THESE UNIQUE

de L'UNIVERSITÉ DE NANTES et de L'UNIVERSITE DE COCODY-ABIDJAN

ÉCOLE DOCTORALE NANTAISE • 3MPL

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

Valorisation de quatre plantes médicinales ivoiriennes : étude phytochimique

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie

Spécialité : Chimie organique

Présentée et soutenue publiquement par

François-Prévost Bi Koffi KOUAME

Le 12 octobre 2012, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	M. Joël BOUSTIE	*Professeur • Université de Rennes*
	Mme. Isabelle BILLAUT	*Maître de conférences (HDR) • Université Paris-Sud, Orsay*
Directeur de thèse	M. Gustave BEDI	*Maître de conférences(CAMES) • Ecole Normale Supérieure, Abidjan*
Co-directeur de thèse	M. Richard ROBINS	*DR1 au CNRS • Université de Nantes*
Invité	M. Jacques LEBRETON	*Professeur • Université de Nantes*
Invitée (Encadrant)	Mme. Illa TEA	*Maître de conférences • Université de Nantes*

Remerciements

Ce travail a été réalisé en cotutelle au sein des Laboratoires de Chimie Organique Biologique (LCOB) de l'Université de Cocody-Abidjan et de Chimie Et Interdisciplinarité : Synthèse, Analyse, Modélisation (CEISAM, LUNAM-CNRS UMR6230) de l'Université de Nantes.

Je remercie Messieurs Zana Félix TONZIBO et Bruno BUJOLI, respectivement directeur du Laboratoire Chimie Organique Biologique et directeur du laboratoire CEISAM qui ont bien voulu m'accepter dans leur équipe pour réaliser ce travail.

Je remercie très cordialement les responsables de la coopération universitaire franco-ivoirienne aussi bien au niveau de l'Institut Français de Coopération qu'au niveau du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique de la Côte d'Ivoire pour avoir financé mes séjours à Nantes durant mon parcours de thèse.

Je remercie Monsieur Jacques LEBRETON Professeur à l'Université de Nantes, qui a bien voulu accepter de participer au jury de cette thèse. Pour le temps qu'il y a consacré, je voudrais qu'il reçoive mes remerciements.

Ensuite qu'il me soit permis d'adresser mes remerciements à Monsieur Joël BOUSTIE, Professeur à l'Université de Rennes, et Madame Isabelle BILLAULT, Maître de conférences (HDR) à l'Université Paris-Sud, Orsay pour avoir bien voulu faire partie du jury et tant que rapporteur, qu'ils reçoivent ici mes remerciements sincères.

Je tiens à exprimer particulièrement ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance à Monsieur Gustave BEDI, Maître de Conférences membre du Conseil Africain et Malgache de l'Enseignement Supérieure (CAMES), directeur de cette thèse. L'origine de cette belle symphonie lui est imputable car depuis ma maitrise en chimie organique, il m'a inculqué le virus de la recherche. Ce qui m'a valu un splendide mémoire de DEA pour lequel son savoir-faire m'a beaucoup galvanisé. Grace à lui, la collaboration a été nouée avec le laboratoire CEISAM pour permettre à ce sujet de thèse débuté en Côte d'Ivoire, de s'achever à Nantes. Je voudrais qu'il accepte ici mes remerciements, pour ses précieux conseils, son aide inestimable et pour son optimisme contagieux qui me fascine de tout temps.

Je n'oublie pas Monsieur Yao Thomas NGUESSAN, Professeur titulaire, ancien membre de LCOB, qui a eu le flair d'autoriser Monsieur Gustave BEDI pour conduire la direction de cette thèse et aussi pour tous ses conseils lors de ma formation doctorale.

Je tiens à remercier sincèrement et sans réserve Monsieur Richard ROBINS, Directeur de Recherche au CNRS de la Faculté des Sciences et Technique de Nantes, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir bien accueilli dans son équipe, pour les discussions fructueuses que j'ai eues avec lui et pour sa gentillesse et sa modestie inégalées lors de l'exécution de la dernière partie de cette thèse à Nantes.

Que ma profonde gratitude soit exprimée ici à Madame Illa TEA, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences et Technique de Nantes, mon encadrante de Nantes, pour m'avoir fait partager ses nombreuses connaissances. Elle m'a souvent donné le courage d'avancer dans mes recherches, notamment en me remotivant lorsque j'en éprouvais le besoin, merci chère maître pour votre apport inestimable.

Merci à Madame Isabelle BILLAULT et à Monsieur Ané ADJOU qui ont accepté de juger ce travail tout au long de son exécution. Je les remercie pour tout ce temps qu'ils y ont consacré. Mes vifs remerciements s'adressent à Mesdames Julie HEMEZ et Virginie SILVESTRE et à Monsieur Denis LOQUET du Laboratoire CEISAM, pour leur enthousiasme et avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je remercie les membres du Laboratoire LCOB pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée tout au long de ces années de thèse. Mes remerciements s'adressent également aux membres de l'équipe EBSI (Élucidation de Biosynthèse et Spectrométries Isotopiques) du laboratoire CEISAM pour leur accueil et leur soutien

Merci à tous les thésards et stagiaires que j'ai eu la chance de côtoyer au laboratoire au cours de ces trois années : Estelle, Julie, Chaïmaâ, Alexis, Didier, Kevin, David, Hubert, Ugo, Maxime, Meerakhan, Yakéné, Mamadou, Kasia à l'Université de Nantes et Landry, Djeda, Faustin, Zana, Diane, Florence, Akpa de l'Université de Cocody, merci pour votre bonne humeur, votre sympathie.

Merci à Monsieur Gbaziké Gagouehi Alexis dit Posner, indicateur botanique habitant du village de BOBIA, dans le centre Ouest de la Cote d'Ivoire, pour sa collaboration franche et désintéressée lors de la récolte des plantes de cette étude.

Merci à tous mes amis pour tous les moments de franche insouciance et de douce gaieté qu'il m'a été donné de partager avec eux entre les lignes de cette thèse.

Enfin, je ne saurais terminer cette liste sans adresser un remerciement particulier à Monsieur Frédérique DUGUE et ceux qui m'ont soutenu dans l'ombre, mes parents, mes sœurs et mes frères, sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Je leur dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection pour toute la patience et les sacrifices qu'ils ont consentis pour moi et dont je serai à jamais redevable, et d'avoir porté ce travail à terme représente pour moi aujourd'hui la plus belle des récompenses.

Que tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Abréviations et symboles

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

AcOEt	acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AIS	Anti-inflammatoire stéroïdien
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	*B cell lymphoma 2*
Bcl-xL	*B cell lymphoma-extra large*
BF_3-Et_2O	Ethoxyethane - trifluoroborane (1:1)
C18 ou RP-18	silice greffée
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CC_{50}	Concentration cytotoxique médiane
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CE_{50}	Concentration Efficace médiane
Chrom1, **Chrom2**, etc	Désignation des composés isolés de *Chromolaena odorata*
CI_{50}	Concentration Inhibitrice à 50% Concentration nécessaire pour avoir 50% d'inhibition de croissance
CL_{50} ou DL_{50}	Concentration Létale médiane
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY	*COrrelated SpectroscopY*
COX	Cyclooxygénase
δ_C	déplacement chimique du carbone.
δ_H	déplacement chimique du proton.
d	Doublet

Da	Dalton (unité de masse moléculaire)
dd	doublet dédoublé
ddd	doublet dédoublé dédoublé
DE_{50}	Dose Efficace qui induit la moitié de l'effet maximal
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHB	Acide dihydroxybenzoïque
DMEM	*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DMSO-d6	diméthyl sulfoxyde deutéré.
dt	doublet détriplé
EDL	Equivalent de Double Liaison
ESI	ionisation par electrospray (*ElectroSpray Ionization*)
FACS	*Fluorescence Activated Cells Sorter*
FAS	*Fatty Acid Synthase*
FL2-H	*Histogram of the fluorescence 2*
FSC-H	*Forward Scatter Histogram*
5-FU	5-fluorouracile
GC	chromatographie en phase gazeuse (*Gaz Chromatography*)
GC-SM	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (*Gaz Chromatography-Mass Spectrometry*)
Hex	Hexane
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine (*Human Immunodeficiency Virus*)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	chromatographie liquide à haute performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
HR	Haute resolution (*High Resolution*)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz

IC ou CI	ionisation chimique (*Chemical Ionisation*)
IE ou EI	ionisation par impact électronique (*Electron Impact ionization*)
IR	Infra-Rouge
J	constante de couplage
KI	indice de Kovats (*Kovats Indices*)
LDL	Lipoprotéine de basse densité (*Low Density Lipoprotein*)
Lep1, **Lep2**, etc	Désignation des composés isolés de *Leptoderris fasciculata*
m/z	rapport masse/charge atomique.
Mor1, **Mor2**, etc	Désignation des composés isolés de *Morinda lucida*
MS	spectrométrie de masse (*Mass Spectroscopy*)
NIST	Base de données (*National Institute of Standards and Technology*)
NOE	*Nuclear Overhauser Effect*
NOESY	*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	*Phosphate Buffer Salin*
PE	Phycoérythrine
PEG 4000	Polyéthylène glycol 4000
ppm	partie par millions.
PSM	Poste de sécurité microbiologique
q.s.p	quantité suffisante pour
RI	Indice de réfraction (Refractive Index)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN 1D, 2D	RMN à une ou deux dimensions
RMN-^{1}H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN-^{13}C	Résonance magnétique nucléaire du carbone
ROS ou ERO	Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*)
rpm	Rotations par minute
s	Singulet

SSC-H	*Side Scatter histogram*
SVF	Sérum de veau fœtal
Syn	Synonyme
THF	Tétrahydrofurane
Tol	Toluene
uma	Unité de masse atomique
UV	Ultra-violet

REMERCIEMENTS I

ABREVIATIONS ET SYMBOLES III

INTRODUCTION 1

PARTIE 1 : SELECTION DES PLANTES DE L'ETUDE 3

1 CRITERES DE SELECTION DES PLANTES 3

1.1 UTILISATION DES PLANTES EN MEDECINE TRADITIONNELLE 3

1.2 LES APPORTS DE LA LITTERATURE 4

2 OBJECTIFS DE L'ETUDE 5

2.1 OBJECTIFS SCIENTIFIQUES 5

2.2 OBJECTIFS SOCIO-ECONOMIQUES 5

PARTIE 2 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 6

1 PRESENTATION DE *CHROMOLAENA ODORATA* (L.) R. M. KING & H. ROBINSON (ASTERACEAE) 6

1.1 GENERALITE 6

1.1.1 Répartition géographique 6

1.1.2 Origine 6

1.1.3 Intrusion et invasion en Afrique 7

1.2 DESCRIPTION 8

1.3 CARACTERISTIQUES BOTANIQUES 8

1.4 UTILISATIONS TRADITIONNELLES 8

1.5 METABOLITES SECONDAIRES SIGNALES DE *CHROMOLAENA ODORATA* 9

1.5.1 Métabolites secondaires volatils et activités biologiques 9

1.5.2 Métabolites secondaires non volatils et activités biologiques 10

2 PRESENTATION DE *LEPTODERRIS FASCICULATA* (BENTH.) DUNN (FABACEAE) 15

2.1 REPARTITION GEOGRAPHIQUE 15

2.2 DESCRIPTION 15

2.3 CARACTERISTIQUES BOTANIQUES 16

2.4 UTILISATIONS TRADITIONNELLES 16
2.5 METABOLITES SECONDAIRES SIGNALES DE *LEPTODERRIS FASCICULATA* 16
2.5.1 Métabolites secondaires volatils : Huiles essentielles 16
2.5.2 Métabolites secondaires non volatils 16

PRESENTATION DE *MORINDA MORINDOIDES* BAKER (RUBIACEAE) 17

2.6 REPARTITION GEOGRAPHIQUE 17
2.7 DESCRIPTION 17
2.8 CARACTERISTIQUES BOTANIQUES 18
2.9 UTILISATION TRADITIONNELLE 18
2.10 METABOLITES SECONDAIRES SIGNALES DE *MORINDA MORINDOIDES* 18
2.10.1 Métabolites secondaires volatils : huiles essentielles 18
2.10.2 Métabolites secondaires non volatils 18

3 PRÉSENTATION DE *MORINDA LUCIDA* BENTH. (RUBIACEAE) 22

3.1 REPARTITION GEOGRAPHIQUE 22
3.2 DESCRIPTION 22
3.3 CARACTERISTIQUES BOTANIQUES 23
3.4 UTILISATION EN MEDECINE TRADITIONNELLE 23
3.5 METABOLITES SECONDAIRES SIGNALES DE *MORINDA LUCIDA* 23
3.5.1 Métabolites secondaires volatils : huiles essentielles 23
3.5.2 Métabolites secondaires non volatils 24

4 LES HUILES ESSENTIELLES 27

4.1 DEFINITION 27
4.2 ROLE PHYSIOLOGIQUE 27
4.3 LOCALISATION ET LIEU DE SYNTHESE 27
4.4 METHODES D'EXTRACTION 27
4.4.1 Enfleurage et Macération 27
4.4.2 Expression 28
4.4.3 Distillation : Hydrodistillation 28
4.4.4 Entraînement à la vapeur 28
4.4.5 Extraction aux solvants volatils 28

4.4.6 Extraction au CO_2 supercritique 28
4.5 CALCUL DU RENDEMENT 29
4.6 COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES 29
4.7 FACTEURS INFLUENÇANT LA COMPOSITION CHIMIQUE 30

5 LES TERPENOÏDES 31

5.1 MONOTERPENES 31
5.2 SESQUITERPENES 32
5.3 DITERPENES 33
5.4 TRITERPENES ET STEROÏDES 33

6 LES COMPOSES PHENOLIQUES 36

6.1 GENERALITES 36
6.2 LES FLAVONOÏDES 36
6.2.1 Définition 36
6.2.2 Classification et caractéristiques des flavonoïdes 37
6.2.3 Propriétés des flavonoïdes 39

7 LES ANTHRAQUINONES 43

7.1 GENERALITES 43
7.2 PROPRIETES DES ANTHRAQUINONES 43
7.2.1 Propriété photosensibilisante 43
7.2.2 Propriété antibactérienne 43
7.2.3 Propriété antifongique 44
7.2.4 Propriété antivirale 45
7.2.5 Propriété anticancéreuse 45
7.2.6 Propriété laxative 45
7.2.7 Propriété antipaludique 46
7.2.8 Propriété antituberculeuse 46

8 INFLAMMATION ET CANCER 47

CONCLUSION PARTIELLE 48

PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS 49

1 ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES FEUILLES DE *CHROMOLAENA ODORATA* 49

1.1 METABOLITES SECONDAIRE VOLATILS : HUILES ESSENTIELLES 49

1.1.1 Rendement en huiles essentielles 49

1.1.2 Composition chimique des huiles essentielles 51

1.2 METABOLITES SECONDAIRES NON VOLATILS 52

1.2.1 Interprétation des CCM préliminaires de l'extrait hexanique C1 52

1.2.2 Purification de l'extrait hexanique C1 53

1.2.3 Détermination structurale des composés isolés de l'extrait hexanique C1 55

2 ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES FEUILLES DE *MORINDA MORINDOIDES* 65

3 ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES FEUILLES, FRUITS ET ECORCES DE *MORINDA LUCIDA* 67

3.1 METABOLITES SECONDAIRE VOLATILS DES FEUILLES ET FRUITS : HUILES ESSENTIELLES 67

3.2 METABOLITES SECONDAIRE NON VOLATILS DES ECORCES 68

3.2.1 Interprétation des CCM préliminaires de l'extrait d'acétate d'éthyle M3 68

3.2.2 Purification de l'extrait d'acétate d'éthyle M3 69

3.2.3 Détermination structurale des composés isolés de M3 70

4 ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES FEUILLES DE *LEPTODERRIS FASCICULATA* 79

4.1 INTERPRETATION DES CCM PRELIMINAIRES DES EXTRAITS DE DICHLOROMETHANE (L2) ET D'ACETATE D'ETHYLE (L3) 79

4.2 PURIFICATION DE L'EXTRAIT DE DICHLOROMETHANE L2 81

4.2.1 Isolement du composé Lep1 82

4.2.2 Isolement du composé Lep2 83

4.2.3 Isolement du composé Lep3 83

4.2.4 Isolement du composé Lep4 83

4.2.5 Isolement des composés Lep5, Lep6, Lep7 et Lep8 83

4.3 DETERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES DE L'EXTRAIT DE DICHLOROMETHANE L2 84

4.3.1 Détermination de la structure du composé Lep6 84

4.3.2 Détermination de la structure du composé Lep8 88

4.3.3 Détermination de la structure du composé Lep3 90

4.3.4 Détermination de la structure du composé Lep7 95
4.3.5 Détermination de la structure du composé Lep5 100
4.3.6 Détermination de structure du composé Lep1 101
4.3.7 Détermination de la structure du composé Lep2 102
4.3.8 Détermination de la structure du composé Lep4 103
4.4 PURIFICATION DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE L_3 104
4.4.1 Isolement de Lep9 105
4.4.2 Isolement de Lep10, Lep11 et Lep12 105
4.5 DETERMINATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES DE L3 105
4.5.1 Détermination de la structure du composé Lep9 105
4.5.2 Détermination de la structure du composé Lep11 108
4.5.3 Détermination de la structure du composé Lep10 109
4.5.4 Détermination de la structure du composé Lep12 110

5 TESTS BIOLOGIQUES DES COMPOSES ISOLES DE *C. ODORATA* 111

5.1 EFFETS SUR LA VIABILITE CELLULAIRE 111
5.2 EFFETS SUR L'APOPTOSE 112
5.3 EFFETS SUR LA CLONOGENEICITE DES CELLULES 113

CONCLUSION GENERALE 115

PARTIE 4 : MATERIELS ET METHODES 119

1 MATERIEL VEGETAL ET EXTRACTION 119

1.1 MATERIEL VEGETAL 119
1.2 PROTOCOLE D'EXTRACTION 119
1.2.1 Huiles essentielles 119
1.2.2 Extraits bruts totaux 119

2 METHODES CHROMATOGRAPHIQUES ANALYTIQUES 122

2.1 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) 122
2.1.1 Réactif à l'acide phosphomolybdique (révélateur universel) 123
2.1.2 Réactif à la Vanilline sulfurique (révélateur polyvalent) 123
2.1.3 Réactif de Neu ou NP/PEG (révélateur des flavonoïdes) 123

2.1.4 Réactif de Liebermann et Burchard (révélateur des stérols, stéroïdes, terpènes) 123

2.1.5 Réactif à la potasse (révélateur des anthraquinones) 124

2.2 CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (CG-SM) 124

3 METHODES CHROMATOGRAPHIQUES PREPARATIVES 124

3.1 CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE OUVERTE (CC) 124

3.2 CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE SUR COUCHE MINCE 125

3.3 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE SEMI-PREPARATIVE (HPLC SEMIPREP) 125

4 METHODES PHYSICO-CHIMIQUES 125

4.1 SPECTROMETRIE DE MASSE (SM) 125

4.1.1 Ionisation par Electrospray (ESI) 125

4.1.2 Impact Electronique (IE) 126

4.1.3 Ionisation chimique (IC) 126

4.1.4 Spectrométrie de masse Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization (MALDI) 126

4.2 SPECTROMETRIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN) 127

4.2.1 Corrélations homonucléaires 127

4.2.2 Corrélations hétéronucléaires 127

4.3 DIFFRACTION AUX RAYONS X 127

5 TESTS BIOLOGIQUES 128

5.1 CONDITIONS DE CULTURE DES LIGNEES CELLULAIRES 128

5.1.1 Lignées et cultures cellulaires 128

5.1.2 Passage cellulaire 128

5.1.3 Comptage cellulaire sur lame de comptage KOVA Glasstic Slide 10 de chez Hycor® 128

5.1.4 Ensemencement 129

5.2 DEPOT DES DROGUES 129

5.2.1 Drogues ou molécules à potentiel anticancéreux à tester 129

5.2.2 ABT 737 ou «Abbott laboratory drug 737» 129

5.3 TESTS CELLULAIRES UTILISES 130

5.3.1 Test APO 2.7 130

5.3.2 Test de la viabilité cellulaire 131

5.3.3 Test de clonogénéicité 132

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 134

LISTE DES TABLEAUX 148

LISTE DES FIGURES 149

LISTE DES COMMUNICATIONS PUBLIEES PENDANT LA THESE 153

ANNEXES 154

Introduction

Les plantes ont depuis longtemps présenté un rôle très important pour l'humanité, car elles peuvent synthétiser un grand nombre de molécules organiques complexes dotées souvent d'activités biologiques potentielles. Elles constituent des merveilleuses usines végétales qui nous donnent la joie de guérir par un geste thérapeutique [1]. On s'en sert traditionnellement pour se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture et conserver les aliments (ou les cadavres).

Jusqu'à aujourd'hui, l'usage populaire des plantes reste d'une grande importance. D'après les données fournies par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), 80% de la population mondiale traitent leurs problèmes de santé par des remèdes traditionnels, d'une part parce qu'elles n'ont souvent pas accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne et, d'autre part, parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité [2]. La majorité des médicaments actuels, sont d'origine végétale ou fabriqués à partir de leurs modèles (synthèse ou hémisynthèse chimique des principes actifs). La médecine par les plantes est donc devenue une grande science, dans laquelle on part de la plante vers le principe actif.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques demeure une tache très intéressante et utile, en particulier pour les plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les terpènes dans les huiles essentielles.

Le traitement par les plantes se trouve surtout facilité par le fait que cette pratique est intimement liée aux coutumes et traditions, ce qui instaure un climat de confiance et une approche aisée des tradipraticiens. Ces détenteurs du savoir traditionnel sont d'un grand secours dans des pays comme la Côte d'Ivoire où la santé des populations est remise en cause par de nombreux facteurs notamment le coût élevé des prestations et des médicaments conventionnels, l'insalubrité de l'environnement, l'insuffisance de campagnes d'éducation pour la santé, pour ne citer que ceux-ci.

Les syndromes inflammatoires sont très fréquemment rencontrés en pratique courante. La réaction inflammatoire d'origine infectieuse ou non infectieuse peut entraîner un état de choc avec défaillance multi-viscérale qui engage le pronostic vital (décès dans 50% des cas).

Les inflammations qui englobent fièvre et douleur sont d'une très grande diversité et évoluent généralement vers la chronicité en l'absence d'un traitement complet et efficace d'où la nécessité de la recherche et de la mise au point de médicaments anti-inflammatoires accessibles par tous.

La communauté scientifique continue de chercher des composés chimiques capables d'atténuer les douleurs, de lutter contre les maladies cardiovasculaires, contre l'hémophilie et enfin contre des vecteurs de douleurs que sont les virus et les bactéries.

Cette nécessité passe par la recherche de molécules naturelles nouvelles isolées des plantes médicinales qui sont utilisées par la médecine traditionnelle. Notre étude a choisi de s'inscrire dans ce cadre.

Partie 1 : Sélection des plantes de l'étude

1 Critères de sélection des plantes

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes, de trouver de nouvelles voies d'applications dans le domaine de la pharmacie et de rendre la stratégie d'isolement la plus efficace, il convient de sélectionner avec soin les plantes à étudier.

Dans cette optique, un certain nombre de critères ont été pris en compte pour sélectionner les plantes de cette étude.

1.1 Utilisation des plantes en médecine traditionnelle

Une étude ethnobotanique axée sur les plantes pouvant avoir une quelconque activité anti-inflammatoire est le critère principal qui domine le choix. Ainsi, les indications du guérisseur traditionnel qui certifie l'usage empirique des différentes préparations traditionnelles des plantes, sont donc extrêmement importantes pour une sélection efficace, puisque la plupart des métabolites secondaires de plantes employées en médecine moderne ont été découverts par l'intermédiaire d'investigations ethnobotaniques [3].

En effet, l'étude des plantes médicinales a réellement commencé en Afrique depuis les Indépendances. Dans certains pays africains, des programmes d'étude ont été élaborés.

En Côte d'Ivoire, depuis 1974, un programme national de recherche sur les substances naturelles a été mis sur pied par le Ministère de la recherche scientifique. En 1999, une division de la médecine traditionnelle a été créée au sein du Ministère de la santé publique. C'est ainsi que plusieurs laboratoires se sont penchés sur l'étude des plantes médicinales. D'autres pays de la sous-région ont aussi élaboré des programmes d'études des plantes médicinales :

- Au Togo, un centre national de recherche sur la médecine traditionnelle et la pharmacopée africaine a été fondé au sein de l'office national de pharmacologie (TOGOPHARMA).

- Au Sénégal, les recherches sur la médecine traditionnelle figurent parmi les priorités du développement économique et social.

- Au Mali, il existe un institut national de recherche sur la médecine traditionnelle.

- En Guinée, en 1971, par décret présidentiel, des guérisseurs et des accoucheuses traditionnelles ont été officiellement associées au système de santé publique.

L'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie mettent en relation les savoirs ancestraux des médecins traditionnels et les connaissances scientifiques actuelles. Ce sont avant tout des domaines de recherche interdisciplinaire à l'interface des sciences de l'Homme, comme

l'ethnologie, l'histoire, la linguistique et des sciences de la nature, comme la botanique, la pharmacologie, la pharmacognosie, la médecine.

Les informations de terrain recueillies auprès des populations (les véritables tradipraticiens ne subsistent plus que dans des zones reculées) sont le reflet d'une approche culturelle de la maladie qui, en Côte d'Ivoire comme dans d'autres médecines traditionnelles, est fondée sur la symptomatologie. Un tel mélange de plantes est indiqué pour une douleur ou un symptôme donné et non pour soigner une maladie. La traduction de ces données symptomatiques brutes en termes de médecine étiologique est délicate et le recours d'un médecin est souvent indispensable à la caractérisation de la maladie. Le traitement varie selon le comportement du malade, ses dires, le rang social avec la prise en compte de son histoire familiale. De plus, le tryptique aliment-médicament-poison rend difficile la catégorisation entre actifs et toxiques qui peuvent être employés, à dessein, simultanément. Il est également nécessaire d'avoir à l'esprit que l'utilisation médicinale des plantes est souvent associée à des concepts irrationnels qui font appel au mystique. La difficulté vient ainsi de la nécessité de déceler, dans les mélanges traditionnellement employés, les plantes dont la présence fréquente fait penser qu'elles sont susceptibles de traiter un aspect donné de la maladie.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc réalisé auprès des guérisseurs traditionnels, une étude ethnobotanique. Cette étude s'est principalement focalisée sur les plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle impliquant des activités hémostatiques, antibactériennes et anti-inflammatoires (employées en cas de grande fièvre).

En tenant compte de tous ces critères, nous avons sélectionné quatre plantes : *Chromolaena odorata* (L) King & Robinson (Asteraceae), *Morinda morindoides* Baker (Rubiaceae), *Morinda lucida* Benth (Rubiaceae) et *Leptoderris fasciculata* (Benth.) Dunn (Fabaceae). Ces plantes sont authentifiées par le centre national de floristique de l'Université Cocody-Abidjan.

1.2 Les apports de la littérature

Les critères que nous venons d'évoquer ayant permis d'établir une liste préliminaire de plantes potentiellement intéressantes, nous avons réalisé une bibliographie détaillée des connaissances phytochimiques des espèces et de leurs activités biologiques.

Dans l'optique de la découverte de nouvelles molécules et/ou de nouvelles voies d'application thérapeutiques, il est plus judicieux de choisir des plantes qui ont été peu ou pas étudiées en phytochimie. Ainsi, dans cette étude, aucune donnée phytochimique n'est disponible dans la littérature pour *Leptoderris fasciculata* et pour les huiles essentielles de *Morinda morindoides*. Cependant, si la famille, le genre ou l'espèce ont déjà été étudiés, ce qui est le cas de *Chromolaena odorata* et de *Morinda lucida*, il sera plus facile de trouver des procédés analytiques, d'identifier rapidement les composés déjà connus et d'étudier leur potentielle activité biologique. Cela permet également d'éliminer les genres et/ou les espèces connues pour leur toxicité.

.

2 Objectifs de l'étude

2.1 Objectifs scientifiques

Notre objectif est de rechercher les composés responsables des activités biologiques à travers une étude des métabolites secondaires volatils (huiles essentielles) et non volatils (composés phénoliques, terpénoïdes, anthraquinones).

Pour ce faire, les matières végétales doivent être soumises à l'hydrodistillation ou à l'entrainement à la vapeur en vue d'extraire les huiles essentielles. Dans le cas de *Chromolaena odorata* (*C. odorata*), une étude de chémotype des huiles essentielles de la plante dans la ville d'Abidjan devra être menée afin d'en connaître la composition chimique d'une zone à une autre.

En ce qui concerne l'étude des métabolites secondaires non volatils, l'extraction devra immédiatement débuter après celle des huiles essentielles. Cependant les purifications ainsi que l'élucidation structurale feront l'objet d'un travail nécessitant du matériel de haute technologie (chromatographie, RMN, MS, RX). Enfin, quelques composés chimiques isolés pourront être soumis à des tests biologiques sur les cellules cancéreuses en raison du lien étroit entre inflammation et cancer, établi récemment par Coussens *et al*. en 2002 [4].

2.2 Objectifs socio-économiques

Pour le grand public, identifier les principes actifs de ces plantes et caractériser leur structure n'a peut-être pas un impact dans l'immédiat. Cependant à long terme la connaissance de leurs activités biologiques, pourrait permettre d'agir sur les doses de consommation en médecine traditionnelle car c'est la dose qui semble constituer une des problématiques majeures de l'utilisation des médicaments traditionnels.

D'autre part, la contribution à la valorisation des vertus de ces plantes pourra réduire le coût très élevé du traitement médical moderne. Par ailleurs, dans le cas de *C. odorata*, la grande majorité des chercheurs et agronomes la considèrent actuellement comme une "peste" végétale qu'il faut éliminer par tous les moyens en raison de son caractère invasif et néfaste pour les populations agricoles. C'est ainsi que de nombreuses recherches ont été menées pour sa gestion chimique et biologique. Dans cette étude, il s'agit d'une réorientation de la recherche en vue de contribuer à sa valorisation.

L'étude que nous allons exposer et dont les résultats constituent un intérêt indéniable pour les scientifiques et le grand public, présente dans une première partie une synthèse bibliographique de l'existant concernant l'utilisation des plantes en thérapie, dans une deuxième partie la présentation et la rationalisation des résultats obtenus au cours de ce travail et enfin, la conclusion et les perspectives de l'étude.

Partie 2 : Synthèse bibliographique

1 Présentation de *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Robinson (Asteraceae)

1.1 Généralité

1.1.1 Répartition géographique

Sa répartition mondiale actuelle s'étend le long de la ceinture intertropicale située entre le 30ème parallèle sud et le 30ème parallèle Nord.

Figure 1 : Répartition mondiale de *Chromolaena odorata* (zones indiquées en couleur jaune) [5]

1.1.2 Origine

C. odorata (L.) King & Robinson (syn. *Eupatorium odoratum* L.) est un arbuste originaire d'Amérique centrale et australe, qui s'est imposé dans tous les pays tropicaux [6]. Elle aurait été introduite dans les années 1920 comme plante de couverture dans le Sud-est Asiatique, d'où l'un de ses noms communs d'herbe du Laos. Elle s'est rapidement répandue et y est devenue une composante à part entière des végétations anthropisées.

1.1.3 Intrusion et invasion en Afrique

Il semble qu'elle ait été introduite en Afrique tropicale, et plus précisément au Nigeria, dans les années 1940 [7]. Après une phase d'extension lente vers les années 1970, elle s'est répandue depuis comme « un feu de brousse » dans toute l'Afrique occidentale et centrale. En Côte d'Ivoire, sa propagation de l'Est vers l'Ouest était due à la fois aux vents dominants. Connue sous le nom de l'ancien dictateur guinéen « Sékou Touré » en Côte d'Ivoire, « Acheampong » au Ghana, « JaBinDe » (l'envahissante) en Centrafrique, « Matapa M'bala » (l'envahisseur) au Congo, « Mighbe » (celle qui écrase tout) au Cameroun : ce sont là quelques un des noms locaux donnés à *C. odorata* en Afrique, noms qui traduisent à la fois l'époque de l'invasion de cette plante et le caractère massif et inexorable de cette invasion (Figure 2). *C. odorata*, connue de tous les paysans des pays tropicaux, pose à tous, paysans, chercheurs, agronomes, décideurs, un défi entièrement nouveau et d'une importance cruciale pour le développement des zones rurales. Il s'agit donc d'apprendre à gérer cette plante de façon à minimiser les effets néfastes et à maximiser les effets bénéfiques.

Figure 2 : Effet invasif de *Chromolaena odorata*

1.2 Description

C. odorata est une herbe ou arbuste vivace odoriférante appartenant à la famille des Asteraceae.

Figure 3 : Espèce *Chromolaena odorata* (L) R. M. King & H. Ronbinson

1.3 Caractéristiques botaniques

L'espèce est une herbe terrestre, annuelle, dressée, non enracinée aux nœuds avec des racines pivotantes de couleur blanche ou brune. Les tiges à section arrondie et pleine sont pubescentes. Les stipules sont absentes. Les feuilles sont simples, opposées, pétiolées, ovales, de plus de 3 cm de long/large, à marge grossièrement dentée. L'apex et la base sont pointus avec une nervation pennée. Absence de gaines foliaires. Fleurs hermaphrodites, regroupées en capitules terminales, sont tubulaires et sessiles de couleur blanche ou pourpre. Le fruit est un akène avec la présence de pappus [8].

1.4 Utilisations traditionnelles

Les extraits de différents organes de *C. odorata* ont été utilisés en médicine traditionnelle pour lutter contre divers maux. La décoction des feuilles a été utilisée pour traiter l'asthme et pour baisser la fièvre chez les enfants atteints de la varicelle [9] et comme remède contre la toux [10]. Elle est utilisée dans le traitement des infections de la peau (impétigo et la teigne) et dans le maintien de l'homéostasie [11, 12]. Les feuilles fraiches ou la décoction ont été utilisées pendant longtemps au Vietnam et dans d'autres pays tropicaux pour le traitement de la morsure de sangsue, de la blessure de tissus mous, blessures de brulures, de l'infection de la peau et de la dentoalvéolaire [13-16].

Les extraits aqueux des feuilles de *C. odorata* ont été utilisés dans le traitement du paludisme [10, 17, 18], comme cataplasme pour arrêter une hémorragie externe [19] et favoriser la guérison de la plaie [20]. En Côte-d'Ivoire, ils ont été utilisés dans la pharmacopée pour soigner les douleurs abdominales et les céphalées [21], comme cicatrisant et agent antiseptique local [22]. La décoction des feuilles est utilisée comme boisson pour le traitement du paludisme et du

diabète. Le pétrissage des feuilles est employé, après solubilisation de la pâte obtenue dans de l'eau, comme purge pour le traitement de la diarrhée [23].

En Thaïlande, la décoction des tiges de la plante peut être utilisée en cas d'hémorragie pulmonaire. Elle est également utilisée comme agent hémostatique pour arrêter des saignements de coupures fraîches et du nez [10].

1.5 Métabolites secondaires signalés de *Chromolaena odorata*

1.5.1 Métabolites secondaires volatils et activités biologiques

Plusieurs travaux de recherche réalisés sur la composition chimique des huiles essentielles de *C. odorata* dans différents pays ont montré que les huiles essentielles des feuilles sont principalement constituées de terpénoïdes. L'étude comparée de chémotypes rencontrés dans la littérature montre une diversité de la composition chimique des huiles essentielles de *C. odorata* (Figure 4).

En Chine les constituants majoritaires des huiles sont le β-caryophyllène (**14**) (16.58%), δ-cadinène (**11**) (15.85%), α-copaène (**12**) (11.58%) et oxyde de β-caryophyllène (**15**) (9.63%). L'effet inhibiteur de l'huile à la concentration de 0.8 mg/mL sur trois champignons phytopathogènes, a été évalué. L'effet antifongique est important pour *Pyricularia grisea* (61.4%), moyen pour *Phytophtora nicotianae* (29.3%) et faible pour *Fusarium oxysporum* (14.4%) [24].

Au Cameroun, elles présentent quatre produits majoritaires : le bicyclogermacrène (**9**) (12.5%), géijérène (**7**) (11.8%), β-farnesène (**6**) (9.98%) et l'α-pinène (**1**) (9.36%). Elles sont toxiques sur les tiques *Rhipicephalus lunulatus* Neumann, ectoparasites de la chèvre naine de Guinée [25]. Bouda *et al.*, sans présenter la composition chimique des huiles, ont montré ses propriétés insecticides contre les insectes ravageurs du grain de maïs, le *Sitophilus zeamais* avec une DL_{50} de 6.78% (environ 1.36 mL mélangé avec 20 g de grains) [9].

Au Nigeria, l'α-pinène (**1**) (42.2%), le β-pinène (**2**) (10.6%), le germacrène-D (**10**) (9.7%) et le β-copaen-4-α-ol (**13**) (9.4%) sont les constituants prédominants. Ces huiles présentent une activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 39 µg/mL et une activité antifongique contre *Aspergillus niger* avec une CMI de 78 µg/mL [26]. Dans ce même pays, Inya-agha *et al.* [27] ont présenté un autre chémotype à α-pinène (**1**) (19.32%), cadinène (19.09%), camphor (**16**) (15.46%), limonène (**3**) (10.22%) et β-caryophyllène (**14**) (7.05%). Cette différence serait liée certainement au lieu géographique de récolte. Ce chémotype a une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.*

En Côte d'Ivoire, les composés majoritaires sont α-pinène (**1**) (21.15%), prégéijérène (**8**) (19.61%), géijérène (**7**) (11.68%), β-pinène (**2**) (10.12%) et germacrène-D (**10**) (9.50%) [21, 28]. Ses huiles essentielles sont d'excellentes inhibitrices de la lipoxygenase L-1 de soja, modèle de la lipoxygenase humaine (15-LO) impliquée dans les processus de l'inflammation

[21]. Ces mêmes huiles essentielles augmentent l'activité de la fonction cyclooxygénase de prostaglandine H synthase avec une concentration de 87.5 µg/mL [29].

Au Congo, le chémotype est marqué par le *p*-cymène (**4**) (22.2%), le thymylacétate (**17**) (15.8%), le prégéijérène (**8**) (14.8%), le β-caryophyllène (**14**) (9.8%) et l'α-pinène (**1**) (8.5%). Au Bénin, il a été signalé un chémotype à β-caryophyllène (**14**) (21.0%), germacrène-D (**10**) (15.3%), oxyde de β-caryophyllène (**15**) (8.0%) [30]. Le chémotype présente uniquement deux composés majoritaires au Vietnam : le géijérène (**7**) (42.5%) et le β-cubebène (**5**) (12.5%) [31].

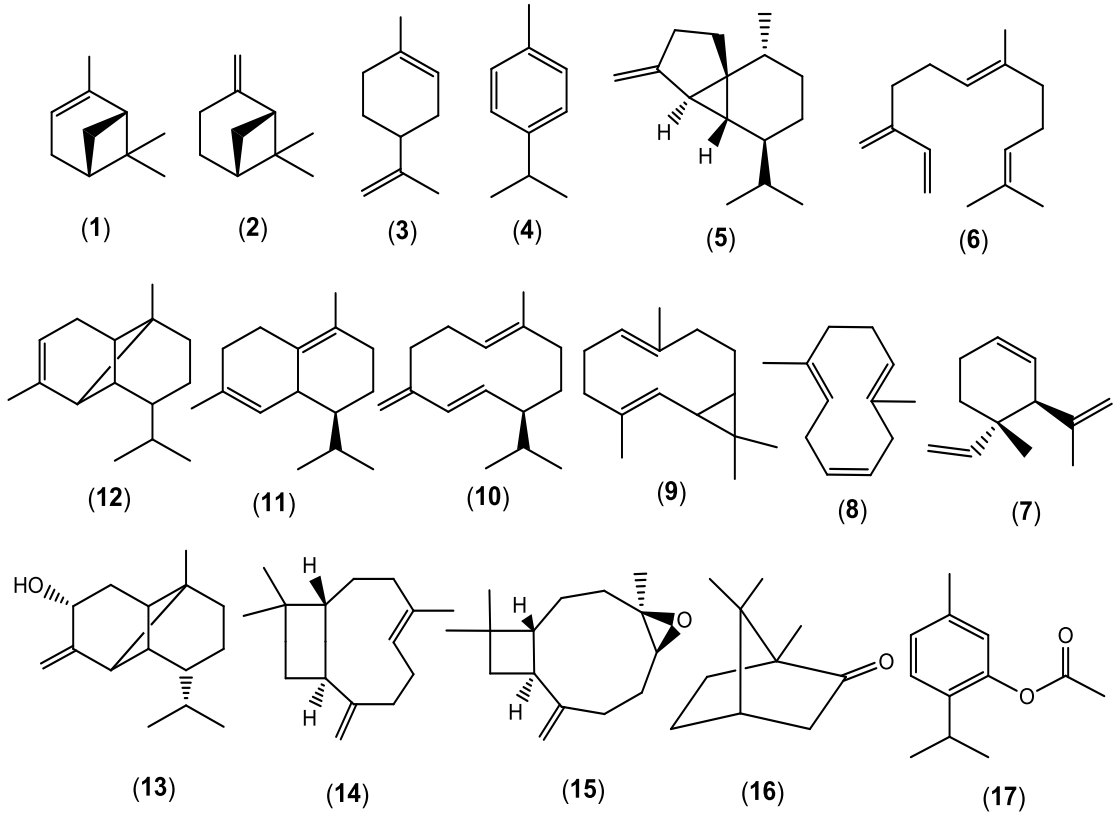


Figure 4 : Composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *C. odorata*

1.5.2 Métabolites secondaires non volatils et activités biologiques

Les métabolites secondaires non volatils signalés de cette plante sont principalement des composés phénoliques dont les plus nombreux sont les flavonoïdes et quelques acides phénoliques. Peu d'alcaloïdes, de terpénoïdes et très peu d'anthraquinones, d'acides gras, de phtalates et d'alcanes ont été rencontrés.

1.5.2.1 *Composés phénoliques*

• Flavonoïdes

Les plus nombreux sont les flavonols (Figure 5) comme la quercétine (**18**), tamarixetin (**19**), ombuin (**20**) [32], les flavanones (Figure 6) comme sakuranetin (**21**) [33], isosakuranetin (**22**) [34], persicogenin (**23**) [32] et les flavones (Figure 7) comme l'eupatilin (**24**) [16], salvigenin (**25**) [35], sinensetin (**26**) [36]. Les moins nombreux sont les chalcones comme l'odoratin (**27**) [37] et les flavanols comme le padmatin (**28**) (Figure 8) [32]. Les travaux de Suksamrarn *et al.* [34] sur l'activité biologique des flavonoïdes isolés de cette plante ont montré que la flavanone 5,7-dihdroxy-4'-méthoxyflavanone ou isosakuranetin (**22**) (Figure 6) présente une activité antimycobactérienne importante contre les *Mycobacterium tuberculosis.* Quelques flavonoïdes glycosides comme le rutin (**29**) [32] (Figure 9) ont été aussi isolés des feuilles de cette espèce végétale. Tous les flavonoïdes isolés de cette espèce sont présentés dans le Tableau 1 dans l'Annexe.

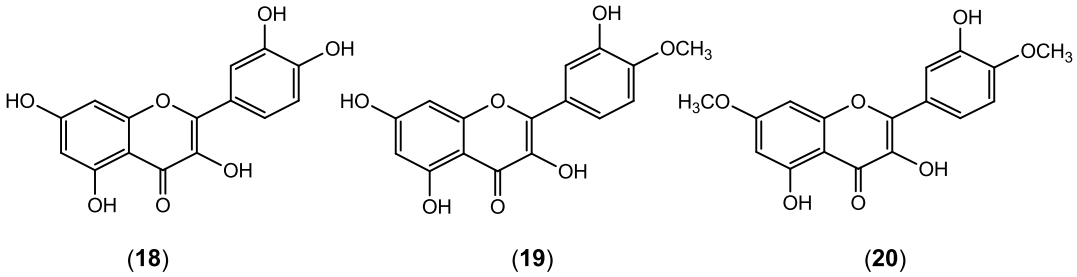


Figure 5 : Exemples de flavonols de *C. odorata*

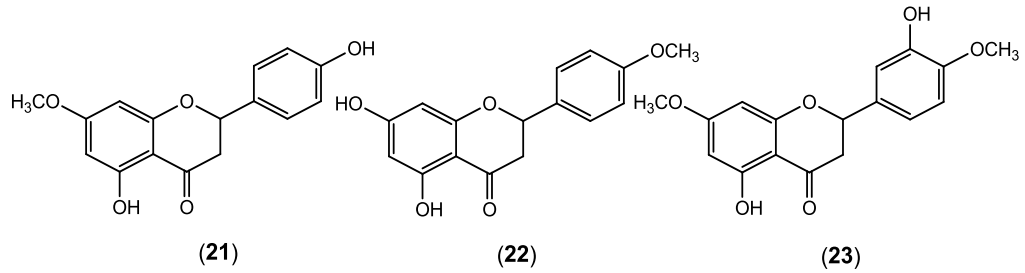


Figure 6 : Exemples de favanones de *C. odorata*

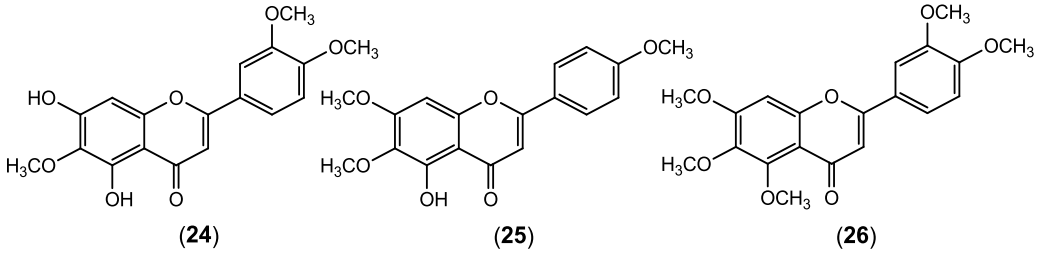


Figure 7 : Exemples de flavones de *C. odorata*

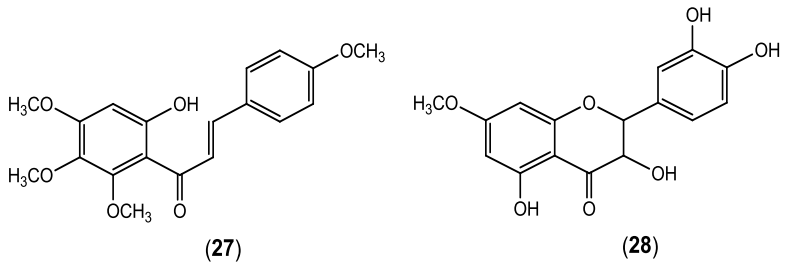


Figure 8 : Exemples de chalcone et flavanol de *C. odorata*

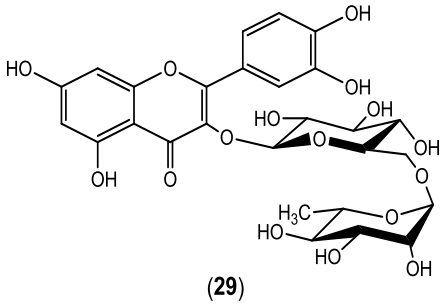


Figure 9 : Exemple de flavonoïde glycoside de *C. odorata*

• Acides phénoliques

Les acides phénoliques (Figure 10), *p*-hydroxybenzoïque (**30**), protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque) (**31**), vanillique (**32**), *p*-coumarique (**33**) et férulique (**34**), présents dans l'extrait éthanolique sont de puissants antioxydants pour la protection des cellules de la peau contre les dommages oxydatifs [16].

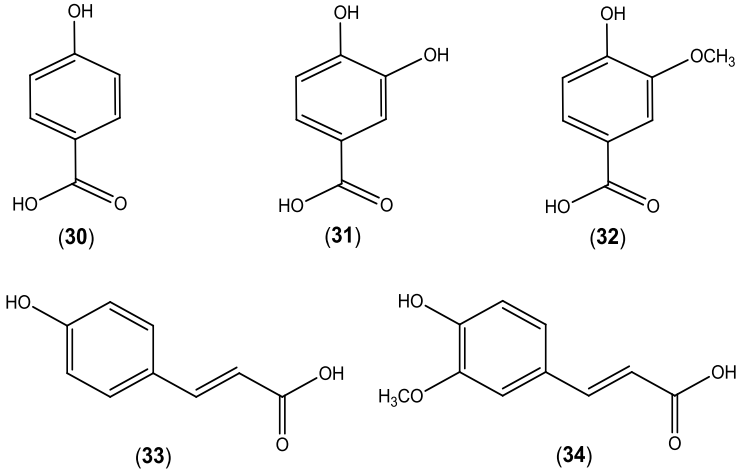


Figure 10 : Acides phénoliques de *C. odorata*

1.5.2.2 *Alcaloïdes*

Biller *et al.* en 1994 [38] ont signalé, dans les racines, la présence de N-oxydes de cinq alcaloïdes pyrrolizidine : les *N*-oxydes de 7-angeloylretrorecine (**35**), de 9-angeloylretrorecine (**36**), de intermedine (**37**), de rinderine (**38**) et de 3'-*O*-acétylrinderine (**39**) (Figure 11). C'est

récemment en 2007 que Thoden *et al.* [39] ont obtenus des alcaloïdes 1,2-dehydropyrrolizidine libres après un traitement à l'acide sulfurique et au zinc de l'extrait de méthanol des racines de *C. odorata*. Ils ont montré l'effet nématicide de ces alcaloïdes contre *Meloidogyne incognita*, un important parasite des plantes.

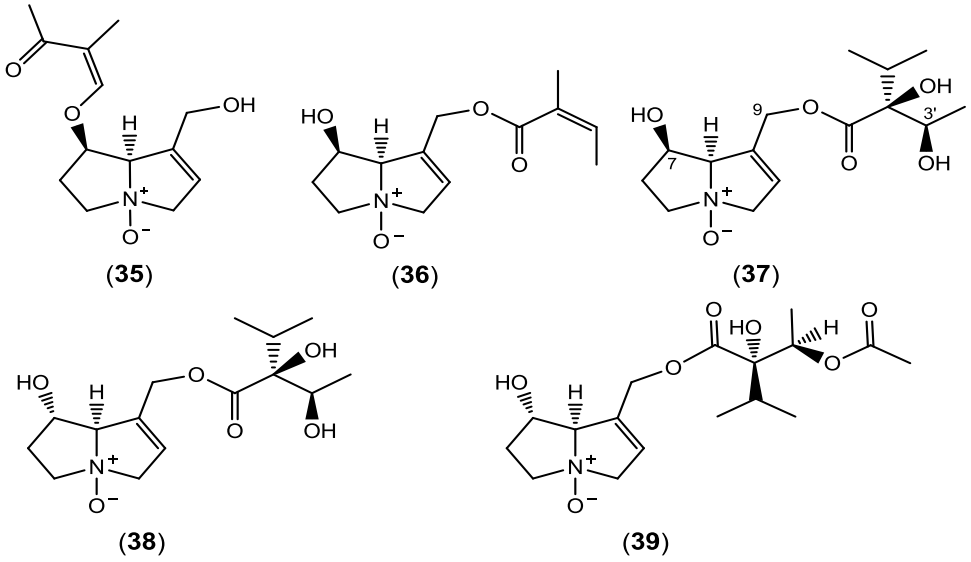


Figure 11 : Alcaloïdes de *C. odorata*

1.5.2.3 *Terpénoïdes*

Talapatra *et al*. en 1974 [35] ont isolé l'acétate de lupéol (**40**) de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante et ont identifié un mélange de lupéol (**41**) et de *β*-amyrin (**42**) (Figure 12) à partir de l'extrait d'éther de pétrole. Récemment en 2005 Amatya et Tuladhar [40] ont mené une étude phytochimique sur l'extrait à l'éther de pétrole des racines. Elle a abouti à l'isolement de trois terpénoïdes triterpène, 3*β*-hydroxy-28-carboxyolean-12-ène nommé acide eupatorique (**43**), poriferastérol (**44**) et l'acétate de butyrospermol (**45**) (Figure 12).

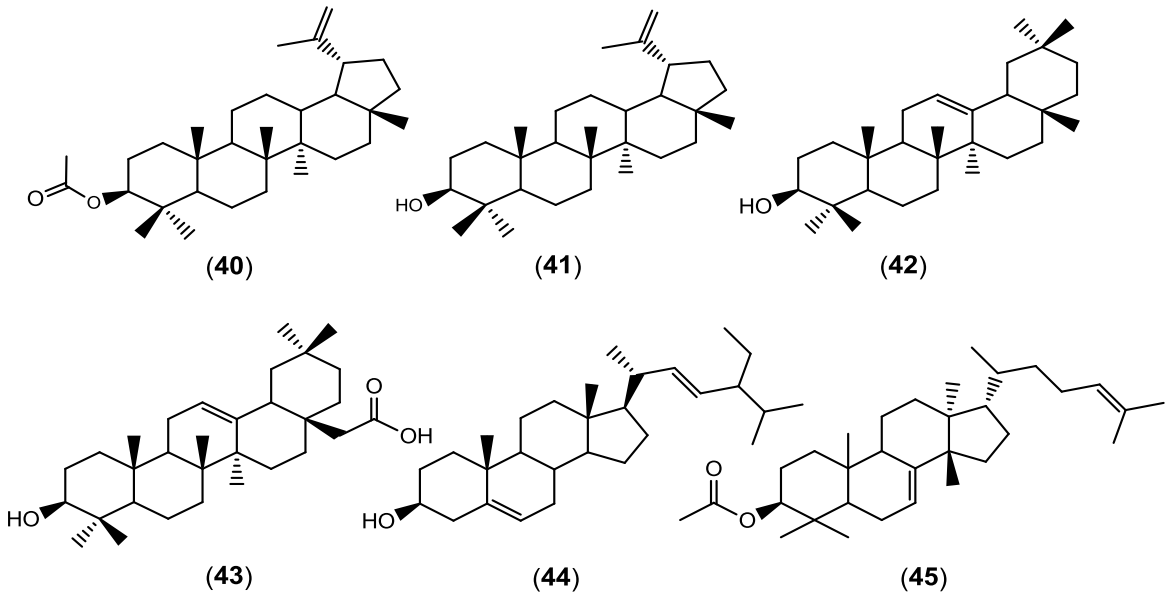


Figure 12 : Terpénoïdes de *C. odorata*

1.5.2.4 *Anthraquinones*

Deux anthraquinones, chrysophanol (**46**) et physcion (**47**) (Figure 13), ont été isolées aussi par Amatya et Tuladhar à partir de l'extrait d'éther de pétrole des racines. L'étude cytotoxique réalisée dans un test de létalité contre *Artemia salina* (crevette de saumure) a révélé une activité significative des deux anthraquinones avec des valeurs de CL_{50} respectives de 289.0 et 158.1 µg/mL [40].

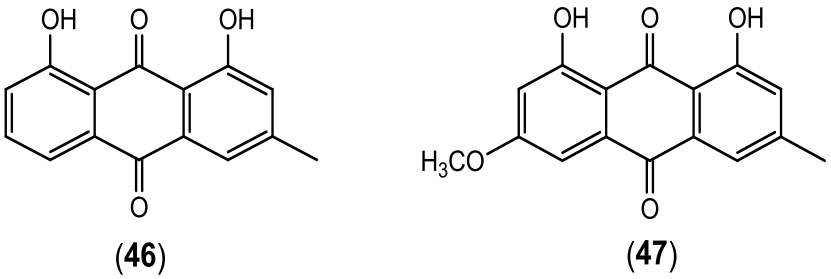


Figure 13 : Anthraquinones de *C. odorata*

1.5.2.5 *Acide gras, phtalate et alcane*

Un acide gras l'acide palmitique (**48**), un phtalate le bis (2-éthylhexyl) phtalate (**49**) (Figure 14) et un alcane l'octadecane ont été signalés par Amatya et Tuladhar. Le phtalate a présenté une activité cytotoxique contre *A. salina* avec une valeur de CL_{50} de 538.1µg/mL [40].

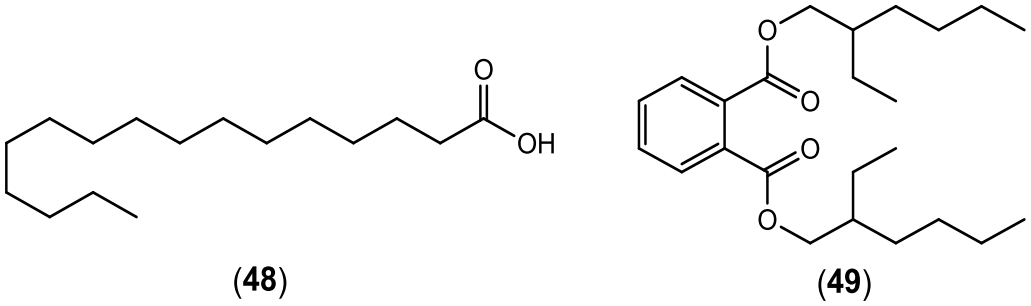


Figure 14 : Acide gras et phtalate de *C. odorata*

Ces groupes de composés possédant des activités biologiques intéressantes (anti-oxydante, antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire,…etc.) sont tout à fait typiques des plantes du genre *Chromolaena* en particulier et de la famille Asteraceae en général. Leur présence explique en grande partie les activités biologiques décrites précédemment.

2 Présentation de *Leptoderris fasciculata* (Benth.) Dunn (Fabaceae)

2.1 Répartition géographique

L'espèce est retrouvée uniquement en Afrique dans la zone intertropicale en Sierra Leone, Guinée, Côte d'Ivoire, Ghana, Gabon et Tanzanie [41]. Cette espèce a été identifiée en Côte d'Ivoire depuis 1988, dans la forêt classée du Haut-Sassandra [42].

Figure 15 : Répartition mondiale de *L. fasciculata* (zones indiquées en jaune) [43]

2.2 Description

Leptoderris fasciculata est une liane ligneuse de la famille des Fabaceae d'environ 10 m de longueur, avec une tige de 30 cm de diamètre. Elle pousse généralement sur les bords ou dans les clairières des forêts [44].

Figure 16 : Espèce *Leptoderris fasciculata* (Benth.) Dunn

2.3 Caractéristiques botaniques

C'est une espèce pérenne dont les feuilles mesurent 20 à 47 cm de long avec des rachis (prolongement des feuilles composées pennées) prolongés de 2 à 3 cm. Les stipules subulées sont ovales et caduques de 3 à 4 mm de long. La corolle blanchâtre ou crème mesure 7 à 12 mm de long avec la présence parsemée de petits poils. Les bractées sont groupées en fascicules avec des fleurs linéaires-lancéolées ovales de 1-2 mm de long. Les fruits sont linéaires arrondis aux extrémités, de 6 à 10 cm de long et de 2 à 3 cm de large avec un aspect ressemblant à du papier. A l'intérieur, on trouve 1 à 2 graines [45].

2.4 Utilisations traditionnelles

La plante entière est utilisée dans le traitement de l'hydropisie, des œdèmes, troubles pulmonaires et comme laxatif. Les écorces sont employées contre les maladies cutanées, les infections parasitaires sous-cutanées, la malnutrition, la débilité et les maux d'estomac [44]. Elle est utilisée par les populations du Sud-est de la Côte d'Ivoire pour l'arrêt d'hémorragie chez les femmes après l'accouchement ou dans le cas des ménorragies.

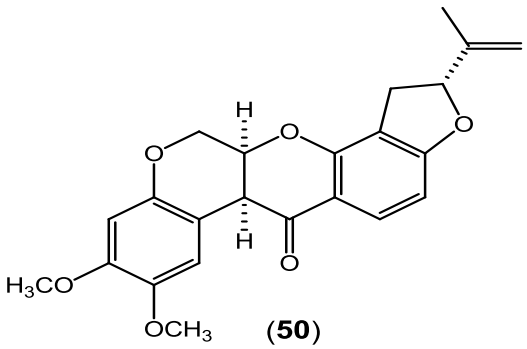
2.5 Métabolites secondaires signalés de *Leptoderris fasciculata*

2.5.1 Métabolites secondaires volatils : Huiles essentielles

Aucune étude sur les huiles essentielles n'a été faite dans la littérature sur cette espèce végétale.

2.5.2 Métabolites secondaires non volatils

Cette plante n'a jamais fait l'objet d'une étude phytochimique. A ce jour, seule la présence de roténones (**50**) (Figure 17) dans les feuilles de *Leptoderris micrantha*, une plante utilisée traditionnellement au Nigeria pour le traitement de la maladie mentale (schizophrénie), a été soupçonnée dans une enquête ethnobotanique [46].



(**50**)

Figure 17 : Roténone soupçonnée de *Leptoderris micrantha*

L'espèce *Leptoderris fasciculata* est intéressante à étudier en raison de l'absence de données phytochimiques dans la littérature.

Présentation de *Morinda morindoides* Baker (Rubiaceae)

2.6 Répartition géographique

Cette plante est uniquement présente en Afrique, sa distribution géographique est essentiellement guinéo-congolaise.

Figure 18 : Répartition mondiale de *M. morindoides* (zones indiquées en jaune) (Baker) [47]

2.7 Description

Figure 19 : Espèce *Morinda morindoides*

Morinda morindoides (Baker) est une liane grimpante, glabre de la famille des Rubiaceae qui se retrouve dans les lisières des forêts.

2.8 Caractéristiques botaniques

Les feuilles sont opposées, oblongues elliptiques ou obovales elliptiques cunéiformes à la base. Ces feuilles longuement acuminées, glabres, mesurent 6-15 cm de longueur sur 3-8 cm de largeur. Le limbe porte, environ, six paires de nervures latérales. Les fleurs, blanches, groupées et capitules, ont le tube de la corolle court et robuste. Les fruits, bosselés, jaunes à maturité, mesurent 4 cm de diamètre [48].

2.9 Utilisation traditionnelle

M. morindoides est une plante qui est citée de façon récurrente dans plusieurs prescriptions thérapeutiques contre diverses maladies. Le décocté des feuilles est utilisé contre le paludisme, le diabète, la diarrhée, la constipation, la blennorragie, les douleurs causées par le rhumatisme, les éruptions cutanées, les infections microbiennes, la gale, les vers intestinaux et amibiase [49-55]. Il est aussi pris en bain de corps contre le prurit. Ce décocté est aussi prescrit dans le traitement des infections uro-génitales par voie orale [56]. La décoction aqueuse des racines soignerait per os le diabète et les gastralgies [57]. Le décocté aqueux du mélange des feuilles de *M. morindoides* et des fruits de *Citrus aurantifolia* est utilisé per os dans le traitement du paludisme [58]. En Côte d'Ivoire, l'extrait des feuilles est utilisé dans le traitement du paludisme, de la diarrhée, la rougeole et la varicelle en raison de ses propriétés anti-fiévreuses.

2.10 Métabolites secondaires signalés de *Morinda morindoides*

2.10.1 Métabolites secondaires volatils : huiles essentielles

Il n'existe aucune donnée dans la littérature sur les huiles essentielles de cette plante à ce jour.

2.10.2 Métabolites secondaires non volatils

Des travaux antérieurs ont permis à certains auteurs d'isoler à partir des feuilles, des composés phénoliques flavonoïdes, des iridoïdes et un terpénoïde.

2.10.2.1 *Composé phénoliques flavonoïdes*

A partir des fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol provenant de l'extrait au méthanol des feuilles, Cimanga *et al*. en 1995 ont isolés pour la première fois neuf flavonoïdes (Figure 20) dont deux aglycones quercetin (**18**), quercetin 7,4'-diméthyléther (**51**) et sept glycosides luteolin 7-glucoside (cynaroside) (**52**), apigenin 7-glucoside (cosmosiin) (**53**), quercetin 3-rhamnoside (quercitrin) (**54**), kaempferol 3-O-rhamnoside (**55**), quercetin 3-rutinoside (rutin) (**29**), kaempferol 3-rutinoside (nicotiflorin) (**56**) et chrysoeriol 7-O-neohesperidoside (**57**) [50]. A cette liste s'est ajouté un flavonoïde glycoside kaempferol 7-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranoside (morindaoside) (**58**) en 1997 [59]. Le chrysoeriol (**59**), kaempferol (**60**), luteolin (**61**) et apigenin (**62**) ont été obtenus en 1999 par hydrolyse acide de leurs correspondants [49].

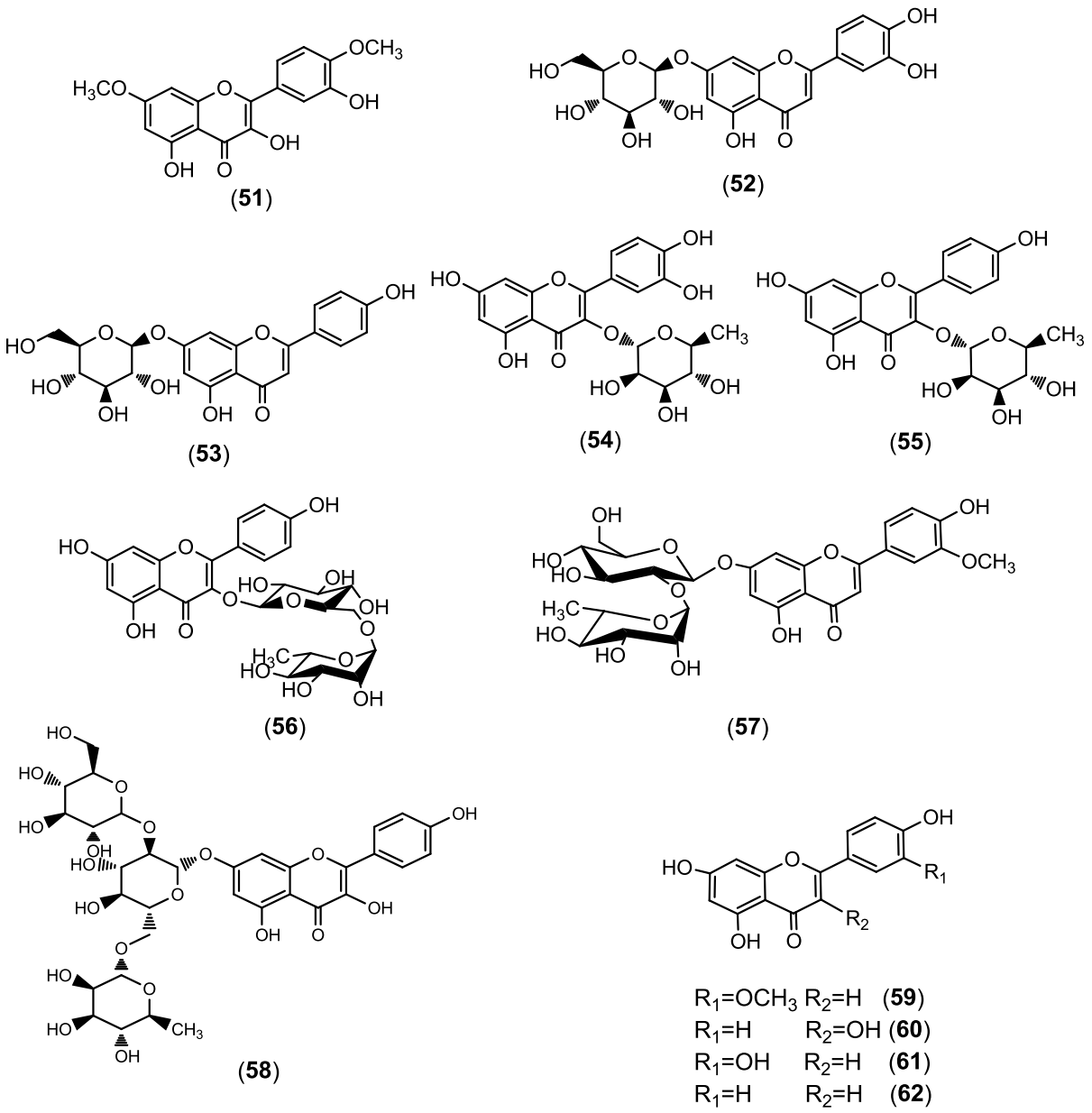


Figure 20 : Flavonoïdes de *M. morindoides*

Tous ces composés, ont été étudiés pour leurs activités biologiques. A l'exception des composés (**54**), (**57**) et (**59**), ces flavonoïdes ont tous présenté des propriétés antioxydantes en inhibant la xanthine oxydase et en piégeant les anions superoxides $O_2^{\bullet -}$ [49]. Cimanga *et al*. en 2006 [51] ont montré, *in vitro*, une activité antiamibienne modérée des flavonoïdes glycosides cosmosiin (**53**) et cynaroside (**52**) contre *Entamoeba histolytica* avec des valeurs respectives de CI_{50} de 22.3 et 37.4 µg/mL. Les flavonoïdes aglycones kaempferol (**60**), apegenin (**62**), et luteolin (**61**) ont présenté une activité antiamibienne plus importante avec des valeurs respectives de CI_{50} de 10.3, 12.7 et 17.8 µg/mL. La quercétine (**18**) et la quercétine 7,4'-diméthyléther (**51**) se sont révélés cytotoxiques sur les cellules MT-4 (lignée de cellules T humaines transformées par le virus HIV1) avec des concentrations cytotoxiques médianes (CC_{50}) respectives de 14.2 et 21.7 µg/mL.

