



Université
de Limoges

FACULTÉ
DE PHARMACIE

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

2013

THÈSE N° 0000 ³³³⁶

Influence de métabolites de *Meiogyne cylindrocarpa* dans la régulation de l'apoptose

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement
le 25 septembre 2013

par

Marie MARTIN de LASSALLE
née le 25 mars 1989 à Limoges (Haute-Vienne)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur BENEYTOU Jean-Louis Président
M^{me} le Professeur MAMBU Lengo Angèle Directrice
M^{me} le Maître de Conférences MILLOT Marion Juge
M. le Docteur et Ingénieur de Recherche DUMONTET Vincent Juge

DOYEN DE LA FACULTE
M. le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1^{er} VICE-DOYEN
M^{me} Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2^e VICE-DOYEN
M. Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert (jusqu'au 8 oct.2012)	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique (jusqu'au 28 févr./2013)	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
DESMOULIÈRE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIÈNE, HYDROLOGIE, ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE

DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Élise	PHARMACOLOGIE
FAGNÈRE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LÉGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

PROFESSEUR

ROUMIEUX Gwenhaël	ANGLAIS
--------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

IMBERT Laurent	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
-----------------------	-----------------------------------

Remerciements

Mes remerciements vont à toutes les personnes qui m'ont encouragée et soutenue, tout au long de mes études, en particulier au cours de la préparation de cette thèse d'exercice.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury :

M. le Professeur BENEYTOU, qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury, qu'il soit assuré de ma respectueuse reconnaissance ;

M^{me} le Professeur MAMBU, directrice de ma thèse, pour l'intérêt qu'elle a bien voulu accorder à ce travail. J'ai toujours été accueillie avec bienveillance ; qu'elle veuille trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude ;

M^{me} MILLOT, qui a su m'initier à la phytochimie ; qu'elle trouve ici l'expression de mes remerciements et de ma très grande reconnaissance ;

M. DUMONTET, qui a encadré et guidé mes travaux à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles et qui a bien voulu se déplacer depuis Gif-sur-Yvette pour faire partie du jury de ma thèse ; je l'en remercie très respectueusement.

Je tiens à exprimer ma gratitude à M^{me} Françoise GUERITTE, directrice de recherche, qui m'a permis d'accomplir un stage dans son équipe, à l'ICSN, M. Marc LITAUDON, ingénieur de recherche, et toute l'équipe du pôle Substances Naturelles-Plantes qui m'ont accueillie avec gentillesse et convivialité dans le laboratoire, ainsi que le personnel du service HPLC, du service RMN, du service de Spectrométrie de masse.

Je n'oublie pas les enseignants qui ont su me transmettre leur savoir et leur passion, particulièrement MM. les Professeurs CHULIA et CARDOT. Qu'ils soient assurés de ma vive reconnaissance et de mon respectueux attachement.

Qu'il me soit enfin permis d'évoquer mes parents, ma famille, mes amis : votre amour et votre confiance m'honorent et ont été une aide précieuse dans tous les instants de ma vie. Je ne saurais jamais vous exprimer pleinement ma gratitude.

Droits d'auteurs

Droits d'auteur réservés.

Toute reproduction
sans accord exprès de l'auteur
à des fins autres que strictement personnelles
est prohibée.

Plan

Table des sigles et abréviations

Introduction

1. Études bibliographiques

1.1. Cancer et apoptose

1.1.1. Cancer

1.1.2. Pathogenèse des cancers

1.1.3. Apoptose

1.1.4. Régulation de l'apoptose

1.1.4.1. Famille des caspases : signalisation et exécution de l'apoptose

1.1.4.2. Voie extrinsèque

1.1.4.3. Voie intrinsèque de l'apoptose : voie mitochondriale

1.1.4.4. Protéines de la famille Bcl-2

1.1.5. Inhibiteurs des protéines Bcl-2

1.1.6. Protéines Bcl-2 et résistances aux chimiothérapies anticancéreuse

1.2. La plante *Meiogyne cylindrocarpa* Burck

1.2.1. Données phylogéniques et botaniques

1.2.2. Données phytochimiques sur le genre *Meiogyne* et les genres apparentés

1.2.3. Travaux antérieurs sur *Meiogyne cylindrocarpa*

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

2.2. Extraction

2.3. Fractionnement de l'extrait

2.3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

2.3.2. Chromatographie Flash

2.3.3. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

2.3.4. Évaluation de l'activité biologique

2.3.5. Criblage structure guidé

2.4. Purifications

2.4.1. Flash chromatographie

2.4.2. Précipitation

2.4.3. Chromatographie sur colonne

2.4.4. CLHP préparative

2.4.5. Chromatographie sur Couche Épaisse (CCE)

2.4.6. Chromatographie en Phase Supercritique (CPS)

2.5. Élucidation structurale

2.5.1. Spectrométrie de Masse Haute Résolution par Électro-Ionisation

2.5.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

3. Résultats et discussions

3.1. Extraction

3.2. Fractionnement, Criblages structure et bioguidés

3.3. Purifications

3.3.1. Fraction 2-2

3.3.2. Fraction 2-3

3.3.3. Fraction 16-4

3.3.4. Fraction 16-5

3.4. Détermination structurale

3.4.1. Méiogynine A

3.4.2. Composé 31

3.4.3. Composé 32

3.4.4. Composés 33 et 34

3.4.5. Composé 35

3.5. Activité biologique des composés isolés

3.6. Discussion

3.6.1. Criblage structure guidé

3.6.2. Origine de l'O-méthylation du composé 35

3.6.3. Composé 31 : comparaison avec l'acide périllique

3.6.4. Composé 32 : stéréochimie de la double liaison 3''-4''

3.6.5. Composés 33 et 34 : configuration du carbone 4''

3.6.6. Importance du spectre d'inhibition

3.6.7. Biosynthèse des analogues de la méiogynine A

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Table des sigles et abréviations

ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'Éthyle
AF	Acide Formique
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
BH	<i>Bcl-2 Homology domain</i>
CC	Chromatographie sur Colonne
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃	Chloroforme deutérié
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CP	Chromatographie en Phase Supercritique
δ_c	Déplacement chimique (ppm) RMN ¹³ C
δ_H	Déplacement chimique (ppm) RMN ¹ H
d	Doublet
DD	<i>Death domain</i>
DED	<i>Death Effector domain</i>
DEDL	Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
FAS	<i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FP	Polarisation de fluorescence
Hept	n-Heptane
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HRESIMS	Spectrométrie de Masse Haute Résolution, Ionisation par Électrospray
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	Concentration inhibitrice 50%
ICSN	Institut de Chimie des Substances Naturelles

<i>J</i>	Constante de couplage (Hz)
<i>K</i>	Constante de dissociation (μM)
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
<i>m</i>	Multiplet
Mcl-1	<i>Myeloid cell lymphoma sequence 1</i>
MEM	Membrane externe mitochondriale
MeOD	Méthanol deutérié
MeOH	Méthanol
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
% inh	Pourcentage d'inhibition
ppm	Partie par million
RDA	Rétro-Diels-Alder
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	<i>Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<i>s</i>	Singulet
<i>t</i>	Triplet
t_r	Temps de rétention (min)
TI	<i>Total Ion Current</i>
TN	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
UPLC	Chromatographie Liquide Ultra-haute Pression
UV	Ultraviolet

Introduction

Le cancer un problème de santé publique majeur, c'est pourquoi la recherche de nouveaux traitements est un enjeu important, d'autant plus que certains d'entre eux sont devenus résistants aux chimiothérapies cytotoxiques actuelles. Le développement de ce type de pathologie, de même que ce type de résistance peuvent être causés par une inhibition de l'apoptose dans les cellules cancéreuses.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux principes actifs, le pôle Substances Naturelles – Plantes de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) a mis en place des collaborations internationales officielles permettant d'élaborer une extractothèque issue de plantes récoltées dans des zones tropicales. Des criblages sont effectués à partir de ces extraits, sur plusieurs cibles biologiques liées à l'apoptose. Les extraits ayant une activité sur l'une de ces cibles sont étudiés en vue d'isoler les molécules responsables de cette activité.

Lors d'un criblage sur une protéine-cible (Bcl-xL) intervenant dans la régulation de l'apoptose, portant sur plus de 1 400 extraits issus de 270 plantes de Malaisie, un extrait d'écorce de *Meiogyne cylindrocarpa*, entre autres, s'est révélé très actif. L'étude de cet extrait a conduit à l'isolement de différentes molécules, dont un composé majoritaire qui interagit fortement avec Bcl-xL : la méiogynine A. La suite de cette étude a permis de mettre en évidence des analogues de cette molécule. Tous n'ont pas pu encore être totalement décrits, compte tenu des faibles quantités isolées.

Le but de ce travail est de mettre en lumière une nouvelle étude phytochimique sur une plus grande quantité d'extrait d'écorce de *Meiogyne cylindrocarpa*. Cette étude vise l'obtention de quantités suffisantes d'analogues terpéniques minoritaires, leur caractérisation et l'évaluation de leur activité sur la cible biologique Bcl-xL.

Ce mémoire s'articule autour de deux grands axes :

- une étude bibliographique préliminaire portant sur le cancer, l'apoptose et sa régulation, suivie par des données liées à *M. cylindrocarpa* ;
- un travail effectué au laboratoire retraçant l'étude phytochimique de cette plante.

1. Études bibliographiques*

1.1. Cancer et apoptose

1.1.1. Cancer

L'Institut National du Cancer (INCa) définit le cancer de la manière suivante : il s'agit d'une maladie provoquée par le développement d'une cellule anormale, conduisant progressivement à une prolifération anarchique de cellules dédifférenciées. Ces cellules forment un amas d'abord localement, puis dans les tissus avoisinants, enfin à distance de l'organe où a débuté le processus. Ainsi, il existe autant de cancers que d'organes pouvant être touchés.

Le développement de la maladie dépend d'un ensemble de facteurs de risques, externes pour les uns (tabagisme, qualité de l'alimentation, exposition à des substances toxiques, aux rayonnements, ou une infection [*Papillomavirus*, hépatite B ou *Helicobacter pylori*]), internes pour les autres (âge, hérédité) qui ne doivent pas être négligés¹.

À l'échelle internationale, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, « le cancer est une cause majeure de décès dans le monde », responsable de la mort de 7,6 millions de personnes en 2008, soit 13 % de la mortalité mondiale².

D'après les derniers chiffres de 2012, il y aurait 355 000 nouveaux cas de cancers en France métropolitaine, et 150 000 décès causés par la maladie. Concernant la période comprise entre 1980 et 2012, l'augmentation de l'incidence des cancers serait due en partie à l'accroissement de la population et à son vieillissement. Une exposition plus forte aux facteurs de risque contribuerait également à l'apparition d'autres cas.

Il faut cependant relever que des progrès significatifs ont été accomplis, notamment grâce aux multiples dépistages mis en place par l'administration (cancers du sein, de la prostate, de l'utérus, par ex.). L'incidence de ces cancers a augmenté parallèlement aux diagnostics plus nombreux, et la mortalité qui en découle est plus faible dans la mesure où le dépistage précoce permet une meilleure prise en charge de la maladie. La modification des habitudes alimentaires ou la diminution de la consommation d'alcool et de tabac ont permis de réduire significativement la mortalité des cancers de l'estomac, de l'œsophage, et de la sphère oropharyngée.

Toujours en France, en ce qui concerne d'autres types de cancers, celui du poumon notamment, on observe une augmentation inquiétante de l'incidence et de la mortalité. Ce cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et la deuxième chez la femme, après le cancer du sein³.

* Les chiffres composés en exposant et disposés en fin de phrase renvoient à la bibliographie en fin de mémoire (p. 58-61) qui classe les auteurs dans leur ordre d'apparition, de 1 à 48.

Toutes ces données font du cancer un problème de santé publique majeur, *itaque* l'étude de ses mécanismes et la recherche de nouveaux traitements représentent des enjeux importants.

Dans les pages suivantes, le mécanisme de l'inhibition de l'apoptose, qui conduit à l'apparition de cancers, sera étudié plus particulièrement, de même que les voies de régulation de ce phénomène pour tenter de comprendre comment on pourrait agir pour ralentir voire éviter le développement de tumeurs cancéreuses.

1.1.2. Pathogenèse des cancers

Un cancer apparaît lorsque l'équilibre est rompu entre les cellules en division et celles censées mourir, à cause de dommages au niveau du matériel génétique. Cela se produit lorsqu'il existe une anomalie de la régulation des divisions cellulaires ou bien lorsque les messages déclenchant l'apoptose ne sont pas reçus.

Dans le second cas évoqué, le problème peut se situer à n'importe quel niveau de la régulation, induisant une déficience ou un échappement à l'apoptose.

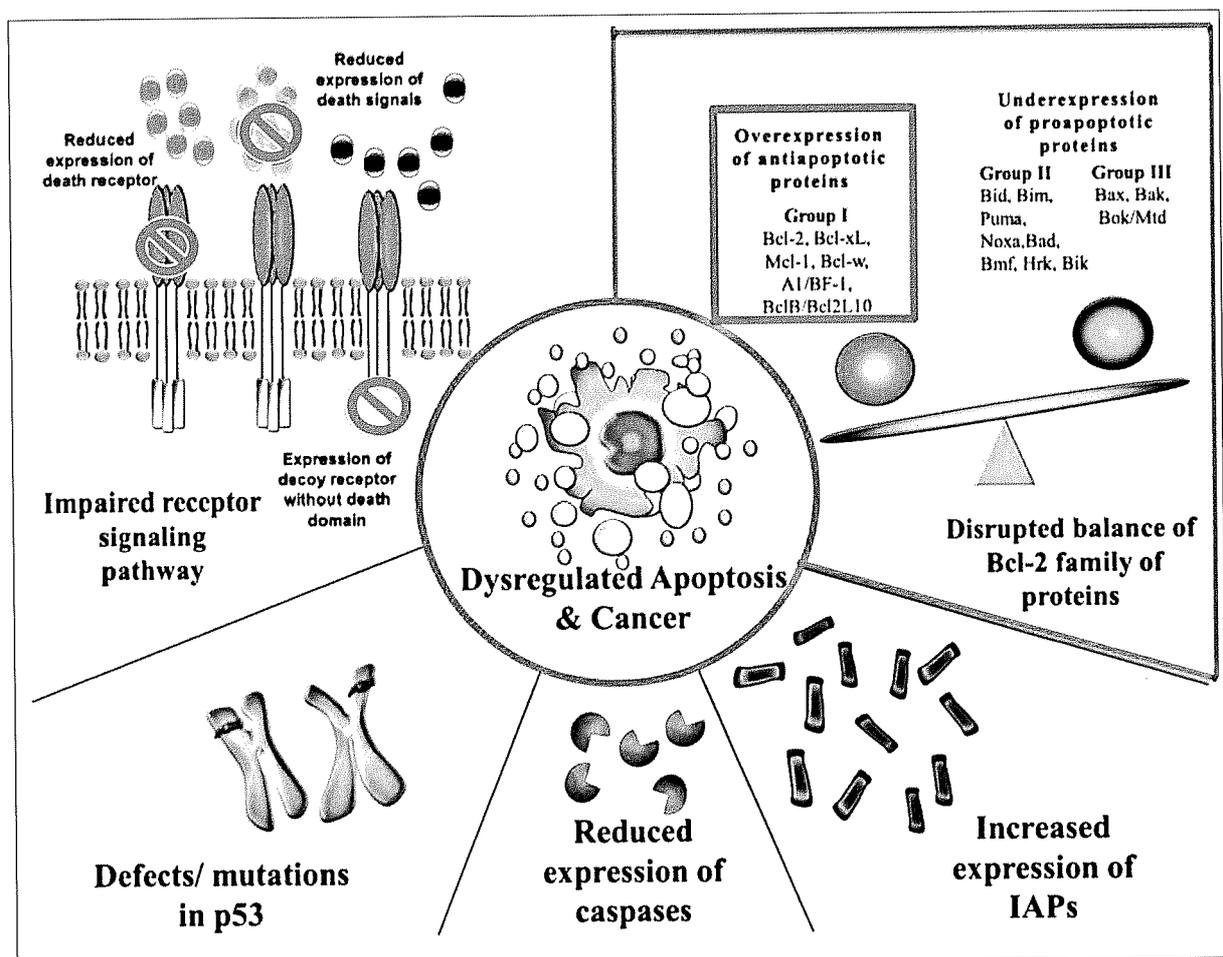


Fig. 1. — Mécanismes contribuant à l'échappement à l'apoptose et à la pathogenèse de cancers⁴.

Comme l'illustre la figure 1, plusieurs mécanismes peuvent être mis en cause : une anomalie du fonctionnement d'enzymes de l'apoptose, ou au niveau de la voie des récepteurs de mort, ou alors un déséquilibre entre protéines pro- et anti-apoptotiques, etc.⁴.

Dans le cadre de ce travail, une focalisation sur la surexpression de protéines anti-apoptotiques est nécessaire : ce mécanisme implique Bcl-xL, qui inhibe l'apoptose et contribue à l'apparition ou au développement de cancers.

1.1.3. Apoptose

Le terme d'apoptose est dérivé du grec ancien ἀπό- (=distant, éloigné), et πτώσις (=chute), d'où *apoptosis* qui désignait à la chute des feuilles d'arbres en automne. Il définit de nos jours un phénomène naturel actif de mort cellulaire programmée. Elle est nécessaire à la survie de l'organisme puisqu'elle sert à compenser la prolifération cellulaire, pour assurer le renouvellement des cellules d'une part, d'autre part à éliminer les cellules endommagées.

Les cellules en cours d'apoptose présentent un aspect particulier : elles sont arrondies et leur taille réduite. La chromatine se condense et l'ADN se coupe en fragments homogènes en nombre de paires de bases, toujours contenus dans le noyau. La composition de la membrane plasmique change, avec l'externalisation d'un marqueur biochimique (la phosphatidylsérine), normalement situé dans le feuillet interne. Le bourgeonnement de la membrane plasmique conduit à la formation de corps apoptotiques : des résidus cellulaires compacts, obtenus à la suite de condensation du cytoplasme et du noyau. Ces corps apoptotiques sont ensuite reconnus grâce aux modifications biochimiques de la membrane, et phagocytés par des cellules phagocytaires avoisinantes ou dégradés dans le milieu extracellulaire.

Il faut noter que l'apoptose peut avoir des conséquences pathologiques. En excès, elle peut se traduire par des maladies neurodégénératives. Lors d'une infection virale, une cellule atteinte peut entrer en apoptose afin d'éviter la phase de réplication du virus; ce qui entraîne une perte massive d'un genre cellulaire. Lorsque l'apoptose est déficiente, elle peut être responsable de maladies auto-immunes, puisqu'elle n'élimine pas les lymphocytes reconnaissant le « soi ». La présence de cellules tumorales dans l'organisme peut également être l'une des pathologies causées par ce défaut d'apoptose.

Toutes ces raisons font que l'apoptose est l'un des thèmes les plus étudiés par les biologistes, qui tentent d'en comprendre les mécanismes, avec comme objectif la connaissance des causes du développement d'une pathologie ainsi que la/les cible(s) thérapeutique(s) à viser⁴.

1.1.4. Régulation de l'apoptose

Le phénomène apoptotique, induisant l'autodestruction de la cellule, est finement régulé, pour éviter qu'il ne se déclenche dans les cellules saines alors qu'il doit être initié dans les cellules anormales. Des signaux issus du milieu extracellulaire, ou du milieu interne, traduisant une atteinte à l'intégrité cellulaire peuvent entrer en jeu. Cette régulation repose sur une cascade de différents facteurs et messagers cellulaires, dont l'élément central est la famille des caspases, des enzymes à la fois régulatrices et effectrices.

Ces effecteurs peuvent être activés selon trois voies de signalisation :

- la voie mitochondriale ou intrinsèque,
- la voie des récepteurs de mort ou extrinsèque,
- enfin, la voie intrinsèque du réticulum, moins connue⁴.

L'objectif de ce travail est l'étude de la régulation de l'apoptose, des caspases aux voies extrinsèque et intrinsèque, en insistant sur la famille des protéines Bcl-2, comprenant la cible privilégiée Bcl-xL.

1.1.4.1. Famille des caspases : signalisation et exécution de l'apoptose

Les caspases sont des enzymes-clés dans l'apoptose ; elles sont maintenues inactives dans les cellules saines par des voies de régulation complexes et interconnectées.

Les caspases (C-asp-ases) sont des cystéine-protéases qui clivent spécifiquement leurs substrats après des résidus acide aspartique. Elles sont divisées en deux groupes selon la fonction qu'elles occupent dans l'organisme :

- celles du groupe I interviennent dans l'inflammation,
- celles du groupe II jouent un rôle majeur dans l'apoptose.

Ce sont ces dernières qui seront décrites en détail ci-après. Chacune des caspases est spécifique à un type de substrat, et leur action combinée mène à une amplification du signal pro-apoptotique puis à la formation du corps apoptotique.

1° Caspases initiatrices

Les caspases-2, -8, -9 et -10 constituent la classe des caspases initiatrices : lorsqu'elles sont activées, elles clivent les procaspases (précurseurs des caspases) effectrices, et déclenchent ainsi leur dimérisation qui rend ces dernières actives. L'activation des caspases initiatrices passe par la formation d'un complexe avec des protéines issues de l'une des voies de signalisation de l'apoptose (fig. 2).

La caspase-2 (flèche violette) est activée par le PIDDosome (*p-53 Induced protein with Death Domain*) de la voie intrinsèque, la caspase-8 (flèche verte), par le DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) de la voie extrinsèque alors que la caspase-9 (flèche orange) est activée par l'apoptosome, issu de la mitochondrie.

De plus, certaines caspases (-2 et -8, par ex.) sont capables de s'autoactiver, conduisant ainsi à une cascade enzymatique qui amplifie le phénomène apoptotique.

2° Caspases effectrices

Cette classe de caspases comprend les caspases-3, -6 et -7. Sous la forme de dimères, leur action protéolytique permet l'activation de DNases qui dégradent l'ADN en fragments de taille homogène et l'inhibition d'enzymes réparatrices de l'ADN. Ces caspases clivent aussi les protéines responsables de la morphologie de la cellule, notamment les lamines et les protéines du cytosquelette cellulaire.

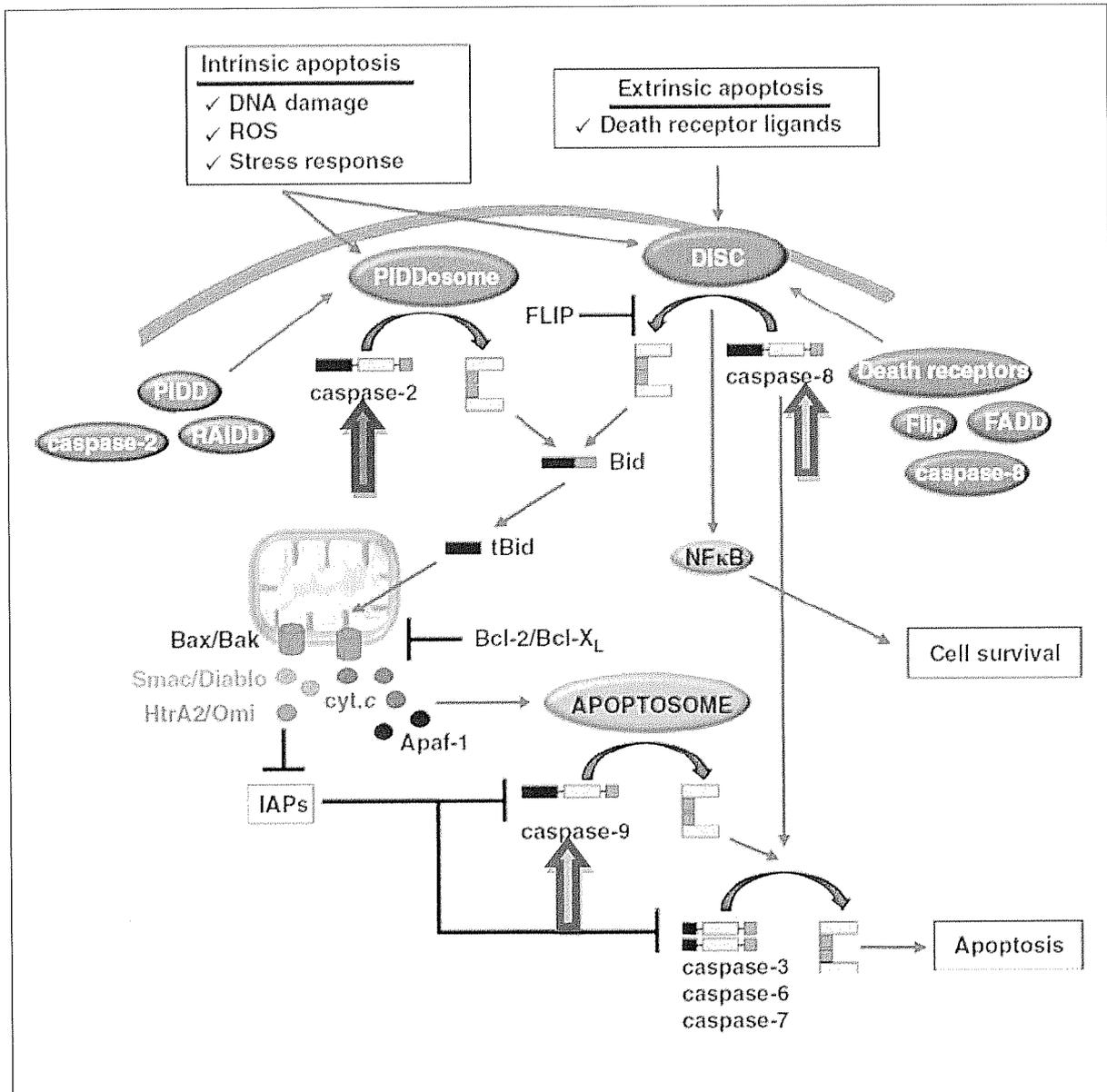


Fig. 2. — Voies de signalisation agissant sur les caspases initiatrices⁵.

Dans la mesure où toutes ces enzymes dépendent de différents moyens de régulation, si l'une d'entre elles est inefficace ou se trouve en quantité insuffisante, d'autres mécanismes ou des voies de signalisation alternatives peuvent compenser ces anomalies, permettant d'assurer la réalisation complète de l'apoptose⁵.

1.1.4.2. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque permet la transmission du signal apoptotique de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Elle est initiée par la liaison de messagers extracellulaires de l'apoptose sur des récepteurs transmembranaires spécifiques, récepteurs de mort. Ils possèdent un « domaine de mort » intracellulaire, conservé parmi ces différents récepteurs et capable d'activer des messagers intracellulaires. La voie extrinsèque est donc aussi appelée « voie des récepteurs de mort ».

Les messagers extracellulaires, ligands proapoptotiques, sont les suivants :

- *Tumor Necrosis Factor* α (TNF α),
- *Apoptosis Stimulating Fragment-Ligand* (FAS-L)
- *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL).

Ces ligands sont des analogues solubles de protéines transmembranaires, retrouvés dans le milieu extracellulaire. Soit la partie extra-cytoplasmique de la protéine transmembranaire est clivée, soit ils sont issus d'un épissage alternatif lors de la traduction.

Le domaine de mort correspond à une portion de la partie C-terminale, constituée de six hélices α . Il est dépourvu d'activité enzymatique bien qu'il permette le recrutement de protéines possédant un domaine homologue dans le cytoplasme pour la formation d'hétéro-oligomères.

Il existe plusieurs types de récepteurs, selon le ligand qui l'active : un récepteur au TNF (TNF-R1), le récepteur FAS et les deux récepteurs de TRAIL : DR4 et DR5.

L'interaction entre le ligand et le récepteur ne peut avoir lieu que lorsqu'ils se présentent tous deux sous la forme de trimères. Cependant, le degré d'oligomérisation du récepteur qui permet la transduction du signal est encore débattu.

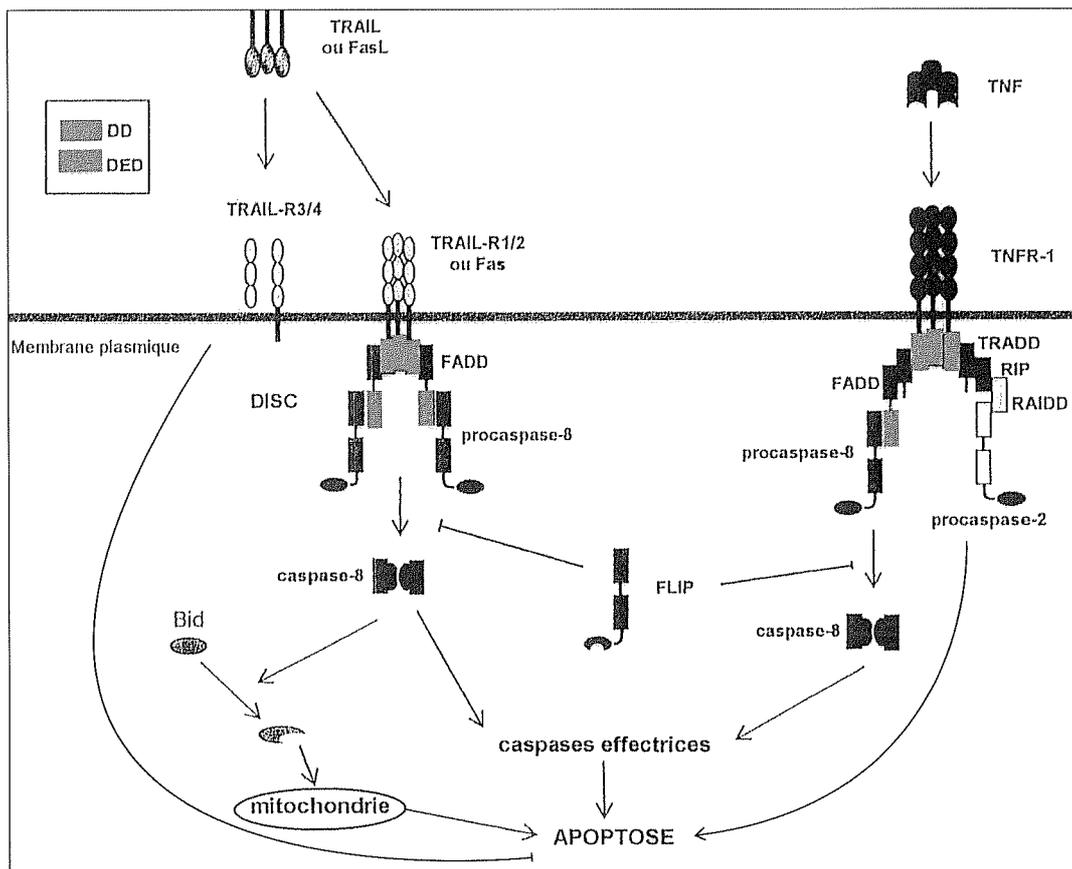


Fig. 3. — Schéma de la voie extrinsèque⁶.

