
→ File → Open → distribution Prot-Tp ac-DMSO 14% EC50



Les produits

Dilution des produits au 1/25

Dans la mesure où l'on ne connaît pas la solubilité des produits dans le DMSO 10% dans le tampon acide, il est préférable de diluer les produits dans le maximum de DMSO puis d'ajouter le tampon. Ne pas oublier d'ajouter la référence Meioygnine A (Mdl-17-3) dans chacune des plaques.

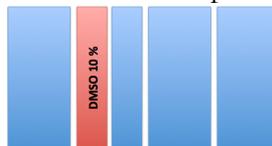


Dépôt des produits manuellement

Distribuer 90 µL de produit pur 0,4 mM dans la colonne 3 d'une plaque de transfert. Attention aux bulles d'air, les éliminer avec un cône lorsqu'il en a. Ne pas oublier d'ajouter la référence Meioygnine A (HB1-25-1) dans chacune des plaques.

Dilutions des produits au robot X8

→ File → Open → Dilution des produits IC₅₀ 4 plaques



Transfert des produits dilués dans la plaque test au robot X96

→ File → Open → Transfert produit IC₅₀

Retirer cônes des colonnes 1/2 et 11/12

Plaque dilution + plaque test

Distribution du ligand de référence manuellement (colonne 1et 2)

Diluer dans du tampon acidifié et distribuer le ligand de référence comme sur le plan IC50 dans la plaque test.

Distribution du ligand fluorescent au robot X96 (dans l'obscurité )

→ File → Open → Transfert Bak-CF IC50 ou transfert 15
Retirer les cônes A11/12, B11/12, C11/12 et D11/12
Préparer du ligand fluorescent à 40 nM dans un tube Falcon de 50 mL recouvert de papier aluminium.
Remplir un couvercle de boîte avec le ligand fluo à 40 nM
Placer la plaque de test.

Fermer la plaque hermétiquement à l'aide d'un feuillet adhésif en aluminium.

Lecture des résultats

Chez Thierry Cresteil au bât 23,
Centrifuger avant lecture.
Faire attention en retirant le film aluminium afin qu'aucune goutte ne sorte des puits.
Exporter les données *via* les transferts publics
run → \\icsn

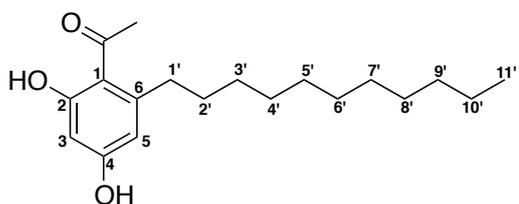
Traitement des résultats

Les résultats sont récupérés sous format Excel.
Le traitement des données → cf fichier excel

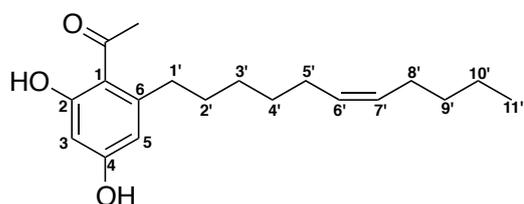
3. valider le bon déroulement du test et détecter les molécules ou extraits qui interfèrent avec le test.
 - Sur le premier volet du fichier de données, traiter l'intensité de fluorescence
4. Obtenir les résultats
 - Sur le second volet du fichier de données, traiter les résultats de FP.

**Merci de mettre à jour le fichier bilan des molécules et extraits testés
→ « Tests Bcl-xL Mcl-1 Date »**

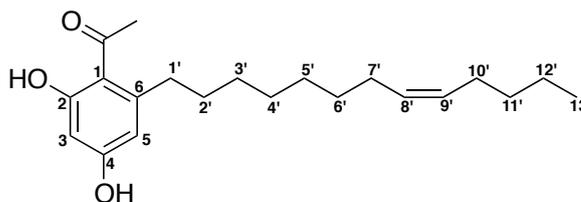
Molécules isolées de *K. hookeriana*



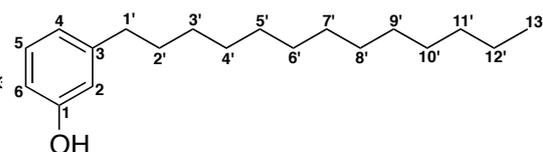
Khookerianone A (46)*



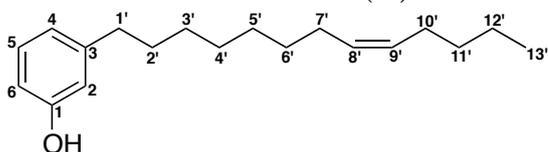
Khookerianone B (47)*



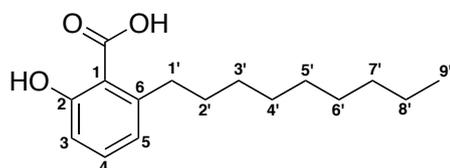
Khookerianone C (57)*



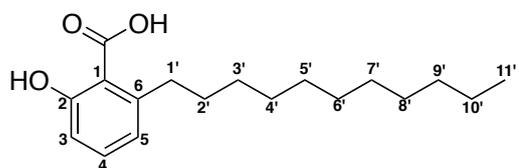
3-tridecylphenol (48)



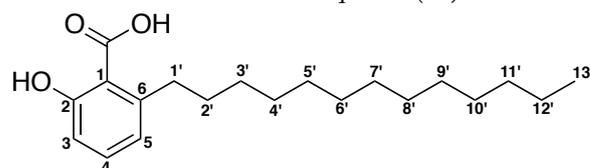
3-(8Z-trideceny)-phenol (49)



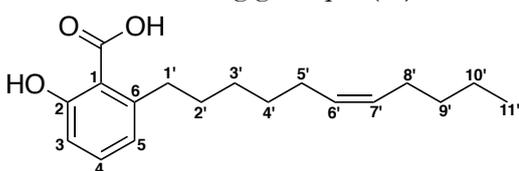
Acide khookerianique A (50)



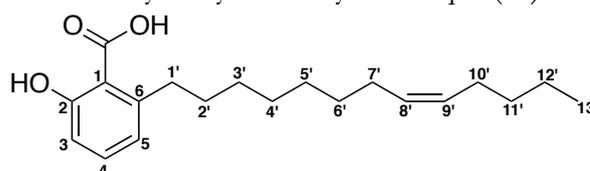
Acide anagantique (51)



Acide 2-hydroxy-6-tridécylbenzoïque (52)

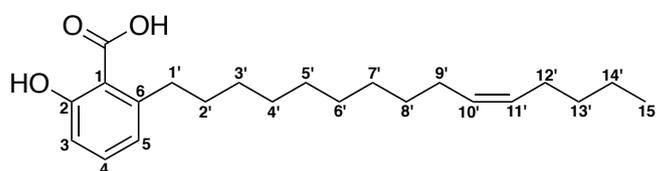


Acide khookerianique B (53)*

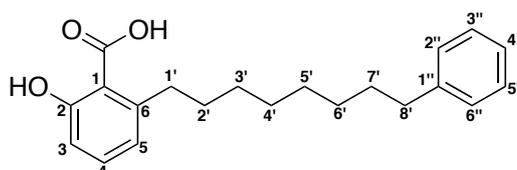


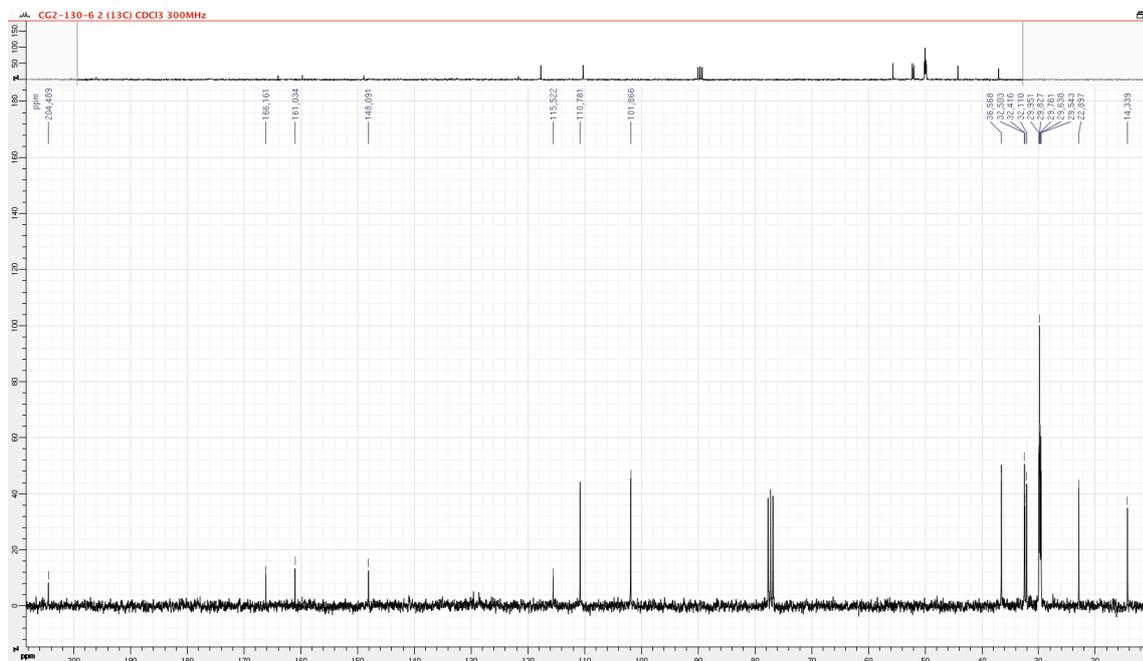
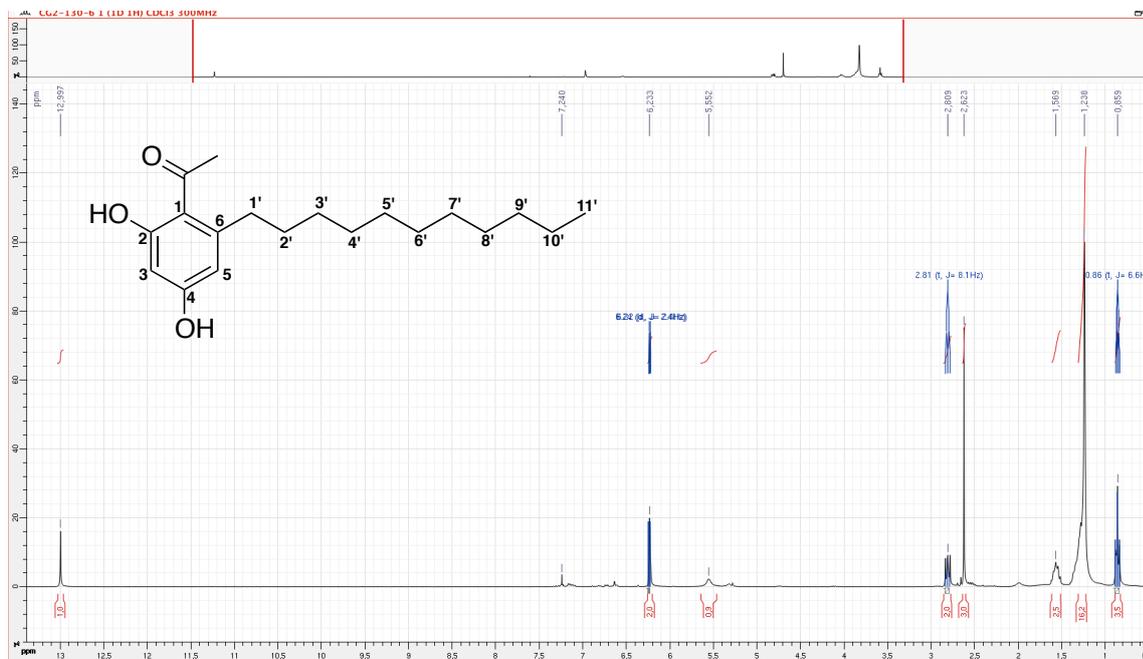
Acide 2-hydroxy-6-((Z)-tridécényl)benzoïque (54)

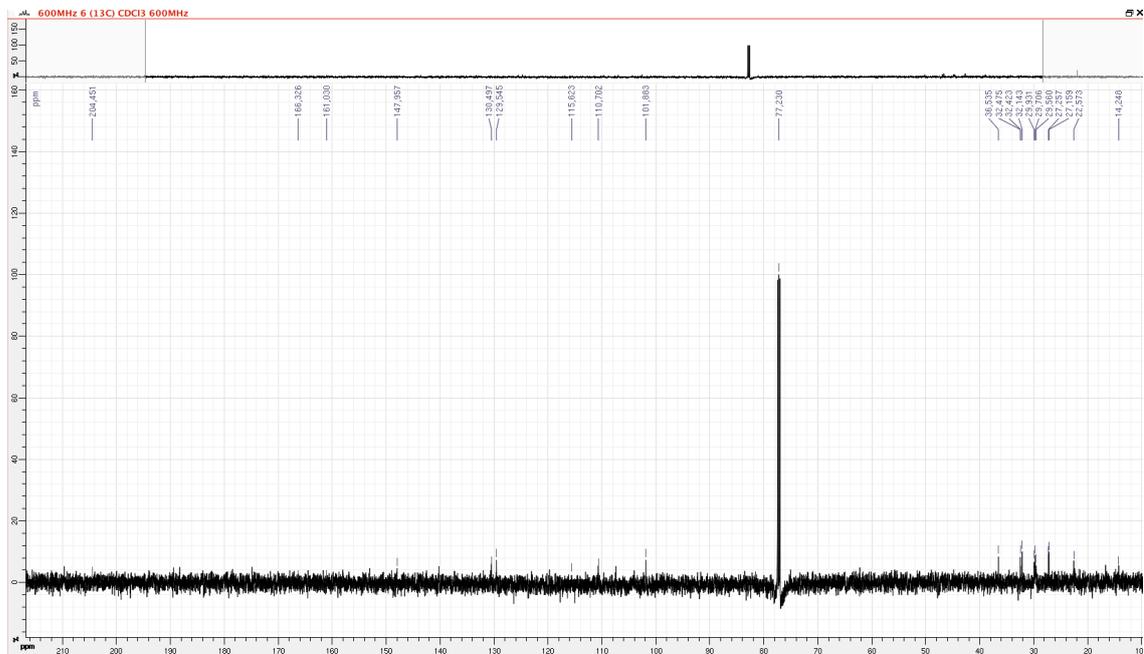
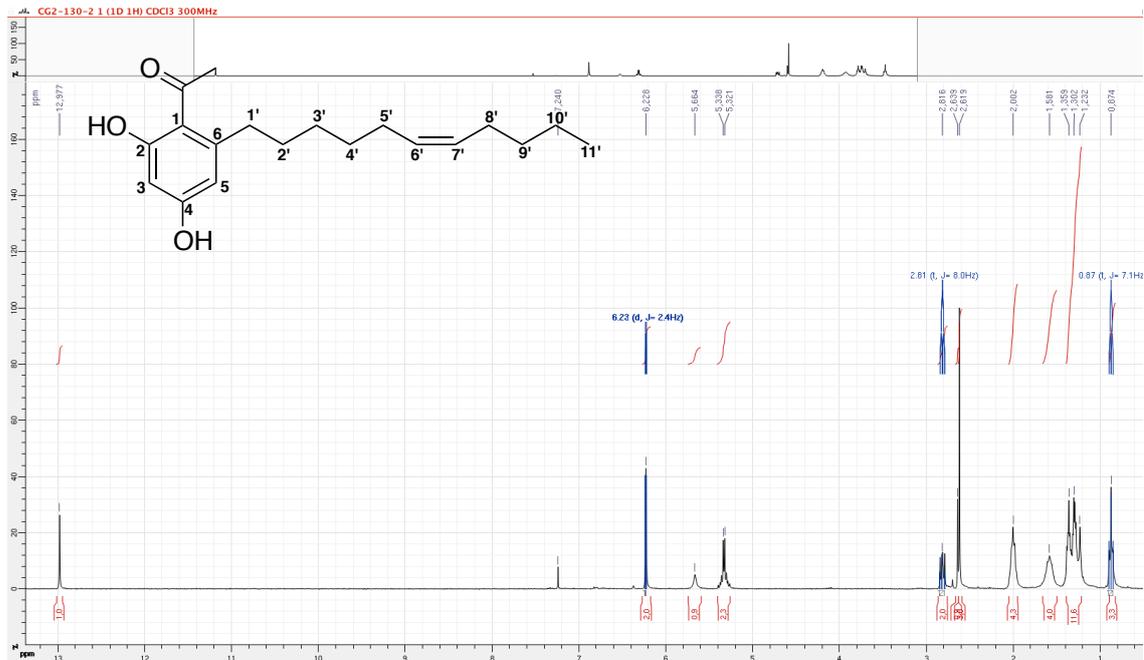
Acide 2-hydroxy-6-(10-pentadécényl)benzoïque (55)

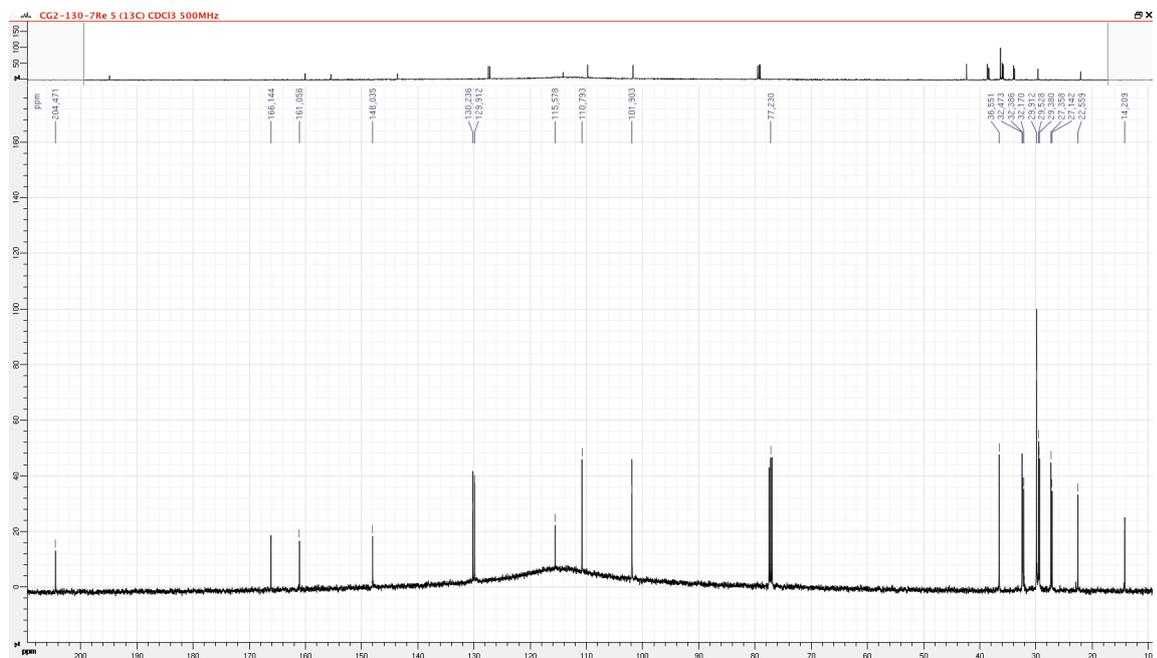
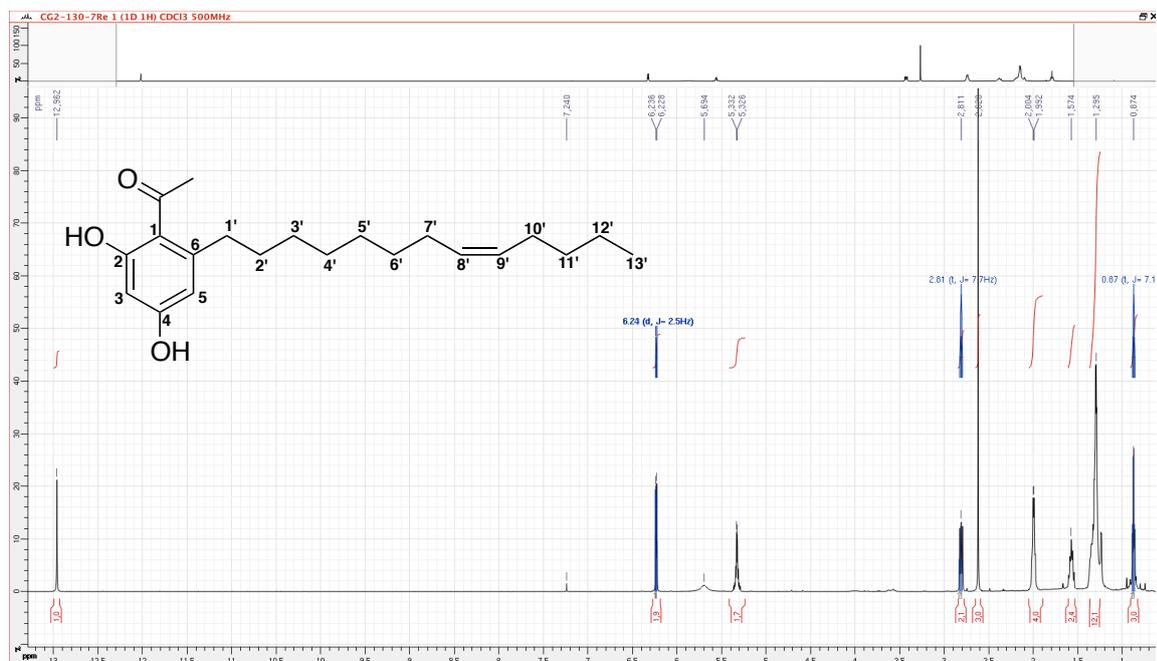


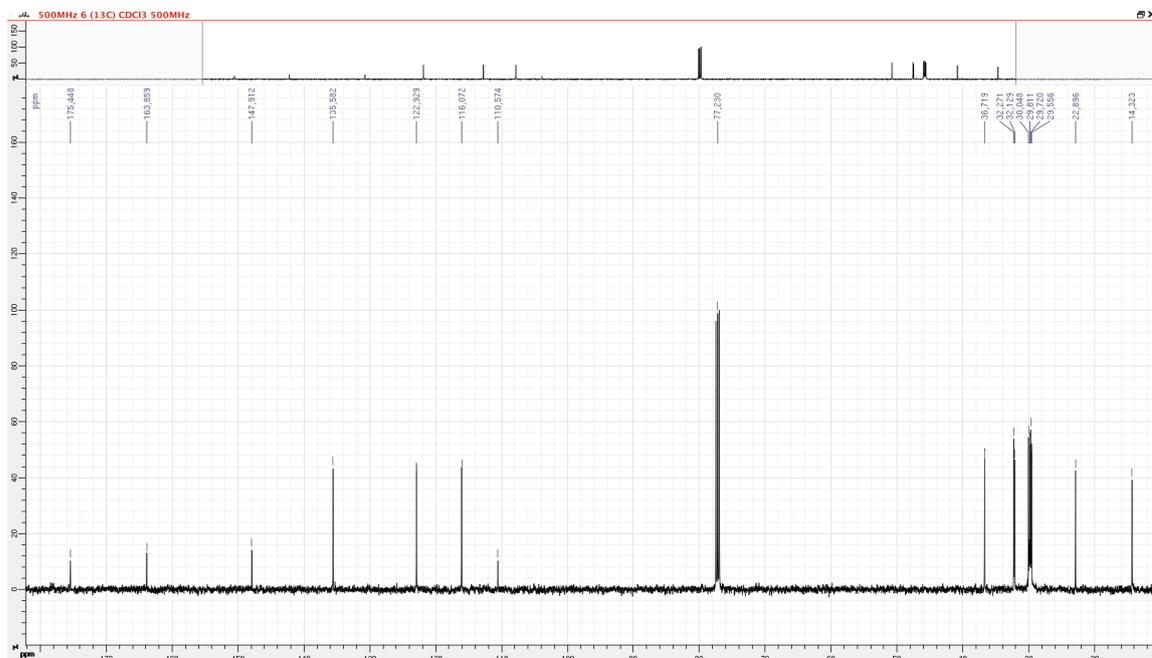
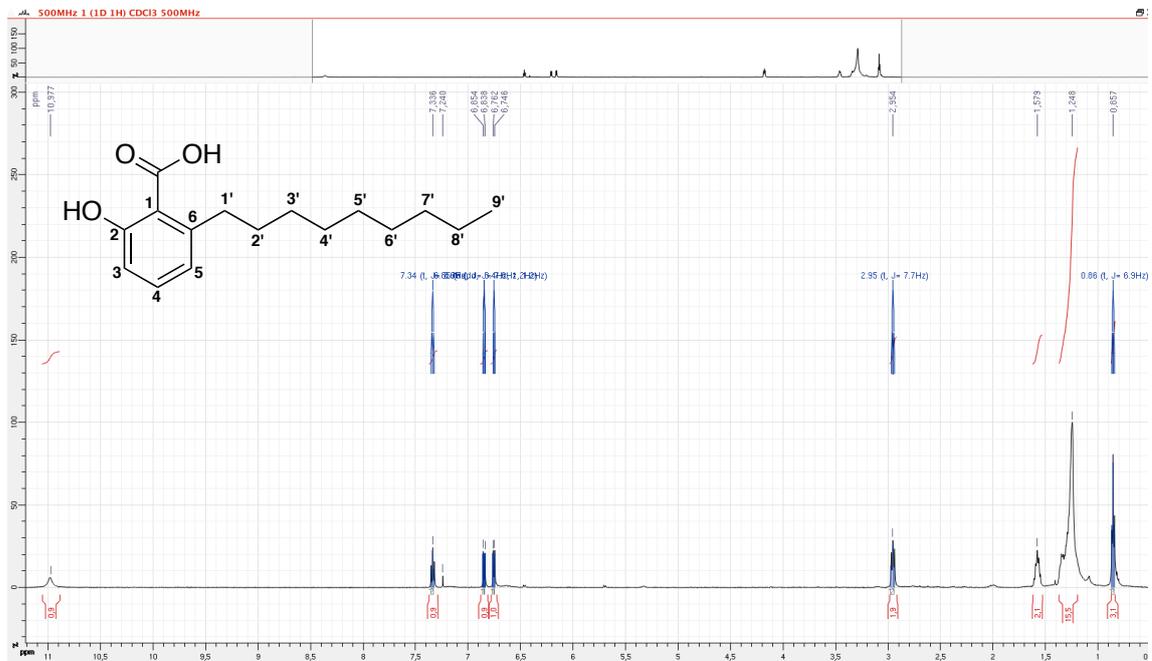
Acide khookerianique C (56)*