Cimanga *et al.* en 2010 [52] ont étudié, *in vitro* l'activité antispasmodique de certains flavonoïdes isolés des feuilles de la plante sur deux agonistes spasmogènes (l'acétylcholine et la solution de KCl dépolarisée) qui induisent des contractions de l'iléon du cobaye. Les travaux ont montré que la quercétine (**18**), quercitrin (**54**) et le rutin (**29**) ont une activité antispasmodique modérée contre les deux agonistes avec des valeurs CI_{50} inférieures à 0.1 µg/mL.

2.10.2.2 *Terpénoïdes*

• Iridoïdes

Un autre traitement des fractions d'acétate d'éthyle et de n-butanol a conduit à l'isolement de huit iridoïdes (Figure 21) gaertneroside (**63**), acétylgaertneroside (**64**), dehydrogaertneroside (**65**), dehydrométhoxygaertneroside (**66**), acide gaertnerique (**67**), méthoxygaertneroside (**68**), epoxygaertneroside (**69**) et epoxyméthoxygaertneroside (**70**) [60].

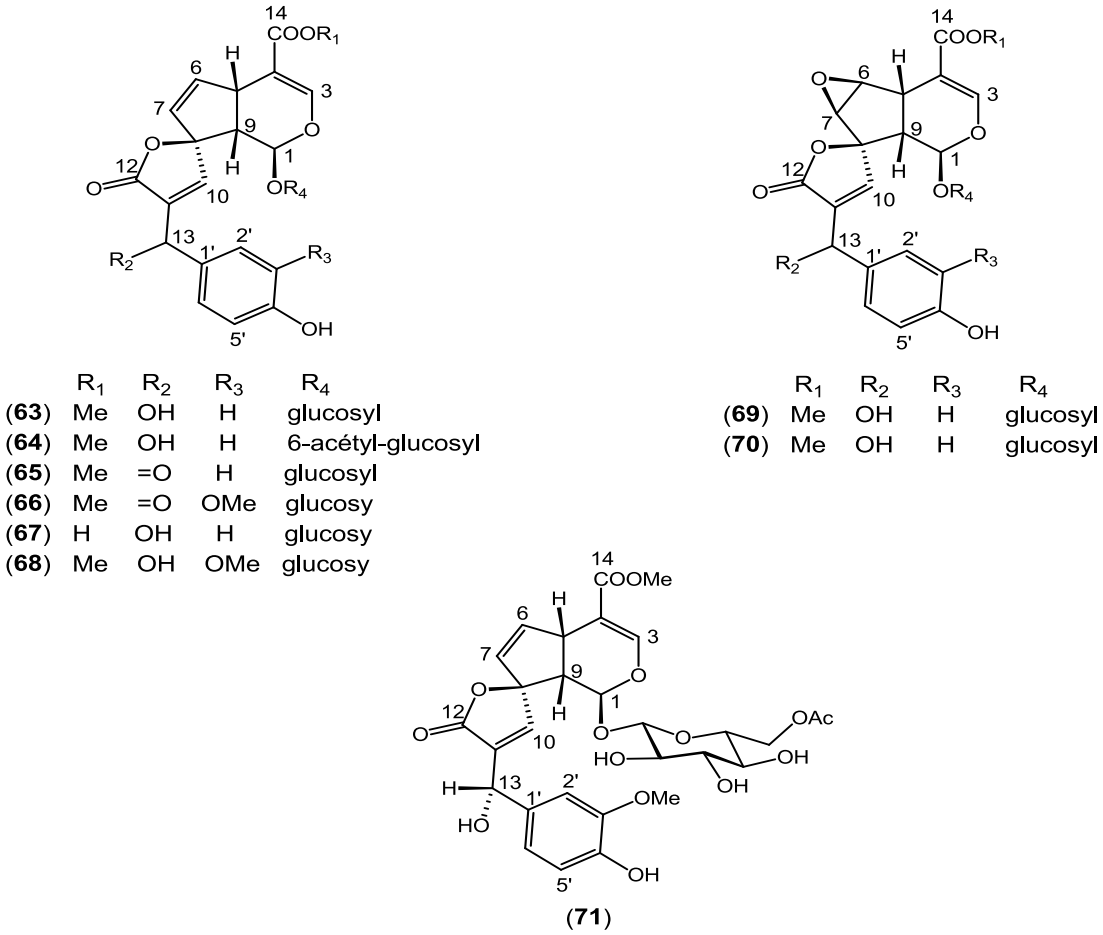


Figure 21 : Iridoïdes de *M. morindoides*

Gaerneroside (**63**), acide gaertnerique (**67**), méthoxygaertneroside (**68**) et epoxygaertneroside (**69**) ont présenté une très bonne activité antiamibienne contre *Entamoeba histolytica* avec des

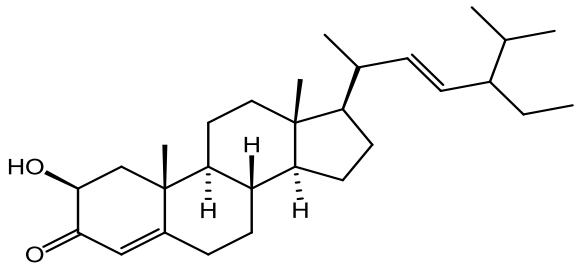
valeurs de CI_{50} inférieures 8 µg/mL. Les plus actifs sont epoxygaertneroside (**70**) (CI_{50} = 1.3 µg/mL) et méthoxygaertneroside (**68**) (CI_{50} = 2.3 µg/mL), suivi de gaertneroside (**63**) et de l'acide gaertnerique (**67**) avec des CI_{50} de 4.3 et 7.1 µg/mL, respectivement [51].

L'étude des propriétés antispasmodiques des composés isolés de la plante a montré que les iridoïdes epoxygaertneroside (**70**) et gaertneroside (**63**) possèdent une bonne activité antispasmodique sur les deux agonistes spasmogènes (l'acétylcholine et la solution de KCl dépolarisée) avec des CI_{50} comprises entre 4 et 7 µg/mL [52].

Tamura *et al.* ont isolé un nouvel iridoïde acétylméthoxygaertneroside (**71**) et quatre déjà connus (**63**), (**64**), (**66**) et (**68**). Ces composés présentent tous des propriétés antipaludiques en inhibant la prolifération de *P. falciparum*. Le plus actif est le dehydrométhoxygaertneroside (**66**) (CI_{50} = 0.04 µM), suivi de l'acétylméthoxygaertneroside (**71**) (CI_{50} = 0.1 µM), gaertneroside **(63**) (CI_{50} = 0.8 µM) et de l'acétylgaertneroside (**64**) (CI_{50} = 4.1 µM) [61].

• Stéroïde

En 2009, Ramiarantsoa *et al.* ont isolé un 3-cétostéroïde, (22*E*)-2*β*-hydroxy 24-éthylcholesta-4,22-dièn-3-one (**72**) (Figure 22), à partir de l'extrait d'éther de pétrole des feuilles [62].



(**72**)

Figure 22 : Terpénoïde de *M. morindoides*

3 Présentation de *Morinda lucida* Benth. (Rubiaceae)

3.1 Répartition géographique

Espèce principalement présente en Afrique dans la zone guinéo-congolaise, a été signalée en Allemagne.

Figure 23 : Répartition mondiale de *M. lucida* [63]

3.2 Description

Figure 24 : Espèce *Morinda lucida* (Benth)

L'espèce *Morinda lucida* Benth est ordinairement un petit arbre très éclectique. On la trouve dans le fourré littoral et dans les savanes côtières, tantôt simple arbuste, tantôt arbre atteignant 15 m de haut et 0.40 m de diamètre. Mais elle existe aussi en forêt, c'est alors un grand arbre de 25 m de haut et de 0.60 m de diamètre. L'écorce rugueuse écailleuse se détache en petites

écailles avec des tranches cassantes de couleur jaune-brunâtres ; parfois les tranches sont blanchâtres avec des granulations brunes. Le bois jaune apparaît immédiatement sous l'écorce [64, 65].

3.3 Caractéristiques botaniques

Les stipules larges, suborbiculaires et foliacées sont très caduques. Les rameaux rougeâtres à reflets vernissés sont très élargis aux nœuds. Les feuilles sont oblongues-elliptiques ou elliptiques, atténuées au sommet ou brièvement acuminées, ordinairement cunéiformes à la base. Elles mesurent 8 à 20 cm de long, 4 à 8.5 cm de large et sont glabres sauf quelques poils à l'aisselle des nervures latérales ; celles-ci au nombre de 6-9 paires. Les pédoncules florifères par 3 ordinairement, sont glabres et mesurent jusqu'à 3 cm de long. Les calices sont cupuliformes, charnus, très épais, libres, mais serrés les uns contre les autres en une petite masse subglobuleuse d'où pointent les corolles. Les fleurs glabres sont odorantes avec des corolles blanches très caduques. La corolle est tubulaire à paroi épaisse d'environ 2.5 cm de long ; 5 lobes de 4 mm de long environ. Les anthères subsessiles, linéaires et incluses sont soudées vers la partie supérieure du tube de la corolle. Les fruits forment une petite masse globuleuse bosselée, charnue, atteignant 1.5 cm de diamètre [65].

3.4 Utilisation en médecine traditionnelle

En Afrique de l'ouest, *M. lucida* est une plante importante en médecine traditionnelle. Les décoctions et infusions ou les emplâtres de racines, écorces et feuilles sont des remèdes reconnus contre différents types de maux, notamment la fièvre, le paludisme [66-70], la trypanosomiase [71, 72] et les poussées de fièvre lors de l'accouchement. Une décoction de l'écorce du tronc est utilisée pour le traitement de l'ictère sévère [69]. La plante est également employée en cas de diabète [66, 73], hypertension artérielle [68, 74, 75], helminthiase [72], d'aménorrhée [66], comme fébrifuge [69], purgatif [76], analgésique général et laxatif [69, 76]. Le décocté aqueux des feuilles fraîches est utilisé en bain de corps contre les éruptions cutanées [56].

M. lucida est citée dans quatre pays africains pour son usage contre les hépatites [77]. Au Nigeria, cette espèce est l'un des remèdes traditionnels les plus utilisés contre la fièvre. Les feuilles pressées et mélangées avec du vin de palme, sont utilisées contre le paludisme et l'hypertension artérielle [78].

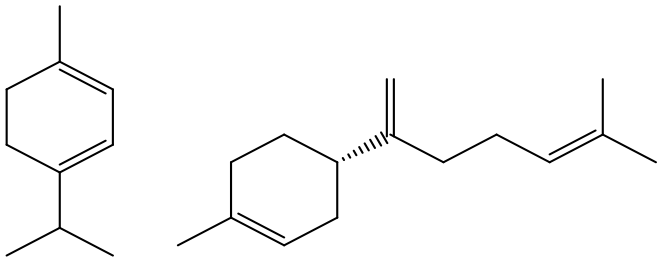
3.5 Métabolites secondaires signalés de *Morinda lucida*

3.5.1 Métabolites secondaires volatils : huiles essentielles

Les huiles essentielles des feuilles et des racines récoltées au Nigeria ont été étudiées par Okoh *et al.* en 2011 [79]. Cinquante composés ont été identifiés dans l'huile des feuilles et les principaux composés sont l'*α*-terpinène (**73**) (17.8%) et le *β*-bisabolène (**74**) (16.3%) (Figure 25). Dans l'huile des racines, 18 composés ont été identifiés, les principaux constituants sont le 3-fluoro-*p*-anidine (51.8%) et l'acide hexadécanoïque ou acide palmitique (**48**) (12.0%).

Ces huiles ont présenté des propriétés antioxydantes avec une plus forte activité pour celles extraites des racines.

Bankole, depuis 1997, a démontré l'activité antifongique des huiles essentielle des feuilles sur *Aspergillus flavus*. Ces huiles inhibent la synthèse de l'aflatoxine B1 produite par le champignon inoculé dans les grains de maïs [80].



(**73**) (**74**)

Figure 25 : Composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles et des racines de *M. lucida*

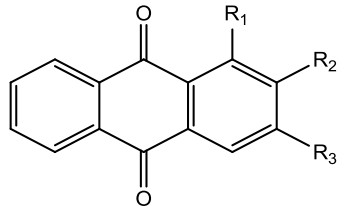
3.5.2 Métabolites secondaires non volatils

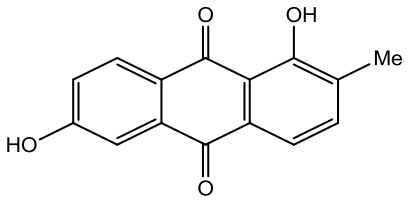
Des études antérieures ont permis d'isoler dix-sept anthraquinones, deux anthraquinols et un iridoïde.

3.5.2.1 *Anthraquinones*

En 1973 Adesogan [81] a isolé dix anthraquinones (Figure 26) à partir de l'extrait d'éther de pétrole du tronc. Ce sont alizarin-1-méthyl éther (**75**), 1-méthoxy-2-méthylanthraquinone (**76**), 1-hydroxy-2-méthylanthraquinone (**77**), anthraquinone-2-aldéhyde (**78**), 2-méthylanthraquinone (**79**), rubiadin (**80**), rubiadin-1-méthyl éther (**81**), damnacanthal (**82**), nordamnacanthal (**83**), soranjidiol (**84**).

Sept nouvelles anthraquinones, le digitolutein (**85**) isolé à partir des écorces du tronc et des racines par Koumaglo *et al.* en 1999 [82], le 3-hydroxyanthraquinone 2-carbaldéhyde (**86**), 3-hydroxy-2-hydroxymethylanthraquinone (**87**), tectoquinone (**88**), damnacanthol **(89**), morindon (**90**) et 1,5,6-triméthoxy-2-méthylanthraquinone (**91**) isolés à partir de l'extrait de dichlorométhane des racines par Rath *et al.* en 1995 [83].





(**84**)

	R_1	R_2	R_3
(**75**)	OMe	OH	H
(**76**)	OMe	Me	H
(**77**)	OH	Me	H
(**78**)	H	CHO	H
(**79**)	H	Me	H
(**80**)	OH	Me	OH
(**81**)	OMe	Me	OH
(**82**)	OMe	CHO	OH
(**83**)	OH	CHO	OH

	R_1	R_2	R_3
(**85**)	OMe	OH	Me
(**86**)	H	CHO	OH
(**87**)	H	CH_2OH	H
(**88**)	H	Me	H
(**89**)	OMe	CH_2OH	OH
(**90**)	OH	OH	H
(**91**)	OMe	Me	H

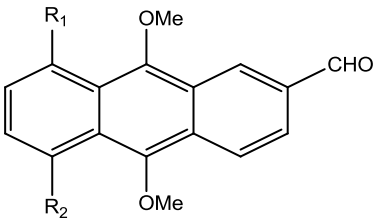
Figure 26 : Anthraquinones des racines, tiges et écorces de *M. lucida*

Des tests biologiques sur plaques préparatives ont montré des activités antifongiques, de alizarin-1-méthyl éther (**75**) contre *Cladosporium cucumerinum* (0.5 µg) et contre *Candida albicans* (1.0 µg), de 3-hydroxy-2-hydroxyméthylanthraquinone (**87**) contre *C. cucumerinum* (2.0. µg) et contre *C. albicans* (5.0 µg) et de nordamnacanthal (**83**) contre *C. cucumerinum* (1.0 µg) [83, 84].

Les effets de digitolutein (**85**), rubiadin-1-methyl éther (**81**) et damnacanthal (**82**) sur la croissance de *Plasmodium falciparum*, *in vitro*, ont été étudiés. Le nombre de parasites a diminué significativement d'une manière dose-dépendante, et 100% d'inhibition a été obtenue avec 30 à 40 µg de chaque composé testé [82].

3.5.2.2 *Anthraquinols*

Deux anthraquinols l'oruwal (**92**) et oruwalol ont été isolés pour la première fois en 1973 par Adesogan. La structure de l'oruwalol n'a pas été identifiée de façon précise. L'examen des données spectrales suggère une structure 5-hydroxyoruwal (**93**) ou 8-hydroxyoruwal (**94**) [81] (Figure 27).

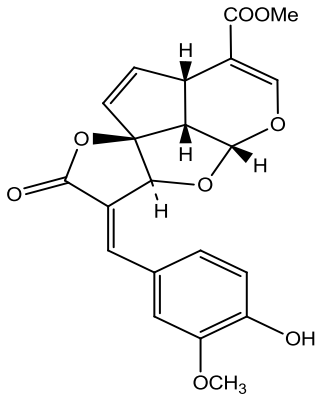


	R_1	R_2
(**92**)	H	H
(**93**)	OH	H
(**94**)	H	OH

Figure 27 : Anthraquinols de tige de *M. lucida*

3.5.2.3 *Iridoïde*

L'iridoïde oruwacin (**95**) (Figure 28) a été identifié par Adesogan en 1979 des extraits d'éther de pétrole des feuilles [85].



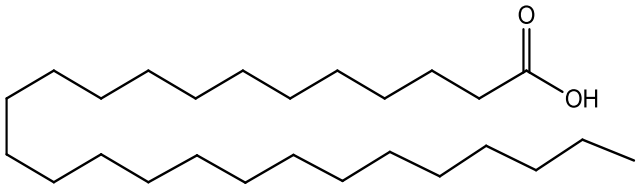
(**95**)

Figure 28 : Iridoïde des feuilles de *M. lucida*

Oruwacin (**95**) possède des propriétés molluscicides contre *Bulinus globosus*, *Bulinus rohlfsii*, *Biomphalaria pfeifferi* et *Lymnea natalensis* qui sont des hôtes intermédiaires de *Fasciola hepatica* (parasite responsable de la fasciolose) et de *Schistosoma haematobium* (parasite responsable de la bilharziose) [86].

3.5.2.4 *Acide gras*

Un acide gras l'acide hexacosanoïque (**96**) (Figure 29) a été identifié dans la fraction de l'éther de pétrole des extraits de tronc d'arbre [81].



(**96**)

Figure 29 : Acide gras du tronc d'arbre de *M. lucida*

A l'issue de cette recherche bibliographique, il est relevé aisément que les anthraquinones constituent la majorité des métabolites secondaires isolés de *M. lucida*. Ces métabolites sont caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques à savoir : RMN-1D, Masse, UV, IR et par comparaison aux spécimens authentiques. Ces composés possèdent des activités biologiques intéressantes (anti-oxydante, antiparasitaire, antifongique, anti-diarrhéique,…etc.).

4 Les huiles essentielles

4.1 Définition

Selon Smallfield [87], les huiles essentielles sont des mélanges naturels de composés aromatiques dans les plantes, qui sont extraites par distillation à la vapeur ou au solvant.

Dans la 8ème édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (essences=huiles volatiles) sont définies comme: « des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenu dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation » [88].

4.2 Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est peu connu [89].

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du « rôle » des huiles essentielles des plantes. Les plus célèbres sont la réduction de la compétition avec les autres espèces de plante (allélopathie) par inhibition chimique de la germination des graines, la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et la protection contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux [90]. Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source d'énergie facilitant certaines réactions chimiques et permettant la conservation de l'humidité des plantes dans les climats désertiques [91].

4.3 Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois racines, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées à la surface de la plante : cellules à huiles essentielles des Lauraceae ou des Zingiberaceae, polis sécréteurs des Lamiaceae, des poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae [88]. Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe [92, 93].

4.4 Méthodes d'extraction

4.4.1 Enfleurage et Macération

Cette technique est la plus ancienne, très couteuse et peu employée aujourd'hui. On l'emploie pour des fleurs sensibles, ne supportant pas un chauffage trop élevé, comme par exemple le

jasmin, la violette et la rose. Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses ou des huiles et chauffées (bain-marie ou soleil) puis étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum, les corps gras sont filtrés au travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées [54, 124-126].

4.4.2 Expression

C'est une technique simple où les écorces des agrumes sont pressées à froid pour extraire les huiles essentielles [54, 124-126].

4.4.3 Distillation : Hydrodistillation

La distillation est la méthode la plus employée pour extraire les huiles essentielles. Le matériel végétal dans un minimum d'eau est chauffé jusqu'à ébullition ; l'huile essentielle s'évapore alors avec les vapeurs dégagées, puis est condensée (elle redevient liquide lorsqu'on la refroidit) et séparée de l'eau [54, 124-126].

4.4.4 Entraînement à la vapeur

Pour éviter certains phénomènes d'hydrolyse sur des composants de l'huile essentielle ou des réactions chimiques pouvant altérer les résultats, le procédé de l'entraînement à la vapeur a été mis au point. La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur est pulsée. Les cellules se distendent et les particules d'huile se libèrent. Ces dernières sont alors vaporisées et condensées dans un serpentin réfrigéré. La récupération de l'huile essentielle se fait de la même manière que dans le cas de l'hydrodistillation [54, 124-126].

4.4.5 Extraction aux solvants volatils

Cette technique est utilisée avec des fleurs ne supportant pas la chaleur, les solvants très volatils par exemple l'éther et l'hexane qui s'évaporent facilement à basse température sont employés. Les végétaux sont placés dans d'énormes cuves en acier appelées extracteurs et soumis à des lavages successifs aux solvants qui se chargent ainsi de leur parfum. Après décantation et filtration, le solvant est évaporé afin d'obtenir une sorte de pâte fortement odorante appelée concrète. Après une série de lavages à l'alcool dans des batteuses mécaniques et de glaçages, la concrète donne naissance à une essence pure appelée absolue [54, 124-126].

4.4.6 Extraction au CO_2 supercritique

Il s'agit du procédé le plus récent d'extraction à froid des matières premières végétales utilisant le gaz carbonique : le CO_2. Sous pression (plus de 75 bars) et à température de 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état ''supercritique''. Au départ de l'extraction au CO_2 supercritique, les végétaux broyés sont placés dans des ''paniers'' cylindriques équipés de filtres aux deux extrémités. Les paniers sont ensuite placés dans l'extracteur, où une pompe assure la circulation du CO_2 à l'état supercritique. L'huile essentielle est alors dissoute dans le

CO_2 sous forme de fluide. Celui-ci est ensuite rendu à l'état gazeux et se sépare du composé extrait, avant d'être envoyé dans le liquéfacteur pour être réutilisé [54, 124-126].

4.5 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle exprimé en pourcentage, est le rapport entre le poids (P_1) de l'huile extraite et le poids (P_2) du matériel végétal utilisé, multiplié par 100 [94]. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R\ (\%) = P_1/P_2\ X\ 100$$

4.6 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes. Les constituants sont principalement des monoterpènes, des sesquiterpènes qui sont estimés à plus de 1000 et 3000 respectivement. Les huiles essentielles renferment des composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures et aussi des phénylpropanes [95]. La Figure 30 ci-dessous présente les structures de quelques composants retrouvés dans les huiles essentielles.

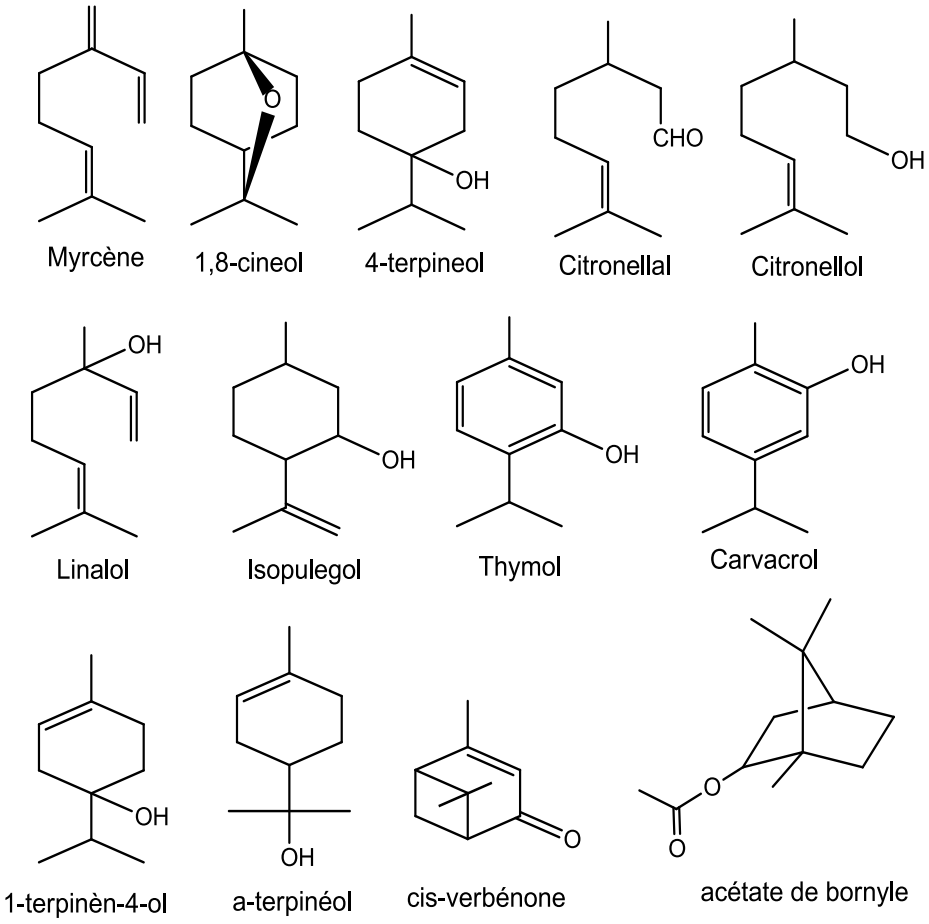


Figure 30 : Quelques composés des huiles essentielles [96, 97]

4.7 Facteurs influençant la composition chimique

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, lieu de séchage, la température et durée de séchage, les parasites, les virus et la qualité des herbes [87, 95]. C'est ainsi que l'action des huiles s'interprète par le résultat de des effets combinés de leurs composés actifs et inactifs. Ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique [95].

Nonobstant la complexité des huiles [95], les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier de façon importante tout au long du développement. De plus, les chémotypes ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques. Par exemple on compte pour *Thymus vulgaris*, espèce morphologiquement homogène, sept chémotypes différents [88].

Les conditions principales requises pour une production rentable en huile essentielle sont : bon matériel végétal, variété de la plante, le sol, équipement d'extraction, le climat [87].

5 Les terpénoïdes

Les terpénoïdes constituent une vaste famille de substances naturelles. Leur squelette carboné résulte de la condensation d'unités à 5 atomes de carbone l'isoprène (1-méthyl-buta-1,3-diène) [98-100]. La dénomination des différentes classes de molécules terpéniques repose sur le nombre de motifs isoprènes constituant leur squelette. Ainsi on rencontre : les hémiterpènes (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40), et les polyterpènes. Certains groupes de molécules n'obéissent pas à cette règle et, parmi ceux-ci, les stéroïdes qui ne comptent que 27 carbones.

De nombreux isoprénoïdes comme le pinène, le thymol, le menthol ou le limonène sont des substances odoriférantes, souvent rencontrées dans les huiles essentielles. D'autres jouent un rôle physiologique important, comme les caroténoïdes, la vitamine E et le cholestérol.

Le nombre de répétitions de ce motif isoprénique, mais aussi, les réactions de cyclisation, les réarrangements et les diverses oxydations et réductions que peuvent subir le squelette carboné sont à l'origine de la grande diversité structurale de ces molécules.

5.1 Monoterpènes

Les monoterpènes (Figure 31) sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90% des huiles essentielles sont des monoterpènes) [101]. Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène, selon le mode de couplage « tète-queue » [102].

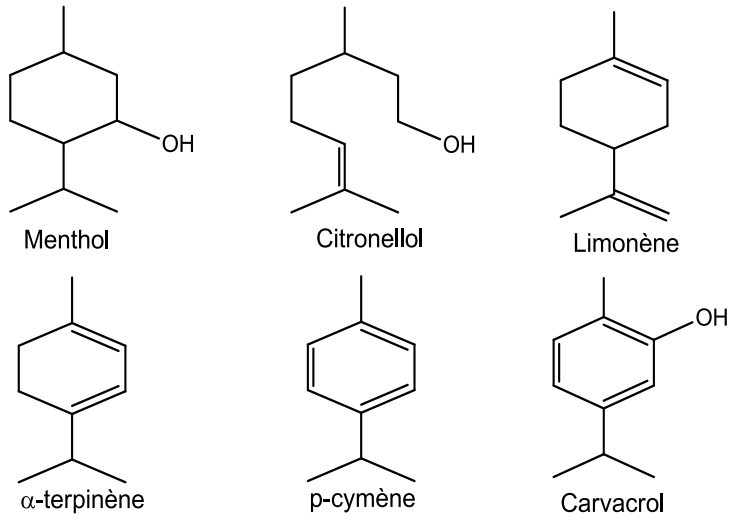


Figure 31 : Exemples de quelques monoterpènes

L'arrangement de leur squelette peut être : acyclique, mono, bi, et tricyclique [88].

Les iridoïdes et les pyréthrines forment deux classes de composés tout à fait particulières des monoterpènes. Les iridoïdes sont des monoterpènes caractérisés par un squelette « cyclopenta[c] pyrane » ou « iridane » (Figure 32).

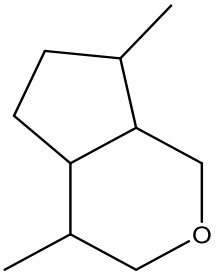


Figure 32 : Squelette iridane

Les monoterpènes sont largement distribués chez les végétaux de la famille Asteraceae [88] à laquelle appartient *C. odorata*.

5.2 Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes (Figure 33) forment une série de composés qui renferment 15 atomes de carbones, ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme : les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature. On peut également rencontrer dans les plantes des sesquiterpènes lactones (Figure 33). Ces métabolites secondaires sont issus de l'oxydation d'un groupe méthyle du groupement isopropyle attaché au squelette de base sesquiterpénique [103]. Les sesquiterpènes et les monoterpènes sont souvent en mélange dans les huiles essentielles des plantes, notamment chez les espèces des familles Lamiaceae, Myrtaceae, Pinaceae et Rutaceae [104].

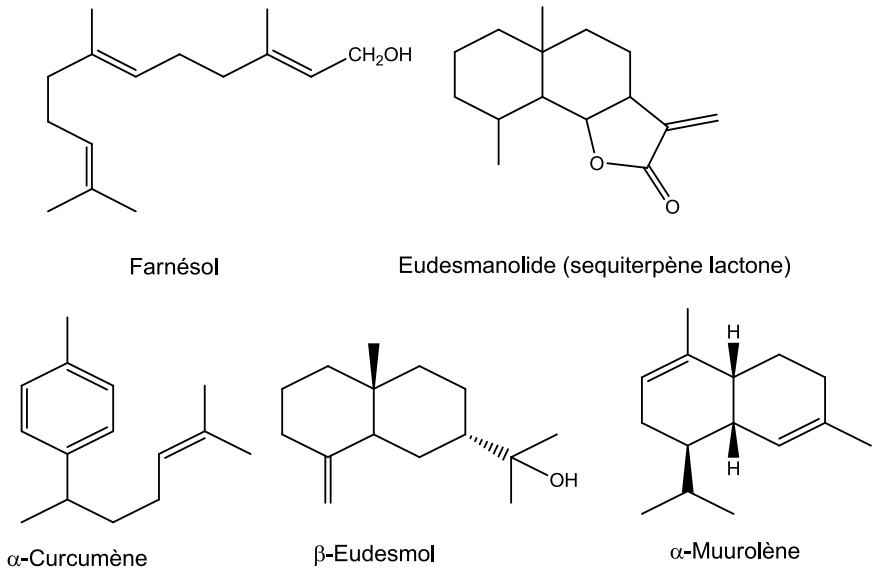


Figure 33 : Exemples de quelques sesquiterpènes

5.3 Diterpènes

Les diterpènes constituent un grand groupe de composés en C-20 issus du métabolisme du 2*E*, 6*E*, 10*E*-géranylgéranylpyrophosphate. Très répandus chez les végétaux supérieurs, ils sont aussi présents chez certains insectes et chez divers organismes marins [88]. On peut les trouver encore dans les résines, les exsudats et les gommes naturelles. Il est rare de rencontrer les diterpènes comme constituants des huiles essentielles, à cause de leurs points d'ébullition élevés [105]. Ils peuvent être acycliques ou cycliques. Deux alcools importants sont connus (Figure 34), le phytol, rencontré sous forme d'ester dans les végétaux à chlorophylle et la vitamine A essentielle à la croissance normale des mammifères et indispensable pour la reproduction et la vue [106].

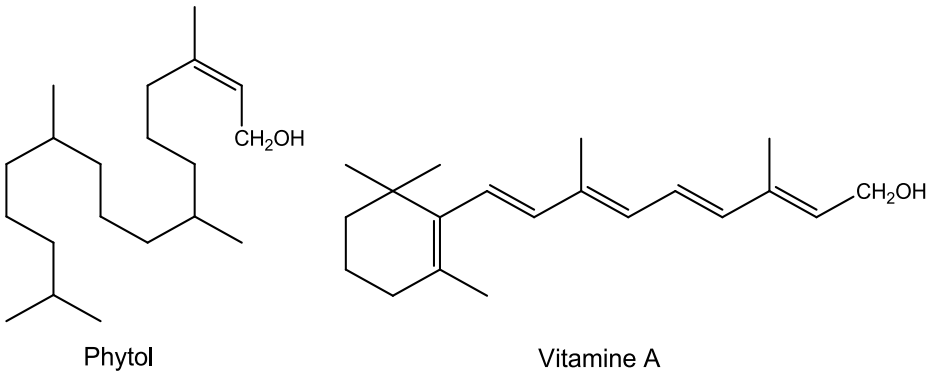


Figure 34 : Exemples de quelques diterpènes

5.4 Triterpènes et stéroïdes

Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3*S*-2,3-époxysqualène, ou plus rarement du squalène lui-même [98-100]. Ils sont presque toujours hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde. Les triterpènes (Figure 35 et Figure 36) présentent une très forte unité structurale, les différences majeures sont d'ordre stéréochimiques ayant trait à la conformation adoptée par l'époxysqualène avant la cyclisation initiale. Le cation formé lors de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1, 2 de protons et de méthyles conduisant aux différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles [98-100].

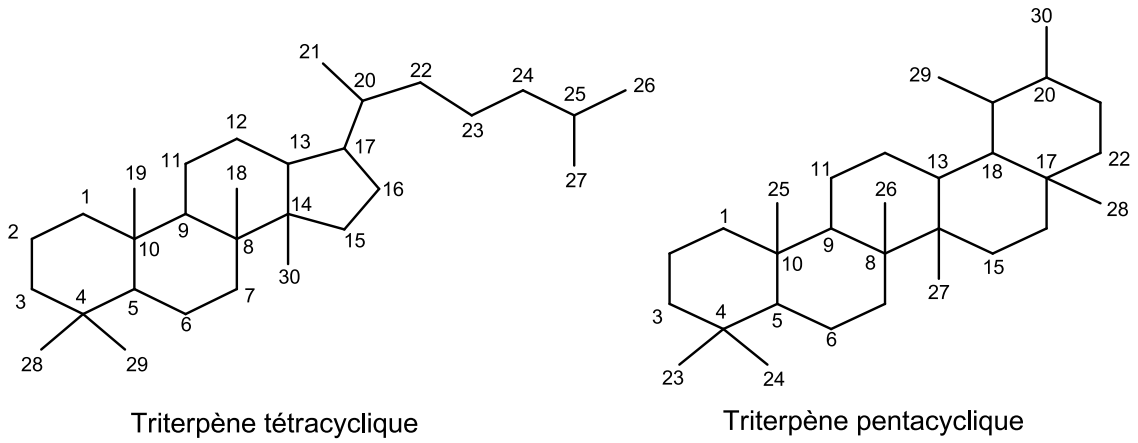


Figure 35 : Squelettes de triterpènes tétracycliques et pentacycliques

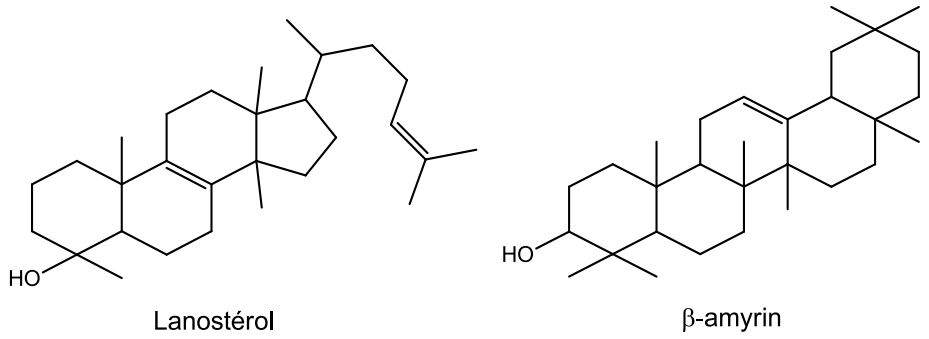


Figure 36 : Exemples de quelques triterpènes

La famille des triterpènes tétracycliques présente une importance particulière par son homogénéité et surtout par ses rapports étroits avec les stéroïdes [107]. Leur structure de base commune est le noyau stérane (Figure 37).

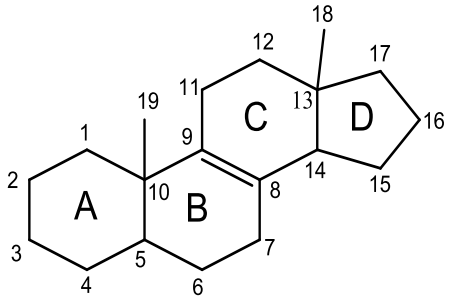


Figure 37 : Structure de noyau stérane

Les stéroïdes (Figure 38) sont des composés qui contiennent le noyau perhydrocyclopenténophénanthrène. Ils comprennent une grande variété de composés naturels parmi lesquels se trouvent les stérols proprement dits, les acides biliaires, les hormones

sexuelles, les hormones corticosurrénales, les glucosides cardiotoniques, les sapogénines et quelques alcaloïdes.

Pratiquement, la position 3 est occupée par l'oxygène dans tous les stéroïdes naturels. Les stérols proprement dits n'ont aucun autre substituant oxygéné. Les substituants situés du même côté du squelette polycyclique que le groupe méthyle C-19 (en C-10) sont dits *β*, et les autres *α* [107].

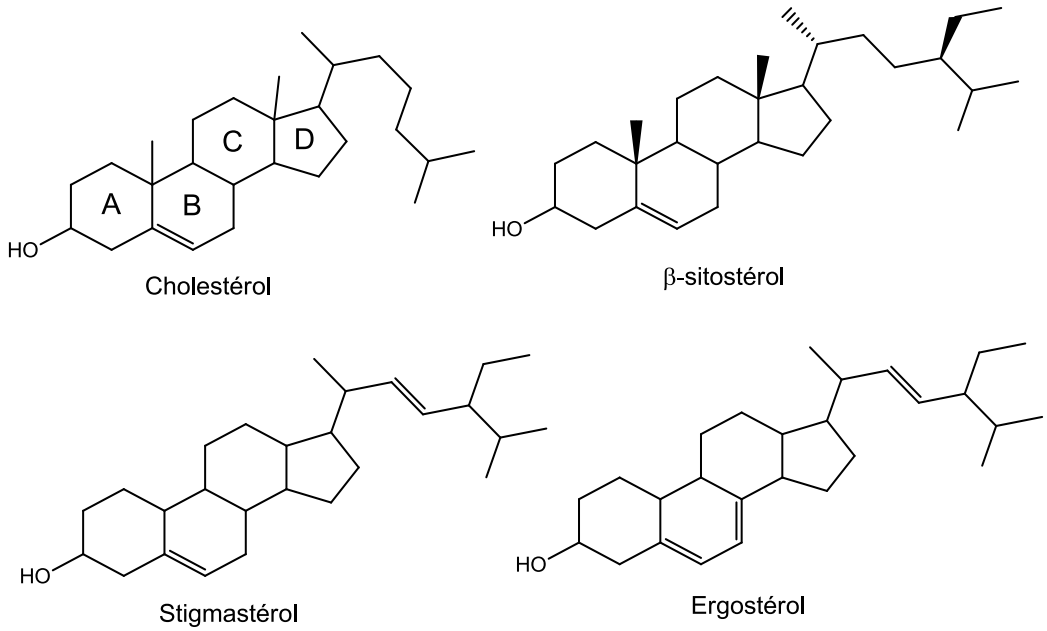


Figure 38 : Exemples de quelques stéroïdes

L'utilisation industrielle et l'intérêt thérapeutique des triterpènes et stéroïdes représentent un enjeu capital dans le domaine de la recherche des substances naturelles. Les propriétés pharmacologiques diverses [98, 100] attribuées à ces composés ont permis leur classement en tant qu'un groupe de métabolites secondaires de grande importance. Ces composés manifestent entre autres :

-des potentialités thérapeutiques dans différents domaines : cytostatiques, anti-inflammatoires, analgésiques, insecticides, molluscicides, etc...

-un intérêt considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique particulièrement la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés : contraceptifs, anabolisants, anti-inflammatoire,…etc.

-un intérêt thérapeutique concernant l'extraction des molécules bioactives, pour l'obtention des formes galéniques simples ou pour celle de préparation en phytothérapie ;

-une importance économique du fait de leur utilisation dans les industries agroalimentaires.

6 Les composés phénoliques

6.1 Généralités

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles [108]. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) [109]. Cependant, ils ont tous la même origine, la voie de phénylpropanoïde précédée par la voie de shikimate.

Les composés phénoliques participent activement aux interactions de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle de signaux de reconnaissance entre les plantes (allélopathie), soit lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés. Ces composés jouent donc un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [109].

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) [109].

Parmi les nombreux composés phénoliques que sont les flavonoïdes, acide benzoïques, acides hydroxycinnamiques, coumarines, stilbènes, subérines et les lignanes, nous nous intéresserons aux flavonoïdes. D'une part parce qu'ils sont plus représentés dans notre étude et d'autre part parce qu'ils présentent quelque fois des activités biologiques importantes.

6.2 Les flavonoïdes

6.2.1 Définition

Le terme « flavonoïde » provenant du latin "flavus", signifiant "jaune" est attribué aux composés possédant un squelette à 15 atomes de carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure 39).

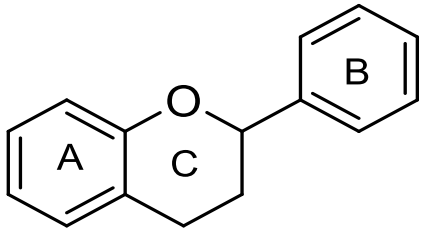


Figure 39 : Structure de base des flavonoïdes

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ils se trouvent d'une manière systématique dans toutes les plantes vasculaires, comme celles appartenant aux familles des Asteraceae et des Fabaceae. Ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, flavanols, dihydroflavonols, isoflavones, chalcones, aurones, anthocyanes et les tanins.

Ils ont été isolés par le scientifique E. Chevreuil en 1814, mais ont été réellement découverts en 1937, par Albert Szent-Györgyi, qui mit en exergue leur influence pour réduire la perméabilité des vaisseaux sanguins.

6.2.2 Classification et caractéristiques des flavonoïdes

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation, du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe se distinguent par les substitutions des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes, existent : les flavones, flavanols, flavanones, dihydroflavonols, flavan-3-ols, flavane-3,4-diols, chalcones, aurones, anthocyanes et isoflavones [98, 110] (Figure 40).

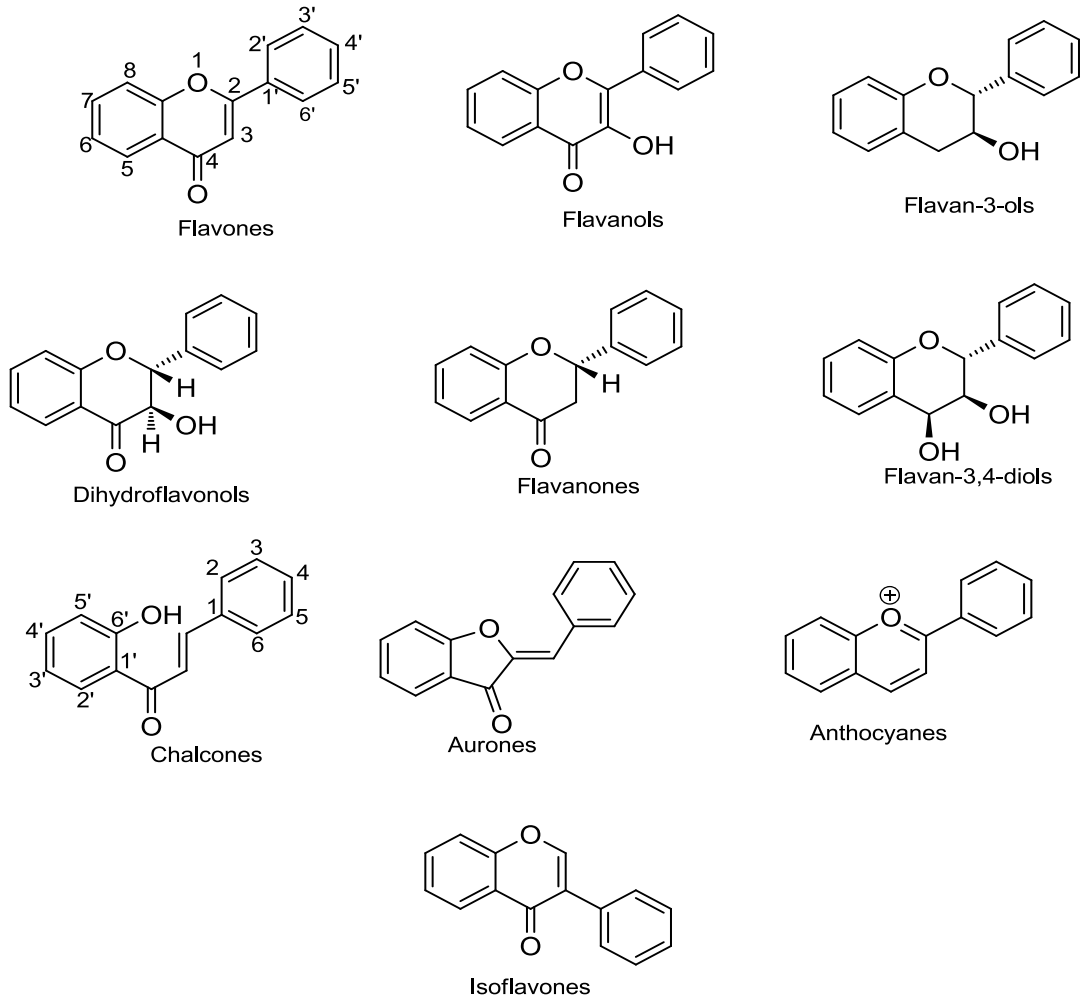


Figure 40 : Les principales classes de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5' (suivant la numérotation présentée pour les flavones, Figure 40). Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosides ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des) liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation [98].

6.2.3 Propriétés des flavonoïdes

6.2.3.1 *Propriétés anti-radicalaires*

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxyles moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle (Figure 41). Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle ($FLO^{\bullet}$). Ce dernier va subir un changement de structure par résonance ; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux $R^{\bullet}$. En outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs.

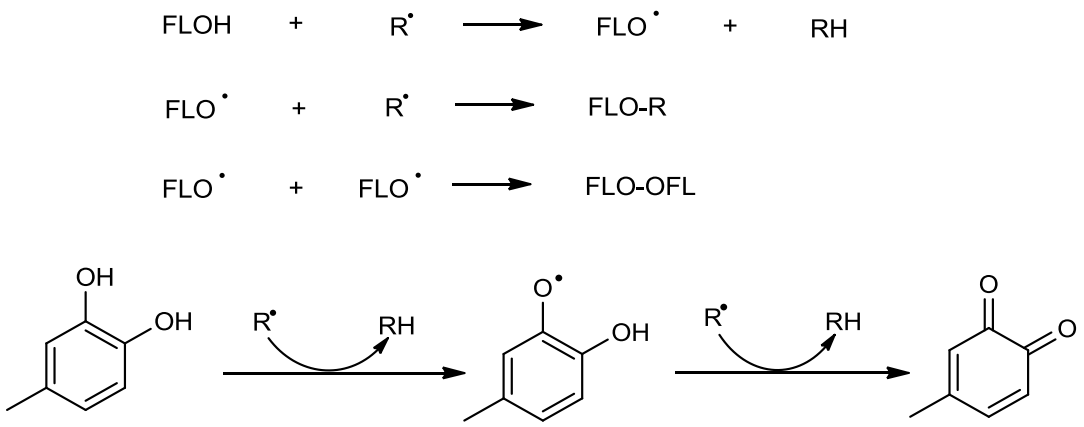


Figure 41 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène ($R^{\bullet}$) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable [111]

La propriété anti-radicalaire des flavonoïdes est étroitement liée à leur structure, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques, cette activité nécessite :

- la structure ortho-dihydroxyphénolique du cycle B (3',4' dihydroxystructure), cette structure est importante pour l'activité anti-radicalaire des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé ;

- la double liaison C2-C3 conjuguée avec la fonction 4 oxo qui est responsable de la délocalisation des électrons, en améliorant ainsi la capacité anti-radicalaire ;

- les groupements hydroxyles libres en C3 et C5 [112].

A titre d'exemple ; la quercétine et la myricétine répondent à tous ces critères nécessaires pour avoir une activité antiradicalaire efficace et importante [113].

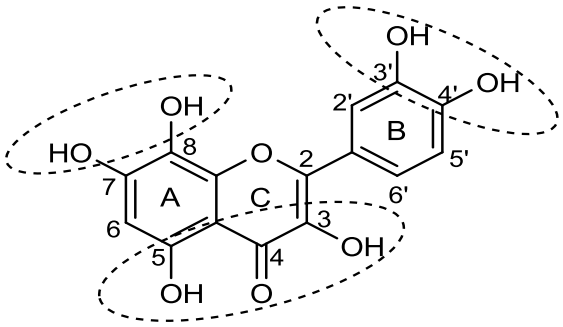


Figure 42 : Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes [112]

6.2.3.2 *Propriétés chélatrices des ions métalliques*

Les ions métalliques sont nécessaires pour le fonctionnement des processus biochimiques et physiologiques cellulaires, mais dans certains cas et lorsque leur mécanisme d'action n'est pas bien contrôlé ces mêmes ions peuvent être à l'origine d'une peroxydation lipidique, un stress oxydatif, ou une blessure des tissus, à titre d'exemple Cu^{2+} est un stimulateur de la peroxydation des lipoprotéines de basse densité (LDL=low-density lipoprotein) [111].

Grâce à leur structure chimique spécifique, les flavonoïdes peuvent facilement chélater les ions métalliques en créant des composés complexes inactifs [114]. La chélation des ions métalliques nécessite trois sites principaux (Figure 43) :

- site situé entre le groupe 3'-OH et le groupe 4'-OH du cycle B ;

- site situé entre le groupe 3-OH et 4-C=O de l'hétérocycle C ;

- site situé entre le groupe 5-OH du cycle A et le groupe 4-C=O de l'hétérocycle C.

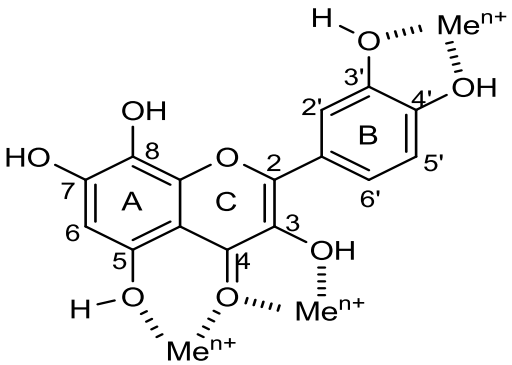


Figure 43 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) [111]

6.2.3.3 *Propriétés antibactériennes*

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus pour leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes

hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [115].

Une étude de Suksamrarn *et al*. [34] a montré que la flavanone 5,7-dihdroxy-4'-méthoxyflavanone présente une activité antimycobactérienne contre les *Mycobacterium tuberculosis* avec une valeur de CMI de 175 µM, tandis que la 4'-hydroxy-5,6,7-triméthoxyflavanone, l'acacetine et luteoline ont une activité faible avec les valeurs de CMI respectives de 606, 704 et 699 µM.

6.2.3.4 *Propriétés anticancéreuses*

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses. D'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose. En effet certains flavanols (épigallocatéchine-3-gallate) présentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de prostate. Ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques i.e. FAS (Fatty Acid Synthase) [116].

Les travaux réalisés par Caltagirone *et al.* en 2000 (cités par Depeint *et al*. [117]) ont montré que l'apigénine et la quercétine ont la capacité d'inhiber la phase de métastase.

Des travaux montrent aussi que la lutéoline a une activité cytotoxique modérée contre les cellules humaines BC de cancer du sein avec une valeur de CI_{50} de 38 µM et contre les cellules NCI-H187 de cancer du poumon avec une CI_{50} de 19 µM. L'acacétine montre également un effet modéré avec une CI_{50} de 25 µM sur les cellules NCI-H187 [34].

Deng *et al*. [118] ont montré que la (*S*)-5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone (naringenin-7,4'-diméthyléther) a un effet cytotoxique contre les cellules LNCaP de cancer de prostate hormono-dépendant, les cellules Lu1 de poumon humain et les cellules MCF-7 humaines de cancer du sein, avec des valeurs de DE_{50} de 6.7, 4.7 et 1.1 µM, respectivement.

L'activité anticancéreuse des flavonoïdes est aussi assurée par l'intervention de plusieurs mécanismes : piégeage des radicaux libres, inhibition du métabolisme d'acide arachidonique, formation d'un complexe inactif avec le carcinogène [119], prévention de l'activation des métabolites carcinogènes, inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses, arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses, induction de l'apoptose, inhibition des processus d'angiogénèse [120].

Récemment deux flavonoïdes glycosides, genkwanin 4'-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside] et sakuranetin 4'-O-[α-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside], isolés de *Chromolaena odorata* ont été évalués in vitro pour leur activité cytotoxique contre les lignées cellulaires cancéreuses LLC et HL-60. Le composé genkwanin 4'-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside] a montré une cytotoxicité contre les lignées de cellules cancéreuses LLC et HL-60 avec des valeurs de CI_{50} respectives de 28.2 et 11.6 µM. Le composé sakuranetin 4'-O-[α-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside] a montré une faible activité cytotoxique contre LLC (valeur CI_{50} supérieure à 50 µM) [121].

6.2.3.5 *Propriétés anti-inflammatoires*

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérosique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires [122] et certains sont capables d'inhiber l'histamine [123].

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myrecétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) [124].

Kaempferide a été signalé comme inhibiteur de l'inflammation induite par la promotion tumorale de l'ester de phorbol ; et la flavone eupatilin inhibe sélectivement la 5-lipoxygénase de cellules mastocytomes cultivées [16, 125].

6.2.3.6 *Propriétés antivirales*

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement à leurs effets sur les enzymes responsables de sa réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase) [126]. Quercétine, apigénine, catéchine et hesperédine sont, parmi les flavonoïdes, caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 [124].

6.2.3.7 *Propriétés antiallergiques*

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca^{2+} dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATPase Ca^{2+} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine montre un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament pour empêcher la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme [127].

7 Les Anthraquinones

7.1 Généralités

Les anthraquinones sont des principes assez fréquents chez les Rubiaceae. Elles appartiennent à la famille des anthracénosides et existent dans les plantes à l'état de génine libre ou sous forme d'hétéroside [128].

Ces composés sont constitués de trois cycles accolés, dont un des cycles est le plus souvent oxydé (Figure 44). Les cycles benzéniques peuvent porter une ou plusieurs fonctions hydroxyles, carboxyles, méthyles, méthoxyles, hydroxyméthyles et former des O-hétérosides avec différents sucres [128].

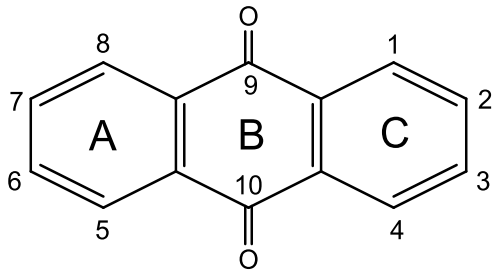


Figure 44 : Anthraquinone

Les anthraquinones sont des composés aromatiques oxydés, principalement d'origine polycétidique dérivé de la cyclisation d'une chaîne « octacétide ». Les composés polycétides proviennent de chaines « polycetométhylène » $-(CH2\text{-}CO)_n-$. La présence de groupes fonctionnels et leur disposition sont déterminées par la séquence de réactions d'alkylation, de déshydratation, d'oxydation, de condensation, d'hydroxylation et de glycosidation [100, 129].

7.2 Propriétés des anthraquinones

7.2.1 Propriété photosensibilisante

Plusieurs dérivés d'anthraquinone ont été étudiés pour leurs propriétés photosensibilisantes dans les réactions photodynamiques [6,7]. Ainsi, par exemple, certains d'entre eux présentent une bonne activité antibactérienne et antivirale en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) et la molécule d'oxygène singulet ($^1O_2$), qui provoquent des dommages oxydatifs ultérieurs [130].

7.2.2 Propriété antibactérienne

Des travaux réalisés sur six anthraquinones isolées de *Morinda angustifolia* ont montré que la 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxyanthraquinone à la dose de 13 µg/disque présente une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis, E. coli, Micrococcus luteus* avec des

diamètres de zones d'inhibition de 14.0, 12.5 et 13.0 mm respectivement. [131]. Six anthraquinones isolées de trois espèces du genre *Xanthoria* (*X. falla*, *X. elegans* et *X. policarpa*), physcion, erythroglaucin, xanthorin, emodin, fallacinal et teloschistin, ont montré une activité antibactérienne à la dose de 25 µg/disque contre *Pseudomonas fluorescens*, *P. glicinea* et *P. phaseolicola* avec une inhibition de la croissance de 5-15%, 5-25% et 5-8% [132]. Les anthraquinones isolées de *Heterophyllaea pustulata*, à savoir soranjidiol, rubiadin, damnacanthal et le 5,5'-bisoranjidiol, ont montré une activité antibactérienne sur *S. aureus* avec des CMI comprises entre 32 et 64 µM [130].

L'activité inhibitrice de la croissance de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 des constituants isolés des écorces de *Tabebuia impetiginosa* a été examinée en utilisant la diffusion des disques en papier et la CMI des essais biologiques. L'activité des composés isolés a été comparée à celle des agents anti-*Helicobacter pylori* disponibles dans le commerce, amoxicilline, le métronidazole et la tétracycline. Avec la méthode de diffusion de disque en papier, la 2-(Hydroxyméthyl) anthraquinone a présenté une forte activité contre *Helicobacter pylori* ATCC 43504 à partir de 0.01 mg/disque. L'acide anthraquinone-2-carboxylique, et le métronidazole ont été moins efficaces en présentant une activité anti-*Helicobacter pylori* modérée à 0.1 mg/disque. Pour la CMI des essais biologiques, la 2-(hydroxyméthyl) anthraquinone (2 µg/mL) et l'acide anthraquinone-2-carboxylique (8 µg/mL) ont été plus actifs que le métronidazole (32 µg/mL) mais moins efficace que l'amoxicilline (0.063 µg/mL) et la tétracycline (0.5 µg/mL) [133].

Le test de létalité des crevettes de saumure a donné une valeur de DL50 de 533 µg/mL pour l'anthraquinone 1,5-dihydroxy-3-méthoxy-7-méthyl-anthraquinone. Elle est active contre deux bactéries à gram positif (*B. anthracis* et *Corynebacterium pseudodiphthericum*) et deux bactéries à gram négatif (*P. aeruginosa* et *P. pseudomalliae*) à la dose de 200 µg/mL [134]. Deux anthraquinones, zenkequinones A et B ont été isolées à partir des écorces de la tige de *Stereospermum zenkeri*. L'activité antimicrobienne des composés isolés a été évaluée contre six souches multirésistantes d'agents pathogènes. Zenkequinone B a montré la meilleure activité antibactérienne contre les bactéries à gram-négative *P. aeruginosa* avec une valeur de CMI de 9.50 µg/mL [135].

7.2.3 Propriété antifongique

Parmi les six anthraquinones isolées de *M. angustifolia*, la 1,8-dihydroxy-2-méthyl-3,7-diméthoxyanthraquinone à la dose de 13 µg/disque, possède une activité antifongique contre *C. albicans* avec un diamètre de zone d'inhibition de 7.5 mm [131].

Les travaux de Manojlović *et al*. [132] ont signalé que les six anthraquinones isolées des trois espèces du genre *Xanthoria* présentaient des activités fongicides contre *Aspergillus niger*, *Doratomyces stemonilis*, *Trhichoderma viride* et *Penicillium verucosum* en inhibant la croissance de 10 à 65% avec une dose de 100 µg/disque.

Une étude de Kanokmedhakul *et al*. a démontré que nordamnacanthal et damnacanthal isolés de *Prismatomeris fragrans* présentaient des activités antifongiques contre *C. albicans* avec les valeurs de CI_{50} de 6.0 et 22.6 µg/mL respectivement [136].

Rhein, physcion, aloe-emodin et chrysophanol isolés à partir des rhizomes de *Rheum emodi* ont montré une activité antifongique contre *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Aspergillus fumigatus* avec des valeurs de CMI comprises entre 25 et 250 µg/mL [137].

7.2.4 Propriété antivirale

Les deux anthraquinones emodin et barbaloin ont montré une activité antivirale. L'excellent agent virucide est l'emodin [138]. Le damnacanthal isolés des racines de *Morinda elliptica* a montré une activité modérée contre le VIH [139]. Un certain nombre d'anthraquinones, des dérivés d'anthrones et d'anthraquinones ont été évalués pour leur activité antivirale contre le cytomégalovirus humain (HCMV). Parmi les composés évalués, quinalizarin, emodin, rhein, hypericin, protohypericin, alizarin, emodin bianthrone et emodin anthrone ont montré une activité antivirale contre la souche AD-169 de HCMV. Lors d'un essai sur une souche de HCMV résistante au ganciclovir, les valeurs de la CE_{50} pour quinalizarin, rhein et l'alizarine étaient supérieures aux valeurs obtenues pour la AD-169 [140].

7.2.5 Propriété anticancéreuse

Parmi les anthraquinones isolées des racines de *Morinda elliptica*, le damnacanthal et le lucidin-ω-méthyl éther, sont cytotoxiques sur les lignées cellulaires MCF-7 (cellules tumorales mammaires) et CEM-SS (leucémie lymphoblastique T). Le rubiadin et le nordamnacanthal sont cytotoxiques sur la lignée CEM-SS [139]. Le nordamnacanthal, damnacanthal et 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-méthoxyanthraquinone isolés de *P. fragrans* ont montré une activité cytotoxique contre les cellules de la lignée BC avec les valeurs de CI_{50} respectives de 6.9, 10.1 et 8.0 µg/mL. De plus, les anthraquinones 1,3-dihydroxy-2-méthyl-5,6-diméthoxyanthraquinone, nordamnacanthal, damnacanthal, rubiadin, rubiadin-1-méthyl éther de *P. fragrans* et la 1-hydroxy-2-méthyl-4,5,6-triméthoxyanthraquinone préparée à partir du traitement 1,3-dihydroxy-2-méthyl-5,6-diméthoxyanthraquinone ont montré une activité cytotoxique contre les cellules de la lignée NCIH187 avec des valeurs de CI_{50} de 8.7, 1.9, 13.5, 14.2, 4.5, 9.4 et 5.1 µg/mL respectivement. Le dérivé éther méthylique, 1-hydroxy-2-méthyl-4,5,6-triméthoxyanthraquinone, est plus active contre NCI-H187 que son parent [136].

7.2.6 Propriété laxative

Barbaloin (10-glucopyranosyl-1,8-dihydroxy-3-(hydroxyméthyl)-9(10H)-anthracénone: aloin A) est l'anthraquinone majoritaire des exsudats et des gels d'*Aloe vera* [141], qui sont largement utilisés pour la fabrication de plusieurs types de boissons, produits alimentaires, cosmétiques et produits pharmaceutiques. Ces préparations ont montré plusieurs activités pharmacologiques dont l'activité laxative est la principale [142]. Il a été souligné que le

clivage de la partie glycoside du barbaloin par la flore intestinale des rats conduit à la formation de son dérivé aglycone, l'aloe-emodin anthrone, qui possède un effet laxatif puissant [143].

7.2.7 Propriété antipaludique

Des études ont montré l'activité antipaludique de certaines anthraquinones isolées des plantes. Le digitolutein, l'éther rubiadin 1-méthyl et damnacanthal, des anthraquinones extraites de l'écorce du tronc et des racines de *M. lucida* ont inhibé significativement la croissance de *P. falciparum in vitro*. Le nombre de parasites (schizontes) a diminué d'une manière dose-dépendante jusqu'à 100% d'inhibition obtenue avec 30 à 40 µg pour chaque composé testé [82]. L'emodin, est l'anthraquinone la plus abondante et la plus active isolée de *Cassia nigricans*. Elle a induit environ 85% de mortalité sur les larves de moustiques *Anopheles gambiaea* à 50 et 25 µg/mL en 24 h [144].

Onegi *et al*. ont montré que le sterekunthal A présente une forte activité antiplasmodique contre deux souches de *P. falciparum* (PoW et Dd2) avec des valeurs CI_{50} de 1.3 µg/mL pour la souche PoW et 0.4 µg/mL pour la souche Dd2 [145].

7.2.8 Propriété antituberculeuse

Nordamnacanthal, damnacanthal, rubiadin et 1-hydroxy-2-hydroxyméthyl-3-méthoxyanthraquinone, isolés de *P. fragrans*, ont montré une activité antituberculeuse contre *Mycobacterium tuberculosis* avec des valeurs de CMI respectives de 100, 25, 100 et 50 µg/mL [136].

8 Inflammation et cancer

L'inflammation est la réponse des tissus vivants à une agression ; elle constitue l'un des mécanismes les plus importants des défenses de l'organisme. Bien que bénéfique, car elle permet d'éliminer l'agent pathogène, l'inflammation peut devenir néfaste notamment en causant de nombreux dommages tissulaires suite à une activité très importante des cellules inflammatoires, une libération accrue d'espèces réactives oxygénées ou à une trop grande agressivité de l'agent pathogène [146]. La réaction inflammatoire peut se manifester de manière aiguë ou chronique. Cette dernière, caractérisée notamment par sa grande durée peut toutefois survenir spontanément [146-148]. De nombreuses pathologies peuvent être liées à une inflammation chronique ; notamment, l'asthme, la maladie d'Alzheimer, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et le cancer [147-149]. Le cancer est une maladie chronique qui résulte d'une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme [150]. Cette prolifération est due à des altérations au niveau des proto-oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeurs [150, 151]. Ce processus, caractérisé par des étapes d'initiation, de promotion et de progression, est responsable de 13% de la mortalité mondiale selon les données de l'OMS [152]. De nos jours, le cancer peut être associé à une inflammation chronique [148, 153]. Des études ont montré avec certitude le lien entre inflammation chronique et cancer. C'est par exemple le cas des cancers de l'estomac ou du col de l'utérus. Le premier se développe suite à une infection bactérienne par *Helicobacter pylori* et le second, à la suite d'une infection par un papillomavirus. Dans les deux cas, les agents pathogènes persistent des années dans l'organisme, entraînant une réaction inflammatoire durable [4, 154].