Après l'activation des récepteurs de mort, des protéines adaptatrices inactives sont recrutées par le domaine de mort (DD [*Death Domain*], en rouge sur la figure 3). Après leur fixation, elles interagissent avec des procaspases et l'association de l'ensemble forme un *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) (fig. 4). Il est nécessaire au clivage de procaspases effectrices en caspases activées et déclenche ainsi la cascade enzymatique de l'apoptose.

Dans l'exemple du récepteur FAS, la protéine adaptatrice est une protéine *FAS Associated Death Domain* (FADD) qui présente un domaine effecteur de mort (DED [*Death Effector Domain*] en bleu sur la figure 3) dans la région N-terminale, capable de recruter à son tour la procaspase-8. Au sein du complexe DISC, le rapprochement de ces procaspases permet leur activation.

La suite de la voie de signalisation dépend du type de cellule dans lequel le processus est déclenché :

- s'agissant d'une cellule de type I (thymocytes), la cascade des caspases est directement activée par la caspase-8 ;

- s'agissant d'une cellule de type II (hépatocyte, par ex.), la caspase-8 clive une protéine Bid (*BH3 interacting death domain agonist*) et libère le fragment C-terminal t-Bid qui agit sur la mitochondrie, entraînant ainsi la poursuite de l'apoptose.

L'activation de la voie extrinsèque est contrôlée par les protéines c-Flip (*Fadd-like ICE inhibitory proteins*). La famille c-Flip comprend plusieurs isoformes ayant en commun des motifs DED leur permettant d'entrer en compétition avec la procaspase-8 lors de la formation du DISC, conduisant à une action inhibitrice sur l'apoptose^{8, 9 et 10}.

1.1.4.3. Voie intrinsèque de l'apoptose : voie mitochondriale

La mitochondrie est l'organe dans lequel la voie des récepteurs de mort rejoint la voie intrinsèque de l'apoptose, au moins dans les cellules de type II.

La régulation de l'apoptose passe aussi par une autre voie de signalisation, interne à la cellule. Elle se manifeste notamment au niveau des mitochondries et différents messagers la contrôlent : le facteur de transcription p-53, des molécules inhibitrices et les protéines de la famille Bcl-2.

1° Facteur de transcription p-53

Sous l'effet de dommages causés à la cellule (anomalie du matériel génétique, activation d'oncogènes, hypoxie ou choc thermique), les protéines p-53, facteurs de transcription nucléaires, induisent la transcription de nombreux gènes dont la réponse conduit soit à l'arrêt du cycle cellulaire, soit à l'apoptose.

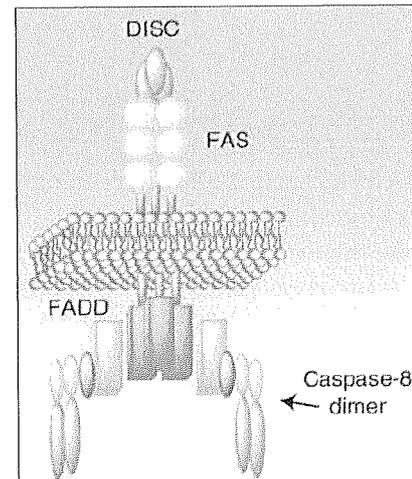


Fig. 4. — Structure du DISC⁷.

Les protéines p-53, « gardiennes du génome », proviennent du gène suppresseur de tumeur p-53, l'expression de ce gène inhibant le développement tumoral. Dans une cellule saine, la protéine p-53 libre existe en très petite quantité : elle est majoritairement liée à une autre protéine, Mdm2 (*Murine double minute 2*), qui favorise sa dégradation.

Dans le cas d'une altération de l'ADN, due à une exposition à des radiations ou une substance toxique par exemple, plusieurs mécanismes contribuent à l'accroissement de la quantité de p-53 libre présente dans la cellule.

L'altération du génome induit l'activation de kinases, comme l'ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) provoquant la dissociation de p-53 et de Mdm2 en phosphorylant les protéines p-53 ; elle participe ainsi à l'augmentation de la quantité de protéine libre. De plus, la phosphorylation de p-53 améliore sa stabilité.

Un second mécanisme impliquant l'activation de la transcription du locus ARF (*Alternative Reading Frame*) du locus *INK4a* conduit à la synthèse de protéine p14^{ARF}, qui peut se fixer sur Mdm2 et en favorise la dégradation.

Lorsque la protéine p-53 est en taux suffisant dans la cellule endommagée, le cycle cellulaire est bloqué jusqu'à la réparation des anomalies génétiques. Si cette réparation n'est pas possible, p-53 induit l'apoptose en augmentant la transcription de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bax et Bak, et en diminuant celle de protéines anti-apoptotiques, de la même famille : Bcl-2 et Bcl-xL, par exemple^{7 et 8}.

2° Étape mitochondriale

Les mitochondries contiennent des molécules solubles qui, lorsqu'elles quittent l'espace intermembranaire, induisent l'apoptose. L'étape mitochondriale consiste en l'augmentation de la perméabilité de la double membrane permettant la diffusion de ces molécules solubles depuis l'intérieur des mitochondries vers le cytoplasme. Cette perméabilisation s'accompagne d'une perturbation du potentiel de membrane mitochondrial et de la fuite de protéines de faible poids moléculaire ; elle constitue le point de non-retour de l'apoptose, et passe sous le contrôle de différentes protéines de la famille Bcl-2, activatrices ou inhibitrices.

Le cytochrome C, encadré en bleu sur la figure 6, est l'une de ces molécules : dans une cellule saine, il joue un rôle important dans la chaîne respiratoire mitochondriale, permettant à la cellule d'emmagasiner de l'énergie sous forme d'ATP. Au cours de l'apoptose, lorsqu'il est relargué depuis l'espace intermembranaire jusque dans le cytoplasme, il s'associe à une protéine adaptatrice Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor-1*). Cette interaction induit l'oligomérisation d'Apaf-1 et permet la fixation de la caspase-9 sur l'oligomère par le biais de domaines spécifiques.

Ainsi un complexe est formé, l'apoptosome (fig. 5, ellipse bleu foncé fig. 6) ; c'est au cœur de ce complexe que la caspase-9 est activée et peut, à son tour, initier l'activité des caspases effectrices, notamment les caspases-3 et -7.

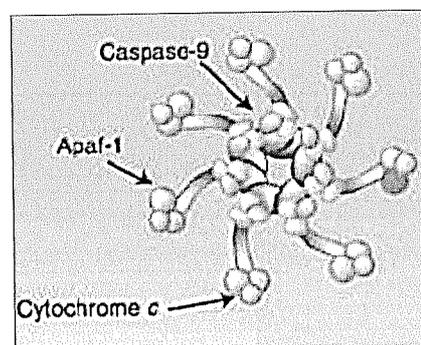


Fig. 5. — Apoptosome⁷.

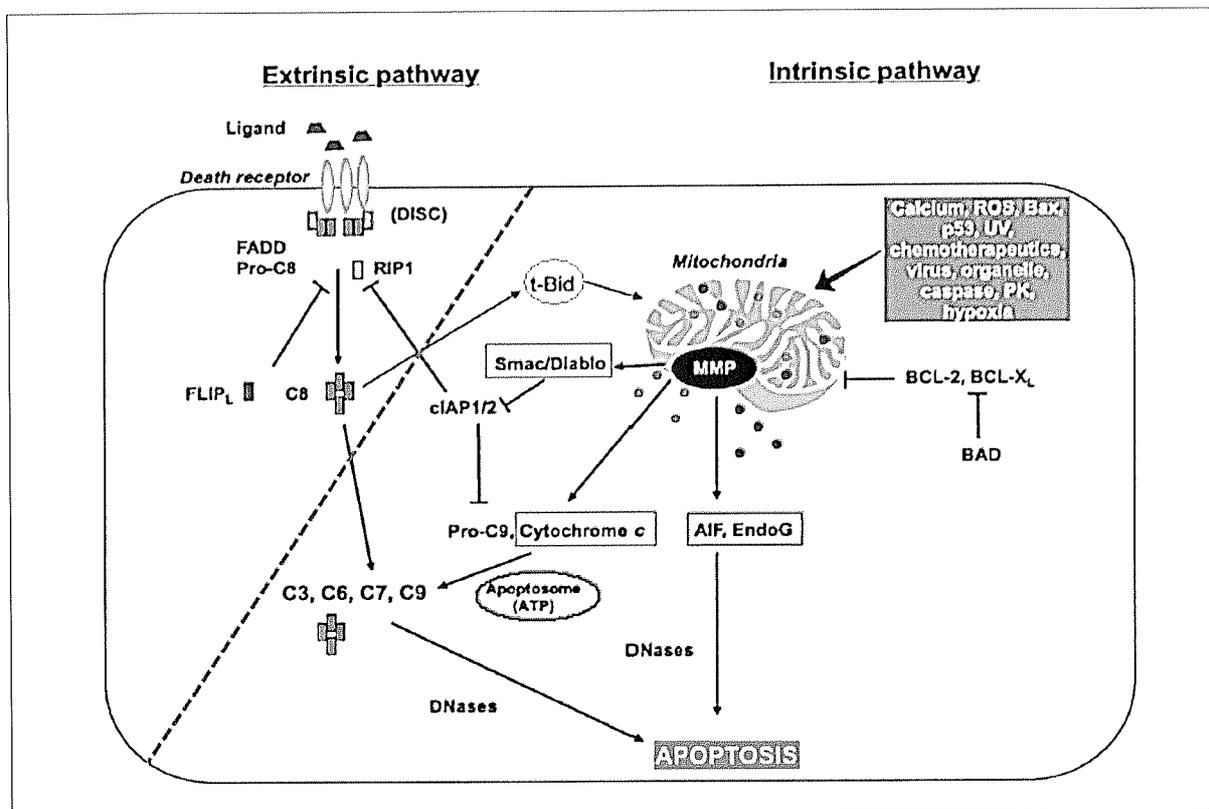


Fig. 6. — Focalisation sur les molécules solubles relarguées par la mitochondrie au cours de l'apoptose⁹.

Deux autres molécules solubles sont libérées par les mitochondries au cours de l'apoptose. Il s'agit de la protéine Smac/Diablo (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low pI*, fig. 6, encadré vert), et d'une sérine protéase, Htra2. Elles ont la capacité d'inhiber les IAP (*Inhibitors of Apoptotic Proteins*) constitutionnellement liées aux caspases pour éviter leur activation. Les protéines Smac/Diablo et Htra2 (codée par le gène HTRA) favorisent donc l'activation des caspases par le cytochrome C.

Citons également la flavoprotéine Aif (*Apoptosis Inducing Factor*) et l'endonucléase G (endo G) (fig. 6, encadré violet) : ces protéines, lorsqu'elles sont relarguées dans le cytoplasme, migrent vers le noyau et interviennent dans les modifications de la chromatine observées au cours de l'apoptose. Aif induit la fragmentation de l'ADN et son action conjointe avec l'endonucléase conduit à la condensation de la chromatine. Ces deux protéines sont des effecteurs de l'apoptose indépendants des caspases⁹.

L'arrêt de l'activité normale de la mitochondrie implique aussi l'accumulation et la diffusion de radicaux libres oxygénés pouvant endommager les structures cellulaires, parmi lesquelles l'ADN. Cela peut contribuer à amplifier l'activation de la voie intrinsèque.

3° Inhibiteurs naturels de la voie intrinsèque

Les IAP (*Inhibitors of Apoptotic Proteins*) sont une famille de protéines découvertes chez *Baculovirus*, et possédant des domaines d'une taille de 70 à 80 acides aminés, les BIR (*Baculovirus IAP Repeat*). Ces domaines sont essentiels pour assurer la liaison entre les IAP et les caspases et leur inhibition. Ces protéines peuvent à leur tour être inhibées par Smac/Diablo et la sérine protéase Htra2.

Outre les IAP, des protéines-chaperons, les HSP (*Heat Shock Proteins*) contrôlent la voie intrinsèque. HSP27 se fixe sur le cytochrome C cytosolique, nuisant à la formation de l'apoptosome. HSP90 inhibe la protéine adaptatrice Apaf-1 et HSP70 présente la particularité d'agir à la fois sur Apaf-1 et sur la flavoprotéine AIF⁹.

1.1.4.4. Protéines de la famille Bcl-2

Parmi les nombreux messagers de la voie mitochondriale, considérons la famille des protéines Bcl-2. Ce sont elles qui régulent la perméabilité de la double membrane de la mitochondrie lors de l'apoptose.

Il a été observé que le gène Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) est surexprimé lors de lymphomes humains à cellules B. Cette surexpression inhibe l'apoptose ; elle ne se traduit pas par une augmentation de la croissance cellulaire, mais par un accroissement de la survie des cellules tumorales. La protéine Bcl-2 issue de la traduction de ce gène est qualifiée d'antiapoptotique¹¹.

Il existe des gènes apparentés au gène Bcl-2. Ils présentent des homologies de séquence BH (*Bcl-2 Homology domain*) entre eux. Ils codent pour différentes protéines, présentant ces domaines BH. Chacun est caractérisé par un enchaînement d'hélices α (fig. 7A), responsable de la structure et de la fonction de ces protéines de la famille Bcl-2. L'extrémité C-terminale est hydrophobe et permet leur ancrage dans une membrane.

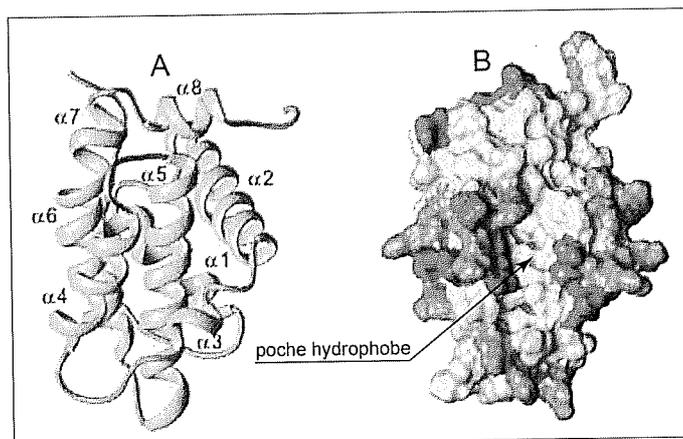


Fig. 7. — Bcl-2.
A. Structure secondaire ; B. Structure tertiaire¹²

La structure tridimensionnelle de ces protéines est la suivante : deux hélices α centrales, majoritairement hydrophobes sont entourées de six ou sept autres hélices α plutôt amphiphiles et de longueurs différentes. Elles forment une poche hydrophobe (fig. 7B) où différents ligands peuvent se fixer.

Parmi cette famille, certaines protéines vont favoriser l'apoptose. Ce sont les protéines proapoptotiques Bax et Bak, qui comprennent plusieurs domaines d'homologie, alors que d'autres, telles que Bid ou Noxa ne contiennent que le domaine BH3 : ce sont les *BH3-only*. En ce qui concerne les protéines qui inhibent l'apoptose, les protéines antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, par ex.), elles sont caractérisées par la présence des domaines d'homologie BH1 à BH4.

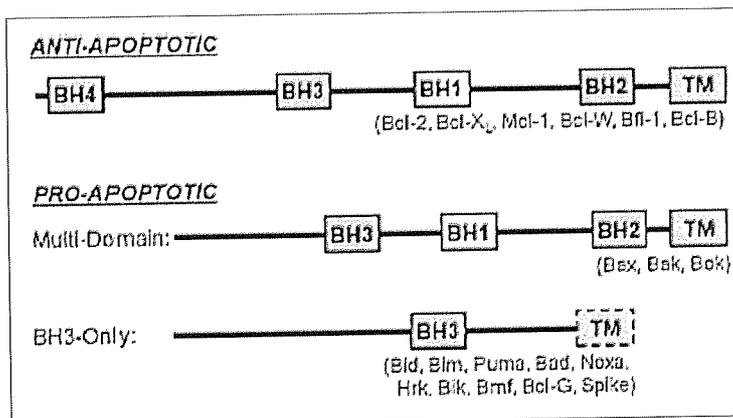


Fig. 8. — Classification des protéines de la famille Bcl-2 selon leurs domaines d'homologie¹³.

Ces protéines jouent un rôle majeur dans la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries et la régulation de ce mécanisme.

Lorsque l'apoptose est déclenchée par la voie extrinsèque, la protéine proapoptotique *BH3-only* Bid, est clivée en t-Bid. Ce fragment active les protéines proapoptotiques Bax et Bak et provoque des changements conformationnels (fig. 9). Bak existe sous forme de monomère dans l'espace intermembranaire, tandis que Bax se présente dans le cytoplasme ou

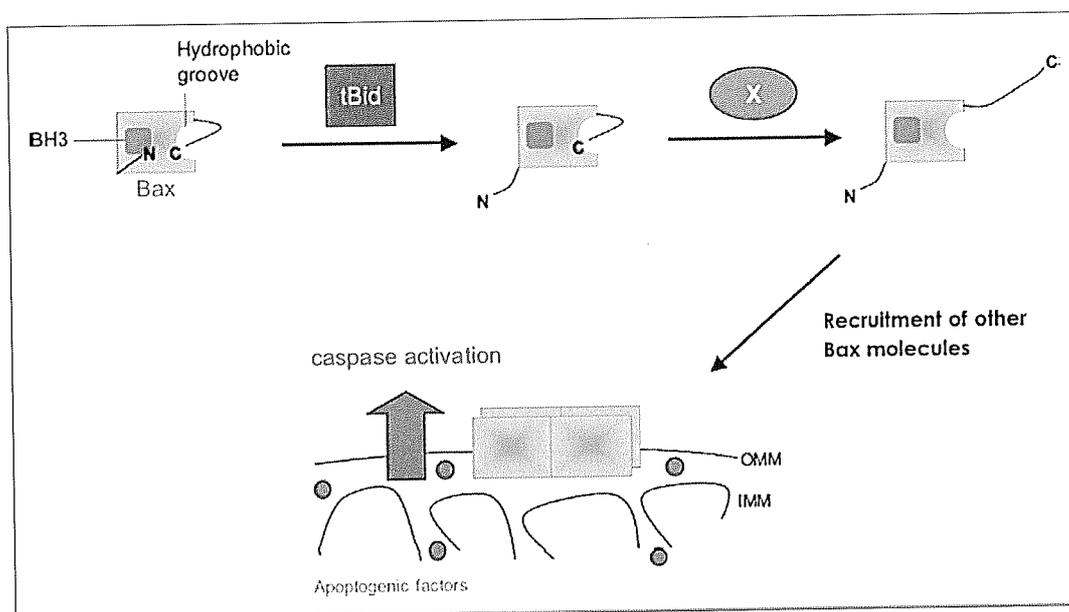


Fig. 9. — Activation et oligomérisation de protéines pro-apoptotiques, exemple de Bax¹⁴.

ancré à l'extérieur de la membrane externe mitochondriale (MEM). Tous deux s'insèrent dans cette membrane lorsqu'ils sont activés, conduisant à l'homo-oligomérisation de ces protéines. L'extrémité C-terminale d'un monomère se détache de la MEM et se fixe dans la poche hydrophobe du monomère voisin, libérant l'extrémité N-terminale de chacun des monomères. Des pores transmembranaires sont ainsi formés, permettant la diffusion des molécules solubles intermembranaires vers le cytoplasme.

La régulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale dépend du reste de la famille Bcl-2. En effet, les protéines *BH3-only* favorisent la formation de ces pores, par l'activation directe de Bak et Bax, ou par une sensibilisation au signal proapoptotique. Au contraire, elle est inhibée par les protéines antiapoptotiques telles Bcl-2 et Bcl-xL. Cette inhibition passe par une hétérodimérisation avec les protéines pro-apoptotiques, grâce aux domaines d'homologie qu'ils partagent. Ces dimères mixtes sont anti-apoptotiques.

L'équilibre entre les formes pro- et antiapoptotiques dépend du rapport des quantités de dimères inhibiteurs (anti/pro) et des dimères activateurs (pro/pro). L'apoptose se déclenche lorsque la quantité de dimères proapoptotiques devient plus importante ; dans le cas contraire, la cellule survit (fig. 10).

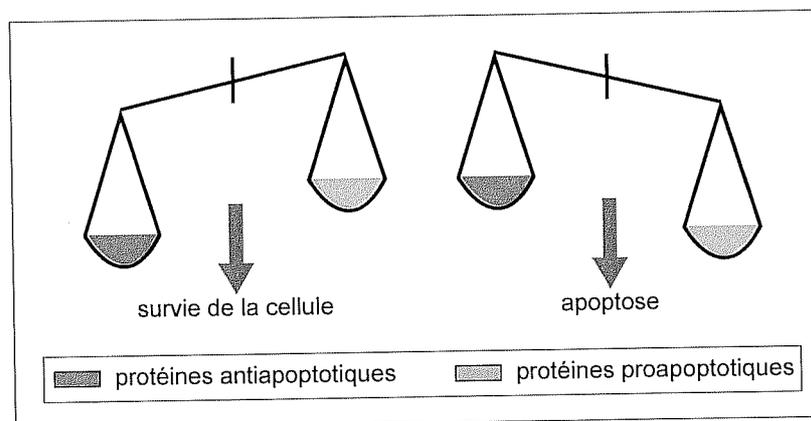


Fig. 10. — Équilibre entre les protéines anti- et proapoptotiques.

La voie intrinsèque tend à modifier cet équilibre en faveur de l'apoptose, en augmentant la quantité de protéines proapoptotiques et en réduisant celle des antiapoptotiques. La protéine p-53 induit la transcription des protéines proapoptotiques Bax et Bak, et parallèlement inhibe celle des protéines antiapoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL.

Parmi la famille Bcl-2, Bcl-xL (*B cell lymphoma extra large*) est la cible des travaux réalisés. Elle existe en grande quantité entre les deux membranes mitochondriales. C'est la première protéine de cette famille dont la structure a été étudiée, à la fois par RMN et par cristallographie.

Le cœur de la structure est constitué des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$, de caractère hydrophobe. Elles sont flanquées d'un côté par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$, et de l'autre par $\alpha 1$ et $\alpha 2$ (fig. 11). La particularité structurale de Bcl-xL est de posséder une longue boucle entre les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$, qui correspond à la région où la variabilité de la séquence des acides aminés est la plus grande parmi les membres de la famille Bcl-2. Des travaux ont tenté de montrer que cette boucle ne serait pas impliquée dans l'activité antiapoptotique, mais plutôt dans la régulation négative de la fonction de Bcl-xL. D'un point de vue tridimensionnel, les domaines BH1, BH2 et BH3 définissent le haut d'une poche hydrophobe, dont le fond est constitué par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 4$. Des études RMN sur le dimère Bcl-xL/Bak ont montré que cette poche est le site d'interaction de cette protéine^{7,12,15}.

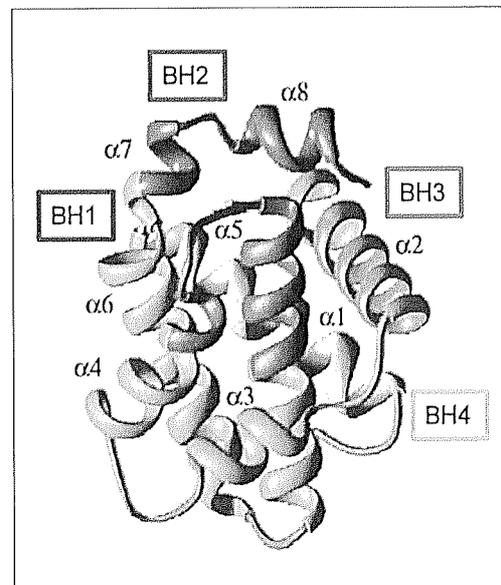


Fig. 11. — Structure tridimensionnelle de Bcl-xL¹²
(la boucle entre $\alpha 1$ et $\alpha 2$ n'est pas représentée pour plus de clarté).

Ces grandes familles de protéines sont interconnectées selon un schéma complexe de signalisations et de transductions du signal, jusqu'à ce qu'un seuil de non-retour soit atteint et mène à la destruction complète de la cellule.

1.1.5. Inhibiteurs des protéines Bcl-2

La lutte contre le cancer peut être menée selon différentes stratégies. Celle qui vise à rétablir l'apoptose, en inhibant les protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2, est décrite ci-après.

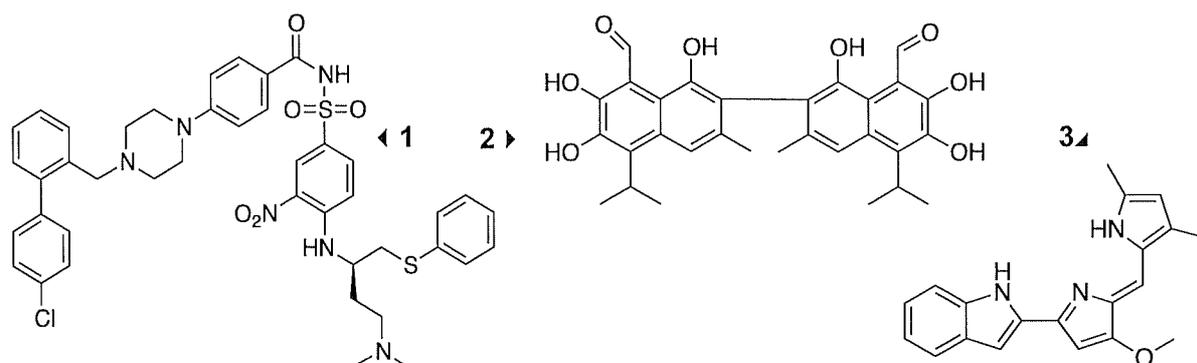
Les premiers inhibiteurs mis au point et dont le brevet a été déposé en 1998, sont des oligonucléotides¹⁶. Plusieurs molécules inhibitrices de Bcl-2 font l'objet d'un brevet et sont actuellement en essais cliniques.

Un classement des brevets déposés dans ce domaine regroupe les inhibiteurs de protéines Bcl-2 en trois catégories :

- les peptides mimant des BH3-only, comme l'ABT-737,
- les molécules non-peptidiques paninhibitrices, c'est-à-dire non sélectives,
- les molécules non-peptidiques inhibitrices sélectives¹⁷.

Les peptides représentent une stratégie prometteuse dans les traitements des cancers provoqués par une déficience ou une inhibition de protéines BH3-only ; elle consiste à imiter la structure de ces protéines. L'étude par RMN de l'interaction entre les protéines-cibles et leur ligand au moment de leur fixation, a permis de mettre au point des peptides inhibiteurs de Bcl-2, comme l'ABT-737 1. La cible de ce traitement est la poche hydrophobe de Bcl-xL. Les protéines Bcl-2 et Bcl-w sont inhibées de même, du fait de leur homologie avec Bcl-xL¹⁸.

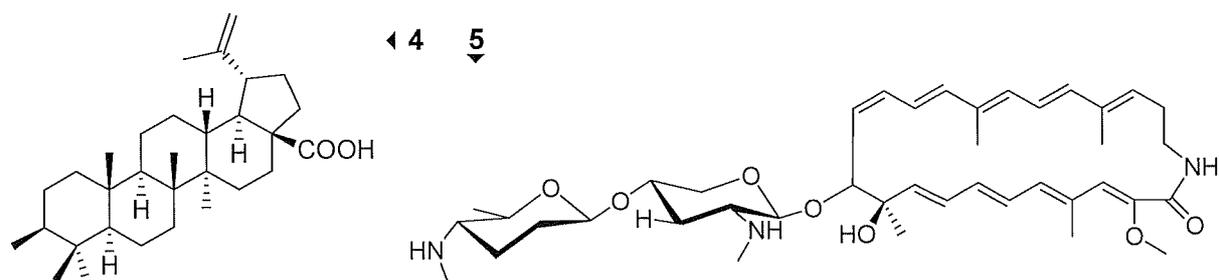
Les molécules non peptidiques sont dérivées de substances naturelles, telles que le gossypol **2** isolé de *Gossypium sp.*, le coton. Une autre de ces molécules, l'Obatoclox® **3** est un analogue de structure d'un composé tri-pyrrole isolé de *Serratia marcescens*, une bactérie¹⁷.



Il existe d'autres molécules naturelles capables d'interagir avec les protéines de la famille de Bcl-2, dont l'acide bétulinique **4**, un triterpène capable d'induire l'apoptose par une augmentation de Bax pro-apoptotique et une diminution de l'expression de Bcl-2.