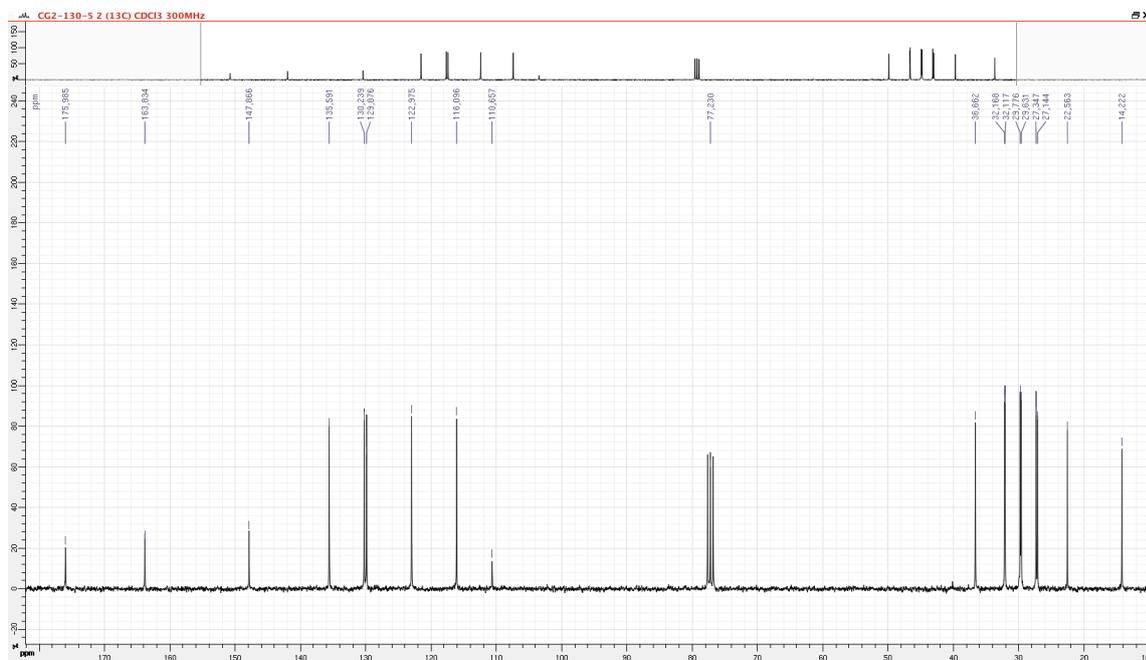
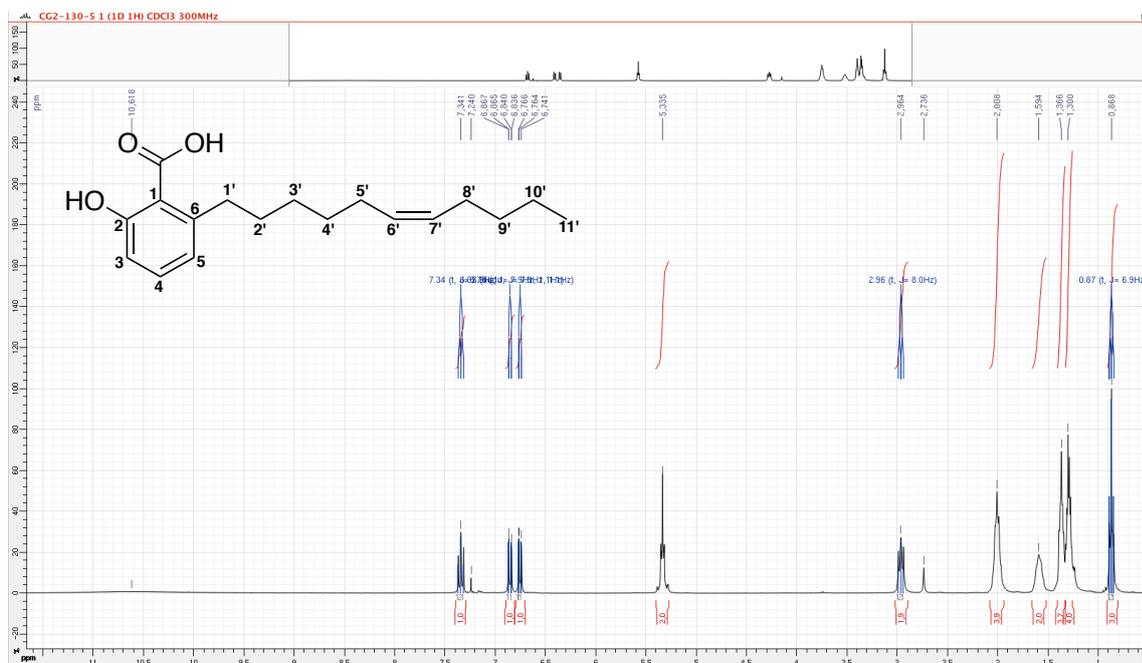


Khookerianone A (46) ^1H et ^{13}C CDCl_3 – 300 MHz

Khookerianone B (47) ^1H et ^{13}C $\text{CDCl}_3 - 500 \text{ MHz}$ 

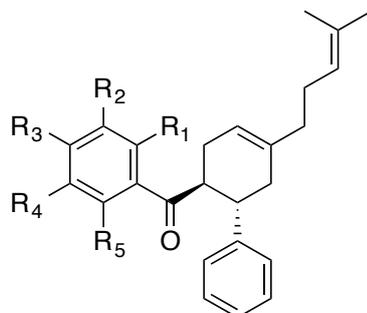
Khookerianone C (57) ^1H et ^{13}C CDCl_3 – 500 MHz

Acide khookerianique A (50) ^1H et ^{13}C $\text{CDCl}_3 - 500 \text{ MHz}$ 

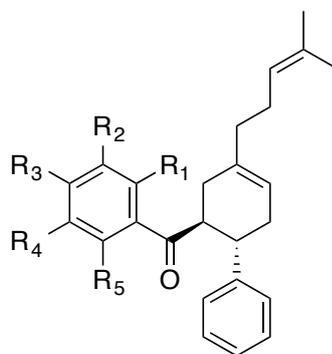
Acide khookerianique B (53) ^1H et ^{13}C CDCl_3 – 300 MHz

Les chalconoïdes adduits de Diels-Alder naturels

diène = myrcène



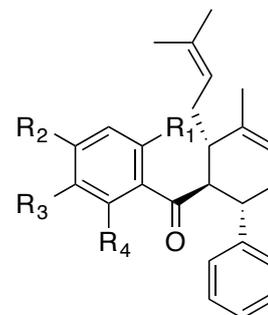
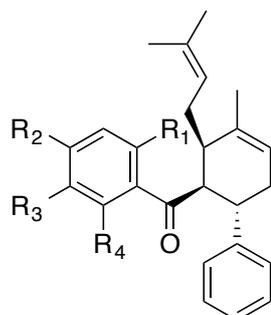
	Fissistine	Crinatusine			Krachaizine		Nicolaioidesine
		A ₁	B ₁	C ₁	A	B	C
R ₁	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH
R ₂	OH	CH ₃	H	H	H	H	H
R ₃	OCH ₃	OH	OH	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
R ₄	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H
R ₅	OH						



	Isofissistine	Crinatusine		
		A ₂	B ₂	C ₃
R ₁	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
R ₂	OH	CH ₃	H	H
R ₃	OCH ₃	OH	OH	OH
R ₄	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	H
R ₅	OH	OH	OH	OH

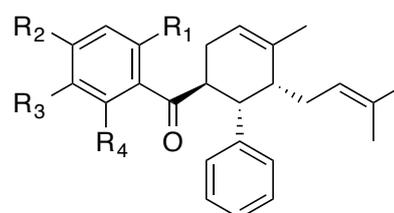
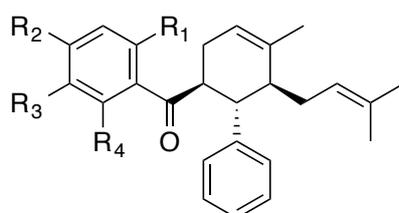
Les chalconoïdes adduits de Diels-Alder naturels

diène = ocimène



	Panduratine	Hydroxypanduratine	Schefflerine
	A	A	
R₁	OH	OH	OH
R₂	OCH ₃	OH	OCH ₃
R₃	H	H	OCH ₃
R₄	OH	OH	OH

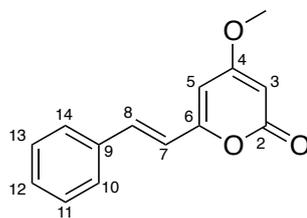
	Nicolaioidesine
	A
R₁	OH
R₂	OCH ₃
R₃	H
R₄	OH



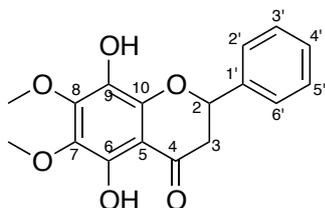
	Isopanduratine	Isoschefflerine
	A	
R₁	OH	OH
R₂	OCH ₃	OCH ₃
R₃	H	OCH ₃
R₄	OH	OH

	Nicolaioidesine
	B
R₁	OH
R₂	OCH ₃
R₃	H
R₄	OH

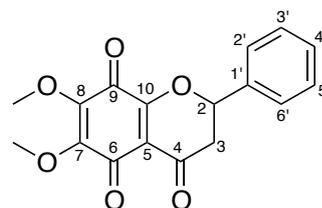
Molécules isolées de *F. latifolium* var. *ovoideum*



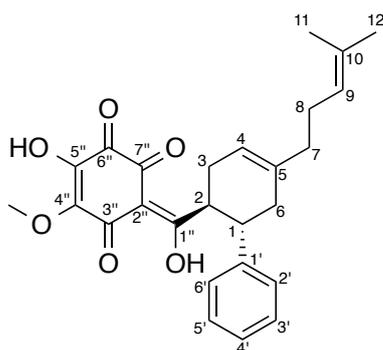
Desméthoxyyangonine (72)



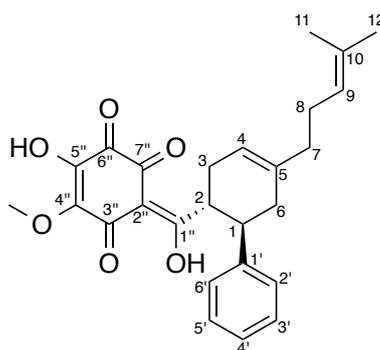
(±)-didymocarpine A (73a)



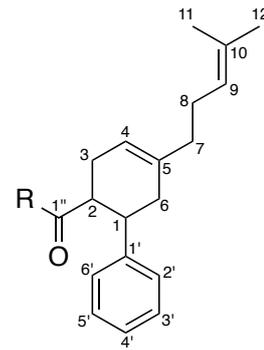
(±)-déhydrodidymocarpine A (73b)



(-)-écarlottone (76)*

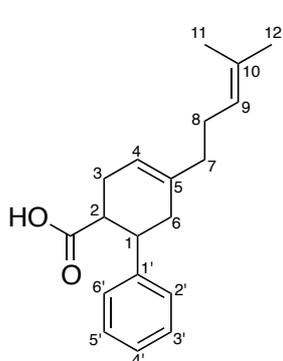


(+)-écarlottone (77)*

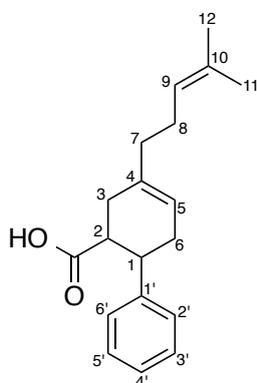


(±)-écarlottone (75)*

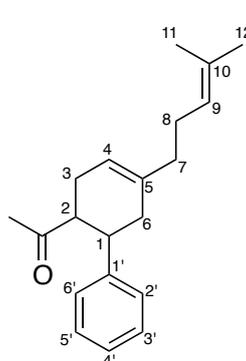
R₁ (81)*
R₂ (82)*



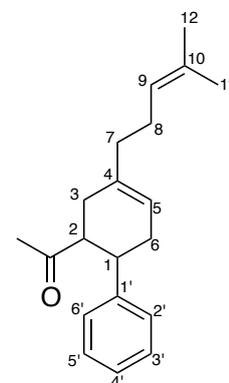
(±)-acide fislatifolique (74)*



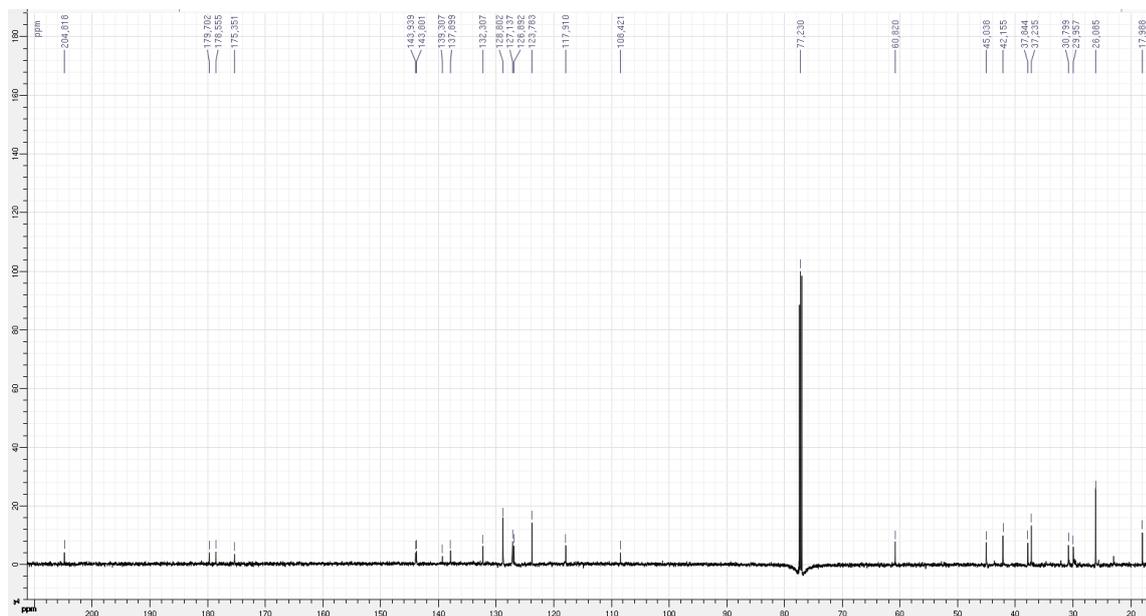
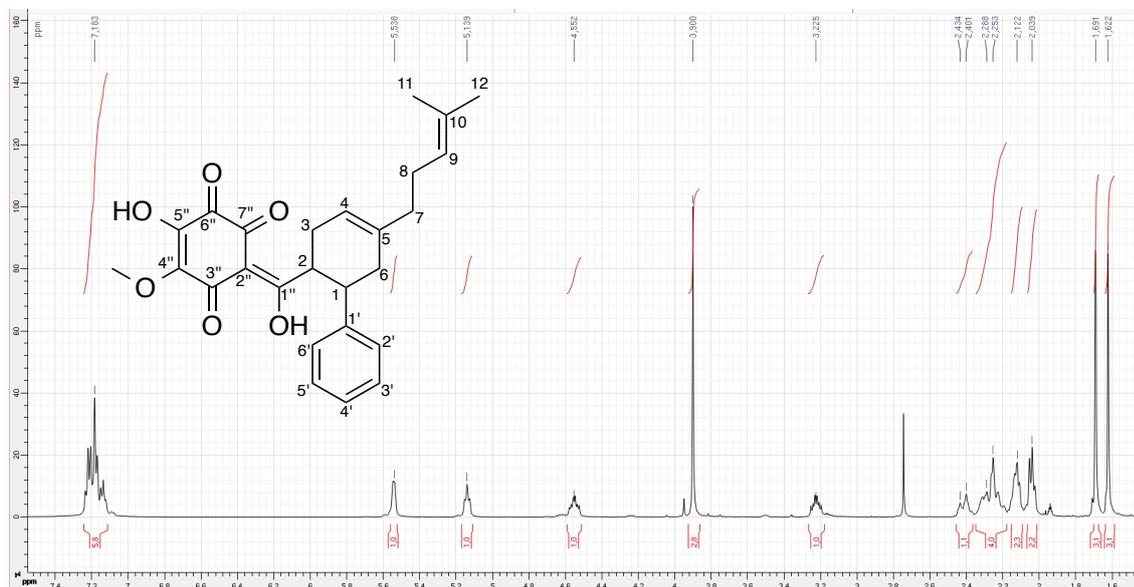
(±)-acide isofislatifolique (80)*

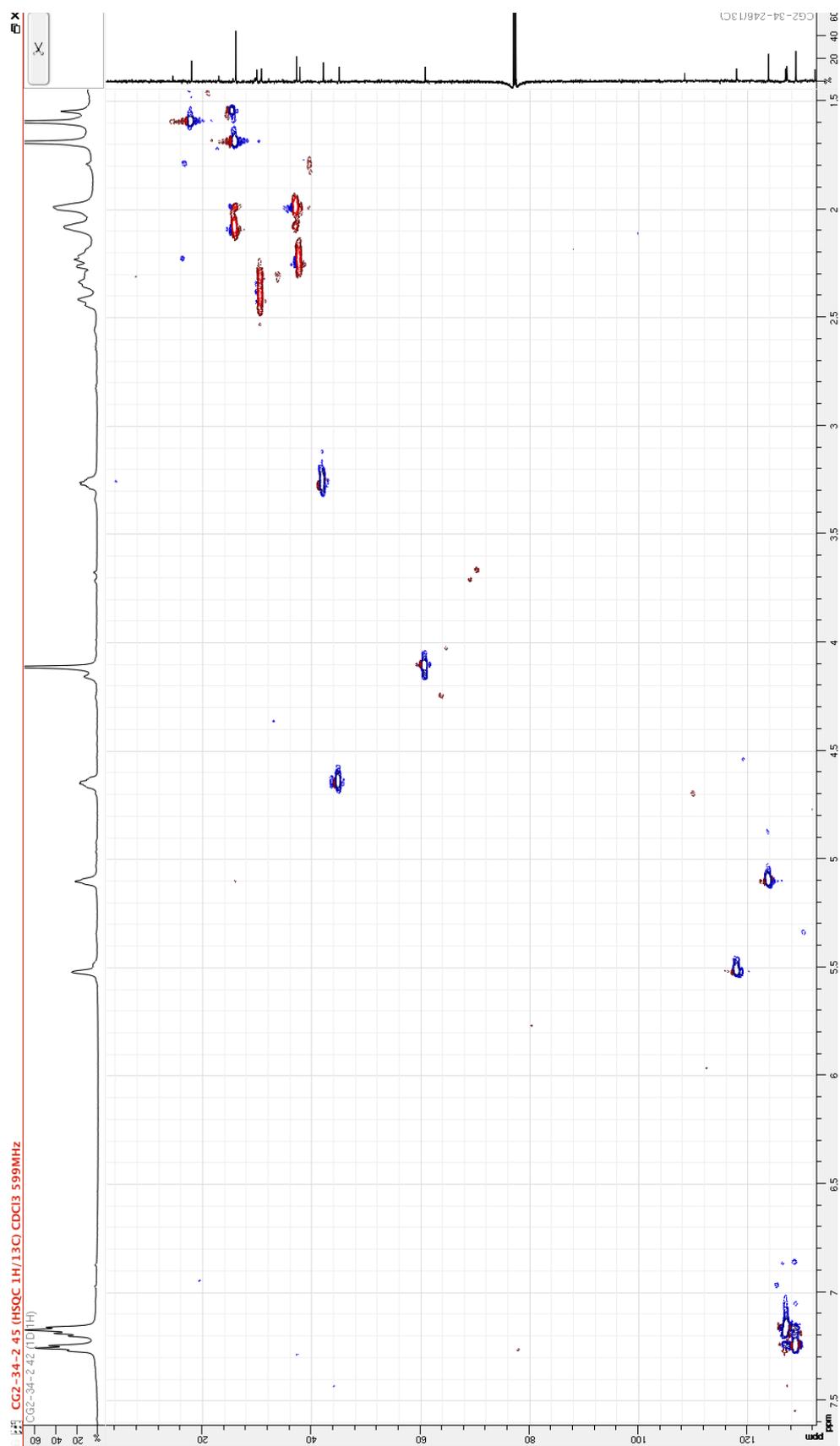


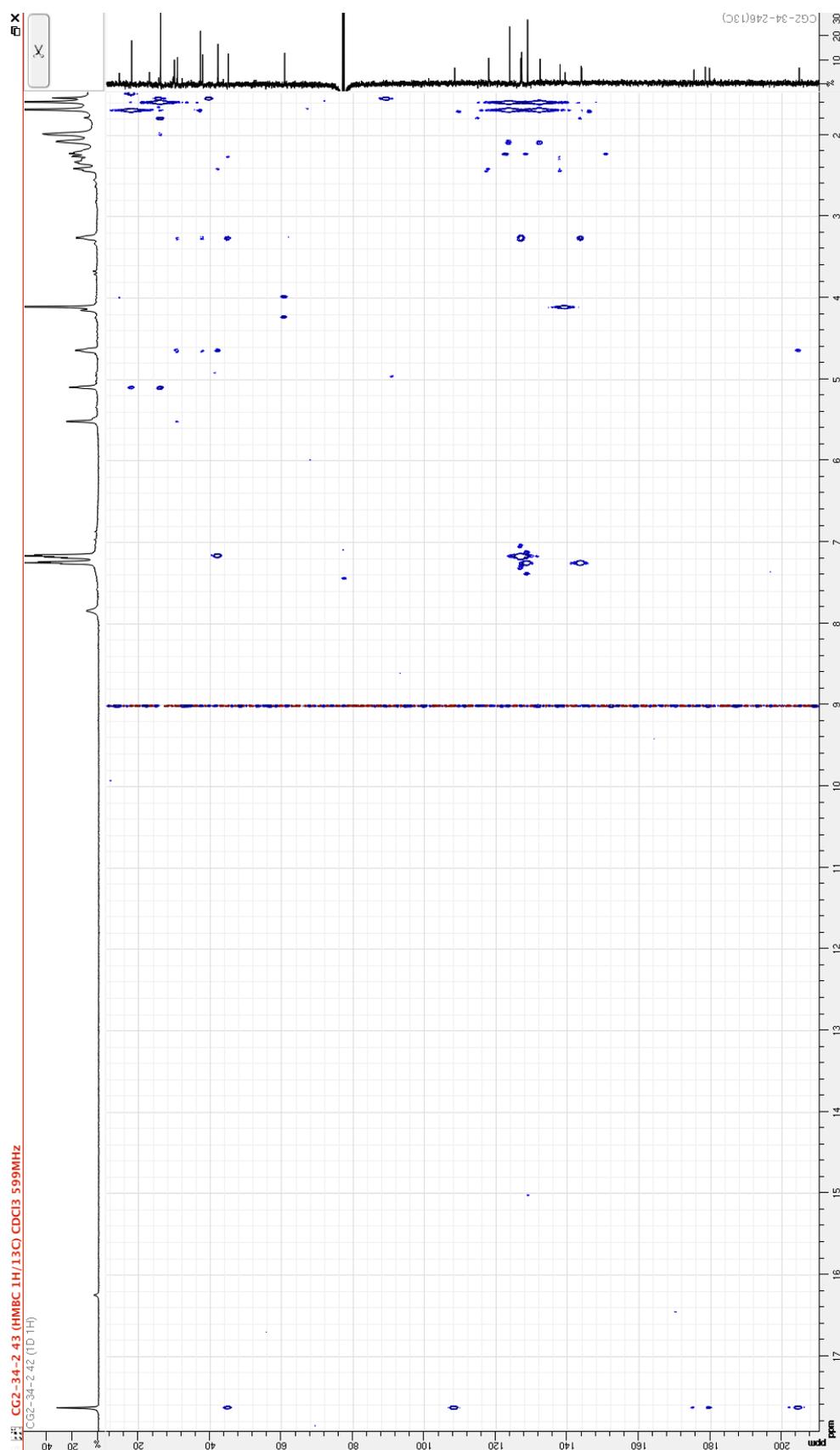
(±)-fislatifolone (78)*

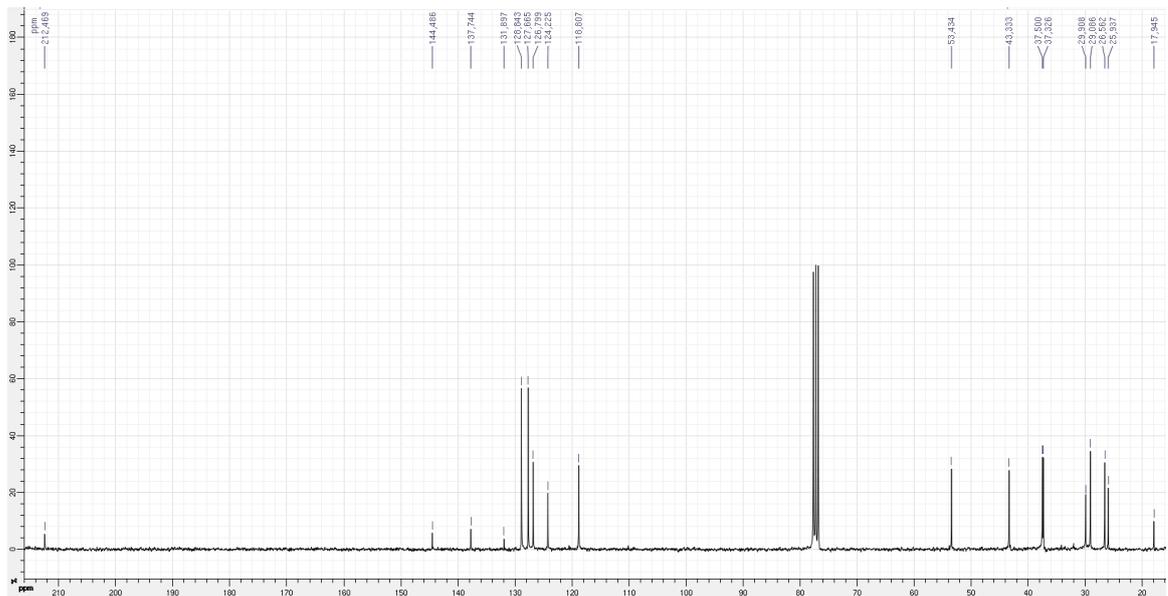
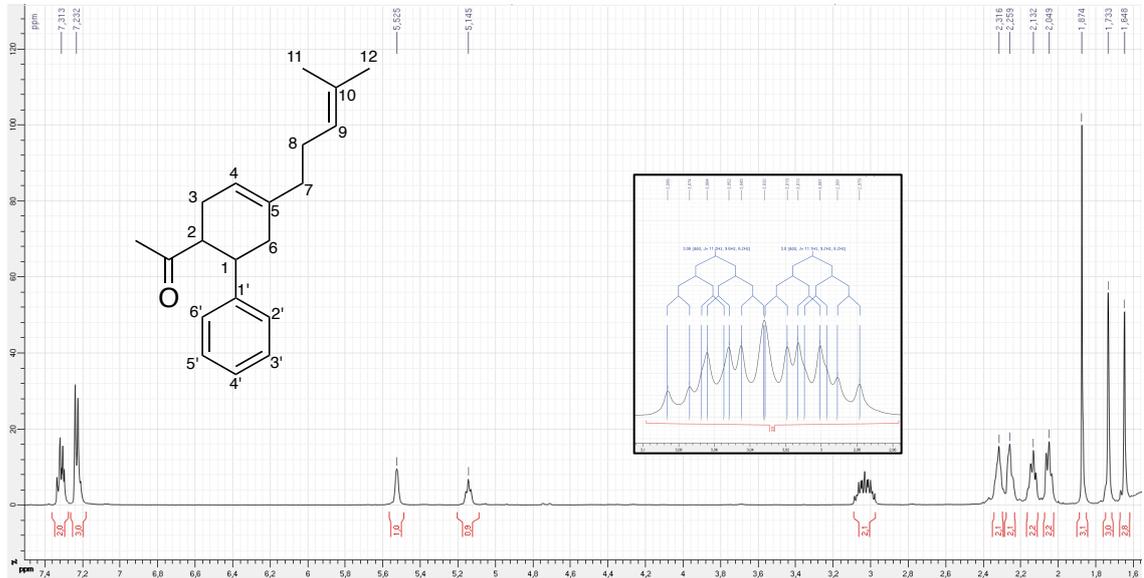