Le traitement du cancer, long, coûteux et inaccessible à la plupart des populations pauvres, nécessite l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et stéroïdiens (AIS). Les AINS et AIS agissent sur les effets initiateurs ou amplificateurs de l'inflammation (migration des cellules inflammatoires, libération de prostaglandines et leucotriènes, ERO…). Toutefois, l'utilisation des molécules anti-inflammatoires, essentiellement d'origine synthétique, n'est pas sans effets nocifs pour l'organisme ; notamment, l'usage prolongé des AINS peut entraîner des troubles au niveau du tractus gastro-intestinal, des toxicités au niveau du rein et de la peau [155]. Dès lors, la recherche de molécules actives dotées de faibles effets secondaires s'avère nécessaire. De telles molécules sont présentes dans les plantes qui constituent, parfois, la seule source de traitement pour les populations pauvres [156, 157].

Nous avons donc entrepris d'extraire et d'identifier les métabolites secondaires présents dans quatre plantes utilisées en médecine traditionnelle ivoirienne dans le traitement de plusieurs pathologies inflammatoires chroniques telles que le paludisme, la diarrhée, la rougeole ou la varicelle. Et enfin, étudier les propriétés anti-inflammatoire et/ou anticancéreuse des métabolites isolés afin d'établir des bases scientifiques d'un traitement traditionnel.

Conclusion partielle

La synthèse bibliographique nous a montré que deux principaux types de composés existent dans les extraits de plantes médicinales. Il s'agit des métabolites secondaires volatils (les huiles essentielles) et les métabolites secondaires non volatils (les flavonoïdes et anthraquinones). Les huiles essentielles extraites des feuilles de *C. odorata*, et celles des feuilles et des racines de *M. lucida*, ont des activités insecticide, antibactérienne, antifongique pour *C. odorata* et des activités antioxydante, anti-inflammatoire pour *M. lucida*.

Les flavonoïdes et les anthraquinones constituent la majorité des métabolites secondaires non volatils isolés de *C. odorata* et de *M. lucida*, respectivement. Ces groupes de composés possèdent des propriétés biologiques telles que les propriétés antioxydante, antibactérienne, anticancéreuse, antiinflammatoire, antivirale, antiallergique pour les flavonoïdes et les propriétés photosensibilisante, antibactérienne, antifongique, antivirale, anticancéreuse, laxative, antipaludique, antituberculeuse pour les anthraquinones.

Cependant, les compositions chimiques des huiles essentielles des feuilles de *M. morindoides*, des graines de *M. lucida* qui ne sont pas encore décrites sont à connaître.

Les métabolites non volatils de *L. fasciculata* sont à connaître et de nouveaux composés non volatils de *M. lucida* sont à découvrir afin d'interpréter leurs activités biologiques *in vitro* et comprendre les modes d'actions thérapeutiques des plantes sélectionnées.

Partie 3 : Résultats et discussions

1 Etude phytochimique des feuilles de *Chromolaena odorata*

L'espèce *Chromolaena odorata* King & Robinson (Asteraceae) a retenu notre attention en premier lieu pour ses utilisations traditionnelles en Côte d'Ivoire dans le traitement des douleurs abdominales, les céphalées, le paludisme, le diabète et pour soigner les plaies et, en second lieu, en raison de son invasion massive et inexorable.

1.1 Métabolites secondaire volatils : huiles essentielles

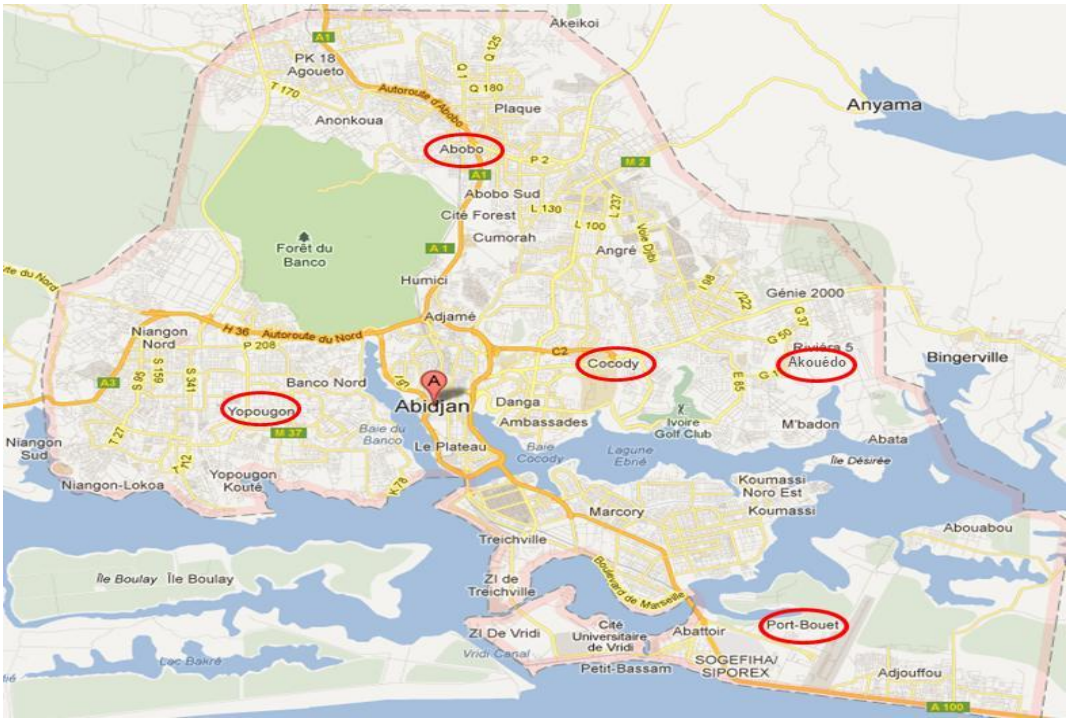


Figure 45 : Carte de la ville d'Abidjan

1.1.1 Rendement en huiles essentielles

1.1.1.1 *Effets de la saison et du lieu géographique de récolte*

L'hydrodistillation des feuilles fraîches de *C. odorata* provenant des cinq sites géographiques de la ville d'Abidjan : Cocody (Abidjan-Centre), Yopougon (Abidjan-Ouest), Port-Bouët (Abidjan-Sud), Abobo (Abidjan-Nord) et d'Akouédo (Abidjan-Est) (Figure 45) a permis d'extraire des huiles essentielles avec des rendements qui varient peu (Figure 46). Les

rendements sont faibles et varient de 0.13 à 0.20%. Pendant toute l'année, les feuilles du site de Cocody (Centre) et de Yopougon (Ouest) donnent les meilleurs rendements 0.18-0.20 et 0.17-0.18% respectivement ; tandis que, celles du site d'Abobo (Nord) donnent les plus faibles rendements en huiles 0.13-0.14%. Les feuilles du site de Port-bouët (Sud) sont fortement influencées par la saison. En effet, en saison pluvieuse, le rendement faible de 0.15% (identique à celui du site d'Akouédo en toute saison) augmente en saison sèche à 0.19%.

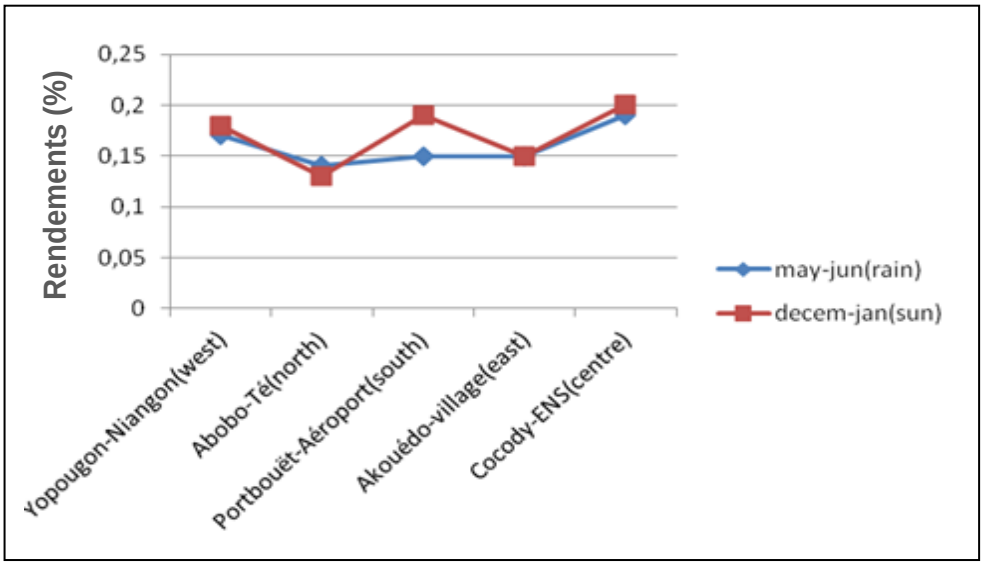


Figure 46 : Effet de la saison et du lieu géographique de récolte

1.1.1.2 *Effet de la durée de stockage*

Afin de déterminer l'effet de la durée de stockage des feuilles sur le rendement en huile, les extractions ont été effectuées le jour de récolte (jour 0), deux jours après la récolte (jour 2), quatre jours après la récolte (jour 4) et six jours après la récolte (jour 6) pour chaque site géographique de récolte.

Au bout de six jours de stockage, les feuilles des sites de Yopougon, Port-Bouët, Abobo et d'Akouédo montrent une perte considérable d'huiles allant jusqu'à 0% pour Abobo et Yopougon. En revanche, la teneur en huiles des feuilles récoltées sur le site de Cocody reste inchangée.

Les pertes d'huiles observées pour les quatre lots suggèrent que la majorité des glandes sécrétrices d'huile essentielle chez cette plante, se trouve disposée sur l'épiderme, comme dans le cas des Lamiaceae. Le séchage aurait alors pour effet d'accentuer les pertes d'huiles essentielles par endommagement des glandes sécrétrices et par évaporation [158]. Il reste à établir la raison de la résistance du lot de Cocody aux processus de dégradation, mais il est clair qu'une telle stabilité est avantageuse pour une exploitation ultérieure.

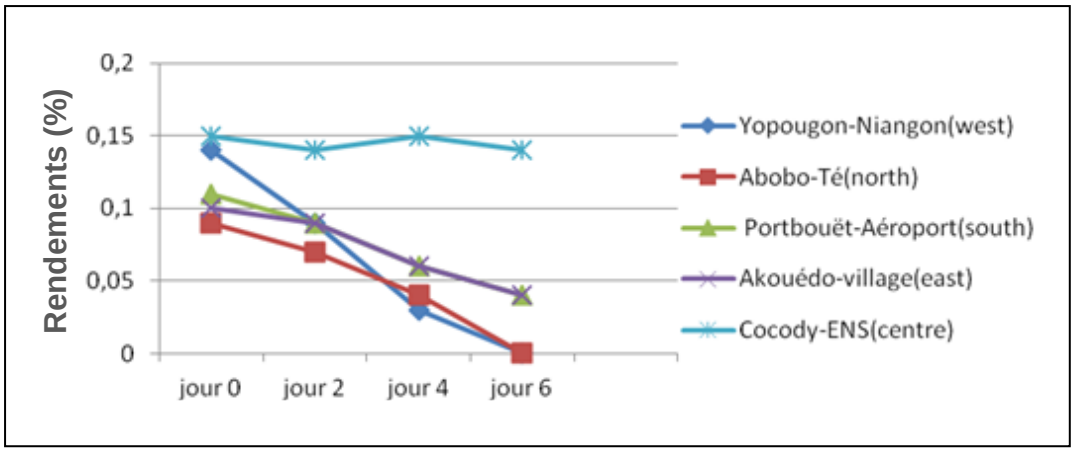


Figure 47 : Effet de la durée de stockage des feuilles sur le rendement

1.1.2 Composition chimique des huiles essentielles

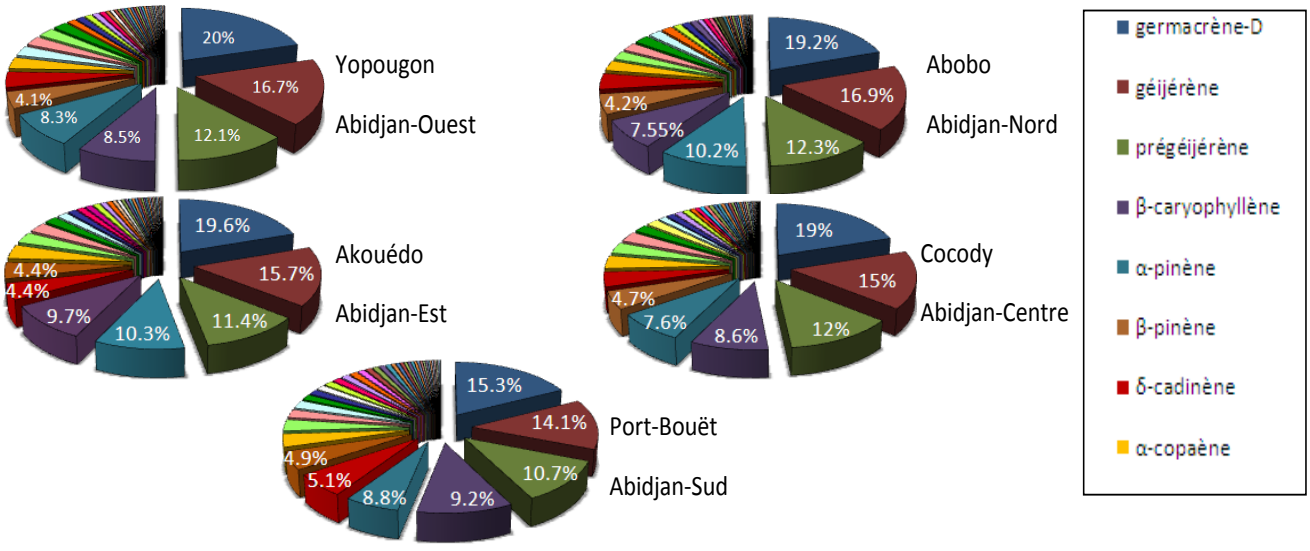


Figure 48 : Composition chimique des huiles essentielles déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) en fonction du lieu de récolte

Les huiles essentielles des cinq sites présentent le même chemotype dominé par les sesquiterpènes germacrène-D (15.3-20.0%), géijérène (14.1-16.9%), prégéijérène (10.7-12.3%) et *β*-caryophyllène (7.5-9.7%) et le monoterpène *α*-pinène (7.6-10.3%). Il faut cependant noter que le pourcentage de ces composés majoritaires varie faiblement selon le site de récolte. Les trois sesquiterpènes, germacrène-D, géijérène et prégéijérène, des puissants larvicides, pesticides [159, 160], sont plus abondants dans les huiles de Yopougon, Akouédo, Abobo et Cocody et moins abondants dans celles de Port-bouët. Il est donc plus judicieux d'éviter d'utiliser les huiles extraites des feuilles du Sud d'Abidjan quand on recherche les propriétés larvicides et pesticides. De même le monoterpène α-pinène, un

antiinflammatoire, antiseptique et antiviral [159], est plus abondant dans les huiles essentielles d'Abobo et d'Akouédo et moins abondant dans celles de Cocody.

Il est certain que les composés volatils de cette plante invasive peuvent être utilisés comme larvicides et insecticides en Côte d'Ivoire. Une telle exploitation donnerait un caractère bénéfique et une nouvelle orientation de la gestion de cette espèce végétale.

Son emploi traditionnel dans différents traitements impliquant des processus inflammatoires serait dû à la présence, en quantité importante, de monoterpènes comme l'α-pinène dans les huiles.

1.2 Métabolites secondaires non volatils

1.2.1 Interprétation des CCM préliminaires de l'extrait hexanique C1

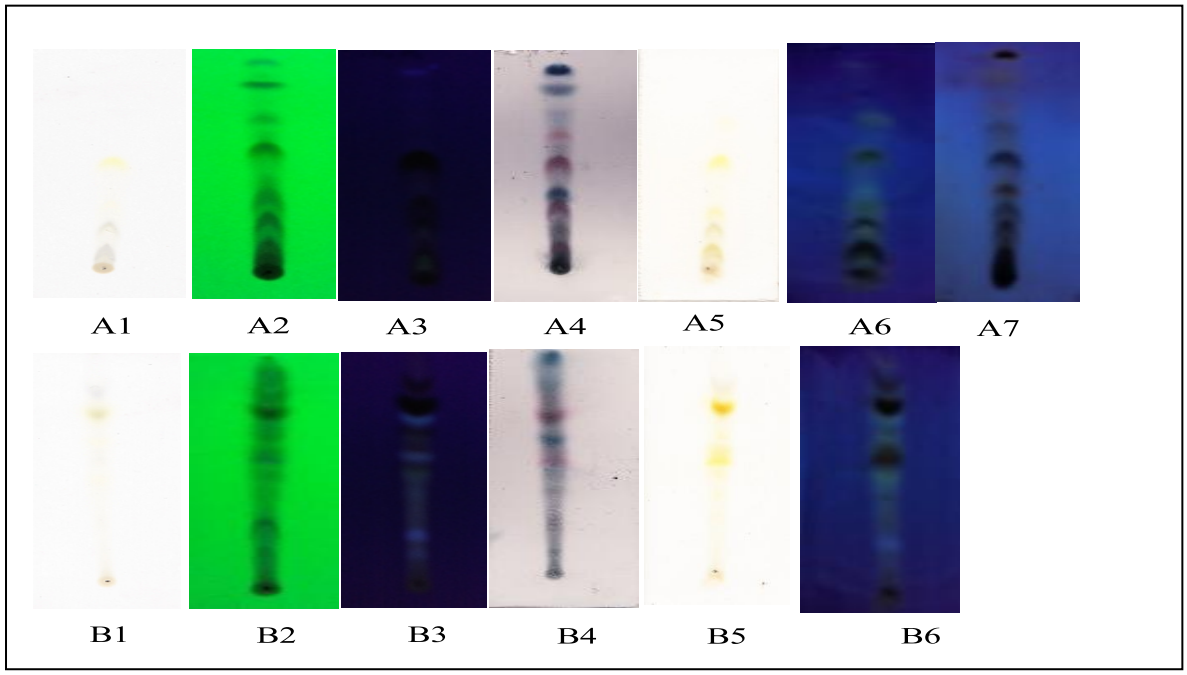


Figure 49 : CCM préliminaires de C1. A élution au CH_2Cl_2. B élution Tol/AcOeEt/MeOH (80 :18 :2). 1-UV visible. 2-UV 254 nm. 3-UV 365 nm. 4-Réactif à la vanilline sulfurique. 5-Réactif de Neu observation UV visible. 6-Réactif de Neu, observation UV 365 nm. 7-Réactif de Liebermann et Burchard, observation UV 365 nm

Des chromatographies sur couche mince (CCM) préliminaires ont été menées sur l'extrait hexanique des feuilles de *C. odorata* (la fraction C1) pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer dans cet extrait. Pour cela, une partie de l'extrait a été solubilisée dans le solvant approprié et déposée sur plaques de CCM. Elles ont ensuite été éluées dans les systèmes de solvants décrits dans la partie Matériels et méthodes et révélées avec divers réactifs pour permettre une première orientation des classes de composés

présentes dans l'échantillon à analyser (Figure 49). Les informations recueillies ont ensuite été confrontées aux données bibliographiques collectées sur cette espèce.

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes (réactif de Neu, fluorescence jaune-orange et verte sous lumière UV à 365 nm). La couleur jaune en UV visible indique la présence probable de chalcones.

Les fractions apolaires semblent contenir des terpènes (coloration bleue violette par révélation à la vanilline sulfurique et fluorescence à 365 nm par révélation avec le réactif de Liebermann et Burchard (Figure 49).

1.2.2 Purification de l'extrait hexanique C1

Plusieurs procédés de purification ont été employés concernant essentiellement des techniques chromatographiques qui seront détaillées dans la partie Matériels et méthodes (colonne ouverte, colonne haute pression etc...). Les fractions présentant des profils identiques en CCM sont réunies et purifiées. Les fractions purifiées contiennent soit un faible mélange de produits, soit un mélange de produits ayant des polarités éloignées permettant leur séparation ou contiennent un produit majoritaire.

1.2.2.1 *Isolement des composés Chrom1 et Chrom2*

Le schéma de fractionnement de l'extrait C1 est présenté sur la Figure 50.

10 g de l'extrait hexanique C1 est prélevé puis fractionné grossièrement par chromatographie en phase normale sur colonne ouverte, éluée par 100% de dichlorométhane (CH_2Cl_2). 75 fractions sont obtenues, notées C1.1 à C1.75.

Une CCM bilan du fractionnement de C1 est réalisée avec 100% de CH_2Cl_2 comme phase mobile. Les molécules les plus apolaires sont éluées en premier puis viennent les molécules les plus polaires. Les composés présents dans les dernières fractions (C1.71 à C1.75) ne migrent pas car elles sont trop polaires pour ce solvant.

Les fractions apolaires C1.1 à C1.3 qui sont des mélanges constitués certainement de terpènes seront purifiées par une autre méthode. Nous décidons de purifier la fraction C1.4 qui contient majoritairement des flavonoïdes. Les autres fractions sont conservées au réfrigérateur à + 5°C. La fraction C1.4 subit un fractionnement sur colonne de silice normale que nous éluons par un mélange CH_2Cl_2/AcOEt (90:10). 4 fractions sont obtenues (C1.4.1 à C1.4.4). Au vu des CCM, la fraction C1.4.3 a subi une autre chromatographie sur colonne de silice normale éluée par Hex/CH_2Cl_2 (40:60) pour donner 6 sous-fractions (C1.4.3.1 à C1.4.3.6). La sous-fraction C1.4.3.2 est soumise à un lavage hexanique des cristaux puis à une dernière chromatographie en phase normale sur colonne de silice éluée par CH_2Cl_2/AcOEt (90:10) pour donner le composé **Chrom1**. La sous-fraction C1.4.3.4 a subit aussi un lavage hexanique des cristaux puis une dernière chromatographie en phase normale sur colonne de silice éluée par CH_2Cl_2 pour donner le composé **Chrom2**. Le composé **Chrom2** a également été obtenu par lavage hexanique des cristaux de C1.4.3.5.

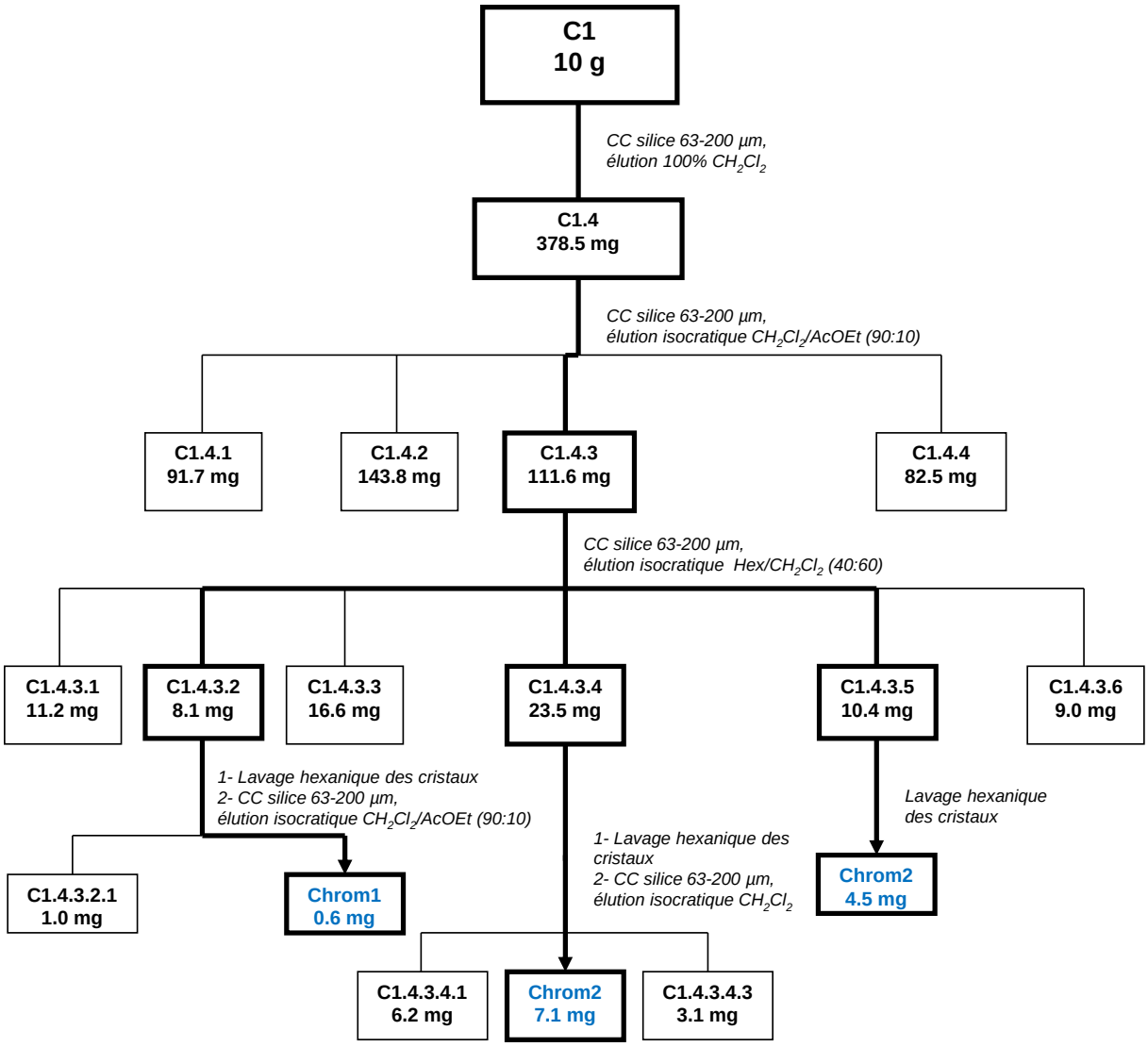


Figure 50 : Schéma de fractionnement de l'extrait hexanique C1 des feuilles de *C. odorata* et isolement des composés Chrom1 et Chrom2

1.2.2.2 *Isolement du composé Chrom3*

Le schéma de fractionnement est présenté sur la Figure 51.

20 g de l'extrait hexanique C1 est prélevé puis fractionné par chromatographie sur colonne ouverte de silice, éluée successivement par un mélange Hex/CH_2Cl_2, CH_2Cl_2/AcOEt puis par l'acétone et enfin par le MeOH. 12 fractions sont obtenues C1'.1 à C1'.12. La fraction apolaire C1'.2 subit une autre chromatographie en phase normale sur colonne de silice éluée par l'hexane 100% pour donner le composé **Chrom3**.

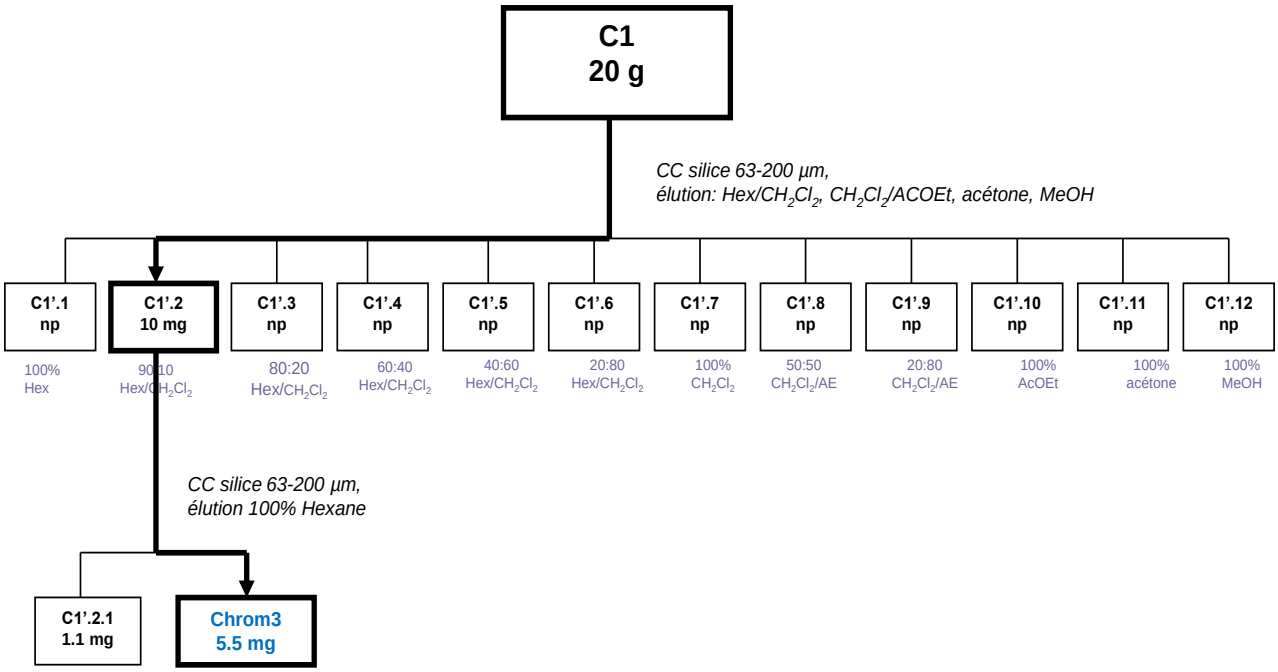


Figure 51 : Schéma de fractionnement de C1 et isolement de Chrom3

1.2.3 Détermination structurale des composés isolés de l'extrait hexanique C1

Note : Les constantes physiques et données spectrales des composés isolés sont présentées en annexes.

1.2.3.1 *Détermination de la structure du composé Chrom1*

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre blanche qui cristallise après évaporation à l'air libre de l'acétone sous forme d'aiguilles. Il réagit positivement au réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse obtenu par ionisation chimique (IC) en mode positif et négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 301 $[M+H]^+$ en mode positif et un ion moléculaire à m/z 300 M^- en mode négatif suggérant une masse atomique de 300 uma.

Spectrométrie RMN

Les protons du cycle A d'un flavonoïde apparaissent sur un spectre RMN-^{1}H entre 6 et 6.5 ppm [161]. Dans cette zone, sur le spectre de RMN-^{1}H du composé **Chrom1** (Figure 52), nous observons deux protons aromatiques couplant entre eux avec la même constante de couplage formant deux doublets à δ_H 6.05 et 6.08 ppm (J = 2.2 Hz), typiques d'un couplage en méta sur un cycle aromatique. Ces signaux sont caractéristiques du cycle A d'un

flavonoïde substitué en C-5 et C-7 et peuvent être attribués aux protons H-6 et H-8 respectivement [162].

Les protons du cycle B d'un flavonoïde sont visibles sur un spectre RMN-^{1}H (Figure 52) entre 6.7 et 7.9 ppm [161]. Sur le spectre de RMN-^{1}H de **Chrom1**, nous observons la présence de deux couples de doublets couplant en position ortho à δ_H 7.51 (*d, J* = 8.7 Hz) et 7.51 ppm (*d, J* = 8.7 Hz) pour H-2' et H-6' et δ_H 7.02 (*d, J* = 8.7 Hz) et 7.02 ppm (*d, J* = 8.7 Hz) pour H-3' et H-5'. Ce système 2H AA', 2H XX' sur le cycle B indique qu'il est substitué en position 4'.

Nous observons aussi (Figure 52) :

- un groupement CH à δ_H 5.55 ppm correspondant au H-2 du cycle C d'une flavanone [161] ;

- un méthylène avec deux protons non équivalents à δ_H 3.23 ppm et 2.8 ppm correspondant aux protons H-3 d'une flavanone [161]. Ils sont couplés entre eux avec un grand couplage ^2J=17.7Hz ;

- un singulet d'intensité 1H à δ_H 12.13 ppm caractéristique d'un proton d'un groupement phénol qui réalise une liaison hydrogène avec une fonction carbonyle. La position 5 du cycle A est donc substituée par un groupe hydroxyle [163] ;

- deux groupements méthoxyle sous forme de deux singulets à δ_H 3.85 et 3.87 ppm sont les substituants en position 4' du cycle B [164] et en position 7 du cycle A respectivement.

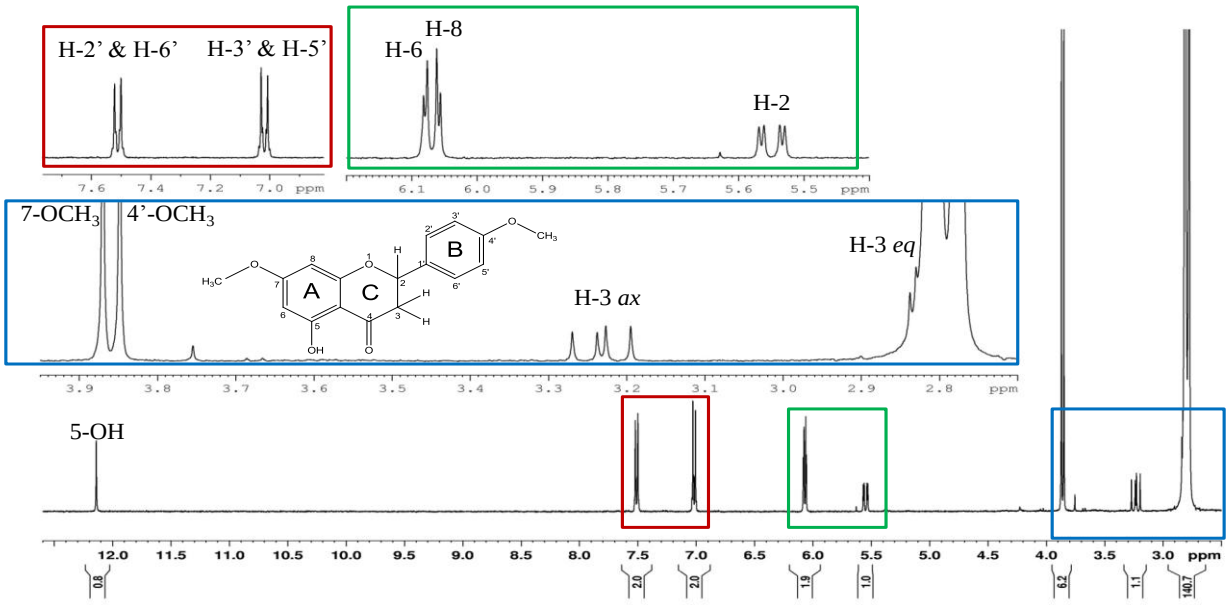


Figure 52 : Spectre de RMN-^{1}H du composé Chrom1 dans l'acétone-d6

Le spectre COSY montre bien la corrélation entre le proton du groupement CH du cycle C à δ_H 5.55 ppm et les deux protons du groupement méthylène.

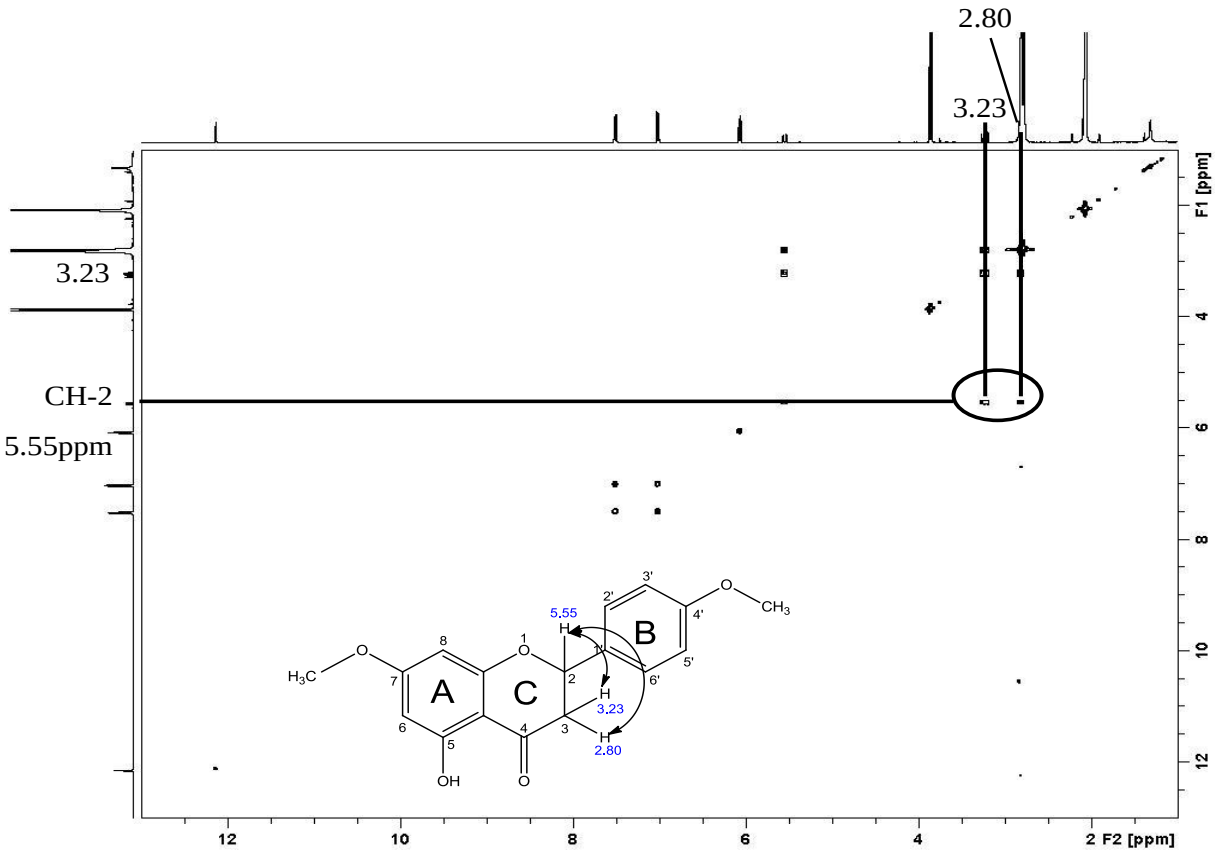


Figure 53 : Spectre COSY du composé Chrom1

Le spectre HSQC montre aussi que le carbone à δ_C 42.7 ppm est corrélé aux deux protons à δ_H 3.23 et 2.80 ppm.

L'ensemble des données précédentes nous permet ainsi d'établir la structure du composé **Chrom1** comme étant de la 5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone (Figure 54). Cette structure a été confirmée grâce au spectre de masse obtenu en impact électronique (IE).

Ce composé a été identifié pour la première fois en 1984, de toute la partie aérienne d'*Eupatorium odoratum*, par Iwu et Chiori [33]. Il a été ensuite isolé des feuilles de *Chromolaena odorata* par Wollenweber en 1995 [32] et par Pisutthanan en 2006 [164].

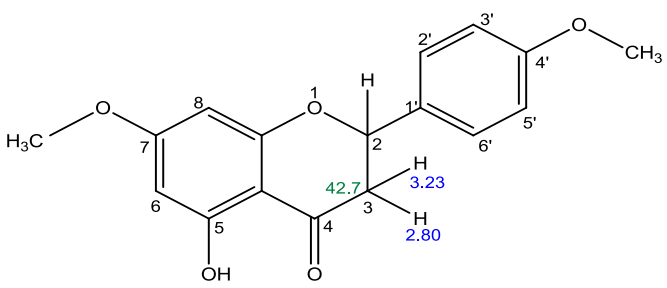


Figure 54 : Structure de 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone (Naringenin-7,4'-dimethylether) et corrélation HSQC du composé Chrom1 ; δ_H en bleu et δ_C en vert

1.2.3.2 *Détermination de la structure du composé Chrom2*

Ce composé a été obtenu sous la forme de cristaux jaune-orangé (aiguilles cristallisation après évaporation de l'acétone). En CCM, il prend une couleur jaune avant et après révélation au réactif de Neu en lumière visible, et une fluorescence jaune sous UV à 365 nm suggérant une structure de type flavonoïde, probablement une chalcone.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse IC réalisé en mode positif et négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 345 $[M+H]^+$ en mode positif et un ion moléculaire à m/z 344 M^- en mode négatif, suggérant une masse atomique de 344 uma.

Spectrométrie RMN

Le spectre de RMN-^{1}H du composé **Chrom2** présente (Figure 55) :

- un signal singulet à δ_H 6.35 ppm caractéristique d'un proton du cycle A d'un flavonoïde trisubstitué ;

- un signal singulet à δ_H 13.73 ppm d'intensité 1H attribué à OH-2' caractéristique d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre un groupement phénol et une fonction carbonyle [163] (Figure 55) ;

- un doublet à δ_H 7.89 ppm (J = 15.9 Hz) d'intensité 1H attribué à H-β d'une chalcone [161] ;

- un doublet à δ_H 7.83 ppm (J = 15.9 Hz) d'intensité 1H attribué à H-α d'une chalcone [161] ;

- deux couples de doublets couplant en position ortho à δ_H 7.73 (*d*, J = 8.8 Hz) et 7.73 ppm (*d*, J = 8.8 Hz) pour H-2 et H-6 et δ_H 7.05 (*d*, J = 8.8 Hz) et 7.05 ppm (*d*, J = 8.8 Hz) pour H-3 et H-5. Ce système 2H AA', 2H XX' sur le cycle B indique qu'il est substitué en position 4 ;

- quatre groupements méthoxyle sous forme de quatre singulets, le méthoxyle à δ_H 3.79, 3.90, 3.95 et 4.00 ppm.

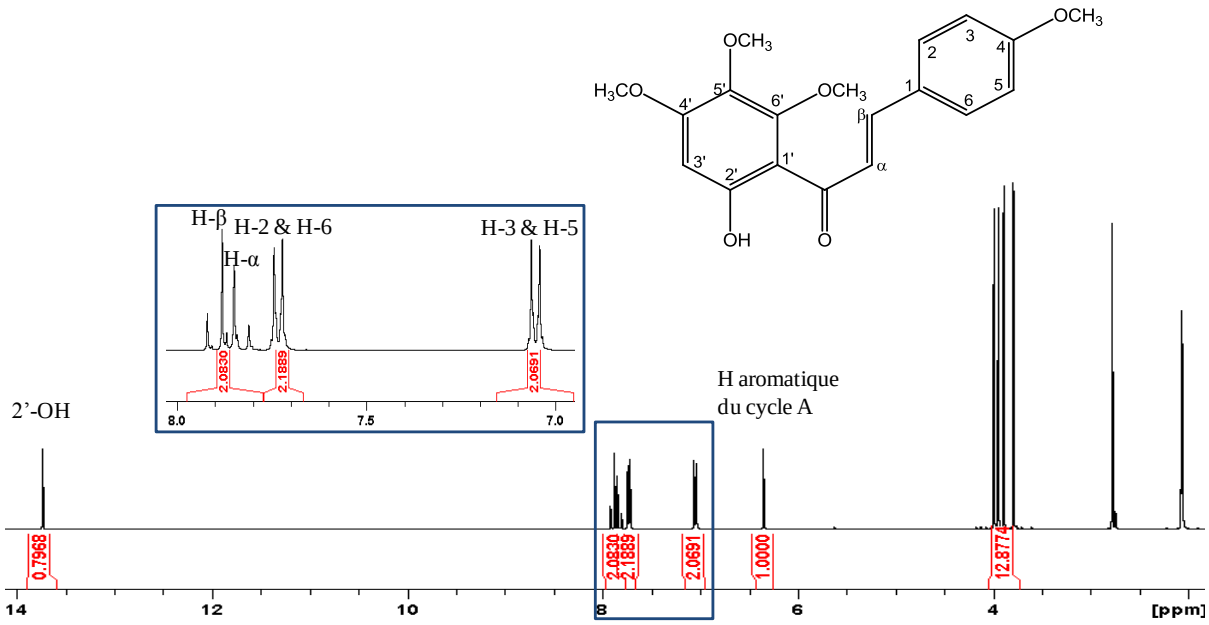


Figure 55 : Spectre RMN-^{1}H du composé Chrom2 dans acétone-d6

A ce stade, nous pouvons dire que nous sommes en présence d'une chalcone renfermant 20 protons et 6 atomes d'oxygène. De plus, le spectre RMN-^{13}C présente 19 atomes de carbone. Ce qui est en accord avec la formule brute de $C_{19}H_{20}O_6$ avec un degré d'insaturation de 10.

Nous sommes donc en présence d'une chalcone dont le cycle B est substitué en position 4 par un méthoxyle (Figure 56). Le cycle A est substitué par un hydroxyle et trois méthoxyles. L'étude du spectre de RMN-2D HSQC et HMBC va nous permettre de positionner les différents substituants sur le cycle A.

Le spectre HSQC montre que le proton à δ_H 6.35 ppm est porté par le carbone à δ_C 96.5 ppm. Les corrélations observées en HMBC montrent que le carbone à δ_C 96.5 ppm portant le proton à δ_H 6.35 ppm du cycle A, corrèle en ^{3}J avec le proton à δ_H 13.73 ppm (OH-2') qui à son tour corrèle avec les carbones à δ_C 162.6 ppm (C-2') et 108.3 ppm (C-1'). Le proton à δ_H 6.35 ppm et le carbone à δ_C 96.5 ppm sont donc en position 3' du cycle A (Figure 56).

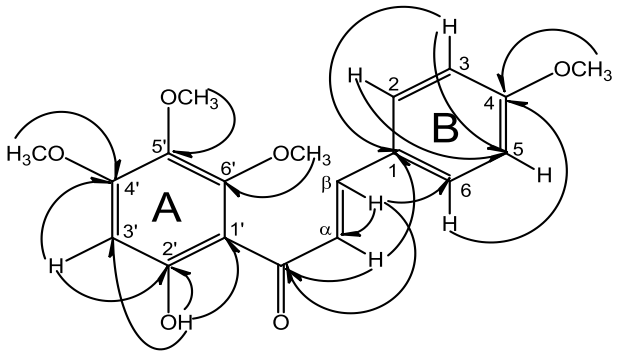


Figure 56 : Structure 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcon et corrélations HMBC du composé Chrom2

Analyse aux rayons X

L'analyse du composé **Chrom2** aux rayons X a confirmé la structure du composé **Chrom2**.

Figure 57 : Structure par analyse aux rayons X du composé Chrom2

Le spectre de masse en IE a aussi permis de confirmer la structure du composé **Chrom2** comme étant la 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcone. Ce composé a déjà été identifié des feuilles de *C. odorata* [34, 37, 165].

1.2.3.3 *Détermination de la structure du composé Chrom3*

Ce composé a été obtenu sous forme d'huile. En CCM, il prend une couleur bleue violette après révélation à la vanilline sulfurique et une fluorescence rouge brune à 365 nm par révélation avec le réactif de Liebermann et Burchard laissant envisager une structure de type terpénique.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse IC en mode positif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 199 $[M+H]^+$ suggérant une masse atomique de 198 uma.

Spectrométrie RMN

Le spectre RMN ^{1}H (Figure 58) montre 5 protons aromatiques (A, B, C, D, E). Le proton H_A (large signal) à δ_H 7.98 ppm est couplé en ^4J = 2.2 Hz avec H_C (*méta*). Le proton H_B (*d*) à δ_H 7.94 ppm est couplé en ^3J = 8.7 Hz (*ortho*) avec H_C. H_C (*dd*) à δ_H 7.37 ppm est donc couplé à H_A et à H_B respectivement en ^4J et ^3J. Les protons H_D (*d*) à δ_H 7.29 ppm et H_E (*d*) à δ_H 7.22 ppm sont couplés entre eux en ^3J. Le proton aliphatique H_F (septuplet) à δ_H 3.75 ppm est couplé aux 6 protons aliphatiques H_I (*d*) à δ_H 1.36 ppm en J = 7.3 Hz signalant un groupement isopropyle. Les $3H_G$ (*s*) à δ_H 2.61 ppm et $3H_H$ (*s*) à δ_H 2.53 ppm sont deblindés plus que la normale ce qui montre la présence de deux groupements méthyle liés à des noyaux aromatiques. La masse moléculaire étant 198 uma, la présence de 5H aromatiques, 2

groupements méthyle et un groupement isopropyle indiquent deux cycles aromatiques accolés.

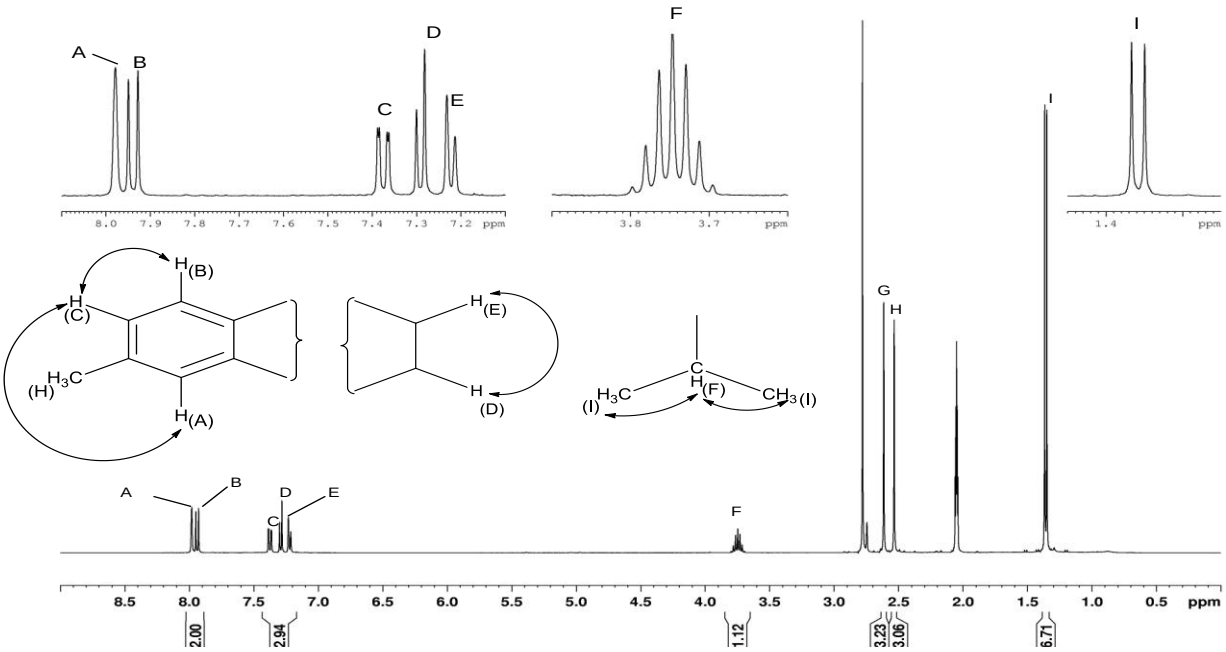


Figure 58 : Spectre RMN-^{1}H du composé Chrom3 dans acétone-d6

Le spectre COSY (Figure 59) montre les corrélations entre H_A et H_C en ^{4}J, entre H_B et H_C en ^{3}J, entre H_D et H_E en ^{3}J. Les $3H_H$ sont corrélés avec H_A, H_B et H_C, ils sont donc sur le même cycle.

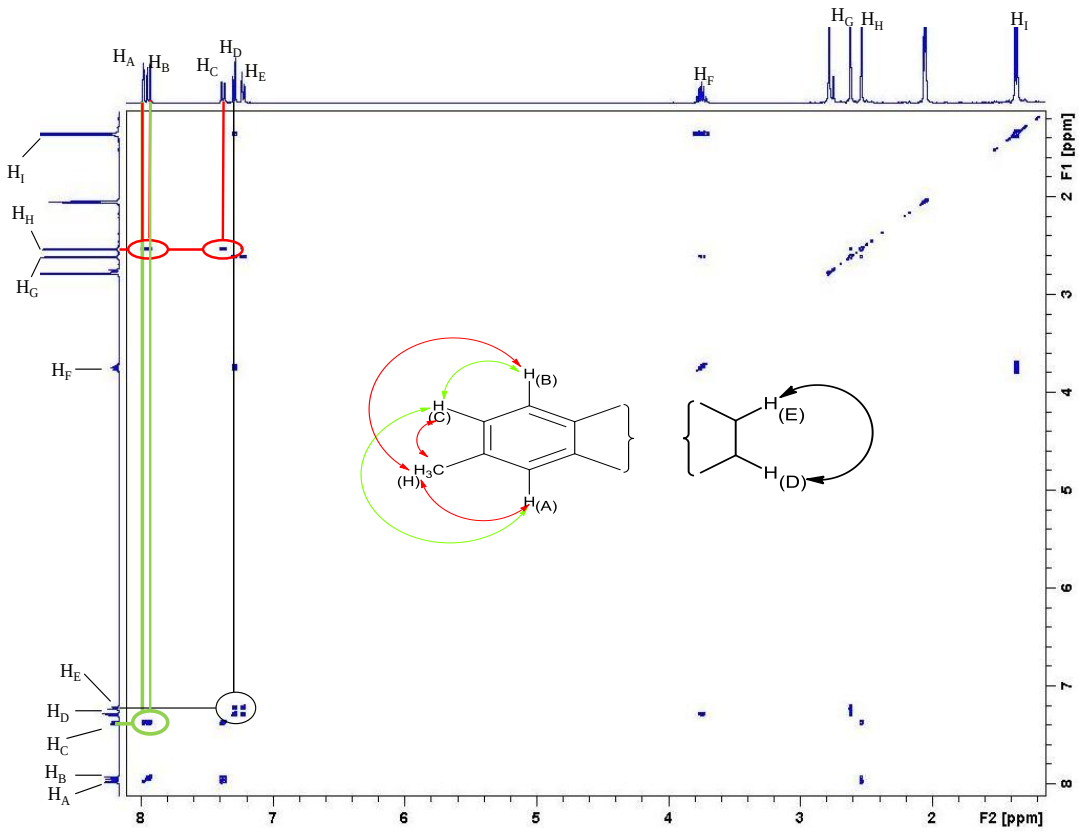
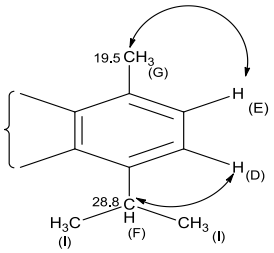


Figure 59 : Spectre RMN-2D COSY du composé Chrom3

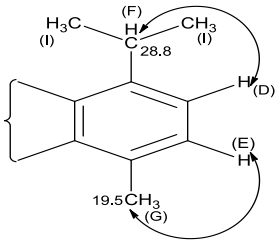
Le spectre RMN ^{13}C présente 15 signaux carbone ce qui confirme bien les deux cycles aromatiques accolés (Figure 61), les deux groupements méthyle, le groupement isopropyle, la masse moléculaire 198 uma et donc la formule moléculaire $C_{15}H_{18}$. De plus le spectre RMN-^{13}C étant découplé protons avec effet NOE, les carbones qui portent des protons sont plus intenses que les carbones quaternaires (5 carbones IV).

Le spectre HSQC a permis d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui portent les protons (H_A, H_B, H_C, H_D, H_E, H_F, H_H et H_I).

La séquence HMBC (Figure 60) montre que le proton H_D est corrélé avec le carbone à δ_C 28.8 ppm qui porte H_F en ^3J. Le proton H_E est corrélé avec le carbone à δ_C 19.5 ppm qui porte les protons H_G en ^3J. Les enchainements possibles sont :



ou



Les protons H_A, H_E, et $6H_I$ sont corrélés en ^3J avec le carbone quaternaire à δ_C 142.9 ppm ce qui confirme le premier enchainement.

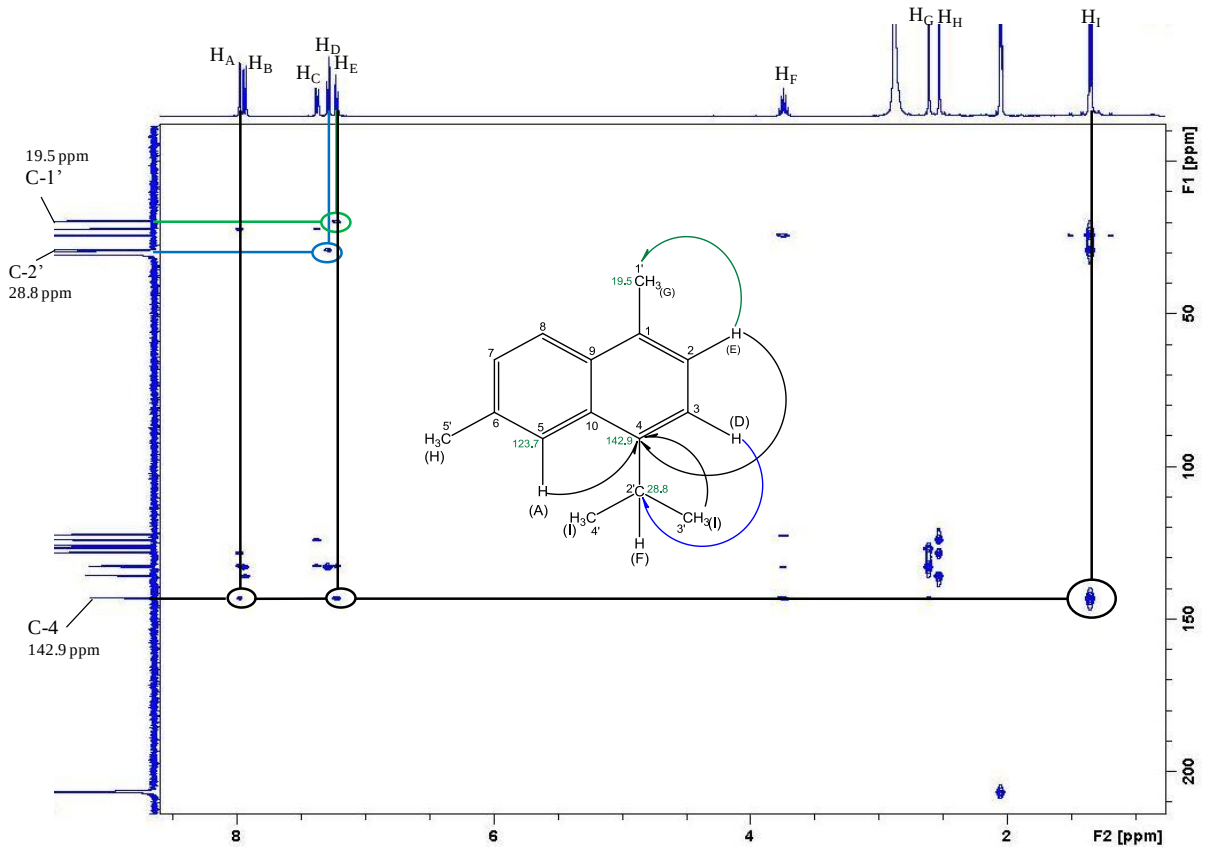


Figure 60 : Spectre RMN-2D HMBC du composé Chrom3

Les corrélations de H_A avec le carbone à δ_C 128 ppm qui porte H_C en ^3J, de H_C avec le carbone à δ_C 123.7 ppm qui porte le proton H_A en ^3J et de H_A et H_C avec le carbone quaternaire à δ_C 132.2 ppm en ^3J, confirment bien la structure 4-isopropyl-1,6-diméthylnaphthalène (cadalène) du composé **Chrom3 (**Figure 61).

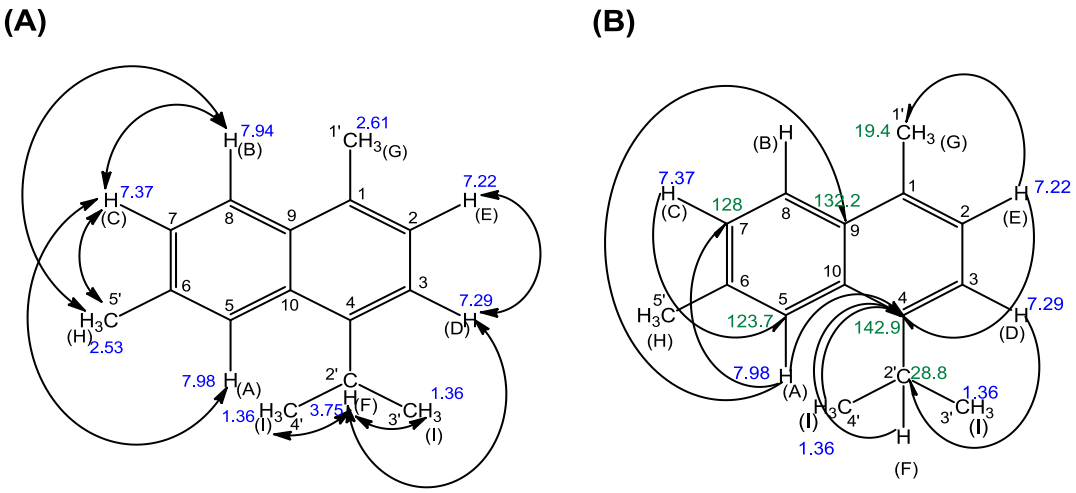


Figure 61 : Corrélation COSY (A) et HMBC (B) du composé Chrom3

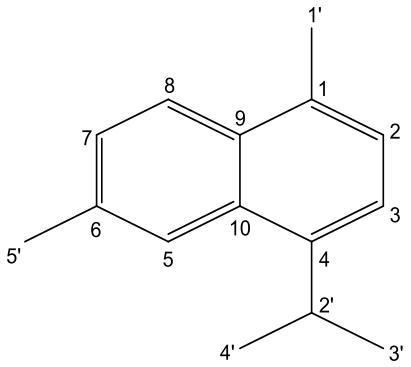


Figure 62 : Structure 4-isopropyl-1,6-diméthylnaphthalène (cadalène) du composé Chrom3

La structure du composé **Chrom3** a été confirmée par le spectre IE. C'est la première fois que ce composé est isolé de cette plante et d'une espèce de la famille des Asteraceae. Cependant, il a déjà été isolé de *Siparuna macrotepala* (Monimiaceae) par El-Seedi *et al.* en 1994 [166], et a été identifié à partir des spectres de masse et RMN-^{13}C. En 1999, Kuo *et al.* [167] ont identifié ce composé dans *Juniperus formosana var. concolor* (Cupressaceae) en comparant le spectre RMN-^{13}C obtenu avec celui El-Seedi *et al.* Les données spectrales RMN-^{1}H et RMN-2D sont présentées ici pour la première fois.

2 Etude phytochimique des feuilles de *Morinda morindoides*

L'espèce *M. morindoides* est intéressante à étudier en raison de ses propriétés anti-fiévreuses observées dans le traitement traditionnel du paludisme, la rougeole et la varicelle.

Dans cette étude nous nous sommes limités pour l'instant à la composition chimique des huiles essentielles. Ces huiles essentielles ont été extraites par entraînement à la vapeur avec un rendement d'environ 0.2%. Les constituants chimiques identifiés par chromatographie en phase gazeuse (CG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG-SM) sont détaillés dans le Tableau 2 dans l'Annexe. La Figure 63 présente la distribution en pourcentage de ces différents constituants.

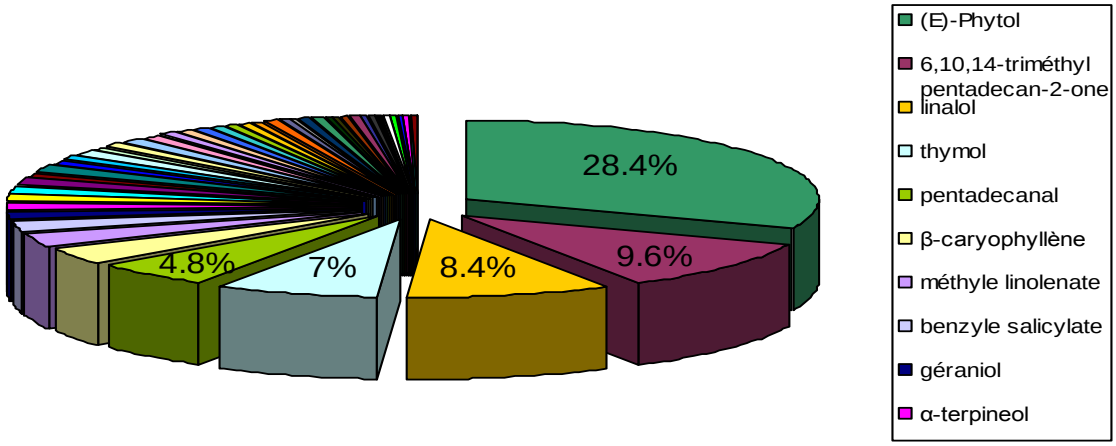


Figure 63 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle de *Morinda morindoides*

Cinquante composés ont été identifiés représentant 91.8% de matières volatiles. Ces composés volatiles sont constitués de 10 monoterpènes (14.7%), 36 sesquiterpènes (35.4%), 7 composés aromatiques (12.1%) et 3 diterpènes (29.6%).

La composition des huiles essentielles est dominée par la présence du diterpène *E*-phytol (28.4%) suivie par 6, 10, 14-triméthyl pentadecan-2-one (9.6%), le linalol (8.4%) et le thymol (7.0%). Nous constatons aisément que le constituant majeur de l'huile, l'*E*-phytol, pourrait transmettre ses différentes propriétés biologiques aux huiles des feuilles de cette plante utilisée en médecine traditionnelle. En effet l'*E*-phytol, un excellent antibactérien et antiviral [168-171] pourrait justifier l'emploi de la décoction des feuilles dans plusieurs traitements traditionnels comme la diarrhée, la rougeole, la varicelle etc. Cette plante pourrait donc être une source potentielle d'*E*-phytol.

L'étude phytochimique basée sur les composés volatils de *M. morindoides* est originale car une information sur la composition chimique et une indication thérapeutique des huiles essentielles extraites des feuilles sont fournies ici pour la première fois.

3 Etude phytochimique des feuilles, fruits et écorces de *Morinda lucida*

L'espèce *Morinda lucida* a suscité notre attention pour son usage traditionnel dans le traitement du paludisme en Côte d'Ivoire.

3.1 Métabolites secondaire volatils des feuilles et fruits : huiles essentielles

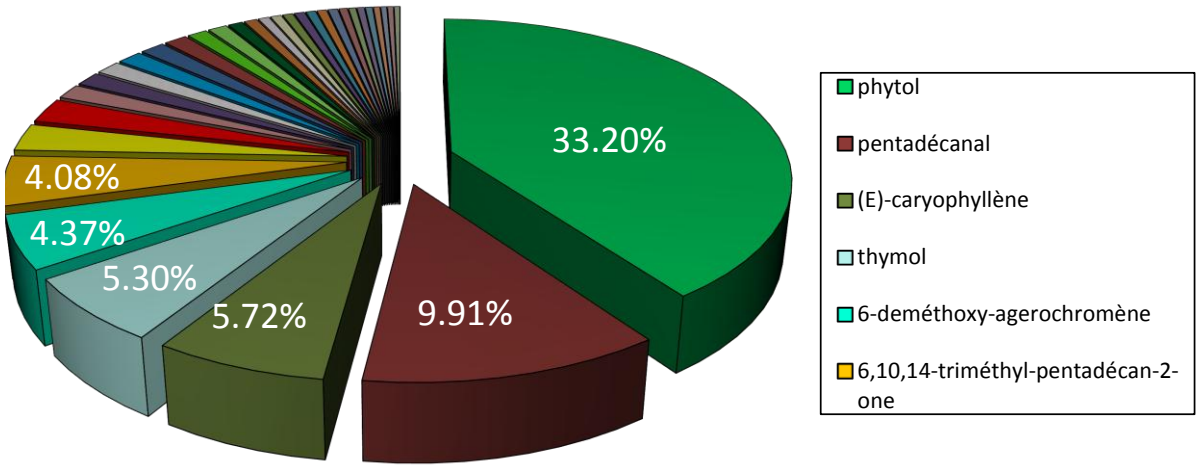


Figure 64 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle des feuilles de *Morinda lucida*

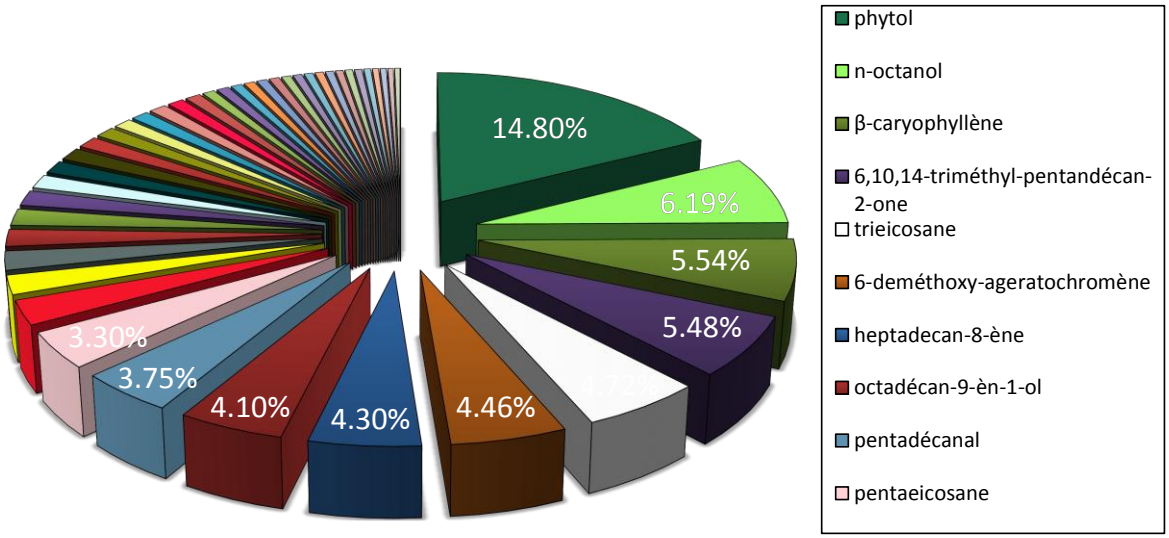


Figure 65 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle des fruits de *Morinda lucida*

Les constituants chimiques des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *M. lucida* qui ont été identifiés par GC et GC-MS sont détaillés dans le Tableau 3 dans l'Annexe. Les Figure 64 et Figure 65 présentent les distributions en pourcentage des différents constituants.