Cependant ce ne sont pas ses seules cibles pouvant entraîner l'apoptose : une inhibition des topo-isomérases I a également été reportée, impliquant l'apparition de dommages au niveau de l'ADN, déclenchant la voie intrinsèque de l'apoptose¹⁹.

D'autres agissent sur la protéine Bcl-xL, à l'instar de l'incédnine **5**. Elle a été découverte dans une souche de *Streptomyces*, grâce à un bioguidage réalisé à partir de cellules de cancer du poumon à petites cellules Ms-1, surexprimant Bcl-xL en présence de traitement anticancéreux. Si elle permet de surmonter des résistances aux traitements cytotoxiques, en revanche elle est inactive sur les cellules tumorales administrée seule. L'inhibition de Bcl-xL induite par l'incédnine n'est pas due à une fixation de cette molécule à la surface de la poche de Bcl-xL, mais sur un autre site de la protéine²⁰.



1.1.6. Protéines Bcl-2 et résistances aux chimiothérapies anticancéreuses

La sensibilité des tumeurs aux traitements cytotoxiques est différente selon le type de cancer, et il se peut que se développe une résistance à ces thérapeutiques causée par plusieurs mécanismes (fig. 12).

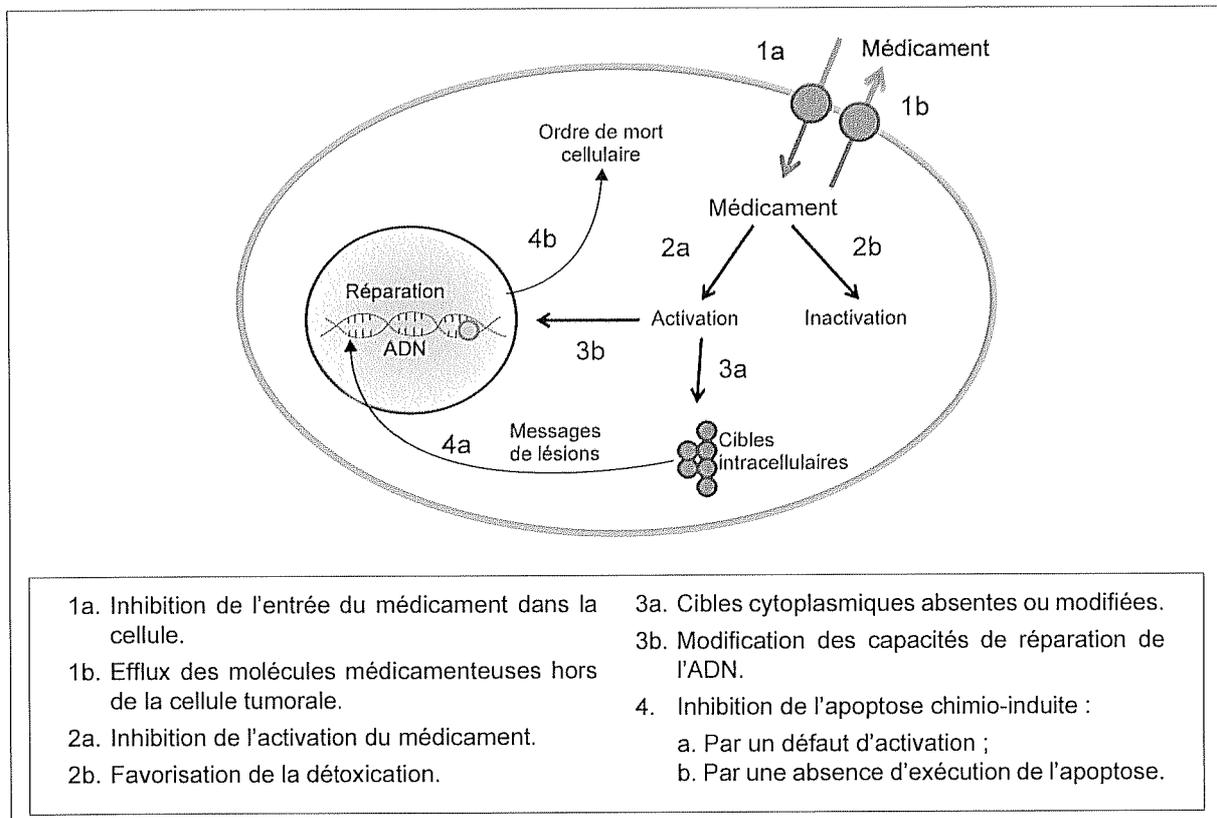


Fig. 12. — Principaux mécanismes de résistance cellulaire aux agents anticancéreux⁸.

Le mécanisme d'inhibition de l'apoptose chimio-induite dépend de différents facteurs, dont les protéines antiapoptotiques font partie. En effet, les cellules tumorales surexpriment des inhibiteurs de l'apoptose, comme Bcl-xL.

La rechute d'un cancer s'accompagne d'une diminution du ratio entre la quantité de dimères proapoptotiques (Bax, Bak) et celle de dimères antiapoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL)²¹. Par conséquent, l'association d'un inhibiteur de ces protéines avec les traitements cytotoxiques habituels pourrait limiter les phénomènes d'échappement au traitement et les rechutes de cancer.

Cela a été démontré dans le cas de lymphomes à cellules B, traités par le rituximab : la surexpression de Bcl-xL entraîne une résistance à l'apoptose induite par le traitement. L'association du rituximab avec l'ABT-737, un inhibiteur de cette protéine anti-apoptotique, permet de corriger cette difficulté²².

1.2. La plante *Meiogyne cylindrocarpa* Burck

1.2.1. Données phylogéniques et botaniques

La famille botanique des Annonaceae appartient à la sous-classe des Magnolidae et à l'ordre des Magnoliales, ce qui en fait une angiosperme primitive.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnolipsidae
Sous-classe	Magnolidae
Ordre	Magnoliales
Famille	Annonaceae
Genre	<i>Meiogyne</i>²³

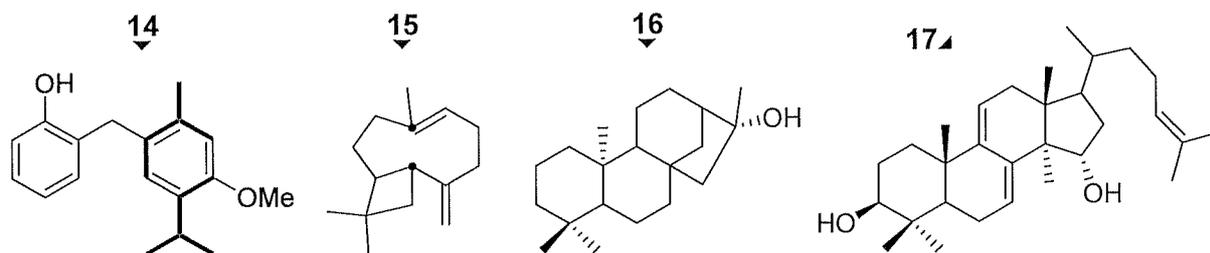


Fig. 13. — *Meiogyne cylindrocarpa* Burck.

Cette vaste famille comprend plus de 2 440 espèces distribuées dans 120 genres environ, morphologiquement homogènes, avec des caractères archaïques et présentant la même répartition géographique. Ce sont des arbres, arbustes ou lianes ligneuses qui peuplent les forêts tropicales ou subtropicales. Ils sont facilement reconnaissables à leur écorce aromatique, leurs feuilles simples alternes et leurs fleurs trimères souvent parfumées, regroupées par deux, trois ou quatre en inflorescences. L'organisation interne des fleurs est à l'origine d'une division en deux sous-familles : celle des Monodoroideae (*Isolona* et *Monodora*) se caractérise par des pièces femelles soudées entre elles, contrairement à celle des Annonoideae (*Annona*, *Uvaria*, *Polyaltha*, *Meiogyne*) où ces organes sont libres²⁴.

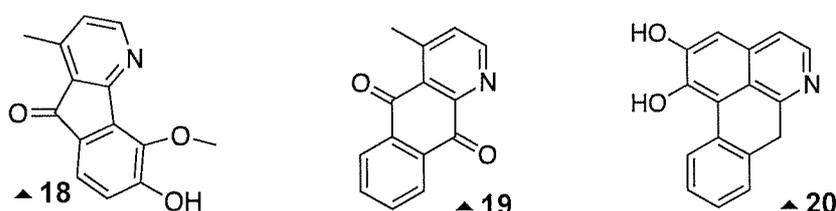
Meiogyne est proche sur le plan phylogénétique des genres *Uvaria* et *Fissistigma*. Il est originaire d'Asie tropicale et comprend des arbres et arbustes persistants, aux feuilles caractérisées par leurs veines transversales proéminentes. Les fleurs sont solitaires ou groupées par deux ou trois en inflorescences axillaires. Il comprend au moins quatorze espèces dont *Meiogyne cylindrocarpa* Burck (synonymes : *Mitrephora cylindrocarpa* Burck et *Polyaulax cylindrocarpa* Backer²⁵), que l'on rencontre à Sumatra, Java, Bornéo jusqu'en Nouvelle Guinée, la côte ouest du Pacifique et le nord de l'Australie²⁵.

Quant aux métabolites d'origine terpénique, ils comprennent des monoterpènes, dont le chamanène **14** issu d'*Uvaria Chamae*, des sesquiterpènes (β -caryophyllène **15**), des diterpènes [(-)-kauran-16 α -ol **16**], et des triterpènes, tel le polycarpol **17**, considéré comme un marqueur chimiotaxonomique de la famille des Annonacées²⁴.



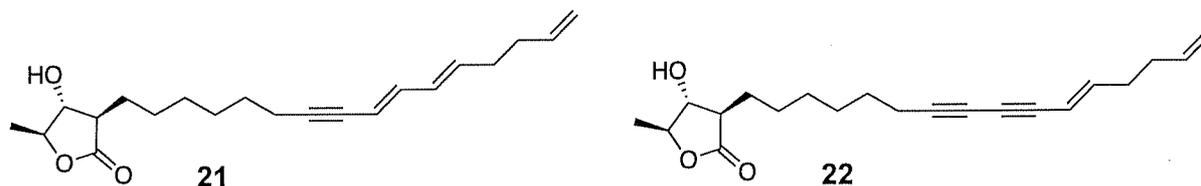
Peu de données phytochimiques existent actuellement sur le genre *Meiogyne stricto sensu*.

À partir d'un extrait d'écorce de *M. virgata* de Malaisie, il a été mis en évidence la présence de divers alcaloïdes, dont une nouvelle azafluorène, la kinabaline **18** mais aussi des structures de type azaanthraquinone comme la cléistopholine **19** et aporphinique, dont l'oxoaporphine **20**²⁸.



L'étude d'un extrait d'écorce de *Meiogyne bailloni*, issu de Nouvelle-Calédonie, conduite à l'ICSN, a confirmé la présence d'alcaloïdes aporphiniques mais aussi de dérivés aristolactames, déjà connus dans les genres phylogénétiquement proches de *Meiogyne* (données non publiées).

D'autres travaux, menés sur un extrait d'écorce de *Meiogyne cylindrocarpa*, de Malaisie, ont permis d'isoler des ényne- γ -lactones, comme la sapranthine G **21** et des énediène- γ -lactones, la sapranthine A **22**²⁹ ainsi que des dimères de sesquiterpènes³⁰. Ils seront décrits plus loin dans ce mémoire.

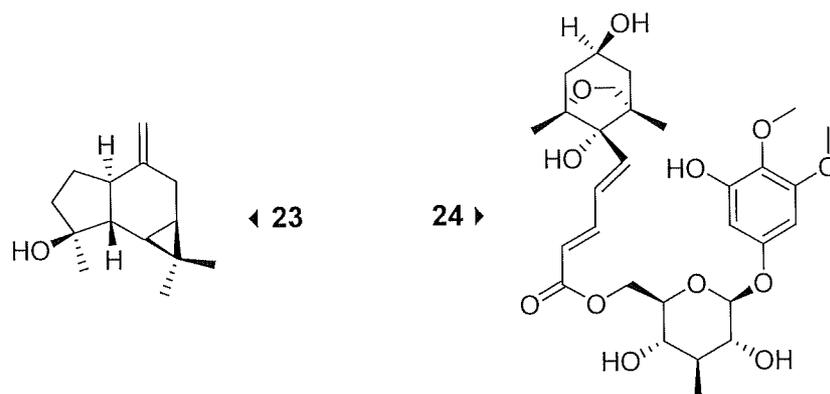


De plus, un examen des données publiées, prenant en compte les synonymes de *Meiogyne* met en évidence plusieurs métabolites.

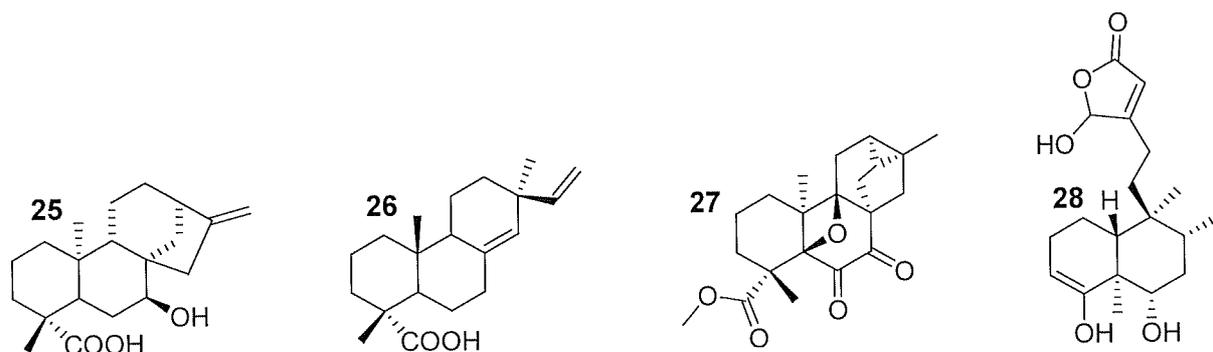
Le genre *Polyaulax* ne possède qu'une seule espèce décrite, *P. cylindrocarpa*, le synonyme de *M. cylindrocarpa*²⁶.

Le genre *Mitrephora* contient davantage d'espèces : le site Internet *The plant list* en dénombre quatre-vingts mais indique que pour la plupart le statut de l'espèce est inconnu. Il se peut que des synonymies n'aient pas encore été établies²⁶. Divers types de métabolites secondaires ont été décrits dans ce genre, où l'on fait mention de lignanes et dérivés de la voie shikimique^{31,32,33}, de polyacétate acides et esters, ainsi que des acétogénines^{34,35,36} mais également d'alcaloïdes, majoritairement de type aporphinique^{31,33,35,37} ou azafluorène³⁸.

En ce qui concerne les terpènes, un sesquiterpénoïde a été isolé chez *M. maingayi*, le spathuléol **23**³¹, un second, la thorelinine **24**, extrait de *M. thorellii*³².



Plusieurs diterpènes, représentés par différents squelettes, sont connus : kaurane ou *ent*-kaurane, (acide (-)-16-hydroxykaurèn-19-oïque **25**)³¹, pimarane et dérivés, (acide (+)-pimarique **26**)³¹, *ent*-trachylobane/trachylobane (mitréphorone A **27**)³⁵, et clérodane, tel l'acide 6 α ,16,18-trihydroxycléroda-(3-4)-(13-14)-dièn-15,16-olide **28**³⁹.



Afin d'élargir ces données, compte tenu de la proximité phylogénique des genres *Meiogyne*, *Uvaria* et *Fissistigma*, il est intéressant de se pencher plus spécifiquement sur les métabolites isolés à partir de plantes de ces deux derniers genres.

D'après Leboëuf, le genre *Uvaria* contient différents types de composés : acétogénines, flavonoïdes, alcaloïdes de type bis-benzyltétrahydroisoquinoléine ou dérivés d'aporphine, ainsi que des triterpènes, ou oligomères de terpénoïdes²⁴.

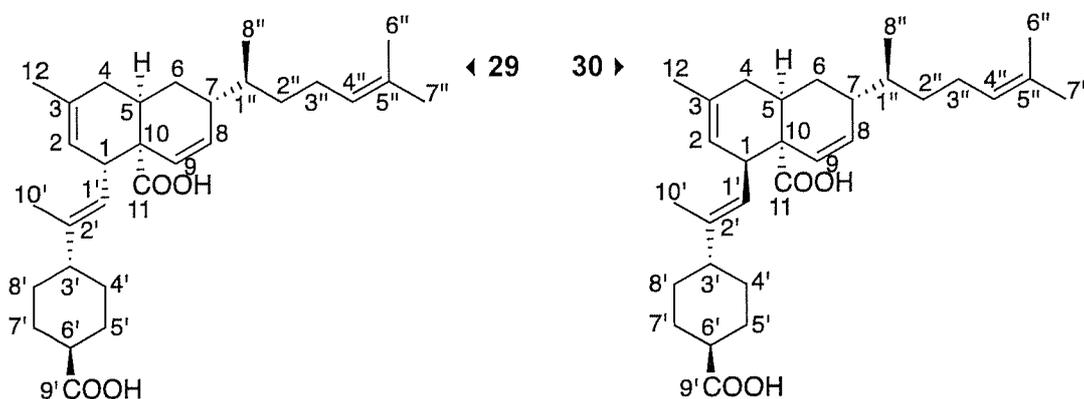
Quant au genre *Fissistigma*, il y est démontré la présence de divers composés : aristolactames et aporphines chez *F. oldhamii*⁴⁰, dérivés de phénanthrène et dihydrochalcones⁴¹, mais aussi des composés mixtes sesquiterpène et flavonoïde, les fissistigmatines⁴².

Du bilan de cette étude bibliographique, il ressort que la diversité chimique au sein des métabolites secondaires des genres *Meiogyne* et apparentés est vaste. Cependant, plusieurs familles de composés sont partagées par les plantes étudiées, comme les alcaloïdes aporphiniques et les terpènes. Pourtant, des particularités existent : par exemple, la production de dimères d'unités sesquiterpènes qui semble réservée à *M. cylindrocarpa*.

1.2.3. Travaux antérieurs sur *Meiogyne cylindrocarpa*

La recherche d'inhibiteurs de la protéine antiapoptotique Bcl-xL a conduit à l'étude de l'extrait d'écorce de *Meiogyne cylindrocarpa*. L'extrait, fractionné par bioguidage, a mené à la purification de deux composés de formule brute $C_{30}H_{44}O_4$: la méiogyne A **29** et son épimère sur la position 1, la méiogyne B **30**. Leur origine est terpénique : il s'agit d'un dimère de sesquiterpènes, formant un bicyclic *cis*-décaline.

La méiogyne A **29** présente plusieurs centres d'asymétrie portés par les carbones 1*R*, 5*S*, 7*S*, 10*S* et 1''*S* et son pouvoir rotatoire $[\alpha_D]$ est de -281 (0,12 CH_2Cl_2)³⁰.



Une hypothèse de biosynthèse de la méiogyne A a été formulée (fig. 14). Deux unités sesquiterpène de type zingibérène et bisabolane subissent une cyclo-addition [2-4] de Diels-Alder. La première présente une fonction diénophile alors que la seconde possède un triène (en violet).

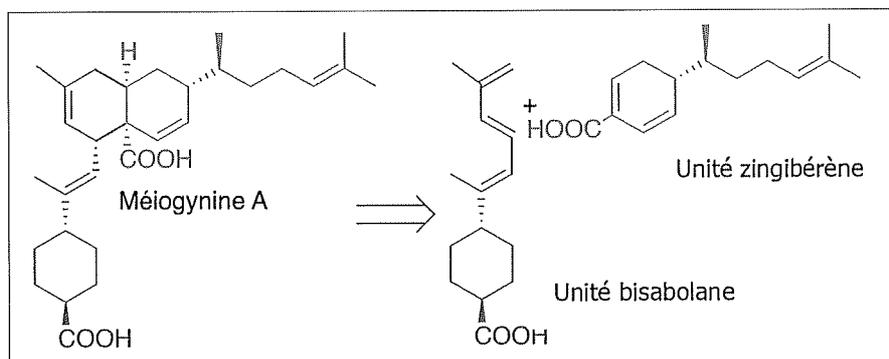


Fig. 14. — Hypothèse biosynthétique de la méiogyne A.

L'addition *endo* des deux unités est majoritaire, ce qui indiquerait un contrôle de la sélectivité faciale, probablement à cause de la présence de la chaîne latérale du diénophile : le triène aurait une approche en *anti*. Ces hypothèses ont été confirmées lors de la synthèse totale de la méiogynine A, de même que sa configuration absolue⁴³.

Une voie de biosynthèse des unités sesquiterpéniques est proposée figure 15.

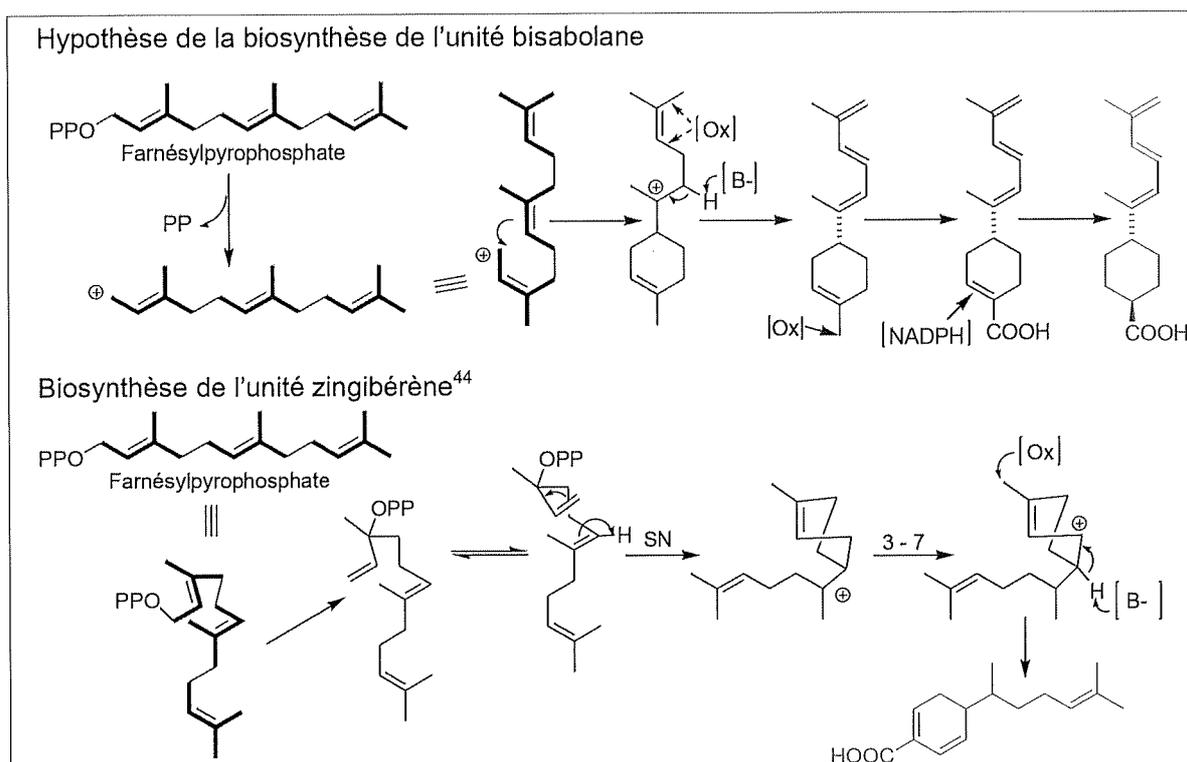


Fig. 15. — Hypothèse de biosynthèse des unités sesquiterpéniques de la méiogynine A.

Pour la sous-unité bisabolane, le précurseur farnésyl-pyrophosphate se cyclise pour former un cyclohexène et est oxydé à proximité de la double liaison. Le proton en α du carbocation est attaqué par une base, ce qui permet de rétablir la neutralité électrique du composé. Le méthyle que porte ce cycle est oxydé en acide carboxylique et sa double liaison est réduite.

Quant à l'unité zingibérène, elle se cyclise consécutivement à une substitution nucléophile. La charge positive migre du carbone 7 au carbone 3, et est neutralisée par l'attaque d'une base sur le proton en α , permettant d'obtenir un cyclohexanediène, formant le diénophile. Une oxydation sur le méthyle du cycle apporte une fonction acide carboxylique à la molécule.

D'un point de vue biologique, la méiogynine A possède une activité intéressante dans la régulation de l'apoptose, concernant notamment la protéine Bcl-xL, avec une concentration inhibitrice $CI_{50} = 2,9 \mu M$ ⁴³. Par ailleurs, le gossypol agit sur cette cible avec une $CI_{50} = 0,42 \mu M$ et l'Obatoclax® a une CI_{50} égale à $4,7 \mu M$ ¹⁷. Des études de modélisation moléculaire sur l'interaction entre la méiogynine A et Bcl-xL ont permis de guider la synthèse d'analogues vers des inhibiteurs plus actifs de cette protéine.

La recherche d'analogues naturels de la méiogynine permettra de compléter la série existante et d'approfondir les relations de structure – activité sur la protéine-cible.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

Le lot KL 4405 d'écorce de *Meiogyne cylindrocarpa* étudié a été récolté dans une forêt de Malaisie, à Mersing, Johore, le 20 sept.1994. La plante a été identifiée par le Dr J. A. Kessler (Leiden). Une part d'herbier a été déposée à l'Herbarium du *Forest Research Institute* et à l'Herbarium National des Pays-Bas, Leiden (réf. KL-4405).

2.2. Extraction

L'extrait a été réalisé à partir de 670 g d'écorce broyée de *Meiogyne cylindrocarpa*, sur un appareil Zippertex®, dans les conditions suivantes : 3 x 4 litres d'AcOEt, cycle de 1 h 30 à 40 °C et 100 bars.

Afin d'éviter des interférences lors de tests biologiques, une filtration sur gel de polyamide a été effectuée, pour éliminer les tanins, souvent responsables de faux positifs par précipitation des protéines.

2.3. Fractionnement de l'extrait

2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Il s'agit d'une technique chromatographique d'adsorption : les molécules déposées sont adsorbées sur une phase stationnaire et y sont éluées par une phase mobile.

Plusieurs supports peuvent servir de phase stationnaire : silice, silice greffée par des radicaux C18, gel de polyamide...

Les solvants d'éluion choisis sont souvent un mélange de solvants pour obtenir des caractéristiques de polarité ou d'apolarité globales satisfaisantes pour la migration des solutés déposés.

Des CCM sont réalisées sur des plaques de silice 60 F254 Merck® de 0,25 mm d'épaisseur pour contrôler les extraits et fractions après chaque étape de purification. Elles sont révélées d'abord par exposition à de la lumière UV à 254 nm (extinction de fluorescence) et à 366 nm (fluorescence), puis par pulvérisation de vanilline sulfurique suivie de chauffage.

La vanilline sulfurique est un révélateur universel qui présente la particularité de colorer les terpènes en bleu⁴⁵. Les analogues de la méiogyne sont de nature terpénique : la coloration en bleu de taches sur les CCM donnerait une indication sur la présence de composés d'intérêt dans les fractions étudiées.

2.3.2. Chromatographie Flash

La chromatographie flash est une technique de chromatographie d'adsorption sur silice qui permet de séparer des composés en fonction de leur affinité pour ce matériau. Les solvants utilisés ont une force ionique croissante, allant de très apolaire à très polaire. Les composés apolaires sont élués les premiers hors de la colonne par la phase mobile, alors que les composés polaires sont élués les derniers. Une pompe reliée au système maintient une pression constante en amont de la colonne, permettant de séparer des composés qui n'auraient pu l'être à pression atmosphérique.

Le fractionnement de l'extrait a été réalisé sur un appareil Combiflash® en phase normale, sur colonne de silice Chromabond® 120 g à partir de 30 g (2 x 15 g) d'extrait brut filtré. La phase mobile est constituée d'un mélange d'Hept/AcOEt/MeOH en gradient (tabl. 1), à un débit de 85 ml/min. Le mélange de solvants élué est recueilli dans des tubes à essais grâce à un collecteur automatique.

Tableau 1. Composition de la phase mobile, chromatographie flash du fractionnement.

% Heptane	% Acétate d'éthyle	% Méthanol	Temps cumulés (min)
80	20	0	0
80	20	0	7
70	30	0	11,5
70	30	0	16
50	50	0	50
50	50	0	57
0	100	0	80
0	100	0	87
0	95	5	110
0	95	5	117
0	50	50	138

2.3.3 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Il s'agit d'une technique de séparation des molécules d'un mélange par différence d'affinité entre une phase mobile, le solvant d'éluion, et une phase stationnaire contenue dans une colonne. Une pompe est installée en amont de la colonne pour assurer un débit de solvant d'éluion, tandis qu'un détecteur est disposé en aval de la colonne pour traduire l'arrivée d'une molécule par un pic sur le chromatogramme.

Différents paramètres augmentent les performances par rapport à une chromatographie flash : la faible granulométrie de la phase stationnaire, la pression à l'intérieur de la colonne et le seuil de détection de ce système, qui est plus bas.

Les profils chromatographiques des fractions ont été réalisés sur une chaîne CLHP Waters™ Alliance®, équipée de deux systèmes de détection : un détecteur ultra-violet visible à barrettes de diodes (Waters 2489) et un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) (Waters 2424). L'avantage que présente le détecteur à barrettes de diodes est de fournir, pour chaque composé élué, une simulation de spectre UV. Cette information peut permettre de le rattacher à une famille de molécules de façon certaine. Le DEDL a un seuil de détection plus bas que le détecteur UV.