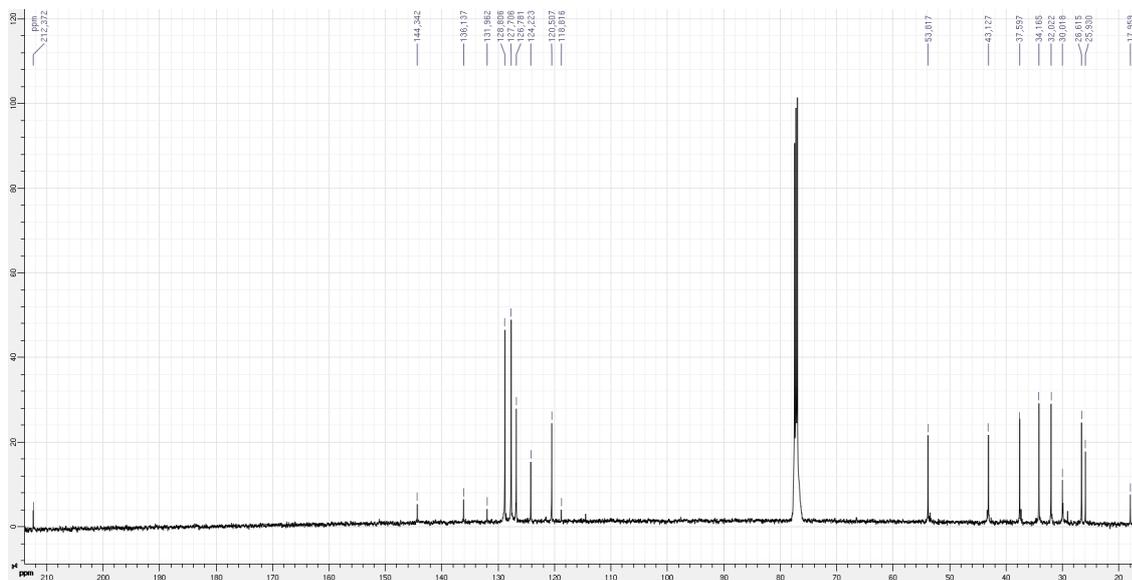
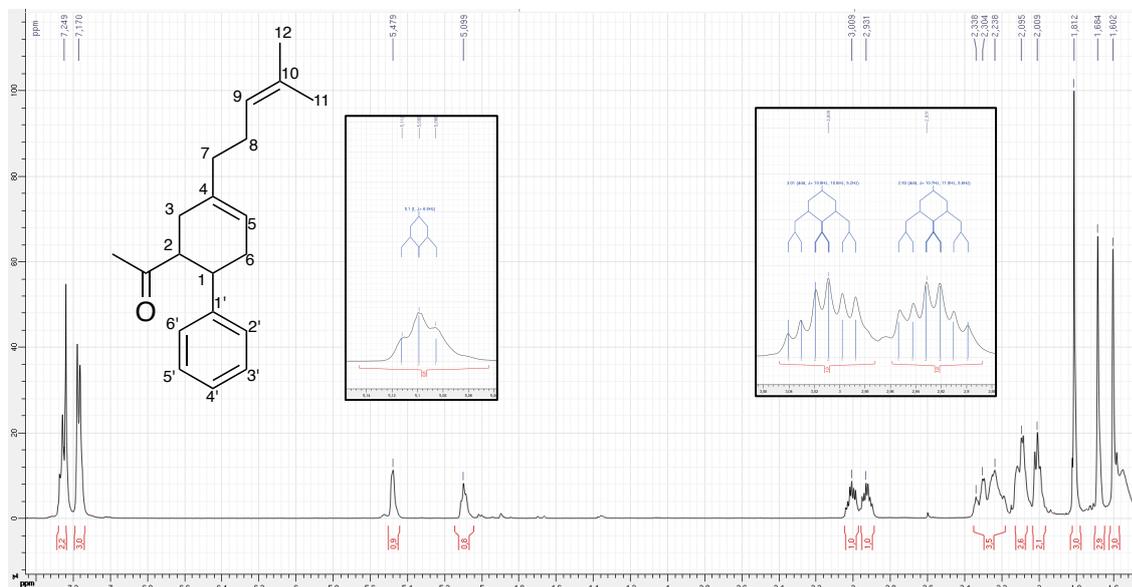
(±)-isofislatifolone (79)*

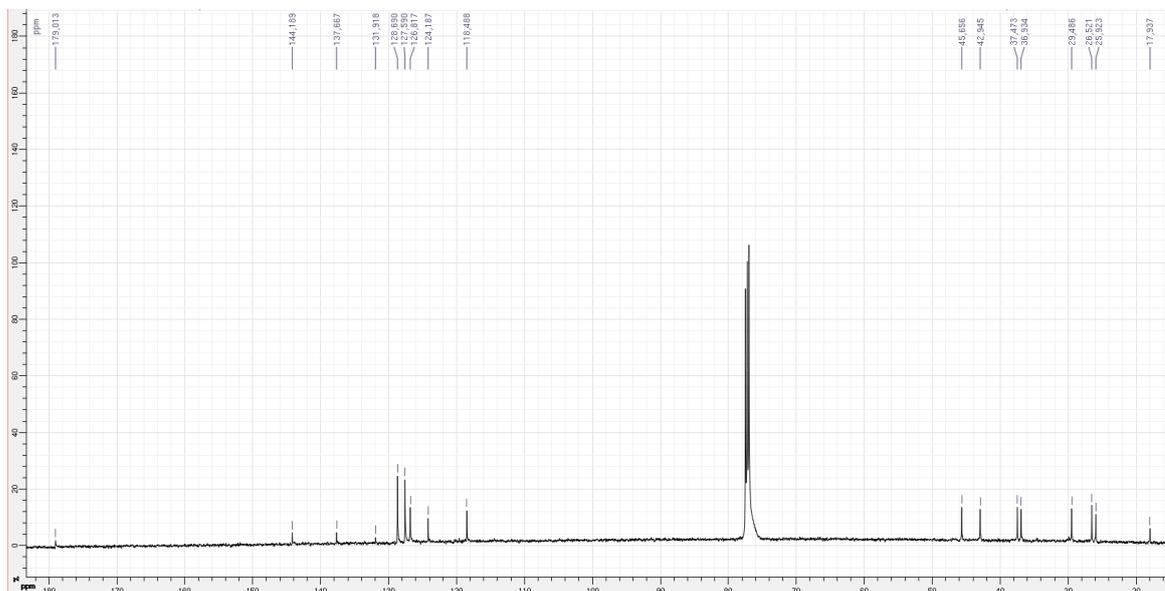
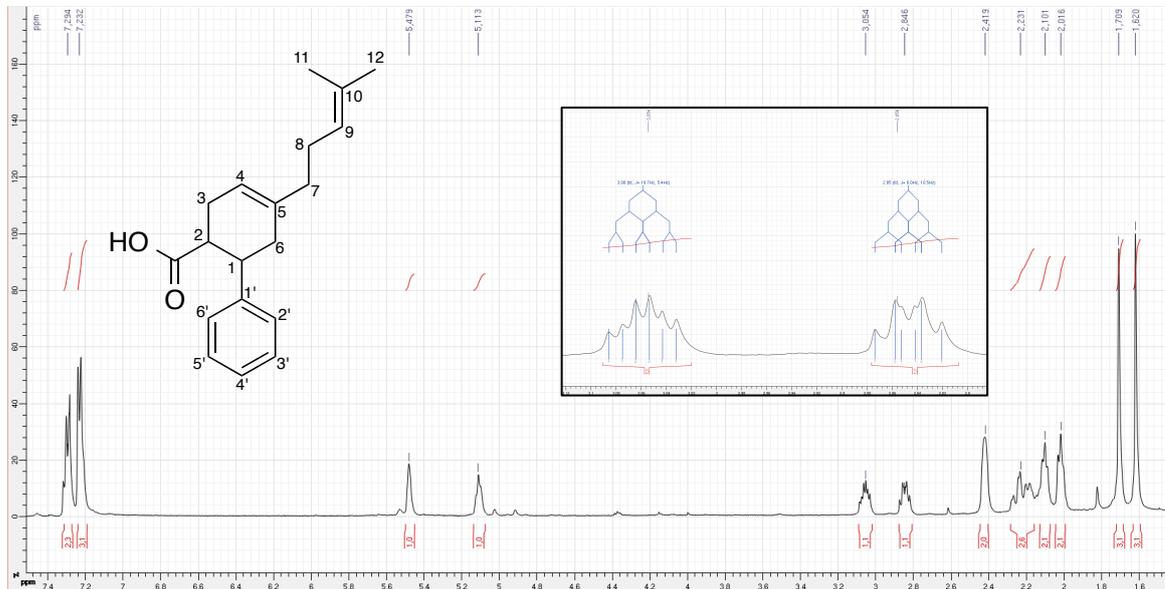
(±)-Ecarlottone (75) RMN ^1H et ^{13}C 600 MHz CDCl_3 243 °K

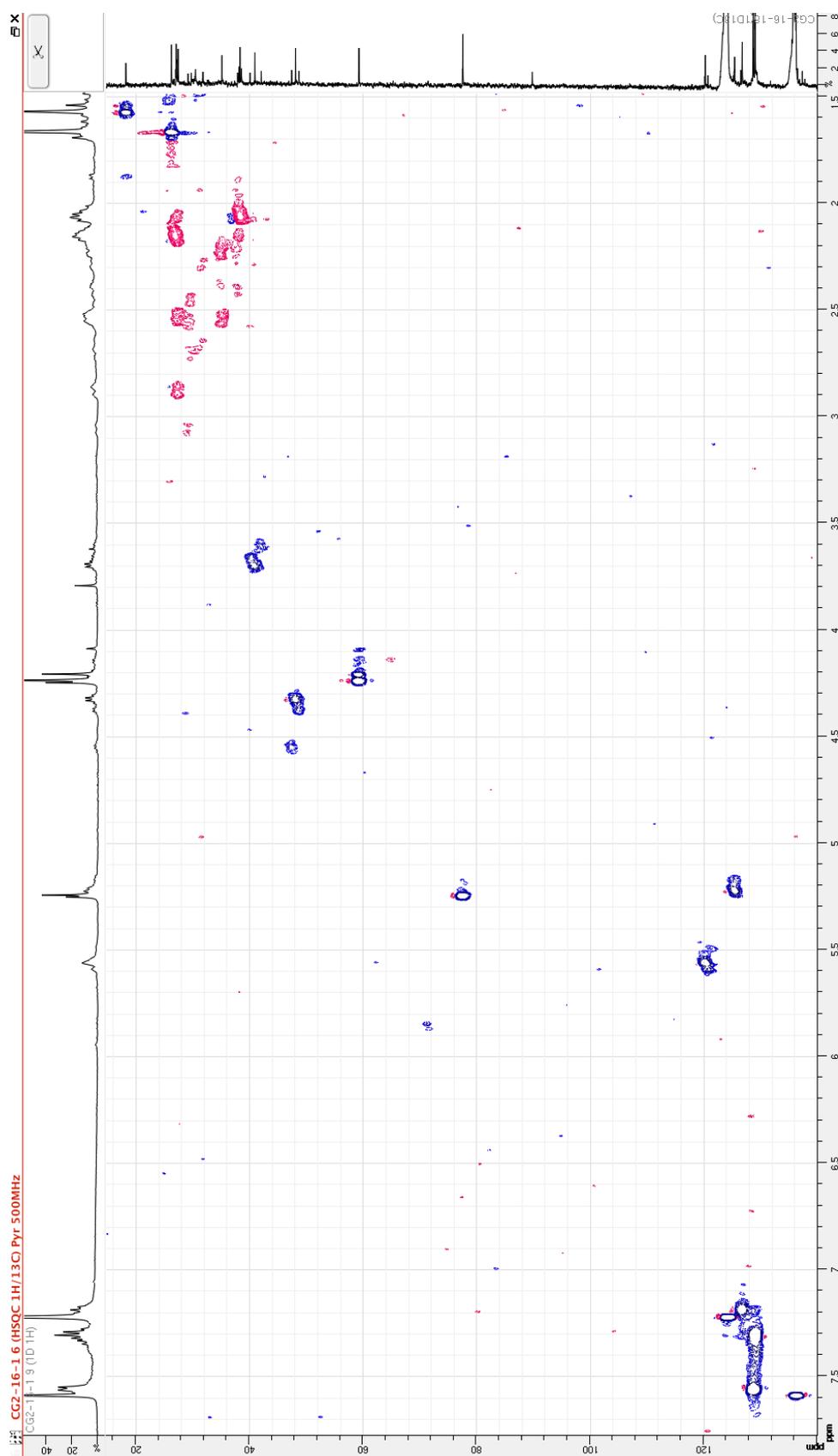
(±)-Ecarlottone (75) RMN HSQC 600 MHz CDCl₃ 243 °K

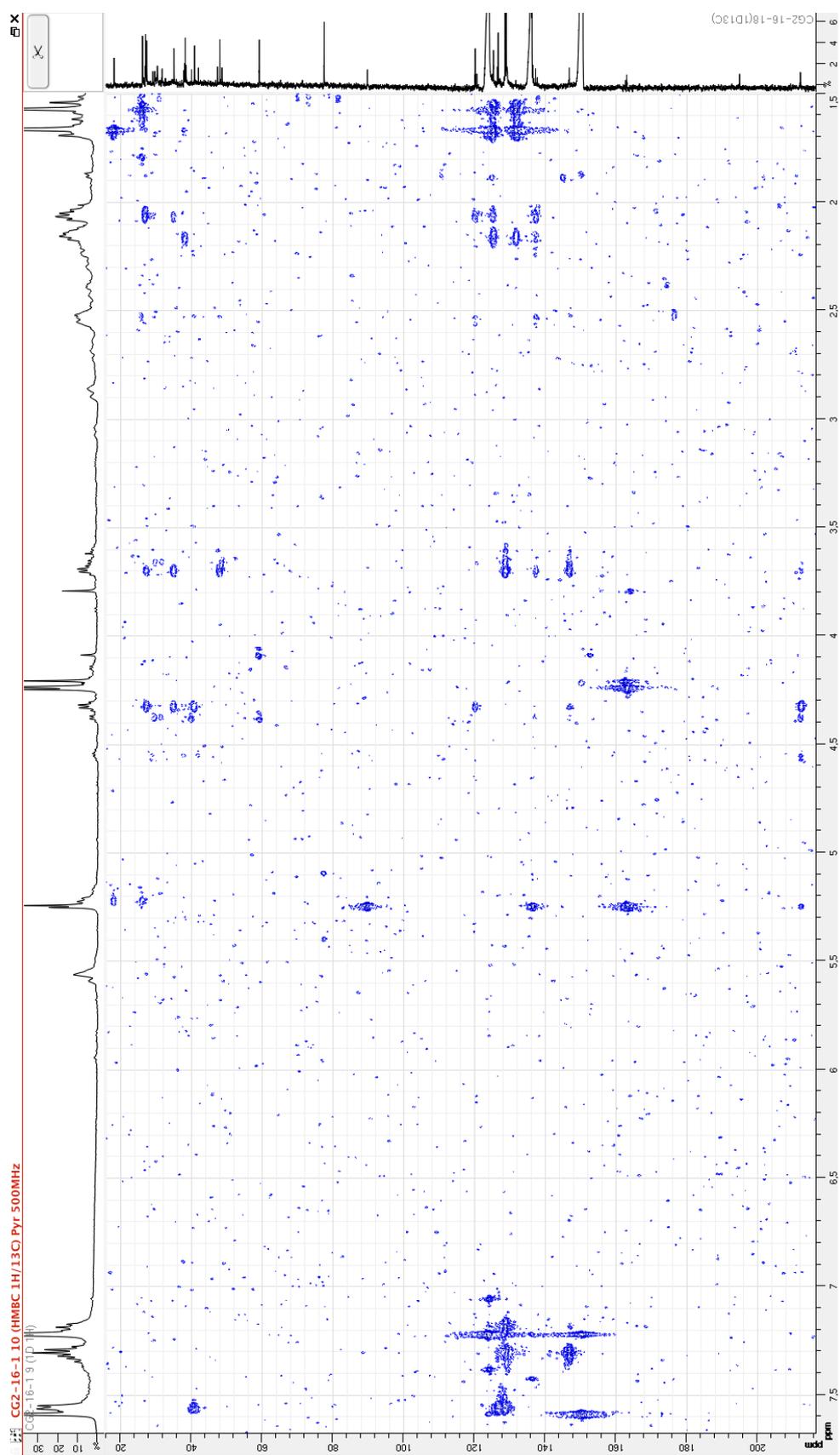
(±)-Ecarlottone (75) RMN HMBC 600 MHz CDCl₃ 243 °K

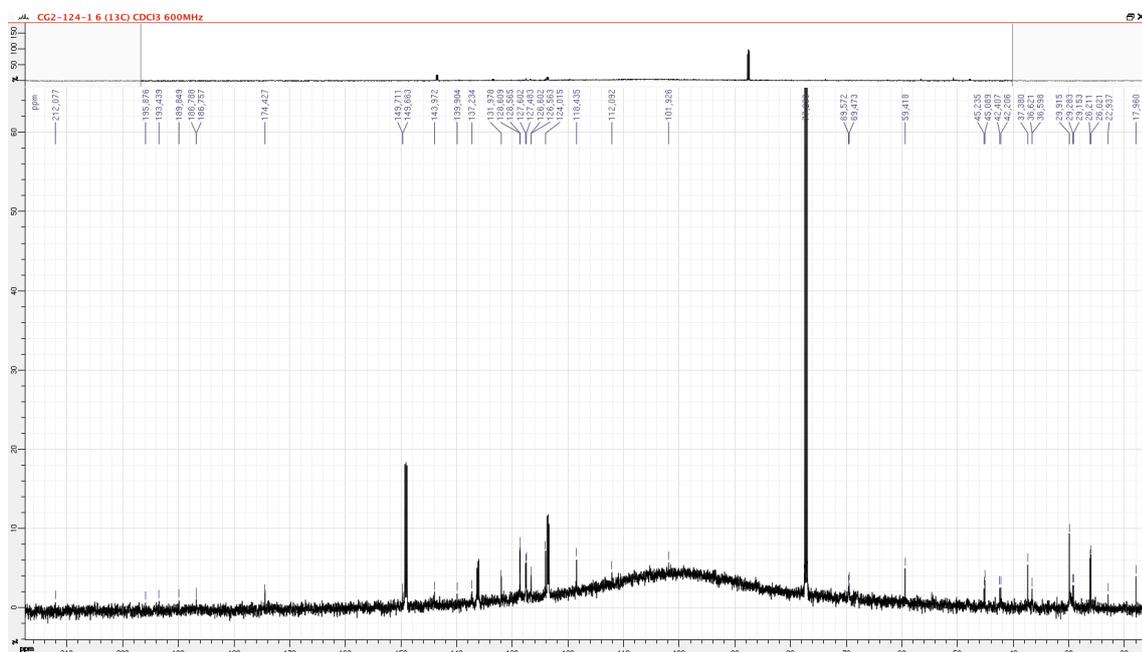
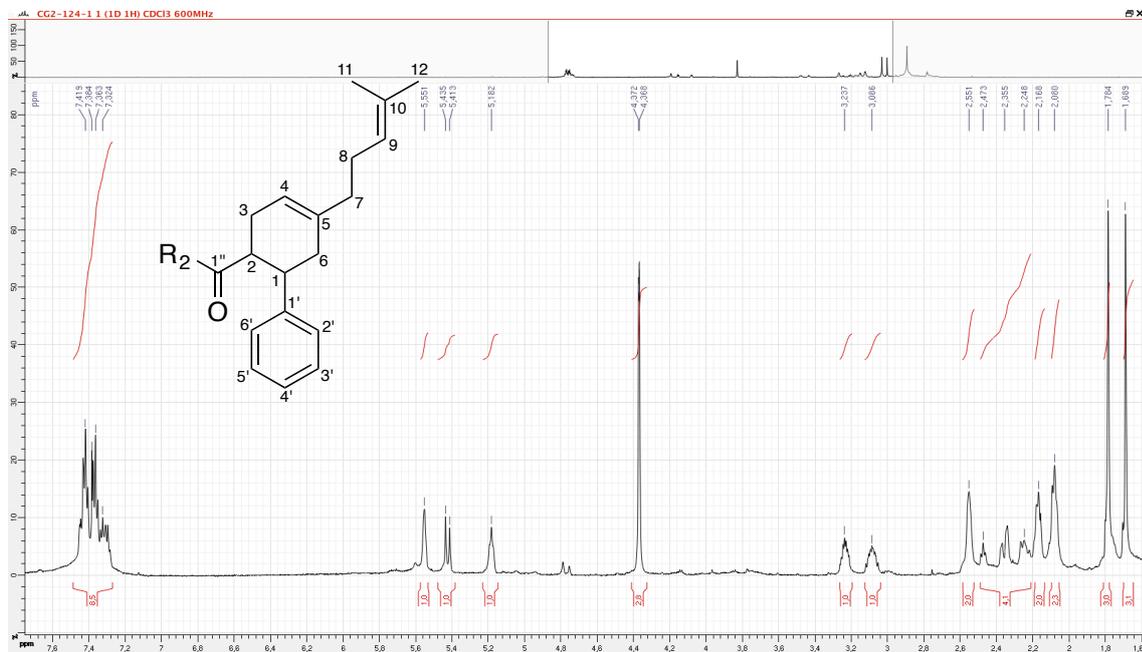
(±)-Fislatifolione (78) RMN ^1H et ^{13}C 500 MHz CDCl_3 

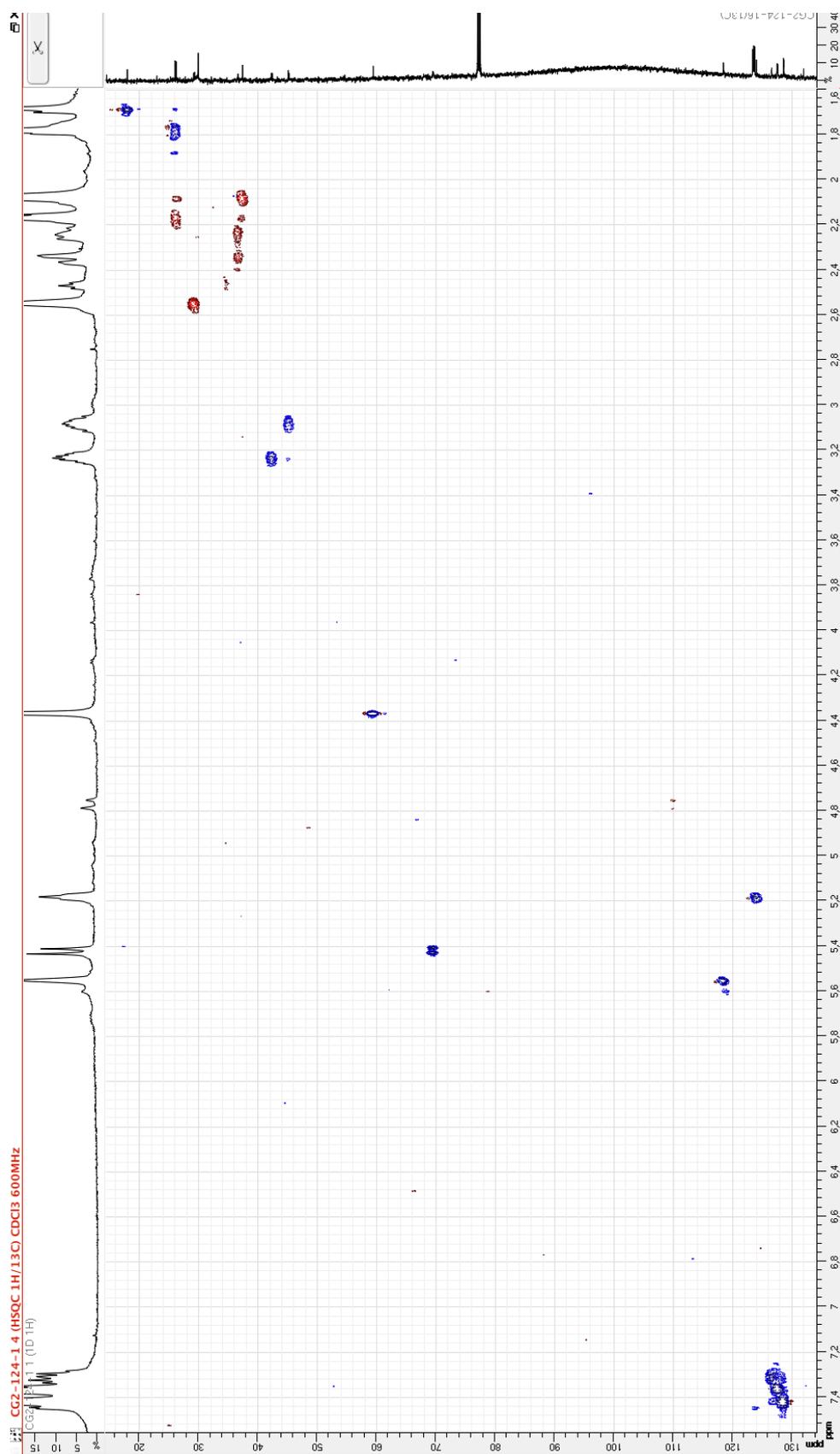
(±)-Isofislatifolone (79) RMN ^1H et ^{13}C 500 MHz CDCl_3 