Quarante-sept composés ont été identifiés dans l'huile des feuilles et les principaux composés sont l'E-phytol ou phytol (33.2%) et le pentadécanal (9.9%). Cette composition chimique est très différente de celle des huiles essentielles extraites des feuilles du Nigeria [79]. En effet, l'α-terpinène (17.8%) et le β-bisabolène (16.3%), les composés majoritaires des huiles obtenues au Nigeria sont absents dans les huiles extraites des feuilles de la Côte d'Ivoire.

Il faut noter que la quantité en phytol dans les huiles des feuilles de cette plante est plus élevée que celles des feuilles de *M. morindoides*. Les huiles des feuilles de *M. lucida* pourraient donc présenter des activités antivirale et antibactérienne très importantes.

En raison du fait qu'une infection virale ou bactérienne s'accompagne de fièvre et que la médecine traditionnelle ne traite que les symptômes, l'emploi de la décoction des feuilles dans le traitement des maux accompagnés de fièvre comme le paludisme, serait justifié par la forte présence du phytol, un puissant antiviral et antibactérien [168-171].

Des huiles des fruits, 37 composés ont été identifiés, les principaux constituants sont le phytol (14.8%) et le *n*-octanol (6.2%). L'étude de la composition chimique des fruits de cette plante est obtenue ici pour la première fois.

En Côte d'Ivoire, le phytol est le composé majoritaire des huiles extraites des feuilles et des fruits, avec une quantité plus importante dans les feuilles. Il serait donc préférable d'opter pour les huiles des feuilles quand on recherche les propriétés biologiques du phytol [168-171].

Cette étude phytochimique sur les composés volatils de *M. lucida* apporte une information sur la composition chimique des huiles essentielles des feuilles de la Côte d'Ivoire et des huiles essentielles des fruits de cette plante. De plus nous donnons ici une indication thérapeutique des huiles extraites des feuilles de *M. lucida* récoltées en Côte d'Ivoire.

3.2 Métabolites secondaire non volatils des écorces

3.2.1 Interprétation des CCM préliminaires de l'extrait d'acétate d'éthyle M3

Des CCM préliminaires ont été menées sur l'extrait d'acétate d'éthyle M3 (Figure 66). Les informations recueillies ont été confrontées aux données bibliographiques collectées sur cette espèce.

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence majoritaire d'anthraquinones (réactif à la potasse alcoolique, taches roses). On note cependant, la présence minoritaire de flavonoïdes (réactif de Neu, fluorescence jaune-orange et verte sous lumière UV à 365 nm).

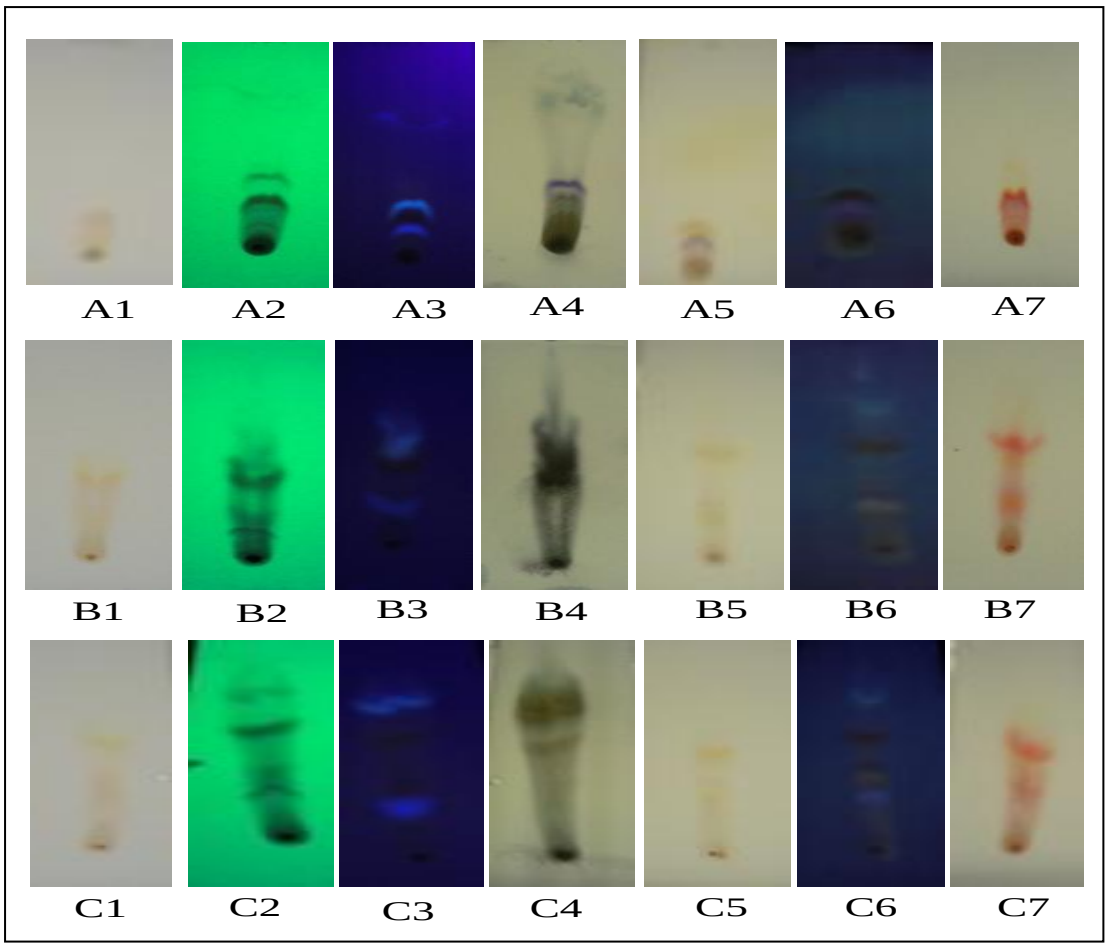


Figure 66 : CCM préliminaires de M3. A élution au CH_2Cl_2. B élution Tol/AcOeEt/MeOH (80 :18 :2). C élution au Hex/AcOEt (50 :50). 1-UV visible. 2-UV 254 nm. 3-UV 365 nm. 4-Réactif à la vanilline sulfurique. 5-Réactif de Neu observation UV visible. 6-Réactif de Neu, observation UV 365 nm. 7-Réactif à la potasse alcoolique.

3.2.2 Purification de l'extrait d'acétate d'éthyle M3

3.2.2.1 *Isolement du composé Mor1*

Le schéma de fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle M3 est présenté sur la Figure 67.

L'extrait M3 (130.5 mg) subit une première chromatographie sur colonne de silice normale éluée, d'abord à l'aide de CH_2Cl_2 (100%) pour donner deux fractions (M3.1 et M3.2) puis à l'aide d'un mélange hexane/AcOEt (30 :70) pour donner 20 fractions (M3.3 à M3.22). La fraction M3.2 pure est le composé **Mor1**.

3.2.2.2 *Isolement des composés Mor2 et Mor3*

La fraction M3.3 est traitée par une autre chromatographie sur colonne de silice normale en utilisant CH_2Cl_2 comme éluant pour conduire aux composés **Mor2** et **Mor3**. Les autres

fractions (M3.4 à M3.22) ont subi le même traitement pour donner 13 composés purs dont leurs identifications structurales sont en cours.

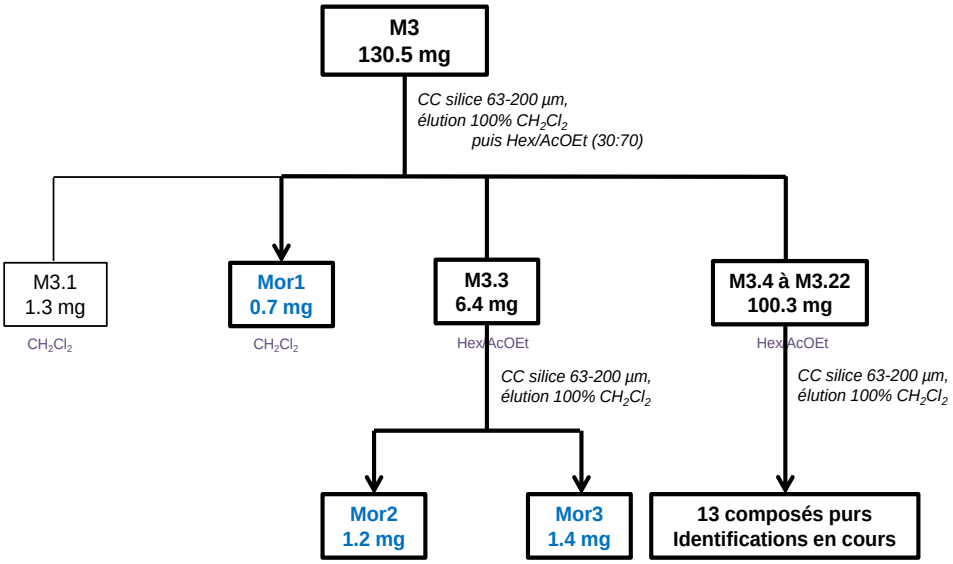


Figure 67 : Schéma de fractionnement de M3 et isolement de Mor1, Mor2 et Mor3

3.2.3 Détermination structurale des composés isolés de M3

3.2.3.1 *Détermination de structure du composé Mor1*

Ce composé se présente sous la forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. En CCM, il donne une fluorescence orangée sous UV à 365 nm et une coloration rose-mauve avec la potasse alcoolique laissant envisager une structure de type anthraquinonique.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse IC obtenu en mode positif et négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 283 $[M+H]^+$ en mode positif et un ion moléculaire à m/z 282 M^- en mode négatif suggérant une masse atomique de 282 uma. Cette masse est confirmée par la mesure de masse exacte réalisée en MALDI qui indique un ion quasi-moléculaire à m/z 305.0410 $[M+Na]^+$.

Spectrométrie RMN

Le spectre de RMN-^{1}H du composé **Mor1** présente (Figure 69) :

- un signal singulet à δ_H 13.37 ppm d'intensité 1H attribuable au OH d'un groupement phénol ;

- deux massifs à δ_H 8.29 ppm et à δ_H 8.37 ppm chacun d'intensité 1H attribuables aux protons H-5 et H-8 respectivement d'une anthraquinone non substituée sur le cycle A ;

- un massif à δ_H 8.00 ppm d'intensité 2H attribuable aux protons H-6 et H-7 du cycle A ;

-un doublet à δ_H 8.24 ppm (J = 8.2 Hz) d'intensité 1H attribuable à H-3 du cycle C ;

- un doublet à δ_H 7.85 ppm (J = 8.2 Hz) d'intensité 1H attribuable à H-4 couplant ainsi en *ortho* avec H-3 ;

- un groupement méthoxyle sous forme de singulet à δ_H 3.93 ppm.

Les signaux à δ_H 4.4 et 4.05 ppm et tous les signaux à δ_H inférieurs à 3.5 ppm sont dus aux impuretés du solvant deutéré acétone-d6 [172].

Le spectre COSY montre bien les corrélations ^3J entre H-3/H-4, H-5/H-6 et H-7/H-8.

Le composé **Mor1** est donc une anthraquinone bisubstituée en 1 et 2. Les motifs suivants peuvent être déduits du spectre RMN-^{1}H et du spectre COSY :

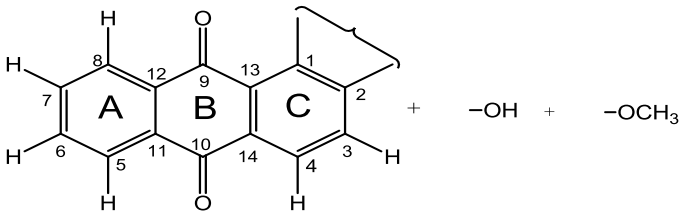


Figure 68 : Différents motifs de la structure du composé Mor1

Ces motifs donnent une masse de 254 uma qui comparée à celle du composé **Mor1** (282 uma), laisse envisager un groupement carbonyle. Les substituants sont donc le groupement hydroxyle OH et le groupement carboxyle $COOCH_3$. Ce qui correspond à la formule brute $C_{16}H_{10}O_5$.

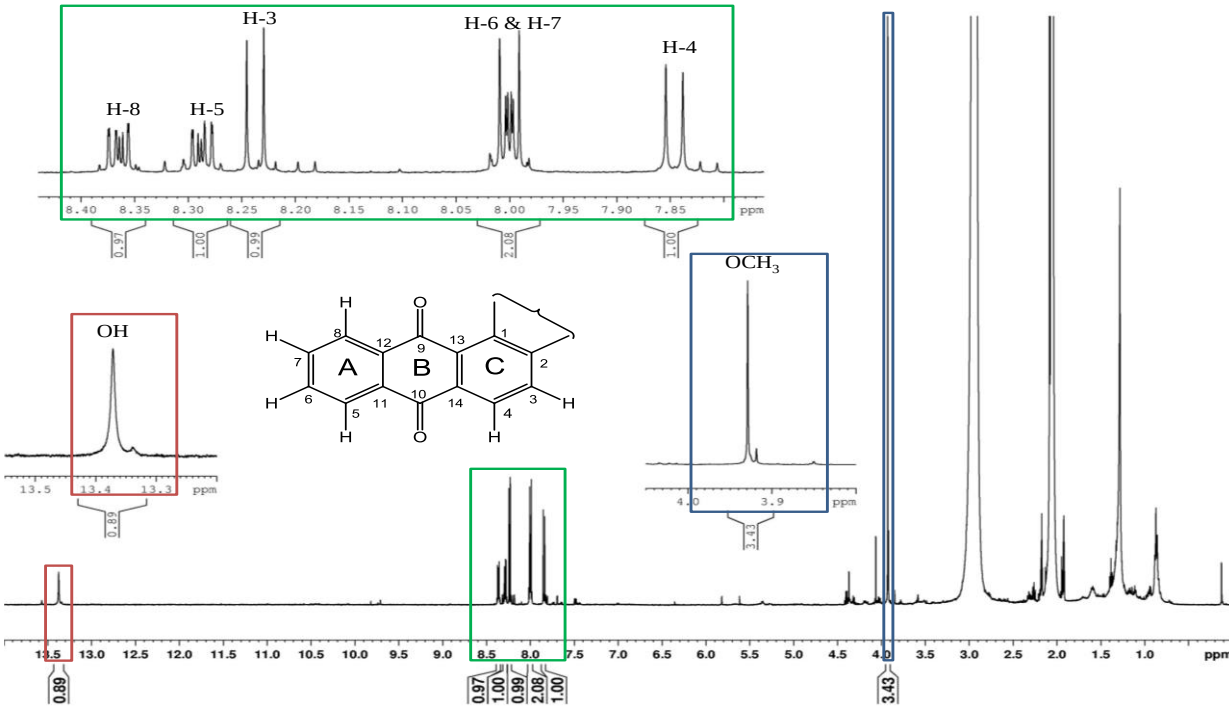


Figure 69 : Spectre RMN-^{1}H du composé Mor1 dans l'acétone-d6

Le spectre RMN-^{13}C présente 16 signaux carbone dont 8 carbones quaternaires, 6 CH aromatiques et 1 CH_3 confirmant ainsi la formule brute envisagée.

L'étude du spectre de RMN-2D HMQC et HMBC va nous permettre de positionner les deux substituants du cycle C.

Le spectre HMBC montre une corrélation entre le proton du groupement hydroxyle avec les carbones à δ_C 118.1 ppm (C-13) et δ_C 126.3 ppm (C-2) en ^3J. Les carbones C-2 et C-13 corrèlent à leur tour avec le proton à δ_H 7.85 ppm (H-4) en ^3J. De plus le carbone du CO du groupement carboxyle à δ_C 165.8 ppm (C-15) corrélé avec le proton à δ_H 8.24 ppm (H-3) et avec les trois protons du groupement méthoxyle à δ_H 3.93 ppm. Aucune tache de corrélation n'est observée entre ce carbone et le proton H-4.

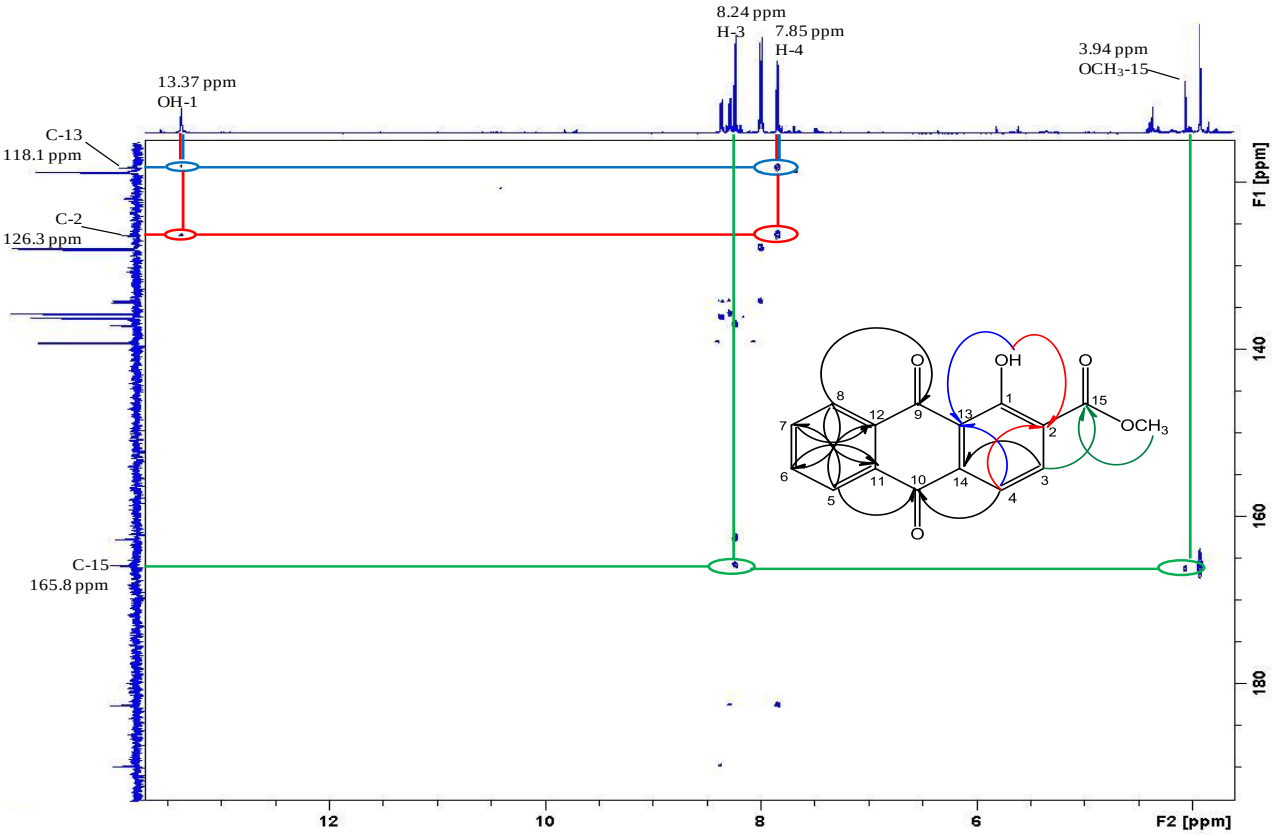


Figure 70 : Spectre HMBC dans l'acétone-d6 et corrélations HMBC du composé Mor1

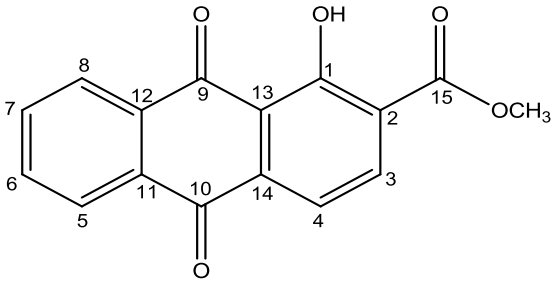


Figure 71 : Structure 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone du composé Mor1

Ces résultats suggèrent une structure 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone du composé **Mor1** (Figure 71). 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone est une nouvelle anthraquinone de *M. lucida* et du genre *Morinda*. Cependant, il a été isolé par Wu *et al.* en 2003 à partir de l'extrait de méthanol des écorces de *Rubia wallichiana* [173], une espèce appartenant à un autre genre de la famille des Rubiaceae. Ils ont identifié ce composé à partir des spectres SM, UV, IR, RMN-^{1}H et NOESY. Nous présentons ici pour la première fois les données RMN-^{13}C, HMBC et HSQC. De plus, le spectre RMN-^{1}H obtenu dans l'acétone-d6 a permis de différencier les protons H-5 et H-8. De même les spectres HSQC et HMBC ont permis de différencier les carbones C-6 et C-7. Ces informations n'ont pas pu être accessibles dans les travaux Wu *et al.*

3.2.3.2 *Détermination de la structure du composé Mor2*

Le composé **Mor2** a été obtenu sous la forme de cristaux jaune (aiguilles cristallisation après évaporation de l'acétone). En CCM, il donne une fluorescence orangée sous UV à 365 nm et une coloration rose-mauve avec la potasse alcoolique laissant envisager une structure de type anthraquinonique.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse IC, nous observons en mode positif un ion quasi-moléculaire à m/z 255 $[M+H]^+$ et un ion moléculaire à m/z 254 M^+ ; en mode négatif un ion moléculaire à m/z 254 M^- suggérant une masse atomique de 254 uma.

Spectrométrie RMN

Le spectre de RMN-^{1}H du composé **Mor2** (Figure 72) présente des similitudes avec celui du composé **Mor1** :

- un large singulet à δ_H 9.26 ppm d'intensité 1H attribuable au OH d'un groupement phénol ;

- un massif à δ_H 8.24 ppm d'intensité 2H attribuable aux protons H-5 et H-8 du cycle A ;

-un doublet à δ_H 8.04 ppm (J = 8.4 Hz) d'intensité 1H attribuable à H-4 du cycle C ;

- un massif à δ_H 7.89 ppm d'intensité 2H attribuable aux protons H-6 et H-7 ;

- un doublet à δ_H 7.37 ppm (J = 8.4 Hz) d'intensité 1H attribuable à H-3 couplant ainsi en ortho avec H-3 ;

- un groupement méthoxyle sous forme de singulet à δ_H 3.95 ppm.

Le spectre COSY confirme les corrélations ^{3}J entre H-3/H-4, H-5/H-6 et H-7/H-8.

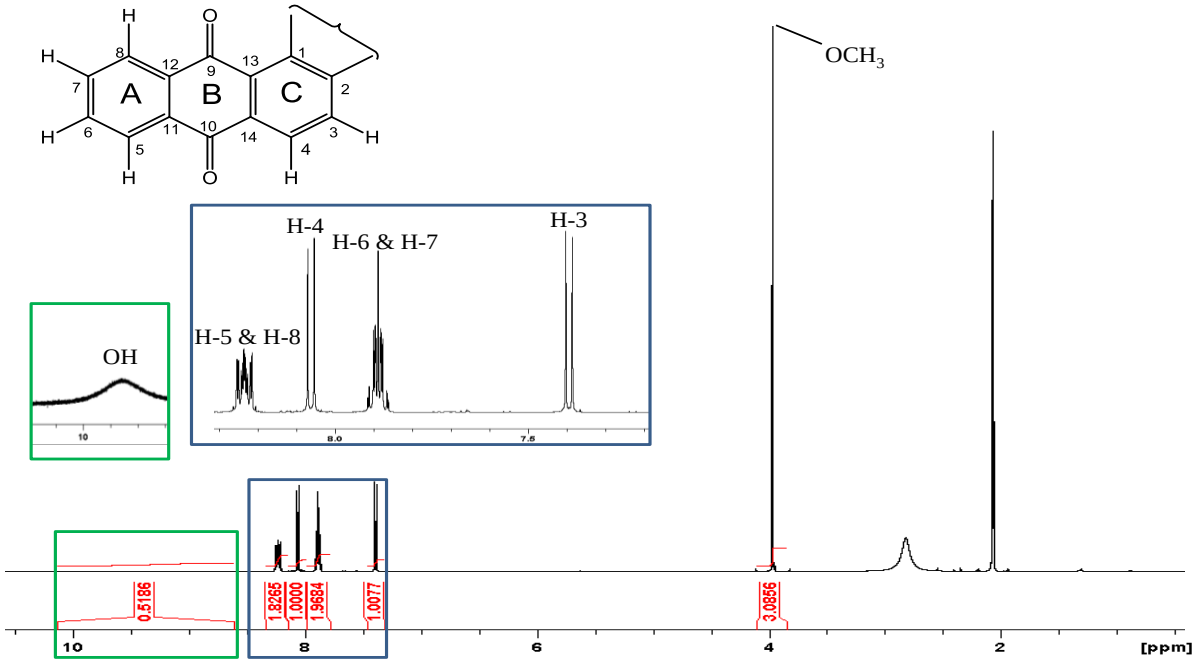


Figure 72 : Spectre RMN-^{1}H du composé Mor2 dans l'acétone-d6

Le composé **Mor2** est donc une anthraquinone bisubstituée avec un groupement hydroxyle et méthoxyle comme substituants, ce qui correspond à une formule brute $C_{15}H_{10}O_4$. Cette formule est confirmée par le spectre RMN-^{13}C qui présente 15 atomes de carbone dont 8 carbones quaternaires, 6 CH aromatiques et 1 CH_3.

L'étude des spectres de RMN 2D HMQC et HMBC ont permis de positionner le groupement hydroxyle en position 1 et le groupement méthoxyle en 2 sur le cycle C. La structure du composé Mor2 est donc 2-hydroxy-1-méthoxyanthraquinone connu sous le nom de alizarin-1-méthyléther. Ce composé à déjà été isolé des écorces de *M. lucida* [81].

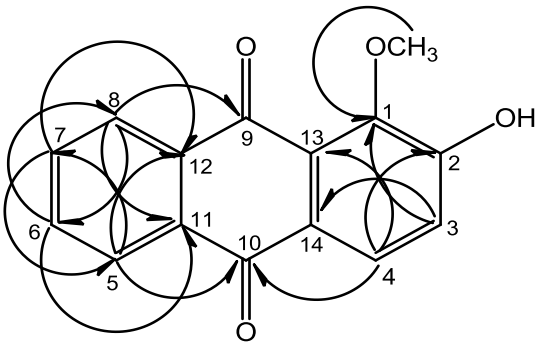


Figure 73 : Corrélations HMBC du composé Mor2

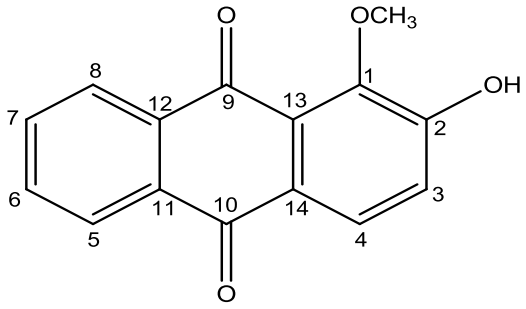


Figure 74 : Structure 2-hydroxy-1-méthoxyanthraquinone (alizarin-1-méthyléther) du composé Mor2

3.2.3.3 *Détermination de structure du composé Mor3*

Le composé **Mor3** a été obtenu aussi sous forme d'aiguilles jaunes après évaporation de l'acétone. En CCM, il donne une fluorescence orangée sous UV à 365 nm et une coloration rose-mauve avec la potasse alcoolique laissant envisager une structure de type anthraquinonique.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse IC obtenu en mode positif et négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 329 $[M+H]^+$ en mode positif et un ion moléculaire à m/z 328 M^- en mode négatif suggérant une masse atomique de 328 uma. La comparaison du spectre IE du composé Mor3 avec ceux de la base de données spectrale indique les formules brutes $C_{19}H_{20}O_5$ et $C_{18}H_{16}O_6$.

Spectrométrie RMN

Sur le spectre RMN-^{1}H du composé **Mor3** nous observons (Figure 75) :

- un large singulet à δ_H 9.23 ppm d'intensité 1H attribuable au OH d'un groupement phénol ;

- quatre doublets à δ_H 8.03 ppm (*J*= 8.0 Hz), 7.98 ppm (*J*= 8.5 Hz), 7.87 ppm (*J*= 8.0 Hz) et 7.36 ppm (*J*= 8.5 Hz) d'intensité chacun 1H et couplant en *ortho*, sont les protons aromatiques caractéristiques d'une anthraquinone tétrasubstituée (deux substituants sur chaque cycle A et C) ;

-un singulet à δ_H 4.63 ppm d'intensité 2H attribuable à CH_2O ;

- trois groupements méthoxyle sous forme de singulet à δ_H 3.93, 3.91 et 3.46 ppm.

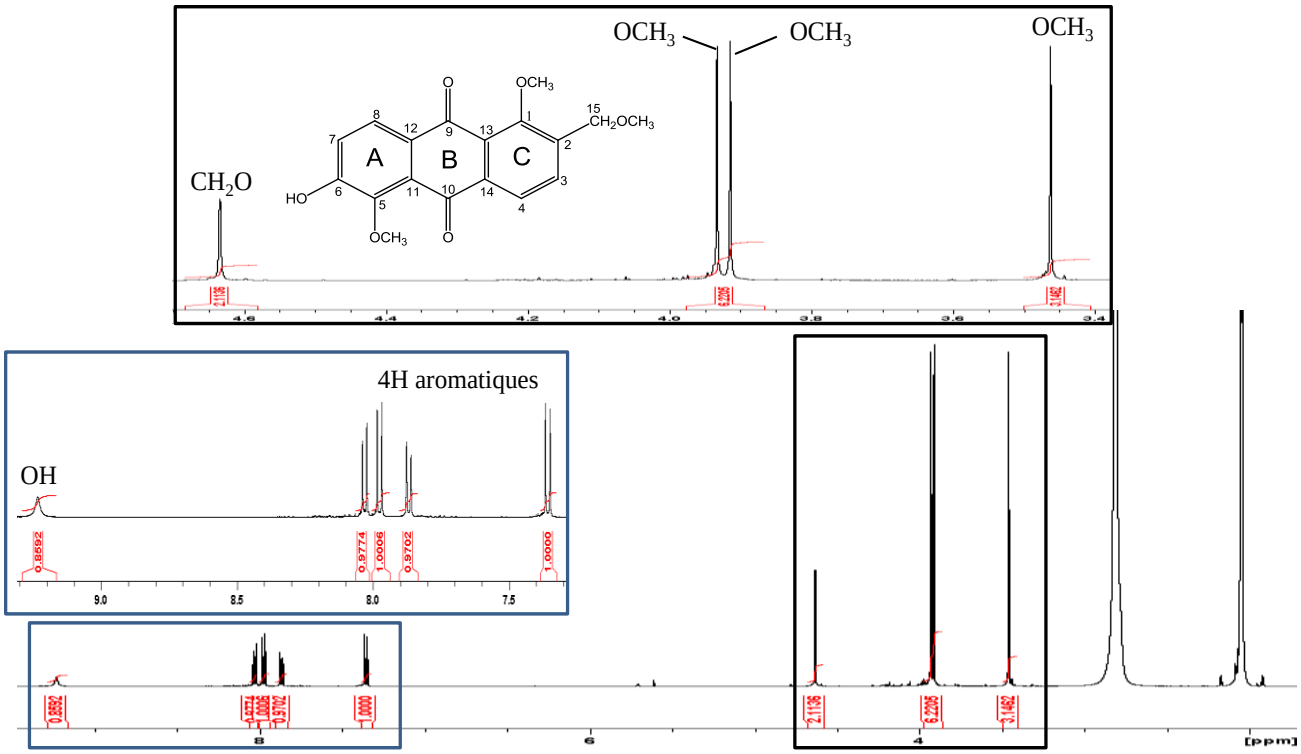


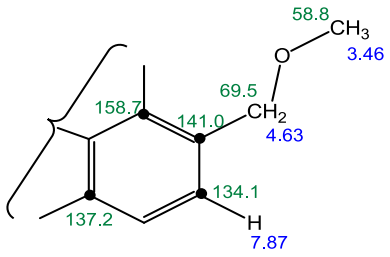
Figure 75 : Spectre RMN-^{1}H du composé Mor3 dans l'acétone-d6

Le spectre RMN-^{13}C avec édition DEPT90 et DEPT135 du composé montre 18 atomes de carbone dont 10 carbones quaternaires (dont 2CO et 8 carbones quaternaires aromatiques), 4CH aromatiques, 1CH_2 et 3CH_3 suggérant la formule $C_{18}H_{16}O_6$.

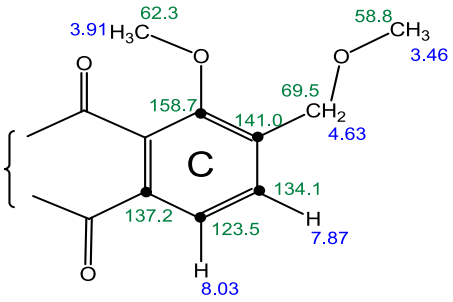
A ce stade nous pouvons dire que le composé **Mor3** est une anthraquinone bisubstituée sur chaque cycle A et C avec les quatre protons aromatiques couplés en *ortho* deux à deux. Les spectres HSQC et HMBC vont permettre d'attribuer la structure de la molécule.

Les 3H de OCH_3 à δ_H 3.46 ppm corrèlent en ^{3}J avec le carbone à δ_C 69.5 ppm qui porte les 2H à δ_H 4.63 ppm de CH_2O. Ces deux protons corrèlent à leur tour avec le carbone à δ_C 134.1 ppm portant le proton à δ_H 7.87 ppm et avec le carbone quaternaire à δ_C 158.7 ppm en ^{3}J. Ils corrèlent aussi avec le carbone quaternaire à δ_C 141.0 ppm en ^{2}J.

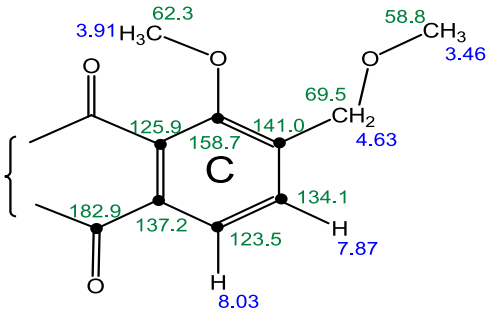
Le proton à δ_H 7.87 ppm corrèle avec le carbone à δ_C 69.5 ppm du CH_2O en ^{3}J, avec les carbones quaternaires à δ_C 137.2 et 158.7 ppm en ^{3}J. Ce qui donne le motif suivant :



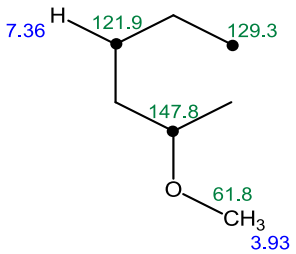
Le carbone quaternaire à δ_C 141.0 ppm corrèle avec le proton à δ_H 8.03 ppm porté par le carbone à δ_C 123.5 ppm en ^3J. Le carbone à δ_C 158.7 ppm est en corrélation avec les 3H du groupement méthoxyle à δ_H 3.91 ppm portés par le carbone à δ_C 62.3 ppm. Ce qui donne le cycle C et ses substituants :



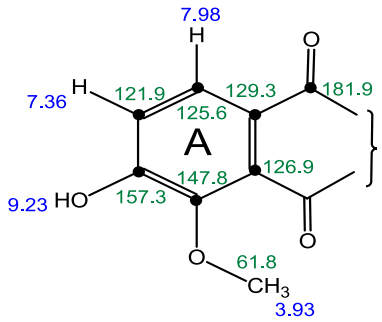
Le proton à δ_H 8.03 ppm corrèle avec les carbones quaternaires à δ_C 125.9 et 141.0 ppm en ^3J et avec le carbone carbonyle à δ_C 182.9 ppm.



Les 3H du groupement méthoxyle à δ_H 3.93 ppm portés par le carbone à δ_C 61.8 ppm corrèlent avec le carbone quaternaire à δ_C 147.8 ppm en ^3J, qui à son tour, corrèle avec le proton à δ_H 7.36 ppm porté par le carbone à δ_C 121.9 ppm en ^3J. Ce proton corrèle en ^3J avec le carbone quaternaire à δ_C 129.3 ppm.



Le proton à δ_H 7.98 ppm porté par le carbone à δ_C 125.6 ppm corrèle en ^3J avec les carbones quaternaires à δ_C 181.9 ppm du groupement carbonyle, à δ_C 126.9 et 157.3 ppm. Le carbone à δ_C 157.3 ppm est certainement celui qui porte le groupement hydroxyle. D'où l'obtention du cycle A et ses substituants :



Les principales corrélations observées en HMBC sont décrites à la Figure 76.

De tout ce qui précède, nous pouvons attribuer le composé **Mor3** à la structure 1,5,15-triméthylmorindol.

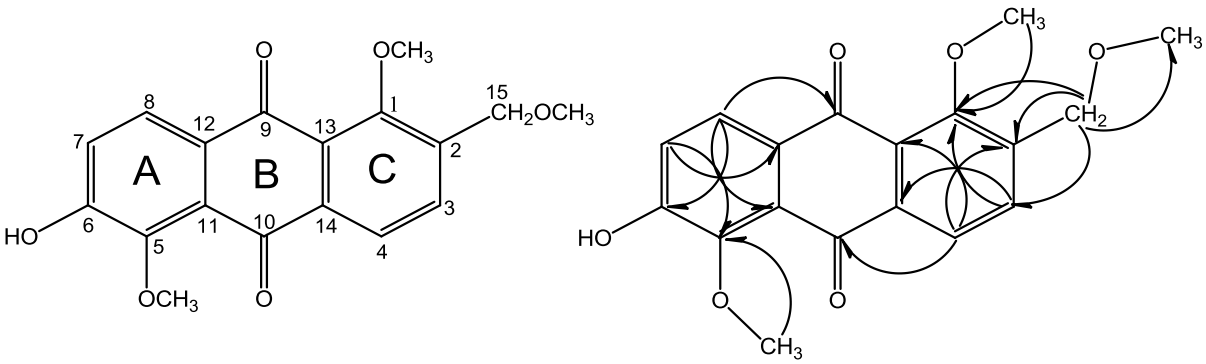


Figure 76 : Structure 1,5,15-triméthylmorindol et corrélations HMBC du composé Mor3

Le composé **Mor3** est une nouvelle anthraquinone de *M. lucida*. Il a été isolé pour la première fois des feuilles de *Morinda citrifolia* par Takashima *et al.* en 2007 [174]. Dans la même année, Akihisa *et al.* [175] l'ont isolé des fruits de *M. citrifolia*. Les études de Takashima *et al.* ont montré que le composé 1,5,15-triméthylmorindol ne présente pas une activité cytotoxique importante sur les cellules de la lignée leucémique humaine T, Jurkat ; mais démontre une cytotoxicité importante (CI_{50} de 14.5 à 15.0 µg/mL) lorsqu'il est combiné avec 0.5 à 1.5 µg/mL de protéine TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), un ligand inducteur d'apoptose relié au facteur de nécrose tumorale. Ces résultats suggèrent que le traitement combiné du composé 1,5,15-triméthylmorindol avec la protéine TRAIL pourrait être une nouvelle stratégie pour le traitement du cancer [174].

Il faut noter qu'il s'agit ici du premier isolement des composés 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone (**Mor1**), alizarin-1-méthyléther (**Mor2**) et 1,5,15-triméthylmorindol (**Mor3**) des feuilles de l'espèce *M. lucida* de côte d'Ivoire.

4 Etude phytochimique des feuilles de *Leptoderris fasciculata*

L'espèce *Leptoderris fasciculata* a suscité notre intérêt d'une part pour son usage traditionnel en Côte d'Ivoire (arrêt d'hémorragie chez les femmes après accouchement) et d'autre part, cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique dans la littérature. Dans cette étude, seuls les extraits de CH_2Cl_2 (L2) et d'AcOEt (L3) ont été soumis à des investigations phytochimiques plus approfondies.

4.1 Interprétation des CCM préliminaires des extraits de dichlorométhane (L2) et d'acétate d'éthyle (L3)

L'étude des différentes CCM de l'extrait de CH_2Cl_2 (L2) nous a montré la présence de composés phénoliques, tels que les flavonoïdes (réactif de Neu, fluorescence jaune-orange, bleue et verte sous lumière UV à 365 nm) (Figure 77).

Les produits apolaires de l'extrait de CH_2Cl_2 (L2) semblent être des terpènes ou des stéroïdes (coloration bleue violette par révélation à la vanilline sulfurique et fluorescence à 365 nm par révélation avec le réactif de Liebermann et Burchard) (Figure 77).

L'extrait polaire d'AcOEt (L3) semble contenir des acides phénoliques assez polaires (fluorescence bleue en UV 365 nm).

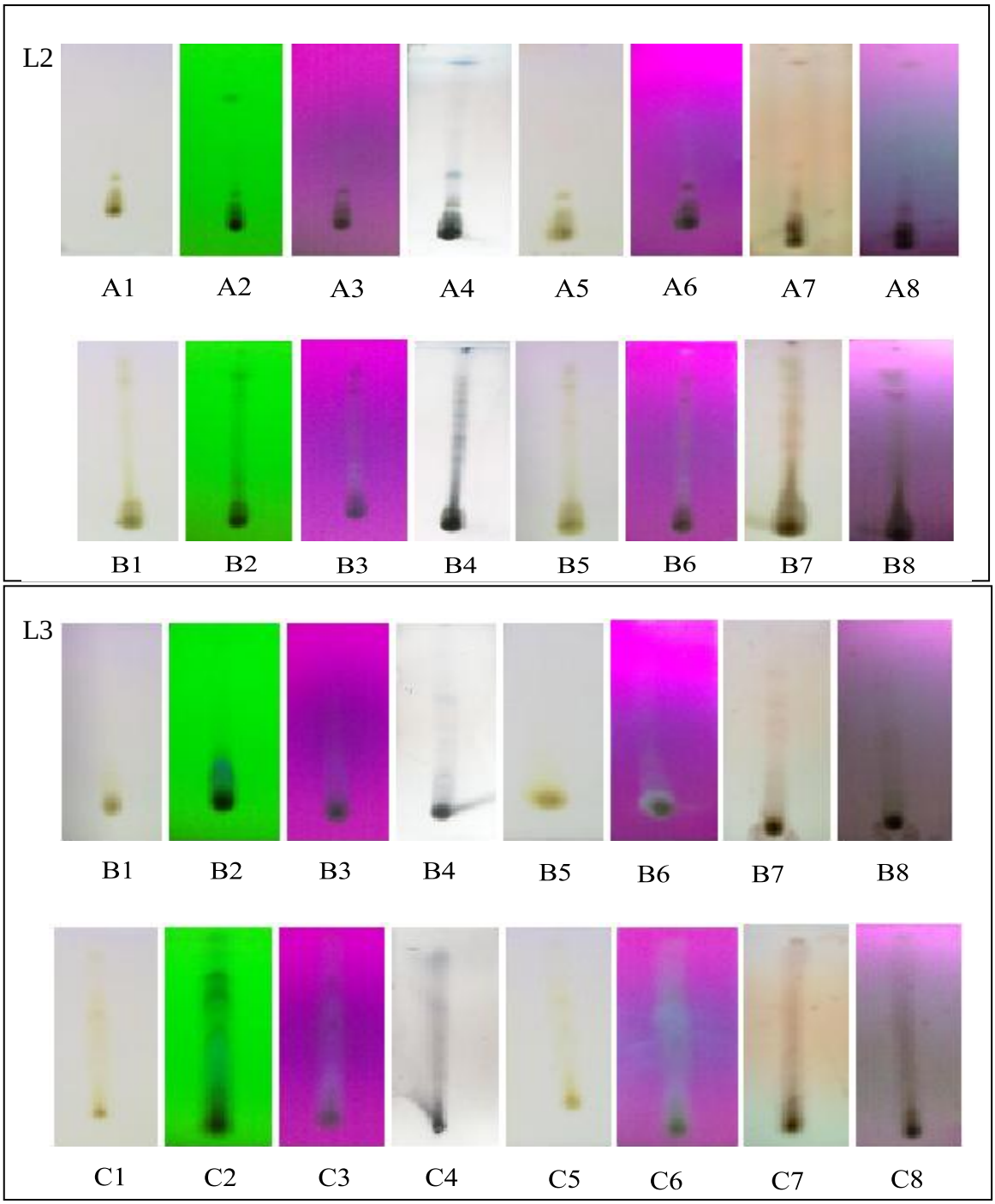


Figure 77 : CCM préliminaires de l'extrait de dichlorométhane (L2) et d'acétate d'éthyle (L3). A élution au CH_2Cl_2. B élution Tol/AcOeEt/MeOH (80 :18 :2). C élution à l'AcOEt. 1-UV visible. 2-UV 254 nm. 3-UV 365 nm. 4-Réactif à la vanilline sulfurique. 5-Réactif de Neu observation UV visible. 6-Réactif de Neu, observation UV 365 nm. 7-Réactif de Liebermann et Burchard, observation UV visible. 8-Réactif de Liebermann et Burchard, observation UV 365 nm.

L'isolement de molécules des extraits de CH_2Cl_2 L2 et d'AcOEt L3 de *L. fasciculata* s'est révélé être particulièrement difficile en raison de la présence de trainées sur CCM. Ces trainées (de couleur marron en UV 254 nm) sont présentes dans toutes les gammes de polarité

ce qui rend l'isolement de molécules pures extrêmement délicat. Par conséquent le travail préliminaire à l'étude des composés de cette plante a consisté à tester de nombreuses méthodes chromatographiques en association avec divers systèmes de solvants afin de mettre au point un système de fractionnement permettant la séparation des composés de l'extrait. L'utilisation en alternance des techniques de chromatographie d'adsorption, de partage et d'interaction hydrophobe permet en partie de remédier à ce problème mais de nombreuses phases de purification sont nécessaires rendant le rendement final en composé pur très faible.

4.2 Purification de l'extrait de dichlorométhane L2

Les schémas d'isolement des produits **Lep1**, **Lep2**, **Lep3** et **Lep4** (Figure 78), **Lep5**, **Lep6**, **Lep7**, et **Lep8** (Figure 79) à partir de l'extrait L2 sont présentés ci-dessous.

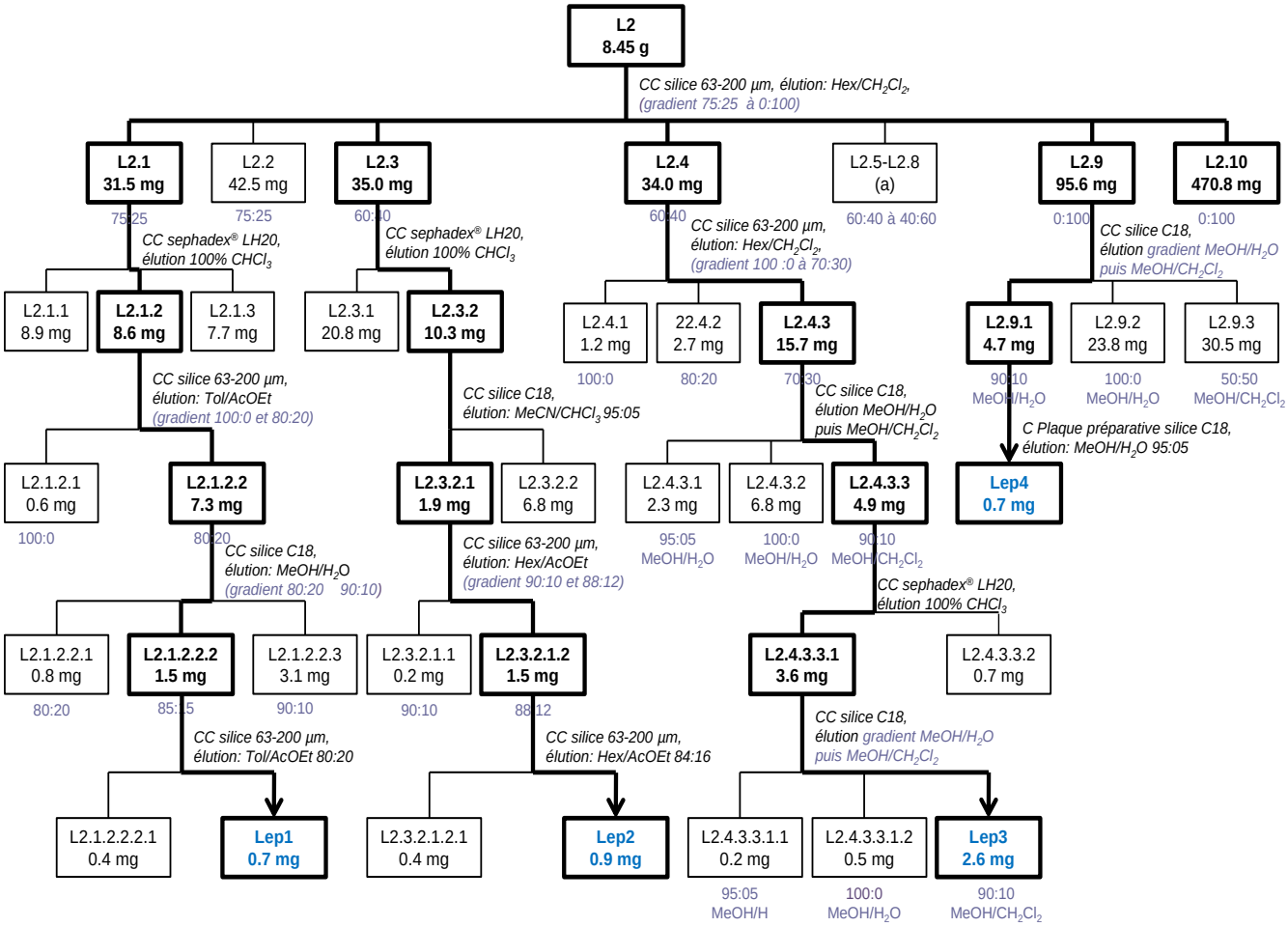


Figure 78 : Schéma d'isolement de Lep1, Lep2, Lep3 et Lep4. (a) L2.5 184 mg Hex/CH_2Cl_2 (60:40); L2.6 127.3 mg Hex/CH_2Cl_2 (50:50); L2.7 126.1 mg Hex/CH_2Cl_2 (40:60); L2.8 136.9 mg Hex/CH_2Cl_2 (40:60)

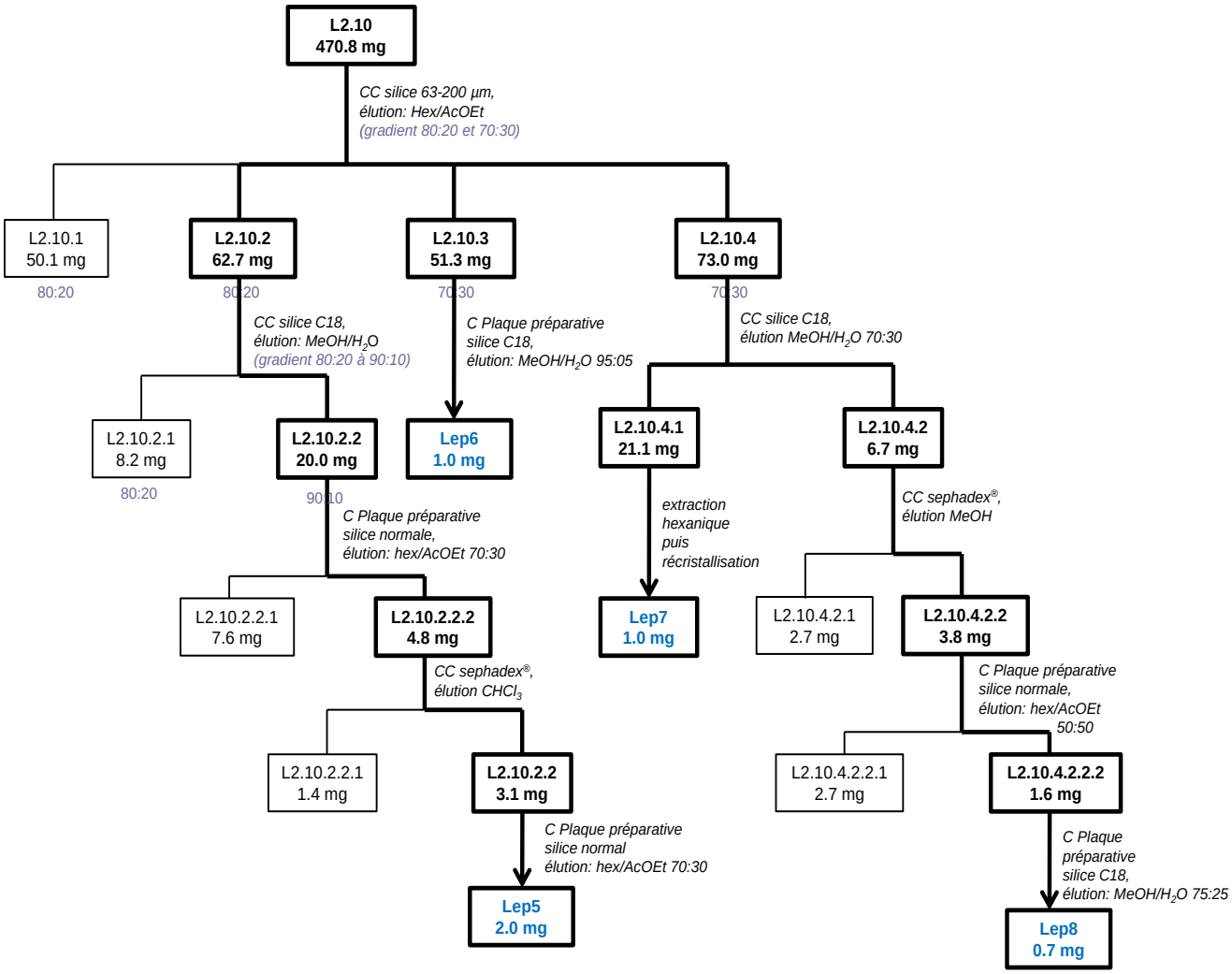


Figure 79 : Schéma d'isolement des composés Lep5, Lep6, Lep7, Lep8

L'extrait L2 (8.45 g) a subi un premier fractionnement par chromatographie en phase normale sur colonne ouverte à l'aide d'un gradient hexane/CH_2Cl_2 pour donner dix fractions (L2.1 à L2.10).

4.2.1 Isolement du composé Lep1

La fraction L2.1 a été soumise à un fractionnement par chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Sephadex® LH20 éluée au $CHCl_3$. Trois fractions sont obtenues (L2.1.1 à L2.1.3). La sous-fraction L2.1.2 est traitée par chromatographie en phase normale à l'aide d'un gradient Tol/AcOEt permettant d'obtenir deux sous-fractions (L2.1.2.1 et L2.1.2.2). La fraction L2.1.2.2 subit une chromatographie en phase inverse et est éluée sur colonne C18 à l'aide d'un gradient MeOH/H_2O pour donner trois sous-fractions (L2.1.2.2.1 à L2.1.2.2.3). La sous-fraction L2.1.2.2.2 est soumise à une dernière chromatographie en phase normale avec comme éluant Tol/AcOEt (80:20), pour donner le composé **Lep1**. Ce produit se dégrade très rapidement lorsqu'il est chauffé à une température voisine de 40°C.

4.2.2 Isolement du composé Lep2

La fraction L2.3 a subi une chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Sephadex® LH20 éluée au $CHCl_3$ pour donner deux fractions L2.3.1 et L2.3.2. Cette dernière est soumise à une chromatographie en phase inverse (C-18) et est éluée sur une colonne C18 avec un mélange de MeCN/$CHCl_3$ (95:05) permettant d'obtenir 3 sous-fractions (L2.3.2.1 à L2.3.2.3). La sous-fraction L2.3.2.3 est purifiée par deux chromatographies successives sur colonnes en phase normale éluées avec des mélanges de Hex/AcOEt pour obtenir le composé **Lep2**.

4.2.3 Isolement du composé Lep3

La fraction L2.4 a été soumise à une chromatographie sur gel de silice à l'aide d'un gradient Hex/CH_2Cl_2 pour donner 3 fractions (L2.4.1 à L2.4.3). La fraction L2.4.3 subit une chromatographie en phase inverse à l'aide d'un gradient MeOH/H_2O puis d'un mélange de MeOH/CH_2Cl_2 (90:10) pour donner 3 sous-fractions (L2.4.3.1 à L2.4.3.3). Un traitement de la sous-fraction L2.4.3.3 par chromatographie d'interaction hydrophobe avec du $CHCl_3$ conduit à deux fractions L2.4.3.3.1 et L2.4.3.3.2. La fraction L2.4.3.3.1 subit enfin une chromatographie en phase inverse, est éluée à l'aide d'un gradient MeOH/H_2O puis un mélange de MeOH/CH_2Cl_2 (90:10) pour conduire au composé **Lep3**.

4.2.4 Isolement du composé Lep4

La fraction L2.9 subit une chromatographie en phase inverse sur colonne éluée avec un gradient MeOH/H_2O puis un mélange de MeOH/CH_2Cl_2 (90:10) pour donner 3 sous-fractions (L2.9.1 à L2.9.3). La sous-fraction L2.9.1 est soumise à une chromatographie en phase inverse sur plaque préparative éluée par un mélange MeOH/H_2O (90:10) pour obtenir le composé **Lep4**.

4.2.5 Isolement des composés Lep5, Lep6, Lep7 et Lep8

La fraction L2.10 est soumise à une chromatographie sur gel de silice à l'aide d'un gradient hexane/AcOEt pour donner 4 fractions (L2.10.1 à L2.10.4). La fraction L2.10.2 subit un fractionnement par chromatographie en phase inverse sur colonne, en utilisant un gradient MeOH/H2O permettant ainsi d'obtenir 3 sous-fractions (L2.10.2.1 à L2.10.2.3).

La sous-fraction L2.10.2.2 est traitée par deux chromatographies en phase normale sur plaques préparatives éluées avec un mélange hexane/AcOEt. Entre elles, est interposée une chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Sephadex® LH20 éluée au $CHCl_3$ pour obtenir le composé **Lep5**.

La fraction L2.10.3 sur CCM montre la présence d'un polyphénol. Il a été, isolé par chromatographie en phase inverse sur plaque préparative éluée avec le MeOH/H_2O (90:10), et nommé **Lep6**.

La fraction L2.10.4 est fractionnée par chromatographie de partage sur silice RP-18 en utilisant le système MeOH/H_2O (70:30) comme éluant. Deux sous-fractions sont obtenues (L2.10.4.1 et L2.10.4.2).

Une extraction hexanique suivie d'une recristallisation dans l'hexane de la sous-fraction L2.10.4.1 donne le composé **Lep7**.

La sous-fraction L2.10.4.2 est soumise à une chromatographie d'interaction hydrophobe et est éluée au MeOH pour donner deux fractions L2.10.4.2.1 et L2.10.4.2.2. Cette dernière subit successivement deux chromatographies sur plaques préparatives. Une en phase normale éluée avec un mélange de Hex/AcOEt (50:50) puis une en phase inverse éluée avec MeOH/H_2O (75:25) pour obtenir le composé **Lep8**.

4.3 Détermination structurale des composés isolés de l'extrait de dichlorométhane L2

4.3.1 Détermination de la structure du composé Lep6

Le composé **Lep6** se présente sous forme de fines aiguilles jaunes pales solubles dans le chloroforme. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence UV à 365 nm (marron foncé) laissant envisager une structure de type flavonoïde.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en IC puis en haute résolution electrospray en mode positif (HRESI+) présentent un ion quasi-moléculaire à m/z 343 $[M+H]^+$ (pour IC) et à m/z 343.11713 $[M+H]^+$ (pour $HRESI^+$) suggérant une masse atomique de 342 uma et une formule brute $C_{19}H_{18}O_6$.

Spectrométrie RMN

Le proton H-2 du cycle C d'une isoflavone apparaît comme un singulet sur un spectre RMN-^{1}H entre 7.79 et 7.81 ppm dans $CDCl_3$ [176, 177] et entre 8.02 et 8.48 ppm dans les solvants polaires DMSO-d6, acétone-d6, CD_3OD [178-180]. L'examen du spectre RMN ^{1}H du composé **Lep6** réalisé dans $CDCl_3$ (Figure 80) montre un singulet d'intégration 1H à δ_H 7.81 ppm caractérisant le proton H-2 d'une isoflavone. Cette structure est confirmée par la présence d'un singulet 1H à δ_H 8.07 ppm sur un spectre RMN-^{1}H réalisé dans l'acétone-d6.

Nous observons aussi :

- un singulet d'intensité 1H à δ_H 6.69 ppm caractéristique d'un proton du cycle A d'un flavonoïde [161] indiquant une trisubstitution du cycle A de la génine isoflavone ;

- deux doublets d'intégration 2H chacun, couplant en ortho, à δ_H 6.96 ppm (J = 8.8 Hz) et à δ_H 7.48 ppm (J = 8.8 Hz), attribuables à H-3', H-5'et H-2', H-6' respectivement [161] Ce système 2H AA', 2H XX' sur le cycle B indique qu'il est substitué en position 4' ;

- quatre groupements méthoxyle sous forme de quatre singulets ; le méthoxyle à δ_H 3.84 ppm est le substituant en position 4' du cycle B [164] et les trois groupements méthoxyles à δ_H 3.92, 3.96 et 3.97 ppm sont les trois substituants du cycle A.

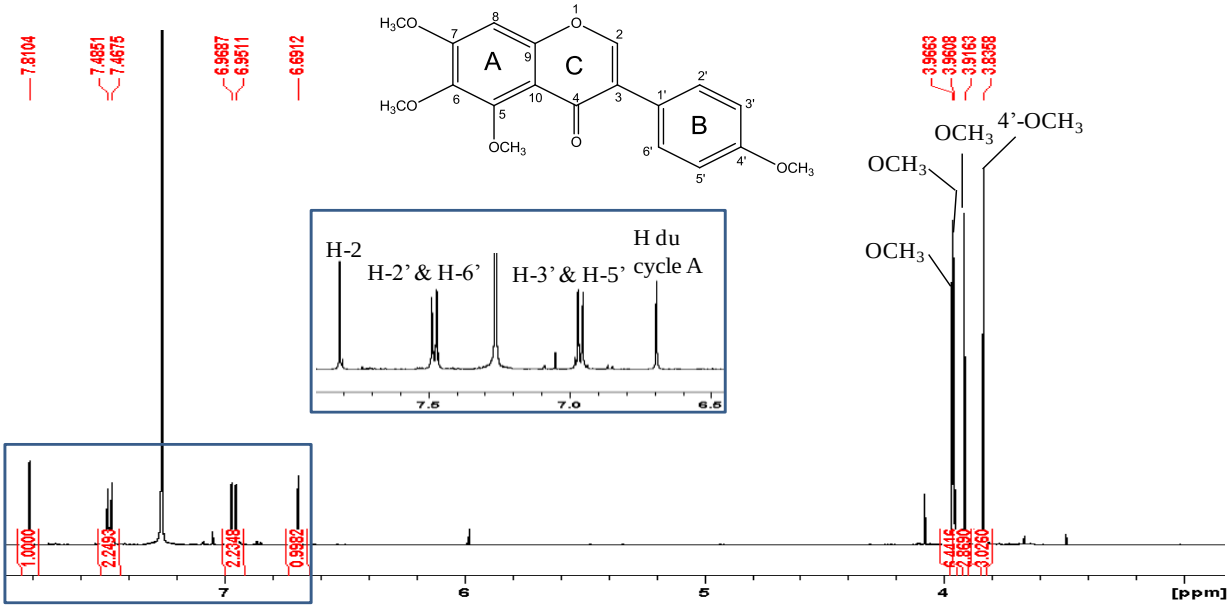


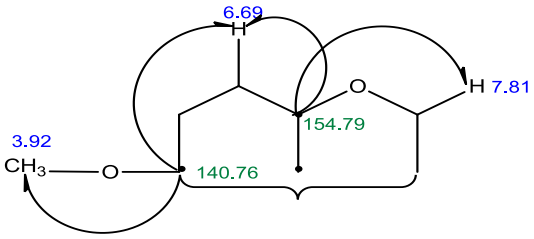
Figure 80 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep6 dans $CDCl_3$

Le spectre RMN-^{13}C avec édition DEPT90 et DEPT135 du composé **Lep6** présente dix-neuf signaux carbone dont neuf quaternaires dont un groupement carbonyle (δ_C 175.32 ppm), six CH et quatre CH_3 confirmant ainsi la formule brute $C_{19}H_{18}O_6$ et la génine isoflavone tetrasubstituée.

Le spectre RMN-2D HSQC permet aisément d'attribuer les déplacements chimiques, des carbones qui portent les protons du cycle B, du carbone qui porte le proton à δ_H 7.81 ppm (H-2), du carbone qui porte le proton du cycle A et du carbone du substituant méthoxyle du cycle B.

L'étude des spectres RMN-2D HSQC et HMBC va nous permettre de positionner les différents substituants sur le cycle A.

Les corrélations observées en HMBC (Figure 81) montrent que les protons du groupement méthoxyle à δ_H 3.92 ppm corrèlent avec le carbone à δ_C 140.76 ppm qui corrèle à son tour avec le proton à δ_H 6.69 ppm. Ce dernier corrèle avec le carbone à δ_C 154.79 ppm qui corrèle à son tour avec le proton H-2 à δ_H 7.81 ppm correspondant à l'enchainement suivant :



L'ensemble des données précédentes nous permet d'identifier le composé **Lep6** comme étant la 4',5,6,7-tetraméthoxyisoflavone.