La colonne analytique employée est une colonne Sunfire® (4,6 x 250 mm), avec une phase stationnaire greffée en C18 (5 µm de diamètre). La phase mobile est un mélange ACN/H₂O acidifié par 0,1 % AF, en gradient de 60 % d'acétonitrile à 100 % sur 35 min.

2.3.4. Évaluation de l'activité biologique

Afin de pouvoir concentrer les efforts de recherche sur les fractions qui peuvent contenir des inhibiteurs de Bcl-xL, leur activité biologique a été évaluée. Seules celles dont l'activité est remarquable sont étudiées. C'est le principe du bioguidage.

Des essais permettent de connaître le pourcentage d'inhibition d'un extrait, d'une fraction ou d'un composé par rapport à la protéine antiapoptotique Bcl-xL. Pour évaluer cette activité, un test biologique reposant sur la polarisation de fluorescence, a été mis au point au laboratoire (ICSN) d'après les travaux de Guo⁴⁶.

Une petite molécule fluorescente en solution est animée de mouvements de rotations rapides. Lorsqu'elle est excitée, la fluorescence est émise dans toutes les directions de l'espace. C'est le cas du peptide marqué à la fluorescéine du test.

Une molécule fluorescente de taille plus conséquente aura une rotation plus lente, ce qui implique que sa fluorescence n'est émise que dans une seule direction : elle est polarisée. C'est ce qui se produit lorsque le peptide fluorescent se fixe sur Bcl-xL.

La compétition entre l'inhibiteur potentiel et le peptide marqué modifie la proportion de peptide libre, et ainsi les propriétés de fluorescence de la solution. La polarisation de fluorescence (FP) est évaluée grâce aux mesures de l'intensité émise dans le même plan de l'excitation (I//) et de celle émise dans le plan perpendiculaire (I⊥), selon l'équation suivante :

$$FP = \frac{I// - I\perp}{I// + I\perp}$$

La protéine (produite à l'ICSN) est mise en solution à 100 nM, le peptide marqué (peptide à façon, produit et purifié par Polypeptide) à 15 nM. Les fractions sont évaluées à 10 µg/ml alors que les produits purs le sont à 10 mM dans le DMSO 8 %. La réaction se fait dans un milieu tamponné (tampon phosphate à pH 7,4).

Deux types de résultats sont obtenus grâce aux valeurs d'intensité de polarisation de fluorescence (FP) :

$$\text{— pourcentage d'inhibition (\% inh)} = \frac{(\text{FP échantillon} - \text{FP blanc})}{(\text{FP ligand WT } 10^{-4} - \text{FP blanc})} \times 100$$

— CI_{50} déterminée graphiquement à partir des pourcentages d'inhibition d'une gamme de concentrations en échantillon à tester.

2.3.5. Criblage structure-guidé

Le criblage « structure-guidé » vise à connaître les fractions où les probabilités de trouver des composés d'intérêt sont élevées, grâce à la spectrométrie de masse, méthode de détermination de masses atomiques ou moléculaires.

En spectrométrie de masse, l'échantillon de produit à analyser est soumis à une source d'ionisation ; les ions ainsi produits sont exposés à un champ électrique et/ou magnétique qui les dévie selon leur rapport m/z dans l'analyseur. En outre, on peut aussi chercher à fragmenter les ions dans une chambre de collision : il s'agit alors de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Le traitement du signal donne un spectre de masse sur lequel sont reportées les abondances des ions formés en fonction de leur rapport m/z croissant.

En ce qui concerne la méiogynine A, un fragment issu d'une réaction de rétro-Diels-Alder (RDA) correspondant à la partie sud de la structure (en rouge, fig. 16), a été constamment observé sur les spectres de masse de tous les analogues de la méiogynine déjà isolés à l'ICSN. On peut raisonnablement penser qu'il est caractéristique de cette famille de composés. Nous en concluons que s'il est détecté dans une fraction, elle contient probablement un analogue de la méiogynine A.

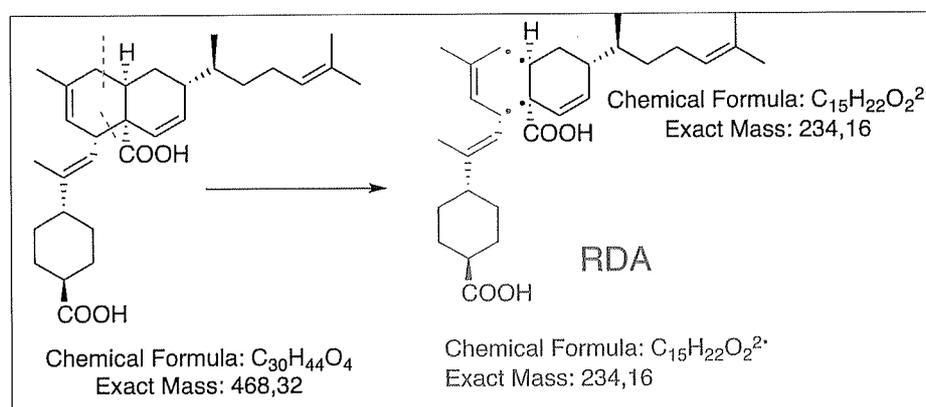


Fig. 16. — Fragmentation de la méiogynine A : réaction de Rétro-Diels-Alder (RDA).

Ce criblage, effectué en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS²), été réalisé en deux étapes : l'étude du fragment de rétro-Diels-Alder (RDA) et celle de l'extrait brut.

L'étude du fragment RDA à partir de la méiogynine A (1 mg/ml) a nécessité l'emploi d'un appareil de chromatographie liquide ultra-haute pression (UPLC) Waters™ Acquity®, couplé à un spectromètre de masse Acquity TDQ® triple quadropôle, ainsi qu'à un détecteur UV-visible et DEDL, en mode « Parent scan » ou « Precursor Ion Scan » qui met en évidence la masse de l'ion moléculaire d'où est issu le fragment RDA.

Ce fragment présente plusieurs formes (fig. 17) :

- [RDA+2Na-H]⁺ à m/z 279,07 en ionisation positive (spectre du haut) ;
- [RDA-H]⁻ à m/z 233,08 en ionisation négative (spectre du bas).

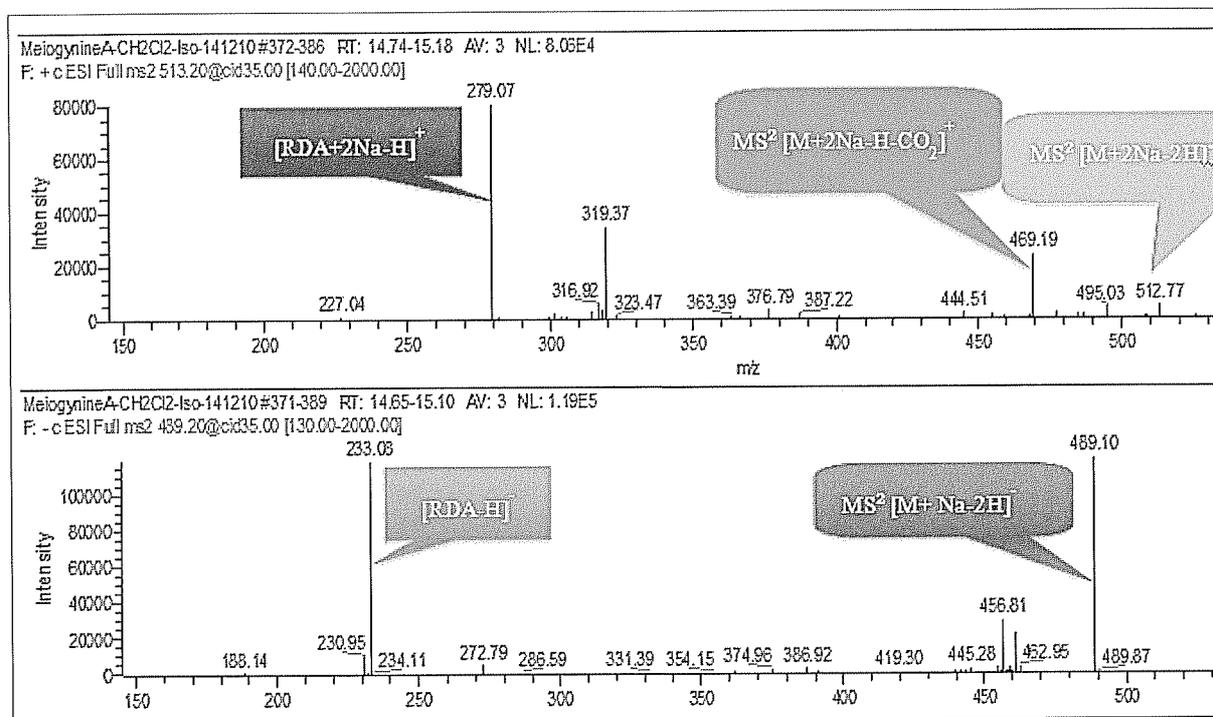


Fig. 17. — Spectre de masse de la méiogynine A (fragmentation ESI).

Un manque de sensibilité sur l'Acquity TDQ® implique le changement de type d'appareil pour rechercher ce fragment issu d'analogues de méiogynine minoritaires dans l'extrait. Sur un spectromètre de masse de type Orbitrap®, la fragmentation en mode négatif conduit à un ion différent : [RDA-H+Na] à m/z 257,15.

Pour l'extrait brut (1 mg/ml), l'étude a été réalisée à l'aide d'un appareil HPLC Waters™ couplé avec l'Orbitrap®. Une liste de rapports m/z pouvant correspondre à des analogues de la méiogynine est établie en prenant en compte les données disponibles sur ces molécules (tabl. 2).

Tableau 2. Récapitulatif des données sur les analogues de la méiogynine a connus.

Type de méiogynine	Formule brute	M	[M-H] ⁻ à m/z	[M+Na-2H] ⁻ à m/z	[M+Na] ⁺ à m/z
A/B	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468,32	467,31	489,3	491,31
Mono-hydroxylation	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	484,32	483,30	505,29	507,31

Cette liste permet de cibler les molécules à fragmenter car l'Orbitrap® ne permet pas de travailler en *Parent scan*. Grâce au système chromatographique (colonne C18 Waters™ Sunfire® 150 x 4,6 mm, 5 µm, ACN/H₂O + 0,1 % AF de 80:20 à 100:0 pendant 25 min, puis palier de 24 min à 250 µl/min) en amont du spectromètre de masse, un temps de rétention est associé à chaque ion parent puis comparé aux temps de rétentions des pics des chromatogrammes obtenus par CLHP analytique des fractions.

2.4. Purifications

2.4.1. Flash chromatographie

L'appareil utilisé est le même que pour le fractionnement. Les colonnes ont une phase stationnaire de silice Grace®. Différentes tailles de colonne et phases mobiles sont employées selon les fractions à purifier en phase normale.

A. Purification de 8,7 g de fraction 2-2 par le gradient suivant (tabl. 3), sur une colonne de 80 g. Le débit est de 60 ml/min.

Tableau 3. Composition de la phase mobile A

% Heptane	% Acétate d'éthyle	% Méthanol	Temps cumulés (min)
80	20	0	0
70	30	0	30
0	100	0	40
0	100	0	46
0	80	20	55
0	80	20	58

B. Purification de 2,2 g de fraction 2-3 sur une colonne de 24 g, en gradient, avec un débit de 30 ml/min, (tabl. 4).

Tableau 4. Composition de la phase mobile B

% Méthanol	% Dichlorométhane	Temps cumulés (min)
0	100	0
5	95	40
5	95	50
10	90	63
50	50	70

C. Purification de 1,1 g de fraction 15-2, en gradient (tabl. 5), sur le même type de colonne et le même débit que précédemment.

Tableau 5. Composition de la phase mobile C

% Méthanol	% Mélange CH ₂ Cl ₂ /MeOH 99:1	Temps cumulés (min)
0	100	0
0	100	25
5	95	33
5	95	46
10	90	50
10	90	55

2.4.2. Précipitation

La précipitation repose sur le principe suivant : un solide peut être insoluble dans un solvant à froid, mais soluble dans ce même solvant à chaud. Lorsqu'il est dissous à chaud, le refroidissement permet la formation de particules du solide de départ. La recristallisation en est un cas particulier, nécessitant un refroidissement très lent.

Cette propriété de précipitation peut être mise en application en vue de séparer les constituants d'un mélange simple, ou de diminuer la quantité d'un composé très majoritaire dans une fraction.

Sur 1,8 g de fraction 8-2, 20 ml d'acétonitrile sont introduits à chaud. Après refroidissement à température ambiante, le précipité obtenu est filtré sur coton hydrophile et lavé à l'acétonitrile froid. Le filtrat est retravaillé de la même façon deux fois. La dernière étape implique une centrifugation (centrifugeuse Toutlemonde® à vitesse moyenne, 10 min) pour séparer efficacement la phase solide de la phase liquide.

2.4.3. Chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne (CC) est une chromatographie d'adsorption : les composés d'un mélange interagissent avec la phase stationnaire de silice et une phase mobile de force ionique croissante en phase normale. Les composés sont élués du plus apolaire au plus polaire.

Une colonne de gel de silice Merck™, avec une granulométrie fine (6-35 µm) en phase normale est employée pour purifier 264 mg de précipité 10-1 (diamètre colonne : 20 mm) puis 1,7 g de filtrat 10-2 (25 mm), sous une pression de 400 mbar. La phase mobile, par paliers de 3 volumes colonne (respectivement 135 ml et 140 ml) est décrite dans le tableau 6. Le mélange de solvant élué est recueilli dans des tubes à essais grâce à un collecteur automatique.

Tableau 6. Composition de la phase mobile de la CC.

% Dichlorométhane	% Méthanol
100	0
99,5	0,5
99	1
98	2
97	3
96	4
95	5

2.4.4. CLHP préparative

La CLHP préparative repose sur le même principe de que celui d'une CLHP analytique, à la différence près que l'éluat est récupéré de façon à séparer les composants du mélange étudié.

La purification de la fraction 16-5 (200 mg) a été réalisée par cette technique sur une chaîne chromatographique Waters™ Autopurif®. La colonne choisie est une Sunfire® préparative (C18, 250 x 19 mm, 10 µm). La phase mobile isocratique est un mélange MeOH/ACN/H₂O 10:55:35 acidifiés par 0,1 % d'acide trifluoroacétique, à un débit de 17 ml/min. La collecte a été effectuée sur des tubes, grâce à un collecteur semi-automatique en mode manuel.

2.4.5. Chromatographie sur couche épaisse (CCE)

Cette technique a le même principe qu'une CCM, c'est-à-dire de séparer les composés d'un mélange. De plus, elle permet de déposer de plus grandes quantités de soluté et aussi de pouvoir récupérer les produits séparés. Il suffit de gratter la phase stationnaire après migration et révélation des composés de la plaque.

La CCE est mise en œuvre pour purifier les fractions 19-3 (14,8 mg) et 19-5 (26,5 mg), sur plaque de silice 60 F254 (Merck®) avec 1 mm d'épaisseur. Les phases mobiles sont respectivement Hept/AcOEt 1:1 +0,1 % AF et CH₂Cl₂/MeOH 95:5 +0,1 % AF. Une triple migration permet de focaliser les bandes. Elles sont révélées aux UV si possible, ou par la vanilline sulfurique sur une marge de la plaque. Après grattage des bandes utiles, les composés sont élués à l'acétone par filtration sous vide sur Büchner. Les solutions contenant les molécules d'intérêt sont ensuite séchées.

2.4.6. Chromatographie en phase supercritique (CPS)

La chromatographie en phase supercritique (CPS) repose sur le même principe chromatographique que la CLHP en phase normale, à ceci près que la phase mobile utilisée est un fluide à l'état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de température et de pression au-delà du point critique C (fig. 18, encadré vert).

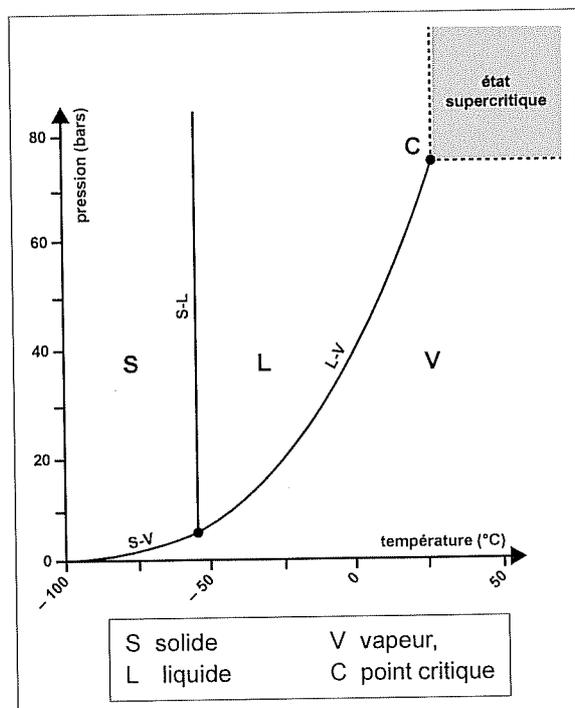


Fig. 18. — Diagramme d'équilibre des phases.

Les fluides supercritiques offrent des propriétés différentes que les phases mobiles liquides : ils ont une viscosité proche de celle des gaz, une masse volumique équivalente à celle des liquides et un pouvoir de solvation proche de celui des solvants organiques peu polaires. A titre d'exemple, on peut comparer le CO₂ supercritique à du benzène du point de vue chromatographique, avec des conditions d'utilisation plus sécurisantes puisqu'il n'est ni toxique, ni polluant, ni inflammable⁴⁷. Le risque encouru par l'utilisateur serait une anoxie provoquée par une fuite du CO₂, stocké sous forme de gaz, dans un local fermé.

Les purifications par CPS ont été réalisées sur un appareil Waters™ SFC-Thar Investigator®, muni d'un détecteur UV Waters™. La colonne utilisée a pour phase stationnaire de la silice greffée par de la 2-éthylpyridine (19 x 150 mm, 5 μm). La pression est stabilisée à 150 bars de CO₂.

Conditions A pour la fraction 16-4 (72,7 mg): température du four à colonne à 40 °C, cosolvant : éthanol en gradient de 22 à 30 % sur 8 min.

Conditions B pour la fraction 27-6 (12,6 mg) : température à 25 °C et cosolvant MeOH/EtOH 1:1 en isocratique à 18 %.

2.5. Éluclidation structurale

Déterminer la structure d'une molécule demande plusieurs analyses. En complément de la spectrométrie de masse et de la RMN, les spectres infrarouge et UV apportent des informations sur les fonctions chimiques que porte la molécule étudiée, et le pouvoir rotatoire permet de connaître la configuration absolue de la structure. Ces derniers renseignements n'ont pas pu être obtenus lors de nos travaux, ce qui explique que seules la spectrométrie de masse et la RMN sont détaillées.

2.5.1. Spectrométrie de Masse Haute Résolution par Électro-Ionisation

La source d'ionisation utilisée permet de conserver l'ion moléculaire intact et de connaître ainsi la masse du composé étudié. La haute résolution est obtenue grâce à l'analyseur à temps de vol (*Time of Flight* ToF) et donne une grande précision sur la masse du composé, permettant de calculer la formule brute.

Les spectres de masse Haute Résolution par Electro-ionisation sont acquis sur le spectromètre de masse ESI-ToF LCT Premier XE Waters™ en ionisation négative et positive, à la concentration de 50 ng/ml en by-pass, c'est-à-dire directement injectés dans le spectromètre de masse.

2.5.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

Différentes expériences de RMN ont été nécessaires pour identifier les composés isolés, comme la RMN du proton (^1H) et du carbone (^{13}C), obtenus grâce à la détection de l'absorption d'une radiation électromagnétique de faible énergie par un atome dont le noyau possède un *spin*, pour les expériences à une dimension. Des spectres à deux dimensions *CORrelation SpectroscopY* (COSY), *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC), *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC), *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy* (NOESY) et *Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY* (ROESY), ont été obtenus grâce à la superposition des données unidimensionnelles.

Les acquisitions ont été réalisées sur des spectromètres Bruker® Advance DPX-300 (RMN à 300 MHz), AMX-500 (RMN à 500 MHz) et AMX-600 (RMN à 600 MHz). Les échantillons à analyser ont été solubilisés dans du chloroforme- d_3 , du méthanol- d_4 ou de l'acétone- d_6 . Les spectres ont été retraités grâce au logiciel NMRnotebook® version 2.7.

3. Résultats et discussion

3.1. Extraction

Les d'écorces de tronc de *Meiogyne cylindrocarpa* (670 g) ont été broyées et extraites à l'AcOEt pour obtenir 60 g d'extrait. Le rendement d'extraction est de 9 %. L'étude phytochimique a été conduite sur 30 g de cet extrait.

3.2. Fractionnement, criblages structure et bioguidés

Le fractionnement par flash chromatographie conduit à l'obtention de 13 fractions, avec un rendement de 100,0 % (tabl. 7).

Tableau 7. Bilan des masses du fractionnement de l'extrait brut.

Fraction	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11	2-12	2-13
Masse (g)	1,95	8,74	2,22	3,54	2,38	1,93	3,42	2,25	0,16	1,63	1,42	0,35	0,15

Pour définir les fractions à étudier en priorité, deux critères sont à prendre en compte : la détection de la présence d'analogues de la méiogynine, par des méthodes spectroscopiques et/ou une activité sur la cible biologique étudiée Bcl-xL.

Lors de l'analyse de l'extrait brut, on relie la présence de ce fragment à un ensemble de composés à différents temps de rétention. Les t_r ainsi obtenus se retrouvent en CLHP dans les fractions 2-1 à 2-4.

En complément, un criblage biologique est réalisé en parallèle, pour mettre en évidence l'activité des fractions sur la protéine antiapoptotique Bcl-xL. Les résultats de ce criblage sont présentés dans le tableau 8, sous forme de pourcentages d'inhibition (% inh moyens pondérés par l'écart-type, pour une concentration de l'échantillon à 10 $\mu\text{g/ml}$; trame bleue : fraction active).

Tableau 8. Résultats du criblage sur Bcl-xL.

Fraction	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	2-6	2-7	2-8	2-9	2-10	2-11	2-12	2-13
Bcl-xl (% inh)	24 $\pm 1,4$	41 $\pm 1,3$	22 $\pm 0,8$	23 $\pm 1,6$	16 $\pm 1,8$	11 $\pm 1,6$	7 $\pm 2,2$	2 $\pm 1,0$	-1 $\pm 1,1$	0 $\pm 0,5$	-1 $\pm 1,1$	-1 $\pm 0,5$	0 $\pm 1,1$

Un seuil de 20% a été fixé : il correspond à la valeur du pourcentage d'inhibition du peptide naturel de Bcl-xL pondéré par la valeur de deux écarts-types. Au-delà de ce seuil, les fractions sont considérées comme actives.

Le recouplement des résultats de ces deux criblages permet de sélectionner les fractions 2-1 à 2-4, actives et contenant probablement des analogues de la méiogynine. La fraction 2-2, la plus active sur Bcl-xL, a été étudiée en priorité compte tenu de sa masse importante.

3.3. Purifications

Lors des travaux réalisés à l'ICSN, seules les fractions 2-2 et 2-3 ont pu être étudiées. La figure 19 reprend les différentes étapes des purifications effectuées

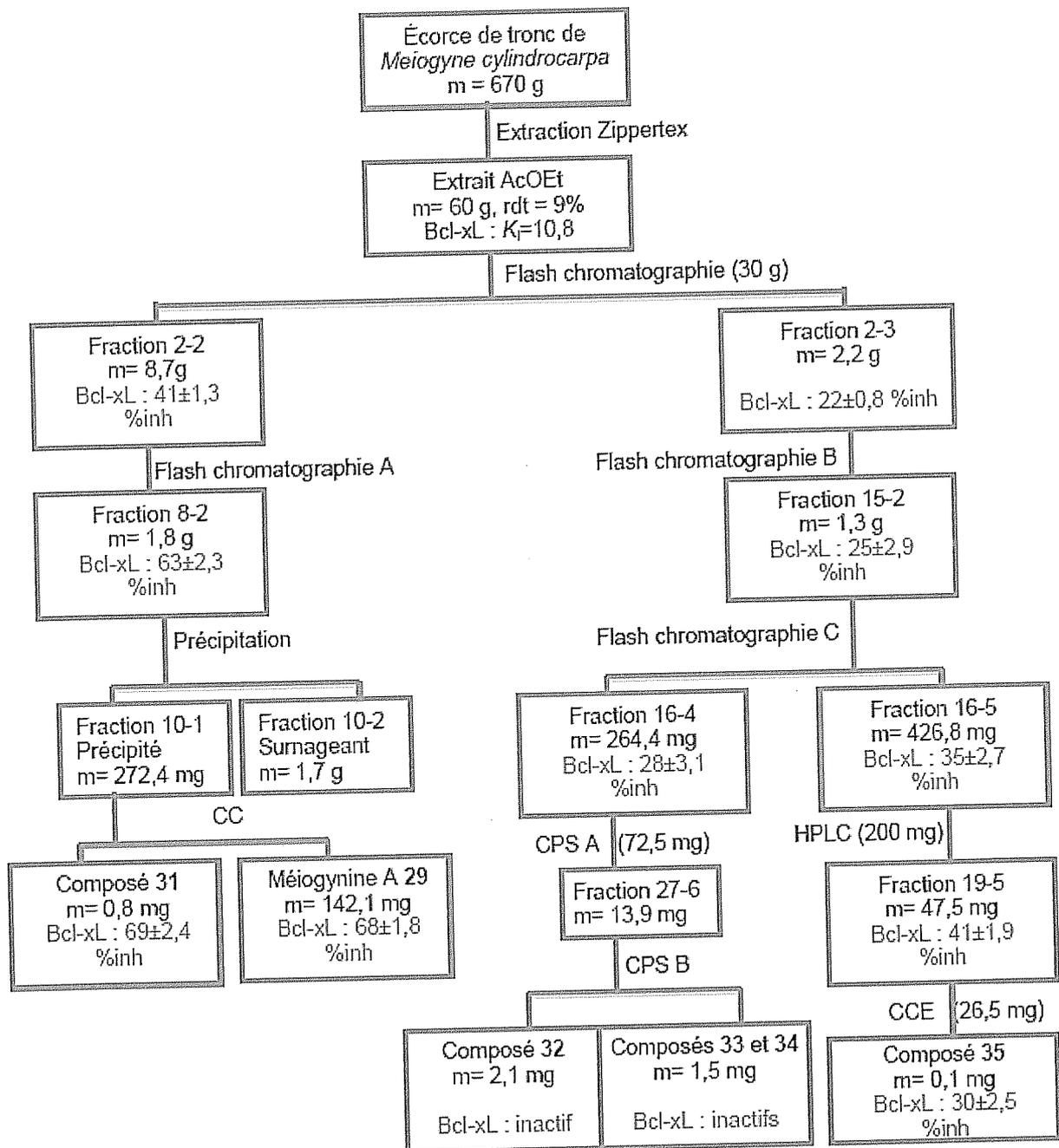


Fig. 19. — Schéma des purifications des fractions 2-2 et 2-3.

3.3.1. Fraction 2-2

Une chromatographie flash, entreprise sur silice avec la phase mobile A. a permis d'obtenir six fractions (tab. 9), avec un rendement de 87,2 %.

Tableau 9. Bilan des masses de la chromatographie flash de la fraction 2-2.

Fractions	8-1	8-2	8-3	8-4	8-5	8-6
Masse (mg)	981,7	1843,5	4089,2	470,3	165,6	66,9
Bcl-xL (% inh)	21±3,3	63±1,3	36±2,6	30±2,5	32±1,5	21±3,6

Le profil CCM de la fraction 8-2 montre un composant majoritaire, lequel, révélé en bleu par la vanilline sulfurique, est peut-être un analogue de méiogynine assez apolaire. De plus, son activité sur Bcl-xL est relativement importante.

Une réaction de précipitation permet d'obtenir un précipité blanc, dont le spectre ^1H RMN met en évidence deux composés principaux.

La purification du précipité par chromatographie sur colonne de silice conduit à l'obtention de quatre fractions (tabl. 10), avec un rendement de 99%.

Tableau 10. Bilan des masses de la CC du précipité.

Fractions	17-1	17-2	17-3	17-4
Masse (mg)	22,8	93,9	142,1	4,2

La fraction 17-3 correspond au composé **29**. Après dégraissage, la fraction 17-1 donne 0,8 mg du composé **31**.

La même chromatographie sur colonne employée sur le surnageant permettrait d'obtenir davantage de composé **29**, moyennant quelques purifications.

3.3.2. Fraction 2-3

Une chromatographie flash sur silice est entreprise avec la phase mobile B, sur la fraction 2-3 (2,2 g) avec un rendement de 75,4% (tabl. 11).

Tableau 11. Bilan des masses.
Chromatographie flash de la fraction 2-3.

Fractions	15-1	15-2	15-3
Masse (mg)	88,8	1385,8	183,5
Bcl-xL (% inh)	-3±2,3	25±2,9	27±4,2

La fraction 15-2, la plus abondante, est soumise à une seconde chromatographie flash sur silice, avec la phase mobile C. Cinq sous-fractions sont ainsi obtenues, avec un rendement de 100,0 % (tabl. 12).

Tableau 12. Bilan des masses.
Chromatographie flash de la fraction 15-2.

Fractions	16-1	16-2	16-3	16-4	16-5
Masse (mg)	119,9	124,8	211,4	264,4	426,8
Bcl-xL (% inh)	5±2,3	11±2,6	31±2,8	28±3,1	35±2,7

Seules les trois dernières sous-fractions présentent des taches bleues caractéristiques de terpènes en CCM (vanilline sulfurique) et ont une activité remarquable sur la protéine-cible.