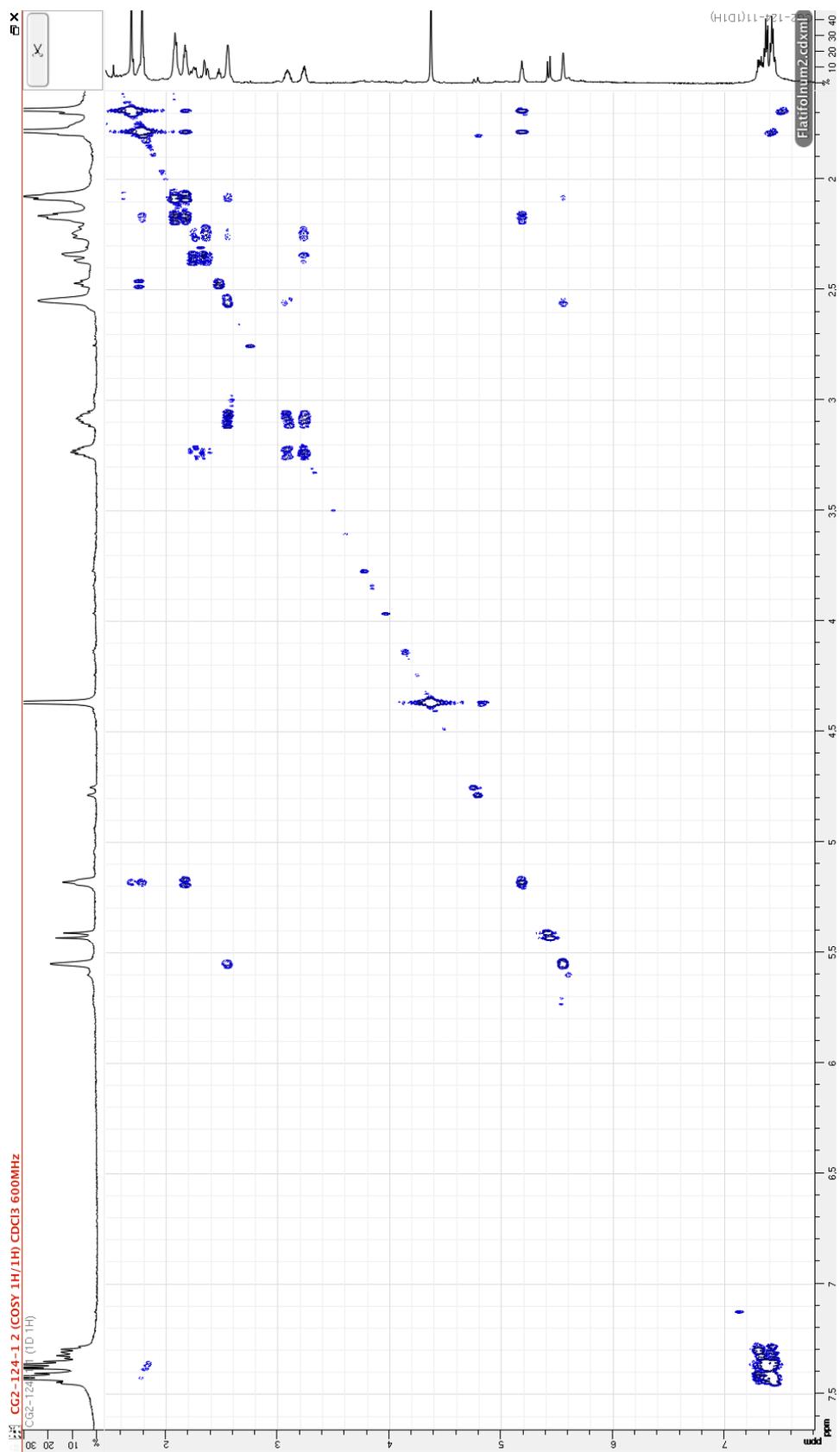
Acide (±)-Fislatifolique (74) RMN ^1H et ^{13}C 500 MHz CDCl_3 

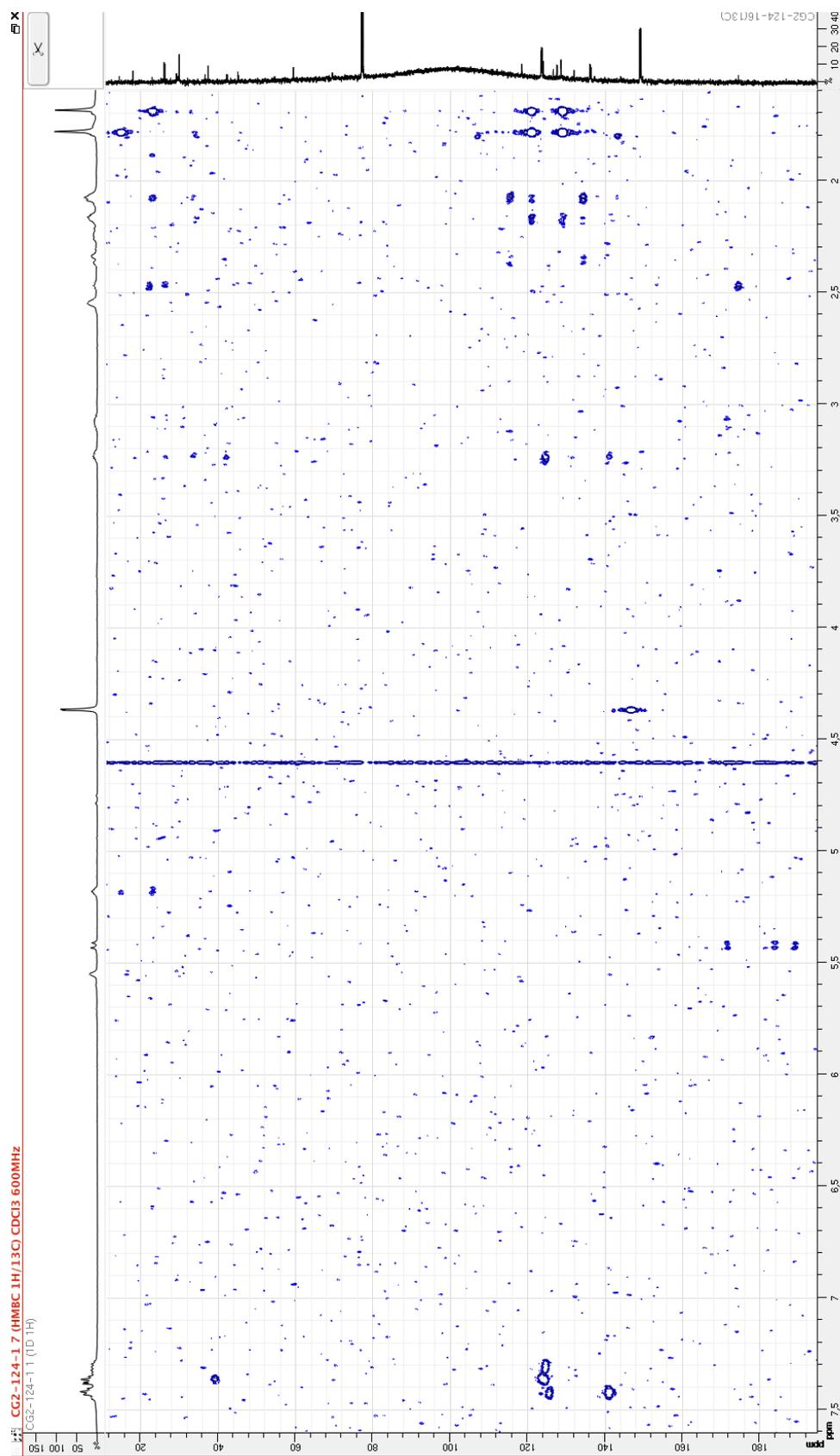
(81) RMN HSQC 500 MHz Pyr- d_5 

(81) RMN HMBC 500 MHz Pyr- d_5 

(82) RMN ^1H et ^{13}C 600 MHz $\text{CDCl}_3/\text{Pyr-}d_5$ 253 °K

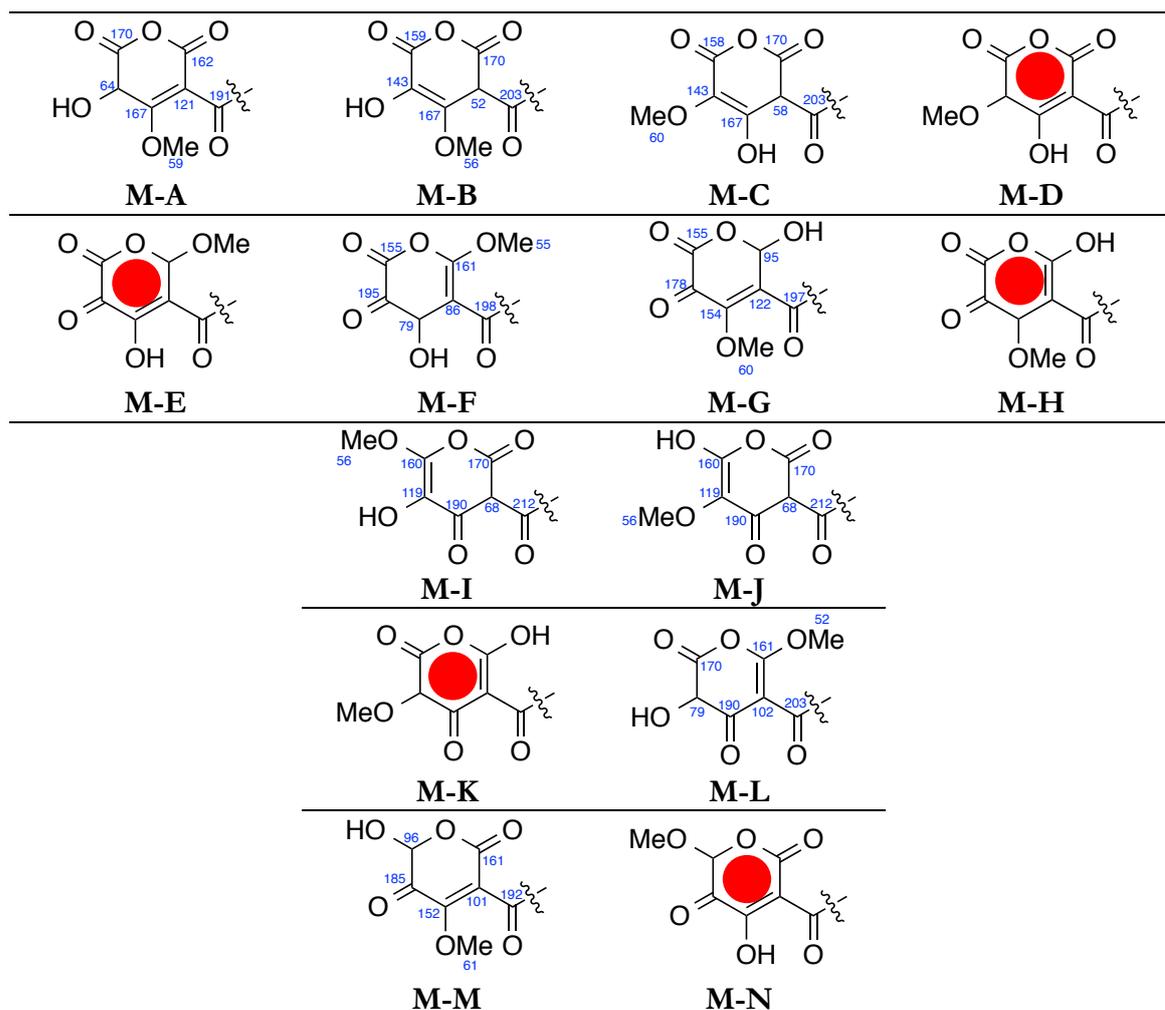
(82) RMN HSQC 600 MHz CDCl₃/Pyr-d₅ 253 °K

(82) RMN COSY 600 MHz CDCl₃/Pyr-d₅ 253 °K

(82) RMN HMBC 600 MHz $\text{CDCl}_3/\text{Pyr}-d_5$ 253 °K

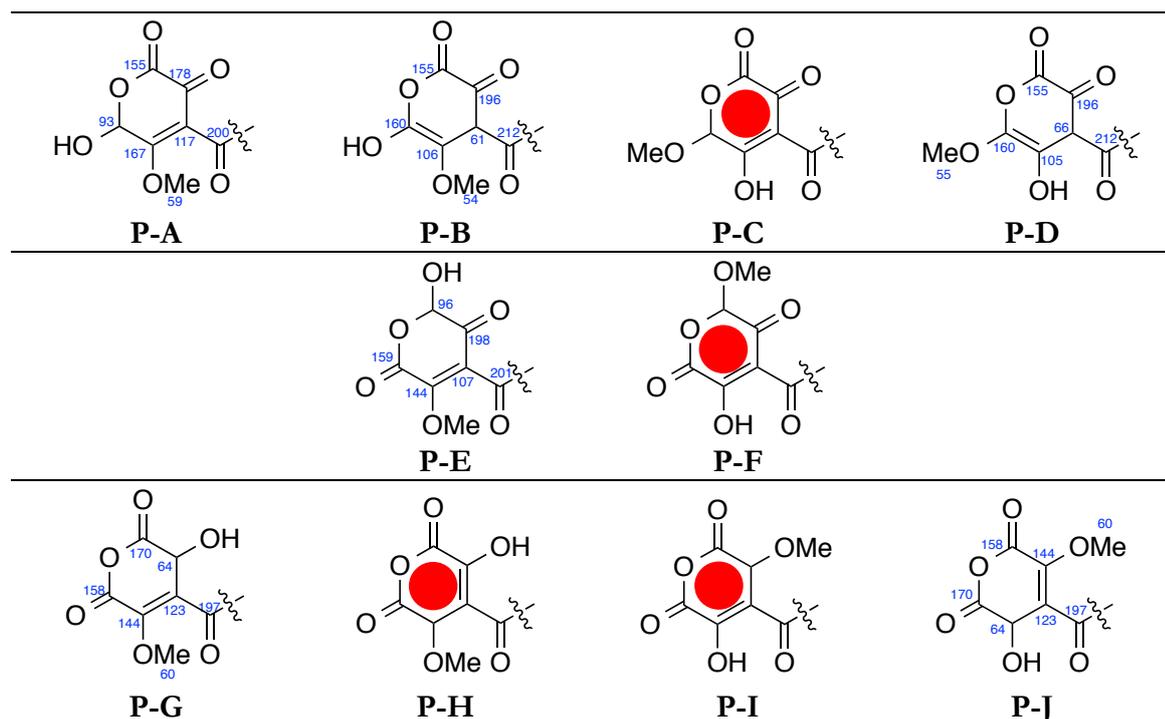
Hypothèses de structure du substituant R₂ de 82 (I/III)

Hétéroatome en position *meta* par rapport à la jonction avec le reste de la molécule.
Le point rouge correspond aux structures impossibles qui ont un carbone tertiaire qui porte le groupement méthoxyle. En bleu, sont indiqués les valeurs des déplacements chimiques des structures simulées par le logiciel ACD/Lab.



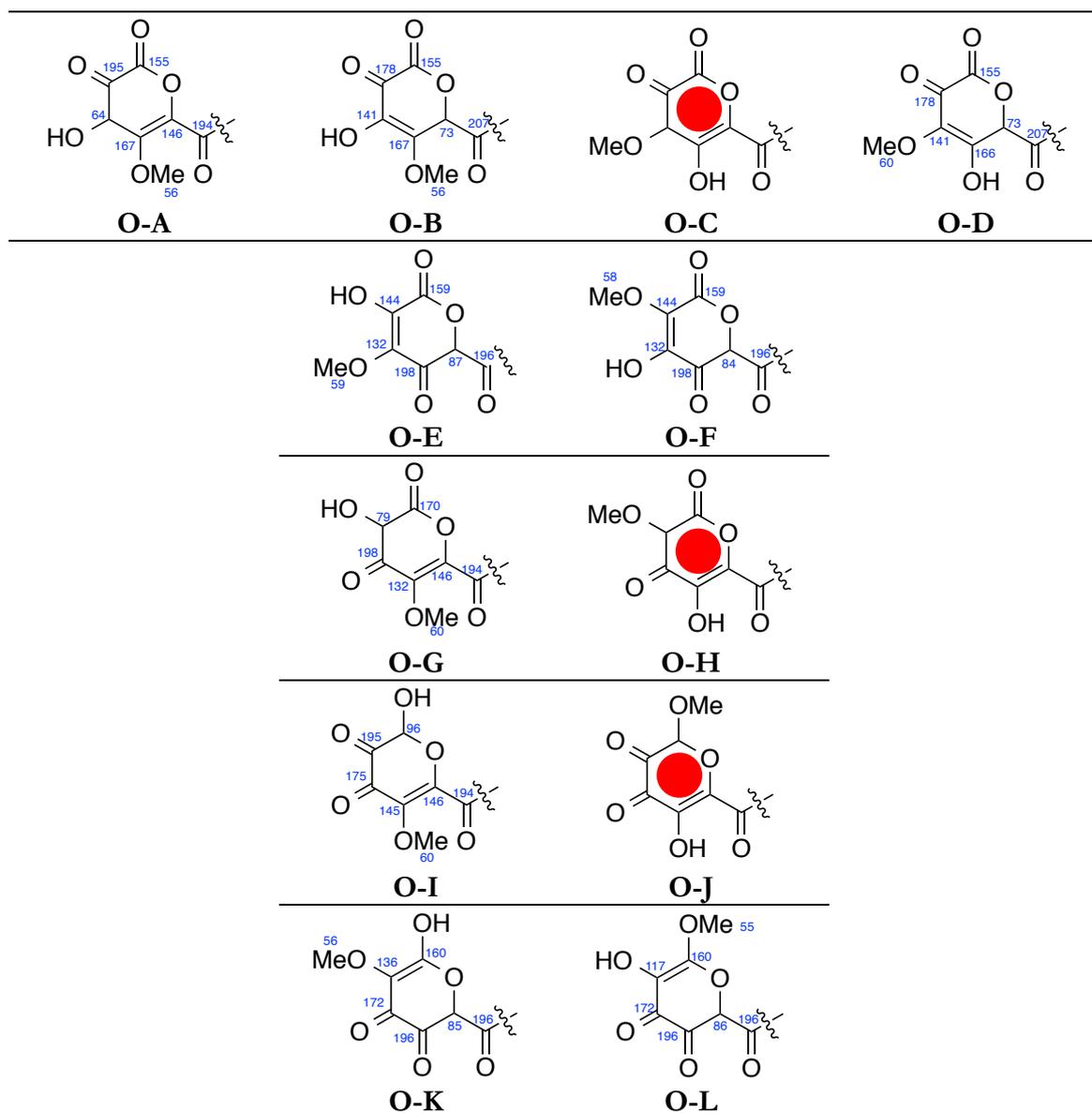
Hypothèses de structure du substituant R₂ de 82 (II/III)

Hétéroatome en position *para* par rapport à la jonction avec le reste de la molécule.
Le point rouge correspond aux structures impossibles qui ont un carbone tertiaire qui porte le groupement méthoxyle. En bleu, sont indiqués les valeurs des déplacements chimiques des structures simulées par le logiciel ACD/Lab.



Hypothèses de structure du substituant R₂ de 82 (III/III)

Hétéroatome en position *ortho* par rapport à la jonction avec le reste de la molécule. Le point rouge correspond aux structures impossibles qui ont un carbone tertiaire qui porte le groupement méthoxyle. En bleu, sont indiqués les valeurs des déplacements chimiques des structures simulées par le logiciel ACD/Lab.



Intercalaire rouge

Publications

Article

Kingianic Acids A–G, Endiandric Acid Analogues from *Endiandra kingiana*

Mohamad Nurul Azmi ^{1,†}, Charlotte Gény ^{2,†}, Aurélie Leverrier ², Marc Litaudon ^{2,*}, Vincent Dumontet ², Nicolas Birlirakis ², Françoise Guéritte ², Kok Hoong Leong ³, Siti Nadiah Abd. Halim ¹, Khalit Mohamad ³ and Khalijah Awang ^{1,*}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University Malaya, Kuala Lumpur 50603, Malaysia; E-Mails: libra_mine85@yahoo.co.uk (M.N.A.); nadiyahhalim@um.edu.my (S.N.A.H.)

² Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), CNRS, Labex LERMIT, Gif-sur-Yvette Cedex 91198, France; E-Mails: charlotte.geny@cnrs.fr (C.G.); aurelie.leverrier@gmail.com (A.L.); vincent.dumontet@cnrs.fr (V.D.); nicolas.birlirakis@cnrs.fr (N.B.); francoise.gueritte@wanadoo.fr (F.G.)

³ Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, University Malaya, Kuala Lumpur 50603, Malaysia; E-Mails: Leongkh@um.edu.my (K.H.L.); khalitmohamad@um.edu.my (K.M.)

† These authors contributed equally to this work. Dedicated to the memory of Dr. Khalit Mohamad.

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: marc.litaudon@cnrs.fr (M.L.); khalijah@um.edu.my (K.A.); Tel.: +33-169-82-30-85 (M.L.); Fax: +33-169-07-72-47 (M.L.); Tel.: +60-3-7967-4064 (K.A.); Fax: +60-3-7967-4193 (K.A.).

Received: 14 November 2013; in revised form: 3 January 2014 / Accepted: 23 January 2014 /

Published: 31 January 2014

Abstract: A phytochemical investigation of the methanolic extract of the bark of *Endiandra kingiana* led to the isolation of seven new tetracyclic endiandric acid analogues, kingianic acids A–G (**1–7**), together with endiandric acid M (**8**), tsangibeilin B (**9**) and endiandric acid (**10**). Their structures were determined by 1D- and 2D-NMR analysis in combination with HRMS experiments. The structure of compounds **9** and **10** were confirmed by single-crystal X-ray diffraction analysis. These compounds were screened for Bcl-xL and Mcl-1 binding affinities and cytotoxic activity on various cancer cell lines. Compound **5** showed moderate cytotoxic activity against human colorectal adeno-carcinoma (HT-29) and lung adenocarcinoma epithelial (A549) cell lines, with IC₅₀ values in the range 15–17 μM, and compounds **3**, **6** and **9** exhibited weak binding affinity for the anti-apoptotic protein Mcl-1.

Keywords: *Endiandra kingiana*; lauraceae; endiandric acids; kingianic acids; anti-apoptotic proteins; Bcl-xL; Mcl-1

1. Introduction

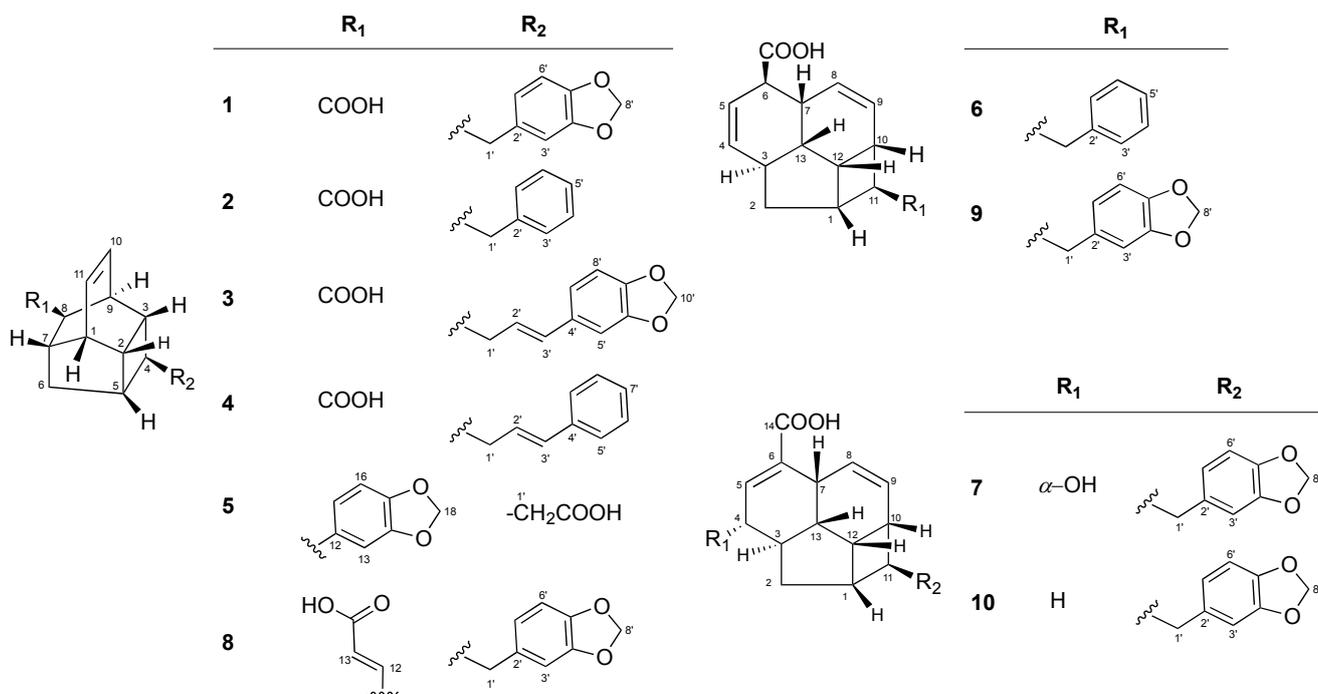
In our pursuit to discover bioactive phytochemicals from the Malaysia flora [1–3] we recently reported a series of new natural pentacyclic polyketides, named kingianins A–L, isolated from the ethyl acetate extract of the bark of *Endiandra kingiana* Gamble (Lauraceae) [4]. Several kingianins showed strong binding affinity to the anti-apoptotic protein Bcl-xL, and can therefore be considered as potential anticancer agents [4]. In order to discover additional members of this chemical series or close analogues, we have embarked on the investigation on the methanolic extract of the bark of this species. *E. kingiana* is a medium-sized evergreen tree, distributed throughout Peninsular Malaysia and Borneo [5–7]. There are about 125 *Endiandra* species found throughout the tropical regions, including 10 species in Malaysia [5–7], but to our knowledge only three species: *E. introrsa*, *E. anthropophagorum* and *E. kingiana*, have been studied for their phytochemicals. The first one has been reported to produce interesting cyclic polyketides, named endiandric acids, possessing eight chiral centers, and usually isolated as racemic mixtures [8–11]. It was postulated by Black and co-workers that they could be formed by non-enzymatic cyclizations ($8\pi e$ and $6\pi e$ electrocyclization followed by Diels-Alder reaction) of a phenylpolyene acid precursor [12–14]. In 1982, Nicolaou's group successfully synthesized the natural endiandric acids by implementing a biomimetic strategy based on Black's hypothesis [14–17]. Endiandric acids and their close derivatives, beilschmiedic acids, are the most characteristic type of natural products isolated from *Beilschmiedia* and *Endiandra* species. They were found to exhibit various biological activities, such as antibacterial [18–20], antiplasmodial [20], antitubercular [21], iNOS inhibitory activity [22], and anticancer properties [20,23]. Recently, Williams *et al.* reported the cytotoxic and antibacterial activities of a series of beilschmiedic acids isolated from a Gabonese *Beilschmiedia* species against NCI-H460 human lung cancer cells and a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, respectively [23]. Talonsti *et al.* have also reported recently the isolation of four beilschmiedic acid derivatives, cryptobeilic acids A–D and tsangibeilin B from the bark of *Endiandra cryptocaryoides* [20]. These compounds showed moderate antiplasmodial activity against the chloroquinone-resistant *Plasmodium falciparum* strain NF54, and antibacterial activities against *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas stutzeri* [20].