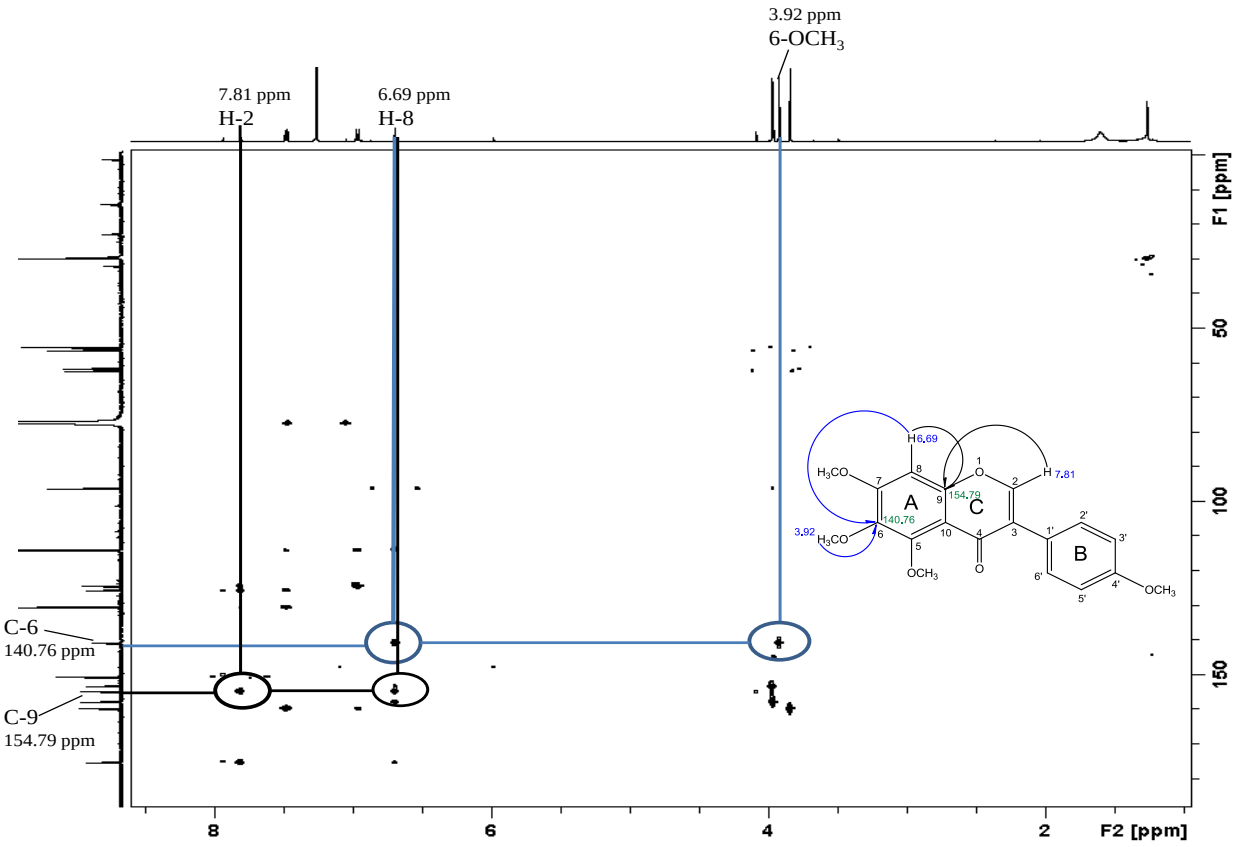


Figure 81 : Spectre RMN-2D HMBC du composé Lep6

Le spectre NOESY confirme bien les effets NOE entre les protons du méthoxyle à δ_H 3.96 ppm et le proton à δ_H 6.69 ppm du cycle A et entre le proton à δ_H 7.81 ppm du cycle C et le proton à δ_H 7.48 ppm du cycle B.

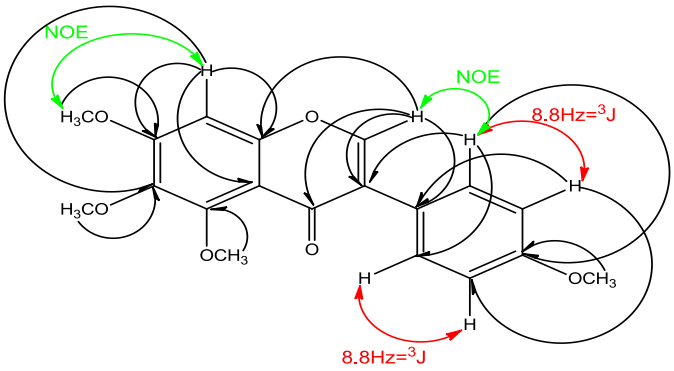


Figure 82 : Corrélation COSY (rouge), NOESY (vert) et HMBC (noir) du composé Lep6

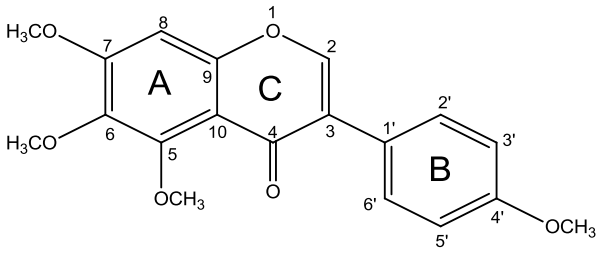


Figure 83 : Structure 4',5,6,7-tetraméthoxyisoflavone du composé Lep6

Analyse aux rayons X

L'ensemble des données aux rayons X a confirmé la structure du composé **Lep6**.

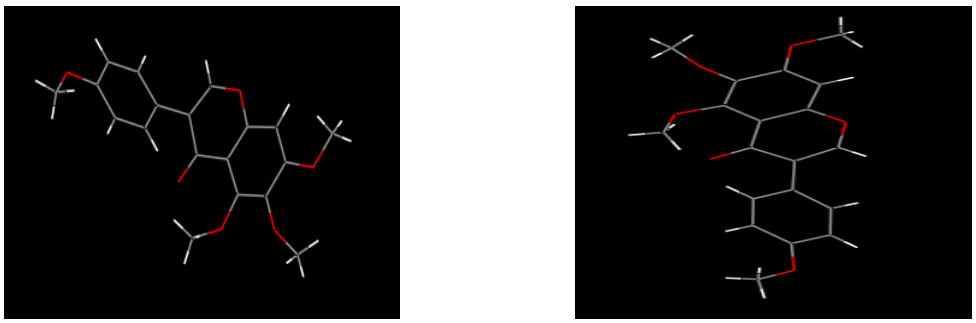


Figure 84 : Structure par analyse aux rayons X du composé Lep6

Le composé **Lep6** est un nouveau produit naturel qui n'a jamais été identifié ni isolé d'une plante. Cependant il a été synthétisé à partir du 3,4,5-triméthoxyphénol et du *p*-méthoxyphényl acétyl chloride en presence du complexe BF_3-Et_2O pour donner d'abord la 6-hydroxy-2,3,4-triméthoxyphényl *p*-méthoxybenzyle cétone qui après cyclisation avec un mélange de *N*,*N*-carbonyldiimidazole/acide formique dans THF conduit à la 4',5,6,7-tetraméthoxyisoflavone [176].

4.3.2 Détermination de la structure du composé Lep8

Le composé **Lep8** se présente sous forme de fines aiguilles jaunes pales soluble dans le $CHCl_3$. Ce composé présente une tache orange avec le révélateur vanilline sulfurique et réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune en UV à 365 nm laissant envisager un polyphénol de type flavonoïde

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse IC réalisé en mode positif et négatif, nous observons un ion quasi moléculaire à m/z 329 $[M+H]^+$ en mode positif et à m/z 327 $[M-H]^-$ en mode négatif, suggérant une masse atomique de 328 uma et une formule brute de $C_{18}H_{16}O_6$. La mesure de masse exacte réalisée en MALDI haute résolution indique un ion quasi-moléculaire à m/z 329.1023 $[M+H]^+$ confirmant ainsi la formule brute envisagée.

Spectrométrie RMN

Le spectre RMN-^{1}H réalisé dans l'acétone-d6 du composé **Lep8** (Figure 85) présente une très grande similarité avec celui du composé **Lep6**. En effet, nous retrouvons le signal du proton du cycle C et les signaux des protons aromatiques des cycles A et B d'une isoflavone substituée en 5,6,7 et 4' : H-2 à δ_H 8.01 ppm (*s*), H-8 à δ_H 6.74 ppm (*s*), H-2'et H-6'à δ_H 7.51 ppm (*d*, *J* = 8.8 Hz), H-3' et H-5' à δ_H 6.96 ppm (*d*, *J* = 8.8 Hz) (Figure 87).

Nous observons aussi trois groupements méthoxyle sous forme de trois singulets. Le groupement méthoxyle à δ_H 3.83 ppm est le substituant en position 4' du cycle B [164] et les deux groupements méthoxyle à δ_H 3.889 et 3.891 ppm sont sur le cycle A. Il nous manque un substituant du cycle A, certainement un groupement hydroxyle (absence surprenante sur le spectre RMN-^{1}H) vu la formule brute envisagée : $C_{18}H_{16}O_6$.

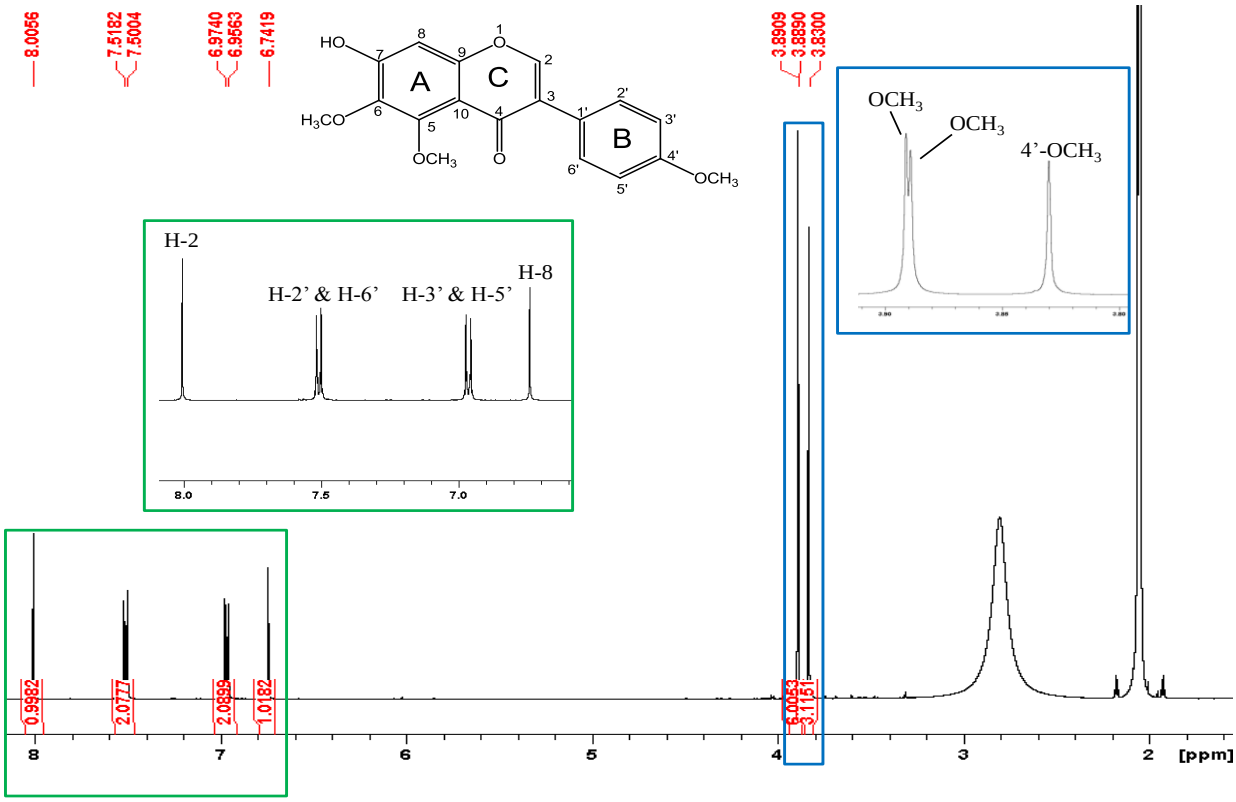


Figure 85 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep8 dans l'acétone-d6

Le spectre RMN-^{13}C avec édition DEPT90 et DEPT135 du composé **Lep8** présente dix-huit signaux carbone dont neuf quaternaires dont un groupement carbonyle (δ_C 174.84 ppm), six CH et trois CH_3 confirmant le groupement hydroxyle comme étant le quatrième substituant.

Des données précédentes et des spectres RMN-2D (HSQC et HMBC) mais aussi des spectres NOESY, on peut en conclure aisément que le proton à δ_H 6.74 ppm situé sur le cycle A portant à la fois le groupement hydroxyle et les deux groupements méthoxyle ne peut pas être à côté d'un groupement méthoxyle car aucune tache de corrélation en NOESY n'est visible entre ce proton et les protons d'un des groupements méthoxyle. Le proton ne peut être qu'à côté du groupement hydroxyle.

De plus le spectre RMN-2D HMBC montre des taches de corrélation entre le proton à δ_H 6.74 ppm avec le carbone à δ_C 113.38 ppm (forte intensité) et avec le carbone à δ_C 155.57 ppm (intensité moyenne) qui corrèle à son tour avec le proton à δ_H 8.01ppm (corrélation intense).

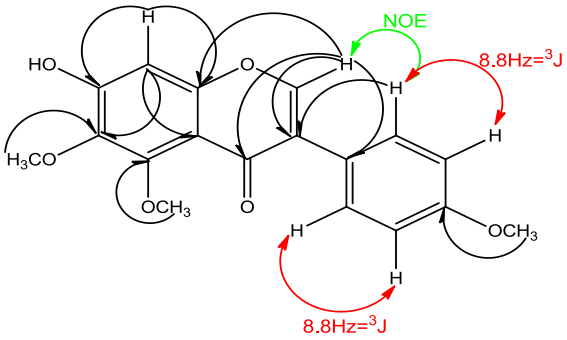


Figure 86 : Corrélation COSY (rouge), NOESY (vert) et HMBC (noir) du composé Lep8

L'ensemble des données précédentes nous permet d'identifier le composé **Lep8** comme étant la 7-hydroxy-4',5,6-triméthoxyisoflavone.

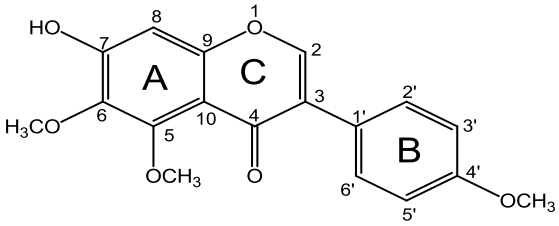


Figure 87 : Structure 7-hydroxy-4',5,6-trimethoxyisoflavone du composé Lep8

Ce composé a été isolé des racines de *Baphia bancoensis* Aubrév. [180] et des écorces de *Dipteryx alata* Vogel [177], deux espèces de Fabaceae. Les données RMN de **Lep8** repassé dans le $CDCl_3$ sont en accord avec les déplacements chimiques $\delta(^1H)$ et $\delta(^{13}C)$ obtenus dans les travaux précédents.

4.3.3 Détermination de la structure du composé Lep3

Le composé **Lep3** se présente sous la forme d'une poudre blanche, soluble dans le $CHCl_3$. Ce composé prend une coloration violette après révélation en CCM par de la vanilline sulfurique et une fluorescence bleue au réactif de Liebermann-Burchard (à 365 nm) suggérant un composé de type triterpénique.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC présente en mode positif un ion quasi-moléculaire à m/z 427 $[M+H]^+$ et en mode négatif, un ion quasi moléculaire à m/z 425 $[M-H]^-$ et un ion moléculaire à m/z 426 $M^{+\bullet}$.

La mesure du spectre de masse IE en mode positif (Figure 88) montre un ion à m/z 426 qui correspond à l'ion moléculaire $M^{+\bullet}$. Le spectre du composé **Lep3** présente également des ions résultant de la fragmentation de la molécule et notamment l'ion B à m/z 207 qui est caractéristique des cycles A et B d'un triterpène (voir schéma Figure 88) [181, 182]; la perte

par cet ion d'une molécule d'eau indique que les cycles A et B portent un groupement hydroxyle, très probablement en position 3 pour des raisons de biosynthèse.

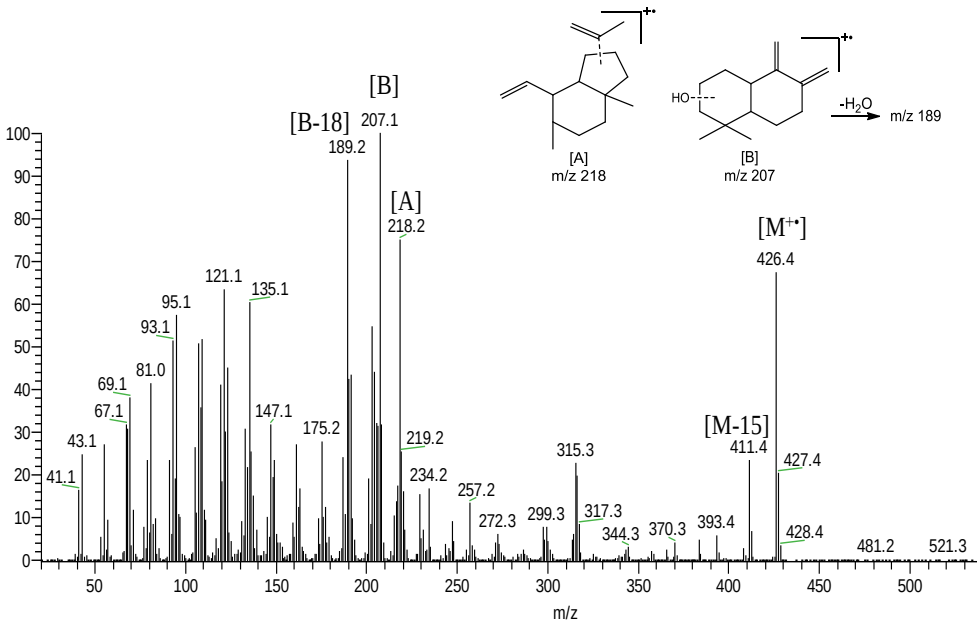


Figure 88 : Spectre de masse IE du composé Lep3

Spectrométrie RMN

La majorité des signaux du spectre RMN-^{1}H du composé **Lep3** (Figure 89) est observée dans la région des hauts champs indiquant la présence de protons aliphatiques. Parmi ceux-ci, le spectre présente un profil typique de triterpène avec la présence de sept groupements méthyles : six formant des singulets (δ_H 1.05, 0.98, 0.96, 0.84, 0.81 et 0.77 ppm) et un formant un doublet dédoublé à δ_H 1.70 ppm (*dd*, J = 1.3 Hz, J = 0.6 Hz) [183].

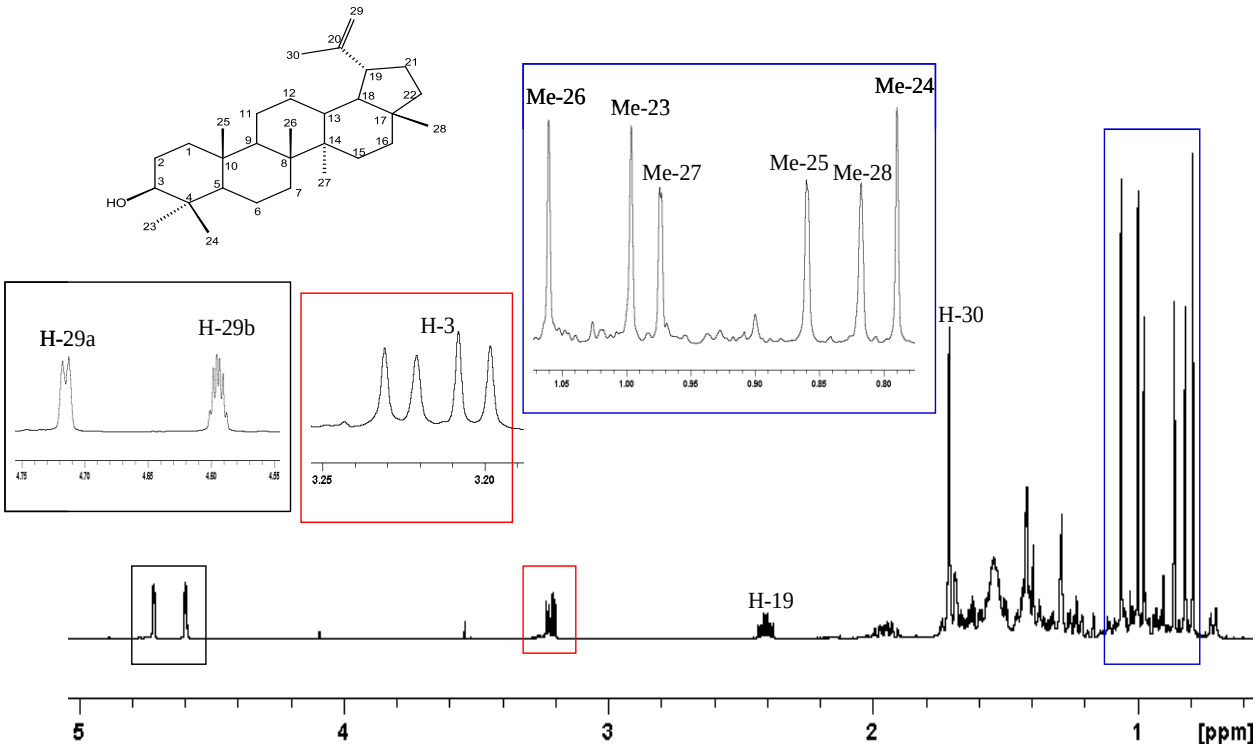


Figure 89 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep3 dans $CDCl_3$

Nous observons également la présence du signal caractéristique d'un proton CH hydroxylé en position 3 à δ_H 3.22 ppm et des signaux de deux protons oléfiniques à δ_H 4.58 et 4.71 ppm.

Les 30 signaux du spectre RMN-^{13}C du composé **Lep3** confirment la présence d'un triterpène (Figure 90) avec sept méthyles dont l'expérience HSQC a permis de définir les corrélations protons (δ_C 28.0/δ_H 1.70, δ_C 15.4/δ_H 0.81, δ_C 16.1/δ_H 0.96, δ_C 16.0/δ_H 1.05, δ_C 14.6/δ_H 0.84, δ_C 18.0/δ_H 0.77 et δ_C 19.3/δ_H 0.98 ppm). Par ailleurs, nous observons la présence d'un carbone quaternaire oléfinique à δ_C 151.1 ppm et d'un carbone secondaire oléfinique à δ_C 109.4 ppm.

Les déplacements chimiques du CH à δ_C 79.1/δ_H 3.22 ppm confirment la présence d'un groupement hydroxyle (Figure 90).

Les signaux d'un CH à δ_C 55.3/δ_H 0.70 ppm sont caractéristiques du CH-5 d'une *trans*-décaline A/B [184].

L'observation conjointe des spectres de RMN-^{1}H et ^{13}C nous indique la présence des signaux caractéristiques d'un groupement isoprène. En effet, les deux protons du CH_2 oléfinique (δ_C 109.4/δ_H 4.58 et 4.71 ppm) couplent entre eux formant chacun un doublet (J = 2.5 Hz) dédoublé par le couplage avec les protons du méthyle à δ_H 1.70 ppm (*dd*, J = 1.3 Hz, J = 0.6 Hz).

Toutes ces informations nous permettent de déduire la formule brute du composé **Lep3** $C_{30}H_{50}O$ et de calculer les équivalents de doubles liaisons (EDL) afin d'envisager le nombre de liaisons conjuguées et/ou de cycles que compte la structure. La formule brute indique 6

degrés d'insaturations, nous pouvons émettre l'hypothèse que le composé **Lep3** est un triterpène pentacyclique dont le cycle E est à 5 liaisons et est substitué par un groupement isoprényle. Le composé **Lep3** peut donc être de type lupane ou hopane [184].

Toutes les autres valeurs de protons et de carbones ont été attribuées d'après l'analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC (Figure 90), elles concordent avec une structure de type lupène. [185, 186]

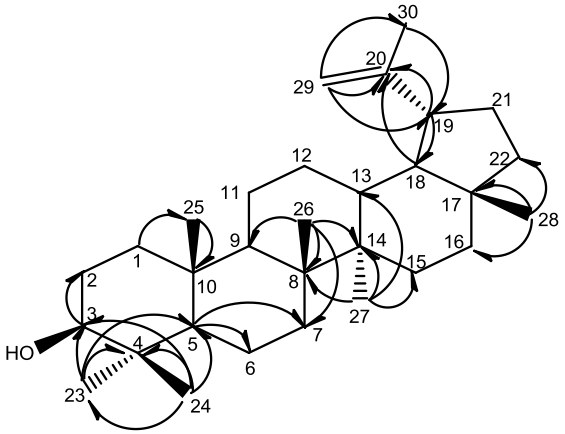


Figure 90 : Corrélations observées sur le spectre HMBC du composé Lep3

En effet, en raison de l'éloignement de la chaîne latérale à trois carbones dans le squelette hopène (Figure 91), le C-13 et le groupement méthyle en position 27 (Me-27) sont beaucoup plus déblindés que dans le squelette lupène [184].

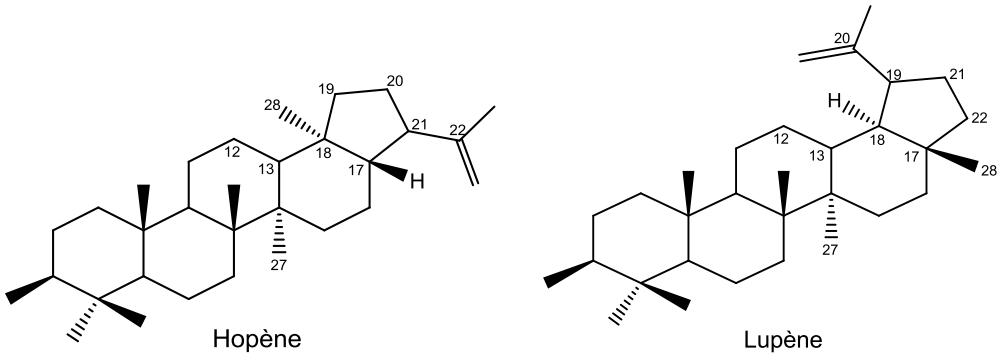


Figure 91 : Squelettes de hopène et lupène

Pour le composé **Lep3**, le déplacement chimique du C-13 est de δ_C 38.1 ppm alors qu'on observerait une valeur d'environ 50 ppm dans le cas d'un hopène ; de la même manière, le Me-27 à δ_C 14.6 ppm dans le composé **Lep3** serait plus débindé (δ_C ~ 18 ppm) dans une structure de type hopène [187, 188].

Le déplacement à δ_H 2.40 ppm est caractéristique du H-19 d'un lupène [189] (Figure 91). Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre d'une part H-19 et C-20 et d'autre part

entre H-30, H-29 et C-19 (δ_C 48.0 ppm) permettent de confirmer que le groupement isoprène est porté par le carbone C-19.

Les valeurs des constantes de couplage entre H-3 et les protons H-2 (*dt*, *J* = 11.3 Hz, *J* = 5.1 Hz) impliquent un couplage *trans-diaxial* entre H-3 et le proton H-2 axial permettant de placer le groupement hydroxyle OH-3 en position *β* équatorial (Figure 90). La configuration *β*-orientée de ce groupement est confirmée par le déplacement chimique du C-3 à δ_C 79.1 ppm (alors qu'elle serait proche de 76 ppm dans le cas d'une orientation *α*) [184].

Sur le spectre NOESY, les corrélations entre H-3*α* et Me-23 et H-5 et H-9 suggèrent une configuration α pour ces groupements, en accord avec la présence d'une *trans*-décaline. Le groupement Me-25 est positionné en équatorial (*β*) dans une *trans*-décaline La position α du groupement isoprène a été déduite de la corrélation spatiale, sur le spectre NOESY, entre le proton H-19 et le signal du proton à δ_H 0.81 ppm (Me-28) positionné via les corrélations NOE entre Me-25, Me-26 et Me-28.

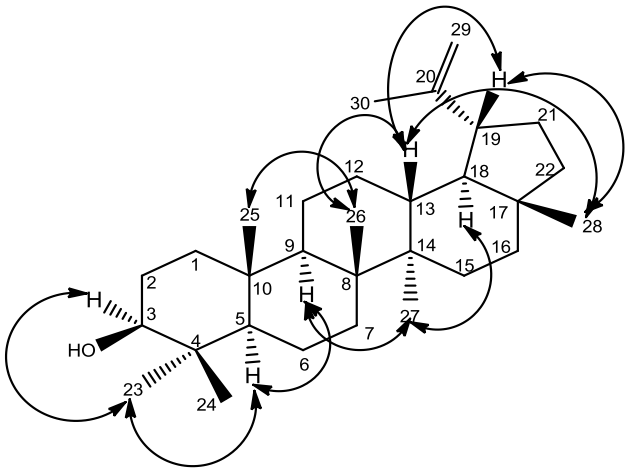


Figure 92 : Principales corrélations observées sur le spectre NOESY

En comparant ces données avec celles de la littérature, nous pouvons identifier le composé **Lep3** au (20)29-lupén-3*β*-ol ou lupéol [190-192] et les pics à m/z 426, 218, 207 et 189 sur le spectre de masse IE (Figure 88) sont les pics caractéristiques [193].

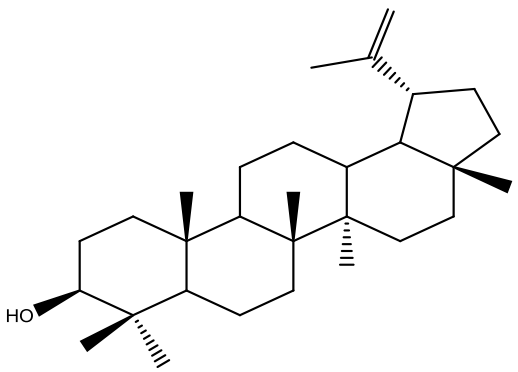


Figure 93 : Structure du (20)29-lupén-3β-ol (composé Lep3)

4.3.4 Détermination de la structure du composé Lep7

Le composé **Lep7** se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le chloroforme et l'acétone. En CCM, il donne une tache avec le réactif de Liebermann-Burchard suggérant un composé de type terpénique.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC montre des ions quasi-moléculaire à m/z 214 $[M+NH_4]^+$, 197 $[M+H]^+$ en mode positif et à m/z 195 $[M-H]^-$ en mode négatif suggérant une masse atomique de 196 uma. Les formules brutes envisagées sont $C_{11}H_{16}O_3$ et $C_{12}H_{20}O_2$.

Spectrométrie RMN

Des spectres RMN-^{1}H (Figure 94) et HSQC nous observons :

- 1H sous forme de singulet à δ_H 5.68 ppm porté par le carbone éthylénique à δ_C 113.3 ppm. Il s'agit donc d'un CH éthylénique ;

- un proton sous forme de sextuplet à δ_H 4.29 ppm (^3J = 3.3 Hz) porté par le carbone à δ_C 66.8 ppm est proche de 5H avec lesquels il a des valeurs de J très proches ;

- 1H sous forme de doublet à δ_H 4.13 ppm (^3J = 3.3 Hz) porté par aucun carbone est attribuable au proton d'un groupement hydroxyle. Ce proton couple en ^3J avec le proton sextuplet δ_H 4.29 ppm ;

- 1H sous forme de doublet dédoublé dédoublé à δ_H 2.39 ppm (^2J = 13.4 Hz, ^3J = 2.8 Hz, ^3J = 2.5 Hz) porté par le carbone à δ_C 46.5 ppm ;

- 1H sous forme de doublet dédoublé à δ_H 1.72 ppm (^2J = 13.4 Hz, ^3J = 3.9 Hz) est porté par le carbone à δ_C 46.5 ppm. Ce carbone porte donc les deux protons à δ_H 2.39 et 1.72 ppm suggérant ainsi un groupement méthylène avec des protons non équivalents ;

- 1H sous forme de doublet dédoublé dédoublé à δ_H 2.00 ppm (^2J = 14.2 Hz, ^3J = 2.4 Hz, ^3J = 2.3 Hz) est porté par le carbone à δ_C 47.9 ppm ;

- 1H sous forme de doublet dédoublé à δ_H 1.54 ppm (^2J = 14.3 Hz, ^3J = 3.7 Hz) est porté par le carbone à δ_C 47.9 ppm. Ce carbone porte donc les deux protons à δ_H 2.00 et 1.54 ppm suggérant ainsi un groupement méthylène avec des protons non équivalents ;

- 3H sous forme de doublet à δ_H 1.74 ppm (J = 0.6 Hz) porté par le carbone à δ_C 27.5 ppm est de type CH_3-C=C ou CH_3-COOR ou CH_3-C-OCOR ;

- deux groupements méthyle sous forme de singulets chacun à δ_H 1.47 et 1.26 ppm portés par les carbones à δ_C 27.0 et 31.1 ppm respectivement, de types CH_3-C.

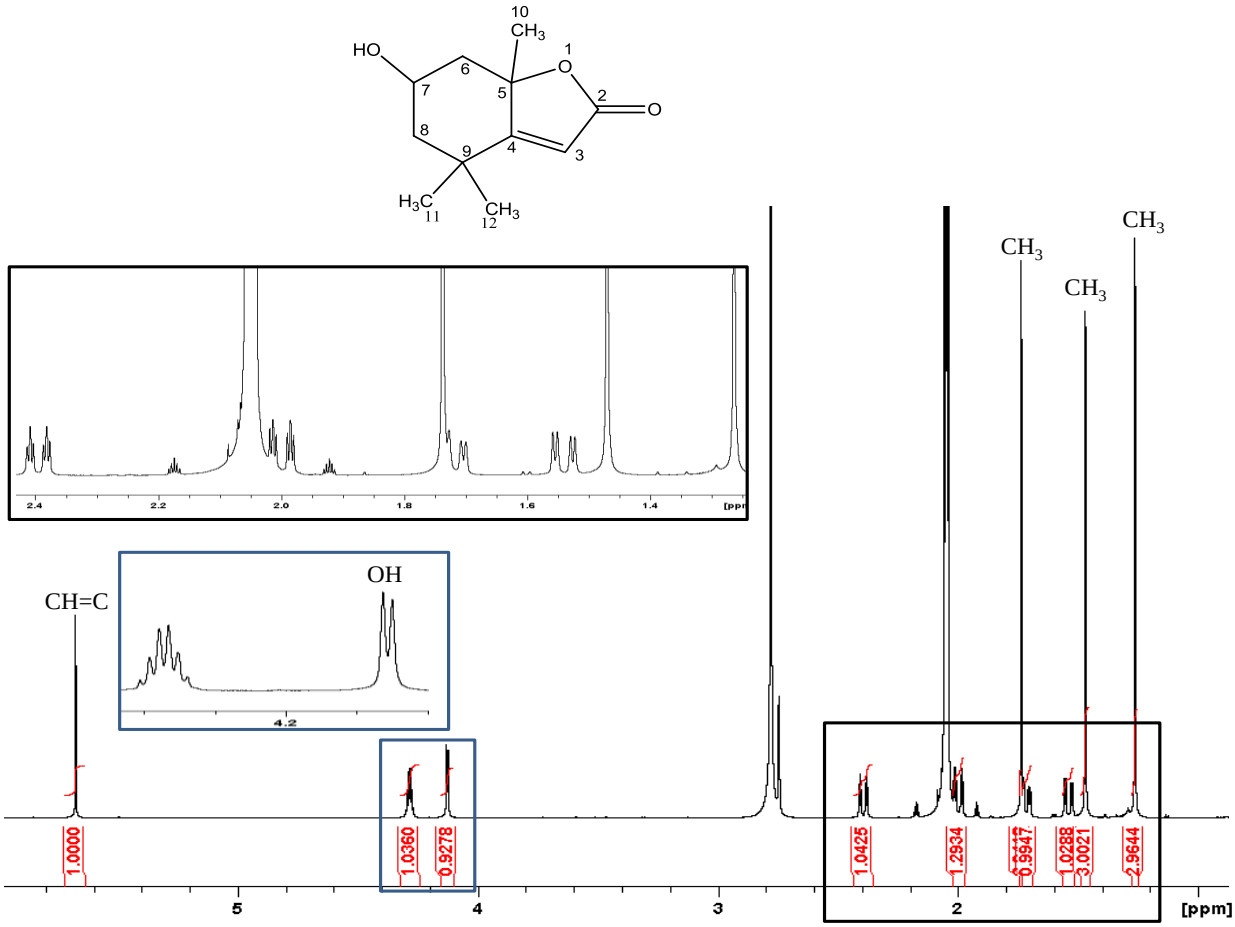
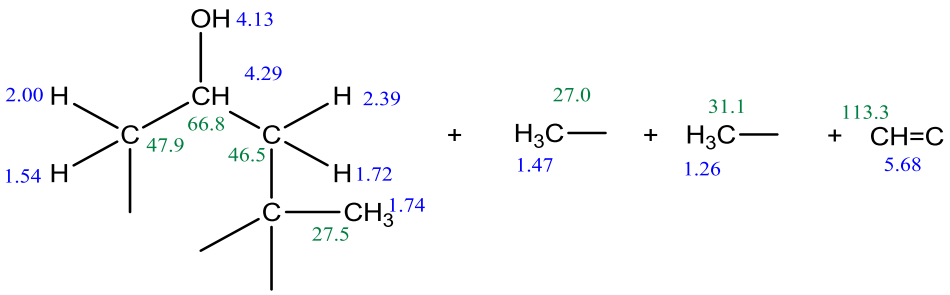


Figure 94 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep7 dans l'acétone-d6

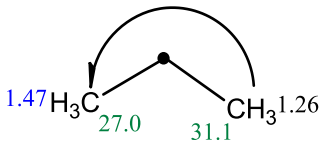
Le spectre COSY montre bien les taches de corrélation du proton CH sextuplet à δ_H 4.29 ppm avec les quatre protons méthyléniques, les 3H du groupement méthyle (doublet) à δ_H 1.74 ppm et le proton du groupement hydroxyle à δ_H 4.13 ppm. Le proton méthylénique à δ_H 2.39 ppm corrèle avec le proton méthylénique à δ_H 1.72 ppm, les 3H à δ_H 1.74 ppm et le proton méthylénique à δ_H 2.00 ppm. Ce proton corrèle aussi avec le proton méthylénique à δ_H 1.54 ppm. Les motifs suivants peuvent être déduits des spectres RMN-^{1}H, HSQC et COSY :



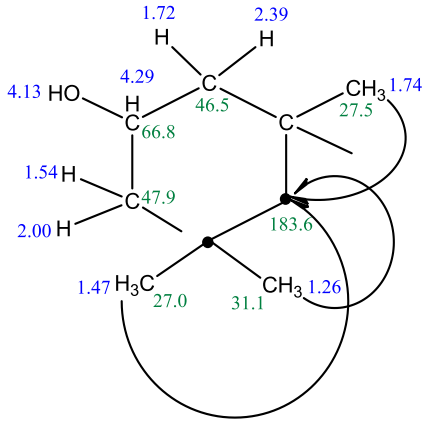
Le spectre RMN-^{13}C avec édition spectrale DEPT90 et DEPT135 présente 11 signaux carbones dont 4 carbones quaternaires (dont 1 CO et 1 éthylénique), 2CH dont 1 éthylénique, $2CH_2$ et $3CH_3$. En comptant le groupement hydroxyle, ces données spectrales sont en accord avec la formule brute $C_{11}H_{16}O_3$. Le nombre d'insaturations est de 4, la RMN nous donne de

façon certaine une fonction carbonyle et une fonction éthylénique soit un nombre d'insaturations de 2. Il nous manque donc deux insaturations pouvant correspondre à deux cycles.

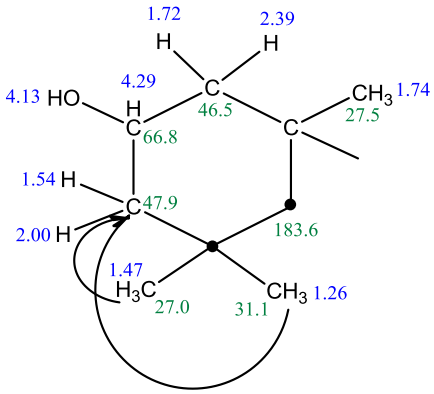
Le spectre HMBC montre que les 3H à δ_H 1.26 ppm portés par le carbone à δ_C 31.1 ppm corrèlent avec le carbone à δ_C 27.0 ppm qui porte les 3H à δ_H 1.47 ppm en ^3J. On peut donc envisager un motif :



Le carbone quaternaire à δ_C 183.6 ppm (C=O ou C=C) corrèle en ^3J avec les protons des trois groupements méthyle à δ_H 1.74, 1.47 et 1.26 ppm. Ce qui correspond à l'enchainement suivant :

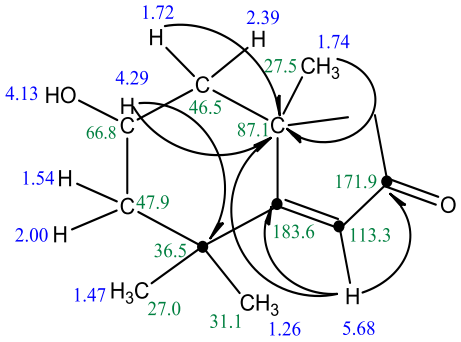


Le carbone à δ_C 47.9 ppm qui porte les 2H non équivalents à δ_H 2.00 et 1.54 ppm corrèle avec les protons des deux groupements méthyle à δ_H 1.47 et 1.26 ppm en ^3J.



Le proton sextuplet à δ_H 4.29 ppm porté par le carbone à δ_C 66.8 ppm corrèle avec les carbones quaternaires à δ_C 36.5 et 87.1 ppm. Ce dernier corrèle avec les 3H à δ_H 1.74 ppm, le proton à δ_H 1.72 ppm et avec le proton éthylénique à δ_H 5.68 ppm. De plus le carbone

quaternaire à δ_C 183.6 ppm (C=O ou C=C) corrèle avec le proton éthylénique à δ_H 5.68 ppm qui corrèle à son tour avec les carbones quaternaires à δ_C 87.1 ppm et à δ_C 171.9 ppm (C=O ou C=C). Ces corrélations nous amène à considérer le carbone quaternaire à δ_C 183.6 ppm comme un éthylénique et le carbone à δ_C 171.9 ppm comme un carbonyle. L'enchainement suivant est donc déduit :



En considérant la formule brute $C_{11}H_{16}O_3$, il nous manque une insaturation et un oxygène. Nous pouvons donc attribuer la structure suivante au composé **Lep7**.

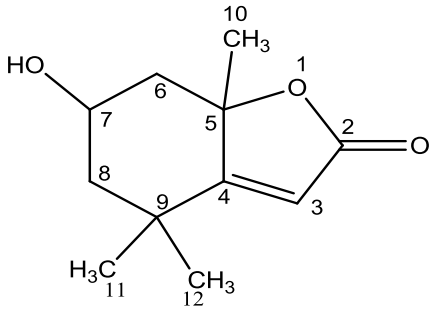


Figure 95 : Structure du composé Lep7

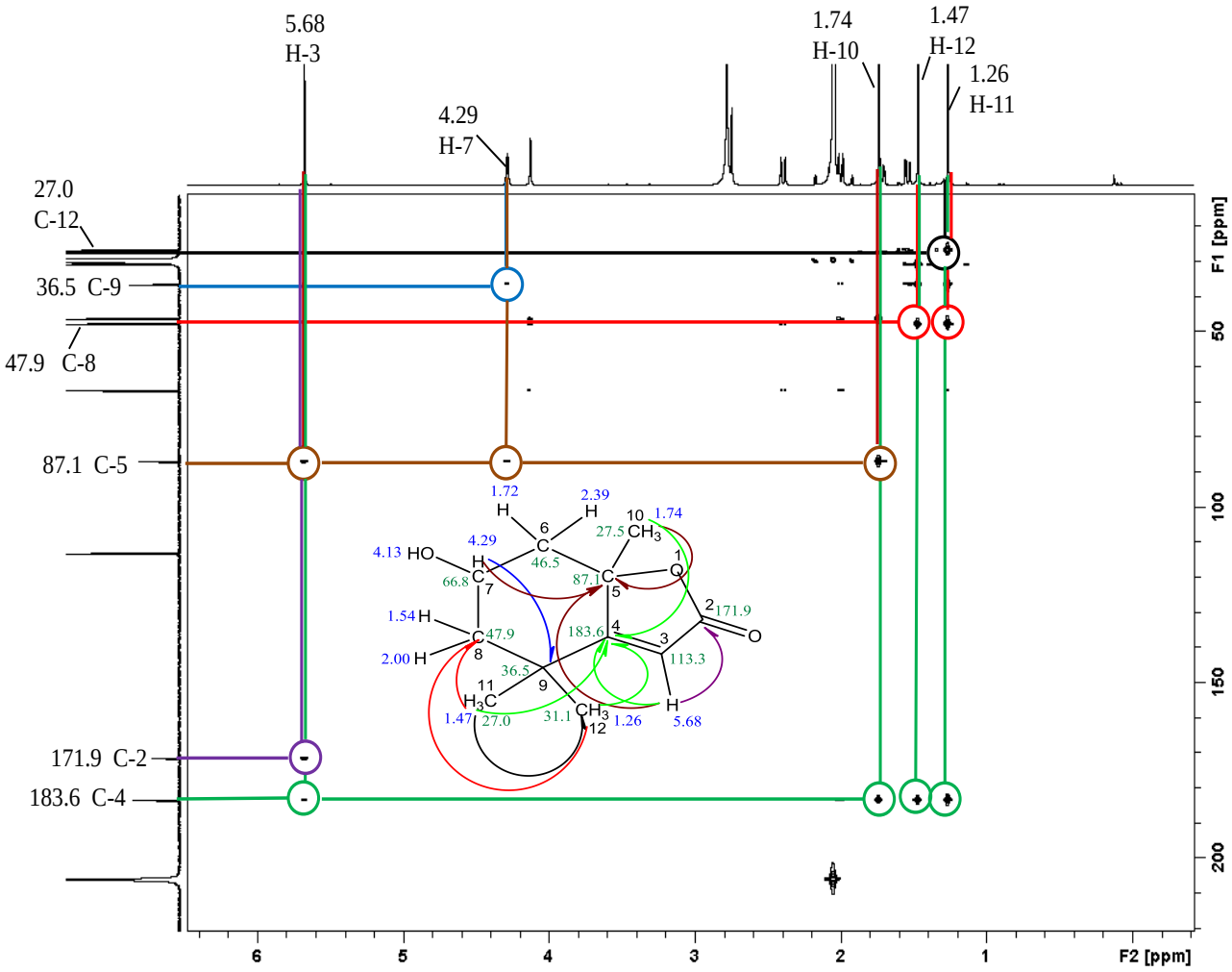


Figure 96 : Spectre HMBC du composé Lep7

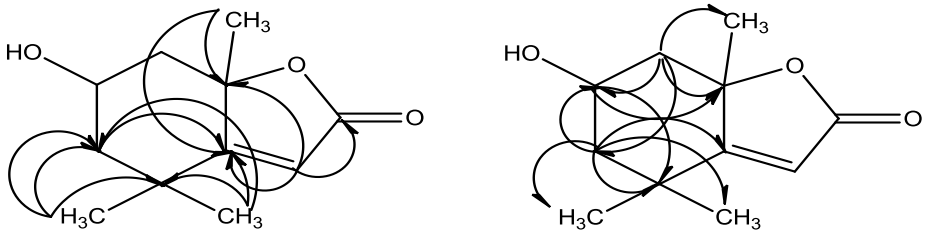


Figure 97 : Corrélations HMBC du composé Lep7

Des spectres NOESY on peut dire que le proton à δ_H 4.29 ppm n'est pas du même côté du plan que les groupements méthyles à δ_H 1.74 et 1.47 ppm. En effet aucune tache de corrélation NOESY n'est visible entre ce proton et les groupements méthyles qui ont entre eux des taches de corrélation NOESY. De plus, ce proton à δ_H 4.29 ppm a des taches de corrélation NOESY avec les protons à δ_H 1.54 et 1.72 ppm. Le proton à δ_H 1.54 ppm a une tache de corrélation NOESY avec le groupement méthyle à δ_H 1.26 ppm, ce qui signifie que le proton à δ_H 4.29 ppm est du même côté du plan que les protons à δ_H 1.54, 1.72 et 1.26 ppm.

Enfin, l'existence d'une tache de corrélation NOESY entre le proton éthylénique à δ_H 5.89 ppm et le groupement méthyle à δ_H 1.26 ppm tend vers la configuration de la molécule suivante :

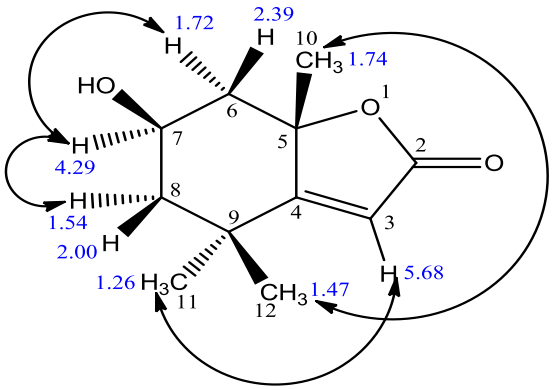


Figure 98 : Principales corrélations NOESY du composé Lep7

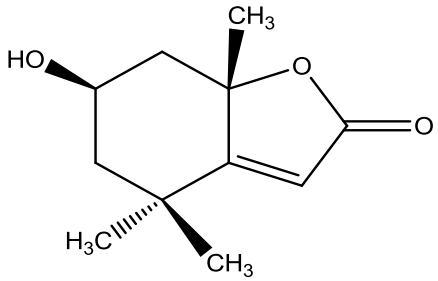


Figure 99 : Structure loliolide du composé Lep7

Ce composé a été isolé de *Medicago sativa* une Fabaceae du genre *Medicago* [194], de *Salvia divinorum* (Lamiaceae) [195], de *Mondia whitei* (Apocynaceae) [196], de *Toona cilita* (Meliaceae) [197], des algues *Undaria pinnatifida* (Alariaceae), *Sargassum ringgoldianum* (Sargassaceae), *Cladostephus spongiosus f. verticillatus* (Cladostephaceae), *Briareum excavatum* (Briareidae) et *Codium Divaricatum* (Codiaceae) [198-202]. Les déplacements chimiques $\delta(^1H)$ et $\delta(^{13}C)$ du composé **Lep7** sont en accord avec ceux de littérature. Ce composé présente des propriétés antioxydantes [202] et antidépressives [196].

4.3.5 Détermination de la structure du composé Lep5

Le composé **Lep5** se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le $CHCl_3$ et l'acétone. En CCM, il donne une tache après révélation à la vanilline sulfurique et une tache au réactif de Liebermann-Burchard (à 365 nm) suggérant un composé de type terpénique.

Spectrométrie de masse

Sur le spectre de masse obtenu IC en mode positif et négatif, nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 474 $[M+NH_4]^+$ et un ion moléculaire à m/z 456 M^- en mode positif. En

mode négatif nous observons un ion quasi-moléculaire à m/z 455 $[M-H]^-$ et un ion moléculaire à m/z 456 M^- suggérant une masse atomique de 456 uma. La comparaison du spectre IE avec ceux de la base de données spectrale indique l'acide oléanolique de formule $C_{30}H_{48}O_3$ (Figure 100).

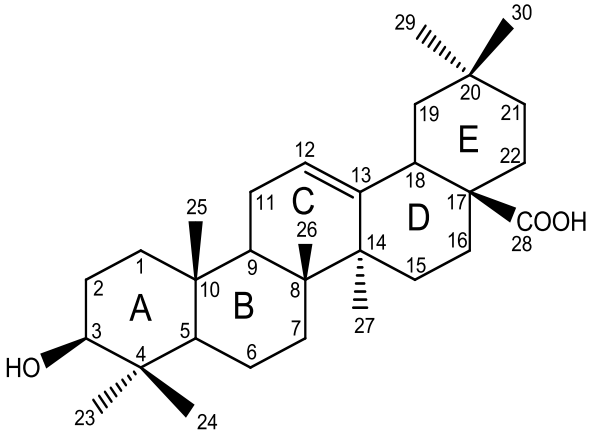


Figure 100 : Acide oléanolique

Spectrométrie RMN

La structure du composé **Lep5** a été établie après analyse des spectres de RMN (voir les détails d'attribution en Annexe) et comparaison des résultats aux données de la littérature [203-205].

L'acide oléanolique (**Lep5)** a été isolé de *Adina rubella* (Rubiaceae) [204], *Psorothamnus arborescens* (Fabaceae) [206], *Sambucus. australis* (Caprifoliaceae) [203], *Salvia divaricata* (Lamiaceae) [205], *Rosa woodsii* (Rosaceae), *Prosopis glandulosa* (Fabaceae), *Phoradendron juniperinum* (Viscaceae), *Syzygium claviflorum* (Myrtaceae), *Hyptis capitata* (Labiatae) et *Ternstroemia gymnanthera* (Theaceae) [207]. Les données spectrales obtenues pour **Lep5** sont en accord avec celles de la littérature. Ce composé est connu pour ses propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes (contre *Staphylococcus aureus* et *Mcrosporium lenosum)*, anticariogène (contre *Streptococcus mutans),* anti-hyperlipidémiques et hépatoprotectrices *in vivo* [208, 209]. Il a également des actions anti-tumorale et antivirale [207, 208]. Il inhibe de façon importante la réplication du VIH-1 dans les cellules H9 infectées avec une valeur CE_{50} de 1.7 µg/mL, et inhibe la croissance des cellules H9 avec une valeur CI_{50} de 21.8 µg/mL [207]. Des résultats suggèrent que l'acide oléanolique améliore l'adiposité viscérale et la tolérance au glucose chez la souris. Il aurait un effet anti-obésité grâce à la modulation du métabolisme des glucides et des lipides [203].

4.3.6 Détermination de structure du composé Lep1

Le composé **Lep1** se présente sous forme d'huile de couleur vert-olive. Ce composé présente une tache fluorescente en UV à 254 et 365 nm laissant envisager la présence de doubles liaisons conjuguées, certainement des cycles aromatiques.

Spectrométrie de masse

Les spectre de masse obtenus en ionisation chimique puis en haute résolution electrospray en mode positif (HRESI+) présentent un ion quasi-moléculaire à m/z 170 $[M+H]^+$ (pour IC) et à m/z 170.09662 $[M+H]^+$ (pour HRESI+) suggérant une masse atomique de 169 uma et une formule brute de $C_{12}H_{11}N$.

La comparaison du spectre de masse IE du composé **Lep1** avec la base de données NIST indique la structure de la diphénylamine de formule brute $C_{12}H_{11}N$

Spectrométrie RMN

Cette structure a été confirmée par les spectres RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, COSY, HSQC et HMBC (voir les détails d'attribution en Annexe).

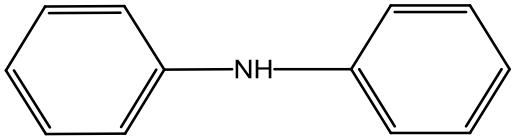


Figure 101 : Structure diphénylamine du composé Lep1

4.3.7 Détermination de la structure du composé Lep2

Le composé **Lep2** se présente sous forme d'huile soluble dans le chloroforme. Il présente une tache fluorescente en UV à 254 et réagit avec le réactif de Liebermann et Burchard en affichant une fluorescence à 365 nm suggérant une structure terpénique.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC du composé **Lep2** indique en mode positif un ion quasi-moléculaire m/z 297 $[M+H]^+$ et un ion moléculaire m/z 296 $M^{+\bullet}$.

Le spectre de masse IE du composé comparé avec ceux de la base de données NIST indique la formule brute $C_{20}H_{40}O$ et la structure du phytol.

Spectrométrie RMN

Toutes les données RMN comparées avec celles se trouvant dans la littérature [210-212] confirment la structure (*E*)-phytol du composé **Lep2** (voir les détails d'attribution en Annexe).

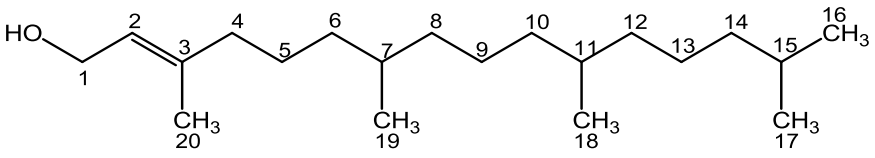


Figure 102 : Structure (*E*)-phytol du composé Lep2

4.3.8 Détermination de la structure du composé Lep4

Le composé **Lep4** se présente sous forme de poudre de couleur jaune champagne soluble dans le chloroforme. Ce composé présente des taches sous lampe Wood à 254 et 365 nm qui laisse envisager la présence de noyau aromatique.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC montre des ions quasi-moléculaire à m/z 123 $[M+H]^+$ en mode positif et à m/z 121 $[M-H]^-$ en mode négatif suggérant une masse atomique de 122 uma et une formule brute de $C_7H_6O_2$.

Le spectre de masse IE du composé **Lep4** comparé avec ceux de la base de données NIST indique la formule brute $C_7H_6O_2$ et la structure 4-hydroxybenzaldéhyde.

Spectrométrie RMN

La structure 4-hydroxybenzaldéhyde du composé **Lep4** est confirmée par les spectres RMN (voir les détails d'attribution en Annexe).

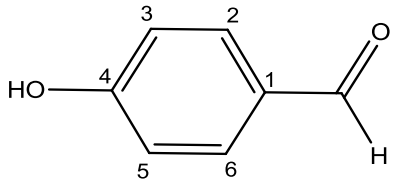


Figure 103 : Structure 4-hydroxybenzaldéhyde du composé Lep4

Le spectre RMN-^{13}C avec édition DEPT90, DEPT135, HSQC et HMBC confirment la structure 4-hydroxybenzaldéhyde du composé **Lep4**. Ce composé a été isolé de *Diplomorpha canescens* (Thymelaeaceae) par Devkota *et al*. en 2012 [213].

4.4 Purification de l'extrait d'acétate d'éthyle L_3

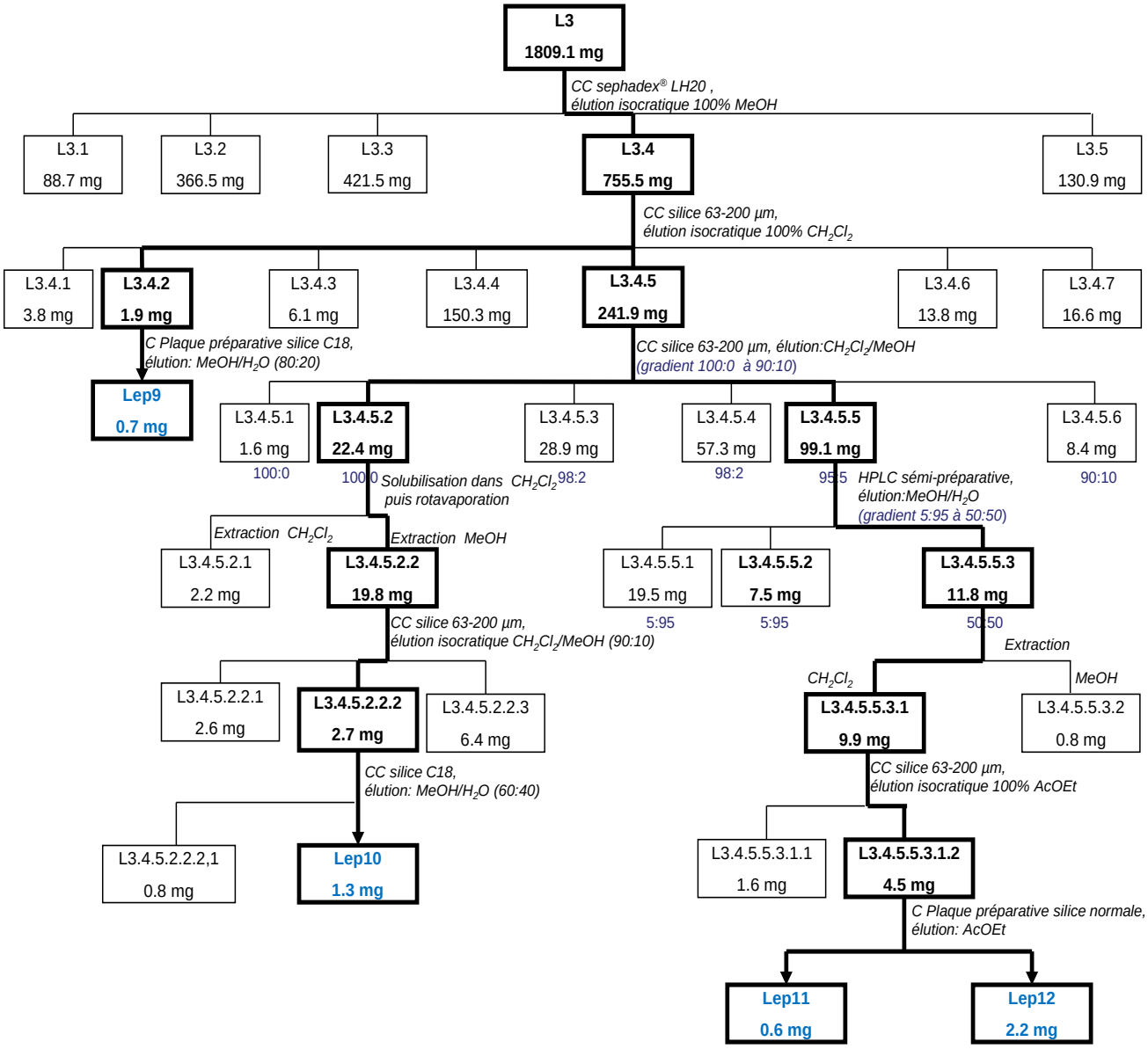


Figure 104 : Schéma de fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle L3

Le schéma de fractionnement de l'extrait L3 est présenté sur la Figure 104.

L'extrait L3 (1809.1 mg) a subi un premier fractionnement par chromatographie d'interaction hydrophobe sur gel de Sephadex® LH20 et a été élué au méthanol pour donner cinq fractions (L3.1 à L3.5). La fraction L3.4 a été soumise à un fractionnement par chromatographie en phase normale sur colonne ouverte éluée à l'aide de CH_2Cl_2 pour donner sept sous fractions (L3.4.1 à L3.4.7).

4.4.1 Isolement de Lep9

La fraction L3.4.2 a été purifiée par à une chromatographie en phase inverse sur plaque préparative éluée par un mélange MeOH/H_2O (80 : 20) pour donner le composé **Lep9**.

4.4.2 Isolement de Lep10, Lep11 et Lep12

La fraction L3.4.5 est traitée par une chromatographie en phase normale sur gel de silice à l'aide d'un gradient CH_2Cl_2/MeOH pour donner six fractions (L3.4.5.1 à L3.4.5.6).

Après solubilisation dans le dichlorométhane et séchage au rotavapor, la fraction L3.4.5.2 a subi une extraction au dichlorométhane puis au méthanol pour donner les sous-fractions L3.4.5.2.1 et L3.4.5.2.2 respectivement. La sous-fraction L3.4.5.2.2 a été purifiée d'abord, par une chromatographie sur colonne en phase normale sur gel de silice éluée par un mélange de CH_2Cl_2/MeOH (90 :10) puis par une chromatographie en phase inverse sur gel de silice C-18 éluée par un mélange de MeOH/H_2O (60 : 40) pour conduire au composé **Lep10**.

La fraction L3.4.5.5 a été fractionnée par HPLC semi-préparative en phase inverse. La phase mobile consistait en un gradient de MeOH/H_2O (5 : 95 et 50 : 50), débit fixé à 2 mL/min. Trois fractions sont ainsi recueillies (L3.4.5.5.1 à L3.4.5.5.3) en 20 minutes. La fraction L3.4.5.5.3 a subi une extraction au dichlorométhane puis au méthanol pour donner les sous-fractions L3.4.5.5.3.1 et L3.4.5.3.2 respectivement. La sous-fraction L3.4.5.5.3.1 a subi une chromatographie sur colonne en phase normale et une chromatographie en phase normale sur plaque préparative éluées à l'aide de l'acétate d'éthyle pour donner les composés **Lep11** et **Lep12**.

4.5 Détermination structurale des composés isolés de L3

4.5.1 Détermination de la structure du composé Lep9

Le composé **Lep9** se présente sous la forme de cristaux blancs. En CCM, il présente une tache orange avec le révélateur vanilline sulfurique. Ce composé réagit avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence verte en UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde

Spectrométrie de masse

Les spectre de masse obtenu en ionisation chimique puis en haute résolution electrospray en mode positif (HRESI+) présentent un ion quasi-moléculaire à m/z 211 $[M+H]^+$ (pour IC) et à m/z 233.09399 $[M+Na]^+$ (pour HRESI+) suggérant une masse atomique de 210 uma et une formule brute de $C_{15}H_{14}O$.

Spectrométrie RMN

Sur le spectre RMN-^{1}H réalisé dans l'acétone-d6 (Figure 105) nous observons :

-un massif d'intensité 2H entre δ_H 7.99-8.05 ppm attribuables à 2CH aromatiques équivalents ;

- un triplet détriplé d'intensité 1H à δ_H 7.61 ppm (^3J = 7.4 Hz et ^4J = 1.3 Hz) caractéristique d'un CH aromatique d'un phényle monosubstitué ;

- un massif d'intensité 2H entre δ_H 7.48-7.54 ppm attribuables à 2CH aromatiques équivalents ;

- un massif d'intensité 4H entre δ_H 7.24-7.34 ppm correspondant à quatre protons aromatiques équivalents deux à deux ;

- un triplet détriplé d'intensité 1H à δ_H 7.17 ppm (^3J = 7.0 Hz et ^4J=1.6 Hz) caractéristique d'un CH aromatique d'un phényle monosubstitué ;

- un couple de triplets d'intensité chacun 2H, couplant entre eux avec la même constante de couplage, à δ_H 3.37 ppm (^3J = 7.6 Hz) et à δ_H 3.03 ppm (^3J = 7.6 Hz) sont attribuables au fragment -CH_2-CH_2-.

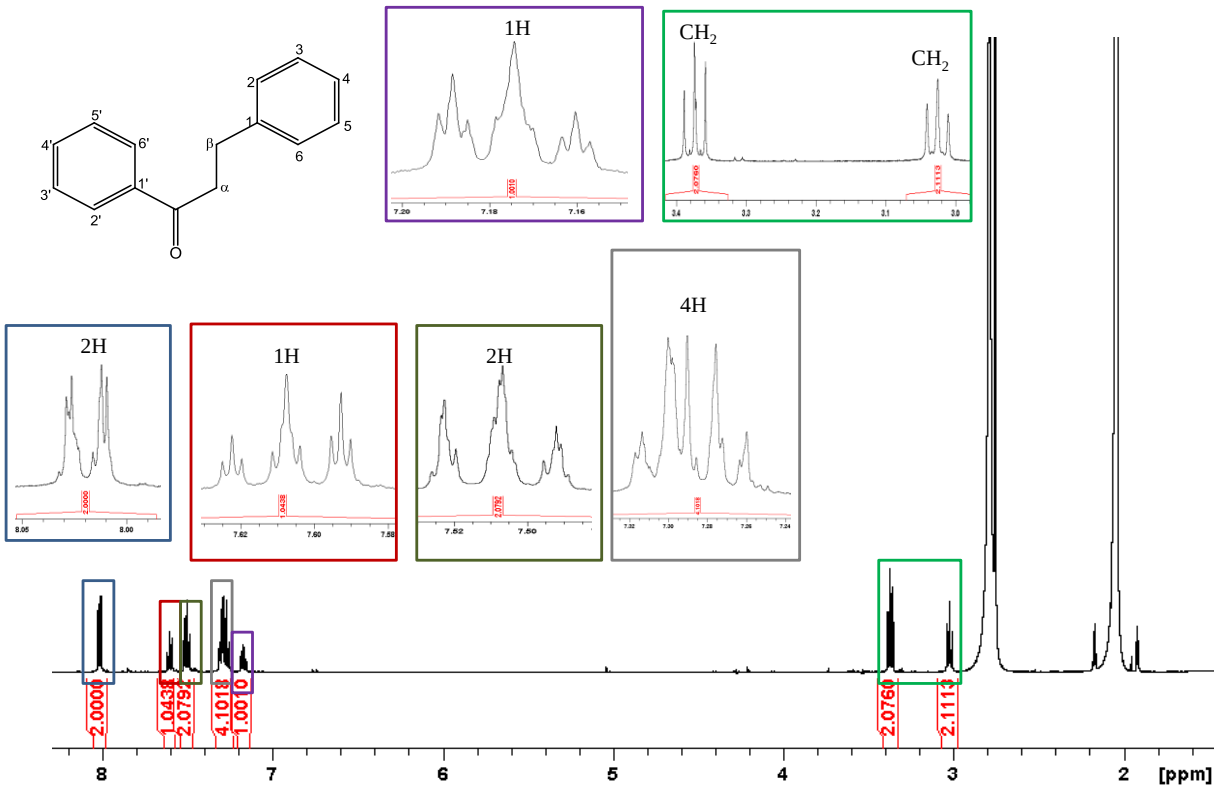


Figure 105 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep9 dans l'acétone-d6

Les motifs suivants peuvent être déduits du spectre RMN-^{1}H et du spectre COSY :

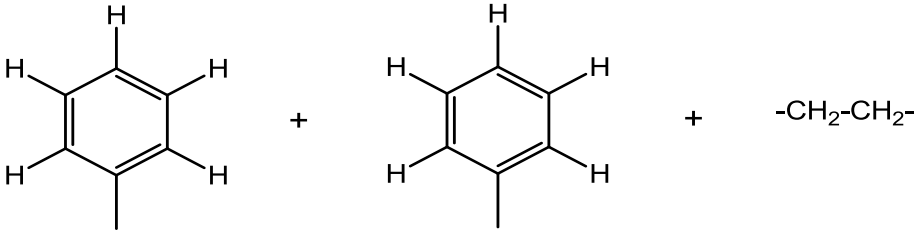


Figure 106 : Motifs du composé Lep9 obtenus à partir des spectres RMN-^{1}H et COSY

Le spectre RMN-^{13}C avec édition spectrale DEPT90 et DEPT135 présente 11 signaux RMN-^{13}C dont 3 carbones quaternaires (dont 1CO et $2C_{IV}$ aromatiques), 6 CH aromatiques et $2CH_2$.