3.3.3. Fraction 16-4

En raison des propriétés de solubilité des analogues de la méiogynine (quasiment insolubles dans l'eau et l'ACN), la solution qui semble la plus appropriée pour purifier cette fraction est une CPS semi-préparative (conditions A). Les six premières fractions correspondent aux pics collectés, la dernière aux pics minoritaires (tabl. 13). Le rendement est de 98,4%.

Tableau 13. Bilan des masses de la CPS de la fraction 16-4

Fractions	27-1	27-2	27-3	27-4	27-5	27-6	27-7
Masse (mg)	7,03	3,20	3,62	8,61	6,67	13,96	28,42

Pour vérifier que ces fractions contiennent des analogues de la méiogynine, un échantillon de chacune est passé en LC-MS. La priorité est donnée à la fraction majoritaire la plus abondante.

La fraction 27-6, $[M+NH_4]^+$ à m/z 502,3 est purifiée par une CPS préparative (conditions B) et donne quatre fractions (tabl. 14). Le rendement est de 50%.

Tableau 14. Bilan des masses de la CPS de la fraction 27-6

Fractions	32-1	32-2	32-3	32-4
Masse (mg)	2,10	0,50	1,53	2,19

La fraction 32-1 correspond au composé **32**, tandis que la fraction 32-3 correspond à un mélange des composés **33** et **34**.

Les autres fractions 27, bien que contenant des analogues de la méiogynine, n'ont pas pu être purifiées ; il aurait fallu pour cela, avoir recours à la CLHP préparative, car dans le cas présent, cette méthode permettant une séparation satisfaisante des composés, sans pour autant nécessiter de mises au point fastidieuses.

3.3.4. Fraction 16-5

Au premier abord, la technique de CLHP préparative pour purifier la fraction 16-5 ne paraît pas la mieux adaptée. La résolution obtenue avec un gradient acétonitrile/eau acidifié est intéressante, en revanche la faible solubilité des analogues de la méiogynine dans ce solvant laisse présager des pertes importantes de produit. Par ailleurs, si la mise en œuvre d'un gradient méthanol/eau acidifié améliore la solubilité, la séparation des pics chromatographiques n'est pas exploitable pour la collecte de fractions. Il faut donc envisager un compromis : une CLHP préparative dont la phase mobile est triple.

À partir de la fraction 16-5, six fractions, correspondant aux pics chromatographiques collectés, sont obtenues, alors que la fraction 19-7 renferme les composés minoritaires (tabl.15). Le rendement est de 100,0 %. L'activité des fractions majoritaires est évaluée par tests biologiques.

Tableau 15.
Bilan des masses de la CLHP préparative de la fraction 16-5.

Fractions	19-1	19-2	19-3	19-4	19-5	19-6	19-7
Masse (mg)	9,19	6,35	21,89	4,90	47,46	15,93	99,97
Bcl-xL (% inh)	10±2,7	5±1,7	28±2,2	4±2,2	41±1,9	18±1,6	Non testé

La fraction 19-5 montre une bonne activité sur Bcl-xL, et la CCM récapitulative de cette purification révèle deux composés majoritaires colorés en bleu par la vanilline. Ils présentent une différence importante de polarité qui permettrait de les séparer par une CCE.

Cette technique conduit à trois fractions, dont les deux premières sont issues des bandes correspondant aux composés d'intérêt (tabl. 16), avec un rendement de 100 %.

Tableau 16.
Bilan des masses de la CCE de la fraction 19-5

Fractions	21-1	21-2	21-3
Masse (mg)	13,75	3,07	9,68

Après purification, la fraction 21-1 donne 0,1 mg de composé **35**.

3.4. Détermination structurale

Dans ce chapitre, chaque composé isolé est étudié. La spectrométrie de masse permettant de déterminer la formule brute, puis l'interprétation des données RMN conduit ensuite à la structure des analogues de la méiogynine A.

Un tableau des déplacements chimiques δ_c et δ_H pour chaque composé, ainsi qu'une représentation des corrélations COSY, HMBC, ROESY ou NOESY sur la structure correspondante sont proposés dans les pages qui suivent.

3.4.1. Méiogynine A

Le spectre de masse HRESIMS montre un ion $[M+Na]^+$ à m/z 491,3134 dont on déduit la formule brute de $C_{30}H_{44}O_4$. Ces données ainsi que les spectres 1H et ^{13}C RMN, correspondent exactement à celles de la méiogynine A, déjà étudiée à l'ICSN (tabl. 17)³⁰.

Les attributions des déplacements chimiques (δ_C et δ_H) sont représentées sur la figure 20.

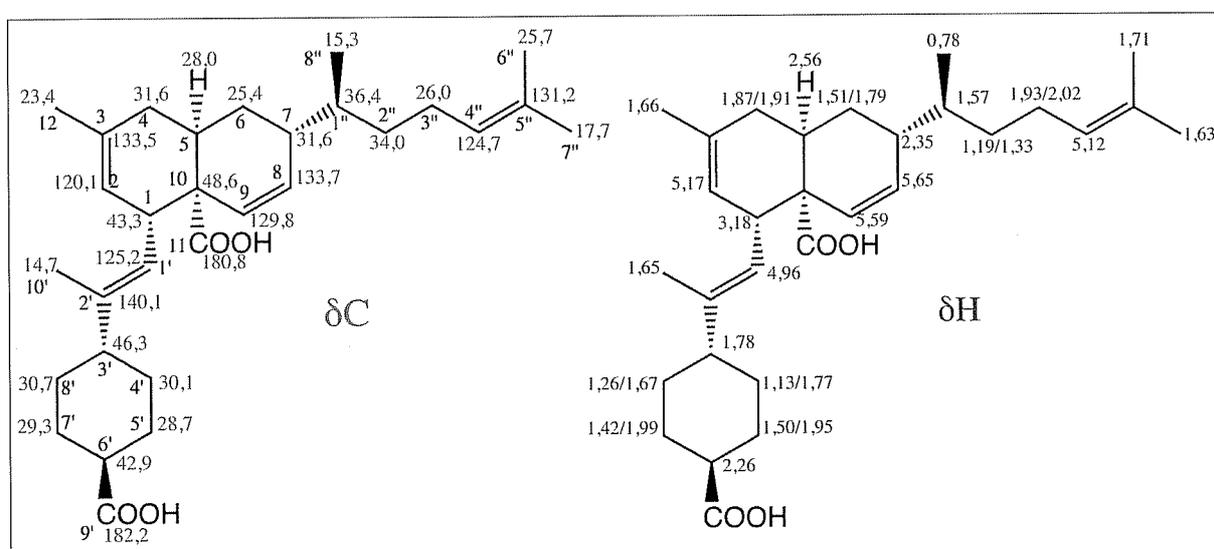


Fig. 20. — Déplacements chimiques de la méiogynine A 29 attribués.

3.4.2. Composé 31

Le spectre de masse HRESIMS montre un ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à m/z 465,3007 dont on déduit la formule brute de $C_{30}H_{42}O_4$. La comparaison avec la formule brute de la méiogynine A est en faveur d'une insaturation supplémentaire pour cet analogue.

Les spectres RMN présentent de nombreux signaux voisins de ceux de la méiogynine A, à quelques différences près (tabl. 18). On note l'apparition de signaux éthyléniques δ_C 130,7 ppm et δ_H 7,04 (1H) porté par le carbone δ_C 144,0 ppm, et la disparition du signal à δ_C 42,9 ppm correspondant au carbone 6' de la méiogynine A et d'un CH_2 cyclique. De plus, un signal à δ_C 174,2 ppm apparaît au détriment du signal à δ_C 182,2 ppm.

Ce nouveau signal à δ_C 182,2 ppm correspondant à un acide fortement blindé, corrèle avec le proton δ_H 7,04 sur le spectre HMBC. Cette double liaison est conjuguée avec ce carbonyle.

Le spectre COSY et les corrélations HMBC permettent de construire le squelette de la molécule et de confirmer la présence d'une double liaison sur le cycle de la partie sud (fig. 21).

Les corrélations ROESY jouent un rôle très important pour déterminer la configuration du carbone 3' : les intensités des signaux des protons à δ_H 2,04 et δ_H 4,96 sont équivalentes, ce qui suppose une possible rotation du cycle sur l'axe 2'-3'.

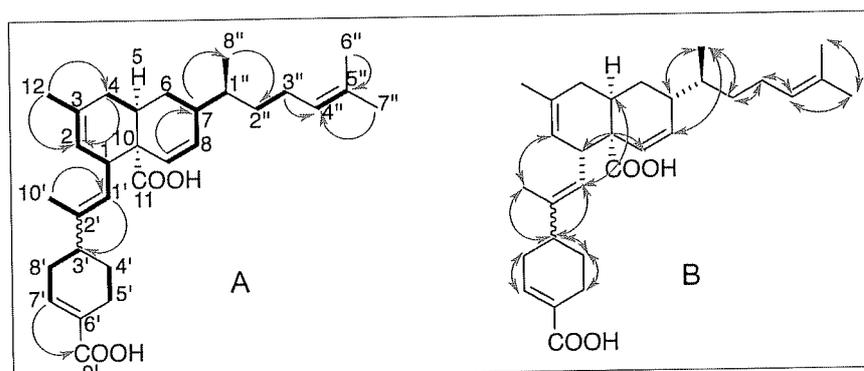


Fig. 21. — Composé 31

A : corrélations COSY (tracés gras) et HMBC (fléchage) ;
B : corrélations ROESY.

Le méthyle à δ_H 1,63 corrélant avec les protons 4' et 8' à la fois, comme le proton éthylénique à δ_H 4,96, indiquent une rotation libre au niveau de la liaison 2'-3' et n'apportent donc aucun renseignement sur la stéréochimie au niveau du carbone 3' et de la position de la double liaison ($\Delta_{5',6'}$ ou $\Delta_{6',7'}$).

3.4.3. Composé 32

Le spectre de masse HRESIMS montre un ion $[M+Na]^+$ à m/z 507,3121 dont on déduit la formule brute de $C_{30}H_{44}O_5$. La comparaison avec la formule brute de la méiogynine A sous-entend que cet analogue de la méiogynine est substitué par un hydroxyle.

Les spectres RMN présentent de nombreux signaux voisins de ceux de la méiogynine A, à quelques différences près (tabl. 19). Les signaux δ_c 82,8 ppm et δ_H 8,36 ppm (1H, s, OH) témoignent de la présence d'un hydroxyle sur un carbone aliphatique non cyclique. Sur le spectre HMBC, le carbone δ_c 82,8 ppm corrèle avec les méthyles δ_H 1,28 ppm, ce qui positionne l'hydroxyle sur le carbone 5".

On remarque ainsi que les carbones constitutifs de la double liaison de la chaîne latérale du composé 32 sont plus déblindés que ceux de la méiogynine A (δ_c 130,3 ppm et δ_c 136,9 ppm contre δ_c 124,7 ppm et δ_c 131,2 ppm) et portent chacun un proton à δ_H 5,63 ppm. Les corrélations HMBC entre les protons à δ_H 1,28 et le carbone à δ_c 136,9 ppm ainsi que δ_H 5,63 ppm et le carbone à δ_c 82,8 ppm positionnent la double liaison en 3"-4".

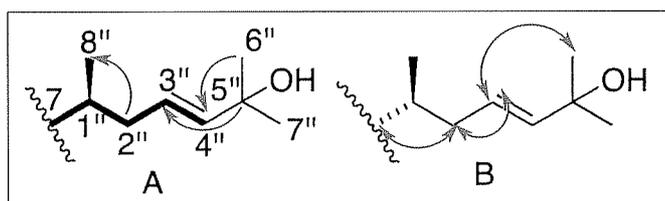


Fig. 22. — Chaîne latérale du composé 32

A. : corrélations COSY (tracés gras) et HMBC (fléchage) ;
B : corrélations ROESY

L'évaluation d'une constante de couplage entre les protons δ_H 5,63 ppm grâce au spectre COSY, donne une estimation de J de l'ordre de 15 Hz et indiquerait que les protons de cette double liaison sont en position *trans*.

Dans le cas d'une configuration *cis*, on s'attendrait à trouver une corrélation entre les protons des méthyles 6" et 7" et ceux portés par le carbone 2", ce que l'on n'observe pas dans notre cas. On suppose donc que cette double liaison est en *trans*.

3.4.4. Composés 33 et 34

Le spectre de masse HRESIMS de **33** et **34** montre un ion $[M+Na]^+$ à m/z 507,3146 pour chacun de ces composés, dont on déduit la formule brute de $C_{30}H_{44}O_5$. La comparaison avec la formule brute de la méiogynine A suppose que ces analogues de la méiogynine sont monohydroxylés.

Les spectres 1H et ^{13}C RMN mettent en évidence la présence de deux composés **33** et **34** correspondant à un mélange d'isomères. L'ensemble des spectres RMN indiquent de nombreux signaux voisins de ceux de la méiogynine A, moyennant quelques différences (tabl. 20).

En particulier, on observe deux nouveaux protons éthyléniques à δ_H 4,93 ppm (1H, d $J=3,2$ Hz) et δ_H 4,94 ppm (1H, d $J=3,2$ Hz) portés par un carbone à δ_C 114,4/114,2 ppm, caractéristique d'un exométhylène, ainsi que la perte d'un méthyle. On note également l'apparition d'un carbone à δ_C 90,9/90,8 ppm fortement déblindé, portant le proton à δ_H 4,19 ppm (1H, t $J=7,1$ Hz), qui traduit la présence d'un hydroxyle sur ce carbone.

Les corrélations HMBC entre les protons à δ_H 4,19 et le carbone à δ_C 114,4/114,2 ainsi que le proton à δ_H 1,65 et le carbone à δ_C 90,9/90,8 positionnent l'exométhylène en 5''-6'' et l'hydroxyle sur le carbone 4''. Les composés **33** et **34** correspondent aux deux isomères de l'hydroxyle en position 4''.

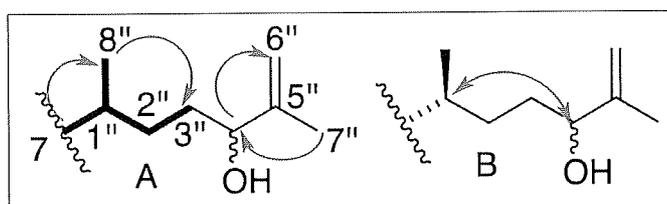


Fig. 23. — Chaîne latérale ces Composés **33** et **34**

A. : corrélations COSY (tracés gras) et HMBC (fléchage) ; B : corrélations ROESY

3.4.5. Composé 35

Le spectre ^1H RMN (300 MHz) montre des déplacements chimiques similaires à ceux des analogues de la méiogynine, en particulier à ceux des composés **33** et **34**. Cependant, on note quelques différences : deux signaux déblindés à δ_{H} 4,18 (1H, dd, $J=12,0$; 6,3) et 4,34 (1H, dd, $J=12,0$; 4,1) qui présentent un effet de toit, ainsi qu'un signal à δ_{H} 3,60 (3H, s) qui correspond à un $-\text{OCH}_3$, suggérant la méthylation d'un hydroxyle.

Afin de déterminer la nature de la modification de la chaîne latérale et la position du $-\text{OCH}_3$ sur celle-ci, l'acquisition d'un spectre de masse et l'enregistrement d'autres spectres RMN devraient être effectués prochainement.

3.5. Activité biologique des composés isolés

Le criblage sur la protéine Bcl-xL donne les résultats suivants (tabl. 21), à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau 21. Activité biologique des composés isolés

Composés	31	32	33/34	35	Méiogynine A 29
Bcl-xL (%inh)	69 \pm 2,4 %	inactif	inactifs	30 \pm 2,5%	68 \pm 1,8%

Le composé **31** a une activité sur Bcl-xL comparable à celle de la méiogynine A **29**, notre référence. Les composés hydroxylés **32**, **33** et **34** ainsi que le composé **35** sont moins actifs, voire inactifs. La chaîne latérale de la méiogynine A semble donc indispensable à l'interaction avec Bcl-xL.

En ce qui concerne le composé **31**, on peut affirmer que la présence d'une double liaison au niveau du cycle de la partie sud de la molécule conserve l'activité biologique.

On peut raisonnablement penser que l'hydroxyle porté sur la chaîne latérale des composés **32**, **33** et **34** s'oppose une interaction correcte de la molécule avec Bcl-xL : la polarité induite par ce groupement ne serait pas compatible avec l'hydrophobie du site de liaison de cette protéine.

L'activité modérée du composé **35** suggère que l'O-méthylation compense suffisamment les propriétés électronégatives de l'hydroxyle pour permettre la liaison de cette molécule au niveau de la poche hydrophobe de la protéine.

3.6. Discussion

3.6.1. Criblage structure-guidé

Les conditions mises en œuvre pour réaliser ce guidage ne sont pas optimales : le recours à différents spectromètres et différents appareils de chromatographie liquide en amont n'assure pas une parfaite reproductibilité des résultats.

Le travail sur l'échantillon de méiogynine A en *Parent scan* a révélé que la sensibilité du triple quadrupôle était trop faible pour poursuivre les investigations sur l'extrait brut ; or les molécules d'intérêt sont minoritaires et la réponse obtenue avec l'échantillon à 1 mg/ml est limitée. Travailler sur l'Orbitrap® permet de résoudre ce problème de sensibilité mais en provoque un autre. En effet, cet analyseur ne permet pas de réaliser de *Parent scan* : il a fallu cibler les masses à fragmenter, à partir du tableau 2, mais aussi à partir des masses jugées intéressantes sur le chromatogramme TIC de l'extrait.

L'idéal aurait été d'employer un spectromètre de masse triple quadrupôle équipé d'un piège à ions, où le *Parent Scan* aurait été plus efficace et plus sensible pour donner une liste exhaustive des ions pseudomoléculaires précurseurs du fragment de RDA. Il aurait aussi permis de mener toute l'analyse dans les mêmes conditions et assurer la reproductibilité des résultats. Ainsi, le fragment étudié aurait toujours été sous la même forme alors que le nombre d'adduits de sodium varie entre celui obtenu dans la source d'ionisation du spectromètre Acquity TDQ® et celle de l'Orbitrap®.

On peut également débattre de la constance de ce fragment de RDA chez les analogues de la méiogynine, admise jusqu'à la découverte du composé **31**. Ainsi la méconnaissance d'une famille de composés représente une limite au criblage structure-guidé par recherche de fragments jugés caractéristiques.

3.6.2. Origine de l'O-méthylation du composé **35**

Bien qu'il existe dans la nature des composés O-méthylés, l'emploi conjoint de méthanol et d'acide, lors des dernières purifications qui conduisent à ce composé, font douter de l'origine naturelle de son O-méthylation.

Pour vérifier l'hypothèse de l'artefact de purification, on compare le t_r du composé **35** avec le profil chromatographique d'une fraction d'où il est issu et qui n'a pas été mise en contact avec le méthanol, à savoir la fraction 2-3. Le temps de rétention en CLHP du pic correspondant au composé **35** est de 27,3 min, alors que rien n'est observé au même t_r sur le chromatogramme de la fraction 2-3. On en déduit que le OCH_3 est issu d'un artefact de purification.

Cela fait problème : le méthanol permet de solubiliser de nombreux analogues de la méiogynine, or cette capacité est exploitée lors de CLHP préparatives. L'artefact d'isolement est-il dû uniquement à la présence de méthanol ou bien nécessite-t-il une catalyse acide ? S'est-il produit lors de l'évaporation de la fraction conduisant à une concentration croissante en acide ? La réponse devrait être obtenue en étudiant un extrait méthanolique d'écorce de *M. cylindrocarpa* : si ce composé est retrouvé, on peut en conclure que l'acide n'est pas nécessaire pour produire cet artefact.

Dans le doute, il est préférable d'éviter d'employer le méthanol et de l'associer avec un acide. Ainsi, les CLHP envisagées pour purifier les fractions 27-1 à 27-5 auraient été réalisées avec une phase mobile triple ACN/MeOH/H₂O sans acide, en gradient de 40:10:50 à 80:20:0, le méthanol étant nécessaire pour améliorer la solubilité des composés dans la phase mobile. Une autre solution serait de mettre en œuvre une technique chromatographique différente, comme la CPS.

En effet, la CPS présente l'avantage de résoudre les problèmes de solubilité des analogues de la méiogynine. Elle permet de travailler sans acide et avec très peu, voire sans méthanol, du fait de la faible proportion de cosolvant mise en jeu ; cela implique aussi une utilisation raisonnée de solvants, par comparaison à des méthodes très consommatrices telle la CLHP.

Cependant, au vu de la complexité de la mise au point de ce type de chromatographie, elle perd de son intérêt pour purifier de petites fractions. Ainsi, pour connaître les conditions idéales, il faut prévoir un grand nombre d'injections qui permettront de sélectionner la colonne, la nature du cosolvant et sa proportion, la température et la pression de même que ses variations. Globalement, l'optimisation pour une CLHP préparative est moins fastidieuse et offre un gain de temps et une économie de la fraction à purifier.

En ce qui concerne les analogues de la méiogynine A, le choix de la CPS ou de la CLHP ne va pas de soi et est toujours le fruit d'un compromis.

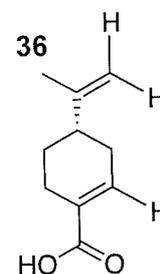
3.6.3. Composé 31 : comparaison avec l'acide périllique

Cette comparaison a pour but de déterminer la configuration du carbone 3' ainsi que la position de la double liaison sur le composé **31**. L'acide (-)-(S)-périllique **36** est un monoterpène, dérivé du limonène qui ressemble à la partie sud du composé **31**.

Dans le cadre d'une étude sur les terpènes utiles en santé humaine, il est évoqué que l'énantiomère de configuration S de cet acide agit sur la régulation de l'apoptose, mais par le biais d'un mécanisme différent d'une inhibition de Bcl-xL, bien que mettant en cause des protéines de la famille Bcl-2.

En effet, l'acide (-)-périllique active la voie de signalisation du TGF- β (*Transforming Growth Factor* β) à laquelle s'ajoute une surexpression des protéines proapoptotiques Bax, Bak et Bad. L'expression des protéines Bcl-xL et p-53 n'est pas modifiée par ce monoterpène¹⁹.

Les données RMN décrites par Miyazawa⁴⁸ et comparées avec celles du composé **31** ne fournissent pas de réponse quant à la position de la double liaison et la configuration du carbone 3'.



3.6.4. Composé 32 : stéréochimie de la double liaison 3''-4''

Les données dont nous disposons actuellement ne permettent pas de déterminer de façon sûre la géométrie de cette double liaison. La mesure de la constante de couplage entre les protons éthyléniques est incertaine, et l'absence de corrélation ROESY entre ces protons et ceux du voisinage ne constitue pas une preuve absolue. Cependant, ces éléments sont de bons indices en faveur d'une stéréochimie *trans*.

La cristallographie confirmerait cette hypothèse. Jusqu'à présent, seul un composé de synthèse ne possédant pas la chaîne latérale a pu être cristallisé. La lipophilie ajoutée par la chaîne latérale rend la cristallisation d'analogues de la méiogynine A plus difficile que celle déjà réalisée. Pour l'heure, les tentatives de cristallisation de la méiogynine se sont révélées infructueuses.

3.6.5. Composés 33 et 34 : configuration du carbone 4''

En l'état actuel des choses, on ne peut connaître ni l'attribution totale des déplacements chimiques pour chacun de ces composés, ni la configuration du carbone asymétrique 4''.

Une séparation CLHP pourrait être envisagée afin de mesurer le pouvoir rotatoire de chacun des composés. Cette donnée pourrait être complétée par une étude de dichroïsme circulaire.

3.6.6. Importance du spectre d'inhibition

Il arrive que des traitements inhibiteurs de protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2 ne soient pas efficaces à long terme sur tous les types de cancers. C'est le cas pour quelques inhibiteurs développés par les laboratoires Abbot®.

Il a été observé, par exemple, lors de traitement par l'ABT-737, spécifique de trois protéines-cibles (Bcl-2, Bcl-w et Bcl-xL), un échappement au traitement. Il s'explique par la surexpression d'une autre protéine de cette famille, Mcl-1.

La protéine Mcl-1 (*Myeloid cell lymphoma sequence 1*), possède une forte affinité avec des protéines proapoptotiques BH3-*only*, ce en quoi elle diverge de Bcl-2 et Bcl-xL. Cela peut s'expliquer par des propriétés quelque peu différentes au niveau de la poche hydrophobe.

Ainsi l'ABT-737 n'est efficace que sur les cancers à fort taux de Bcl-2 et Bcl-xL et exprimant peu Mcl-1, sauf en cas d'association avec un inhibiteur de cette dernière¹⁸.

Les inhibiteurs moins spécifiques, comme le gossypol ou l'Obatoclast®, dont les spectres d'activités comprennent notamment Mcl-1 n'entraînent pas ce problème d'échappement¹⁷.

Il serait intéressant de connaître le spectre d'inhibition de la méiogynine A et ses analogues, afin d'évaluer quels seraient les risques d'échappement *in vivo*.

3.6.7. Biosynthèse des analogues de la méiogynine A

Tous les composés isolés possèdent un cyclohexane dans la partie sud de la molécule, hormis le composé 31. De plus, lors de la biosynthèse de l'unité bisabolane de la méiogynine A 29, une étape de réduction d'un cyclohexène intervient (cf. fig. 15, p. 31). Cela suppose que le composé 31 soit un précurseur de la méiogynine A 29.

Les composés 32-34 présentent des différences par rapport à la méiogynine A 29 au niveau de leur chaîne latérale :

- apparition d'un hydroxyle,
- migration d'une double-liaison.

On peut raisonnablement conclure que ces modifications sont issues d'une époxydation de la double liaison ($\Delta 4'-\Delta 5'$) de la méiogynine A **29**, suivie d'une ouverture de l'époxyde par un acide. Le proton acide peut attaquer l'époxyde de deux façons, conduisant à deux types de dérivés : le composé **32** d'une part, les diastéréoisomères **33** et **34**, d'autre part (fig. 24).

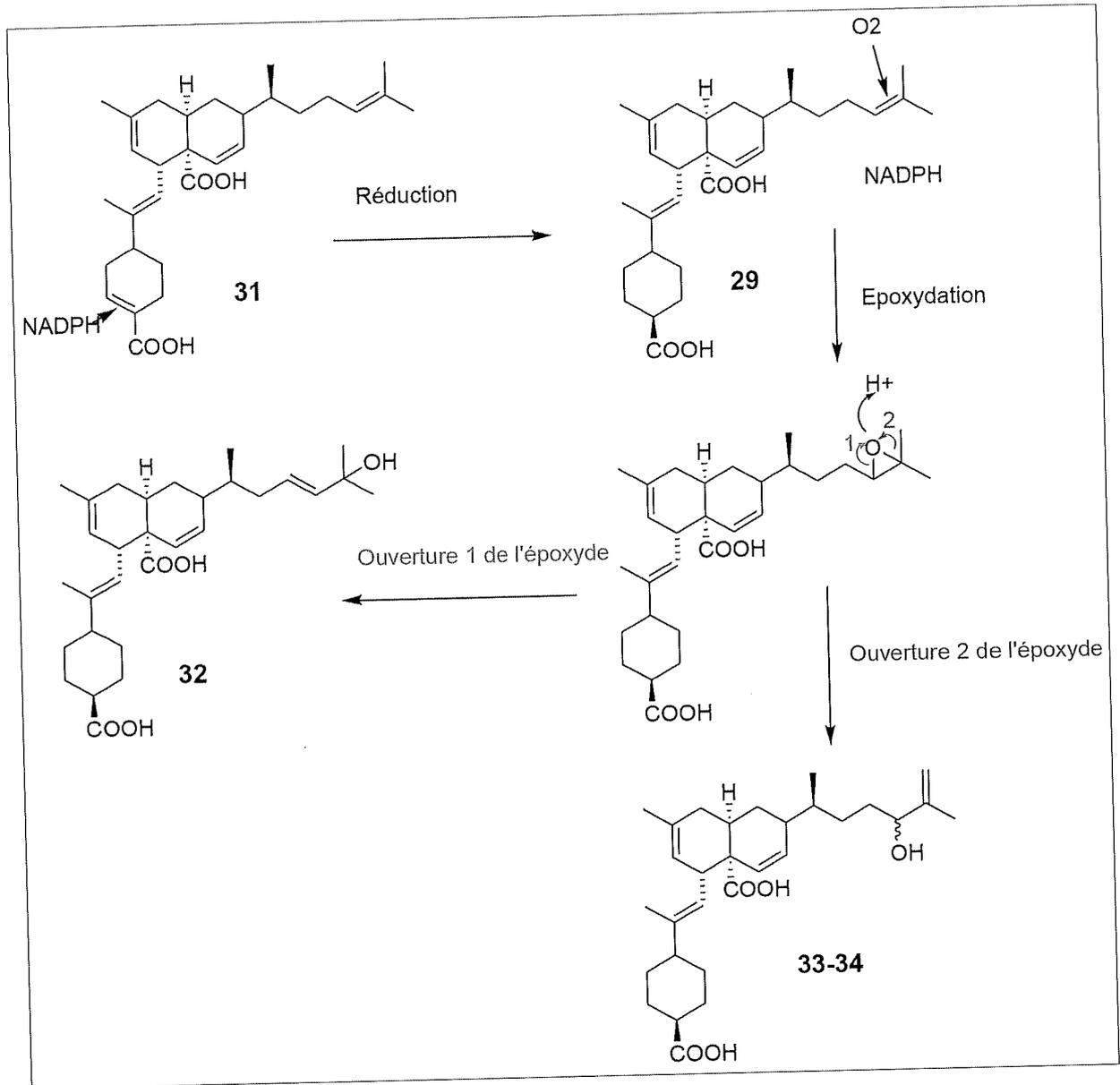


Fig. 24. — Proposition de la biosynthèse des analogues de la méiogynine A.