The chemical investigation of the methanolic extract of *E. kingiana* bark extract led to the isolation of seven new endiandric acids, kingianic acids A–G (**1**–**7**), together with endiandric acid M (**8**), tsangibeilin B (**9**) and endiandric acid (**10**) (compound **10** was only found in the “PubChem” database (CID 71521970) without an associated reference regarding its origin and its spectroscopic data, so this compound is fully described in the present manuscript). Herein, the isolation and structure elucidation of the new tetracyclic endiandric acids; kingianic acids A–G, and the cytotoxic activities, Bcl-xL and Mcl-1 affinities of compounds **1**, **3**, **5**–**9** are reported.

2. Results and Discussion

The EtOAc-soluble part of the *E. kingiana* methanol extract was subjected to silica gel chromatography to afford eight fractions Fr.1-Fr.8. Fractions Fr.4 and Fr.5 were further purified using silica gel as well as semi-preparative HPLC leading to the isolation of the kingianic acid series **1–7**, endiandric acid M (**8**), tsangibeilin B (**9**) and endiandric acid **10** (Figure 1). All assignments of ^1H - and ^{13}C -NMR data were then established through in depth analysis of 2D-NMR; NOESY, COSY, HSQC and HMBC experiments. All compounds **1–10** were isolated as optically inactive, thus suggesting that they are racemic mixtures and their spectroscopic data were very similar. They all possess a 13 carbon atom fused rings system and they can be divided into two main skeletal types. Six of compounds (**1–5**, **8**) belong to the first type as can be seen in endiandric acid K and endiandramide A [22]. While compounds **6**, **7**, **9** and **10** belong to the second type, similar to tsangibeilins A and B and endiandramide B [22].

Figure 1. Structures of compounds **1–10**.



Kingianic acid A (**1**) was isolated as a colorless oil. The HRESIMS spectrum of **1** showed a pseudomolecular ion peak $[\text{M}-\text{H}]^-$ at m/z 323.1279 (calcd. 323.1284), consistent with a molecular formula $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$ with 11 degrees of unsaturation. Its UV spectrum showed absorption bands at 233 and 286 nm, suggesting the presence of a benzenoid moiety, and its IR spectrum indicated the presence of OH ($3,431\text{ cm}^{-1}$), carbonyl ($1,701\text{ cm}^{-1}$) and methylenedioxy ($1,040$ and 936 cm^{-1}) groups [22]. The ^{13}C -NMR and DEPT spectra exhibited 20 signals, including 13 methines, three methylenes, and four quaternary carbons. The resonances of the methines at C-1 (δ_{C} 41.8), C-2 (δ_{C} 39.7), C-3 (δ_{C} 38.8), C-4 (δ_{C} 40.6), C-5 (δ_{C} 39.8), C-7 (δ_{C} 38.3), C-8 (δ_{C} 48.8) and C-9 (δ_{C} 34.8), including two olefinic carbons at C-10, C-11 and a methylene at C-6 observed in the DEPT spectrum, were characteristic of a tetracyclic endiandric acid like endiandric acid K [22]. The ^1H and ^{13}C -NMR

spectra of **1** (Table 1) were also similar to those of endiandric acid K [22], except for the methylene proton signals [δ_{H} 2.72 (m, H-1'a); 2.78 (m, H-1'b)]. This group is placed between C-4 of the tetracyclic acid moiety and C-2' of the benzenoid moiety in **1**, instead of three methylenes in endiandric acid K.

Table 1. ^1H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz) NMR data of compounds **1–3** (CDCl_3).

Position	1		2		3	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	2.71 m	41.8	2.72 dd (1.62, 5.1)	41.8	2.41 m	39.9
2	2.42 dt (8.5, 5.5)	39.7	2.44 dt (9.3, 3.7)	39.7	2.72 m	41.8
3	1.73 m	38.8	1.76 m	38.9	1.74 m	38.9
4	2.00 t (8.5)	40.6	2.07 t (8.0)	40.2	1.85 t (7.5)	39.0
5	2.34 t (6.5)	39.8	2.37 t (6.0)	39.9	2.38 m	39.8
6	1.55 d (13.0)	38.5	1.54 d (12.8)	38.4	1.58 d (12.8)	38.4
	1.90 ddd (13.0, 7.5, 5.5)		1.90 ddd (13.0, 7.4, 5.4)		1.93 dt (7.1, 12.9)	
7	2.57 t (5.0)	38.3	2.56 t (4.9)	38.3	2.57 t (5.5)	38.3
8	2.86 d (3.5)	48.8	2.87 d (2.6)	48.8	2.89 d (3.2)	48.6
9	2.98 dt (7.0, 4.0)	34.8	2.98 m	34.8	3.05 t (3.6)	34.8
10	6.22 t (4.0)	131.3	6.22 m	131.3	6.24 t (3.7)	131.9
11	6.22 t (4.0)	132.0	6.22 m	132.0	6.24 t (3.7)	132.3
1'	2.72 m	41.7	2.83 m	41.9	2.35 m	39.3
	2.78 m		2.86 m			
2'	-	134.7	-	140.9	6.02 dt (6.9, 15.7)	126.9
3'	6.66 s	109.1	7.15 d (7.1)	128.7	6.29 d (15.7)	130.5
4'	-	147.5	7.28 t (7.6)	128.3	-	131.4
5'	-	145.7	7.19 t (7.3)	125.8	6.90 d (1.2)	108.4
6'	6.72 d (8.0)	108.1	7.28 t (7.6)	128.4	-	148.0
7'	6.60 d (8.0)	121.5	7.15 d (7.1)	128.6	-	146.7
8'	5.92 s	100.8			6.73 d (8.0)	108.2
9'					6.76 d (8.0)	120.3
10'					5.94 s	101.0
C=O	-	179.3	-	179.4	-	178.3

The ^1H NMR of **1** revealed two *cis* olefinic proton signals at δ_{H} 6.22 (t, $J = 4.0$ Hz, H-10 and H-11). The three aromatic protons resonated as one singlet at δ_{H} 6.66 (s, H-3') and two *ortho*-coupled doublets δ_{H} 6.72 (d, $J = 8.0$ Hz, H-6') and 6.60 (d, $J = 8.0$ Hz, H-7') suggested the presence of a 1,3,4-trisubstituted aromatic ring. In addition, proton signals at δ_{H} 5.92 (s, H-8') confirmed the presence of the methylenedioxy group. As determined from the HMBC spectrum, the long-range correlations between H-7 (δ_{H} 2.57) and H-8 (δ_{H} 2.86) to COOH (δ_{C} 179.3) indicated the presence of carboxylic acid moiety attached to C-8 position of the tetracyclic moiety. Finally, the correlations of H-3'/C-1' (δ_{C} 41.7), H-7'/C-1', H-1'/C-2' (δ_{C} 134.7) and H-5'/C-1' determined the connection of the methylenedioxyphenyl moiety to the tetracycle core through C-1' (Figure 2). The relative configuration of **1** was deduced from NOESY analysis (Figure 3) in combination with biogenetic consideration and comparison with endiandric acid K [22]. Based on NOESY spectrum, the α -orientation of H-9 was deduced from the correlations of H-9/H-8 and H-8/H-4. In contrast, other correlations between H-3/H-2, H-2/H-1 and H-5/H-6 β and H-6 β /H-7 suggested that protons H-1, H-2, H-3, H-5 and H-7 to be

β -oriented. Thus, the relative configuration was assigned as *rel*-(1*RS*, 2*RS*, 3*RS*, 4*SR*, 5*SR*, 7*SR*, 8*RS*, 9*SR*), the same as that of endiandric acid K [22].

Figure 2. Key ^1H - ^1H COASY (bold) and HMBC ($^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$) correlations of **1**, **6** and **10**.

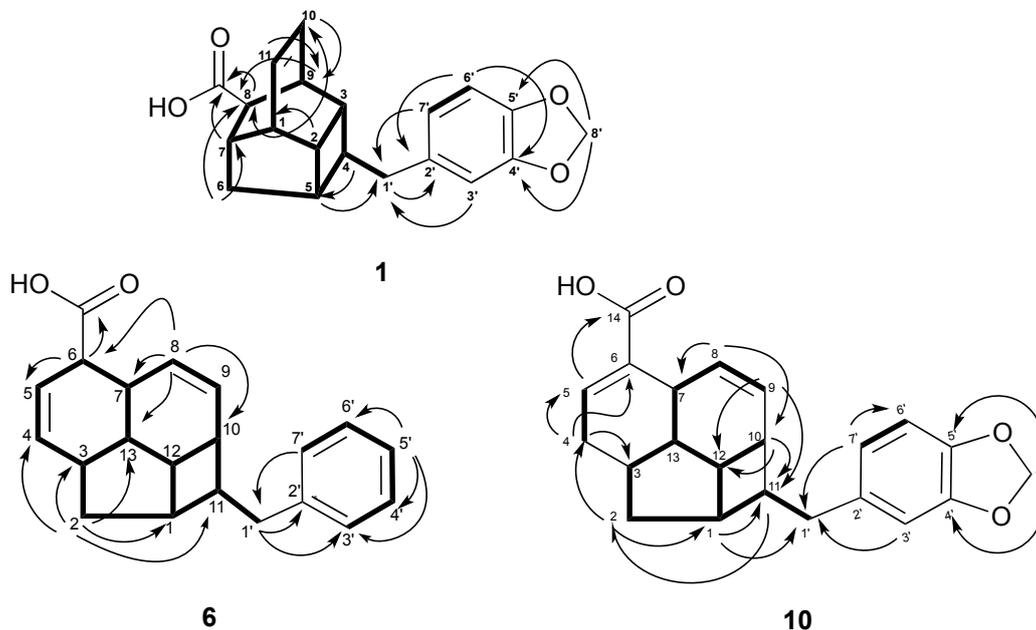
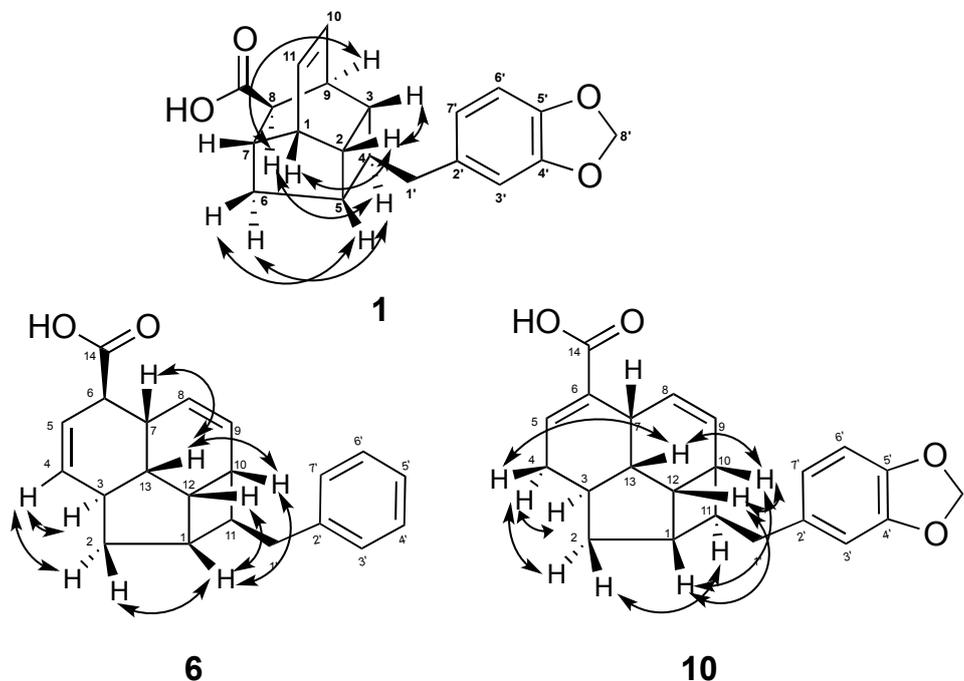


Figure 3. Selected NOESY ($^1\text{H}\leftrightarrow^1\text{H}$) correlations of **1**, **6** and **10**.



Kingianic acid B (**2**) was obtained as a yellowish oil. The HRESIMS of **2** showed a pseudomolecular ion peak $[\text{M}-\text{H}]^-$ at m/z 279.1398 (calcd. 279.1385) which indicated the molecular formula $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_2$, and was consistent with 10 degrees of unsaturation. The UV, IR, ^1H and ^{13}C -NMR data (Table 1) were similar to those of **1**. The ^{13}C -NMR and DEPT spectra exhibited 11 signals for an endiandric acid moiety, including the presence of 10 methines and one methylene group. The NMR

data of compound **2** were nearly identical to those of **1**, except for the substituent at C-4, indicating that the methylenedioxyphenyl in **1** was replaced by a monosubstituted phenyl moiety in **2** [δ_{H} 7.15 (d, $J = 7.1$ Hz, H-3' and H-7'); 7.28 (t, $J = 7.6$ Hz, H-4' and H-6') and 7.19 (t, $J = 7.3$ Hz, H-5')]. Analysis of the NOESY spectrum indicated that **2** possess the same relative configuration as **1**.

Kingianic acids **3** and **4** were isolated as yellowish oils. The molecular formula of **3** ($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_4$) and **4** ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2$) were established by the $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion peaks at m/z 349.1439 (calcd. 349.1440) and 305.1539 (calcd. 305.1542) in the HRESIMS, respectively. The ^1H and ^{13}C -NMR data (Tables 1 and 2) of compounds **3** and **4** were very similar to both **1** and **2**, and the analysis of the COSY correlations of **3** and **4** revealed the characteristic signals for a tetra-fused ring system as seen in compounds **1** and **2**. The presence of a carbonyl group was indicated by the absorption band at $1,697\text{ cm}^{-1}$ in the IR spectrum of **3** and $1,693\text{ cm}^{-1}$ for **4**, and confirmed by signals at δ_{C} 178.3 and 177.5 in their ^{13}C -NMR spectra, respectively. In the HMBC spectra of **3** and **4**, the correlations from H-8 and H-7 to COOH confirmed the connectivity of the carboxylic acid function. Besides the characteristic tetracyclic moiety, analysis of COSY and HMBC correlations indicated that the methylenedioxyphenyl and monosubstituted phenyl moieties were attached at C-4 in compounds **3** and **4**, respectively. The geometry of C-2', 3' double bond was assigned as *trans* on the basis of the coupling constants of H-3' (δ_{H} 6.29, d, $J = 15.7$ Hz) and (δ_{H} 6.38, d, $J = 15.8$ Hz) in both compounds (Tables 1 and 2). The NOESY spectra of **3** and **4**, showed correlation between H-8 and H-4 indicating that the benzyl moiety at C-4 assumed a β -position on the tetracyclic framework. Thus, the relative configuration of **3** and **4** were determined to be *rel*-(1*RS*, 2*RS*, 3*RS*, 4*SR*, 5*SR*, 7*SR*, 8*RS*, 9*SR*), the same as in compounds **1** and **2**.

Kingianic acid **5** was isolated as a yellowish oil. HRESIMS of **5** gave an $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion at m/z 323.1298 (calcd 323.1284), consistent with a molecular formula of $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$ with 11 degrees of unsaturation. Its UV and IR spectra were similar to those of **1**. A close examination of the NMR spectra of compound **5** (Table 2) indicated that **5** possessed the same tetracyclic moiety as **1**, but with different substituents at C-4 and C-8. The two substituents consisted of an acetic acid group [δ_{H} 2.64 (*m*, H₂-1'); δ_{C} 176.9 (COOH)] and a methylenedioxyphenyl moiety (δ_{H} 6.61, *s*, H-13; 6.67, d, $J = 8.0$ Hz, H-16; 6.54, d, $J = 8.0$ Hz, H-17; and 5.89, *s*, H-18). Their location at C-4 and C-8, respectively, was deduced from COSY and HMBC correlations. The COSY correlation between H-4 and H₂-1' on one hand, and HMBC correlations from H-8 (δ_{H} 3.25) to C-12 (δ_{C} 140.2), and from H-13 (δ_{H} 6.61)/H-17 (δ_{H} 6.54) to C-8 (δ_{C} 47.9) on the other hand, confirmed the location of the acetic acid group and the methylenedioxyphenyl moiety at C-4 and C-8, respectively. The relative configuration of compound **5**, named kingianic acid E, was fixed by a NOESY experiment as the same as that of compound **1**.

The molecular formula $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2$ of kingianic acid **6** was determined by HRESIMS analysis; 305.1557 (calcd 305.1542), for which 10 degrees of unsaturation could be deduced. The UV spectrum of **6** showed characteristic absorption bands at 232 and 288 nm suggesting the presence of a benzenoid moiety, and its IR spectrum showed absorption bands at $3,432\text{ cm}^{-1}$ for an OH group and $1,696\text{ cm}^{-1}$ for a carbonyl group. The ^{13}C -NMR and DEPT spectrum, which showed 21 signals for two methylenes, 16 methines (nine olefinic), and two quaternary and a carbonyl carbon that were characteristic of the tetracyclic endiandric acid skeleton as seen in tsangibeilin **9** [22]. The ^1H and ^{13}C -NMR spectra of compound **6** were reminiscent to those of **9**, except for the absence of signal for a methylenedioxy group in **6** and the appearance of five aromatic proton and carbon signals, thus suggesting that the methylenedioxyphenyl moiety was replaced by a monosubstituted phenyl moiety. All carbon-carbon

connectivities of compound **6** were determined through a thorough analysis of 2D NMR spectra (Figures 2 and 3), and comparison with those of tsangibeilin B (**9**). The location of the COOH group at C-6, and the phenyl moiety at C-11, was confirmed by HMBC correlation from H-6 to the carbonyl carbon at δ_C 179.4, and from COSY correlations between H-11 and H₂-1', respectively. The relative configuration of **6** was ascertained by the careful inspection of NOESY spectrum (Figure 3) and biogenesis considerations of tsangibeilin B as reference [22].

Table 2. ¹H (600 MHz) and ¹³C (150 MHz) NMR data of compounds **4** and **5** (CDCl₃).

Position	4		5	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
1	2.73 m	41.9	2.76 dd (5.1, 10.8)	42.4
2	2.40 m	39.8	2.46 m	39.9
3	1.76 m	39.0	2.62 m	40.3
4	1.88 t (7.4)	38.9	2.44 m	35.3
5	2.36 t (7.4)	39.9	2.37 t (6.6)	40.2
6	1.61 d (12.7)	38.4	1.74 d (12.6)	39.3
	1.93 m		1.94 m	
7	2.58 t (5.1)	38.3	2.31 t (4.6)	43.1
8	2.90 d (3.8)	48.6	3.25 d (2.5)	47.9
9	3.06 t (3.8)	34.8	2.72 m	39.6
10	6.23 d (3.1)	131.4	5.93 t (7.0)	132.3
11	6.24 d (3.0)	131.9	6.29 t (7.3)	130.5
12				140.2
13			6.61 s	109.5
14				146.9
15				145.2
16			6.67 d (8.0)	107.4
17			6.54 d (8.0)	121.6
18			5.89 s	100.7
1'	2.43 m	39.4	2.64 m	40.4
2'	6.19 m	128.7		
3'	6.38 d (15.8)	131.0		
4'	-	137.7		
5'	7.35 d (7.2)	126.0		
6'	7.30 t (7.6)	128.5		
7'	7.20 t (7.3)	127.0		
8'	7.30 t (7.6)	128.5		
9'	7.35 d (7.2)	126.0		
10'				
C=O	-	177.5		176.9

Thus, the relative configuration of **6**, named kingianic acid F or 11{1'-[phenyl]}-tetracyclo[5.4.2.0^{3,13}.0^{10,12}]trideca-4,8-dien-6-carboxylic acid (kingianic acid F), was assigned as *rel*-(1*RS*, 2*RS*, 3*RS*, 4*SR*, 5*SR*, 7*SR*, 8*RS*, 9*SR*), same as that of tsangibeilin B (**9**) [22].

Kingianic acid G (**7**) was obtained as a yellowish oil. The negative-mode HREIMS exhibited a quasi-molecular ion peak at m/z 365.1401 [M-H]⁻ (calcd. 365.1389), which suggested the molecular formula of C₂₂H₂₂O₅, and implied 12 degrees of unsaturation. The UV absorption bands at λ_{\max} 234 and 286 nm confirmed the presence of a benzenoid nucleus [23]. The absorption bands at 2,600–3,300, 1,687, 1,632, 1,040 and 937 cm⁻¹ in the IR spectrum revealed the presence of OH, C=O, C=C and O-CH₂-O groups, respectively. The ¹H and ¹³C-NMR data of **7** were similar to those of **10**, suggesting that they both share a common tetracyclic endiandric acid skeleton, except for the presence of an α -OH at δ_{H} 4.23 (d, J = 9.8 Hz, H-4) in **7**. The location of this hydroxy group at C-4 was deduced from the COSY correlations between H-3/H-5 and H-4, and HMBC correlations from H-2a (δ_{H} 1.29), H-3 and H-13 to C-4. The relative configuration of the stereogenic centers was established by biogenetic considerations [24], analysis of the NOESY spectrum and comparison with NMR data reported in the literature [23]. NOESY correlations between H-12 and H-1/H-10/H-13, H-1, and between H-7 and H-8/H-13 confirmed that protons H-1, H-7, H-10, H-12 and H-13 are all cofacial, arbitrarily assigned as β -oriented. Since cross peaks between H-4 at δ_{H} 4.23 and H-2a and H-2b, at δ_{H} 1.29 and 1.79 respectively, were equally intense, the relative configuration at C-4 could not be deduced from the NOESY spectrum. However, comparison of NMR data of kingianic acid G (**7**) with data reported in the literature for beilschmiedic acids H and I allowed the assignment of the 4-OH configuration [23]. Indeed, since compound **7** possesses similar ¹³C chemical shifts to beilschmiedic acid H for carbons C-3, C-4 and C-5 (δ_{C} 44.1, 73.6, 145.6, respectively for **7**; δ_{C} 45.1, 74.5 and 145.8, respectively for beilschmiedic acid H), it can be deduced that the hydroxy group is α -oriented, as was the case for beilschmiedic acid H [23]. In the case of beilschmiedic acid I, having a β -oriented hydroxy group at C-4, chemical shifts of C-3, C-4 and C-5 are more shielded; 43.1, 65.9 and 141.5 ppm, respectively [23]. Thus, kingianic acid G (**7**) was proposed to have the same relative configuration as beilschmiedic acid H.

Compound **10** was obtained as an amorphous solid. The HRESIMS spectrum of **10** showed a pseudomolecular ion peak [M-H]⁻ at m/z 349.1431 (calcd. 349.1440), consistent with a molecular formula of C₂₂H₂₂O₄, with 12 degrees of unsaturation. Its IR spectrum showed strong absorption bands at 1,685 cm⁻¹ for C=O, and 1,630 cm⁻¹ for C=C, and UV absorption bands at λ_{\max} 234 and 286 nm suggesting the presence of a benzenoid moiety. The ¹³C-NMR spectrum of **10** (Table 3) contained 22 carbons signals, which were sorted by DEPT-135 NMR and HSQC into 5 quaternary carbons, 14 methines and 4 methylene groups. Resonances of methines at δ_{C} 40.9 (C-1), 35.6 (C-3), 144.6 (C-5), 33.3 (C-7), 127.1 (C-8), 127.0 (C-9), 33.2 (C-10), 46.9 (C-11), 34.0 (C-12) and 42.2 (C-13), and methylene groups at δ_{C} 37.0 (C-2) and 32.2 (C-4) observed in the DEPT spectrum, were characteristic of a tetracyclic endiandric acid skeleton as seen in cryptobeilic acids A-D [20]. The ¹³C-NMR spectrum showed also signals of a conjugated carbonyl group at δ_{C} 178.0 (COOH), an olefinic quaternary carbon at δ_{C} 134.6 (C-6) and carbons of a substituted methylenedioxybenzyl moiety (C-1'-C-8'). The presence of olefinic methines in **10** was confirmed by the ¹H-NMR spectrum (Table 3), which showed a broad singlet of proton H-5 at δ_{H} 7.23 (brs, H-5) and a pair of protons appearing as doublet at δ_{H} 5.39 (d, J = 10.0 Hz, H-8) and 5.54 (d, J = 10.0 Hz, H-9). The *ortho* coupled proton H-6' and H-7' resonated as a pair of doublets at δ_{H} 6.71 (d, J = 7.9 Hz, H-6') and 6.60 (d, J = 7.9 Hz, H-7'),

while H-3' appeared as a singlet at δ_H 6.65 (s, H-3'). In addition, protons signal at δ_H 5.91 (s, H-8') confirmed the presence of the methylenedioxy group. HMBC correlations (Figure 2) from H-5 to C-6 (δ_C 134.6) and COOH (δ_C 178.0), and from H-8 to C-6 established the location of the carboxylic group at C-6. The attachment of the methylenedioxybenzyl moiety at H-11 was confirmed by the correlation from H-11 to C-2', and from H-1' to C-10 and C-1. The relative configuration of the asymmetric carbons was established by NOESY analysis (Figure 3) and confirmed by X-ray crystallographic analysis (see Supporting Information). Therefore, the relative configuration of H-1, H-3, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12, and H-13 was assigned as *rel*-(1*SR*,3*RS*,7*RS*,10*RS*,11*SR*,12*SR*,13*SR*), same as that of beilschmiedic acid H [23].

Table 3. ^1H (600 MHz) and ^{13}C (150 MHz) NMR data of compounds **6**, **7**, and **10** (CDCl_3).

Position	6		7		10	
	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C
1	2.45 m	41.0	2.48 m	40.9	2.42 m	40.9
2	1.30 dt (6.3, 12.1)	34.7	1.29 m	35.0	1.20 m	37.0
	1.53 dd (6.4, 11.9)		1.79 m		1.53 m	
3	2.55 m	36.9	2.08 m	44.1	2.04 m	35.6
4	6.19 d (9.7)	134.4	4.23 d (9.8)	73.6	2.08 m, 2.47 m	32.2
5	5.72 d (9.6)	123.9	7.03 brs	145.6	7.23 brs	144.6
6	3.00 m	49.0	-	134.3	-	134.6
7	2.84 m	32.8	3.23 brs	33.2	3.26 brs	33.3
8	5.40 m	129.8	5.43 d (10.5)	127.7	5.39 d (10.0)	127.1
9	5.42 m	129.1	5.53 d (10.5)	126.2	5.54 d (10.0)	127.0
10	2.39 m	34.5	2.42 m	33.7	2.40 m	33.2
11	1.82 m	46.9	1.76 m	46.8	1.74 m	46.9
12	2.70 dd (7.7, 16.2)	32.9	2.80 m	33.6	2.77 m	34.0
13	1.73 m	42.0	1.86 m	40.8	1.68 m	42.2
1'	2.81 m	42.9	2.71 d (8.0)	42.5	2.70 d (8.0)	42.6
2'	-	140.7	-	134.6	-	134.6
3'	7.15 d (6.8)	128.6	6.64 s	108.9	6.65 s	109.0
4'	7.24 t (6.7)	128.4	-	147.5	-	147.4
5'	6.20 dt (2.1, 7.3)	125.8	-	145.6	-	145.6
6'	7.24 t (6.7)	128.4	6.71 d (7.9)	108.1	6.71 d (7.9)	108.0
7'	7.15 d (6.8)	128.6	6.59 d (7.9)	121.3	6.60 d (7.9)	121.3
8'			5.91 s	100.7	5.91 s	100.7
C=O		179.4		170.3		178.0

Endiandric acid M (**8**) and tsangibeilin B (**9**) were readily identified by comparison with literature data [22,25]. The structure and relative configuration of tsangibeilin B (**9**) were confirmed by single-crystal X-ray analysis (see Supporting Information).