Vu la formule brute $C_{15}H_{14}O$, le nombre d'insaturations de 9, la présence d'un groupement carbonyle et l'ensemble des données précédentes, nous permet d'identifier le composé **Lep9** comme étant la dihydrochalcone.

Les différentes taches de corrélations en HSQC et en HMBC ont permis d'attribuer les déplacements chimiques des carbones et des protons du composé **Lep9**.

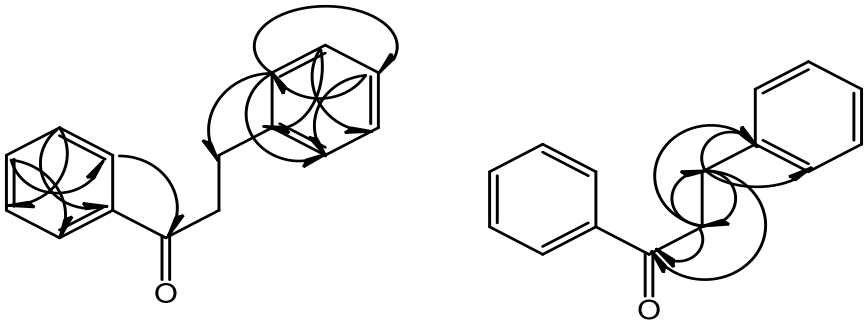


Figure 107 : Corrélation HMBC du composé Lep9

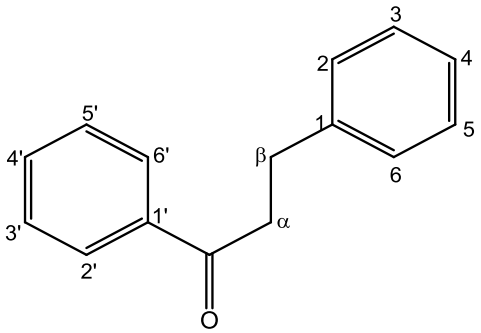


Figure 108 : Structure dihydrochalcone du composé Lep9

Le composé **Lep9** est un nouveau produit naturel isolé pour la première fois d'une plante. Cependant il a été synthétisé par Martĭnez *et al*. en 2006 [214] qui ont présenté des données spectrales (δ_H et δ_C) comparables avec celles du composé **Lep9**.

4.5.2 Détermination de la structure du composé Lep11

Le composé **Lep11** se présente sous la forme de cristaux beiges solubles dans l'acétone et le méthanol. Il est visible en UV 254 nm sur plaque CCM.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC du composé **Lep11** indique un in quasi-moléculaire à m/z 167 $[M-H]^-$ en mode négatif et un ion moléculaire à m/z 168 $M^{+\bullet}$ en mode positif proposant une masse atomique de 168 uma et une formule brute $C_8H_8O_4$.

Spectrométrie RMN

L'analyse du spectre RMN-^{1}H (Figure 109) montre :

- un large massif de type proton échangeable à δ_H 7.9-8.8 ppm attribuable à un groupement hydroxyle ;

- un proton aromatique à δ_H 7.59 ppm (*dd*, ^3J = 8.20Hz et ^4J = 1.90Hz) couplant avec deux autres protons aromatiques en *ortho* et en *méta* ;

- un proton aromatique à δ_H 7.56 ppm (*d*, ^4J = 1.90Hz) couplant en *méta* ;

- un proton aromatique à δ_H 6.91 ppm (*d*, ^3J = 8.20Hz) couplant en *ortho* ;

- un groupement méthoxyle sous forme de singulet à δ_H 3.91 ppm.

Le spectre RMN-^{1}H donnant au total trois protons aromatiques laisse envisager un noyau benzénique trisubstitué.

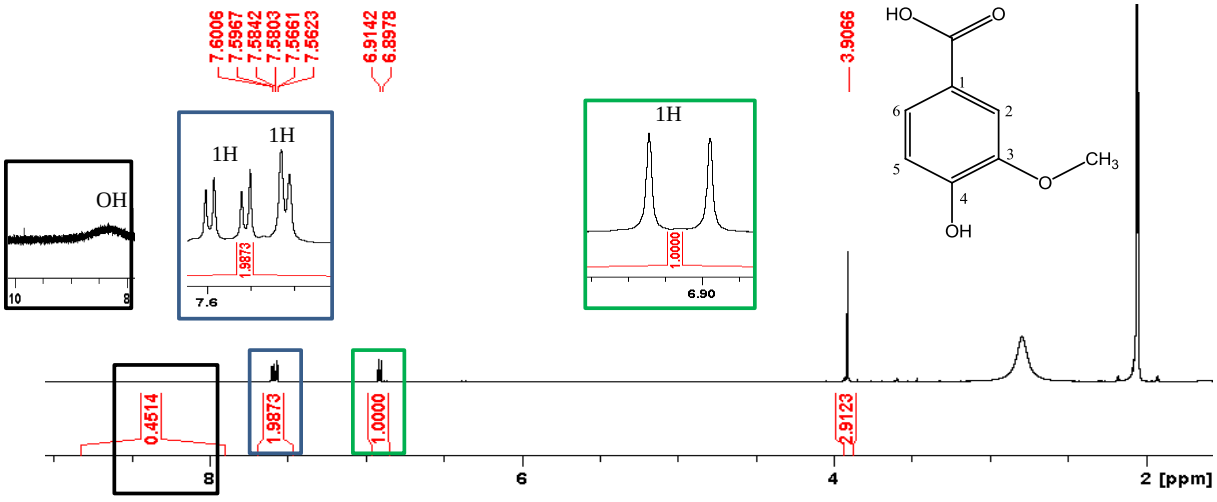


Figure 109 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep11 dans l'acétone-d6

Les spectres RMN-^{13}C, HSQC et les éditions spectrales DEPT90, DEPT135 présentent huit signaux carbone dont un CH_3, trois CH aromatiques et quatre carbones quaternaires dont un carbonyle. Au vu des intégrales protons, du nombre de carbone et de la formule brute ($C_8H_8O_4$) cela laisse supposer un cycle aromatique tri-substitué (de type vanilline) ayant pour substituant un groupement acide carboxylique COOH, un groupement hydroxyle OH et un groupement méthoxyle OCH_3.

Le spectre RMN-2D HMBC montre que les protons du groupement méthoxyle à δ_H 3.91 ppm corrèlent avec le carbone à δ_C 148.09 ppm qui corrèle à son tour avec les protons à δ_H 6.91 et à δ_H 37.56 ppm. De plus les corrélations observées entre le carbone à δ_C 167.48 ppm du groupement COOH et les deux protons à δ_H 7.59 ppm et 7.56 ppm du cycle aromatique, suggèrent que le composé **Lep11** est l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (acide vanillique) (Figure 110).

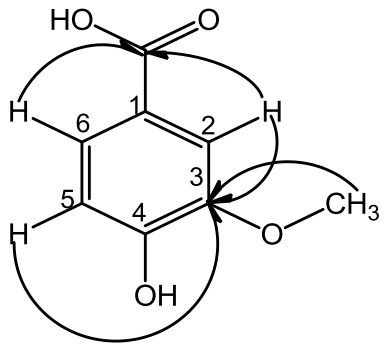


Figure 110 : Structure et principale corrélations HMBC du composé Lep11

Ce composé a été identifié de *Melittis melissophyllum* par Skrzypczak-Pietraszek *et al*. [215] et isolé des racines de *Cynanchum paniculatum* par Weon et al. [216]. Il a été aussi obtenu par conversion de l'acide *trans*-férulique dans les cellules *Rhodotorula rubra* [217].

4.5.3 Détermination de la structure du composé Lep10

Le composé **Lep10** a été obtenu sous forme de cristaux de couleur beige solubles dans le méthanol. En CCM, il est visible en UV 254 nm.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC obtenu en mode négatif indique un ion quasi-moléculaire à m/z 121 $[M-H]^-$ suggérant une masse atomique de 122 uma.

La comparaison du spectre de masse IE du composé **Lep10** avec ceux de la base de données NIST indique l'acide benzoïque de formule brute $C_7H_6O_2$.

Spectrométrie RMN

Les spectres RMN-^{1}H, RMN-^{13}C, HSQC et HMBC confirment la structure acide benzoïque du composé **Lep10** (voir les détails de l'attribution dans l'Annexe). Ce composé a été isolé des rhizomes d'*Anemarrhena asphodeloides* (Liliaceae) par Youn *et al*. en 2010 [218].

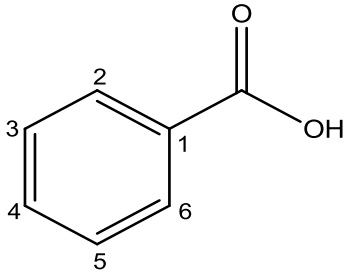


Figure 111 : Structure d'acide benzoïque du composé Lep10

4.5.4 Détermination de la structure du composé Lep12

Le composé **Lep12** a été obtenu sous forme de cristaux de couleur marron-claire solubles dans le méthanol et l'acétone. En CCM, il est visible en UV 254 et 365 nm.

Spectrométrie de masse

Le spectre de masse IC du composé **Lep12** obtenu en mode négatif indique un ion quasi-moléculaire à m/z 137 $[M-H]^-$ proposant une masse atomique de 138 uma.

La comparaison du spectre de masse IE du composé **Lep10** avec ceux de la base de données NIST indique l'acide 2-hydroxybenzoïque de formule brute $C_7H_6O_3$.

Spectrométrie RMN

Les données RMN confirment la structure acide 2-hydroxybenzoïque du composé **Lep12**. Ce composé a été isolé de *Lolium multiflorum* une espèce de la famille des Poaceae [219].

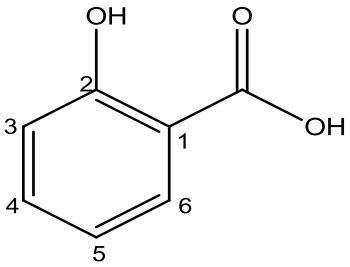


Figure 112 : Structure de l'acide 2-hydroxybenzoïque du composé Lep12

5 Tests biologiques des composés isolés de *C. odorata*

5.1 Effets sur la viabilité cellulaire

Les composés isolés **Chrom2** (C2) et **Chrom3** (C3) de *C. odorata* ont été testés sur les lignées cellulaires du cancer du sein Cal51, MCF7, et la lignée cellulaire du cancer du col de l'utérus HeLa, afin de voir leurs effets sur la viabilité cellulaire.

Le resvératrol inducteur d'apoptose est utilisé comme contrôle positif. La viabilité a été évaluée par dosage de l'ATP.

Aucun effet significatif n'a été observé pour **Chrom3** sur la viabilité cellulaire (Figure 113). Toutefois, la chalcone **Chrom2** à 20 µM diminue significativement la viabilité cellulaire de Cal51, MCF7, et les cellules HeLa de 19, 18 et 30% respectivement (Figure 113). L'effet de **Chrom2** est nettement supérieur à celui du resvératrol pour les lignées MCF7 et HeLa.

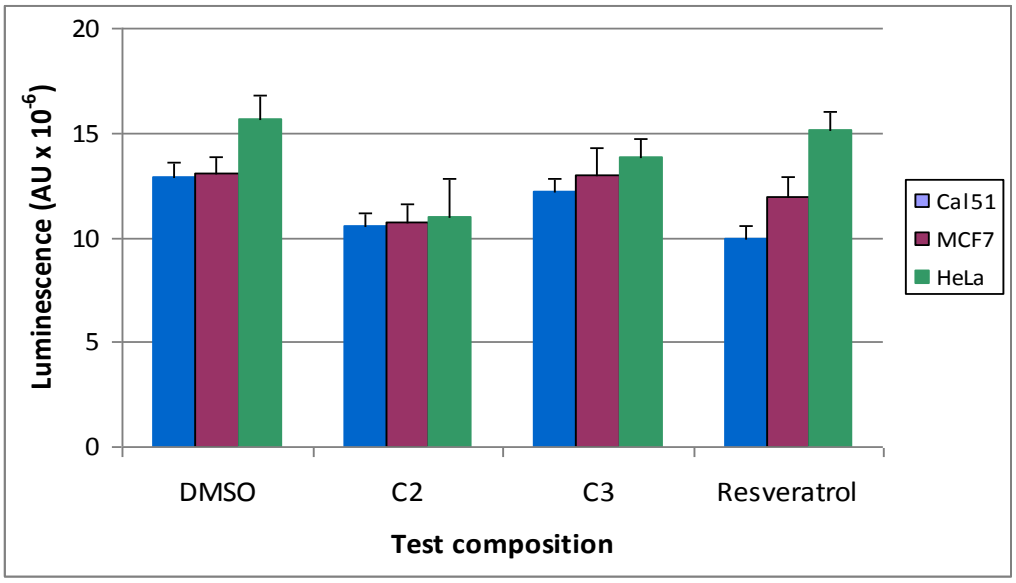


Figure 113 : Effet des composés isolés sur la viabilité des cellules. Cellules traitées avec 20 µM chalcone (C2), 20 µM cadalène (C3) ou 20 µM resvératrol pendant 48 h, puis l'ATP a été quantifiée en utilisant le test de viabilité CellTiter Glo®

Des travaux ont montré une activité non cytotoxique de la chalcone contre les lignées cellulaires cancéreuses KB, BC ou NCI-H187 même lorsqu'elles sont exposées à plus de 58 µM [34], indiquant une certaine sélectivité des lignées cellulaires. Par ailleurs Deng *et al*. [118] n'ont signalé aucune cytotoxicité contre les cellules MCF7 pour une autre chalcone (2'-hydroxy-4,4',6'-triméthoxychalcone) étroitement liée à **Chrom2**. Ce qui indiquerait un rôle potentiellement important du groupement 5'-méthoxyle. Toutefois, la cytotoxicité de **Chrom2**

est comparable à celle rapportée pour les flavonoïdes glycosides des feuilles de *C. odorata* [121].

5.2 Effets sur l'apoptose

Les composés **Chrom2**, **Chrom3** et le resvératrol ont été testés contre la lignée Cal51 au cours de trois expériences indépendantes.

Seul le resvératrol a induit un effet apoptotique important en agent simple (Figure 114). Toutefois lorsque la chalcone **Chrom2** (10 µM) est couplée avec ABT737 (1 µM) (l'inhibiteur de BH3-mimétique Bcl2/BclxL : voir mode d'action et structure dans le paragraphe **5.2.2**), on observe une augmentation de l'effet apoptotique 3 fois supérieur à celui de la chalcone ou de l'ABT737 seuls, indiquant un effet synergique significatif (Figure 114). L'ampleur de cet effet synergique sur l'induction de l'apoptose pour cette lignée est équivalente à celle du resvératrol.

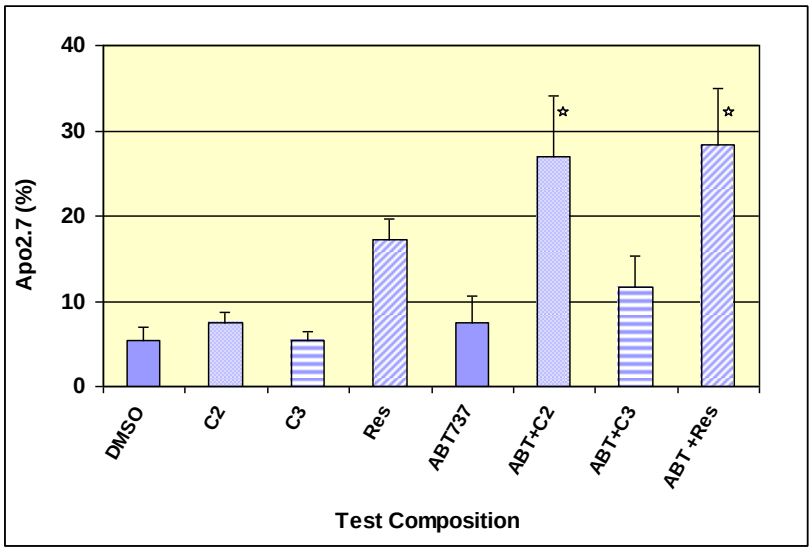


Figure 114 : Effet des composés isolés sur l'apoptose. Cellules Cal51 ont été traitées avec 20 µM de chalcone (C2), cadalène (C3) ou le resvératrol (Res) pendant 48 h en combinaison ou non avec l'activité pharmacologique inhibiteur de Bcl2/BclxL ABT737 (Selleck) à 1 µM. Puis les cellules ont été récupérées et analysées par cytométrie de flux après immunomarquage Apo2.7. Les données (% de cellules positives Apo2.7) sont la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres représentent l'écart type = effet significatif par rapport au composé seul ($p < 0.05$)

Afin de mieux comprendre l'efficacité des composés comme agents simples contre une gamme de types de cellules cancéreuses, les tests ont été effectués sur des lignées cellulaires du cancer du sein MCF7, MDA-MB-231, BT549, U251, et HTC116 sans réplication. Aucun effet significatif n'a été observé en agent simple ou en combinaison pour tous les composés isolés.

5.3 Effets sur la clonogénéicité des cellules

Les effets sur la viabilité à long terme des lignées cellulaires de cancer du sein MCF7, Cal51 et MDA-MB-468 de **Chrom2**, **Chrom3** et du resvératrol ont été évalués pour leur influence sur la clonogénéicité durant une incubation de 14 jours. Les tests ont été effectués à 10, 20 et 50 µM de produits dans des plaques de culture à 6 puits. Le resvératrol inhibe fortement la formation de colonies pour toutes les lignées (Figure 115). La chalcone **Chrom2** (C2) a montré une inhibition dose-dépendante contre les trois lignées. En revanche, aucun effet du cadalène **Chrom3** (C3) n'a été constaté.

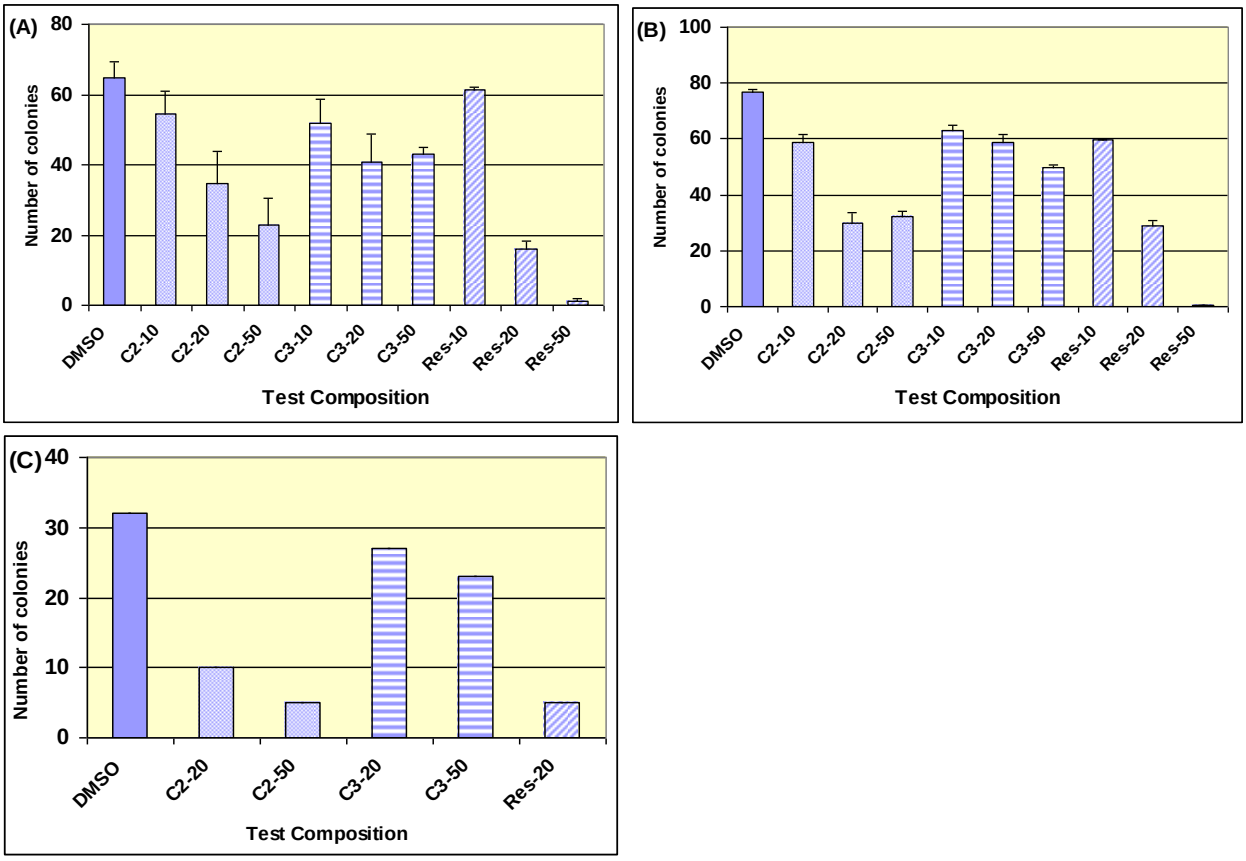


Figure 115 : Effet des composés isolés de feuilles de *C. odorata* sur la clonogénéicité des cellules. Tests de clonogénéicité effectués par incubation des lignées cellulaires (A) Cal51, (B) MCF7 ou (C) MDA-MB-468 avec 10, 20 ou 50 µM de la chalcone (C2), cadalène (C3) ou le resvératrol (Res) pendant 14 jours. Les colonies sont mises en évidence au Crystal Violet et dénombrées manuellement. Pour (A) et (B), les données (nombre de colonies) sont la moyenne de 4 expériences indépendantes. La barre représente l'écart-type. Pour (C), un seul test a été effectué

La chalcone 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcone (**Chrom2**) diminue la viabilité cellulaire des lignées du cancer du sein Cal51, MCF7, et la lignée cellulaire du cancer du col de l'utérus HeLa. Son effet est plus important sur les cellules MCF7 et HeLa par rapport à celui du resvératrol qui est une molécule déjà connue pour son activité anticancéreuse.

Concernant l'effet apoptotique contre la lignée Cal51, lorsque la chalcone **Chrom2** est couplée avec l'ABT737, nous constatons une augmentation de l'effet apoptotique 3 fois supérieur à celui de la chalcone ou de l'ABT 737 seuls, indiquant un effet synergique significatif. Cet effet synergique sur l'induction de l'apoptose pour cette lignée est équivalent à celui du resvératrol.

Chrom2 montre une inhibition dose-dépendante contre la formation de colonies pour les lignées cellulaires de cancer du sein MCF7, Cal51 et MDA-MB-468.

Conclusion générale

Les plantes restent la source prédominante de médicaments pour la majorité de la population mondiale, en particulier dans les pays en voie de développement. Environ 40 % des médicaments sont ainsi dérivés de la nature [220]. Dans le cas de la lutte contre les affections d'origine inflammatoire, l'utilisation des AINS avec ses effets secondaires par la médecine conventionnelle, encourage la recherche de nouvelles molécules antiinflammatoires issues de la biodiversité végétale.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire de chimie organique et biologique (Université de Cocody-Abidjan) dont l'un des objectifs est de découvrir de nouveaux principes actifs afin de valoriser les plantes utilisées en médecine traditionnelle en Côte d'Ivoire.

Le but de ce travail était d'isoler des métabolites secondaires volatils et non volatils, de les identifier et de leur attribuer des propriétés biologiques par des tests activités biologiques. Nous avons présenté les résultats de l'étude phytochimique des quatre plantes *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Robinson, *Morinda morindoides* Baker, *Morinda lucida* Benth et *Leptoderris fasciculata* (Benth.) Dunn.

Chromolaena odorata

L'étude des rendements en huiles essentielles montre que les feuilles d'Abidjan-centre (Cocody) et d'Abidjan-ouest (Yopougon) sont riches en huiles essentielles durant toute l'année. Tandis que celles provenant d'Abidjan-nord (Abobo) sont pauvres en huiles essentielles. Nous notons globalement une influence de la saison sur le rendement. Cette influence est plus forte pour les feuilles d'Abidjan-sud (Port-Bouët) avec une forte diminution de la teneur en huiles essentielles en saison pluvieuse.

L'étude de l'effet de la durée de stockage des feuilles sur la teneur en huiles essentielles, montre une perte d'huiles pour tous les sites de récoltes sauf Abidjan-centre dont les feuilles résistent aux processus de dégradation.

Les compositions chimiques des huiles essentielles des cinq sites géographiques de récolte, montrent que les huiles essentielles d'Abidjan-ouest (yopougon), Abidjan-nord (Abobo), Abidjan-est (Akouédo) et Abidjan-centre (Cocody) contiennent plus de sesquiterpènes et donc seront plus larvicides et pesticides [159, 160]. Les huiles d'Abidjan-nord et Abidjan-est (Akouédo) pourront présenter aussi plus de propriétés antiinflammatoires, antiseptiques et antivirales que les autres sites en raison de la quantité plus élevée en α-pinène [159]. Ce composé expliquerait l'emploi de la décoction des feuilles de cette plante dans le traitement traditionnel, en Côte d'Ivoire, des douleurs abdominales, céphalées et du paludisme qui sont des maux impliquant des phénomènes inflammatoires.

L'étude phytochimique de l'extrait hexanique des feuilles *C. odorata* a permis d'isoler deux flavonoïdes la 5-hydroxy-7,4'-diméhoxyflavanone (**Chrom1**) et la 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcone (**Chrom2**) et un terpenoïde le cadalène (**Chrom3**). Le cadalène n'a jamais été isolé de cette plante et c'est la première fois que les données spectrales RMN-^{1}H et RMN-2D sont obtenues.

Des données récentes ont élargi le concept que l'inflammation est une composante essentielle de la progression tumorale. De nombreux cancers résultent de sites d'infection, d'une irritation chronique et de l'inflammation. Il est désormais clair que le microenvironnement de la tumeur, qui est largement orchestré par les cellules inflammatoires, est un participant indispensable dans le processus néoplasique, favorisant la prolifération, la survie et la migration [4]. Le lien étroit entre inflammation et cancer pourrait suggérer des propriétés anticancéreuses aux molécules isolées de *C. odorata*. L'étude d'activité anticancéreuse réalisée était de mettre en évidence les effets des molécules isolées (**Chrom2** et **Chrom3**) sur la viabilité cellulaire, l'apoptose et sur la clonogénéicité des cellules cancéreuses de différentes lignées.

La chalcone 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcone (**Chrom2**) diminue la viabilité cellulaire des lignées du cancer du sein Cal51, MCF7, et la lignée cellulaire du cancer du col de l'utérus HeLa. Son effet est plus important sur les cellules MCF7 et HeLa par rapport à celui du resvératrol qui une molécule connue pour son activité anticancéreuse.

Concernant l'effet apoptotique contre la lignée Cal51, lorsque la chalcone **Chrom2** est couplée avec l'ABT737, nous constatons une augmentation de l'effet apoptotique 3 fois supérieur à celui de la chalcone ou de l'ABT 737 seuls, indiquant un effet synergique significatif. Cet effet synergique sur l'induction de l'apoptose pour cette lignée est équivalent à celui du resvératrol.

Chrom2 montre une inhibition dose-dépendante contre la formation de colonies pour les lignées cellulaires de cancer du sein MCF7, Cal51 et MDA-MB-468.

Morinda morindoides

L'étude des huiles essentielles des feuilles de *M. morindoides* montre que le rendement en huiles essentielles est comparable à celui de *C. odorata*, une célèbre plante aromatique et anti-inflammatoire utilisée comme antipaludéen en Côte d'Ivoire [21]. De plus, le constituant prédominant de ses huiles, l'*E*-phytol (28.4%), présente d'excellentes activités antibactérienne et antivirale [168-171] qui pourraientt justifier l'emploi de la décoction des feuilles dans plusieurs traitements traditionnels comme la diarrhée, la rougeole, la varicelle etc.

Morinda lucida

L'étude phytochimique des métabolites secondaires volatils de *M. lucida* présente pour la première fois la composition chimique des huiles essentielles des fruits de cette plante, avec le phytol (14.8%) et *n*-octanol (6.2%) comme constituants majoritaires.

La composition chimique des huiles essentielles des feuilles est différente de celles extraites des feuilles du Nigeria. En effet, nous avons un chémotype particulier à phytol (33.2%) et pentadécanal (9.9%) alors que celles du Nigeria indiquaient un chémotype à α-terpinène (17.8%) et β-bisabolène (16.3%) [79].

La teneur en phytol des huiles des feuilles de cette espèce est plus élevée que celle des feuilles de *M. morindoides*. Les huiles de *M. lucida* pourraient donc avoir des activités antivirale et antibactérienne plus importante [168-171]. Ces activités justifieraient l'usage traditionnel de la décoction des feuilles dans le traitement de maux accompagnés de fièvre comme le paludisme en Côte d'Ivoire.

L'étude phytochimique orientée vers les composés non volatils a permis d'isoler et d'identifier trois anthraquinone 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone (**Mor1**), alizarin-1-méthyléther (**Mor2**) et 1,5,15-triméthylmorindol (**Mor3**). Cette étude a permis, pour la première fois, de différencier les protons H-5 et H-8, les carbones C-6 et C-7 et d'obtenir les données RMN-^{13}C, HMBC, HSQC pour le composé 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone.

L'anthraquinone 1,5,15-triméthylmorindol (**Mor3**) démontrant une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses de la lignée leucémique humaine T [174] justifierait l'emploi traditionnel des écorces contre diverses manifestations inflammatoires par le lien étroit entre inflammation et cancer [4].

Leptoderris fasciculata

L'étude phytochimique de *L. fasciculata* est réalisée ici pour la première fois. Elle a permis d'isoler et d'identifier 12 composé dont 3 flavonoïdes 4',5,6,7-tetramethoxyisoflavone (**Lep6**), 7-hydroxy-4',5,6-triméthoxyisoflavone (**Lep8**) et la dihydrochalcone (**Lep9**) ; 2 triterpènes le lupéol (**Lep3**) et l'acide oléanolique (**Lep5**) ; 3 acides phénoliques l'acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque ou acide vanillique (**Lep11**), acide 2-hydroxybenzoïque (**Lep12**) et l'acide benzoïque (**Lep10**) ; un diterpène l'*E*-phytol (**Lep2**) ; un monoterpène le loliolide (**Lep7**) ; une diphénylamine (**Lep1**) et un hydroxybenzaldéhyde le 4-hydroxybenzaldéhyde (**Lep12**).

Dans cette étude deux nouvelles molécules naturelles 4',5,6,7-tetrameéhoxyisoflavone (**Lep6**) et dihydrochalcone (**Lep9**) ont été isolées pour la première fois d'une plante.

Le loliolide (**Lep7**) est connu pour ses propriétés antidépressives [196] et antioxydantes [202].

De plus l'acide oléanolique (**Lep5**) a des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, anti-cariogène, anti-hyperlipidémiques et hépatoprotectrices *in vivo* [208, 209]. Il a également des actions anti-tumorale, antivirale [207, 208] et anti-obésité [203]. Toutes ces activités biologiques font de *L. fasciculata* une potentielle plante médicinale renfermant de puissants principes actifs.

D'autres composés devront être isolés des extraits polaires (extrait de méthanol) pour les différentes espèces étudiées et particulièrement pour *Leptoderris fasciculata*.

Des tests biologiques anticancéreux, antiviraux et antibactériens devront être réalisés pour les différents métabolites secondaires isolés. Une étude devra être menée pour identifier les sites des molécules actives afin de comprendre leur mode d'action.

Par ailleurs, une fois les activités biologiques des composés seront connues, il serait intéressant de développer des voies de synthèse ou d'hémi-synthèse afin d'obtenir une quantité importante de principes actifs ou d'augmenter leurs activités biologiques.

Partie 4 : Matériels et méthodes

1 Matériel végétal et extraction

1.1 Matériel végétal

Les 4 plantes de cette étude ont été récoltées en Côte d'Ivoire et identifiées par le botaniste ivoirien, le Pr Aké-Assi du Centre National de Floristique de l'Université de Cocody-Abidjan. Les récoltes ont été faites en avril 2008, dans les forêts secondaires de Gagnoa (Centre-ouest de la Côte d'Ivoire) pour *Morinda morindoides* et *Morinda lucida*, d'Agboville (Sud-est de la Côte d'Ivoire) pour *Leptoderris fasciculata* et à Abidjan pour *Chromolaena odorata*.

Pour l'étude du chémotype des huiles essentielles de *Chromolaena odorata*, les feuilles ont été récoltées en début de matinée (8h00) dans cinq sites géographiques de la ville Abidjan : Cocody (Abidjan-Centre), Yopougon (Abidjan-Ouest), Port-Bouët (Abidjan-Sud), Abobo (Abidjan-Nord) et d'Akouédo (Abidjan-Est). Les récoltes ont été réalisées pendant la saison des pluies (mai-Juin) et pendant la saison sèche (décembre-janvier).

Afin d'étudier l'effet du stockage sur les rendements en huiles, 2 kg de feuilles fraîches ont été récoltées pour chacun des 5 sites. Chaque lot de feuilles fraîches a été divisé en 4 parties de 500 g et conservées à température ambiante (environ 25°C).

1.2 Protocole d'extraction

1.2.1 Huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par entraînement à la vapeur à l'aide d'un appareil de type Clevenger. 500 g de matières végétales est placé sur une grille métallique sous laquelle se trouve de l'eau à ébullition pendant 2h. Les huiles sont entraînées par la vapeur. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmonte l'eau dans l'ampoule à décanter. L'huile séparée de l'eau est séchée par congélation puis par le sulfate de magnésium, et conservée à 0°C.

1.2.2 Extraits bruts totaux

1.2.2.1 *Traitement préliminaire*

Les feuilles ou écorces ont été séchées à température ambiante au laboratoire à l'abri de la lumière et pulvérisées à l'aide d'un broyeur concasseur Retsch® avec un tamis de 0,5 mm. Cette poudre est conservée à l'étuve (30°C).

1.2.2.2 *Extraction à partir du matériel végétal*

Deux méthodes d'extractions ont été utilisées : extraction liquide-liquide pour *C. odorata* et extraction solide-liquide pour *M. lucida* et *L. fasciculata*.

Extraction liquide-liquide à partir des feuilles de C. odorata

L'extraction des produits non volatils est réalisée à partir de 3 kg de poudre des feuilles séchées macérée dans l'éthanol à 80 % à température ambiante pendant 72 heures. L'extrait éthanolique dilué obtenu, est ensuite dégraissé à l'hexane par extraction liquide-liquide. La fraction hexanique obtenue est appelée C1 (67.2 g). L'extrait éthanolique dégraissé est évaporé à siccité puis le résidu, solubilisé dans l'eau, est partagé par extraction liquide-liquide entre le dichlorométhane et l'eau puis entre l'acétate d'éthyle et l'eau. Les fractions de dichlorométhane et d'acétate d'éthyle obtenues sont nommées C2 (81.7 g) et C3 (78.8 g) respectivement. Après passage de l'acétate d'éthyle, le résidu est séché à siccité à l'étuve à 40 °C. Enfin la fraction éthanolique C4 (82.0 g) est obtenue par macération dans l'éthanol (99 %) du résidu séché à l'étuve. Chaque extraction est répétée 3 fois. La Figure 116 décrit le processus d'obtention des différents extraits. Dans cette étude, seul l'extrait C1 a été soumis à une investigation phytochimique plus approfondie.

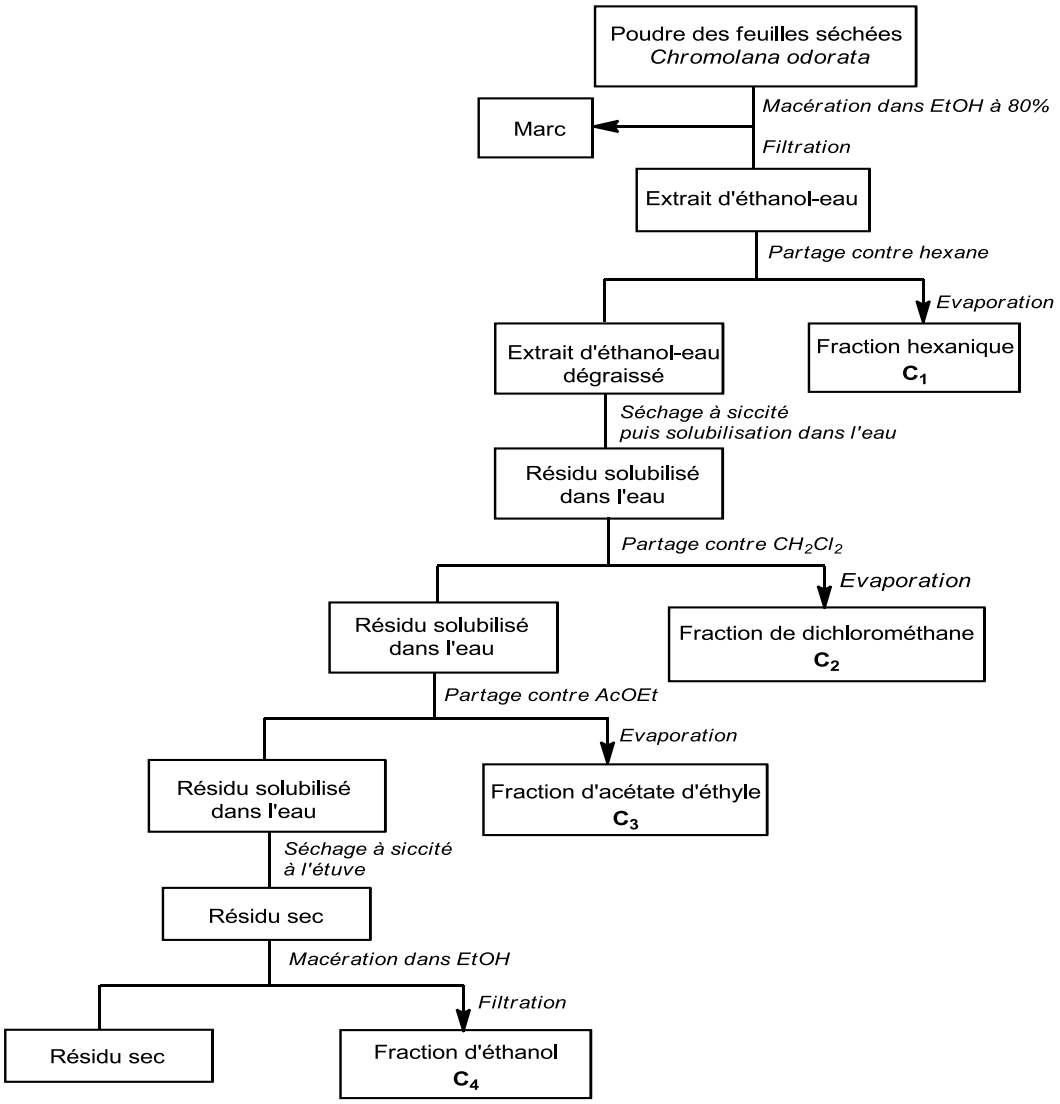


Figure 116 : Schéma d'extraction des fractions C1 à C4

Extraction solide-liquide à partir des écorces de M. lucida et des feuilles de L. fasciculata

L'extraction primaire, à partir du matériel végétal séché et broyé (500g pour *L. fasciculata* et 100g pour *M. lucida*), est réalisée par macération, en utilisant l'hexane. Après filtration et évaporation à sec du solvant, l'extrait hexanique obtenu est nommé F1. Le marc issu de cette extraction est mis à macérer dans le dichlorométhane. La fraction de dichlorométhane obtenue est appelée F2. Le résidu obtenu est ensuite macéré dans l'acétate d'éthyle pour conduire à l'extrait d'acétate d'éthyle F3. Enfin, le résidu est récupéré et mis à macérer dans un solvant polaire, le méthanol pour donner l'extrait méthanolique F4. Les macérations sont réalisées sous agitation à température ambiante pendant 72 heures. Chaque macération est répétée 3 fois pour extraire le maximum de substances. Les différentes étapes de cette extraction sont récapitulées dans la Figure 117.

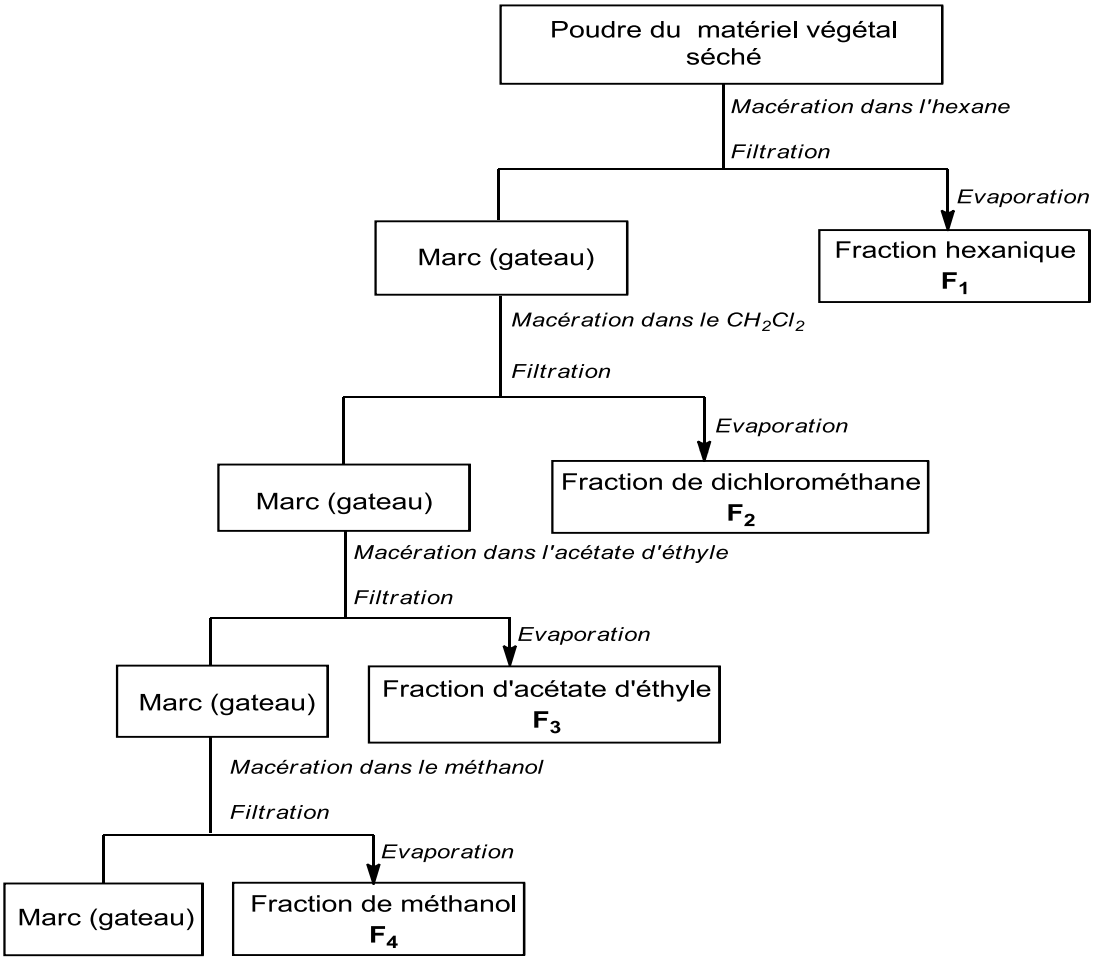


Figure 117 : Schéma d'extraction de *M. lucida* et *L. fasciculata* et obtention des fractions F1 à F4

Nous obtenons ainsi les fractions M1 (fraction hexanique, 400 mg), M2 (fraction de dichlorométhane, 410 mg), M3 (fraction d'acétate d'éthyle, 130 mg) et M4 (fraction de méthanol, 125 mg) pour les écorces de *M. lucida* et les fractions L1 (fraction hexanique, 2.1 g), L2 (fraction de dichlorométhane, 8.45 g), L3 (fraction d'acétate d'éthyle, 1.81 g) et L4 (fraction de méthanol, 25.9 g) pour les feuilles de *L. fasciculata*. Les fractions plus polaires M3, L3 et L2 ont été soumises à une étude phytochimique plus approfondie dans ces travaux.

2 Méthodes chromatographiques analytiques

2.1 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Utilisés à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale et/ou en phase inverse sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F_{254} (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié.

Cette phase mobile est constituée d'un solvant pur ou d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants (les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante) :

• Tol/AcOEt/MeOH (80:18:2)

• CH_2Cl_2 100%

•AcOEt 100%

• MeOH/H_2O (90:10)

• Hex/AcOEt (30:70), (50 :50)

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés.

L'utilisation de différents réactifs permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suites aux différentes chromatographies.

Les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants :

2.1.1 Réactif à l'acide phosphomolybdique (révélateur universel)

Préparer une solution de 22.1 g d'acide phosphomolybdique dans 180 mL d'éthanol à 95%. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ.

2.1.2 Réactif à la Vanilline sulfurique (révélateur polyvalent)

Préparer une solution composée de 1 g de vanilline, 2 mL d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95% q.s.p. 100 mL. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

2.1.3 Réactif de Neu ou NP/PEG (révélateur des flavonoïdes)

Préparer une solution A composée de 1 g d'acide amino-2-éthyldiphénylborique et de 100 mL de méthanol et une solution B composée de 5 g de PEG 4000 et de 100 mL d'éthanol. Pulvériser un mélange de 10 mL de solution A et 8 mL de solution B. Chauffer la plaque de CCM à 110 °C pendant 2 minutes environ [221]. Observés en lumière UV à 365 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.

2.1.4 Réactif de Liebermann et Burchard (révélateur des stérols, stéroïdes, terpènes)

Préparer, à basse température et juste avant emploi, une solution de 5 mL d'anhydride acétique, 5 mL d'acide sulfurique concentré et q.s.p. 50 mL d'éthanol à 95 %. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 10 minutes. Les composés révélés présentent une fluorescence à 365 nm.

2.1.5 Réactif à la potasse (révélateur des anthraquinones)

Préparer une solution de potasse 5 g de potasse dans 100 mL d'éthanol à 95%. Après pulvérisation, une coloration rose-mauve apparait immédiatement.

2.2 Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM)

Les analyses des huiles essentielles ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse (CG) et ensuite par CG couplée à la détection par spectrométrie de masse (CG-SM). Relatif à l'analyse par CG, la chromatographie en phase gazeuse a été réalisée en utilisant un Delsi DI 200 muni d'un détecteur à ionisation de flamme et une colonne DB5 (25m x 0.25 mm, df: 0.25 µm) avec un débit de 60 mL/min.

Les conditions opératoires sont les suivantes : azote comme gaz porteur, programmation de la température à 50°C pendant 5min et 30°C/min jusqu'à 220°C, température de l'injecteur à 220°C, température du détecteur à 250°C.

Les analyses des huiles par CG-SM ont été effectuées en utilisant un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard modèle 6890 couplé à un modèle Hewlett-Packard MS 6890 équipé d'une colonne HP5 (30m x 0.25 mm df: 0.25 µm) programmé à 50°C (5 min) et à 50°C/min jusqu'à 300°C (température stabilisée pendant 5 min. Le gaz porteur à 1.0 mL/min). L'injection a été définie en mode split (1/10). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont à 250°C et 320°C respectivement. L'ionisation a été effectuée par impact d'électrons à 70 eV, le multiplicateur d'électrons a été fixé à 2200 V, et la température de source d'ions est de 230°C.

Les données du spectre de masse ont été acquises dans le mode de balayage dans la gamme de m / z 33-450. L'identification des composés a été réalisée par calcul des indices de rétention (RI) ou Indices de Kovats (KI) et sont comparés avec ceux des spectres de masse dans les banques de données, Adams [222] ou Mc Lafferty et Stauffer [223].

Les analyses ont été réalisées au Laboratoire de chimie des Hétérocycles et des Glucides à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand.

3 Méthodes chromatographiques préparatives

3.1 Chromatographie sur Colonne ouverte (CC)

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mises en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale 0.063–0.200 mm, 70-230 mesh silica gel (Merck). L'élution est réalisée par simple

gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide.

Les chromatographies d'interaction hydrophobe sont réalisées sur gel de Sephadex® LH20.

Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

3.2 Chromatographie préparative sur couche mince

Les plaques utilisées sont des plaques gel de silice de 2 mm sur verre (Merck 60 F254). Les échantillons ont été solubilisés dans le solvant adéquat puis déposé sur la plaque. La plaque a été développée dans une cuve saturée contenant le mélange de solvants approprié. La silice contenant le composé a ensuite été récupérée à l'aide d'une spatule. La silice est ensuite dispersée dans une petite quantité de solvant, puis filtrée sous vide pour permettre la récupération du composé.

3.3 Chromatographie Liquide Haute Performance semi-préparative (HPLC semiprep)

Les purifications ont été effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent Série 1100 munie d'une pompe isocratique et d'un détecteur à indice de réfraction (RI) pilotés par le logiciel Chemstation d'Agilent.

Les analyses ont été réalisées en phase inverse avec une colonne HPLC de type Agilent Zorbax 300SB-C18 (5 µm, 250 x 9.4 mm). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 2 mL/min.

4 Méthodes physico-chimiques

4.1 Spectrométrie de Masse (SM)

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus par plusieurs modes d'ionisation. Les analyses ont été réalisées par Julie Hemez du laboratoire CEISAM de l'Université de Nantes.

4.1.1 Ionisation par Electrospray (ESI)

L'ionisation est ici produite par application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique (3 à 6 keV) sur un liquide traversant un capillaire à un faible débit (1-10 µL/min). Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire. La rupture de la phase liquide forme des gouttelettes hautement chargées (Spray). L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au sommet où des forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celle-ci et provoquer leur explosion. Ces gouttelettes

subissent alors une cascade de fissions donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule [224].

Les spectres de masse haute résolution électrospray (ESI) ont été réalisés sur un spectromètre de masse doté d'une trappe linéaire couplée à un Orbitrap (LTQ-Orbitrap de ThermoFisher Scientific) en mode d'ionisation électrospray positif. L'appareil se situe au Laberca, laboratoire d'Oniris (Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes Atlantique).

4.1.2 Impact Electronique (IE)

En IE, un faisceau d'électrons de haute énergie bombarde les molécules en phase gazeuse. Les ions ainsi formés pas impact des électrons avec les espèces moléculaires sont ensuite accélérés vers l'analyseur afin d'être séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Du fait de l'impact des électrons, les ions formés dans la source possèdent une énergie interne qui les conduit à se fragmenter. L'ionisation par impact électronique présente un inconvénient quant au repérage de l'ion moléculaire $M^{+\bullet}$, d'intensité souvent très faible, voire indétectable. Cette technique a tout de même l'intérêt de donner des informations structurales avec l'aide de banques de données par exemple.

Les spectres de masse IE des produits purs isolés ont été réalisés sur un spectromètre masse DSQII (ThermoFisher Scientific) avec une tension d'accélération des électrons de 70 eV

4.1.3 Ionisation chimique (IC)

La source IC est similaire à la source IE, seules sont modifiées ses conditions d'utilisation. L'ionisation se produit par interaction entre des ions réactifs (NH_4^+ ici), préparés eux-mêmes par ionisation électronique, et les molécules de l'échantillon. Le gaz réactif NH_3, sous sa forme protonée NH_4^+, se comporte comme un acide de Brönsted vis-à-vis de la molécule. Il se produit donc une réaction de protonation de celle-ci via un complexe ion molécule intermédiaire qui peut apparaître sur les spectres.

Les spectres de masse IC des produits purs isolés ont été réalisés sur un spectromètre masse DSQII (ThermoFisher Scientific) avec une tension d'accélération des électrons de 70 eV et l'ammoniac comme gaz réactant.

4.1.4 Spectrométrie de masse Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization (MALDI)

Un mélange de matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique conductrice est désorbé et ionisé par un faisceau laser pulsé travaillant généralement dans l'UV. Les ions ainsi produits sont ensuite transportés dans un analyseur à temps de vol ou TOF (analyseur couramment couplé à la source Maldi) travaillant en mode réflectron.

Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre de masse de type MALDI-TOF-TOF (Autoflex III de Bruker) en mode d'ionisation positif sur la plate-forme "Biopolymères, Intéractions, Biologie Structurale" de l'INRA de Nantes. La matrice utilisée est l'acide dihydroxybenzoïque (DHB).

4.2 Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés au sein de l'équipe EBSI du laboratoire CEISAM de l'Université Nantes sur des appareils de type Brüker Avance 400 (fréquences de 400.13 (^{1}H) et 100.03 MHz (^{13}C)), ou Brüker Avance 500 avec cryosonde (fréquences de 500.13 (^{1}H) et 125.75 MHz (^{13}C)) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés $CDCl_3$, acétone-d6 et CD_3OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Les programmes de séquence impulsionnelle standard fournie par Brüker ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

4.2.1 Corrélations homonucléaires

- **COSY** (^{1}H-^{1}H) : cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^{2}J et ^{3}J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.

- **NOESY** (^{1}H-^{1}H) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

4.2.2 Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** ($^{1}J_{H–C}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.

- **HMBC** ($^{2}J_{H–C}$, $^{3}J_{H–C}$) : cette technique permet la détection des couplages longue distance $^{2}J_{H–C}$ et $^{2}J_{H–C}$.

4.3 Diffraction aux rayons X

Les expériences ont été menées au laboratoire sur un diffractomètre Nonius-Brüker Kappa CCD avec une radiation Mo-$KL_{2,3}$ à 293K. La résolution des structures a été faite à l'aide du logiciel SHELXS [225]. Les expériences ont été réalisées par M. Aurélien Planchat du Laboratoire CEISAM de l'Université Nantes.

5 Tests Biologiques

Les tests biologiques ont été réalisés par le Dr Sophie Barillé-Nion de l'INSERM-Université de Nantes au centre de recherche en cancérologie Nantes-Angers.

5.1 Conditions de culture des lignées cellulaires

5.1.1 Lignées et cultures cellulaires

Toutes les lignées cellulaires sont fournies dépourvues de mycoplasmes ou autre contaminant. Les lignées humaines de cancer du sein utilisées sont les lignées CAL51, BT549, U251, HTC116, MCF7, MDA-MB-231 et MDA-MB-468. La lignée HeLa (cancer du col de l'utérus) est également utilisée pour les tests. Les cellules sont mises en culture dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF), 4 mM de glutamine, de la pénicilline et de la streptomycine. Toutes les manipulations, de l'étape de mise en culture, à celle de dépôt des drogues se font en milieu stérile sous les PSM (poste de sécurité microbiologique).

5.1.2 Passage cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées étant adhérentes au plastique, il est nécessaire de les diviser quand elles arrivent à confluence. Il faut donc «passer les cellules» c'est-à-dire les diluer dans du milieu de culture propre afin qu'elles puissent à nouveau se diviser dans de bonnes conditions. Vingt passages maximum sont effectués à partir d'un même échantillon de cellules : au-delà, des phénomènes de dérive génétique par sélection cellulaire involontaire pourraient se produire. Dans un premier temps, les cellules sont lavées par du phosphate buffered-saline (PBS). Cette étape est nécessaire dans la mesure où le SVF contient des inhibiteurs de la trypsine ; il faut donc totalement l'éliminer. La trypsine est ensuite ajoutée et incubée 5 minutes à 37°C dans l'incubateur à 5% de CO_2. Cette protéase rompt les adhérences entre les cellules entre elles, mais aussi entre les cellules et le plastique de la cuve. Elle va donc permettre de récupérer une suspension cellulaire qu'on va pouvoir diluer à nouveau dans du milieu DMEM.

5.1.3 Comptage cellulaire sur lame de comptage KOVA Glasstic Slide 10 de chez Hycor®

Une dilution au demi de notre suspension cellulaire dans de l'éosine va nous permettre de visualiser les cellules mortes. Ce colorant ne pénétrant que dans les cellules dont la membrane est altérée, il va pouvoir mettre en évidence des débris cellulaires et ainsi donner un premier aperçu de l'état général de notre culture cellulaire : c'est un indicateur de la viabilité cellulaire. Les cellules non colorées sont dénombrées par comptage au microscope. La surface de la lame de comptage permet de dénombrer les cellules dans 1 µL. On peut alors calculer le nombre de cellules/mL contenues dans notre suspension puis diluer celle-ci pour obtenir le nombre de cellules désiré dans un volume donné.

5.1.4 Ensemencement

Pour les tests d'apoptose, des plaques 24 puits à fond plat sont utilisées et ensemencées avec 500 µL de suspension cellulaire à 30 000 cellules/puits. Des plaques blanches opaques de 96 puits sont utilisées pour les tests de viabilité cellulaire. En effet, pour doser l'activité luciférase, le support ne doit pas permettre la diffusion de la luminescence. Ces plaques sont ensemencées avec 50 µL à 10 000 cellules/puits. On utilise des plaques 6 puits à fond plat pour les tests de clonogénéicité : 2 mL à 100 cellules/puits sont alors déposés. Il faut utiliser dans ce cas une très faible quantité de cellules initiales pour pouvoir dénombrer facilement le nombre de clones formés.

5.2 Dépôt des drogues

Les cellules sont traitées par les différentes drogues initialement aliquotées qui sont alors diluées dans du milieu DMEM. Le contrôle négatif au DMSO est toujours basé sur la concentration la plus forte de drogue utilisée. Ceci permet de s'assurer de l'absence d'effet du solvant. Chaque drogue est préparée dans une dilution intermédiaire 4X, et pour une plaque de 24 puits on dépose 250 µL de chaque drogue dans chaque puits pour obtenir la concentration X finale, dans un volume final de 1 mL par puits. On teste aussi «l'effet croisé» de deux drogues différentes. Les cellules sont laissées à incuber avec les drogues pendant 48h à 37°C.

5.2.1 Drogues ou molécules à potentiel anticancéreux à tester

La chalcone (2'-hydroxy-4,4',6'-trimethoxychalcone), le cadalène et la flavanone (5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavanone) sont les molécules isolées de *C. odorata*.

Le resvératrol (Figure 118) *in vitro*, induit l'apoptose [226, 227], probablement par une action sur la COX et à travers l'amélioration de la fonction mitochondriale [228], a été utilisé comme contrôle positif.

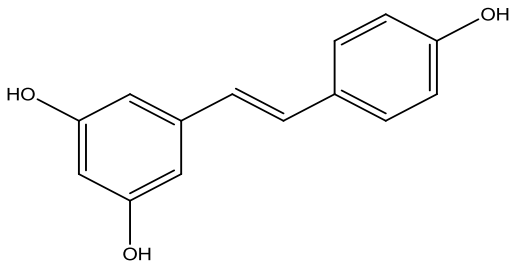


Figure 118 : Structure du resvératrol

5.2.2 ABT 737 ou «Abbott laboratory drug 737»

L'ABT737 (Figure 119) (initialement produite par les Laboratoires Abbott), est un inhibiteur de BH3-mimétique Bcl2/BclxL qui semble agir en bloquant l'activité anti-apoptotiques de la

famille des protéines Bcl-2 surexprimée dans les cellules cancéreuses [229], d'où la restauration de la mort cellulaire des cellules cancéreuses.

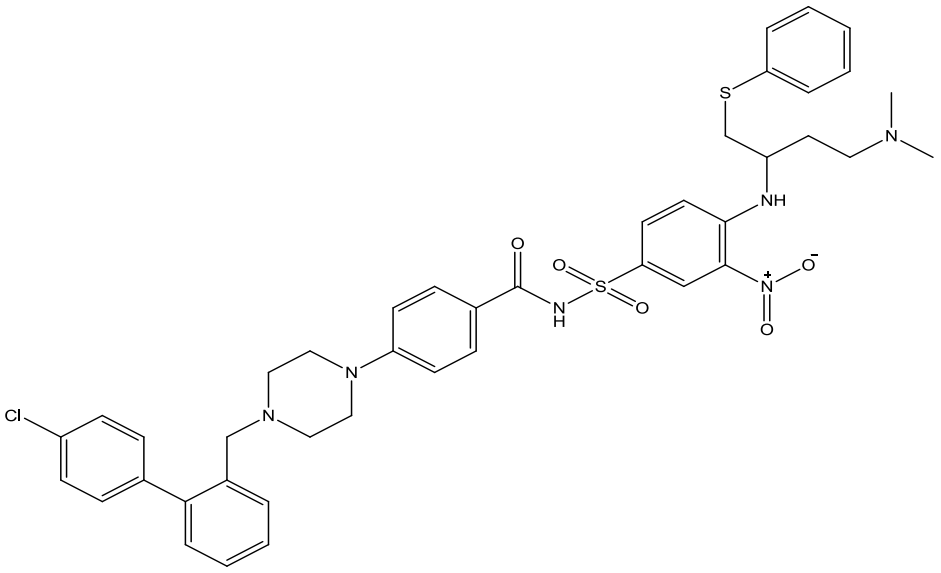


Figure 119 : Structure de l'ABT737 ou 4-[4-[(4'-Chloro[1,1'-biphényl]-2-yl)méthyl]-1-piperazinyl]-N-[[4-[[(1R)-3-(diméthylamino)-1-[(phénylthio)méthyl]propyl]amino]-3-nitrophényl]sulfonyl]benzamide

5.3 Tests cellulaires utilisés

5.3.1 Test APO 2.7

5.3.1.1 *Principe*

Pour étudier l'effet de ces drogues sur l'apoptose des cellules tumorales, nous avons dans un premier temps fait des cultures cellulaires de différentes lignées de tumeurs cancéreuses. Les cellules sont ensemencées jusqu'à 80% de confluence : c'est en effet à ce niveau de confluence qu'un effet des drogues pourra être observé. Ces lignées sont adhérentes, c'est pourquoi une étape de trypsination est nécessaire avant de pouvoir ensemencer ou récupérer les cellules. Pour l'étude de combinaison d'une drogue donnée avec des agents anticancéreux avérés, une concentration fixe d'une drogue donnée sera déposée dans tous les puits d'une même colonne, et une concentration donnée d'une autre drogue le sera dans tous les puits d'une même ligne. Ainsi, en «croisant» les drogues nous pourrons évaluer si un effet synergique, additif ou même antagoniste se produit. Ces expériences seront refaites avec diverses lignées de cellules et avec des concentrations variables de chaque drogue.

Après incubation avec chaque drogue, les cellules sont analysées par un test de détection de l'apoptose APO2.7. L'antigène APO2.7 (aussi appelé antigène 7A6) est une protéine de 38 kDa exprimée à la membrane des mitochondries durant la phase précoce de l'apoptose. Cet antigène s'exprime en réponse à une induction d'apoptose due à divers stress (activation d'un récepteur de mort Fas, irradiation γ ou encore en réponse à un traitement par des drogues pro-apoptotiques). Des cellules viables ou nécrotiques sont donc négatives en APO2.7. Grâce à un

anticorps monoclonal spécifique de cet antigène, le clone 2.7A6A3 couplé à la phycoérythrine (PE), on peut marquer spécifiquement les cellules en apoptose. Après ce marquage, la fixation de l'anticorps sur les antigènes APO2.7 est analysée au cytomètre en flux ou FACS (Fluorescence activated cells sorting). Cet appareil permet d'analyser la morphologie des cellules sur deux paramètres ; la granulosité et la taille (FSC/SSC) ainsi que leur fluorescence en FL2-H. Les cellules vont ainsi passer devant un laser les unes après les autres : leur fluorescence en PE et leur morphologie permettra de les répartir sur un dot-plot. Des contrôles positifs et négatifs sont nécessaires afin de quantifier l'autofluorescence des cellules en absence de drogue (ce contrôle sera constitué par les cellules traitées au DMSO) et en présence d'une drogue dont on sait d'après la littérature qu'elle induit de l'apoptose (ici le Resvératrol). On analyse donc le pourcentage de cellules positives à l'APO2.7 au bout d'une durée de 48h d'incubation avec les drogues.

5.3.1.2 *Trypsination*

Après incubation des cellules avec les drogues pendant 48h, une étape de trypsination est nécessaire. On récupère ainsi dans le surnageant les cellules mortes non adhérentes et les cellules vivantes adhérentes. Le contenu de chaque puits de culture est transféré dans un eppendorf, puis, après centrifugation, chaque culot cellulaire est déposé sur plaque 96 puits à fonds en V. On récupère ainsi toutes les cellules adhérentes ou non, mortes ou vivantes. Les plaques sont centrifugées 2 minutes à 2000 rpm. Chaque culot cellulaire est repris dans 50 µL d'une dilution de l'anticorps monoclonal anti 7A6 couplé à la PE (2 µL d'anticorps pour 48µL de PBS/puits). L'anticorps est ensuite incubé 20 minutes à l'obscurité, puis rincé par du PBS avant centrifugation 2 minutes à 3000 rpm. Le surnageant est vidé et 150 µL de PBS contenant 1% de formaldéhyde pour fixer cellules et anticorps sont ajoutés. Le contenu de chaque puits est finalement transféré dans des tubes FACS bouchés puis conservés à 4°C jusqu'à l'analyse en cytométrie en flux. Celle-ci sera faite sur un FACS Calibur II de la plate-forme cytométrie de l'U892.

5.3.2 Test de la viabilité cellulaire

5.3.2.1 *Principe*

On peut également quantifier la viabilité cellulaire en mesurant la quantité d'adénosine triphosphate (ATP) produite par les cellules. Pour ce faire la méthode de dosage de chez Promega, la « CellTiter Glo® Luminescent Cell Viability Assay » est utilisée. Elle permet de mesurer la quantité d'ATP présente dans chaque culture cellulaire, quantifiant alors les cellules métaboliquement actives. Pour ce dosage, une enzyme particulière, la luciférase, est ajoutée aux cellules en culture. Celle-ci émet de la lumière en catalysant son substrat, la luciférine en présence de Mg^{2+}, d'ATP et de dioxygène. L'ATP utilisé pour la réaction sera celui présent dans le milieu de culture et la quantité de lumière émise sera donc proportionnelle à la quantité d'ATP utilisée par les cellules : elle reflètera donc indirectement la quantité de cellules viables.

5.3.2.2 *CellTiter Glo®*

La mesure de la luminescence est réalisée après 72h d'incubation des drogues grâce à un kit spécifique CellTiter Glo®. Le tampon et le substrat CellTiter Glo® sont mélangés afin de reconstituer le mélange enzyme lyophilisée/substrat : ceci forme alors le réactif CellTiter Glo®. La luminescence basale est obtenue sur un puits de la plaque contenant le milieu de culture mais pas de cellule. La plaque est laissée 30 minutes à température ambiante et un volume de réactif CellTiter Glo® équivalant au volume de cellules présent dans chaque puits est ajouté (soit 50 µL ici). Après lyse cellulaire, la luminescence se stabilise et on peut la mesurer automatiquement avec un luminomètre.