Conclusion

Le fractionnement de l'extrait AcOEt d'écorce de *Meiogyne cylindrocarpa*, guidé par un double criblage biologique et structural a permis d'isoler en grande quantité la méiogynine A, composé majoritaire déjà décrit³⁰ ainsi que cinq nouveaux analogues de la méiogynine (composés **31-35**). L'analyse structurale par spectrométrie de masse et RMN, réalisée sur chacun des analogues a entraîné leur caractérisation en grande partie. Des incertitudes demeurent quant à la stéréochimie de certains de ces composés et le composé **35** reste en cours d'identification.

Des analogues de la méiogynine A (**31** et **35**), actifs sur la protéine-cible Bcl-xL, ont été isolés sans que toutes les fractions contenant potentiellement ce type de molécules n'aient été explorées. L'évaluation de leur CI_{50} et le calcul de leur K_i donneront la possibilité de les comparer aux autres molécules actives de la série, qu'elles soient naturelles ou synthétiques.

L'isolement de nouveaux analogues de la méiogynine A pourrait être conduit par une poursuite des purifications, notamment une CLHP préparative des fractions 27-1 à 27-5, ainsi que l'étude de la fraction 2-1, qui n'ont pas pu être menées au cours des travaux à l'ICSN, faute de temps.

Enfin, la quantité de méiogynine A isolée contribuera à la synthèse d'analogues ou de dérivés de cette dernière, élaborés d'après les études de modélisation et de RMN *in proteo* en cours à l'ICSN (ANR ApoMeioA), dans un but d'optimisation de l'activité biologique sur la cible.

Cette famille de composés rétablirait l'apoptose dans les cellules cancéreuses, conformément aux résultats obtenus au cours des tests protéiques. Il restera ultérieurement à évaluer la cytotoxicité *in vitro* et *in vivo* de ces analogues sur différentes lignées cellulaires cancéreuses.

Références bibliographiques

1. Institut National du Cancer. <http://www.e-cancer.fr> **2013** (consulté le 16 août 2013)
2. Cancer, Aide-mémoire N°297. <http://www.who.int/mediacentre> **2013** (consulté le 16 août 2013)
3. Binder-Foucard F., Rasamimanana Cerf N., Belot A., Bossard N. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Synthèse. *Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire. 2013*
4. Wong R., Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **2011**, 30 (87)
5. Olsson M., Zhivotovsky B., Caspases and cancer. *Cell death and differentiation* **2011**, 18, 1441-1449
6. Beneytout J.-L. Apoptose ou mort cellulaire programmée, cours M1 SVS, **2008**
7. Danial, N. N., BCL-2 family proteins: Critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research* **2007**, 13 (24), 7254-7263
8. Lacave R., Larsen C.-J., Robert J. Cancérologie fondamentale. *John Libbey Eurotext* **2005**
9. Indran R. I., Tufo G., Pervaiz S., Brenner C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **2011**, 1807, 735–745
10. Genetech USA. Dysregulation of apoptosis. <http://www.biooncology.com/biological-pathways/apoptosis> **2013** (consulté le 17 août 2013)
11. Mercié P., Belloc F., Mécanismes physiopathologiques et méthodes d'analyse de l'apoptose cellulaire. *La Revue de Médecine Interne* **2001**, 22 (1), 90-96
12. Petros A., Olejniczak E., Fesik S. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, 1644, 83– 94
13. Yip K.W., Reed J.C. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* **2008**, 27, 6398–6406
14. Lucken-Ardjomande S., Martinou J.-C. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *Comptes-Rendus Biologies* **2005**, 328 616–631

15. Hardwick J. M., Chen Y., Jonas E. Multipolar functions of BCL-2 proteins link energetics to apoptosis. *Trends Cell Biol.* **2012**, 22 (6), 318–328
16. Cossum P., Ojwang J., Rando R., Stein C. A. Oligonucleotide inhibitors of Bcl-xL, EP1093373 A4 **1999**
17. Bajwa N., Liao C., Nikolovska-Coleska, Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* **2012**, 22 (1), 37-55
18. Shamas-Din A., Brahmabhatt H., Leber B., Andrews D. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* **2011**, 1813, 508–520
19. Paduch, R., Kandefor-Szerszen, M., Trytek, M., Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2007**, 55 (5), 315-327
20. Futamura Y., Sawa R., Umezawa Y., Igarashi M., Nakamura H., Hasegawa K., Yamasaki M., Tashiro E., Takahashi Y., Akamatsu Y., Imoto M. Discovery of Incednine as a Potent Modulator of the Anti-apoptotic Function of Bcl-xL from Microbial Origin. *Journal of American Chemical Society* **2008**, 130, 1822-1823
21. Marie, J. P.; Marzac, C.; Legrand, O., Mécanismes de résistance aux agents cytostatiques. *EMC - Hématologie* **2004**, 1 (3), 59-68
22. Stolz C., Hess G., Hähnel P., Grabellus F., Hoffarth S., Schmid K., Schuler M. Targeting Bcl-2 family proteins modulates the sensitivity of B-cell lymphoma to rituximab-induced apoptosis. *Blood* **2008**, 112 (8)
23. The Angiosperm Phylogeny, G., An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**, 161 (2), 105-121
24. Leboeuf M., Cavé A., Bhaumik P. K., Mukherjee B., Mukherjee R. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry* **1980**, 21 (12), 2783-2813
25. The plant list. <http://www.theplantlist.org> **2010** (consulté le 17 août 2013)
26. Vanheusden E.C.H., Revision of *Meiogyne* (Annonaceae). *Blumea* **1994**, 38 (2), 487-511
27. Hisham A., Pieters L. A. C., Claeys M., H, Van Den Heuvel H., Esmans E., Dommissse R., Vlietinck A. J. Acetogenins from root bark of *Uvaria narum*. *Phytochemistry* **1991**, 30 (7), 2373-2377
28. Tadic' D., Cassels B. K., Leboeuf M., Cavé A. Kinabaline and the aporphinoid biogenesis of azaanthracene and azafluorene alkaloids. *Phytochemistry* **1987**, 26 (2), 537-541.
29. Bousserouel H.; Awang K.; Guéritte F.; Litaudon M. Enyne- and enediyne- γ -lactones from the bark of *Meiogyne cylindrocarpa*. *Phytochemistry Letters* **2012**, 5 (1), 29-32.
30. Litaudon M.; Bousserouel H.; Awang K.; Nosjean O.; Martin M.-T.; 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. *Journal of Natural Products* **2009**, 72 (3), 480-483.

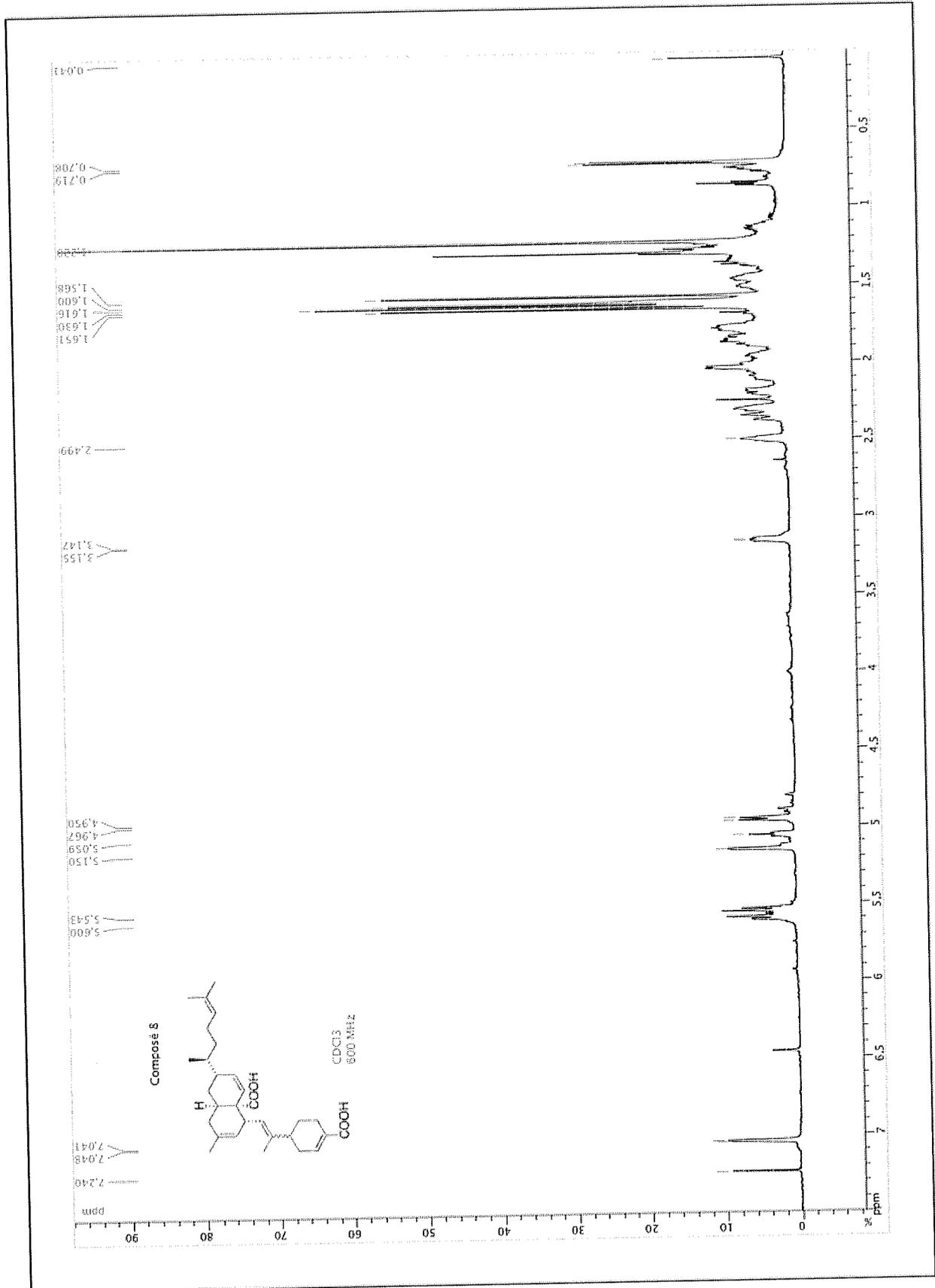
31. Deepralard K., Pengsuparp T., Moriyasu M., Kawanishi K., Suttisri R. Chemical constituents of *Mitrephora maingayi*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2007**, *35*, 696-699
32. Ge F., Tang C.-P., Ye Y. Lignanamides and Sesquiterpenoids from Stems of *Mitrephora thorelii*. *Helvetica Chimica Acta* **2008**, *91*, 1023-1030
33. Moharam B.-A., Jantan I., Jalil J., Shaari K. Inhibitory Effects of Phylligenin and Quebrachitol Isolated from *Mitrephora vulpina* on Platelet Activating Factor Receptor Binding and Platelet Aggregation. *Molecules* **2010**, *15*, 7840-7848
34. Zhang Q., Di Y.-T., He H.-P., Li S.-L., Hao X.-J. Mitregenin, a new annonaceous acetogenin from *Mitrephora maingayi*. *Natural Product Communications* **2010**, *5* (11), 1793-1794
35. Li C., Lee D., Graf T.-N., Phifer S.-S., Nakanishi Y., Burgess J.-P., Riswan S., Setyowati F.-M., Saribi A.-M., Soejarto D., Farnsworth N.-R., Falkinham III J.-O., Kroll D.-J., Kinghorn A. D., Wani M.-C., Oberlies N.-H. A Hexacyclic ent-Trachylobane Diterpenoid Possessing an Oxetane Ring from *Mitrephora glabra*. *Organic Letters* **2005**, *7* (25), 5709-5712
36. Zgoda J., Freyer A., Killmer L., Porter J. Polyacetylene Carboxylic Acids from *Mitrephora celebica*. *Journal of Natural Products* **2001**, *64*, 1348-1349
37. Yu, R., Li, B.-G., Ye, Q., Zhang, G.-L. A novel alkaloid from *Mitrephora maingayi*. *Natural Product Research* **2005**, *19* (4), 359-362
38. Mueller D., Davis R.-A., Duffy S., Avery V.-M., Camp D., Quinn R.-J.. Antimalarial Activity of Azafluorenone Alkaloids from the Australian Tree *Mitrephora Diversifolia*. *Journal of Natural Products* **2009**, *72*, 1538-1540
39. Meng, D.-H., Xu, Y.-P., Chen, W.-L., Zou, J., Lou, L.-G., Zhao, W.-M. Anti-tumour clerodane-type diterpenes from *Mitrephora thorelii*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2007**, *9* (7), 679-684
40. Ge Y.-W., Zhu S., Shang M.-Y., Zang X.-Y., Wanga X, Bai Y.-J., Li L., Komatsu K., Cai S.-Q. Aristololactams and aporphines from the stems of *Fissistigma oldhamii* (Annonaceae). *Phytochemistry* **2013**, *86*, 201-207
41. Hongping Z., Xiaoling L., Xiaohong S., Qiangzhi X., Binghua J. Dihydrochalcones and phenanthrene derivatives from *Fissistigma bracteolatum*. *Journal of Medical Colleges of PLA* **2010**, *25*, 226-234
42. Porzel A., Phuong Lien T., Schmidt J., Drosihn S., Wagner C., Merzweiler K., Van Sungb T., Adam G. Fissistigmatins A-D: Novel Type Natural Products with Flavonoid-Sesquiterpene Hybrid Structure from *Fissistigma bracteolatum*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 865-872
43. Fotsop Fomekong D.; Roussi F.; Leverrier A.; Bret  ch   A.; Guéritte F. Biomimetic Total Synthesis of Meiogynin A, an Inhibitor of Bcl-xL and Bak Interaction. *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75* (21), 7412-7415.
44. Breeden D.-C., Coates R.-M. 7-Epizingiberene, A Novel Bisabolane Sesquiterpene from Wild Tomato Leaves. *Tetrahedron* **1994**, *50* (38), 11123-11132.

45. Waksmundazka-Hajnos M; Sherma J; Kowalska T. Destructive universal detection reagents. in *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC press **2008** 99, p. 180
46. Guo X.-Q., Castellano F.-N., Li L., Lakowicz J.-R.. Use of a Long-Lifetime Re(I) Complex in Fluorescence Polarization Immunoassays of High-Molecular-Weight Analytes. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, 632-637
47. Rouessac F., Rouessac A. Analyse chimique. Dunod 7^e édition, **2009**
48. Miyazawa, M.; Wada, T.; Kameoka, H., Biotransformation of (+)- and (-)-Limonene by the Larvae of Common Cutworm (*Spodoptera litura*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46 (1), 300-303.

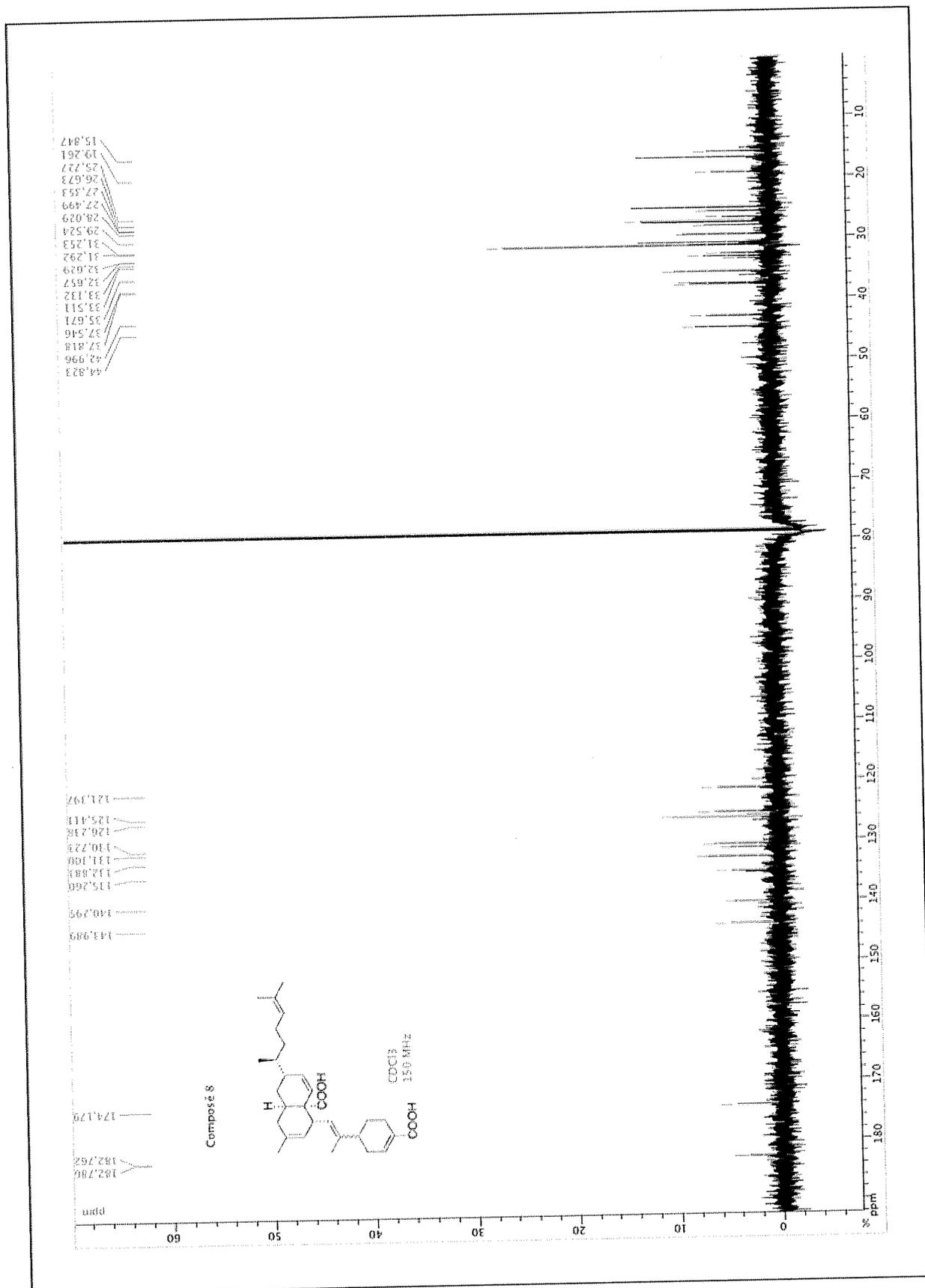
Annexes

1. Données RMN du composé 31	63
2. Données RMN du composé 32	69
3. Données RMN du mélange de composés 32 et 34	75
4. Données RMN du composé 35	80

