

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique*



*Thèse de Doctorat*

*Présentée à l'Université 8 mai 1945 de Guelma*  
*Faculté des Mathématiques, de l'Informatique et des Sciences de*  
*la Matière*

*Département des Sciences de la Matière*  
*Spécialité : Science Chimique*

*par : Mme Bouakkaz Samia*

---

Métabolites secondaires du figuier *Ficus Carica* L., Isolement, identification structurale, dosage par HPLC couplée à la spectrométrie de masse et activités biologiques.

---

**Soutenue publiquement le 09 décembre 2013**

Devant la commission d'examen:

<b>M. Abdaoui</b>	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Président
<b>H. Amira-Guebailia</b>	MCA. Université 8 mai 1945, Guelma	Directrice de thèse
<b>R. Seridi</b>	Prof. Université Badji Mokhtar, Annaba	Examinatrice
<b>S. Akkal</b>	Prof. Université Mentouri, Constantine	Examineur
<b>D. Benouareth</b>	Prof. Université 8 mai 1945, Guelma	Examineur
<b>M. Benahmed</b>	MCA. Université de Tébessa	Examineur

## RÉSUMÉ

Dans cette étude, quatre composés terpéniques ont été isolés à partir des sarments du figuier commun (*Ficus carica* L.). La méthode de fractionnement utilisée est à deux étapes: Une chromatographie sur couche mince (CCM) suivie d'une HPLC préparative. La structure chimique des composés isolés a été élucidée en utilisant la RMN du proton.

Par ailleurs, nous avons procédé au dosage de deux furocoumarines linéaires, le psoralène et le bergaptène, considérées comme phytoalexines et utilisées en médecine, pour le traitement des maladies de peau comme le psoriasis et le leucoderme, et d'un flavonol la quercétine 3-O-glucoside dans les sarments et les feuilles de huit variétés de *Ficus carica* L. Ce dosage a été effectué au moyen de la chromatographie liquide à haute performance HPLC couplée à un détecteur UV-VIS pour certaines analyses et à un spectromètre de masse pour certaines autres.

L'utilisation de la technique HPLC-DAD-MS nous a permis de détecter deux pigments anthocyanes dans les différentes variétés noires de figes implantées dans l'Est de l'Algérie, la Cyanidine 3-O rutinoside était l'anthocyane principale bien que son glucoside a également été détecté. Des différences significatives entre la pulpe et la pelure en contenu anthocyanique ont été observées, cette dernière étant la partie qui a présenté les teneurs les plus élevées. Les variétés Blanquette (violet foncé) et Hamri ont présenté les teneurs en anthocyanes les plus importantes.

La dernière partie concerne l'étude de l'activité anti

oxydante de cinq 4-hydroxy-3-aryl-coumarines et d'une 7-hydroxy-4-méthylcoumarine. Cette étude a été faite théoriquement par la méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) et les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel GAUSSIAN 03. L'activité antioxydante des hydroxy-coumarines a été comparée à celle de leurs analogues sulfurés. Les structures des molécules et des radicaux libres correspondants ont été optimisées par AM1, puis une optimisation complète de ces structures à un niveau B3LYP 6-31G \* de la théorie a été réalisée. Les résultats des calculs théoriques étaient en excellente concordance avec les résultats expérimentaux publiés. Par ailleurs ces résultats confirment que la fixation directe du groupe mercaptan au cycle aromatique de l'hydroxycoumarine est une stratégie efficace pour améliorer son activité antioxydante.

### **Mots clés**

*Ficus carica*, furanocoumarines, anthocyanes, rutine, phytoalexine, activité antioxydante, HPLC, RMN, spectrométrie de masse, DFT.

## **ABSTRACT**

In this study, four terpenic compounds were isolated from the stems of the common fig (*Ficus carica* L.). A two steps method of fractionation was used: A thin layer chromatography (TLC) followed by preparative HPLC. The chemical structure of the isolated compounds was elucidated using proton NMR.

In addition, we proceeded to the quantification of two linear furocoumarins, psoralen and bergapten, considered as phytoalexins and used in medicine for the treatment of skin diseases such as psoriasis and leukoderma, and a flavonol quercetin 3-O-glucoside in the stems and leaves of eight varieties of *Ficus carica* L. This quantification was performed using High Performance Liquid Chromatography HPLC coupled to a UV-VIS detector for some analyses and a mass spectrometer for some others.

The use of HPLC-DAD-MS technique allowed us to detect two anthocyanin pigments in figs dark varieties located in the east of Algeria, Cyanidin 3-O rutinoside was the main anthocyanin although its glucoside was also detected. Significant differences between pulp and peel in anthocyanin content were observed, the latter part presented the highest level of this pigment. Blanquette (dark purple) and Hamri varieties presented the highest concentrations of anthocyanins.

The last part deals with the study of the antioxidant activity of five 4-hydroxy-3-aryl-coumarins and a 7-hydroxy-4-methylcoumarin. This theoretical study was performed by density functional theory (DFT) and calculations were performed using GAUSSIAN 03 software. The antioxidant activity of hydroxy-coumarins was compared to that of their sulfured analogues. The structures of molecules and corresponding free radicals have been optimized by AM1 and full optimization of these structures at a B3LYP 6-31G \* level of theory was performed. The results of theoretical calculations were in excellent agreement with published experimental results. Furthermore, these results confirm that the direct attachment of the mercaptan group to the aromatic ring of the hydroxycoumarin is an effective strategy to improve its antioxidant activity.

### **Keywords**

*Ficus carica*, furanocoumarins, anthocyanins, rutin, phytoalexin, antioxidant activity, HPLC, NMR, mass spectrometry, DFT.

## ملخص

من خلال هذا البحث، تم عزل أربعة مركبات تربينية من فروع شجرة التين و ذلك باستخدام طريقة التجزئة على مرحلتين: المرحلة الأولى تشمل طبقة كروماتوغرافية رقيقة (TLC) متنوعة بتحليل مائع ذي ضغط عال تحضيرى préparative (HPLC). بالنسبة للتركيب الكيميائي للمركبات المعزولة تم توضيحه باستخدام الرنين المغناطيسي النووي للهيدروجين NMR. وبالإضافة إلى ذلك، تم القيام بتحديد اثنين من الفوروكومارين الخطية و هما: اليزورلان psoralène و البرقبطان bergaptène، وتعتبر من الفيتواليكسين phytoalexins والتي تستخدم في الطب، و لعلاج الأمراض الجلدية مثل الصدفية ويوكوديرما، والفلافون كيرسيتين 3-O-جلوكوسيدي الموجودة في فروع و أوراق ثمانية أنواع من التين. تم إجراء هذا الاختبار باستخدام تحليل مائع ذي ضغط عال HPLC المتصل بجهاز كشف الأشعة فوق البنفسجية VIS لبعض التحاليل ومطياف الكتلة بالنسبة للبعض الآخر. استخدام تقنية MS-DAD-HPLC سمحت لنا بالكشف عن اثنين من أصباغ الأنثوسيانين في أنواع مختلفة من التين الأسود و الموجود بشرق الجزائر. Cyanidin 3-O rutinoside كان المركب الرئيسي على الرغم من أن الجلوكوسيد Cyanidin 3-O glucoside تم الكشف عنها كذلك. وقد تم ملاحظة فروق ذات دلالة بين اللب والقشر في محتوى الأنثوسيانين، وهذا الأخير هو الطرف الذي حقق أعلى محتويات. بالنسبة إلى أصناف البلنكيت Blanquette (الأرجواني الداكن) والحمري فقد أعطت محتويات من الانثوسيانين الأكثر أهمية. يتناول الجزء الأخير من هذه الدراسة النشاط المضاد للأكسدة لخمس 4 هيدروكسي-3-أريل-الكومارين و 7 هيدروكسي-4-methylcoumarin. أجريت هذه الدراسة نظريا من خلال الطريقة النظرية لوظيفية الكثافة (DFT) والعمليات الحسابية أجريت باستخدام برنامج Gaussian 03. تمت مقارنة النشاط المضاد للأكسدة للهيدروكسي كومارين مع نظائرها الكبريتية. وقد تم تطوير أداء هياكل الجزيئات و الجذور الحرة المقابلة بواسطة AM1 و بعدها تم تنفيذ تطوير كامل لهذه الهياكل على مستوى نظرية G31-6 B3LYP\*. وكانت نتائج الحسابات النظرية مطابقة بدرجة ممتازة مع النتائج التجريبية التي تم نشرها. و علاوة على ذلك، فإن هذه النتائج تؤكد على أن التثبيت المباشر للكبريت على حلقة مركب الهيدروكسي كومارين hydroxycoumarin يمثل إستراتيجية فعالة لتحسين النشاط المضاد للأكسدة.

**الكلمات الرئيسية :** التين، فيرونوكومارينز furanocoumarins، الانثوسيانين، وروتين، داخرة نباتية، الأنشطة المضادة للأكسدة، HPLC، NMR، قياس الطيف الكتلي، DFT.

*Dédicaces*

Cette thèse est dédiée:

*A ma mère*

*A mon mari et mes enfants*

*A mes frères*

## ***Remerciements***

A l'heure du bilan, je ne peux m'attribuer seule le mérite de ce travail. Et c'est donc en toute logique que je voudrais remercier les personnes qui y ont contribué, alors au terme de cette humble recherche,

Je souhaite exprimer ma gratitude à ma ex-copine de classe et ma directrice de thèse, Docteur Maitre de conférences ***Mme AMIRA-GUEBAILIA HABIBA*** pour avoir accepté de diriger ce travail. J'aimerais lui témoigner ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité, ses qualités pédagogiques et scientifiques. Je voudrais lui avouer que, sans elle, ce travail n'aurait jamais vu le jour. ***Habiba***, merci pour ta disponibilité, tes encouragements et ta rigueur scientifique. Ton sérieux et ta patience ont été primordiaux pendant ma thèse. Un autre grand Merci pour tous les bons et opportuns moments qu'on a passés ensemble.

J'aimerais également remercier le ***Professeur Jean-Michel Mérillon***, directeur du GESVAB à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, où une partie de ce travail a été réalisée, je le remercie de m'avoir accueillie dans son laboratoire et offert l'opportunité de réaliser ce travail et d'élargir mes connaissances en matière de phytopharmacie, de purification et d'identification des métabolites secondaires.

Je tiens à remercier ***Dr Jean-Claude Delaunay et Dr Céline rivièr***e de m'avoir supervisée durant la période de stage au GESVAB.

J'adresse aussi, mes remerciements les plus chaleureux au spécialiste de l' RMN du groupe GESVAB, ***Dr Tristan Richard*** pour avoir analysé par RMN certaines des molécules que j'ai purifiées.

Je remercie également le directeur de laboratoire de Chimie Appliquée (LCA) de l'université de Guelma, le professeur ***Abdaoui Mohamed*** qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury de thèse, je le remercie pour ses encouragements et les facilités accordées pour la réalisation de ce travail.

Je remercie aussi très vivement Monsieur **Ali Benayahoum**, doctorant et membre de l'équipe 'substances naturelles et applications', du laboratoire LCA, pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans l'étude par modélisation moléculaire de l'activité antioxydante des coumarines.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le professeur **Salah Akkal** de l'Université Mentouri de Constantine pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger ce travail afin de l'enrichir de ses précieux conseils. .

J'aimerais également remercier le Professeur **Ratiba Seridi** de l'Université Badji Mokhtar de Annaba qui m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur **Merzoug Benahmed** Maître de conférences de l'Université de Tébessa pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur **Djamel Benouareth** de l'Université 8 mai 1945 de Guelma qui m'a fait l'honneur d'examiner et d'enrichir mon travail de thèse.

Finalement, je destine mes remerciements et non des moindres - pour leur dire toute ma reconnaissance- à mes amies **Nabila, Soraya** et collègues du département de génie des procédés, en particulier **Karima, Mouna, Abida, Hayette et Hassiba**.

Le moment des remerciements a toujours été un moment délicat par crainte d'oubli, alors mes remerciements vont également à toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées mais à qui je témoigne toute mon affection.

## Abréviations et symboles

OMS	Organisation mondiale de la santé
Et al.	Et autre auteurs
BP	Qu'Allah le bénisse et lui accorde la paix
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
DAD	Détecteur à barrette de diodes
UV	Ultraviolet
<i>F. carica</i>	<i>Ficus carica</i>
HSV-1	Herpes simplex virus 1 connu aussi comme Human herpes virus 1
min	Minute
Uma	Unité de Masse Atomique
PUVA	P psoralène, UVA rayonnement ultraviolet de type A UV-A (400-315nm)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
TFA	Acide trifluoroacétique
CIM	Concentration Inhibitrice Minimale
DPPH	1-1 Diphényl 2- Picril Hydrazine
C4H	Cinnamate 4-hHydroxylase
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
MeOH	Méthanol
ppm	Partie Par Million
HF	Hartree-Fock
B3LYP	Becke style 3 Paramètre de Densité de Théorie de la Fonctionnelle au 2 <sup>eme</sup> dérivés (en utilisant Lee-Yang-Parr corrélation fonctionnelle)
IR	Infrarouge
MS	Spectroscopie de masse
$\delta$	Déplacement chimique
<i>dd</i>	Doublet dédoublé
$\lambda_{max}$	Maximum d'absorption dans l'UV/Vis

nm	Nanomètre
$m/z$	Rapport masse/charge électrique
Cy	Cyanidine
Na	Sodium
$r_{A-B}$	Distance entre atome A et atome B

# Sommaire

Résumé	ii
Abréviation et symboles	viii
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures	xv
Introduction	1

## Chapitre I : Etude botanique, phytochimique et activités biologiques de *Ficus carica*

I.1. Caractères généraux	6
I.1.1. Taxonomie	6
I.1.2. Répartition mondiale	7
I.1.3. Types de figuiers	8
I.1.4. Caractères morphologiques	8
I.1.5. Pollinisation du figuier	9
I.1.6. Diverses variétés de figues	10
I.1.7. Panorama de la biodiversité de la Figueraie Algérienne	10
I.2. Le fruit <i>Ficus carica</i>	12
I.2.1. Description	12
I.2.2. Valeur nutritive	14
I.2.3. Métabolites secondaires du fruit	15
I.2.3.1. Les non-flavonoïdes	15
I.2.3.2. Les flavonoïdes	16
I.2.3.3. Les coumarines	18
I.2.4. Propriétés phytopharmaceutiques	19
I.3. La figue sèche	20
I.4. Les feuilles de <i>Ficus carica</i>	21
I.4.1. Métabolites secondaires des feuilles du figuier	21
I.4.1.1. Coumarines	21
I.4.1.2. Flavonoïdes	22
I.4.2. Les études pharmacologiques des feuilles de <i>Ficus carica</i>	22
I.5. Écorce, bois, tiges et racines	23
I.6. Latex	24

I.6.1. Chimie et pharmacologie du latex de la figue	24
---	----

## **Chapitre II: Métabolites secondaires de *Ficus carica*, structure, biosynthèse et importance biologique**

II.1. Généralités	29
II.2. Les coumarines	29
II.2.1. Sources des coumarines	29
II.2.2. Classification	30
II.2.2.1. Coumarines simples	30
II.2.2.2. Furanocoumarines	31
II.2.2.3. Pyranocoumarines	31
II.2.2.4. Dicoumarines (coumarines dimériques)	31
II.2.2.5. Tricoumarines (coumarines trimériques)	31
II.2.3. Les furocoumarines	31
II.2.3.1. Nature chimique	31
II.2.3.2. Distribution dans le règne végétal	33
II.2.3.3. Rôles écologiques des furocoumarines	33
II.2.3.4. Propriétés biologiques, photobiologiques et activités Pharmacologiques des furocoumarines	34
II.2.3.4.1. Phototoxicité des furocoumarines	34
II.2.3.4.2. Photosensibilisation	35
II.2.3.4.3. Activités mutagène et carcinogène	35
II.2.3.4.4. Activités antibactériennes	37
II.2.3.4.5. Inhibition d'enzymes de mammifères et d'insectes	37
II.2.3.4.6. Propriétés antioxydantes des coumarines	38
II.2.3.5. Biosynthèse des furocoumarines linéaires	40
II.3. Les anthocyanes	43
II.3.1. Structures chimiques	43
II.3.2. Propriétés des anthocyanes	44
II.3.2.1. Stabilité	44
II.3.2.2. Effet du pH	45
II.3.2.3. Spectre d'absorption	47
II.3.2.4. Décoloration par le Bisulfite de Sodium	47
II.3.3. Rôle écologique des anthocyanes	47

II.3.4. Propriétés biologiques des anthocyanes	47
II.3.5. Extraction des anthocyanes	49
II.4. Les Terpènes	49
II.4.1. Généralités	49
II.4.2. Classification	50
II.4.2.1. Hémiterpènes (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> )	50
II.4.2.2. Monoterpènes (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	51
II.4.2.3. Sesquiterpènes (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	52
II.4.2.4. Diterpènes (C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> )	52
II.4.2.5. Triterpènes (C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> )	53
II.4.2.6. Tetraterpènes	54
II.4.2.7. Polyterpènes	55

### **Chapitre III: Matériels et méthodes**

III.1. Solvants	57
III.2. Appareillage	57
III.3. Broyage et macération	59
III.4. Extraction	59
III.5. Purification des polyphénols	59
III.5.1. Chromatographie sur couches minces semi-préparatives	59
III.6. Dosage par HPLC-DAD et HPLC-MS	60
III.6.1. Solvants utilisés	60
III.6.2. Gradient	61
III.6.3. Injection	63
III.7. Dosage des polyphénols dans les sarments, fruits et feuilles de <i>Ficus carica</i>	63
III.7.1. Échantillons de sarments et de feuilles étudiés	63
III.7.2. Échantillons de fruits (figues) étudiés dans le dosage des anthocyanes	64
III.7.2.1. Filtration sur résine Amberlite XAD 7HP	65
III.7.3. Standards	67
III.7.4. Préparation des gammes étalons	67
III.7.5. Analyses par HPLC	67
III.7.5.1. Préparation des échantillons	67
III.7.6. Intégration	68

III.8. Etude théorique de l'activité antioxydante des coumarines	68
--	----

### **Chapitre IV: Résultats et Discussion**

IV.1. Caractérisation des principaux composés isolés des sarments de <i>Ficus carica</i>	73
IV.2. Dosage des polyphénols dans différentes parties de <i>Ficus carica</i>	76
IV.2.1. Données chromatographiques des standards	76
IV.2.2. Concentrations des polyphénols dans différentes parties de <i>F. carica</i> L.	82
IV.2.2.1. Validation de la méthode analytique	82
IV.2.2.2. Identification des furanocoumarines et de la rutine par RP-HPLC-MS dans les sarments et feuilles <i>Ficus carica</i> .	86
IV.2.2.3. Distribution des polyphénols dans les sarments et feuilles de <i>Ficus carica</i>	90
IV.2.2.4. Identification des anthocyanes dans les fruits par RP-HPLC-MS	95
IV.2.2.5. Distribution des anthocyanes dans diverses variétés de figues	99
IV.3. Activité antioxydante	101
IV.3.1. Optimisation de la géométrie	102
IV.3.2. HOMO et LUMO	105
IV.3.3. Potentiel d'Ionisation Adiabatique (AIP)	109
IV.3.4. Enthalpie de dissociation de liaison (BDE)	111
Conclusion	113
Bibliographie	116
Annexes	I

## Liste des tableaux

Tableau I.1: Classification classique du figuier.	7
Tableau I.2 : Caractères morphologiques du figuier.	9
Tableau I.3: Variétés du genre <i>Ficus</i> .	10
Tableau I. 4: Noms vernaculaires de quelques variétés de figues.	13
Tableau I.5: Valeur nutritive de figue fraîche.	15
Tableau I.6: Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques présents dans la figue.	16
Tableau II.1: Structures de quelques coumarines (génines).	30
Tableau II.2: Structures de quelques hétérosides de coumarines.	30
Tableau II.3: Les anthocyanidines naturelles.	44
Tableau III.1: Gradient HPLC analytique pour les coumarines.	61
Tableau III.2: Gradient HPLC utilisé pour l'analyse des anthocyanes.	62
Tableau III.3: Noms vernaculaires et emplacement des 8 variétés de figues étudiées.	64
Tableau IV.1: Données HPLC analytique pour le psoralène.	76
Tableau IV.2: Données HPLC analytique pour le bergaptène.	77
Tableau IV.3: Données HPLC analytique pour la rutine.	78
Tableau IV.4: Données HPLC analytique de la keracyanine.	80
Tableau IV.5: Données HPLC analytique pour la cyanidine 3-O-glucoside.	81
Tableau IV.6: Temps de rétention ( $T_R$ ), données de spectrométrie de masse et l'identification des coumarines dans les sarments de <i>Ficus carica</i> .	90
Tableau IV.7: Concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , DW) des polyphénols dans 8 variétés Algériennes de <i>Ficus carica</i> .	93
Tableau IV.8: Teneurs de psoralène et de bergaptène dans différentes parties de <i>Ficus carica</i> L.	93
Tableau IV.9: Temps de rétention ( $T_R$ ), données de spectrométrie de masse et l'identification des anthocyanes dans les figues.	98
Tableau IV.10: Concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ FW) des anthocyanes dans 6 variétés de <i>Ficus carica</i> Algériennes.	99
Tableau IV.11: Valeurs optimisées par B3LYP/6-31G * des angles de dièdre et des longueurs des liaisons hydroxyles et sulfhydriles des antioxydants étudiés.	105
Tableau IV.12: Propriétés théoriques de la 4-hydroxycoumarine et ses dérivées.	110
Tableau IV.13: Propriétés théoriques de la 4-hydroxycoumarine et ses dérivées sulfurées.	111

## Liste des figures

Figure I.1: <i>Ficus carica</i>	9
Figure I.2: Quelques variétés de figes (a): unifères (b): bifères.	11
Figure I.3: Fruit de <i>Ficus carica</i> .	14
Figure I.4: Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans la figue.	16
Figure I.5: Squelette d'un flavonoïde.	17
Figure I.6: Structures chimiques de quelques flavonols présents dans la figue.	17
Figure I.7: Structures chimiques de flavan-3-ols de la figue.	18
Figure I.8: Feuille de <i>Ficus carica</i> .	21
Figure I.9: Lutéoline.	22
Figure II.1: Structures chimiques de quelques coumarines.	32
Figure II.2: Réactions de monoaddition en C-3—C-4(1) ou en C-4'—C-5'(2).	36
Figure II.3: Réactions de bi-addition en C-4'—C-5' et C-3—C-4.	37
Figure II.4: Biosynthèse des furocoumarines linéaires.	42
Figure II.5: Structure du cation flavylium.	43
Figure II.6: Transformations structurales des anthocyanes en milieu aqueux.	46
Figure II.7: Addition du bisulfite de sodium sur le cation flavylium.	47
Figure II.8: Exemples de composants hemiterpéniques.	50
Figure II.9: Exemples de composants monoterpéniques.	51
Figure II.10: Exemples de sesquiterpènes.	52
Figure II.11: Exemples de composants diterpéniques.	53
Figure II.12: Quelques exemples de triterpènes.	54
Figure II.13: Structures de deux caroténoïdes.	54
Figure III.2: Schéma de principe d'une chaîne HPLC.	57
Figure III.2: Gradient HPLC utilisé pour l'analyse des furocoumarines.	61
Figure III.3: Gradient HPLC pour les anthocyanes.	62
Figure III.4: Protocole de traitement du fruit.	66
Figure IV.1: Structure de la friedelin.	73
Figure IV.2: Structure du lupéol.	74
Figure IV.3: Structure de l'acide oléanolique.	75
Figure IV.4: Structure de l'acide 3-acétyl bétulinique.	75

Figure IV.5: Courbe étalon du Psoralène.	77
Figure IV.6: Temps de rétention et profil UV du Psoralène.	77
Figure IV.7: Courbe étalon du Bergaptène.	78
Figure IV.8: Temps de rétention et profil UV du Bergaptène.	78
Figure IV.9: Courbe étalon de la rutine.	79
Figure IV.10: Temps de rétention et profil UV de la rutine.	79
Figure IV.11: Courbe étalon de la keracyanine.	80
Figure IV.12: Temps de rétention et profil UV de la keracyanine.	80
Figure IV.13: Courbe étalon de la cyanidine 3-O-glucoside.	81
Figure IV.14: Temps de rétention et profil UV de la cyanidine 3-O-glucoside.	81
Figure IV.15: Chromatogramme HPLC de l'écorce des sarments de <i>Ficus carica</i> , variété Blanquette.	83
Figure IV.16: Chromatogramme HPLC de la partie bois des sarments de <i>Ficus carica</i> , variété Blanquette.	84
Figure IV.17: Chromatogramme HPLC des feuilles de <i>Ficus carica</i> , variété Blanquette.	85
Figure IV.18: Identification des furanocoumarines et de la rutine par RP-HPLC-MS.	87
Figure IV.19: Chromatogramme HPLC-UV à 310nm de la partie bois des sarments de <i>Ficus carica</i> variété Blanquette.	87
Figure IV.20: Superposition des chromatogrammes de standards purs et d'extraits de sarments de la variété Blanquette (HPLC-DAD-MS).	88
Figure IV.21: Spectres de masse en mode positif obtenus par HPLC-MS.	89
Figure IV.22: Comparaison entre concentrations de psoralène, bergaptène et rutine dans les trois parties des variétés de sarments de figuiers étudiées (A-H).	92
Figure IV.23: Chromatogramme HPLC à 518nm de la pelure du fruit variété Blanquette.	96
Figure IV.24: Chromatogramme HPLC à 518nm de la pulpe du fruit variété Blanquette.	96
Figure IV.25: Chromatogramme HPLC-UV à 510nm de la pelure de la variété Blanquette.	97
Figure IV.26: Spectres de masse par HPLC-DAD-MS, en mode positif de la keracyanine.	97
Figure IV.27: Superposition des chromatogrammes de standards purs et d'extraits de la pelure du fruit variété Blanquette (HPLC-DAD-MS).	98
Figure IV.28: Structures chimiques des coumarines étudiées.	102
Figure IV.29: Structures chimiques optimisées des coumarines étudiées.	104
Figure IV.30: Distribution des HOMOs (a) et LUMOs (b) des différentes hydroxycoumarines étudiées.	109

# *Introduction*

## Introduction

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales, source essentielle de médicaments. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis il arrive à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne, laquelle en effet n'a pu trouver remède à tous les maux, en plus de se buter à une résistance accrue des pathogènes et à une panoplie d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments traditionnels. Depuis, l'importance des plantes médicinales est progressivement prouvée par la recherche scientifique, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne principalement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Par ailleurs, selon l'OMS, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées en Afrique, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui constituent 90% de la médecine traditionnelle. La valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être : sécurité, efficacité et qualité.

Depuis quelques années, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que la consommation de légumes, de fruits et de certaines boissons peut prévenir des maladies cardiovasculaires et certains cancers (Block et al., 1992). Plusieurs études épidémiologiques et cliniques confirment le rôle incontestable de la consommation régulière de fruits et de légumes dans la réduction du risque des cancers et des maladies chroniques, notamment, les affections cardiovasculaires (Liu, 2003). En effet, les bons aliments peuvent avoir un effet beaucoup plus large sur une variété de problèmes de santé que les médicaments modernes (Bharat et al., 2006).

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires qui sont les protéines, les glucides et les lipides. Les métabolites secondaires sont classés en plusieurs grands groupes: parmi ceux-ci, les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques (Li et al., 2007). Les métabolites secondaires végétaux sont des molécules qui constituent très souvent la clé de voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement. D'une part, les pigments et les arômes (flavonoïdes, caroténoïdes, terpènes...) sont très souvent impliqués dans des relations à bénéfices réciproques établies au cours de l'évolution entre plantes et animaux (pollinisation, dissémination des semences...). D'autre part, la plupart des métabolites

secondaires végétaux sont des phytoalexines, c'est à dire des molécules biologiquement actives, impliquées dans la défense des végétaux.

Parmi ces plantes, les figes comestibles, *Ficus carica* L. occupent une place importante dans la nutrition humaine et animale dans le monde entier. Les êtres humains ont consommé les fruits de ces arbres depuis les premiers temps, et les ont utilisés ainsi que d'autres parties de ces arbres à des fins médicinales.

La consommation régulière de figes contribue à abaisser l'hypertension artérielle, contrôler le cholestérol, soulager la constipation, prévenir le cancer du côlon, contrôler le taux de glucose dans le sang, prévenir l'apparition du diabète de type 2 et constitue un important draineur des voies respiratoires et intestinales. Récemment, les aspects pharmacologiques de *Ficus carica* ont été spécifiquement examinés et ont montré que cette plante :

- Possède des effets antitumoraux, en réduisant la toxicité et les effets secondaires en actinothérapie et en chimiothérapie (Zhang et Jiang 2006).
- Permet de contrôler l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie, et renforcer la résistance à l'oxydation.
- A une action contre les bactéries et les virus.

La richesse de la fige en fibres et en potassium contribue à prévenir de nombreuses affections. Les fibres améliorent la digestion, permettent de mieux absorber les nutriments et contrôlent le taux de sucre absorbé durant le repas, l'empêchant d'augmenter trop rapidement. Les fibres protègent également de nombreuses affections intestinales et les études démontrent qu'une consommation élevée en fibres protège des affections cardiovasculaires. L'alimentation occidentale est généralement beaucoup trop riche en sodium et favorise les affections cardiaques, une bonne façon de contrecarrer les effets dans l'organisme d'une trop haute consommation de sodium, est d'augmenter la consommation de potassium que l'on retrouve en bonne quantité dans la fige.

La fige renferme une enzyme qui lui est particulière, connue sous le nom d'enzyme de la fige ou "Ficine", et dont le rôle important dans la digestion a été prouvé. Il a été également prouvé que ce fruit est bénéfique pour l'écoulement du lait, pour le traitement des hémorroïdes, la constipation chronique, la goutte, les maladies pulmonaires, les douleurs prémenstruelles, l'épilepsie, les ulcères buccaux, la gingivite, l'amygdalite, la pharyngite, le vitiligo, la cicatrisation des blessures et des différents ulcères (*Lansky et Helena, 2011*).

Aussi "Abu Dardàa" a-t-il rapporté ce hadith du Messenger d'Allah (BP sur lui) : "Si je disais qu'il y a un fruit qui provient du Paradis, je dirais que c'est la fige parce qu'elle est sans

noyau. Mangez-en, car elle guérit les hémorroïdes et est bénéfique à la Goutte." De là vient le serment par la figue dans le Coran et la nomination d'une de ses Sourates par ce nom.

Pour toutes ces raisons, l'objectif de ce travail de thèse consiste en la valorisation de cette plante, pour cela:

En premier lieu, les sarments de *Ficus carica* ont été soumis à une extraction par solvant afin d'en extraire des métabolites secondaires.

En second lieu, une analyse qualitative et quantitative de coumarines dans les sarments et les feuilles et d'anthocyanes dans les fruits de différentes variétés de figuiers de l'Est Algérien a été effectuée par HPLC-DAD et HPLC-DAD-MS.

La troisième partie concerne l'étude par DFT de l'activité antioxydante de cinq C3-aryl-4-hydroxycoumarines, dérivés de la 4-hydroxycoumarine et de la 4-méthylumbelliférone, afin d'évaluer l'effet de différents substituants aryles en C3 sur l'activité antioxydante. En outre, une étude sur les différences de l'activité antiradicalaire de chaque hydroxycoumarine et son analogue sulfuré a été effectuée afin de visualiser l'effet de la fixation du groupe mercaptan au cycle aromatique de l'hydroxycoumarine sur cette activité.

Ce travail sera présenté en quatre chapitres:

L'état des connaissances bibliographiques botaniques et phytochimiques sur *Ficus carica* L. ainsi que les activités biologiques les plus importantes des différentes parties de cette plante seront présentés dans un premier chapitre.

Dans un deuxième chapitre, nous aborderons un aperçu général sur les métabolites secondaires, notamment ceux ayant fait l'objet de cette étude: les coumarines, les anthocyanes et les composés terpéniques.

Le troisième chapitre sera consacré aux méthodes et techniques utilisées pour l'extraction, la purification ainsi que l'identification structurale des composés obtenus, nous présenterons également dans ce chapitre le dosage de certaines molécules dans les sarments, les feuilles et les fruits de huit variétés locales de figues.

L'interprétation des résultats de dosage et la détermination structurale des composés isolés ainsi que les résultats de l'étude théorique de l'activité antioxydante effectuée par des méthodes de chimie computationnelle seront détaillés dans le quatrième chapitre.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale qui portera sur une lecture attentive des différents résultats obtenus et des perspectives.

# *Chapitre I*

## I. Etude botanique, phytochimique et activités biologiques de *Ficus carica*

### I.1. Caractères généraux

Avec le raisin, les olives et les dattes, la figue compte au nombre des tout premiers fruits cultivés et est l'un des premiers arbres dont nos ancêtres aient savouré les fruits, précédant même les céréales, le miel, les dattes, la grenade et les olives (Kislev et al., 2006). On retrouve alors des traces de la figue depuis les temps bibliques en passant par toutes les anciennes civilisations (égyptienne, grecque, romaine).

2500 ans avant notre ère, les figues sont déjà mentionnées sur des tablettes d'argile Sumériennes, on les retrouve également cinq siècles plus tard chez les Assyriens. La figue est par ailleurs, le fruit le plus fréquemment mentionné dans la Bible et a été cité dans la « Sourat Attine » du Coran. Dès l'antiquité, on appréciait leur goût sucré et leur haute valeur nutritive. Leur séchage rapide et facile, ne nécessitant pas la mise en œuvre de techniques ou de précautions sophistiquées, permettait d'en apprécier les bienfaits longtemps après la récolte, atout essentiel dans des conditions de vie primitive.

L'histoire du figuier présente beaucoup d'analogie avec celle de l'olivier en ce qui concerne l'origine et les limites géographiques. Avec l'olivier, la vigne et le grenadier, il constitue le fond de l'arboriculture de l'ancien monde méditerranéen (Lansky et Helena, 2011). Les figues et les figuiers, sont un genre peu étudié en pharmacognosie moderne, cependant, les figues ont été utilisées en médecine pendant des siècles, et cette utilisation a été enregistrée dans les écrits classiques médicaux d'Europe et du Moyen-Orient. Une de leurs utilisations, bien connues, est le placement des cataplasmes de figues sur des tumeurs comme traitement des enflures anormales. Ces renflements, selon les rapports d'experts, auraient pu être dus à une infection ou, alternativement, à un cancer (Ben Noun, 2003). Dans les deux cas, les figues peuvent être des traitements médicaux efficaces bien que les fruits, «figues » pourraient être une source de médicaments moins connue que les feuilles ou l'écorce.

#### I.1.1. Taxonomie

*Ficus carica* ou figuier commun est un arbre fruitier de la famille des Moracées du genre ficus et dont le Nom scientifique est: *Ficus carica* L. (Tableau I.1), il est considéré comme l'emblème du bassin méditerranéen, où il est cultivé depuis des millénaires. Nos ancêtres ont utilisé les différentes parties de cet arbre, feuilles, latex, écorce et racines à des fins médicinales. Le genre *Ficus* possède en moyenne 850 espèces, et le *Ficus* est probablement le leader de tous les genres de plantes vu le nombre d'espèces dont il dispose (Lansky et Helena, 2011). On

l'appelle aussi "figuier de Carie" ou "arbre à cariques". Le nom générique *Ficus* est le nom latin du figuier. L'adjectif spécifique *carica* signifie originaire de la Carie, ancienne province d'Asie mineure d'où le figuier est supposé provenir (Neal, 1965; Dehgan, 1998).

**Tableau I.1:** Classification classique du figuier.

Règne	<i>Plantae</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Urticales</i>
Famille	<i>Moracée</i>
Genre	<i>Ficus</i>
<b>Nom binomial</b>	
<b><i>Ficus carica</i> L.</b>	
<b>Classification phylogénétique</b>	
Ordre	<i>Rosales</i>
Famille	<i>Moracée</i>

### I.1.2. Répartition mondiale

*Ficus carica* est cultivé depuis longtemps dans divers endroits à travers le monde pour ses fruits comestibles. Il s'agit d'une récolte mondiale importante. Il est généralement admis que les figues sont originaires d'Asie mineure et ont réussi à se répandre dans le monde entier (Flaishman et al., 2008). Le figuier se rencontre depuis très longtemps dans tout le Bassin Méditerranéen, de la Syrie au Maroc et de la Turquie au Portugal, et dans les États-Unis d'Amérique. Selon Dehgan (1998), Le figuier est cultivé partout où règne un climat présentant de fortes similitudes avec le climat méditerranéen. *Ficus carica* préfère le plein soleil et divers sols bien drainés. Il est étonnamment résistant au froid, et il supportera des gels de -12°C à -15°C. Les principaux producteurs de figues comestibles sont la Turquie, l'Égypte, le Maroc, l'Espagne, la Grèce, la Californie, l'Italie, le Brésil et d'autres endroits où les hivers sont généralement doux et les étés chauds et secs (Tous et Ferguson, 1996).

Les principaux ennemis du *Ficus carica* sont la mosaïque (Maladie virale très difficile à combattre), la mouche de la figue comestible et les cochenilles. Le figuier est un arbre rustique ne demandant pas de traitements particuliers, un traitement d'hiver préventif peut lui être suffisant.

### **I.1.3. Types de figuiers**

Les figuiers se divisent en deux grandes familles de base (Peter Bauwens, 2008):

a)- Les figuiers mâles, dits aussi figuiers de bouc (caprifigier) donnant des figes immangeables, ne produisent que des figes-fleurs qui ne parviennent jamais à maturité, donc fruits impropres à la consommation mais qui abritent en hiver un insecte, le blastophage qui assurera la pollinisation des figes en mai et juillet, en effet certaines variétés ont besoin de pollinisation pour faire fructifier leur figes d'automne.

b)- Les figuiers femelles produisent les figes comestibles et sont subdivisés en deux types:

- Les figuiers bifères donnant des fruits utilisables à l'état frais, fructifient deux fois par an. En effet, il se forme en fin de production des figes d'automne précédentes, des petites figes, qui passent l'hiver au stade 'grain de poivre' pour reprendre leur développement au printemps de l'année suivante et mûrir à partir de mi-juin. Ce sont les figes fleurs (FF) ou figes de printemps ou breba (El-bakor) et une deuxième récolte ou figes d'automne (sur les bois de l'année en cours) à partir d'août. La plupart des variétés de cette catégorie donnent des fruits impropres au séchage.
- Les figuiers unifères ou d'automne produisant les figes de séchage en une seule récolte à l'automne.

### **I.1.4. Caractères morphologiques**

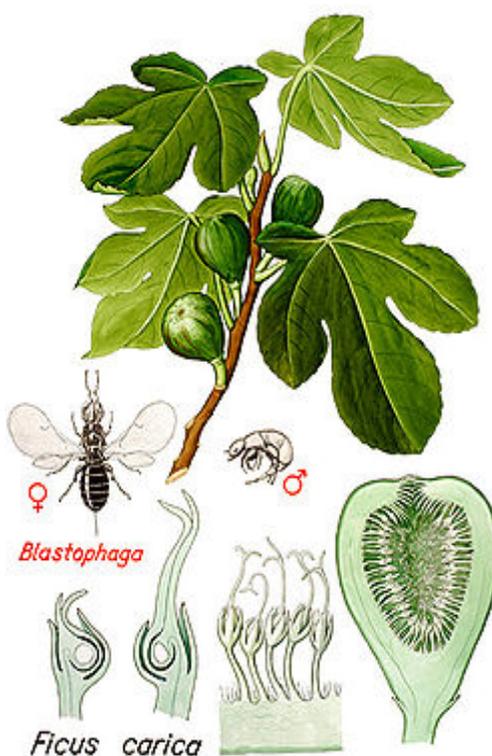
*Ficus carica*; est un arbre, le plus souvent de trois à quatre mètres de haut, mais qui peut atteindre jusqu'à huit mètres dans des conditions climatiques ou d'environnement adaptées notamment près des sources ou des puits. C'est un arbre au feuillage très décoratif, au tronc souvent tortueux, au port souvent buissonnant et aux fruits largement appréciés (Tableau I.2). La floraison a lieu à l'intérieur des figes, toutes les parties de la plante (rameaux, feuilles, fruits) contiennent un latex blanc et irritant. Les feuilles, urticantes, peuvent provoquer des allergies de la peau (Figure I.1). La mise à fruits débute à partir de la troisième année mais le rendement maximal est atteint à l'âge de six ans.

**Tableau I.2 :** Caractères morphologiques du figuier.

Écorce	L'écorce est lisse et gris argenté.
Feuilles	Couleur vert clair et de grande taille.
Fleurs	Minuscules et hors de vue.
Fruits	Souvent craquage à maturité.
Graines	Généralement creuses et peuvent être grandes, moyennes ou petites et en grand nombre de 30 à 1600 graines par fruit. .

### I.1.5. Pollinisation du figuier

Pour la caprifigation, le figuier est une espèce dioïque avec un arbre mâle (caprifiguiier) et un arbre femelle (figuier commun). Le premier assure la fourniture du pollen et l'accomplissement du cycle de l'insecte pollinisateur, le deuxième assure la production des figues comestibles. Ces dernières peuvent être des figues fleurs qui ne possèdent que des fleurs femelles et n'ont donc pas besoin de pollinisation donc se développent par *parthénocarpi*e ou des figues d'automne qui nécessitent généralement la pollinisation pour arriver à maturité. Cette pollinisation s'effectue grâce à un insecte qui vit dans les fleurs femelles du caprifiguiier, la guêpe pollinisatrice pour *Ficus carica* est *Blastophaga psenses* (L.) (Wagner et al., 1999).



**Figure I.1:** *Ficus carica*.

### I.1.6. Diverses variétés de figes

Il existe environ 250 espèces de figuiers (Tableau I.3) et 3 groupes de couleurs de figes (blanches ou vertes, grises ou rouges, noires ou violettes foncées). Selon leur forme, on divise les figes en trois groupes. Le premier est constitué de figes tout simplement rondes, souvent aplaties à la base et parfois également en haut. Toute une série de figes ont un profil triangulaire ou en forme de cône rappelant la forme d'une poire et le dernier groupe est constitué de fruits oblongs, irréguliers ou asymétriques (Peter Bauwens, 2008).

**Tableau I.3:** Variétés du genre Ficus.

<i>Ficus pumila</i>	<i>Ficus pumila variegata</i>	<i>Ficus religiosa</i>	<i>Ficus retusa</i>	<i>Ficus lyrata</i>	<i>Ficus buxifolia</i>
<i>Ficus benghalensis</i>	<i>Ficus wildemaniana</i>	<i>Ficus triangularis</i>	<i>Ficus cyatispula</i>	<i>Ficus elastica</i>	<i>Ficus Benjamina</i>
<i>Ficus carica</i>	<i>Ficus sycomorus</i>	<i>Ficus citrifolia</i>	<i>Ficus pumila</i>	<i>Ficus microcorpa</i>	<i>Ficus dendrocida</i>
<i>Ficus blepharophylla</i>	<i>Ficus rubiginosa</i>	<i>Ficus retusa</i>	<i>Ficus rumphii</i>	<i>Ficus bizanae</i>	<i>Ficus lutea</i>

Il existe plus de 150 variétés de figes, la valeur nutritive serait sensiblement la même quelque soit la variété, mais les fruits de couleur foncée seraient plus riches en antioxydants. La figure (I.2) illustre quelques variétés de figes parmi les plus commercialisées dans le monde.

### I.1.7. Panorama de la biodiversité de la Figueraie Algérienne

Comme les autres pays de la Méditerranée, le figuier est aussi très ancien en Algérie. Les villageois de certaines zones de production (Mechtras, Boghni, Draa el Mizan) affirment que sa culture est très ancienne et que le fruit séché s'échangeait avec les céréales en provenance d'autres pays. Les diverses dénominations berbères pour désigner l'arbre, les fruits frais, les figes sèches attestent de son ancienneté sur le sol algérien. Parmi les exportations de fruits algériens, les figes sèches tiennent la troisième place après les agrumes et les dattes. En effet, la fige sèche, aliment riche en sucre (55 % environ) et en sels de calcium, constitue avec l'huile d'olive la base de la nourriture des populations kabyles. Le figuier (*Ficus carica*) se localise essentiellement dans les régions montagneuses de Kabylie. Sur les 7,6 millions de figuiers que compte l'Algérie, 6 millions se trouvent dans les deux wilayas de Tizi Ouzou et de Béjaïa.

(a)



Col de dame noir



Napolitaine



Ronde de Bordeaux



Marseillaise



Panachée



Boule d'or

(b)



Brown Turkey



Mission noir



Goutte d'or



Dalmatie



Grise Saint Jean



Sultane

**Figure I.2:** Quelques variétés de figues (a): unifères (b): bifères.

L'Algérie est le 7<sup>ème</sup> producteur mondial de figes, avec 60 000 t/ an, derrière la Turquie (280 000 t/an), l'Egypte (180 000 t/an) et le Maroc (67 000 t/an). Les variétés algériennes ont été décrites par plusieurs auteurs et botanistes à l'instar de MAURI (1939, 1942), MANN (1939, 1942), MAZIERES (1920) et le botaniste et médecin français TRABUT (1904) (IRA. J CONDIT, 1955). Selon un recensement établi par l'Institut Technique de l'Arboriculture fruitière (ITAF, Algérie), il existe 37 variétés de figes en Algérie. La monographie réalisée en 1955 par IRA. J CONDIT a recensé pas moins de 43 variétés (Idem, 1934) dont 17 caprifigiers et 26 variétés comestibles. Nous présentons dans le tableau (I.4) quelques variétés de figiers que l'on peut trouver autour de la Méditerranée et ailleurs.

## **I.2. Le fruit *Ficus carica***

### **I.2.1. Description**

Le terme, « fruit sans fleur » donné à la figue donne une indication quant à sa forme alambiquée. Les figes contiennent nombreuses graines, chacune représentant techniquement un fruit minuscule, modeste et intérieurement féminine, la figue cache ses fleurs dans son fruit (Lansky et Helena, 2011). Le fruit du figuier s'appelle syconium (Figure I.3), c'est un réceptacle de fleur très agrandi, charnu et creux, ce syconium porte à l'intérieur une masse de fleurs minuscules. Les fruits sont en fait de tous petits akènes qui se développent à partir de ces fleurs. Nous mangeons donc dans le cas de la figue, une sorte d'enveloppe qui contient les fruits (Peter Bauwens, 2008).

Le réceptacle contient une ouverture, qu'on appelle ostiole. Il est fermé par des écailles protectrices qui empêchent l'entrée d'insectes indésirables. Les figes peuvent être de différentes tailles, formes et couleurs, allant du jaune crémeux au noir. Leur chair change également de couleur d'une variété à l'autre. Le même arbre peut donner des fruits différents. Les fruits peuvent être consommés crus, séchés ou en conserve (Neal, 1965).

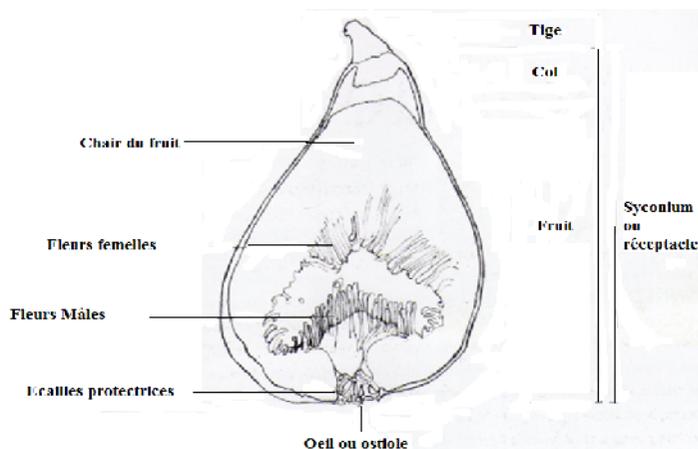
Un séchage rationnel a pour but de faire passer la teneur en eau de la figue de 38 à 50% au moment de la cueillette à 25 ou 30% en fin de séchage, la concentration en sucre qui atteint ou dépasse 50 % joue le rôle d'antiseptique, constituant un milieu visqueux défavorable à la vie des microbes. On procède donc au séchage naturel par utilisation de la chaleur solaire. Après

**Tableau I.4:** Noms vernaculaires de quelques variétés de figes.

(<http://www.pommiers.com/figue/figuier.htm>)

Pays	Algérie	Egypte	Grèce	Inde	Italie	Maroc	Japon	Palestine	Portugal	Tunisie
<b>Variétés</b>	Abiarious, Azaich, Azenjar, Averane, Bardajic, Francescana, Isly, Napolitaine, Tagaouaout, Thamriout, Tharanimt, Tharlit, Thaïadelst, Thamcingoult, Thankarkor, Thazgouart	Kahramani	Pregussata	Poona	Datero, Fracazzano ou Sesso-fracazzano Lucano, Paradisi, Pissaluto, Rizzelo, San Antonio, Verderano	Nabout, verte ou blanche, consommé frais ou sec	Horaisshi	Hdadi, Khdari, Kharroubi, Hmari, Mwazi, Tdani	Badalhouce, Moscatel Branco, Rei, Sao Luiz	Asselbou-tchiche (blanche), Bayoudi (blanche), Bezoul-el Khadem, Bidh-el- djemel, Biter-abiod (blanche), El-khadri (blanche), El-nouchi (blanche), Habitiz,, Tebessi, Temri

avoir séjourné de 1 à 3 jours au soleil suivant la rapidité de dessiccation, les fruits achèvent leur séchage lentement à l'ombre ce qui conserve à la peau toute sa souplesse et donne finalement un produit de qualité supérieure. La dessiccation est arrêtée lorsqu'au toucher, le fruit présente une certaine élasticité.



**Figure I.3:** Fruit de *Ficus carica*.

### I.2.2. Valeur nutritive

Les figues sont l'une des sources les plus élevées en calcium et en fibres. Les figues fraîches et séchées contiennent environ 30 % de fibres solubles et 70 % de fibres insolubles. De façon générale, une alimentation riche en fibres est associée à un plus faible risque de cancer du côlon. Les fibres solubles peuvent contribuer à normaliser les taux sanguins de cholestérol, de glucose et d'insuline, ce qui peut aider au traitement des maladies cardiovasculaires et du diabète de type 2. Quant aux fibres insolubles, elles aident à maintenir une fonction intestinale adéquate.

La figue contient un grand pourcentage de glucides dont la plupart sont des monosaccharides et des composés d'amidon, avec une petite proportion de protéines en plus d'une plus petite proportion de sels minéraux comme le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore, le fer, le cuivre, le zinc, le soufre, le sodium et le chlore. Elle contient également de nombreuses vitamines, des enzymes, des acides, des agents antiseptiques, en plus d'une grande quantité d'eau. Donc, la figue est un fruit riche en éléments nécessaires à la nourriture de l'Homme et dans des proportions équilibrées. Sa richesse en sucre et en sels minéraux en fait un aliment recommandé par la diététique. En fruit sec, elle est très énergétique (250 kcal/100 g) (Tableau I.5).

**Tableau I.5:** Valeur nutritive de figue fraîche.

<b>Figue crue</b> (valeur nutritive pour 100g)			
Eau : 79,11 g	Cendres totales : 0,66 g	Fibres : 2,9 g	Valeur énergétique: 74 kcal
Protéines: 0,75 g	Lipides: 0,30 g	Glucides: 19,18 g	Sucres simples : 16,26 g
minéraux			
Calcium : 35 mg	Fer : 0,37 mg	Magnésium : 17 mg	Phosphore : 14 mg
Potassium : 232 mg	Cuivre : 0,070 mg	Sodium : 1 mg	Zinc : 0,15 mg
Vitamines			
Vitamine C : 2,0 mg	Vitamine B1 : 0,060 mg	Vitamine B2 : 0,050 mg	Vitamine B3 : 0,400 mg
Vitamine B5 : 0,300 mg	Vitamine B6 : 0,113 mg	Vitamine B9 : 0 µg	Vitamine B12 : 0,00 µg
Vitamine A : 142 µg	Rétinol : 0 µg	Vitamine E : 0,11 µg	Vitamine K : 4,7 µg
Acides gras			
Saturés : 0,060 g	Mono-insaturés : 0,066 g	Polyinsaturés : 0,144 g	Cholestérol : 0 mg

La figue séchée est une source de vitamines A et K. Elle contient différents nutriments (dont les fibres, le potassium, le calcium et le fer) en taux plus élevé que ceux des canneberges, dattes, raisins et prunes séchés. Bien que les produits laitiers soient la principale source de calcium dans notre alimentation, les figues séchées en contiennent plus que la plupart des autres fruits. La biodisponibilité du calcium de la figue séchée n'est pas encore connue, mais sa consommation reste un moyen certain pour augmenter l'apport en calcium.

### **I.2.3. Métabolites secondaires du fruit**

La figue, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (polysaccharides) et possède aussi d'autres composés comme, les alcaloïdes, les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanes (responsables de la couleur), les saponines, les stérols ( $\beta$ -sitostérols), les terpènes ( $\beta$ -amyrins,  $\beta$ -carotènes, lycopène, lutéine...) (Puech et al., 1976) et des tanins.

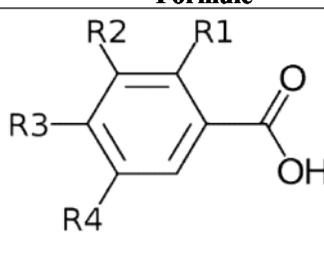
Les composés phénoliques caractérisés dans la figue comprennent les anthocyanes ayant une forte activité antioxydante. Robert Veberic et son groupe en 2008, ont mis en évidence par HPLC-DAD la présence dans les figues nord-méditerranéennes de composés polyphénoliques sous forme d'acides phénols et de flavonoïdes. Oliveira et al. (2009) ont détecté par HPLC-DAD et HPLC-UV la présence d'acide férulique et de très petites quantités de psoralène et de bergaptène dans les fruits de *Ficus carica*.

#### **I.2.3.1. Les non-flavonoïdes**

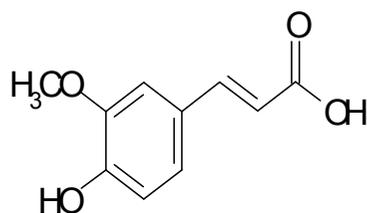
Les composés non-flavonoïdes, dans le cas de la figue, sont les acides phénoliques, ne possédant pas de squelette «flavone». On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque,

composés d'un squelette à sept carbonés. Ils sont principalement représentés dans la figure par l'acide syringique et l'acide gallique qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine.

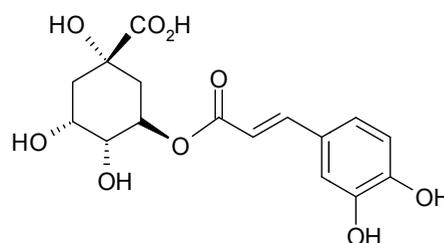
**Tableau I.6:** Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques présents dans la figure.

	R1	R2	R3	R4	Formule
<i>acide gallique</i>	H	OH	OH	OH	
<i>acide syringique</i>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	

D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (Figure I.4). Les composés les plus fréquents dans la figure sont l'acide férulique et l'acide chlorogénique ou caféylquinique ACQ (acide hydroxycinnamique conjugué à l'acide quinique).



*Acide férulique*



*Acide caféylquinique*

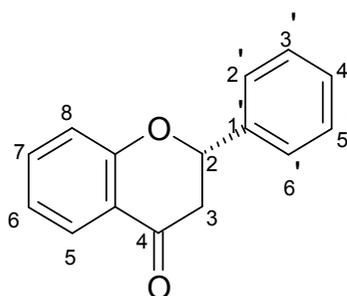
**Figure I.4:** Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans la figure.

### ***1.2.3.2. Les flavonoïdes***

Les figes contiennent différents antioxydants, particulièrement des composés phénoliques de la famille des flavonoïdes. La pelure des figes, qui est habituellement consommée, contient la majorité des antioxydants du fruit. Les figes de couleur foncée contiendraient davantage d'antioxydants que les variétés de couleur plus pâle. De plus, une portion de figes fraîches aurait un pouvoir antioxydant plus élevé qu'une portion de figes séchées. En effet, certains composés phénoliques contenus dans les fruits frais seraient détruits ou convertis en des

formes non antioxydantes au cours du processus de séchage.

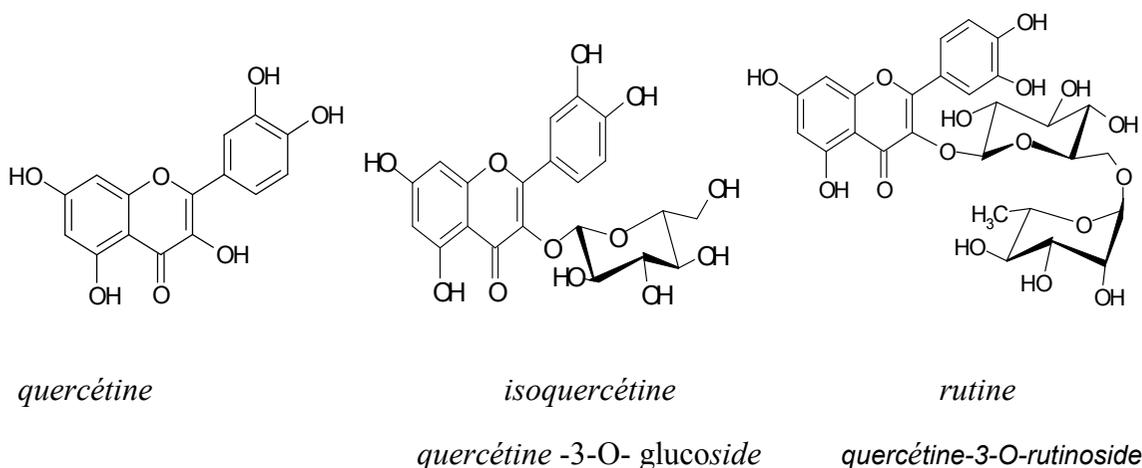
Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C6-C3-C6) (Figure I.5). Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés: les flavonols, les anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central.



**Figure I.5:** Squelette d'un flavonoïde.

- **Les flavonols**

Les flavonols (hydroxy-3 flavones) sont largement répandus, ils sont caractérisés par la présence de carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en 6 ou 8 colorent certaines fleurs au jaune primevère (Guignard, 1996 ; Alais et Linden, 1997). La quercétine, son glycoside isoquercétine et son diglucoside rutine (Figure I.6) sont majoritairement présents dans la figue. Les flavonols ont des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies cardiaques et de certains cancers (Bohm et al.,1998; Vinson et al.,1995), ou encore des activités antitumorales et chimiopréventives (Lacaille-Dubois et Wagner,1996).



*quercétine*

*isoquercétine*

*rutine*

*quercétine -3-O- glucoside*

*quercétine-3-O-rutinoside*

**Figure I.6:** Structures chimiques de quelques flavonols présents dans la figue.

- **Les anthocyanes**

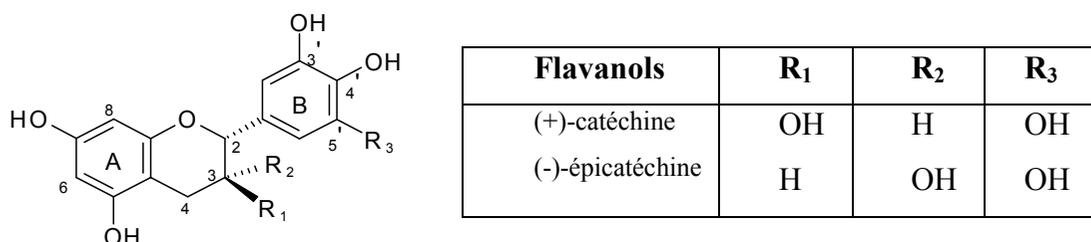
Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des figues de couleur sombre. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en position C-3 (Ribereau-Gayon, 1968). L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. Contrairement à d'autres espèces qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglucosylées en position C-3' et C-5', l'espèce *Ficus carica* se caractérise par la présence majoritaire de 2-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier: La cyanidine 3-glucoside et la keracyanine (Del Caro et Piga, 2008).

- **Les tanins condensés (flavan-3-ols)**

Les tanins condensés, appelés aussi proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, thé...) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits. Les tanins condensés sont des polymères de flavanols.

Ces tanins sont très abondants dans certains végétaux consommés par l'homme comme les prunes, fraises et pommes. Ce sont eux qui confèrent une astringence à ces produits alimentaires. D'autre part, leur aptitude à piéger les radicaux libres pourrait réduire les risques de maladies cardiovasculaires et du cancer.

Les principaux flavan-3-ols identifiés dans la figue sont la (-)-épicatéchine et la (+)-catéchine.



**Figure I.7:** Structures chimiques de flavan-3-ols de la figue.

### 1.2.3.3. Les coumarines

Les coumarines sont des composés relativement toxiques et physiologiquement actifs que les plantes utilisent pour leur défense. Les coumarines sont généralement localisées dans les feuilles l'écorce, ainsi que dans les graines des végétaux et fournissent un composant aromatique et attrayant pour les plantes. Les principales coumarines identifiées dans la figue sont le psoralène et le bergaptène avec des quantités négligeables (Oliveira et al., 2009).

#### **I.2.4. Propriétés phytopharmaceutiques**

Les figues ont un certain nombre de caractéristiques qui les rendent particulièrement adaptées à la fermentation en un vin de fruits. Selon un brevet chinois (Fang, 2007), la fermentation de mélanges contenant des proportions presque égales de jus de raisin et de figue a produit un mélange qui stimule la rate, favorise la digestion, soulage les hémorroïdes et la constipation et retarde le vieillissement. Ce mélange a montré également des effets de prévention et de traitement du cancer et d'amélioration d'immunité. *Ficus carica*, source de certains composés bioactifs a montré des effets antioxydant, antivirale, antibactérien, anti inflammatoire, hypoglycémique, anticancéreux, hypotriglycéridique, vermifuge et bien d'autres activités (Wang et al., 2004 ; Jeong et al., 2005).

##### **❖ Activité antioxydante**

Dans une étude réalisée par Anat Solomon et al. publiée dans Journal of Agricultural and Food Chemistry en 2006 (Solomon et al., 2006), la cyanidine-3-O-rhamnoglucoside (cyanidine-3-O-rutinoside; C3R) a été révélée par RMN du proton et du carbone comme l'anthocyanine la plus importante dans les figues. Toutes les figues utilisées dans l'étude étaient du genre *F. carica* et concernait des variétés de fruits de couleur allant de la plus claire à la plus foncée.

La concentration des anthocyanes était beaucoup plus élevée dans les peaux que dans la pulpe intérieure et directement proportionnelle à la noirceur des peaux de fruits, avec la fraction anthocyanes contribuant à 28% de l'effet antioxydant total dans la variété rouge brune de Turquie, et 36 % dans la variété "Black Mission".

##### **❖ Activité hépatoprotectrice**

Des changements biochimiques, histologiques, et fonctionnels significatifs, ont été induits chez les rats traités par l'extrait de l'éther de pétrole des figues, indiquant une activité hépatoprotectrice prometteuse (Justain Raj et Joseph, 2011).

##### **❖ Activité Antipyrétique**

L'extrait éthanolique de *F. carica*, a montré une importante réduction dose dépendante de la température normale du corps. L'effet a duré jusqu'à cinq heures après l'administration de l'extrait éthanolique en comparaison avec celui du paracétamol, agent antipyrétique standard (150 mg / kg.) (Justain Raj et Joseph, 2011).

### ❖ L'activité antibactérienne

L'extrait méthanolique des figues a montré une forte activité antibactérienne contre des bactéries orales. La combinaison de cet extrait à l'ampicilline ou à la gentamicine a eu un effet synergique contre les bactéries orales. Il a été alors prouvé que la figue pourrait agir comme un agent antibactérien naturel (Justain Raj et Joseph, 2011).

### ❖ L'activité antispasmodique et antiplaquettaire

L'extrait éthanolique aqueux des fruits mûrs de *F. carica* a été étudié pour ses activités antispasmodique et antiplaquettaire sur le jéjunum isolé du lapin et sur un modèle *ex vivo* de plaquettes humaines, respectivement. L'extrait a montré une efficacité dans les deux cas (Gilani et al., 2008), ce qui laisse supposer que ces figues posséderaient des composés actifs sur la sérotonine. La sérotonine (5-hydroxytryptamine) étant un dénominateur commun à l'action des plaquettes et à la contraction des muscles lisses ainsi que les processus mentaux supérieurs. L'inhibition simultanée de l'agrégation plaquettaire et de la spasticité intestinale par les extraits des fruits de *F. carica*, laisse suggérer que l'indoleamine est produite dans ces conditions et ceci est digne d'une investigation spécifique (Singh et Goel, 2009).