Compounds **1**, **3**, **5–9** were screened against the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1 using fluorescence polarization assays according to Qian and co-workers [26]. Assays are based on the interaction of fluorescein-labeled peptides [the BH3 domain of BAK protein (F-Bak) or BID protein (F-Bid) to Bcl-xL and Mcl-1, respectively]. No binding was detected for Bcl-xL and only weak binding affinity for Mcl-1 (25%–30% inhibition at 20 μM and $\geq 75\%$ at 100 μM) were obtained with compounds **3**, **6** and **9** (Table 4). In these assays, amount of compounds **2**, **4** and **10** were not sufficient for this biological evaluation.

Table 4. Biological activities of compounds **1**, **3**, **5–9**.

Compounds	Bcl-xL/Bak binding affinity		Mcl-1/Bid binding affinity		Cytotoxicity		
	(%)		(%)		(IC ₅₀ in μM , mean \pm s.d., $n = 3$)		
	20 μM	100 μM	20 μM	100 μM	HT-29	A549	PC3
1	3 \pm 1.5	21 \pm 1.8	3 \pm 2.0	36 \pm 2.3	35.0 \pm 0.2	85.4 \pm 0.2	>100
3	9 \pm 1.5	25 \pm 1.7	30 \pm 2.2	75 \pm 1.1	>100	85.3 \pm 0.2	>100
5	2 \pm 1.4	1 \pm 0.8	3 \pm 1.3	8 \pm 5.5	17.1 \pm 0.1	15.4 \pm 0.2	77.2 \pm 0.2
6	4 \pm 1.6	22 \pm 2.9	28 \pm 3.7	80 \pm 0.7	NT	NT	NT
7	5 \pm 1.3	19 \pm 1.6	8 \pm 1.1	47 \pm 2.9	NT	NT	NT
8	0	10 \pm 0.5	4 \pm 0.8	39 \pm 0.9	>100	>100	>100
9	6 \pm 1.5	26 \pm 2.5	25 \pm 2.1	81 \pm 2.4	>100	38.1 \pm 0.1	>100
U-Bak (Ki)		12 \pm 1 nM					
U-Bid (Ki)				16 \pm 2 nM			
ABT-737 (Ki)		57 \pm 10 nM		47 \pm 22 nM			
Cisplatin					70.3 \pm 1.1	36.2 \pm 1.4	44.5 \pm 7.7

NT: not tested; U-Bak and U-bid correspond to unlabeled peptides Bak and Bid, respectively.

Compounds **1**, **3**, **5**, **8** and **9** were screened for cytotoxic activity against A549 (lung adenocarcinoma epithelial), HT29 (colorectal adenocarcinoma) and PC3 (prostate adenocarcinoma) cell lines using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS)-based assay (Table 4). Compound **5** showed moderate cytotoxic activity against lung adenocarcinoma epithelial (A549) and colorectal adenocarcinoma cell lines (HT-29) with IC₅₀ of 15.36 \pm 0.19 μM and 17.10 \pm 0.11 μM , respectively. The other compounds showed very weak or devoid of (A549) cytotoxic activity against the cancer cell lines tested. Our results are in agreement with a previous study by Williams, in which some synthetic tetracyclic endiandric acids were not active on prostate adenocarcinoma cancer cells (PC3), but significantly active on lung carcinoma cells [23].

3. Experimental

3.1. General

Optical rotations were measured on a JASCO P-1020 polarimeter. IR spectra (neat) were taken on a Perkin Elmer RX1 FT-IR spectrometer. 1D (¹H, ¹³C, DEPT) and 2D (COSY, NOESY, HSQC, HMBC) NMR experiments were carried out on a Bruker Avance 600 (600 MHz for ¹H NMR, 150 MHz for ¹³C NMR) spectrometer. Data were analysed via TopSpin software package. Chemical shifts were internally referenced to the solvent signals in CDCl₃ (¹H, δ 7.26; ¹³C, δ 77.0). High-resolution ESIMS on a Thermoquest TLM LCQ Deca ion-trap mass spectrometer. Silica gels (230–400 mesh) (Merck) were used for column chromatography (CC), and silica gel 60 F-254 (Merck) was used for analytical TLC. Agilent® Eclipse Zorbax C18 column (250 \times 9.4 mm, 3.5 μm) and Waters® X-Bridge C18 column (250 \times 10.0 mm, 5.0 μm); were used for semi-preparative HPLC separations using a Waters auto purification system equipped with a sample manager (Waters 2767), a column fluidics organizer, a binary pump (Waters 2525), a UV–Vis diode array detector (190–600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. X-ray data collection was obtained from a

BrukerAPEX2; cell refinement: SMART [27]; data reduction: SAINT [27]; program(s) used to solve the structure: SHELXTL [28]; program(s) used to refine structure: SHELXTL [28].

3.2. Plant Material

The bark of *Endiandra kingiana* Gamble was collected at Reserved Forest Sg. Temau, Kuala Lipis, Pahang, Malaysia in May 2006. This plant was identified by T. Leong Eng Botanist University of Malaya. A voucher specimen (KL-5243) has been deposited at the Herbarium of the Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.

3.3. Extraction and Isolation

The air-dried bark of *E. kingiana* (1.5 kg) were sliced, ground and extracted with EtOAc (3 × 1.5 L) followed by MeOH (3 × 1.5 L) at 40 °C and 100 bar using a Zippertex static high-pressure, high-temperature extractor developed at the ICSN pilot unit. The methanol extract was concentrated under reduced pressure and was partitioned with EtOAc/H₂O (1:1, v/v) to afford an EtOAc-soluble fraction (22.5 g) and a H₂O-soluble fraction (91.7 g). The EtOAc-soluble fraction (22 g) was subjected to column chromatography (CC, 660 g SiO₂, 230–400 mesh; hexane/dichloromethane/methanol step gradient) to give eight fractions, identified as Fr. 1–Fr. 8.

Fr. 4 (4.3 g) was subjected to CC (129 g, SiO₂, 230–400 mesh; hexane/AcOEt step gradient) to obtain 20 subfractions base on TLC profile: Fr. 4.1–Fr. 4.20. Fraction Fr. 4.3 (37.8 mg) was separated using semi-preparative C₁₈ HPLC eluted at 3.5 mL/min isocratically with MeCN-H₂O 65:35 + 0.1% formic acid from 5 to 50 min (Agilent[®] Eclipse Zorbax C₁₈ column (250 × 9.4 mm, 3.5 μm). Serial collections afforded **2** (*t_R* 8.0 min, 1.2 mg) and **4** (*t_R* 16.0 min, 1.0 mg). **1** (*t_R* 13.1 min, 12.1 mg), **6** (*t_R* 24.8 min, 3.4 mg) and **10** (*t_R* 19.9 min, 1.2 mg) were purified from the fraction Fr. 4.4 (71.0 mg) with a semi-preparative C-18 column (Agilent[®] Eclipse Zorbax C18 column (250 × 9.4 mm, 3.5 μm) using MeCN-H₂O 65:35 plus 0.1% formic acid at 3.5 mL/min. Further analogues were separated from fraction Fr. 4.7 (41.4 mg) and separated using semi-preparative C-18 column (Agilent[®] Eclipse Zorbax C18 column (250 × 9.4 mm, 3.5 μm) using MeCN-H₂O 65:35 plus 0.1% formic acid at 3.5 mL/min. Serial collections afforded **9** (*t_R* 14.7 min, 1.8 mg) and **3** (*t_R* 16.4 min, 4.4 mg). From fraction Fr 4.14 (72.4 mg), **5** (*t_R* 14.6 min, 1.4 mg) and **8** (*t_R* 25.1 min, 2.0 mg) were isolated using semi-preparative HPLC eluted at 3.5 mL/min isocratically with MeCN-H₂O 60:40 plus 0.1% formic acid (Agilent[®] Eclipse Zorbax C18 column (250 × 9.4 mm, 3.5 μm). Fr. 5 (0.7 g) was subjected to CC (21 g, SiO₂, 230–400 mesh; hexane/AcOEt step gradient) to obtain 12 subfractions according to their TLC profiles. Fraction Fr. 5.7 (26.8 mg) was purified using a semi-preparative C₁₈ column (Waters[®] X-Bridge C18 column (250 × 10.0 mm, 5.0 μm) using MeCN-H₂O 50:50 plus 0.1% formic acid at 3.0 mL/min afforded **7** (*t_R* 13.4 min, 1.5 mg).

3.4. Spectral Data

Kingianic acid A (**1**): yellowish oil; $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.20, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} 233, 286 nm; IR (neat) ν_{\max} 3431(OH), 1701 (C=O), 1040, 936 (OCH₂O) cm⁻¹; ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 1; HRESIMS *m/z* 323.1279 [M–H][−] (calcd for C₂₀H₁₉O₄, 323.1284).

Kingianic acid B (2): yellowish oil; $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.12, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} 212, 287 nm; IR (neat) ν_{\max} 3432(OH), 1721 (C=O) cm⁻¹; ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 279.1398 [M-H]⁻ (calcd for C₁₉H₁₉O₂, 279.1385).

Kingianic acid C (3): yellowish oil; $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.20, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} 212, 290 nm; IR (neat) ν_{\max} 3437 (OH), 1697 (C=O), 1037, 923 (OCH₂O) cm⁻¹; ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 1; HRESIMS m/z 349.1439 [M-H]⁻ (calcd for C₂₂H₂₁O₄, 349.1440).

Kingianic acid D (4): yellowish oil; $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.10, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} 212, 289 nm; IR (neat) ν_{\max} 3440(OH), 1693 (C=O) cm⁻¹; ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 2; HRESIMS m/z 305.1539 [M-H]⁻ (calcd for C₂₁H₂₁O₂, 305.1542).

Kingianic acid E (5): yellowish oil; $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.14, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} 234, 286 nm; IR (neat) ν_{\max} 3444(OH), 1665 (C=O), 1039, 938 (OCH₂O) cm⁻¹; ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 2; HRESIMS m/z 323.1298 [M-H]⁻ (calcd for C₂₀H₁₉O₄, 323.1284).

Kingianic acid F (6): yellowish oil; $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.16, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} 232, 288 nm; IR (neat) ν_{\max} 3432 (OH), 1696 (C=O) cm⁻¹; ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 3; HRESIMS m/z 305.1557 [M-H]⁻ (calcd for C₂₁H₂₁O₂, 305.1542).

Kingianic acid G (7): Yellowish oil. $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.14, CHCl₃). UV (MeOH) λ_{\max} 234, 286 nm. IR (neat) ν_{\max} 2600–3300 (OH), 1687 (C=O), 1632 (C=C) and 1040, 937 (OCH₂O) cm⁻¹. ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 3. HREIMS: m/z 365.1401 [M-H]⁻ (calcd for C₂₂H₂₁O₅, 365.1389).

Compound **10**: Amorphous solid. $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.12, CHCl₃). UV (MeOH) λ_{\max} 234, 286 nm. IR (neat) ν_{\max} 1685 (C=O), 1630 (C=C) and 1039, 935 (OCH₂O) cm⁻¹. ¹H-NMR and ¹³C-NMR, see Table 3. HREIMS: m/z 349.1431[M-H]⁻ (calcd for C₂₂H₂₁O₄, 349.1440). A colourless crystal was obtained from MeOH, crystallized in the monoclinic crystal system with P21/c space group. Cell parameters: a = 6.141(2) Å; b = 23.448(8) Å; c = 12.366(4) Å; β = 104.38°; V = 1834.58(8) Å³, T 100 K. For the X-ray crystallographic data of compound **10** see Supporting Information. Supplementary crystallographic data have been deposited with the CCDC as CCDC-918161.

CCDC-918161 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; Fax: +44 1223 336033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

3.5. Bcl-xL and Mcl-1 Binding Affinity Assays

The binding affinities of compounds for Bcl-xL and Mcl-1 were evaluated by competition against fluorescently labelled reference compounds, Bak and Bid, respectively, as described by Qian *et al.* [26]. Human 45-84/ C37 Bcl-xL and mouse DN150/DC25 Mcl-1 proteins were recombinantly produced by N. Birlirakis at ICSN. Bak, 5-Carboxyfluorescein-Bak, Bid and 5-carboxyfluorescein-Bid peptides were synthesized by PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France). All sequences are available in the Supporting Information (S37). Unlabelled peptides were dissolved in DMSO (Carlo Erba, Val de Reuil, France) and labelled peptides were diluted in assay buffer, which contained 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4),

50 mM NaCl, 2 μ M EDTA, 0.05% Pluronic F-68, without pluronic acid for storage at -20 °C. Liquid handling instrument, Biomek[®]NX and Biomek[®]3000 (Beckman Coulter, Villepinte, France), were used to add protein and fluorescein-labelled peptides. 15 nM labelled BH3 peptide, 100 nM protein, and 100 μ M of unlabelled BH3 peptide or compound (first diluted in 10 mM DMSO and then buffer for final concentration from 10^{-9} to 10^{-4} M) into a final volume of 40 μ L were distributed in a 96 well black polystyrene flat-bottomed microplate (VWR 734-1622). The microplate was then incubated at room temperature for 1 h and shaken before fluorescent polarization measure. Fluorescence polarization in millipolarization units was measured with a Beckman Coulter Paradigm[®] using FP cartridge (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535nm). The exposure time was 300 ms per channel. All experimental data were collected using the Biomek Software[®] (Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA) and analysed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA). Results are expressed as binding activity, *i.e.*, percentage of inhibition of the binding of labelled reference compound, or as K_i , the concentration corresponding to 50% of such inhibition, and corrected for experimental conditions according to Kenakin rearranged equation [29], which is adapted from Cheng and Prusoff equation [30]. ABT-737, which was kindly provided by O. Nosjean (Institut de Recherche Servier, Croissy, France), and unlabeled peptides Bak and Bid were used as positives control. The performance of the assays was monitored by use of Z' factors as described by Zhang *et al.* [31]. The Z' factors for these assays are 0.8 (Bcl-xL/Bak) and 0.7 (Mcl-1/Bid) indicating that they should be robust assays.

3.6. Cell Viability Assay

Human cancer cell lines A549 (Lung adenocarcinoma epithelial), HT29 (Colorectal adenocarcinoma) and PC3 (Prostate adenocarcinoma) cells were obtained from the ATCC (Manassas, VA, USA). Cells were grown in RPMI-1640 or DMEM medium with 10% FBS supplemented with 4 mM L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin. For experimental purposes, the cells growing exponentially and maintained at 70%–80% confluency were used. Cells were seeded into 96-well plates at 10^4 cells/well and allowed to adhere overnight; the medium was then removed. A stock solution of test compound in DMSO was diluted in medium to generate a series of working solutions. Aliquots (100 μ L) of the working solutions were added to the appropriate test wells to expose cells to the final concentrations of compound in a total volume of 100 μ L. Nine different concentrations (100 μ L–0.4 μ L) were tested, in triplicates. Cisplatin is used as a positive control and wells containing vehicle without compound were used as negative controls. Plates were kept for 48 h in a 37 °C, 5% CO₂ incubator. After incubation, viable cells were detected with the CellTiter 96 AQueous cell proliferation assay (Promega Corp., Madison, WI, USA). Plates were read in a microplate reader (Tecan Infinite[®] 200 PRO series, Mannedorf, Switzerland) at 490nm. Then, dose-response curves were generated and the IC₅₀ values were determined using GraphPad Prism 5.04 software (La Jolla, CA, USA [32]).

4. Conclusions

The phytochemical investigation of *Endiandra kingiana* methanolic bark extract has led to the isolation of seven new tetracyclic endiandric acid analogues, named kingianic acids A–G (1–7), together with endiandric acid M (8), tsangibeilin B (9) and compound 10. These compounds were

screened for Bcl-xL and Mcl-1 binding affinities, and cytotoxic activity on various cancer cell lines. Compound **5** showed moderate cytotoxic activity, with IC₅₀ values in the range 15–17 µM, and compounds **3**, **6** and **9** exhibited weak binding affinity for the anti-apoptotic protein Mcl-1. This is the first report of binding affinity toward Mcl-1 for endiandric acid analogues.

Supplementary Materials

Supplementary materials: HRESIMS and NMR spectra for compounds **1–7** and **10**, and the X-ray crystallographic analysis data of tsangibeilin B (**9**) and endiandric acid **10** can be accessed at: <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/2/1732/s1>.

Acknowledgments

This work was carried out in the frame of an official collaboration agreement between the Centre National de la Recherche Scientifique (France) and the University of Malaya (Kuala Lumpur, Malaysia). We are grateful to Bright Spark Unit, University of Malaya, Malaysia and French Embassy in Malaysia for a scholarship (M.N.A). We thank D. M. Nor, R. Syamsir and T. Leong Eng (UM) for the collection and identification of plant material, and Cheah Foo Kit (UM) for the help with cytotoxic assays. Great appreciation is also given to M. T. Martin (CNRS) and N. Mohamad (UM) for NMR discussion and Y. Six (CNRS) for his careful reading of the manuscript. We thank the University of Malaya (PV050/2012A, RP001-2012B and RP001A-13BIO), the Agence National de la Recherche (ANR), contract number ANR-2010-JCJC-702-1 and ICSN, CNRS for financial support.

Author Contributions

Mohamad Nurul Azmi and Charlotte Geny contributed equally to this work.

Conflicts of Interest

The authors declare no competing financial interest.

References

1. Litaudon, M.; Bousserouel, H.; Awang, K.; Nosjean, O.; Martin, M.-T.; Tran Huu Dau, M.-E.; Hadi, H.A.; Boutin, J.A.; Sévenet, T.; Guéritte, F. A dimeric sesquiterpenoid from a Malaysian *Meiogyne* as a new inhibitor of Bcl-xL/BakBH3 domain peptide interaction. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 480–483.
2. Leverrier, A.; Dau, M.E.T.H.; Retailleau, P.; Awang, K.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Kingianin A: A new natural pentacyclic compound from *Endiandra kingiana*. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3638–3641.
3. Leverrier, A.; Martin, M.-T.; Servy, C.; Ouazzani, J.; Retailleau, P.; Awang, K.; Mukhtar, M.R.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Rearranged diterpenoids from the biotransformation of *ent* trachyloban-18-oic acid by *Rhizopus arrhizus*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *76*, 1121–1125.
4. Leverrier, A.; Awang, K.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Pentacyclic polyketides from *Endiandra kingiana* as inhibitors of the Bcl-xL/Bak interaction. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 1443–1452.

5. Ng, F.S.P. *Tree Flora of Malaya, a Manual for the Forester*; Whitmore, T.C., Ed.; Longman: Kuala Lumpur, Malaysia, 1989; Volume 4, p. 141.
6. Burkill, I.H. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsular*, 2nd ed.; Government of Malaya and Singapore: Kuala Lumpur, Malaysia, 1966; p. 1773.
7. Mabberley, D.J. *Mabberley's Plant-Book: A Portable Dictionary of Plants, Their Classification and Uses*, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2008; p. 1021.
8. Bandaranayake, W.M.; Banfield, J.E.; Black, D.S.C.; Fallon, G.D.; Gatehouse, B.M. Endiandric acid, a novel carboxylic acid from *Endiandra introrsa* (Lauraceae): X-Ray structure determination. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 162–163, doi:10.1039/C39800000162.
9. Bandaranayake, W.M.; Banfield, J.E.; Black, D.S.C.; Fallon, G.D.; Gatehouse, B.M. Constituents of *Endiandra* species. I. Endiandric acid, a novel carboxylic acid from *Endiandra introrsa* (Lauraceae) and a derived lactone. *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 1655–1667.
10. Bandaranayake, W.M.; Banfield, J.E.; Black, D.S.C.; Fallon, G.D.; Gatehouse, B.M. Constituents of *Endiandra* species. III. 4-[(E,E)-5'-Phenylpenta-2',4'-dien-1'-yl]tetracyclo[5,4,0,0^{2,5},0^{3,9}]undec-10-ene-8-carboxylic acid from *Endiandra introrsa* (Lauraceae). *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 567–579.
11. Bandaranayake, W.M.; Banfield, J.E.; Black, D.S.C. Constituents of *Endiandra* species. II. (E)-4-(6'-phenyltetracyclo[5.4.2.03,13.010,12]trideca-4',8'-dien-11'yl)but-2-enoic acid from *Endiandra introrsa* (Lauraceae) and a derived lactone. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 557–565.
12. Bandaranayake, W.M.; Banfield, J.E.; Black, D.S.C. Postulated electrocyclic reactions leading to endiandric acid and related natural products. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 902–903, doi:10.1039/C39800000902.
13. Banfield, J.E.; Black, D.S.C.; Fallon, G.D.; Gatehouse, B.M. Constituents of *Endiandra* species. V. 2-[3',5'-Dioxo-4'-phenyl-10'-{(E,E)-5"-phenyl-penta-2",4"-dien-1"-yl}-2',4',6'-triazatetracyclo[5,4,2,0^{2,6},0^{8,11}]tridec-12'-en-9'-yl]-acetic acid derived from *Endiandra introrsa* (Lauraceae). *Aust. J. Chem.* **1983**, *36*, 627–632.
14. Banfield, J.E.; Black, D.S.C.; Johns, S.R.; Willing, R.I. Constituents of *Endiandra* species. IV. 2-(8'-[(E,E)-5"-phenylpenta-2",4"-dien-1"-yl]bicyclo[4.2.0]octa-2',4'-dien-7'-yl)acetic acid, a biogenetically predicted metabolite of *Endiandra introrsa* (Lauraceae) and its structure determination by means of 1D and 2D NMR spectroscopy. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 2247–2256.
15. Nicolaou, K.C.; Petasis, N.A.; Zipkin, R.E. The endiandric acid cascade. Electrocyclizations in organic synthesis. 4. Biomimetic approach to endiandric acids A-G. Total synthesis and thermal studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5560–5562.
16. Nicolaou, K.C.; Zipkin, R.E.; Petasis, N.A. The endiandric acid cascade. Electrocyclizations in organic synthesis. 3. "Biomimetic" approach to endiandric acids A-G. Synthesis of precursors. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5558–5560.
17. Nicolaou, K.C.; Petasis, N.A. *Strategies and Tactics in Organic Synthesis*; Lindberg, T., Ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1984; Volume 1, pp. 155–173.
18. Chouna, J.R.; Nkeng-Efouet, P.A.; Lenta, B.N.; Devkota, K.P.; Neumann, B.; Stammeler, H.-G.; Kimbu, S.F.; Sewald, N. Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 684–688.

19. Chouna, J.R.; Nkeng-Efouet, P.A.; Lenta, B.N.; Wansi, J.D.; Kimbu, S.F.; Sewald, N. Endiandric acid derivatives from the stem bark of *Beilschmiedia anacardioides*. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 13–16.
20. Talontsi, F.M.; Lamshöft, M.; Bauer, J.O.; Razakarivony, A.A.; Andriamihaja, B.; Strohmam, C.; Spitteller, M. Antibacterial and antiplasmodial constituents of *Beilschmiedia cryptocaryoides*. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 97–102.
21. Yang, P.-S.; Cheng, M.-J.; Peng, C.-F.; Chen, J.-J.; Chen, I.-S. Endiandric acid analogues from the roots of *Beilschmiedia erythrophloia*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 53–58.
22. Huang, Y.-T.; Chang, H.-S.; Wang, G.-J.; Cheng, M.-J.; Chen, C.-H.; Yang, Y.-J.; Chen, I.-S. Anti-inflammatory endiandric acid analogues from the roots of *Beilschmiedia tsangii*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1875–1880.
23. Williams, R.B.; Martin, S.M.; Hu, J.-F.; Norman, V.L.; Goering, M.G.; Loss, S.; O’Neil-Johnson, M.; Eldridge, G.R.; Starks, C.M. Cytotoxic and antibacterial beilschmiedic acids from a gabonese species of *Beilschmiedia*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1319–1325.
24. Gravel, E.; Poupon, E. Biogenesis and biomimetic chemistry: Can complex natural products be assembled spontaneously? *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *1*, 27–42.
25. Huang, Y.-T.; Chang, H.-S.; Wang, G.-J.; Lin, C.-H.; Chen, I.-S. Secondary metabolites from the roots of *Beilschmiedia tsangii* and their anti-inflammatory activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 16430–16443.
26. Qian, J.; Voorbach, M.J.; Huth, J.R.; Coen, M.L.; Zhang, H.; Ng, S.-C.; Comess, K.M.; Petros, A.M.; Rosenberg, S.H.; Warrior, U.; *et al.* Discovery of novel inhibitors of Bcl-xL using multiple high-throughput screening platforms. *Anal. Biochem.* **2004**, *328*, 131–138.
27. Bruker (2000). *SAINT and SMART*; Bruker AXS Inc.: Madison, WI, USA, 2000.
28. Sheldrick, G.M. *SHELXTL. Version 5.1 Bruker AXS*; University of Göttingen: Göttingen, Germany, 2008.
29. Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P.P.; Krajewski, K.; Saito, N.G.; Stuckey, J.A.; *et al.* Development and optimization of a binding assay for the XIAP BIR3 domain using fluorescence polarization. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
30. Cheng, Y.; Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
31. Zhang, J.H.; Chung, T.D.; Oldenburg, K.R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67–73.
32. Riss, T.L.; Moravec, R.A. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound MTS for *in vitro* proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell* **1992**, *3*, 184a–188a.

Sample Availability: Samples of compounds **1–10** are not available.