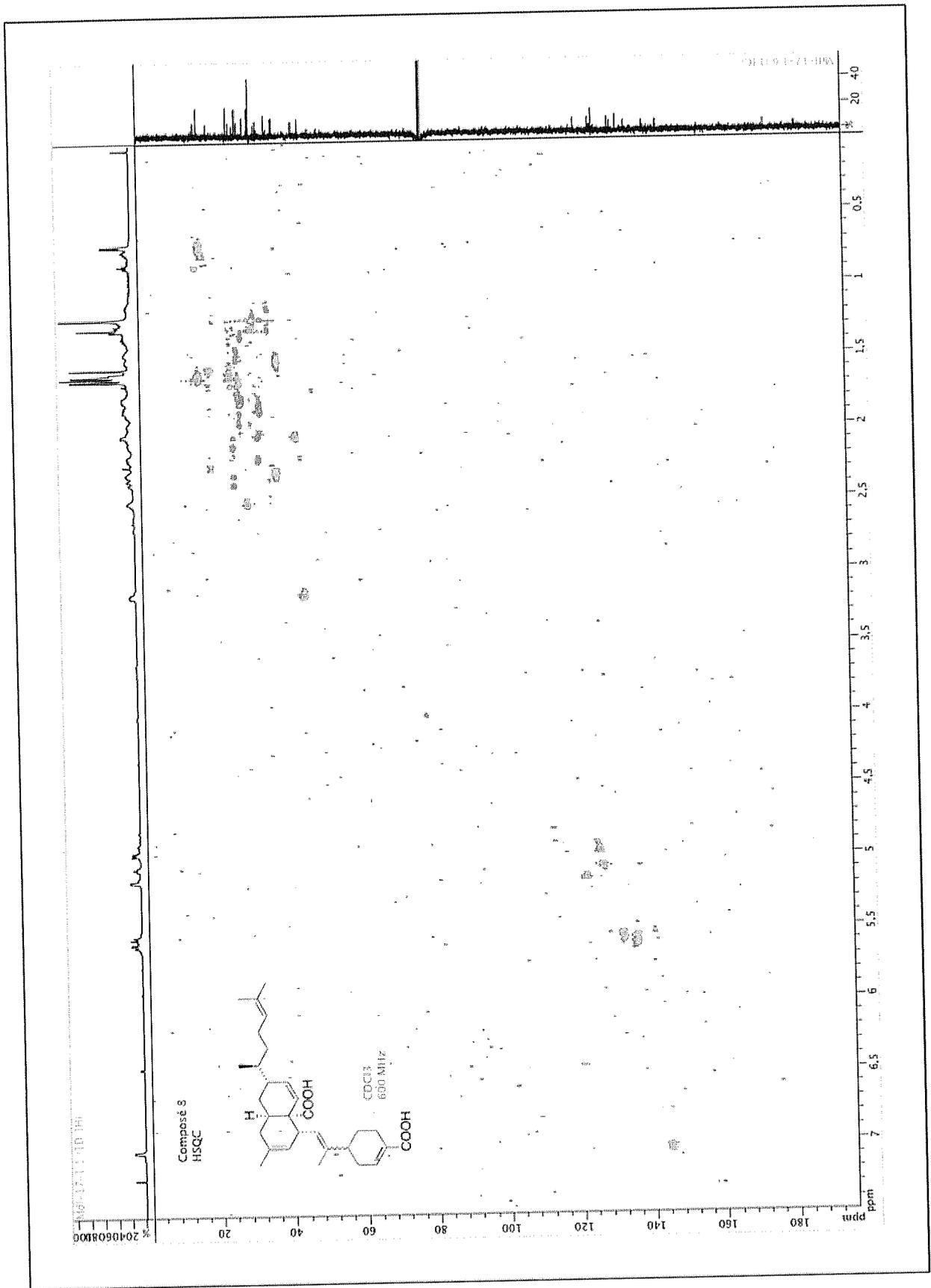
Annexe 1. Données RMN du composé 31



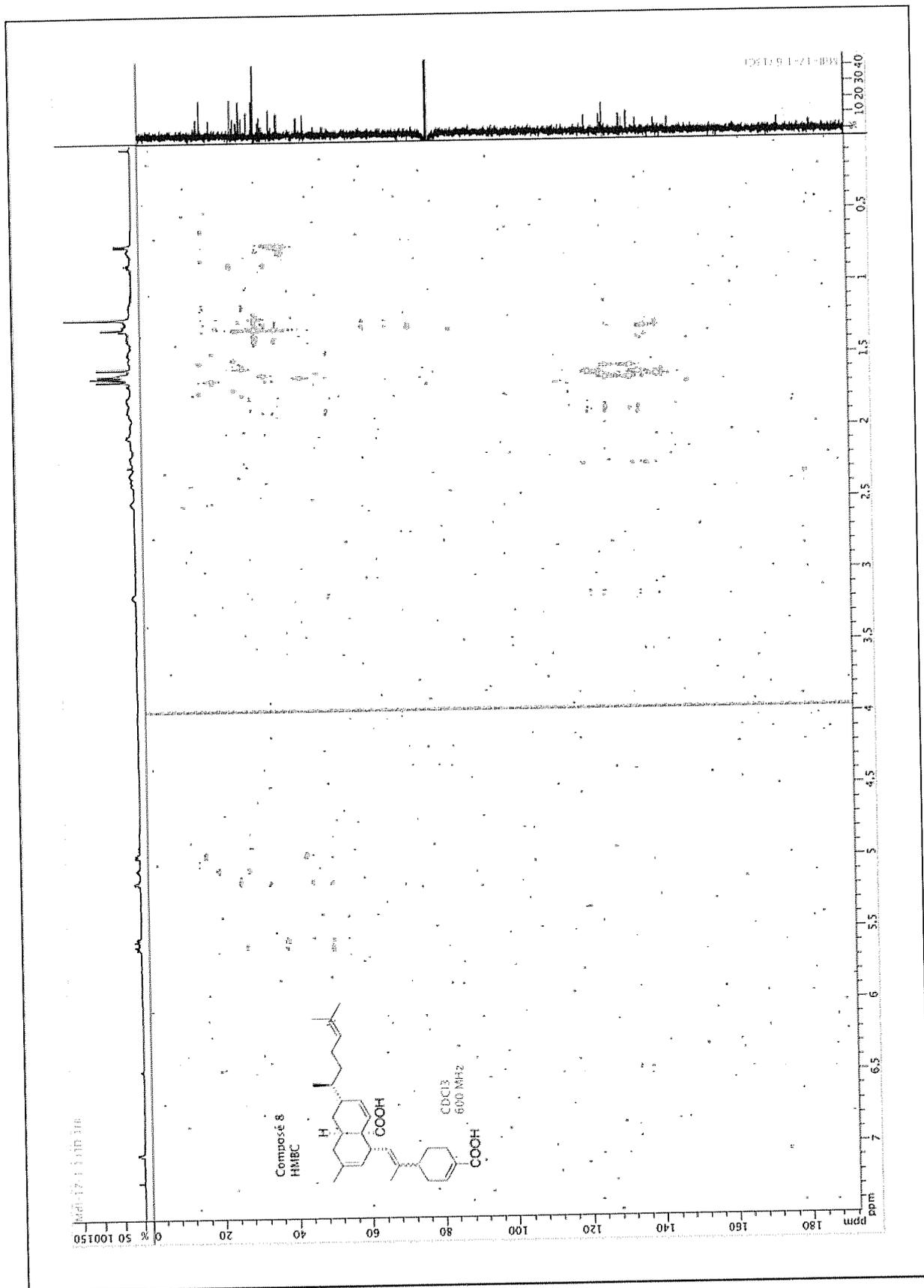
RMN ¹H du composé 31



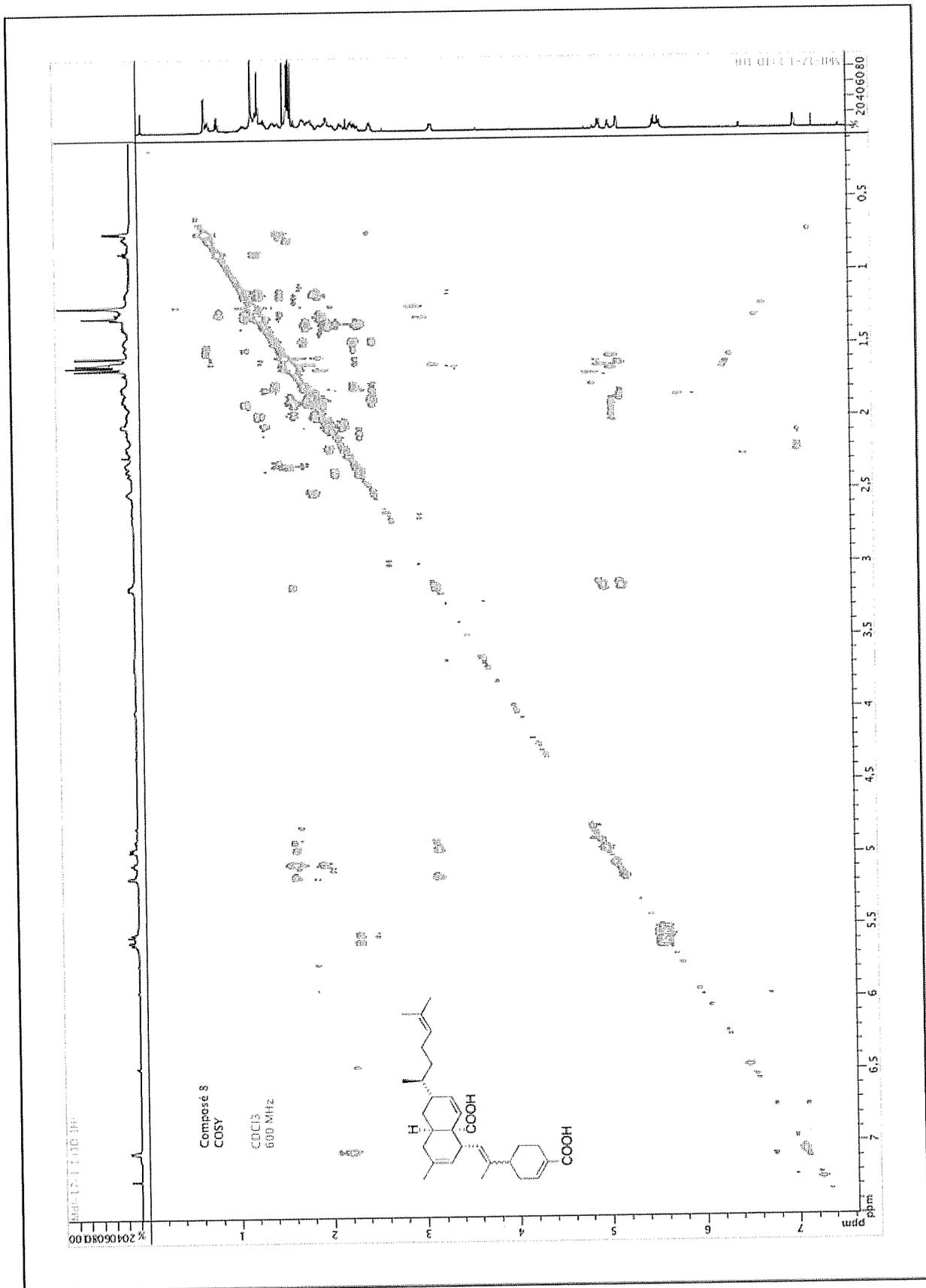
RMN ¹³C du composé 31



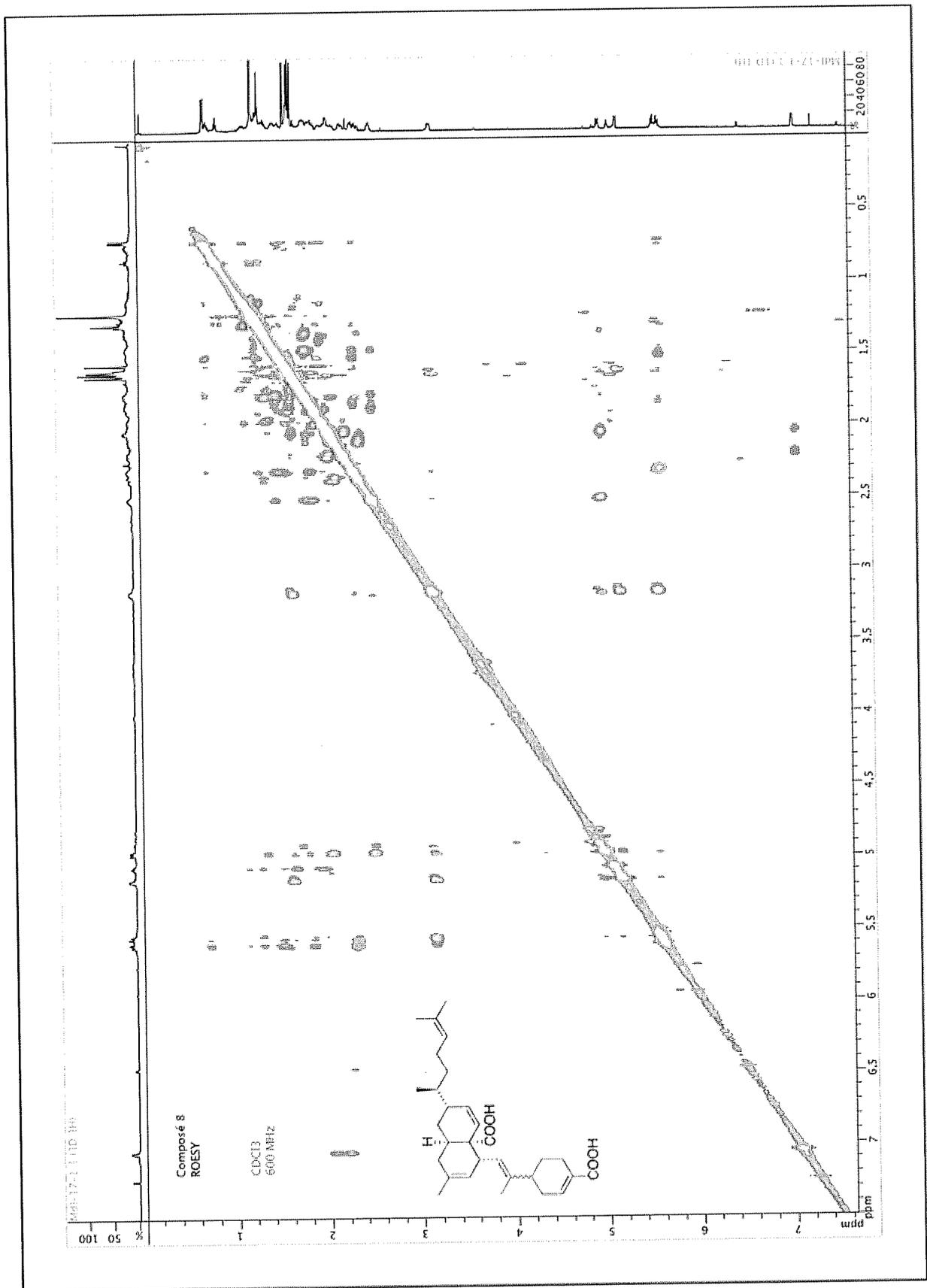
HSQC du composé 31



HMBC du composé 31

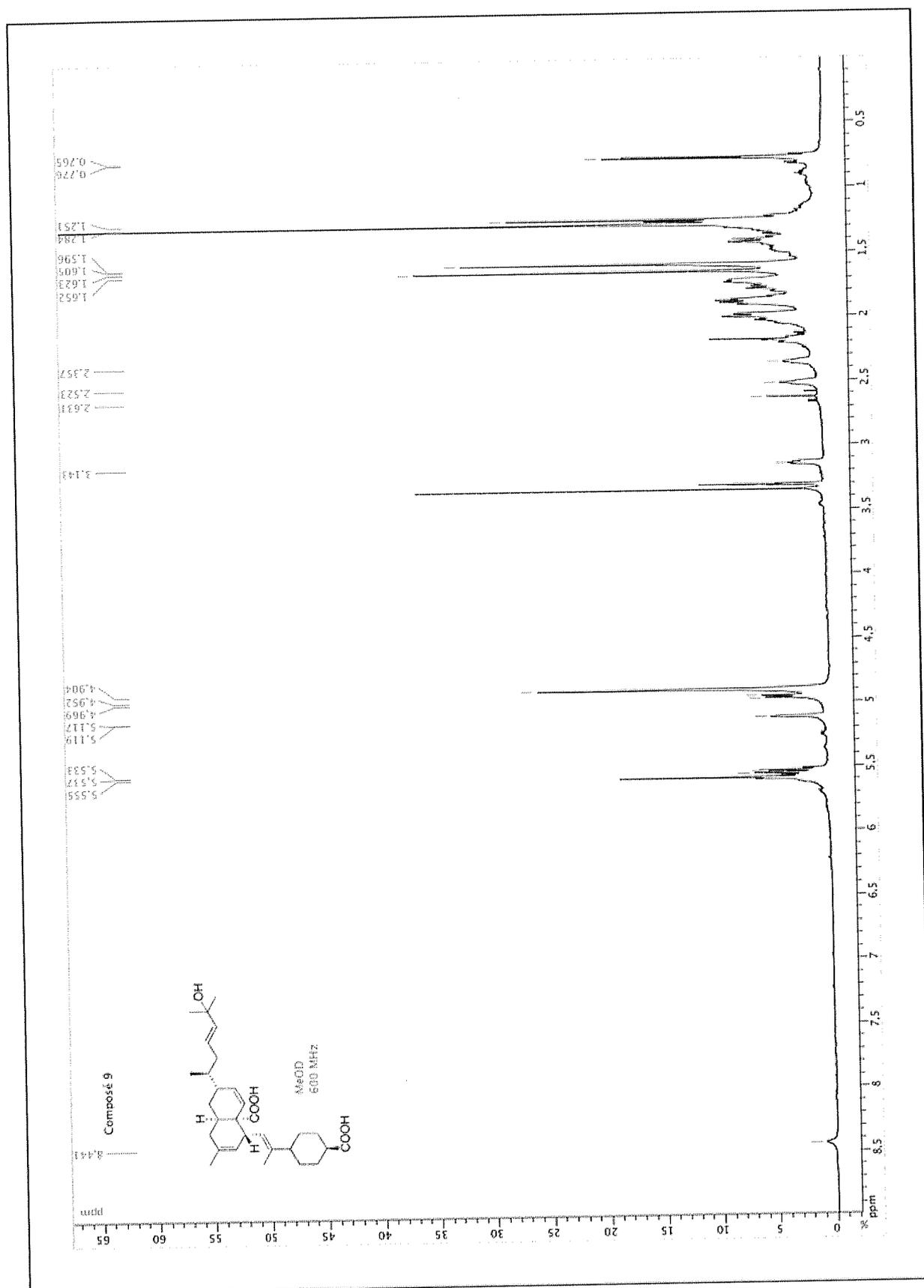


COSY du composé 31

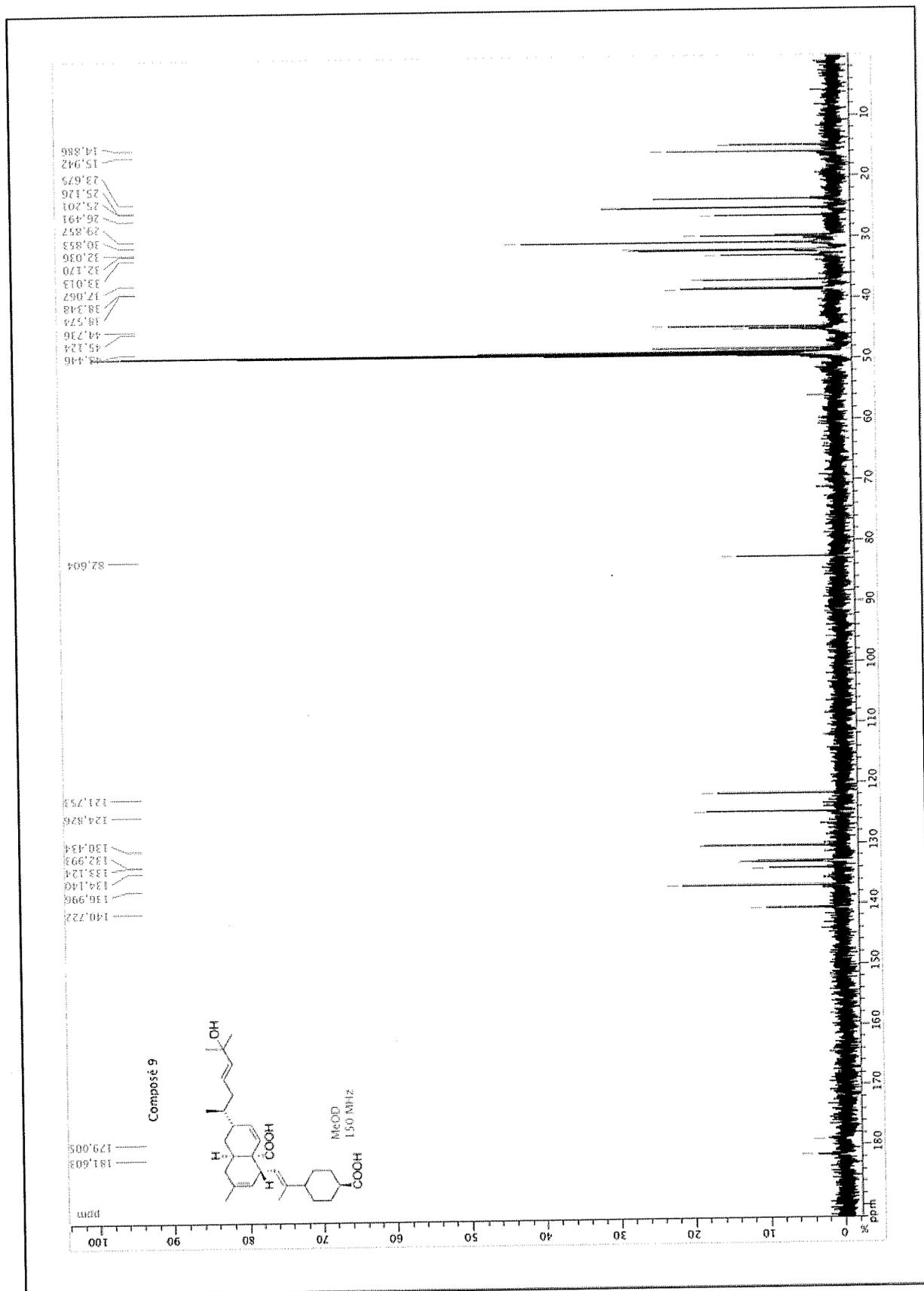


ROESY du composé 31

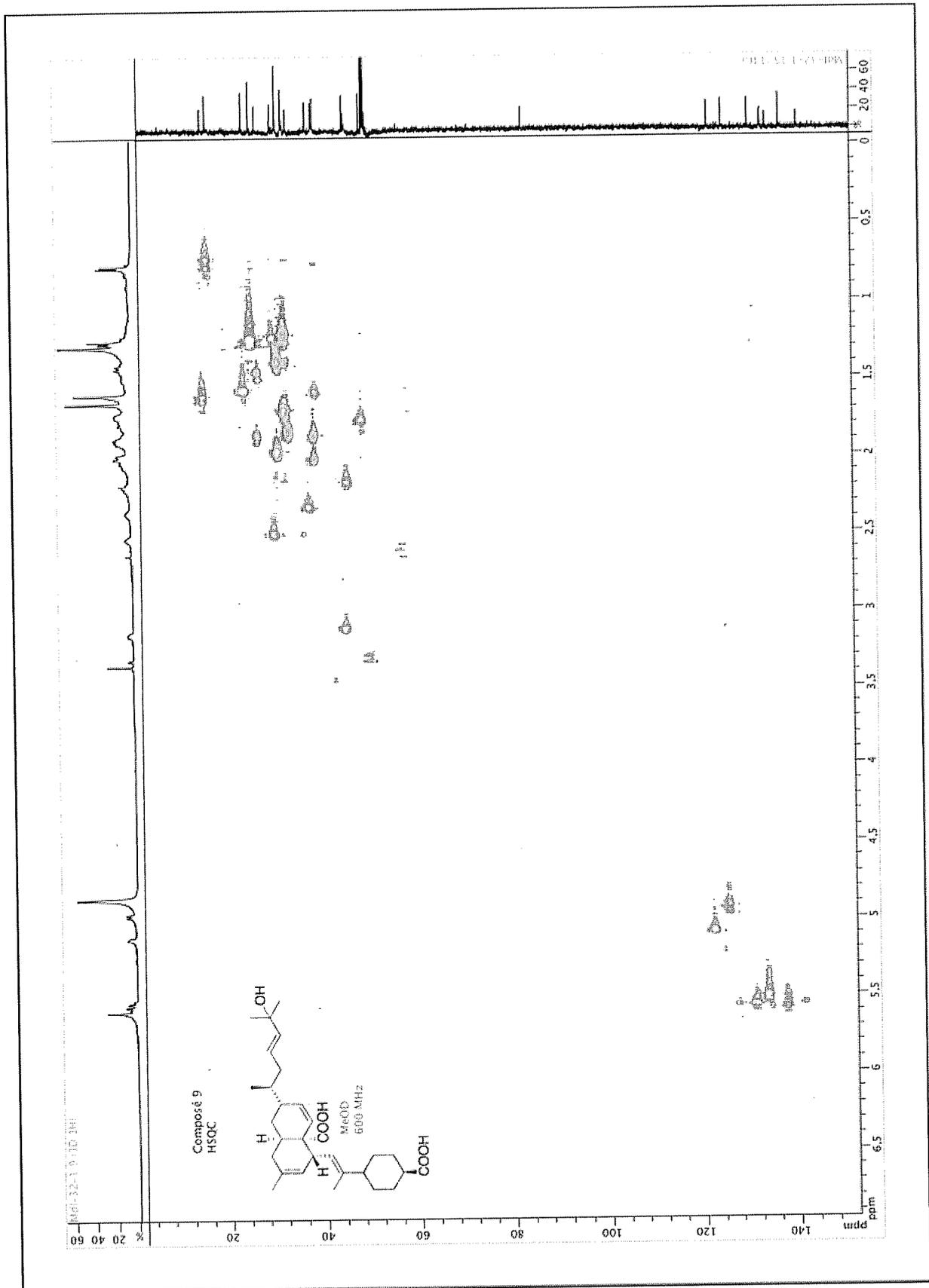
Annexe 2. Données RMN du composé 32



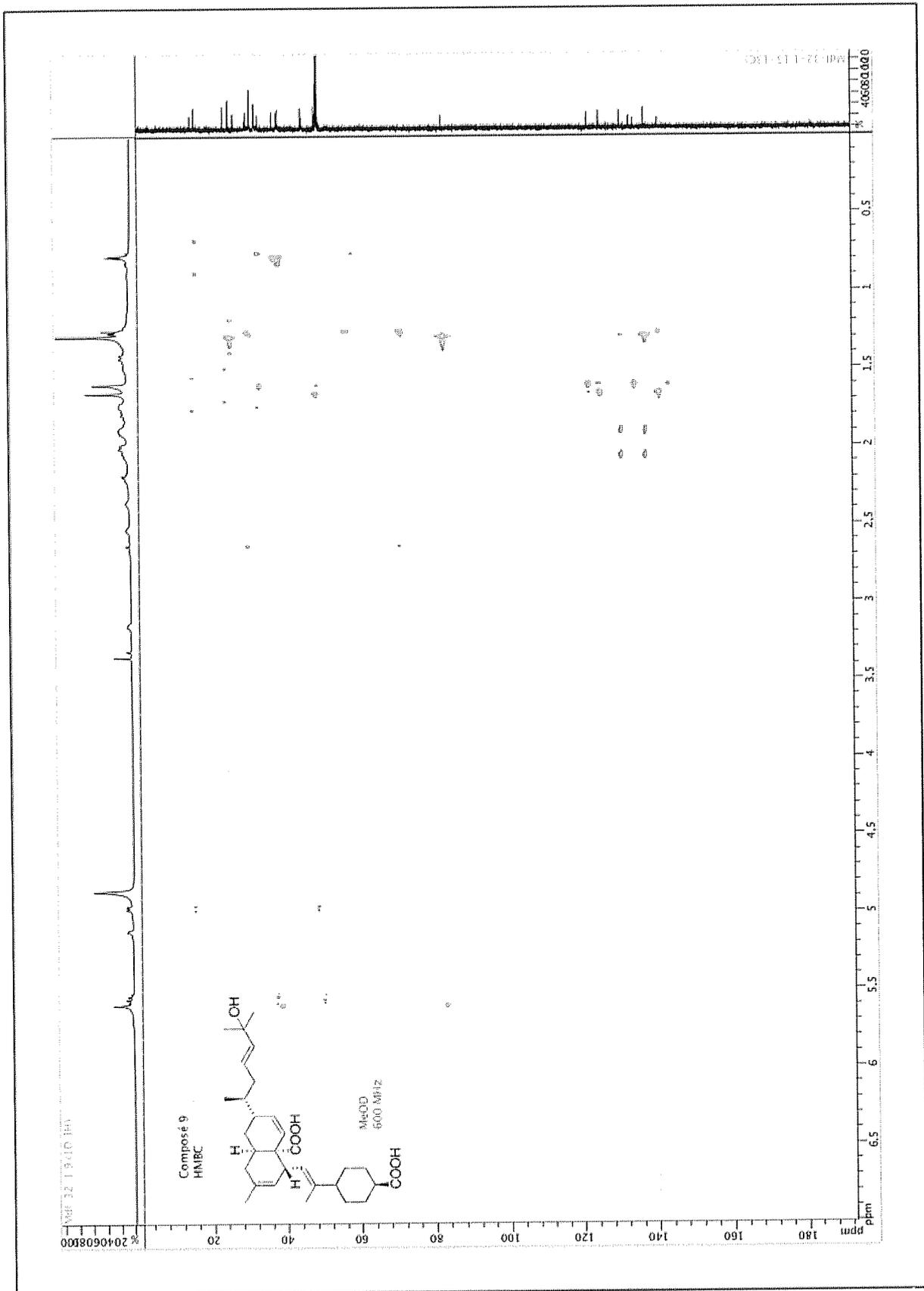
¹H RMN du composé 32



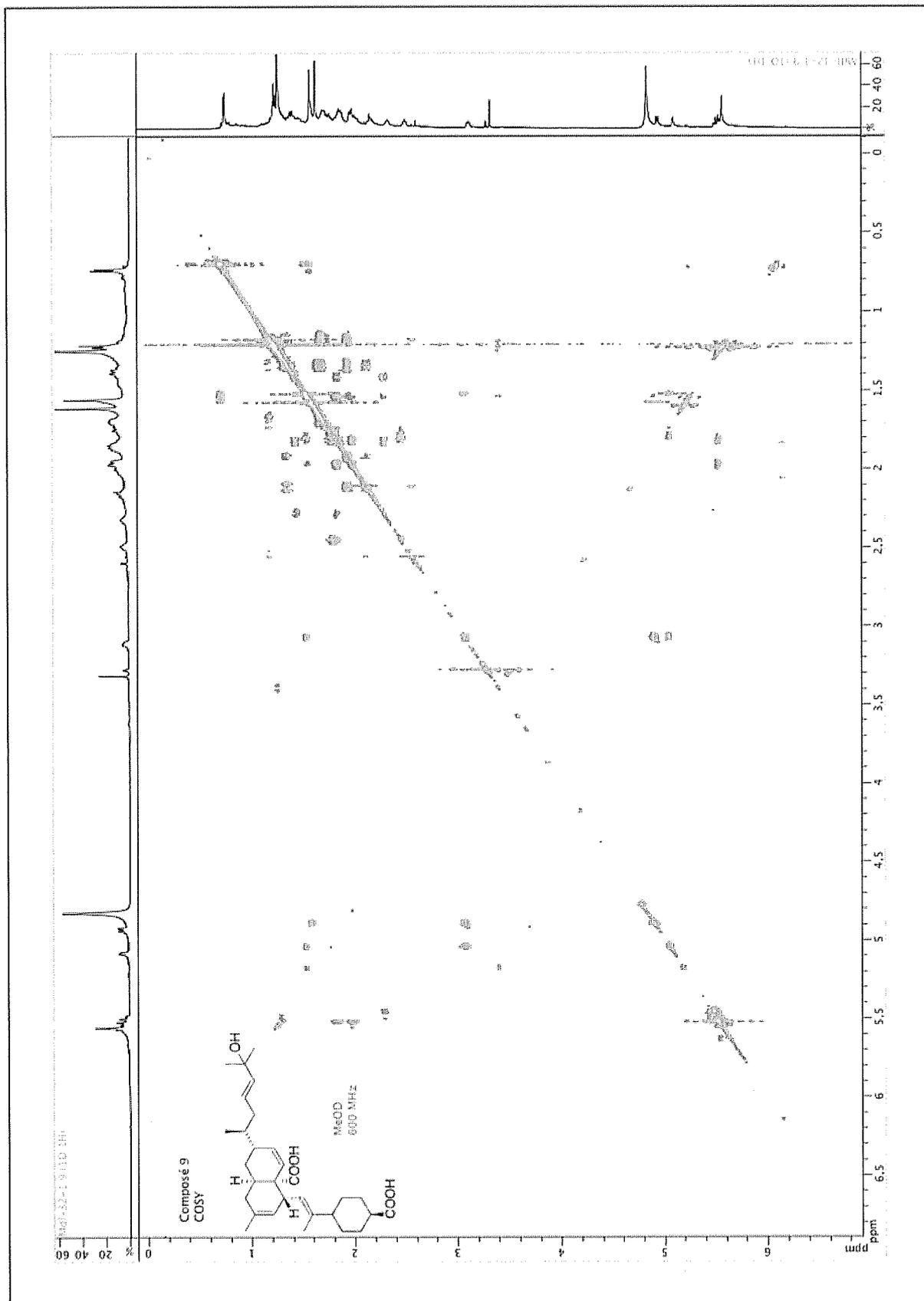
¹³C RMN du composé 32



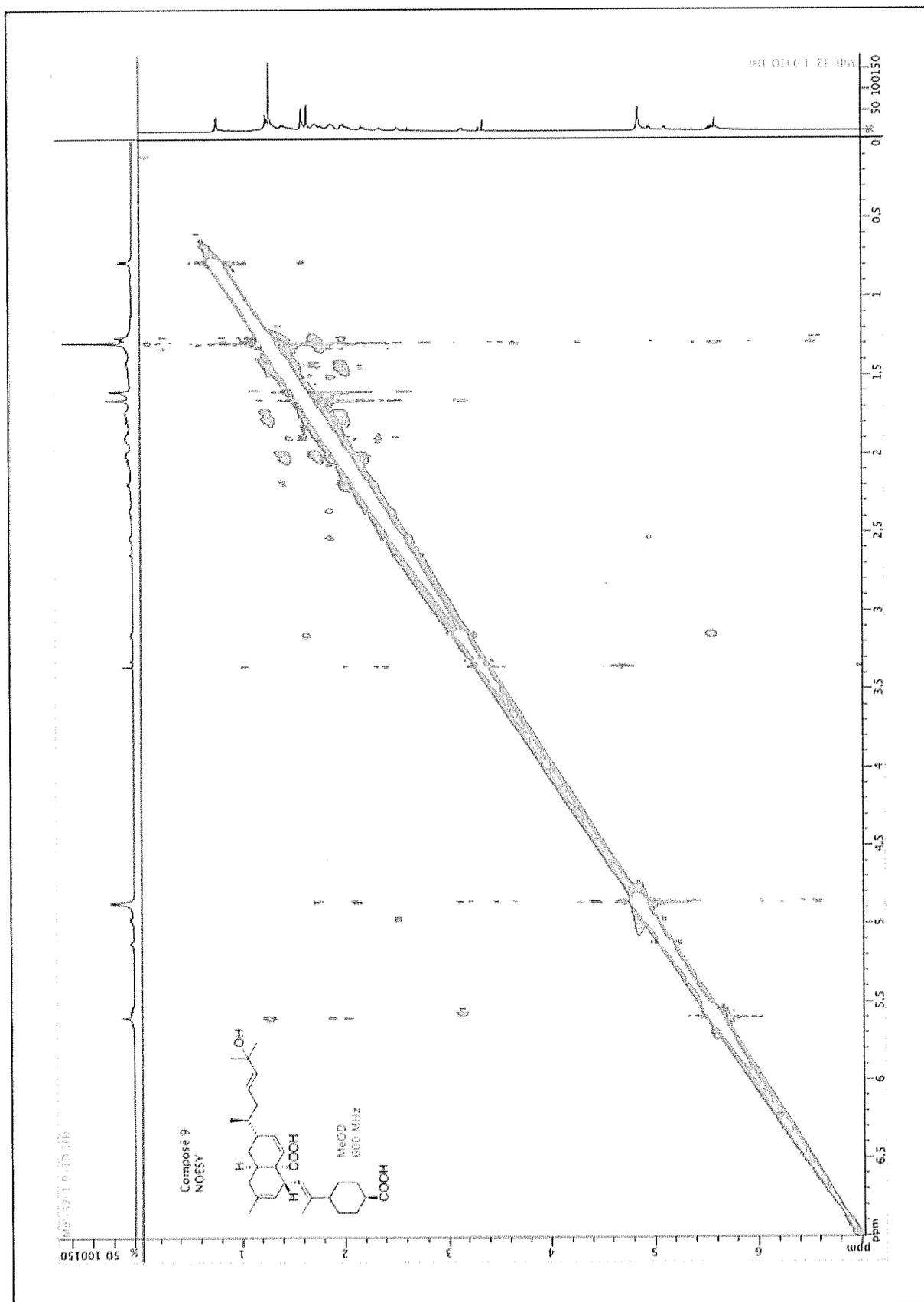
HSQC du composé 32



HMBC du composé 32

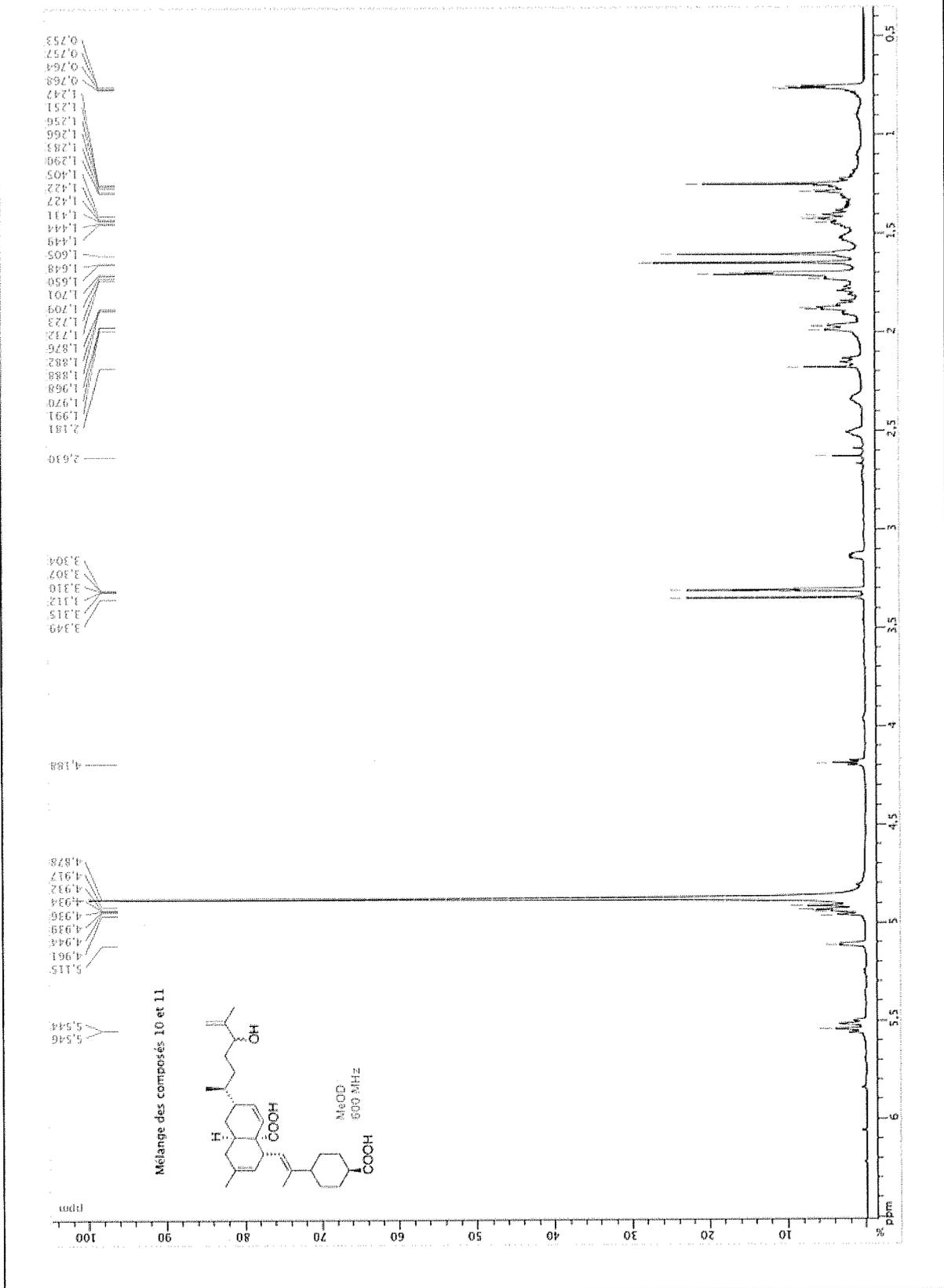


COSY du composé 32

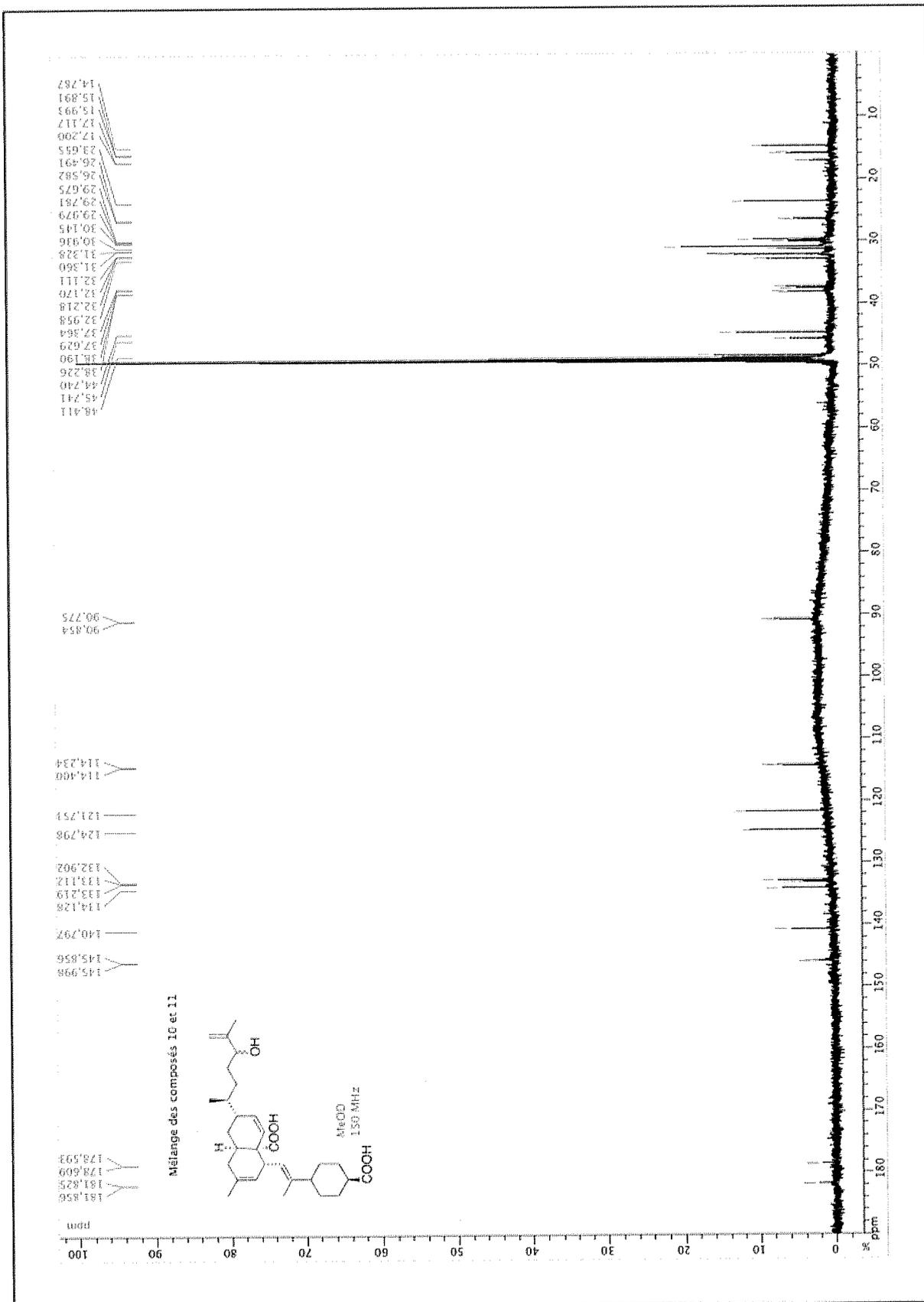


NOESY du composé 32

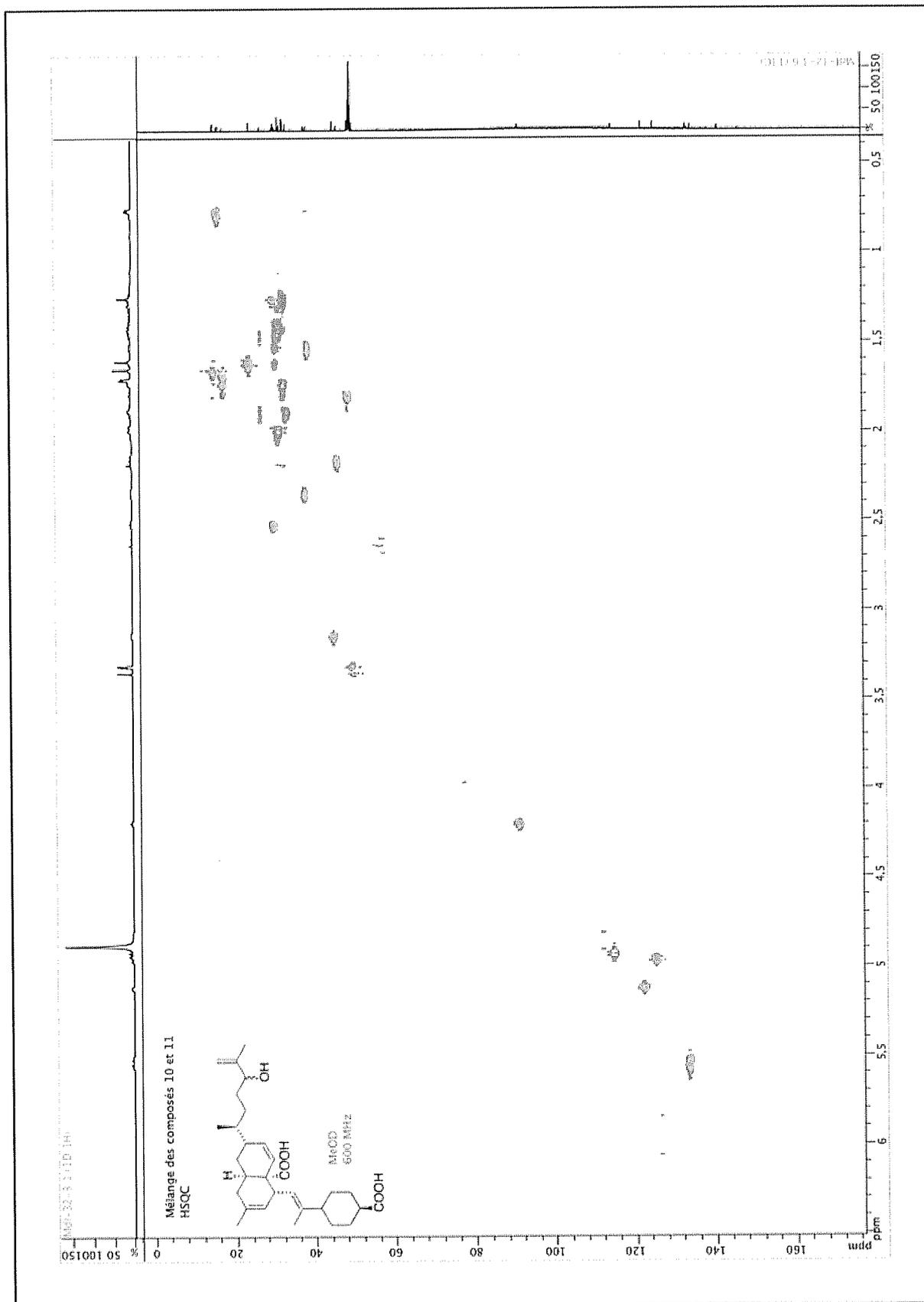
Annexe 3. Données RMN du mélange de composés 32 et 34



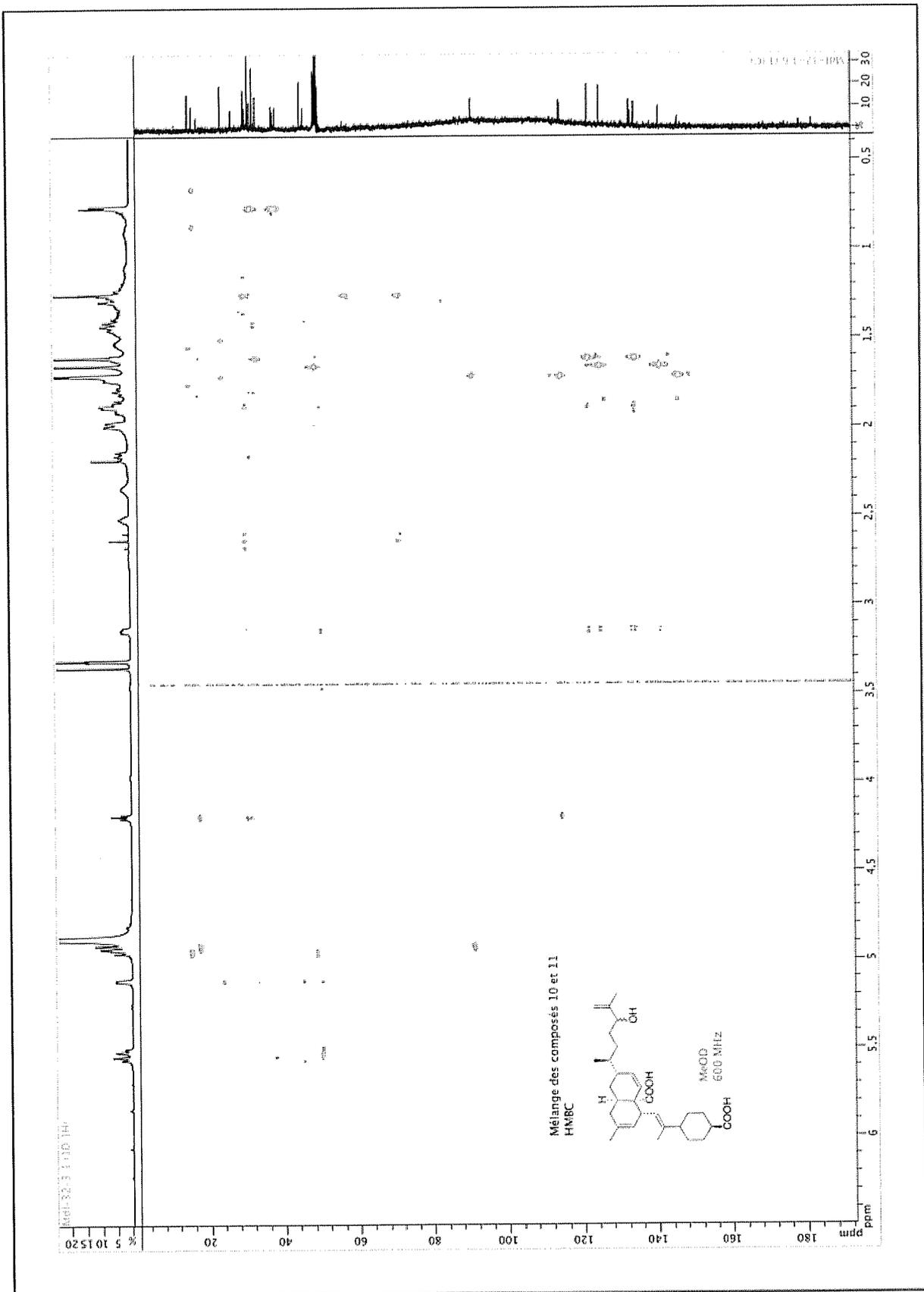
¹H RMN du mélange des composés 33 et 34



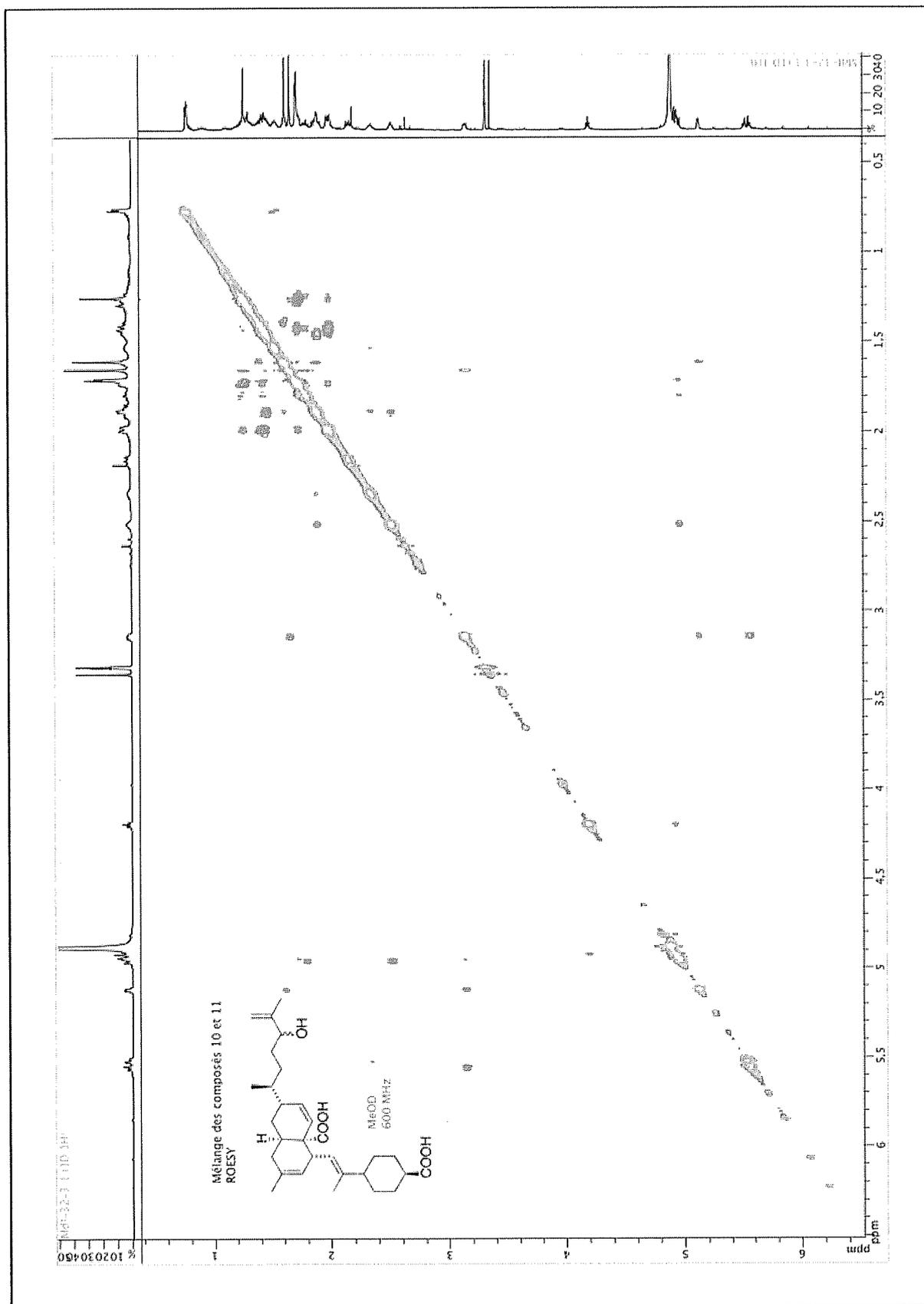
¹³C RMN du mélange des composés 33 et 34



HSQC du mélange des composés 33 et 34

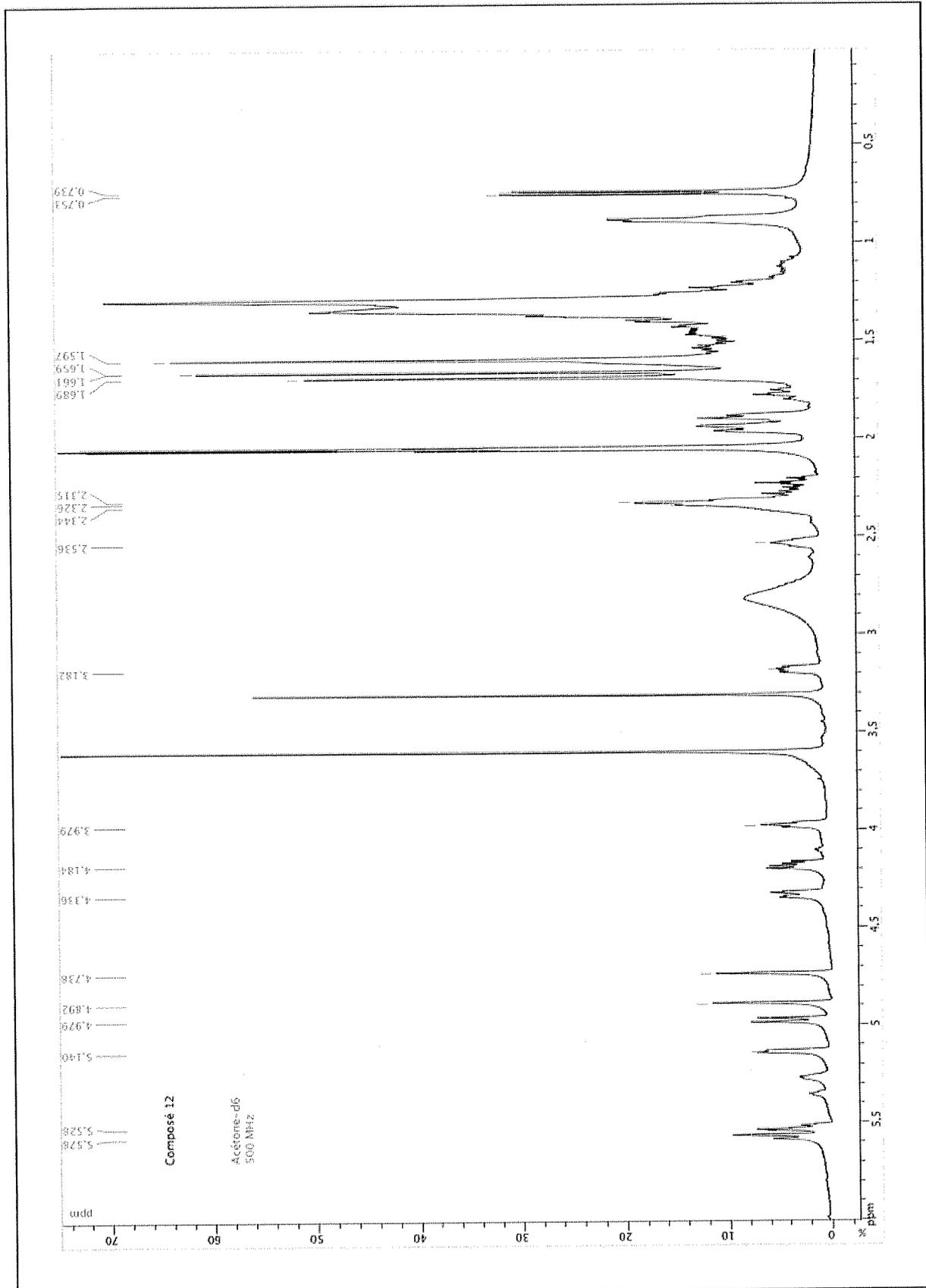


HMBC du mélange des composés 33 et 34



ROESY du mélange des composés 33 et 34

Annexe 4. Données RMN du composé 35



¹H RMN du composé 35

Table des matières

Table des sigles et abréviations	10
Introduction	8
1. Études bibliographiques	11
1.1. Cancer et apoptose	11
1.1.1. Cancer	11
1.1.2. Pathogenèse des cancers	12
1.1.3. Apoptose.....	13
1.1.4. Régulation de l'apoptose	13
1.1.4.1. Famille des caspases : signalisation et exécution de l'apoptose.....	14
1.1.4.2. Voie extrinsèque	15
1.1.4.3. Voie intrinsèque de l'apoptose : voie mitochondriale.....	17
1.1.4.4. Protéines de la famille Bcl-2	20
1.1.5. Inhibiteurs des protéines Bcl-2	23
1.1.6. Protéines Bcl-2 et résistances aux chimiothérapies anticancé.....	24
1.2. La plante <i>Meiogyne cylindrocarpa</i> Burck.....	26
1.2.1. Données phylogéniques et botaniques	26
1.2.2. Données phytochimiques sur le genre <i>Meiogyne</i> et les genres apparentés ...	27
1.2.3. Travaux antérieurs sur <i>Meiogyne cylindrocarpa</i>	30
2. Matériels et méthodes.....	32
2.1. Matériel végétal	32
2.2. Extraction.....	32
2.3. Fractionnement de l'extrait	32
2.3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)	32
2.3.2. Chromatographie Flash	33
2.3.3. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	33
2.3.4. Évaluation de l'activité biologique.....	34
2.3.5. Criblage structure guidé	35

2.4. Purifications	37
2.4.1. Flash chromatographie	37
2.4.2. Précipitation	38
2.4.3. Chromatographie sur colonne	39
2.4.4. CLHP préparative	39
2.4.5. Chromatographie sur Couche Épaisse (CCE).....	39
2.4.6. Chromatographie en Phase Supercritique (CPS).....	40
2.5. Éluclidation structurale	41
2.5.1. Spectrométrie de Masse Haute Résolution par Électro-Ionisation	41
2.5.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire.....	41
3. Résultats et discussion	42
3.1. Extraction.....	42
3.2. Fractionnement, Criblages structure et bioguidés	42
3.3. Purifications	43
3.3.1. Fraction 2-2	44
3.3.2. Fraction 2-3	44
3.3.3. Fraction 16-4	45
3.3.4. Fraction 16-5	46
3.4. Détermination structurale	47
3.4.1. Méiogynine A.....	48
3.4.2. Composé 31	49
3.4.3. Composé 32	50
3.4.4. Composés 33 et 34	51
3.4.5. Composé 35	52
3.5. Activité biologique des composés isolés	52
3.6. Discussion	52
3.6.1. Criblage structure guidé	52
3.6.2. Origine de l'O-méthylation du composé 35	53
3.6.3. Composé 31 : comparaison avec l'acide périllique	54
3.6.4. Composé 32 : stéréochimie de la double liaison 3"-4".....	54
3.6.5. Composés 33 et 34 : configuration du carbone 4"	55
3.6.6. Importance du spectre d'inhibition.....	55
3.6.7. Biosynthèse des analogues de la méiogynine	55
Conclusion	57
Références bibliographiques.....	58
Annexes	
1. Données RMN du composé 31	63
2. Données RMN du composé 32.....	69
3. Données RMN du mélange de composés 33 et 34	75
4. Données RMN du composé 35.....	80

Table des illustrations

Fig. 1. Mécanismes contribuant à l'échappement à l'apoptose	12
Fig. 2. Voies de signalisation agissant sur les caspases initiatrices	15
Fig. 3. Schéma de la voie extrinsèque.....	16
Fig. 4. Structure du DISC.....	17
Fig. 5. Apoptosome	18
Fig. 6. Focalisation sur les molécules solubles relarguées par la mitochondrie	19
Fig. 7. Bcl-2, A. Structure secondaire ; B. Structure tertiaire	20
Fig. 8. Classification des protéines de la famille Bcl-2.....	21
Fig. 9. Activation et oligomérisation de protéines pro-apoptotiques, exemple de Bax	21