5.3.3 Test de clonogénéicité

5.3.3.1 *Principe*

Une des caractéristiques majeure des cellules cancéreuses est leur capacité à former des clones à partir d'une seule cellule. Nous nous proposons donc de tester l'effet de nos drogues sur cette capacité à former ces clones. Ceux-ci peuvent se développer en deux dimensions sur une surface plastique et alors s'épandre sur cette surface, ou bien ils peuvent se développer en trois dimensions en s'insérant dans un support poreux. Ces conditions, qui sont alors plus physiologiques, peuvent être reproduites en cultivant les cellules dans un gel d'Agar, permettant ainsi d'étudier la conservation de ce caractère malin face aux drogues. Pour pouvoir visualiser un effet des drogues sur la clonogénéicité une faible densité cellulaire au départ est nécessaire. Une quantité fixe et connue de cellules est donc mise en culture dans chaque puits, et chaque drogue est ensuite ajoutée en agent simple à une concentration connue. Après deux semaines de cultures, les clones sont colorés au Crystal Violet et dénombrés à l'œil nu. La comparaison du nombre de clones obtenus en fonction des différentes drogues mises en présence permettra de statuer sur l'effet de celles-ci sur la clonogénéicité sur plastique ou sur Agar.

5.3.3.2 *Préparation des gels*

Pour la clonogénéicité sur plastique en deux dimensions, les drogues sont ajoutées selon le même protocole que pour le test APO2.7 à la différence qu'elles sont testées uniquement en agent simple.

Les gels d'Agar des tests de clonogénéicité en milieu semi-solide 3D sont constitués sous PSM. Ces gels se constituent en deux couches :

La couche inférieure est constituée d'un mélange d'Agar 2% fondue dans une solution de PBS 1X (Ca^{2+}, Mg^{2+}) et conservée au bain-marie à 40°C. Cette solution d'Agar est mélangée avec du milieu de culture DMEM dans les proportions 25 :75. 1 mL de ce mélange chaud est ensuite déposé dans chaque puits qu'on laisse solidifier pendant une heure.

La couche supérieure est constituée d'Agar 1,4% fondu dans du PBS 1X (Ca^{2+}, Mg^{2+}). 2mL de cette solution sont déposés sur la couche inférieure : pour que les cellules soient

directement dans le gel, nous réaliserons les suspensions cellulaires mélangées aux drogues directement dans la solution d'Agar. Il faut 14 mL d'Agar/DMEM chaud pour ensemencer une plaque (compter un puits de plus, soit, sept ici avec 2 mL/puits). Pour 100 cellules/puits, il faut 700 cellules au total. Un volume adéquat de cellules « stock » déjà trypsinées et dénombrées est donc ajouté aux 14 mL de DMEM. La température de l'Agar/DMEM ne doit pas être trop élevée au risque de tuer les cellules, ni trop basse, auquel cas le gel polymériserait avant d'être coulé dans les puits. Après homogénéisation ce tube est séparé en 6 tubes contenant chacun 2 mL de milieu qui recevront chacun le volume de drogue nécessaire pour avoir la concentration finale voulue. On peut alors couler les 2 mL de couche supérieure Agar/DMEM/cellules/drogues sur la couche inférieure polymérisée. Les plaques sont incubées deux semaines à 37°C, puis les colonies sont mises en évidence au Crystal Violet et dénombrées pour chaque puits.

5.3.3.3 *Coloration au Crystal Violet*

Afin de mieux visualiser le nombre de colonies qui ont poussées lors du test de clonogénéicité, (que ce soit sur plastique ou sur gel d'Agar) les colonies sont colorées au Crystal Violet qui est un colorant de l'ADN. Les cellules sont rincées en PBS et le Crystal Violet 0.5% dilué dans du méthanol est ajouté. On laisse agir 10 minutes et on retire le colorant. Puis on rince en PBS et on laisse les plaques sécher à l'air. On procède de même pour les plaques en milieu gélifié sans passer par l'étape d'élimination du surnageant.

Références bibliographiques

1. Hurtel, J.-M., *Huiles essentielles et médecine. Aromathérapie* 2006, http://www.phytomania.com/frame1024.htm.
2. Novais, M.H., et al., *Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal).* Journal of Ethnopharmacology, 2004. **93**: p. 183-195.
3. Gurib-Fakim, A., *Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow.* Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**(1): p. 1-93.
4. Coussens, L.M. and W. Zena, *Inflammation and cancer.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-867.
5. Encyclopedia of Life, *Chromolaena odorata.* http://eol.org/pages/467611/maps
6. Zachariades, C., et al., *Chromolaena odorata (L.) King and Robinson (Asteraceae).* Biological Control of Tropical Weeds using Arthropods 2009, Cambridge: Ed. R. Muniappan, G. V. P. Reddy, and A. Raman, Cambridge University Press p. 130-162
7. De Rouw, A., *The invasion of Chromolaena odorata and competition with the native flora in a rain forest zone, South-west Côte d'Ivoire.* J. Biogeogr. , 1991. **18**: p. 13-23.
8. *Chromolaena odorata (L.) R. M. King & Robinson - ASTERACEAE – Dicotylédone.* http://www.oswaldasia.org/species/e/eupod/eupod_fr.html#Botanique.
9. Bouda, H., et al., *Effect of essential oils from leaves of Ageratum conyzoides, Lantana camara and Chromolaena odorata on the mortality of Sitophilus zeamais (Coleoptera, Curculionidae).* Journal of Stored Products Research. , 2001. **37**(2): p. 103-109.
10. Thakong, K., *A study on the antimalarial constituents and chemical composition of Eupatorium odoratum (L.)*, 1999, Mahidol University: Mahidol, THAILAND
11. Agu, S.I., *Phytochemical investigation of Nigerian medicinal plants used in the treatment of skin disease*, 1980, Thesis M.Sc. Université de Ife, Nigeria.
12. Irobi, O.N., *Antibiotic properties of ethanol extract of Chromolaena odorata (Asteraceae).* International Journal of Pharmacognosy, 1997. **35**(2): p. 111-115.
13. Le, T.T., *The use of Eupolin prepared from Eupatorium odoratum to treat soft tissue wounds.*, in *The 5th European Tissue Repair Society Meeting*1995 Abst. 30: Padova, Italy.
14. Phan, T.T., M.A. Hughes, and G.W. Cherry, *Effects of an aqueous extract from the leaves of Chromolaena odorata (Eupolin) on the proliferation of human keratinocytes and on their migration in an in vitro model of reepithelialization.* Wound. Rep. Reg. , 2001. **9**: p. 305-313.
15. Rajinder, R., et al., *Medicinal Plants and their Role in Wound Healing* Vet Scan 2008. **3**(1): p. 1-7
16. Phan, T.-T., et al., *Phenolic compounds of Chromolaena odorata Protect cultured skin cells from oxidative damage: Implication for cutaneous wound healing.* Biol. Pharm. Bull. , 2001. **24**(12): p. 1373 - 1379.

17. Akah, P.A., *Mechanism of activity of Eupatorium odoratum L.* . International Journal of Crude Drug Research, 1990. **23**: p. 253-256.

18. Ayensu, E.S., *Médicinal plants of West Africa.* Reference Publications Inc., Algonac, Michigan, 1978: p. 162.

19. Triratana, T., R. Suwannuraks, and W. Naengchomnong, *Effect of Eupatorium odoratum on blood coagulation* J. Med. Assoc. Thai. , 1991. **74**(5): p. 283-287.

20. Zakaria, M. and M.A. Mohd, *Traditional Malay Medicinal Plants*. 1994, Malaysia: Ed. Fajar Bakti.

21. Bedi, G., et al., *Etude des effets antidouleurs des huiles essentielles de Chromolaena odorata et de Mikania cordata, par action sur la Lipoxygenase L-1 de soja.* Physical Chemical News 2004. **15**: p. 124-127.

22. Bamba, D., et al., *Essential oil of Eupatorium odoratum.* Planta Medica., 1993. **59** (2): p. 184-185.

23. N'guessan, K., et al., *Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire).* Sciences & Nature 2009. **6**(1): p. 1-15

24. Ling, B., et al., *Chemical composition of volatile oil from Chromolaena odorata and its effect on plant, fungi and insect growth.* Ying Yong Sheng Tai Xue Bao, 2003. **14**(5): p. 744-6.

25. Pamo, E.T., et al., *Composition chimique et effet acaricide des huiles essentielles des feuilles de Chromolaena odorata (L.) King and Robinson. et d'Eucalyptus saligna Smith. sur les tique (Rhipicephalus lunulatus Neumann) de la chèvre naine de Guinée dans l'Ouest-Cameroun.* Livestock Research for Rural Development 2004. **16**(9): p. 1-9.

26. Owolabi, M.S., et al., *Chemical Composition and Bioactivity of the Essential Oil of Chromolaena odorata from Nigeria.* Rec. Nat. Prod, 2010. **4**(1): p. 72-78.

27. Inya-agha, S.I., et al., *Phytochemical and Antibacterial Studies on the Essential Oil of Eupatorium odoratum.* Pharmaceutical Biology, 1987. **25**(1): p. 49-5.

28. Bedi, G., Z.F. Tonzibo, and T.Y. N'guessan, *Composition chimique des huiles essentielles de Chromolaeana odorata L . King Robinson d'Abidjan-Côte d'Ivoire.* Soc. Ouest-Afr. Chim., 2001. **11**: p. 29-37.

29. Bedi, G., et al., *Effect of essential oil of Chromoleana odorata (Asteraceae) from Ivory Coast, on cyclooxygenase function of prostagladin-H synthase activity.* African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2010. **4**(8): p. 535-538

30. Sohounhloue, D.K., et al., *Chemical composition of the essential oil of Chromolaena odorata L. King Robinson collected in Houin (Benin).* J. Soc. Ouest-Afr. Chim. , 1996. **2**: p. 75-82.

31. Nguyen, X.D., K.B. Le, and P.A. Leclercq, *The constituents of the leaf oil of Chromolaena odorata (L) R. M. King and Robinson from Vietnam.* J. Essential Oil Res., 1992. **4**: p. 309-310.

32. Wollenweber, E., M. Dorr, and R. Muniappan, *Exudate flavonoids in a tropical weed, Chromolaena odorata (L.) R. M. King et H. Robinson.* Biochemical Systematics and Ecology, 1995. **23**(7): p. 873-874.

33. Iwu, M.M. and C.O. Chiori, *Antimicrobial activity of Eupaturium odoratum ectracts.* Fitoterapia, 1984. **55**(6): p. 354 - 356.

34. Suksamrarn, A., et al., *Antimycobacterial Activity and Cytotoxicity of Flavonoids from the Flowers of Chromolaena odorata.* Arch. Pharm. Res. , 2004. **27**(5): p. 507-511.

35. Talapatra, S.K., D.S. Bhar, and B. Talapatra, *Flavonoid and terpenoid constituents of Eupatorium odoratum.* Phytochemistry, 1974. **13**: p. 284 - 285.

36. Barua, R.N., et al., *Flavonoids of Chromolaena odorata.* Phytochemistry, 1978. **17**: p. 1807-1808.

37. Bose, P.K., et al., *Flavonoid constituents of Eupatorium odoratum.* Phytochemistry, 1973. **12**: p. 667-668.

38. Biller, A., et al., *Pyrolizidine alkaloids in Chromlolaena odorata. chemical and chemoecological aspects.* Phytochemistry, 1994. **35**(3): p. 615-619.

39. Thoden, T.C., M. Boppré, and J. Hallmann, *Pyrrolizidine alkaloids of Chromolaena odorata act as nematicidal agents and reduce infection of lettuce roots by Meloidogyne incognita.* Nematology, 2007. **9**(3): p. 343-349.

40. Amatya, S. and S.M. Tuladhar, *Eupatoric Acid: A Novel Triterpene from Eupatorium odoratum L. (Asteraceae).* Z. Naturforsch, 2005. **60b**: p. 1006-1011.

41. Discover Life, *Leptoderris fasciculata.* http://www.discoverlife.org/mp/20q?search=Leptoderris+fasciculata.

42. Kouamé, N., et al., *Végétation et flore de la forêt classée du Haut-Sassandra en Côte d'Ivoire.* Sciences et Médecine - Revue CAMES, 1998. **00**.

43. Encyclopedia of Life, *Leptoderris fasciculata* http://eol.org/pages/686281/maps.

44. Burkill, H.M., *The useful plants of west tropical Africa - Entry for Leptoderris fasciculata (Benth.) Dunn [family Leguminosae-Papilionoideae]*. JSTOR Plant Science http://plants.jstor.org/upwta/3_622, 1985. **3**

45. Gillett, J.B., R.M. Polhill, and B. Verdcourt, *Flora of Tropical East Africa - Entry for LEPTODERRIS fasciculata (Benth.) Dunn [family Leguminosae-Papilionoideae]*. JSTOR Plant Science http://plants.jstor.org/flora/ftea002473, 1971.

46. Mubo, A.S., O.S. Mike, and O.S. Tolani, *Ethnobotanical Survey of Anti-Psychotic Plants in Lagos and Ogun States of Nigeria.* European Journal of Scientific Research, 2008. **19**(4): p. 634-644.

47. Encyclopedia of Life, *Morinda morindoides* http://eol.org/pages/1097127/maps

48. Bagre, I., et al., *Étude botanique et exploration de l'activité antifongique de Morinda morindoides (Baker) Milne-Redh. sur la croissance in vitro de Cryptococcus neoformans* Phytothérapie, 2011. **9**: p. 136–141.

49. Cimanga, K., et al., *Constituents from Morinda morindoides leaves as inhibitors of xanthine oxidase and scavengers of superoxide anions.* Pharmacy and Pharmacology Communication, 1999. **5**: p. 419–424.

50. Cimanga, K., et al., *Flavonoid O-glycosides from the leaves of Morinda morindoides* Phytochemistry, 1995. **38**(5): p. 1301-1303.

51. Cimanga, K.R., et al., *Cytotoxicity and in vitro susceptibility of Entamoeba histolytica to Morinda morindoides leaf extracts and its isolated constituents.* Journal of Ethnopharmacology, 2006. **107**: p. 83–90.

52. Cimanga, R.K., et al., *The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of Morinda morindoides (Baker) Milne-Redh. (Rubiaceae).* Journal of Ethnopharmacology 2010. **127**: p. 215-220.

53. Mankele, R., et al., *Etude des effets de Morinda morindoides (Back) sur le système immunitaire de l'homme.* Phytothérapie 2006. **2**: p. 68-73.

54. Méité, S., et al., *Antidiarrheal Activity of the Ethyl Acetate Extract of Morinda morindoides in Rats.* Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2009. **8**(3): p. 201-207.

55. Satoru, T., et al., *New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from Morinda morindoides.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2010. **20**: p. 1520-1523.

56. Mozouloua, D., A.K. Apema, and J.P. Nguengue, *Etude Préliminaire des Plantes Médicinales à Effets Antidermatosiques Utilisées en Pharmacopée à Bangui.* Unité de Recherche en Sciences Appliquées au Développement (URSAD), 2011.

57. Adjanohoun, E.J., et al., *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République Populaire du Congo*. 1988, Paris: Ed. ACCT. 605

58. Nsonde-Ntandou, G.F., et al., *Enquête ethnobotanique : screening chimique et efficacité thérapeutique de quelques plantes utilisées contre le paludisme en médecine traditionnelle à Brazzaville.* Phytothérapie, 2005. **1**: p. 13-18.

59. Cimanga, K., et al., *Complement-modulation properties of a kaempferol 7-O-rhamnosylsophoroside from the leaves of Morinda morindoides.* Planta Medica. , 1997. **63**: p. 220-223.

60. Cimanga, K., et al., *Complement-inhibiting iridoids from Morinda Morindoides.* J. Nat. Prod. , 2003. **66**: p. 97-102.

61. Tamura, S., et al., *New anti-malarial phenylpropanoid conjugated iridoids from Morinda morindoides.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**: p. 1520-1523.

62. Ramiarantsoa, H., et al., *A Ketosteroid Isolated from Morinda Morindoides.* European Journal of Scientific Research, 2009. **28**(4): p. 621-626.

63. Encyclopedia of Life, *Morinda lucida.* http://eol.org/pages/1110319/maps

64. Aubréville, A., *A.O.F-Cameroun-A.E.F.* 1950: Société d'Editions Géographiques, Maritimes et Coloniales.

65. Aubréville, A., *La flore forestière de la Côte d'Ivoire* Vol. Deuxième édition revisée-Tome troisième. 1959: Centre technique forestier tropical.

66. Eyog, O.M., et al., *Rapport du Programme de ressources génétiques forestières en Afrique au sud du Sahara (programme SAFORGEN) Réseau "Espèces Ligneuses Médicinales" Compte rendu de la première réunion du Réseau 15-17 Décembre 1999 Station IITA Cotonou, Bénin.* 1999.

67. Olajide, O.A., S.O. Awe, and J.M. Makinde, *The Effects of Morinda lucida Benth (Rubiaceae) Extract on the Gastrointestinal Tract of Rodents.* Phytotherapy Research, 1998. **12**: p. 439-441

68. Olumayokun, A.O., et al., *Evaluation of the Anti-diabetic Property of Morinda lucida Leaves in Streptozotocin-diabetic Rats.* J. Pharm. Pharmacol, 1999. **51**: p. 1321-1324.

69. Raji, Y., O.S. Akinsomisoye, and T.M. Salman, *Antispermatogenic activity of Morinda lucida extract in male rats.* Asian J. Androl, 2005. **7**(4): p. 405-410.

70. Watt, J.M. and M.G. Breyer-Brandwijk, *The medicinal and poisonous plants of Southern and Eastern Africa.* 1962, London: E.S. Livingstone Ltd.

71. Asuzu, I.U. and C.N. Chineme, *Effects of Morinda lucida leaf extract on Trypanosome brucei brucei infections in mice.* J. Ethnopharmacol, 1990. **30**: p. 307-313.

72. Okpekon, T., et al., *Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast.* Journal of Ethnopharmacology 2004. **90**: p. 91-97.

73. Kamanyi, A., D. Njamen, and B. Nkeh, *Hypoglycaemic properties of the aqueous root extract of Morinda lucida (Benth) (Rubiaceae). Studies in the mouse.* Phytotherapy Research, 1994. **8**(6): p. 369-371.

74. N'guessan, H.A., et al., *CCM D'extraits Sélectifs de 10 Plantes Utilisées Dans le Traitement Traditionnel de L'hypertension Artérielle en Cote d'Ivoire.* European Journal of Scientific Research 2011. **66**(4): p. 575-585.

75. Tra Bi, F.H., et al., *Études de quelques plantes thérapeutiques utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle et du diabète : deux maladies émergentes en Côte d'Ivoire.* Sciences & Nature, 2008. **5**(1): p. 39-48

76. Olajide, O.A., S.O. Awe, and J.M. Makinde, *Purgative effect of the methanol extract of Morinda lucida.* Fitoterapia 1999. **70**: p. 1-4.

77. Bitsindou, M., J. Lejoly, and E.K. Van, *Les plantes employées contre les affections hépatiques en médecine traditionnelle africaine MEDICAMENTS ALI MENTS : L'APPROCHE ETHNOPHARMACOLOGIQUE* in *2ème Colloque Européen d'Ethnopharmacologie et de la 11ème Conférence internationale d'Ethnomédecine*1993: Heidelberg.

78. Osakwe, I.I. and W. Drochner, *Nutritive value of Morinda lucida and its fermentation parameters in West African dwarf (WAD) sheep when fed as supplement to grass hay.* Small Ruminant Research 2006. **64**: p. 107-115.

79. Okoh, S.O., et al., *Composition and antioxidant activities of leaf and root volatile oils of Morinda lucida.* Nat Prod Commun, 2011. **6**(10): p. 1537-1541.

80. Bankole, S.A., *Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (Azadirachta indica and Morinda lucida) on growth and aflatoxin B1 production in*

maize grain by a toxigenic Aspergillus flavus. Letters in applied microbiology, 1997. **24**(3): p. 190-192.

81. Adesogan, E.K., *Anthraquinones and anthraquinols fromMorindalucida: The biogeneticsignificance of oruwal and oruwalol.* Tetrahedron Letters, 1973. **29**(24): p. 4099-4102.

82. Koumaglo, K., et al., *Effects of three compounds extracted from Morinda lucida on Plasmodium falciparum.* Planta Med., 1992. **58**: p. 533-535.

83. Rath, G., M. Ndonzao, and K. Hostettmann, *Antifungal anthraquinones from Morinda lucida.* International Journal of Pharmacognosy, 1995. **33**: p. 107-114.

84. Phakhodee, W., *Distribution of Naturally Occurring Anthraquinones, Iridoids and Flavonoids from Morinda Genus: Chemistry and Biological Activity.* Walailak J Sci & Tech, 2012. **9**.

85. Adesogan, E.K., *Oruwacin, a new iridoid ferulate from Morinda lucida* Phytochemistry, 1979. **18**(1): p. 175-176.

86. Adewunmi, C.O. and E.K. Adesogan, *Anthraquinones and Oruwacin from Morinda lucida as Possible Agents in Fascioliasis and Schistosomiasis Control.* Fitoterapia, 1984. **55**(4): p. 259-264.

87. Smallfield, B., *Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes.* Crop & Food Research 2001. **Number 45**: p. 4.

88. Bruneton, J., *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales*. 1993, Paris: 2éme édition Tec&Doc. . p.387-402.

89. Rai, M.K., D. Acharya, and P. Wadegaonkar, *Plant derived-antimycotics : Potential of Asteraceous plants. In: Plant: derived-antimycotics :Current Trends and Future prospects.* Haworth press, N-York, Londin, Oxford 2003: p. 165-185.

90. Porter, N., *Essential oils and their production.* Crop & Food Research Limited, 2001. **Number 39**.

91. Belaïche, P., *Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie*. 1979: Tome 1 l'Aromathérapie, Ed. Maloine S. A. Paris.

92. Fahn, A., *Secretory tissues in plants* 1979, London: Academic Press.

93. Fahn, A., *Tansley Review No. 14 Secretory tissues in vascular plants.* New Phytol., 1988. **108**: p. 229-257.

94. Carée, P., *Précis de technologie et de chimie industrielle*. 1953: Tome III Ed. Ballière J. B. Et Fils.

95. Svoboda, K.P. and J.B. Hampson, *Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxydant, antiinflammatory and other related pharmacological activities.* Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK, KA6 5HW, 1999: p. 1-17.

96. Bedi, S.G., et al., *Anti-inflammatory and analgesic activities: chemical constituents of essential oils of Ocimum gratissimum, Eucalyptus Citriodora and Cymbopogon goganteus inhibited lipoxygenase L-1 and cycloxygenase of PGHS.* Bull. Chem. Soc. Ethiop., 2003. **17**: p. 191-197.

97. Besombes, C., *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées*, 2008, Université de La Rochelle.

98. Bruneton, J., *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 1999, Paris: Ed. (3) Techniques et documentation.

99. Dey, P.M. and J.B. Harborne, *Methods in plant biochemistry*. Vol. 7 Terpenoids. 1991, San Diego: Academic press.

100. Manitto, P. and P.G. Sammes, *Biosynthesis of Natural Products*. 1981, New York: John Wiley

101. Bakkali, F., et al., *Biological effects of essential oils - A review,*. Food Chem. Toxicol., 2007. **46**(2): p. 446-475.

102. de Padua, L.S., N. Bunyapraphatsara, and R.H.M.J. Lemmens, *Plant Resources of South-East Asia, No. 12 (1). Medicinal and Poisonous Plants 1*. 1999, Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers.

103. Herz, W., in V. H. Heywood, J. B. Harbone, B. L.Turner (Eds.), *The biology and chemistry of the Compositae.* Academic Press, london, 1977. **Chapter 11**: p. 337.

104. Baranska, M., et al., *Chemotaxonomy of aromatic plants of the genus Origanum via vibrational spectroscopy* Anal.Bianal.Chem, 2005. **381**(6): p. 1241-1247.

105. Langenheim, J.H., *Plant resins.* Am. Scientist, 1990. **78**: p. 16-24.

106. Mark, M. and N.B. Ghyselinck, *Effets de la vitamine A sur la spermatogenèse.* mt Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie, 2009. **11**(3): p. 215-26.

107. Ourisson, G. and P. Grabbé, *Les triterpènes tétracycliques*. 1961: Hermann Ed 194.

108. Urquiaga, I. and F. Leighton, *Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress.* Biological Research, 2000. **33** (2): p. 55-64.

109. Macheix, J.J., A. Fleuriet, and C. Jay-Allemand, *Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. 2005: Ed. Presses polytechnologiques et Universitaires romandes p. 4-5.

110. Harborne, J.B., *The flavonoids, advances in research since 1980*. 1988, London: Chapman & Hall. .

111. Tiqwari, A.K., *Imbalance in antioxidant defence and human diseases : Multiple approach of natural antioxidants therapy.* Current Science, 2001. **81**(9): p. 1179-1181.

112. Amić, D., et al., *Structure-Radical scavenging activity relashionships of flavonoids.* Croatica Chemica Acta, 2003. **76** (1): p. 55-61.

113. Middleton, E., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The effects of plants flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer.* Phamacological Reviews, 2000. **52**(4): p. 673-751.

114. Malešev, D. and V. Kuntić, *Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions.* Journal of the Serbian Chemical Society, 2007. **72** (10): p. 921-939.

115. Cowan, M.M., *Plant products as antimicrobial agents.* Clinical Microbiology Reviews, 1999. **12** (4): p. 564-570.

116. Brusselmans, K., et al., *Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity.* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(7): p. 5636-5645.

117. Depeint, F., et al., *Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities.* Proceeding of the Nutrition Society, 2002. **61**: p. 97-103.

118. Deng, Y., et al., *Phytochemical and bioactivity studies on constituents of the leaves of Vitex quinata.* Phytochemistry Letters, 2011. **4**: p. 213-217.

119. Hertog, M.G., *Epidemiological evidence on potential health propreties of flavonoids.* Proceeding of the Nutrition Society, 1996. **55**: p. 385-397.

120. Ren, W., et al., *Flavonoids : Promising anticancer agents.* Medicinal Research Reviews, 2003. **23**(4): p. 519-539.

121. Hung, T.M., et al., *Flavonoid Glycosides from Chromolaena odorata Leaves and Their in Vitro Cytotoxic Activity.* Chem. Pharm. Bull., 2011. **59**(1): p. 129-131

122. González-Gallego, J., S. Sánchez-Campos, and M.J. Tuñón, *Anti-inflammatory propreties of dietary flavonoids. Nutricion hospitalaria.* Nutricion hospitalaria, 2007. **22** (3): p. 287-293.

123. Kim, H.P., et al., *Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mecanisms.* Journal of Pharmacological Sciences, 2004. **96**(3): p. 229-245.

124. Tapas, A.R., D.M. Sakarkar, and R.B. Kakde, *Flavonoids as nutraceuticals.* Topical journal of Pharmaceutical Research, 2008. **7**(3): p. 1089-1099.

125. Harborne, J.B., H. Baxter, and G.P. Moss, *Phytochemical dictionary : a handbook of bioactive compounds from plants, 2nd edition*. 1999, London, UK: Taylor & Francis.

126. Bylka, W., I. Mathawska, and N.A. Pilewski, *Natural flavonoid as antimicrobial agents.* Journal of the American Nutraceutical Association, 2004. **7**(2): p. 24-26.

127. Marfak, A., *Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides*, 2003, Université de Limoges: Limoges.

128. Bertille, B., *Les Rubiacées : botanique, biochimie et plantes utiles*, 2011, Université de Lille II: Lille.

129. Muzychkina, R.A., *Natural Anthraquinoues: Biological and Physiological Properties*. 1998, Moscow: G. A. Tolstikov ed. Publishing House PHASIS p. 27-45.

130. Comini, L.R., et al., *Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from Heterophyllaea pustulata (Rubiaceae).* Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2011. **102**(2): p. 108-114.

131. Xiang, W., et al., *Antimicrobial anthraquinones from Morinda angustifolia.* Fitoterapia, 2008. **79**: p. 501-504.

132. Manojlović, N.T., et al., *Isolation and antimicrobial activity of anthrquinones from some species of the lichen genus Xanthoria.* J. Serb. Chem. Soc., 2000. **65**(8): p. 555-560.

133. Park, B.-S., et al., *Antibacterial activity of Tabebuia impetiginosa Martius ex DC (Taheebo) against Helicobacter pylori.* Journal of Ethnopharmacology, 2006. **105**(1-2): p. 255-262.

134. Kazmi, M.H., et al., *An anthraquinone derivative from Cassia italica.* Phytochemistry, 1994. **36**(3): p. 761-763.

135. Lenta, B.N., et al., *Anthraquinones from the stem bark of Stereospermum zenkeri with antimicrobial activity.* Phytochemistry, 2007. **68**(11): p. 1595-1599.

136. Kanokmedhakul, K., S. Kanokmedhakul, and R. Phatchana, *Biological activity of Anthraquinones and Triterpenoids from Prismatomeris fragrans.* Journal of Ethnopharmacology, 2005. **100**(3): p. 284-288.

137. Agarwal, S.K., et al., *Antifungal activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi.* Journal of Ethnopharmacology, 2000. **72**(1-2): p. 43-46.

138. Alves, D.S., et al., *Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin.* Biochemical Pharmacology, 2004. **68**: p. 549-561.

139. Ali, A.M., et al., *Antiviral, Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Anthraquinones Isolated from the Roots of Morinda elliptica.* Pharm. Biol., 2000. **38**: p. 298-301.

140. Barnard, D.L., et al., *Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus.* Antiviral Research, 1992. **17**(1): p. 63-77.

141. Groom, Q.J. and T. Reynolds, *Barbaloin in aloe species.* Planta Med., 1986. **52**: p. 345-348.

142. Plasket, L.G., *The nature of the plant and its background In: The health and medical use of Aloe vera*. 1996, Cornwall, UK: Biomedical Information Service Ltd. p. 10-7.

143. Akao, T., et al., *A purgative action of barbaloin is induced by Eubacterium sp. strain BAR, a human intestinal anaerobe, capable of transforming barbaloin to aloe-emod in anthrone.* Biol Pharm Bull, 1996. **19**(1): p. 136-138.

144. Georges, K., et al., *Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from Cassia nigricans from Burkina Faso.* Bioresource Technology, 2008. **99**(6): p. 2037-2045.

145. Onegi, B., et al., *Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from Stereospermum kunthianum.* Phytochemistry, 2002. **60**(1): p. 39-44.

146. Russo-Marie, F., A. Peltier, and B. Polla, *L'inflammation*. 1998: Editions John Libbey Eurotext.

147. Ferguson, L.R., *Chronic inflammation and mutagenesis.* Mutation Research, 2010. **690**: p. 3-11.

148. Parke, A. and D. Parke, *The pathogenesis of inflammatory disease: Surgical shock and multiple system organ failure.* Inflammopharmacology, 1995. **3**(2): p. 149-168.

149. Roifman, I., et al., *Chronic inflammatory diseases and cardiovascular risk: a systematic review.* Can J Cardiol, 2011. **27**(2): p. 174-182.

150. Rakoff-Nahoum, S., *Why Cancer and Inflammation?* YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE, 2006. **79**: p. 123-130.

151. Shu, L., et al., *Phytochemicals: cancer chemoprevention and suppression of tumor onset and metastasis.* Cancer and Metastasis Reviews, 2010. **29**(3): p. 483-502.

152. Organisation Mondiale de la Santé, *Cancer. Aide-mémoire n°297*, 2012, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/index.html.

153. Macarthur, M., G.L. Hold, and E.M. El-Omar, *Inflammation and Cancer. II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy.* Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2004. **286**: p. G515-G520.

154. Zucman-Rossi, J., *Le lien entre cancer et inflammation se resserre.* Inserm http://www.inserm.fr/espace-journalistes/le-lien-entre-cancer-et-inflammation-se-resserre, 2008.

155. Ng, S.C., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs-uses and complications.* Singapore Med. J., 1992. **33**: p. 510-513.

156. Kumaraswamy, M.V., M.P. Raghavendra, and S. Satish, *Antioxidant and anti-inflammatory activity of isolated phytoconstituent from Woodfordia fructicosa Kurz.* J. Pharm. Res., 2010. **3**(7): p. 1492-1495.

157. Organisation Mondiale de la Santé, *Stratégies de l'OMS pour la médecine traditionnelle 2002-2005*. 2002. 78p.

158. Lippert, C., *Production d'huiles essentielles de trois plantes aromatiques (O. gratissimum L., L. multiflora Moldenke, H. suaveolens L.) au Bénin (Parakou). Effet du mode de séchage sur le rendement d'extraction et la qualité des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation*, 2011.

159. Duke, A.J., *Alpha-pinene.* Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/chem-activities.pl.

160. Ravi, K.S., et al., *Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of Chloroxylon swietenia DC against Aedes aegypti and Anopheles stephensi.* Bioresource Technology, 2006. **97**: p. 2481-2484.

161. Mabry, T.J., K.R. Markham, and M. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*. 1970, New York: Springer.

162. Markham, K.R., *Techniques of Flavonoid Identification*. 1982, London: Academic Press.

163. Harborne, J.B., *The flavonoids: advances in research since 1986*. 1993, London: Chapman & Hall/CRC.

164. Pisutthanan, N., et al., *A new flavonoid from Chromolaena odorata.* Natural Product Research, 2006. **20**(13): p. 1192–1198.

165. Wafo, P., et al., *2'-Hydroxy-4,4',5',6'-tetramethoxychalcone.* Acta Crystallographica, 2005. **E61**: p. o3017-o3019.

166. El-Seedi, H., F. Ghia, and K.B.G. Torssell, *Cadinane Sesquiterpenes from Siparuna macrotepala.* Phytochemistry, 1994. **35**(6): p. 1495-1497.

167. Kuo, Y.-H. and M.-T. Yu, *Four New Sesquiterpenes from the Heartwood of Juniperus formosana var. concolor.* Chem. Pharm. Bull., 1999. **47**(7): p. 1017—1019.

168. Padmini, E., A. Valarmathi, and M.U. Rani, *Comparative analysis of chemical composition and antibacterial activities of Mentha spicata and Camellia sinensis.* ASIAN J. EXP. BIOL. SCI., 2010. **1**(4): p. 772- 781.

169. Rajab, M.S., et al., *Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives : A preliminary structure-activity study.* 1998. **64**(1): p. 2-4

170. Snipes, W., et al., *Inactivation of lipid-containing viruses by long-chain alcohols.* Antimicrob Agents Chemother, 1977. **11**(1): p. 98-104.

171. Yoshihiro, I., et al., *Biphasic effects of geranylgeraniol, terpenone and phytol on the growth of Staphylococcus aureus.* Antimicrob. Agents Chemother, 2005. **49**(5): p. 1770-1774.

172. Gottlieb, H.E., V. Kotlyar, and A. Nudelman, *NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities.* J. Org. Chem., 1997. **62**: p. 7512-7515.

173. Wu, T.-S., et al., *Cytotoxic Anthraquinones from the Stems of Rubia wallichiana DECNE.* Chem. Pharm. Bull., 2003. **51**(8): p. 948-950.

174. Takashima, J., et al., *New constituents from the leaves of Morinda citrifolia.* Chem Pharm Bull, 2007. **55**(2): p. 343-5.

175. Akihisa, T., et al., *Anti-inflammatory and Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Fruits of Morinda citrifolia (Noni).* Journal of Natural Products, 2007. **70**(5): p. 754-757.

176. Gao, H. and J. Kawabata, *α-Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α-glucosidase inhibitors.* Bioorganic & Medicinal Chemistr y, 2005. **13**: p. 1661-1671.

177. Puebla, P., et al., *Chemical Constituents of the Bark of Dipteryx alata Vogel, an Active Species against Bothrops jararacussu Venom.* Molecules, 2010. **15**: p. 8193-8204.

178. López, L.M., et al., *An isoflavone glucoside from Retama sphaerocarpa Boissier.* Phytochemistry, 1998. **48**(2): p. 401-402.

179. Moriyasu, M., et al., *New isoflavones from Belamcandae Rhizoma.* J. Nat. Med., 2007. **61**: p. 329-333.

180. Yao-Kouassi, P.A., et al., *Isoflavonoid Glycosides from the Roots of Baphia bancoensis.* J. Nat. Prod., 2008. **71**: p. 2073–2076.

181. Budzikiewicz, H., J.M. Wilson, and C. Djerassi, *Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. XXXII. Pentacyclic Triterpenes.* Journal of the American Chemical Society, 1963. **85**(22): p. 3688-3699.

182. Ullah, N., et al., *A pentacyclic triterpene from Daphne oleoides.* Phytochemistry, 1999. **50**(5): p. 839-841.

183. Karliner, J. and C. Djerassi, *Terpenoids. LVII. Mass Spectral and Nuclear Magnetic Resonance Studies of Pentacyclic Triterpene Hydrocarbon.* The Journal of Organic Chemistry, 1966. **31**(6): p. 1945-1956.

184. Mahato, S.B. and A.P. Kundu, *^{13}C-NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features.* Phytochemistry, 1994. **37**(6): p. 1517-1575.

185. Ammann, W., et al., *^{1}H and ^{13}C chemical shifts and coupling constants of lupane. Application of two-dimensional NMR techniques.* Organic Magnetic Resonance, 1982. **20**(4): p. 260-265.

186. Reynolds, W.F., et al., *Total assignment of ^{13}C and ^{1}H spectra of three isomeric triterpenol derivatives by 2D NMR: an investigation of the potential utility of ^{1}H chemical shifts in structural investigations of complex natural products.* Tetrahedron, 1986. **42**(3): p. 3419-3428.

187. Endale, A., et al., *Hopane-type saponins from the seeds of Glinus lotoides.* Journal of Natural Products, 2005. **68**(3): p. 443-446.

188. Meselhy, M.R. and E.S.A. Aboutabl, *Hopane-type saponins from Polycarpon succulentum growing in Egypt.* Phytochemistry, 1997. **44**(5): p. 925-929.

189. Culioli, G., et al., *A lupane triterpene from frankincense (Boswellia sp., Burseraceae).* Phytochemistry, 2003. **62**(4): p. 537-541.

190. Ali, M., A. Heaton, and D. Leach, *Triterpene Esters from Australian Acacia.* Journal of Natural Products, 1997. **60**: p. 1150-1156.

191. Mutai, C., et al., *Cytotoxic lupane-type triterpenoids from Acacia mellifera.* Phytochemistry, 2004. **65**(8): p. 1159-1164.

192. Pereira, F.B.M., F.M.J. Domingues, and A.M.S. Silva, *Triterpenes from Acacia dealbata.* Natural Product Letters, 1996. **8**: p. 97-104.

193. Fotie, J., et al., *Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from Holarrhena floribunda.* Journal of Natural Products, 2006. **69**(1): p. 62-67.

194. Hong, Y.H., et al., *Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (Medicago sativa) beyond coumestrol.* J Agric Food Chem, 2011. **59**(1): p. 131-7.

195. Valdes, L.J., *Loliolide from Salvia divinorum.* Journal of Natural Products, 1986. **49**(1): p. 171-171.

196. Neergaard, J.S., et al., *Serotonin transporter affinity of (−)-loliolide, a monoterpene lactone from Mondia whitei.* South African Journal of Botany, 2010. **76**(3): p. 593-596.

197. Liu, Y.-B., et al., *Chemical Constituents of Toona ciliata var. pubescens.* Chinese Journal of Natural Medicines, 2011. **9**(2): p. 115-119.

198. El Hattab, M., et al., *Apo-fucoxanthinoids and loliolide from the brown alga Cladostephus spongiosus f. verticillatus (Heterokonta, Sphacelariales)*. Vol. 36. 2008, Kidlington, Royaume-Uni: Elsevier. 5.

199. He, Z., et al., *Chemical composition of the green alga Codium Divaricatum Holmes.* Fitoterapia, 2010. **81**(8): p. 1125-8.

200. Kimura, J. and N. Maki, *New Loliolide Derivatives from the Brown Alga Undaria pinnatifida.* Journal of Natural Products, 2001. **65**(1): p. 57-58.

201. Ping-Jyun, S., et al., *Loliolide: Occurrence of a carotenoid metabolite in the octocoral Briareum excavatum (Briareidae).* Biochem Syst Ecol, 2010. **38**(1): p. 116-118.

202. Yang, X., et al., *Antioxidant activity and cell protective effect of loliolide isolated from Sargassum ringgoldianum subsp. coreanum.* Algae, 2011. **26**(2): p. 201-208.

203. de Melo, C.L., et al., *Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet.* Chem Biol Interact, 2010. **185**(1): p. 59-65.

204. Fang, S.-y., et al., *Triterpenoids from Adina rubella.* Journal of Natural Products, 1996. **59**(3): p. 304-307.

205. Turkmen, Z., et al., *A triterpene oleanolic acid conjugate with 3-hydroxyflavone derivative as a new membrane probe with two-color ratiometric response.* J Biochem Biophys Methods, 2005. **64**(1): p. 1-18.

206. Salem, M.M. and K.A. Werbovetz, *Isoflavonoids and other compounds from Psorothamnus arborescens with antiprotozoal activities.* J Nat Prod, 2006. **69**(1): p. 43-9.

207. Kashiwada, Y., et al., *Anti-AIDS Agents. 30. Anti-HIV Activity of Oleanolic Acid, Pomolic Acid, and Structurally Related Triterpenoids 1.* Journal of Natural Products, 1998. **61**(9): p. 1090-1095.

208. Cayman Chemical *Oleanolic Acid* Item Number 11726 Item Number 11726 http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/11726, 2012.

209. Liu, J., *Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid.* J Ethnopharmacol, 1995. **49**(2): p. 57-68.

210. Arigoni, D., et al., *Dimethylallyl pyrophosphate is not the committed precursor of isopentenyl pyrophosphate during terpenoid biosynthesis from 1-deoxyxylulose in higher plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999. **96**: p. 1309-1314.

211. Arigoni, D., et al., *Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997. **94**: p. 10600-10605.

212. Umlauf, D., et al., *Biosynthesis of the irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in Tanacetum vulgare L. (Asteraceae).* Phytochemistry, 2004. **65**: p. 2463-2470.

213. Devkota, H.P., et al., *Phenolic Compounds from the Aerial Parts of Diplomorpha canescens.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2012. **60**(4): p. 554-556.

214. Martínez, R., D.J. Ramón, and M. Yus, *Easy a-alkylation of ketones with alcohols through a hydrogen autotransfer process catalyzed by $RuCl_2(DMSO)_4$.* Tetrahedron, 2006. **62**: p. 8988-9001.

215. Skrzypczak-Pietraszek, E. and J. Pietraszek, *Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (Melittis melissophyllum L., Lamiaceae).* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **66**: p. 154-161.

216. Weon, J.B., et al., *Neuroprotective compounds isolated from Cynanchum paniculatum.* Arch. Pharmacal Res., 2012. **35**(4): p. 617-621.

217. Huang, Z., L. Dostal, and J.P.N. Rosazza, *Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanillic Acid and Guaiacol by Rhodotorula rubra.* The Journal of Biological Chemistry 1993. **268**(32): p. 23954-23958.

218. Youn, U.J., et al., *A Pyridyl Alkaloid and Benzoic Acid Derivatives from the Rhizomes of Anemarrhena asphodeloides.* Natural Product Sciences, 2010. **16**(4): p. 203-206.

219. Ponce, M.A., et al., *Flavonoids, benzoic acids and cinnamic acids isolated from shoots and roots of Italian rye grass (Lolium multiflorum Lam.) with and without endophyte association and arbuscular mycorrhizal fungus.* Biochemical Systematics and Ecology, 2009. **37**(4): p. 245-253.

220. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years.* J. Nat. Prod., 2007. **70**: p. 461-477.

221. Wagner, H. and S. Bladt, *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2001, New-York.: Springer.

222. Adams, R.P., *Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. 1995, Illinois, USA: Allured Publishing Co.

223. Mc Lafferty, F.W. and D.B. Stauffer, *The Wiley NBS registry of mass spectral data.* 1989, New York: 2ème Edition John Wiley and Sons.

224. De Hoffmann, E., J. Charrette, and V. Stroobant, *Spectrométrie de masse - Cours et exercices corrigés*. 1999, Paris: 2ème édition Dunod p. 14-31.

225. Sheldrick, G.M., *Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger structures.* Acta Crystallographica, Section A: Foundations of Crystallography A46, 1990: p. 467-473.

226. Signorelli, P. and R. Ghidoni, *Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises.* J. Nutr. Biochem. , 2005. **16**: p. 449-466.

227. Tang, H.Y., et al., *Resveratrol-induced cyclooxygenase-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells.* Mol Cancer Ther 2006. **5**: p. 2034-2042.

228. Lagouge, M., et al., *Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1α.* Cell, 2006. **127**(6): p. 1109-1122.

229. Buron, N., et al., *Use of human cancer cell lines mitochondria to explore the mechanisms of BH3 peptides and ABT-737-induced mitochondrial membrane permeabilization.* PloS one, 2010. **5**(3): p. e9924.

230. Fernandez, C., B.M. Fraga, and M.G. Hernandez, *Flavonoid aglycones from some Canary islands species of Sideritis* J. Nat. Prod., 1988. **51**: p. 591-593.

231. Wollenweber, E. and J.N. Roitman, *A Novel Methyl Ether of Quercetagetin from Chromolaena odorata Leaf Exudate.* Biochemical Systematics and Ecology, 1996. **24**(5): p. 479-480.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Quelques métabolites secondaires non volatils de *Chromolaena odorata* 154

Tableau 2 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Morinda morindoides* 156

Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles des graines et des feuilles de Morinda lucida KI :Kovats indices ; RI : Retention indices..... 158

Liste des figures

Figure 1 : Répartition mondiale de *Chromolaena odorata* (zones indiquées en couleur jaune) [5]..... 6
Figure 2 : Effet invasif de *Chromolaena odorata* 7
Figure 3 : Espèce *Chromolaena odorata* (L) R. M. King & H. Ronbinson 8
Figure 4 : Composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *C. odorata*..... 10
Figure 5 : Exemples de flavonols de *C. odorata*..... 11
Figure 6 : Exemples de favanones de *C. odorata*..... 11
Figure 7 : Exemples de flavones de *C. odorata* 11
Figure 8 : Exemples de chalcone et flavanol de *C. odorata*..... 12
Figure 9 : Exemple de flavonoïde glycoside de *C. odorata* 12
Figure 10 : Acides phénoliques de *C. odorata*..... 12
Figure 11 : Alcaloïdes de *C. odorata* 13
Figure 12 : Terpénoïdes de *C. odorata* 13
Figure 13 : Anthraquinones de *C. odorata*..... 14
Figure 14 : Acide gras et phtalate de *C. odorata*..... 14
Figure 15 : Répartition mondiale de *L. fasciculata* (zones indiquées en jaune) [43] 15
Figure 16 : Espèce *Leptoderris fasciculata* (Benth.) Dunn 15
Figure 17 : Roténone soupçonnée de *Leptoderris micrantha*..... 16
Figure 18 : Répartition mondiale de *M. morindoides* (zones indiquées en jaune) (Baker) [47]..... 17
Figure 19 : Espèce *Morinda morindoides* 17
Figure 20 : Flavonoïdes de *M. morindoides*..... 19
Figure 21 : Iridoïdes de *M. morindoides* 20
Figure 22 : Terpénoïde de *M. morindoides* 21
Figure 23 : Répartition mondiale de *M. lucida* [63]..... 22
Figure 24 : Espèce *Morinda lucida* (Benth)..... 22
Figure 25 : Composés majoritaires des huiles essentielles des feuilles et des racines de *M. lucida* 24
Figure 26 : Anthraquinones des racines, tiges et écorces de *M. lucida* 25
Figure 27 : Anthraquinols de tige de *M. lucida*..... 25
Figure 28 : Iridoïde des feuilles de *M. lucida*..... 26
Figure 29 : Acide gras du tronc d'arbre de *M. lucida* 26
Figure 30 : Quelques composés des huiles essentielles [96, 97] 29
Figure 31 : Exemples de quelques monoterpènes 31
Figure 32 : Squelette iridane 32
Figure 33 : Exemples de quelques sesquiterpènes 32
Figure 34 : Exemples de quelques diterpènes 33
Figure 35 : Squelettes de triterpènes tétracycliques et pentacycliques..... 34
Figure 36 : Exemples de quelques triterpènes..... 34
Figure 37 : Structure de noyau stérane..... 34

Figure 38 : Exemples de quelques stéroïdes 35

Figure 39 : Structure de base des flavonoïdes 37

Figure 40 : Les principales classes de flavonoïdes 38

Figure 41 : Piégeage des espèces réactives dérivées de l'oxygène ($R^{\bullet}$) par les flavonoïdes et formation d'une structure stable [111] 39

Figure 42 : Critères structuraux essentiels pour une bonne activité antiradicalaire des flavonoïdes [112] 40

Figure 43 : Principaux sites impliqués dans la chélation des ions métalliques (Me^{n+}) [111] 40

Figure 44 : Anthraquinone 43

Figure 45 : Carte de la ville d'Abidjan 49

Figure 46 : Effet de la saison et du lieu géographique de récolte 50

Figure 47 : Effet de la durée de stockage des feuilles sur le rendement 51

Figure 48 : Composition chimique des huiles essentielles déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) en fonction du lieu de récolte 51

Figure 49 : CCM préliminaires de C1. A élution au CH_2Cl_2. B élution Tol/AcOeEt/MeOH (80 :18 :2). 1-UV visible. 2-UV 254 nm. 3-UV 365 nm. 4-Réactif à la vanilline sulfurique. 5-Réactif de Neu observation UV visible. 6-Réactif de Neu, observation UV 365 nm. 7-Réactif de Liebermann et Burchard, observation UV 365 nm 52

Figure 50 : Schéma de fractionnement de l'extrait hexanique C1 des feuilles de *C. odorata* et isolement des composés Chrom1 et Chrom2 54

Figure 51 : Schéma de fractionnement de C1 et isolement de Chrom3 55

Figure 52 : Spectre de RMN-^{1}H du composé Chrom1 dans l'acétone-d6 56

Figure 53 : Spectre COSY du composé Chrom1 57

Figure 54 : Structure de 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone (Naringenin-7,4'-dimethylether) et corrélation HSQC du composé Chrom1 ; δ_H en bleu et δ_C en vert 57

Figure 55 : Spectre RMN-^{1}H du composé Chrom2 dans acétone-d6 59

Figure 56 : Structure 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcon et corrélations HMBC du composé Chrom2 . 59

Figure 57 : Structure par analyse aux rayons X du composé Chrom2 60

Figure 58 : Spectre RMN-^{1}H du composé Chrom3 dans acétone-d6 61

Figure 59 : Spectre RMN-2D COSY du composé Chrom3 62

Figure 60 : Spectre RMN-2D HMBC du composé Chrom3 63

Figure 61 : Corrélation COSY (A) et HMBC (B) du composé Chrom3 63

Figure 62 : Structure 4-isopropyl-1,6-diméthylnaphthalène (cadalène) du composé Chrom3 64

Figure 63 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle de *Morinda morindoides* 65

Figure 64 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle des feuilles de *Morinda lucida* 67

Figure 65 : Distribution en pourcentage des différents composants de l'huile essentielle des fruits de *Morinda lucida* 67

Figure 66 : CCM préliminaires de M3. A élution au CH_2Cl_2. B élution Tol/AcOeEt/MeOH (80 :18 :2). C élution au Hex/AcOEt (50 :50). 1-UV visible. 2-UV 254 nm. 3-UV 365 nm. 4-Réactif à la vanilline sulfurique. 5-Réactif de Neu observation UV visible. 6-Réactif de Neu, observation UV 365 nm. 7-Réactif à la potasse alcoolique. 69

Figure 67 : Schéma de fractionnement de M3 et isolement de Mor1, Mor2 et Mor3 70

Figure 68 : Différents motifs de la structure du composé Mor1 71

Figure 69 : Spectre RMN-^{1}H du composé Mor1 dans l'acétone-d6 71
Figure 70 : Spectre HMBC dans l'acétone-d6 et corrélations HMBC du composé Mor1 72
Figure 71 : Structure 2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone du composé Mor1 72
Figure 72 : Spectre RMN-^{1}H du composé Mor2 dans l'acétone-d6 74
Figure 73 : Corrélations HMBC du composé Mor2 74
Figure 74 : Structure 2-hydroxy-1-méthoxyanthraquinone (alizarin-1-méthyléther) du composé Mor2 75
Figure 75 : Spectre RMN-^{1}H du composé Mor3 dans l'acétone-d6 76
Figure 76 : Structure 1,5,15-triméthylmorindol et corrélations HMBC du composé Mor3 78
Figure 77 : CCM préliminaires de l'extrait de dichlorométhane (L2) et d'acétate d'éthyle (L3). A élution au CH_2Cl_2. B élution Tol/AcOeEt/MeOH (80 :18 :2). C élution à l'AcOEt. 1-UV visible. 2-UV 254 nm. 3-UV 365 nm. 4-Réactif à la vanilline sulfurique. 5-Réactif de Neu observation UV visible. 6-Réactif de Neu, observation UV 365 nm. 7-Réactif de Liebermann et Burchard, observation UV visible. 8-Réactif de Liebermann et Burchard, observation UV 365 nm. 80
Figure 78 : Schéma d'isolement de Lep1, Lep2, Lep3 et Lep4. (a) L2.5 184 mg Hex/CH_2Cl_2 (60:40); L2.6 127.3 mg Hex/CH_2Cl_2 (50:50); L2.7 126.1 mg Hex/CH_2Cl_2 (40:60); L2.8 136.9 mg Hex/CH_2Cl_2 (40:60)81
Figure 79 : Schéma d'isolement des composés Lep5, Lep6, Lep7, Lep8 82
Figure 80 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep6 dans $CDCl_3$ 85
Figure 81 : Spectre RMN-2D HMBC du composé Lep6 86
Figure 82 : Corrélation COSY (rouge), NOESY (vert) et HMBC (noir) du composé Lep6 87
Figure 83 : Structure 4',5,6,7-tetraméthoxyisoflavone du composé Lep6 87
Figure 84 : Structure par analyse aux rayons X du composé Lep6 87
Figure 85 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep8 dans l'acétone-d6 89
Figure 86 : Corrélation COSY (rouge), NOESY (vert) et HMBC (noir) du composé Lep8 90
Figure 87 : Structure 7-hydroxy-4',5,6-trimethoxyisoflavone du composé Lep8 90
Figure 88 : Spectre de masse IE du composé Lep3 91
Figure 89 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep3 dans $CDCl_3$ 92
Figure 90 : Corrélations observées sur le spectre HMBC du composé Lep3 93
Figure 91 : Squelettes de hopène et lupène 93
Figure 92 : Principales corrélations observées sur le spectre NOESY 94
Figure 93 : Structure du (20)29-lupén-3β-ol (composé Lep3) 94
Figure 94 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep7 dans l'acétone-d6 96
Figure 95 : Structure du composé Lep7 98
Figure 96 : Spectre HMBC du composé Lep7 99
Figure 97 : Corrélations HMBC du composé Lep7 99
Figure 98 : Principales corrélations NOESY du composé Lep7 100
Figure 99 : Structure loliolide du composé Lep7 100
Figure 100 : Acide oléanolique 101
Figure 101 : Structure diphénylamine du composé Lep1 102
Figure 102 : Structure (*E*)-phytol du composé Lep2 102
Figure 103 : Structure 4-hydroxybenzaldéhyde du composé Lep4 103
Figure 104 : Schéma de fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle L3 104
Figure 105 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep9 dans l'acétone-d6 106

Figure 106 : Motifs du composé Lep9 obtenus à partir des spectres RMN-^{1}H et COSY 107

Figure 107 : Corrélation HMBC du composé Lep9 107

Figure 108 : Structure dihydrochalcone du composé Lep9 107

Figure 109 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep11 dans l'acétone-d6 108

Figure 110 : Structure et principale corrélations HMBC du composé Lep11 109

Figure 111 : Structure d'acide benzoïque du composé Lep10 110

Figure 112 : Structure de l'acide 2-hydroxybenzoïque du composé Lep12 110

Figure 113 : Effet des composés isolés sur la viabilité des cellules. Cellules traitées avec 20 µM chalcone (C2), 20 µM cadalène (C3) ou 20 µM resvératrol pendant 48 h, puis l'ATP a été quantifiée en utilisant le test de viabilité CellTiter Glo® 111

Figure 114 : Effet des composés isolés sur l'apoptose. Cellules Cal51 ont été traitées avec 20 µM de chalcone (C2), cadalène (C3) ou le resvératrol (Res) pendant 48 h en combinaison ou non avec l'activité pharmacologique inhibiteur de Bcl2/BclxL ABT737 (Selleck) à 1 µM. Puis les cellules ont été récupérées et analysées par cytométrie de flux après immunomarquage Apo2.7. Les données (% de cellules positives Apo2.7) sont la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres représentent l'écart type = effet significatif par rapport au composé seul ($p < 0.05$) 112

Figure 115 : Effet des composés isolés de feuilles de *C. odorata* sur la clonogénéicité des cellules. Tests de clonogénéicité effectués par incubation des lignées cellulaires (A) Cal51, (B) MCF7 ou (C) MDA-MB-468 avec 10, 20 ou 50 µM de la chalcone (C2), cadalène (C3) ou le resvératrol (Res) pendant 14 jours. Les colonies sont mises en évidence au Crystal Violet et dénombrées manuellement. Pour (A) et (B), les données (nombre de colonies) sont la moyenne de 4 expériences indépendantes. La barre représente l'écart-type. Pour (C), un seul test a été effectué 113

Figure 116 : Schéma d'extraction des fractions C1 à C4 121

Figure 117 : Schéma d'extraction de *M. lucida* et *L. fasciculata* et obtention des fractions F1 à F4 122

Figure 118 : Structure du resvératrol 129

Figure 119 : Structure de l'ABT737 ou 4-[4-[(4'-Chloro[1,1'-biphényl]-2-yl)méthyl]-1-piperazinyl]-N-[[4-[[(1R)-3-(diméthylamino)-1-[(phénylthio)méthyl]propyl]amino]-3-nitrophényl]sulfonyl]benzamide 130

Figure 120 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep1 dans l'acétone-d6 166

Figure 121 : Corrélation COSY et HMBC du composé Lep1 167

Figure 122 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep2 dans $CDCl_3$ 169

Figure 123 : Spectre RMN-1H du composé Lep4 dans CDCl3 172

Figure 124 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep5 dans l'acétone-d6 174

Figure 125 : Structure et principales corrélations NEOSY du composé Lep5 177

Figure 126 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep10 dans MeOD 182

Figure 127 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep12 dans l'acétone-d6 186

Liste des communications publiées pendant la thèse

Publications

- F.P. Bi Kouamé, G. Bedi, A.M. Koffi, J.C. Chalchat and T. Y. N'Guessan Volatiles Constituents from Leaves of *Morinda morindoïdes* (Rubiaceae): A medicinal plant from the Ivory Coast ***The Open Natural Products Journal.*** **3 (2010), 6-9.**
- F.P. Bi Kouamé, Camille Jacques, Gustave Bedi, Virginie Silvestre, Denis Loquet, Sophie Barillé-Nion, Richard J Robins, Illa Tea Phytochemicals Isolated from Leaves of *Chromolaena odorata* : Impact on Viability and Clonogenicity of Cancer-Cells Lines ***Phytother Res,*** **(2012).** DOI: 10.1002/ptr.4787.

Actions de communication grand public

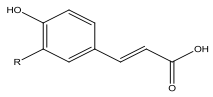
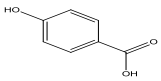
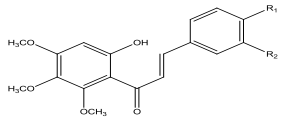
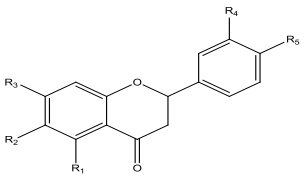
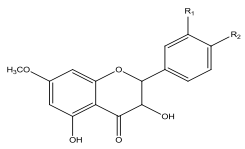
- F.P. Bi Kouamé, G. Bedi, A.M. Koffi, J.C. Chalchat et T. Y. N'Guessan Etude chimique des huiles essentielles des feuilles de *Morinda morindoïdes* (Rubiaceae) : une plante médicinale de Côte d'Ivoire **JSA-SOACHIM 2009** (Yamoussoukro-Côte d'Ivoire).
- F.P. Bi Kouamé, G. Bedi, J.C. Chalchat and T. Y. N'Guessan.Etude géographique du chemotype des huiles essentielles de *Chromolaena odorata* de la ville d'Abidjan, Côte d'Ivoire **JSA-SOACHIM 2010** (Niamey-Niger)
- François P. Bi Kouamé, Illa Tea, Gustave Bedi et Richard Robins Evaluation of the chemical and biological properties of tropical medicinal plants : *Chromolaena odorata* (Asteraceae), *Morinda lucida* (Rubiaceae), *Leptoderris fasciculata* (Fabaceae) **JED 3MPL 2011** (Mans-France).

Posters

- François P. Bi Kouamé, Illa Tea, Gustave Bedi et Richard Robins Valorisation de plantes médicinales de Côte d'Ivoire: étude chimique et biologique de *Chromolaena odorata* **JED 3MPL 2010** (Nantes-France).
- François P. Bi Koffi Kouamé , Illa Téa, Bédi Gustave et Richard Robins Evaluation of chemical and biological properties of medicinal plants from the Ivory Coast: *Chromolaena odorata* **XXVth International Conference on Polyphenols 2010** (Montpellier-France).

Annexes

Tableau 1 : Quelques métabolites secondaires non volatils de *Chromolaena odorata*

Groupe Chimique et Structure	Nom	Ref.
Coumarines (acides hydroxycinnamiques) 	R=H Acide 3-(4-hydroxyphenyl)-prop-2-ènoïque R=OCH_3 Acide férulique	[16]
Hydroxybenzoïque 	Acide *p*-hydroybenzoïque	[16]
Flavonoïde – Chalcone 	R_1=OH, R_2=H 2',4-dihydroxy-4',5',6' trimethoxychalcone R_1=OCH_3, R_2=OCH_3 2'-hydroxy-3,4,4',5',6'-pentamethoxychalcone	[36]
	R_1=OCH_3, R_2=H 2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetramethoxychalcone (Odoratin)	[37]
Flavonoïde- Flavanone 	R_1=R_3=OH, R_2=R_4=H, R_5=OCH_3 Isosakuranetin	[34]
	R_1=R_3=R_2=OCH_3,R_4=H,R_5=OH 4'-hydroxy-5,6,7-trimethoxyflavanone	[36]
	R_1=R_5=OH, R_2=R_4=H,R_3=OCH_3 Sakuranetin	[33]
	R_1=OH,R_2=R_3=R_5=OCH_3,R_4=H; 5-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavanone R_1=OH,R_2=H,R_3=R_4=R_5=OCH_3 Eriodictyol-7,3',4'-trimethylether	[230]
	R_1=OH,R_2=R_4=H,R_3=R_5=OCH_3; Naringenin-7,4'-dimethylether R_1=R_4=OH,R_2=H,R_3=R_5=OCH_3 Persicogenin	[32]
	R_1=R_3=R_2=OCH3,R_4=H,R_5=OCH_3; 5,6,7,4'-Tetramethoxyflavanone	[34]
	R_1=R_3=OH,R_2=R_5=OCH_3,R_4=H; 5,7-dihydroxy-6,4'-dimethoxyflavanone	[164]
Flavonoïde- Flavanol 	R_1=R_2=OH; Padmatin R_1=H,R_2=OCH_3; Aromadendrin-7,4'-dimethylether	[32]
Flavonoïde- Flavone	R_1=R_3=R_4=R_6=OCH_3, R_2=R_5=OH Quercetagetin-3,5,7,3'-tetramethyl ether	[33]
	R_1=OH, R_2=R_3=R_5=OCH_3, R_4=R_6=H; Salvigenin	[35]
	R_1=R_2=R_3=R_5=OCH_3, R_4=R_6=H; 5,6,7,4'- tetramethoxyflavone	[36]

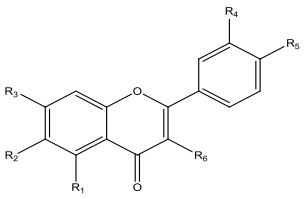
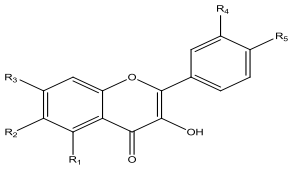
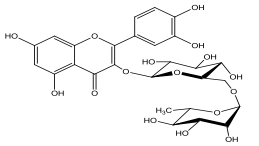
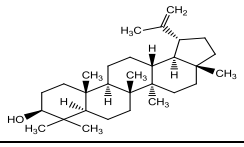
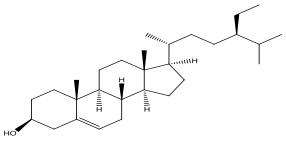
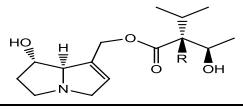
	R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OCH_3, R_6=H; Sinensetin	
	R_1=R_3=OH, R_2=R_5=OCH_3, R_4=R_6=H; Scutellarein-6,4'-dimethylether R_1=R_3=OH, R_2=R_6=H, R_4=R_5=OCH_3; Luteolin-3',4'-dimethylether R_1=R_3=OH, R_2=R_4=R_6=H, R_5=OCH_3; Acacetin	[32]
	R_1=R_3=OH, R_2=R_4=R_5=OCH_3, R_6=H; Eupatilin R_1=OH,R_2=R_3=R_4=R_5=OCH_3, R_6=H; 5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone	[16]
Flavonoïde- Flavonol	R_1=R_3=OH, R_2=R_4=H, R_5=OCH_3 ; Kaempferid	[33]
	R_1=R_3=R_4=OH, R_2=H, R_5=OCH_3; Tamarixetin	[32]
	R_1=R_3=R_4=R_5=OH, R_2=H; Quercetin R_1=R_3=R_4=R_5=OH, R_2=R_4=H; Kaempferol R_1=R_3=OH, R_2=H, R_4=R_5=OCH_3; Quercetin-3',4'-dimethylether R_1=OH, R_2=H, R_3=R_4=R_5=OCH_3; Quercetin-3',4',7-trimethylether R_1=R_4=OH, R_2=H, R3=R_5=OCH_3; Ombuin R_1=R_5=OH, R_3=OCH_3, R_4=H; Rhamnocitrin R_1=OH, R_2=R_4=H, R_3=R_5=OCH_3; Kaempferol-4',7-dimethylether R_1=R_4=R_5=OH, R_2=H, R_3=OCH_3; Rhamnetin R_1=R_3=R_4=OH,, R_2=R_5=OCH_3; Laciniatin	[32]
	R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OCH_3; 3-hydroxy-3',4',5,6,7-pentamethoxyflavone	[231]
Flavonoïde glycoside 	Rutin	[32]
Triterpenoïde 	Lupeol	[35]
Sterol 	β-sitostérol	[35]
Alcaloïde pyrolizidine 	R=OH Rinderine R=OAc 3'-Acétylrinderine	[38]

Tableau 2 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles de *Morinda morindoides*

KI :Kovats indices ; RI : Retention indices

N°	KI	RI	Composés	Pourcentage % v/v
Monoterpènes				
1	1060	1060	*γ*-terpinène	0.2
2	1072	1068	*n*-octanol	0.1
3	**1101**	**1096**	**linalol**	**8.4**
4	1104	-	hortrienol	0.1
5	1193	1195	*α*-terpineol	1.4
6	1197	1190	méthyle salicylate	1.2
7	1221	-	*β*-cyclocitral	0.3
8	1225	1230	nerol	0.7
9	1251	1255	géraniol	1.5
10	1283	-	vitispirane	0.8
Total monoterpènes				**14.7**
Sesquiterpènes				
11	1322	1330	hex-3-enyle tiglate	0.2
12	1337	1340	*δ*-élémène	0.4
13	1380	1380	(*E*)-*β*-damascenone	0.9
14	1391	1389	*β*-elemène	0.6
15	1424	1418	*β*-caryophyllène	3.1
16	1429	1430	(*E*)-*α*-ionone	0.1
17	1447	1453	geranyl acétone	0.6
18	1460	1454	*α*-humulène	0.7
19	1464	1463	6-demethoxy ageratochromène	1.2
20	1480	1485	D-germacrène	1.3
21	1485	1489	(*E*)-*β*-ionone	0.4
22	1493	1498	α-selinène	0.8
23	1499	1498	tiglate de benzyle	0.9

24	1503	1506	(*E*, *E*)-*α*-farnesène	0.8
25	1516	1514	*γ*-cadinène	0.3
26	1520	1523	*δ*-cadinène	0.3
27	1529	-	zingigerone	0.2
28	1551	1549	élémol	0.5
29	1561	1564	nerolidol	0.3
30	1613	1613	tétradecanal	0.5
31	1628	1624	10-épi-*γ*-eudesmol	0.4
32	1655	1654	*α*-cadinol	0.2
33	1660	1664	7-épi-*γ*-eudesmol	0.4
34	1666	1669	hex-3-enyle salicylate	0.1
35	1702	1700	eudesm-7(11)-en-4-ol	0.4
36	1715	-	pentadécanal	4.8
37	**1836**	**1837**	**6, 10, 14-triméthyl pentadecan-2-one**	**9.6**
38	1872	-	octadecan-9-yne	1.3
39	1878	-	méthyle linolénate	2.9
40	1886	-	farnésyle acétone	0.3
Total sesquiterpènes				**35.4**
Composés aromatiques				
41	1026	1025	*p*-cymène	0.2
42	**1291**	**1290**	**thymol**	**7**
43	1573	1578	(*Z*)-hex-3-enyle benzoate	1
44	1581	1580	hexyle benzoate	0.5
45	1587	1588	(*E*)-hex-3-enyle benzoate	0.8
46	1770	1760	Benzoate de benzyle	0.9
47	1860	1866	benzyle salicylate	1.7
Total composés aromatiques				**12.1**
Diterpènes				
48	1918	1944	isophytol	0.1
49	1945	1987	acide hexadécanoïque	1.1
50	**2111**	**-**	**(*E*)-phytol**	**28.4**

Total diterpènes	**29.6**
TOTAL	**91.8**

Tableau 3 : Composition chimique des huiles essentielles des graines et des feuilles de Morinda lucida
KI :Kovats indices ; RI : Retention indices

FRUITS					FEUILLES				
N°	**KI**	**RI**	**Composés**	**Pourcentage %**	**N°**	**KI**	**RI**	**Composés**	**Pourcentage %**
1	1071	1068	***n*-octanol**	**6.19**	1	854	854	(*E*)-hex-3-énol	-
2	1099	1097	linalol	1.54	2	864	859	(*Z*)-hex-3-énol	0.27
3	1170		acide caprylique	2.20	3	868	871	*n*-hexanol	0.51
4	1193	1189	*α*-terpinéol	1.16	4	1025	1025	*p*-cymène	-
5	1196	1192	salicylate de méthyle	0.34	5	1058	1060	*γ*-terpinène	-
6	1250	1253	géraniol	0.43	6	1071	1068	*n*-octanol	0.45
7	1262	1264	(*E*)-decan-2-enal	0.55	7	1099	1097	linalol	0.61
8	1289	1290	thymol	0.30	8	1193	1192	salicylate de méthyle	1.15
9	1378	1377	*α*-copaène	0.26	9	1200	1197	safranal	0.26
10	1386	1388	*β*-bourbonène	0.50	10	1220		*β*-cyclocitral	0.39
11	1391	1391	*β*-élémène	0.90	11	1290	1290	**thymol**	**5.30**
12	1423	1419	***β*-caryophyllène**	**5.54**	12	1336	1338	δ-élémène	0.34
13	1430	1432	*β*-copaène	-	13	1378	1377	*α*-copaène	0.45
14	1433	1437	*γ*-élémène	-	14	1386		*β*-bourbonène	0.27
15	1452	1446	(*E*)-*β*-farnesène	0.61	15	1391	1391	*β*-élémène	0.89
16	1459	1455	*α*-humulène	1.15	16	1411		(*Z*)-caryophyllène	0.45
17	1463	1463	6-deméthoxy-ageratochromène	4.46	17	1423	1419	**(*E*)-caryophyllène**	**5.72**
18	1484	1485	germacrène-D	1.51	18	1428	1427	2,5-dimethoxy-*p*-cymène	-
19	1492	1496	*γ*-amorphène	0.37	19	1433	1430	(*E*)-α-ionone	0.34
20	1499	1496	bicyclogermacrène + pentadécanal	0.77	20	1452	1446	(*E*)-*β*-farnesène	0.48
21	1503	1500	*α*-muurolène	0.40	21	1459	1455	*α*-humulène	1.07
22	1510	1506	(*E*, *E*)-*α*-farnesène	0.27	22	1463	1463	6-deméthoxy-agerochromène	4.37

23	1519	1519	*β*-sesquiphellandrène	0.37
24	1524	1523	*δ*-cadinène	0.41
25	1563	1563	(*E*)-nerolidol	0.30
26	1580	1578	spathulénol	0.37
27	1586	1583	oxyde de caryophyllène	1.25
28	1612	1613	tétradécanal	0.61
29	1627	1624	10-épi-*γ*-eudesmol	1.71
30	1658	1654	*α*-cadinol	0.80
31	1676		heptadecan-8-ène	4.30
32	1698		heptadécane	0.52
33	1701	1700	eudesm-7(11)-èn-4-ol	0.46
34	1714		pentadécanal	3.75
35	1769	1760	benzoate de benzyle	0.45
36	1779		hexadécanal	0.98
37	1834	1837	**6,10,14-triméthyl-pentandécan-2-one**	**5.48**
38	1890		3,12,15-octadecatrienoate de méthyle	1.38
39	1956		acide hexadécanoïque	0.51
40	1993		octadécan-13-ènal	0.87
41	2057		octadécan-9-èn-1-ol	4.10
42	2099		heneicosane	1.70
43	2107	1996	**phytol**	**14.80**
44	2199		doeicosane	1.05
45	2289		trieicosane	4.72
46	2399		tetraeicosane	0.87
47	2499		pentaeicosane	3.30
			TOTAL	**88.68**

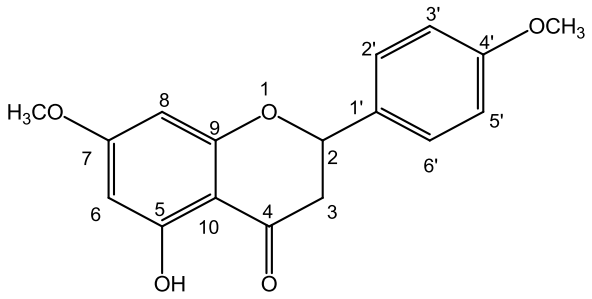
23	1479	1485	(*E*)-*β*-ionone	2.06
24	1484	1486	*β*-selinène	1.15
25	1492	1494	*α*-selinène	1.15
26	1499	1499	*α*-muurolène	0.92
27	1519	1519	*β*-sesquiphellandrène	0.51
28	1550	1549	élémol	1.17
29	1581	1581	oxyde de caryophyllène	0.30
30	1612	1613	tétradécanal	1.24
31	1627	1619	10-épi-*γ*-eudesmol	2.25
32	1665	1664	7-épi-*α*-eudesmol	0.33
33	1701	1700	eudesm-7(11)-en-4-ol	0.68
34	1714		**pentadécanal**	**9.91**
35	1768	760	benzoate de benzyle	0.48
36	1834	1837	6,10,14-triméthyl-pentadécan-2-one	4.08
37	2108	1996	**phytol**	**33.20**
			TOTAL	**82.75**

Composé Chrom1

5-hydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone

ou

naringenin-7,4'-diméthylether



$C_{17}H_{16}O_5$

masse : 300

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 300 (100), 299 (37), 193 (12), 192 (5), 167 (7), 166 (16), 135 (7), 134 (57), 129 (5), 122 (5), 121 (55), 119 (19), 110 (5), 95 (11), 91 (15)

RMN (400 MHz, acétone-d6)

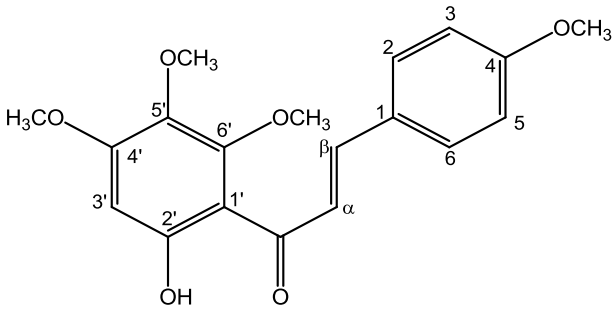
position	δ_C	δ_H
1	-	-
2	78.9	5.55 (*dd*, *J* = 12.8, *J* = 3.3 Hz)
3_{ax}	42.7	3.23 (*dd*, *J* = 17.7, *J* = 12.8 Hz)
3_{eq}	42.7	2.80 (*dd*, *J* = 17.7, *J* = 3.3 Hz)
4	196.6	-
5	163.5	-
6	94.2	6.05 (*d*, *J* = 2.2 Hz)
7	167.1	-
8	93.1	9.08 (*d*, *J* = 2.2 Hz)
9	162.3	-
10	102.8	-
1'	130.2	-
2'	127.5	7.51 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
3'	113.6	7.02 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
4'	159.5	-
5'	113.6	7.02 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
6'	127.5	7.51 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
5-OH	-	12.13 *s*
7-OCH_3	55.4	3.87 *s*
4'-OCH_3	55.7	3.85 *s*

Composé Chrom2

2'-hydroxy-4,4',5',6'-tetraméthoxychalcone

ou

odoratin



$C_{19}H_{20}O_6$

masse : 344

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 344 (100), 343 (11), 211 (10), 210 (81), 196 (7), 167 (25)

RMN (400 MHz, acétone-d6)

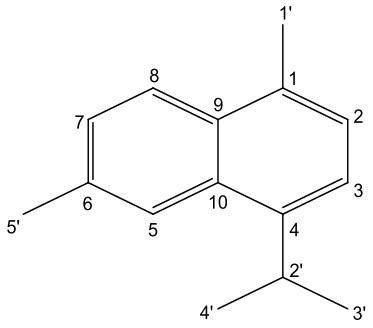
position	δ_C	δ_H
1	128.1	-
2	130.3	7.73 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
3	114.6	7.05 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
4	161.9	-
5	114.6	7.05 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
6	130.3	7.73 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
β-CH	124.1	7.89 (*d*, *J* = 15.9 Hz)
α-CH	143.1	7.83 (*d*, *J* = 15.9 Hz)
1'	108.3	-
2'	162.6	-
3'	96.5	6.35 (*s*)
4'	135.4	-
5'	160.5	-
6'	154.9	-
5-OH	-	13.73 (*s*)
4-OCH_3	54.9	3.90 (*s*)
4'-OCH_3	60.4	3.79 (*s*)
5'-OCH3	55.7	3.95 (*s*)
6'-OCH3	61.4	4.00 (*s*)
C=O	192.7	-

Composé Chrom3

4-isopropyl-1,6-diméthylnaphthalène

ou

cadalène



$C_{15}H_{18}$

masse : 198

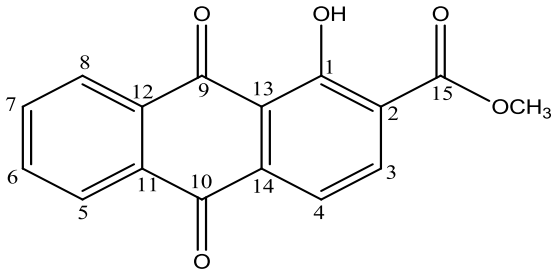
EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 198 (71), 184 (15), 183 (100), 168 (35), 167 (17), 165 (22), 155 (13), 153 (23), 152 (22), 141 (10)

RMN (500 MHz, $CDCl_3$)

position	δ_C	δ_H
1	132.5	-
2	126.4	7.22 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
3	122.2	7.29 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
4	142.4	-
5	123.7	7.98 (*d*, *J* = 2.2 Hz)
6	135.5	-
7	128.0	7.37 (*dd*, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.2 Hz)
8	125.6	7.94 (*d*, *J* = 8.7 Hz)
9	132.2	-
10	132.6	-
1'	19.4	2.61 *s*
2'	28.8	3.75 (*septuplet*, *J* = 7.3 Hz)
3'	23.9	1.36 (*d*, *J* =7.3Hz)
4'	23.9	1.36 (*d*, *J* =7.3Hz)
5'	21.9	2.53 *s*

Composé Mor1

2-acétyl-1-hydroxyanthraquinone



$C_{16}H_{10}O_5$

masse : 282

poudre jaune

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 282 (63), 252 (11), 251 (39), 250 (49), 224 (12), 223 (11), 222 (46), 194 (23), 167 (17), 166 (13), 140 (12), 139 (100), 138 (67), 137 (29), 43 (10)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

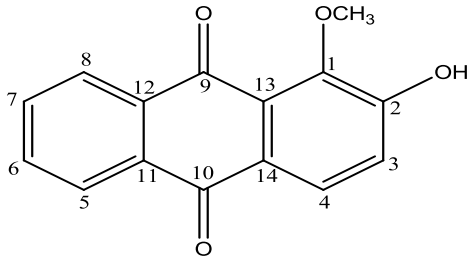
position	δ_C	δ_H
1	162.6	-
2	126.3	-
3	139.1	8.24 (*d*, *J* = 8.2 Hz)
4	118.7	7.85 (*d*, *J* = 8.2 Hz)
5	127.9	8.29 m
6	136.2	8.00 m
7	135.6	8.00 m
8	127.8	8.37 m
9	189.8	-
10	182.5	-
11	134.2	-
12	134.1	-
13	118.1	-
14	137.0	-
15	165.8	-
1-OH	-	13.37 *s*
15-OCH_3	52.7	3.93 *s*

Composé Mor2

2-hydroxy-1-méthoxyanthraquinone

ou

alizarin-1-méthyléther



$C_{15}H_{10}O_4$

masse : 254

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 254 (52), 236 (32), 225 (11), 211 (10), 209 (17), 208 (100), 207 (13), 183 (16), 180 (11), 168 (13), 155 (10), 152 (16), 139 (31), 127 (39), 126 (32), 77 (19), 76 (10)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	δ_C	δ_H
1	148.3	-
2	157.3	-
3	120.9	7.37 (*d*, *J* = 8.4 Hz)
4	124.9	8.04 (*d*, *J* = 8.2 Hz)
5	126.2	8.24 m
6	133.6	7.89 m
7	133.8	7.89 m
8	126.7	8.24 m
9	183.0	-
10	181.5	-
11	133.0	-
12	134.8	-
13	126.6	-
14	127.0	-
1-OCH_3	61.8	3.95 *s*
2-OH	-	9.26 *s*

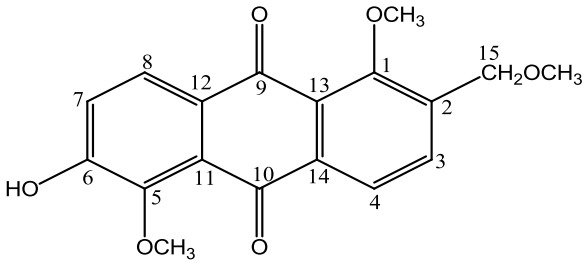
Composé Mor3

1,5,15-triméthylmorindol

$C_{18}H_{16}O_6$

masse : 328

cristaux sous forme d'aiguilles jaunes



EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 328 (60), 314 (19), 313 (100), , 297 (18), 296 (29), 295 (25), 283 (27), 270 (15), 265 (26), 250 (21), 225 (17), 224 (15), 223 (19), 222 (52), 221 (17), 181 (19), 152 (18), 139 (24), 127 (16), 126 (15), 45 (23)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	δ_C	δ_H
1	158.7	-
2	141.0	-
3	134.1	7.87 (*d*, *J* = 8.0 Hz)
4	123.5	8.03 (*d*, *J* = 8.0 Hz)
5	147.8	-
6	157.3	-
7	121.9	7.36 (*d*, *J* = 8.5 Hz)
8	125.6	7.98 (*d*, *J* = 8.5 Hz)
9	181.9	-
10	182.9	-
11	126.9	-
12	129.3	-
13	125.9	-
14	137.2	-
15	69.5	4.63 *s*
1-OCH_3	62.3	3.91 *s*
5-OCH_3	61.8	3.93 *s*
6-OH	-	9.23 *s*
15-OCH_3	58.8	3.46 *s*

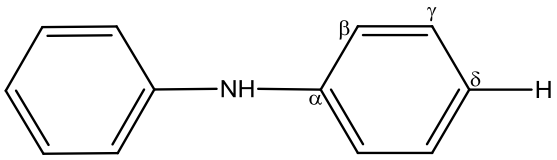
Composé Lep1

diphénylamine

$C_{12}H_{11}N$

masse : 169

huileux



EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 169 (100), 168 (60), 167 (32), 166 (6), 84 (9)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

Le spectre RMN-^{1}H. du composé **Lep1** montre un large singulet d'intégration 1H à δ_H 7.32 ppm caractérisant le proton NH. Nous observons aussi :

- un multiplet d'intégration 4H aromatiques à δ_H 7.23 ppm correspondant aux quatre protons équivalents en position γ de l'azote ;

- un multiplet d'intégration 4H aromatiques à δ_H 7.12 ppm correspondant aux quatre protons équivalents en position β de l'azote ;

- un triplet détriplé d'intégration 2H aromatiques à δ_H 6.85 ppm (^3J = 7.3 Hz, ^4J = 1.1 Hz) qui correspond aux deux protons équivalents en position δ de l'azote.

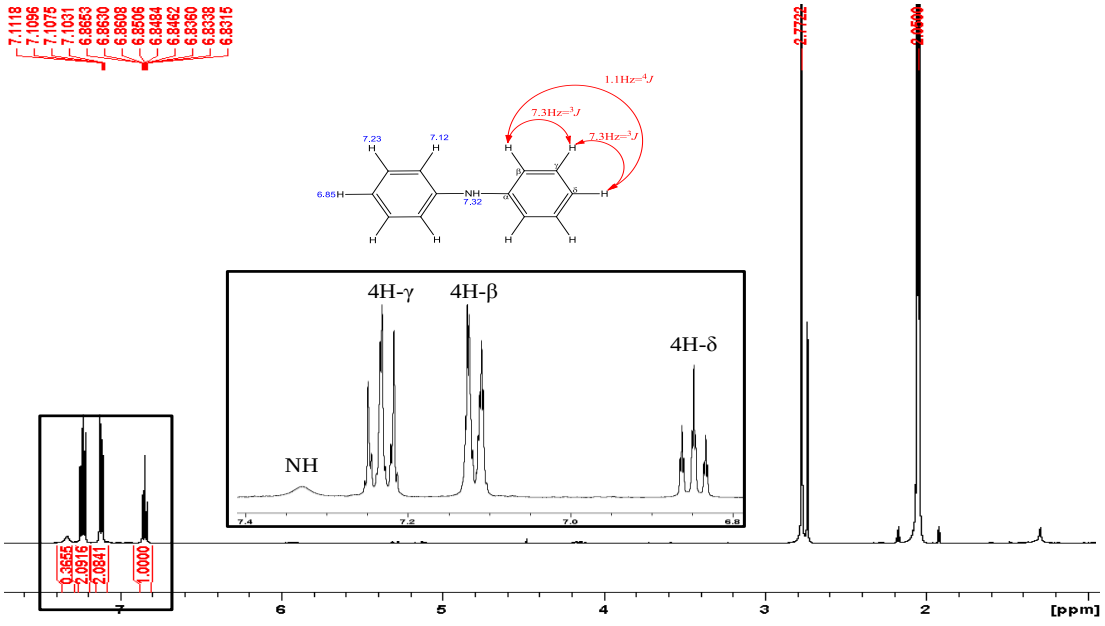


Figure 120 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep1 dans l'acétone-d6

Le spectre Cosy montre bien le couplage en *ortho* entre les protons H-γ et H-δ et le couplage en méta entre les protons H-β et H-δ mais aussi le couplage en *ortho* entre les protons H-β et H-γ.

Les spectres RMN-^{13}C, HSQC et HMBC confirment bien la structure diphénylamine du composé **Lep1**.

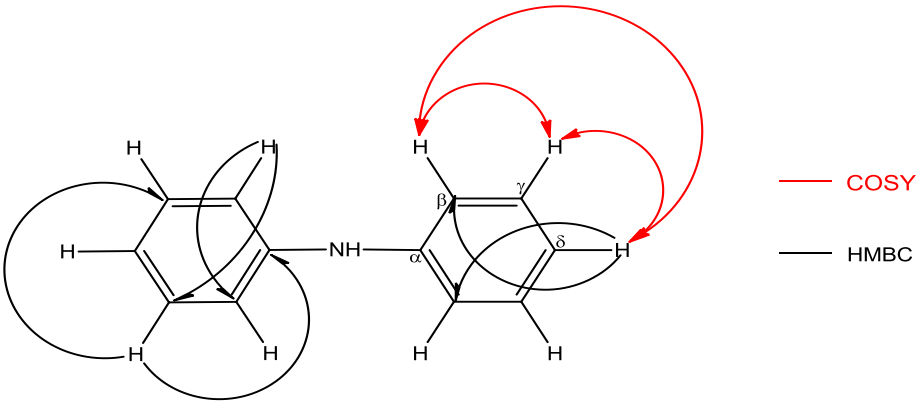
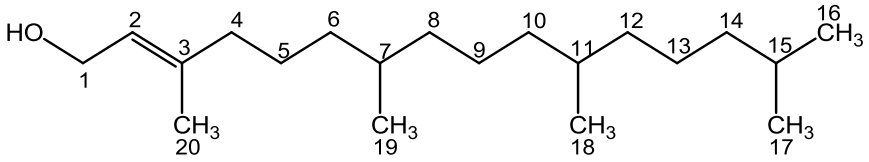


Figure 121 : Corrélation COSY et HMBC du composé Lep1

Composé Lep2

***E*-phytol**



$C_{20}H_{40}O$

masse : 296

huileux

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 137 (6), 126 (12), 125 (7), 124 (14), 123(47), 122 (6), 111 (13), 110 (5), 109 (10), 97 (15), 96 (11), 95 (21), 86 (7), 85 (16), 84 (10), 83 (26), 82 (22), 81 (43), 80 (7), 71 (100), 70 (18), 69 (25), 68 (18), 67 (11), 57 (36), 56 (17), 55 (31), 43 (43), 42 (6), 41 (32)

RMN (500 MHz, $CDCl_3$)

L'étude du spectre RMN-^{13}C de ce composé et les séquences DEPT 90 et DEPT135 montre la présence de vingt atomes de carbone répartis comme suit :

- dix groupements CH_2 hybridés sp^3 dont un oxygéné (δ_C 59.61 ppm) ;

- quatre groupements CH dont un éthylénique à δ_C 123.28 ppm ;

- cinq groupements CH_3 ;

- un carbone quaternaire éthylénique à δ_C 140.48 ppm.

A ce stade, on peut évaluer le nombre d'atomes d'hydrogènes à 39. Par ailleurs nous remarquons sur le spectre RMN-^{1}H (Figure 122) :

- un multiplet d'intégration 1H à δ_H 5.41 ppm attribuable au CH éthylénique ;

- un doublet d'intégration 2H à δ_H 4.15 ppm (J = 6.9 Hz) attribuable au CH_2 oxygéné ;

- un multiplet d'intégration 2H à δ_H 2.00 ppm qui ne peut être attribué qu'à un CH_2 voisin à un carbone éthylénique.

Tous les autres signaux apparaissent dans l'intervalle des déplacements chimiques inférieur à 1.7 ppm.

Ces observations permettent de suggérer que l'atome d'oxygène signalé plus haut sur un groupement CH_2, ne peut être que sous la forme d'un groupement hydroxyle. Ce qui confirme la formule brute $C_{20}H_{40}O$ du composé **Lep2**.

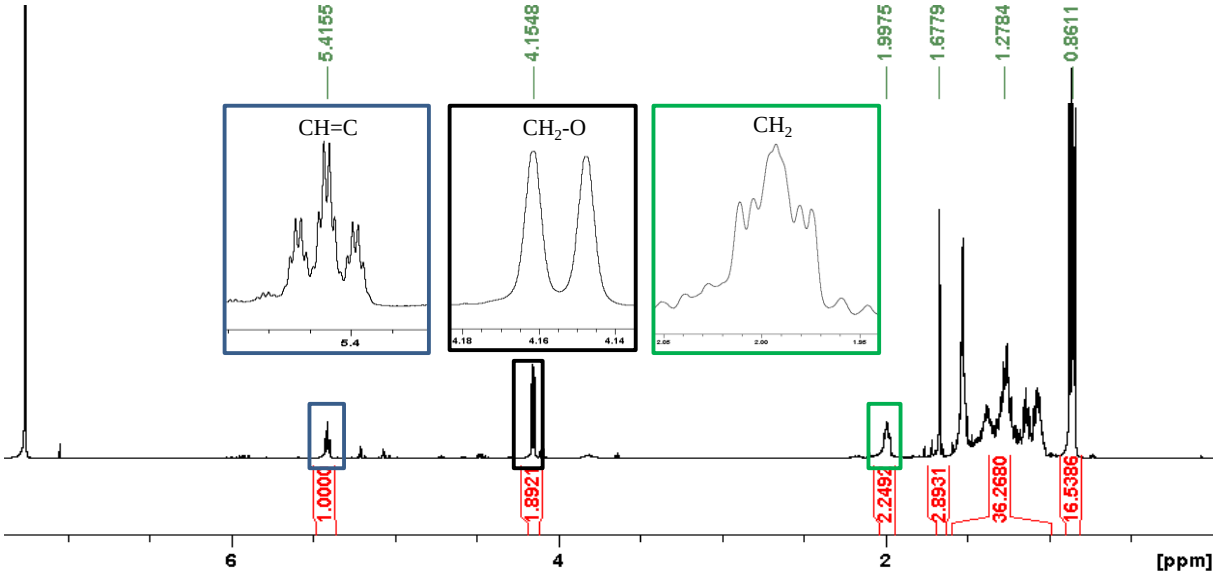
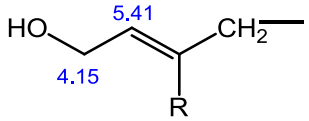
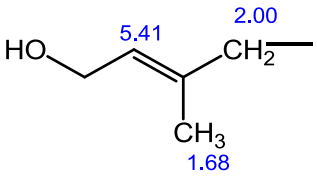


Figure 122 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep2 dans $CDCl_3$

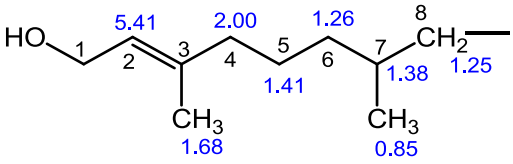
L'examen du spectre COSY montre que les deux protons à δ_H 4.15 ppm du groupement CH_2OH corrèlent avec le proton à δ_H 5.41 ppm du CH éthylénique suggérant que ces protons sont voisins. On peut écrire, en tenant compte de ce qui a été dit précédemment, une partie de la molécule sous forme :



Le proton éthylénique à δ_H 5.41 ppm corrèle avec les 3H sous forme de singulet à δ_H 1.68 ppm. Un groupement méthyle est donc placé sur la double liaison ; ceci est d'ailleurs correct vu la valeur du déplacement chimique de ce méthyle d'où la portion de structure :



Le CH_2 à δ_H 2.00 ppm corrèle avec un CH_2 à δ_H 1.41 ppm qui corrèle à son tour avec un autre CH_2 à δ_H 1.26 ppm. Ce dernier corrèle avec un CH à δ_H 1.38 ppm qui lui-même corrèle avec un CH_3 à δ_H 0.85 ppm et un CH_2 à δ_H 1.25 ppm d'où la portion de structure :



L'examen du spectre HMBC confirme toutes ces données, notamment, les corrélations des protons du groupe CH_2 oxygéné avec les carbones éthyléniques et le carbone du méthyle en position 3 ; ainsi que des corrélations entre les protons de ce méthyle et les atomes de carbone éthylénique et le carbone du méthylène en position 4.

Outre le méthyle en position C-3, déjà signalé, deux apparaissent sous forme d'un doublet d'intégration 6H à δ_H 0.87 ppm (J = 6.4 Hz) signifiant la présence d'un groupement isopropyle dans la structure. Les deux autres apparaissent tous les deux sous forme de doublet à δ_H 0.85 ppm, (J = 6.1 Hz) et δ_H 0.85 ppm, (J = 6.6 Hz) signifiant la présence de deux méthyles sur un groupement CH.

Toutes ces données comparées avec celles se trouvant dans la littérature [210-212] confirment la structure (*E*)-phytol du composé **Lep2.**

Composé Lep3

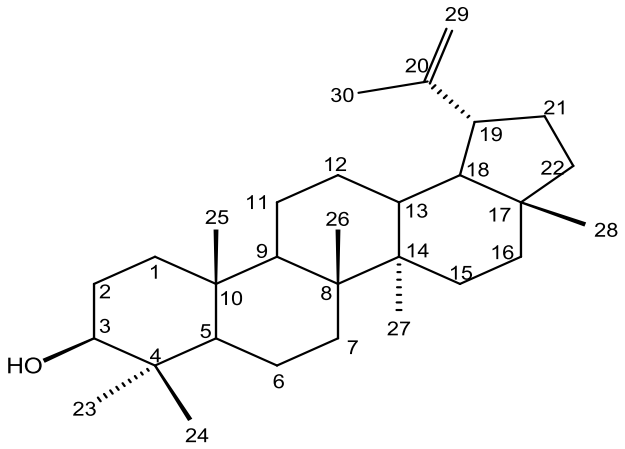
(20)29-lupén-3β-ol

ou

lupéol

$C_{30}H_{50}O$

masse : 426



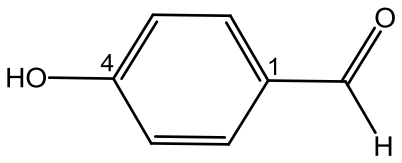
EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 426 (67), 411 (23), 218 (76), 207 (100), 189 (94), 175 (28)

RMN (500 MHz, $CDCl_3$)

position	DEPT	δ_C	δ_H
1	CH_2	38.7	1.68 *m*, 0.91 *m*
2	CH_2	27.5	1.04 *m*, 1.61 *m*
3	CH	79.1	3.22 (*dd*, *J* = 11.3 Hz, *J* = 5.1 Hz)
4	C	38.9	-
5	CH	55.3	0.70 (*d*, *J* = 8.9 Hz)
6	CH_2	19.3	1.40 *m*, 1.51 *m*
7	CH_2	34.3	1.40 *m*
8	C	40.8	-
9	CH	50.5	1.28 *m*
10	C	37.2	-
11	CH_2	20.9	1.23 *m*, 1.42 *m*
12	CH_2	25.2	1.08 *m*, 1.69 *m*
13	CH	38.1	1.65 *m*
14	C	42.8	-
15	CH_2	27.4	1.04 *m*, 1.61 *m*
16	CH_2	35.6	1.45 *m*
17	C	43.0	-
18	CH	48.3	1.37 *m*
19	CH	48.0	2.40 (*dd*, *J* = 11.0 Hz, *J* = 5.6 Hz)
20	C	151.1	-
21	CH_2	29.9	1.31 *m*, 1.93 *m*
22	CH_2	40.0	1.20 *m*, 1.40 *m*
23	CH_3	28.0	0.98 *s*
24	CH_3	15.4	0.77 *s*
25	CH_3	16.1	0.84 *s*
26	CH_3	16.0	1.05 *s*
27	CH_3	14.6	0.96 *s*
28	CH_3	18.0	0.81 *s*
29	CH_2	109.4	4.71 (*dd*, *J* = 2.5 Hz, *J* = 0.6 Hz) 4.58 (*dd*, *J* = 2.5 Hz, *J* = 1.3 Hz)
30	CH_3	19.3	1.70 (*dd*, *J* = 1.3 Hz, *J* = 0.6 Hz)

Composé Lep4

4-hydroxybenzaldéhyde



$C_7H_6O_2$

masse : 122

poudre jaune

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 122 (93), 121 (100), 93 (38), 65 (26), 63 (6), 39 (10)

RMN (500 MHz, $CDCl_3$)

Sur le spectre RMN-^{1}H du composé **Lep4** (Figure 123) nous observons :

- Un signal singulet à δ_H 9.88 ppm d'intensité 1H attribuable au proton d'une fonction aldéhyde CHO ;

- Deux doublets d'intégration 2H chacun, couplant en ortho, à δ_H 7.81 ppm (J = 8.6 Hz) et à δ_H 6.95 ppm (J = 8.6 Hz). Ce système 2H AA', 2H XX' sur le cycle aromatique indique qu'il est bisubstitué en position 1 et 4 ;

- un large singulet d'intégration 1H à δ_H 5.42 ppm caractérisant le groupement hydroxyle d'un phénol.

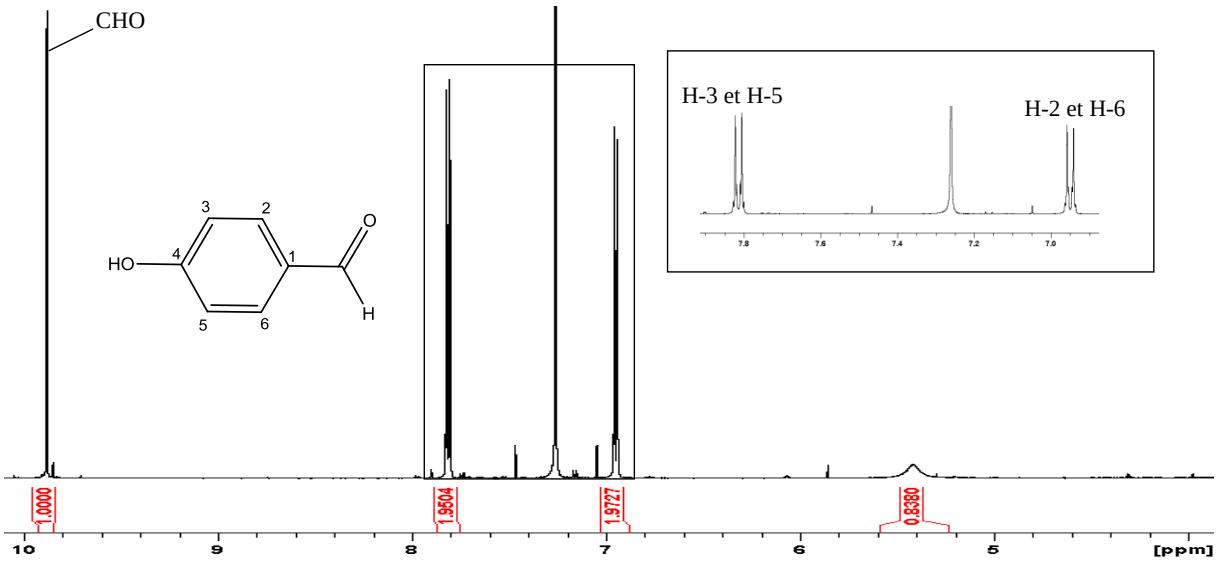


Figure 123 : Spectre RMN-1H du composé Lep4 dans CDCl3

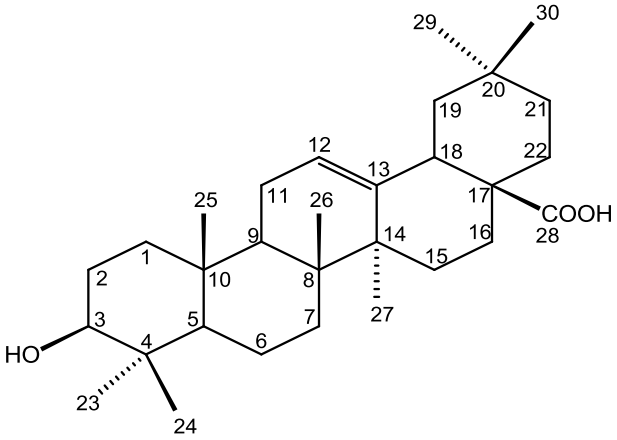
Composé Lep5

acide oléanolique

$C_{30}H_{48}O_3$

masse : 456

poudre blanche



EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 248 (100), 207 (22), 203 (63), 189 (19), 133 (21)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	DEPT	δ_C	δ_H
1	CH_2	39.4	1.61 *m*, 1.00 *m*
2	CH_2	28.1	1.62 *m*, 1.52 *m*
3	CH	78.6	3.15 (*dd*, *J* = 11.1 Hz, *J* = 4.7 Hz)
4	C	39.5	-
5	CH	56.3	0.80 *m*
6	CH_2	19.2	1.55 *m*, 1.51 *m*
7	CH_2	34.5	1.40 *m*, 1.21 *m*
8	C	40.2	-
9	CH	48.6	1.602 *m*
10	C	37.9	-
11	CH_2	24.2	1.89*m*, 1.603 *m*
12	CH	123.1	5.24 (*t*, *J* = 3.7 Hz)
13	C	145.0	-
14	C	42.6	-
15	CH_2	28.5	1.81 *m*, 1.07 *m*
16	CH_2	23.8	2.01 *m*, 1.61 *m*
17	C	46.91	-
18	CH	42.3	2.89 (*dd*, *J* = 13.9 Hz, *J* = 4.4 Hz)
19	CH_2	46.87	1.72 *m*, 1.14 *m*
20	C	31.3	-
21	CH_2	33.7	1.51 *m*, 1.30 *m*
22	CH_2	33.38	1.76 *m*, 1.54 *m*
23	CH_3	28.7	0.99 *s*
24	CH_3	16.3	0.78 *s*
25	CH_3	15.8	0.938 *s*
26	CH_3	17.6	0.81 *s*
27	CH_3	26.3	1.17 *s*
28	C	178.9	-
29	CH_3	33.41	0.92 *s*
30	CH_3	23.9	0.940 *s*

Il s'agit d'un triterpène dont le squelette typique de l'oléane est constitué de cinq cycles à C6 : A, B, C, D et E [207].

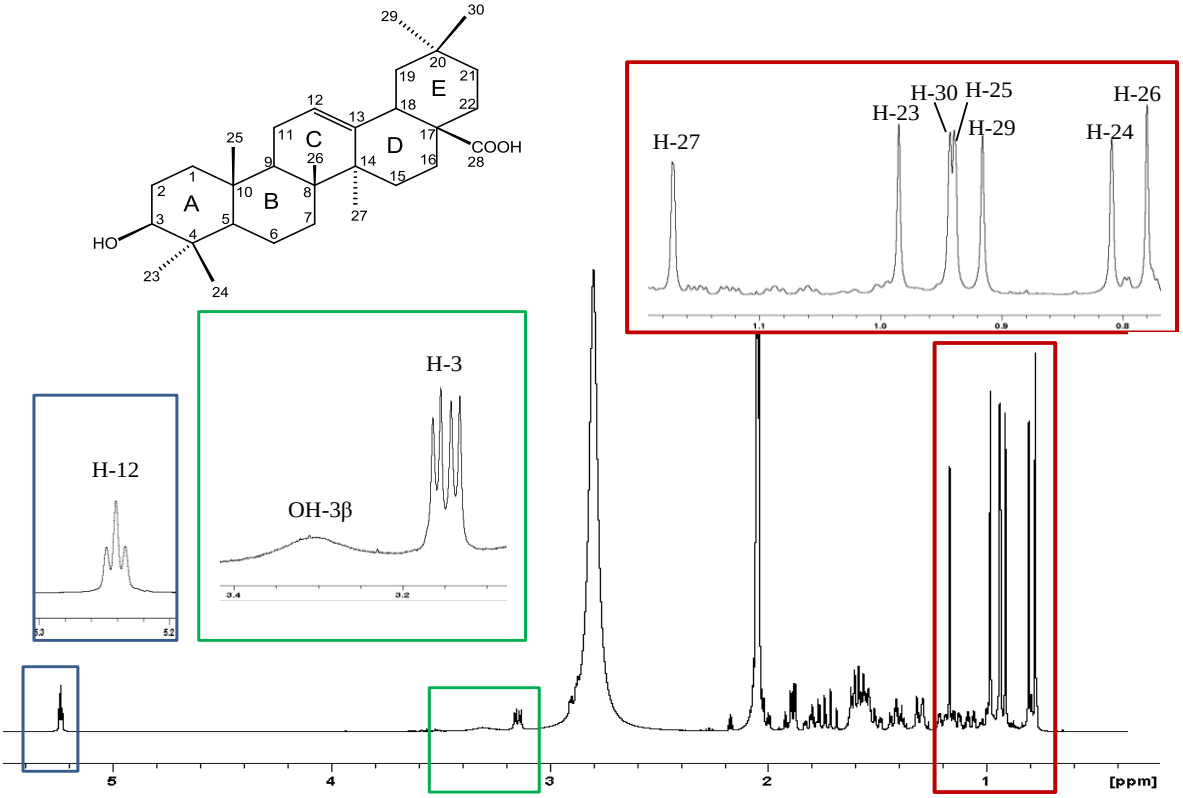
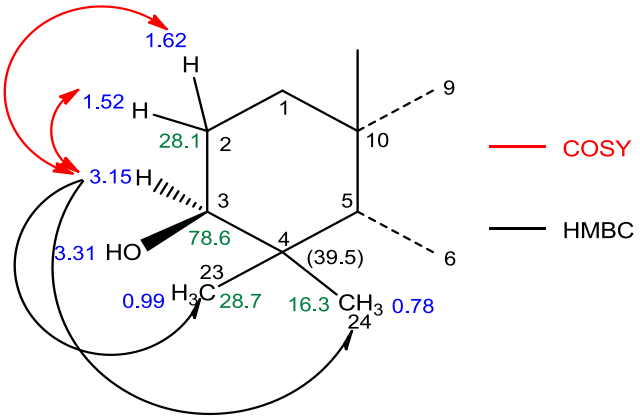


Figure 124 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep5 dans l'acétone-d6

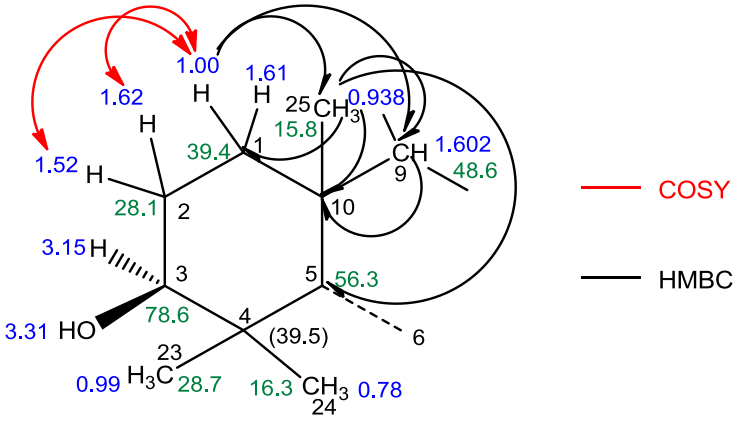
L'interprétation des spectres RMN-^{13}C avec éditions DEPT90 et DEPT135 permet de dénombrer les 30 atomes de carbone dont huit quaternaires (dont un C=O et un éthylénique), 5CH, 10CH_2 et 7CH_3.

A l'exception des sept singulets dans la zone de déplacements chimiques (0.77-1.18 ppm), d'un large singulet à δ_H 3.31 ppm et d'un triplet à δ_H 5.24 ppm, le spectre RMN-^{1}H (acétone-d6) (Figure 124) est mal résolu. Les sept singulets correspondent à des méthyles ; le singulet à δ_H 3.31 ppm est relatif au groupement hydroxyle en position 3-*β* du cycle A. Le triplet à δ_H 5.24 ppm représente le signal du proton éthylénique CH=C du cycle C (Figure 124).

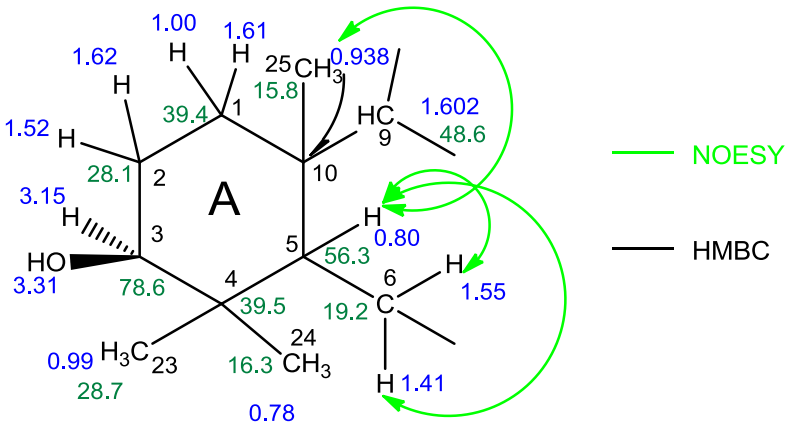
Le spectre HSQC établit la corrélation entre le proton éthylénique à δ_H 5.24 ppm et le carbone à δ_C 123.1 ppm. Le signal proton à δ_H 3.15 ppm porté par le carbone à δ_C 78.6 ppm est caractéristique du proton CH hydroxylé en position 3. Sur le spectre COSY, ce proton est corrélé en ^{3}J avec les 2H méthyléniques CH_2-2 dont le signal multiplet est centré à δ_H 1.59 ppm (1.62 et 1.52). Le spectre HMBC montre des corrélations du proton à δ_H 3.15 ppm avec les carbones à δ_C 28.7 ppm (CH_3-23) et à δ_C 16.3 ppm (CH_3-24).



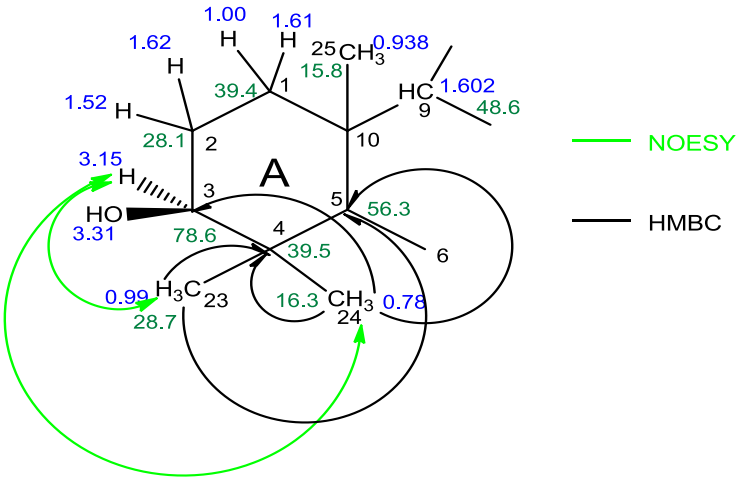
Les 2H du CH_2-2 dont le signal multiplet est centré à δ_H 1.59 ppm présentent une corrélation en ^3J (COSY) avec le proton à δ_H 1.00 ppm. Ce dernier est corrélé en ^3J (HMBC) avec les carbones à δ_C 15.8 ppm (CH_3-25) et à δ_C 48.6 ppm (CH-9). Le déplacement chimique des 3H de CH_3-25 est δ_H 0.938 ppm (HSQC). Sur le spectre HMBC, ils sont corrélés avec les carbones à δ_C 56.3 ppm (CH-5), 48.6 ppm (CH-9), 37.9 ppm (C-10) et 39.4 ppm (CH_2-1). Il faut noter en plus, la corrélation HMBC entre le proton CH-9 et le carbone quaternaire C-10.



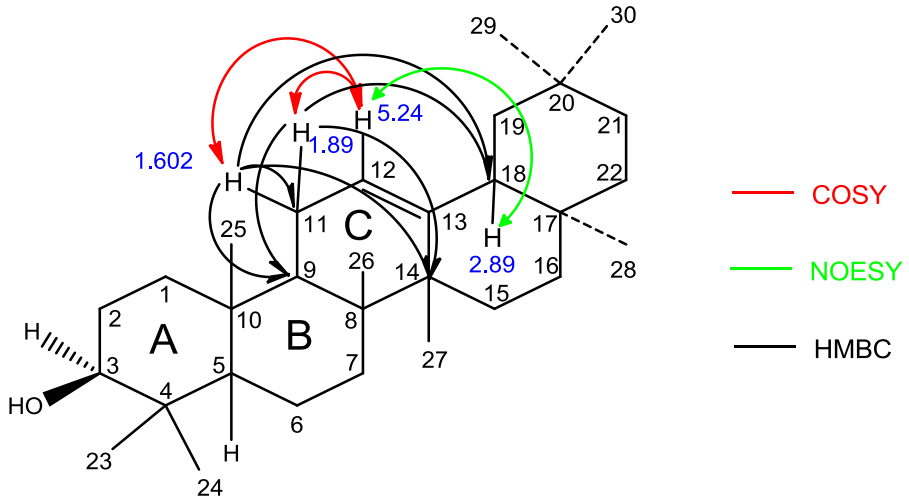
Sur le spectre NOESY nous observons une corrélation entre le proton CH-5 à δ_H 0.80 ppm et les 3H de CH_3-25 sortant sous forme singulet. Par conséquent ce méthyle est lié au carbone quaternaire C-10, confortant ainsi la corrélation observée en HMBC entre les protons CH_3-25 et le carbone C-10. Or seul le proton CH-5 est corrélé en ^3J (COSY et NOESY) avec les protons CH_2-6 à δ_H 1.55 et 1.41 ppm ; ce qui exclut la possibilité de liaison C-10-C-6. On en déduit la jonction C-10-C-5 permettant de constituer le cycle A.



Le spectre NOESY présente pour le proton CH-3 à δ_H 3.15 ppm des taches de corrélation avec les protons à δ_H 0.99 ppm (CH_3-23) et à δ_H 0.78 ppm (CH_3-24) qui sont à leur tour corrélés en HMBC aux mêmes carbones à δ_C 78.6 ppm (CH-3), à δ_C 56.3 ppm (CH-5) et au carbone quaternaire C-4 à δ_C 39.5 ppm. Les méthyles CH_3-23 et CH_3-24 sont donc géminés.



Le proton CH-12 (δ_H 5.24 ppm) est corrélé en ^3J (COSY et NOESY) aux protons du CH_2-11 à δ_H 1.89 et 1.603 ppm. Ces derniers sont corrélés en HMBC aux carbones CH-9, CH_2-11, C-14 et CH-18. Sur le spectre NOESY le proton CH-12 est corrélé aux protons à δ_H 2.89 ppm (CH-18) et aux 2H de CH_2-11 à δ_H 1.89 et 1.603 ppm. Or le proton CH-18 n'est pas corrélé en ^3J (COSY) avec le proton CH-12, donc le carbone quaternaire entre CH_2-11 et CH-18 est hybridé sp^2 : C-13 (δ_C 145.0 ppm).



Les corrélations HMBC d'une part et NOESY d'autre part observées pour les méthyles CH_3-26 et CH_3-27 permettent d'établir entre autres les liaisons C-14-C-8 et C-7C-8. La liaison C-6-C-7 est confortée par la corrélation en HMBC entre les protons CH_2-6 et le carbone CH_2-7. Sachant que le proton CH-12 est corrélé en HMBC à C-14 et que la liaison C-12-13 existe déjà, on en déduit la jonction C-13-C14 qui complète le squelette des cycles A, B et C.

En combinant les résultats issus des spectres COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ceux de la littérature, on parvient à reconstituer le squelette du triterpène à l'exception du groupement COOH dont la présence est indiquée par le signal C=O à δ_C 178.9 ppm. Les corrélations HMBC relatives à la fonction COOH n'ont pas été observées. Les protons méthyléniques de CH_2-6 et CH_2-22 et celui de CH-18 sont tous corrélés en HMBC au carbone C-17. Ces corrélations précisent les liaisons C-17-CH_2-16, C-17-C-18 et C-17-C-22. Le carbone quaternaire C-17 sera donc lié au groupement COOH.

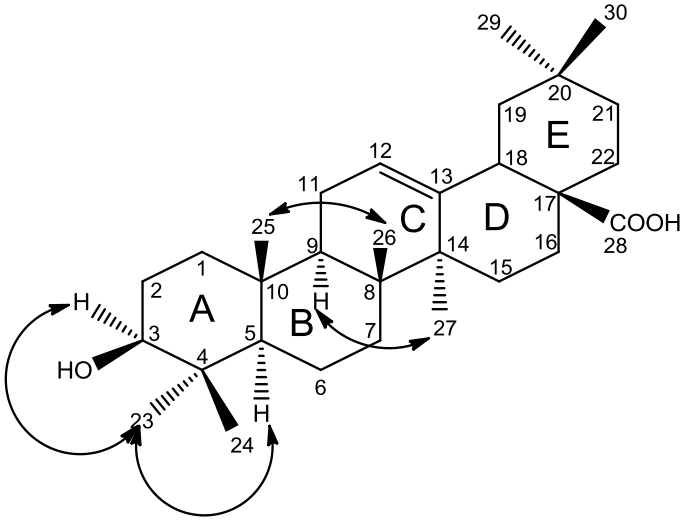


Figure 125 : Structure et principales corrélations NEOSY du composé Lep5

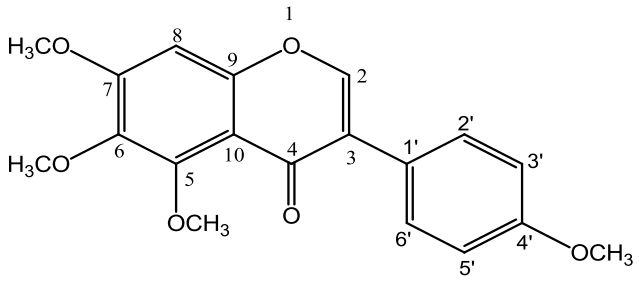
Composé Lep6

4',5,6,7-tetraméthoxyisoflavone

$C_{19}H_{18}O_6$

masse : 342

cristaux sous forme d'aiguilles jaunes pales



EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 342 (25), 328 (17), 327 (100), 299 (7), 284 (5), 171 (7), 167 (6), 132 (5)

RMN (500 MHz, $CDCl_3$)

position	δ_C	δ_H
1	-	-
2	150.6	7.81 *s*
3	125.6	-
4	175.3	-
5	153.2	-
6	140.8	-
7	157.9	-
8	96.2	6.69 *s*
9	154.8	-
10	113.8	-
1'	124.4	-
2'	130.5	7.48 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
3'	114.1	6.96 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
4'	159.7	-
5'	114.1	6.96 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
6'	130.5	7.48 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
5-OCH_3	62.3	3.97 *s*
6-OCH_3	61.7	3.92 *s*
7-OCH_3	56.4	3.96 *s*
4'-OCH_3	55.5	3.84 *s*

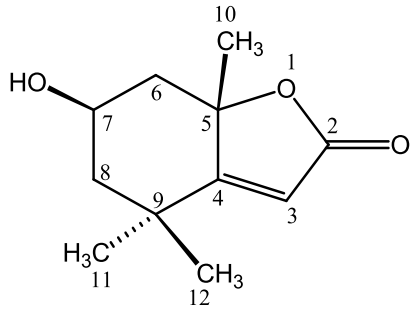
Composé Lep7

Loliolide

$C_{11}H_{16}O_3$

masse : 196

poudre blanche



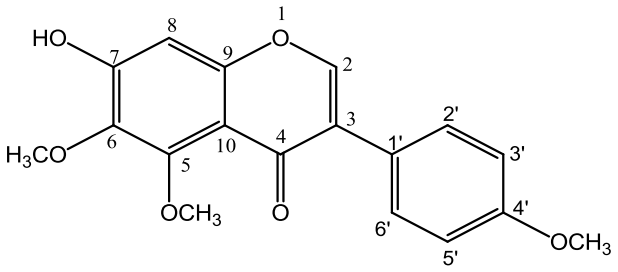
EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 196 (19), 179 (11), 178 (96), 163 (43), 153 (20), 150 (9), 140 (54), 139 (15), 138 (8), 137 (12), 136 (14), 135 (46), 125 (14), 112 (23), 111 (100), 110 (19), 109 (26), 108 (11), 107 (34), 97 (20), 96 (10), 95 (36), 93 (18), 91 (16), 85 (26), 83 (9), 81 (19), 79 (18), 77 (11), 69 (20), 67 (35), 66 (9), 65 (14), 57 (33), 55 (13), 53 (13), 51 (8), 43 (93)41 (31), 39 (18)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	δ_C	δ_H
1	-	-
2	171.6	-
3	113.1	5.68 *s*
4	183.4	-
5	87.1	-
6	46.5	1.72 H-*α* (*dd*, *J* = 13.4 Hz, *J* = 3.9 Hz) 2.39 H-*β* (*ddd*, *J* = 13.4 Hz, *J* = 2.8 Hz, *J* = 2.5 Hz)
7	66.8	4.29 (*sextuplet*, *J* = 3.3 Hz)
8	47.9	1.54 H-*α* (*dd*, *J* = 14.3 Hz, *J* = 3.7 Hz) 2.00 H-*β* (*ddd*, *J* = 14.2 Hz, *J* = 2.4 Hz, *J* = 2.3 Hz)
9	36.6	-
10	27.5	1.74 (*d*, *J* = 0.6 Hz)
11	31.1	1.26 *s*
12	26.9	1.47 *s*
7-OH	-	4.13 (*d*, *J* = 3.3 Hz)

Composé Lep8

7-hydroxy-4',5,6-triméthoxyisoflavone



$C_{18}H_{16}O_6$

masse : 328

cristaux sous forme d'aiguilles jaunes pales

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 328 (18), 314 (17), 313 (100), 311 (5), 285 (6), 164 (8), 132 (8)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	δ_C	δ_H
1	-	-
2	151.6	8.01 *s*
3	125.4	-
4	174.8	-
5	153.8	-
6	140.5	-
7	157.3	-
8	100.2	6.74 *s*
9	155.6	-
10	113.4	-
1'	125.9	-
2'	131.3	7.51 (*d*, *J* = 8.9 Hz)
3'	114.3	6.97 (*d*, *J* = 8.9 Hz)
4'	160.4	-
5'	114.3	6.97 (*d*, *J* = 8.9 Hz)
6'	131.3	7.51 (*d*, *J* = 8.8 Hz)
5-OCH_3	62.1	3.891 *s*
6-OCH_3	61.6	3.889 *s*
4'-OCH_3	55.6	3.83 *s*

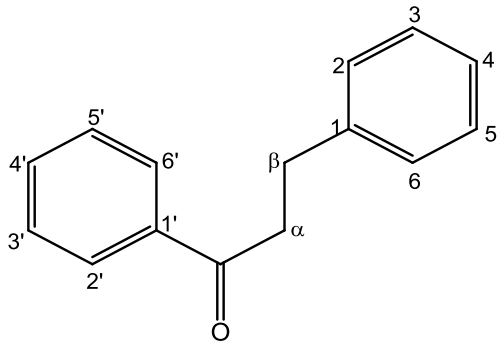
Composé Lep9

dihydrochalcone

$C_{15}H_{14}O$

masse : 210

cristaux blancs



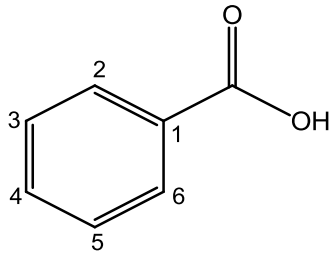
EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 210 (62), 105 (100), 91 (13), 77 (33), 51 (7)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	δ_C	δ_H
1	142.6	-
2	129.3	7.24-7.34 *m*
3	129.2	7.24-7.34 *m*
4	126.8	7.17 (*tt*, *J* = 7.0 Hz, *J* = 1.6 Hz)
5	129.2	7.24-7.34 *m*
6	129.3	7.24-7.34 *m*
α-CH_2	40.8	3.37 (*t*, *J* = 7.6 Hz)
β-CH_2	30.7	3.03 (*t*, *J* = 7.6 Hz)
1'	138.1	-
2'	128.8	7.99-8.05 *m*
3'	129.5	7.48-7.54 *m*
4'	133.7	7.61 (*tt*, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.3 Hz)
5'	129.5	7.48-7.54 *m*
6'	128.8	7.99-8.05 *m*
C=O	199.4	-

Composé Lep10

acide benzoïque



$C_7H_6O_2$

masse : 122

cristaux belges

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 123 (8), 122 (99), 106 (7), 105 (100), 78 (5), 77 (61), 76 (6), 74 (7), 51 (24), 50 (15)

RMN (500 MHz, MeOD)

Sur le spectre RMN-^{1}H du composé **Lep10** (Figure 126) nous observons :

- deux protons aromatiques à δ_H 7.99 ppm (^3J = 7.3 Hz) sous forme de doublet ;
- un proton aromatique à δ_H 7.47 ppm (^3J = 7.3 Hz) sous forme de triplet ;
- deux protons aromatiques à δ_H 7.39 ppm (^3J = 7.4 Hz) sous forme de triplet

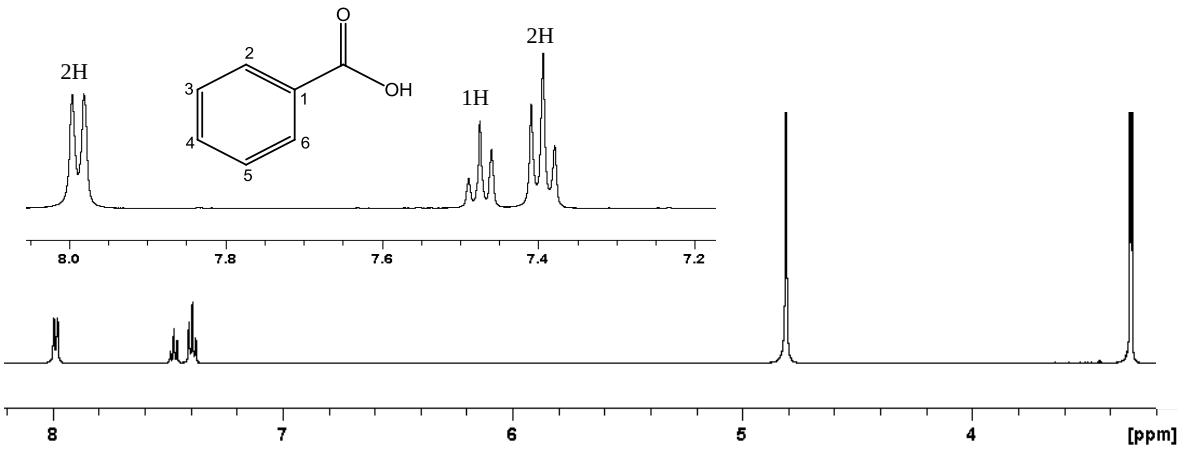


Figure 126 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep10 dans MeOD

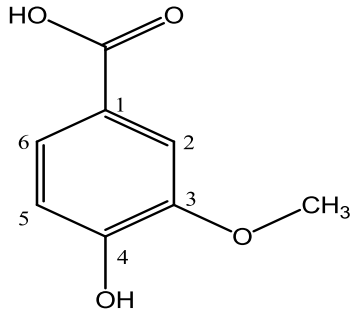
Les signaux RMN-^{1}H suggèrent un noyau benzénique monosubstitué.

Le spectre RMN-^{13}C avec les éditions DEPT90 et DEPT135 montre 7 signaux carbone dont 2 quaternaires (du type CO et/ou aromatique), 5CH aromatiques dont 2 CH aromatiques deux à deux équivalents.

Si on prend en compte la masse de 122 g/mol obtenue par le spectre IC et les données RMN nous pouvons envisager une formule brute de $C_7H_6O_2$ avec un nombre d'insaturations de 5. La RMN nous donne de façon certaine un cycle aromatique et très probablement une fonction carbonyle CO, soit un nombre d'insaturations de 5. De la formule brute on en déduit aisément que la fonction CO est une fonction acide carboxylique COOH. Ainsi le composé **Lep10** est l'acide benzoïque.

Composé Lep11

4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque ou acide vanillique



$C_8H_8O_4$

masse : 168

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 168 (100), 154 (6), 153 (73), 151(16), 125 (17), 123 (5), 97 (21), 52 (6), 51 (6)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

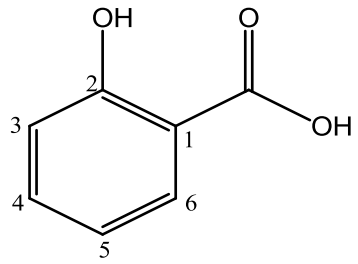
position	δ_C	δ_H
1	123.0	-
2	113.5	7.56 (*d*, *J* = 1.9 Hz)
3	149.1	-
4	152.1	-
5	115.5	6.91 (*d*, *J* = 8.2 Hz)
6	124.9	7.59 (*dd*, *J* = 8.2 Hz, *J* = 1.9 Hz)
1-COOH	167.5	-
3-OCH_3	56.4	3.91 *s*
4-OH	-	7.9-8.8 large *s*

Composé Lep12

acide 2-hydroxybenzoïque

ou

acide salicylique



$C_7H_6O_3$

masse : 138

EI-MS (positif) m/z (int. rel) : 138 (43), 121 (11), 120 (100), 93(7), 92 (69), 65 (10), 64 (20), 63 (15), 39 (8)

RMN (500 MHz, acétone-d6)

position	δ_C	δ_H
1	113.7	-
2	163.0	-
3	118.0	6.94 (*d*, *J* = 8.1 Hz)
4	136.5	7.51 (*td*, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.2 Hz)
5	119.9	6.93 (*t*, *J* = 7.5 Hz)
6	131.3	7.90 (*dd*, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.2 Hz)
1-C=O	172.8	-

Sur le spectre RMN-^{1}H du composé **Lep12** nous observons :

- un proton aromatique à δ_H 7.90 ppm (^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.2 Hz) sous forme de doublet dedoublé ;

- un proton aromatique à δ_H 7.51 ppm (^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.2 Hz) sous forme de triplet dedoublé ;

- deux protons aromatiques entre δ_H 6.85-7.02 ppm sous forme d'un massif.

Des spectres RMN-^{1}H et COSY, nous pouvons dire que le composé Lep12 possède un noyau benzénique bisubstitué en position 1 et 2.

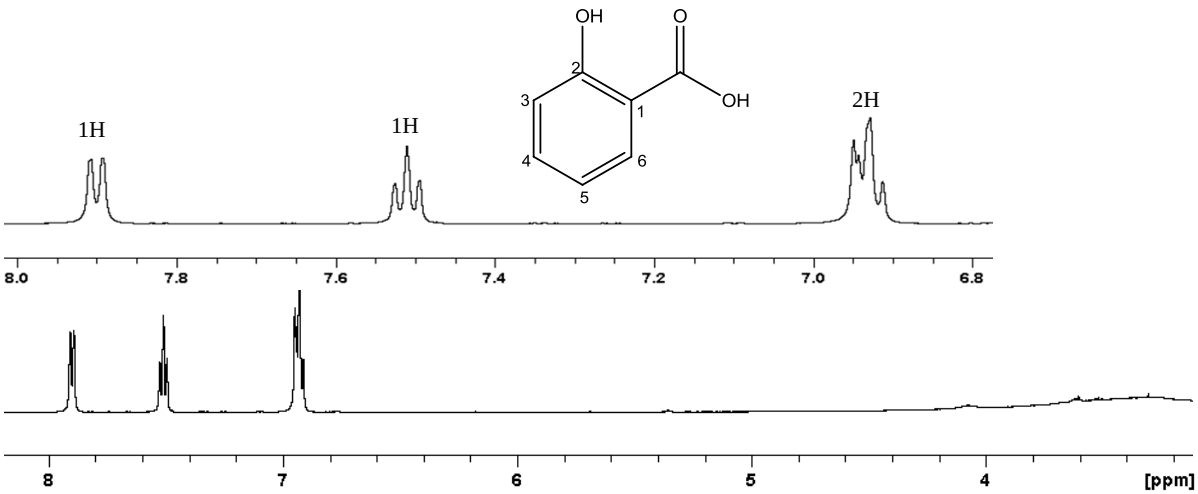


Figure 127 : Spectre RMN-^{1}H du composé Lep12 dans l'acétone-d6

La séquence HSQC montre que massif compris entre δ_H 6.85 et 7.02 ppm est constitué d'un doublet à δ_H 6.94 ppm (^{3}J = 8.1 Hz) et d'un triplet à δ_H 6.93 ppm (^{3}J = 7.5 Hz).

Le spectre RMN-^{13}C donne 7 signaux carbone dont trois quaternaires (dont probablement un CO et deux aromatiques) et 4 CH aromatiques.

Si on prend en compte la masse de 138 g/mol obtenue par le spectre IC et les données RMN nous pouvons envisager une formule brute de $C_7H_6O_3$ avec un nombre d'insaturations de 5. La RMN nous donne de façon certaine un cycle aromatique et une fonction carbonyle CO ; soit un nombre d'insaturations de 5. Au vu des intégrales protons, du nombre de carbone et de la formule brute, cela nous laisse supposer que cette molécule est un cycle aromatique bi-substitué ayant pour substituant une fonction acide carboxylique COOH et une fonction hydroxyle OH. Ainsi le composé **Lep12** est l'acide 2-hydroxybenzoïque