Endiandric Acid Analogues from *Beilschmiedia ferruginea* as Dual Inhibitors of Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid Interactions

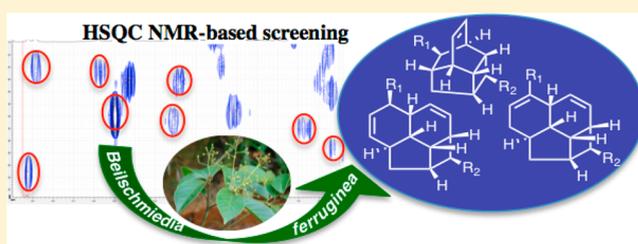
Cécile Apel,^{†,§} Charlotte Gény,^{†,§} Vincent Dumontet,[†] Nicolas Birlirakis,[†] Fanny Roussi,[†] Van Cuong Pham,[‡] Huong Doan Thi Mai,[‡] Van Hung Nguyen,[‡] Van Minh Chau,[‡] and Marc Litaudon^{*†}

[†]Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), CNRS, 1 av de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

[‡]Institute of Marine Biochemistry of the Vietnam Academy of Sciences and Technology (VAST), 18 Hoang Quoc Viet Road, 90184 Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Supporting Information

ABSTRACT: A rapid screening by ¹H and ¹H–¹³C HSQC NMR spectroscopy of EtOAc extracts of *Endiandra* and *Beilschmiedia* species allowed the selection of *Beilschmiedia ferruginea* leaves and flowers extract for a chemical investigation, leading to the isolation of 11 new tetracyclic endiandric acid analogues, named ferrugineic acids A–K (1–11). Their structures were determined by 1D and 2D NMR spectroscopic analysis in combination with HRMS data. These compounds were assayed for Bcl-xL and Mcl-1 binding affinities. Ferrugineic acids B, C, and J (2, 3, and 10) exhibited significant binding affinity for both antiapoptotic proteins Bcl-xL ($K_i = 19.2, 12.6, \text{ and } 19.4 \mu\text{M}$, respectively) and Mcl-1 ($K_i = 14.0, 13.0, \text{ and } 5.2 \mu\text{M}$, respectively), and ferrugineic acid D (4) showed only significant inhibiting activity for Mcl-1 ($K_i = 5.9 \mu\text{M}$).



The antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, and A1, members of the Bcl-2 family, have become attractive molecular targets for cancer treatment or prevention drug discovery.^{1,2} While discovering new selective Bcl-xL inhibitors provides a promising approach in the search for anticancer drugs,³ it has also been shown that most cancers depend on more than one antiapoptotic Bcl-2 member for survival. Among these proteins, Mcl-1 is overexpressed in many cancers, contributes to tumor progression, and has emerged as one of the major resistance factors in cancer cells.^{2,3} Thus, effective treatment may require simultaneous inhibition of multiple antiapoptotic Bcl-2 proteins, as it was suggested by the study of Placzek and co-workers, who investigated the mRNA expression levels of six antiapoptotic Bcl-2 subfamily members in 68 human cancer cell lines.⁴ In this context, the discovery of dual inhibitors acting on Bcl-xL and Mcl-1 could play a significant role in cancer treatment.

We recently reported a series of new natural endiandric acids, kingianic acids A–G, isolated from the EtOAc bark extract of *Endiandra kingiana* Gamble (Lauraceae).⁵ Kingianic acids C and F and tsangibeilin B showed weak binding affinity to the antiapoptotic protein Mcl-1.⁵

Endiandric acids, which possess a unique tetracyclic carbon skeleton, are exclusively produced by species of the genus *Endiandra* or *Beilschmiedia*. With the objective of discovering new endiandric acid analogues, and taking into account these preliminary results, we undertook a rapid screening by ¹H and ¹H–¹³C HSQC NMR experiments of EtOAc extracts of *Beilschmiedia* and *Endiandra* species that we had in our plant

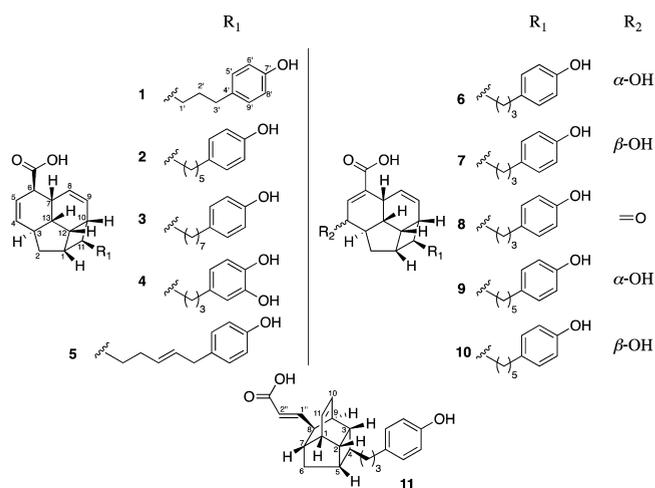
library. Among the different extracts, the NMR spectra of the EtOAc extract of the leaves and flowers of *Beilschmiedia ferruginea* H. Liu (Lauraceae) displayed the expected set of NMR resonances for endiandric acids. This species is a medium-size evergreen tree mainly distributed in Vietnam. To date there are 287 species of *Beilschmiedia*,⁶ but only nine species, *B. oligandra*,⁷ *B. tooram*,⁷ *B. obtusifolia*,⁷ *B. fulva*,⁸ *B. erythrophloia*,^{9,10} *B. anacardioides*,^{11–13} *B. tsangii*,^{14,15} *B. cryptocaryoides*,¹⁶ and an unknown Gabonese species,¹⁷ were reported to produce endiandric acids, most of which were published in the past three years. They possess various biological activities, such as antiallergic and antiasthmatic,⁸ antibacterial,^{11,16,17} antimycobacterial,⁹ antiplasmodial,¹⁶ iNOS inhibitory activity,¹⁴ and cytotoxic properties.¹⁷

The chemical investigation of the EtOAc extract of *B. ferruginea* leaves and flowers extract led to the isolation of 11 new endiandric acids that we named ferrugineic acids A–K (1–11). Herein, the isolation, structure elucidation, and Bcl-xL and Mcl-1 affinities of the endiandric acids are reported.

RESULTS AND DISCUSSION

The majority of endiandric acid derivatives possess a tetracyclic carbon skeleton formed with 11 or 13 carbon atoms including one or two double bonds and seven or eight sp³ hybridized methines, whose NMR spectroscopic data are relatively constant irrespective of the compound considered. Indeed,

Received: February 22, 2014



the methine proton and carbon NMR chemical shifts are consistently between 1.40 and 3.0 ppm, and 34 and 53 ppm, respectively. We therefore screened by ^1H NMR and ^1H - ^{13}C HSQC experiments EtOAc extracts prepared from *Endiandra* and *Beilschmiedia* species, that we had in our plant library. We first selected the crude extracts showing two sets of proton resonances at ca. 1–3 and 5–7 ppm (Figure 1) in the ^1H NMR spectrum followed by those showing HSQC-correlations corresponding to endiandric acid sp^3 -methines in the 2D-spectrum (Figure 2). From 39 crude EtOAc extracts prepared from various plant parts of three *Endiandra* and 14 *Beilschmiedia* species, the EtOAc leaves plus flowers extract of *B. ferruginea*, which showed the strongest NMR signal-to-noise ratio, was selected for further chemical investigation.

Approximately 100 g of air-dried powder of the leaves and flowers were extracted with EtOAc to yield a crude extract (3.0 g) after evaporation of solvent. The extract was subjected to silica gel chromatography using a gradient of *n*-heptane/ CH_2Cl_2 /MeOH of increasing polarity to produce 18 fractions (F1–F18). Preparative HPLC were used to further purify fractions F15–F18, which have shown “endiandric acid-NMR fingerprinting” in the ^1H NMR spectrum, leading to ferrugineic

acids A–K (1–11). All assignments of ^1H and ^{13}C data were established through analysis of 2D NMR, NOESY, COSY, HSQC, and HMBC experiments. All compounds were isolated as racemic mixtures and possess similar spectroscopic data. They all retain the characteristic endiandric acid tetracyclic carbon skeleton as exemplified by tsangibeilins A and B and endiandramide A (compounds 1–10), and endiandramide B (compound 11).¹⁸ Their UV spectra showed absorption bands between 221–225 and 277–283 nm suggesting the presence of a benzenoid moiety, and their IR spectra indicated the presence of hydroxy groups (3300 – 3358 cm^{-1}), carbonyl function (1680 – 1705 cm^{-1}), and aromatic groups (2920 – 2925 cm^{-1}). The ^1H and ^{13}C NMR data of compounds 1–11 are reported in Table 1, and key 2D NMR correlations of compounds 1, 6, and 11, representative of three different carbon skeletons, are presented Figure 3. The relative configurations of the stereogenic centers of 1–11 were deduced from NOESY analysis in combination with biosynthesis considerations and comparison with reported data. The relative configuration of compound 11 was assigned as *rel*-(1*R*, 2*R*, 3*R*, 4*S*, 5*S*, 7*S*, 8*R*, 9*S*), the same as in endiandric acids C,¹⁹ I and J,¹⁰ and K.¹⁴ The carbon skeleton of endiandric acid analogues 1–5 is the same as that of endiandric acid A,¹⁹ whereas the carbon skeleton of analogues 6–10 is similar to that of beilschmiedic acid A.¹¹ Thus, the relative configurations were assigned as *rel*-(1*S*, 3*S*, 6*R*, 7*R*, 10*R*, 11*S*, 12*S*, 13*S*) for the first case and *rel*-(1*S*, 3*S*, 4*R* or 4*S*, 7*R*, 10*R*, 11*S*, 12*S*, 13*S*) for the second case.

The HRESIMS spectrum of compound 1 showed an $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion at m/z 349.1793 (calcd 349.1804), which, in conjunction with the ^{13}C NMR spectroscopic data is consistent with a molecular formula of $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_3$, indicating 11 indices of hydrogen deficiency. The ^1H and ^{13}C NMR data of compound 1 were close to those of kingianic acid F and tsangibeilin B,^{5,18} indicating that 1 possessed the same carbon skeleton but with a slightly different side chain. Comparing the molecular formula of 1 with that of kingianic acid F suggested that 1 possessed one additional hydroxy and two additional methylene groups. Besides the characteristic tetracyclic moiety, analysis of COSY and HMBC correlations (Figure 3) indicated that a 4-substituted phenyl ring was connected to a three-carbon

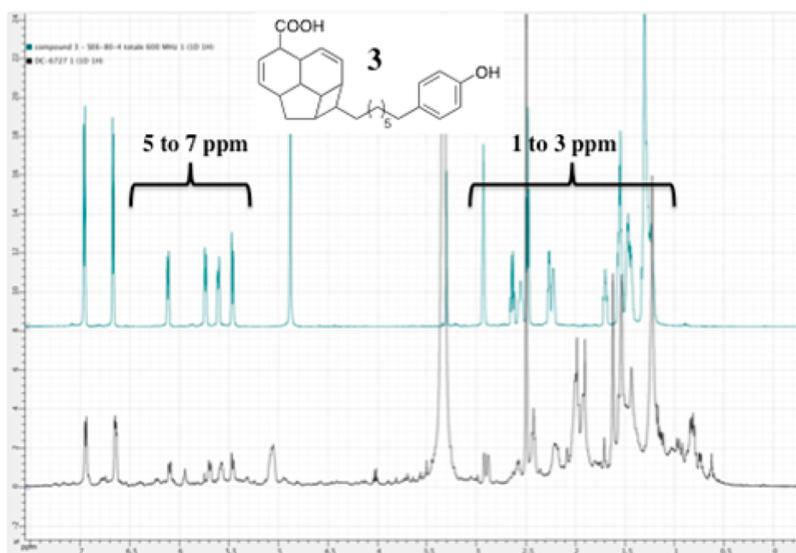


Figure 1. ^1H NMR spectra of compound 3 (top, 600 MHz in methanol- d_4) and crude EtOAc extract (bottom, 500 MHz in DMSO- d_6) of leaves + flowers of *B. ferruginea* (15 mg, 8 scans).

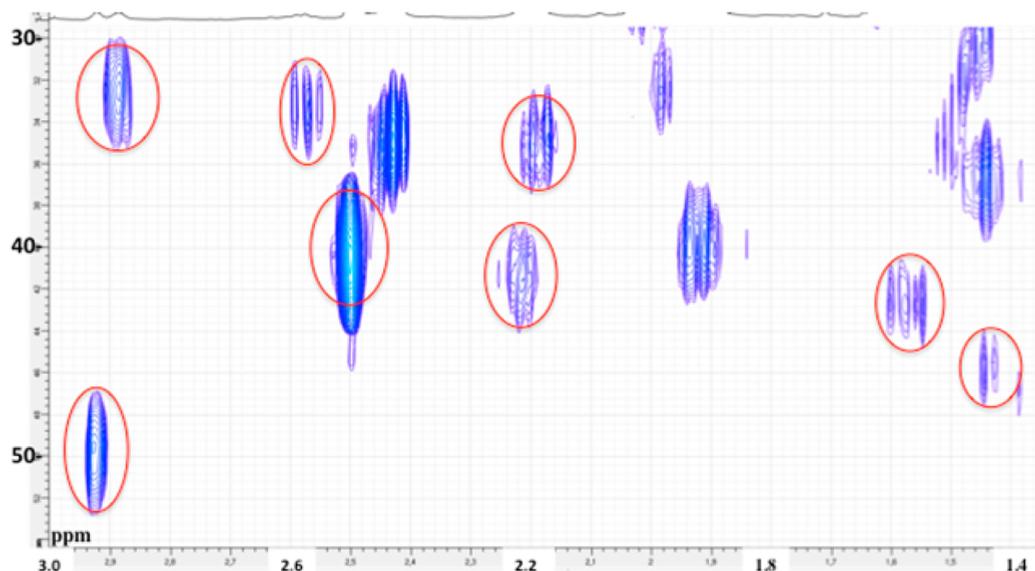


Figure 2. Expansion (1.40 to 3.00 and 30 to 54 ppm, proton and carbon chemical shifts, respectively) of the HSQC spectrum (500 MHz in DMSO- d_6 , 8 scans, 128 experiences, total time of 30 min) of the crude EtOAc extract of leaves + flowers of *B. ferruginea* (15 mg); HSQC correlations of endiandric acid methines are circled in red.

aliphatic side chain. Furthermore, HMBC correlations from H-5', H-6', H-8', and H-9' to C-7' at δ 156.4 suggested that a hydroxy group was attached at C-7'. Other 2D correlations are identical to those of kingianic acid F. The relative configuration of **1** was defined by the inspection of the NOESY spectrum (Figure 4) and biosynthesis considerations of tsangibeillin B as reference, whose X-ray crystallographic analysis has recently been reported in the study of Talontsi and co-workers.¹⁶ NOESY correlations between H-7/H-13/H-10/H-1/H-12/H-2 β suggested that H-1, H-2 β , H-7, H-10, H-12, and H-13 are β -oriented. In contrast, the α -orientation of H-3 and H-11 were deduced from correlations of H-3/H-2 α and H-3/H-11. Thus, compound **1**, which was named ferrugineic acid A, possessed the structure as shown.

Compounds **2** and **3** were assigned molecular formula of C₂₅H₃₀O₃ and C₂₇H₃₄O₃, respectively, on the basis of ¹³C NMR spectroscopic and HRESIMS data, indicating 11 indices of hydrogen deficiency. From these formula and their spectroscopic data closely comparable to those of compound **1**, it is apparent that compounds **2** and **3** had a structure similar to **1** but with a carbon aliphatic side chain including five and seven methylene groups, respectively, instead of the three methylenes for **1**. Compounds **2** and **3** were named ferrugineic acids B and C.

The HRESIMS spectrum of compound **4** showed an [M – H][–] ion at m/z 365.1748 (calcd 365.1753), which, in conjunction with the ¹³C NMR spectroscopic data is consistent with a molecular formula of C₂₃H₂₆O₄, indicating 11 indices of hydrogen deficiency, thus suggesting the presence of an additional hydroxy group when compared with compound **1**. Its 1D and 2D NMR spectroscopic data confirmed the presence of a 1,2,4-trisubstituted instead of a 1,4-disubstituted benzene ring for **1**. Compound **4** was named ferrugineic acid D.

Compound **5** was assigned the molecular formula of C₂₅H₂₈O₃ on the basis of ¹³C NMR spectroscopic and HRESIMS data, indicating 12 indices of hydrogen deficiency. The NMR spectroscopic data of compound **5** are similar to those of compound **2**, but with the presence of two olefinic protons at δ 5.41 (H-3') and δ 5.51 (H-4') in the ¹H NMR

spectrum, and resonances at δ 132.1 and 131.6 (C-3' and C-4', respectively) in the ¹³C NMR spectrum, compatible with a double bond in the chain. A coupling constant $J_{H3'-H4'}$ of 15.0 Hz was observed for the olefinic protons indicating an (*E*)-double bond. These data, together with COSY, NOESY, and HMBC analysis, confirmed the structure of compound **5**, named ferrugineic acid E.

The HRESIMS data of compounds **6** and **7** were identical and showed an [M – H][–] ion at m/z 365.1760 (calcd 365.1753), which, in conjunction with the ¹³C NMR spectroscopic data is consistent with a molecular formula of C₂₃H₂₆O₄, indicating 11 indices of hydrogen deficiency. Their spectroscopic data were similar to those of beilschmiedic acids C and A, respectively,¹¹ indicating that these compounds possess the same carbon skeleton but with an additional hydroxy group. Indeed, in the HMBC spectrum, key correlations between H-3/C-4 and H-4/C-5, C-6 confirmed the location of the double bond at C-5/C-6 instead of C-4/C-5 and the presence of a C-4 hydroxy group, compared to beilschmiedic acids C and A.¹¹ The α -orientation of OH-4 in compound **6** was suggested by NOESY correlations between H-4, H-13, H-7, H-10, H-12, H-1, and H-2 β , as depicted in Figure 4, similar to cryptobeilic acid B¹⁶ and beilschmiedic acid H,¹⁷ but due to overlapping of H-13 and H-2 resonances, the relative configuration of the C-4 stereocenter could not be confirmed at this stage. However, the analysis of the NMR data of compounds **6** and **7** permitted the deduction of their relative configuration by comparison with the NMR data reported for beilschmiedic acids C and A,¹¹ beilschmiedic acid H and I,¹⁷ and cryptobeilic acid B and A,¹⁶ respectively, that only differ by the relative configuration of the C-4 stereocenter. The chemical shifts of carbons C-4 at δ 74.4 and 66.0, C-5 at δ 144.0 and 141.1, C-13 at δ 42.5 and 36.2, and the ³J_{H4,H3} coupling constant values of 9.7 and 4.3 Hz observed for compounds **6** and **7**, respectively, suggested an α -orientation of the 4-OH group for **6**, and a β -orientation for **7**.^{11,16,17} Indeed, in the case of endiandric acids bearing a 4 α -hydroxy group, as in the case for beilschmiedic acid C, beilschmiedic acid H, and cryptobeilic acid B, the ¹H–¹H coupling constant between H-4 and H-5 is

Table 1. NMR Spectroscopic Data (Methanol- d_4) for Compounds 1–11

position	1 (75 and 300 MHz)		2 (125 and 500 MHz)		3 (150 and 600 MHz)		4 (125 and 500 MHz)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	42.7	2.27, m	42.8	2.27, m	42.7	2.27, m	42.8	2.27, m
2	36.1	1.31, td (12.1, 5.6) 1.58, dd (12.1, 5.6)	36.1	1.31, m 1.56, m	36.1	1.31, m 1.55, m	36.2	1.31, td (12.1, 5.6) 1.58, dd (12.1, 5.6)
3	38.3	2.57, m	38.4	2.57, m	38.3	2.56, m	38.4	2.57, m
4	134.6	6.14, dt (9.7, 2.2)	134.6	6.14, d (9.7)	134.2	6.14, d (9.7)	134.0	6.11, dt (9.7, 2.2)
5	126.5	5.73, dt (9.7, 3.0)	126.5	5.73, dt (9.7, 3.0)	127.0	5.73, dt (9.7, 3.0)	127.4	5.75, dt (9.7, 3.0)
6	51.1	2.94, m	51.2	2.94, m	51.7	2.94, m	52.2	2.91, m
7	34.2	2.93, m	34.2	2.93, m	34.2	2.94, m	34.4	2.94, m
8	131.4	5.46, brdd (10.2, 1.3)	131.4	5.46, d (9.8)	131.6	5.46, d (9.8)	131.8	5.47, d (9.8)
9	130.1	5.63, ddd (10.2, 4.1, 2.8)	130.1	5.61, dt (9.8, 3.1)	130.0	5.61, dt (9.8, 3.1)	129.9	5.62, dt (9.8, 3.1)
10	36.5	2.22, m	36.5	2.24, m	36.5	2.23, m	36.5	2.23, m
11	47.5	1.49, m	47.7	1.49, m	47.6	1.44, m	47.6	1.48, m
12	34.6	2.64, q (8.0)	34.6	2.64, q (8.0)	34.6	2.65, q (8.0)	34.6	2.64, q (8.0)
13	43.7	1.68, m	43.8	1.69, m	43.7	1.70, m	43.8	1.71, m
1'	38.0	1.51, m	38.5	1.49, m	38.6	1.47, m	38.0	1.51, m
2'	30.6	1.50, m	28.2	1.29, m	28.3	1.24, m	30.5	1.50, m
3'	36.2	2.49, t (7.5)	30.3	1.30, m	30.8	1.30, m	36.4	2.44, m
4'	134.6		33.1	1.56, m	30.4	1.30, m	135.7	
5'	130.4	6.96, d (8.5)	36.1	2.49, t (7.5)	30.9	1.30, m	116.6	6.47, dd (8.0, 1.8)
6'	116.7	6.68, d (8.5)	135.0		33.3	1.54, m	145.8	6.66, d (8.0)
7'	156.4		130.4	6.97, d (8.3)	36.2	2.49, t (7.5)	144.3	
8'	116.7	6.68, d (8.5)	116.1	6.68, d (8.3)	134.9		116.4	
9'	130.4	6.96, d (8.5)	156.4		130.4	6.97, d (8.3)	120.8	6.60, d (1.8)
10'			116.1	6.68, d (8.3)	116.1	6.68, d (8.3)		
11'			130.4	6.97, d (8.3)	156.4			
12'					116.1	6.68, d (8.3)		
13'					130.4	6.97, d (8.3)		
CO	178.4		178.5		179.2		180.0	
position	5 (125 and 500 MHz)		6 (125 and 500 MHz)		7 (125 and 500 MHz)		8 (125 and 500 MHz)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	42.6	2.29, m	42.7	2.33, m	42.1	2.31, m	41.7	2.33, m
2	34.0	1.30, m 1.54, m	36.5	1.30, td (12.0, 5.8) 1.82, dd (12.0, 5.8)	33.06	1.39, dd (12.2, 5.3) 1.63, ddd (12.2, 6.0)	31.3	1.53, m 1.64, dd (12.7, 5.4) 3.07, ddd (12.7, 5.7)
3	38.4	2.54, m	45.3	2.09, m	43.4	2.08, m	50.3	
4	134.3	6.11, dt (9.7, 2.2)	74.4	4.12, d (9.7)	66.0	4.29, brt (4.3)	204.9	
5	127.0	5.74 (9.7, 2.9)	144.0	6.82, s	141.1	7.0, d (4.9)	132.3	6.55, s
6	51.8	2.94, m	138.3	ND	138.9	ND	ND	
7	34.3	2.93, m	34.9	3.20, brs	35.2	3.21, brs	36.8	3.53, s
8	131.6	5.46, brd (10.2)	128.4	5.57, brs	126.1	5.45, d (10.2)	123.4	5.57, d (10.0)
9	129.9	5.62, ddd (10.2, 4.0, 2.4)	128.5	5.58, brs	129.3	5.62, dt (10.2, 3.4)	131.0	5.81, dt (10.0, 3.1)
10	36.4	2.25, m	35.9	2.26, m	35.8	2.26, m	35.8	2.36, m
11	46.8	1.52, m	47.5	1.50, m	47.9	1.41, m	48.1	1.44, m
12	34.6	2.65, q (8.0)	35.3	2.76, q (8.0)	34.3	2.73, q (8.0)	35.3	2.82, q (8.0)
13	43.8	1.69, m	42.5	1.83, m	36.2	2.01, m	45.4	2.30, m
1'	38.4	1.58, m	38.0	1.50, m	38.0	1.51, m	37.9	1.53, m
2'	31.3	2.00, dd (13.5, 6.6)	30.6	1.50, m	30.7	1.51, m	30.5	1.53, m
3'	132.1	5.41, dd (15.0, 6.6)	36.2	2.50, brt	36.2	2.50, brt	36.2	2.50, m
4'	131.6	5.51, dd (15.0, 6.6)	134.9		134.9		134.8	
5'	39.3	3.19, d (6.6)	130.4	6.97, d (8.5)	130.4	6.97, d (8.3)	130.4	6.97, d (8.3)
6'	133.2		116.2	6.68, d (8.5)	116.2	6.68, d (8.3)	116.2	6.68, d (8.3)
7'	130.5	6.95, d (8.5)	156.4		156.5		156.5	
8'	116.2	6.67, d (8.5)	116.7	6.68, d (8.5)	116.2	6.68, d (8.3)	116.2	6.68, d (8.3)
9'	156.6		130.4	6.97, d (8.5)	130.4	6.97, d (8.3)	130.4	6.97, d (8.3)
10'	116.2	6.67, d (8.5)						
11'	130.5	6.95, d (8.5)						
CO	179.2		172.1		171.3		172.2	

Table 1. continued

position	9 (125 and 500 MHz)		10 (125 and 500 MHz)		11 (75 and 300 MHz)	
	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	42.8	2.33, m	42.1	2.31, m	43.8	2.67, brdd (10.0, 4.7)
2	36.5	1.29, td (12.0, 5.8) 1.81, dd (12.0, 5.8)	33.1	1.37, dd (12.1, 5.3) 1.62, ddd (12.1, 6.0)	41.7	2.35, brdt (8.5, 5.5)
3	45.3	2.09, m	43.4	2.06, m	41.5	1.58, m
4	74.4	4.12, d (9.7)	66.0	4.29, brt	40.3	1.81, brt
5	144.4	6.84, s	139.9	6.98, d (4.5) ^a	41.6	2.23, brt
6	ND		ND		39.9	1.60, 1.90 m
7	34.8	3.20, brs	35.3	3.24, brs	43.3	1.86, m
8	128.2	5.55, brs	126.2	5.45, d (10.2)	48.5	2.79, brdd (8.1, 2.8)
9	128.6	5.57, brs	129.2	5.59, dt (10.2, 3.4)	39.1	2.52, m
10	35.9	2.26, m	35.8	2.26, m	133.9	6.19, m
11	47.3	1.45, m	47.9	1.37, m	131.7	6.22, m
12	35.3	2.77, q, (8.0)	34.3	2.73, q (8.0)		
13	42.5	1.83, m	36.2	2.01, m		
1'	38.5	1.49, m	38.5	1.49, m	37.4	1.55, m
2'	28.2	1.29	28.2	1.29	30.7	1.55, m
3'	30.4	1.29	30.3	1.29	36.3	2.52, m
4'	33.1	1.57	33.0	1.56	135.0	
5'	36.2	2.50, t (7.4)	36.1	2.50, t (7.4)	130.4	6.98, d (8.5)
6'	135.0		135.0		116.2	6.68, d (8.5)
7'	130.4	6.97, d (8.1)	130.4	6.97, d (8.1)	156.4	
8'	116.2	6.68, d (8.1)	116.1	6.67, d (8.1)	116.2	6.68, d (8.5)
9'	ND		156.4		130.4	6.98, d (8.5)
10'	116.7	6.68, d (8.1)	116.1	6.67, d (8.1)		
11'	130.4	6.97, d (8.1)	130.4	6.97, d (8.1)		
1''					156.0	6.74, dd (15.7, 8.1)
2''					120.9	5.66, d (15.7)
CO	ND		ND		170.9	

^aoverlap. ND: not detected.