Fig. 10. Équilibre entre les protéines anti- et pro-apoptotiques	22
Fig. 11. Structure tridimensionnelle de Bcl-xL	23
Fig. 12. Principaux mécanismes de résistance cellulaire aux agents anticancéreux	25
Fig. 13. <i>Meiogyne cylindrocarpa</i> Burck	26
Fig. 14. Hypothèse biosynthétique de la méiogynine A.....	30
Fig. 15. Hypothèse de biosynthèse des unités sesquiterpéniques de la méiogynine A	31
Fig. 16. Fragmentation de la méiogynine A : réaction de Rétro-Diels-Alder (RDA).....	35
Fig. 17. Spectre de masse de la méiogynine A	36
Fig. 18. Diagramme d'équilibre des phases	40
Fig. 19. Schéma des purifications des fractions 2-2 et 2-3.....	43
Fig. 20. Déplacements chimiques de la méiogynine A 29 attribués	48
Fig. 21. Composé 31	49
Fig. 22. Chaîne latérale du composé 32.....	50
Fig. 23. Chaîne latérale des composés 33 et 34	51
Fig. 24. Proposition de la biosynthèse des analogues de la méiogynine A.....	56

Table des tableaux

Tabl. 1. Composition de la phase mobile, Chromatographie flash du fractionnement.....	33
Tabl. 2. Récapitulatif des données sur les analogues de la méiogynine A connus.....	37
Tabl. 3. Composition de la phase mobile A.....	37
Tabl. 4. Composition de la phase mobile B.....	38
Tabl. 5. Composition de la phase mobile C	38
Tabl. 6. Composition de la phase mobile de la CC.....	39
Tabl. 7. Bilan des masses du fractionnement de l'extrait brut.....	42
Tabl. 8. Résultats du criblage sur Bcl-xL.....	42
Tabl. 9. Bilan des masses de la chromatographie flash de la fraction 2-2.....	44
Tabl. 10. Bilan des masses de la CC du précipité	44
Tabl. 11. Bilan des masses	44
Tabl. 12. Bilan des masses.....	45
Tabl. 13. Bilan des masses de la CPS de la fraction 16-4.....	45
Tabl. 14. Bilan des masses de la CPS de la fraction 27-6.....	45
Tabl. 15. Bilan des masses de la CLHP préparative de la fraction 16-5.....	46
Tabl. 16. Bilan des masses de la CCE de la fraction 19-5.....	46
Tabl. 17. Données RMN de la méiogynine A 29 CDCl ₃ , 500 MHz.....	A48
Tabl. 18. Corrélations.HSQC du composé 31 , CDCl ₃ , 600 MHz	A49
Tabl. 19. Corrélations HSQC du composé 32 , MeOD, 600 MHz.....	A50
Tabl. 20. Corrélations HSQC du mélange des composés 33 et 34 , CDCl ₃ , 600 MHz.....	A51
Tabl. 21. Activité biologique des composés isolés.....	52



SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Influence de métabolites de *Meiogyne cylindrocarpa* dans la régulation de l'apoptose

Résumé

Meiogyne cylindrocarpa, une Annonaceae du Sud-Est de l'Asie et du Nord de l'Australie, a été sélectionnée dans le cadre d'une recherche sur de nouveaux traitements anticancéreux. Les métabolites biosynthétisés par cette plante se sont révélés actifs sur l'apoptose. Ils inhibent la protéine antiapoptotique Bcl-xL, ce qui permettrait de rétablir l'apoptose déficiente dans les cellules cancéreuses.

L'investigation phytochimique de l'extrait AcOEt des écorces de cette plante a conduit à l'isolement de six dimères de sesquiterpènes, dont un est connu : la méiogyne A, ainsi que cinq nouveaux analogues de ce composé. L'évaluation de leur activité biologique montre qu'un dérivé, le composé **31** a une activité comparable à celle de la méiogyne A ; le composé **35** est modérément actif. Les trois autres analogues sont inactifs.

Leur interaction avec la protéine-cible Bcl-xL met en lumière des disparités permettant une ébauche de relation structure-activité.

De plus, une hypothèse de la biosynthèse de ces métabolites a été proposée.

Mots-clés

Apoptose, Bcl-xL, *Meiogyne cylindrocarpa*, Annonaceae, dimères de sesquiterpènes

Abstract

Meiogyne cylindrocarpa, a plant from the Annonaceae family, found in the South-East of Asia and in the North of Australia, was chosen as part of a research program for new cancer treatments. Metabolites from this plant have shown an activity on anti-apoptotic protein Bcl-xL, which could restore inefficient apoptosis in tumoral cells.

A phytochemical study on a EtOAc bark extract from this plant lead to the isolation of six dimeric sesquiterpenoids : meioygnine A and five new derivatives of this compound. Biological assays showed that compound **31** had almost the same activity as meioygnine A ; compound **35** was moderate active. The three other analogues were inactive.

Their different interaction with the target-protein Bcl-xL enables to find a structure-activity relationship hypothesis.

Moreover, a biosynthesis proposal for these metabolites was given.

Keywords

Apoptosis, Bcl-xL, *Meiogyne cylindrocarpa*, Annonaceae, dimeric sesquiterpenoids