### I.3. La figue sèche

Les figues séchées possèdent une bonne capacité antioxydante, mais elle est moins importante que celle d'autres fruits séchés comme les abricots, les pruneaux et les raisins. Les figues sèches sont un moyen extrêmement populaire et ancien pour l'utilisation et le stockage des figues. Récemment, un certain nombre d'études ont mis en évidence la sensibilité des figues sèches à l'infestation par les moisissures, autrement dit, les champignons qui se développent dans les filaments multicellulaires appelés hyphes, qui peuvent produire des composés toxiques capables d'induire spécifiquement le cancer ou nuire à la résistance de l'hôte mammifère au cancer.

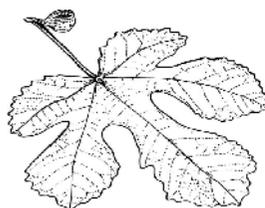
L'aflatoxine est parmi les plus connues de ces toxines, qui peuvent promouvoir et induire un cancer du foie et représentent un facteur de risque majeur de l'hépatocarcinome dans les pays en développement, notamment en Afrique et au Moyen-Orient (Groopman et al., 2008).

Les figues séchées produisent une augmentation significative de la capacité antioxydante du plasma (Vinson et al., 2005) et sont également utilisées contre divers troubles gastro-intestinaux, respiratoires, inflammatoires, cardiovasculaires ainsi que pour le traitement des ulcères et de certains cancers (Rubnov et al., 2001).

#### **I.4. Les feuilles de *Ficus carica***

Si les figes étaient notre première nourriture et le premier aliment médicamenteux, les feuilles de figuier étaient probablement notre premier médicament réel (Lansky et Helena, 2011). En général, les feuilles des figuiers contiennent des antioxydants plus forts que ceux des fruits.

Le figuier possède des feuilles caduques, rugueuses, finement velues, assez grandes (jusqu'à 25 cm de long). Elles sont munies d'un long pétiole et d'un limbe palmatilobé, profondément divisé en trois à sept lobes crênelés (le plus souvent cinq) de forme variable, séparés par des sinus arrondis (Figure I.8). Enfin, le feuillage dégage une odeur caractéristique, souvent appréciée.



**Figure I.8:** Feuille de *Ficus carica*.

##### **I.4.1. Métabolites secondaires des feuilles du figuier**

Les feuilles de figuiers sont riches en polyphénols, notamment les coumarines et les flavonoïdes, en triterpénoïdes et stérols (acétate calotropenyl, méthyle maslinate et l'acétate de lupéol) (Saeed et Sabir, 2002), en enzymes protéolytiques (Gonashvili et Gonashvili, 1968) et en protéines (Deleanu, 1916). Elles fournissent de puissants médicaments anti-inflammatoires avec une forte action anticancéreuse. Parmi les composés phénoliques identifiés à partir des feuilles de *F. carica*, on cite :

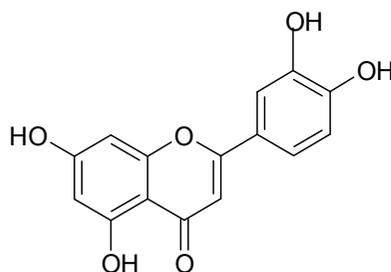
###### **I.4.1.1. Coumarines**

Le psoralène et le bergaptène sont les deux furocoumarines mises en évidence dans les feuilles de *F. carica* par chunyan et al. (2009) en utilisant la chromatographie à contre-courant, la résonance magnétique et nucléaire du proton RMN-1H, du carbone RMN-13C et la spectroscopie de masse (MS). Des études antérieures ont rapporté d'autres coumarines dans les feuilles de *F. carica*, y compris le bergaptène, 4', 5' dihydropsoralène (marmesine) et l'umbelliférone (Innocenti et al., 1982).

#### ***I.4.1.2. Flavonoïdes***

Vaya et Mahmood (2006) ont utilisé la chromatographie liquide à haute performance et la spectrométrie de masse pour étudier les feuilles de *F. carica* et ont trouvé que les flavonoïdes principaux présents étaient la quercétine et la lutéoline, avec un total de 631 et de 681 mg /kg d'extrait, respectivement.

On prête à la lutéoline (Figure I.9) un grand rôle dans le corps humain, comme antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, et comme régulateur du système immunitaire. La lutéoline ou lutéolol joue aussi un rôle important dans la prévention du cancer, en effet c'est un composé anticancéreux puissant (Zand et al., 2000) et possède une activité anti-invasive remarquable des cellules cancéreuses de la prostate chez l'être humain (Lansky et al., 2005).



**Figure I.9:** Lutéoline.

En outre Teixeira et al. (2006) ont mis en évidence la présence d'autres composés phénoliques dans les feuilles de *F. carica*: l'acide chlorogénique, et la rutine. La rutine, ou rutoside est un diglucoside de la quercétine, un bon antioxydant. C'est d'ailleurs le flavonol le plus largement étudié sur le plan pharmacologique. Une étude de l'université nationale de Kangwon en Corée du Sud en 2009 a révélé que la quercétine et la rutine ensemble, aident à stopper l'apoptose dans les cellules endothéliales non cancéreuses, ce qui aide à prévenir de l'athérosclérose (Lansky et Helena, 2011).

#### **I.4.2. Les études pharmacologiques des feuilles de *Ficus carica***

##### **❖ Forte activité antitumorale**

Meng et al. en 1996 ont montré que l'extrait aqueux de feuilles de *F. carica* a une forte activité antitumorale. Cet extrait possède également une faible toxicité et a montré un effet virucide sur le HSV-1, virus causant les boutons de fièvre, de petites cloques douloureuses, remplies de liquide qui se produisent sur les lèvres, la bouche, le nez, le menton, les joues et la gorge (Wang et al., 2004).

### ❖ **Contrôle de la glycémie postprandiale**

L'administration de l'extrait aqueux de feuilles de *F. carica* par voies orale ou intrapéritonéale chez les rats diabétiques a induit une hypoglycémie importante. D'autre part, cet extrait a été administré comme un supplément au petit déjeuner, lors du contrôle de diabète chez certains patients insulinodépendants (insulin dependent diabetes mellitus (IDDM)), il s'est avéré alors que la glycémie postprandiale était significativement plus faible. Ces résultats ont confirmé que l'extrait aqueux de *Ficus carica* a une activité hypoglycémiant importante (Serraclara et al., 1998).

### ❖ **Activité Hypolipémiante**

Les foies de volailles à abdomens adipeux ont été découpés en tranches et traités avec des concentrations croissantes de l'extrait de feuilles de *F. carica*, Les résultats ont montré que l'extrait de feuilles de *F. carica* pourrait être un complément bénéfique pour moduler la sécrétion de triglycérides (TG) et de cholestérol total (TC) dans le foie de volaille. D'autre part Canal et al. (2000) ont prouvé suite au traitement de rats par cet extrait que ce dernier provoquerait la baisse du taux de cholestérol total et du rapport cholestérol total/cholestérol HDL, avec réduction de l'hyperglycémie.

En outre les activités antioxydante, anticholinestérasique et antimicrobienne contre 5 espèces de bactéries ont été testées et prouvées dans les feuilles de *F. carica* (Oliveira et al., 2009).

## **1.5. Écorce, bois, tiges et racines**

La tige peut se référer aux branches et peut même se référer à la tige d'une feuille ou d'un fruit et la plupart du temps, cela peut souvent se référer à l'écorce du tronc. L'écorce de *F. carica* est riche en polyphénols, notamment en flavonoïdes et leurs glycosides, en triterpénoïdes, en furocoumarines, en stérols et en d'autres acides phénoliques complexes. Certaines techniques spécifiques ont été utilisées pour la mesure de la teneur en polyphénols dans l'écorce de la tige de *Ficus carica* en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (Govindarajan et al., 2008). Dans une étude récente, Conforti et al. (2012), ont mis en évidence l'activité antioxydante et antiproliférative des sarments de *Ficus carica* même si elle était bien inférieure à celle des feuilles.

En médecine traditionnelle, les racines ont été utilisées dans le traitement du leucoderme et de teignes. Les fractions de benzène et d'éther de pétrole de l'extrait alcoolique de l'écorce de la racine de *F. carica* (Jain et al., 2007) ont révélé la présence de certains composés dans cette

partie de plante, tels que: l' $\alpha$ -amyrine, le  $\beta$ -sitostérol, le  $\beta$ -sitostérol- $\beta$ -D-glucoside, le psoralène, le bergaptène et la xanthotoxine. Le  $\beta$ -sitostérol est connu comme un puissant antipyrétique, anti-inflammatoire (Bouic et Lamprecht, 1999) et anticancéreux (Awad et Fink, 2000). Le psoralène a été effectivement utilisé dans les traitements du psoriasis photoréactifs (PUVA) (Rodriguez-Granados et al., 2009).

De façon générale, les flavonoïdes trouvés dans les racines et l'écorce de racines de *Ficus carica*, ainsi que les stérols et les triterpénoïdes ont une grande importance pharmacologique. Les stérols ont des propriétés anticancéreuses et diminuent le taux de cholestérol (Jones et AbuMweis, 2009), tandis que les terpénoïdes sont considérés comme des hypotenseurs, des relaxants musculaires, des antiallergiques (Asakawa, 2008), et peuvent également être intégrés dans les produits pharmaceutiques pour faciliter et améliorer la pénétration transdermique naturelle (Sapra et al., 2008).

## **I.6. Latex**

Les espèces de *Ficus*, fruits immatures, feuilles, branches, tiges et probablement aussi les racines produisent un liquide vasculaire connu sous le nom de latex très utilisé en médecine. Selon Dioscorides Pline (1902), la méthode de collecte est de prendre le jus de branches du figuier sauvage avant apparition des bourgeons, en pilant et en appuyant la dessus. Le jus est séché à l'ombre et stocké. Les utilisations traditionnelles comprennent les traitements externes pour les verrues et la dermatite ainsi que des applications externes pour les douleurs rhumatismales et l'ophtalmie (inflammation de l'œil) (Lansky et al., 2008). Le latex est très probablement synthétisé pour servir la plante, elle même, il sert de fluide vasculaire, homologue du sang chez les animaux. Il porte les éléments nutritifs, il aide à l'auto-guérison, s'implique dans le mécanisme de toxicité, et abrite également le système immunitaire de la plante. En réponse aux stress, le latex peut transmettre certains changements, y compris la production de caoutchouc, ce propos n'est toujours pas bien compris (Kim et al., 2003).

### **I.6.1. Chimie et pharmacologie du latex de la figue**

Le latex de *Ficus* est riche en un groupe d'enzymes protéolytiques (Gonashvili, 1964) connu sous le nom de ficine ou aussi ficain. La ficine isolée du latex de *F. carica* est une cystéine protéinase puissante considérée ici comme une chaîne peptidique linéaire unique (une protéine purifiée unique). Ces enzymes, qui ont la capacité de dissoudre les protéines, ont un rôle dans le débridement chimique des tumeurs externes et peuvent également être utilisées comme attendrisseurs de viande.

Une étude comparative de l'activité protéolytique du latex de *Ficus* de 46 espèces différentes, a montré que 13 espèces seulement ont une activité appréciable, avec le plus haut degré constaté dans le cas du latex de *Ficus stenocarpa* suivie de près, du latex de *F. carica* (Williams et al., 1968). Wang et al. (2008) ont montré également que le latex de *F. carica* posséderait des effets significatifs sur l'induction de l'apoptose.

Dans un criblage de l'activité protéolytique du latex à partir d'un groupe de plantes constitué de *Ficus carica*, *Carica papaya*, *Cryptostegia grandiflora*, *Calotropis procera*, et *Calotropis gigantea*, *F. carica* a présenté la plus forte activité protéolytique avec un temps optimal associé de 45 min, contre 75 min pour *Carica papaya*, 120 min pour *Cryptostegia grandiflora*, 150 min pour *Calotropis procera* et 210 min dans le cas de *Calotropis gigantea* (Pant et Srivastava, 1966).

Récemment, le latex de *Ficus* est employé dans un gel transdermique, une pommade, et une crème avec une large action anti-inflammatoire (Santana, 2008). Outre les enzymes protéolytiques, d'autres composés sont présents dans le latex: des acides aminés, des vitamines, des glucides, des lipides, et aussi des alcaloïdes (Shukla et Krishna, 1971). Le latex contient également d'autres protéines pharmacologiquement importantes, dont une récemment découverte dans *F. carica* ayant un poids moléculaire de 6481uma et qui a révélé une activité antifongique (Mavlonov et al., 2008).

Dans une étude plus récente, Oliveira et al. (2010) ont identifié par HPLC-MS, dans le latex de *F. carica* la présence des acides : Oxalique, citrique, malique, quinique, shikimique et fumarique; 5 aldéhydes; 7 alcools; 1 cétone; 9 monoterpènes et 9 sesquiterpènes.

#### ❖ Verrues

Les verrues sont de petites tumeurs bénignes brutes, causées par un virus, en particulier, le virus du papillome humain, ou VPH. Le latex de *Ficus* a longtemps été utilisé par application locale comme un moyen d'accélérer la résolution des verrues. Bien que le mécanisme d'action soit mal compris, deux études Irlandaises l'une sur l'homme et l'autre sur les bovins, ont mis en évidence l'efficacité de cette thérapie spécifique.

Dans l'étude de bovins, 12 vaches souffrant de papillomatose ont été divisées en groupes. Un groupe a été traité une fois tous les 5 jours avec application locale du latex de *F. carica*, un deuxième tous les 5 jours avec de l'acide salicylique, un traitement conventionnel courant. Lors du traitement des deux groupes, il a été remarqué que la deepithelization (processus d'enlèvement des tissus non vivants de brûlures, plaies et autres blessures) et le rétrécissement des verrues ont commencé au bout de 5 jours. La conclusion de l'étude est que le latex de *Ficus* a

un effet thérapeutique à peu près comparable à celui de l'acide salicylique (Hemmatzadeh et al., 2003).

Dans l'étude sur les humains, 25 patients ont reçu l'instruction d'appliquer le latex de *Ficus carica* sur un côté du corps des verrues, alors que l'autre côté a été traité par cryothérapie. Après 6 mois, les verrues traitées au latex de *Ficus* chez 11 patients (44%), ont connu une résolution complète. Les 14 autres patients (56%) ont complètement guéri après la cryothérapie. Bien que le traitement par le latex du figuier fût légèrement moins efficace que la cryothérapie, les effets indésirables ont été observés uniquement dans les traitements cryothérapeutiques. Dans l'ensemble, lors du traitement des verrues, le latex du figuier a révélé plusieurs avantages, à savoir, la thérapie de courte durée, aucun rapport d'effets secondaires, facilité d'utilisation, observance du patient et un taux de réapparition faible (Bohlooli et al., 2007).

#### ❖ L'hypertension

D'autres médicaments possibles à partir de latex de *F. carica* sont des peptides qui sont des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Maruyama et al., 1989), une cible importante dans l'hypertension.

#### ❖ Activité anticancéreuse

Des composés bioactifs tels que le 6-*O*-acyl- $\beta$ -*D*-glucosyl- $\beta$ -sitostérol (AGS), ont été isolés à partir du latex de *F. carica* (Rubnov et al., 2001). Ces composés ont été testés pour leurs effets sur différentes cellules cancéreuses, à savoir, le récepteur d'oestrogène positif MCF-7 (cancer du sein humain), DU145 récepteur d'androgène humain négatif (cancer de la prostate) et cellules de leucémies. L'activité inhibitrice de l'AGS a été observée dans toutes les lignées cellulaires testées. En tant que composés naturels ou synthétiques, ces composés ont montré des effets inhibiteurs *in vitro* sur la prolifération de diverses cellules cancéreuses. En bref, en dépit de sa toxicité potentielle, le latex de *F. carica* est un produit naturel qui devrait être de plus en plus étudié pour son activité anticancéreuse (Amara et al., 2008)

#### ❖ Activité antifongique et antimicrobienne

Les extraits méthanolique, hexanoïque, chloroformique et d'acétate d'éthyle du latex de *Ficus carica* ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes *in vitro* contre cinq espèces bactériennes et sept souches de champignons (Aref et al., 2010). L'activité antimicrobienne des extraits a été évaluée, la fraction méthanolique a montré une inhibition totale (100%) contre les *Candida albicans* à une concentration de 500 $\mu$ g/ml et un effet négatif sur *Cryptococcus*

*neoformans*. *Le microsporium canis* a été fortement inhibé par l'extrait méthanolique (75%) et totalement par l'extrait d'acétate d'éthyle à une concentration de 750µg/ml.

#### ❖ Hépatotoxicité

Les effets de l'administration orale et intra-péritonéale du latex de *F. carica* sur la peroxydation lipidique induite par le tétrachlorure de carbone dans les homogénats de foie de rats femelles ont été étudiés. Le traitement par voie orale n'a eu aucun effet, mais l'injection intra-péritonéale a entraîné la peroxydation lipidique hépatique.

## *Chapitre II*

## II. Métabolites secondaires de *Ficus carica*, structure, biosynthèse et importance biologique

### II.1. Généralités

En biologie végétale, les composés produits par les plantes sont subdivisés en deux groupes de molécules: Les **métabolites primaires** qui jouent un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement végétal (protéines, lipides, glucides, acides aminés, acides nucléiques), et les **métabolites secondaires** dont l'action est déterminante pour l'adaptation de la plante au milieu naturel (*agents protecteurs contre les stress physiques, défense contre les agressions extérieures, ...*). Les métabolites secondaires comportent: les composés phénoliques, les composés alcaloïdes et les terpènes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités biologiques (Huang et Ferraw, 1991 ; Li et al., 2007).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires représentant les composés phytochimiques essentiels des légumes, des fruits et d'autres plantes et sont associés non seulement aux effets bénéfiques de la santé humaine mais aussi aux propriétés colorantes et sensorielles des boissons (Duthie et al., 2003). Ces substances présentent des propriétés antioxydantes, anticancéreuses, antimutagènes et antibactériennes non négligeables (Redoyal et al., 2005 ; Hatano et al., 2005).

En 2006, environ 8000 composés phénoliques ont été identifiés et distribués en différents groupes dont les plus connus sont les coumarines, les flavonoïdes, les tanins, et les stilbènes (Hu et al., 2005 ; Luthria et Mukahapadhyay, 2006).

### II.2. Les coumarines

#### II.2.1. Sources des coumarines

Les coumarines sont des substances naturelles organiques et aromatiques; ce sont des composés phénoliques végétaux importants qui contribuent à l'adaptation des plantes aux stress biotique ou abiotique. Les coumarines tirent leur nom de *kumarú*, nom vernaculaire de la fève tonka *Coumarouna odorata* encore appelée *Disteryx odorata Wild* de la famille des Fabacées. Les coumarines ont été isolées pour la première fois en 1820 par Vogel et sont considérées comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Les coumarines sont abondantes dans certaines familles des dicotylédones, comme les Apiacées, Astéracées, Fabacées, Moracées, Rosacées, Rubiacées, Rutacées et Solanacées. Quelques monocotylédones, sont également riches en coumarines, ces dernières sont

généralement répandues dans tout le règne végétal, elles se localisent dans toutes les parties des plantes y compris les fruits et s'accumulent surtout dans les feuilles, les racines et les écorces, ainsi que dans les tissus âgés ou lésés et sont responsables de l'odeur caractéristique de l'aspérule odorante et du mélilot desséché.

Les coumarines sont très largement distribuées dans le règne végétal mais elles peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (Hoffmann, 2003).

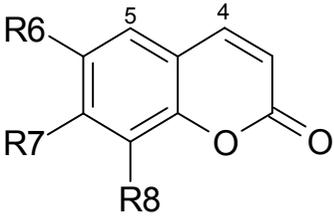
## II.2.2. Classification

Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés de type C6-C3, avec neuf carbones. Suivant la nature des substitutions sur leur structure de base, les coumarines sont classées en cinq catégories (Dean, 1952 ; Spath, 1937):

### II.2.2.1. Coumarines simples

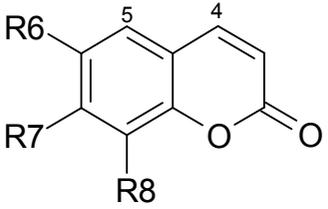
Les coumarines les plus répandues dans le règne végétal possèdent des substitutions OH ou OCH<sub>3</sub> en positions 6 et 7 (Tableau II.1).

**Tableau II.1:** Structures de quelques coumarines (génines).

	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	
<b>Umbelliférone</b>	H	OH	H	
<b>Esculétol</b>	OH	OH	H	
<b>Scopolétol</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
<b>Herniarine</b>	H	OCH <sub>3</sub>	H	
<b>Scopanone</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	
<b>Fraxétol</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	

Les hydroxyles des positions 6 et 7 peuvent être engagés dans une liaison hétérosidique pour donner les glucosides de coumarine (Tableau II.2).

**Tableau II.2:** Structures de quelques hétérosides de coumarines

	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	
<b>Esculine</b>	O-Glu	OH	H	
<b>Cichorine</b>	OH	O-Glu	H	
<b>Scopoline</b>	OCH <sub>3</sub>	O-Glu	H	
<b>Skimmine</b>	H	O-Glu	H	
<b>Fraxoside</b>	OCH <sub>3</sub>	O-Glu	OH	

La fusion de la coumarine avec un hétérocycle supplémentaire à 5 ou 6 atomes donne deux nouvelles classes:

#### ***II.2.2.2. Furanocoumarines***

Composés formés par la fusion d'un hétérocycle furane avec la coumarine et ses dérivés. L'association du noyau furane peut se faire :

- Soit dans le prolongement de la coumarine (forme linéaire): psoralène et ses dérivés (bergaptène, isopimpinelline, xanthotoxine).
- Soit sur le côté (forme angulaire): angélicine et ses dérivés (Figure II.1).

#### ***II.2.2.3. Pyranocoumarines***

Composés formés par la fusion d'un hétérocycle pyrane avec la coumarine (Figure II.1)

- Soit dans le prolongement (forme linéaire) : xanthylétine
- Soit latéralement (forme angulaire) : séséline

#### ***II.2.2.4. Dicoumarines (coumarines dimériques)***

Ce sont des composés formés par la liaison de deux unités coumariniques simples.

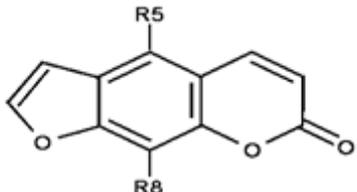
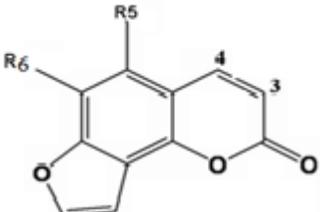
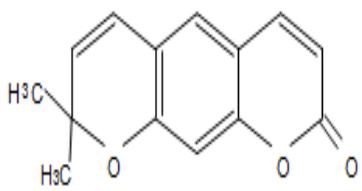
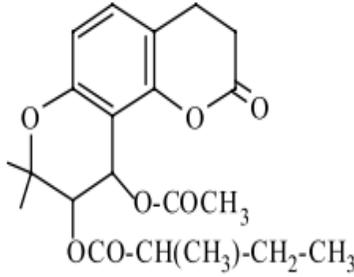
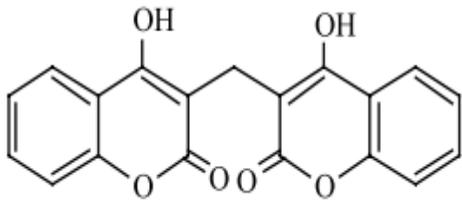
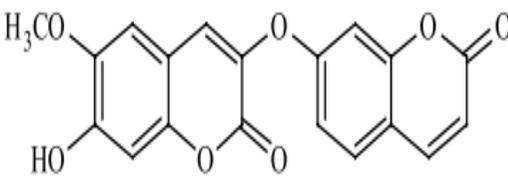
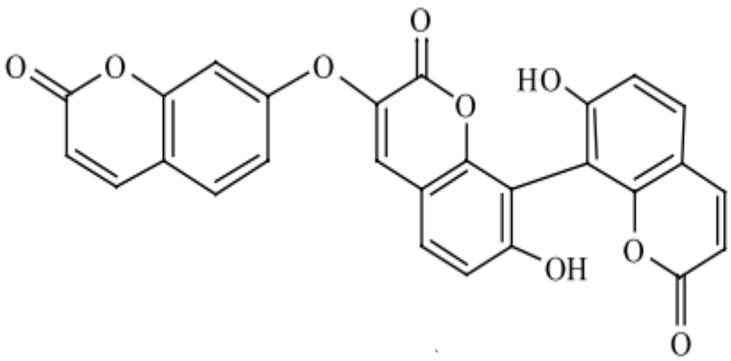
#### ***II. 2.2.5. Tricoumarines (coumarines trimériques)***

Ce sont des composés issus de l'union de trois entités coumariniques.

### **II.2.3. Les furocoumarines**

#### ***II.2.3.1. Nature chimique***

Les furocoumarines (appelées encore furanocoumarines) constituent une famille de composés synthétisés par certaines espèces de végétaux supérieurs (Bourgau et al., 1989). La structure aromatique des furocoumarines leur confère de fortes absorbances dans les longueurs d'ondes UV, avec des spectres relativement spécifiques pour chacune d'elles, ce qui facilite leur détection en particulier par la technique de chromatographie liquide haute performance. Les furocoumarines présentent une bonne solubilité dans les solvants aprotiques polaires comme l'acétonitrile et le chloroforme, également dans certains solvants protiques polaires tels que le méthanol et l'éthanol, mais sont peu solubles dans l'eau. Ce sont des molécules relativement stables.

 <p>Psoralene: R5, R8: H  Bergaptene: R5: OMe  Xanthotoxine: R8: OMe  Isopimpinelline: R5, R8: OMe</p> <p>Furocoumarines linéaires</p>	 <p>Angelicine: R5, R6: H  Sphondine: R6: OMe  Pimpinelline: R5, R6: OMe</p> <p>Furocoumarines angulaires</p>
 <p>Xanthylétine (Pyranocoumarine)</p>	 <p>Séséline (Pyranocoumarine)</p>
 <p>Dicoumarol</p>	 <p>Daphnorétine</p>
 <p>Triumbéllatine</p>	

**Figure II.1:** Structures chimiques de quelques coumarines.

### **II.2.3.2. Distribution dans le règne végétal**

Les furocoumarines sont présentes dans quatre grandes familles taxonomiques: les Rutacées (ex: *Ruta graveolens*, *Citrus bergamia*), les Moracées (ex: *Ficus carica*), les Apiacées (ex: *Ammi majus*, *Apium graveolens*, *Pastinaca sativa*, *Petroselinum sativum*) et les Fabacées ou légumineuses (ex: *Psoralea sp.*, *Coronilla sp.*) (Pathak et al., 1962).

Alors que les Moracées et les Légumineuses ne synthétisent principalement que deux types de molécules (psoralène et bergaptène pour les Moracées; psoralène et angélicine pour les Légumineuses), les Rutacées et surtout les Apiacées en synthétisent un large panel, le bergaptène, la xanthoxine et l'isopimpinelline constituent néanmoins les formes principales dans ces deux familles (Bourgaud et al., 1989).

Les noms de ces furocoumarines dérivent des plantes dans lesquelles elles ont été découvertes pour la première fois (exemple: le bergaptène est présent dans la bergamote: *Citrus bergamia*, la rutarétine dans *Ruta graveolens*), ils sont également liés à leurs propriétés (exemple: la xanthoxine pour sa couleur jaune et son activité phototoxique).

Il existe des isomères linéaires et angulaires, de ces molécules, désignés par le préfixe iso- (exemple : isopimpinelline).

### **II.2.3.3. Rôles écologiques des furocoumarines**

Les furocoumarines ont des rôles écologiques variés, et ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce de la plante. Dans la cellule végétale les furanocoumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée (Hoffmann, 2003). Cette glycosylation est donc une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules et permet l'accumulation de quantités importantes de molécules inertes dans les tissus qui ne sont activées qu'en cas de prédation (Vogt et Jones, 2000). Dans le cas des furocoumarines, la proportion de molécules glycosylées varie considérablement d'une espèce à l'autre. Elles sont considérées comme des phytoalexines qui jouent un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement et sont également une source importante de produits pharmaceutiques actifs (Whitehead et Threlfall, 2002). En effet, ces molécules protègent la plante contre les herbivores et les microorganismes pathogènes grâce à leurs propriétés phototoxiques d'une part (Mc Cloud et al., 1992 ; Neal et Wu, 1994 ; Ojala et al., 2000) et d'autre part, elles sont impliquées dans des processus d'allélopathie, inhibant la germination et la croissance des plantes concurrentes (Baskin et al., 1967 ; Hale et al., 2004).

#### ***II.2.3.4. Propriétés biologiques, photobiologiques et activités pharmacologiques des furocoumarines***

Les coumarines ont manifesté une large gamme d'activités biologiques. Les propriétés médicinales des coumarines comprennent l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, les activités anticoagulante, antibactérienne, antitumorale, antivirale, anti-inflammatoire, anti-oxydante et spasmodique (Hoult et Paya, 1996 ; Kostova, 2007; Patel et Patel, 2011).

Quelques plantes contenant des dérivés du psoralène, comme l'*Ammi majus* ou le *Psoralea corylifolia*, ont été utilisées depuis l'antiquité par les médecines traditionnelles -respectivement en Egypte et en Inde - pour le traitement d'affections cutanées (vitiligo, lèpre) (Fitzpatrick et Pathak, 1959). En 1947, Famhy et Abu-Shady démontrèrent que la xanthotoxine, première furocoumarine isolée à partir de fruits d'*Ammi majus*, est responsable de la repigmentation de la peau observée dans le traitement du vitiligo, maladie caractérisée par une dépigmentation de la peau (Famhy et Abu-Shady, 1947). L'isolement, l'identification et la synthèse de nombreuses molécules de cette famille eurent lieu entre les années 40 et 60 (El Mofty, 1948; Lerner et al., 1953). Les propriétés biologiques de ces molécules s'avèrent très variées et sont souvent dépendantes d'une exposition aux UV. L'utilisation clinique des furocoumarines s'est largement développée, avec en particulier l'introduction de la P-UVA photochimiothérapie (P pour psoralène) en 1974 pour le traitement de maladies de peau telles que le psoriasis et le vitiligo (Parrish et al., 1974; Henseler et al., 1981).

##### ***II.2.3.4.1. Phototoxicité des furocoumarines***

Certaines plantes appartenant aux familles productrices de furocoumarines, comme les Apiacées (carotte, céleri, persil) ou les Rutacées (Citrus), ont un intérêt agronomique évident. Chez ces espèces à usage alimentaire, les furocoumarines ont fait l'objet d'études car elles présentent un risque de toxicité majeur pour les consommateurs de ces produits végétaux. En effet, chez l'homme la consommation des espèces végétales qui renferment des furocoumarines linéaires ou angulaires provoque, s'il est accompagné d'une exposition à la lumière solaire, une dermatite phototoxique d'intensité variable allant du simple érythème jusqu'à l'apparition de bulles et de vésicules au niveau des zones exposées, quelques jours après le contact (Heskel et al., 1983), les zones touchées présentent une hyperpigmentation (Bruneton, 1999). La cause étant, la coumarine qui *n'est pas toxique en soi mais qui peut être convertie par les champignons en une toxine*, le dicoumarol qui peut provoquer des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K, un facteur de coagulation du sang (Schorderet, 1992 ; Repcak et al., 2001; Khan et al., 2005) et par conséquent le problème se pose pour la récolte manuelle de plantes produisant des

furocoumarines comme le céleri (*Apium graveolens*), ou la rue officinale (*Ruta graveolens* L.).

#### **II.2.3.4.2. Photosensibilisation**

Les furocoumarines, surtout linéaires, ont des propriétés photosensibilisantes. Ces propriétés sont liées à des processus photochimiques induits par les furocoumarines en présence d'oxygène, sous l'influence du rayonnement UV solaire.

Ces processus photochimiques conduisent à la formation de la mélanine et donc à la pigmentation cutanée. En effet après stimulation par des rayonnements ultra-violet de grande longueur d'onde (365 nm), certaines furocoumarines ont la propriété de stimuler la synthèse de mélanine en provoquant une prolifération des mélanocytes cutanées, à travers une augmentation de leur activité mitotique. Cette propriété a été exploitée par les égyptiens pour le traitement de la dépigmentation (Bruneton, 1993). Une utilisation de cette propriété dans des crèmes bronzantes a été développée par les laboratoires Bergaderm pour un certain temps, puis abandonnée depuis les années 90 suite aux soupçons concernant la carcinogénicité de ce type de traitement (Stern et al., 1997).

L'utilisation des furocoumarines est retrouvée dans le cadre des nouveaux développements dans divers domaines thérapeutiques, qui constituent des pistes de recherche pour le traitement comme le traitement symptomatique de multiples scléroses (Pereira et al., 2007), la dépression (Veselovskaya et al., 2006), la photochimiothérapie de lymphome à cellules T (Plumas et al., 2003) et la chimiothérapie de tumeurs résistantes à la polychimiothérapie (Kawase et al., 2005).

Des activités antimitotiques sur des cellules mammifères ont été également décrites ainsi qu'une action bloquant la germination et l'élongation des entre-nœuds (mérithalle), des coléoptiles et des racines pour plusieurs plantes non productrices de furocoumarines comme *Lactuca sativa*, *Lycopersicum esculentum* ou *Avena* sp. (Baskin et al., 1967; Juntilla, 1976).

#### **II.2.3.4.3. Activités mutagène et carcinogène**

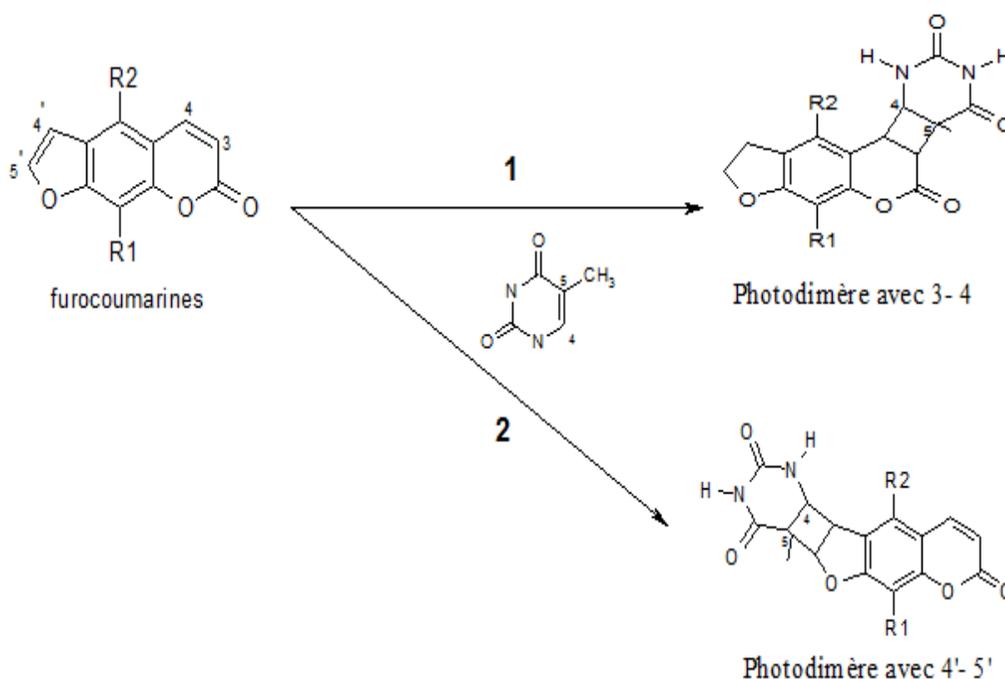
Certaines furocoumarines associées à des rayonnements UV, ont révélé des activités mutagènes ou même létales sur des micro-organismes fongiques ou bactériens, ainsi que sur la croissance de certaines cellules tumorales (Pathak et Fitzpatrick, 1992). Ces expériences ainsi que des études menées sur les effets de la P-UVA thérapie (Stern et al., 1997), suggèrent que les furocoumarines soient des molécules potentiellement carcinogènes (Housman et al., 2002).

D'autre part, les furocoumarines linéaires peuvent être le support de cycloaddition avec les bases pyrimidiques de l'ADN ou de l'ARN, la duplication des brins est alors bloquée ainsi que la

traduction des ARNs. Cette propriété est souvent invoquée pour expliquer les caractères mutagènes et carcinogènes de ces molécules (Bruneton, 1999).

En effet, ces processus photochimiques entraînent malheureusement, la formation des composés d'addition (par liaisons covalentes) entre les furocoumarines et les bases pyrimidiques de l'ADN (cytosine, uracile, thymine). Les furocoumarines sont alors capables de produire des photomodifications de différentes biomolécules en se fixant de manière covalente sur les bases thymines de l'ADN par un mécanisme d'addition photo-dépendant. La furocoumarine non irradiée, à l'état fondamental, s'intercale entre les acides nucléiques de la double hélice d'ADN, et suite à l'excitation par les UV-A, il y a formation de photoadduits (furocoumarine-ADN) monofonctionnels ou bifonctionnels avec les bases pyrimidiques.

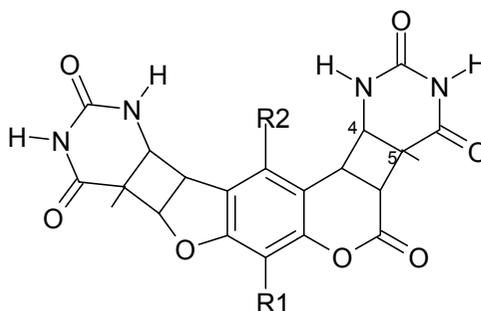
Il peut donc se produire une cycloaddition de la thymine au niveau des carbones 4 et 5 sur la furocoumarine en C-3—C-4 ou en C-4'—C-5' (Figure II.2) :



**Figure II.2:** Réactions de monoaddition en C-3—C-4(1) ou en C-4'—C-5'(2).

Il s'agit dans ces deux situations de mono-additions. Il peut aussi se former des bi-additions avec adjonction de chacune des liaisons C-3—C-4 et C-4'—C-5' avec une base pyrimidique du double brin d'ADN, on obtient dans ce cas des liaisons croisées au sein de la double hélice (Figure II.3).

✓ Photodimère avec 3-4 et 4'-5'



**Figure II.3:** Réactions de bi-addition en C-4'—C-5' et C-3—C-4

La formation de ces composés de bi-addition, laisse craindre des d'effets indésirables notamment sur l'augmentation de la mutagénicité et de la mortalité cellulaire, donc d'une action cancérigène de ces substances, surtout si elles pénètrent dans les tissus en forte concentration.

#### **II.2.3.4.4. Activités antibactériennes**

Les coumarines possèdent des activités biologiques importantes. Des études récentes (Kuate et al., 2007) réalisées sur des composés coumariniques comme le psoralène, le bergaptène, la 7-méthoxycoumarine et la 7-hydroxycoumarine, isolés de l'extrait méthanolique de *Treulia obovoifa* (Moracée) ont permis de mettre en évidence une activité anti-bactérienne avec une CIM variant entre 78,12 et 156,25 µg/ml. Ces résultats réaffirment les vertus thérapeutiques de cette plante, utilisée traditionnellement dans le traitement des maladies infectieuses de la peau.

#### **II.2.3.4.5. Inhibition d'enzymes de mammifères et d'insectes**

D'une manière générale, les plantes à furocoumarines présentent un intérêt fondamental dans le domaine de la biologie végétale dans la mesure où elles constituent un des modèles les mieux compris de coévolution avec des insectes herbivores. Certains de ces insectes ont la capacité de métaboliser les furocoumarines linéaires en dérivés non-toxiques. La présence de furocoumarines angulaires répondrait ainsi à un mécanisme adaptatif mis en place par les plantes afin de rendre les furocoumarines moins facilement métabolisables et donc plus résistantes à une agression par les insectes.

Les dérivés du psoralène ont été tout d'abord, connus pour leur pouvoir inhibiteur d'enzymes du type cytochrome P450, dans les extraits de foie de mammifères ou d'insectes (Fouin-Fortunet et al., 1986; Zumwalt et Neal, 1993). Les enzymes inhibées étant la plupart

du temps, impliquées dans la détoxification de xénobiotiques chez ces organismes. Les furocoumarines peuvent jouer un rôle synergique vis à vis de la toxicité/efficacité d'autres phytoalexines synthétisées par les plantes. Cet effet synergique se manifeste aussi - parfois de manière indésirable - lorsque la consommation d'aliments contenant des furocoumarines - comme le céleri ou le jus de pamplemousse - est associée à la prise de certains types de médicaments. Il en résulte une inhibition des enzymes du foie du patient, ce qui cause une accumulation potentiellement dangereuse des molécules biologiquement actives (Chan et al., 1998). Le processus d'inhibition des P450 par les furocoumarines est un mécanisme d'inactivation auto-catalytique également appelé inhibition suicide. La furocoumarine pénètre à l'intérieur du site actif du P450, et est métabolisée en un produit hyper-réactif qui se fixe en formant une liaison covalente avec l'enzyme. Cette réaction est irréversible et l'enzyme n'est alors plus fonctionnelle.

#### ***II.2.3.4.6. Propriétés antioxydantes des coumarines***

Les antioxydants sont des composés qui peuvent retarder, entraver ou empêcher l'oxydation des composés sensibles par différents mécanismes comme les radicaux libres, les enzymes pro-oxydants ou chélation des ions métalliques actifs en fonction de la nature des agents oxydants (Nordberg et Arner, 2001). Ce sont des composés très divers qui regroupent des protéines à activité enzymatique (superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase, catalase) et non enzymatique (séquestrant des métaux) et des petites molécules liposolubles (vitamine E,  $\beta$ -carotène) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique).

L'oxygène est essentiel à notre survie, cependant son utilisation par les cellules de notre corps n'est pas sans danger. Une partie significative (1-2 %) de l'oxygène que nous respirons est transformée en dérivés toxiques appelés **radicaux libres** (Boveris et Chance, 1973). qui sont des dérivés du fonctionnement normal du corps mais qui sont aussi produits en plus grand nombre lorsque le corps est agressé (cigarette, pollution, infections, etc.). A cause de leur réactivité (ils possèdent un ou plusieurs électrons libres), les radicaux libres peuvent réagir et endommager les composantes cellulaires comme les protéines, les lipides et l'ADN (Evans et Halliwell, 1999). L'oxydation des biomolécules par les radicaux libres est impliquée dans plusieurs pathologies comme les maladies cardiovasculaires (artériosclérose) (Ko et al., 1998), la cancérogenèse (Klaunig et Kamendulis, 2004), l'arthrite, l'asthme, les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer, le mongolisme) (Cavin, 1999), l'arthrose, le cataracte, le diabète, la chute de cheveux et le vieillissement (Pastre et priymenko, 2007 ; Bekro et al., 2008).

Au cours du vieillissement, la génération de radicaux libres augmente et leur quantité

devient supérieure à la capacité des **défenses des antioxydants de notre organisme**. Bien que le corps soit capable de produire ses propres antioxydants, ils ne suffisent souvent pas à neutraliser toute la quantité de radicaux libres. Ce déséquilibre appelé stress oxydatif va mener l'organisme vers un état pathologique (Wickens, 2001). Donc le vieillissement et le mauvais fonctionnement du système circulatoire sont souvent le résultat des dommages causés par des radicaux libres.

Les radicaux libres sont capables de favoriser des dommages et l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules (Aravodis, 2005). Les cibles biologiques les plus vulnérables à cet endommagement oxydatif sont : l'ADN (modification des bases, cassure des brins) (Rehman et al., 1999), les protéines (modification structurales et fonctionnelles) et les lipides (peroxydation lipidique) (Hu et al., 2005).

L'incapacité des antioxydants systémiques d'atténuer l'aggravation de la formation de radicaux libres à partir des polluants environnementaux réclame d'urgence l'identification et la conception de nouvelles entités chimiques ayant une activité antioxydante. Au cours des deux dernières décennies, il ya eu un nombre croissant de publications sur les activités antioxydantes des coumarines naturelles ou de synthèse.

L'étude de la relation structure-activité (QSAR) de l'activité antioxydante a été réalisée sur des coumarines naturelles isolées à partir de plantes médicinales coréennes (Thuong et al., 2010) et à partir de *Haplopappus multifolius*. Les résultats obtenus ont révélé que certaines coumarines; scopolétine, aesculetin, fraxetin, umbelliférone et daphnétine possédaient des activités antioxydantes considérables (Torres, 2006). Les résultats ont également démontré que l'anneau  $\alpha$ -pyrone de coumarines a considérablement amélioré leur capacité d'inhibition des réactions d'oxydation et que le groupe catéchol contribue significativement aux activités antioxydantes des coumarines. Dans le même contexte (relation structure-activité de l'activité antioxydante) il a été établi que la 7,8-dihydroxy-et 6,7-dihydroxy-4-méthylcoumarines ont montré d'excellentes propriétés réductrices du fer ( Koleckar et al., 2013).

Les hydroxy-coumarines constituent un groupe important de composés phénoliques ayant un faible poids moléculaire et ont largement été utilisées pour la prévention et le traitement de la maladie thromboembolique veineuse, de l'infarctus du myocarde et de la maladie de strokes (Voora et al., 2005).

Dans le cas des composés phénoliques, l'activité antioxydante est fortement liée à leur structure moléculaire, plus précisément à la présence, la localisation et le nombre de groupes hydroxyyles, et les effets de conjugaison et de résonance (Rice-Evans et al., 1996). Les propriétés antioxydantes des hydroxycoumarines ont suscité un grand intérêt de plusieurs groupes de recherche en raison de leur bioactivité et de leurs propriétés pharmacologiques prometteuses.

Cependant, leur extraction à partir de sources naturelles, comme les plantes, est parfois gênante car cela prend du temps et nécessite un équipement de haute technologie. Par conséquent, les méthodes de synthèse pour obtenir des dérivés de la coumarine ont fortement été encouragées ces dernières années.

Différentes familles d'hydroxycoumarines ont déjà été synthétisées et leurs propriétés antioxydantes ont permis de conclure que le nombre et la position des groupes hydroxyles sont essentiels pour leur activité (Bailly et al., 2004 ; Cavar et al., 2009). Toutefois, seules les structures de base ont été étudiées et la relation entre la présence de substituants et leur réactivité envers différents agents oxydants n'a pas encore été complètement élucidée. La plupart de ces études sont consacrées aux dérivés de la coumarine portant les groupes hydroxyles en positions 5, 6, 7 et / ou 8, ce qui signifie que ce sont des groupes phénoliques et, dans certains cas, des groupes catéchol.

Bien que leurs propriétés médicinales aient été reconnues, les 4-hydroxycoumarines ont été peu étudiées comme des antioxydants. Récemment, Stanchev et al. (2009) ont rapporté l'activité antioxydante *in vitro* d'une série de dérivés de la 4-hydroxycoumarine différemment substitués. Les 4-hydroxycoumarines ont été testées pour l'activité de piégeage des radicaux libres par le test DPPH (Kirkiacharian et al., 1999). Dans une étude récente, l'activité de piégeage de radicaux libres, l'action antioxydante et l'inhibition de l'enzyme prooxydante de six dérivés de la C3-aryl-4-hydroxycoumarine ont été évaluées (Sergio et al., 2011).

#### **II.2.3.5. Biosynthèse des furocoumarines linéaires**

La voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires (Bourgand et al., 2006) commence par une étape spécifique à cette voie, une hydroxylation en *méta* de l'acide p-coumarique par l'enzyme coumarate 2-hydroxylase (C2H) (Figure II.4). L'acide 2,4-dihydroxycinnamique va ensuite se condenser par estérification intramoléculaire (lactonisation) pour former l'umbelliférone (7-hydroxycoumarine) (Brown, 1970) permettant la synthèse des furocoumarines.

Certains auteurs suggèrent que cette réaction est catalysée par une enzyme de la famille des cytochromes P450 (C4H); une enzyme clé dans la voie des phénylpropanoïdes (Hehn, 2007). L'étape suivante est la synthèse de la démethylsubérosine par ajout d'une unité isoprénique (IPP), l'enzyme responsable de cette étape est la dimethylallylpyrophosphatase. Le groupement prényl peut être ajouté sur les carbones C6 ou C8 de l'umbelliférone.

Si l'ajout de l'isoprène se fait en C-6, il conduit aux furocoumarines dites «linéaires»; s'il se fait en C-8, il induit la formation de «furocoumarines angulaires».

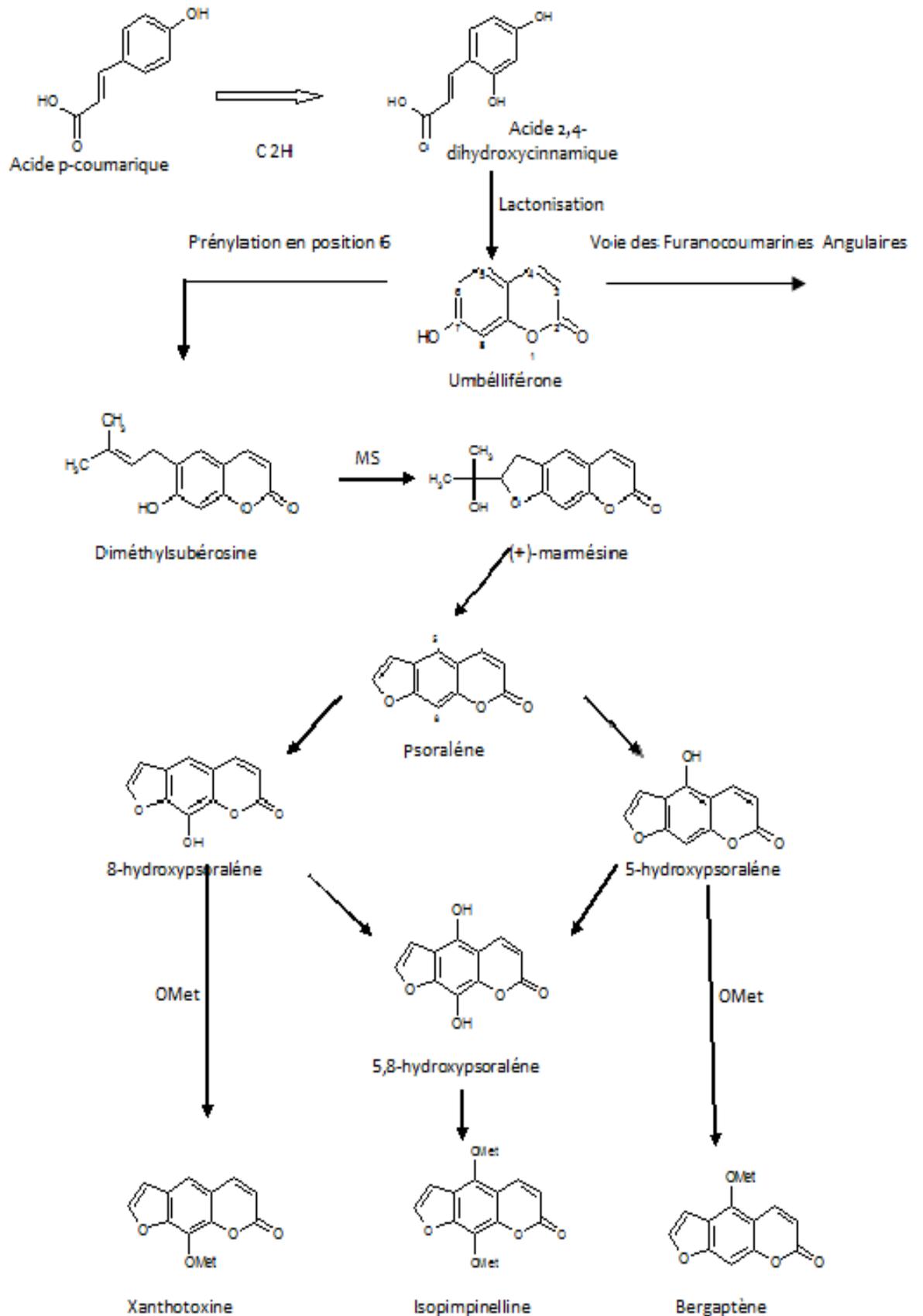
Dans la voie des furanocoumarines linéaires, la déméthylsubérosine est convertie en(+)-marmésine par cyclisation intramoléculaire entre l'hydroxyl en C7 et la fonction alcène du prényl en C6 par la marmésine synthase. La (+)-marmésine est ensuite métabolisée en psoralène par libération d'une molécule d'acétone.

La synthèse des dérivés méthoxylés du psoralène implique ensuite une hydroxylation en position 5 ou 8 conduisant respectivement au bergaptol (5-hydroxypsoralène) et au xanthotoxol (8-hydroxypsoralène), suivie d'une O-méthylation qui donne finalement le bergaptène (5-MOP) et la xanthotoxine (8-MOP) (Brown, 1970).

Chez *Ficus carica L.*, la biosynthèse du 8-MOP et du 5-MOP prend aussi une voie parallèle en passant par une hydroxylation en 5 ou en 8 de la marmésine, puis par une O-méthoxylation (Innocenti et al., 1981).

L'addition de l'unité isoprénique en C-8 entraîne, de la même façon, la formation de l'angélicine (équivalent angulaire du psoralène). La pimpinelline (5,6-diméthoxyangélicine) est le dérivé méthoxylé (en C-5 et C-6) de l'angélicine.

Ces furocoumarines, toxiques également pour les plantes productrices, subissent, après formation, une glycosylation, ce qui augmente leur solubilité et leur stabilité, facilite leur transport et leur compartimentation intracellulaire (vacuole) ou extracellulaire (excrétion).

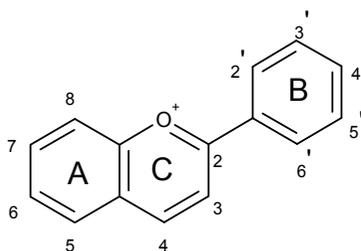


**Figure II.4:** Biosynthèse des furocoumarines linéaires.

## II.3. Les anthocyanes

### II.3.1. Structures chimiques

Les anthocyanes (du grec *anthos* signifiant fleur et *kyanos* signifiant bleu) ou glycosides d'anthocyanidines sont des flavonoïdes capables d'absorber la lumière visible, ce sont aussi des pigments naturels qui participent à la coloration de certaines parties de plantes en leur offrant une palette large allant du rouge au bleu en passant par les pourpre, rose, orange, violet. On les trouve en abondance dans la cerise, le cassis, la fraise, la framboise, la groseille, le *Ficus carica* etc.... (Harbone, 1967 ; Brouillard, 1993; Tanaka et al., 2008). Les anthocyanes ont un squelette carboné de base à quinze atomes de carbone organisés en trois cycles identifiés par les lettres A, B, C (Figure II.5). Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.



**Figure II.5:** Structure du cation flavylum.

Les anthocyanes ont une structure de base commune, le cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium. L'aglycone de l'anthocyane est appelé anthocyanidine, il constitue le groupement chromophore du pigment. Les anthocyanidines sont le plus souvent glycosylées en position 3 et 5 avec le plus fréquemment des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose) et des di- et tri-saccharides formés par la combinaison des monosaccharides précédents (Brouillard, 1993). La présence des groupements hydroxyles sur les cycles, ainsi qu'un ou plusieurs sucres rendent ces composés très solubles dans l'eau, l'éthanol et le méthanol et augmente leur stabilité (Rivas-Gonzalo, 2003). Les sucres peuvent aussi être acylés par différents acides organiques l'acide cinnamique, p-coumarique, acétique, caféique, férulique, sinapique et malonique, augmentant ainsi la diversité de ces molécules (Brouillard, 1993). En milieu aqueux acide, la couleur de l'anthocyanidine est déterminée par le degré d'hydroxylation du noyau B, produisant un effet bathochrome (bleuissement). Au contraire, les réactions de

méthylation des positions 3' et 5', de même que la glycosylation de la position 3, produisent un effet hypsochrome (vers la couleur orange), (Brouillard et Dubois, 1977).

Harborne et Williams (2001) ont rapporté 18 structures d'anthocyanidines parmi lesquelles six sont largement répandues et couramment retrouvées dans les fruits et légumes: pélargonidine, delphinidine, cyanidine, péonidine, pétunidine et malvidine. Leurs structures se différencient par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxy sur le cycle B (tableau II.3).

Les cinq anthocyanidines (delphinidine, cyanidine, péonidine, pétunidine et malvidine) sont instables, donc ces molécules seront ensuite glycosylées en position 3 pour former des anthocyanes. La proportion des différentes formes d'anthocyanes est une caractéristique variétale et peut être utilisée comme critère taxonomique (Roggero et al., 1988).

**Tableau II.3:** Les anthocyanidines naturelles.

<b>Anthocyanidines R=H</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	
Malvidine	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	
Péonidine	OCH <sub>3</sub>	H	
Delphinidine	OH	OH	
Pétunidine	OCH <sub>3</sub>	OH	
Cyanidine	OH	H	

Dérivant de ces anthocyanidines, il existe un large éventail d'anthocyanes qui se différencient par la nature et le nombre de sucres attachés à l'aglycone et la position de ces sucres ainsi que la nature et le nombre des acides aliphatiques ou aromatiques fixés aux résidus des sucres. Dans la nature, les anthocyanes hydroxylées en position 3 sont en règle générale toujours glycosylées. Lorsqu'il existe des groupements additionnels de sucres, ils occupent les positions 5 et/ou 7, et moins fréquemment les positions 3' et 5'. Des anthocyanines inhabituelles portant des sucres seulement à la position 3' ont été également décrites par Fossen et Andersen (1999).

## **II.3.2. Propriétés des anthocyanes**

### **II.3.2.1. Stabilité**

Malgré leur pouvoir colorant, les anthocyanes sont peu utilisées dans l'industrie alimentaire et cosmétique, du fait de leur instabilité (perte ou changement de couleur) vis-à-vis de facteurs

physico-chimiques comme la lumière, la température, le pH, ainsi que des réactions avec le dioxyde de soufre utilisé comme agent conservateur des aliments, de leur faible solubilité dans l'eau et d'une possible précipitation d'anthocyanes sous forme de complexes avec les protéines. La stabilité des anthocyanes augmente avec le nombre de groupements méthoxy sur le cycle B et diminue avec l'augmentation du nombre de groupements hydroxyles. Ainsi, parmi les anthocyanes les plus couramment rencontrées, les plus stables sont la malvidine, suivie de la peonidine, la petunidine et la cyanidine. La glycosylation et l'acylation des sucres augmentent aussi la stabilité et, donc les diglycosides d'anthocyanes sont plus stables que leurs monoglycosides correspondants (Rivas-Gonzalo, 2003).

#### ***II.3.2.2. Effet du pH***

L'effet du pH est le premier facteur agissant sur le changement de couleur d'une anthocyane donnée. La variation de la structure de l'anthocyane en fonction du pH est une particularité de ces molécules. En général les anthocyanes sont plus stables à pH acide. Une solution aqueuse d'anthocyanes à pH inférieur à 2, est rouge. Lorsque le pH augmente, ça devient bleue puis finalement incolore à pH neutre. Ces changements de couleur sont dus à des équilibres chimiques réversibles entre les différentes formes obtenues à partir de réactions de déprotonation et d'hydratation de l'ion flavylium (Brouillard et Dubois, 1977). La structure des anthocyanes, et donc leur couleur varient avec le pH (Figure II.6).

Les changements de structure qui ont lieu chez les anthocyanes lors d'un changement de pH font intervenir plusieurs types d'équilibres chimiques réversibles. En solution aqueuse, l'ion flavylium A<sup>+</sup>, forme colorée en rouge sous laquelle est représentée généralement les anthocyanes, n'est prédominante qu'en milieu très acide (pH<2) et est soumise à des réactions de déprotonation des groupements hydroxyles en position 5, 7 et 4' dès que le pH augmente (Brouillard et Dubois, 1977) pour donner d'autres types d'anthocyanes de couleur bleue, appelées bases quinoniques. A des valeurs de pH entre 3,5 et 4,5 le cation flavylium et la base quinonique coexistent, tandis qu'à pH 4,5- 6,0 seules les bases quinoniques neutres sont présentes. Lors d'une augmentation de pH, c'est la forme incolore hémiacétal (AOH) qui prédomine. En présence de solutions légèrement acides ou neutres, la pseudobase carbinol AOH est transformée, conduisant ainsi à une chalcone ouverte jaune pâle C (en formes cis et trans) par ouverture du cycle (Rivas-Gonzalo, 2003).

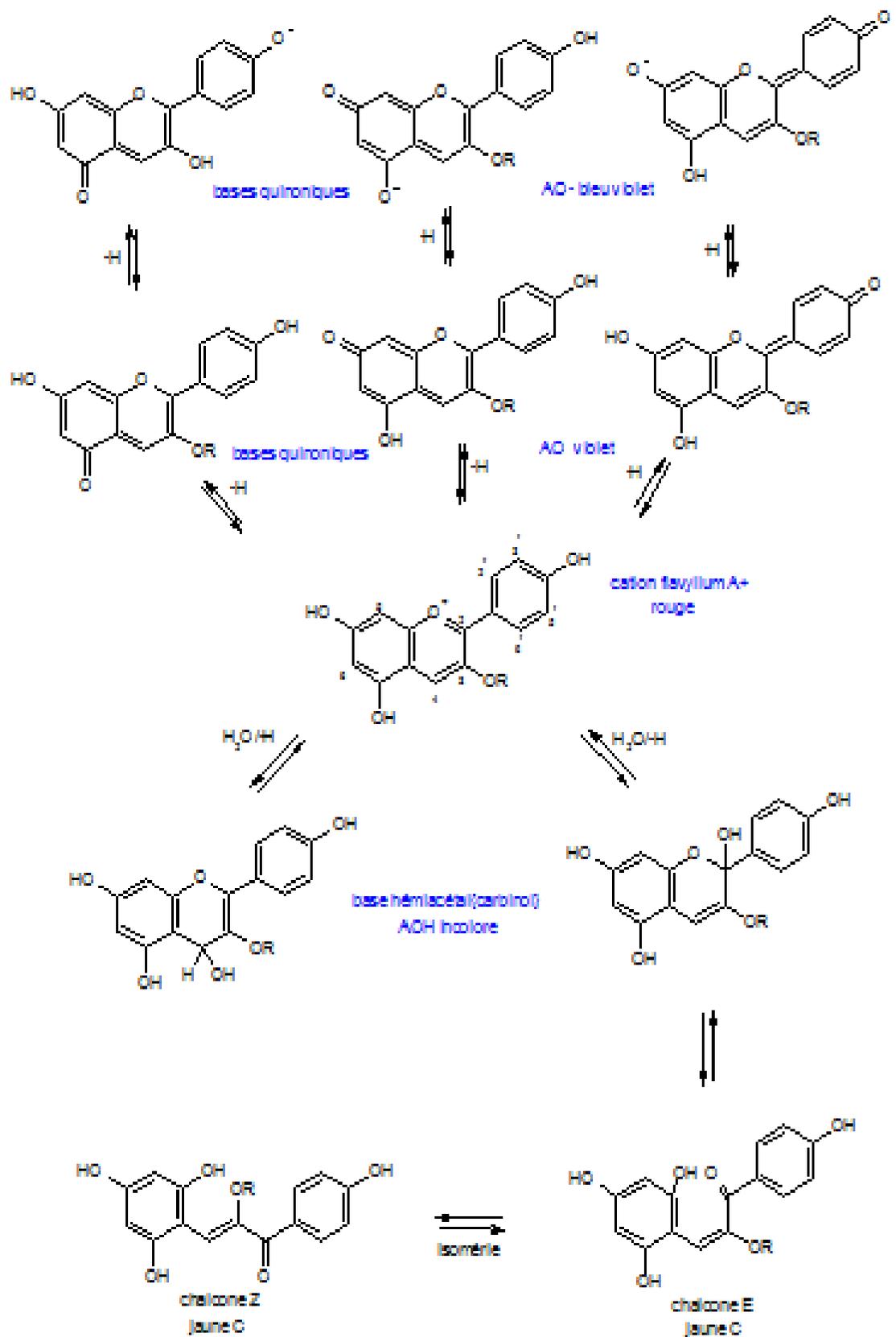


Figure II.6: Transformations structurales des anthocyanes en milieu aqueux.

### II.3.2.3. Spectre d'absorption

Comme tous les flavonoïdes, les anthocyanidines présentent une absorption caractéristique dans le domaine UV (Markham, 1982). La forme cationique de l'anthocyanidine est caractérisée par deux bandes d'absorption, dont une intense, dans le domaine du visible (Harborne, 1967). Ce maximum d'absorption subit un effet bathochrome quand la polarité des solvants diminue (solvatochromie négative), par contre on observe un effet hypsochrome quand les positions 3' et 5' sont méthoxylées ou glycosylées.

### II.3.2.4. Décoloration par le bisulfite de Sodium

L'addition de métabisulfite de sodium sur le carbone 4 de l'anthocyane (Figure II.7) conduit à sa décoloration (Timberlake et Bridle, 1967 ; Berke et al., 1998) par formation d'un 4-sulfonate incolore. Cette réaction est réversible et la forme flavylum rouge peut être régénérée par acidification ou ajout d'acétaldéhyde qui combine le bisulfite.

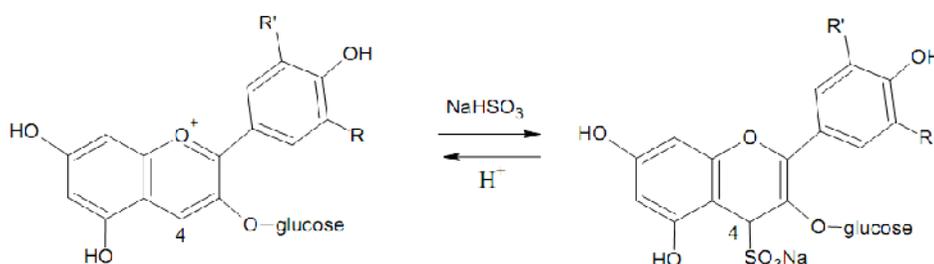


Figure II.7: Addition du bisulfite de sodium sur le cation flavylum.

### II.3.3. Rôle écologique des anthocyanes

Les anthocyanes sont synthétisés au niveau des fleurs, des fruits, des feuilles et des graines d'un grand nombre de végétaux. Leur accumulation confère des avantages écologiques et physiologiques majeurs (Koes et al., 1994; Harborne et Williams, 2000; Dixon et al., 2005). Les anthocyanes participent activement à la coloration des fleurs et des fruits (Harborne et Williams, 2000; Tanaka et al., 2008) apportant ainsi des avantages adaptatifs pour les interactions plantes-insectes (Archetti, 2000; Manetas, 2006). En effet, la coloration des fleurs faciliterait leur attraction par les insectes pour la pollinisation (Cooley et al., 2008; Rausher, 2008).

### II.3.4. Propriétés biologiques des anthocyanes

En plus de leur rôle de colorants, les anthocyanes possèdent des caractéristiques biologiques intéressantes. À ce jour, un intérêt majeur est porté aux effets bénéfiques des anthocyanes pour la santé humaine (Harborne et Williams, 2000). Plusieurs études suggèrent

que les anthocyanes ont un effet bénéfique dans le traitement de nombreuses maladies de microcirculation résultantes de la fragilité des capillaires (Havsteen, 1983). Ces pigments peuvent aussi prévenir le cholestérol responsable de l'athérosclérose (Kadar et al., 1979; Scharrer et Obre, 1981). Ils posséderaient, en plus, d'autres propriétés biologiques comme agents antioxydants, anti-inflammatoires et anti cancérogènes (Kamei et al., 1995).

Ils suscitent de plus en plus d'intérêt vis à vis de la prévention et du traitement de certaines maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Des travaux réalisés *in vivo* ont suggéré une diminution des accidents cardiovasculaires associée à une consommation régulière d'anthocyanes (Toufektsian et al., 2008).

Les effets positifs de ces pigments peuvent être liés à leur potentiel antioxydant démontré par plusieurs études *in vitro* (Tsuda et al., 1994). Les anthocyanes apportent alors une contribution substantielle aux antioxydants totaux du régime alimentaire (Ramarathnam et Osawa, 1996). Elles peuvent, en effet, attaquer les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes et l'oxyde nitrique (Tsuda et al., 1996; Sichel et al., 1991; Vanacker et al., 1995) en contrariant leurs effets par don d'électrons pour terminer la réaction en chaîne des radicaux libres (Ramarathnam et Osawa, 1996).

La capacité antioxydante est influencée par le nombre d'hydroxyles sur le cycle B, de sorte que la delphinidine et la cyanidine sont les plus efficaces des anthocyanes connues (Marazzoni et Bombardelli, 1996).

Les travaux de Fimognari et al. (2004) ont indiqué que la cyanidine 3-O-glucoside possède une activité anti-génotoxique *in vitro*, ce qui suggère son utilisation potentielle comme agent chimio-préventif. Les anthocyanes des myrtilles possèdent un pouvoir inhibiteur sur l'agrégation des plaquettes du sang (Marazzoni et Magistretti, 1990) qui interviennent dans la thrombose (coagulation du sang) et le développement de l'athérosclérose (Beretz et Cazenave, 1988). Dans ce processus d'anti-agrégation plaquettaire, il a été observé que la cyanidine 3-O-glucoside, la delphinidine -O-glucoside et la malvidine 3-O glucoside sont aussi actives dans l'inhibition de la coagulation *in vitro* (Marazzoni et Bombardelli, 1996).

On rapporte également que les anthocyanes ont des effets directs et indirects sur le collagène, qui est l'élément protéique principal des tissus connectifs (tendons et cartilage). La structure réticulaire des anthocyanes renforce de ce fait la matrice du collagène. De plus elles sont rapportées comme étant des molécules bioactives inhibant les enzymes qui décomposent le collagène (Marazzoni et Bombardelli, 1996).

Suite à des essais cliniques réalisés sur des contrôleurs du trafic aérien, des pilotes et des conducteurs de camions, qui ont révélé le potentiel des extraits anthocyanosidiques à améliorer

la vision nocturne, l'utilisation des anthocyanes a été recommandée à ce groupe de personnes actives et tous ceux qui souffrent d'une faible vision nocturne (Marazzoni et Bombardelli, 1996).

Des essais cliniques ont démontré l'efficacité des extraits riches en anthocyanes dans le traitement des maladies vasculaires périphériques, c'est à dire que ces extraits ont permis la réduction de l'approvisionnement en sang des membres inférieurs de femmes enceintes souffrant d'insuffisance veineuse chronique et dans le traitement pré- et post-opératoire de la varice des veines et dans les phases aiguës d'hémorroïdes (Marazzoni et Bombardelli, 1996).

### **II.3.5. Extraction des anthocyanes**

La procédure la plus commune pour extraire les anthocyanes utilise des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol avec différentes proportions d'acide chlorhydrique (HCl 0.1- 1%). L'utilisation d'un solvant organique a l'avantage d'inactiver les enzymes présentes dans les tissus végétaux et de faciliter le traitement subséquent de l'extrait obtenu, car il est facilement évaporé. Néanmoins, dépendant de la nature de l'échantillon, il peut s'avérer nécessaire d'ajouter de l'eau afin de réaliser une extraction complète des anthocyanes (Escribano-Baillon et Santos-Buelga, 2003). Pour une extraction des composés d'origine alimentaire, il est préférable d'utiliser l'éthanol car il est moins toxique, bien qu'il soit moins efficace dans l'extraction.

Strack et Wray (1989) ont rapporté que pendant le procédé d'extraction et la concentration subséquente, l'acide chlorhydrique peut hydrolyser les anthocyanes fortement acylés, particulièrement celles liées à des acides aliphatiques. Pour cette raison, et afin de réaliser une meilleure extraction des anthocyanes labiles, des conditions acides plus douces comme celles obtenues avec l'acide acétique, trifluoroacétique (TFA) tartrique, ou citrique sont recommandées.

## **II.4. Les terpènes**

### **II.4.1. Généralités**

Les terpènes (isoprénoides) sont des produits naturels, formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées, appelées unités isopréniques (Bruneton, 1999; Dey et Harborne, 1991; Manitto, 1981). Le terme terpène inventé par Kékulé (Teisseire, 1991), vient de leur origine historique de l'arbre de térébinthe : « *Pistacia Terebinthus* ». Les terpènes font partie des métabolites secondaires les plus répandus dans la nature (Bouvier et al., 2005).

Ils sont présents dans les végétaux, dont ils sont souvent les constituants "de senteur" (térébenthine, camphre, menthol, citronnelle), on les extrait sous forme d'huiles essentielles pour la parfumerie à partir des fleurs, des tiges, des racines et des différentes parties des plantes

(Schulz et al., 2003). La très grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal, mais cette spécificité n'est pas absolue. On rencontre des sesquiterpènes et des diterpènes de structures variées chez les animaux marins (Cœlentérés, Spongiaires) (Bruneton, 1993).

Plus de 36000 structures différentes de terpènes ont été identifiées (Hill, 2002) et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques: Anti-microbienne, insecticide, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire (Murakami et al., 2004; Griffin et al., 1999), anesthésique et anti-histaminique (des mono et sesquiterpènes), diurétique ( $\beta$ -eudesmol) (Velicković et al., 2003 ; Hsiou et al., 2000) et neuroprotective ( $\alpha$ -terpinène,  $\gamma$ -terpinène, et trans-caryophyllène) (Hyun-J et al., 2007). On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpènes (taxol), et des activités anti-oxydantes attribuées surtout aux diterpènes phénoliques (Hill, 1993 ; Valdés, 1994).

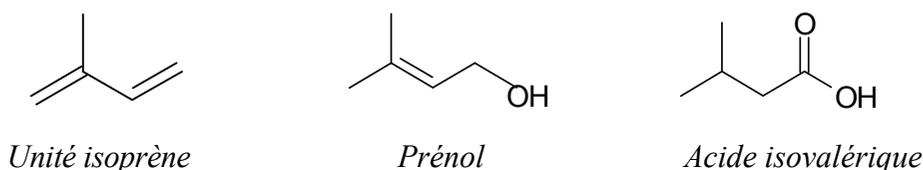
#### II.4.2. Classification

Les composés terpéniques sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Suivant le nombre entier d'unités pentacarbonées (C<sub>5</sub>) ramifiées, (isoprène), nous pouvons réaliser la classification suivante:

- C<sub>5</sub> : hémiterpènes (une unité isoprène)
- C<sub>10</sub> : monoterpènes (deux unités isoprène)
- C<sub>15</sub> : sesquiterpènes (trois unités isoprène)
- C<sub>20</sub> : diterpènes (quatre unités isoprène)
- C<sub>30</sub> : triterpènes
- C<sub>40</sub> : tetraterpènes (caroténoïdes)
- C<sub>45</sub> et C<sub>50</sub> : queues terpéniques des molécules d'ubiquinone et de plastoquinones
- Au-delà : polyterpènes (caoutchouc...)

##### II.4.2.1. Hémiterpènes (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>)

Les hémiterpènes se composent d'une unité d'isoprène unique. L'isoprène est lui-même considéré comme le seul hémiterpène, mais des dérivés oxygénés tels que prénil et acide isovalérique sont des hémiterpénoïdes.



**Figure II.8:** Exemples de composants hémiterpéniques.

### II.4.2.2. Monoterpènes (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>)

Composés à 10 carbones, souvent volatils, aromatiques et biologiquement actifs (bactériostatiques). Ils résultent d'une fusion typique tête-à-queue des unités d'isoprène (Allen et al., 1977). On distingue les monoterpènes linéaires (acycliques), les monoterpènes monocycliques et bicycliques (Figure II.9).

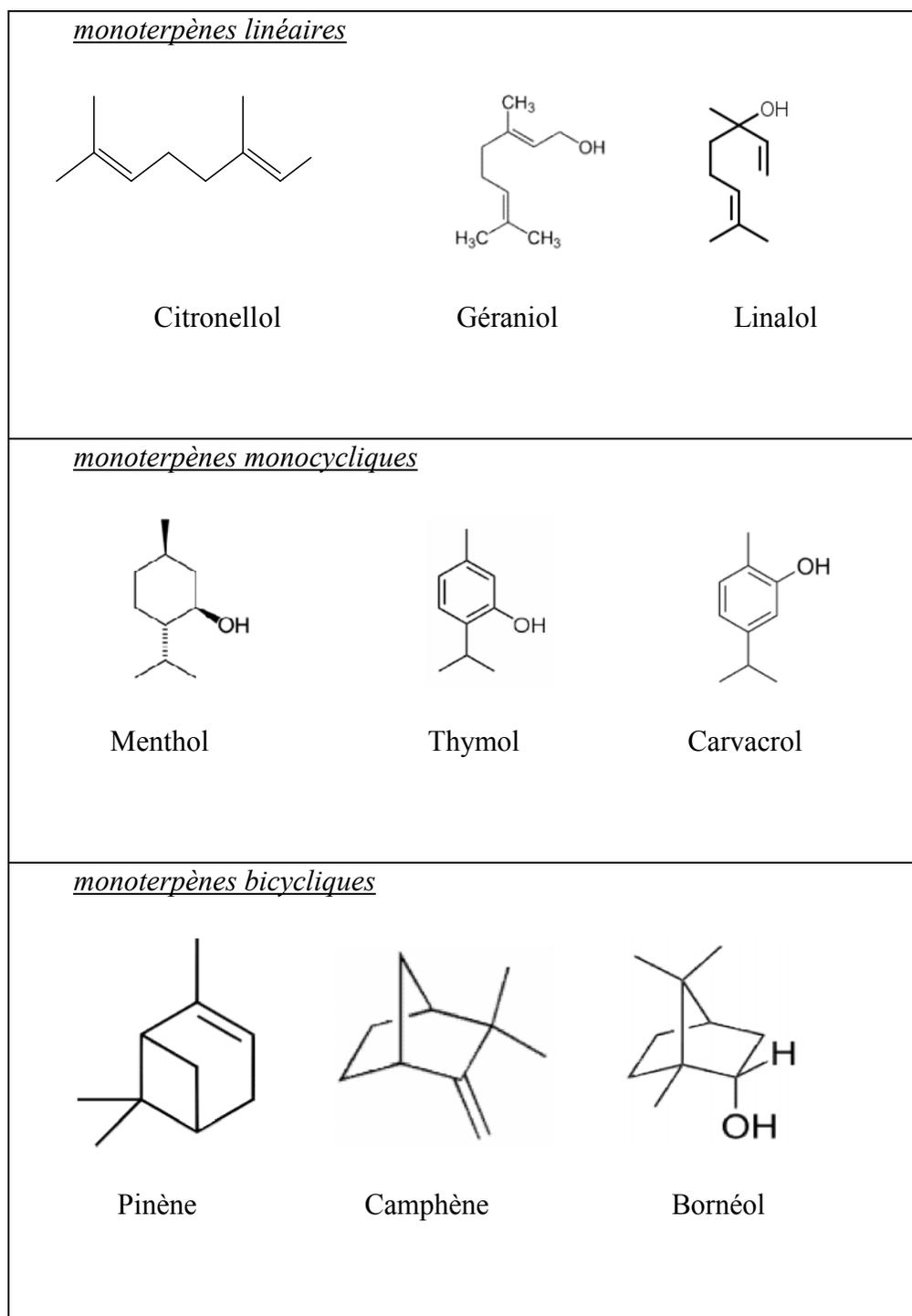
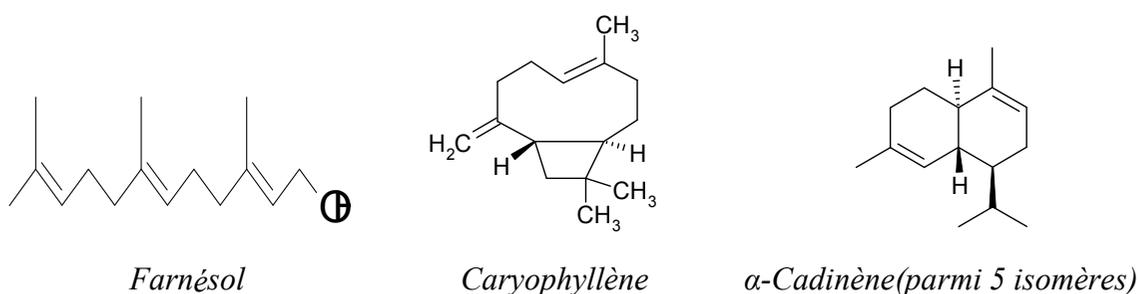


Figure II.9 : Exemples de composants monoterpéniques.

Ils sont largement présents dans les résines et les huiles essentielles (exemples du pinène constituant majeur de l'essence de térébenthine et du menthol).

#### II.4.2.3. Sesquiterpènes (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>)

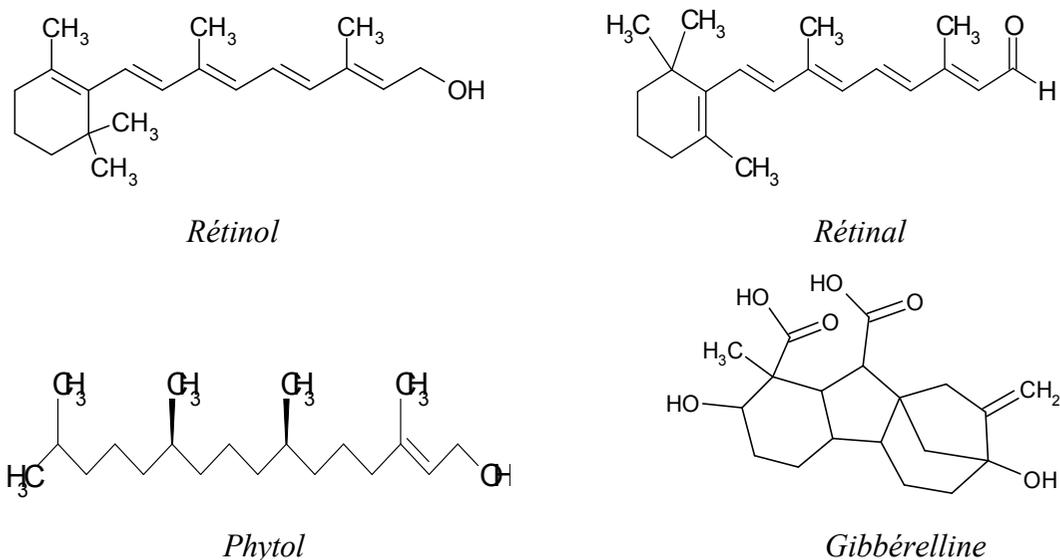
Composés à 15 carbones de formule moléculaire C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés exemple: le farnésol un sesquiterpène linéaire de nombreuses huiles essentielles, abondamment utilisé en parfumerie. On distingue également les sesquiterpènes monocycliques et polycycliques (exemple : le caryophyllène, un sesquiterpène bicyclique naturel qui est un constituant de nombreuses huiles essentielles, en particulier l'huile de girofle, l'huile à partir des tiges et des fleurs de *Syzygium aromaticum* (clous de girofle). Dans les plantes, ils ont le rôle d'agent de défense. Dans une huile essentielle, nous retrouvons presque exclusivement des mono- et sesquiterpènes.



**Figure II.10:** Exemples de sesquiterpènes.

#### II.4.2.4. Diterpènes (C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>)

Ils sont biosynthétisés à la suite du couplage de quatre (4) unités isoprène (Langenheim, 1990), très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont surtout rencontrés dans les résines ainsi que dans les champignons. Ils sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins (Bruneton, 1993). Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature dont la majorité est sous forme cyclique. Les diterpènes sont à la base d'une catégorie de molécules de grande importance biologique, ils sont connus pour leurs activités antimicrobienne et anti-inflammatoire. Ces composés peuvent être acycliques telles que le rétinol, le rétinol (Vitamine A), le phytol, un alcool non saturé, estérifié dans les chlorophylles, la vitamine K1, comme ils peuvent être cycliques, le cas des gibbérellines, composés diterpéniques tetracycliques.



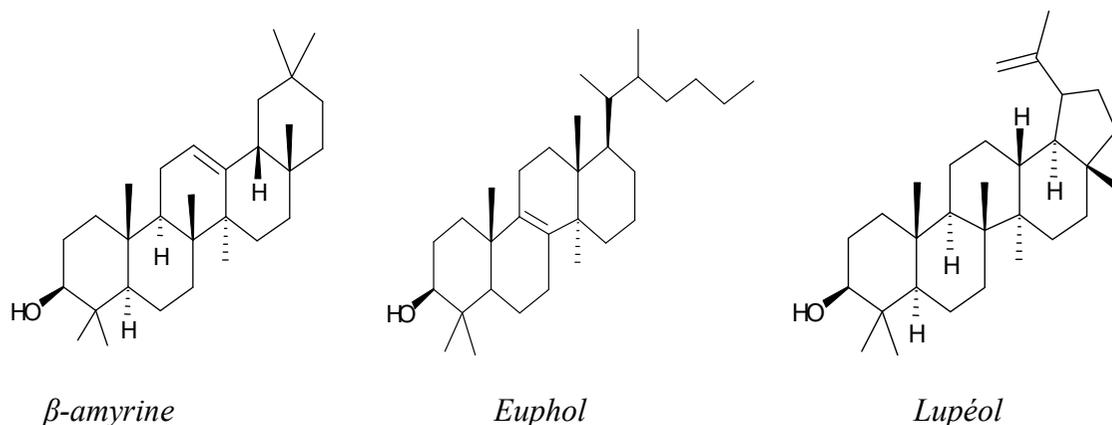
**Figure II.11:** Exemples de composants diterpéniques.

#### II.4.2.5. Triterpènes (C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>)

Ces composés en C<sub>30</sub> sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifié, ou sous forme hétérosidique. Cette famille regroupe des composés :

- aliphatiques, dérivés d'une unité à 30 carbones, le squalène, surtout rencontré dans le règne animal, se trouve également dans les huiles végétales (Olive, Lin, Arachide). C'est un intermédiaire essentiel dans la biosynthèse du cholestérol, des hormones stéroïdes et de la vitamine D chez l'Homme.
- tetracycliques, exemple l'euphol, et l'euphorbol trouvés dans les résines d'*Euphorbia resinifera*.
- pentacycliques, Ils sont très fréquents chez les plantes, on cite : l' $\alpha$ -amyrine, la  $\beta$ -amyrine et le lupéol (Figure II.12).

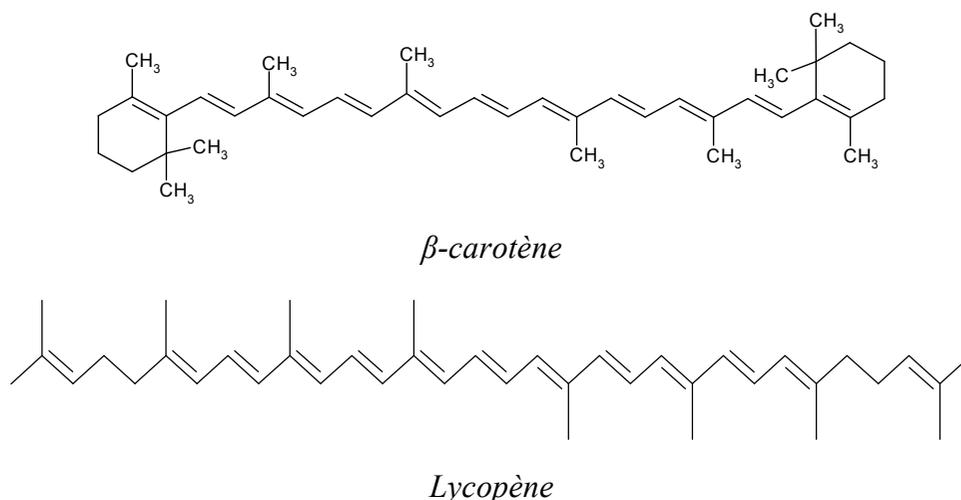
Ces molécules ont des potentialités thérapeutiques dans les différents domaines: cytostatiques, anti-inflammatoires, analgésiques, insecticides, et jouent un rôle considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique particulièrement dans la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés: contraceptifs, anti-inflammatoires,...etc. les triterpènes ont également une importance économique du fait de leur utilisation dans les industries agroalimentaires.



**Figure II.12:** Quelques exemples de triterpènes.

#### II.4.2.6. Tetraterpènes

Cette famille de terpènes à 40 carbones (8 unités d'isoprène), compte en particulier les caroténoïdes; pigments jaunes très répandus chez les animaux et les végétaux dont un pigment photosynthétique majeur, le beta-carotène, mais également des pigments aux propriétés anti-oxydantes comme le lycopène de la tomate. Le lycopène et le  $\beta$ -carotène sont des exemples des caroténoïdes acycliques et cycliques respectivement. Les caroténoïdes représentent un large groupe de pigments naturels de couleurs jaune, orange et rouge. Ils sont très répandus dans les plantes, les algues, et différents microorganismes. Actuellement environ 750 caroténoïdes ont été identifiés dans la nature (Britton, 1995). Les caroténoïdes sont subdivisés en deux groupes: Les hydrocarbures (carotènes), et leurs dérivés oxygénés (les xanthophylles). Les caroténoïdes sont des composés biologiquement importants, car se sont des provitamines, et des agents anti-oxydants (Khachik et al., 1995).



**Figure II.13:** Structures de deux caroténoïdes.

#### ***II. 4.2.7. Polyterpènes***

Ce sont des macromolécules, composées d'un grand nombre d'unités d'isoprène (plus de 8 unités). Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis- et trans. Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien, alors que le trans-polyisoprène est la partie principale de la *Gutta-percha* (Dubois, 1968). Donc les polyterpènes sont des macromolécules de poids moléculaire très élevé. Sur le plan thérapeutique, ces composés n'ont pas d'activités biologiques reconnues (Buchanan, 1979).

## *Matériels et Méthodes*

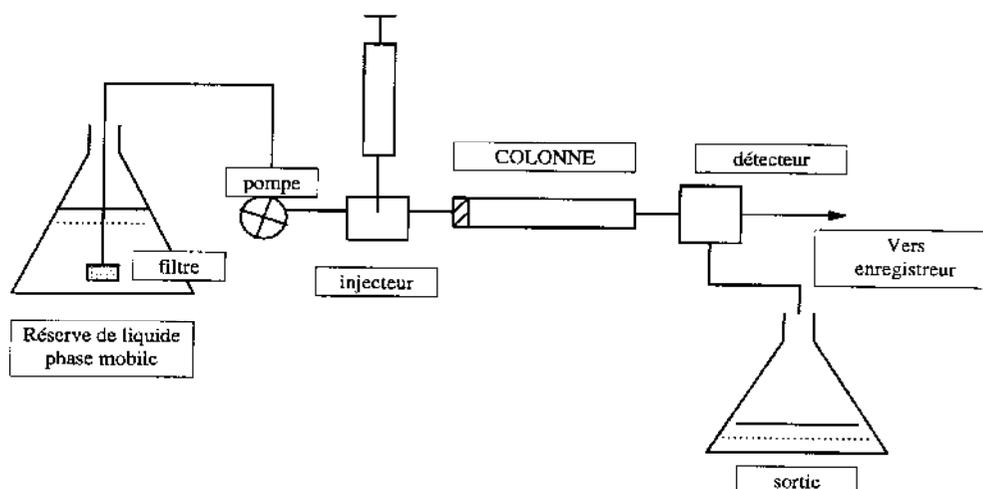
### III. Matériels et méthodes

#### III.1. Solvants

Tous les solvants organiques utilisés en chromatographie analytique ou préparative étaient de grade HPLC. Le méthanol a été acheté chez Carlo Erba (Val-de-Reuil, France) et l'acétonitrile de Scharlau Chemie (Sentmenat, Espagne). L'eau déminéralisée a été préparée par un système de purification d'eau Milli-Q (Millipore, MA, USA). Le chloroforme deutéré,  $\text{CDCl}_3$  a été fourni par Cambridge Isotope Laboratories Inc. (USA). Les molécules standards, y compris le psoralène, le bergaptène, la xanthotoxine, l'isopimpinelline, l'acide férulique, les chlorures de keracyanine, de callistephine, de péonidine 3-O-glucoside et de cyanidine 3-O glucoside ont été achetés chez Extrasynthèse (Genay, France).

#### III.2. Appareillage

- Broyeur (tamis maille 1,5 mm, RetschMühle)
  - Lyophilisateur (**Unitrap modèle 10-100**)
  - Speed-vac (**Savant**)
  - Milli-Q (Millipore, MA, USA).
  - Évaporateur sous pression réduite (**Laborota – 4000**)
  - Centrifugeuse (Bioblock **scientific, model 3K18**)
- 
- **HPLC Préparative**



**Figure III.1:** Schéma de principe d'une chaîne HPLC ([http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/chim/Jumber/HPLC/Chromatographie\\_en\\_phase\\_liquide.htm](http://www.ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/chim/Jumber/HPLC/Chromatographie_en_phase_liquide.htm))

L'appareil utilisé était du type Varian (Varian, modèle ProStar 210) avec une colonne Bischoff Prontosil C18 (250 x 8 mm, 5 µm diamètre de particule).

Détecteurs: Détecteur à barrettes de photodiodes, ProStar 335 ou à lampe UV-VIS.

#### ▪ HPLC analytique

Pour le dosage, nous avons utilisé une HPLC-DAD du type Agilent, série 1100 avec un détecteur muni d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur (G1354A), d'un autosampler automatique (G1313A), d'un compartiment de colonne thermostaté (G1316A) et d'un détecteur à barrettes de photodiodes (G1315B). Les données ont été analysées en utilisant le logiciel de chromatographie ChemStation. La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne Bischoff Prontosil 120-5-C18-AQ (250 x 4,0 mm, taille des particules 5 µm) thermostatée à 25°C dans le cas des coumarines et à 35 °C dans le cas des anthocyanes.

La partie des analyses par HPLC élaborée au Laboratoire de Chimie Appliquée de Guelma, a été réalisée en utilisant un appareil HPLC analytique du type Shimadzu couplé à un détecteur UV-VIS SPD-10Avp, équipée d'une Colonne C<sub>18</sub> (Nucleosil 100-5, diamètre des billes de silice: 5 µm), une pompe de type LC-10ATvp, un dégazeur de type DGU-14A et un système de control de type SCL-10Avp.

#### ▪ HPLC-DAD-MS

Les dosages des coumarines dans les sarments et des anthocyanes dans les fruits ont été réalisés en utilisant un appareil HPLC du type Agilent avec un détecteur série 1200 (université Bordeaux 2, France), couplé à un spectromètre de masse à piège ionique Esquire 3000+ équipé d'une source ESI (Electrospray Ionisation) de Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA). L'instrument HPLC comprend un autosampler automatique, un dégazeur, une pompe binaire, un appareil de chauffage/sélecteur de colonne et un détecteur à barrettes de photodiodes du même fournisseur. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Esquire. La colonne était du même type que celle utilisée pour le dosage. Les spectres ont été enregistrés dans le mode positif.

#### ▪ Spectroscopie RMN

Les analyses par Résonance Magnétique Nucléaire RMN, ont été réalisées par un spectromètre du type Bruker (300 MHz) AMX 300, à 300 K dans le mode transformée de Fourier. Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm par rapport aux solvants deutérés (chloroforme 7,27 ppm).

### **III.3. Broyage et macération**

Les sarments d'un figuier donnant la variété noire de figes locales ont été récoltés à Guelma, (ville située à l'Est de l'Algérie). Les sarments ont été découpés en petits morceaux puis séparés à l'aide d'un couteur en deux parties (écorce et bois) et laissés sécher à l'air libre après quoi, ils ont été finement broyés. Environ 340 g de poudre d'écorce et 700 g de poudre de bois ont été utilisés séparément pour l'extraction sur colonne (1mètre de longueur et 8 cm de diamètre) à l'aide d'un mélange de solvants acétone/eau (80/20). La macération a duré environ 48 heures à température ambiante. Une fois filtré, chaque extrait est concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, en vue d'éliminer l'acétone.

### **III.4. Extraction**

L'extrait aqueux obtenu à partir de chaque partie des sarments est soumis à une délipidation dans une ampoule à décanter à l'éther de pétrole en vue de le débarrasser de la chlorophylle, des lipides, des xanthophylles...etc. L'extrait aqueux issu de cette opération est soumis à l'extraction répétée à l'aide de l'acétate d'éthyle.

À la fin de cette étape, trois phases ont été obtenues; deux phases organiques (phase éther de pétrole et phase acétate d'éthyle) et une phase aqueuse. La phase d'acétate d'éthyle a été soumise à la purification pour l'isolation des métabolites secondaires.

### **III.5. Purification des polyphénols**

La méthode chromatographique utilisée pour la purification des composés de la phase acétate d'éthyle est la chromatographie sur couche mince semi- préparative.

#### **III.5.1. Chromatographie sur couches minces semi-préparatives**

Les fractions qui contiennent peu de composés selon les CCM analytiques (un nombre limité de tâches) ont été re-purifiées au moyen de la chromatographie sur couche mince semi-préparative où la phase stationnaire est du Polygram silica gel déposé sur des plaques en verre. Le suivi de la séparation s'effectue à l'aide de plaques CCM analytiques (silice déposée sur feuille d'aluminium). Après développement dans des cuves en verre (Canmag), les plaques ont été observées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 366 nm. L'éluant est un mélange  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCOOH}$ , 85/15/3 (v/v).

Les techniques de détection utilisées en chromatographie sur couche mince analytique et préparative sont simples et reproductibles. Elles sont également relativement sensibles car elles permettent la détection de la majorité des substances présentes même en faibles quantités. Dans le présent travail, de l'extraction, à la purification, et à la caractérisation, nous

avons utilisé des réactifs adaptés à la chromatographie sur couche mince. Le principal réactif de pulvérisation est un réactif à base d'anisaldéhyde: méthanol/*p*-anisaldehyde acidifiée (acide sulfurique) (Paterson et Bridge, 1994).

#### **Le réactif à l'anisaldéhyde**

Ce réactif est préparé comme suit :

- On mélange 0,5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial.

- On ajoute 85 ml de méthanol

- On ajoute 5 ml d'acide sulfurique concentré

La solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 4°C pendant toute la durée d'utilisation. Les plaques sont pulvérisées (sous hotte) avec ce réactif et finalement chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à apparition de tâches de diverses couleurs.

Après élution et séchage des plaques, les composés ont été grattés et récupérés dans des béchers. À ce stade, les composés sont attachés à la silice et pour s'en débarrasser, une quantité de solvant a été ajoutée dans chaque bécher pour les dissoudre. Une agitation mécanique est nécessaire pour la dissolution complète des composés grattés. Finalement, le tout est filtré à travers du papier filtre, qui retient la silice alors que le filtrat est soumis à l'évaporation sous vide.

### **III.6. Dosage par HPLC-DAD et HPLC-MS**

L'appareil utilisé est du type Agilent Modèle (1100) muni de quatre pompes pour la délivrance de solvants, d'un détecteur à barrettes de diode couplé à une "chemstation" pour la manipulation et le traitement des chromatogrammes. La colonne (250 x4 mm) utilisée est garnie de silice greffée au C18 (Nucleosil 100, diamètre des billes de silice: 5  $\mu$ m), cette dernière est utilisée comme phase stationnaire. La température de la colonne et le débit sont respectivement de 25°C et de 1ml/min pour les coumarines et de 35°C et 0,5ml/min respectivement pour les anthocyanes.

#### **III.6.1. Solvants utilisés**

\*Les phases mobiles utilisées dans le dosage des furocoumarines sont:

**Solvant A:** H<sub>2</sub>O/(TFA (0,05%))

**Solvant B:** Acétonitrile /(TFA (0,05%)).

\*Les solvants utilisés dans le dosage des anthocyanes sont :

**Solvant A:** H<sub>2</sub>O/ (TFA (0,1%))

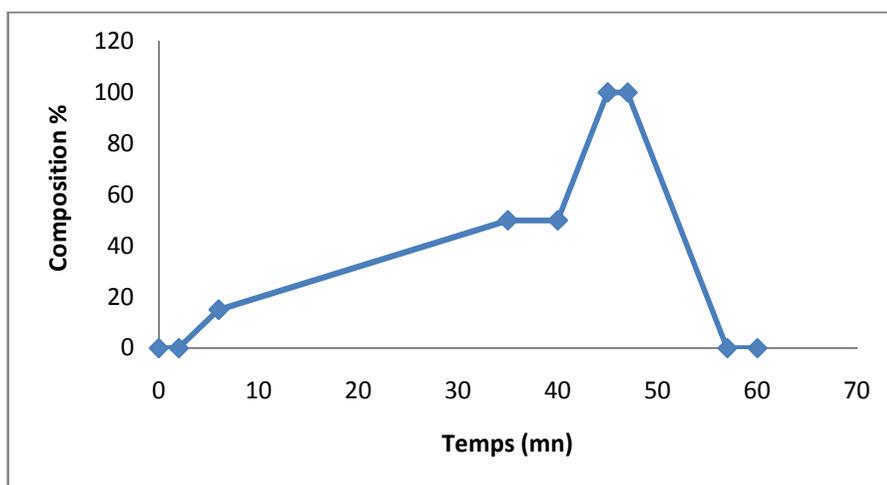
**Solvant B:** Acétonitrile / (TFA (0,1%).

### III.6.2. Gradient

\*Le gradient HPLC utilisé pour l'analyse quantitative des furanocoumarines (Figure III.2) était comme suit: 0% B (0-2 min), 0-15% B (2-6 min), 15-50 % B (6-35 min), 50% B (35-40 min), 50-100% B (40-45 min), 100% B (45-47 min), 100-0% B (47-57 min), 0% A (57-60 min) (Tableau III.1) à un débit de 1 ml min<sup>-1</sup>.

**Tableau III.1:** Gradient HPLC analytique pour les coumarines.

Temps (mn: sec)	%A	%B	Débit (ml/min)
0:00	100	00	1
02:00	100	00	1
06:00	85	15	1
35:00	50	50	1
40:00	50	50	1
45:00	00	100	1
47:00	00	100	1
57:00	100	00	1
60:00	100	00	1

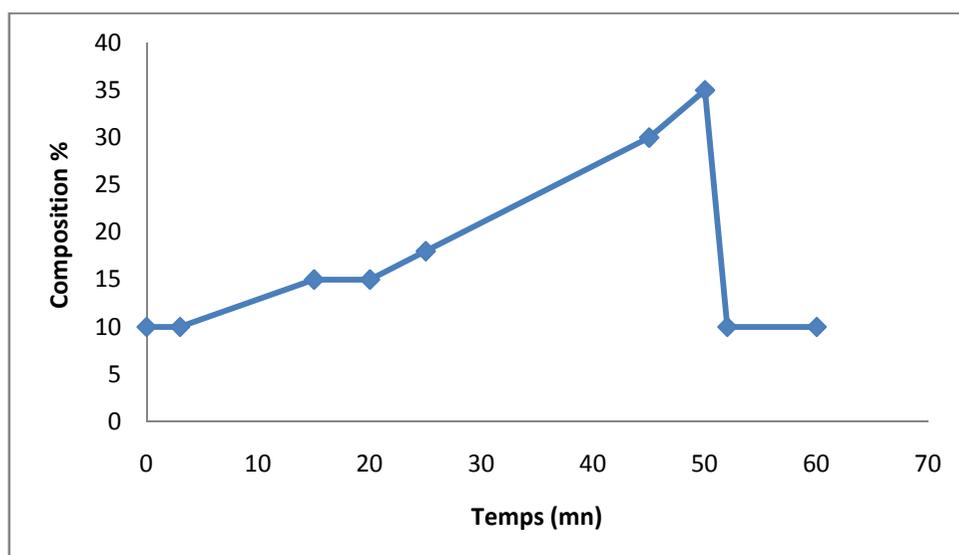


**Figure III.2:** Gradient HPLC utilisé pour l'analyse des furocoumarines.

\*Le gradient HPLC utilisé pour l'analyse quantitative des anthocyanes (Figure III.3) était comme suit: isocratique à 10 % B pendant 3 min, de 10 % à 15 % B pendant 12 min, isocratique à 15 % B pendant 5 min, de 15 à 18 % B pendant 5 min, de 18 % à 30 % B pendant 20 min et enfin de 30 % à 35 % B pendant 5 min, à un débit de 0,5 ml min<sup>-1</sup>. La détection a été réalisée par un détecteur à barrette de diode aux longueurs d'onde sélectionnées.

**Tableau III.2:** Gradient HPLC utilisé pour l'analyse des anthocyanes.

Temps (mn : sec)	%A	%B	Débit (ml/min)
0:00	90	10	0,5
03:00	90	10	0,5
15:00	85	15	0,5
20:00	85	15	0,5
25:00	82	18	0,5
45:00	70	30	0,5
50:00	65	35	0,5
52:00	90	10	0,5
60:00	90	10	0,5



**Figure III.3:** Gradient HPLC pour les anthocyanes.

Les gradients et les phases mobiles utilisés pour l'identification par HPLC-DAD-MS sont les mêmes que ceux utilisés dans le dosage par HPLC-DAD dans le cas des anthocyanes.

Pour les coumarines, les extraits ont été élués avec un mélange binaire d'eau acidulée avec 0,1% de HCOOH (solvant A) et d'acétonitrile, 0,1% HCOOH (solvant B). Le gradient d'éluion était (v / v): 0 -2min 5% de B, 6 min 15% B, 35- 40 min 50% B, 40 – 45 min 100% B, 45-47min 100% B, , 47-57 min 5% B. Entre chaque deux échantillons, on laisse 1 heure pour rééquilibrer la colonne. Le débit de sortie par HPLC a été divisé par un diviseur passif avec un rapport moyen de 1:100 en fonction du débit de solvant d'écoulement et de sa viscosité. Le débit et la température du séchage du gaz ont été fixés à 5,0 L.min<sup>-1</sup> et 325 °C, respectivement. La pression du nébuliseur a été fixée à 15 psi. Les paramètres de l'ESI-MS (Electrospray Ionisation) (mode positif) étaient les suivants: HV capillaire -3700 V, plaque d'extrémité compensée -500 V, capillaire sortie 127,9 V, 31,7 V écumoire; lecteur de piège 89,4.

### **III.6.3 Injection**

Chacun des appareils HPLC-DAD analytique ou HPLC-DAD-MS est équipé d'un injecteur automatique, l'échantillon a été préparé dans des cupules spéciales et injecté dans la colonne alors que l'injection dans l'appareil HPLC Shimadzu s'est faite manuellement à l'aide d'une microsiringue. La détection a été faite à 295 et 310 nm dans le cas des coumarines (longueurs d'ondes caractéristiques des furanocoumarines) et de la rutine et à 506, 516, 518 et 520 nm pour les anthocyanes: callistephine, cyanidine 3-O-glucoside, keracyanine et péonidine 3-O-glucoside respectivement. Le volume d'injection était de 20 µL pour tous les échantillons, sarments (écorce et bois), feuilles et fruits. L'appareil HPLC a été programmé pour exécuter une série de trois analyses consécutives pour chaque échantillon.

## **III.7. Dosage des polyphénols dans les sarments, fruits et feuilles de *Ficus carica***

### ***III.7.1. Échantillons de sarments et de feuilles étudiés***

Les sarments et les feuilles de huit différents figuiers *Ficus carica* L. ont été récoltés de différentes régions de l'Est Algérien et plus précisément dans les villes de Annaba et Guelma et leurs alentours. Quatre types de ces figuiers produisent des figues noires (Blanquette, Zreka, Boule d'or et Hamri) alors que les autres donnent les variétés vertes (Albo, Bakor blanc, Bakor noir et Cavalière). Ces variétés locales de sarments et de feuilles de figuiers ont été recueillies en Mai-Juin 2010 et ont été authentifiées par l'Institut Technique des Arbres fruitiers et viticoles (ITAFV), Medjez Dchich, Skikda, Algérie. Les noms de ces

variétés et leurs lieux de récolte sont indiqués dans le tableau (III.3), leurs fiches signalétiques correspondantes obtenues de ITAFV de Skikda sont données dans l'annexe A. Les échantillons ont ensuite été déposés au laboratoire pour extraction et analyse.

**Tableau III.3:** Noms vernaculaires et emplacement des 8 variétés de figes étudiées.

Variété	Nom Vernaculaire	Location
A	Blanquette	Guelma (Wedzeneti)
B	Zreka	Guelma (Belkheir)
C	Boule d'or	Annaba (Seraidi)
D	Hamri	Guelma (Wedzeneti)
E	Albo	Guelma
F	Bakor blanc	Guelma (Bouati)
G	Bakor noir	Guelma (Belkheir)
H	Cavalière	Guelma (Bouati)

Les deux parties de sarments (écorce et bois) de chaque variété ont été séparées et découpées en petits morceaux et laissés sécher à l'air libre après quoi, elles ont été finement broyées à l'aide d'un moulin à café électrique. Les feuilles ont simplement été séchées à l'ombre à l'air libre, puis pulvérisées et tamisées.

Environ 2g de poudre de chacune des deux parties de chaque variété de sarments et de feuilles ont été utilisés pour l'extraction dans un bécher de 250 ml à l'aide d'un mélange de solvants CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (50/50). La macération a duré environ 24 heures à température ambiante. Chaque extrait obtenu a été filtré à travers un filtre en PTFE (Polytétrafluoro éthylène) de 0,45 µm de diamètre des pores, puis évaporé sous vide à 30 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif en vue d'éliminer le méthanol. L'extrait est ensuite lyophilisé sous forme de poudre solide. 5 mg de chaque échantillon sont ensuite dissouts dans 1 ml de méthanol et filtrés à travers un filtre à membrane ayant 0,25 µm de diamètre des pores (Macherey-Nagel, France), avant l'injection dans l'équipement HPLC pour identification et dosage.

### ***III.7.2. Échantillons de fruits (figes) étudiés dans le dosage des anthocyanes***

Les huit variétés de fruits citées dans le tableau (III.3) ont subi des analyses qualitatives et quantitatives par HPLC-DAD. Les fruits de chaque variété ont été récoltés au stade de maturité, 5 unités ont été aléatoirement sélectionnées à partir d'environ 1 kg de chaque variété. Les figes ont été immédiatement pesées et manuellement pelées, une fois séparées,

les deux parties pulpe et pelure sont analysées séparément.

La pelure (2 à 3 g) et la pulpe (8 à 10 g) ont été soumises à l'extraction dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (v/v), l'eau contient 0,5 % d'acide trifluoroacétique (TFA), la première macération a duré 16 heures à 4 °C. Par la suite, les extraits obtenus ont été centrifugés pendant 20 minutes. Ce processus a été répété deux fois à deux intervalles de 4 heures, complétant un total de 24 h d'extraction. Les extraits ont été combinés et concentrés sous vide à 30 °C jusqu'à ce que le méthanol ait été chassé. L'extrait obtenu a ensuite été soumis à une purification en le déposant sur une colonne en verre chargée d'Amberlite XAD7HP précédemment activée avec du méthanol suivi d'eau, les sucres et plusieurs substances polaires (glycérol, acides organiques) ont été alors éliminées en faisant passer de l'eau ultrapure.

### ***III.7.2.1. Filtration sur résine Amberlite XAD 7HP***

L'AMBERLITE XAD 7HP ou plus simplement XAD-7 est un adsorbant polymère de qualité industrielle pour l'enlèvement, l'immobilisation et la récupération des peptides et des protéines à partir de solutions aqueuses. Il s'agit d'un polymère acrylique non ionique aliphatique qui tire ses propriétés d'adsorption à partir de sa structure macroréticulaire. L'amberlite XAD7HP a une excellente stabilité thermique et physique. En effet en raison de sa nature aliphatique, l'amberlite XAD7HP peut adsorber des composés non polaires à partir de systèmes aqueux, et peut également adsorber les composés polaires de solvants non polaires. Cette résine est fournie sous forme de billes blanches et insolubles dans l'eau et les solvants organiques.

### **Préparation de la colonne de résine**

La colonne de résine utilisée était de 20cm de hauteur et de 2cm de diamètre, elle est alors chargée avec la résine XAD 7 HP. Il faut que l'extrait présente une fluidité satisfaisante mais non excessive dans la colonne, on évite de cette façon l'encrassement prématuré des résines. L'ajustement de la fluidité de l'extrait s'effectue par son évaporation sous vide à une température variant de 30 à 40°C au pH spontané de l'eau.

Avant de charger la résine dans la colonne, on y met une couche de coton afin d'éviter la descente des billes de XAD-7. Une fois la colonne chargée de résine, on élimine l'eau dans laquelle la résine est en suspension et on met une couche de verre fritté la dessus, l'extrait est ensuite chargé dans la colonne.

### Récupération des polyphénols fixés sur la résine

Après introduction du volume total de l'extrait, on effectue un rinçage de la colonne avec de l'eau ultrapure. L'eau a pour effet d'éluer les composés non fixés par la résine, c'est à dire les sucres et les autres substances non polyphénoliques. Le rinçage est effectué par le haut de la colonne.

Après l'étape de rinçage, on procède à l'étape de récupération des polyphénols adsorbés. Cette étape est effectuée en éluant les composés adsorbés sur la résine par du méthanol (0,5 % TFA). L'élution s'effectue par le haut de la colonne et le liquide s'écoule par le bas. Le méthanol provoque un décrochement progressif de la coloration rouge, signe de la présence d'anthocyanidines dans l'éluât.

### Concentration

Après que la totalité de l'éluât méthanolique a été rassemblée, on concentre celui-ci par évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif (30°C) en ajoutant régulièrement de l'eau dans le liquide lors de l'évaporation du méthanol sous vide de manière à ne pas risquer de détériorer ou de décomposer les polyphénols. A la fin de l'évaporation du méthanol, les anthocyanidines se trouvent dans un milieu à 100 % aqueux. L'extrait est alors lyophilisé, ensuite pesé, on obtient finalement une poudre fine, de couleur violette à noire. La poudre est stockée dans un endroit sec à une température variant de 10 à 25°C à l'abri de la lumière. Le protocole est résumé sur la figure (III.4) ci-dessous.

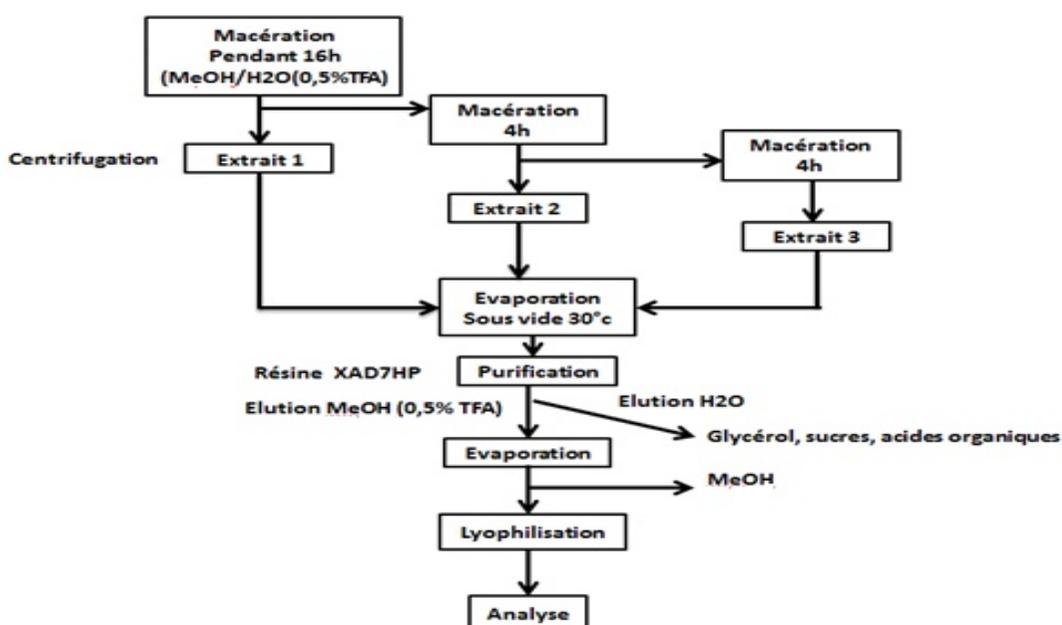


Figure III.4: Protocole de traitement du fruit.

Les pigments anthocyanes retenus par la résine échangeuse d'ions (Amberlite) sont élués avec quelques ml de méthanol acidifié à 0,5 % TFA. Par la suite, l'extrait méthanolique est évaporé sous vide dans un évaporateur rotatif (30°C), lyophilisé, pesé et enfin dissous dans une solution aqueuse acidifiée à 0,1 % TFA pour analyse par HPLC,

Pour la pelure et la pulpe de chaque variété de fruit, les extraits ont été préparés indépendamment, purifiés et enfin analysés séparément.

### ***III.7.3. Standards***

Les composés que nous avons analysés dans les sarments, les feuilles, et les fruits des différentes variétés de *Ficus carica* cités précédemment sont: Le psoralène, le bergaptène, la xanthoxine, l'isopimpinelline, l'acide férulique, les chlorures de keracyanine, de callistephine, de péonidine 3-O-glucoside et de cyanidine 3-O glucoside.

### ***III.7.4. Préparation des gammes étalons***

La solution mère est préparée à la base de 1mg de chacun des standards pur dans 1ml de solvant (50% MeOH), des dilutions successives ont par la suite été effectuées. Les courbes étalons sont ensuite tracées pour chacun des standards.

### ***III.7.5. Analyses par HPLC***

Les analyses ont été faites sur un appareil du type Agilent. Les solvants et le gradient utilisés ont déjà été mentionnés dans les Tableaux (III.1) et (III.2) ci-dessus.

#### ***III.7.5.1. Préparation des échantillons***

Dans des cupules de 300 µl, on place les échantillons préparés par dilution de 5 mg de poudre lyophilisée dans 1 ml de méthanol dans le cas des furocoumarines et de la rutine et de 5mg de poudre lyophilisée dans 1 ml d'H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) dans le cas des anthocyanes. Après filtration sur une membrane Millipore de 0.45 µm, on règle le volume injecté à 20 µL à partir du programme chemstation qui pilote toute l'opération d'analyse. Après l'analyse de chaque échantillon, la colonne est rééquilibrée avec la phase A (H<sub>2</sub>O/TFA) pendant 10 min, ceci est rendu possible par le placement de cupules ne contenant que le solvant A pur. Les longueurs d'onde de détection sélectionnées étaient 310 nm (caractéristiques des flavonoïdes) pour les coumarines et la rutine et 518 nm pour les anthocyanes.

### **III.7.6. Intégration**

Une intégration consiste à mesurer la surface sous un pic. La détection d'un pic chromatographique par l'intégrateur, dépend de 2 paramètres:

- la largeur attendue des pics
- le seuil d'intégration (sensibilité)

La largeur de pic est à peu près prévisible en fonctions de la technique d'analyse et des conditions opératoires. Elle détermine la fréquence d'échantillonnage du signal. Le pic est alors découpé en tranches. Le seuil d'intégration est la valeur du signal à partir de laquelle le calculateur repère un début de pic.

Les surfaces des pics correspondant aux composés auxquels nous nous intéressons sont données par le logiciel dans un fichier contenant les données chromatographiques sous forme de tableaux contenant le numéro du pic, son temps de rétention, et sa surface et ce à la fin de chaque analyse.

### **III.8. Etude théorique de l'activité antioxydante des coumarines**

Tous les calculs présentés dans la présente étude ont été réalisés en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT), telle que transposée dans le package GAUSSIAN 03 (Frisch et al., 2003). La précision de la DFT est en général meilleure que la méthode Hartree-Fock dans laquelle le spin de l'électron n'est pas pris en considération, en particulier le calcul des molécules avec des liaisons hydrogène, et c'est la raison pour laquelle, la DFT a été la méthode de choix pour cette partie du travail.

L'étude détaillée des propriétés électroniques d'un système moléculaire nécessite la prise en compte des effets de corrélation électronique en particulier, lorsque celui-ci contient des métaux. Les méthodes Post Hartree-Fock (post HF) permettent d'intégrer ces effets mais sont souvent lourdes et limitantes quant à la taille de systèmes étudiés. C'est pour quoi, au cours de ces trente dernières années, la Théorie de la fonctionnelle de la densité ou DFT a été considérablement développée pour l'étude des systèmes chimiques et s'est imposée comme une alternative performante aux méthodes Post HF initialement conçues et appliquées aux problèmes de l'état solide. Plusieurs raisons ont contribué à sa popularité quant aux applications chimiques :

- ✓ Cette théorie inclut dans son formalisme une grande part de corrélation électronique.
- ✓ La méthode peut-être appliquée à tout type de système : covalent, ionique ou métallique.

✓ Les ressources informatiques requises sont moins importantes que celles utilisées dans les calculs du type Post HF, rendant ainsi possibles les études des systèmes moléculaires de plus grandes tailles.

L'objectif visé dans cette étude théorique est de déterminer l'activité antioxydante de cinq C3-aryl-4-hydroxycoumarines, dérivés de la 4-hydroxycoumarine, afin d'évaluer l'effet de différents substituants aryles en C3 sur la dite activité, et de la 4-méthylumbelliférone, un 7-hydroxycoumarine typique. En outre une étude sur les différences de l'activité antioxydante de chaque hydroxycoumarine précédemment citée et son analogue sulfuré a été effectuée afin de visualiser l'effet de la substitution du groupe hydroxyle par un groupement sulfhydryle sur l'activité antioxydante.

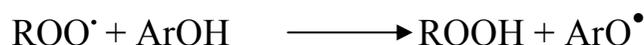
Notre étude théorique comprend:

- (i) L'optimisation de la géométrie,
- (ii) L'orbitale moléculaire la plus occupée (HOMO, Highest occupied Molecular Orbital),
- (iii) L'orbitale moléculaire la plus inoccupée (LUMO, Lowest Unoccupied Molecular Orbital),
- (iv) Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP, Adiabatic Ionisation Potential),
- (v) L'énergie de dissociation des liaisons (BDE, Bond Dissociation Energy)

La structure de chaque composé phénolique (ArOH) a d'abord été soumise à une analyse de conformation systématique (Halgren, 1996). Pour les espèces ayant plus de conformations, tous les conformères ont été étudiés. Le conformère avec l'énergie électronique la plus faible a été utilisé dans ce travail. Les conformations générées ont été entièrement optimisées par la méthode semi-empirique en utilisant le modèle Austin AM1 (Dewar et al., 1985). Tous les calculs ont été effectués en considérant la molécule isolée dans le vide, et sans aucune restriction géométrique. Puis une optimisation complète des structures originales de la 4-hydroxycoumarine, de ses molécules analogues et des radicaux libres correspondants a été réalisée à un niveau 6-31G \*, base définie par la méthode B3LYP (Becke, 1988; Becke, 1993).

Les propriétés antiradicalaires des composés phénoliques (ArOH) sont liées à leur capacité de transférer leur atome H phénolique à un radical libre. Le modèle de substitution phénolique est le facteur clé qui définit la capacité du composé phénolique à piéger les radicaux libres, en transférant son atome d'hydrogène. De nombreux auteurs ont suggéré que l'enthalpie de dissociation homolytique de la liaison O-H (BDE O-H) est le descripteur principal de l'activité antioxydante.

Ce mécanisme dépend des enthalpies de dissociation de deux liaisons (BDEs): la BDE de O-H de ArOH et la BDE de H-R du radical. Le paramètre BDE-OH (l'enthalpie par mole nécessaire pour rompre la liaison OH de certaines molécules spécifiques) (McNaught et Wilkinson, 1997) est lié à la voie de transfert de l'atome H suivant la réaction suivante :



En utilisant les enthalpies de l'état standard à 1 atm et 298,15 K, les valeurs de BDE homolytiques ont été calculées par la relation suivante:

$$\text{BDE}_{\text{ArO-H}} = \Delta_f\text{H}(\text{ArO}^\bullet) + \Delta_f\text{H}(\text{H}^\bullet) - \Delta_f\text{H}(\text{ArOH}) \quad (\text{I})$$

Où:

✓  $\Delta_f\text{H}(\text{ArO}^\bullet)$  est l'enthalpie de formation du radical de l'hydroxycoumarine générée après abstraction de H,

✓  $\Delta_f\text{H}(\text{H}^\bullet)$  est l'enthalpie de formation de l'atome d'hydrogène,

✓  $\Delta_f\text{H}(\text{ArOH})$  est l'enthalpie de formation de la molécule antioxydante.

Une valeur faible de BDE est généralement attribuée à une plus grande capacité de donner un atome d'hydrogène du groupe hydroxyle et entraînant plus facilement une réaction de piégeage de radicaux libres. Le radical généré est un radical libre relativement stable. De l'autre côté, des approches basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) permettent de calculer des valeurs précises de la BDE.

Le potentiel d'ionisation adiabatique (AIP) est défini comme étant l'énergie minimale nécessaire pour arracher un électron à partir d'une molécule isolée (ou atomes) dans son état fondamental pour former un ion en phase gazeuse (McNaught et Wilkinson, 1997). De nombreux auteurs ont corrélé les AIP d'un composé à son activité antioxydante (Cheng et al., 2003; Wright et al., 2001; Klein et al., 2006; Leopoldini et al., 2004). Les valeurs des AIP ont été calculées à partir de l'équation (II).

$$\text{AIP} = \Delta H_f(\text{ArOH}^{\bullet+}) - \Delta H_f(\text{ArOH}) \quad (\text{II})$$

Dans l'équation II:

✓  $\Delta H_f(\text{ArOH})$  enthalpie de formation du composé phénolique (ArOH),

✓  $\Delta H_f(\text{ArOH}^{\bullet+})$  l'enthalpy de formation du radical cationique correspondant ( $\text{ArOH}^{\bullet+}$ ).

## ***Résultats et Discussion***

## IV. Résultats et Discussion

### IV.1. Caractérisation des principaux composés isolés des sarments de *Ficus carica*

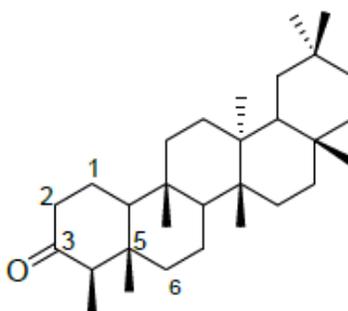
A partir des sarments de *Ficus carica*, nous avons isolé quatre molécules, dont la structure chimique a été déterminée en utilisant la RMN du proton et par comparaison des données de celle-ci avec celle de la littérature.

#### **P1 : Friedelin**

Sur le spectre de RMN du proton du composé P1 (Friedelin) dans le chloroforme deutéré  $CDCl_3$  (300 MHz), on observe 7 signaux entre 0.73 et 1.25 ppm sous forme de singulets correspondant aux méthyles angulaires d'un triterpène pentacyclique et 8 pics dont un doublet à  $\delta(H)$  0.88 correspondant au méthyle 23. On observe également les 2 protons H-2 déblindés aux positions  $\delta$  (2.37, 2.25 (m)) et le proton H-4 à  $\delta$  (2.30) (m), à cause de la fonction cétone en position 3. Le pic à 7ppm correspond au  $CDCl_3$  chloroforme (solvant RMN).

Ces données ont été comparées à ceux de la littérature confirmant que le produit P1 (poudre blanche) correspond bien à la friedelin (figure IV.1), un triterpène pentacyclique déjà connu dans les plantes du genre *Ficus* (Lansky et Helena, 2011; Mahato et Kundu, 1994).

La friedelin a été isolée à partir d'extraits de feuilles de *Ficus benghalensis* et a été identifiée au moyen de la chromatographie par comparaison directe avec le standard pur (Chatterjee et Chakraborty, 1968), elle a également été identifiée par IR, RMN 1H, RMN 13C et MS dans les feuilles de *Ficus benjamina* (Parveen et al., 2009).



**Figure IV.1:** Structure de la friedelin.

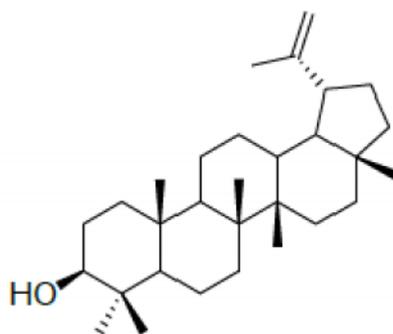
Formule brute:  $C_{30}H_{50}O$

Poids moléculaire: 426.72 g/mol.

## **P2: Lupéol**

Le spectre de RMN du proton du composé P2 (lupéol) dans le chloroforme deutéré montre sept singulets qui correspondent aux méthyles angulaires d'un triterpène pentacyclique. On observe aussi sur ce spectre, des signaux à  $\delta(H)$  4.65 (1H, singulet large), 4.55 (1H, singulet large), 3.17 (1H, m) correspondant aux déplacements chimiques des protons du méthylène terminal 29 et de l'oxyméthine en position 3 des composés de la classe de lup-20(29)-en-3-ol. Ces données comparées à celles publiées ont permis d'élucider la structure de ce composé comme étant le lupéol (Devang et Indermeet, 2011), la figure (IV.2) illustre la structure de ce composé.

Le lupéol est un triterpénoïde dérivé du lupane également connu sous le nom de fagarsterol présent dans une grande variété de plantes telles que le manguier et l'*Acacia visco*. C'est un composé pharmacologiquement actif qui possède diverses vertus médicinales, notamment anti-inflammatoires (Saleem, 2009), mais aussi anti-protazoaires, antimicrobiennes, antitumorales, et chimiothérapeutiques (Prasad et al., 2008); il agit efficacement dans les modèles de laboratoire comme inhibiteur du cancer de la prostate et du cancer de la peau (Prasad et al., 2008 ; Nigam et al., 2007 ; Saleem et al., 2004).



**Figure IV.2:** Structure du lupéol.

Le lupéol, a été isolé des feuilles et des sarments de *Ficus thunbergii* (Kitajima et al., 1994), du latex et de l'écorce de sarments de *Ficus glomerata* Roxb (Hai et al., 1991 ; Singhal et Saharia, 1980), du latex de *Ficus elastica* (van der Bie, 1946), du latex de *Ficus alba* (Ultee, 1922b) et a aussi été isolé et identifié sous forme d'acétate de lupéol dans les feuilles de *Ficus carica* (Saeed et Sabir, 2002).

Formule brute :  $C_{30}H_{50}O$

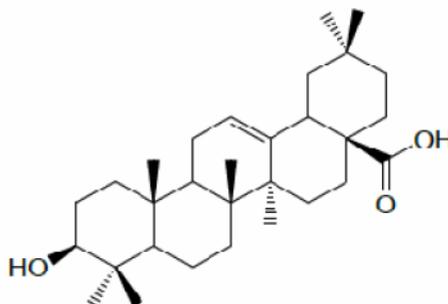
Poids moléculaire :  $426,7174 \pm 0,0278$  g/mol

Solubilité: insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'éther, le benzène, l'éther de pétrole et l'alcool chaud.

Point de fusion : 216 °C.

### **P3: Acide oléanolique**

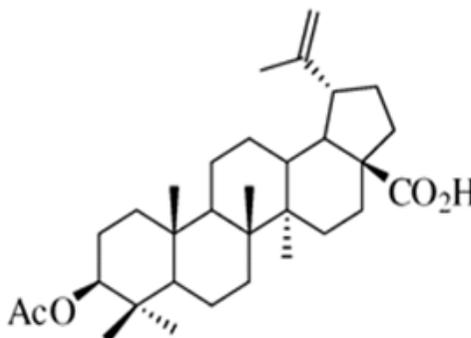
Ce composé a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de RMN <sup>1</sup>H montre 7 singulets attribuables aux méthyles angulaires des triterpènes pentacycliques de type olean-12-ène ;  $\delta$  0.73 (3H, *s*, Me-26), 0.75 (3H, *s*, Me-24), 0.88 (3H, *s*, Me-29), 0.89 (3H, *s*, Me-25), 0.96 (3H, *s*, Me-30), 1.15 (3H, *s*, Me-23), 1.25 (3H, *s*, Me-27). On observe aussi sur ce spectre un signal à  $\delta$  (H) 5.25 (1H, *t*,  $J=1\text{HZ}$ ), attribuable au proton  $\Delta_{12}$  des triterpènes pentacycliques, un signal à 3.2 (1H, *dd*) correspondant au proton de l'oxyméthine en position C(3) et un doublet dédoublé à 2.8 ppm (1H, *dd*) qui est celui du proton H-18.



**Figure IV.3:** Structure de l'acide oléanolique.

L'ensemble de ces données comparées à celles de la littérature (Abdul Majid et al., 2011) ont conduit à l'identification de P3 comme étant l'acide oléanolique. Ce dernier a été identifié dans le genre *Ficus*, plus précisément dans les feuilles de *Ficus hispida* (Khan et al., 1990) et dans les feuilles de *Ficus benjamina* (Farag, 2005).

### **P4: Acide 3-acétyl bétulinique**



**Figure IV.4:** Structure de l'acide 3-acétyl bétulinique.

Ce composé a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de RMN 1H montre les signaux suivants : 0,7 ppm (m) H5 ; 0,85 ppm (s) 9H 3 CH3 (26, 25 et 27) ; 0,9 ppm (s) CH3 (C24) ; 0,95ppm, (s) CH3 (C23) ; 1,0 ppm 2H, H11 beta et H12 alpha (m) ; 1,2 ppm (m) H15 alpha; 1,25 ppm (m) H6 beta et H7 beta ; 1,4 ppm (m) H11 alpha; 1,48 ppm (m) H 7 alpha ; 1,6 (m) H 21 alpha; 1,62 (m) H16 alpha; 1,65 (m) H22 alpha; 1,66 H1 beta (d, large) ; 1,65 H,18 (dd) ; 1,69 ppm (s) H30 (CH3) ; 2,05 (s) CH3 du CH3-C0 de la position C3; 2,25 (ddd) H2; 2,95 ppm (m) H19; 4,45 ppm (dd) C3 H; 4,59 ppm (s) H éthylénique (H29alpha ) et 4,75 ppm (s) H éthylénique (H29beta).

Ces résultats ont été comparés à ceux publiés par Abdul Majid Ayatollahi et al. et ont permis d'identifier le composé P4 comme étant l'acide 3-acétyl bétulinique. L'acide bétulinique a précédemment été isolé à partir des feuilles et des sarments de *Ficus thunbergii* (Kitajima et al., 1994) et sa structure été déterminée par des méthodes spectrales.

## ***IV.2. Dosage des polyphénols dans différentes parties de *Ficus carica****

### ***IV.2. 1. Données chromatographiques des standards***

Les figures (IV.5) à (IV.10) représentent les spectres UV et les courbes étalons des différents composés à doser dans les sarments et les feuilles de *Ficus carica* et les tableaux (IV.1) à (IV.3) montrent les données pour construire les courbes d'étalonnage.

#### **❖ Courbes étalons, temps de rétention et maximum d'absorption:**

#### **Psoralène**

**Tableau IV.1:** Données HPLC analytique pour le Psoralène.

µg injectés	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,10	186	187,5	187,8	187,1	1,1
0,5	1178	1179	1179,7	1178,9	0,9
1	2122.2	2122.7	2121.1	2122	0,9
2.5	6041.9	6042	6042.1	6042	0,1
5	11685,9	11686.2	11686.8	11686,3	0,5

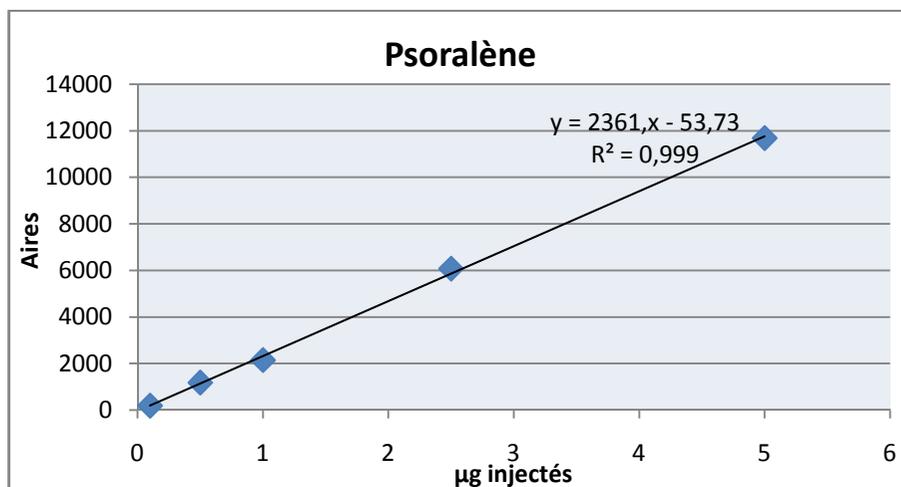


Figure IV.5: Courbe étalon du Psoralène.

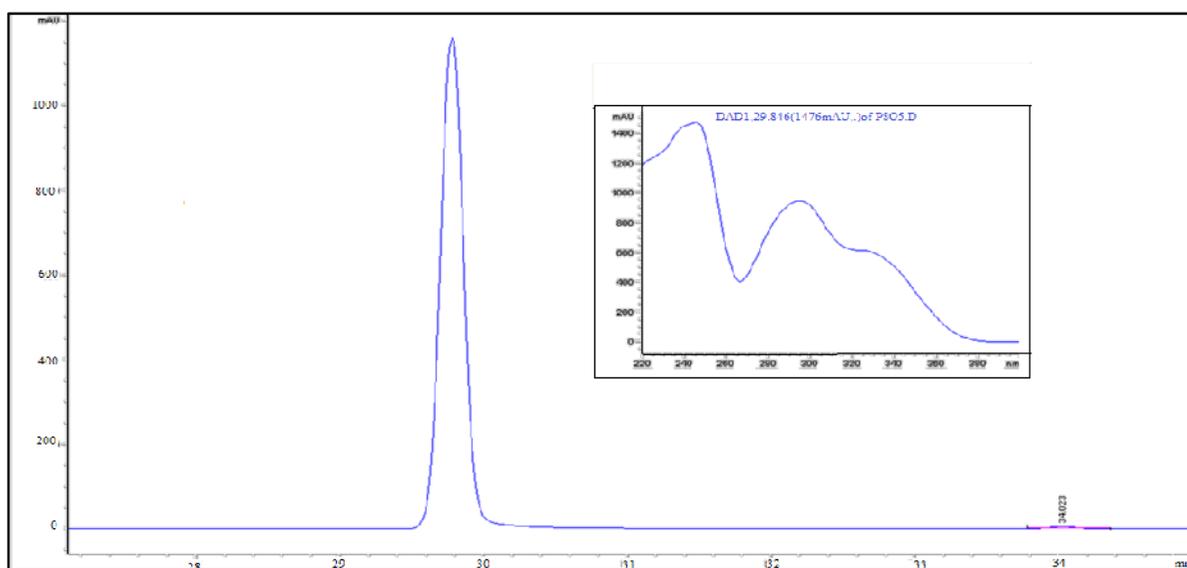


Figure IV.6: Temps de rétention et profil UV du psoralène;  
 $Tr = 29,84 \text{ min}$ ,  $\lambda_1 \text{ max} = 245 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 \text{ max} = 295 \text{ nm}$ .

### Bergaptène

Tableau IV.2: Données HPLC analytique pour le bergaptène.

µg injectés	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,1	146,3	146,5	146,1	146,3	0,2
0,5	1530,1	1530,5	1529,4	1530	0,6
1	2582,8	2582,4	2583,5	2582,9	0,6
2,5	7632,4	7631,9	7631,7	7632	0,4
5	15330,6	15332	15330,4	15331	1,0

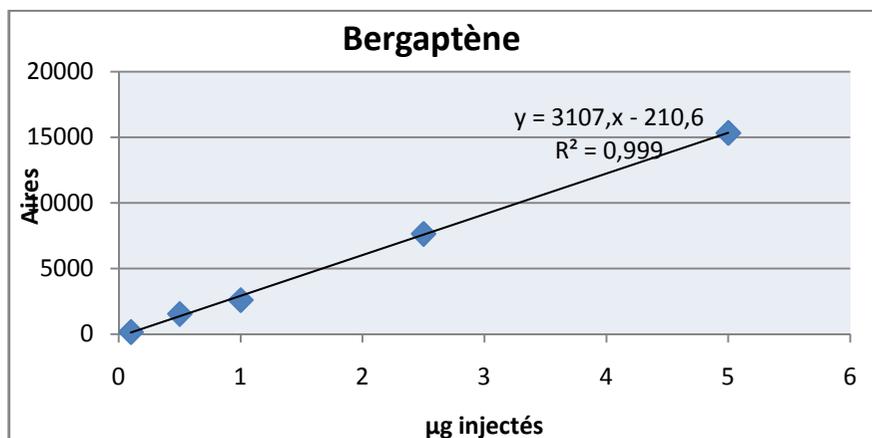


Figure IV.7: Courbe étalon du bergaptène.

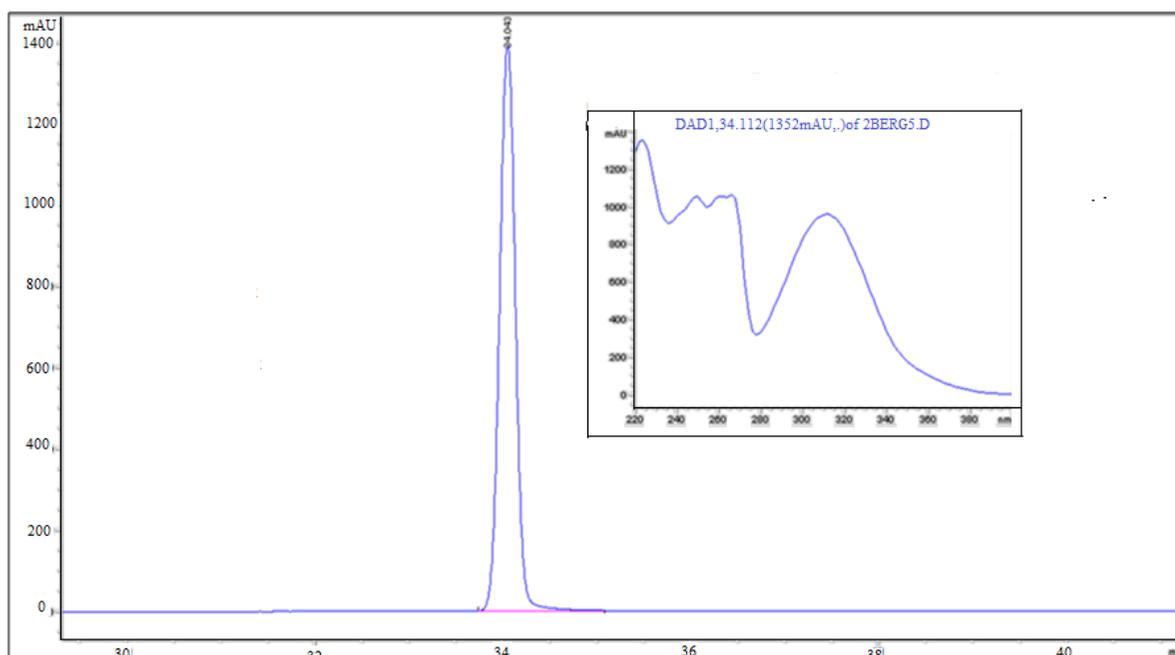
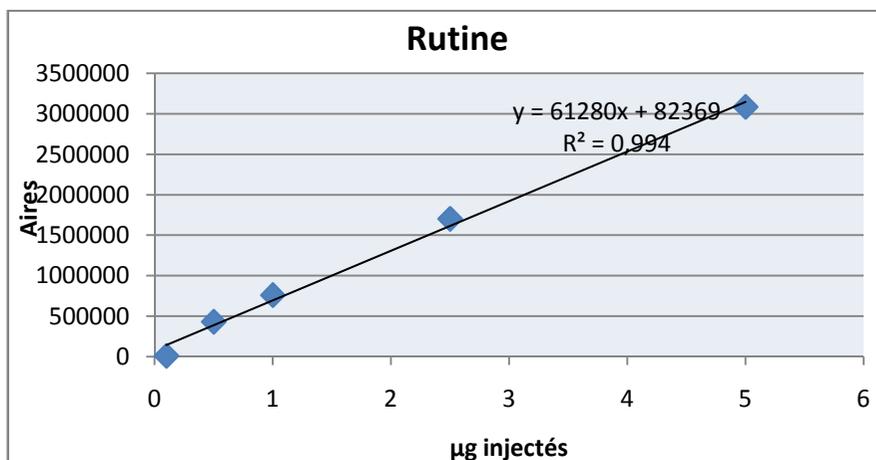


Figure IV.8: Temps de rétention et profil UV du bergaptène;  
 $Tr = 34,11 \text{ min}$ ,  $\lambda_1 \text{ max} = 254 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 \text{ max} = 310 \text{ nm}$ .

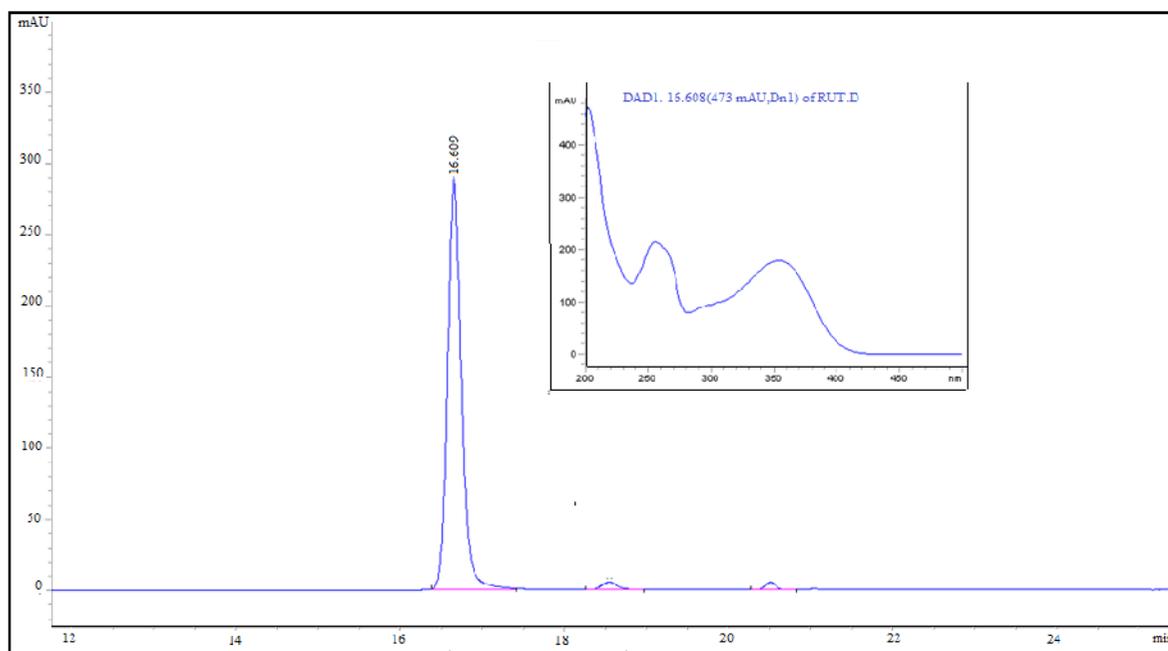
### Rutine

Tableau IV.3: Données HPLC analytique pour la rutine.

µg injectés	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,1	8375.2	8375.5	8374.3	8375	0,7
0,5	429687	429688	429689	429688	1,0
1	759397	759398	759396	759397	1,0
2,5	1703120,3	1703120,7	1703119	1703120	1,0
5	3087798	3087802	30877800	3087800	2,0



**Figure IV.9:** Courbe étalon de la rutine.



**Figure IV.10:** Temps de rétention et profil UV de la rutine  
 $T_r = 16,61 \text{ min}$ ,  $\lambda_1 \text{ max} = 255 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 \text{ max} = 355 \text{ nm}$ .

De la même manière Les figures (IV.11) à (IV.14) représentent les spectres UV et les courbes étalons des composés à doser dans les peaux et les pulpes de fruits de *Ficus carica* et les tableaux (IV.4) et (IV.5) montrent les données pour construire les courbes d'étalonnage.

### Cyanidine 3-O-rutinoside ou keracyanine

Tableau IV.4: Données HPLC analytique de la keracyanine.

µg injectés	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,05	124,3	124	124,3	124,2	0,2
0,1	270,2	271,2	271	270,8	0,6
0,25	711,5	711,8	712,4	711,9	0,5
0,5	1471,5	1472,5	1472,3	1472,1	0,6
1	2874,9	2874	2875,5	2874,8	0,8

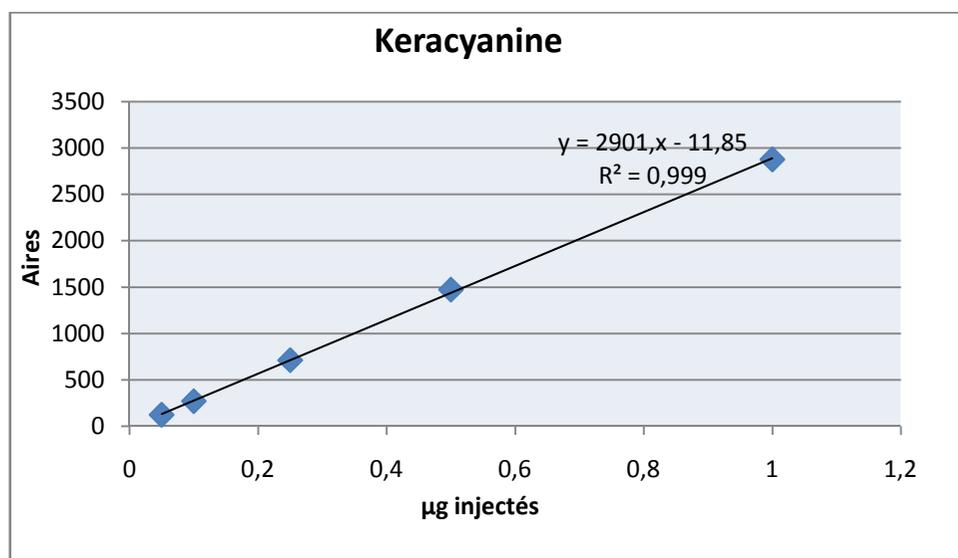


Figure IV.11: Courbe étalon de la keracyanine.

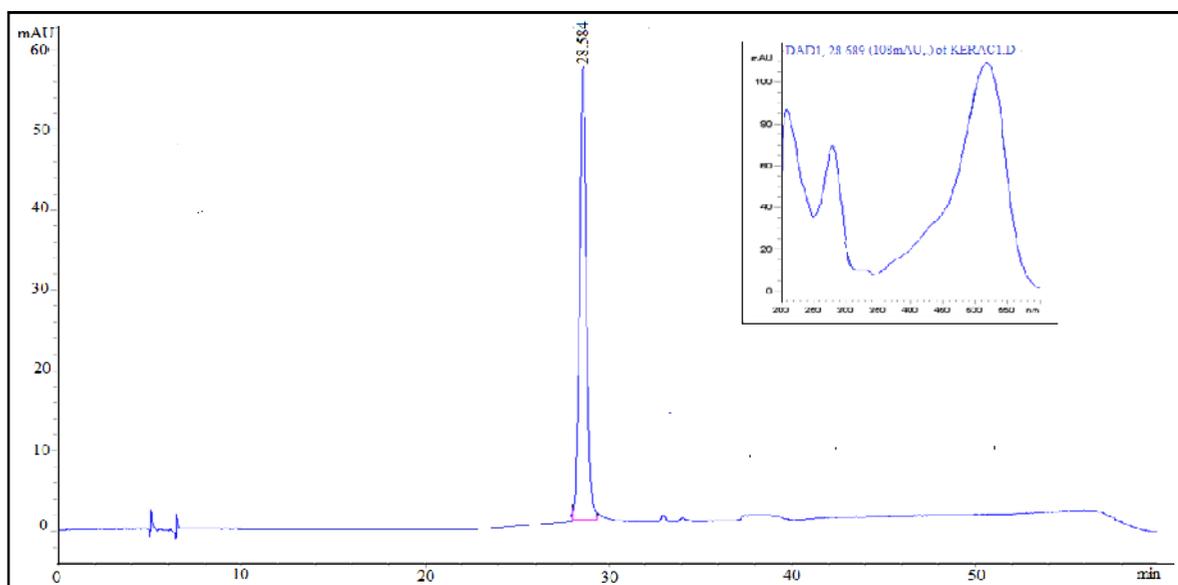


Figure IV.12: Temps de rétention et profil UV de la keracyanine;  
Tr= 28,69 min,  $\lambda$  max =518nm.

## Cyanidine 3-O-glucoside

Tableau IV.5: Données HPLC analytique pour la cyanidine 3-O-glucoside.

µg injectés	Aires			Moyenne	Écart type
	1	2	3		
0,05	97,7	97,5	98,2	97,8	0,4
0,1	158	157,9	157,2	157,7	0,5
0,25	559,7	560,8	560,4	560,3	0,5
0,5	1002,5	1003,1	1002,2	1002,6	0,5
1	2123	2122	2124	2123	1,0

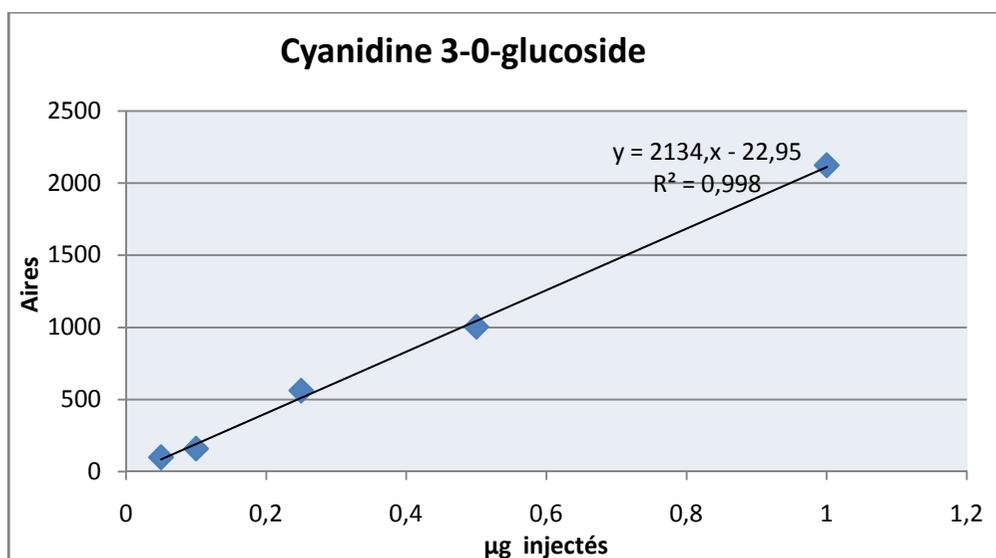


Figure IV.13: Courbe étalon de la cyanidine 3-O-glucoside.

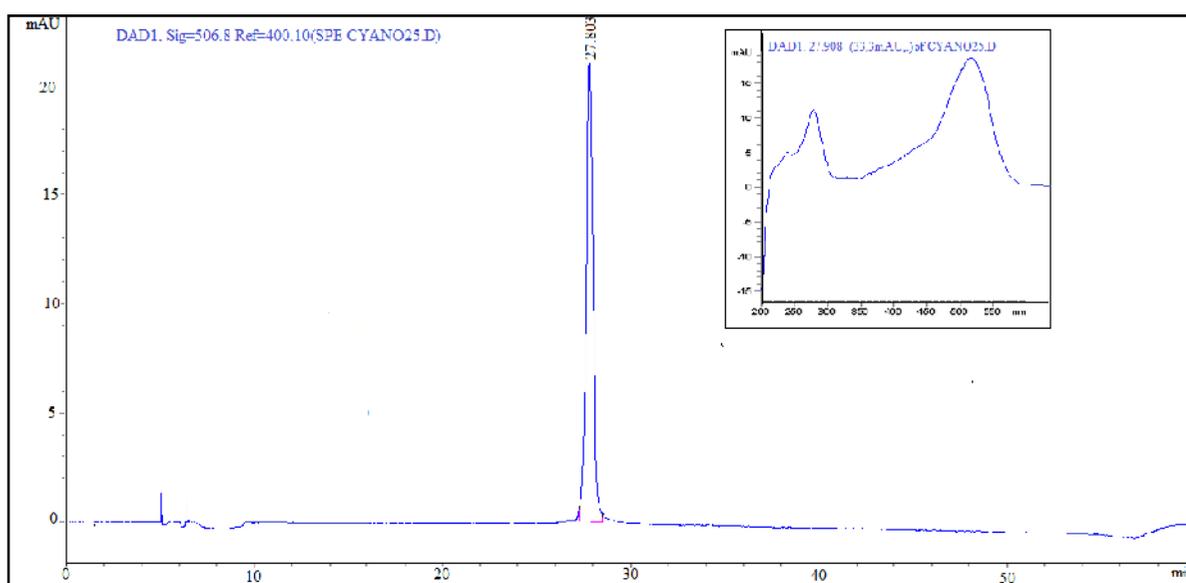


Figure IV.14: Temps de rétention et profil UV de la cyanidine 3-O-glucoside;  
 $T_r = 27,80\text{min}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 516\text{nm}$ .

## ***IV.2.2. Concentrations des polyphénols dans différentes parties de Ficus carica L.***

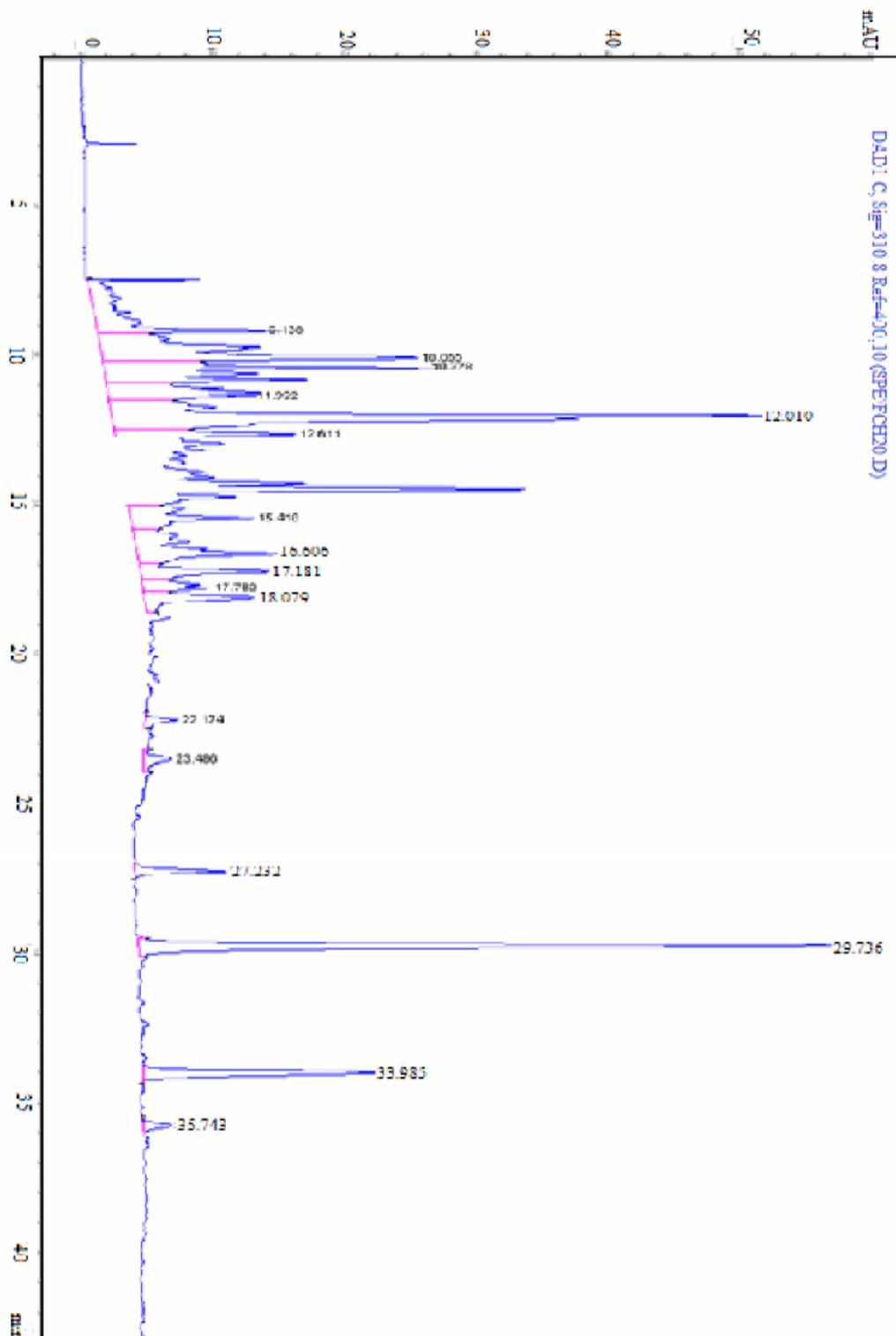
### ***IV.2.2.1. Validation de la méthode analytique***

Les différentes molécules ont été dosées par la méthode du standard externe. La gamme de concentration de travail était de 0,01 à 0,5 mg/ml pour les composés: psoralène, bergaptène et rutine et de 0,005 à 0,1 mg/ml pour les composés: keracyanine et cyanidine 3-O-glucoside. Les courbes d'étalonnage ont été calculées en représentant les aires des pics (Y) par rapport à la concentration (X, µg injectés) pour cinq concentrations différentes, chaque point étant la valeur moyenne de trois mesures de surface indépendantes.

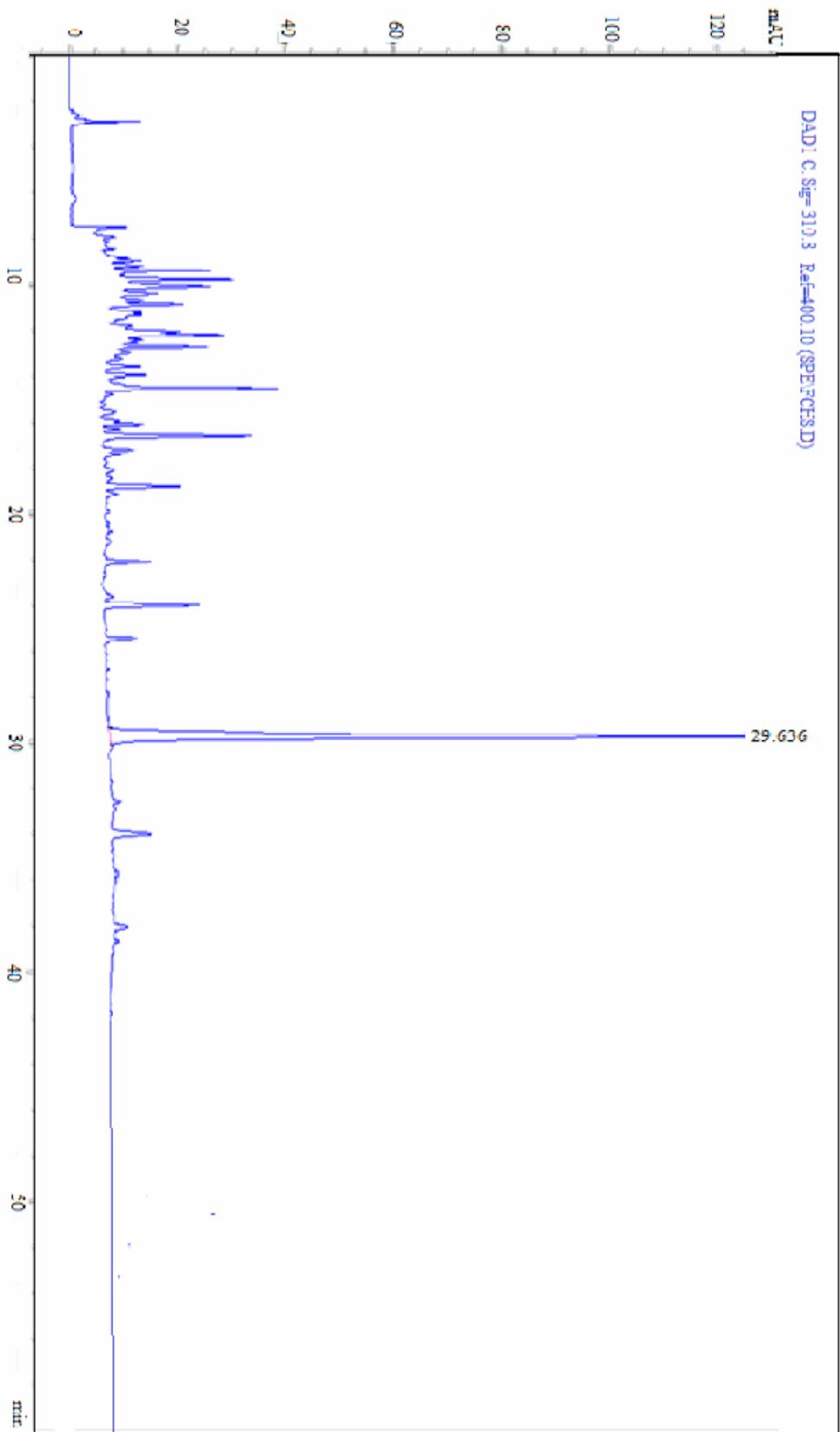
Comme nous l'avons vu dans la section précédente, les courbes d'étalonnage étaient linéaires et un facteur de régression, ( $R^2 > 0,99$ ) a été obtenu pour toutes les solutions des composés standards. Le dosage des polyphénols a été réalisé par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur à barrettes de photodiodes et l'identification a été faite par chromatographie couplée à un détecteur à barrettes de diode et à un spectromètre de masse. La ligne de base pour tous les échantillons était linéaire et la séparation et la résolution des pics qui nous intéressaient étaient excellentes. Les capacités de récupération de la méthode ont été évaluées quatre fois par dopage d'extraits avec trois concentrations différentes de standards purs (0,5, 0,7 et 1,0 mg). La récupération moyenne était supérieure à 98% pour les cinq molécules.

Dans les conditions expérimentales citées, la méthode proposée a été validée par la linéarité, la précision, la récupération, la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ). Les limites de détection (LOD,  $S / N = 3$ ) et de quantification (LOQ,  $S / N = 10$ ) étaient de 1 µg / ml et 3 µg / ml respectivement.

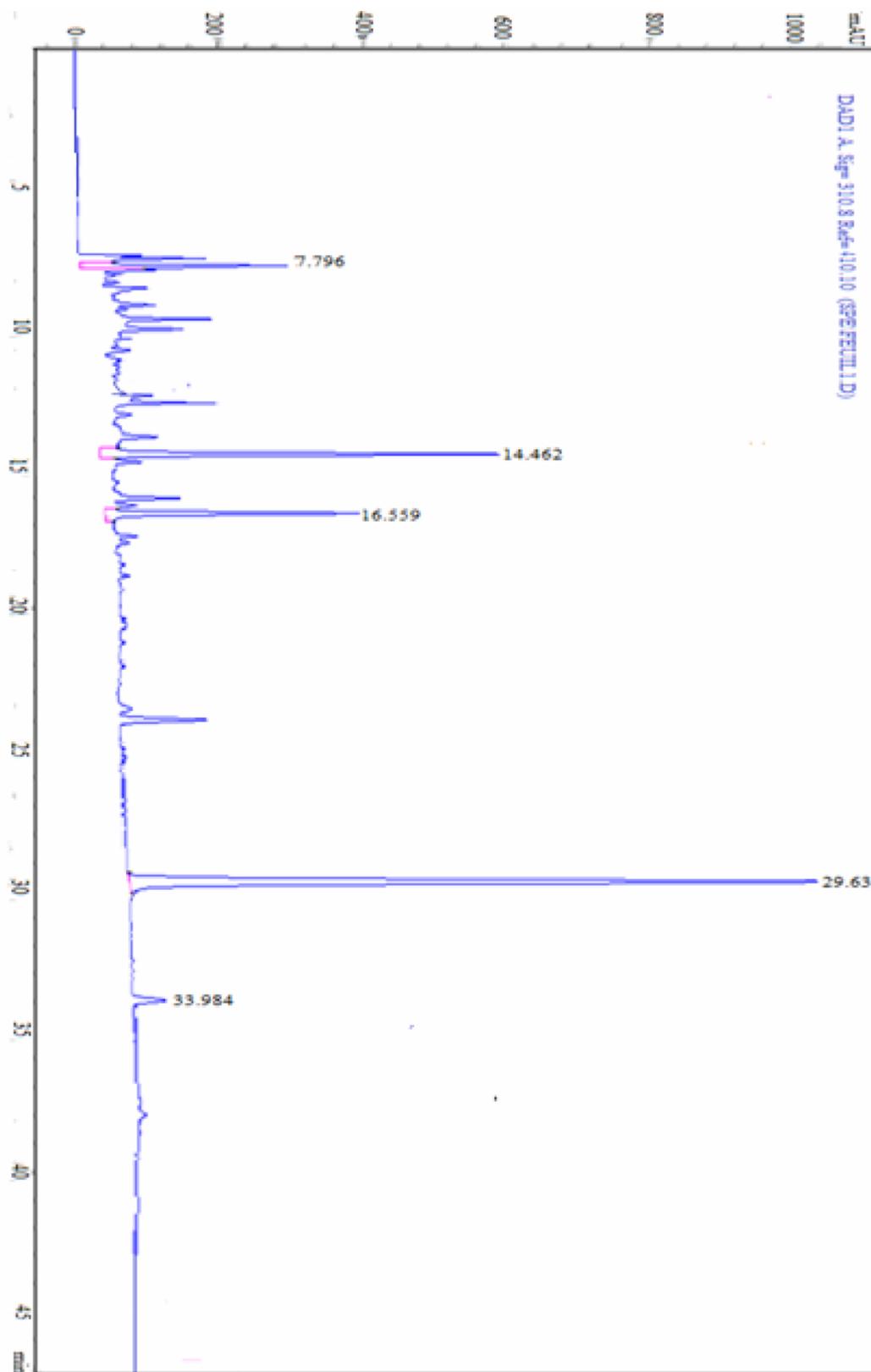
Nous représentons dans la figure (IV.15) le chromatogramme HPLC de l'écorce des sarments du figuier donnant les figes de la variété Blanquette, dans la figure (IV.16) le chromatogramme HPLC de la partie bois des sarments de la même variété et dans la figure (IV.17) le chromatogramme HPLC des feuilles de la même variété, alors que les chromatogrammes des autres variétés obtenus suite à l'analyse par HPLC-DAD (GESVAB, France) et HPLC Shimadzu (LCA, Guelma) seront présentés en annexe B.



**Figure IV.15:** Chromatogramme HPLC de l'écorce des sarments de *Ficus carica*, variété Blanquette: Tr= 16,60 min pour rutine; Tr= 29,73 min pour psoralène et Tr= 33,98 min pour bergaptène.



**Figure IV.16:** Chromatogramme HPLC de la partie bois des sarments de *Ficus carica*, variété Blanquette.



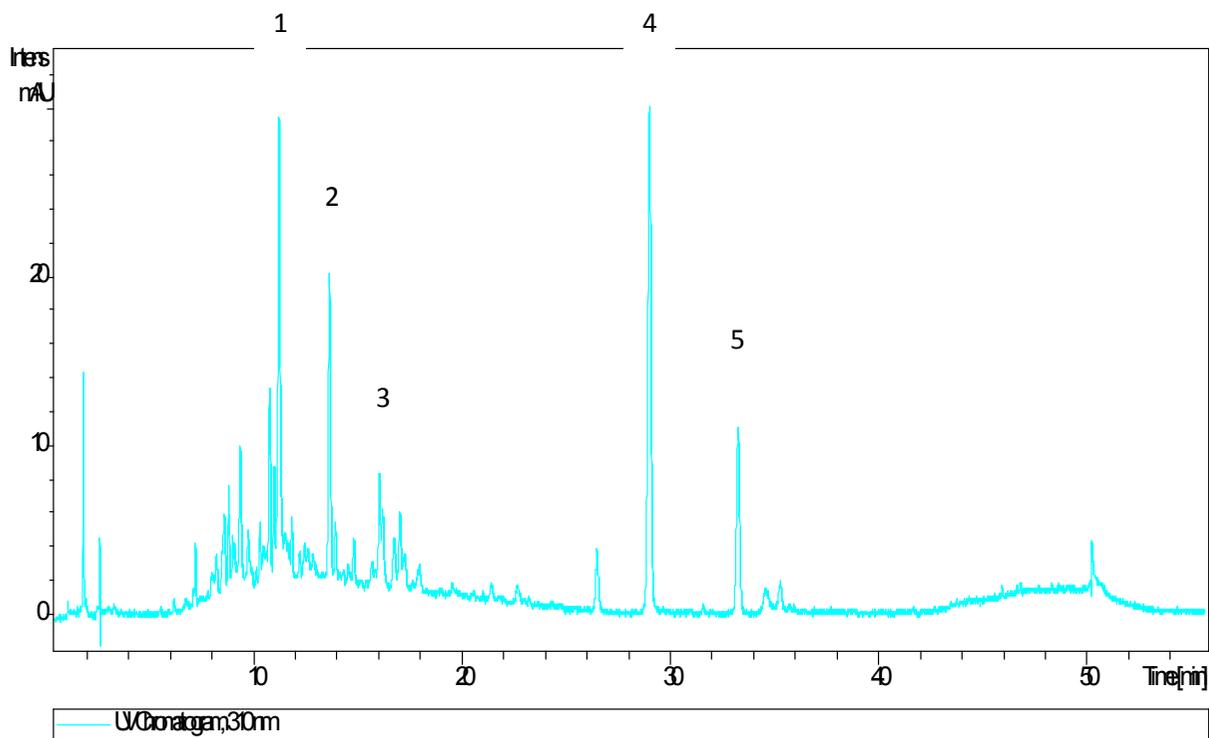
**Figure IV.17:** Chromatogramme HPLC des feuilles de *Ficus carica*, variété Blanquette: Tr= 16,559 min pour rutine; Tr= 29,63 min pour psoralène et Tr= 33,98 min pour bergaptène.

#### **IV.2.2.2. Identification des furanocoumarines et de la rutine par RP-HPLC-MS dans les sarments et les feuilles de *Ficus carica*.**

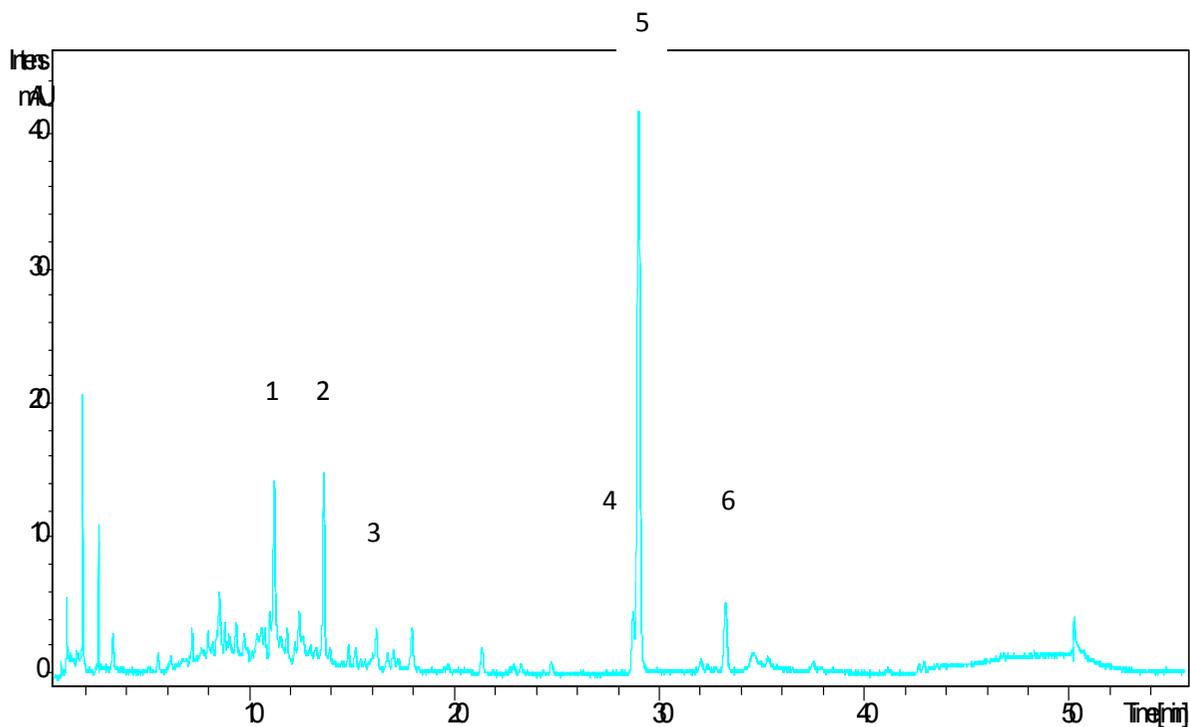
L'identification des furanocoumarines a été réalisée par HPLC-DAD-MS. Ces analyses ont été effectuées sur un appareil du type Agilent série 1200 couplé à un spectromètre de masse. Les trois principaux composés identifiés dans les sarments des échantillons analysés sont la rutine, le psoralène et le bergaptène (Figures IV.18 et IV.19).

Nous avons recherché la xanthotoxine, l'isopimpinelline et l'acide férulique dans les sarments et feuilles de différentes variétés de *Ficus carica*, aucune de ces molécules n'a pu être détectée dans ces échantillons.

Les deux furanocoumarines, psoralène et bergaptène et la rutine ont été identifiés en comparant leurs temps de rétention relatifs à l'état pur à ceux des échantillons. Les spectres UV des composés purs ont aussi été comparés à ceux des pics correspondant à ces composés dans l'échantillon à analyser (Figure IV.20). La spectrométrie de masse a confirmé la présence de ces molécules dans les échantillons avec des ions moléculaires à  $m/z$   $[M+H]^+$  187, 217 et 611 correspondant au psoralène, bergaptène et rutine respectivement. Les spectres de masse correspondant aux standards, psoralène et bergaptène sont donnés dans la figure (IV.21).

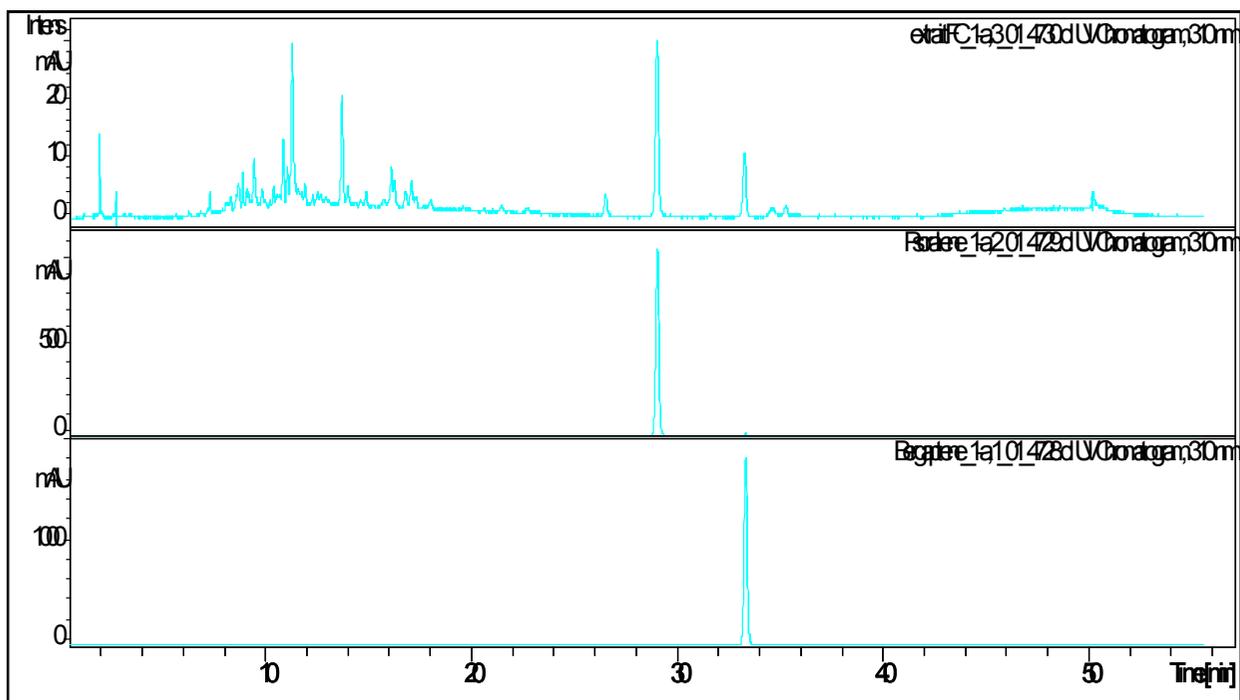


**Figure IV.18:** Chromatogramme HPLC-UV à 310nm de l'écorce des sarments de *Ficus carica* variété Blanquette; 1: Inconnu, 2: Inconnu, 3: Rutine, 4: Psoralène, 5: Bergaptène.

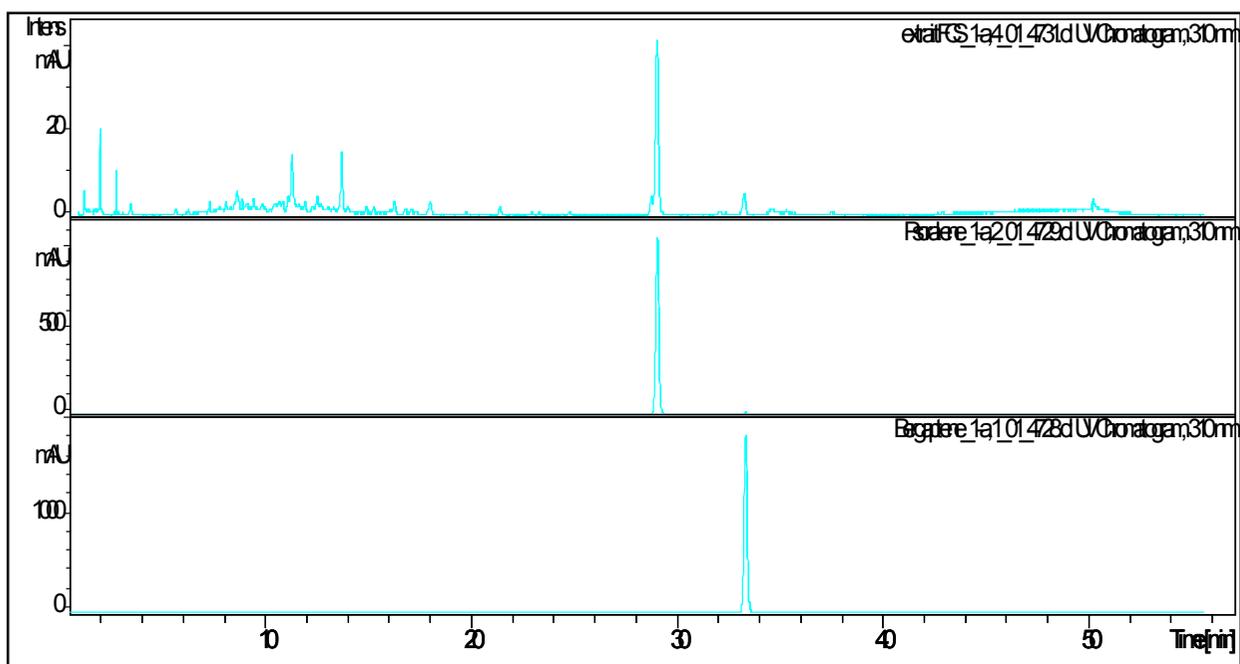


**Figure IV.19:** Chromatogramme HPLC-UV à 310nm de la partie bois des sarments de *Ficus carica* variété Blanquette; 1: Inconnu, 2: Inconnu, 3: Rutine, 4: Inconnu, 5: Psoralène, 6: Bergaptène.

(a)

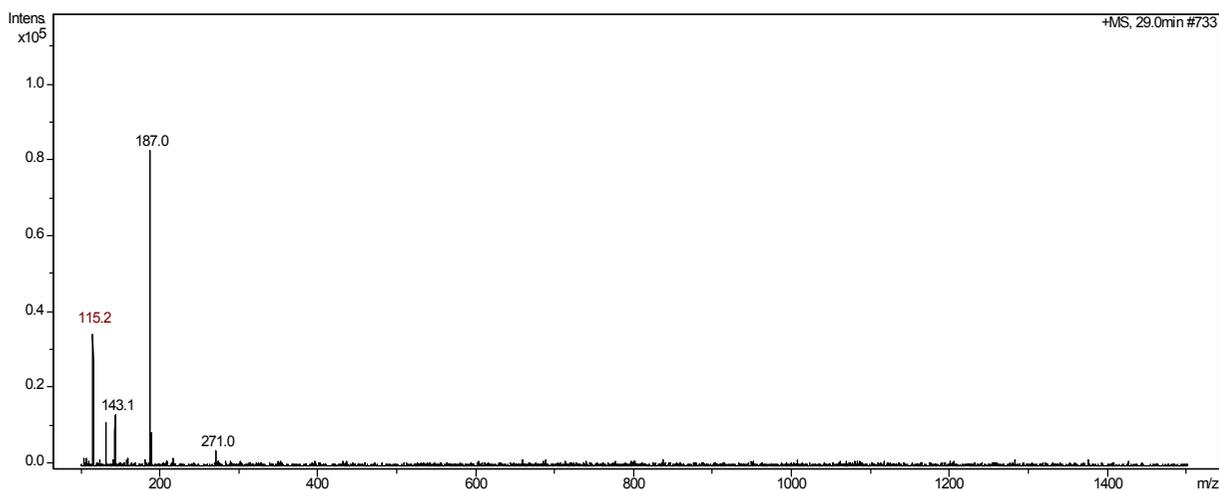


(b)

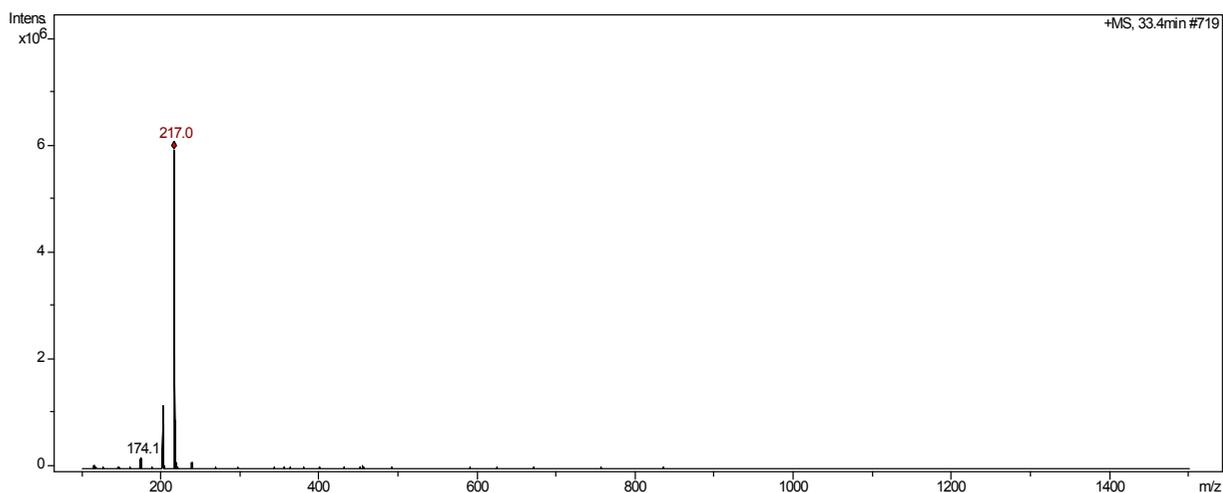


**Figure IV.20:** Superposition des chromatogrammes de standards purs et d'extraits de sarments de la variété Blanquette (HPLC-DAD-MS).  
(a) écorce et (b) partie bois.

(a)



(b)



**Figure IV.21:** Spectres de masse en mode positif obtenus par HPLC- MS:(a) pic du psoralène et (b) pic du bergaptène.

Le spectre de masse du psoralène montre un pic à  $m/z+1=187$  compatible avec la masse du psoralène de formule  $C_{11}H_6O_3$ . Le pic à  $m/z+1=143$  correspond à la perte du noyau furane, le pic à  $m/z+1=115,2$  correspond à la perte de  $CH_2CH_2$  du cycle chromène.

Le spectre de masse du bergaptène montre un pic à  $m/z+1=217$  compatible avec la masse du bergaptène de  $C_{12}H_8O_4$ . Le pic à  $m/z+1=174,1$  correspond à la perte du fragment  $C-OCH_3$ .

Les résultats des analyses HPLC-DAD-MS (temps de rétention, ion moléculaire) sont présentés dans le Tableau (IV.6).

**Tableau IV.6:** Temps de rétention ( $T_R$ ), données de spectrométrie de masse et l'identification des coumarines dans : (a) écorce de sarment; (b) partie bois.

(a)

Pic	Nom du produit	$T_R$	$[M+H]^+$	MM
1		11.3 min	441.0	440
2		13.7 min	389.0	388
3	Rutine	16.0 min	611.2	610
4	Psoralène	29.0 min	187.0	186
5	Bergaptène	33.3 min	217.0	216

(b)

Pic	Nom du produit	$T_R$	$[M+H]^+$	MM
1		11.3 min	441.0	440
2		13.7 min	389.0	388
3	Rutine	16.0 min	611.2	610
4		28.7 min	273.1	272
5	Psoralène	29.0 min	187.0	186
6	Bergaptène	33.3 min	217.0	216

#### IV.2.2.3. *Distribution des polyphénols dans les sarments et feuilles de Ficus carica*

Les concentrations des composés dans les divers échantillons de sarments étudiés (tableau IV.7) sont calculées à partir des aires des pics des chromatogrammes de l'HPLC analytique.

D'après les figures obtenues par HPLC-DAD et par HPLC-DAD-MS, le psoralène était le composant majoritaire dans les deux parties de sarments et dans les feuilles de toutes les variétés de figuiers étudiées. En ce qui concerne le contenu et la distribution des furanocoumarines, des différences significatives dans le contenu en psoralène et en bergaptène entre le bois, l'écorce et les feuilles de la même variété d'une part, et de l'autre part, entre les différentes variétés étudiées ont été constatées.

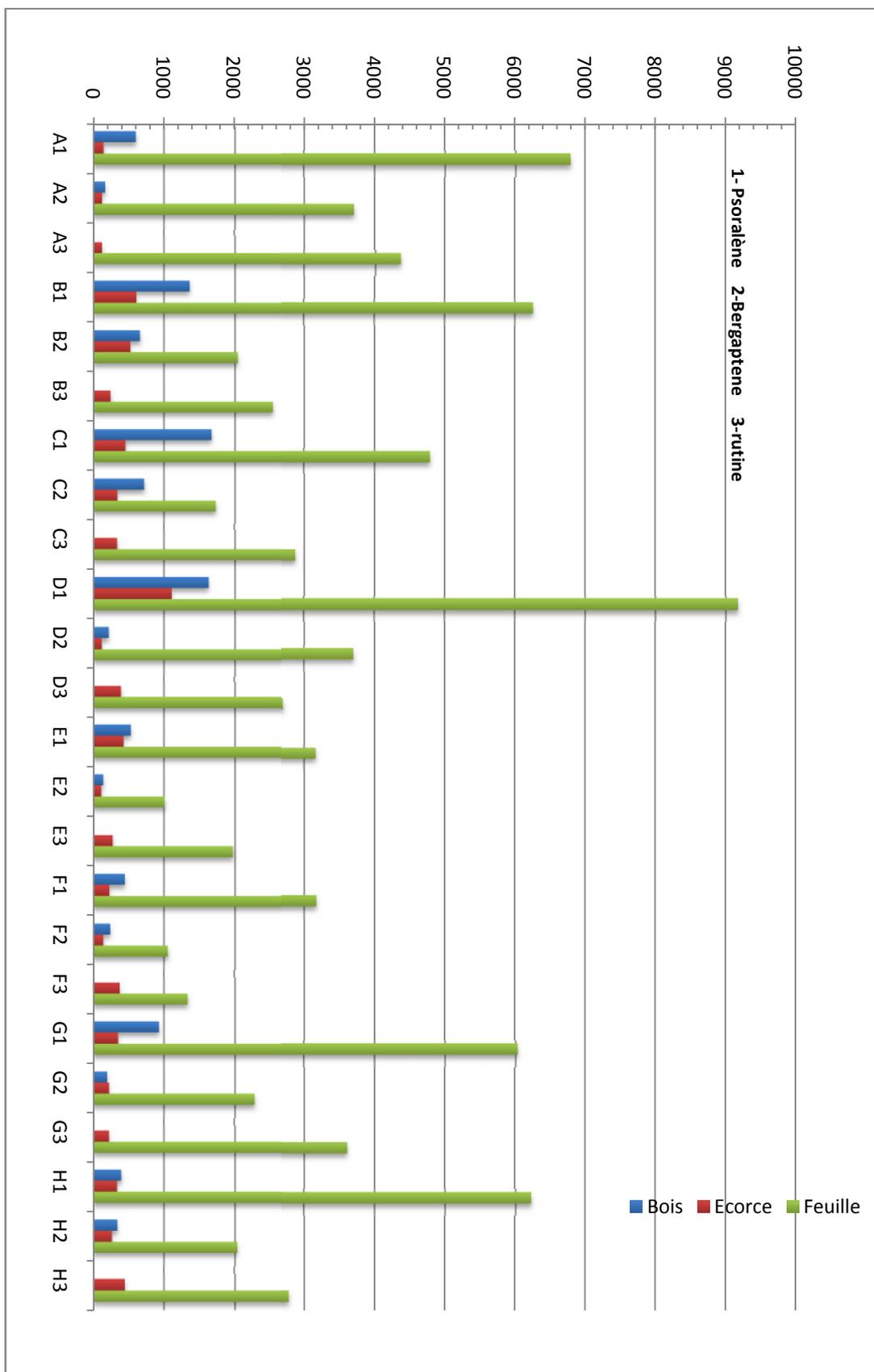
Le tableau (IV.7) montre les concentrations individuelles du psoralène, du bergaptène et de la rutine ( $\mu\text{g}$  de composé/ g de poids sec de sarment, DW<sup>b</sup>) trouvées dans les trois parties de chaque variété. <sup>b</sup>DW: de l'Anglais Dried Weight, la masse est reportée à la matière sèche de

l'échantillon. La figure (IV.22) montre que le psoralène était le composé prédominant dans les trois parties de *Ficus carica* L. et variait (en ug / g, DW) de 146,65 à 1110,28 dans l'écorce de sarment, de 395,68 à 1671,80 dans la partie bois et de 3161,08 à 9171,33 dans les feuilles. La concentration du bergaptène variait (en ug / g DW) de 144,21 à 718,60 dans la partie bois, de 114,32 à 524 dans l'écorce de sarment et de 1009,47 à 3694,64 dans les feuilles. La rutine n'a pas été quantifiée dans la partie bois de toutes les variétés (très petites quantités) et sa concentration variait (en ug / g DW) de 127,9 à 448,39 dans l'écorce de sarment et de 1331,90 à 4358,01 dans les feuilles.

En ce qui concerne la répartition des trois molécules entre les deux parties de sarment, les concentrations des deux furanocoumarines psoralène et bergaptène étaient plus élevées dans la partie bois des sarments que dans l'écorce dans tous les échantillons, à l'exception de bergaptène dans l'échantillon G (Figure IV.22). Dans cette étude, les quantités de psoralène et de bergaptène déterminées dans les sarments des différentes variétés de *Ficus carica* sont très inférieures à celles déterminées dans les feuilles, mais sont plus élevées que celles détectées dans les fruits par Oliveira et al. (2009). Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus récemment par Conforti et al. (2012) et confirment que l'allocation des furanocoumarines dans la figue suit l'ordre : feuilles > bois de sarment > écorce de sarment > pulpe de fruits > écorces de fruits (Tableau IV.8).

D'une façon générale, la localisation préférentielle des furocoumarines dans les plantes se fait sur la surface des organes qui sont les plus vulnérables à la prédation. Cette localisation préférentielle au niveau des organes reproducteurs et les parties exposées à la prédation a été montrée chez certaines plantes comme le panais (*Pastinaca sativa*) et la rue officinale (*Ruta graveolens*) (Brown 1970 ; Milesi et al. 2001).

Le fait que la plus forte concentration en psoralène et en bergaptène se trouve dans les feuilles laisse à penser que ces dernières peuvent servir d'organe principal pour l'accumulation de furanocoumarines. Cela peut s'expliquer par le fait que les feuilles protègent les fruits contre les rayons UV et ils ont un rôle important dans le processus de la photosynthèse.



**Figure IV.22:** Comparaison entre concentrations de psoralène, bergaptène et rutine dans les trois parties des variétés de sarments de figiers étudiées (A-H).

**Tableau IV.7:** Concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , DW) des polyphénols dans 8 variétés Algériennes de *Ficus carica*.

Composés	Variétés noires				
	A	B	C	D	
P	Bois	600.99 ± 1.04	1363.28 ± 5.39	1671.80 ± 3.20	1628.36 ± 11.82
	Ecorce	146.65 ± 1.16	610.88 ± 3.02	455.21 ± 1.24	1110.28 ± 9.85
	Feuille	6771.30 ± 39,6	6258.87 ± 48,3	4786.72 ± 68,91	9171.33 ± 27,40
B	Bois	168.95 ± 3.02	660.66 ± 3.85	718.60 ± 2.38	219.18 ± 2.33
	Ecorce	127.07 ± 1.72	524.00 ± 2.62	340.48 ± 1.47	120.75 ± 3.99
	Feuille	3688.40 ± 36,21	2042.42 ± 58,43	1727.99 ± 73,21	3694.64 ± 29,82
R	Bois	nq	nq	nq	nq
	Ecorce	127.29 ± 1,03	246.22 ± 1,22	337.43 ± 1,12	392.95 ± 2.21
	Feuille	4358.01 ± 79,30	2538.16 ± 118,35	2873.30 ± 68,8	2695.98 ± 41,2
Variétés claires					
Composés	E	F	G	H	
P	Bois	531.36 ± 0.31	448.75 ± 1.16	930.83 ± 0.92	395.68 ± 0.01
	Ecorce	430.04 ± 0.22	229.82 ± 0.21	352.99 ± 1.09	336.58 ± 0.03
	Feuille	3161.08 ± 36,40	3172.70 ± 25,3	6026.78 ± 78,70	6216.40 ± 29,30
B	Bois	144.21 ± 0.34	243.60 ± 0.58	199.03 ± 0.44	342.59 ± 1.65
	Ecorce	114.31 ± 0.17	144.19 ± 0.59	224.58 ± 0.70	265.49 ± 1.98
	Feuille	1009.47 ± 12,3	1053.36 ± 21,20	2275.89 ± 52,30	2034.58 ± 26,35
R	Bois	nq	nq	nq	nq
	Ecorce	276.48 ± 2,14	376.81 ± 3,20	225.19 ± 1,23	448.39 ± 2,18
	Feuille	1970.95 ± 17,54	1331.90 ± 4,20	3595.55 ± 11,8	2778.96 ± 17,42

P : Psoralène, B : Bergaptène, R : Rutine

**Tableau IV.8:** Teneurs de psoralène et de bergaptène dans différentes parties de *Ficus carica* L.

	Ecorce de sarment ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) (étude en cours)	Partie bois ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) (étude en cours)	Feuilles ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) (Andreia P. Oliveira et al.)	Feuilles ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) (étude en cours)	Pelure de fruit ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) Andreia P. Oliveira et al.)	Pulpe de fruit ( $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) Andreia P. Oliveira et al.)
P	395.68- 1671.80	1146.65-11110.28	3774.7-9359.7	3161,08 - 9171,33	2.6-18.4	3.7 - 17.0
B	114.32 - 524	144.21- 718.60	1336.7-4627.2	1009,47 - 3694,64	0.0-26.8	0.0 - 45.8

Le fait que les concentrations du psoralène et de bergaptène soient plus élevées dans la partie bois que l'écorce des sarments peut être aussi due à l'oxydation partielle de ces molécules (due à la lumière UV et de l'oxygène à laquelle la partie externe de la tige est exposée). En outre, certains auteurs ont mis en évidence l'interconversion enzymatique entre les deux molécules psoralène et bergaptène (Aya et al., 2008).

Nous avons également constaté que les sarments de la plupart des variétés produisant des fruits noirs, en particulier Zreka, Boule d'Or et Hamri, avaient une plus grande concentration de psoralène et de bergaptène que ceux qui donnent des fruits verts. Les dernières variétés pourraient être moins sensibles ou moins exposées à l'invasion d'insectes et aux divers facteurs de stress, rôle principal des furanocoumarines en tant que phytoalexines dans le figuier comme il a déjà été signalé (Chapitre 2). Ça mène aussi à penser à une corrélation positive entre le teneur en anthocyanes responsables de l'intensité de la couleur des figues et celles des coumarines dans les sarments.

La teneur en rutine, était plus importante dans l'écorce des sarments que dans le bois où cette molécule était non décelable. Les plus fortes concentrations de rutine ont été détectées dans les feuilles de toutes les variétés et avec des différences significatives par rapport aux écorces de sarments. La plus grande concentration a été détectée chez les feuilles de la variété noire Blanquette, avec une concentration de 4358,01ug/g.

À la différence du psoralène et du bergaptène, les différences entre les teneurs de la rutine dans les variétés noires et vertes de figuiers étaient non significatives. Teixeira et al. (2006) ont également identifié la rutine dans des feuilles de figuier, mais cette molécule n'a pas été dosée dans les feuilles.

L'acide férulique a été détecté et quantifié par Oliveira et al. (2009) dans la pelure de fruit et dans les feuilles de deux variétés de *Ficus carica* (Pingo de mel et Branca traditional), dans notre étude, on a recherché ce composé dans nos échantillons, en injectant en HPLC le standard pur, le temps de rétention coïncidait bien avec celui du pic dans l'extrait de feuille à environ 14,68 min, néanmoins une différence était observée lors de la comparaison des spectres UV du pic correspondant au composé pur et à son homologue dans l'extrait, ceci peut être dû à la Co-élution d'un autre pic avec celui du composé recherché ou à l'absence totale de ce composé. Des études complémentaires par HPLC et par spectrométrie de masse sont nécessaires pour mener à la conclusion finale quant à la présence ou l'absence de ce composé dans les échantillons des extraits de feuilles étudiés.

L'acide férulique n'a également pas été détecté dans les deux parties de sarments étudiées (Tableaux IV.7).

#### ***IV.2.2.4. Identification des anthocyanes dans les fruits par RP-HPLC-MS***

Pour l'analyse quantitative des anthocyanes, deux courbes étalons ont été obtenues par l'injection de différentes concentrations de la cyanidine 3-O-glucoside (Figure IV.13) et de la keracyanine (Figure IV.11), standards achetées chez extrasynthèse (Genay, France). Les courbes d'étalonnage ont été calculées en représentant les aires des pics (Y) par rapport à la concentration (X,  $\mu\text{g}$  injectés) pour cinq concentrations différentes. Dans cet intervalle, les deux courbes d'étalonnage sont linéaires avec un coefficient de corrélation ( $R^2 > 0.99$ ).

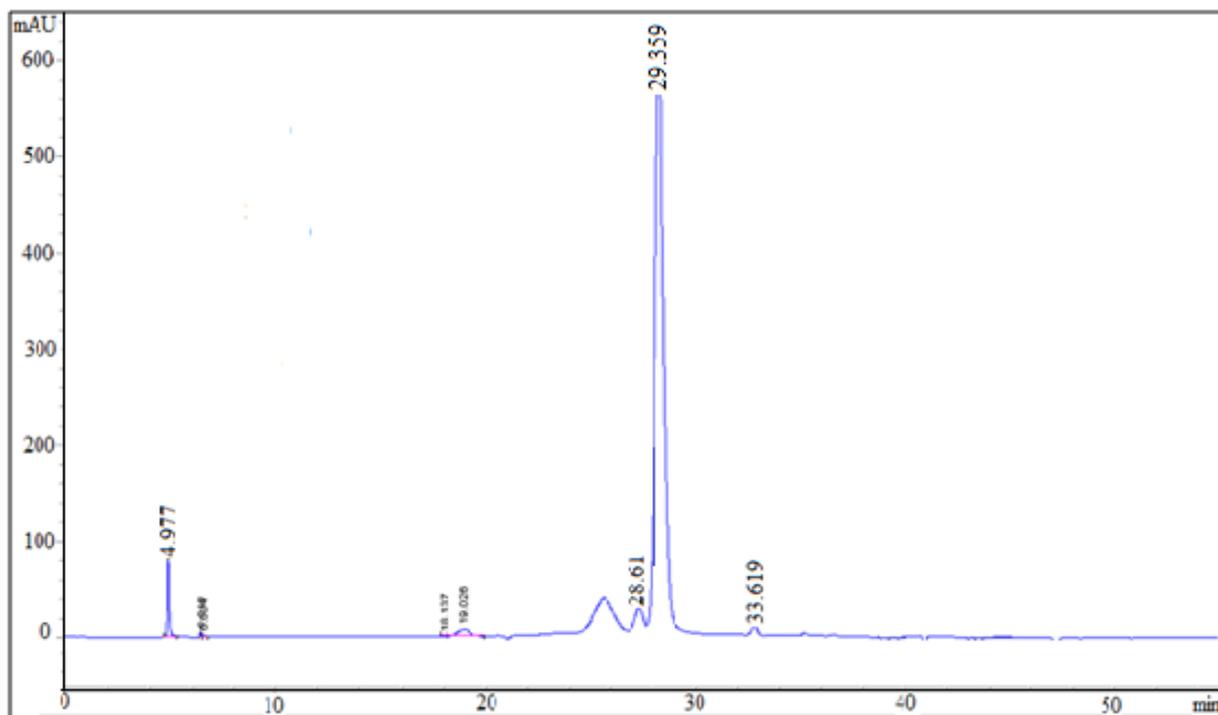
La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ), définies respectivement, comme pic de bruit 3:1, et 10:1, ont été déterminées pour les deux molécules. La gamme de concentration de travail était de 0,005 à 0,1 mg/ml pour les deux composés: keracyanine et cyanidine 3-O-glucoside. Comme il a déjà été mentionné, la détermination des teneurs en anthocyanes dans les extraits de la pelure et de la pulpe de chacune des six variétés étudiées a été effectuée en triplicata.

D'autres anthocyanidines détectées et identifiées dans des travaux antérieurs (Duenas et al., 2008) ont été recherchées à citer: pelargonidine 3-glucoside, péonidine 3-glucoside et petunidine 3-glucoside, l'analyse des spectres correspondants n'a révélé aucune trace de ces composés dans nos échantillons.

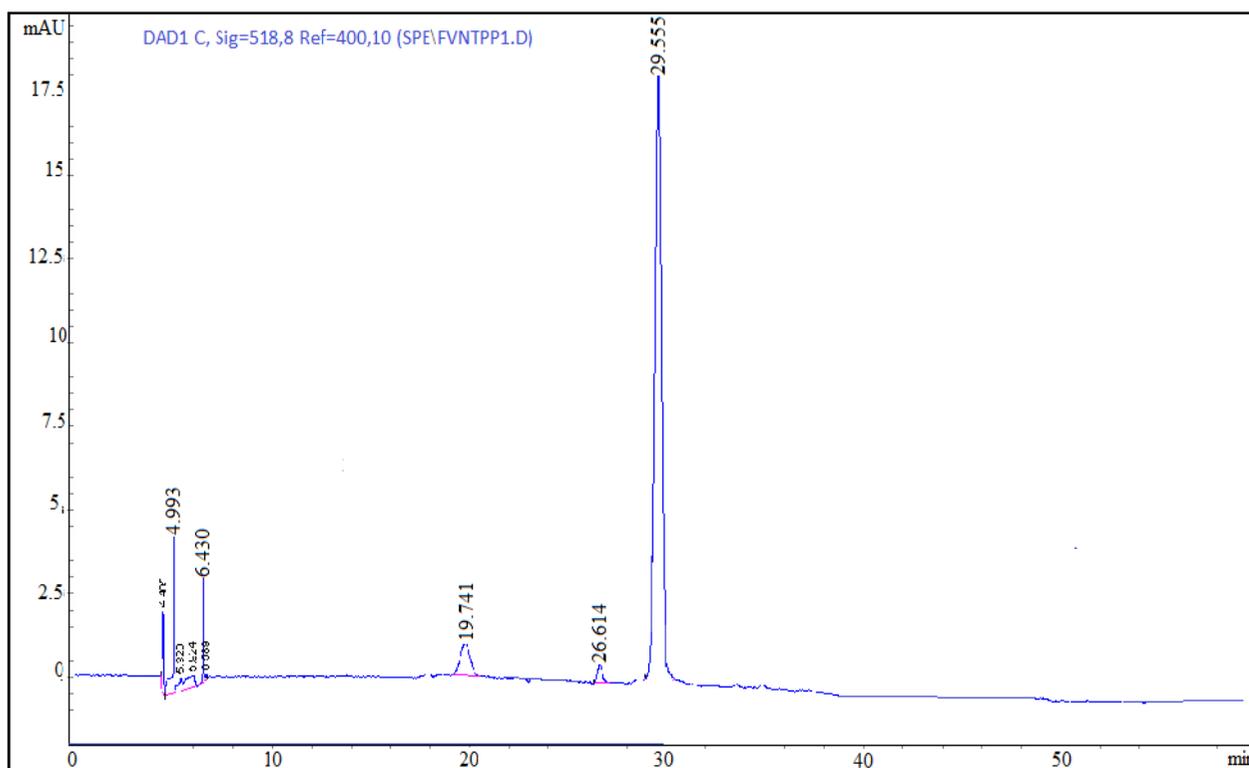
La figure (IV.23) montre le profil du chromatogramme obtenu par HPLC-DAD de l'extrait de la pelure de la variété Blanquette et la figure (IV.24) montre celui de la pulpe du fruit de la même variété alors que les chromatogrammes des autres variétés seront présentés en annexe C.

L'identification des pigments anthocyanes a été réalisée par HPLC-DAD-MS. Les deux composés principaux identifiés dans les échantillons de fruits analysés sont la cyanidine 3-O-glucoside (pic 1) et la cyanidine 3-O-rutinoside (pic 2) (Figure IV.25), ce dernier étant bien majoritaire dans toutes les variétés analysées. Les chromatogrammes des autres variétés obtenus suite à l'analyse par HPLC-DAD-MS seront présentés en annexe C.

L'identité de ces composés a été déterminée par comparaison de leurs caractéristiques chromatographiques et les spectres d'absorption aux molécules standards pures. Ces deux Composés (pics 1 et 2) montrent une longueur d'onde maximale  $\lambda_{\text{max}}$  à 516–518 nm, longueur caractéristique de la cyanidine et de ses dérivés (Santos Buelga et al., 2003). La spectrométrie de masse a confirmé la présence de ces molécules dans les échantillons avec des ions moléculaires à  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  595,2 et 449,1 correspondant à la keracyanine et à la cyanidine 3-O-glucoside respectivement (Tableau IV.9). Ces deux anthocyanines avaient été décrites dans les figures par d'autres auteurs (Puech et al., 1975 ; Solomon et al., 2006; Del Caro et Piga, 2008).

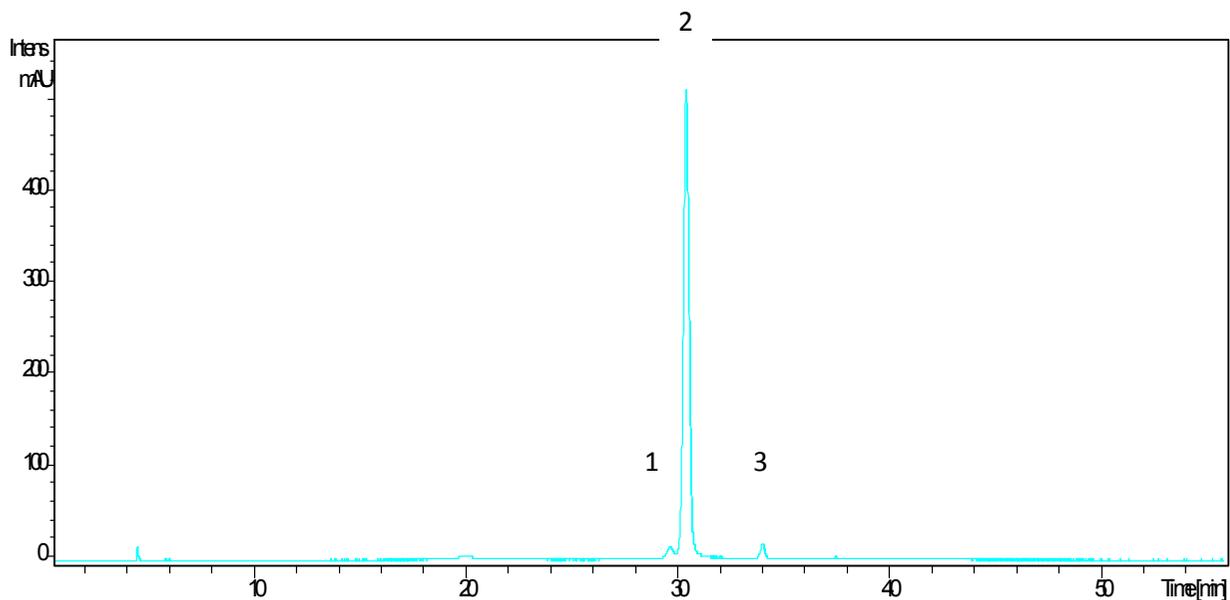


**Figure IV.23:** Chromatogramme HPLC à 518nm de la pelure du fruit variété Blanquette; Tr= 28,61 min pour la cyanidine 3-0-glucoside; Tr= 29,36 min pour la keracyanine.

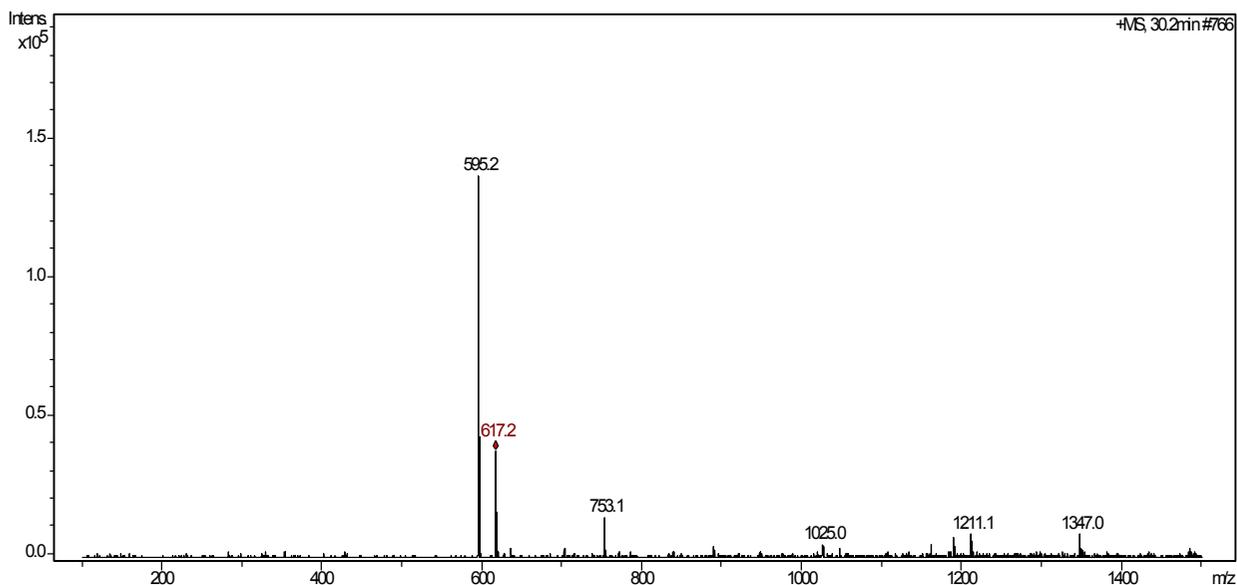


**Figure IV.24:** Chromatogramme HPLC à 518nm de la pulpe du fruit variété Blanquette; Tr= 29,55 min pour la keracyanine.

Le chromatogramme obtenu suite à l'analyse par HPLC-DAD-MS de la pelure des fruits de la variété Blanquette est donné dans la figure (IV.25) et le spectre de masse du composant prédominant fait l'objet de la figure (IV.26). Sur ce spectre, on voit bien le pic à  $m/z+1=595,2$  qui correspond à la masse du fragment keracyanine de formule moléculaire  $C_{27}H_{31}O_{15}^+$  obtenu suite à la fragmentation du chlorure de keracyanine de masse moléculaire 631 g/mol et perte du fragment chlore. Le pic à  $m/z+Na=617,2$  est compatible avec la masse de cette molécule.



**Figure IV.25:** Chromatogramme HPLC-UV à 510nm de la pelure de la variété Blanquette; 1: Cyanidine 3-O-glucoside, 2: Cyanidine 3-O-rutinoside, 3: Inconnu.



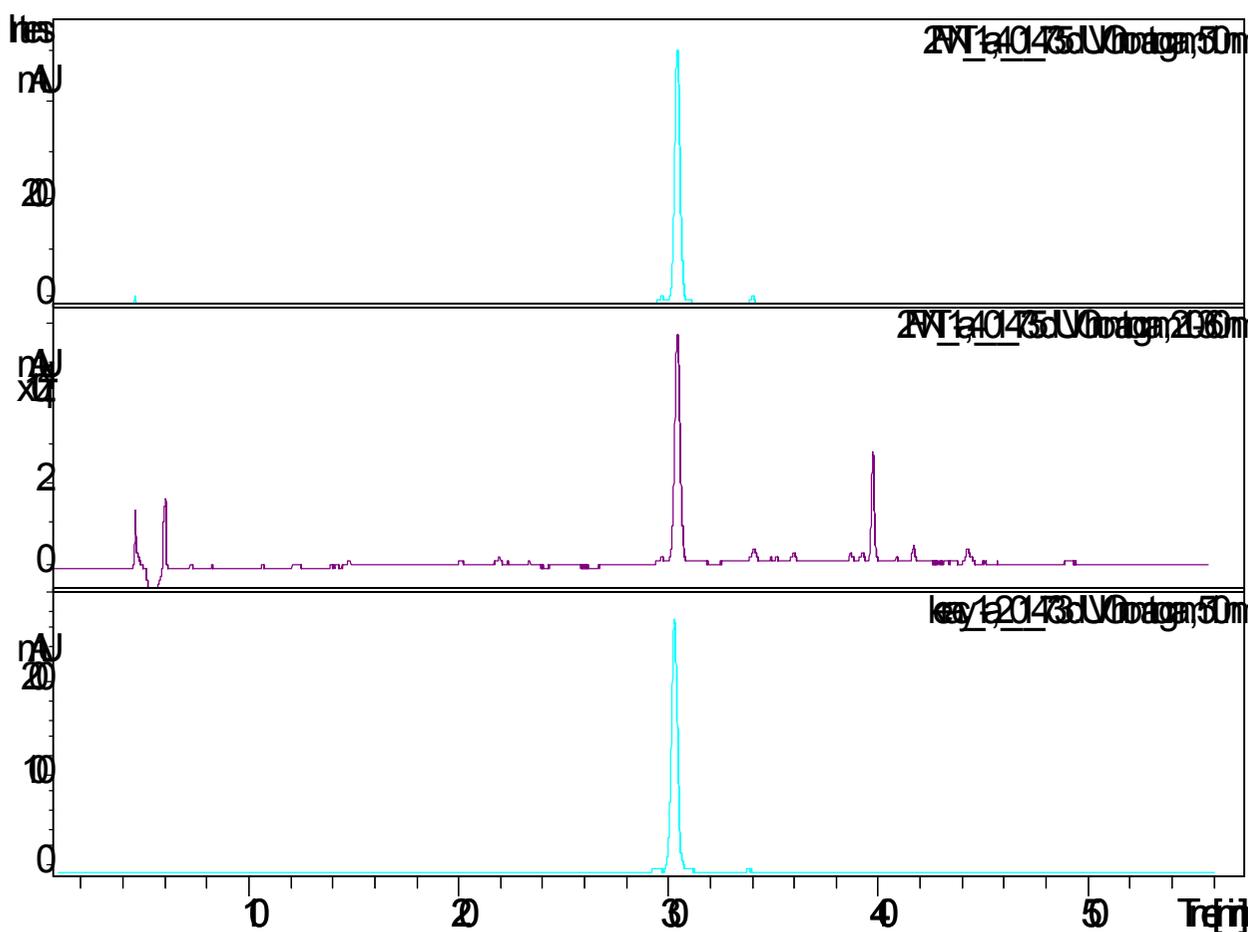
**Figure IV.26:** Spectres de masse par HPLC-DAD-MS, en mode positif de la keracyanine.

La figure (IV.27) montre la superposition des chromatogrammes de standards purs et d'extraits de la pelure du fruit de la variété Blanquette (HPLC-DAD-MS).

Les résultats des analyses HPLC-DAD-MS (temps de rétention, longueur d'onde maximale et ion moléculaire) sont présentés dans le Tableau (IV.9).

**Tableau IV.9:** Temps de rétention ( $T_R$ ), données de spectrométrie de masse et l'identification des anthocyanes dans les figes.

Pic	Nom du produit	$T_R$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	MM
1	Cyanidine-3- <i>O</i> -glucoside	29.5 min	449.1		448
2	Cyanidine-3- <i>O</i> -rutinoside	30.3 min	595.2	617.2	594
3		33.9 min	579.2		578



**Figure IV.27 :** Superposition des chromatogrammes de standards purs et d'extraits de la pelure du fruit variété Blanquette (HPLC-DAD-MS).

#### IV.2.2.5. Distribution des anthocyanes dans diverses variétés de figes

Le contenu et la distribution des anthocyanes ont été étudiés dans six variétés de figes, l'une d'entre elles est une variété verte (Bakor), une deuxième est à peau verte et à pulpe rose-foncée (Albo). Les autres variétés présentaient une couleur de pelure bleu-violette intense alors que la couleur de la chair variait du rose-claire au rose-foncé. Dans ces derniers, les deux parties du fruit, pulpe et pelure ont été analysées.

Des différences significatives dans la teneur en anthocyanes ont été trouvées entre la pulpe et la pelure de la même variété d'une part et entre les diverses variétés étudiées d'autre part. Le tableau (IV.10) montre la concentration individuelle de pigments anthocyanes ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , FW<sup>a</sup>) dans les variétés de figes analysées. <sup>a</sup>FW : de l'Anglais Fresh Weight, la masse est reportée à la matière fraîche de l'échantillon. Aucune anthocyane n'a été détectée dans la pelure ou la pulpe de la variété verte étudiée (Bakor), la pelure de la variété Albo était exempte d'anthocyanines.

La concentration en keracyanine dans la pelure variait de 59,33 à 137,15 ( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW). La variété Blanquette (de couleur violette foncée) présentait la plus grande teneur en keracyanine suivie de la variété Hamri (violette). La plus petite teneur en keracyanine, estimée à 59,33( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) a été détectée dans la variété Zreka. Dans la pulpe, Les concentrations en keracyanine étaient nettement inférieures à celles des pelures et s'échelonnaient entre 1,04 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , FW) dans la variété Zreka à 11( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) dans la variété Blanquette. La keracyanine a été détectée uniquement dans la pulpe de la variété Albo (rose-foncée) avec une concentration de 2,15  $\mu\text{g g}^{-1}$  (FW), cette molécule est bien responsable de la coloration de la chair de ce fruit.

**Tableau IV.10:** Concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) des anthocyanes dans 6 variétés de *Ficus carica* L. Algériennes.

		Variétés noires					
Composés		<i>Blanquette</i>	<i>Zreka</i>	<i>Boule d'or</i>	<i>Hamri</i>	<i>Albo</i>	<i>Bako</i>
<b>Cy 3 rutinose</b>	pelure	137,15±8,43	59,33±0,69	81,57±7,18	104,52±6,32	—	—
	pulpe	11±0,45	1,04±0,14	6,93±0,26	1,83±0,03	2,15±0,12	—
<b>Cy 3 glucose</b>	pelure	8,62±1,92	3,65±0,27	3,01±0,04	11,65±0,12	—	—
	pulpe	—	—	—	—	—	—

Le glucoside de cyanidine a été détecté seulement dans la pelure des quatre variétés noires étudiées en quantités bien minimales comparées à celles de la keracyanine, la concentration en  $\mu\text{g g}^{-1}$  (FW) variait de 3,01 dans la variété Boule d'or à 11,65 dans la variété Hamri. La présence de ce composé dans les figues est très bénéfique car il a été rapporté comme très actif dans l'inhibition de la coagulation sanguine *in vitro* (Marazzoni et Bombardelli, 1996).

Donc la cyanidine 3-O-rutinoside est l'anthocyanidine majoritaire dans les deux parties du fruit. Dans une étude réalisée sur la variété Mission (pulpe et pelure) par Puech et al. (1975) les pourcentages de 75% (pourcentage de l'ensemble des anthocyanes) pour cyanidine 3-O-rutinoside et 11% pour cyanidine 3-O-glucoside ont été trouvés. En outre, d'après une étude récente (Del Caro et Piga, 2008), la cyanidine 3-O-rutinoside était le deuxième composé représentatif dans la figue après la rutine.

Duenas et al. (2008) ont détecté par HPLC-DAD-MS en plus des anthocyanes déjà citées, la présence d'autres types d'anthocyanes: la pelargonidine 3-glucoside, la pelargonidine 3-rutinoside et la petunidine 3-rutinoside. La pelure des figues noires a montré une teneur appréciable en cyanidine 3-O-rutinoside tandis que la cyanidine 3-O-glucoside a été détectée seulement dans la pelure des figues. Ces données confirment celles rapportées par Solomon (Solomon et al., 2006).

Dans notre étude les figues noires ont présenté des teneurs nettement plus élevées en pigments anthocyanes que celles des figues à peaux vertes, ceci est en accord avec une étude réalisée sur les polyphénols des figues qui a confirmé la localisation majeure des trois classes de polyphénols dans la pelure des fruits à peaux sombres. Cette différence significative entre peau et pulpe a également été trouvée récemment dans un fruit, largement consommé, la pomme (Del Caro et Piga, 2008).

Un certain nombre d'études ont montré que la présence de composés phénoliques présents dans les aliments et surtout les fruits peut être particulièrement importante pour les consommateurs, en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la santé. En plus des effets antioxydants, les composés phénoliques possèdent un large éventail de propriétés biochimiques et peuvent également avoir un effet bénéfique dans la prévention du développement de maladies comme le cancer et les maladies cardiovasculaires. En plus des anthocyanidines, des études effectuées sur les polyphénols de *Ficus carica* (Robert Veberic et al., 2008), ont mis en évidence la présence des composés phénoliques suivants: l'acide gallique, l'acide chlorogénique, acide syringique, (+)-catéchine, épicatechine et rutine, avec la teneur la plus élevée en rutine (jusqu'à 28,7 mg par 100 g, DW).

La quantité de rutine présente dans la figue est plus élevée que celle présente dans les cerises douces, les pêches, les abricots et la pelure de pomme tel que rapporté par Veberic et Stampar (2005).

### **IV.3. Activité antioxydante**

Cinq 4-hydroxy-3-aryl-coumarines ont été choisies pour déterminer leurs activités antioxydantes en prenant comme référence la 4-hydroxycoumarine non substituée. Par ailleurs, la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (4-méthylumbellifère) a également été soumise aux calculs afin de comparer les réactivités entre la 4-hydroxy et la 7-hydroxycoumarine. La figure (IV.28) illustre les structures chimiques des composés étudiés.

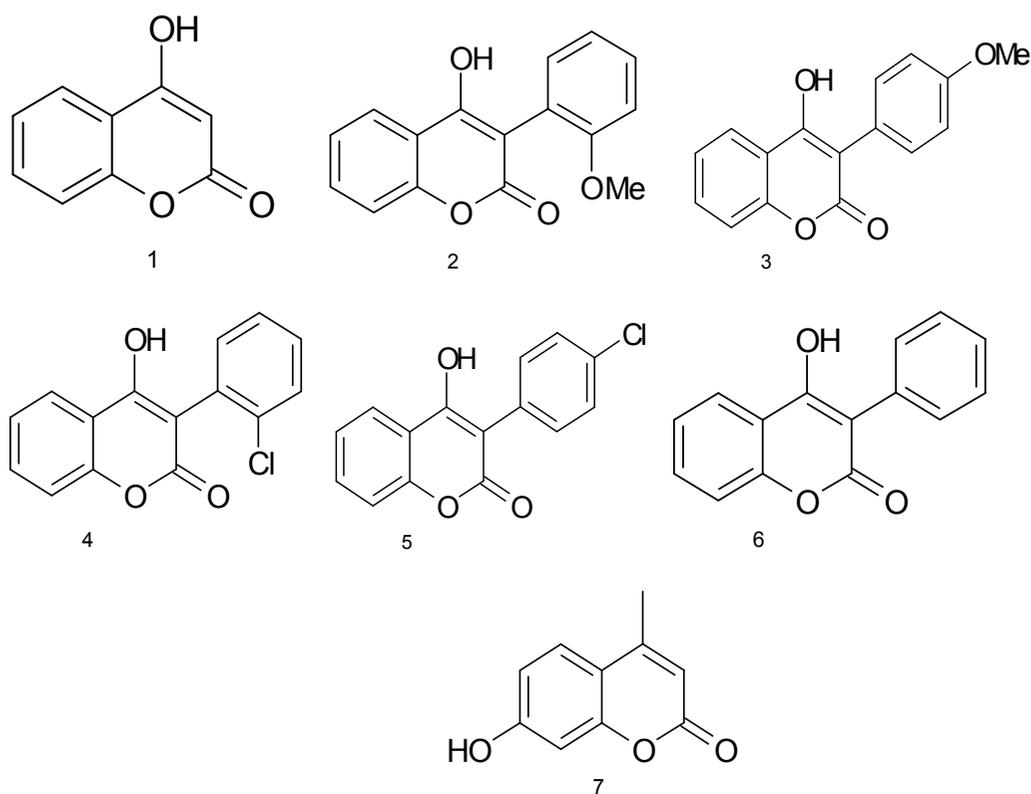
La substitution d'un groupement phényle dans le cycle pyrone de la coumarine a peu d'influence sur l'activité antioxydante des coumarines (Zhang et Wang, 2004). Cependant, la substitution en C3 du composé 1 avec des groupes donneurs d'électrons (OPh, benzyle) augmente considérablement l'activité de piégeage des radicaux (Kirkiacharian et al., 1999). Donc le comportement de cette famille de molécules vis-à-vis des facteurs d'oxydation, notamment les radicaux libres, dépend fortement de la nature du substituant en C3.

La capacité du composé phénolique à piéger les radicaux libres, en leur transférant son atome d'hydrogène est le facteur clé de l'activité antioxydante de ce type de molécules. Selon les connaissances actuelles, le mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène (TAH) est le mécanisme qui intervient principalement dans les réactions des radicaux avec les hydroxycoumarines. Le mécanisme TAH correspond à la dissociation homolytique d'une liaison O-H.

D'autre part, la différence significative entre l'enthalpie de dissociation de la liaison OH (BDE-OH) (369,4 à 378,2 kJ / mol) (Walker et Tsang, 1990) et la liaison SH (BDE-SH) (331,0 à 349,4 kJ / mol) (Chandra et al., 2003) pour le phénol ((ArOH), Ar = aryle) et le thiophénol (ArSH) respectivement rend ce dernier plus vulnérable à une réaction de TAH que le premier. Nous pensons alors que la fixation directe du groupe mercapton au cycle aromatique de la coumarine est une stratégie efficace pour améliorer l'activité antiradicalaire. Par conséquent, nous avons adopté une étude systématique sur les différences entre les activités antioxydantes de chaque hydroxycoumarine et son analogue sulfuré et expliqué l'effet de la substitution de l'oxygène par le soufre sur les paramètres étudiés et l'activité antioxydante.

### IV.3.1. Optimisation de la géométrie

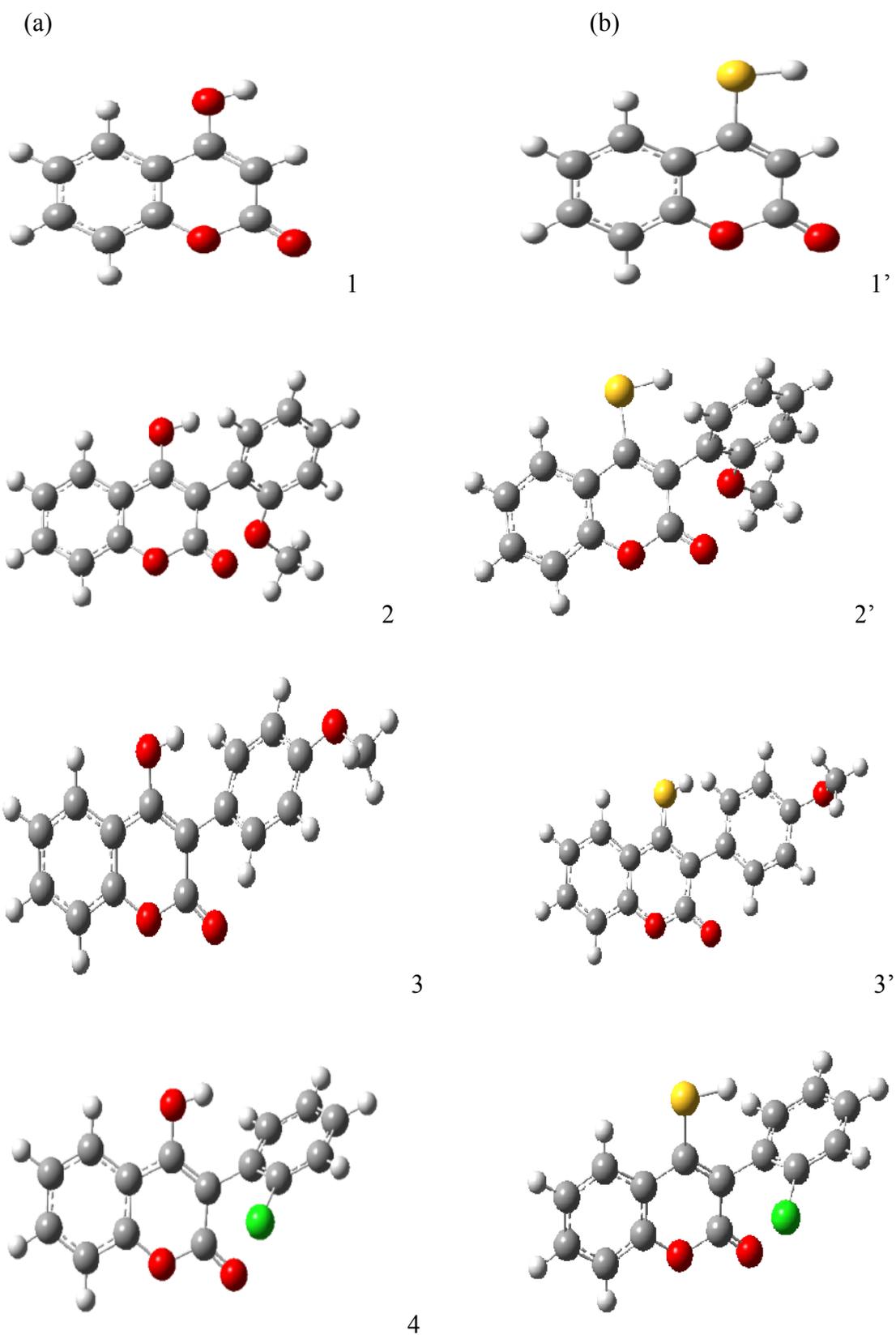
La figure IV.29 montre la géométrie optimisée de la 4-hydroxy-coumarine et de ses dérivées. Lors de la première étape, nous avons effectué une analyse conformationnelle dans le but de déterminer les fonctionnalités qui pourraient être liées aux propriétés antioxydantes des composés étudiés.

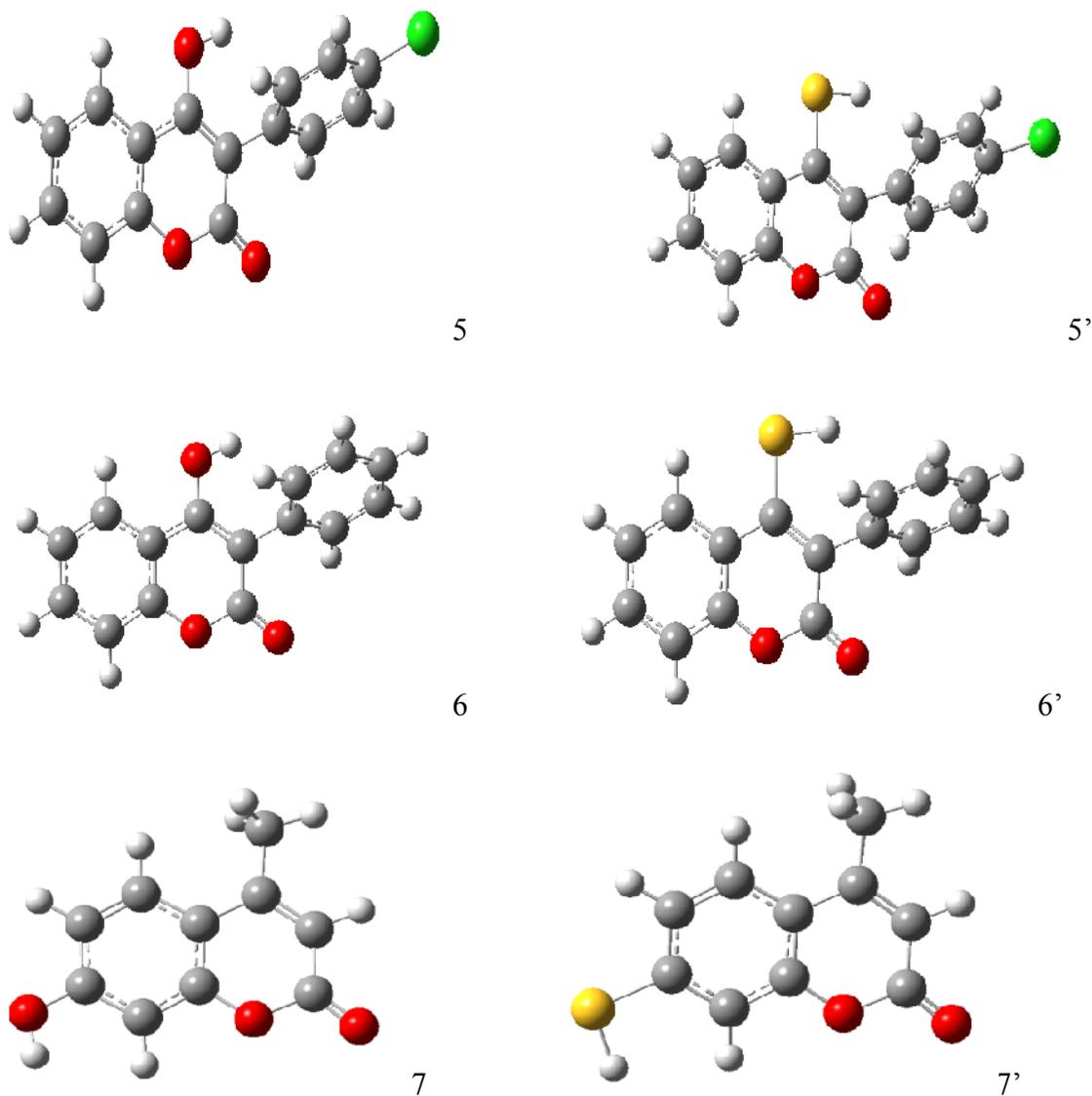


**Figure IV.28:** Structures chimiques des coumarines étudiées.

Comme le montre le tableau (IV.11), les atomes d'hydrogène de tous les groupes OH et SH se situent pratiquement dans le plan des cycles phényles de tous les composés (à partir des valeurs optimisées des angles de dièdre  $\alpha$  (Ca-Cb-Cc-Cd)). D'autre part, d'après les valeurs des distances interatomiques, les valeurs des longueurs des liaisons S-H calculées sont plus élevées que celles des liaisons O-H dans tous les composés étudiés. Ces dernières sont presque identiques, la longueur de la liaison O-H dans le composé 2 est de 0.9760 Å et elle est de 0.9759 Å pour le composé 3. Les longueurs des liaisons des composés 2 et 6, 4 et 5 ainsi que 1 et 7, ont des valeurs pratiquement identiques et sont respectivement, 0.9751 et 0.9753, 0.9713 et 0.9703 Å.

Le composé 7' correspondant au 4-méthylumbelliférone (7-hydroxy-4-méthylcoumarine) possède la plus longue liaison SH avec une valeur de 1.3483 Å, qui est presque égale à celle des composés 2' et 1' avec des valeurs respectives de 1.3480 et 1.3479 Å





**Figure IV.29:** Structures chimiques optimisées des coumarines étudiées  
 (a): hydroxy -coumarines (b): coumarines sulfurées.

Cependant, les longueurs des liaisons S-H dans les autres composés suivent la séquence :  
 $3' > 6' > 4' > 5'$ .

**Tableau IV.11:** Valeurs optimisées par B3LYP/6-31G \* des angles de dièdre  $\alpha$  [°] et  $\theta$  [°] et des longueurs des liaisons hydroxyles et sulfhydriles (Å) des antioxydants étudiés.

Composé	O-H (Å)	$\alpha$ (°)	$\theta$ (°)	Composé	S-H (Å)	$\alpha$ (°)	$\theta$ (°)
1	0.9713	0.0010	-	1'	1.3479	0.0007	-
2	0.9760	1.0806	63.2766	2'	1.3480	0.6131	73.6272
3	0.9759	3.5532	49.3642	3'	1.3477	2.5714	61.0013
4	0.9751	0.5003	68.5907	4'	1.3473	0.7258	82.4518
5	0.9753	3.7233	48.9647	5'	1.3471	2.9289	62.0776
6	0.9760	2.8001	49.4795	6'	1.3475	1.0553	63.7328
7	0.9703	0.0008	-	7'	1.3483	0.0016	-

### IV.3.2. HOMO et LUMO

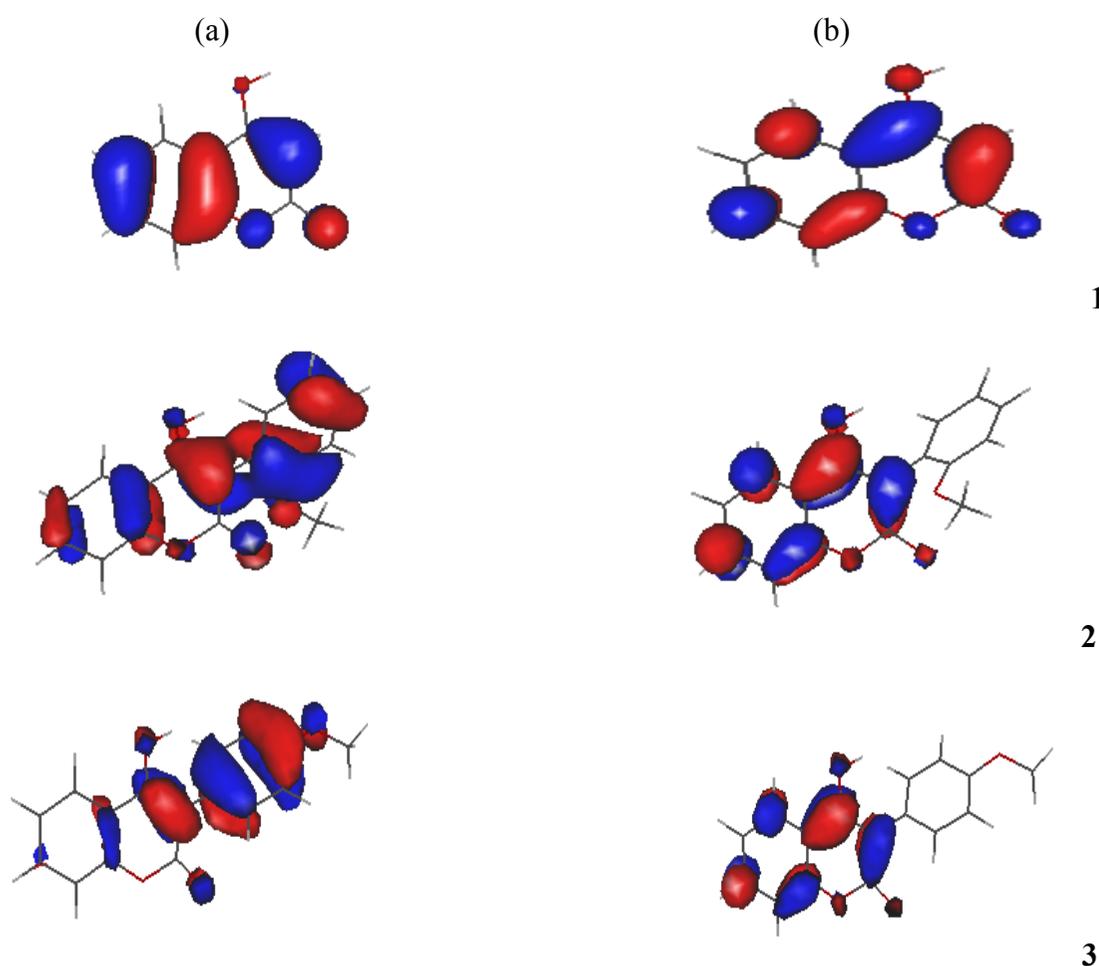
HOMO (acronyme de *Highest Occupied Molecular Orbital*), et LUMO (acronyme de *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), sont les principales orbitales impliquées dans la réaction chimique. Les énergies des orbitales moléculaires sont des propriétés moléculaires qui fournissent des informations utiles sur les interactions donneur-accepteur d'électrons (Takahata et Prabhakar, 1991). Selon la théorie de la réactivité des électrons, la réaction chimique a lieu à une position où le chevauchement entre la HOMO et la LUMO est maximal (Fukui, 1975). L'énergie de la HOMO ( $\epsilon_{\text{HOMO}}$ ) est l'énergie du niveau le plus élevé de la molécule contenant des électrons. Une molécule avec une valeur de  $\epsilon_{\text{HOMO}}$  élevée est capable de donner plus facilement des électrons, elle est donc relativement plus réactive qu'une molécule avec une valeur de  $\epsilon_{\text{HOMO}}$  plus faible (Saraf et al., 2003b). L' $\epsilon_{\text{HOMO}}$  est directement liée au potentiel d'ionisation et caractérise la sensibilité de la molécule envers l'attaque des électrophiles.

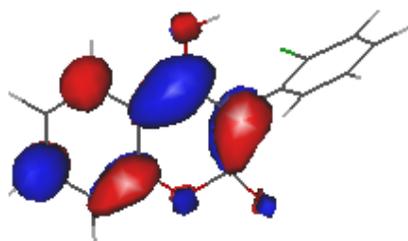
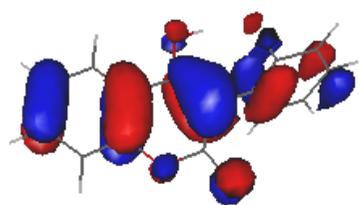
L'énergie de la LUMO ( $\epsilon_{\text{LUMO}}$ ) est l'énergie du niveau le plus bas dans la molécule qui ne contient pas d'électrons. Plus l' $\epsilon_{\text{LUMO}}$  est faible plus il est facile à la molécule d'accepter les électrons (Saraf et al., 2003b). L' $\epsilon_{\text{LUMO}}$  est directement lié à l'affinité électronique et caractérise la sensibilité de la molécule envers l'attaque des nucléophiles.

L'énergie de l'HOMO décrivant la capacité des électrons donneurs est un paramètre adéquat pour représenter le potentiel de piégeage des radicaux libres de polyphénols, depuis le processus de ralentissement de l'auto-oxydation en passant par l'abstraction d'un atome H, ainsi que le transfert d'électrons. Des valeurs plus élevées de l'HOMO pour une molécule donnée indiquent que c'est une bonne donneuse d'électrons.

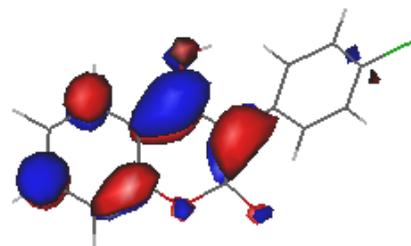
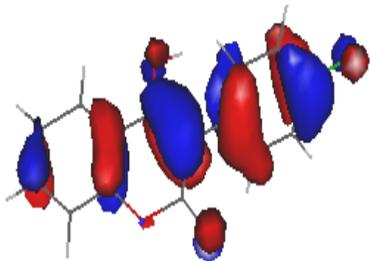
Dans le composé 1 (figure IV.30), les deux orbitales HOMO et LUMO sont essentiellement distribuées sur toute la molécule, la position 4-OH est facilement attaquable par les deux agents électrophiles et nucléophiles. Les mêmes observations ont été faites dans le composé 1' à l'exception des densités des orbitales HOMO et LUMO sur la position 4-OH, qui sont plus élevées que celles de l'analogue 1. Notons que ce site est un groupe nucléophile fort dans 1'.

Dans le composé 2, les orbitales HOMO sont réparties sur la molécule, en revanche les orbitales LUMO sont absentes dans le substituant 3-aryle. La même observation a été faite pour les composés 3, 4, 5 et 6. En précisant que les orbitales HOMO et LUMO sont présentes sur la position 4-OH de ces composés. Dans le composé analogue 2', les LUMO sont distribués seulement sur le groupe 4-hydroxycoumarine mais les HOMO présentent une faible densité dans cette entité. La même constatation a été faite pour les composés 3 et 3', mais les HOMO sont presque absentes dans l'anneau B (entité sans groupe OH).

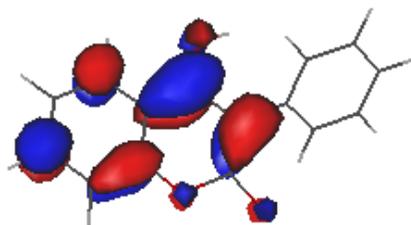
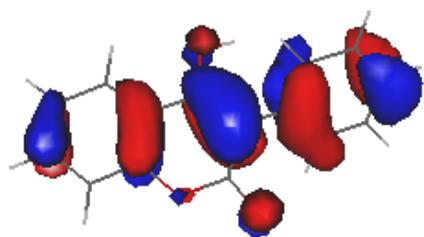




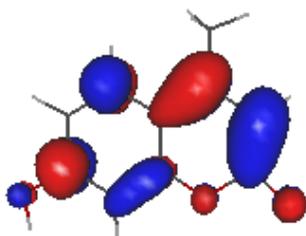
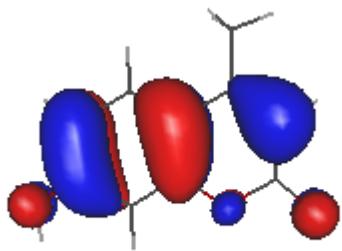
4



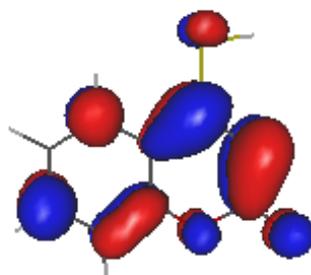
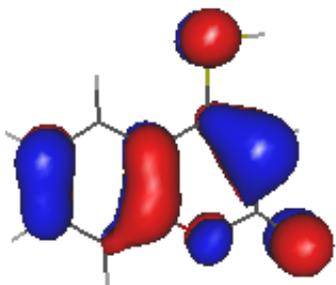
5



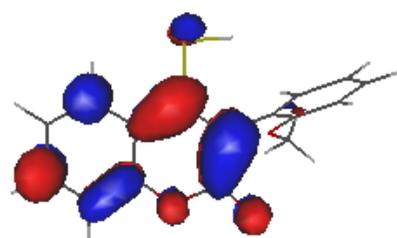
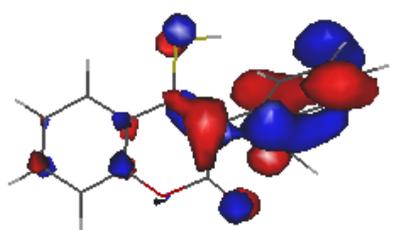
6



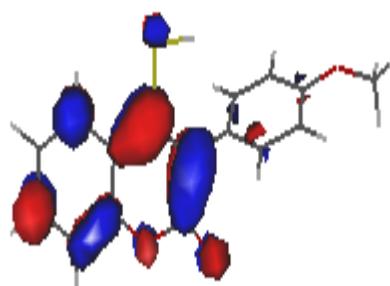
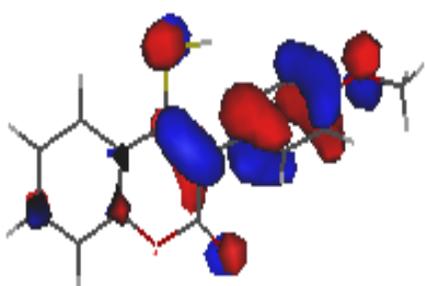
7



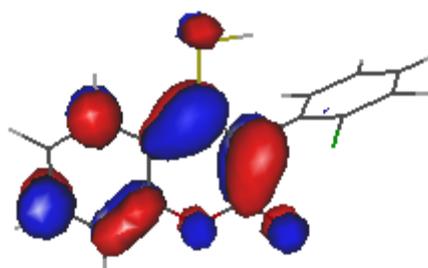
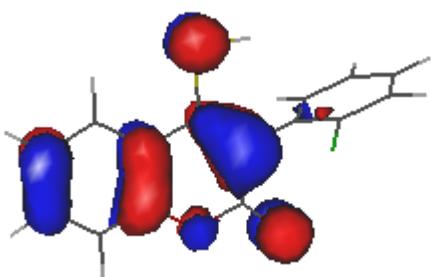
1'



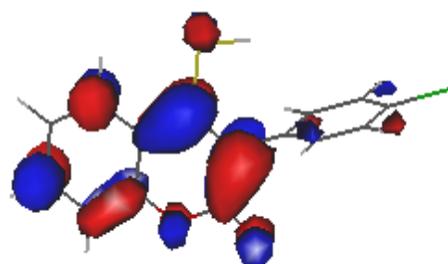
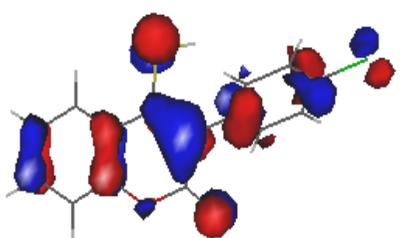
2'



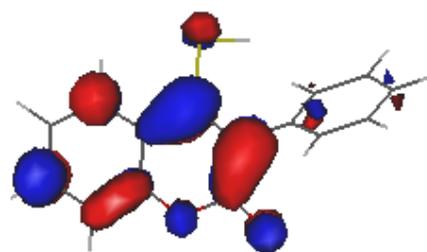
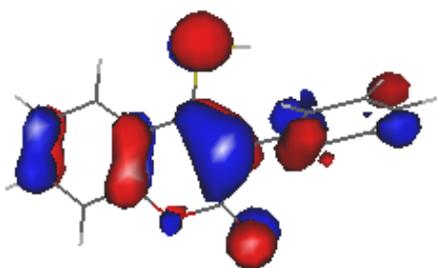
3'



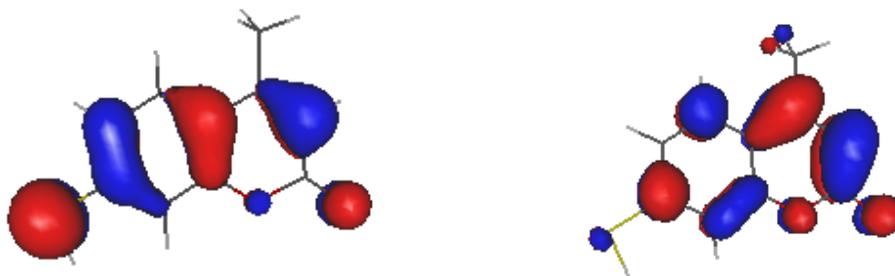
4'



5'



6'



7'

**Figure IV.30:** Distribution des HOMOs (a) et LUMOs (b) des différentes hydroxycoumarines étudiées.

Dans le composé 4', l'HOMO et la LUMO sont absentes dans le substituant 3-aryle avec une densité plus élevée sur la position 4-OH. Pour le dernier composé 7 - hydroxycoumarine, les deux orbitales HOMO et LUMO sont distribuées principalement sur la molécule, une densité élevée de l'HOMO sur la position 7-OH dans le composé 7' est observée.

Comme la montre le tableau (IV.12), la valeur de l'HOMO dans la 4-hydroxycoumarine (1) est -6,3963 (ev), l'ajout d'un groupe phényle en position C3 (6) augmente cette valeur à -6,0564 (ev). D'autre part, lorsque les substituants en position C3 étaient 1 - (4-chlorophényl) (4) et 1 - (2-chlorophényl) (5), les valeurs de l'HOMO ont une valeur comprise entre celle du composé (1) et (6). Cependant, les composés portant le groupe OMe en ortho et para comme substituant du noyau aryle en C3 (2) et (3), ont les plus hautes valeurs de l'HOMO ; -5,9119 et -5,7255 (ev). Dans la 7-hydroxycoumarine (7), la valeur de l'HOMO était supérieure à celle de la 4-hydroxycoumarine avec une valeur estimée à -6,0836 (ev).

Selon les calculs par DFT (Tableau IV.12), les valeurs de l'HOMO obtenues pour les composés 1 à 7 sont : -6,3963, -5,9119, -5,7255, -6,2784, -6,1813, -6,0564 -6,0836 (ev) et les valeurs pour leurs analogues sulfurés (Tableau IV.12) sont : -6,4988, -6,0096, -5,8390, -6,4017, -6,3165, -6,2080 et -6,1358 (ev) respectivement. Ces résultats indiquent que chaque coumarine hydroxylée est plus sensible à l'ionisation que son analogue sulfurée. Les composés les plus nucléophiles dans cette étude théorique sont 2, 3 et 3'.

### IV.3.3. Potentiel d'ionisation Adiabatique (AIP)

Le potentiel d'ionisation (AIP) est défini comme étant l'énergie minimale nécessaire pour arracher un électron à partir d'une molécule isolée (ou atomes) dans son état fondamental pour former un ion en phase gazeuse (McNaught et Wilkinson, 1997), donc ça représente la facilité d'un don d'électrons, les molécules ayant les plus petites valeurs de l'AIP sont les plus actives. Des HOMO élevées ou des AIP faibles reflètent une forte capacité à donner des électrons (Cheng

et al., 2003; Wright et al., 2001; Klein et al., 2006; Leopoldini et al., 2004).

**Tableau IV.12:** Propriétés théoriques de la 4-hydroxycoumarine et ses dérivées.

Composés	$E_{\text{total}}/\text{Hartree}$	HOMO (ev)	LUMO (ev)	BDE kJ/mol	AIP kJ/mol
<b>1</b>	-572.2459543	-6.3963	-1.5937		788.0169
<b>R-1</b>	-571.6046538	$\alpha = -7.1127$ $\beta = -7.0191$	$\alpha = -1.7894$ $\beta = -4.6471$	370.2681	
<b>2</b>	-917.8247561	-5.9119	-1.4090		695.9665
<b>R-2</b>	-917.1901201	$\alpha = -5.9214$ $\beta = -6.3524$	$\alpha = -1.3975$ $\beta = -3.9445$	352.7697	
<b>3</b>	-917.8271077	-5.7255	-1.5368		677.0306
<b>R-3</b>	-917.2003562	$\alpha = -5.6711$ $\beta = -6.5247$	$\alpha = -1.3741$ $\beta = -3.8917$	332.0694	
<b>4</b>	-1262.8949157	-6.2784	-1.6065		742.0416
<b>R-4</b>	-1262.2563638	$\alpha = -6.5764$ $\beta = -6.8101$	$\alpha = -1.6800$ $\beta = -4.3494$	363.0561	
<b>5</b>	-1262.8992418	-6.1813	-1.8141		725.5779
<b>R-5</b>	-1262.2682447	$\alpha = -6.2722$ $\beta = -6.8218$	$\alpha = -1.7496$ $\beta = -4.3342$	346.7900	
<b>6</b>	-803.3037484	-6.0564	-1.6457		720.4099
<b>R-6</b>	-802.6717531	$\alpha = -6.2031$ $\beta = -6.7236$	$\alpha = -1.6054$ $\beta = -4.1744$	345.8373	
<b>7</b>	-611.5615667	-6.0836	-1.5782		748.4021
<b>R-7</b>	-610.9219998	$\alpha = -6.4319$ $\beta = -7.0069$	$\alpha = -1.9850$ $\beta = -4.2406$	365.7163	

Les résultats obtenus (tableaux IV.12 et IV.13) montrent que les valeurs les plus élevées de l'AIP correspondent aux valeurs de l'HOMO les plus basses. Dans cette étude, en général, la structure à trois anneaux a une contribution plus efficace à l'HOMO et à l'AIP que celle à deux anneaux. En outre, les positions des deux substituants donneur et attracteur d'électrons ont une grande influence sur les valeurs de l'HOMO et de l'AIP. Les valeurs les plus faibles trouvées dans cette étude étaient 695.9665, 677.0306 et 682.9247 kJ / mol correspondant aux composés 2, 3 et 3' respectivement.

**Tableau IV.13:** Propriétés théoriques de la 4-hydroxycoumarine et ses dérivées sulfurées.

Composés	$E_{\text{total}}/\text{Hartree}$	HOMO (ev)	LUMO (ev)	BDE kJ/mol	AIP kJ/mol
1'	-895.2101053	-6.4988	-1.9412		789.5838
R-1'	-894.5695235	$\alpha = -6.5723$ $\beta = -6.5190$	$\alpha = -2.0212$ $\beta = -5.2577$	368.3811	
2'	-1240.7849778	-6.0096	-1.6805		702.6545
R-2'	-1240.1546884	$\alpha = -6.0749$ $\beta = -6.0512$	$\alpha = -1.9252$ $\beta = -4.2496$	341.3583	
3'	-1240.7861294	-5.8390	-1.7989		682.9247
R-3'	-1240.1607422	$\alpha = -5.8262$ $\beta = -5.9154$	$\alpha = -1.9668$ $\beta = -4.1100$	328.4875	
4'	-1585.8556532	-6.4017	-1.8778		749.3107
R-4'	-1585.2174977	$\alpha = -6.4292$ $\beta = -6.3329$	$\alpha = -1.9072$ $\beta = -4.8879$	362.0109	
5'	-1585.8582277	-6.3165	-2.0408		731.2265
R-5'	-1585.2299745	$\alpha = -6.3595$ $\beta = -6.2978$	$\alpha = -2.2887$ $\beta = -4.4988$	336.0124	
6'	-1126.2626341	-6.2080	-1.8784		726.7172
R-6'	-1125.6341038	$\alpha = -6.2640$ $\beta = -6.1495$	$\alpha = -2.1358$ $\beta = -4.3470$	336.7400	
7'	-934.5294757	-6.1358	-1.8024		747.9793
R-7'	-933.8887312	$\alpha = -6.2232$ $\beta = -6.0999$	$\alpha = -1.8487$ $\beta = -4.9775$	368.8083	

#### IV.3.4. Enthalpie de dissociation de liaison (BDE)

L'énergie d'une molécule diatomique est directement liée à la distance entre les deux atomes,  $r_{A-B}$ . Lorsque le système est dans son état d'énergie le plus bas, les deux atomes, A et B, sont séparés par une distance connue comme étant la distance de la liaison à l'équilibre. Si nous rapprochons les atomes, il y aura une répulsion défavorable entre eux et l'énergie du système augmente. Si nous séparons les deux atomes, il y aura une force d'attraction et l'énergie du système augmentera également jusqu'à ce que nous atteignons un point où le lien est rompu. La

quantité d'énergie qu'il faut pour cette rupture s'appelle l'énergie de dissociation de liaison ou BDE.

Il faut souligner que les molécules avec de faibles valeurs de BDE auraient une forte activité antioxydante, car elles peuvent donner plus facilement des hydrogènes lors de réactions avec les radicaux libres. Par conséquent, les molécules ayant la plus faible BDE sont les plus actives.

Les valeurs des BDEs calculées pour les molécules étudiées sont présentées dans les tableaux (IV.12) et (IV.13). La valeur de la BDE de la 4-hydroxycoumarine était 370,2681 kJ / mol, alors qu'elle est de 365,7163 kJ / mol pour la 7-hydroxy-4-méthyl-coumarine. La substitution d'un groupe phényle en position C3 (cas du composé 6), diminue la valeur de la BDE à 345,8373 kJ / mol. D'autre part, la substitution d'un atome de chlore, groupement électro-attracteur, en position 6' (composé 4) ou en position 4' (composé 5) sur le phényle de la position C3 de la 4-hydroxycoumarine, conduit à l'augmentation des BDEs (346,7900 et 363,0561 kJ / mol). Par contre, lorsque le chlore est remplacé par un méthoxy (OMe), un groupement électro-donneur en position 4'(composé 3), la plus petite valeur de la BDE (332,0694 kJ / mol) a été obtenue. Ce même groupement placé en position 6' (composé 2) cause l'augmentation de la BDE (352,7697 kJ / mol).

En général, tous les composés obtenus par substitution de la 4-hydroxycoumarine en C3 par des aryles seraient meilleurs antioxydants parce qu'ils ont de plus faibles énergies de dissociation que la 4-hydroxycoumarine.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec les résultats de l'activité antiradicalaire obtenus expérimentalement par DPPH (Sergio et al., 2011), où il a été montré que les composés porteurs de groupes donneurs OMe en position ortho et para comme substituants du noyau aryle en C3 avaient l'activité antioxydante la plus importante.

Le résultat le plus important de cette étude théorique est que les valeurs des BDEs des coumarines sulfurées sont plus faibles que leurs analogues hydroxylées. Ces dernières peuvent être plus sensibles à l'interaction avec les radicaux libres par un don d'électron unique alors que les analogues sulfurés peuvent efficacement piéger les radicaux libres par l'intermédiaire du mécanisme du transfert d'atome d'hydrogène TAH.

## ***Conclusion***

## Conclusion

Le présent travail rapporte dans la première partie, l'étude phytochimique des sarments de *Ficus carica* L., plante considérée comme emblème du bassin méditerranéen et largement répandue sur le sol Algérien. L'intérêt quant à l'investigation chimique de la plante en question, est justifié par le fait que peu d'études ont été effectuées sur les figues Algériennes. Ce travail nous a permis d'isoler quatre produits naturels. Leurs structures ont été établies par les méthodes spectroscopiques d'analyse axées principalement sur la RMN du proton.

Il s'agit de la première étude comparant la teneur en furanocoumarines linéaires et en rutine entre l'écorce, la partie bois des sarments et les feuilles de huit variétés de *Ficus carica* cultivées dans différentes régions de l'Est Algérien. Des différences dans la concentration des trois molécules, entre les deux parties de sarments et les feuilles ont été observées; également une différence significative dans la concentration de ces molécules a été détectée entre les arbres donnant les fruits verts et ceux donnant les figues noires.

Les résultats de la présente étude indiquent que les sarments de *Ficus carica* L. ainsi que les feuilles peuvent être considérés pour l'extraction en raison des teneurs élevées en furanocoumarines linéaires. Concrètement, cette étude comble une lacune dans notre connaissance de la distribution de furanocoumarines entre les différentes parties du figuier et permet de conclure que la répartition des furanocoumarines entre les cinq matières végétales suit l'ordre: feuilles > bois > écorce > pulpes de fruits > pelures de fruits. Comme les feuilles et les tiges sont caractérisées par des quantités élevées de psoralène et bergaptène, leur utilisation par les industries cosmétiques et pharmaceutiques pour le traitement de certaines maladies dermatologiques, comme le psoriasis et le vitiligo est recommandée.

L'utilisation de l'HPLC-DAD-MS nous a permis également de détecter deux pigments anthocyanes dans les différentes variétés noires de figues. La cyanidine 3-O rutinoside ou keracyanine était l'anthocyane principale dans les variétés étudiées. La cyanidine 3-O glucoside a également été détectée mais en quantités moindres par rapport à la keracyanine.

Des différences significatives en teneurs d'anthocyanes ont été observées entre la pulpe et la pelure des figues, cette dernière et surtout celle des variétés Blanquette (violet foncé) et Hamri ont présenté les concentrations les plus élevées en anthocyanes.

Dans une dernière partie, L'activité antioxydante de nouveaux substituants de la 4-hydroxycoumarine, les 3-aryl-4-hydroxycoumarines, a été évaluée en utilisant la théorie de la fonctionnelle de la densité. La présence des substituants 3-aryl sur les coumarines a nettement augmenté leur activité antioxydante. Nos résultats ont montré que les 3-méthoxy-4-hydroxycoumarines sont les piègeurs de radicaux les plus actifs parmi les hydroxycoumarines étudiées et ceci est dû au caractère de donneurs d'électrons des groupements méthoxy qui sont capables de stabiliser le radical électrophile formé même s'ils ne sont pas directement liés à la structure de base de la coumarine mais au système aryle en position 3.

Une excellente corrélation entre les valeurs des énergies de dissociation de liaisons calculées dans la présente étude et les résultats expérimentaux trouvés par d'autres auteurs (Sergio et al., 2011) pour les mêmes molécules (C3-aryl-4 hydroxycoumarines), a été constatée.

Par ailleurs, et sur la base des paramètres calculés, la fixation directe du groupe mercaptan (SH) sur le cycle aromatique de la coumarine a conduit à la diminution des valeurs des énergies de dissociation des liaisons (BDEs) des molécules correspondantes. La sulfuration des coumarines apparaît donc comme une nouvelle stratégie pour une meilleure efficacité de l'activité antiradicalaire. De ce fait, il est suggéré que ces composés pourraient avoir une grande importance thérapeutique, en l'occurrence, pour la prévention ou le ralentissement de la progression du vieillissement associé au stress oxydatif qui est à l'origine de la plupart des pathologies dont, le cancer et l'Alzheimer.

Les résultats de l'étude des deux parties de sarments, des feuilles et des fruits de *Ficus carica* ont révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires ainsi que leur diversité structurale. Des recherches sur les composés purifiés et non identifiées dans les extraits de sarments de feuilles et de fruits sont en cours.

# *Bibliographie*

## Bibliographie

- Abdul Majid Ayatollahia, f, Mustafa Ghanadianb, Suleiman Afsharypourb, Omer Mohamed Abdellac, Mehdi Mirzaid, Gholamreza Askarie (2011).** Pentacyclic Triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with Their T-cell Proliferation Activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10 (2): 287-294.
- Alais C., Linden G. (1997).** Abrégé de biochimie alimentaire. Ed. Masson. pp: 13-69.
- Allen K.G., Banthorpe D. V., Charlwood B.V. (1977).** Metabolic pools associated with monoterpene biosynthesis in higher plants. *Phytochemistry*, 16: 79-83.
- Amara A.A., El-Masry M.H., Bogdady H.H. (2008).** Plant crude extracts could be the solution: Extracts showing in vivo antitumorigenic activity, *Pak J. Pharm Sci.*, 21: 159–71.
- Aravodis E. (2005).** Antioxydant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 4 (2):128-133.
- Archetti M. (2000).** The origin of autumn colours by coevolution. *Journal of Theoretical Biology*, 205: 625-630.
- Aref H.L., Salah K.B., Chaumont J.P., Fekih A., Aouni M., Said K. (2010).** In vitro antimicrobial activity of four *Ficus carica* latex fractions against resistant human pathogens (antimicrobial activity of *Ficus carica* latex). *Pak J. Pharm. Sci.*, 23: 53–8.
- Asakawa Y. (2008).** Liverworts—potential source of medicinal compounds. *Curr. Pharm. Des.*, 14: 3067–88.
- Awad A.B., Fink C.S. (2000).** Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action. *J. Nutr.*, 130: 2127–30.
- Aya I., Tatsuya K., Hiroyuki S., Nobuhiro S., Yoshihiro O., Nobuyuki K., Yoshie K. (2008).** Constitutive expression of bergaptol O-methyltransferase in *Glehnia littoralis* cell cultures. *Plant Cell Rep.*, 28: 257-265.
- Bailly F., Maurin C., Teissier H., Vezin H., Cotelle P. (2004).** Antioxidant Properties of 3-Hydroxycoumarin Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 12: 5611-5618.
- Baskin J.M., Ludlow C. J., Harris T. M., Wolf F.T. (1967).** «Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subcaulis* (Leguminosae).» *Phytochemistry*, 6: 1209-1213.
- Becke A.D. (1988).** *Phys. Rev. A.* 38(6): 3098-3100.
- Becke A.D. (1993).** *J. Chem. Phys.*, 98(7): 5648-5652.
- Bekro J.A.M., Konan K.M., Békro Y. A., Djié Bi M.G., Zomi Bi T.J., Mambo V., Boua B.B. (2008).** Phytocompounds of the extracts of four medicinal plants of Cote D'ivoire and assensment of their potential antioxidant by thin layer chromatography. *Euro. Journal Publishing*, 24(2): 219-228.

- Ben-Noun L.L. (2003).** Figs the earliest known ancient drug for cutaneous anthrax. *Ann Pharmacother.*, 37: 297–300.
- Beretz A. Cazenave J.P. (1988).** The effects of flavonoids on blood-vessel wall interaction, p. 187-200. In : Cody, V.; Middleton, E. Jr.; Harbone, J. B.; Beretz, A. *Plant flavonoids in Biology and Medicine*. Alan, R. Liss, new-York.
- Berke B., Chèze C., Vercauteren J., Deffieux G. (1998).** Bisulfite addition to anthocyanins: revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters*, 39:5771-5774.
- Bharat B., Aggarwal (MD Anderson Cancer Center) et al. (2006).** Review: From traditional Ayurvedic medicine to modern medicine: Identification of therapeutic targets for suppression of inflammation and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*, 10(1): 87-118.
- Block G., Patterson B., Subar A. (1992).** Fruit, vegetable, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18(1): 1-29.
- Bohlooli S., Mohebipoor A., Mohammadi S., Kouhnavard M., Pashapoor S. (2007).** Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts (*Verruca vulgaris*) vs. Cryotherapy. *Int. J. Dermatol.*, 46: 524–6.
- Bohm H., Boeing H., Hempel J. (1998).** Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37(2): 147-63.
- Bouic P.J., Lamprecht J.H. (1999).** Plant sterols and sterolins: A review of their immunomodulating properties. *Altern. Med. Rev.*, 4: 170–7.
- Bourgaud F., Allard N., Guckert A., Forlot P. (1989).** Natural sources of furocoumarins (psoralens). Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities. T. B. Fitzpatrick, Forlot, P., Pathak, M.A., Urbach, F. Paris, John Libbey Eurotext: Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities.
- Bourgaud F., Hehn A., Larbat R., Doerper S., Gontier E., Kellner S., Matern U. (2006).** "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes.". *Phytochemistry Reviews*, 5: 293-308.
- Bouvier F., Rahier A., Camara B. (2005).** Biogenesis molecular regulation and function of plant isopropanoids. *Progress in lipid research*, 44: 357-429.
- Boveris A., Chance B. (1973).** The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 134: 707-716.
- Britton G. (1995).** Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9: 1551–1558.
- Brouillard R. (1993).** The Flavonoids, Advances in research since 1986, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, pp: 525-538.

- Brouillard R., Dubois J.E. (1977).** Mechanism of Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media. *Journal of the American Chemical Society*, 99: 1359-1364.
- Brown S. A. (1970).** "Biosynthesis of furanocoumarins in parnsips." *Phytochemistry*, 9: 2471-2475.
- Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> édition Tec et Doc (Ed). Paris, pp: 389-617.
- Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc (Ed). Paris, 658p.
- Buchanan R.A., Swanson C.L., Weisleder D., Cull I.M. (1979).** *Phytochemistry*, 18: 1069-1071.
- Canal J.R., Torres M.D., Romero A., Perez C. (2000).** A chloroform extract obtained from a decoction of *Ficus carica* leaves improves the cholesterolaemic status of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta. Physiol. Hung.*, 87: 71–6.
- Cavar S., Kovac F., Maksimovic M. (2009).** Synthesis and antioxidant activity of selected 4-methylcoumarins. *Food Chemistry*, 117:135-142.
- Cavin A. (1999).** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antixydantes et antiradicalaires, *Tinospora rispa* (Menispermaceae); *Merremia emarginata* (convolvulaceae) et *Orphea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat. Lausanne, 243p.
- Chan W. K., Nguyen V. P., Harris R. Z. (1998).** "Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine." *Life Sciences*, 62(10): 135-142.
- Chandra A. K., Nam P.-C., Nguyen M. T. (2003).** *J. Phys. Chem. A*, 107: 9182 – 9188.
- Chatterjee D., Chakraborty D.P. (1968).** Chemical examination of *Ficus bengalensis*. *J. Indian Chem. Soc.*, 45: 285.
- Cheng Z., Ren J., Li Y., Chang W., Chen Z. (2003).** *J. Pharm. Sci.*, 92(3):475-484.
- Chunyan C., Bo S., Ping L., Jingmei L., Ito Y. (2009).** Isolation and purification of psoralen and bergapten from *Ficus carica* L. leaves by high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 32: 136–143.
- Conforti F., Menichini G., Zanfini L., Tundis R., Statti G. A., Provenzano E., Menichini F., Somma F., Alfano C. (2012).** Evaluation of phototoxic potential of aerial components of the fig tree against human melanoma. *Cell Prolif.*, 45: 279–285.
- Cooley A.M., Carvalho G., Willis J.H. (2008).** Is floral diversification associated with pollinator divergence? Flower shape, flower colour and pollinator preference in Chilean *Mimulus*. *Annals of Botany*, 101: 641-650.

- Dean F. M. (1952).** Naturally occurring coumarins. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe*: 291.
- Dehgan B. (1998).** *Landscape Plants for Subtropical Climates*. University Press of Florida, Gainesville, FL. xxxii, 638 pp.
- Del Caro A., Piga A. (2008).** Polyphenol composition of peel and pulp of two Italian fresh fig fruitd cultivars (*Ficus carica* L.). *Eur. Food Res. Technol.*, 226: 715-719.
- Deleanu N.T. (1916).** The peptolytic enzyme of *Ficus carica*. *Bull Sect. Sci. Acad. Roum.*, 4:345-54.
- Devang J. Pandya, Indermeet S. Anand (2011). Isolation and high-performance thin layer chromatographic estimation of Lupeol from *Oxystelma esculentum*. *Pharmaceutical methods* | Volume: 2 | Issue: 2 | pp: 99-105.
- Dewar M.J.S., Zoebisch E.G., Healy E.F., Stewart, J.J.P. (1985).** AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.*, 107(13): 3902-3909.
- Dey P.M., Harborne J.B. (1991):** *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids. Academic press.
- Dioscorides P. (1902).** Des Pedanios Dioscurides aus Anazarbos Arzneimittellehre in fünf Büchern, trans. and comm. *J. Berendes. Stuttgart: Ferdinand Enke*.
- Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B. (2005).** Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research?. *New Phytologist*, 165: 9-28.
- Dubois P. (1968).** *Plastiques modernes*, Tome I, Masson et Cle Editeurs, Paris, pp: 421.
- Duenas Paton M., Perez J. J., Santos-Buelga C., Escribano M. T. (2008).** Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 : 107-115, Estados Unidos de América (USA).
- Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A. (2003).** Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc.Nutr.Soc.*, 62: 599-603.
- El-Mofty A. M. (1948).** A Preliminary clinical report on treatment of Leucoderma with Ammi Majus Linn. *J. Roy. Egypt. Med. Association*, 31: No. 8: 651.
- Escribano-Baillon M. T., Santos-Buelga C. J. (2003).** Chapter 1, Analysis of polyphenols. In *Methods in Polyphenols Analysis*, edited by Santos-Buelga, C; Williamson, G.
- Evans P., Halliwell B. (1999).** Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 28: 19-40.
- Fahmy I.R., Abu-Shady H. (1947).** "Ammi majus L.: pharmacological study and isolation of a crystalline constituent, ammoidin." *Q. J. Pharm. Pharmacol.*, 20: 281-291.

- Fang C. (2007).** [Grape wine prepared from grape and fig]. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu. *Chinese Patent Application: CN 2006-10052538 20060719.*
- Farag S.F. (2005).** Phytochemical and pharmacological studies of *Ficus benjamina* L. leaves. *Mansoura J. Pharm. Sci.* 21: 19–36.
- Fimognari C., Berti F., Cantelli-Forti G., Hrelia P. (2004).** Effect of cyanidine 3-Oglucopyranoside on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environ. Mol. Mutagen.*, 43: 45-52.
- Fitzpatrick T.B., Pathak M.A. (1959).** Historical aspects of methoxypsoralen and other furocoumarins. *The Journal of Investigative Dermatology*, 32: 229-231.
- Flaishman M.A., Rodov V., Stover E. (2008).** The fig: Botany, horticulture, and breeding. *Hortic Rev.*, 34: 113–96.
- Fossen T., Andersen O. M. (1999).** Delphinidin 3'-galloylgalactosides from blue flowers of *Nymphaea caerulea*. *Phytochemistry*, 50: 1185.
- Fouin-Fortunet H., Tinel M., Descatoire V., Letteron P., Larrey D., Geneve J., Pessayre D. (1986).** Inactivation of cytochrome P-450 by the drug methoxypsoralen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 236: 237-247.
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B. et al. (2003).** Gaussian 03. Gaussian, Inc., Pittsburgh.
- Fukui K. (1975).** Theory of Orientation and Stereoselection. *Springer Verlag*- New York pp.39.
- Gilani A.H., Mehmood M.H., Janbaz K.H., Khan A.U., Saeed S.A. (2008).** Ethnopharmacological studies on anti-spasmodic and antiplatelet activities of *Ficus carica*. *J. Ethno. pharmacol.*, 119: 1-5.
- Gonashvili S.G. (1964).** [Proteolytic properties of the latex from the fig tree (*Ficus carica* L.)]. *Vopr Pitan.*, 23: 26–30.
- Gonashvili S.G., Gonashvili M.S. (1968).** Proteolytic enzymes of some Georgian plants. *Rastitel'nye Resursy*, 4: 356–65.
- Govindarajan R., Singh D.P., Rawat A.K. (2008).** Validated reversed-phase column high-performance liquid chromatographic method for separation and quantification of polyphenolics and furocoumarins in herbal drugs. *J. AOAC Int.*, 91: 1020–4.
- Griffin S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach, D.N. (1999).** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and fragrance journal*, 14: 322-332.
- Groopman J.D., Kensler T.W., Wild C.P. (2008).** Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu. Rev. Public Health*, 29:187–203.
- Guingard J. (1996).** Biochimie végétale. Lavoisier, Paris, 175-192 p.

- Hai M.A., Sutradhar R.K., Ahmad M.U. (1991).** Chemical constituents of *Ficus glomerata* Roxb (Moraceae). *J. Bangladesh Chem. Soc.*, 4: 247–50.
- Hale A.L., Meepagala K.M., Oliva A., Aliotta G., Duke S.O. (2004).** "Phytotoxins from the Leaves of *Ruta graveolens*". *J. Agric. Food Chem.*, 52(11): 3345-3349.
- Halgren T.A. (1996).** *J. Comput. Chem.*, 17: 490-519.
- Harborne J. B. (1967),** Comparative Biochemistry of the Flavonoids, Academic Press, New York, 1-30.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2001).** Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 18: 310-333.
- Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T. (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66:2047-2055.
- Havsteen B. (1983).** Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.*, 32:1141–1148.
- Hehn A. (2007).** Thèse de doctorat : Métabolisme secondaire : les cytochromes P 450 s acteurs de l'adaptation des plantes à leur environnement, Strasbourg.
- Hemmatzadeh F., Fatemi A., Amini F. (2003).** Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet Public Health*, 50: 473–6.
- Henseler T., Wolff K., Honigsmann H., Christophers E. (1981).** "Oral 8-methoxypsoralen photochemotherapy of psoriasis. The Europea PUVA study: a cooperative study among 18 European centres." *Lancet*, 1: 853-857.
- Heskel N. S., Amon R. B., Storrs F. J., White C. R. (1983).** "Phytophotodermatitis due to *Ruta graveolens*." *Contact Dermatitis*, 9(4): 278-280.
- Hill R.A. (1993).** In the chemistry of natural products, 2nd ed. (Ed.R.H.Thomson), Blackie, Glasgow.124.
- Hill R.A. (2002).** dictionary of natural products on CD-ROM, Ed. version 10 :2. Chapman et Hall, CRC, New york.
- Hoffman L. (2003).** Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 245p.
- Hoult J. R. S., Paya M. (1996).** Pharmacological and biochemical action of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacol.*, 27: 713-722.

- Housman T. S., Rohrback J. M., Fleischer A. B. J., Feldman S. R. (2002).** "Phototherapy utilization for psoriasis is declining in the United States." *Journal of The American Academy of Dermatology*, 46(4): 557-559.
- Hsiou-Y.D., Yang-ch.W., Hang-ch.L. (2000).** *Journal of the chinese chemical society*, 47: 561-566.
- Hu S.G., Li L., He X.W. (2005).** Solid-phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1062:31-37.
- Huang M.T., Ferraw T. (1991).** Phenolic compound in food and cancer prevention. Phenolic compounds in food and their effects on health, 3:83.
- Hyun-J., Hyun J.K., Hyang S. C. (2007).** Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. *Life sciences*, 80: 4AS835-841.
- Idem (1934).** Cytological and morphological studies in the genus *Ficus*. II. Chromosome number and morphology in thirty-one species. *Univ. Calif. Publ. Bot.*, 17: 61–74.
- Innocenti G., Bettero A., Caporale G. (1982).** Determination of the coumarinic constituents of *Ficus carica* leaves by HPLC. *Farmaco Sci.*, 37: 475–85.
- Innocenti G., Dall'Acqua F., Guiotto A., Rodighiero P., Caporale G. (1981).** "The role of hydroxymarmesins in the biogenesis of O-alkylfurocoumarins." *Il Farmaco Edizione scientifica*, 36(7): 614-621.
- IRA J. CONDIT (1955).** – Fig varieties. A Monograph. *Journal of Agricultural Science*. Published by the California Agricultural Experiment Station. Vol. 23, N° 11.
- Jain R., Jain S., Jain S.C. (2007).** Secondary metabolites from *Ficus carica* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. A Phys. Sci.*, 77: 99–100.
- Jeong M. R., Cha J. D., Lee Y. E. (2005).** Antibacterial activity of Korean Fig (*Ficus carica* L.) against food poisoning bacteria. *Korean J. Food. Cookery Sci.*, 21:84-93.
- Jones P. J., AbuMweis S. S. (2009).** Phytosterols as functional food ingredients: Linkages to cardiovascular disease and cancer. *Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 12: 147–51.
- Juntilla O. (1976).** Allelopathic inhibitors in seeds of *Heracleum laciniatum*. *Physiologia plantarum*, 36: 374-378.
- Justain Raj S., Joseph B. (2011).** Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn –An overview. *Int. Journal of Pharm. Tech. Research.*, 1: 08-12.
- Kadar A., Robert L., Miskulin M., Tixier J.M., Brechemier D., Robert A.M. (1979).** Influence of anthocyanoside treatment on the cholesterol-induced atherosclerosis in the rabbit. *Parvo Arterielle*, 5: 187-208.

- Kamei H. et al. (1995).** Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest. Medline*, 13: 590– 594.
- Kawase M., Sakagami H., Motohashi N., Hauer H., Chatterjee S.S., Spengler G. (2005).** "Coumarin derivatives with tumor-specific cytotoxicity and multidrug resistance reversal activity." *In Vivo*, 19: 705-711.
- Khachik F., Beecher G.R., Smith J., Lutein C., (1995).** lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J. Cell. Biochem. (Suppl. 22)*: 236–246.
- Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin (2005).** Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15: 3584-3587.
- Khan M. S.Y., Siddiqui A. A., Javed K. (1990).** Chemical investigation of the leaves of *Ficus hispida*. *Indian J. Nat. Prod.* 6: 14–15.
- Kim J.S., Kim Y.O., Ryu H.J., Kwak Y.S., Lee J.Y., Kang H. (2003).** Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol.*, 44: 412–9.
- Kirkiacharian S., Bakhchinian R., Chidiak H., Mazmanian M., Planche C. (1999).** "Two New Flavonoids and Other Constituents in Licorice Root; Their Relative Astringency and Radical Scavenging Effects," *Annales Pharmaceutiques Françaises*. Vol. 57, No. 5: 251-259.
- Kislev M.E., Hartmann A., Bar-Yosef O. (2006).** Early domesticated fig in the Jordan Valley. *Science*, 312: 1372–5.
- Kitajima J., Arai M., Tanaka Y. (1994).** Triterpenoid constituents of *Ficus thunbergii*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 42: 608–10.
- Klaunig J.E., Kamendulis L.M. (2004).** The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44: 239-267.
- Klein E., Lukes V., Cibulková Z.P.J. (2006).** *TEOCHEM: J. Mol. Struct.*, 758(2-3): 149-159.
- Klein E., Lukes V. (2006).** *Chem. Phys.*, 330: 515-525.
- Ko F.N., Cheng Z. J., Lin C.N., Teng C.M., (1998).** Scavenger and antioxydant properties of prenylflavones isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Free Radical Biology and Medecine*, 25:160-168.
- Koes R.E., Quattrocchio F., Mol J.N.M. (1994).** The Flavonoid Biosynthetic-Pathway in Plants - Function and Evolution. *Bioessays*, 16: 123-132.
- Koleckar V., Jahodar L., Opletal L., Macakova K., Cahlikova L., Jun D., Kuca K. (2013).** Evaluation of the antioxidant activity of several naturally occurring coumarins and their synthesized analogues by "ferric reducing antioxidant power" assay. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28: 1-6.

- Kostova I. (2007).** Studying plant-derived coumarins for their pharmacological and therapeutic properties as potential anticancer drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*. Vol. 2, No. 12: 1605–1618.
- Kuete V., Metuno R., Ngameni B., Tsafack A. M., Ngandeu F., Fotso G. W., Bezabih M., Etoa F., Ngadjui B. T., Abegaz B. M., Penlap Beng V. J. (2007).** *Ethnopharmacology*, 112, 531.
- Lacaille-Dubois M.A., Wagner H. (1996).** Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica*, 143(6): 555-62.
- Langenheim J.H.(1990).** *Am. Scientist*, 78:16-24.
- Lansky E.P., Harrison G., Fromm P., Jiang W.G. (2005).** Pomegranate (*Punica granatum*) pure chemicals show possible synergistic inhibition of human PC-3 prostate cancer cell invasion across Matrigel. *Invest New Drugs*, 23(2):121-2.
- Lansky E.P., Helena M.P. (2011).** Figs The Genus *Ficus* Traditional Herbal Medicines for Modern Times. Volume 9, by Taylor and Francis Group, LLC New York USA.
- Lansky E.P., Paavilainen H.M., Pawlus A.D., Newman R.A. (2008).** *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119:195-213.
- Leopoldini M., Marino T., Russo N., Toscano M. (2004).** *J. Phys. Chem. A.*, 108: 4916-4922.
- Lerner A. B., Denton C. R., Fitzpatrick T. B. (1953).** "Clinical and experimental studies in vitiligo." *Journal of investigative Dermatology*, 20: 299-308.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., chen F., Tian Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102:771-776.
- Liu R. H. (2003).** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J. Clin. Nut.*, 78 (3): 517S-20S.
- Luthria D.L., Mukahapadhyay S. (2006).** Influence of sample preparation on Assay of phenolic acids from eggplant. *Agric. Food. Chem.*, 54: 41-47.
- Mahato S. B., Kundu A. P. (1994).** <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features, *Phytochemistry*, 37: 1517-1575.
- Manetas Y. (2006).** Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red? *Flora*, 201: 163-177.
- Manitto P. (1981):** Biosynthesis of natural products. John Willey et sons. New York.
- Marazzoni P., Bombardelli E. (1996).** *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, 68: 3-28.

- Marazzoni P., Magistretti M. J. (1990).** Activity of mystocyan, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. *Fitoterapia*: 61,13.
- Markham K. R. (1982).** Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London, pp: 36-51.
- Maruyama S., Miyoshi S., Tanaka H. (1989).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric Biol Chem.*, 53: 2763–7.
- Mavlonov G.T., Ubaidullaeva K.A., Rakhmanov M.I., Abdurakhmonov I.Y., Abdukarimov A. (2008).** Chitin-binding antifungal protein from *Ficus carica* latex. *Chem. Nat. Compd.*, 44: 216–9.
- Mc Cloud E. S., Berenbaum M. R. et Tuveson R. W. (1992).** "Furanocoumarin content and phototoxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri*) foliage exposed to enhanced ultraviolet-B (UVB) irradiation." *Journal of Chemical Ecology* , 18(7): 1125-1137.
- McNaught A. D., Wilkinson A. (1997).** Compendium of Chemical Terminology: IUPAC Recommendations (online version), 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford.
- Meng Z., Wang Y., Ji J., Zhong W. (1996).** Studies of chemical constituents of *Ficus carica* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 27: 202–4.
- Milesi S., Massot B., Gontier E., Bourgaud F., Guckert A. (2001).** "*Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins." *Plant Science*, 161: 189-199.
- Murakami A., Tanaka T., Lee J.Y., Surch Y.J., Kim H.W., Kawabata K., Nakamura Y., Jiwajinda S., Ohigashi H. (2004).** Zerumbone, A sesquiterpene en subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International journal of cancer*, 110: 481-490.
- Neal J.J., Wu D. (1994).** "Inhibition of insect cytochromes P450 by furanocoumarins". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 50: 43-50.
- Neal M.C. (1965).** In Gardens of Hawai'i. Bernice P. Bishop Museum, Special Publication 40, Honolulu, HI.
- Nigam N., Prasad S., Shukla Y. (2007)** « Preventive effects of lupeol on DMBA induced DNA alkylation damage in mouse skin », *Food Chem. Toxicol.*, vol. 45, n° 11, p. 2331–5 (DOI:10.1016/j.fct.2007.06.002 [archive]) PMID : 17637493 [archive].
- Nordberg J., Arner E.S.J. (2001).** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 31: 1287-1312.
- Ojala T., Remes S., Haansuu P., Vuorela H., Hiltunen R., Haahtela K., Vuorela P. (2000).** "Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland." *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2): 299-305.

- Oliveira A.P., Silva L.R., Ferreres F. (2010).** Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* latex. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 3393–8.
- Oliveira A.P., Valentao P., Pereira J.A., Silva B.M., Tavares F., Andrade P.B. (2009).** *Ficus carica* L.: metabolic and biological screening. *Food Chem. Toxicol.*, 47: 2841-2846.
- Pant R., Srivastava S.C. (1966).** Proteolytic activity of some plant latex: Effect of time variation. *Curr. Sci.*, 35: 42–3.
- Parrish J. A., Fitzpatrick T. B., Pathak M. A., Tanenbaum L. (1974).** "Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light." *N. Engl. J. Med.*, 291: 1207-1211.
- Parveen M., Ghalib R.M., Mehdi S.H., Rehman S.Z., Ali M. (2009).** A new triterpenoid from the leaves of *Ficus benjamina* (var. *comosa*). *Nat. Prod. Res.*, 23: 729–36.
- Pastre J., Priymenko N. (2007).** Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Med. Vet.*, 158(4): 180-189.
- Patel Rajesh M., Patel Natvar J. (2011).** *In vitro* antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmacy Education and Research*. 1:52-68.
- Paterson R., Bridge P. D. (1994).** Biochemical techniques for filamentous fungi. *IMI Technical Handbooks: No1*, International Mycological Institute: U.K.
- Pathak M.A., Farrington D.J., Fitzpatrick T.B. (1962).** "The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants". *Journal of investigative Dermatology*, 39: 225-299.
- Pathak M.A. Fitzpatrick T.B. (1992).** The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *Journal of Photochemical and Photobiology B: Biology*, 14: 3-22.
- Pereira L., Villinger F., Wulff H., Sankaranarayanan A., Raman G., AA A. (2007).** "Pharmacokinetics, toxicity, and functional studies of the selective kv1.3 channel blocker 5-(4-Phenoxybutoxy)Psoralen in rhesus Macaques." *Experimental Biology and Medicine*, 232: 1338-1354.
- Peter Bauwens (2008).** Figues de tous pays. Edisud.
- Plumas J., Drillat P., Jacob M., Richard M.J., MC F.(2003).** "Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations." *Bulletin Du Cancer*, 90: 763-770.
- Prasad S., Kalra N., Singh M., Shukla Y. (2008)** «Protective effects of lupeol and mango extract against androgen induced oxidative stress in Swiss albino mice », *Asian. J. Androl.*, vol. 10, n° 2, p. 313–8.
- Puech A.A., Rebeiz C.A., Crane J.C. (1976).** Pigment changes associated with application of ethephon ((2-chloroethyl)phosphonic acid) to fig (*Ficus carica* L.) fruits. *Plant Physiol.*, 57: 504–9.

- Puech A.A., Rebeiz C.A., Catlin P.B., Crane J.C. (1975).** Characterization of anthocyanins in fig (*Ficus carica* L.) fruits. *Journal of Food Science*, 40: 775–780.
- Ramarathnam N., Osawa T. (1996).** International conference on food factors: Chemistry and cancer prevention. *Trend Food Sci. Technol.*, 7: 64-66.
- Rausher M.D. (2008).** Evolutionary transitions in floral color. *International Journal of Plant Sciences*, 169: 7-21.
- Redoyal L.M., Beltram M., Saucho R., Olmedo D.A. (2005).** Bioorganic and medicinal chemistry Letters. *Fitoterapia*, 15: 4447-4450.
- Rehman A., Nouroozj., Moller W. (1999).** Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *EEBS*, 488:120-122.
- Repcak M., Imrich J., Fanekova M. (2001).** Umbelliferone, a stress metabolite of *Chamomilla recutita* (L) Rauschert. *Plant Physiol.*, 158: 1085-1087.
- Ribereau-Gayon P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 7: 933-956.
- Rivas-Gonzalo J. (2003).** Analysis of polyphenols. In *Methods in Polyphenols Analysis*; Santos-Buelga, C; Williamson, G Eds.; Athenaeum Press Ltd., RSC, UK, pp 9598: 338-358.
- Rodríguez-Granados M. T., Pereira-Rodríguez M. J., Vazquez-Vizoso F. L. (2009).** [Therapeutic effectiveness of psoralen-UV-A bath therapy in psoriasis]. *Actas Dermosifiliogr.*, 100: 212–21.
- Roggero J., Larice J., Rocheville-Divorne C., Archier P., Cohen S. (1988).** Composition anthocyanique des cépages: essai de classification par analyse en composantes principales et analyse factorielle discriminante. *Cahiers scientifiques RFOE n°112*: 277-284.
- Rubnov S., Kashman Y., Rabinowitz R., Schlesinger M., Mechoulam R. (2001).** Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: Isolation and structure elucidation. *J. Nat. Prod.*, 64: 993–6.
- Saeed M.A., Sabir A.W. (2002).** Irritant potential of triterpenoids from *Ficus carica* leaves. *Fitoterapia*, 73: 417–20.
- Saleem M. (2009).** Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *CancerLett.* May 21 [Epub ahead of print].
- Saleem M., Afaq F., Adhami V. M., Mukhtar H. (2004)** « *Lupeol modulates NF-kappaB and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice* », *Oncogene*, vol. 23, n° 30, p: 5203–14 (DOI:10.1038/sj.onc.1207641 [archive]) PMID : 15122342 [archive].

- Santana C.A.R. (2008).** [Topical pharmaceutical composition]. Brazilian Patent Application BR 2006-2051 *Braz. Pedido PI*.
- Santos-Buelga C., Garcia-Viguera C., Tomas-Barberan F.A. (2003).** On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. In: Santos-Buelga, C., Williamson, G.E. (Eds.), *Methods in Polyphenol Analysis*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp: 92–124.
- Sapra B., Jain S., Tiwary A.K. (2008).** Percutaneous permeation enhancement by terpenes: Mechanistic view. *AAPS J.*, 10: 120–32.
- Saraf S.R., Rogers W.J., Mannan M.S. (2003b).** Prediction of reactive hazards based on molecular structure. *Journal of Hazardous Materials*, 98(1-3): 15-29.
- Scharrer A., Ober M. (1981).** Anthocyanosides in the treatment of retinopathies [translated from German]. *Klin Monatsbl Augenheilkd.*, 178: 386-389.
- Schorderet M. (1992).** Pharmacologie. Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. OPU. Alger, 918p.
- Schulz H., Schrader B., Quilitzsch R., Pfeffer S., Kruger H. (2003).** *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2475.
- Sergio A. R., Monica A. N., Maria T. B. (2011).** Effect of different C3-aryl substituents on the antioxidant activity of 4-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorganic and Medicinal J.*, 19: 6233-6238.
- Serraclara A., Hawkins F., Perez C., Dominguez E., Campillo J.E., Torres M.D. (1998).** Hypoglycemic action of an oral fig-leaf decoction in type-I diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.*, 39: 19–22.
- Shukla O.P., Krishna Murti C.R. (1971).** Biochemistry of plant latex. *J. Sci. Ind. Res.*, 30: 640–62.
- Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Di Bilio A. J., Bonomo R. P. (1991).** In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub>. *Free Radical Biol. Med.*, 11:1– 8.
- Singh D., Goel R. K. (2009).** Anticonvulsant effect of *Ficus religiosa*: Role of serotonergic pathways. *J. Ethnopharmacol.*, 123: 330–334.
- Singhal R.K., Saharia H.S. (1980).** Chemical examination of *Ficus glomerata* Roxb. *Herba Hung* 19: 17–20.
- Solomon A., Golubowicz S., Yablłowicz Z. et al. (2006).** Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54:7717–23.
- Spath E. (1937):** Die natürlichen *Cumarine*. *Ber.*, 70A: 83.

- Stanchev S., Hadjimitova V., Traykov T., Boyanov T., Ilia M. (2009).** Investigation of the antioxidant properties of some new 4-hydroxycoumarin derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 44(7):3077-82.
- Stern R.S., Nichols K.T., Vakeva L.H. (1997).** Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet a radiation (PUVA). *The New England Journal of Medicine*, 336: 1041-1045.
- Strack D., Wray V. (1989).** Methods in Plants Biochemistry. Academic Press, New York, Vol.I, p. 325.
- Takahata Y., Prabhakar Y. S. (1991).** *Drug Des. Delivery*, 7: 227.
- Tanaka Y., Sasaki N., Ohmiya A. (2008).** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*, 54: 733-749.
- Teisseire P.J. (1991).** « Chimie de substances odorantes », Tec et Doc, Lavoisier, Paris, pp :9.
- Teixeira D.M., Patão R.F., Coelho A.V., da Costa C.T. (2006).** Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *J. Chromatogr. A*, 1103: 22-8.
- Thuong P.T., Hung T.M., Ngoc T.M., Ha do T., Min B.S., Kwack S.J., Kang T.S., Choi J.S., Bae K. (2010).** Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure-activity relationships. *Phytotherapy Research*, Volume 24, issue 1:101 - 106.
- Timberlake C., Bridle P. (1967).** Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. II. Reactions with sulphur dioxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18: 473-478.
- Torres R., Faini F., et al. (2006).** Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. *Phytochemistry*, 67 (10): 984-7.
- Toufektsian M.C., Lorgeril M., Nagy N., Salen P., Donati M.B., Giordano L., Mock H.P., Peterek S., Matros A., Petroni K., Pilu R., Rotilio D., Tonelli C., de Leiris J., Boucher F., Martins C. (2008).** Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Nutrition*, 138: 747-752.
- Tous J., Ferguson L. (1996).** Mediterranean fruits.. In: J. Janick (ed.), *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, VA. p.416-430.
- Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kawakishi S., Osawa T. (1996).** Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.* Medline, 52:1033-1039.
- Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S.-W., Kawakishi S., Osawa T. (1994).** Antioxidative Activity of the Anthocyanin Pigments Cyanidin 3-O-.beta.-D-Glucoside and Cyanidin. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (11): 2407-2410.

- Ultee A.J. (1922b).** A variety of wax in the latex of *Ficus alba* Reiner. *Bull Jard Bot Buitenzorg* 5: 241–3.
- Valdés L.J. (1994).** *A. J. Psychoactive Drugs*.26, pp: 277-283.
- Vanacker S.A.B.E., Tromp M.N.J.L., Haenen G.R.M.M., Vandervijgh W.J.F., Bast A. (1995).** Flavonoids as Scavengers of Nitric Oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214:755-759 (Medline).
- Van Der Bie V. G. J. (1946).** A Comparison of Different Types of Rubber Obtained from the Same Field Latex. *Rubber Chemistry and Technology*, Vol. 19, No. 3, pp: 848-855.
- Vaya J., Mahmood S. (2006).** Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *Biofactors*, 28:169–75.
- Veberic R., Colaric M., Stampar F. (2008).** Phenolic acids and flavonoids (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Journal of Food Chemistry*, 106:153-157.
- Veberic R., Stampar F. (2005)** Quality of Apple Fruits (*Malus domestica*) from Organic Versus Integrated Production. Montpellier France, 05: 12-16.
- Velicković A.S., Ristić M.S., Veliković D.T., Ilić S.N., Mitić N.D. (2003).** *J. Serb. Chem. Soc.*, 68(6): 435-445.
- Veselovskaya M.V., Garzed M.M., Vinogradova V.I., Khilia P.V.(2006).** Modified Coumarins furocoumarin derivatives of cytisin. *Chemistry of Natural Compound*, 42(3): 277-280.
- Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M, Jang J. (1995).** Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2800-2802.
- Vinson J. A., Zubik L., Bose P., Samman N., Prosch J. (2005):** Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, 24(1): 44-50.
- Vogt T., Jones P. (2000).** Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterisation of a supergen family. *Trends in plant science*, 5:380-386.
- Voora D., McLeod H. L., Eby C., Gage B. F. (2005).** The pharmacogenetics of coumarin therapy. *Pharmacogenomics*, 6(5):503-13.
- Wagner W.L., Herbs D.R., Sohmer S.H. (1999).** Manual of the Flowering Plants of Hawai'i. 2 vols. *Bishop Museum Special Publication 83*. University of Hawai'i and Bishop Museum Press, Honolulu, HI.
- Walker J. A., Tsang W. (1990).** *J. Phys. Chem.*, 94: 3324 –3327.
- Wang G., Wang H., Song Y., Jia C., Wang Z., Xu H. (2004).** Studies on anti-HSV effect of *Ficus carica* leaves. *Zhong Yao Cai* [Journal of Chinese Medicinal Materials], 27:754-6.

- Wang J., Wang X., Jiang S. et al. (2008).** Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 1025–33.
- Whitehead I. M., Threlfall D. R. (2002).** Production of phytoalexins by plant tissue cultures tissue cultures. *Journal of biotechnology*, 26: 63-81.
- Wickens A.P. (2001).** Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology*, 128: 379-391.
- Zhang H.Y., Wang L.F. (2004).** Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* vol. 673 issue 1-3:199-202.
- Williams D.C., Sgarbieri V.C., Whitaker J.R. (1968).** Proteolytic activity in the genus *Ficus*. *Plant Physiol.*, 43: 1083–8.
- Wright J.S., Johnson E.R., DiLabio G.A. (2001).** *J. Am. Soc.*, 123(6): 1173-1118.
- Zand R.S., Jenkins D.J., Diamandis E.P. (2000).** Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat.*, 62: 35–49.
- Zhang K., Jiang R. (2006).** Pharmacological study of *Ficus carica*. *Zhongguo LinchuangKangfu* 10: 226–8.
- Zumwalt J.G., Neal J.J. (1993).** Cytochromes P450 from *Papilio polyxenes*: adaptations to host plant allelochemicals. *Comp. Biochem. Phys.*, 106C:111-118.

## Publications scientifiques

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

(1) Samia Rouaiguia-Bouakkaz, Habiba Amira-Guebailia, Céline Rivière, Jean-Claude Delaunay, Pierre Waffo-Téguo and Jean-Michel Mérillon (2013). *Identification and quantification of furanocoumarins in stem bark and woody part of eight Algerian varieties of Ficus carica L. by RP-HPLC-DAD and RP-HPLC-DAD-MS.* J. Natural Product Communications, Vol. 8, No. 4: 485 - 486.

### Communications nationales (orales)

(1) S. Bouakkaz-Rouaiguia et H. Amira-Guebailia (2009). *SCREENING DE PLANTES COMESTIBLES POUR LEUR COMPOSITION EN POLYPHEOLS A INTERET THERAPEUTIQUE.* Troisième journée de la chimie et ses applications, Université de Guelma.

(2) Rouaiguia Samia ; Amira-Guebailia Habiba (2011). *Dosage de coumarines dans les sarments de Ficus carica L.* Quatrième journée de la chimie et ses applications, Université de Guelma.

### Communications nationales (poster)

(1) S. Bouakkaz-Rouaiguia, H. Amira-Guebailia et al. (2012). *QUANTITATIVE DETERMINATION OF COUMARINS IN FICUS CARICA L. STEM BARK AND WOOD PART BY HPLC-DAD-MS.* Cinquième journée de la chimie et ses applications, Université de Guelma.

### Communications internationales (poster)

(1) Rouaiguia, B.S. ; Amira, G.H. ; Benayahoum, A. and Mérillon, J.M.(2013). *HPLC COUPLED TO MASS SPECTROMETRY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF COUMARINS IN FICUS CARICA L. STEMS* International Symposium on Chemistry for Life, Tlemcen, March 2013.

# *Annexes*

## A. Annexe A

### Fiches signalétiques des différentes variétés de Figues étudiées réalisées par l'Institut Technique des Arbres Fruitières et Viticoles (ITAFV), Medjez Dchich, Skikda

#### \* A1

##### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier

**Variété : *Blanquette (A)***

Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : Etalé
- \* Type de production : Unifère



#### \* A2

##### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier

**Variété: *Zreka (B)***

Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : Etalé
- \* Type de production : Bifère



## \* A3

### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier

**Variété: *Boule d'or* (C)**

#### Caractères physiques de l'arbre

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : Etalé
- \* Type de production : Bifère



## \* A4

### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier

**Variété: *Hamri* (D)**

#### Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : Etalé
- \* Type de production : Unifère



## \* A5

### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier

Variété : *Albo (E)*

Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : Etalé
- \* Type de production : Bifère



## \* A6

### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier

Variété : *Bakor blanc (F)*

Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port Etalé
- \* Type de production : Bifère



## \*A7

### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier :

**Variété : Bakor noir (G)**

Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : E
- \* Type de production : Bifère



## \*A8

### Fiche signalétique de la variété

Espèce : figuier :

**Variété : Cavalière (H)**

Caractères physiques de l'arbre :

- \* Vigueur : Vigoureux
- \* Port : Etalé
- \* Type de production : Bifère

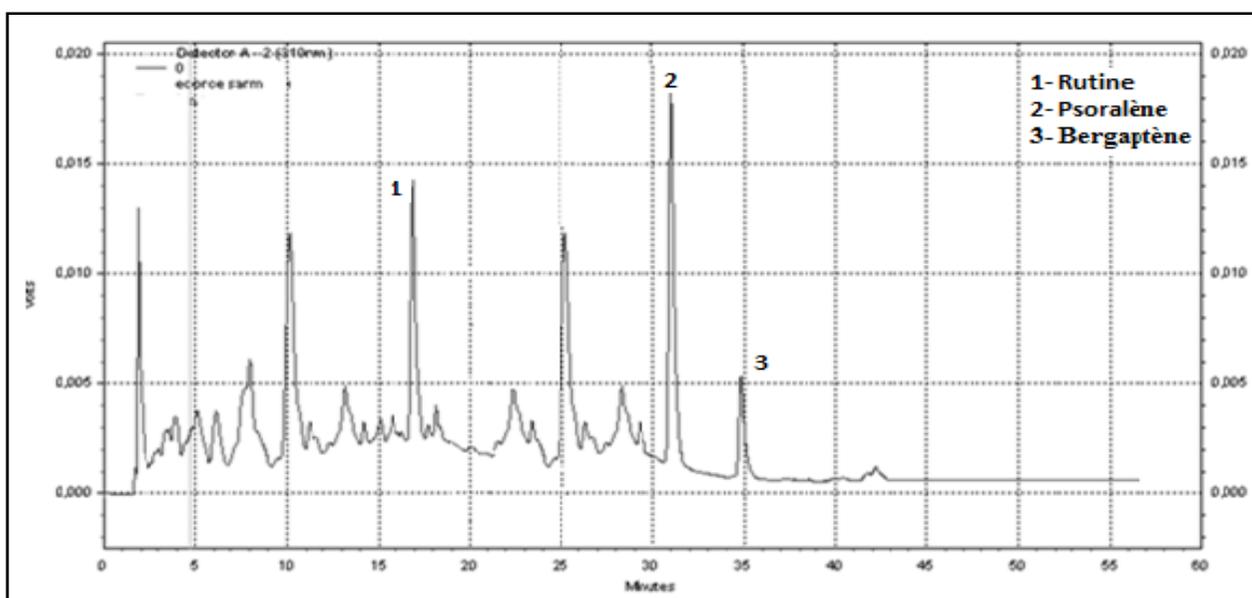


## B. Annexe B

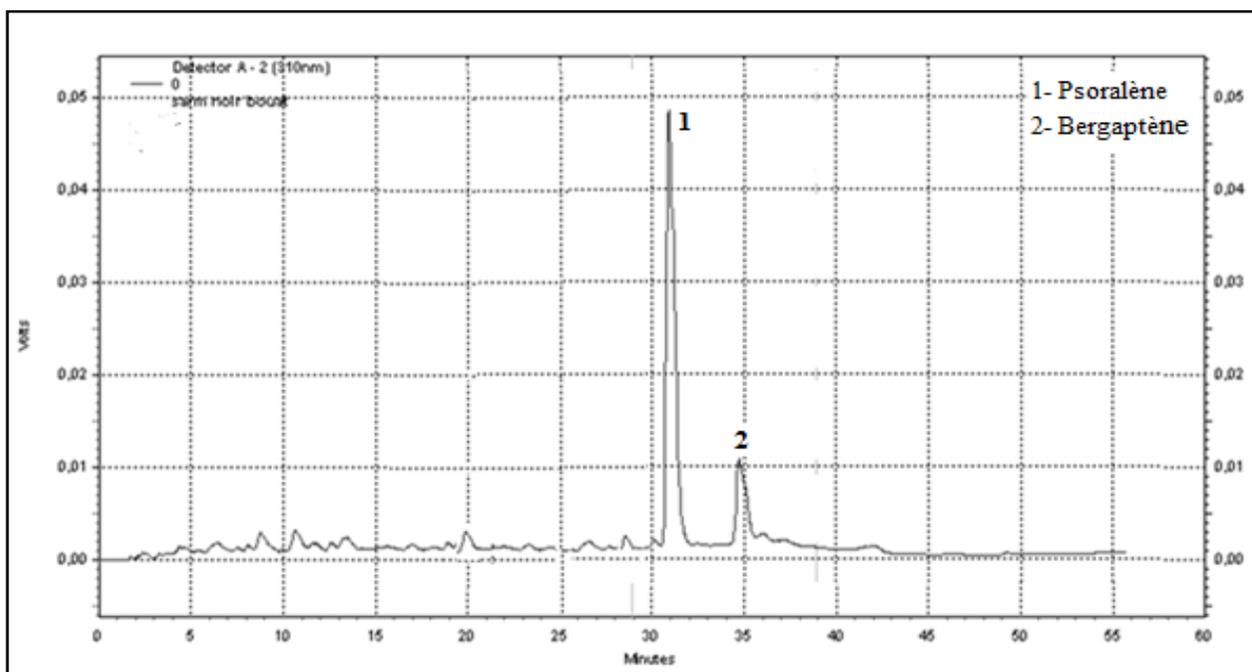
Chromatogrammes HPLC des extraits de sarments et de feuilles des diverses variétés de *Ficus carica* (310nm), appareil HPLC Shimadzu (Tokyo, Japan) équipé d'une colonne Nucleosil-100 C8 (CS-chromatography service GMBH, Germany), (125 mm×4.6 mm ID, taille particule 5 µm)

### B.1. La variété Blanquette (A)

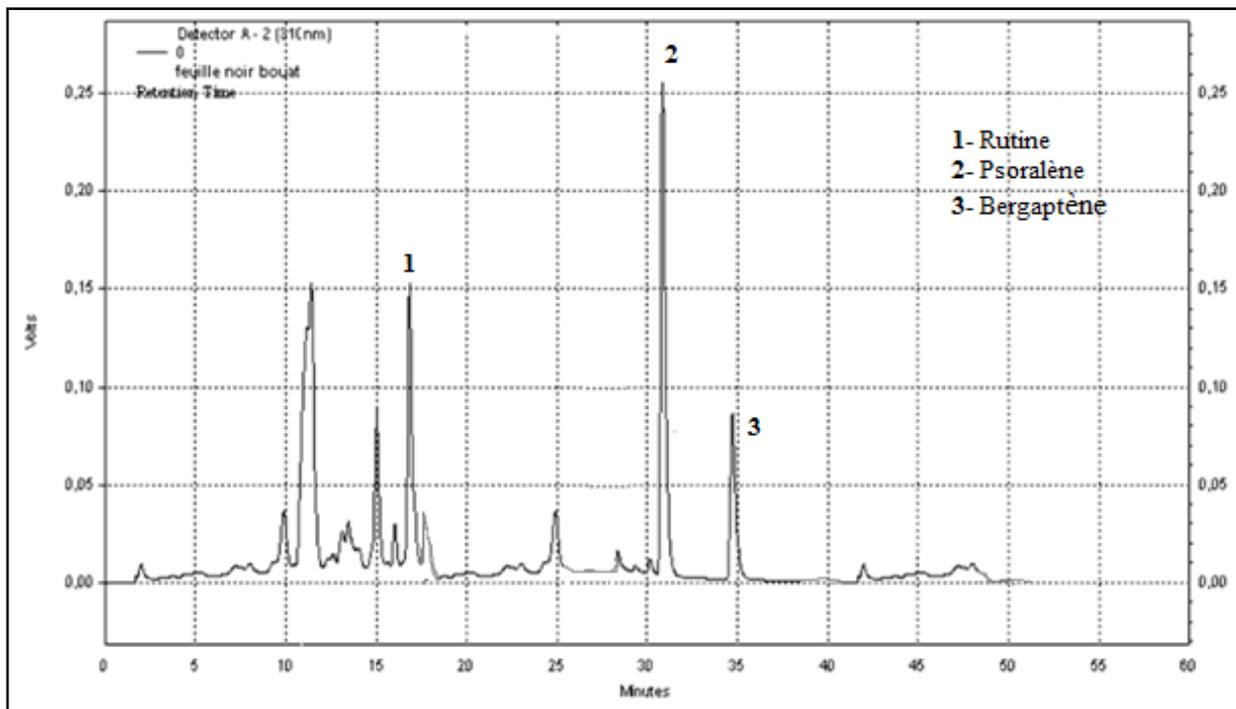
#### 1. Ecorce de sarment



#### 2. Sarment

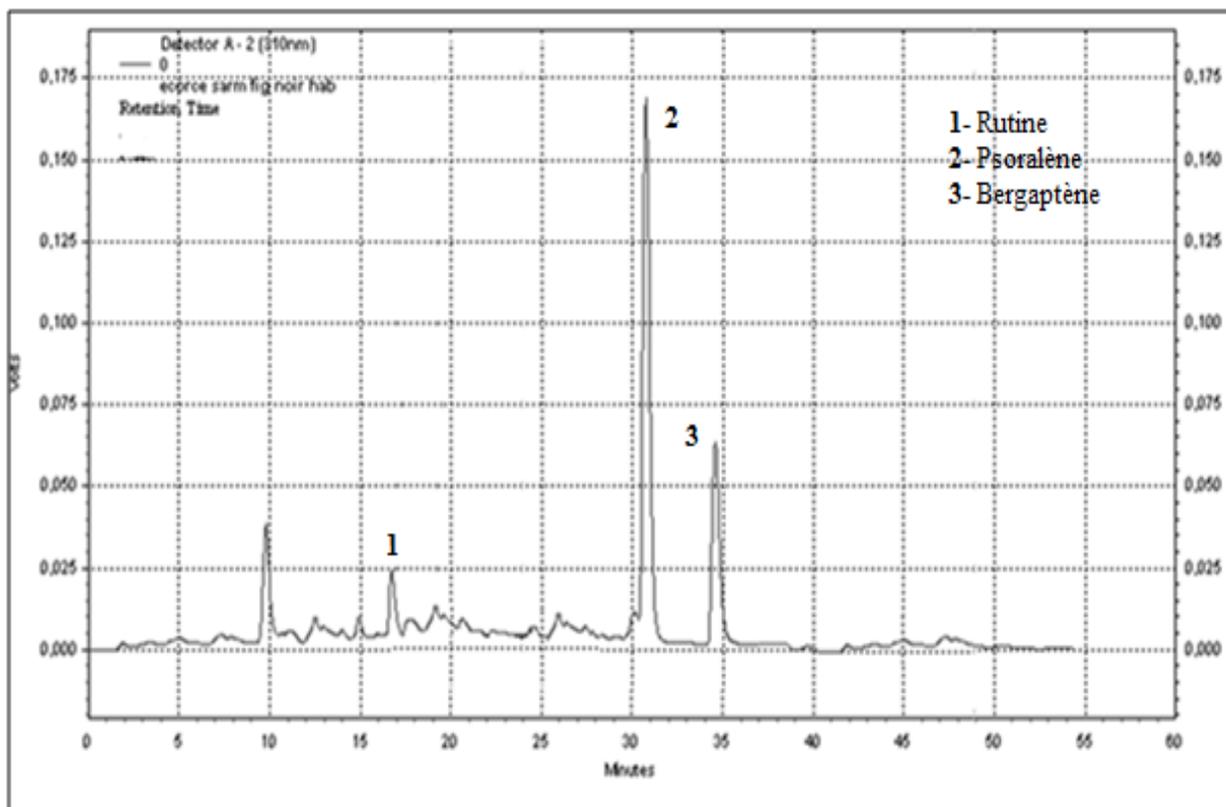


### 3. Feuille

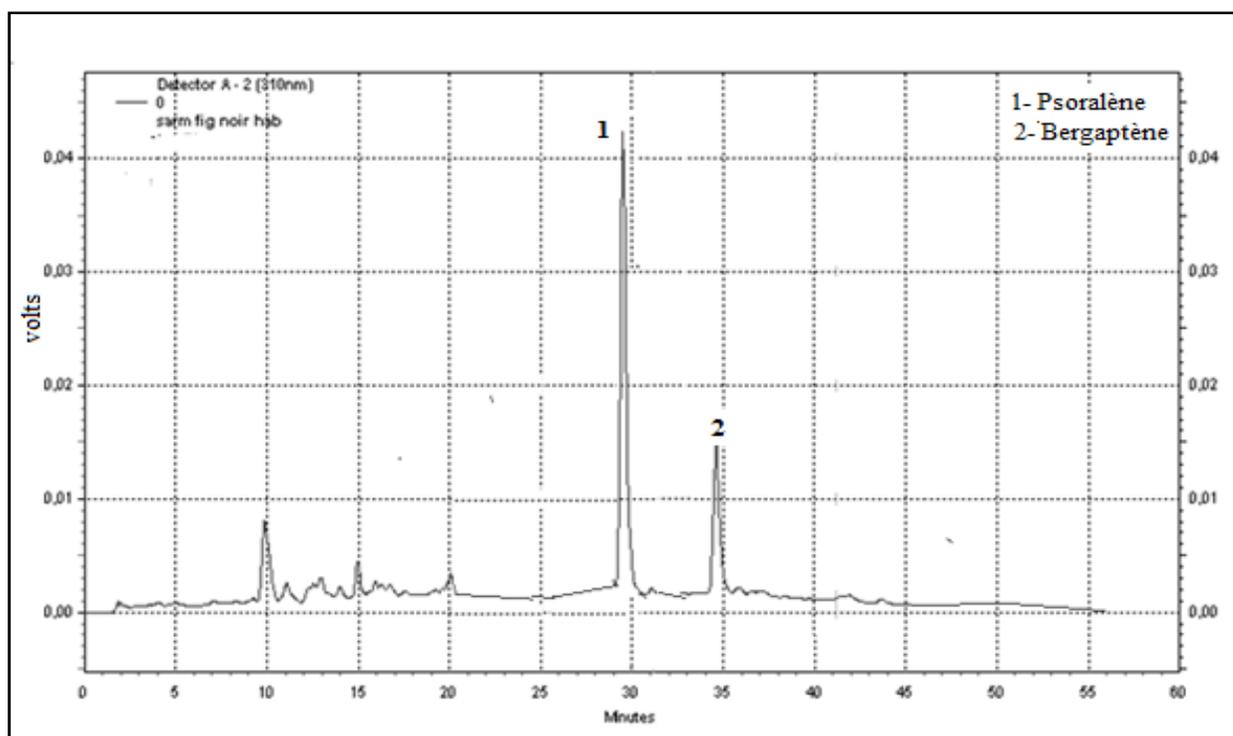


## B.2. La variété Zreka (B)

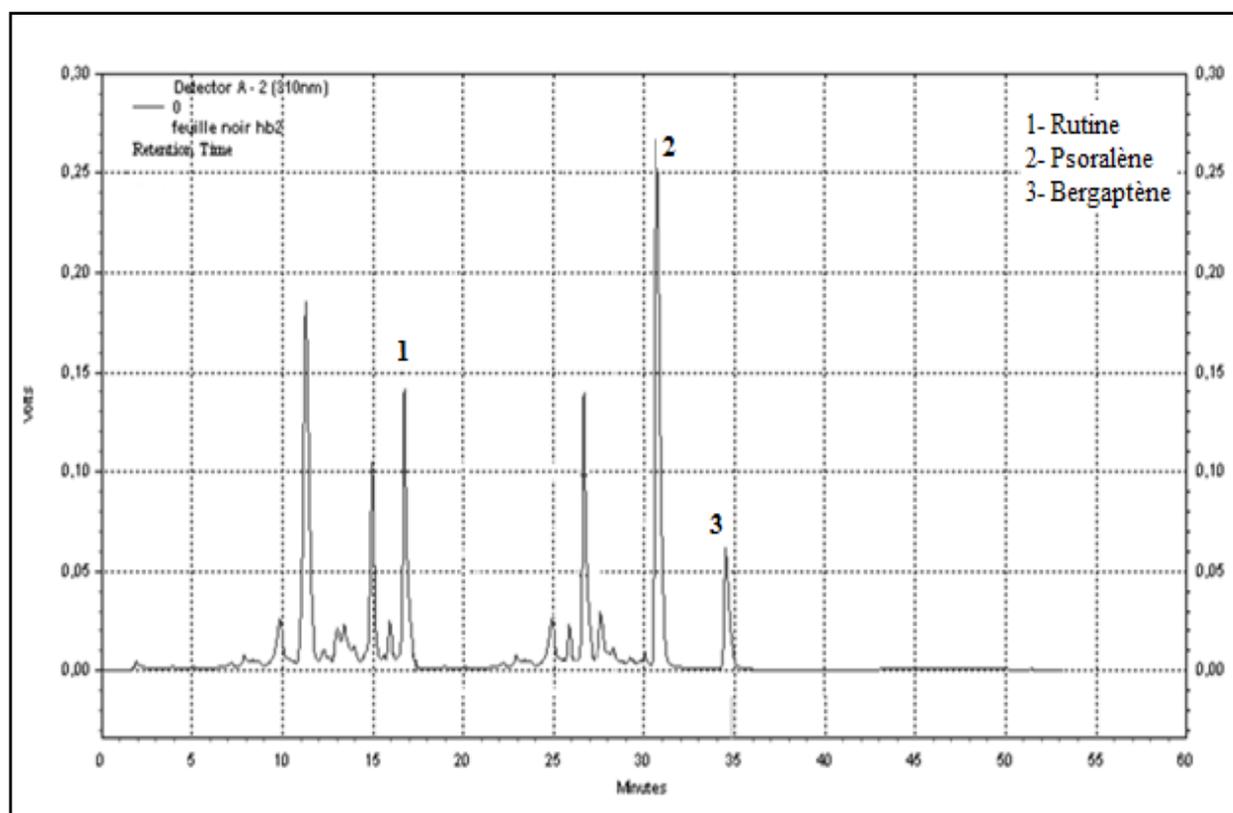
### 1. Ecorce de sarment



## 2. Sarment

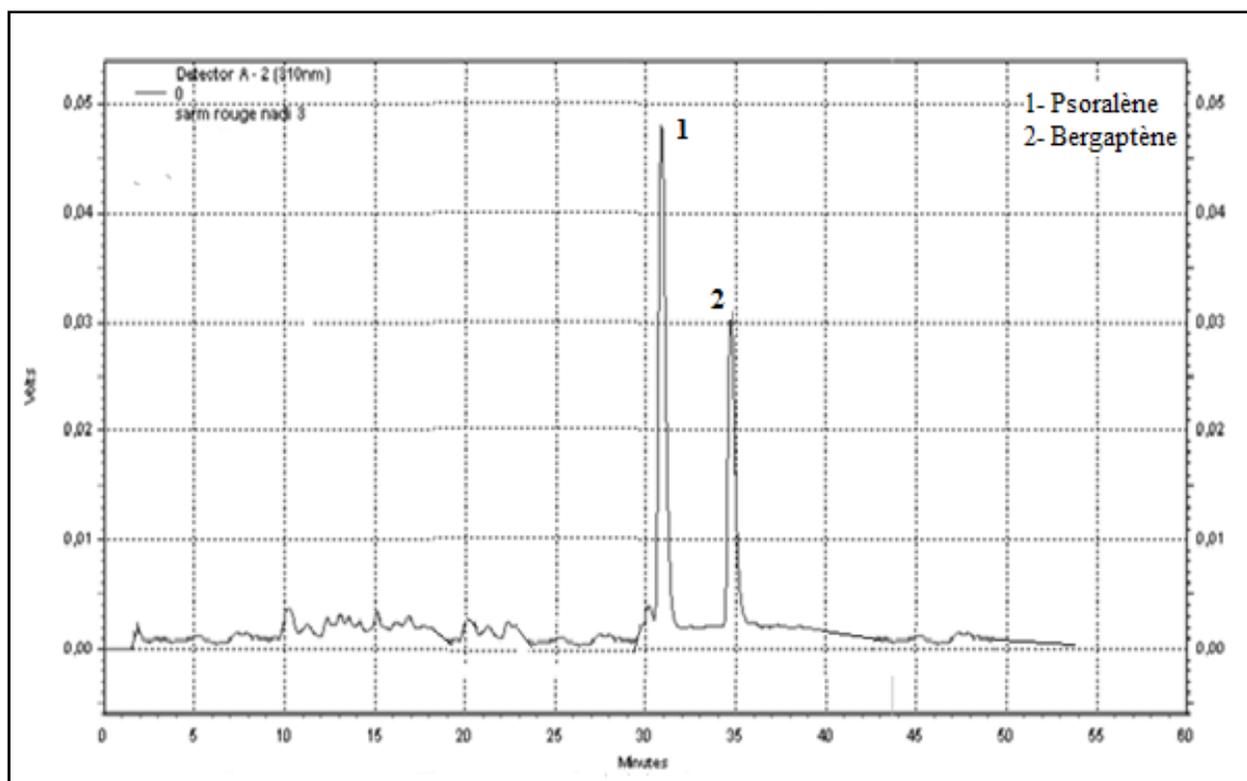
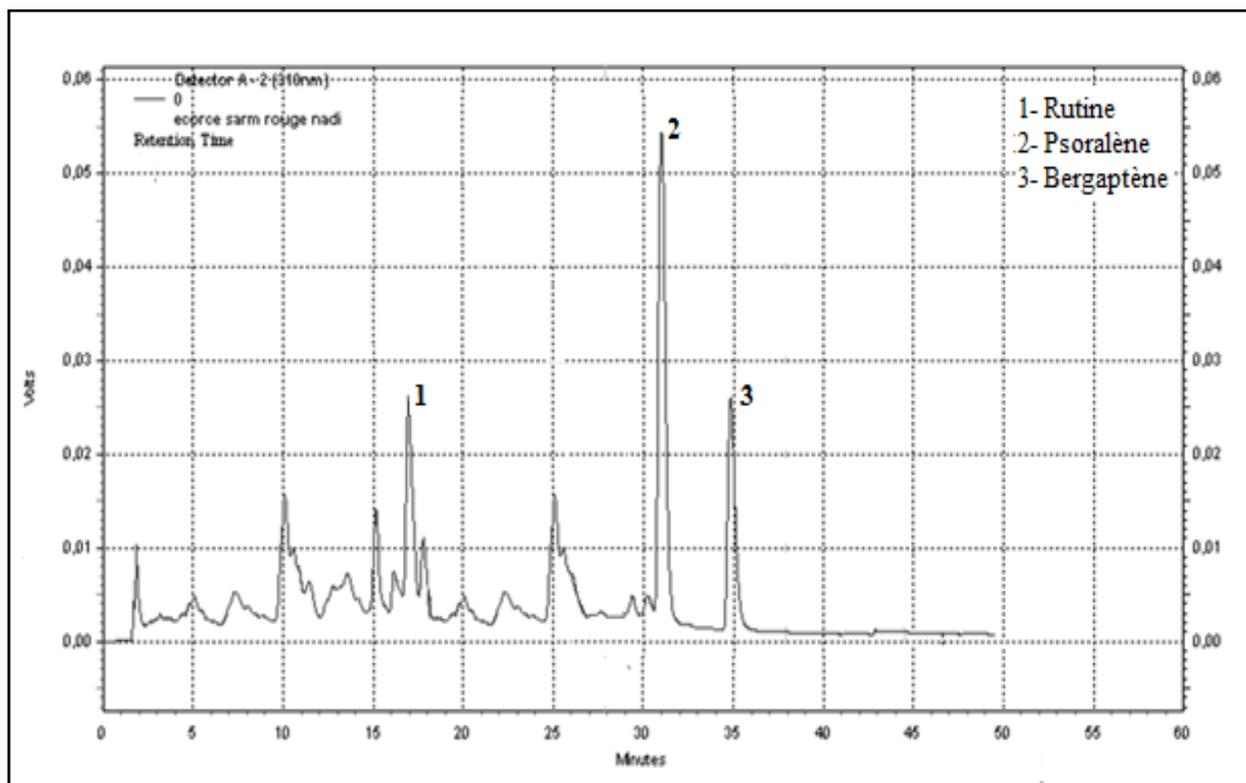


## 3. Feuille



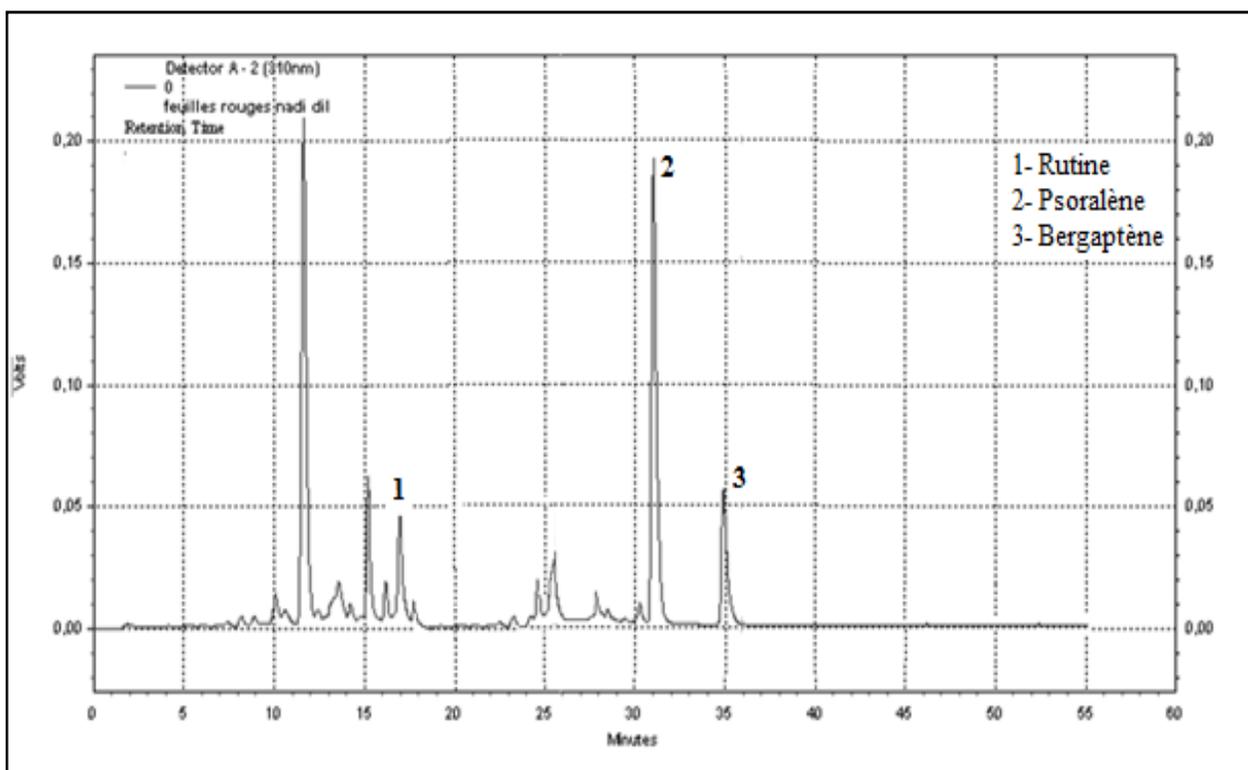
### B.3. La variété Boule d'or (C)

#### 1. Ecorce de sarment



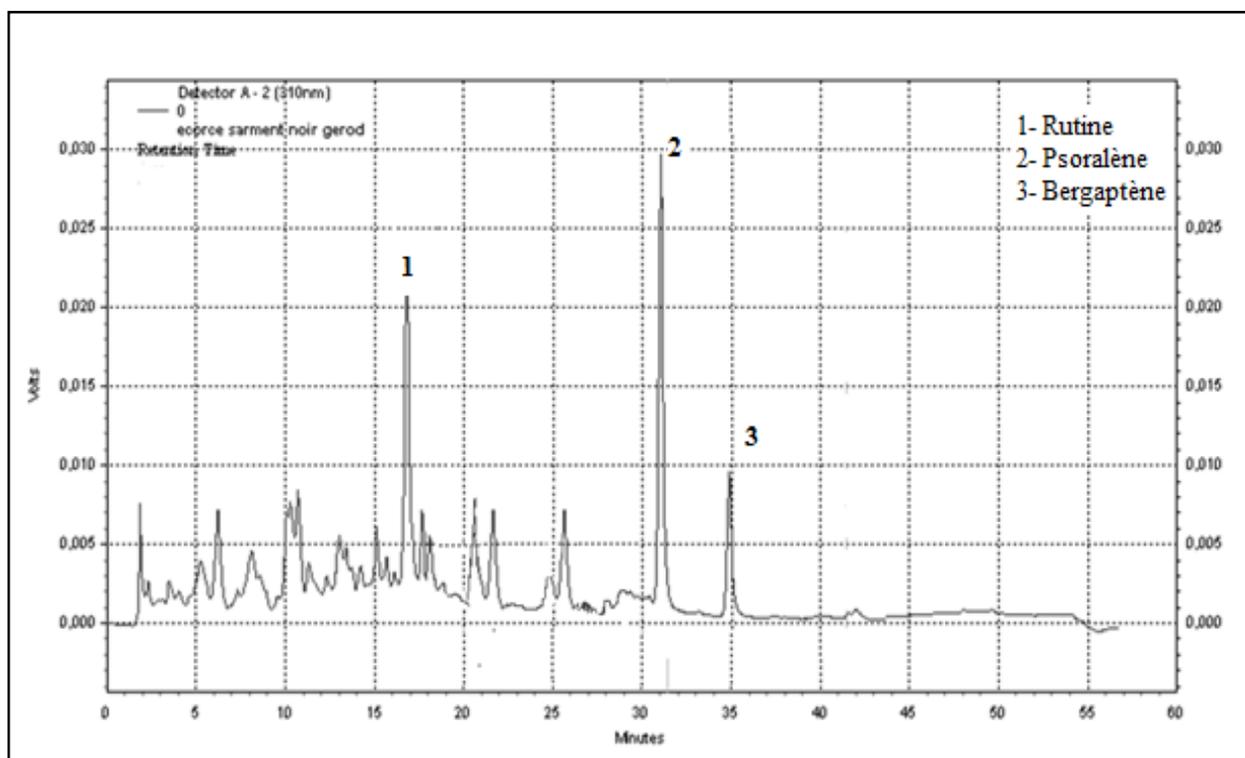
#### 2. Sarment

### 3. Feuille

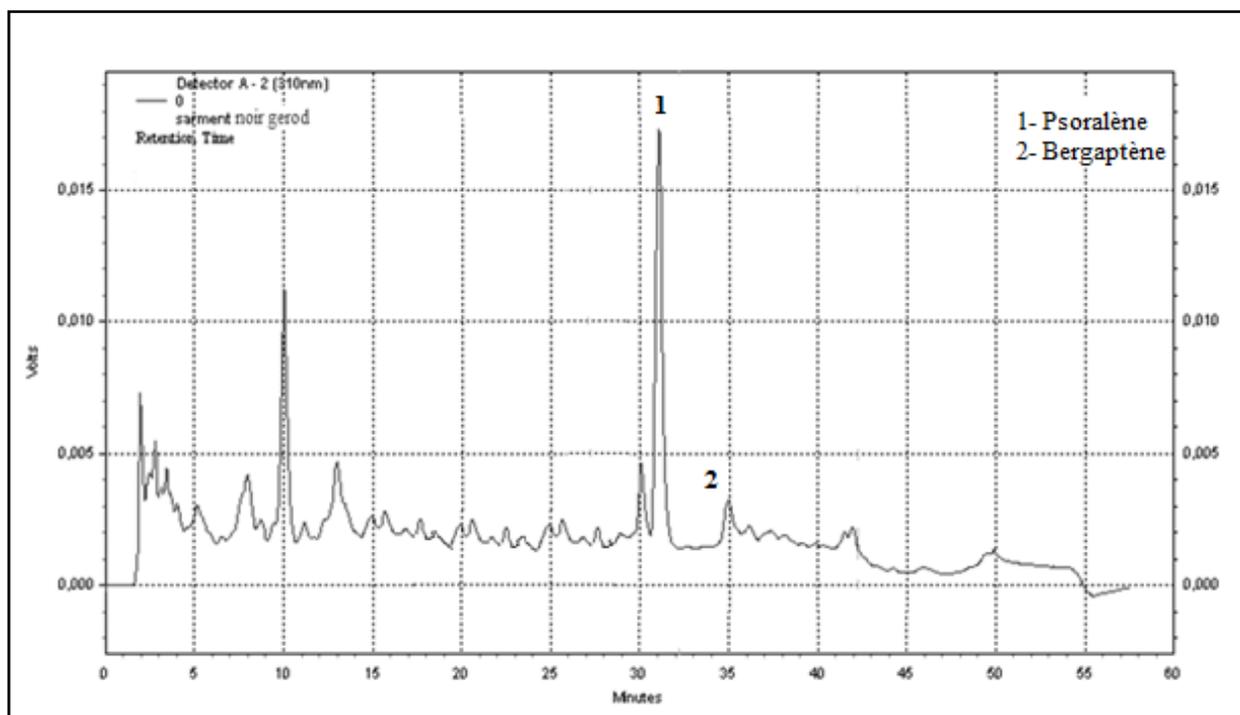


### B.4. La variété Hamri (D)

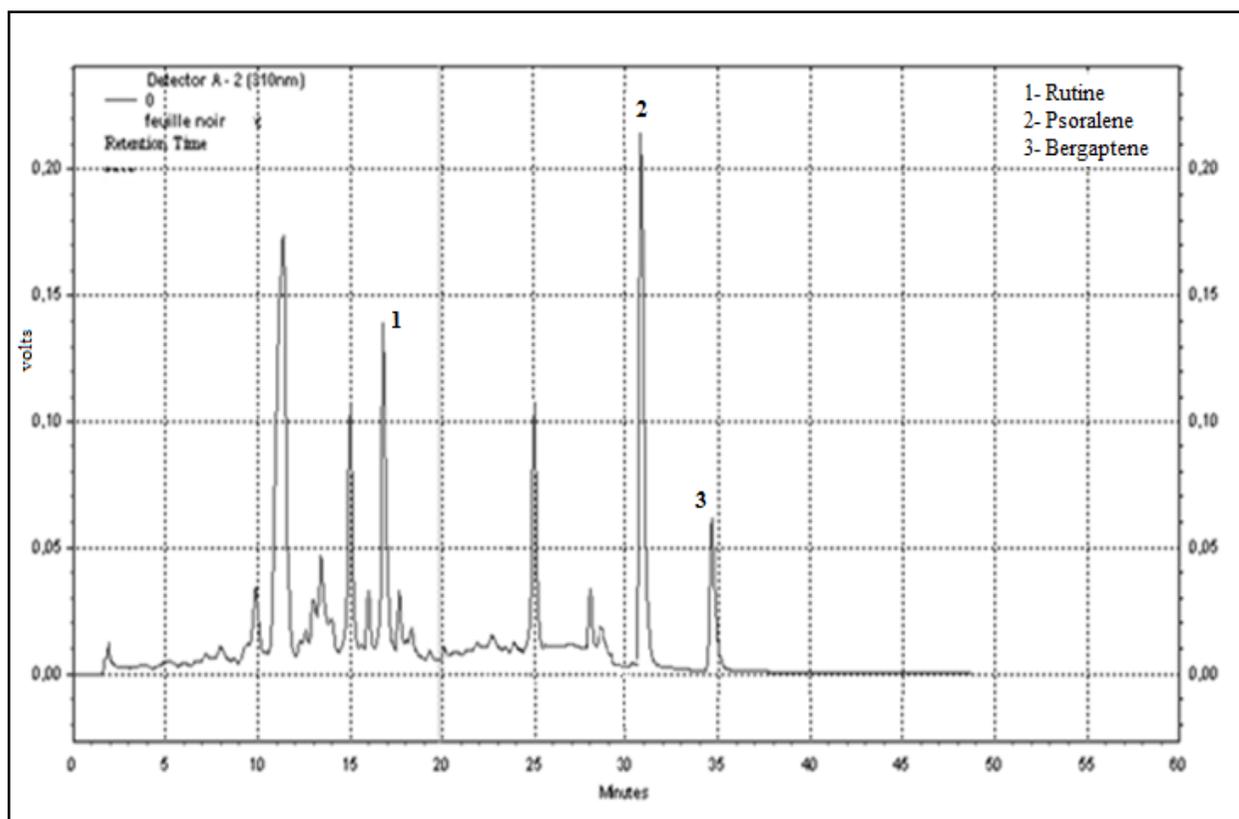
#### 1. Ecorce de sarment



## 2. Sarment

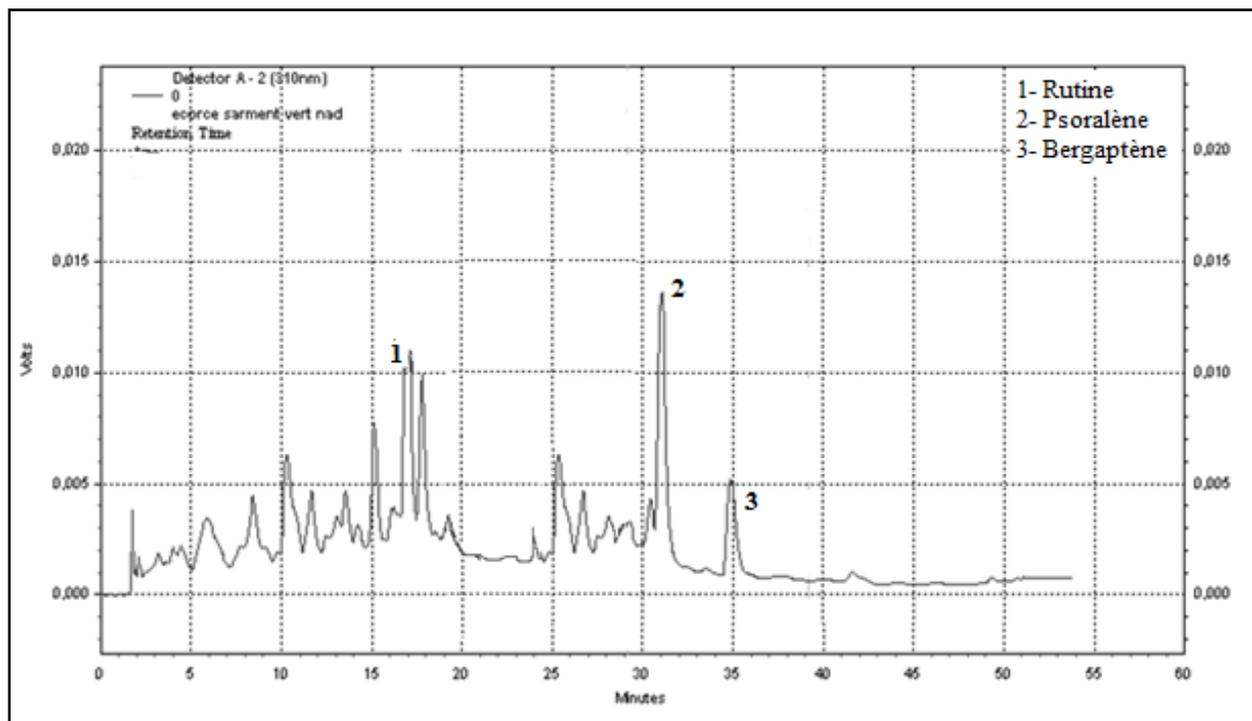


## 3. Feuille

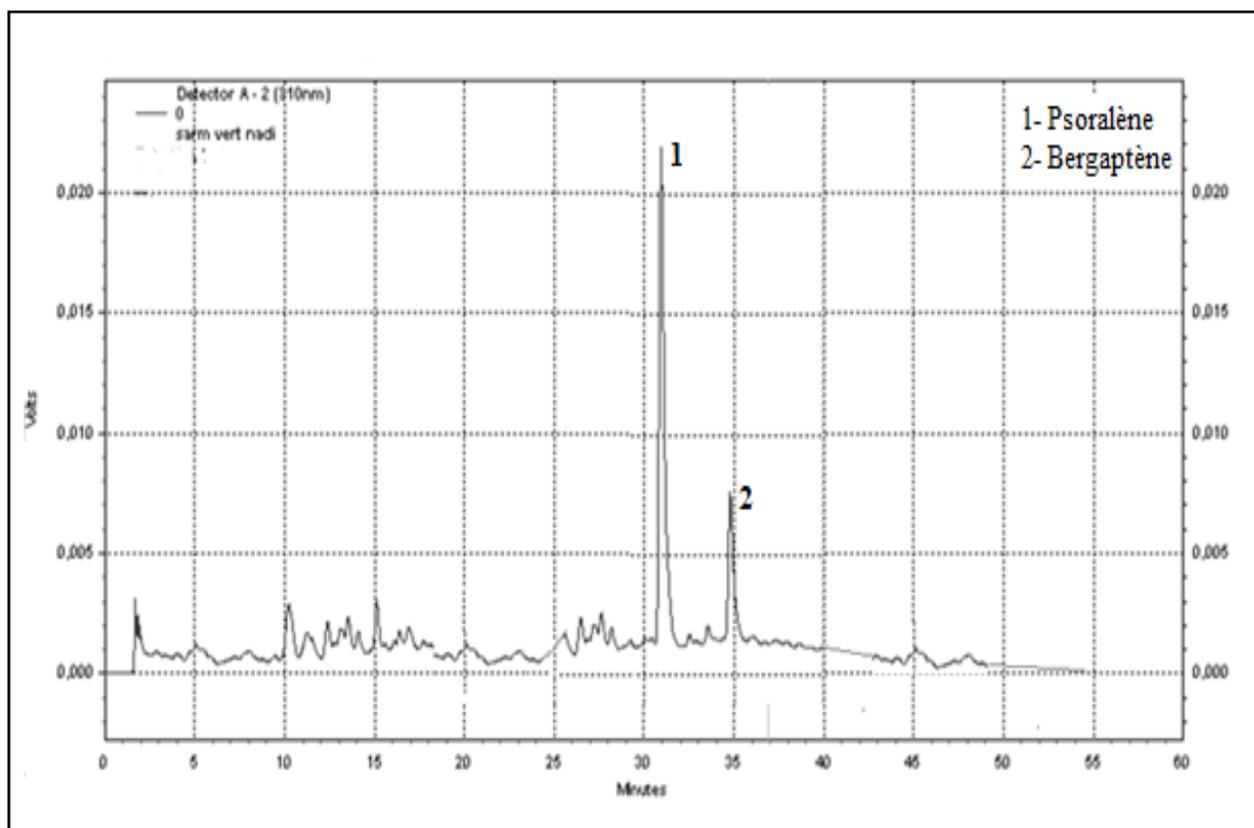


## B.5. La variété Albo (E)

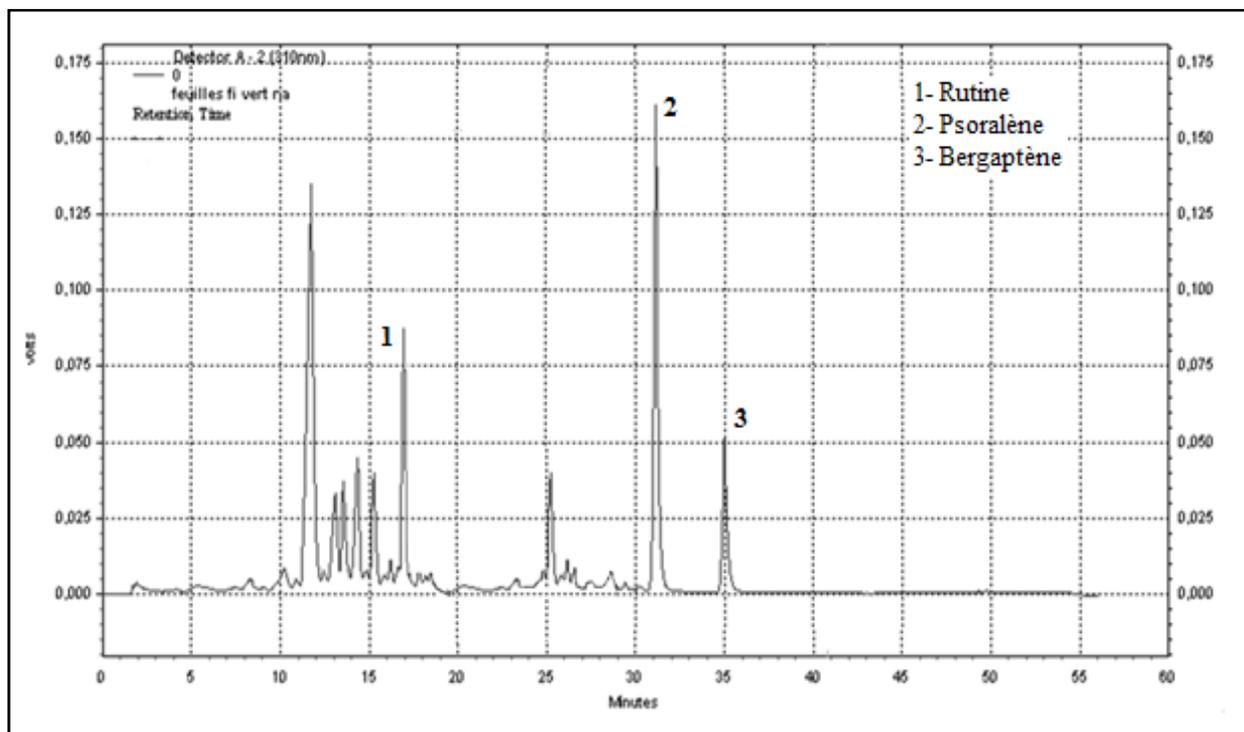
### 1. Ecorce de sarment



### 2. Sarment

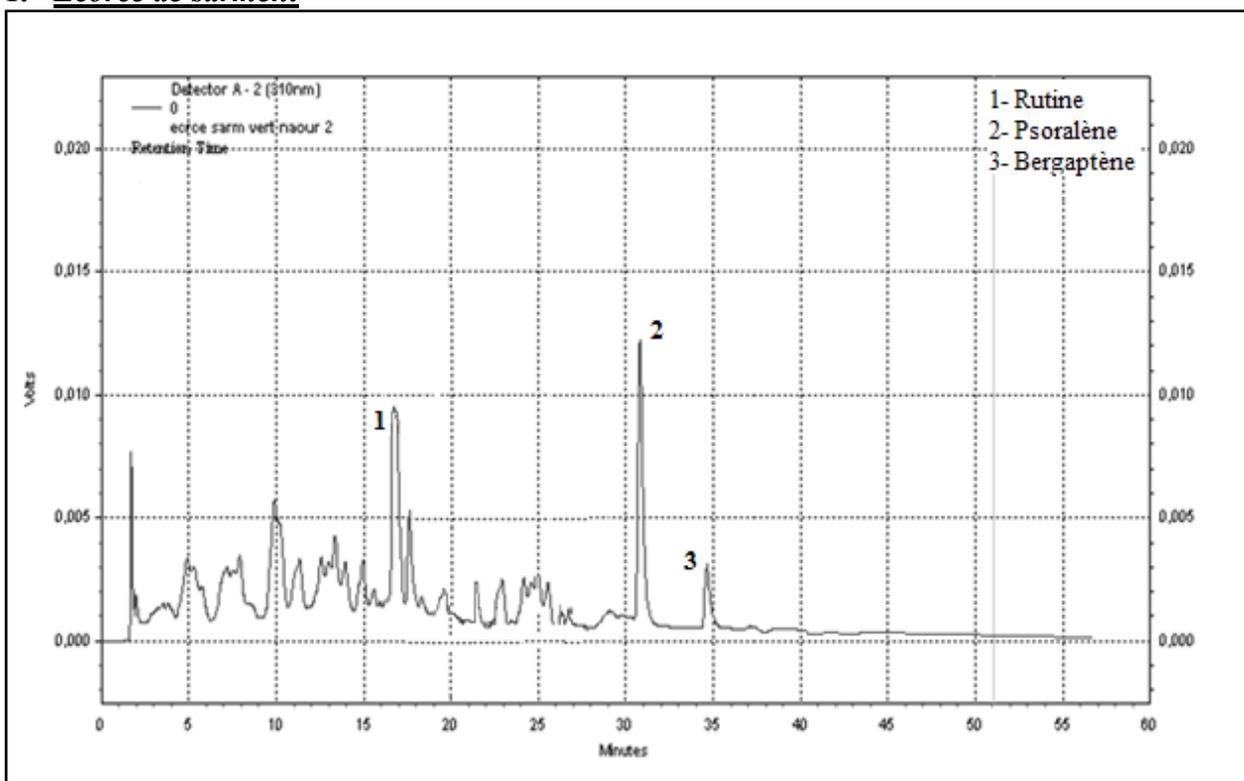


### 3. Feuille

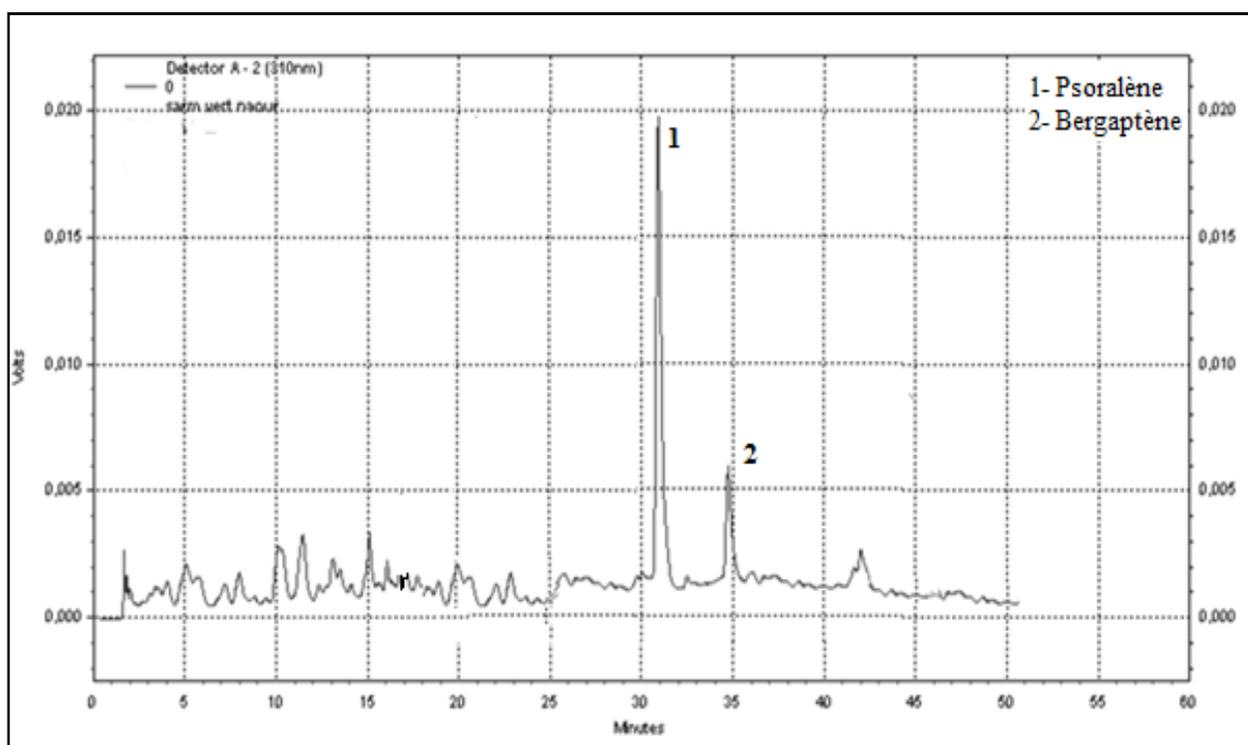


### B.6. La variété Bakor blanc (F)

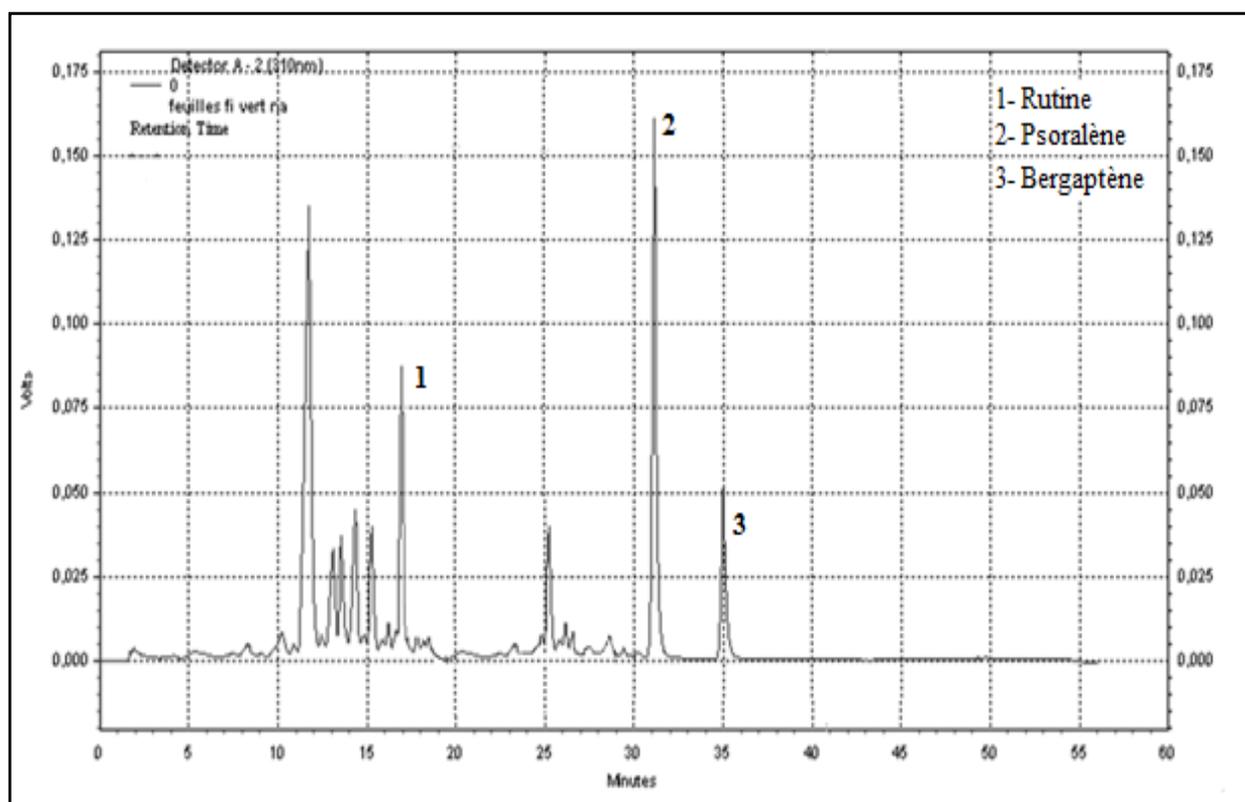
#### 1. Ecorce de sarment



## 2. Sarment

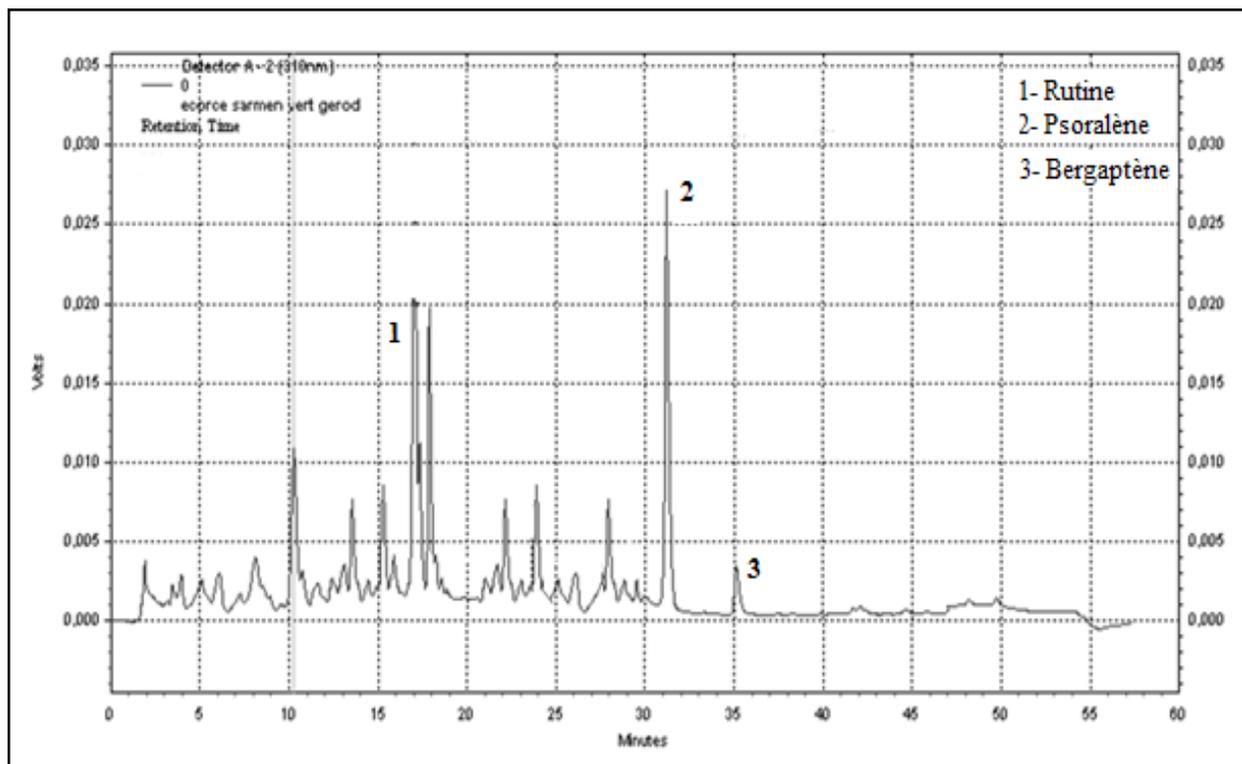


## 3. Feuille

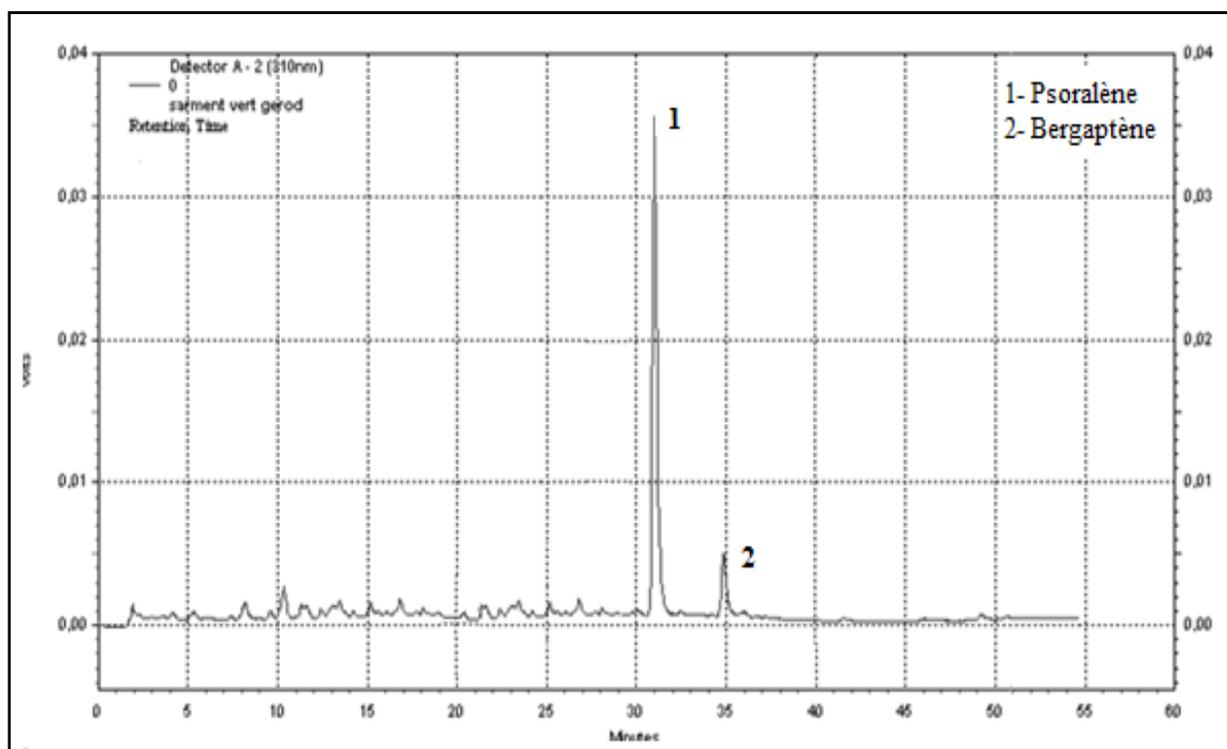


## B.7. La variété Bakor noir (G)

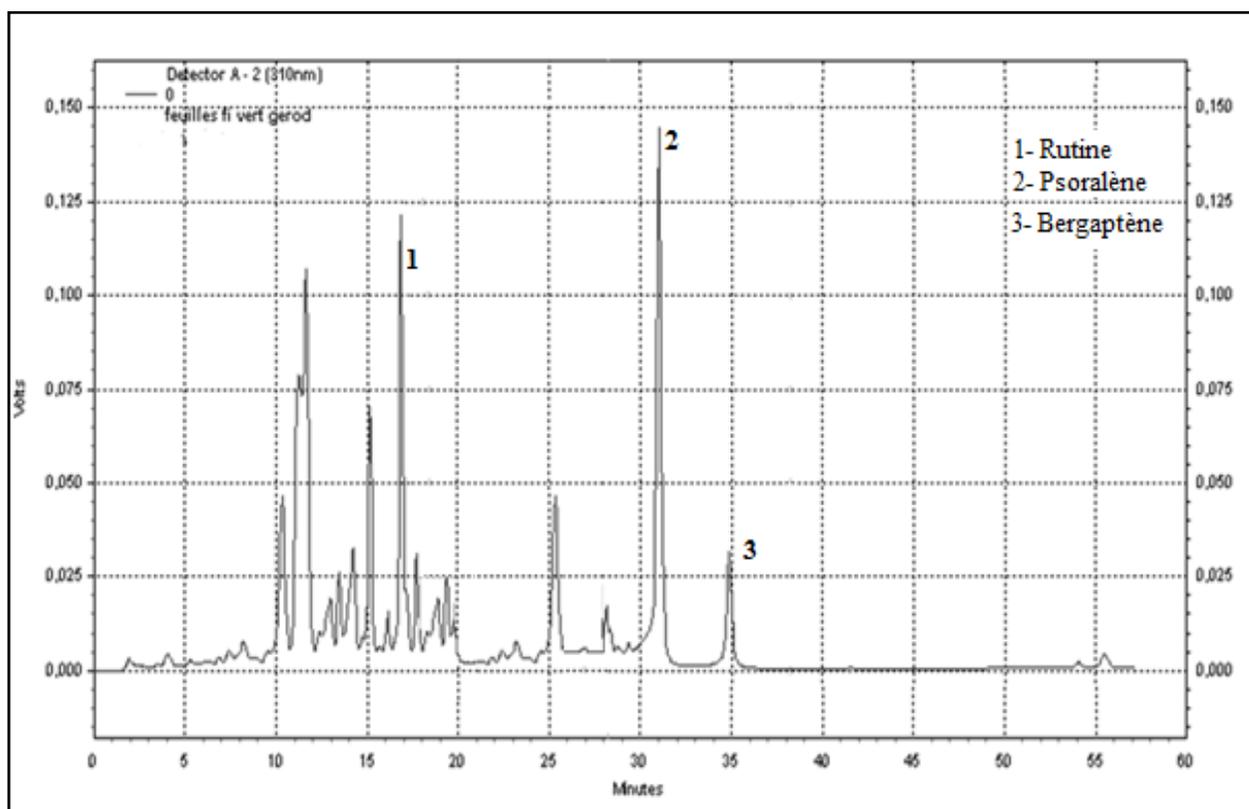
### 1. Ecorce de sarment



### 2. Sarment

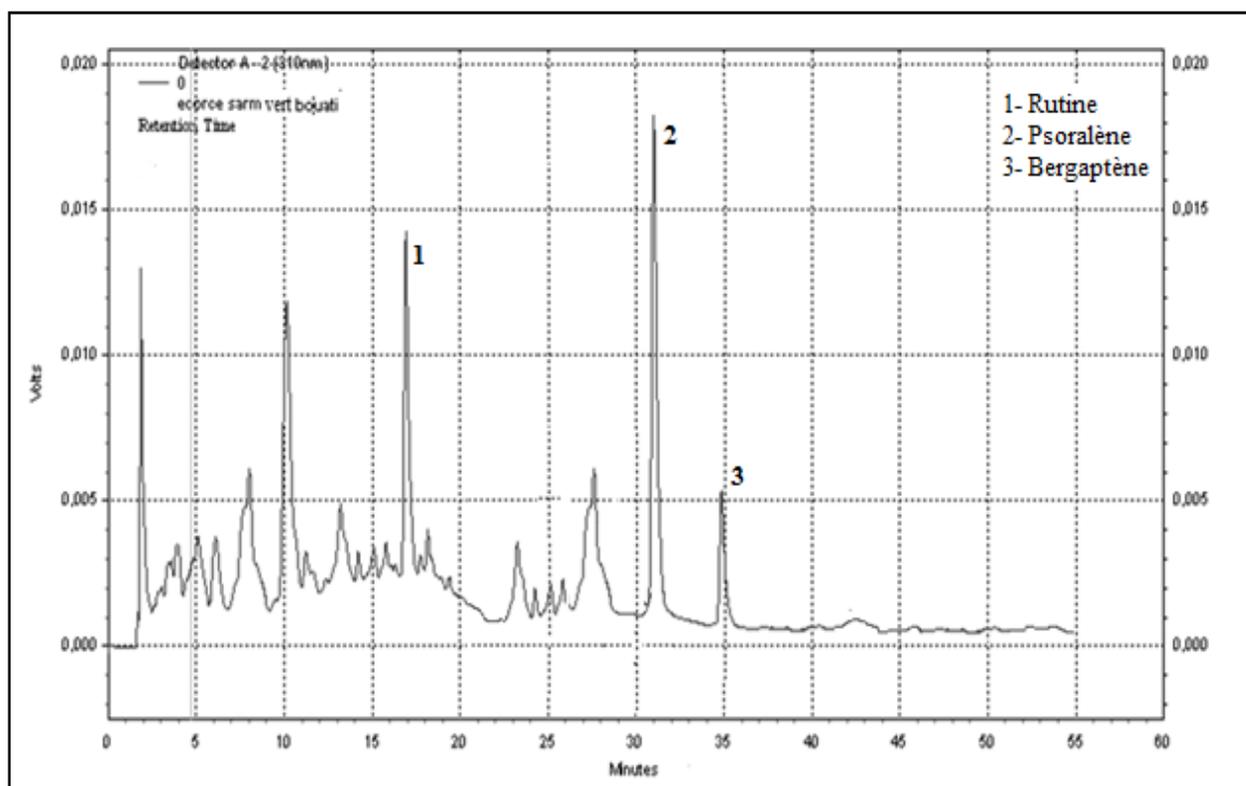


### 3. Feuille

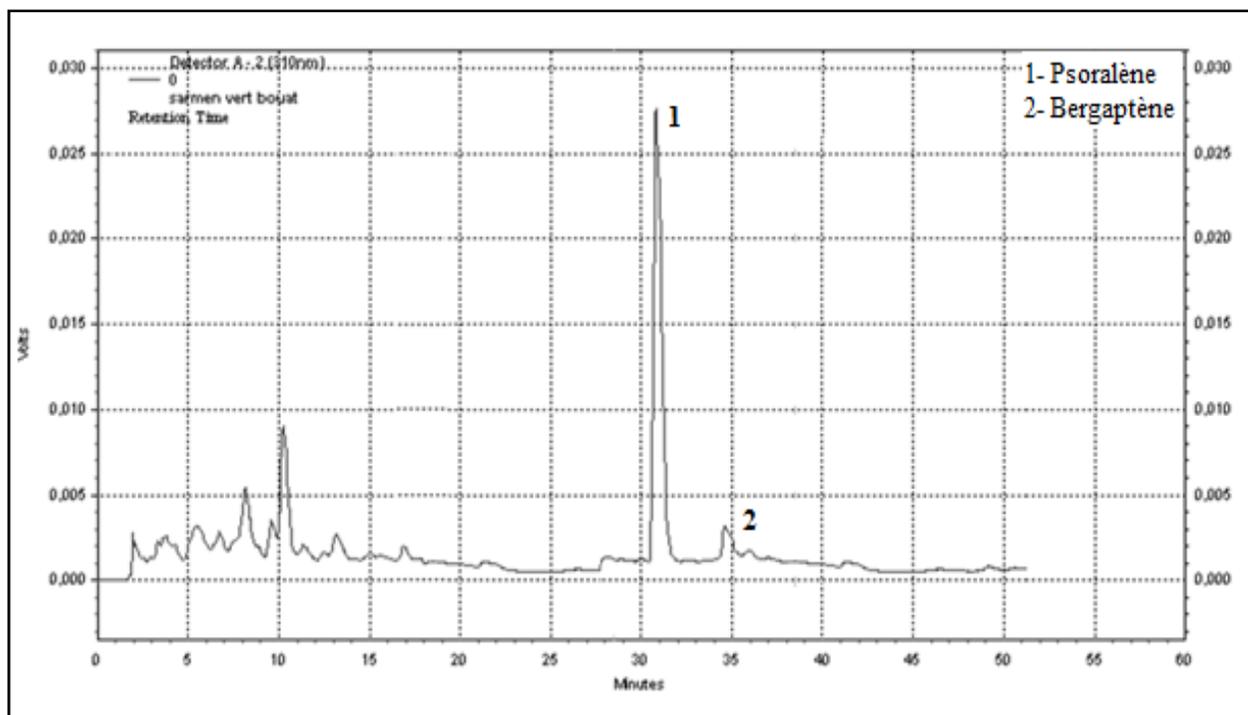


### B.8. La variété Cavalière (H)

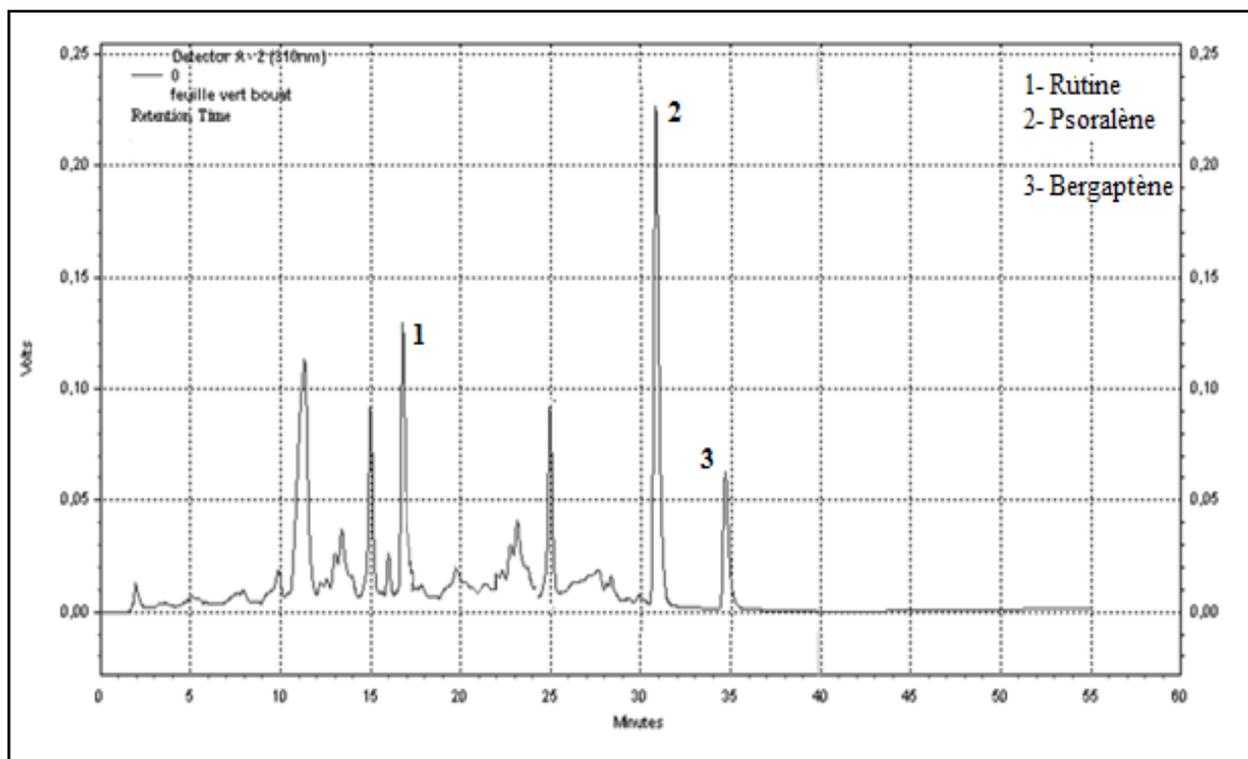
#### 1. Ecorce de sarment



## 2. Sarment



## 3. Feuille



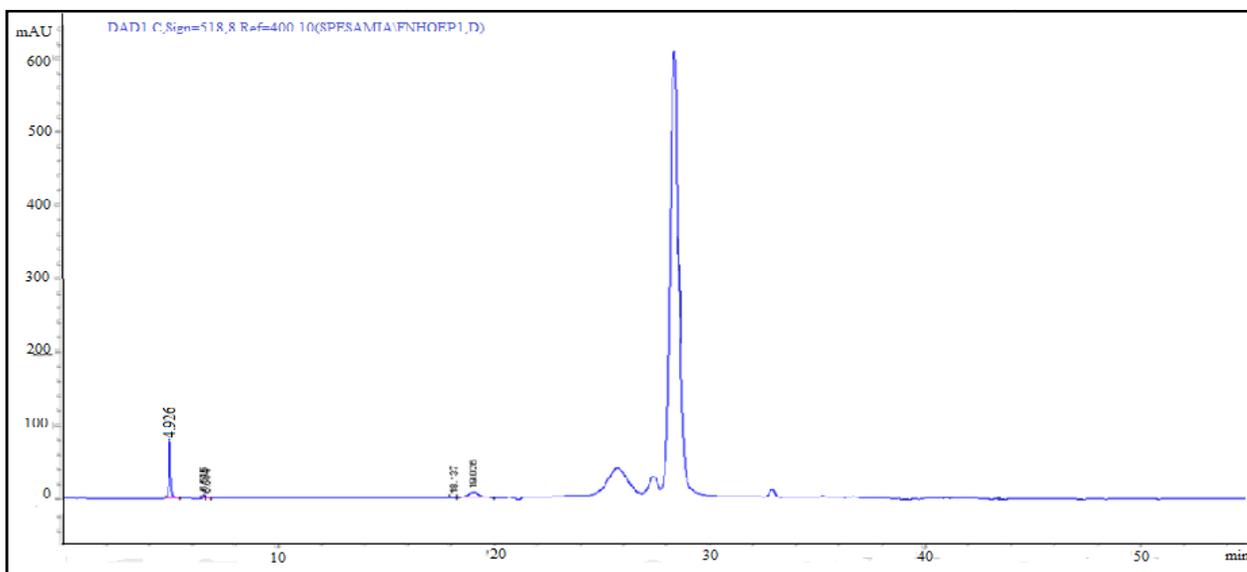
## C. Annexe C

**Chromatogrammes HPLC et Spectres de Masse des extraits des diverses variétés de fruits de *Ficus carica*, appareil HPLC de type Agilent avec un détecteur série 1200 (université Bordeaux 2, France), couplé à un spectromètre de masse à piège ionique Esquire 3000+ équipé d'une source ESI (Electrospray Ionisation)**

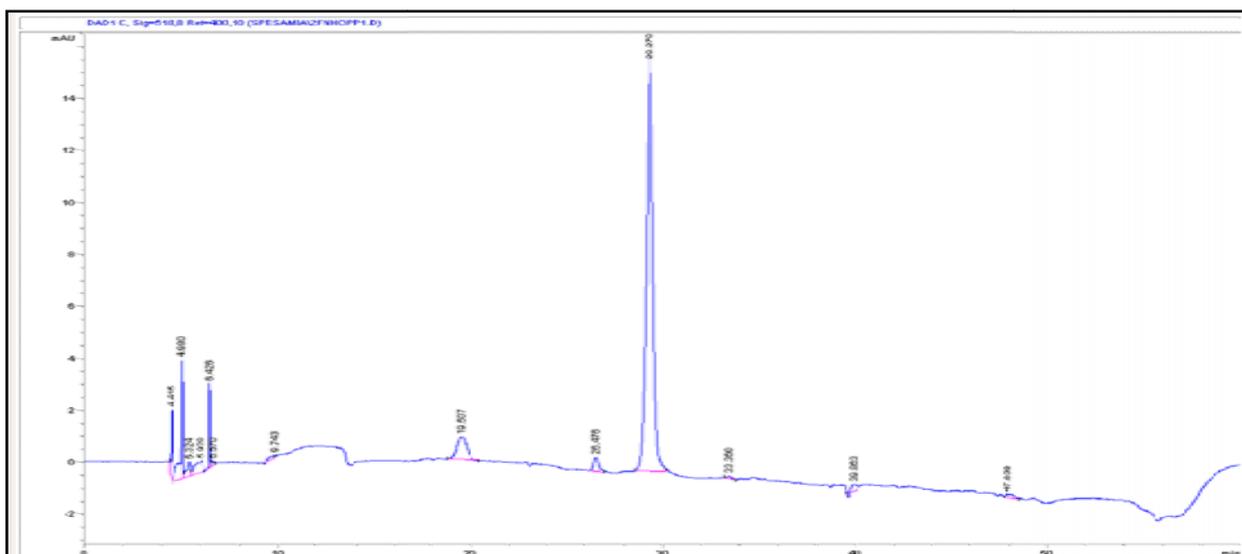
### C.1. Les chromatogrammes HPLC des différentes variétés à 518 nm

#### C.1.1. La variété Boule d'or

##### C.1.1.1. Pelure

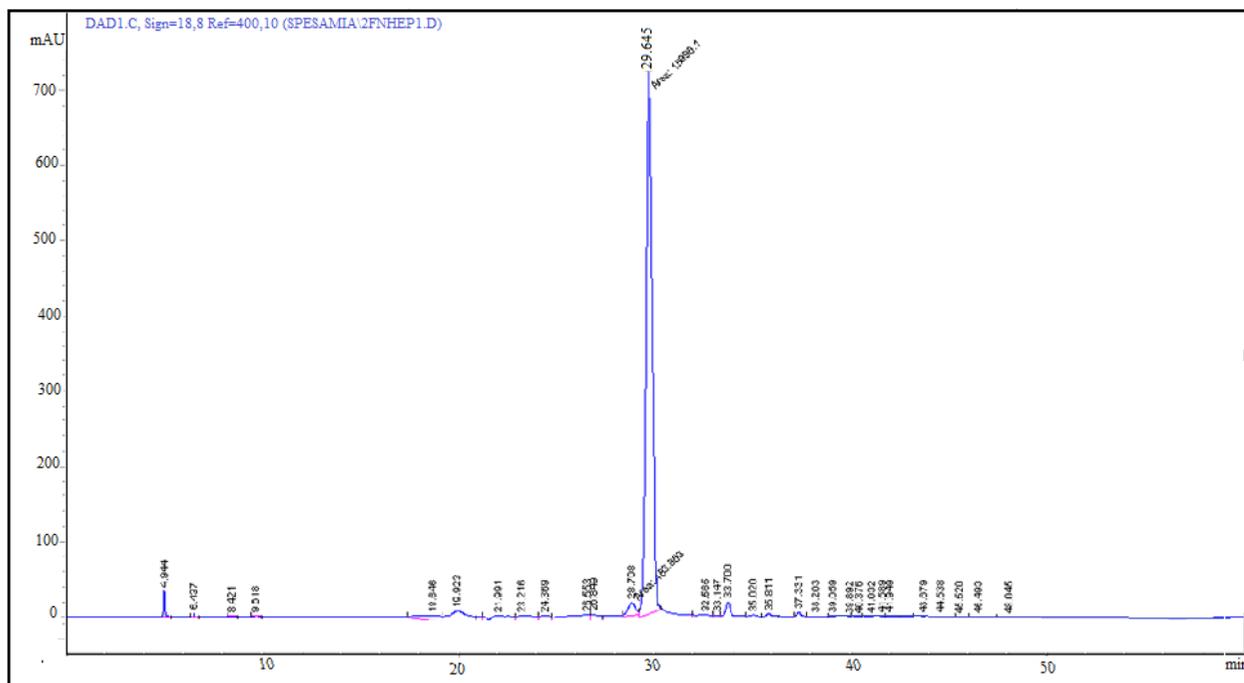


##### C.1.1.2. Pulpe

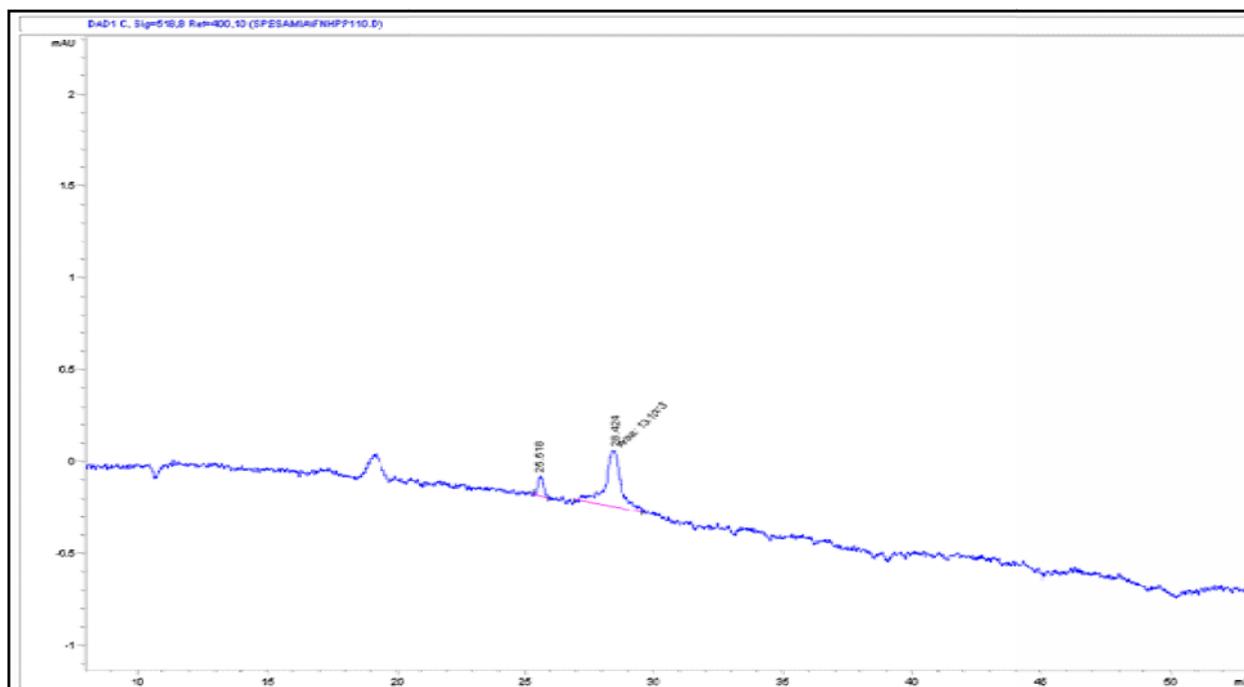


## C.1.2. La variété Hamri

### C.1.2.1. Pelure

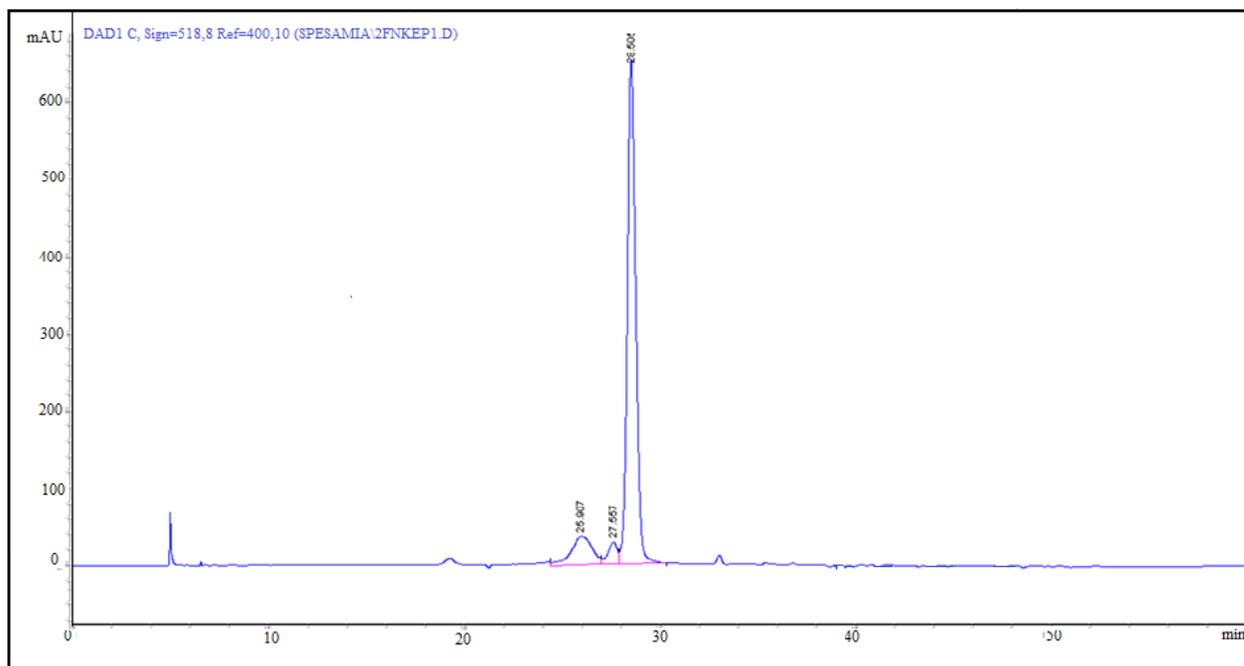


### C.1.2.2. Pulpe

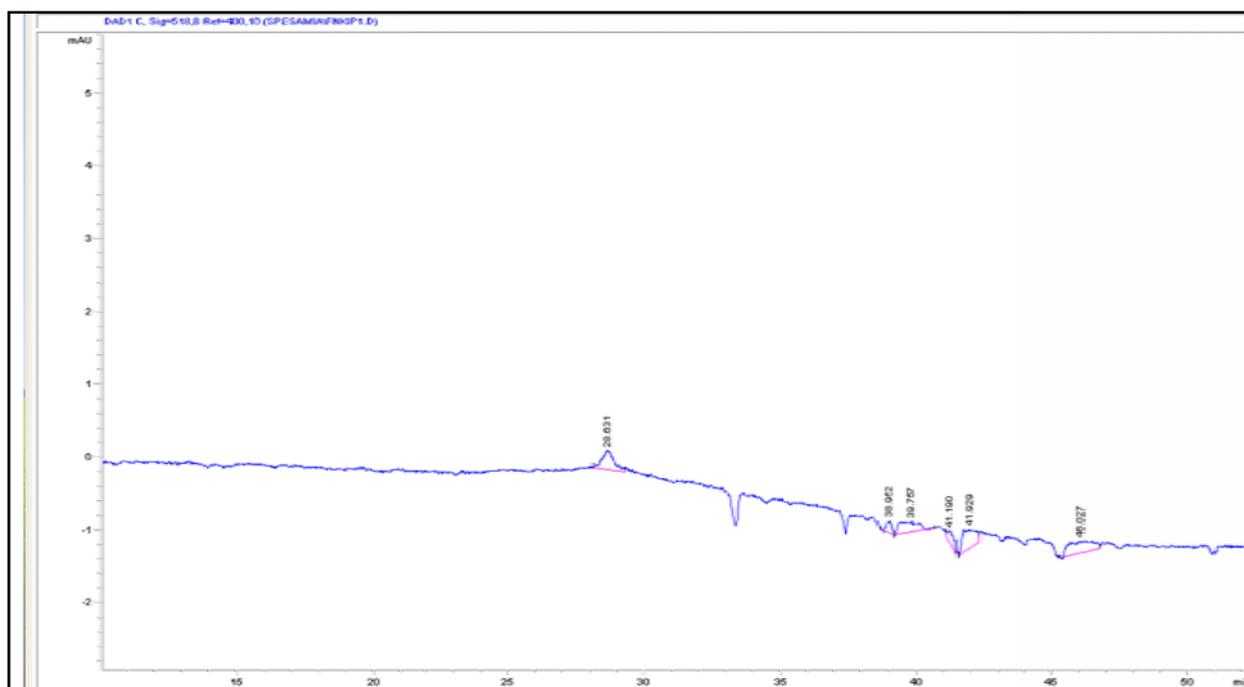


### C.1.3. La variété Zreka

#### C.1.3.1. Pelure

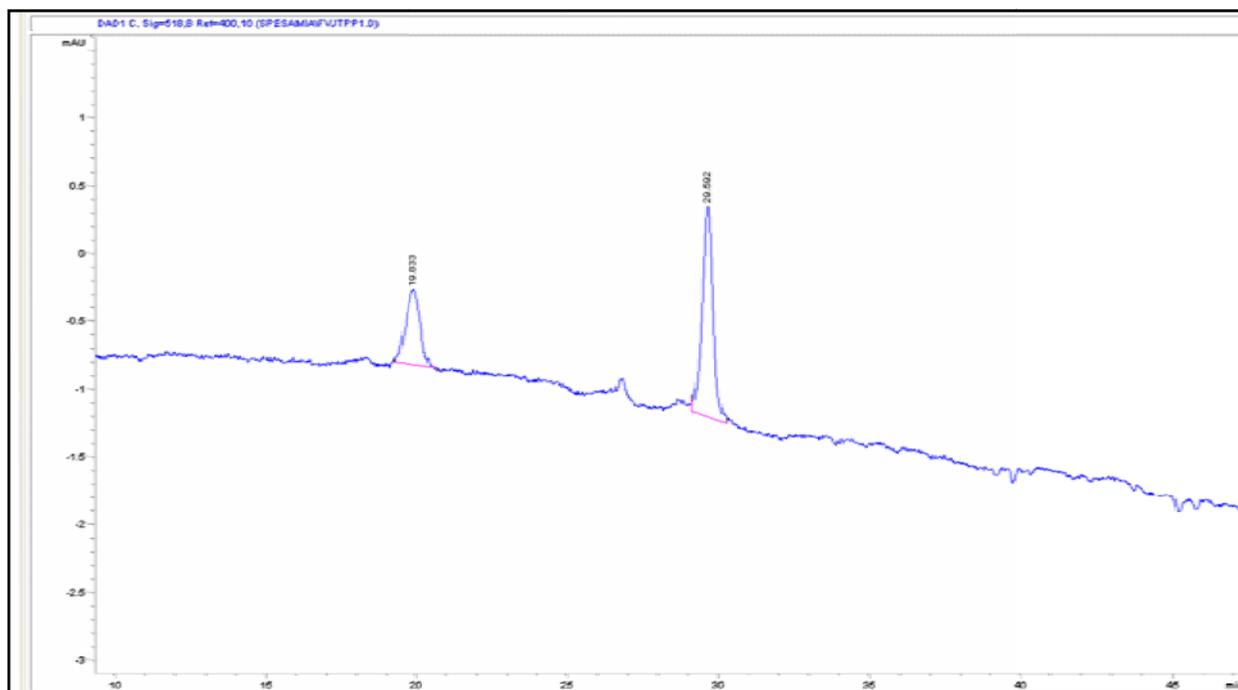


#### C.1.3.2. Pulpe



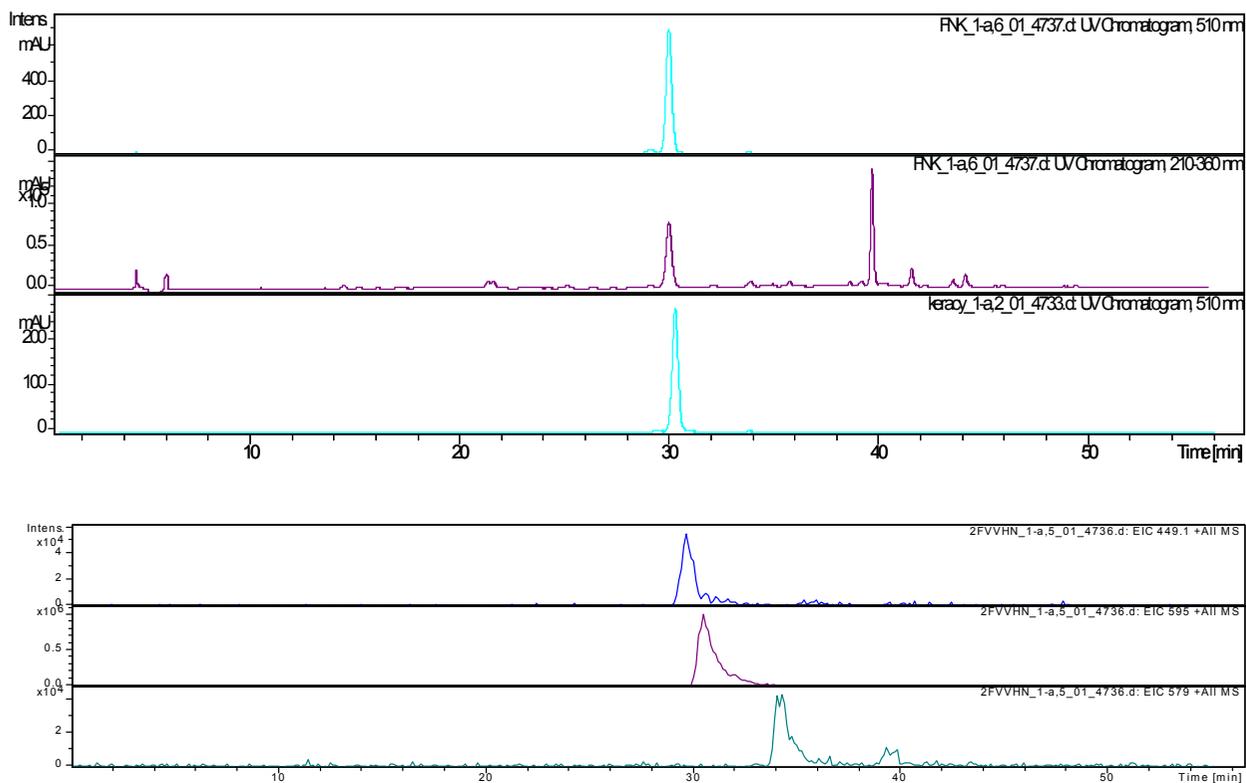
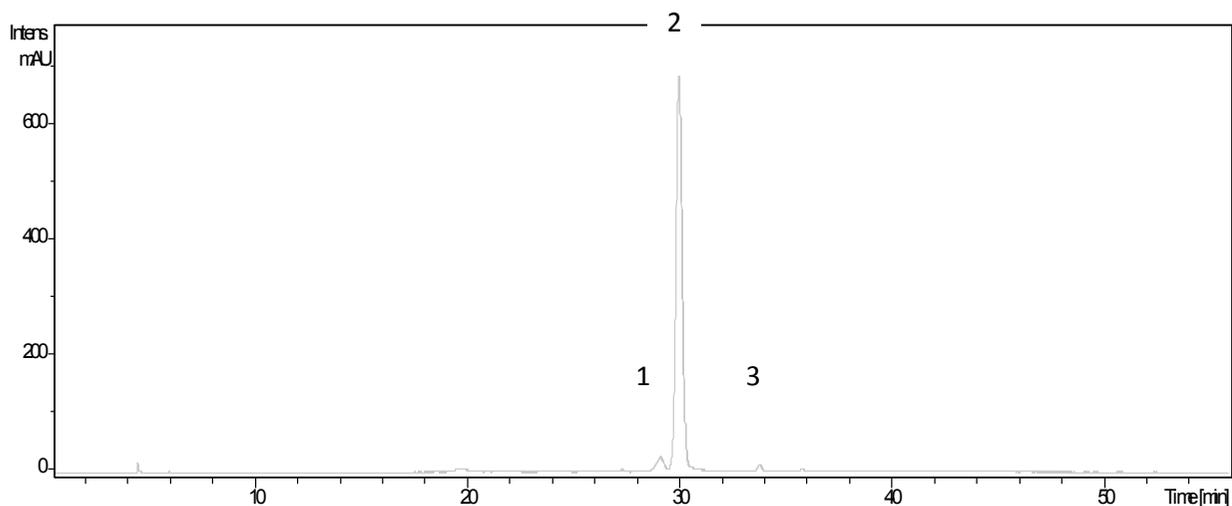
## C.1.4. La variété Albo

### C.1.4.1. Pulpe



## C.2. Les chromatogrammes HPLC-MS des différentes variétés à 510 nm

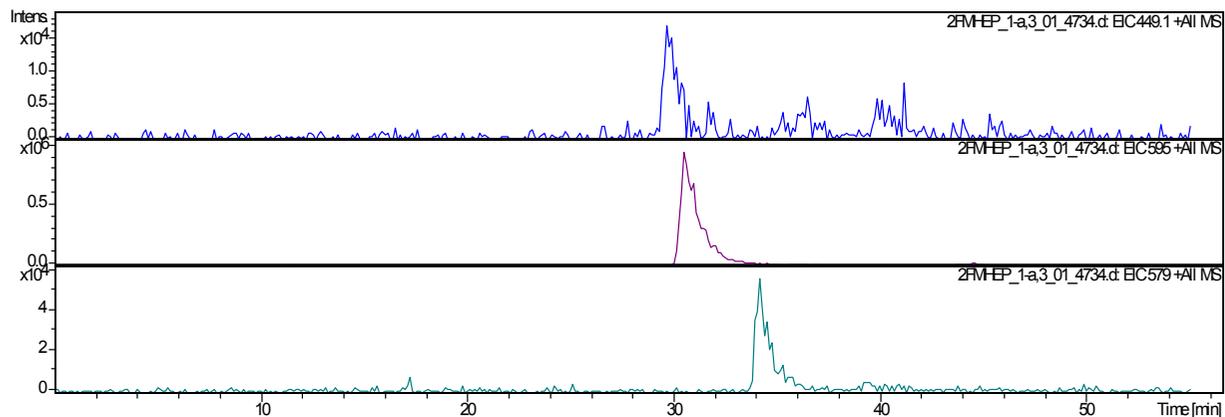
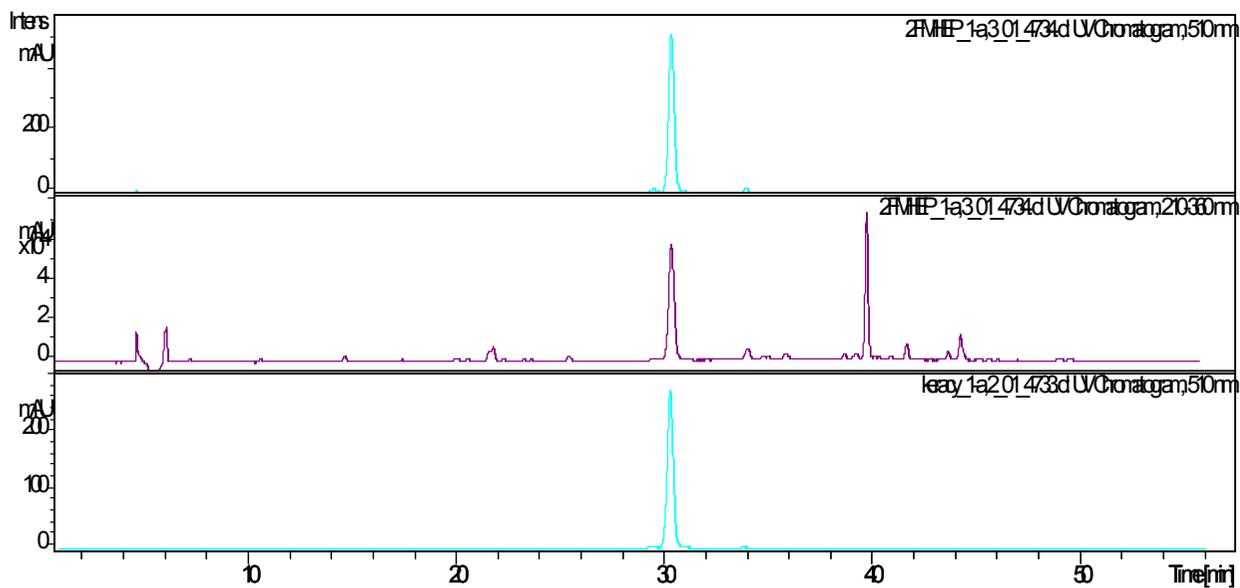
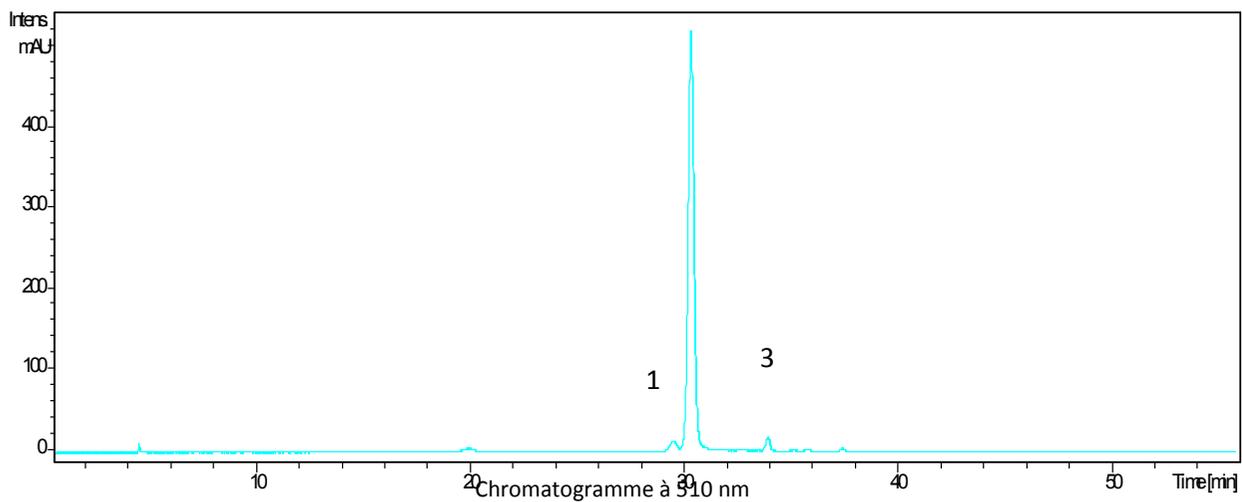
### C.2.1. Pelure de la variété Boule d'or



Pic	Nom du produit	T <sub>R</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	MM
1	Cyanidine-3-O-glucoside	29.5 mi	449.1		448
2	Cyanidine-3-O-rutinoside	30.3 mi	595.2	617.2	594
3		33.9 mi	579.2		578

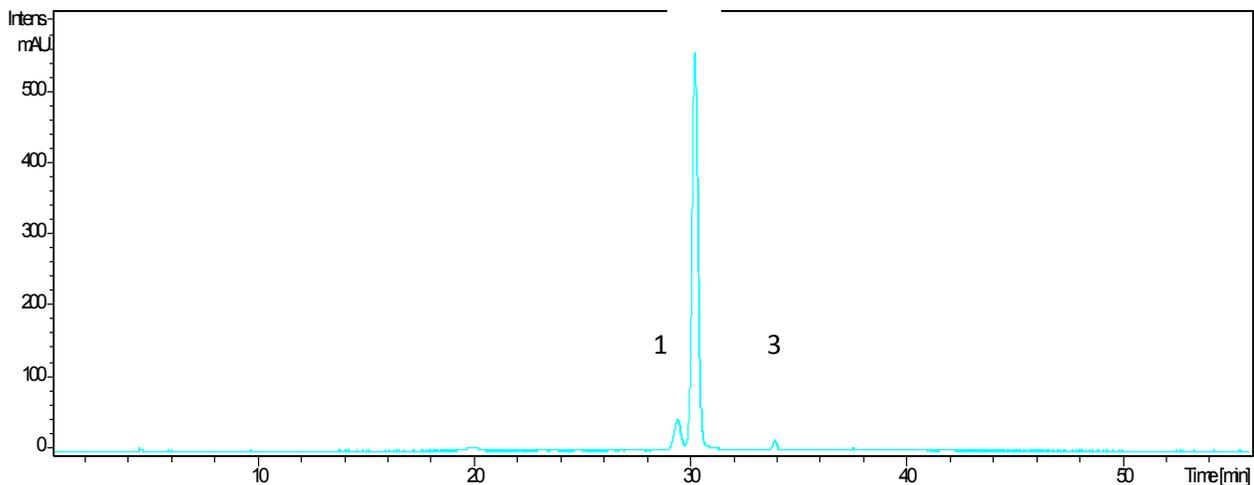
## C.2.2. La Pelure de la variété Hamri

2

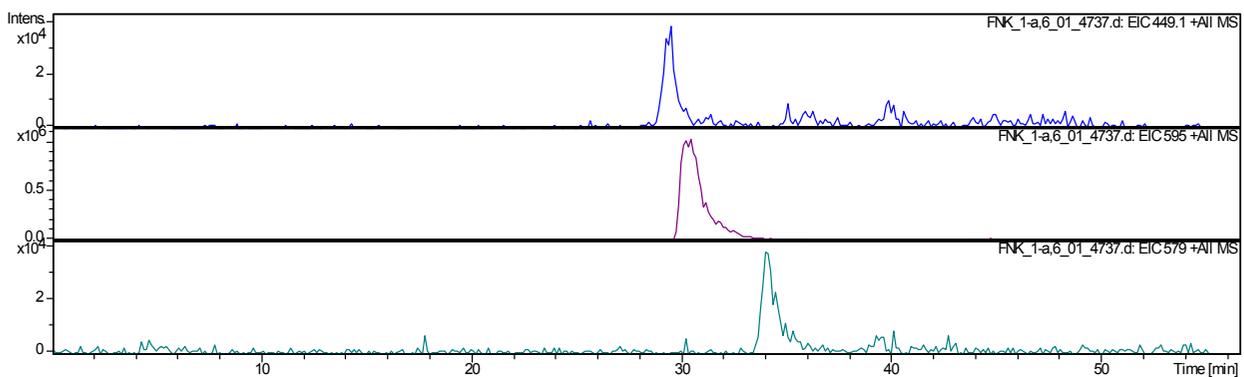
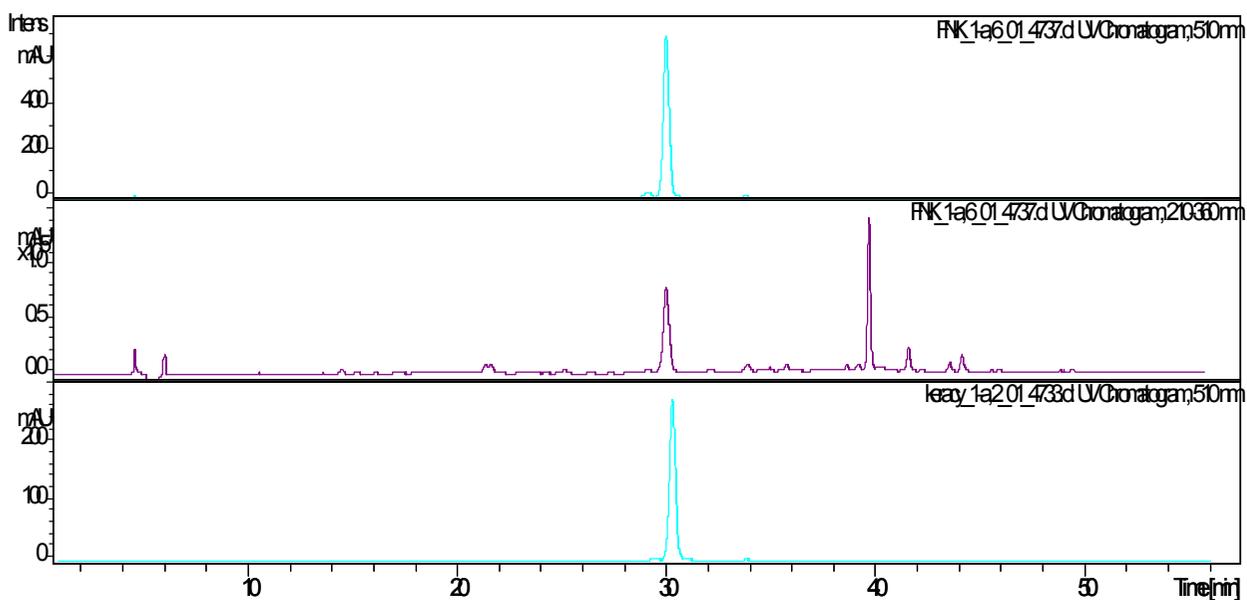


### C.2.3. La pelure de la variété Zreka

2

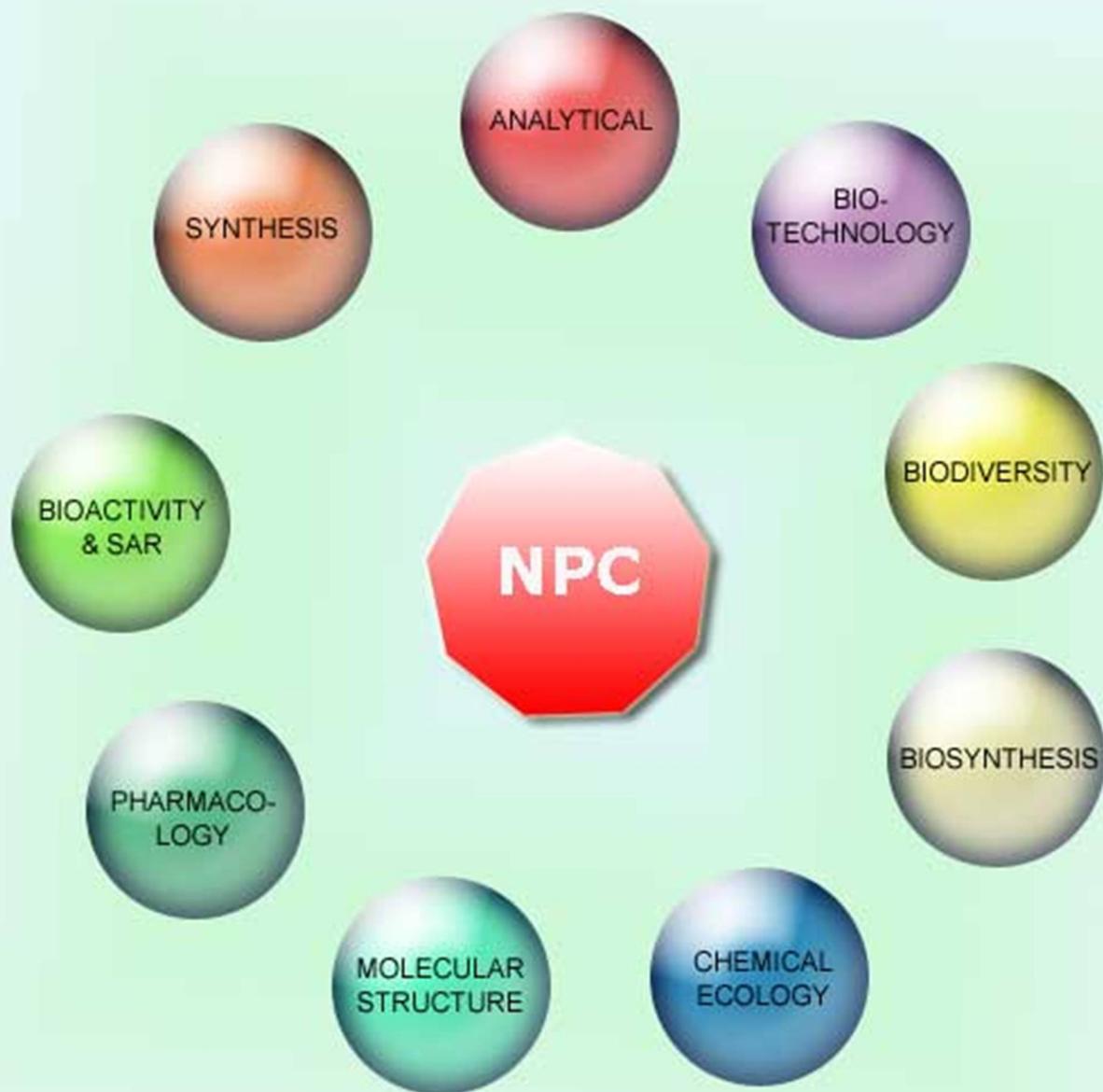


Chromatogramme à 510 nm



# NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS

An International Journal for Communications and Reviews Covering all  
Aspects of Natural Products Research



Volume 8. Issue 4. Pages 427-552. 2013  
ISSN 1934-578X (printed); ISSN 1555-9475 (online)  
[www.naturalproduct.us](http://www.naturalproduct.us)

**EDITOR-IN-CHIEF****DR. PAWAN K AGRAWAL**

Natural Product Inc.  
7963, Anderson Park Lane,  
Westerville, Ohio 43081, USA  
agrawal@naturalproduct.us

**EDITORS****PROFESSOR ALEJANDRO F. BARRERO**

Department of Organic Chemistry,  
University of Granada,  
Campus de Fuente Nueva, s/n, 18071, Granada, Spain  
afbarre@ugr.es

**PROFESSOR ALESSANDRA BRACA**

Dipartimento di Chimica Bioorganica e Biofarmacia,  
Università di Pisa,  
via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy  
braca@farm.unipi.it

**PROFESSOR DEAN GUO**

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs,  
School of Pharmaceutical Sciences,  
Peking University,  
Beijing 100083, China  
gda5958@163.com

**PROFESSOR YOSHIHIRO MIMAKI**

School of Pharmacy,  
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences,  
Horinouchi 1432-1, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan  
mimakiy@ps.toyaku.ac.jp

**PROFESSOR STEPHEN G. PYNE**

Department of Chemistry  
University of Wollongong  
Wollongong, New South Wales, 2522, Australia  
spyne@uow.edu.au

**PROFESSOR MANFRED G. REINECKE**

Department of Chemistry,  
Texas Christian University,  
Forts Worth, TX 76129, USA  
m.reinecke@tcu.edu

**PROFESSOR WILLIAM N. SETZER**

Department of Chemistry  
The University of Alabama in Huntsville  
Huntsville, AL 35809, USA  
wsetzer@chemistry.uah.edu

**PROFESSOR YASUHIRO TEZUKA**

Institute of Natural Medicine  
Institute of Natural Medicine, University of Toyama,  
2630-Sugitani, Toyama 930-0194, Japan  
tezuka@inm.u-toyama.ac.jp

**PROFESSOR DAVID E. THURSTON**

Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry,  
The School of Pharmacy,  
University of London, 29-39 Brunswick Square,  
London WC1N 1AX, UK  
david.thurston@pharmacy.ac.uk

**HONORARY EDITOR****PROFESSOR GERALD BLUNDEN**

The School of Pharmacy & Biomedical Sciences,  
University of Portsmouth,  
Portsmouth, PO1 2DT U.K.  
axuf64@dsl.pipex.com

**ADVISORY BOARD**

Prof. Berhanu M. Abegaz  
Gaborone, Botswana

Prof. Viqar Uddin Ahmad  
Karachi, Pakistan

Prof. Øyvind M. Andersen  
Bergen, Norway

Prof. Giovanni Appendino  
Novara, Italy

Prof. Yoshinori Asakawa  
Tokushima, Japan

Prof. Lee Banting  
Portsmouth, U.K.

Prof. Julie Banerji  
Kolkata, India

Prof. Anna R. Bilia  
Florence, Italy

Prof. Maurizio Bruno  
Palermo, Italy

Prof. César A. N. Catalán  
Tucumán, Argentina

Prof. Josep Coll  
Barcelona, Spain

Prof. Geoffrey Cordell  
Chicago, IL, USA

Prof. Ana Cristina Figueiredo  
Lisbon, Portugal

Prof. Cristina Gracia-Viguera  
Murcia, Spain

Prof. Duvvuru Gunasekar  
Tirupati, India

Prof. Kurt Hostettmann  
Lausanne, Switzerland

Prof. Martin A. Iglesias Arteaga  
Mexico, D. F., Mexico

Prof. Leopold Jirovetz  
Vienna, Austria

Prof. Vladimir I Kalinin  
Vladivostok, Russia

Prof. Niel A. Koobanally  
Durban, South Africa

Prof. Karsten Krohn  
Paderborn, Germany

Prof. Chiaki Kuroda  
Tokyo, Japan

Prof. Hartmut Laatsch  
Gottingen, Germany

Prof. Marie Lacaille-Dubois  
Dijon, France

Prof. Shoei-Sheng Lee  
Taipei, Taiwan

Prof. Francisco Macias  
Cadiz, Spain

Prof. Imre Mathe  
Szeged, Hungary

Prof. Ermino Murano  
Trieste, Italy

Prof. M. Soledade C. Pedras  
Saskatoon, Canada

Prof. Luc Pieters  
Antwerp, Belgium

Prof. Peter Proksch  
Düsseldorf, Germany

Prof. Phila Raharivelomanana  
Tahiti, French Polynesia

Prof. Luca Rastrelli  
Fisciano, Italy

Prof. Monique Simmonds  
Richmond, UK

Dr. Bikram Singh  
Palampur, India

Prof. John L. Sorensen  
Manitoba, Canada

Prof. Valentin Stonik  
Vladivostok, Russia

Prof. Winston F. Tinto  
Barbados, West Indies

Prof. Sylvia Urban  
Melbourne, Australia

Prof. Karen Valant-Vetschera  
Vienna, Austria

**INFORMATION FOR AUTHORS**

Full details of how to submit a manuscript for publication in Natural Product Communications are given in Information for Authors on our Web site <http://www.naturalproduct.us>.

Authors may reproduce/republish portions of their published contribution without seeking permission from NPC, provided that any such republication is accompanied by an acknowledgment (original citation)-Reproduced by permission of Natural Product Communications. Any unauthorized reproduction, transmission or storage may result in either civil or criminal liability.

The publication of each of the articles contained herein is protected by copyright. Except as allowed under national "fair use" laws, copying is not permitted by any means or for any purpose, such as for distribution to any third party (whether by sale, loan, gift, or otherwise); as agent (express or implied) of any third party; for purposes of advertising or promotion; or to create collective or derivative works. Such permission requests, or other inquiries, should be addressed to the Natural Product Inc. (NPI). A photocopy license is available from the NPI for institutional subscribers that need to make multiple copies of single articles for internal study or research purposes.

**To Subscribe:** Natural Product Communications is a journal published monthly. 2013 subscription price: US\$2,395 (Print, ISSN# 1934-578X); US\$2,395 (Web edition, ISSN# 1555-9475); US\$2,795 (Print + single site online); US\$595 (Personal online). Orders should be addressed to Subscription Department, Natural Product Communications, Natural Product Inc., 7963 Anderson Park Lane, Westerville, Ohio 43081, USA. Subscriptions are renewed on an annual basis. Claims for nonreceipt of issues will be honored if made within three months of publication of the issue. All issues are dispatched by airmail throughout the world, excluding the USA and Canada.

## Identification and Quantification of Furanocoumarins in Stem Bark and Wood of Eight Algerian Varieties of *Ficus carica* by RP-HPLC-DAD and RP-HPLC-DAD-MS

Samia Rouaiguia-Bouakkaz<sup>a</sup>, Habiba Amira-Guebailia<sup>a,b\*</sup>, Céline Rivière<sup>b</sup>, Jean-Claude Delaunay<sup>b</sup>, Pierre Waffo-Téguo<sup>b</sup> and Jean-Michel Mérillon<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Appliquée, Université du 8 Mai 1945, Guelma, 24000, Algérie

<sup>b</sup>Groupe d'Études des Substances Végétales à Activité Biologique, EA 3675-GESVAB, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université Victor Segalen Bordeaux, 210, Chemin de Leysotte, CS 50008, F-33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

amira\_h\_g@yahoo.co.uk

Received: August 28<sup>th</sup>, 2012; Accepted: March 3<sup>rd</sup>, 2013

Furanocoumarins are the major phytoalexins of *Ficus carica* and are effective natural drug candidates for treatment of several types of cancer and skin disease. The objectives of this study were to analyze and quantify linear furanocoumarins, mainly psoralen and bergapten, in wood and bark of stems from eight Algerian varieties of fig and to establish the differences in the content of these metabolites in the eight local samples. Psoralen and bergapten contents in the stem bark and wood (in  $\mu\text{g/g DW}$ ) varied respectively from 146.6 to 1110.3 and from 395.7 to 1671.8 for psoralen, and from 114.3 to 524.0 and from 144.2 to 718.6 for bergapten. This study fills a gap in our knowledge of furanocoumarin distribution in different parts of the fig tree. Psoralen and bergapten concentrations were higher in the wood than in the stem bark. Most of the dark fruited fig trees produce these two coumarins more than the green ones.

**Keywords:** *Ficus carica*, Furanocoumarins, Phytoalexins, Psoralen, HPLC-DAD, Mass spectrometry.

*Ficus carica* L., known as the common fig, is a deciduous tree belonging to the Moraceae family and was one of the earliest cultivated fruit trees. It is an important constituent of the Mediterranean diet [1a]. Previous studies on this tree indicated that *F. carica* is used not only as food but also for its medicinal properties in traditional Ayurvedic and Chinese Medicine [1b]. Different parts of the tree, including the fruits at different stages of ripening, fresh or dry tree bark, leaves, twigs, young shoots and latex, are used for the treatment of cancers and diabetes thanks to the anti-inflammatory and antioxidant action of some fig secondary metabolites [1b-1d]. In Algeria, *F. carica* is commonly known as Ettin in Arabic and Karmous or Kartous in Algerian dialects. In this country, the leaves and fruits are used to treat diabetes mellitus [1e]. According to our ethnobotanical investigations in Guelma, a town situated in the east of Algeria, fresh fig is used by the local population against constipation and flatulence, whereas the dried fruit is widely used for anemia, bronchitis and arthritis (unpublished results).

Psoralen and bergapten are the main furanocoumarins identified in the fig tree. Recent studies indicate fairly high levels of these two metabolites in the bark and woody parts, and even higher levels in the leaves [2a,b]. On the contrary, the amounts of these two coumarins are negligible in the fruits [2a-d]. Most phytochemical studies carried out on the fig tree have been focused on the leaves and fruits. However, the furanocoumarins content of fig stems has received less attention. Moreover, few comparative studies on the chemical composition of different varieties of fig have been performed. The main aim of this study was to establish a specific HPLC-DAD-MS method to identify and quantify psoralen and bergapten in eight samples and two parts, bark and wood, of fig stems from eight Algerian varieties.

The results of HPLC-DAD-MS analyses of the eight fig stem samples showed that psoralen appeared at 29.0 min, with a

molecular ion at  $m/z$   $[M+H]^+$  187 and bergapten at 33.3 min, with a molecular ion at  $m/z$   $[M+H]^+$  217. The two other main linear furanocoumarins, isopimpinellin and xanthotoxin, were not detected. Significant differences in psoralen and bergapten content between wood and bark of the same variety and between the eight varieties have been observed. Table 1 shows the individual concentrations of psoralen and bergapten ( $\mu\text{g/g}$  dried weight, DW) found in the two parts of each variety. Psoralen was the predominant compound in the two parts of *F. carica* stems and was found to vary (in  $\mu\text{g/g DW}$ ) from 146.6 to 1110.3 in the stem bark and from 395.7 to 1671.8 in the wood. The bergapten concentration varied (in  $\mu\text{g/g DW}$ ) from 144.2 to 718.6 in the wood and from 114.3 to 524.0 in the stem bark.

**Table 1:** Coumarin contents ( $\mu\text{g/g DW}$ ) in different varieties of fig stems.

Compounds		Dark varieties			
		Sample A	Sample B	Sample C	Sample D
P	wood	601.0 $\pm$ 1.0	1363.3 $\pm$ 5.4	1671.8 $\pm$ 3.2	1628.4 $\pm$ 11.8
	bark	146.6 $\pm$ 1.2	610.9 $\pm$ 3.0	455.2 $\pm$ 1.2	1110.3 $\pm$ 9.8
B	wood	168.9 $\pm$ 3.0	660.7 $\pm$ 3.8	718.6 $\pm$ 2.4	219.2 $\pm$ 2.3
	bark	127.1 $\pm$ 1.7	524.0 $\pm$ 2.6	340.5 $\pm$ 1.5	120.7 $\pm$ 4.0
		Green varieties			
		Sample E	Sample F	Sample G	Sample H
P	wood	531.4 $\pm$ 0.3	448.2 $\pm$ 1.2	930.8 $\pm$ 0.9	395.7 $\pm$ 0.01
	bark	430.0 $\pm$ 0.2	229.8 $\pm$ 0.2	353.0 $\pm$ 1.1	336.6 $\pm$ 0.03
B	wood	144.2 $\pm$ 0.3	243.6 $\pm$ 0.6	199.0 $\pm$ 0.4	342.6 $\pm$ 1.6
	bark	114.3 $\pm$ 0.2	144.2 $\pm$ 0.6	224.6 $\pm$ 0.7	265.5 $\pm$ 2.0

P: Psoralen; B: Bergapten

Regarding the distribution of the two coumarins between the two stem parts, both psoralen and bergapten contents were higher in the wood than in the stem bark in all samples, except for bergapten in sample G. Our results are in agreement with those obtained recently by Conforti *et al.* [2b] and confirm that the furanocoumarin distribution in fig follows the order: leaves > wood > bark > fruit peel > fruit pulp (Table 2). In addition, the stems of most varieties producing dark fruits, in particular Zreka, Boule d'Or and Hamri, have greater concentrations of psoralen and bergapten than those

giving green fruits. The latter varieties might be less susceptible to stress factors, as the phytoalexin role of furanocoumarins in the fig tree has already been reported. This is the first study comparing bark and wood among different Algerian varieties of *F. carica*. The findings indicate that both fig stems and leaves could be used for extraction thanks to their high psoralen and bergapten content.

**Table 2:** Psoralen and bergapten levels ( $\mu\text{g/g}$ , DW) in different parts of the fig.

	Stem bark <sup>a</sup>	Stem wood <sup>a</sup>	Leaves <sup>b</sup>	Fruits neel <sup>b</sup>	Fruits niln <sup>b</sup>
<b>P</b>	395.7- 1671.8	146.6-1110.3	3774.7-9359.7	2.6-18.4	3.7 - 17.0
<b>B</b>	114.3 – 524.0	144.2- 1718.6	1336.7-4627.2	0.0-26.8	0.0 - 45.8

<sup>a</sup>: The current study, <sup>b</sup>: Oliveira *et al* [2b], P: Psoralen, B: Bergapten

## Experimental

**Plant material:** *Ficus carica* L. stems from 8 Algerian varieties (A-H) were collected in the eastern part of Algeria in May-June 2010 (Table 3). The local fig varieties were authenticated by the Institut Technique des Arbres fruitiers et viticoles (ITAFV), Medjez Dchich, Skikda, Algeria. Voucher specimens were deposited at the Laboratory of Applied Chemistry, University of Guelma, Algeria.

**Table 3:** Vernacular name and location of the 8 varieties studied.

Variety	Color of fruits	Vernacular Name	Location
Sample A	Black skin	Blanquette	Guelma town (Wedzeneti)
Sample B	Black skin	Zreka	Guelma town (Belkheir)
Sample C	Black skin	Boule d'or	Annaba town (Seraidi)
Sample D	Black skin	Hamri	Guelma town (Wedzeneti)
Sample E	Green skin	Albo	Guelma town
Sample F	Green skin	Bakor blanc	Guelma (Bouati)
Sample G	Green skin	Bakor noir	Guelma town (Belkheir)
Sample H	Green skin	Cavalière	Guelma (Bouati)

**Reagents and chemicals:** All organic solvents used were of HPLC grade. Methanol was purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and acetonitrile from Scharlau Chemie (Sentmenat, Spain). Deionized water was prepared by a Milli-Q Water Purification system (Millipore, MA, USA). Psoralen, bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin were purchased from Extrasynthèse (Genay, France).

**Preparation of the samples:** The bark and woody part of fig stems were separated, shade-dried and pulverized. Two g of each sample were exhaustively extracted with  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (50:50) and filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE filter. The extracts were then evaporated under vacuum at 35°C and lyophilized to give 100 mg of solid powder. A 5 mg aliquot was dissolved in 1 mL of methanol and filtered through a 0.25  $\mu\text{m}$  membrane filter (Macherey-Nagel) prior to injection into the HPLC equipment.

**Quantification by RP-HPLC-DAD:** An Agilent HPLC 1100 series instrument was used for quantification. Data analysis was performed using ChemStation chromatography software. Chromato-

graphic separation was achieved on a Bischoff ProntoSIL 120-5-C18-AQ column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle size) thermostated at 25°C. The flow rate was typically 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$  for all samples. Water and acetonitrile, both modified with 0.05% trifluoroacetic acid, were used as mobile phases A and B, respectively. Gradient elution was as follows: 0 min-2 min 100% A, 6 min 85% A, 35 min-40 min 50% A, 45 min-47 min 0% A, 57 min 95% A followed by 10 min for reequilibration. The selected wavelength for quantification was 310 nm.

**Identification of furanocoumarins by RP-HPLC-MS:** The HPLC-DAD-MS analyses were performed on an Agilent HPLC 1200 series, coupled with an Esquire 3000+ ion trap mass spectrometer equipped with an ESI source from Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA). Data analysis was performed using Esquire software. The column was identical to that used for the quantification. Fractions were eluted with a gradient of water-0.1% HCOOH (solvent A) and acetonitrile-0.1% HCOOH (solvent B) according to a gradient program slightly modified (95 % A between 0 min and 2 min). The HPLC output flow was split with a passive splitter with an average 1:100 ratio depending on the flow solvent and viscosity and rate. Drying gas flow was set at 5.0  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  and drying temperature at 325°C; nebulizer pressure was set to 15 psi. ESI-MS parameters (positive mode) were: HV capillary -3700 V, end plate offset -500 V, capillary exit 127.9 V, skimmer 31.7 V; trap drive 89.4.

**Validation of the analytical method:** The working concentration range was 0.01-0.5  $\text{mg/mL}$  for psoralen and bergapten. The calibration curves were calculated by plotting the peak area ratio (Y) versus concentration (X,  $\mu\text{g}$  injected) of the two coumarins in the standard solution at 5 different concentrations, each point being the mean value from 3 independent area measurements. Within this interval, the calibration curves were linear with correlation coefficient for psoralen and bergapten  $R^2 > 0.99$ . Coumarin contents in the bark and woody part of stems extracts were determined in triplicate. Compounds were identified by comparing their relative retention times, UV and mass spectra with authentic references. The recovery capacities of the method were assessed in quadruplicate by spiking extracts with 3 different concentrations of pure psoralen and bergapten (0.5, 0.7 and 1.0 mg) standards. The average recovery was greater than 98% for both compounds. Under the above experimental conditions, the proposed method was validated by linearity, precision, recovery, LOD and LOQ. The limits of detection (LOD, S/N = 3) and quantification (LOQ, S/N = 10) were 1  $\mu\text{g/mL}$  and 3  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

**Acknowledgments** - The authors thank the Institut Technique des Arbres fruitiers et viticoles ITAF, de Medjez Dchich, Skikda, Algeria, for authenticating the fig varieties.

## References

- (a) Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, Altman A, Kerem Z, Flaishman MA. (2006) Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 7717-7723; (b) Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD, Newman RA. (2008) *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, **119**, 195-213; (c) Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J. (2005) Dried fruits: excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, **24**, 44-50; (d) Perez C, Canal JR, Torres MD. (2003) Experimental diabetes treated with *Ficus carica* extract: effect on oxidative stress parameters. *Acta Diabetologica*, **40**, 3-8; (e) Azzi R, Djaziri R, Lahfa F, Sekkal FZ, Benmehdi H, Belkacem N. (2012) Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, **6**, 2041-2050.
- (a) Singh AP, Singh DP, Srivastava S, Govindarajan R, Rawat AKS. (2007) A validated quantitative HPTLC method for analysis of biomarkers in *Ficus carica* L. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, **20**, 437-441; (b) Oliveira AP, Valentao P, Pereira JA, Silva BM, Tavares F, Andrade PB. (2009) *Ficus carica* L.: metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2841-2846; (c) Conforti F, Menichini G, Zanfini L, Tundis R, Statti G A, Provenzano E, Menichini F, Somma F, Alfano C. (2012) Evaluation of phototoxic potential of aerial components of the fig tree against human melanoma. *Cell Proliferation*, **45**, 279-285; (d) Zaynoun ST, Aftimos BG, Ali LA, Tenekjian KK, Khalide U, Kurban AK. (1984) *Ficus carica*; isolation and quantification of the photoactive components. *Contact dermatitis*, **11**, 21-25.

<b>Volatile Composition of Six Horsetails: Prospects and Perspectives</b> Françoise Fons, Didier Froissard, Jean-Marie Bessière, Alain Fruchier, Bruno Buatois and Sylvie Rapior	509
<b>Chemical Compositions of the Rhizome, Leaf and Stem Oils from Malaysian <i>Hornstedtia leonurus</i></b> Nor Akmalazura Jani, Hasnah Mohd. Sirat, NorAzah Mohamad Ali and Azrina Aziz	513
<b>Effect on Emotional Behavior and Stress by Inhalation of the Essential oil from <i>Chamaecyparis obtusa</i></b> Hikaru Kasuya, Erika Hata, Tadaaki Satou, Masaki Yoshikawa, Shinichiro Hayashi, Yoshinori Masuo and Kazuo Koike	515
<b>Chemical Composition and Antibacterial Activity of Rhizome Oils from Five <i>Hedychium</i> Species</b> Ratchuporn Suksathan, Siriwoot Sookkhee, Somboon Anuntalabhochai and Sunee Chansakaow	519
<b>Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Three Essential Oils from <i>Curcuma wenyujin</i></b> Jingjing Zhu, Agnieszka D. Lower-Nedza, Meng Hong, Song Jiec, Zhimin Wang, Dong Yingmao, Christine Tschiggerl, Franz Bucar and Adelheid H. Brantner	523
<b>Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of Aerial Parts and Ripe Fruits of <i>Echinophora spinosa</i> (Apiaceae) from Italy</b> Daniele Fraternali, Salvatore Genovese and Donata Ricci	527
<b>Composition and <i>in vitro</i> Anticancer Activities of the Leaf Essential Oil of <i>Neolitsea variabilissima</i> from Taiwan</b> Yu-Chang Su, Kuan-Ping Hsu, Eugene I-Chen Wang and Chen-Lung Ho	531
<b><u>Review/Account</u></b>	
<b>Natural Products from Marine Algae of the Genus <i>Osmundaria</i> (Rhodophyceae, Ceramiales)</b> Kelvin Osako and Valéria Laneuville Teixeira	533
<b>Phenols, Alkaloids and Terpenes from Medicinal Plants with Antihypertensive and Vasorelaxant Activities. A Review of Natural Products as Leads to Potential Therapeutic Agents</b> Francesco Maione, Carla Cicala, Giulia Musciacco, Vincenzo De Feo, Anibal G. Amat, Armando Ialenti and Nicola Mascolo	539
<b>Diosmin – Isolation Techniques, Determination in Plant Material and Pharmaceutical Formulations, and Clinical Use</b> Anna Bogucka – Kocka, Michał Woźniak, Marcin Feldo, Janusz Kocki and Katarzyna Szewczyk	545

# Natural Product Communications

## 2013

Volume 8, Number 4

### Contents

<u>Original Paper</u>	<u>Page</u>
<b>Anti-melanogenesis Constituents from the Seaweed <i>Dictyota coriacea</i></b> Ryeo Kyeong Ko, Min-Chul Kang, Sang Suk Kim, Tae Heon Oh, Gi-Ok Kim, Chang-Gu Hyun, Jin Won Hyun and Nam Ho Lee	427
<b>Methyl Carnosate, an Antibacterial Diterpene Isolated from <i>Salvia officinalis</i> Leaves</b> Elisa Klimati, Fabio Mastrogiovanni, Maria Valeri, Laura Salvini, Claudia Bonechi, Nilufar Zokirzhonovna Mamadalieva, Dilfuza Egamberdieva, Anna Rita Taddei and Antonio Tiezzi	429
<b>Cytotoxicity of Meroterpenoids from <i>Sargassum siliquastrum</i> against Human Cancer Cells</b> Jung Im Lee, Myoung K. Kwak, Hee Y. Park and Youngwan Seo	431
<b>Isolation of Methyl 27-caffeoyloxyoleanolate – A New Oleanane Triterpenoid from the Roots of <i>Hibiscus vitifolius</i></b> Duraismy Ramasamy and Ariamuthu Saraswathy	433
<b>Synthesis and Cytotoxic Activity of New Betulin and Betulinic Acid Esters with Conjugated Linoleic Acid (CLA)</b> Barbara Tubek, Pawel Mitula, Natalia Niezgoda, Katarzyna Kempinska, Joanna Wietrzyk and Czeslaw Wawrzenczyk	435
<b>Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids and Evaluation of Some Biological Activities of Algerian <i>Senecio delphinifolius</i> (Asteraceae)</b> Soukaina Tidjani, Philippe N. Okusa, Amar Zellagui, Laetitia Moreno Y Banuls, Caroline Stévigny, Pierre Duez and Salah Rhouati	439
<b>Berberine: a New Isoquinoline-isoquinolone Alkaloid from <i>Berberis vulgaris</i> (Berberidaceae)</b> Anna Hošťálková, Zdeněk Novák, Milan Pour, Anna Jirošová, Lubomír Opletal, Jiří Kuneš and Lucie Cahliková	441
<b>Dicentrine Production in Callus and Cell Suspension Cultures of <i>Stephania venosa</i></b> Tharita Kitisripanya, Jukrapun Komaikul, Nirachara Tawinkan, Chuennapha Atsawinkowit and Waraporn Putalun	443
<b>New Flavan and Alkyl <math>\alpha,\beta</math>-Lactones from the Stem Bark of <i>Horsfieldia superba</i></b> Nabil Ali Al-Mekhlafi, Khozirah Shaari, Faridah Abas, Ethyl Jeyaseela Jeyaraj, Johnson Stanslas, Shaik Ibrahim Khalivulla and Nordin H. Lajis	447
<b>New Flavonol Triglycosides from the Leaves of Soybean Cultivars</b> Yoshinori Murai, Ryoji Takahashi, Felipe Rojas Rodas, Junichi Kitajima and Tsukasa Iwashina	453
<b>Melitidin: A Flavanone Glycoside from <i>Citrus grandis</i> ‘Tomentosa’</b> Wei Zou, Yonggang Wang, Haibin Liu, Yulong Luo, Si Chen and Weiwei Su	457
<b>Two New Chalcones from the Flowers of <i>Clerodendrum inerme</i></b> Shaik Khadar Shahabuddin, Rachakunta Munikishore, Golakoti Trimurtulu, Duvvuru Gunasekar, Alexandre Deville and Bernard Bodo	459
<b>A Novel Phenolic Compound from <i>Phyllanthus emblica</i></b> Gaimei She, Ruiyang Cheng, Lei Sha, Yixia Xu, Renbin Shi, Lanzhen Zhang and Yajian Guo	461
<b>Anti-austeric Activity of Phenolic Constituents of Seeds of <i>Arctium lappa</i></b> Yasuhiro Tezuka, Keiichi Yamamoto, Suresh Awale, Feng Li, Satoshi Yomoda and Shigetoshi Kadota	463
<b>Bioactive Lignans from the Leaves and Stems of <i>Schisandra wilsoniana</i></b> Guang-Yu Yang, Rui-Rui Wang, Zhong-Hua Gao, Yin-Ke Li, Liu-Meng Yang, Xiao-Nian Li, Shan-Zhai Shang, Yong-Tang Zheng, Wei-Lie Xiao and Han-Dong Sun	467
<b>Antioxidative / Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Asteraceae Plants</b> Ivana Generalić Mekinić, Franko Burčul, Ivica Blažević, Danijela Skroza, Daniela Kerum and Višnja Katalinić	471
<b>Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Phenolic Compounds of Selected <i>Inula</i> species from Turkey</b> Alper Gökbulut, Onural Özhan, Basri Satılmış, Kadir Batçoğlu, Selami Günal and Engin Şarer	475
<b>Two New Dihydrostilbenoid Glycosides Isolated from the Leaves of <i>Litsea coreana</i> and their Anti-inflammatory Activity</b> Wenjian Tang, Weili Lu, Xiaoqing Cao, Yilong Zhang, Hong Zhang, Xiongwen Lv and Jun Li	479
<b>Inhibitory Activity of Benzophenones from <i>Anemarrhena asphodeloides</i> on Pancreatic Lipase</b> Yang Hee Jo, Seon Beom Kim, Jong Hoon Ahn, Qing Liu, Bang Yeon Hwang and Mi Kyeong Lee	481
<b>Identification and Quantification of Furanocoumarins in Stem Bark and Wood of Eight Algerian Varieties of <i>Ficus carica</i> by RP-HPLC-DAD and RP-HPLC-DAD-MS</b> Samia Rouaiguia-Bouakkaz, Habiba Amira-Guebailia, Céline Rivière, Jean-Claude Delaunay, Pierre Waffo-Téguo and Jean-Michel Mérillon	485
<b>UPLC-Q-TOF/MS Coupled with Multivariate Statistical Analysis as a Powerful Technique for Rapidly Exploring Potential Chemical Markers to Differentiate Between <i>Radix Paeoniae Alba</i> and <i>Radix Paeoniae Rubra</i></b> Nian-cui Luo, Wen Ding, Jing Wu, Da-wei Qian, Zhen-hao Li, Ye-fei Qian, Jian-ming Guo and Jin-ao Duan	487
<b>Antimicrobial Activity of Crude Methanolic Extract from <i>Phyllanthus niruri</i></b> Darah Ibrahim, Lim Sheh Hong and Ninthianantham Kuppan	493
<b>Cellulose Contents of Some Abundant Indian Seaweed Species</b> Arup K. Siddhanta, Sanjay Kumar, Gaurav K. Mehta, Mahesh U. Chhatbar, Mihir D. Oza, Naresh D. Sanandiyaa, Dharmesh R. Chejara, Chirag B. Godiya and Stalin Kondaveeti	497
<b>Anti-inflammatory Potential of Silk Sericin</b> Pornanong Aramwit, Pasarapa Towiwat and Teerapol Srichana	501
<b>Composition of Essential Oil from Aerial and Underground Parts of <i>Geum rivale</i> and <i>G. urbanum</i> Growing in Poland</b> Aleksandra Owczarek, Jan Gudej and Agnieszka Kice	505

Continued Inside backcover