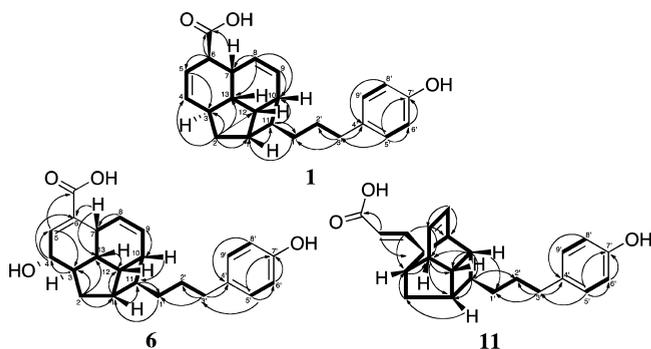


Figure 3. Key ^1H - ^{13}C correlations of compounds **1**, **6**, and **11**.

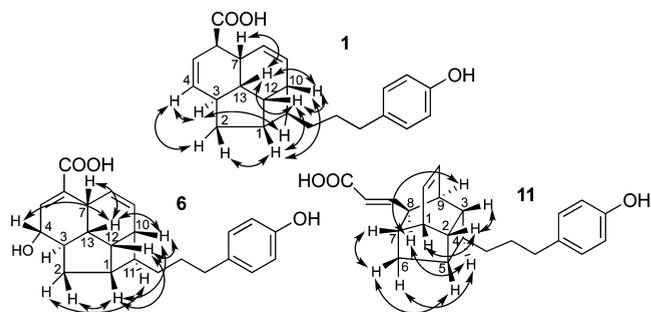


Figure 4. Key NOESY correlations of compounds **1**, **6**, and **11**.

approximately 9.5 Hz, and the chemical shifts of carbons C-4, C-5, and C-13 are 71.5–74.5, 145.1–145–8, and 34.7–42.0 ppm, respectively, whereas in the case of beilschmiedic acid A, beilschmiedic acid I, and cryptobeilic acid A bearing a 4β -hydroxy group, the H-4/H-5 vicinal coupling constant is approximately 4.0 Hz, and the chemical shifts of carbons C-4, C-5, and C-13 are shielded (64.1–65.9, 141.5–142.0, and 34.6–36.1, respectively). Other 1D and 2D NMR spectroscopic data indicated that compounds **6** and **7** had the same C-11 side chain as compound **1**. Compounds **6** and **7** were named ferrugineic acids F and G.

Compound **8** was assigned the molecular formula of $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_4$ on the basis of ^{13}C NMR spectroscopic and HRESIMS data, indicating 12 indices of hydrogen deficiency. The ^1H and ^{13}C NMR data were comparable to those of cryptobeilic acid C,¹⁶ indicating it had the same tetracyclic carbon skeleton but a slightly different side chain. When compared with the NMR data of compounds **6** and **7**, the presence of a C-4 carbonyl group instead of oxymethine groups in **6** and **7**, was confirmed by HMBC correlation from H-3 (δ_H 3.07) to C-4 (δ_C 204.9). Other 1D and 2D NMR spectroscopic data of compound **8**, named ferrugineic acid H, were identical to those of **6** and **7**, indicating that the same side chain is attached at C-11.

Compounds **9** and **10** were assigned molecular formula of $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_4$ on the basis of ^{13}C NMR spectroscopic and HRESIMS data, indicating 11 indices of hydrogen deficiency. From this formula and their spectroscopic data closely comparable to those of compounds **6** and **7**, we deduced that

compounds **9** and **10** possessed a structure similar to **6** and **7** but with an aliphatic side chain including five methylene groups, instead of three for compounds **6** and **7**. As for compounds **6** and **7**, the relative configurations of compounds **9** and **10** were deduced from comparison of the NMR data reported of beilschmiedic acids C and A,¹¹ beilschmiedic acid H and I,¹⁷ and cryptobeilic acid B and A,¹⁶ respectively. The chemical shifts of C-4 at δ 74.4 and 66.0, C-5 at δ 144.4 and 139.9, C-13 at δ 42.5 and 36.2, and the $^3J_{\text{H-4,H-3}}$ coupling constant values of 9.7 and 4.5 Hz observed for compounds **9** and **10**, respectively, suggested an α -orientation of the OH group at C-4 for **9**, and a β -orientation for **10**. Compounds **9** and **10** were named ferrugineic acids I and J.

The HRESIMS spectrum of ferrugineic acid K (**11**) showed an $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion at m/z 349.1786 (calcd for 349.1804), which, in conjunction with the ^{13}C NMR spectroscopic data is consistent with a molecular formula of $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{O}_3$, indicating 11 indices of hydrogen deficiency. Its 1D and 2D NMR spectroscopic data were similar to those of endiandric acid M,¹⁸ with an acrylic acid moiety attached at C-8. In the ^1H – ^1H COSY and HMBC spectra, the correlations depicted in Figure 3 confirmed the planar structure **11** as shown. The relative configuration of **11** was deduced from NOESY analysis (Figure 4). Based on the NOESY spectrum, the α -orientation of H-9 was deduced from correlations between H-8 and, H-4 and H-9. The correlations between H-3/H-2, H-2/H-1, H-5/H-6 β , and H-6 β /H-7 suggested these protons were all β -oriented (Figure 4). Thus, the relative configuration was assigned as *rel*-(1*RS*, 2*RS*, 3*RS*, 4*SR*, 5*SR*, 7*SR*, 8*RS*, 9*SR*), the same as that of kingianic acids A–E.⁵

Compounds **6**–**10** could be artifacts formed by autoxidation of compounds **1** and **2** during isolation and/or storage steps as it was reported for phorbol esters.²⁰ Indeed, compounds **1** and **2**, when stored at 25 °C in diffuse daylight for 1 month were converted preferentially into their 4-hydroxy analogues, **6** + **7** and **8** + **9**, respectively. Over a longer period of 3 to 6 months, at 4 °C in the dark, the same conversion was observed. In contrast, solutions of compounds **1**–**5** in DMSO, stored at 4 °C in the dark, did not show an appreciable degree of autoxidation products after approximately 6 months. All attempts of purification of the enantiomers using chiral columns were unsuccessful.

Binding affinities of compounds **1**–**7** and **9**–**11** to antiapoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1 were screened using a published fluorescence polarization assay.²¹ Binding was measured by fluorescence polarization after competition between the ligand and a fluorescein-labeled peptide [the BH3 domain of BAD protein (F-Bad) or BID protein (F-Bid) to Bcl-xL and Mcl-1, respectively].

Results are given as the percentage of binding at 100 μM , and for compounds having showed a significant binding activity (>50% inhibition for Bcl-xL/Bak and Mcl-1/Bid) by the K_i value, the concentration corresponding to 50% of the binding of the labeled reference compound, and corrected for experimental condition according to Cheng and Prusoff (Table 2).²² The biological data were compared with the results obtained for kingianic acids,⁵ separated into three groups according to their tetracyclic carbon skeletons. In the first group characterized by a tetracyclic ring system formed with 11 carbon atoms (kingianic acids A–E,⁵ endiandric acid M,⁵ and ferrugineic acid K, **11**), only kingianic acid C showed a weak binding affinity for Mcl-1, and no compound showed binding affinity for Bcl-xL. In contrast, in the second group

Table 2. Biological Activity of Compounds 1–7 and 9–11

compound	Bcl-xL/Bak binding affinity		Mcl-1/Bid binding affinity	
	% at 100 μM	K_i μM	% at 100 μM	K_i μM
1	22 \pm 2	>100	0	ND
2	60 \pm 6	19.2 \pm 1.6	85 \pm 2	14.0 \pm 3.3
3	93 \pm 3	12.6 \pm 0.2	82 \pm 2	13.0 \pm 5.0
4	39 \pm 3	>100	82 \pm 2	5.2 \pm 0.2
5	20 \pm 1	ND	14 \pm 3	ND
6	7 \pm 1	ND	0	ND
7	17 \pm 1	ND	3 \pm 1	ND
9	35 \pm 1	ND	7 \pm 2	ND
10	58 \pm 7	19.4 \pm 3.0	81 \pm 3	5.9 \pm 0.5
11	22 \pm 3	>100	0	ND
U-Bak		0.012 \pm 0.001		
U-Bid				0.016 \pm 0.002
ABT-737		<0.001		20.8 \pm 2.9

ND: not determined. U-Bak and U-Bid correspond to unlabeled peptides Bak and Bid, respectively.

characterized by a 13 carbon atoms fused ring system with $\Delta^{4,5}$ and $\Delta^{8,9}$ double bonds (kingianic acid F,⁵ tsangibeilin B,⁵ and ferrugineic acids A–E, **1**–**5**), ferrugineic acids B and C (**2** and **3**) exhibited significant binding affinities for both antiapoptotic proteins, and ferrugineic acid D (**4**) showed only a strong inhibiting activity for Mcl-1. Considering the weak binding affinity for Mcl-1 of kingianic acid F,⁵ tsangibeilin B,⁵ and ferrugineic acids A and E (**1** and **5**), it could be postulated that the length of the saturated carbon side chain (preferentially five or seven CH_2 groups) associated with a terminal 4-hydroxyphenyl ring, play a crucial role for Bcl-xL and Mcl-1 binding affinities. In the third group characterized by the same tetracyclic ring system than the previous one but with $\Delta^{5,6}$ and $\Delta^{8,9}$ double bonds (kingianic acid G,⁵ ferrugineic acids F, G, I, and J, **6**, **7**, **9** and **10**), only ferrugineic acid J (**10**) showed a significant binding affinity for both proteins, indicating that the β -oriented C-4 hydroxy group (cf. **10** versus **9**) and the length of the saturated carbon side chain (preferentially five CH_2 groups, cf. **10** versus **7**) are essential for a strong activity.

Compounds **1**–**11** were tested for cytotoxic activity against HCT-116 (human colorectal carcinoma) and K562 (human leukemia) cancer cell lines using a resazurin-based fluorimetric assay. All compounds were devoid of cytotoxicity on the two cancer cell lines tested at concentrations up to 50 μM .

In conclusion, a rapid ^1H and HSQC NMR screening of various *Beilschmiedia* and *Endiandra* EtOAc extracts was used to select the Vietnamese species *B. ferruginea* for further chemical and biological investigation. The chemical study led to the discovery of 11 new endiandric acids (**1**–**11**), belonging to three different structural types. Of this chemical series, ferrugineic acids B, C, and J (**2**, **3**, and **10**) exhibited strong inhibiting activities of the antiapoptotic proteins Bcl-xL and Mcl-1.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured at 25 °C on a JASCO P1010 polarimeter. UV spectra were recorded on a PerkinElmer Lambda 5 spectrophotometer. IR spectra were performed on a Nicolet FT-IR 20S spectrometer. NMR spectra were recorded in methanol- d_4 on a Bruker 600 MHz instrument (Avance 600) using a 1.7 mm microprobe for compound **3**, on a Bruker 500 MHz instrument (Avance 500) for plant extracts,

fractions, and compounds **2**, **4**–**10**, and on a Bruker 300 MHz instrument (Avance 300) for compounds **1** and **11**. Chemical shifts (relative to TMS) are in ppm, and coupling constants are in Hz. HRESIMS data were acquired on a Thermoquest TLM LCQ Deca ion-trap. Kromasil analytical and preparative C₁₈ columns (250 × 4.6 mm and 250 × 21.2 mm ID; 5 μm Thermo) were used for HPLC separations using a Waters autopurification system equipped with a sample manager (Waters 2767), a column fluidics organizer, a binary pump (Waters 2525), a UV–vis diode array detector (190–600 nm, Waters 2996), and a PL-ELS 1000 ELSD Polymer Laboratory detector. All solvents and silica gel 60 (6–35 μm) were purchased from SDS (France), and analytical plates (Si gel 60 F254) were from Merck (France).

Plant Material. The leaves and flowers of *B. ferruginea* were collected in May 2005 at A Luoi, Thua Thien Hue Province, Vietnam, and authenticated by Dr. Nguyen Quoc Binh. A voucher specimen (VN-1515) has been deposited at the Herbarium of Institute of Ecology and Biological Resources of the Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam.

Extraction and Isolation. The dried leaves and flowers (100 g) of *B. ferruginea* were extracted with EtOAc (3 × 300 mL) to yield a crude extract (3.0 g) after concentration in vacuo at 40 °C. This extract was subjected to silica gel column chromatography using a gradient of *n*-heptane-CH₂Cl₂-MeOH (1:0:0 to 0:9:1) of increasing polarity to afford 18 fractions F1–F18, according to their TLC profiles. Purification of fraction F16 (266 mg) by preparative HPLC (C₁₈ column, Kromasil, 250 × 21.2 mm, 5 μm, MeCN-H₂O 70:30 + 0.1% formic acid at 21 mL/min) afforded compounds **1** (43.1 mg), **2** (15.0 mg), **3** (17.7 mg), and **5** (3.2 mg) (*t*_R: 7.6, 15.6, 24.8, and 12.4 min, respectively). Purification of fraction F15 (140 mg) under the same conditions afforded additional batches of compounds **1** (5.1 mg), **2** (1 mg), and **3** (5.1 mg). Fraction F17 (100 mg) was subjected to preparative HPLC (C₁₈ column, Kromasil, 250 × 21.2 mm, 5 μm, MeCN-H₂O 60:40 + 0.1% formic acid at 21 mL/min) to yield compound **11** (10.0 mg) (*t*_R: 16.0 min). Purification of fraction F18 (200 mg) by preparative HPLC (C₁₈ column, Kromasil, 250 × 21.2 mm, 5 μm, MeCN-H₂O 50:50 + 0.1% formic acid at 21 mL/min) afforded compounds **4** (2.8 mg), **6** (4.8 mg), **7** (4.3 mg), **8** (0.9 mg), **9** (1.9 mg), and **10** (2.1 mg) (*t*_R: 17.6, 9.5, 8.7, 15.5, 22.2, and 20.7 min, respectively).

Ferruginic acid A (1). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.32), 280 (2.60) nm; IR ν_{\max} 3312, 2923, 1704, 1513, 1247 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₃H₂₅O₃, 349.1804; found, 349.1793.

Ferruginic acid B (2). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.36), 280 (2.63) nm; IR ν_{\max} 3300, 2924, 1703, 1514, 1247 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₅H₂₉O₃, 377.2117; found, 377.2103.

Ferruginic acid C (3). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.39), 280 (2.67) nm; IR ν_{\max} 3312, 2923, 1704, 1514, 1247 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₇H₃₃O₃, 405.2430; found, 405.2416.

Ferruginic acid D (4). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.34), 283 (2.78) nm; IR ν_{\max} 3326, 2923, 1705, 1515, 1382, 1242 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₃H₂₅O₄, 365.1753; found, 365.1748.

Ferruginic acid E (5). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.35), 279 (2.63) nm; IR ν_{\max} 3330, 2924, 1701, 1514, 1237 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₅H₂₇O₃, 375.1960; found, 375.1938.

Ferruginic acid F (6). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 223 (3.41), 278 (2.64) nm; IR ν_{\max} 3310, 2920, 1684, 1512, 1232 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₃H₂₅O₄, 365.1753; found, 365.1760.

Ferruginic acid G (7). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.56), 278 (2.56) nm; IR ν_{\max} 3312, 2923, 1694, 1513, 1247 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₃H₂₅O₄, 365.1753; found, 365.1758.

Ferruginic acid H (8). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 224 (3.51), 277 (2.78) nm; IR ν_{\max} 3358, 2925, 1680, 1575, 1515, 1372, 1236 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₃H₂₃O₄, 363.1596; found, 363.1596.

Ferruginic acid I (9). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 223 (3.56), 278 (2.80) nm; IR ν_{\max} 3312, 2921, 1693, 1514, 1237 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₅H₂₉O₄, 393.2066; found, 393.2061.

Ferruginic acid J (10). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 221 (3.59), 280 (2.82) nm; IR ν_{\max} 3313, 2924, 1689, 1514, 1236 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₅H₂₉O₄, 393.2066; found, 393.2060.

Ferruginic acid K (11). Colorless oil, $[\alpha]_D^{25} \pm 0$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 223 (3.54), 278 (2.77) nm; IR ν_{\max} 3310, 2924, 1688, 1514, 1225 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR: Table 1; HRESIMS *m/z*: [M – H]⁻ calcd for C₂₃H₂₃O₃, 349.1804; found, 349.1786.

Bcl-xL and Mcl-1 Binding Affinity Assays. The binding affinities of compounds for Bcl-xL and Mcl-1 were evaluated by competition against fluorescently labeled reference compounds, Bak and Bid, respectively, as described by Qian and co-workers.²¹ Bcl-xL and Mcl-1 proteins have been produced by N. Birlirakis at ICSN. Bak, 5-carboxyfluorescein-Bak, Bid, and 5-carboxyfluorescein-Bid peptides were synthesized by PolyPeptide Laboratories, Strasbourg, France. All sequences are available in the Supporting Information (S23). Unlabeled peptides were dissolved in DMSO (Carlo Erba, Val de Reuil, France) and labeled peptides were diluted in assay buffer, which contained 20 mM Na₂HPO₄ (pH 7.4), 50 mM NaCl, 2 μM EDTA, 0.05% Pluronic F-68, without pluronic acid for storage at –20 °C. A liquid handling instrument, BiomekNX and Biomek3000 (Beckman Coulter, Villepinte, France), were used to add His-protein and fluorescein-labeled peptides. Fifteen nanomolar labeled BH3 peptide, 100 nM His-protein, and 100 μM of unlabeled BH3 peptide or compound (first diluted in 10 mM DMSO and then buffer for final concentrations from 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M) into a final volume of 40 μL were distributed in a 96-well black polystyrene flat-bottomed microplate (VWR 734-1622). The microplate was incubated at room temperature for 1 h and shaken before fluorescent polarization measurement. Fluorescence polarization in millipolarization units was measured with a Beckman Coulter Paradigm using FP cartridge (λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 535 nm). The exposure time was 300 ms per channel. All data were collected using Biomek Software and analyzed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA). Results are expressed as binding activity, that is, percentage of inhibition of the binding of labeled reference compound, or as K_i, the concentration corresponding to 50% of such inhibition, and corrected for experimental conditions according to the Kenakin rearranged equation,²³ which is adapted from the Cheng and Prusoff equation.²² Unlabeled peptides Bak and Bid were used as positives control, with K_i of 12 ± 1 nM and 16 ± 2 nM, respectively. The performance of the assays was monitored by use of Z' factors as described by Zhang and co-workers.²⁴ The Z' factors for these assays are 0.8 (Bcl-xL/Bak) and 0.7 (Mcl-1/Bid) indicating that they should be robust assays.

Cell Culture and Proliferation Assay. Cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.) and were cultured according to the supplier's instructions. Human HCT-116 colorectal carcinoma cells and K-562 leukemia cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% glutamine. Cell lines were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell viability was assessed using Promega CellTiter-Blue reagent (Promega, Madison, WI, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were seeded in 96-well plates (2.5 × 10³ cells/well) containing 50 μL of growth medium. After 24 h of culture, the cells were supplemented with 50 μL of medium containing different concentrations (0.05 μM to 50 μM final concentration) of the tested compound dissolved in DMSO (0.1% and 0.25% in the preparations). After 72 h of incubation, 20 μL of resazurin was added for 1.5 h before recording fluorescence (λ_{ex} = 560 nm, λ_{em} = 590 nm) using a microtiter plate fluorometer. The IC₅₀ corresponds to the concen-

tration of compound that induced a 50% decrease in fluorescence of drug-treated cells compared with untreated cells. Vinorelbine was used as a positive control ($IC_{50} = 0.015$ and $0.006 \mu\text{M}$ on HCT-116 and K-562, respectively).

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

NMR spectra for compounds **1–11** and peptide sequences. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: marc.litaudon@cnrs.fr. Fax: +33169077247. Tel.: +33169823085.

Author Contributions

§C.A. and C.G. contributed equally to this work

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean-François Gallard (ICSN-CNRS) for his help and advice in NMR studies. We are grateful to Concepcion Garcia, who performed the cytotoxic assays on two cancer cell lines. We thank the Agence National de la Recherche (ANR), contract no. ANR-2010-JCJC-702-1 and ICSN, CNRS (France) for financial support. This work was carried out within the framework of an International Associated Laboratory (LIA) between the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France) and the Vietnam Academy of Science and Technology (VAST, Vietnam).

■ REFERENCES

- (1) Davids, M. S.; Letai, A. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3127–3135.
- (2) Lessene, G.; Czabotar, P. E.; Colman, P. M. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 989–1000.
- (3) Jeng, P. S.; Cheng, E. H. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 351–352.
- (4) Placzek, W. J.; Wei, J.; Kitada, S.; Zhai, D.; Reed, J. C.; Pellicchia, M. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e40.
- (5) Azmi, M. N.; Gény, C.; Leverrier, A.; Litaudon, M.; Dumontet, V.; Birlirakis, N.; Guéritte, F.; Leong, K. H.; Halim, S.; Mohamad, K.; Awang, K. *Molecules* **2014**, *19*, 1732–1747.
- (6) The Plant List, version 1. <http://www.theplantlist.org> (accessed 2010).
- (7) Banfield, J. E.; Black, D. S. C.; Collins, D. J.; Hyland, B. P. M.; Lee, J. J.; Pranowo, S. R. *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 587–607.
- (8) Eder, C.; Haag-Richter, S.; Kogler, H. Endiandric acid H and its derivatives, procedures for its production and use of the same in the treatment of asthma. Patent No. DE10235624A1, February 19, 2004.
- (9) Yang, P.-S.; Cheng, M.-J.; Peng, C.-F.; Chen, J.-J.; Chen, I.-S. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 53–58.
- (10) Yang, P.-S.; Cheng, M.-J.; Chen, J.-J.; Chen, I.-S. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 2130–2138.
- (11) Chouna, J. R.; Nkeng-Efouet, P. A.; Lenta, B. N.; Devkota, K. P.; Neumann, B.; Stammler, H.-G.; Kimbu, S. F.; Sewald, N. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 684–688.
- (12) Chouna, J. R.; Nkeng-Efouet, P. A.; Lenta, B. N.; Wansi, J. D.; Kimbu, S. F.; Sewald, N. *Phytochem. Lett.* **2010**, *3*, 13–16.
- (13) Chouna, J. R.; Alango, N.-E. P.; Ndjakou, L. B.; Duplex, W. J.; Neumann, B.; Stammler, H.-G.; Fon, K. S.; Sewald, N. *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 1071–1076.
- (14) Huang, Y.-T.; Chang, H.-S.; Wang, G.-J.; Cheng, M.-J.; Chen, C.-H.; Yang, Y.-J.; Chen, I.-S. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1875–1880.
- (15) Huang, Y.-T.; Chang, H.-S.; Wang, G.-J.; Lin, C.-H.; Chen, I.-S. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 16430–16443.

- (16) Talontsi, F. M.; Lamshöft, M.; Bauer, J. O.; Razakarivony, A. A.; Andriamihaja, B.; Strohmann, C.; Spiteller, M. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 97–102.
- (17) Williams, R. B.; Martin, S. M.; Hu, J.-F.; Norman, V. L.; Goering, M. G.; Loss, S.; O’Neil-Johnson, M.; Eldridge, G. R.; Starks, C. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1319–1325.
- (18) Huang, Y.-T.; Chang, H.-S.; Wang, G.-J.; Cheng, M.-J.; Chen, C.-H.; Yang, Y.-J.; Chen, I.-S. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1875–1880.
- (19) Bandaranayake, W.; Banfield, J.; Black, D.; Fallon, G.; Gatehouse, B. *Aust. J. Chem.* **1982**, *35*, 567–579.
- (20) Schmidt, R.; Hecker, E. *Cancer Res.* **1975**, *35*, 1375–1377.
- (21) Qian, J.; Voorbach, M. J.; Huth, J. R.; Coen, M. L.; Zhang, H.; Ng, S. C.; Comess, K. M.; Petros, A. M.; Rosenberg, S. H.; Warrior, U.; Burns, D. J. *Anal. Biochem.* **2004**, *328*, 131–138.
- (22) Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- (23) Nikolovska-Coleska, Z.; Wang, R.; Fang, X.; Pan, H.; Tomita, Y.; Li, P.; Roller, P. P.; Krajewski, K.; Saito, N. G.; Stuckey, J. A.; Wang, S. *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
- (24) Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67–73.

Résumé

Dans le but de rechercher des inhibiteurs naturels des protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Mcl-1, deux essais biologiques ont été mis au point sur Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF. Ces deux tests utilisent la polarisation de fluorescence et sont basés sur la liaison d'un peptide pro-apoptotique marqué à la fluorescéine (Bak-CF ou Bid-CF) avec une protéine anti-apoptotique (Bcl-xL ou Mcl-1). Au total, près de 600 extraits de plantes, provenant de diverses régions du monde, ont été criblés sur les deux protéines Bcl-xL et Mcl-1 permettant de sélectionner les extraits acétate d'éthyle des écorces de *Knema hookeriana* (Myristicaceae) et de *Fissistigma latifolium* var. *ovoideum* (Annonaceae). L'analyse chimique des constituants des écorces de *K. hookeriana* a conduit à l'isolement de 12 lipides phénoliques dont 6 n'avaient jamais été isolés d'un organisme vivant. Seuls les acides anacardiques ont révélé de très fortes inhibitions de l'interaction Bcl-xL/Bak-CF et Mcl-1/Bid-CF dans les essais par polarisation de fluorescence. Une étude plus approfondie des interactions entre le plus actif des produits et les protéines (Bcl-xL, Mcl-1, Bak et Bid) par RMN, a montré que la modulation des interactions Bcl-xL/Bak et Mcl-1/Bid n'est pas liée à l'affinité de l'acide anacardique pour les protéines Bcl-xL et Mcl-1 mais à une forte affinité pour les peptides Bid et Bak. Le fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt des écorces de *F. latifolium* a conduit à l'isolement d'une nouvelle chalcone prénylée, la (\pm)-écarlottone possédant une *dual* activité sur les protéines, Bcl-xL et Mcl-1. Par la suite, le fractionnement "RMN-guidé" a mené à l'isolement de 6 analogues.

Mots-clés

Cancer, apoptose, Bcl-xL, Mcl-1, *dual* inhibiteur, polarisation de fluorescence, *Knema hookeriana*, lipides phénoliques, *Fissistigma latifolium*, chalcone prénylée, adduits de Diels-Alder.

Laboratoire de rattachement

Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS)
1, avenue de la Terrasse
91190 Gif sur Yvette
France

POLE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Université Paris Sud 11
UFR, Faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry