

Thèse en co-tutelle présentée en vue de l'obtention :



- du grade de Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques de l'Université de Liège, Faculté de Médecine, Département de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie



- du titre de Docteur de l'Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie

## **Etude de la composition chimique et des potentialités antipaludiques de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Cambodge et dans l'archipel des Mascareignes**

Marie-Caroline JONVILLE

### **Jury**

Pr. Monique Tits	Université de Liège	Président
Dr. Riad Elias	Université de la Méditerranée	Secrétaire
Pr. Patrick De Mol	Université de Liège	Examineur
Pr. Dominique Mattar	Université Henri Poincaré (Nancy)	Examineur
Pr. Michel Frédéric	Université de Liège	Promoteur belge
Pr. Evelyne Ollivier	Université de la Méditerranée	Promoteur français
Pr. Luc Angenot	Université de Liège	Co-promoteur belge
Pr. Guy Balansard	Université de la Méditerranée	Co-promoteur français
Pr. Luc Pieters	Universiteit Antwerpen	Rapporteur
Pr. Marie-Geneviève Dijoux	Université Claude Bernard Lyon I	Rapporteur



*A mes aïeuls*

*A Beto et à notre futur*



# TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements</b> .....	<b>i</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des abréviations, sigles et acronymes</b> .....	<b>iv</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>CHAPITRE I : Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. Le paludisme</b> .....	<b>1</b>
I.1.A. Description générale .....	1
I.1.B. Vecteur de la maladie et transmission.....	2
I.1.C. Le Plasmodium.....	4
I.1.C.1. Cycle biologique .....	4
I.1.C.2. Les cinq espèces parasitant l'être humain .....	6
I.1.C. Thérapies .....	7
I.1.D. Résistances .....	11
I.1.D.1. <i>Homo sapiens</i> .....	11
I.1.D.2. <i>Anopheles sp.</i> .....	12
I.1.D.3. <i>Plasmodium sp.</i> .....	13
I.1.E. Le paludisme dans les Mascareignes .....	14
I.1.F. Le paludisme au Cambodge.....	15
<b>I.2. La démarche ethnopharmacologique</b> .....	<b>17</b>
I.2.A. L'ethnopharmacologie .....	18
I.2.B. La méthodologie .....	21
I.2.C. Principes actifs <i>versus</i> extraits standardisés (MTA).....	24
<b>I.3. Objectifs de la thèse</b> .....	<b>25</b>
<b>CHAPITRE II : Etude préliminaire de plantes des Mascareignes utilisées dans le traitement de la malaria</b> .....	<b>27</b>
<b>II.1. Présentation de l'île de la Réunion</b> .....	<b>27</b>
II.1.A. Géographie et biodiversité .....	27
II.1.B. Histoire et système thérapeutique .....	34
II.1.B.1. Le peuplement de l'île par l'homme.....	34
II.1.B.2. Système thérapeutique .....	35
<b>II.2. Travaux antérieurs en pharmacognosie</b> .....	<b>38</b>
<b>II.3. Travaux personnels</b> .....	<b>41</b>
II.3.A. Sélection des plantes et préparation d'extraits .....	41
II.3.B. Tests pharmacologiques .....	45

II.3.B.1. Tests <i>in vitro</i> .....	45
II.3.B.1. Tests <i>in vivo</i> .....	49
II.3.C. Conclusion.....	52
CHAPITRE III : Contribution à l'étude de <i>Fagraea fragrans</i> Roxb.....	55
<b>III.1. Introduction : Travaux antérieurs</b> .....	<b>55</b>
III.1.A. Criblage antiplasmodial préliminaire.....	55
III.1.B. Données botaniques.....	55
III.1.C. Utilisations ethnobotaniques.....	60
III.1.D. Données phytochimiques.....	60
III.1.E. Données pharmacologiques.....	61
<b>III.2. Travaux personnels</b> .....	<b>62</b>
III.2.A. Etude phytochimique.....	62
III.2.A.1. Criblage phytochimique.....	62
III.2.A.2. L'écorce de tronc.....	64
III.2.A.3. Les feuilles.....	69
III.2.A.4. Récapitulatif des composés isolés.....	74
III.2.B. Elucidation structurale et biosynthèse.....	74
III.2.B.1. Composé apolaire de l'écorce de tronc.....	74
III.2.B.2. Composés polaires majoritaires de l'écorce de tronc et des feuilles.....	83
III.2.C. Activités biologiques.....	87
III.2.C.1. Tests antiplasmodiaux <i>in vitro</i> .....	87
III.2.C.2. Tests cytotoxiques <i>in vitro</i> .....	93
III.2.C.3. Tests d'hémolyse <i>in vitro</i> .....	95
III.2.C.4. Tests antipaludiques <i>in vivo</i> .....	95
III.2.D. Conclusion.....	96
CHAPITRE IV : Contribution à l'étude de <i>Strychnos nux-vomica</i> L. ....	99
<b>IV.1. Introduction : Travaux antérieurs</b> .....	<b>99</b>
IV.1.A. Bref historique des <i>Strychnos</i> au Laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg.....	99
IV.1.B. Bref historique du <i>Strychnos nux-vomica</i> .....	100
IV.1.C. Données botaniques.....	101
IV.1.D. Utilisations ethnobotaniques.....	103
IV.1.E. Données phytochimiques.....	103
IV.1.F. Données pharmacologiques.....	110
<b>IV.2. Motivation du travail</b> .....	<b>114</b>
<b>IV.3. Travaux personnels</b> .....	<b>115</b>
IV.3.A. Etude phytochimique.....	115
IV.3.A.1. Vérification de la présence d'alcaloïdes fluorescents orange ou jaune.....	115

IV.3.A.2. Extraction des alcaloïdes.....	117
IV.3.A.3. Etude du précipité à l'interphase (précipité 2).....	118
IV.3.A.4. Etude de l'extrait dichlorométhane pH8 (E8) .....	120
IV.3.A.5. Etude de l'extrait dichlorométhane pH12 (E12).....	122
IV.3.A.6. Récapitulatif des composés isolés .....	123
IV.3.B. Elucidation structurale .....	123
IV.3.B.1. Composé OR1 (issu de l'extrait P2).....	123
IV.3.B.2. Composé BL1 (issu de l'extrait P2) .....	126
IV.3.B.3. Composé OR2 (issu de l'extrait P2).....	128
IV.3.B.4. Composé OR3 (issu de l'extrait E8) .....	130
IV.3.B.5. Stéréochimie des alcaloïdes.....	135
IV.3.C. Activités biologiques.....	138
IV.3.C.1. Tests antiplasmodiaux <i>in vitro</i> .....	138
IV.3.C.2. Tests cytotoxiques <i>in vitro</i> .....	140
IV.3.C.3. Activité convulsivante ou curarisante.....	141
IV.3.D. Conclusion .....	141
CHAPITRE V : Conclusions et perspectives générales .....	143
CHAPITRE VI : Matériels et méthodes.....	148
<b>VI.1.PHYTOCHIMIE.....</b>	<b>148</b>
VI.1.A. Matériel végétal, extraction et criblage phytochimique .....	148
VI.1.A.1. Identification, récolte et séchage .....	148
VI.1.A.2. Préparation des extraits .....	149
VI.1.A.3. Évaporation des solvants .....	150
VI.1.A.4. Criblage phytochimique.....	150
VI.1.B. Techniques chromatographiques liquides.....	154
VI.1.B.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	154
VI.1.B.2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte .....	154
VI.1.B.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	155
VI.1.B.4. Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	155
VI.1.B.5. Autres types de chromatographie liquide utilisés.....	156
VI.1.C. Etude phytochimique des extraits de <i>Fagraea fragrans</i> Roxb.....	156
VI.1.C.1. Fractionnements de l'extrait DCM d'écorce de tronc .....	156
VI.1.C.2. Fractionnements de l'extrait DCM des feuilles.....	158
VI.1.C.3. Analyse CLHP des composés isolés .....	158
VI.1.C.4. Transformation chimique .....	159
VI.1.D. Etude phytochimique des extraits de <i>Strychnos nux-vomica</i> L. ....	160
VI.1.D.1. Analyse des lots en CLHP .....	160
VI.1.D.2. Fractionnements de l'extrait P2.....	160

## TABLE DES MATIERES

---

VI.1.D.3. Fractionnements de l'extrait DCM pH 8.....	161
VI.1.D.4. Etude de l'extrait dichlorométhane pH12.....	161
VI.1.E. Techniques spectroscopiques et spectrométries .....	162
VI.1.E.1. Spectroscopie ultraviolet (UV)-visible (vis) .....	162
VI.1.E.2. Spectroscopie infra-rouge (IR) .....	162
VI.1.E.3. Spectrométrie de masse (MS) .....	162
VI.1.E.4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	163
VI.1.E.5. Pouvoir rotatoire .....	163
VI.1.E.6. Dichroïsme circulaire (DC) .....	163
VI.1.F. Modélisation moléculaire .....	163
<b>VI.2. PHARMACOLOGIE.....</b>	<b>164</b>
VI.2.A. Tests antiplasmodiaux ( <i>in vitro</i> ).....	164
VI.2.A.1. Culture de Plasmodium falciparum .....	164
VI.2.A.2. Test de chimiosensibilité <i>in vitro</i> .....	165
VI.2.A.3. Evaluation de la parasitémie .....	166
VI.2.A.4. Classification de l'activité antiplasmodiale.....	168
VI.2.B. Tests cytotoxiques ( <i>in vitro</i> ).....	168
VI.2.C. Tests d'hémolyse ( <i>in vitro</i> ) .....	170
VI.2.D. Tests antipaludiques ( <i>in vivo</i> ).....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	173
<b>ANNEXE I : Tableaux détaillés des expériences <i>in vivo</i> .....</b>	<b>187</b>
<b>ANNEXE II : La modélisation moléculaire .....</b>	<b>189</b>
<b>ANNEXE III : Quelques spectres RMN des alcaloïdes bisindoliques isolés.....</b>	<b>191</b>
<b>ANNEXE IV : Fiches analytiques des trois composés isolés pour la première fois dans le règne végétal.....</b>	<b>196</b>
<b>ANNEXE V : Productions scientifiques .....</b>	<b>200</b>



## **REMERCIEMENTS**

Ces six années de thèse et d'assistantat m'ont permis de développer diverses compétences techniques et humaines. Cet aboutissement personnel n'aurait pu se réaliser correctement sans la présence des nombreuses personnes qui m'ont entourée.

Je profite de l'occasion pour exprimer mon respect et mon immense gratitude au Professeur Luc Angenot pour la confiance qu'il m'a accordée en m'engageant dans son service. J'ai notamment pu apprécier ses riches connaissances dans de nombreux domaines, sa mémoire impressionnante, sa passion pour les Strychnos et leurs alcaloïdes, son esprit ouvert et sa joie de vivre.

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Monique Tits qui, toujours à l'affût des dernières avancées en phytothérapie, prodigue des conseils pertinents et apporte un grand soutien moral aux membres du laboratoire. De plus, je suis honorée qu'elle assure la présidence de ce jury de thèse.

Au Professeur Michel Frédéric qui grâce à son suivi quotidien m'a initiée au métier de chercheur et m'a fait profiter de son savoir tant en ce qui concerne la RMN que le paludisme, je lui en suis entièrement reconnaissante. C'est également grâce à lui que la collaboration avec l'Université de la Réunion est née ; merci de m'avoir intégrée dans ce projet.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Patrick De Mol qui, en assurant la présidence du comité de thèse, a pu suivre l'évolution de ce travail. Son intérêt et sa guidance m'ont été fort bénéfiques. Il m'a également accueillie à mes débuts au sein de son Laboratoire de Microbiologie Médicale (ULg) pour réaliser la culture du Plasmodium. Il en va de même pour le Docteur Alain Chariot du Laboratoire de Chimie Médicale (ULg) participant aussi aux comités de thèse et m'ayant permis d'effectuer les tests cytotoxiques (salle de culture du GIGA).

La co-tutelle n'aurait pas eu lieu sans le dévouement du Professeur Evelyne Ollivier, je la remercie vivement pour ses encouragements et sa gentillesse. Je lui suis également reconnaissante pour l'opportunité donnée à découvrir le Laboratoire LASEVE de l'Université de Québec, à Chicoutimi (UQAC-Canada). Je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Guy Balansard pour l'accueil qu'il m'a réservé lors de mon stage de DEA dans son laboratoire et pour avoir mis en place les projets me concernant.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux Professeurs Luc Pieters (Université d'Anvers) et Marie-Geneviève Dijoux-Franca (Université de Lyon I) qui ont accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur, je les remercie vivement pour le temps et le professionnalisme qu'ils ont consacrés à ces tâches. Je remercie aussi le Professeur Dominique Mattar-Laurain (Université Henri Pointcaré) et le Docteur Riad Elias (Université de la Méditerranée) qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Un tout grand merci à Monsieur Jean-Noël Wauters pour ses compétences en CLHP et les services fournis, aux autres membres du laboratoire qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce parcours : Gene, Virginie, Delphine, Martine, Olivia, Raymond, Mariano, Ewa, César, Alembert et Nathalie, sans oublier ceux qui ont fait partie du laboratoire, merci pour leur aide et la convivialité partagée.

J'exprime ma profonde gratitude au Docteur Georges Dive (ULg) pour sa disponibilité, sa patience et son enthousiasme. Sans lui, les études de modélisations moléculaires n'auraient pas pu eu lieu.

Je remercie l'équipe du Professeur Nadine Azas du Laboratoire de Parasitologie (Université de la Méditerranée) qui a réalisé certains tests antiplasmodiaux sur la souche W2 et aussi le personnel de l'animalerie (ULg) pour leur aide dans les manipulations sur souris.

Je voudrais également remercier tous ceux qui m'ont permis l'identification structurale des composés isolés : le Docteur Robert Faure (spectropôle de Marseille) pour le spectre de masse du fagraldéhyde, le Docteur Eric Ziemons (Laboratoire de Chimie Analytique, ULg) pour le spectre IR du fagraldéhyde, Monsieur Van Heugen (ATC) pour la prise de spectres de masse exacte, le Docteur André Matagne (Laboratoire d'Enzymologie et Repliements des Protéines, ULg) pour l'accès au spectropolarimètre, ainsi que les membres du Laboratoire d'Analyse des Médicaments (ULg) pour l'accès au polarimètre, et plus particulièrement le Docteur Sylvestre Dossou pour avoir consacré du temps aux essais de séparation énantiomérique.

Je souhaite remercier tous ceux qui m'ont chaleureusement accueillie lors de mon séjour à l'Université de la Réunion, et plus particulièrement : le Professeur Jacqueline Smadja (Laboratoire des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments - LCSNS) sans oublier son invitation à la journée de récolte avec les personnes du programme phytochik, ce fut un réel enrichissement ; le Docteur Isabelle Grondin (LCSNS) pour l'accueil amical, l'enthousiasme qu'elle suscite et le temps consacré à la découverte de l'île ; ainsi que le Docteur Hippolyte Kodja (UMR PVBMT) avec qui j'ai pu avoir de nombreux échanges même lors de ses passages à Liège. Je remercie aussi le Docteur Dominique Strasberg et Monsieur Jacques Fournel, botanistes de l'Université de la Réunion, pour leur enseignement durant les récoltes.

Je tiens à remercier les Professeurs André Pichette et Jean Legault pour la confiance qu'ils m'ont accordée et leur accueil dans le Laboratoire LASEVE (UQAC) où j'ai appris à réaliser des tests anti-inflammatoires *in vitro*.

Je n'aurai pas pu effectuer mes divers séjours à l'étranger sans le Fonds Léon Frédéricq qui m'a octroyé une bourse de voyage en 2007 et sans la convention Samuel de Champlain entre France et Québec qui a financé mon séjour de cinq semaines dans le Laboratoire LASEVE de l'UQAC. J'exprime, ici, ma reconnaissance à leurs représentants.

Enfin ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans les chercheurs et apprentis-chercheurs croisés lors de mes passages dans les divers laboratoires ; je les remercie pour les échanges fructueux et amicaux, et tout particulièrement Joanne Bero pour ses conseils avisés, son enthousiasme, sa bonne humeur mais surtout pour l'amitié qui s'est développée au-delà du laboratoire.

A tous mes amis pour leurs encouragements et les bons moments passés ensemble.

A ma famille, et plus particulièrement à mes parents, qui ont cru en moi et m'ont donné l'opportunité et la liberté de suivre les études qui m'ont permis d'aboutir à cette thèse.

## **RESUME**

Cette thèse a été menée dans l'optique de participer à la recherche de nouveaux antipaludiques provenant de plantes en suivant la démarche ethnopharmacologique.

La première partie du travail a consisté à sélectionner des plantes utilisées traditionnellement contre les fièvres dans l'archipel des Mascareignes. Trente-trois échantillons provenant de vingt espèces végétales ont été récoltés, séchés et extraits par du méthanol et du dichlorométhane. Un criblage antiplasmodial *in vitro* a permis de mettre en évidence neuf extraits prometteurs ( $CI_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$ ). Puis, des tests sur souris ont confirmé l'intérêt de deux espèces : *Psiadia dentata* D.C. et *Terminalia bentzoe* L. Ces deux plantes endémiques sont des candidates pour des études phytochimique et pharmacologique approfondies ultérieures.

La deuxième partie du travail présente l'exploration phytochimique et pharmacologique de deux espèces végétales du Cambodge. La première, *Fagraea fragrans* Roxb. est un arbre retenu lors d'un criblage antiplasmodial antérieur. Un nouveau composé monoterpénique, nommé fagraldéhyde et possédant un squelette inusuel, a été isolé à partir de l'écorce de tronc. Une hypothèse biosynthétique différente des séco-iridoïdes classiques a été postulée ; ce composé est, malgré tout, qualifié de séco-iridoïde aglycone. De plus, les composés majoritaires des extraits méthanoliques des feuilles et de l'écorce de tronc ont été identifiés. Il s'agit de séco-iridoïdes communs chez les *Gentianaceae* : le gentiopicroside, le swéroside et la swertiamarine.

Au niveau pharmacologique, il apparaît que l'activité perçue lors du criblage serait due à des composés labiles ou à des composés minoritaires, probablement des terpènes, agissant en synergie. L'existence de prodrogues dans les extraits méthanoliques a été investiguée ; il semble que, hormis les séco-iridoïdes isolés, des composés sont transformés en produits actifs en présence d'ammoniaque. L'étude *in vivo* de la décoction d'écorce de tronc présage un effet indirect sur la forme intra-érythrocytaire du plasmodium, il se pourrait que la plante soulage d'autres symptômes ressentis lors d'une attaque paludique (fièvre, douleur, inflammation) ou qu'elle agisse à un autre stade du développement du parasite.

La deuxième espèce étudiée récoltée au Cambodge est *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae). Lors d'études antérieures, plusieurs alcaloïdes bisindoliques provenant d'autres espèces du genre ont démontré posséder une puissante activité antimalarique ( $CI_{50} < 1 \mu\text{M}$ ). Seuls deux alcaloïdes bisindoliques ont jusqu'à présent été décrits dans le vomiquier : la longicaudatine et la strychnochrysin. Notre étude a permis d'isoler trois nouveaux alcaloïdes bisindoliques et de réisoler la strychnochrysin. Ils sont tous formés d'un noyau strychnane et d'un noyau corynanthéane. Une règle générale concernant la stéréochimie du noyau strychnane est maintenant établie en observant plusieurs autres alcaloïdes : la présence d'un septième cycle inverse la conformation d'un carbone inclus dans ce cycle. Cette inversion est identifiable par analyse des spectres RMN du proton et du carbone ainsi que par dichroïsme circulaire si la structure est hautement conjuguée. Elle est de surcroît expliquée par une étude de modélisation moléculaire.

L'activité antiplasmodiale des alcaloïdes isolés confirme la relation de structure-activité établie par nos prédécesseurs. L'écorce de tronc de *S. nux-vomica* regorge encore de nombreux alcaloïdes et notamment de bases anhydronium qui seraient responsables de l'excellente activité antiplasmodiale observée dans l'extrait les renfermant ( $CI_{50} = 1,8 \mu\text{g/ml}$ ).

## **LISTE DES ABREVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES**

ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt  
Ach : acétylcholine  
ACN : acétonitrile  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
BCG : bacille de Calmette-Guérin  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CDCl<sub>3</sub> : chloroforme deutéré  
CI<sub>50</sub> : concentration inhibitrice à 50 %  
CLHP : chromatographie liquide haute performance  
COSY : corrélation spectroscopy  
CPC : chromatographie de partage centrifuge  
DAD : détecteur à barrette de diodes  
DCM : dichlorométhane  
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane  
DE<sub>50</sub> : dose efficace à 50 %  
DI<sub>50</sub> : dose inhibitrice à 50 %  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DPPH : 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
ELSD : détecteur de dispersion de la lumière par évaporation  
EtOAc : acétate d'éthyle  
EtOH : ethanol  
Ext. : extrait  
Glc : D-glucose  
Hex : hexane  
HMBC : heteronuclear multiple bond correlation  
HSQC : heteronuclear single-quantum correlation  
iPrOH : iso-propanol  
IR : infra-rouge  
IS : index de sélectivité  
i.p. : intrapéritonéal  
J : constante de couplage  
LPS : lipopolysaccharide  
m/z : rapport masse sur charge  
MeOD : méthanol deutéré  
MeOH : méthanol  
MIC : concentration minimale inhibitrice  
MS : mass spectroscopy  
MTA : médicament traditionnel amélioré  
n-BuOH : n-butanol  
NOESY : nuclear overhauser and exchange spectroscopy  
OMS : organisation mondiale de la santé  
PA : principe actif  
ppm : partie par million  
R<sub>f</sub> : facteur de rétention  
RMN : résonance magnétique nucléaire  
Si : silice

TFA : acide trifluoroacétique

Tol : toluène

UCL : université catholique de Louvain

ULg : université de Liège

UV : ultra-violet

WHO : world health organization (=OMS)

$\delta$  : déplacement chimique

$\Delta\varepsilon$  : dichroïsme circulaire molaire (ou absorptivité dichroïque molaire différentielle)

$\lambda$  : longueur d'onde

## LISTE DES FIGURES

Figure I.1. : Carte des régions de transmission de malaria en 2010. ....	1
Figure I.2 : Carte mondiale estimant le nombre de morts par 1000 habitants provoqué par la malaria en 2006 .....	2
Figure I.3 : Distribution mondiale des vecteurs de malaria dominants ou potentiellement importants.....	3
Figure I.4. : Cycle biologique du <i>Plasmodium</i> touchant l'homme et l'anophèle. ....	5
Figure I.5 : Structure générale du plasmodium intra-erythrocytaire et les principales cibles médicamenteuses.....	11
Figure I.6 : Taux d'incidence de la malaria au Cambodge entre 1999 et 2009.....	15
Figure I.7 : Taux d'incidence du paludisme en 2003 au Cambodge par région.....	16
Figure I.8 : Carte des provinces du Cambodge.....	17
Figure I.9 : Les différentes spécialités requises dans la recherche ethnopharmacologique. ....	21
Figure II.1 : Carte représentant la pluviométrie annuelle en 1999 sur l'île de la Réunion. ....	28
Figure II.2 : Carte mondiale reprenant les 34 « points chauds » de biodiversité.....	29
Figure II.3 : Limites du Parc National de l'île de la Réunion. ....	30
Figure II.5 : Carte phytogéographique de l'île de la Réunion.....	31
Figure II.4 : Strates des divers écosystèmes présents sur l'île de la Réunion variant selon l'altitude. ....	31
Figure II.6 : Moyenne et écart-type du pourcentage en parasitémie des groupes testés .....	50
Figure II.7 : Moyenne et écart-type du pourcentage en parasitémie des groupes testés.....	50
Figure II.8 : Comparaison de l'activité inhibitrice des extraits de plantes des Mascareignes vis-à-vis de <i>Plasmodium berghei</i> . ....	51
Figure II.9 : Pourcentage de survie des souris dans chaque groupe pendant 14 jours. ....	52
Figure III.1 : Arbre phylogénétique des lamiales et des gentianales .....	58
Figure III.2 : CCM comparative des extraits DCM de <i>Fagraea fragrans</i> . ....	63
Figure III.3 : CCM comparative des extraits MeOH de <i>Fagraea fragrans</i> .....	63
Figure III.4 : CCM du 1 <sup>er</sup> essai de fractionnement de l'extrait DCM de l'écorce de tronc. ....	64
Figure III.5 : CCM des fractions de l'extrait DCM d'écorce de tronc.....	65
Figure III.6 : Profil chromatographique CLHP à 254 nm du produit isolé F3P maintenu quelques jours au frigo.....	66
Figure III.7 : Profil chromatographique à 254 nm du produit isolé F4P.....	66
Figure III.8 : CCM de la fraction F8 et du témoin gentiopicroside. ....	68
Figure III.9 : Schéma de fractionnement de l'extrait DCM d'écorce de tronc de <i>Fagraea fragrans</i> incluant les composés identifiés.....	69
Figure III.10 : CCM des fractions de l'extrait DCM des feuilles.....	70
Figure III.11 : CCM des fractions de F1. ....	71
Figure III.12 : CCM du produit polaire de l'extrait DCM des feuilles. ....	71
Figure III.13 : CCM des fractions de F1f.....	71
Figure III.14 : Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de feuilles de <i>Fagraea fragrans</i> incluant les composés identifiés.....	73
Figure III.15 : Spectre UV-vis du composé F4P dans le méthanol. ....	74
Figure III.16 : Spectre IR du composé F4P dans le tétrachloroéthylène.....	75
Figure III.17 : Structure 2D du composé F4P (fagraldéhyde).....	76
Figure III.18 : Les différentes voies de fragmentation proposées suite aux ions filles obtenus dans le spectre MS/MS du fagraldéhyde.....	77
Figure III.19 : Zoom sur la zone déblindée du spectre RMN du proton de l'extrait DCM et du fagraldéhyde dans le CDCl <sub>3</sub> . ....	78
Figure III.20 : Géométrie optimum calculée pour le rotamère aldéhydique.....	79
Figure III.21 : Conformations possibles du cycle lactonique. ....	79
Figure III.22 : Conformation du cycle lactonique la plus stable.....	80
Figure III.23 : Spectre UV-vis calculé .....	80
Figure III.24 : Spectre DC de la configuration R calculé .....	81

Figure III.25 : Spectre DC de la configuration S calculé.....	81
Figure III.26 : Hypothèse biosynthétique du fagraldéhyde à partir de l'iridodial.....	82
Figure III.27 : Structure 2D du composé PM1 (gentiopicroside).....	83
Figure III.28 : Structure 2D du composé PM2 (swéroside).....	84
Figure III.29 : Structure 2D du composé PM3 (swertiamarine).....	84
Figure III.30 : Schéma biosynthétique des séco-iridoïdes.....	86
Figure III.31 : Profil chromatographique des extraits aqueux de bois de tronc, d'écorce de tronc et de feuilles de <i>F. fragrans</i> .....	87
Figure III.32 : CCM des transformations des extraits polaires par voie chimique.....	88
Figure III.33 : CCM des hydrolyses acides.....	89
Figure III.34 : Parasitémie chez la souris infestée par <i>Plasmodium berghei</i> et traitée par l'extrait aqueux de l'écorce de <i>F. fragrans</i> .....	96
Figure IV.1 : Photos du tronc du specimen <i>Strychnos nux-vomica</i> récolté au Cambodge et zoom sur le suber couleur rouge-ôcre.....	101
Figure IV.2: Structures des principaux alcaloïdes indoliques isolés du <i>S. nux-vomica</i> .....	106
Figure IV.3 : Biosynthèse de la strictosidine.....	107
Figure IV.4 : Les trois types de squelettes carbonés issus de la strictosidine, rencontrés chez les alcaloïdes indolomonoterpéniques.....	108
Figure IV.5 : Schéma simplifié de l'origine biosynthétique des alcaloïdes indoliques de type I.....	109
Figure IV.6 : Hypothèse biosynthétique de la formation de la strychnine.....	110
Figure IV.7 : CCM des extraits MeOH acide des poudres de suber et d'écorce du tronc de <i>S. nux-vomica</i> .....	116
Figure IV.8 : Profil chromatographique CLHP des extraits méthanoliques de poudre du suber et de poudre d'écorce du Lot 1.....	116
Figure IV.9 : Schéma d'extraction des alcaloïdes de la poudre de suber de <i>S. nux-vomica</i> .....	117
Figure IV.10 : CCM des divers extraits du suber de tronc de <i>Strychnos nux-vomica</i> .....	117
Figure IV.11 : CCM des fractions de l'extrait P2.....	118
Figure IV.12 : CCM des sous-fractions de la fraction P2P4.....	119
Figure IV.13 : CCM des sous-fractions de la fraction P2P3.....	119
Figure IV.14 : Schéma de fractionnement de l'extrait P2 de l'écorce de tronc de <i>Strychnos nux-vomica</i> incluant les composés identifiés.....	120
Figure IV.15 : CCM des fractions de l'extrait E8.....	120
Figure IV.16 : CCM des sous-fractions de la fraction E8P10.....	121
Figure IV.17 : Schéma de fractionnement de l'extrait E8 de l'écorce de <i>S. nux-vomica</i> .....	121
Figure IV.18 : CCM des fractions de l'extrait E12.....	122
Figure IV.19 : Spectre UV-vis du composé OR1.....	123
Figure IV.20 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé OR1.....	124
Figure IV.21 : Structure 2D du composé OR1 (strychnochryrine).....	126
Figure IV.22 : Spectre UV-vis du composé BL1.....	126
Figure IV.23 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé BL1.....	127
Figure IV.24 : Structure 2D du composé BL1 (N <sub>7</sub> -méthyl-longicaudatine).....	128
Figure IV.25 : Spectre UV-vis du composé OR2.....	128
Figure IV.26 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé OR2.....	129
Figure IV.28 : Spectre UV-vis du composé OR3.....	130
Figure IV.27 : Structure 2D du composé OR2 (déméthoxyguiaflavine).....	130
Figure IV.29 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé OR3.....	131
Figure IV.30 : Structure 2D du composé OR3.....	132
Figure IV.31 : Dénomination par lettres des 6 cycles de la strychnine et des 4 cycles de la partie corynanthéane.....	135
Figure IV.32 : Structures tridimensionnelles de la strychnochryrine Nb-méthylée variant au niveau de la configuration du C-17.....	136
Figure IV.33 : Structures tridimensionnelles de la déméthoxyguiaflavine variant au niveau de la configuration du C-17.....	136
Figure IV.34 : Forme aromatique dipolaire et forme neutre des bases anhydronium.....	139

## LISTE DES FIGURES

---

Figure VI.1 : Schéma du protocole de la transformation chimique des extraits polaires .....	159
Figure VI.2 : Réactions redox menant au colorant formazan.....	166
Figure VI.3 : Clivage du sel de tetrazolium WST-1 en formazan. ....	169
Figure VI.4 : Réduction de résazurine en résorufine.....	170



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Médicaments antiparasitaires développés entre 1981 et 2006.....	18
Tableau II.1 : L'endémisme dans les territoires océaniques intertropicaux isolés. ....	29
Tableau II.2 : Représentation culturelle de la maladie et thérapies selon l'influence ethnique. ...	37
Tableau II.3 : Tableau ethnopharmacologique des espèces retenues et récoltées.....	43
Tableau II.4 : Récapitulatif des diverses drogues récoltées et leur mode de séchage.....	44
Tableau II.5 : CI <sub>50</sub> (µg/ml) des extraits actifs vis-à-vis des deux souches de <i>Plasmodium falciparum</i> et leur index de sélectivité .....	46
Tableau III.1 : Hiérarchie taxonomique de <i>Fagraea fragrans</i> selon les deux types de classification actuelle. ....	56
Tableau III.2 : Historique de la classification du genre <i>Fagraea</i> . ....	57
Tableau III.3 : Classes phytochimiques présentes dans l'écorce de tronc et les feuilles de <i>Fagraea fragrans</i> . ....	62
Tableau III.4 : Ions majoritaires et leurs fragments filles (MS2) retrouvés dans les sous-fractions de F6.....	67
Tableau III.5 : Ions majoritaires et leurs fragments filles (MS2) retrouvés dans diverses fractions apolaires des feuilles. ....	72
Tableau III.6 : Récapitulatifs des composés isolés chez <i>Fagraea fragrans</i> .....	74
Tableau III.7 : Déplacements chimiques en ppm et corrélations des signaux obtenus pour le composé F4P. ....	76
Tableau III.8 : Comparaison des déplacements chimiques (δ, en ppm) des trois séco-iridoïdes dans le MeOD. ....	85
Tableau III.9 : Activité antiplasmodiale des extraits de <i>Fagraea fragrans</i> vis-à-vis de la souche chloroquino-sensible 3D7 du <i>Plasmodium falciparum</i> .....	87
Tableau III.10 : Activité antiplasmodiale vis-à-vis de la souche chloroquino-résistante W2 avant et après transformation chimique. ....	89
Tableau III.11 : Activité antiplasmodiale des hydrolyses acides vis-à-vis des deux souches. ....	90
Tableau III.12 : Principales activités pharmacologiques testées des séco-iridoïdes isolés. ....	92
Tableau III.13 : Activité cytotoxique des fractions d'écorce de <i>F. fragrans</i> vis-à-vis de 3 lignées cellulaires humaines.....	94
Tableau III.14 : Activité cytotoxique des fractions de feuilles de <i>F. fragrans</i> vis-à-vis de 3 lignées cellulaires humaines.....	94
Tableau IV.1 : Hiérarchie taxonomique de <i>Strychnos nux-vomica</i> . ....	102
Tableau IV.2 : Principaux alcaloïdes décrits dans les diverses parties de <i>S. nux-vomica</i> . ....	104
Tableau IV.3 : CI <sub>50</sub> des activités antiplasmodiales <i>in vitro</i> des alcaloïdes bisindoliques les plus actifs provenant de <i>Strychnos</i> . ....	113
Tableau IV.4 : Poids des fractions de l'extrait E12 .....	122
Tableau IV.5 : Récapitulatifs des composés isolés chez <i>Strychnos nux-vomica</i> .....	123
Tableau IV.6 : Déplacements chimiques de la strychnochrysin dans le méthanol et le chloroforme deutérés. ....	125
Tableau IV.7 : Déplacements chimiques dans le MeOD des alcaloïdes isolés.....	134
Tableau IV.8 : Tableau comparatif des déplacements chimiques <sup>13</sup> C des carbones autour de C-17 de divers alcaloïdes indoliques .....	137
Tableau IV.9 : Activité antiplasmodiale des extraits du suber de l'écorce de tronc de <i>S. nux-vomica</i> vis-à-vis de la souche 3D7 de <i>P. falciparum</i> .....	138
Tableau IV.10 : CI <sub>50</sub> de quelques fractions de l'extrait dichlorométhane pH12 vis-à-vis de la souche 3D7 de <i>Plasmodium falciparum</i> . ....	138
Tableau IV.11 : Principales bases anhydronium pourvues d'activité antiplasmodiale <i>in vitro</i> vis-à-vis de souches chloroquino-résistantes et chloroquino-sensibles .....	139
Tableau IV.12 : CI <sub>50</sub> sur <i>Plasmodium falciparum</i> des alcaloïdes bisindoliques isolés du suber de tronc de <i>Strychnos nux-vomica</i> . ....	140
Tableau IV.13 : Activité antiproliférative des alcaloïdes bisindoliques isolés vis-à-vis de fibroblastes humains.....	141



# **INTRODUCTION GENERALE**



# CHAPITRE I :

## Introduction générale

---

### I.1. LE PALUDISME

#### I.1.A. Description générale

Le paludisme (du latin *palus* qui signifie le marais), également appelé malaria (de l'italien *mal aria* qui signifie le mauvais air) ou fièvre des marais, est une maladie parasitaire causée par un hématozoaire, le plasmodium, transmis à l'homme par le moustique du genre *Anopheles*.

Cette maladie actuellement présente dans les régions tropicales et subtropicales du globe (Figure I.1.) a sévi pendant longtemps dans l'hémisphère nord. Elle était déjà décrite par les anciennes civilisations d'Égypte, de Chine (fièvre périodique) et en Grèce, notamment par Hippocrate (460-370 ACN) (fièvre atrabilaire) [196]. Mais ce n'est qu'en 1880 que l'origine de ce fléau a été découverte en Algérie par un médecin français Alphonse Laveran.

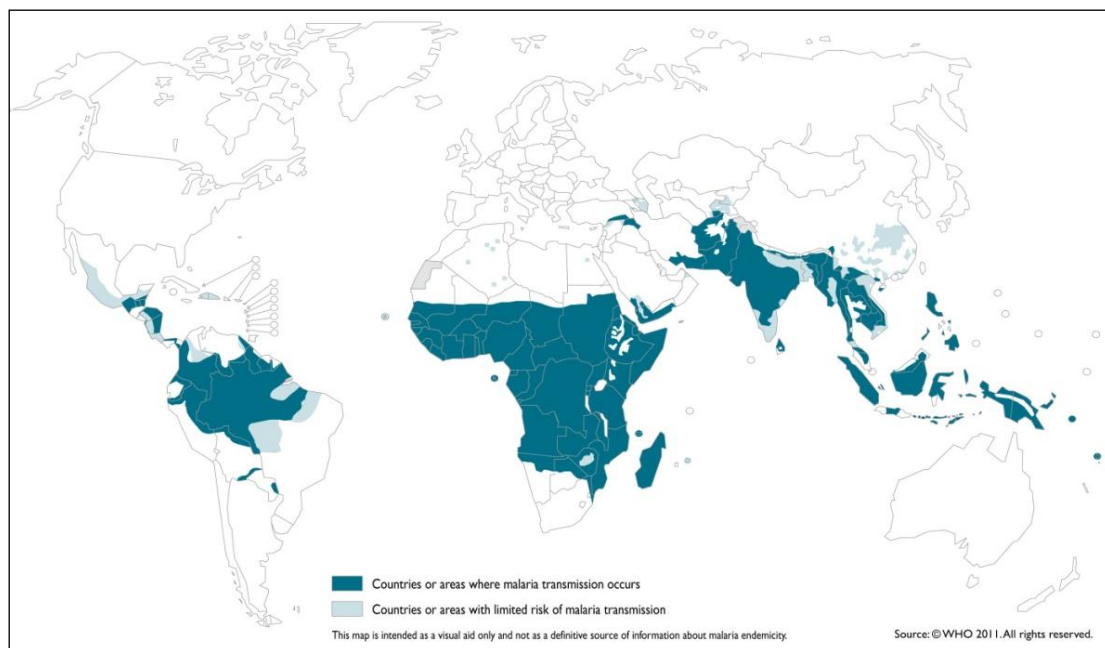


Figure I.1. : Carte des régions de transmission de malaria en 2010. Source WHO 2011. Zone foncée : pays touchés par la malaria ; zone claire : pays à risque ; zone blanche : pas de malaria endémique.

La malaria se manifeste par de la fièvre, des sudations ou des frissons, des céphalées, des nausées et vomissements, et des courbatures. Dans certains cas, elle peut provoquer des complications sévères telles qu'anémie grave (surtout chez les enfants en bas âge), neuropaludisme (coma profond, touchant surtout les enfants plus âgés et les adultes),

détresse respiratoire (réaction inflammatoire dans les poumons), prostration, convulsions, hémoglobinurie macroscopique due à l'hémolyse, hypoglycémie, défaillance rénale, acidose, ictère [34]. La malaria peut-être prévenue et soignée, mais elle reste dans certains cas une maladie mortelle. Les dernières données de l'OMS dénoncent qu'en 2008, 250 millions de cas d'infection ont été décrits dans les régions où la malaria sévit dont près d'un million provoquant la mort. Les victimes les plus touchées sont les enfants vivants en Afrique subsaharienne (Figure I.2.) [199]. Ces chiffres en font une des maladies infectieuses les plus sévères pour l'être humain.

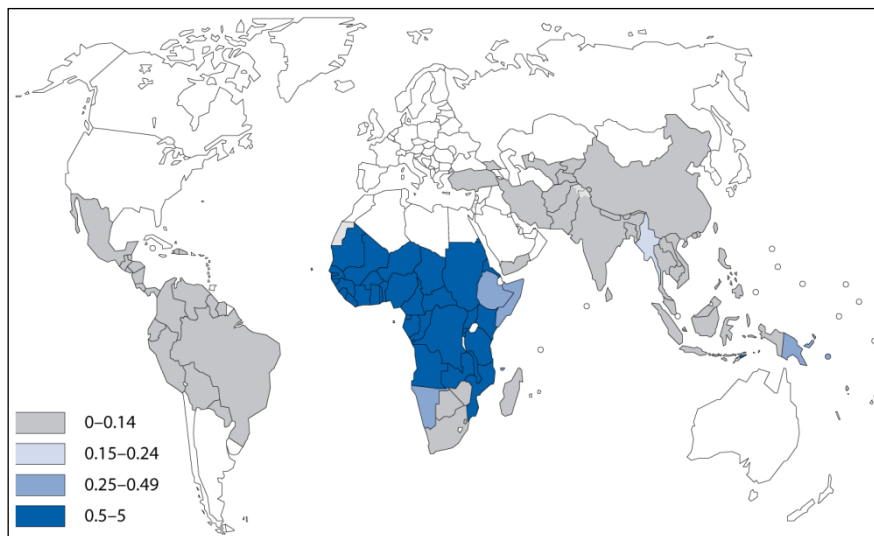


Figure I.2 : Carte mondiale estimant le nombre de morts par 1000 habitants provoqué par la malaria en 2006. *Source WHO 2011.*

### I.1.B. Vecteur de la maladie et transmission

Le plasmodium est transmis à l'homme par la pique d'un insecte, l'anophèle femelle. Ce sont des moustiques (famille des *Culicidae*) de la sous-famille *Anophelinae*. Sur les 430 espèces que compte le genre *Anopheles*, seules 30-40 *Anopheles sp.* sont des vecteurs potentiels pour l'homme (fig. I.3.). Il existe une grande variation dans la capacité des différentes espèces d'anophèles à transmettre les *plasmodia* ; en pratique, seule une vingtaine d'espèces assure la transmission [34].

En plus de cette spécificité d'espèces, la transmission est limitée par l'arrêt du cycle de vie du parasite dans son hôte invertébré. Ce cycle sporogonique dépend fortement de la température extérieure et de la longévité des moustiques. Par exemple, dans le cas de *Plasmodium falciparum* (espèce la plus dangereuse pour l'homme), des températures supérieures à 18°C mais inférieures à 33°C sont nécessaires au développement du parasite. Le cycle sporogonique dure 12 jours à 25°C mais 23 jours à 20°C.

La longévité et le cycle de vie du moustique varient également selon la température et l'humidité ambiantes. En général, une humidité supérieure à 60 % et une température moyenne de 25 °C sont idéales pour le développement larvaire (climat tropical). De plus, chaque espèce d'anophèle s'est adaptée à un type de collection d'eau particulier (gîte larvaire). Ces gîtes larvaires varient suivant l'altitude, le niveau de pollution, la salinité de l'eau, la pluviométrie, la nature du sol ou la présence d'abris végétaux.

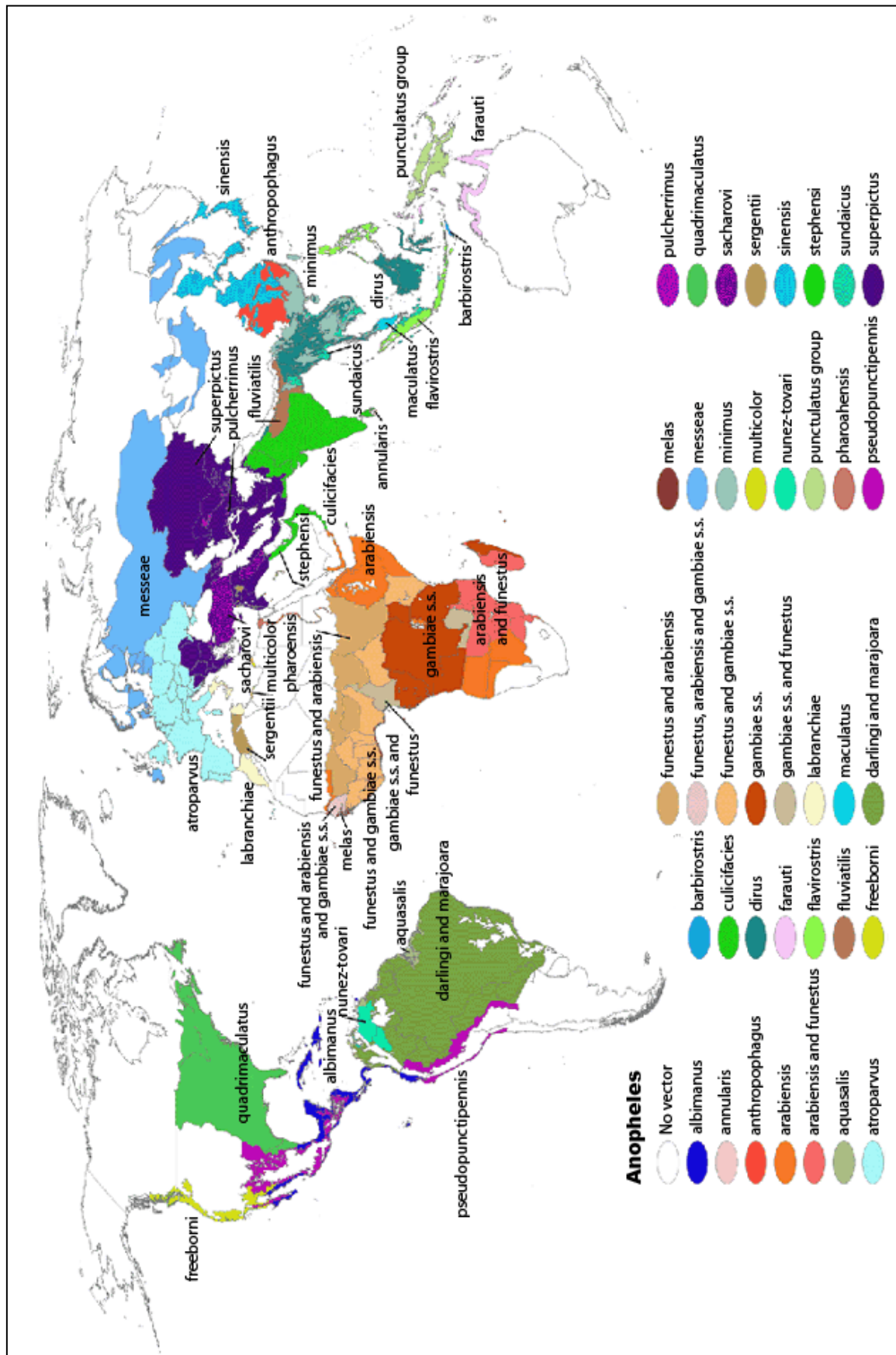


Figure I.3 : Distribution mondiale des vecteurs de malaria dominants ou potentiellement importants.  
 Source : Kiszewski et al. [109].

Le cycle de vie du moustique comporte 4 stades (zygotique, larvaire, pupaire ou nymphal, et imagal ou adulte). Les trois premiers stades se développent en milieu aquatique, à la surface de l'eau, et dure de 6 à 15 jours dans un climat tropical (et plusieurs mois en climat tempéré). La femelle pond ses œufs dans des gîtes larvaires adaptés, les œufs éclosent au bout de 2 à 3 jours en climat tropical, la larve passe par 3 mues de croissance (larves à 4 instars) qui durent au minimum 5 jours. La dernière mue forme un cocon où se développe la pupe ou nymphe qui devient un adulte en 1 à 3 jours. Dans les conditions optimales, le mâle vit seulement quelques jours, le temps de copuler, tandis que la femelle peut vivre plusieurs semaines (jusqu'à 1 mois). Une seule copulation suffit pour que la femelle féconde périodiquement ses œufs grâce à la spermathèque que le mâle lui a laissée lors de l'accouplement. La femelle a besoin d'un repas sanguin suivi d'une période de repos pour faire mûrir les oeufs (stade zygotique). Le repas sanguin est un moment critique pour la transmission de la malaria. La séquence (repas sanguin, maturation des oeufs et ponte) est répétée plusieurs fois au cours de la vie du moustique et s'appelle le **cycle trophogonique** (ou cycle gonotrophique); en climat tropical et selon l'espèce, 2 jours suffisent entre deux pontes [34, 148].

La transmission dépend également du comportement piqueur du moustique. Ainsi, il existe des anophèles, endophagiques, qui piquent à l'intérieur des maisons, et d'autres, exophagiques, qui piquent à l'extérieur des abris. Ces derniers sont moins touchés par les insecticides pulvérisés dans les habitations. Le lieu de repos après le repas sanguin dépend également de l'espèce d'anophèle. Il y a les moustiques qualifiés d'endophiles qui se reposent dans les habitations et les exophiles qui sortent en pleine nature pour se reposer. En général, toutes les espèces piquent durant la nuit et leur vol n'est pas audible [148].

En analysant le cycle de vie du moustique, on constate que le climat tropical est très favorable au développement du moustique, mais aussi du Plasmodium. Ceci explique en partie la répartition géographique de la maladie dans le monde. Notons que la maladie est également transmise d'homme à homme par contact sanguin direct (transfusion, blessure, aiguille souillée,...) ou par voie transplacentaire.

### **I.1.C. Le Plasmodium**

Le parasite responsable de la malaria est un protozoaire de l'embranchement des *Apicomplexa*, de la classe des *Haemosporidea*, de l'ordre des *Haemosporida*, de la famille des *Plasmodiidae*, du genre *Plasmodium*.

Ce genre, comptant 146 espèces, possède un cycle évolutif complexe puisqu'il alterne une reproduction asexuée chez un hôte vertébré (mammifères, oiseaux, reptiles) et sexuée chez un hôte invertébré [196].

#### **I.1.C.1. Cycle biologique**

##### **Cycle asexué (hôte vertébré)**

Lors d'une piqure de moustique infecté, les sporozoïtes situés dans les glandes salivaires de l'anophèle passent dans le sang de l'hôte vertébré et migrent jusque dans le foie. Chez



l'homme, dans le cas de *P. vivax* et *P. ovale*, les sporozoïtes peuvent entrer dans un état dormant, appelé hypnozoïtes, pour s'activer quelques semaines voire des années plus tard. Les sporozoïtes entrent dans les hépatocytes par invagination et se multiplient par schizogonie pour générer des dizaines de milliers de mérozoïtes. Le cycle de schizogonie hépatocytaire peut durer entre 5 et 15 jours selon l'espèce. L'éclatement du schizonte entraîne la libération des mérozoïtes dans la circulation sanguine.

Le cycle intra-érythrocytaire (fig. 1.4.B.) débute par l'invasion des mérozoïtes dans les globules rouges. Par un mécanisme de reconnaissance récepteur/ligand, les mérozoïtes vont se lier à la membrane des érythrocytes et se réorienter pour s'attacher irrémédiablement par adhésion apicale. Ce processus complexe impliquant diverses protéines aboutit à la libération du contenu des organelles apicales (rhoptries, micronème et granules denses) dans la membrane érythrocytaire afin de permettre la pénétration du mérozoïte dans le globule rouge par invagination. Le développement du parasite dans la vacuole parasitophore passe par plusieurs stades : jeune trophozoïte, appelé également stade anneau, trophozoïte mature et finalement schizonte. Les nutriments (hémoglobine, acides aminés, acide para-aminobenzoïque, glucose, acides gras) nécessaires au développement sont importés du cytoplasme du globule rouge dans la vacuole parasitophore ; le parasite les digère alors dans sa vacuole digestive. Il a également la capacité d'exporter des protéines à la surface des érythrocytes. Certaines protéines, appelées knobs, sont impliquées dans l'adhésion des globules rouges à d'autres hématies ou à la paroi des vaisseaux sanguins (cas de *P. falciparum*). Cette adhésion permet d'éviter la destruction de l'hématie infectée dans la rate et cause les cas graves du paludisme et l'infection placentaire. D'autres protéines favorisent la perméabilité membranaire nécessaire à l'importation d'autres nutriments.

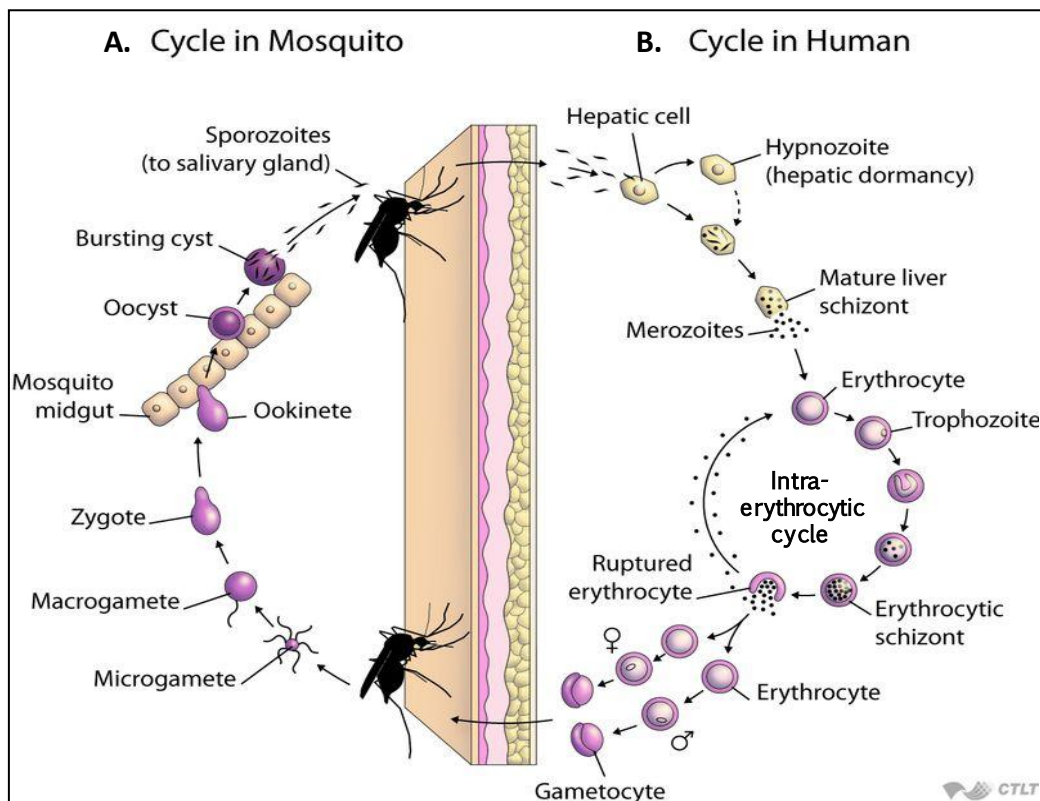


Figure 1.4. : Cycle biologique du *Plasmodium* touchant l'homme et l'anophèle.  
Source : [www.malariasite.com](http://www.malariasite.com)

Au stade schizonte érythrocytaire, le noyau se divise et forme environ 16 mérozoïtes par bourgeonnement. Le schizonte éclate pour libérer les mérozoïtes qui peuvent initier un nouveau cycle intra-érythrocytaire. Lors de l'éclatement du schizonte, des substances pyrogènes (comme les cytokines TNF) sont également libérées dans la circulation sanguine et provoquent les symptômes de la maladie. Au bout de plusieurs cycles, certains mérozoïtes sont programmés pour former des gamétocytes mâles (microgamètes) et femelles (macrogamètes) qui assurent le cycle sexué du parasite [34, 196].

### Cycle sexué (hôte invertébré)

Lors d'un repas sanguin, le moustique aspire le sang de son hôte infecté. Le sang ingéré s'accumule dans l'abdomen puis passe dans l'estomac du moustique où les globules rouges et blancs sont digérés. Les gamétocytes (haploïdes) restent dans l'estomac où le microgamète mâle se scinde par exflagellation en 8 microgamètes flagellés qui se déplacent pour féconder un macrogamète et donner un zygote diploïde. Le zygote se transforme en ookinète mobile qui traverse la paroi de l'estomac pour s'y fixer à l'extérieur (oocyste). Le noyau se divise par méiose pour redevenir haploïde. Cette multiplication par schizogonie forme des milliers de sporozoïtes dans l'oocyste qui sont libérés ensuite dans l'hémolymphe. Certains de ces sporozoïtes mobiles vont ensuite migrer dans les glandes salivaires du moustique (fig. 1.4.A.) [34, 196].

### I.1.C.2. Les cinq espèces parasitant l'être humain

Des 146 espèces de plasmodium, seules quatre espèces infectent l'homme (*P. malariae*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum*); cependant, une espèce (*P. knowlesi*) parasitant les macaques a manifesté récemment une capacité zoonotique (transmission de l'animal à l'homme).

- ***Plasmodium malariae*** : distribuée mondialement, cette espèce possède le cycle érythrocytaire le plus long parmi les cinq espèces (environ 72 heures). Elle provoque donc des fièvres tous les trois jours, que l'on nomme également fièvres quartes bénignes. Mais quand l'infection est chronique, des complications rénales d'origine vraisemblablement immunologique peuvent survenir.
- ***Plasmodium vivax*** : cette espèce se retrouve essentiellement en Asie et en Amérique latine ; elle s'est également adaptée au climat plus tempéré. Elle provoque des fièvres tierces (car son cycle érythrocytaire dure deux jours). Elle a la particularité (avec *P. ovale*) de produire des hypnozoïtes (état dormant) dans le foie qui peuvent s'activer même après plusieurs années. Ces formes sont donc responsables de rechutes paludiques. Une autre caractéristique de cette espèce est qu'elle ne reconnaît pas les hématies dépourvues des antigènes de groupes sanguins Duffy. Le groupe Duffy négatif est extrêmement fréquent (85 % de la population) en Afrique subsaharienne, c'est pourquoi *P. vivax* ne se rencontre pratiquement pas en Afrique.
- ***Plasmodium ovale*** : l'espèce la plus rare car elle est la plus sensible aux anticorps spécifiques humains ; le cycle et la morphologie de cette espèce sont très semblables à *P. vivax*, elle produit également des hypnozoïtes et provoque des fièvres tierces bénignes. Contrairement à *P. vivax*, cette espèce peut infecter les

personnes déficientes de la protéine Duffy (cf. § I.1.D.1). On la retrouve donc principalement en Afrique subsaharienne.

- ***Plasmodium falciparum*** : distribuée dans toutes les zones tropicales et subtropicales, cette espèce est responsable de la fièvre tierce maligne ; elle amène souvent des complications sévères et peut entraîner le décès. En effet, cette espèce a la particularité d'induire une adhérence des globules rouges infectés à l'endothélium des petits vaisseaux (protéines knobs) qui entraîne les complications telle que la malaria cérébrale. De plus, la maturation des schizontes hépatiques est plus rapide (6 jours) que chez les autres espèces (~ 15 jours) et les vecteurs sont nombreux. Elle se transmet donc plus rapidement.
- ***Plasmodium knowlesi*** : cette espèce nouvellement décrite se retrouve uniquement dans le Sud-est Asiatique où vivent les macaques porteurs du Plasmodium (*Macaca nemestrina* et *M. fascicularis*). Le cycle érythrocytaire de cette espèce ne dure que 24 heures. Elle peut donc entraîner des complications sévères ; la fièvre est quotidienne.

### I.1.C. Thérapies [196]

Avant le 19<sup>e</sup> siècle (siècle des premières découvertes de chimiothérapie), les hommes utilisaient les végétaux pour se soigner, pour traiter le paludisme également. La première molécule pure utilisée pour traiter la malaria est la quinine isolée en 1820 par Pelletier et Caventou, deux pharmaciens français. Ce composé provient de l'écorce de quinquina (*Cinchona sp.*). Cette écorce a été introduite en Europe au 17<sup>e</sup> siècle, suite à l'observation faite par les Jésuites de son utilisation en Amérique Latine. Les Jésuites installés en Equateur avaient vu que les mineurs amérindiens souffrant de frissons mâchaient l'écorce d'un petit arbre. Quand la comtesse de Chinchón, femme du vice-roi du Pérou, souffrit de fièvre périodique, les Jésuites lui donnèrent cette écorce qui la soigna aussitôt. Ils rapportèrent la poudre d'écorce en Europe où la « poudre des Jésuites » eut un grand succès. Linné s'inspira de l'histoire de la comtesse pour nommer le genre *Cinchona*. Pendant près d'un siècle, la quinine fut le seul traitement chimiothérapeutique de la malaria puisque cet alcaloïde était fiable, peu toxique et bon marché (fin du 19<sup>e</sup> siècle, les Britanniques cultivaient l'arbuste à Ceylan et les Hollandais à Java).

Puis, vu la difficulté d'approvisionnement en écorce de quinquina pendant la Deuxième Guerre mondiale, les chercheurs se mirent à synthétiser des dérivés de quinine. Ainsi apparurent la chloroquine (premier antipaludique de synthèse) et la primaquine. Suite à la découverte d'un insecticide, le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), par Muller en 1939, l'OMS lance un programme d'éradication du paludisme. Les moyens financiers ont permis de l'éradiquer dans une grande partie de l'hémisphère nord (États-Unis, Europe, Union Soviétique). Mais déjà en 1960, apparaissent des cas de résistances au DDT (remplacé par des organophosphorés, des carbamates ou des pyréthrinoïdes) suivis de peu par les premières résistances aux antimalariques.

Malheureusement, les bailleurs de fonds des zones tempérées ne se sentant plus menacés et les chercheurs n'ayant plus de financement pour de nouvelles études, ils abandonnèrent le sujet malaria pendant de nombreuses années, puisqu'à défaut

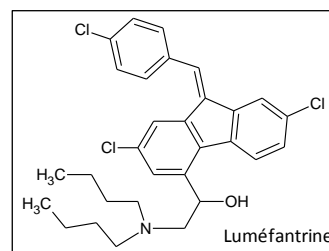
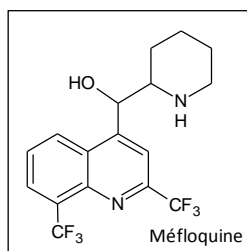
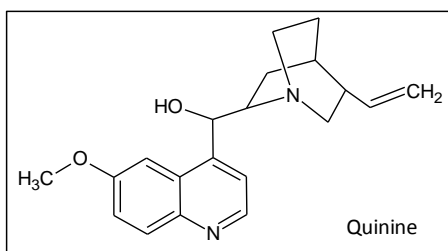
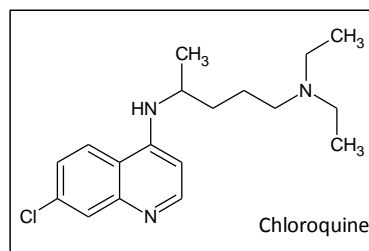
d'éradication mondiale, le paludisme était contrôlé. Dans les années 70, les Chinois de leur côté ont isolé et caractérisé un principe actif (l'artémisinine) d'une herbacée (*Artemisia annua*) qu'ils utilisaient depuis plus de 2000 ans dans leur médecine traditionnelle et mirent cette lactone sesquiterpénique en vente sur le marché mondial. Par divers facteurs, principalement le développement de résistances multiples, la situation dans les régions chaudes du globe se détériorant, les chercheurs se sont à nouveau activés et, depuis une dizaine d'années, de nouvelles sources de financement se sont créées, notamment par des partenariats entre des institutions publiques et privées.

Les divers types de molécules développées et utilisées pour traiter le paludisme sont brièvement présentés ci-dessous selon leur mode ou site d'action [68].

### 1) Composés interférant dans la détoxification de l'hème :

Lors de son cycle intra-érythrocytaire, le parasite importe les nutriments dont il a besoin pour son développement via le cytoplasme du globule rouge ; ceux-ci incluent également l'hémoglobine qui est dégradée pour libérer les acides aminés essentiels au plasmodium. La ferriprotoporphyrine IX qui est un produit de cette dégradation est un hème oxydé toxique pour le parasite. Pour assurer sa survie, le plasmodium a développé un mécanisme de détoxification qui polymérise l'hème en hémozoïne (cristaux jaunes). Le groupe des **quinolines**, en pénétrant dans la vacuole digestive certainement à l'aide de transporteurs, empêche la détoxification entraînant la mort du parasite. Le mode d'action encore incertain est probablement lié à leur caractère de base faible qui augmenterait le pH acide de la vacuole digestive. Les quinolines inhiberaient l'action de protéases acides ou elles agiraient comme inhibiteur compétitif de protéines impliquées dans la détoxification de l'hème ou/et dans le transport de macromolécules. Elles agissent comme schizonticides.

Les quinolines étaient, pendant tout le 20<sup>e</sup> siècle, les plus utilisées dans le traitement du paludisme, elles sont subdivisées en trois classes, mais uniquement deux d'entre elles exercent leur action dans la vacuole digestive du plasmodium : la classe des **4-aminoquinolines** avec la chloroquine, l'amodiaquine, la pyronaridine, et la classe des **aryl-amino alcools** comprenant la quinine, la quinidine, la méfloquine, l'halofantrine, ou la luméfántrine. La 3<sup>e</sup> classe, représentée par la primaquine, est décrite dans le paragraphe suivant.



## 2) Composés interférant dans la synthèse d'acides nucléiques :

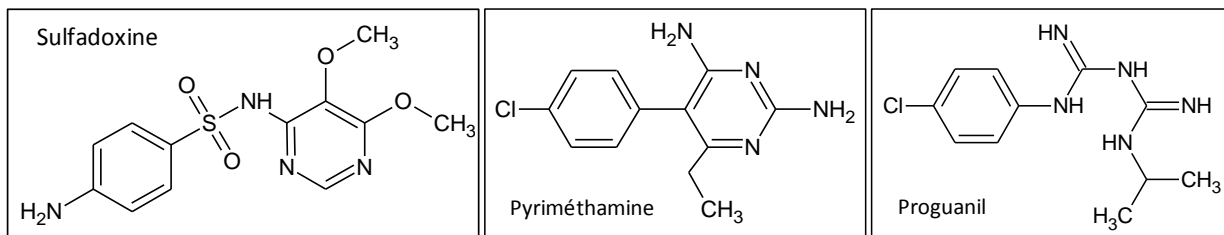
### Dans le noyau

Lors de la division cellulaire par schizogonie que ce soit au stade hépatique ou intra-érythrocytaire, le noyau subit plusieurs mitoses entraînant ainsi la multiplication du parasite. Contrairement à l'homme, le parasite synthétise lui-même l'acide folique (vitamine B9) précurseur de bases constituantes de l'ADN. Diverses enzymes sont impliquées dans ce mécanisme et sont les cibles des antimalariques de type **antifolates**. Les antifolates (antifoliques et antifoliniques) sont schizonticides (stade hépatique et érythrocytaire).

Les **antifoliques** que sont les sulfones et sulfonamides comme la sulfadoxine, synthétisés au départ pour leurs propriétés antibactériennes, agissent en tant qu'analogue compétitif du PABA (acide para-amino-benzoïque) nécessaire à la synthèse de l'acide folique.

Les **antifoliniques** comme la pyriméthamine (une diaminopyrimidine) et le proguanil (un biguanide, prodrogue transformée par le cytochrome P450) inhibent la dihydrofolate reductase, enzyme indispensable à la formation du précurseur des bases pyrimidiques de l'ADN à partir d'acide folique.

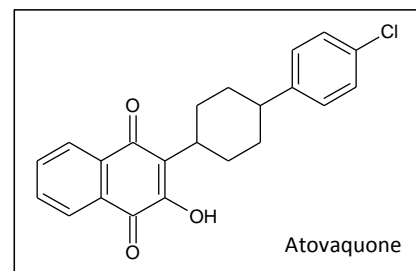
Ces deux groupes de molécules aboutissent à une diminution de production d'acide tétrahydrofolique et donc à une altération de la synthèse des pyrimidines et des acides aminés. L'association sulfadoxine/pyriméthamine est souvent rencontrée sur le marché.



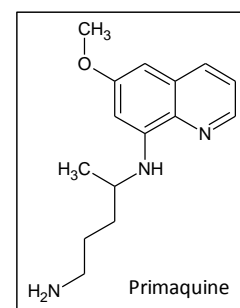
### Dans les mitochondries

Deux antipaludiques sont des inhibiteurs d'enzymes intervenant au niveau de la chaîne de transfert des électrons qui participe à la biosynthèse des pyrimidines.

**L'atovaquone**, une naphthoquinone analogue du coenzyme Q (ubiquinone), inhibe la dihydro-orotate réductase qui a pour rôle de transférer un électron à l'ubiquinone qui le passe ensuite au cytochrome bc1. L'atovaquone produit un effet synergique quand elle est utilisée en combinaison avec le proguanil (Malarone®) [183]. Seule, sa dose doit être trop élevée pour être efficace et donc elle devient toxique. De plus, la résistance du parasite se développe très rapidement.

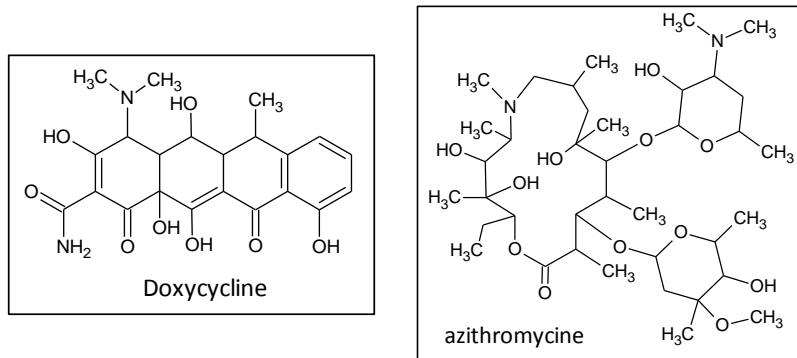


**La primaquine** est la représentante principale de la 3<sup>e</sup> classe des quinolines, les 8-aminoquinolines, mais son site d'action serait au niveau des mitochondries bien que son mode d'action précis ne soit pas encore élucidé. L'avantage de cette molécule est qu'elle agit sur les gamétocytes, ce qui permet d'interrompre la transmission de l'infection au moustique, et sur les hypnozoïtes, ce qui prévient les rechutes causées par *P. vivax* et *P. ovale*.



### 3) Composés interférant dans la synthèse protéique

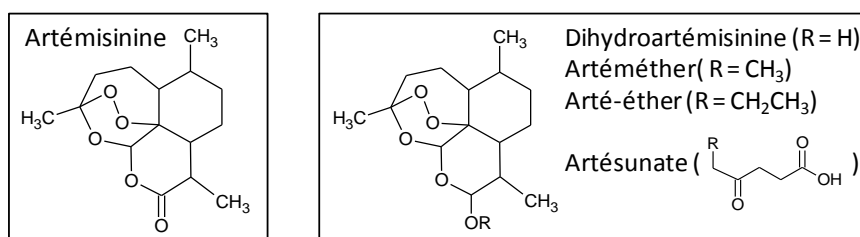
Les antibiotiques tels que les tétracyclines (doxycycline) se fixant à la sous-unité 30S et les macrolides (azithromycine) se fixant à la sous-unité 50S des ribosomes procaryotiques, sont des inhibiteurs de la synthèse protéique des procaryotes. Le site d'action chez le protozoaire (eucaryote) n'est pas encore certain, mais il semblerait qu'ils agiraient soit dans les mitochondries soit dans l'apicoplaste, organelle spécifique aux apicomplexes qui aurait une origine cyanobactérienne [57]. Toutefois, ces antibiotiques sont efficaces contre tous les stades du plasmodium.



### 4) Composés induisant un stress oxydatif

Le groupe des lactones sesquiterpéniques, artémisinine et ses dérivés hémisynthétiques tels qu'artémether, artésunate, dihydroartémisinine, ont une courte durée de vie dans l'organisme. Deux hypothèses existent quant à leur mode d'action, dont la première interviendrait dans la vacuole digestive. Ces composés auraient la capacité de générer des radicaux libres par le clivage du pont endopéroxyde qui alkylerait ou oxyderait des protéines ou lipides cruciaux au plasmodium. Ce clivage serait activé par la présence de fer provenant de l'hème et produirait un intermédiaire Fe-oxo puis un époxyde qui est un agent alkylant très actif.

La deuxième hypothèse de mode d'action est l'inhibition de la  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase plasmodiale, PfATP6, protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique qui est chargée de l'homéostasie ionique et de la génération de gradients électrochimiques qui fournissent l'énergie nécessaire aux processus vitaux. Les *plasmodia* résistant à l'artémisinine ont des mutations dans le gène codant pour PfATP6. Quoiqu'il en soit, ces composés sont efficaces sur tous les stades du cycle intraérythrocytaire et sur les jeunes gamétocytes.



La figure I.5. résume les principaux sites d'action des médicaments antipaludiques au sein du Plasmodium en stade intra-érythrocytaire. Encore aucun médicament n'est actif sur les sporozoïtes sanguins.

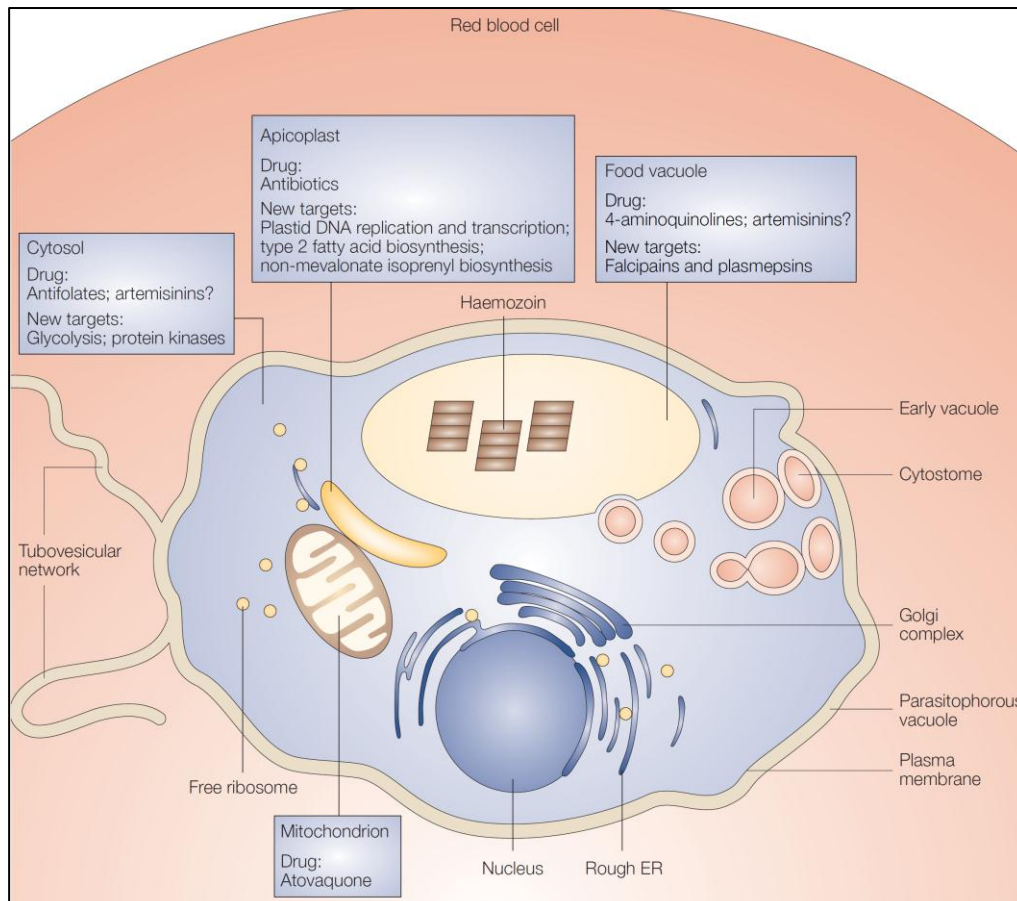


Figure I.5 : Structure générale du plasmodium intra-érythrocytaire et les principales cibles médicamenteuses. *Source Fidock et al. [57].*

Le choix d'utilisation d'un antimalarique dépend de l'espèce de *Plasmodium*, des résistances décrites dans la région où sévit la maladie, du plan de lutte mis en place dans le pays, et de son utilisation en prophylaxie ou en traitement.

### I.1.D. Résistances

Chaque être vivant développe au cours de son évolution des mécanismes permettant sa survie. Ainsi chaque « acteur » du paludisme, en contact avec des agents voulant lui nuire, a développé des mécanismes de résistances.

#### I.1.D.1. *Homo sapiens*

**Facteurs génétiques :** l'homme côtoyant le plasmodium depuis bien longtemps a subi des mutations géniques lui permettant de se protéger du parasite. En général, les troubles liés aux globules rouges offrent une protection contre la malaria. Par exemple, les hémoglobulines anormales telles que HbF, déficientes d'une des quatre chaînes protéiques la constituant et provoquant des anémies qui sont héréditaires (thalassémies) ou telles que HbS, portant une mutation sur la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine (allèle S) provoquant de l'anémie à cellules falciformes (drépanocytose ou sicklémie), perturbent la schizogonie et diminuent donc la virulence du parasite. D'autres maladies

génétiques comme la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD) (nombreuses mutations possibles) troublent le développement du parasite [34]. Ces maladies sont présentes surtout en Afrique et en Asie, lieu endémique du paludisme depuis la nuit des temps.

Les érythrocytes n'exprimant pas le gène codant pour la glycoprotéine Duffy (récepteur de signaux sécrétés lors d'une inflammation, mais aussi récepteur (antigène) spécifique de *P. vivax*) sont résistants à l'invasion parasitaire [196].

**Facteurs immunologiques :** Le système immunitaire, qu'il soit inné (leucocytes phagocytaires, réaction inflammatoire) ou adaptatif (lymphocytes T et B cellules NK), joue un rôle dans l'élimination du parasite. La réponse adaptative a beaucoup plus été étudiée suite à l'observation que certains êtres humains vivant dans les zones endémiques et ayant subi plusieurs attaques paludiques ont développé une semi-immunité contre le plasmodium. Ces personnes ne souffrent généralement pas des accès sévères de la maladie.

Plusieurs protéines antigéniques ont pu être isolées du Plasmodium. Il s'est avéré que le parasite pour s'adapter aux différentes cellules qu'il envahit au cours de son cycle de vie a développé de nombreux types d'antigènes différents, spécifiques à chaque stade (grand polymorphisme antigénique). Il apparaît que seuls les antigènes de surface induisent une immunité protectrice chez l'homme. La réponse immune freine la multiplication de parasites : les anticorps (liés aux antigènes du parasite) facilitent la phagocytose des macrophages. Les lymphocytes jouent un rôle sur le stade hépatique [89, 196].

L'idée de développer un vaccin comme moyen de prévention pourrait donc réduire les cas de mortalité. Cependant, malgré plusieurs essais, aucun vaccin antimalarique n'a montré une efficacité satisfaisante. Pour le moment, un vaccin (développé par GlaxoSmithKline) est en essai clinique de phase III, les résultats sont attendus pour fin 2012. Les résultats en phase II ont montré une protection de ~ 30 % sur les cas non sévères et ~ 50 % sur les cas de malaria sévères [34]. Le développement d'un vaccin contre la malaria semble bien complexe et ne protège que trop peu de personnes.

Un autre type d'immunité empêche également les accès graves du paludisme, il s'agit de l'immunité congénitale qui est la transmission d'immunoglobulines maternelles (IgG) à l'enfant par passage transplacentaire. Elle protège le bébé durant ses 6 premiers mois, mais si son immunité adaptative ne prend pas le relais, il devient vulnérable à la malaria et risque de mourir [89].

### I.1.D.2. *Anopheles sp.*

Il a récemment été démontré qu'au sein d'une espèce d'anophèle vectrice, il existe des souches qui résistent à l'infection du parasite. La réponse immunitaire de cette souche encapsule et tue le plasmodium ayant envahi l'estomac de l'anophèle. Les mécanismes génétiques de cette souche réfractaire sont en cours d'étude [34].

Depuis l'utilisation d'insecticides pour combattre la malaria, les moustiques ont eux aussi développé des mécanismes de résistance. La tendance actuelle n'est plus



d'éradiquer les moustiques nuisibles, mais plutôt de réduire et de contrôler leur densité en dessous d'un seuil épidémiologique tolérable pour limiter l'usage abusif des pesticides polluants [148].

### I.1.D.3. *Plasmodium sp.*

Suite à la réaction immunitaire de son hôte vertébré, le parasite a développé des mécanismes moléculaires pour déjouer la réponse de l'hôte (polymorphisme de protéines, compétition entre réponses innée et adaptative). Ainsi il a été démontré que la multiplication schizogonique entraîne la sécrétion de cytokines ayant des effets pyrogènes. Lors de l'éclatement du schizonte, ces cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF, sont libérées dans le sang et engendrent, par activation d'autres médiateurs, différentes pathologies telles que l'adhérence des cellules endothéliales (spécifique de *P. falciparum*) pouvant provoquer la malaria cérébrale, l'hyperactivité du système réticulo-endothélial aboutissant à une érythrophagocytose (de globules rouges parasités et non parasités, mais présentant aussi des immunoglobulines) et un hypersplénisme provoquant l'anémie, ou l'inhibition de cellules érythroïdes progénitrices dans la moelle diminuant la production de réticulocytes [117].

La réponse pro-inflammatoire pathologique reste encore peu connue et est difficile à étudier notamment par le manque de modèle animal adéquat (les souris ne manifestent pas de fièvre, mais souffrent plutôt d'une hypothermie) et parce qu'elle est systémique (de nombreux facteurs entrent en jeu)[89].

#### **Résistance aux antimalariques [56, 198]:**

De plus, le *Plasmodium* menacé par des substances pures s'est protégé par des mutations chromosomiques ponctuelles sur les gènes codant pour les cibles des antipaludiques, le rendant alors moins sensible aux antimalariques. Le premier cas de résistance à un antipaludique a été décrit en 1957 à la frontière thai-cambodgienne et visait la chloroquine, molécule la plus utilisée à l'époque. Peu de temps après, cette même résistance de *P. falciparum* a été rapportée en Amérique latine (Colombie, Vénézuéla) et dans les années 70 au Kenya. La résistance s'est rapidement propagée géographiquement et à d'autres quinolines. Actuellement, *P. falciparum* a développé des résistances à tous les antimalariques du marché, le dernier cas étant celui de l'artémisinine, apparu en 2008 à la frontière thai-cambodgienne [142]. Parmi les autres espèces, seule *P. vivax* semble avoir également développé des résistances à certains antimalariques.

Depuis le séquençage complet du génome de *Plasmodium falciparum*, certains gènes mutés ont été identifiés par les scientifiques :

La résistance à la chloroquine a déjà été beaucoup étudiée, pour comprendre le mécanisme appliqué aussi aux autres 4-aminoquinolines. Il semble que cette résistance soit due en partie à une mutation (sur le codon T76) d'un gène codant pour un transporteur transmembranaire, *pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine résistance transporter), situé dans la membrane de la vacuole digestive. Certains chercheurs pensent que cette mutation est un prérequis, mais n'est pas l'unique cause de la résistance ; il semble que le gène *pfmdr1* codant pour une P-glycoprotéine, qui expulse les composés toxiques hors des cellules, aurait également un rôle modulateur à jouer dans la résistance à la chloroquine.

Le gène *pfmdr1* semble être impliqué dans différentes résistances (multidrogues résistant) comme celle des amino-alcools et des lactones sesquiterpéniques. Dans la région thai-cambodgienne, les associations artémether/lumefantrine ou artésunate/méfloquine montrant une faible réponse sur certains parasites ont été corrélées à une augmentation du nombre de copies de ce gène muté. Il semble que la résistance à la quinine soit également due à une mutation sur le gène *Pfnhe-1* codant pour une pompe à protons  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Plusieurs protéines transmembranaires sont donc impliquées dans le mode d'action des amino-alcools.

La résistance à la pyriméthamine (antifolinique) est liée à plusieurs mutations ponctuelles sur le gène *Pfdhfr* codant pour la dihydrofolate réductase (la résistance augmente avec le nombre de mutations). Il semble que pour pallier la réduction d'activité de l'enzyme, *P. falciparum* surexprime le gène *gch1* codant pour la GTP-cyclohydrolase I également impliquée dans la biosynthèse des folates. Par contre la résistance à la sulfadoxine (antifolique) a été associée à 5 mutations sur le gène *Pfdhps* codant pour la dihydroptéroate synthase.

La résistance de l'atovaquone est due à une mutation (sur le codon 268) du gène *pfcytb* codant pour le cytochrome b des mitochondries, faisant augmenter de 1000 fois la  $\text{CI}_{50}$  de l'atovaquone.

En attendant que de nouveaux antipaludiques soient découverts, les scientifiques ont montré qu'il y a possibilité de rétablir la sensibilité aux antipaludiques actuels en détournant le mécanisme de résistance. Par exemple dans les cas des quinolines, on peut les associer à des composés permettant leur entrée dans la vacuole digestive comme le vérapamil, un antagoniste calcique. De nombreux essais *in vitro* et/ou *in vivo* inversant la résistance ont déjà été publiés [70, 137, 171].

De plus, pour ralentir le phénomène de résistance, l'OMS recommande d'utiliser des combinaisons médicamenteuses avec l'artémisinine (ACT) telle que l'artémether et la luméfantine, l'artésunate et l'amodiaquine, l'artésunate et la méfloquine, l'artésunate et la sulfadoxine-pyriméthamine (voir Treatment Guideline de l'OMS) et d'éviter l'utilisation monothérapeutique ciblant un seul site d'action.

### **I.1.E. Le paludisme dans les Mascareignes [104, 127, 151]**

L'historique du paludisme dans l'archipel des Mascareignes va de pair avec la colonisation des îles et la navigation maritime. Les îles Maurice, Rodrigues et la Réunion étaient inhabitées à l'origine. Le 17<sup>e</sup> siècle, siècle de création des Compagnies des Indes Orientales européennes, apporta les premiers hommes sur ces îles qui se situaient sur le chemin du retour de la Route des Indes. L'île Maurice et l'île de la Réunion étaient un lieu d'escale privilégié entre les côtes de Malabar en Inde et l'Afrique. Les maladies les plus répandues au sein des navigateurs étaient le scorbut et la malaria. Les malades séjournaient donc sur les îles de l'archipel pendant leur convalescence. L'installation d'une population sur les îles débuta réellement à la fin du 17<sup>e</sup> siècle. Des cas isolés de malaria, nommée à l'époque « fièvre intermittente », étaient sporadiquement décrits sur les deux îles. Ce n'est que bien plus tard que de graves épidémies de paludisme touchèrent d'abord l'île Maurice (entre 1866 et 1867), puis l'île de la Réunion (entre

1868 et 1869) et causèrent 25 à 33 % des décès annuels. L'île Rodrigues, plus éloignée, resta indemne à cette affection. La thérapie utilisée employait déjà la quinine. Le quinquina fut introduit sur l'île de la Réunion à partir de 1867 et des pilules d'écorce étaient distribuées aux pauvres.

On peut se demander pourquoi autant de temps s'écoula pour le développement de cette maladie. La cause est évidemment liée au cycle de vie du parasite. Le Plasmodium a besoin comme nous l'avons vu de l'homme, mais également de moustiques anophèles qui n'étaient pas présents à l'origine sur les îles. Au temps des bateaux à voiles, la durée du voyage entre les escales durait plusieurs semaines et les moustiques provenant d'Afrique ou d'Inde et ayant une durée de vie de 10 à 21 jours, mourraient en pleine mer. Ce n'est qu'à partir de l'utilisation des bateaux à vapeur (à partir de 1850), beaucoup plus rapides, que les moustiques ont pu survivre au voyage et se sont acclimatés sur les îles.

L'endémie restant élevée au 20<sup>e</sup> siècle, un programme de lutte contre la malaria débuta en 1914. La quinine était utilisée en traitement et en prophylaxie, et des moustiquaires étaient distribuées dans chaque demeure. Dans les années 40, le paludisme était encore la première cause de mortalité à la Réunion (~ 40 %). Un autre moyen de lutte fut alors introduit en 1949 : des pulvérisations intra-domiciliaires obligatoires de DDT. Comme les campagnes de pulvérisation ne se sont pas déroulées simultanément dans toutes les régions de l'île, il a fallu plusieurs années pour éliminer le paludisme. La surveillance épidémiologique a permis de déclarer officiellement l'éradication du paludisme à Maurice en 1973. Le comité d'experts de l'OMS décerna le label d'éradication à la Réunion en 1979. Depuis, des cas importés surviennent de temps en temps, mais la maladie est bien contrôlée.

### I.1.F. Le paludisme au Cambodge

Le Cambodge a toujours été la cible du paludisme. Même si des programmes de contrôle et d'éradication existent, le nombre recensé de cas de malaria ne diminue pas au cours du temps. Les chiffres des 10 dernières années (fig. I.6.) montrent plutôt une évolution en dents de scie, qui peut être expliquée par divers facteurs comme des changements climatiques (variations périodiques des précipitations), des migrations de populations suite aux guerres ou aux changements d'activités forestières ou rizicoles, et une mauvaise utilisation des antimalariques.

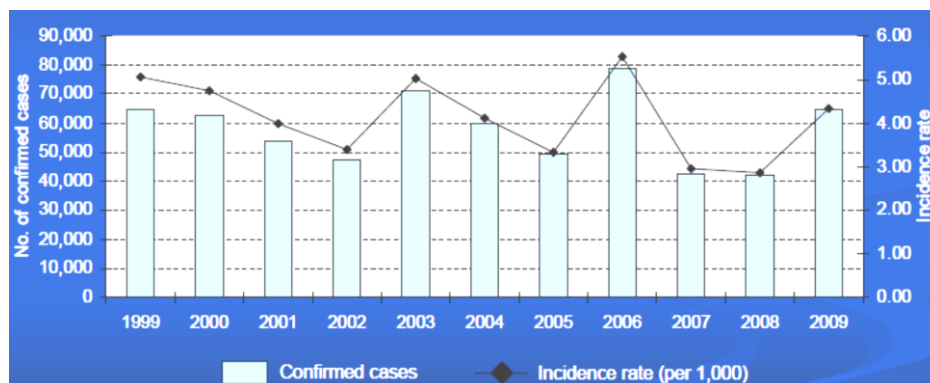


Figure I.6 : Taux d'incidence de la malaria au Cambodge entre 1999 et 2009. Source : WHO 2011.





Figure I.8 : Carte des provinces du Cambodge.

### Traitement et résistance [197]

Le Cambodge est, avec la Thaïlande, le pays qui enregistre le taux de pharmacorésistance le plus élevé du monde. A cause de la multirésistance, les politiques nationales ont dû changer leur traitement de nombreuses fois. Actuellement, la combinaison artésunate/méfloquine est utilisée en premier lieu. Dans la province de Pailin, où plus de 10 % d'échecs ont été enregistrés, le traitement de remplacement est la combinaison dihydroartémisinine/pipéraquine (une bisquinoline). Le taux élevé de résistance est en grande partie expliqué par l'utilisation de médicaments contrefaits et à l'interruption des traitements, car le coût des médicaments délivrés par le secteur public est beaucoup trop élevé pour la population. Dès lors, la plupart des patients (80 %) se tournent vers le secteur privé qui est souvent plus accessible (situé dans tous les villages), mais où aucun contrôle de qualité n'est réalisé. Des médicaments périmés ou sous-dosés sont distribués, les patients sont souvent mal conseillés, ou le diagnostic n'est pas assez rapide. Les patients se tournent également vers leur médecine traditionnelle utilisant la phytothérapie.

## I.2. LA DEMARCHE ETHNOPHARMACOLOGIQUE

La capacité du parasite à s'adapter aux molécules le tuant incite la recherche à continuellement développer de nouveaux médicaments antipaludiques.

Newman et Cragg [140] signalent que parmi les nouveaux médicaments mis sur le marché entre 1981 et 2006 toutes maladies confondues, 50 % des petites molécules sont naturelles ou d'origine naturelle. Et en ce qui concerne les médicaments antiparasitaires, seuls 4 sur 14 proviennent de synthèse totale (tableau I.1).

generic name	trade name	year introduced	reference	page	source
artemisinin	Artemisin	1987	ARMC 23	327	N
ivermectin	Mectizan	1987	ARMC 23	336	N
arteether	Artemotil	2000	DNP 14	22	ND
artemether	Artemetheri	1987	I 090712		ND
artenusate	Arinate	1987	I 091299		ND
eflornithine HCl	Ornidyl	1990	DNP 04	104	ND
mefloquine HCl	Fansimef	1985	ARMC 21	329	ND
albendazole	Eskazole	1982	I 129625		S
halofantrine	Halfan	1988	ARMC 24	304	S
lumefantrine	no trade name	1987	I 269095		S
quinfamide	Amenox	1984	ARMC 20	322	S
atovaquone	Mepron	1992	ARMC 28	326	S*
bulaquine/chloroquine	Aablaquin	2000	DNP 14	22	S*
trichomonas vaccine	Gynatren	1986	I 125543		V

Tableau I.1: Médicaments antiparasitaires développés entre 1981 et 2006. ARMC : Annual Report in Medicinal Chemistry ; DNP : Drug News and Perspective ; I : Prous Integrity database ; N : produit naturel ; ND : dérivés de produits naturels ; S : synthèse totale ; S\* : synthèse totale, mais le pharmacophore est inspiré de produits naturels ; V : vaccin. Source Newman et cragg [140].

Ceci indique que les ressources naturelles restent une source importante de médicaments surtout quand on sait que sur les ~ 270 000 plantes recensées, seules 10 % ont été examinées phytochimiquement. Plusieurs méthodes sont utilisées pour repérer de nouvelles molécules actives parmi les milliards de composés se trouvant dans la nature. Les industriels du monde capitaliste fonctionnant plutôt dans l'optique « le temps c'est de l'argent » et « le profit avant tout » préfèrent la technique du « medium or highthroughput screening » (criblage à moyen ou haut débit) qui consiste à passer au crible de tests pharmacologiques jusqu'à 10 000 molécules par jour. Les composés testés sur des cibles pharmacologiques particulières proviennent de librairies créées au moyen de la chimie combinatoire ou par protéogénomique. Mais la chimie de synthèse est limitée dans la diversité structurale tandis que la nature en regorge.

Dans la recherche universitaire qui mise plutôt ses intérêts sur le développement et l'apprentissage de la connaissance, la méthode utilisée dans le domaine de la pharmacognosie est généralement la démarche ethnopharmacologique qui fait appel à l'histoire de l'humanité et donc combine le culturel et le scientifique. De tout temps, l'homme a utilisé son environnement pour survivre. Ainsi les plantes étaient utilisées à des fins alimentaires, mais également pour se soigner. Dans l'idée qu'il y a une raison biologique pour que l'utilisation des plantes à des fins médicales ait perduré pendant des générations et des générations, la chance de trouver de nouveaux principes actifs par le biais de l'ethnopharmacologie est plus grande que par le fruit du hasard.

## I.2.A. L'ethnopharmacologie

Le terme ethnopharmacologie provient de deux mots grecs « ethnos » et « pharmakon » qui signifient respectivement « peuple » et « remède ». Ainsi l'ethnopharmacologie selon son étymologie consiste en l'étude des remèdes ancestraux dans les différentes sociétés. Si nous voulons une définition plus précise de l'ethnopharmacologie, tournons-nous vers celle donnée par Dos Santos et Fleurentin en 1990 : c'est « l'étude scientifique interdisciplinaire de l'ensemble des matières d'origine végétale, animale ou minérale, et des savoirs ou des pratiques s'y rattachant, que les cultures vernaculaires mettent en œuvre pour modifier les états des organismes vivants, à des fins thérapeutiques,

curatives, préventives, ou diagnostiques » [48]. Cette discipline allie donc deux domaines *a priori* éloignés, les sciences humaines et les sciences de la vie.

Bien que cette discipline soit exercée depuis des centaines d'années (exemple du quinquina décrit au point I.1.C.), le terme ethnopharmacologie n'a été proposé dans le monde scientifique que depuis seulement une trentaine d'années, indirectement suite à une conférence organisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette organisation prône que la santé est un droit fondamental de l'être humain, mais que des inégalités frappantes en matière de résultats sanitaires, d'accès aux soins et de coûts des soins existent surtout en défaveur des pays en développement. En 1978, l'OMS organise une conférence sur les soins de santé primaires où la déclaration d'Alma-Ata a été rédigée. Cette déclaration définit clairement les recommandations pour développer et mettre en œuvre les soins de santé primaires dans le monde entier et en particulier dans les sociétés plus pauvres. Elle est en faveur de l'étude des médecines traditionnelles : « les états membres doivent intégrer dans leurs politiques pharmaceutiques nationales les médicaments traditionnels qui ont fait preuve d'efficacité et doivent élaborer un cadre réglementaire spécifique. Pour cela, il est recommandé de mettre en place des programmes pour l'étude des médecines traditionnelles et pour le recensement, la préparation, la culture et la conservation des plantes médicinales. Il est aussi implicitement recommandé d'associer les tradipraticiens aux soins de santé primaire » [59].

Ces recommandations comprennent les trois objectifs principaux de l'ethnopharmacologie qui consistent en :

- L'évaluation et le recensement des remèdes et des soins des pratiques traditionnelles.
- La validation et l'intégration de la médecine traditionnelle dans les systèmes de santé dans les pays en voie de développement.
- Le développement éventuel d'une pharmacopée traditionnelle à partir de l'inventaire des plantes médicinales et des produits d'origine naturelle.

Comme pour toute science, une méthodologie a été développée et les compétences requises à la démarche ethnopharmacologique ont été bien définies. Ainsi, cette démarche résumée dans la figure I.9. peut être divisée en trois grandes étapes :

- 1) **Un travail de terrain** consistant à comprendre le fonctionnement du système de santé traditionnel en le replaçant dans son contexte socioculturel, et à recenser et récolter les matières premières utilisées pour soigner.
- 2) **Un travail de laboratoire** mettant en œuvre la recherche d'une activité biologique qui validerait l'efficacité thérapeutique des remèdes traditionnels.
- 3) **Un retour de l'information** sur le terrain par la diffusion des travaux accomplis et leur valorisation dans le cadre d'un programme de développement de médicaments traditionnels.

Ainsi diverses disciplines entrent en jeu :

**L'ethnologie** : surtout les domaines de l'anthropologie médicale (étudiant les représentations et les expressions de la maladie, les différents moyens mis en œuvre pour la traiter et les rapports entre thérapeutes et malades en fonction de la culture de

la société étudiée), l'ethnobotanique (étude du rapport entre les végétaux et la société) et l'anthropologie des religions (qui tente d'expliquer les faits religieux de la société).

Elle a un rôle majeur en amont et en aval de la recherche ethnopharmacologique. Elle essaie dans un premier temps de comprendre les conceptions vernaculaires de la santé, de la maladie et des remèdes. En effet, les termes santé et maladie, pour les populations étudiées, n'ont pas forcément le même sens que celui donné par les médecins occidentaux. L'ethnologue permet au pharmacologue d'éviter les contresens en remplaçant l'usage thérapeutique dans son contexte socioculturel. Finalement, pour le retour des informations vers le terrain, il aide au dialogue, à la diffusion de certains résultats vers les sociétés qui ont fourni les informations de départ. En effet, l'intégration des nouvelles propositions dans les contextes sociaux et culturels, la justesse des moyens et du langage utilisés, dépendront d'une grande part, de la bonne connaissance des sociétés concernées. Car chaque société construit son système de pensée sur base de son histoire, de ses croyances et de sa logique. Pour échanger des informations, il est nécessaire de faire abstraction de nos représentations, de ce que notre société nous a inculqué (J.P. Nicolas *in* [58]).

**L'histoire et la linguistique** : utiles lorsque les informations récoltées sont des documents historiques par exemple pour la médecine chinoise ou la médecine arabo-persane. Les historiens et linguistes peuvent alors interpréter des textes anciens, savoir les replacer dans leur époque et ainsi éviter tout anachronisme.

**La botanique** : permet l'identification précise des végétaux composant les remèdes vernaculaires nommés par les tradipraticiens. Le botaniste fait le lien entre le nom vernaculaire qui peut varier d'une ethnie à l'autre et le nom latin utilisé par tous dans le monde scientifique. Il évite ainsi qu'une plante ne soit confondue avec une autre lors de son étude au laboratoire. Il élabore également un herbier afin d'inventorier les végétaux utilisés et permettre l'éventuelle création d'une pharmacopée locale. Il veille également à préserver la biodiversité par une étude phytogéographique de la région étudiée.

**La phytochimie et la pharmacologie** : ces disciplines, regroupées dans le domaine de la pharmacognosie, interviennent au niveau de la recherche en laboratoire. Le phytochimiste étudie la composition chimique de la drogue (mise en évidence des composés majoritaires, détermination de l'empreinte chimique de la drogue), il essaie de purifier le(s) principe(s) actif(s) et de déterminer la structure chimique des molécules isolées. Le pharmacologue évalue l'impact des composants du remède à l'aide de tests pharmacologiques *in vitro* et *in vivo*, tant au point de vue de l'activité que de la toxicité. Il participe également à l'étude du mode d'action des molécules actives, de l'influence de la dose ou du mode de préparation, à l'élaboration d'études cliniques et à la mise au point de médicaments traditionnels améliorés (MTA).

**La santé publique** : les professionnels de santé, ainsi que les ethnologues, ont un rôle à jouer dans la première et la dernière étape de la démarche ethnopharmacologique. Ils participent à la connaissance de l'état sanitaire des populations par un recensement des maladies les plus courantes, ils étudient les disponibilités locales en matière de santé, et participent à l'évaluation clinique. Ils adhèrent également à la recherche ethnopharmacologique lors de la valorisation de la médecine traditionnelle sur le terrain. Ils peuvent en effet contrôler la fabrication et l'utilisation des MTA, créer des



dispensaires, former des agents de santé locaux, ou mettre en place une pharmacopée locale.

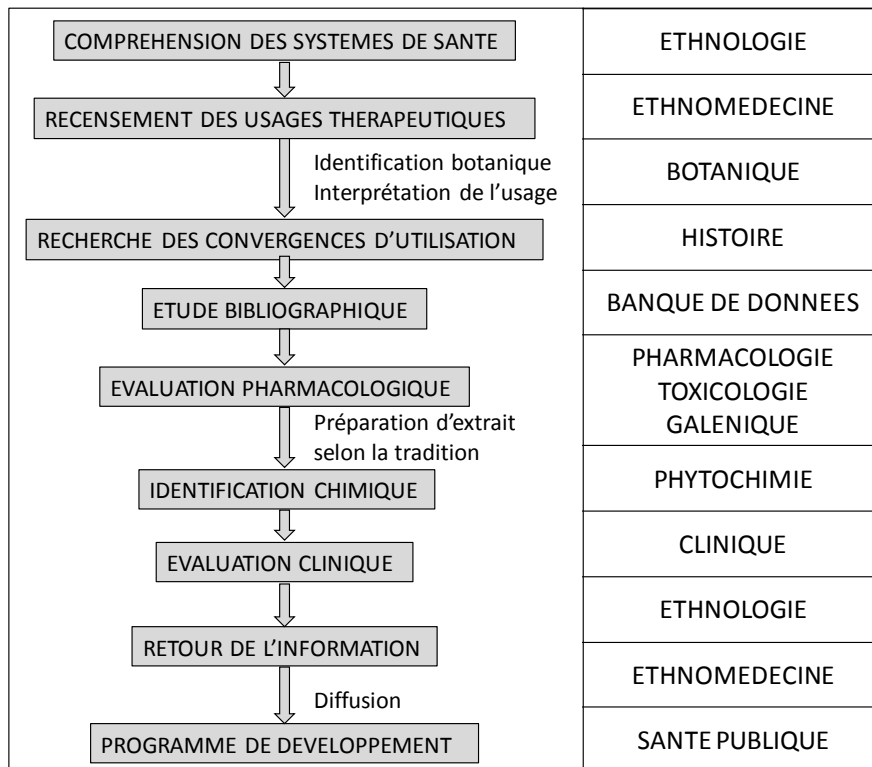


Figure I.9 : Les différentes spécialités requises dans la recherche ethnopharmacologique. *Source : J. Fleurentin in [58].*

Enfin, l'ethnopharmacologie participe à la mondialisation en permettant de concilier les sociétés rurales traditionnelles, chez qui l'utilisation des plantes médicinales est le premier recours aux soins de santé, et les sociétés industrielles qui portent l'intérêt des plantes médicinales principalement sur la découverte de nouveaux médicaments ou de nouveaux outils pharmacologiques suivant des règles scientifiques et économiques. Son objectif est de justifier par des méthodes scientifiques l'utilisation des médicaments traditionnels et de découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques. Par le respect qu'elle observe face aux divers systèmes de pensée existant sur terre, elle valorise la diversité culturelle. Elle met en évidence l'importance de la nature pour l'humanité et de ce sens, elle permet de maintenir la biodiversité dans les biotopes fragilisés par la pression démographique.

## I.2.B. La méthodologie

**Le travail de terrain (les enquêtes ethnobotaniques)** (J. Fleurentin, C. Haxaire, J.P. Nicolas *in* [58])

La première étape de la démarche ethnopharmacologique est d'enquêter sur le terrain afin de recenser les utilisations thérapeutiques que les agents de santé traditionnels font des plantes à leur disposition. Pour comprendre la conception vernaculaire du remède et du médicament, il est important d'étudier les systèmes de pensées traditionnels en

matière de santé (ethnomédecine). C'est pourquoi les informations recueillies dans les enquêtes ethnobotaniques ne doivent à ce stade ni être triées ni être interprétées ; elles doivent être complètes et précises afin de connaître la manière dont la société pense la santé et la maladie. Dans un climat de confiance et de respect, les agents de santé locaux (tradipraticiens) peuvent transmettre leur savoir et leurs croyances. Bien souvent, les sociétés traditionnelles ont un concept de la maladie lié au spirituel. Les informations transcrites contiendront les symptômes ressentis décrits selon le concept local, les modes de préparations des remèdes incluant toutes les associations minérales, végétales ou animales, les modes d'administration, les doses et la durée du traitement, mais aussi les pratiques magico-religieuses puisque l'objectif premier de ces enquêtes est de mettre par écrit le savoir traditionnel oral qui disparaît peu à peu.

Dans une seconde étape, l'ethnologue en compagnie du botaniste et du pharmacologue, pourront trier et interpréter les informations pour les traduire en langage scientifique. Ils classeront les informations selon leurs caractères anthropologiques et celles identifiant la matière médicale. Ils choisiront parmi toutes les informations, celles qui méritent de donner lieu à des études pharmacologiques.

Lors de la récolte du végétal en compagnie du tradipraticien, de nombreux détails doivent être notés : la période, le lieu de récolte et le biotope, les rituels s'il y en a, la partie utilisée, si la plante est utilisée sèche ou fraîche, le mode de conservation, le(s) nom(s) vernaculaire(s). Car les scientifiques savent que les composés chimiques ne sont pas répartis équitablement dans tous les organes de la plante (importance de l'organe utilisé), que certains sont fragiles et s'oxydent rapidement (importance du mode de séchage et de conservation), que d'autres sont actifs suites à des biotransformations (cas des prodrogues), la composition chimique d'un végétal peut varier selon la période de l'année (selon le cycle végétatif) et même de la journée, ou selon le biotope (importance du lieu et la période de récolte). Certaines molécules sont extraites préférentiellement en solution acide (utilisation de vinaigre ou de jus de citron) ou basique (utilisation d'argile ou de soude) ou dans des alcools, certaines sont lipophiles (utilisation d'huile de massage) ou volatiles (bains de vapeur, fumigation), certaines sont toxiques par voie orale et ne sont utilisées que par voie externe localisée (cataplasme, pommade). Certains composés peuvent agir en synergie sur diverses cibles pharmacologiques (importance de prendre en compte les associations même si elles sont intégrées dans les pratiques magico-religieuses).

Un herbier devra également être réalisé pour une identification scientifique ultérieure, car il arrive qu'un même nom vernaculaire (utilisé par différentes ethnies) représente des espèces complètement différentes.

### **Le travail de laboratoire** (G. Balansard, F. Mortier *in* [58])

Quel que soit l'objectif de départ, qui est soit de cibler une indication thérapeutique pour les drogues végétales recensées soit d'étudier un végétal pour diverses activités pharmacologiques, des protocoles expérimentaux doivent être déterminés et bien choisis pour tester l'efficacité thérapeutique le plus près possible de la tradition.

Le travail de laboratoire débute par la préparation des extraits végétaux. Un extrait sera préparé selon la méthode traditionnelle en respectant le plus possible l'extrait traditionnel (temps de préparation, ustensile, qualité des solvants). L'idéal serait

d'utiliser la même eau (pH, dureté et pureté équivalente) ou le même solvant pour reproduire exactement ce que fait le tradipraticien. En plus, d'autres extraits seront préparés avec des solvants de polarité croissante pour préfractionner les composés chimiques de la drogue. En effet, bien souvent une drogue est utilisée pour des affections variées, l'extraction par des solvants de polarité distincte permet de cibler lors des tests pharmacologiques le type de classe phytochimique responsable de l'activité mise en évidence. Il sera dès lors possible de définir un effet dominant pour un extrait particulier.

Une fois les extraits préparés, un premier criblage pharmacologique est effectué. Selon l'éthique, les premiers tests à réaliser pour vérifier une activité pharmacologique déterminée seront les tests *in vitro* puisqu'ils évitent de consommer des animaux de laboratoire. Les tests *in vitro* ciblent une activité bien spécifique ce qui permet de trier les extraits potentiellement intéressants pour la suite de l'étude. Cependant, ces tests limitent l'étude pharmacologique puisque les problèmes de biodisponibilité, de métabolisation ou de synergie ne sont pas pris en compte. Il est important de garder cela à l'esprit surtout dans le cas de résultats négatifs avant de conclure à l'inefficacité de la drogue végétale pour une action donnée. Des tests *in vivo* seront envisagés pour confirmer l'activité perçue *in vitro*, surtout si la plante possède une action par voie générale. L'idéal est de tester également l'extrait traditionnel chez l'animal.

Une fois que les extraits les plus actifs sont sélectionnés via le criblage pharmacologique, l'étude phytochimique peut débuter. Cette étude a pour objectif d'isoler les principes actifs de l'extrait. La technique du fractionnement bioguidé permet de cibler les fractions actives jusqu'à isolement du produit actif. Il arrive que l'activité se perde au fur et à mesure du fractionnement. Dans ce cas, l'étude phytochimique permettra de connaître la composition chimique des molécules majoritaires de l'extrait ou de la formulation utilisée en médecine traditionnelle. Elle permettra de découvrir l'empreinte chimique spécifique de la drogue, primordiale pour une standardisation de l'extrait.

Une fois les composés isolés et déterminés, ou les extraits standardisés, des études pharmacologiques plus approfondies sont menées afin de déterminer la toxicité et de quantifier l'effet par des paramètres pharmacocinétique et pharmacodynamique. Ceci en vue d'élaborer des études cliniques pour au final développer le futur médicament.

Des études chimiques plus poussées peuvent également être menées afin de doser le(s) principe(s) actif(s) et d'optimiser le rendement de ces composés en étudiant leur production par la plante selon le stade végétatif et la variation saisonnière, mais aussi en étudiant le procédé d'extraction. Au niveau pharmacologique, la détermination des principes actifs permet de poursuivre l'étude sur les mécanismes d'action. Le principe actif peut également être modifié par chimie de synthèse afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique.

### **Le retour de l'information sur le terrain (J.P. Nicolas, R. Sanogo, B. Weniger *in* [58])**

Dans un souci d'échange et de respect, il est important pour les populations ayant divulgué leurs secrets dans un climat de confiance de recevoir les résultats des études menées au laboratoire. Les études de laboratoire étant longues et laborieuses, l'approche la plus rapide est la publication des premiers résultats dans des journaux scientifiques internationaux. Cela permet de ne pas dupliquer des travaux déjà réalisés

et parfois cela mène à des collaborations qui peuvent compléter plus rapidement les études phytochimiques ou pharmacologiques. L'intérêt principal des sociétés fournissant les informations de terrain est de pouvoir continuer à utiliser leurs plantes pour recourir aux premiers soins. Le développement d'une pharmacopée locale et la mise en place de médicaments traditionnels améliorés (MTA) favorise une sécurité et une standardisation d'utilisation. Ces dernières années ont vu le développement de diverses associations ou organismes nationaux dans plusieurs pays (surtout en Afrique) pour permettre le développement de la médecine traditionnelle.

### 1.2.C. Principes actifs *versus* extraits standardisés (MTA)<sup>[172]</sup>

Dans le cas des antimalariques issus de plantes, il a été démontré que des associations existant au sein de l'extrait d'où ils ont été isolés améliorent l'efficacité thérapeutique.

Ainsi on peut rencontrer des associations :

- de type synergique, incluant des synergies pharmacodynamiques (l'activité des constituants associés est supérieure à la somme des effets de chaque constituant pris isolément) où des composés agissent sur des cibles différentes, mais pour produire un même effet pharmacologique et qui seuls n'auraient qu'un très léger effet thérapeutique ; des synergies pharmacocinétiques où des composés augmenteraient l'adsorption du principe actif (PA) en agissant sur sa perméabilité membranaire ou ralentiraient la métabolisation du PA en agissant sur les enzymes responsables de sa dégradation ou diminueraient l'excrétion en agissant sur des pompes éliminant le PA de la cellule.
- permettant la protection chimique du PA puisque des composés peuvent être labiles dans certaines conditions en laboratoire (température, pH, lumière, solvant, air ambiant) ou dans l'organisme (enzymes, pH).
- des mécanismes d'action complémentaires par exemple l'immunomodulation : il arrive que des composés n'aient aucun effet antiplasmodial, mais agissent en stimulant le système immunitaire. Ces composés pourraient intervenir dans la prophylaxie ou dans d'autres maladies infectieuses également.

Diverses études récentes ont montré que l'utilisation de l'extrait aqueux (ou alcoolique) d'*Artemisia annua* permettait un dosage moins élevé en artémisinine dans l'extrait par rapport à l'usage de la molécule seule (*in vivo* et *in vitro*). L'hypothèse expliquant ce phénomène est la présence de composés phénoliques (surtout des flavonoïdes, mais aussi des acides phénols et des coumarines) qui agiraient à divers niveaux tant sur l'amélioration de l'adsorption de l'artémisinine dans la paroi intestinale, que sur la diminution de sa métabolisation en agissant sur le cytochrome P450 dégradant l'artémisinine (sa durée de  $\frac{1}{2}$  vie serait alors augmentée). Ces composés phénoliques pourraient également inhiber les récepteurs membranaires responsables de la résistance du Plasmodium [172, 203].

L'exemple du quinquina est également parlant [50, 172] : le Quinimax®, une association de quinine (71,4 %), de quinidine (18,6 %) et cinchonine (5 %), est prescrit en cas de résistance à la quinine. Ces alcaloïdes, avec la cinchonidine, sont les composés majoritaires des écorces de *Cinchona sp.* La cinchonine a la capacité d'inhiber la P-

glycoprotéine impliquée dans la résistance multidrogués [182]. De plus, cette association permettrait de diminuer le cinchonisme (effets secondaires des alcaloïdes du quinquina) puisque la dose de chaque constituant du mélange est moins élevée que la dose nécessaire à l'utilisation de la quinine seule pour une même efficacité thérapeutique.

En somme, l'utilisation d'extraits de plantes standardisés apporte de nombreux avantages par la multitude de composés qu'ils contiennent :

- Diminution du dosage du PA par rapport à son utilisation pure
- Réduction des effets toxiques (secondaires)
- Diminution ou retardement d'apparition de résistance
- Moindre coût de production et de distribution
- Amélioration de l'efficacité thérapeutique

Cependant, l'isolement de principe actif (PA) présente également des avantages surtout dans l'étude pharmacologique approfondie.

- Le PA peut servir comme médicament, mais aussi comme outil pharmacologique
- Le PA permet l'étude du mode d'action ou du site d'action pharmacologique
- Son efficacité thérapeutique peut être améliorée par hémisynthèse
- L'isolement de PA permet l'élimination des composés toxiques qui pourraient être présents dans l'extrait. De ce point de vue, la toxicité des plantes peut être également un critère de sélection pour la découverte de nouveaux principes actifs. Dans ce cas, seul un fractionnement bioguidé permettrait d'éliminer les substances toxiques et de découvrir les principes actifs.

Dans le cas de la malaria où l'utilisation de monothérapie a rapidement développé des résistances, contrairement à l'utilisation d'extraits de plantes toujours efficaces même après des millénaires, il serait plus judicieux de prioriser la validation d'usages traditionnels de plantes plutôt que l'isolement de nouveaux principes actifs. De plus, la grande problématique des populations touchées par la malaria est le coût et l'accès à la chimiothérapie ; donc l'urgence réside dans la mise au point de MTA (médicaments traditionnels améliorés) car l'emploi traditionnel permet de raccourcir les études pharmacologiques et cliniques qui peuvent durer des années lors de développement d'un nouveau médicament. Le MTA devra cependant posséder une posologie quantifiée, une efficacité scientifiquement confirmée et des limites de toxicité déterminées.

### **I.3. OBJECTIFS DE LA THESE**

Cette thèse a été menée dans l'optique de participer à la recherche de nouveaux antipaludiques provenant de plantes et d'explorer phytochimiquement et pharmacologiquement les extraits utilisés en médecine traditionnelle.

Durant cette thèse, plusieurs plantes ont pu être étudiées à des degrés divers. La première plante, *Fagraea fragrans* Roxb., étudiée sur le plan phytochimique et antimalarique, est un arbre du Cambodge sélectionné par des enquêtes ethnobotaniques antérieures et par un criblage antiplasmodial réalisés par le Laboratoire de

Pharmacognosie de l'Université de la Méditerranée en coopération pédagogique avec la Faculté de Pharmacie de l'Université de Phnom Penh [91].

Vu les résultats peu prometteurs sur le plan antiplasmodial de cette drogue, et grâce à une nouvelle collaboration créée entre le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège et l'Université de la Réunion, le sujet a été mis de côté pour entreprendre une nouvelle étude. Cette étude consistait en la sélection et en un criblage pharmacologique préliminaire de plantes des Mascareignes dans le but de mettre en évidence des candidats potentiels à des études phytochimiques et pharmacologiques plus poussées.

En parallèle et grâce à la collaboration des Laboratoires de Pharmacognosie de l'Université de la Méditerranée et de l'Université de Liège, une étude délaissée il y a quelques années à la suite d'un accident tragique de la chercheuse, a été reprise [19]. L'équipe de Marseille a pu nous fournir la matière première nécessaire à cette étude : l'écorce de *Strychnos nux-vomica* L. en provenance cette fois du Cambodge. L'arbre, de renommée internationale, surtout pour ses graines, contient en effet des alcaloïdes bisindoliques potentiellement intéressants sur le plan antiplasmodial puisque d'autres alcaloïdes bisindoliques de *Strychnos* avaient déjà prouvé leur efficacité antimalarique.

Ainsi, durant cette thèse, nous avons pu contribuer à l'étude phytochimique et pharmacologique de deux plantes du Cambodge : *Fagraea fragrans* Roxb. et *Strychnos nux-vomica* L. Ces études sont présentées dans la deuxième partie du manuscrit. Par ailleurs, nous avons pu mener une étude préliminaire permettant de sélectionner des plantes des Mascareignes potentiellement intéressantes pour soigner le paludisme. Cette étude est présentée dans la première partie du manuscrit.

# **PARTIE 1 : LES PLANTES DES MASCAREIGNES**





## CHAPITRE II :

### Etude préliminaire de plantes des Mascareignes utilisées dans le traitement de la malaria

---

Mener une étude ethnopharmacologique dans un lieu où le paludisme a été éradiqué peut sembler *a priori* insensé. Cependant, cette localisation a certaines caractéristiques avantageuses :

- 1) L'île de la Réunion étant un département d'outre-mer français, il est plus facile du point de vue administratif d'établir des conventions entre deux universités européennes pour permettre la récolte des végétaux sélectionnés.
- 2) L'île étant située dans l'hémisphère sud, elle possède un terrain similaire à celui rencontré dans les pays touchés par la malaria. Si l'étude aboutit à des drogues actives, il sera plus facile de cultiver les espèces d'intérêt dans les autres pays tropicaux.
- 3) Au niveau de la biodiversité, nous avons vu que l'ethnopharmacologie participe d'une certaine manière à la protection d'espèces végétales. Les Mascareignes étant classés dans les 5 régions les plus riches du globe en biodiversité végétale, il est intéressant de prospecter parmi les espèces endémiques avant leur disparition et dans le but de promouvoir leur maintien.
- 4) Finalement, cette étude souligne l'importance de réaliser des enquêtes ethnopharmacologiques avant que le savoir oral ne disparaisse, même si les informations recueillies ne sont pas immédiatement utilisées. L'exemple de la Réunion montre que les renseignements transcrits permettent, même des années plus tard, de valoriser ces informations.

#### II.1. PRESENTATION DE L'ILE DE LA REUNION

« Nous comprendre c'est évoluer l'un vers l'autre et accepter d'autres façons de penser notre Monde » (Jean-Pierre Nicolas, lors de la formation en ethnopharmacologie à Metz en septembre 2004).

##### II.1.A. Géographie et biodiversité [25, 29, 122, 123]

L'île de la Réunion est une île dite récente bien qu'émergée de l'océan il y a un peu plus de 2 millions d'années. Elle fait partie de l'archipel des Mascareignes situé dans l'océan Indien. Cette île a la particularité d'être volcanique. Actuellement, l'île compte un massif volcanique inactif (le Piton des Neiges ayant un point culminant à 3071 m) centré sur l'île et occupant près de 2/3 de la superficie, et un volcan actif (le Piton de la Fournaise, point culminant à 2632 m, datant de 500 000 ans) au sud de l'île (fig. II.1). L'ancien volcan s'est effondré à 3 endroits ce qui a provoqué des affaissements de terrain plus ou moins circulaires qu'on appelle cirques et formant un trèfle vu du ciel. Ces cirques profonds de plus de 1000 m sont entourés de remparts ayant des pentes très abruptes,

mais couvertes de végétation ; ces murs naturels permettent le développement de microclimats. Des remparts similaires se retrouvent aussi dans le massif de la Fournaise.

Cette morphologie montagneuse avec des altitudes assez impressionnantes pour une île joue un rôle également dans le climat. En effet, l'île est subdivisée d'un côté dit « au vent » situé à l'est d'où proviennent les alizés, et de l'autre côté de la barrière montagneuse, situé à l'ouest, la zone dite « sous le vent ». Surtout en été, des nuages se forment tout au long de la journée et stagnent dans les « hauts » en fin d'après-midi ; cet effet est dû à l'accumulation de chaleur. Il y a donc plus de précipitations du côté est (fig. II.1.). Cependant, deux saisons se distinguent dans l'année ; il existe l'hiver austral de mai à novembre qui est plutôt une période sèche et fraîche et l'été austral de novembre à avril plutôt chaud et pluvieux.

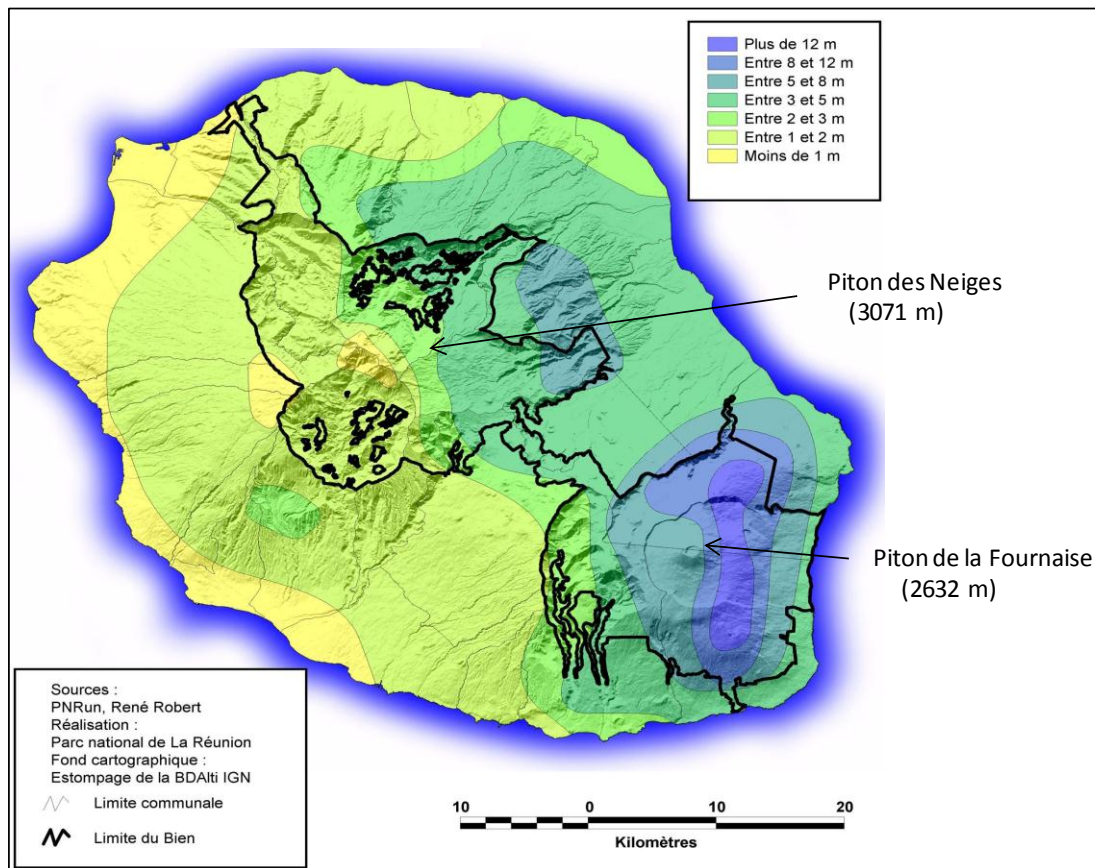


Figure II.1 : Carte représentant la pluviométrie annuelle en 1999 sur l'île de la Réunion.  
Source : Dossier UNESCO [174].

Ces caractéristiques géomorphologiques et cette variété climatique jouent un rôle dans la diversité floristique. La Réunion est classée, avec Madagascar et les deux autres îles formant l'archipel des Mascareignes (Maurice et Rodrigues), dans les 34 « hotspot » de biodiversité (faune et flore) mondiale (fig. II.2.). Ces « points chauds » sont des régions du globe les plus riches en biodiversité, mais où la faune et la flore souvent originelle sont menacées de disparition.

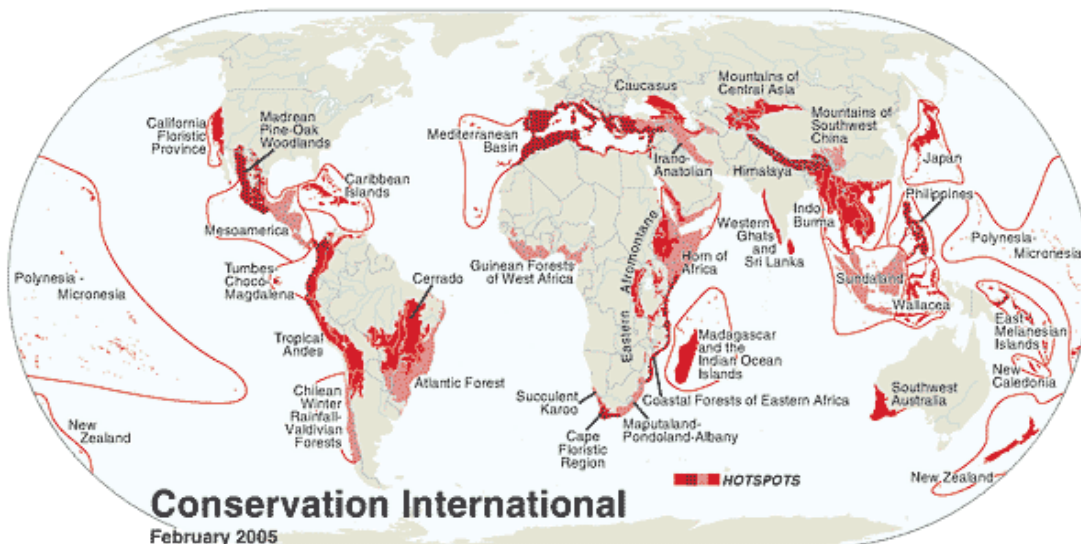


Figure II.2 : Carte mondiale reprenant les 34 « points chauds » de biodiversité. *Source : www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Documents/cihotspotmap.pdf*

Une caractéristique de la flore de l’île de la Réunion est son nombre élevé d’espèces végétales endémiques (spécifiques à une région particulière). Si on se réfère uniquement à la flore vasculaire des territoires océaniques intertropicaux (tableau II.1.), la Réunion présente un pourcentage d’endémisme important la situant en 4<sup>e</sup> position.

Îles	Espèces indigènes	Espèces endémiques	Pourcentage d’endémiques
Ascension	25	11	44
Açores	600	55	9
Galápagos	543	229	42
Hawaii	970	883	91
Madalra	760	131	17
Nouvelle Calédonie	3250	2474	76
Nouvelle Zélande	2000	1620	81
Norfolk	174	48	28
Rodrigue	145	40	28
Maurice	685	311	45
La Réunion	840	389	46

Tableau II.1 : L’endémisme dans les territoires océaniques intertropicaux isolés. *Source : Kurtz [116]*

Sur 840 taxons indigènes (présents avant l’arrivée de l’homme ; 49 % de la population végétale), 28,1 % sont des endémiques stricts (présents uniquement sur l’île de la Réunion) et 18,6 % des endémiques régionaux (présents également dans les autres îles de l’archipel).

Comme sur d’autres îles océaniques intertropicales, la flore de la Réunion résulte d’une immigration, lente et sélective d’espèces végétales, et de processus de spéciation (mutation de l’espèce indigène en espèce endémique, favorisée par l’isolement géographique). Ces espèces végétales, provenant des zones continentales les plus proches (Madagascar, Afrique de l’Est, Asie du Sud-Est, Australie), ont été transportées par voie éolienne (espèces représentant près de 30 % des origines de la flore indigène), par les courants marins (espèces peuplant principalement le littoral, représentant 5 à 10 % de la flore indigène) ou par les oiseaux (ce qui concerne plus de 50 % des origines de la flore indigène).

Dans l'archipel des Mascareignes, l'île de la Réunion a pu mieux maintenir sa flore indigène. En effet, Maurice et Rodrigues, ayant un relief plus facile à conquérir par l'homme, ont gardé beaucoup moins de forêts primaires : Rodrigues n'en a plus que 0,2 %, Maurice 5 % et la Réunion jusqu'à 30 % [42]. Plusieurs structures locales se mobilisent pour maintenir et valoriser ce patrimoine unique. A titre d'exemple, le Conservatoire Botanique National de Mascarin (CNBM) joue un rôle particulièrement important dans la protection d'espèces menacées ; l'UMR « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical » de l'Université de la Réunion étudie les mécanismes évolutifs des espèces végétales, la diversité de leurs génomes et l'interaction avec les microorganismes phytopathogènes.

Les efforts fournis par ces divers groupes ont permis à l'île de la Réunion d'être en 2010 reconnue patrimoine mondial de l'humanité de l'UNESCO pour sa riche biodiversité. On espère que ce titre aidera à maintenir les limites du Parc National (créé en 2007 et couvrant 40 % du territoire ; fig. II.3.) et à lutter contre les espèces exotiques (amenées par l'homme) envahissantes qui étouffent, voire tuent, certaines espèces indigènes. Actuellement, la flore exotique est estimée à 51 % de la flore vasculaire globale.

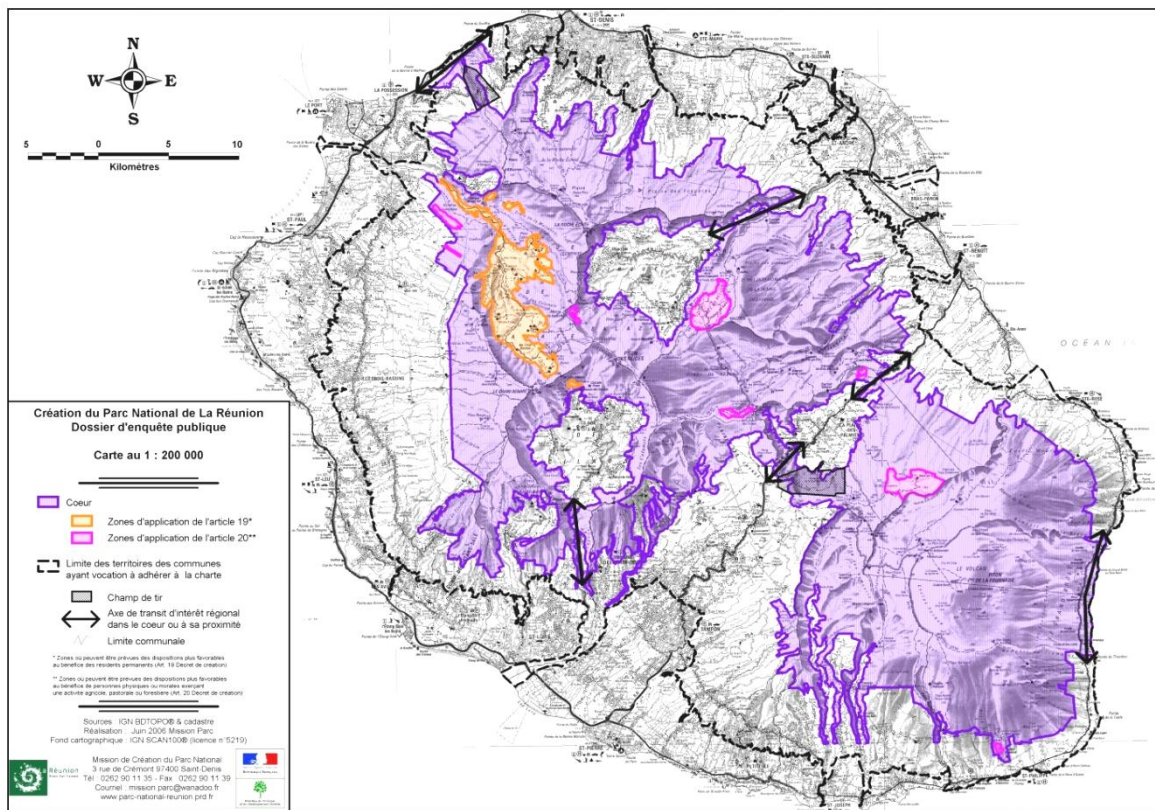


Figure II.3 : Limites du Parc National de l'île de la Réunion. Source : Dossier UNESCO [174].

## Phytogéographie

Afin de démontrer le caractère remarquable de l'île de la Réunion au niveau de la diversité floristique, les divers écosystèmes s'y retrouvant sont présentés ci-après.

La répartition du tapis végétal actuel a été étudiée à partir des années 70 par un botaniste local, Thérésien Cadet [29]. Il a ainsi décrit cinq grandes strates suivant les différents facteurs écologiques (climatiques, édaphiques et biotiques) (fig. II.4. et II.5.).

En général, une végétation plus verte, attribuable aux fortes pluies, se développe dans l'est et une flore plus sèche dans l'ouest.

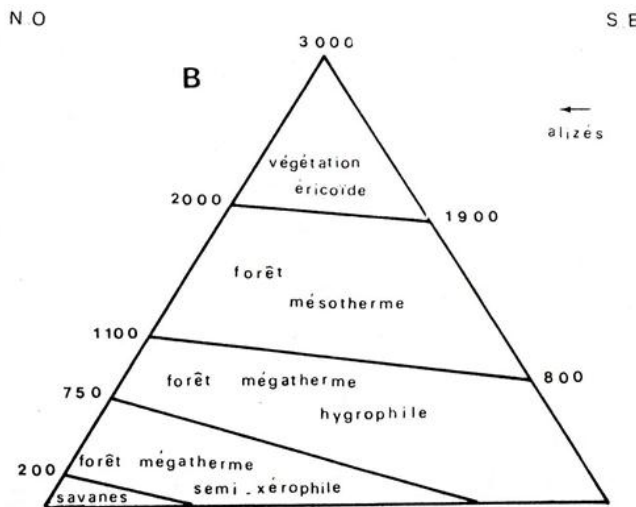


Figure II.4 : Strates des divers écosystèmes présents sur l'île de la Réunion variant selon l'altitude. Source : Cadet [29].

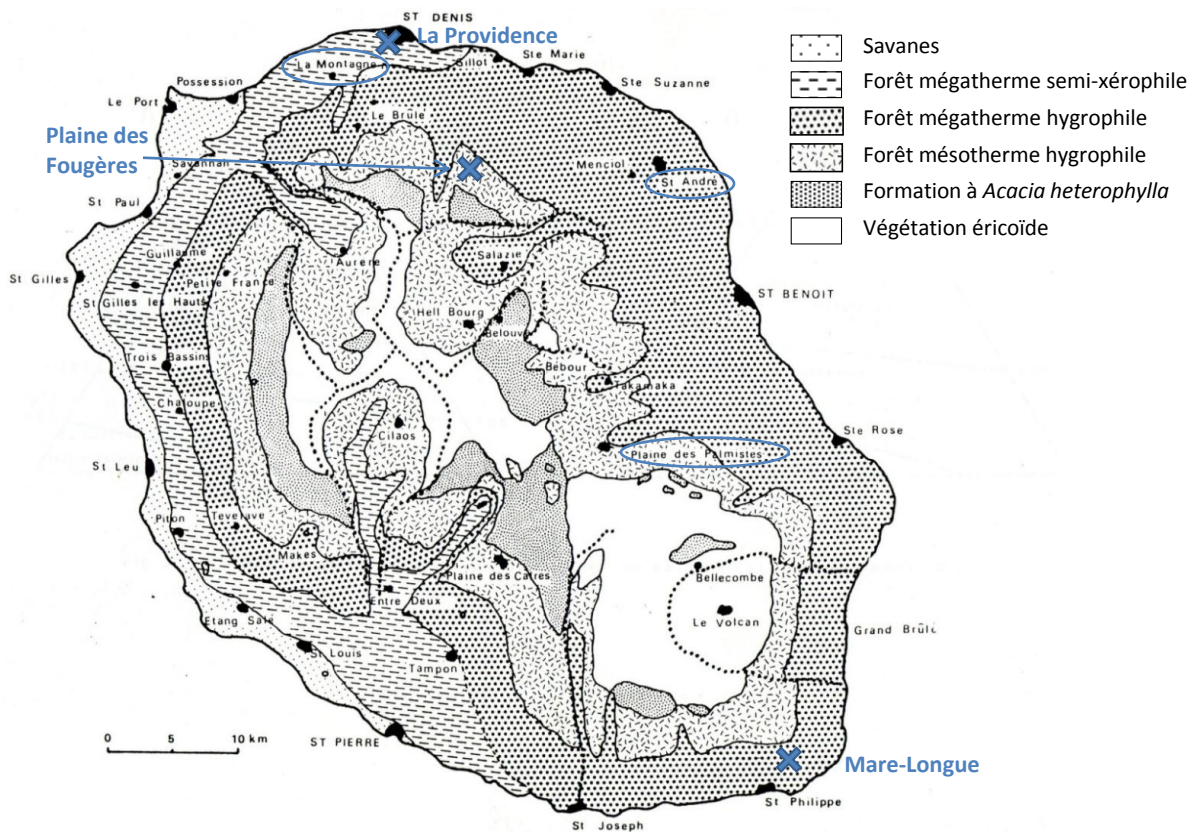


Figure II.5 : Carte phytogéographique de l'île de la Réunion. Source : Cadet [29].

Ces strates, dépendantes de l'altitude, sont présentées ci-après:

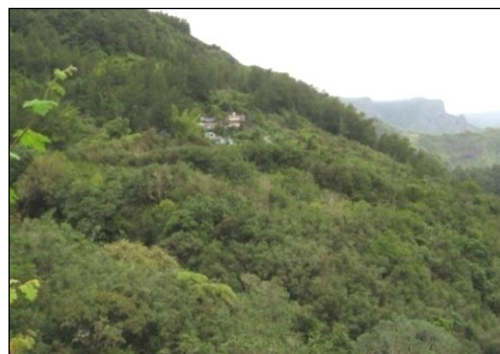
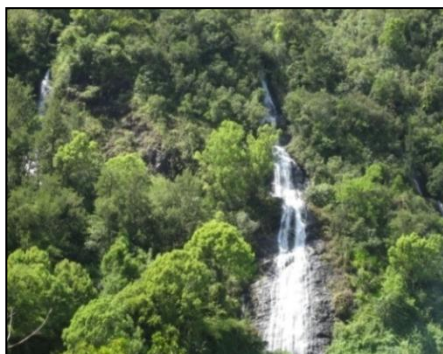
- **Végétation du littoral** : quelques espèces halophiles survivent, mais cette strate a fortement été dégradée par l'introduction d'espèces exotiques en culture. En dehors des champs cultivés (principalement de la canne à sucre), on retrouve « la savane » à l'ouest, caractérisée par des graminées et des fourrés.



- **Forêt mégatherme semi-xérophile** : Comme son nom l'indique, cette zone aime la sécheresse, elle est marquée par des températures élevées, une pluviométrie faible (inférieure à 1500 mm eau/an) et une saison sèche bien marquée. Elle se retrouve dans les basses pentes de la région sous le vent (à l'ouest) et se caractérise actuellement par des fourrés et l'absence d'épiphyte vu l'éclairage important et la faible humidité. Mais elle est menacée de disparition totale à cause de l'activité humaine.



- **Forêt mégatherme hygrophile** (= forêt tropicale humide des bas) : en grande partie détruite par l'homme. Elle est caractérisée par une pluviométrie élevée (supérieure à 1500 mm eau/an) et n'a pas de saison écologiquement sèche (température moyenne de 17,5°C). Elle se retrouve dès 300 m d'altitude dans l'extrême Sud-Est (forêt de Mare-Longue) et vers 1000 m sur les pentes occidentales, et est absente dans les cirques. Il y a essentiellement des arbres et arbustes, peu d'herbacées terrestres, mais une grande variété d'épiphytes.



- **Forêt mésotherme hygrophile** (= forêt tropicale humide des hauts): caractérisée par une bonne pluviométrie, une isotherme de 17°C et 11°C selon la saison. Il n'y a pas de saison écologiquement sèche à cause de brouillard fréquent. La température

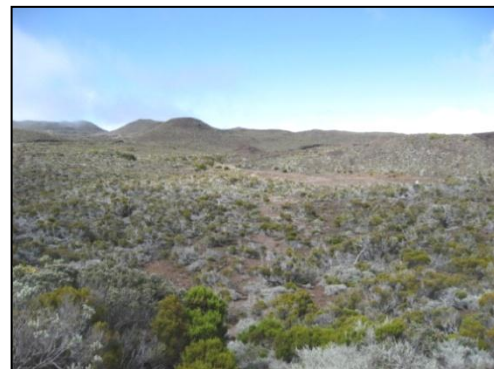
relativement basse et l'ensoleillement faible invitent à une faible évapotranspiration. Cette strate se retrouve entre 800 et 1700 m S.E. et 1000 à 2000 m E. (zone sous le vent).



Sa diversité floristique au niveau des ligneux est moins importante que dans la forêt mégatherme mais leur hauteur est modeste comme pour la forêt mégatherme. On retrouve beaucoup de fougères arborescentes et des épiphytes.



- **Végétation éricoïde des hautes altitudes** (= végétation altimontaine) : seule strate préservée avant l'arrivée de l'homme, car située aux altitudes les plus élevées (1600/1900 m jusqu'au sommet). Elle est caractérisée par des températures assez basses menant parfois à du gel, la pluviométrie varie de 1500 à 3000 mm/an et la présence de brouillard ralentit l'évapotranspiration. On passe d'une prairie altimontaine, avec présence d'arbustes dits éricoïdes, à un groupement bryolichénique. Peu de plantes à usage médicinal se rencontrent dans cette strate.



## II.1.B. Histoire et système thérapeutique

### II.1.B.1. Le peuplement de l'île par l'homme

L'île a été décrite pour la première fois par un géographe arabe (Al Sharif el-Edrissi) vers l'an 1153. Redécouverte par des Portugais au 15<sup>e</sup> siècle après l'ouverture de la voie de l'Inde en passant par le cap de Bonne Espérance, ce n'est qu'au 17<sup>e</sup> siècle qu'elle fut colonisée. A cette époque, Français et Hollandais se disputaient la propriété des terres de cette région comme terre d'escale pour les navires marchands européens. La France avait déjà la souveraineté théorique sur Madagascar. En 1638, l'île Maurice fut propriété hollandaise et en 1641 la France prit possession de la Réunion qui fut alors baptisée île Bourbon. La colonisation de l'île fut assez lente. Les premiers habitants furent un groupe de mutins de Madagascar envoyés en guise de punition par le gouverneur de France qui voulait transformer l'escale de la Réunion sur la route des Indes en un établissement pénitentiaire. Après trois ans, ils furent rapatriés et, par la description paradisiaque qu'ils firent de l'île, un groupe de sept Français et six Malgaches s'y installèrent, mais à cause de violents cyclones dévastant leur installation, ils ne restèrent que quatre ans.

Une Compagnie Française des Indes Orientales fut créée par Colbert en 1664 pour gérer le commerce entre le Cap Horn et le Cap de Bonne-Espérance et concurrencer les autres Compagnies européennes. La Compagnie Française imposa l'année suivante la colonisation de l'île pour accueillir les navires marchands y faisant escale. En 1690, l'île comptait environ 390 habitants, principalement des infirmiers et des gardiens de magasins de stockage.

Pourtant le roi Louis XIV voulait profiter de cette terre. Ainsi l'île changea de rôle : de lieu d'escale pour marchandises et infirmerie, elle devint lieu de culture. C'est alors que commença le recrutement par la Compagnie Française des Indes Orientales d'esclaves à Madagascar et en Afrique de l'Est, nommés « Cafres ». La culture du café débuta en 1716. La traite des esclaves fut officialisée en 1727 suite au succès de la culture de café (1716-1767) et des épices (giroflier, muscade, vanillier).

Au milieu du 18<sup>e</sup> siècle, la population d'esclaves représentait 80 % de la population totale estimée à 25000 personnes. Il y eut évidemment des rébellions (surtout entre 1730 et 1770) et certains « Cafres » s'échappèrent dans les montagnes où ils retrouvaient une nature similaire à celle d'où ils provenaient. Les évadés étaient alors appelés « les marrons » et étaient pourchassés pour rétablir l'ordre. L'arrivage massif d'Africains et de Malgaches continua suite au succès des cultures. Pour éviter le marronnage, les maîtres diversifièrent les origines des esclaves et allèrent s'approvisionner aussi en Asie (côte de Malabar au sud-ouest de l'Inde et région du Bengale), mais ceux-ci étaient moins appréciés, car moins robustes et moins résistants. À cause des prix fixés par la Compagnie, beaucoup de petits propriétaires colons s'appauvrirent et se réfugièrent vers les hauts où ils étaient appelés « petits blancs ».

Suite à la Révolution française, l'île changea de nom et devint l'île de la Réunion, et la Compagnie perdit son monopole. Le 27 juillet 1793, la Convention de Paris proclama l'interdiction de la traite et, quelques mois plus tard, le 4 février 1794, celle de l'esclavage. Mais l'île continua de pratiquer l'esclavage, malgré l'illégalité de la situation. Dès 1815, un nouveau type de culture fut mis en place, celui de la canne à sucre, jusqu'en



1848 date d'abolition de l'esclavage. Après l'abolition, une nouvelle vague d'immigration d'Indiens hindouistes, de Chinois christianisés sur place et possédant le monopole du commerce alimentaire, puis des Indiens musulmans possédant le monopole du commerce de tissus, de vêtements et de chaussures, vinrent pour travailler librement.

Le 19 mars 1946, l'Assemblée nationale française adopta la loi dite «de l'assimilation», qui transformait les «Quatre vieilles» colonies (La Réunion, la Guadeloupe, la Martinique et la Guyane française) en départements français. Ainsi, l'île de La Réunion devint un département français d'outre-mer (DOM). Après 1946, une nouvelle vague d'immigration surgit venue des Comores, de Madagascar et de la métropole.

La population actuelle est le résultat d'un brassage de populations de diverses origines (malgaches, africains, indiens, chinois, français) et de diverses religions (catholiques, hindous, musulmans) qui vivent pacifiquement.

### II.1.B.2. Système thérapeutique [5, 14, 35]

L'articulation des différents groupes ethniques dans la société réunionnaise est fort complexe puisque leur histoire, leur origine et leur statut sont fortement différents. Toutefois, ils ont contribué chacun à leur manière à la culture créole et plus particulièrement à la médecine populaire créole. Un anthropologue contemporain, Jean Benoist, a catégorisé la société en différents groupes sociaux [14] en fonction de leur origine :

-Société de planteurs incluant les riches propriétaires français « gros blancs » et les descendants des esclaves cafres. Ce sont principalement des agriculteurs et des employés agricoles ;

-Société paysanne où les petits cultivateurs « blancs des hauts », les Indiens malabars et les marrons restés indépendants forment l'essentiel de la population ;

-Société pseudo-industrielle : née de la départementalisation, elle représente le secteur tertiaire ultra-moderne appuyée sur l'administration des notables et des métropolitains (« les zoreilles ») ;

-Isolats culturels : groupe minoritaire (~ 10 % de la population de l'île) comprenant les Chinois, les Indo-musulmans et les Comoriens. Ces communautés, implantées récemment, sont peu ouvertes aux échanges ethniques et culturels ; elles n'ont donc pas participé à la formation de la médecine populaire créole.

#### **Naissance d'une médecine traditionnelle créole**

Au début du peuplement de l'île, les colons blancs d'origine modeste (venus des campagnes françaises), à défaut de médecins, sont perdus dans une flore qu'ils ne connaissent pas, contrairement aux Malgaches qui retrouvent certaines espèces végétales similaires ou identiques à celles de leur pays d'origine. Leur connaissance phytothérapeutique est donc respectée ; certaines espèces ont même été introduites en même temps qu'eux comme l'ayapana (*Eupatorium triplinerve*). Certains remèdes locaux enseignés par les Malgaches ont eu tellement de succès qu'ils restent encore utilisés aujourd'hui tels que la résine médicinale du « benjoin pays » (*Terminalia bentzoe*).

Cependant, à l'époque de l'esclavage, l'ethnie africaine a été convertie au christianisme ; leur culte (pratiques de vaudou) lié au traitement thérapeutique a été interdit. Toutefois, au cours du 18<sup>e</sup> siècle, époque des grandes explorations botaniques, les propriétés curatives des végétaux sont peu à peu reconnues et inventoriées. On introduit également les ouvrages et les médications classiques européennes de l'époque (pilules, baumes, poudres fébrifuges) pour traiter les colons et les noirs. Par leur faible coût et leur accessibilité, les remèdes locaux restent malgré tout plus communs. De plus, les Marrons des hauts exercent en cachette leurs pratiques de guérisseurs.

La médecine européenne prend de plus en plus d'importance durant le 19<sup>e</sup> siècle ; le gouvernement de France envoie des médecins et des chirurgiens. C'est à ce moment qu'un fossé se creuse entre la médecine classique exercée par les riches chrétiens et la médecine empirique qui est encore exploitée par les plus pauvres ou les Indiens.

Notons que les Indiens, venus plus tard sur l'île, n'ont pas été convertis au christianisme. Ils ont donc introduit le système de représentation des êtres surnaturels (bons et mauvais esprits) et la croyance dans l'au-delà dans la tradition populaire. Mais les principaux apports phytothérapeutiques sont ceux de l'ethnie africaine.

Jusqu'à la départementalisation, peu de pharmaciens et de médecins européens étaient présents sur l'île. Dès lors, la pratique de la médecine populaire est restée très diffusée. A partir de la départementalisation, la médecine moderne s'impose véritablement, elle est soutenue par une idéologie scientifique qui considère que la tradition s'oppose au progrès, au développement, à la mondialisation. Cependant, la médecine traditionnelle se maintient, car elle représente une identité culturelle créée par l'interaction de plusieurs ethnies et rendue unique. La médecine moderne pour les Réunionnais représente l'expression de l'autorité extérieure française.

### **Représentation culturelle de la maladie**

La médecine populaire créole est un syncrétisme de pratiques et de croyances chrétienne, hindoue et africaine. Dans leur système de représentation, il existe deux types de maladies :

La maladie « naturelle » provoquée par des causes naturelles, imprégnée par la théorie des quatre humeurs d'Hippocrate. La description de ce type de maladie a été apportée par les colons français et n'a pas suivi l'évolution scientifique moderne de la médecine. Elle se base donc sur la dialectique du chaud et du froid ; une personne malade possède un déséquilibre thermique. L'action thérapeutique est basée sur la loi des contraires pour remettre le corps en équilibre par l'usage de plantes. Les maladies les plus courantes sont ici décrites en guise d'exemples :

- le refroidissement (fièvre, respiration difficile, sensation de froid, maux de tête). Ces maux sont soignés par des plantes poussant dans les « bas » (régions chaudes de l'île) consommées en tisane, macérées dans du rhum à boire avec du miel, en friction avec du camphre, en bain ...
- l'échauffement (insolation, coups de soleil, gerçures, irritation, inflammation, maux de ventre, constipation, dysenterie, violents maux de tête). On utilise des plantes poussant dans les lieux humides du littoral ou dans les régions fraîches des « hauts », en décoction bue froide ou en cataplasme.

- le saisissement (provoqué par une violente émotion, il peut porter au cœur, il se manifeste par des angoisses, des insomnies). Des tisanes de plantes aux vertus calmantes associées à des éléments réchauffant (rhum ou épices) qui liquéfient le sang (vitalité de l'organisme) sont utilisées comme thérapie.

L'autre catégorie de maladie dans la conception réunionnaise est la maladie « arrangée » qui est à l'origine d'une action maléfique (jeteur de sort) d'un sorcier ou d'un mauvais esprit et se manifeste par divers symptômes. La maladie de ce type la plus commune est la « kriz » reconnue par l'épilepsie, des convulsions, des crises de tétanie, de nerfs, de colère. En médecine contemporaine, elle se qualifie de désordre d'ordre psychique ou neurologique. La manière de « tirer l'esprit » dépend des traditions culturelles (tableau II.2.).

A l'époque, pour être tisaneur ou exorciste, il fallait avoir reçu un don, un pouvoir magico-religieux ayant un ascendant sur le patient. Le savoir acquis était transmis oralement à une autre personne proche ayant reçu aussi ce don. Pour maintenir ce don, les tisaneurs et exorcistes devaient respecter des obligations personnelles (respect d'interdits alimentaires, accomplissement de rituels).

	Maladies « naturelles »	Maladies « arrangées »
Tradition chrétienne	Le <b>tisaneur</b> soigne par les plantes et des formules magiques ou des prières	Les <b>prêtres</b> ont recours aux prières et aux médailles pour protéger du mauvais sort. Dans les cas plus graves, les <b>exorcistes</b> « tirent l'esprit » par le sel, l'eau bénite, des prières, et en utilisant des techniques de livres de magie de tradition française (du 18 <sup>e</sup> siècle).
Tradition malabar	Le <b>prêtre malabar</b> guérit aussi par les plantes et des prières	Les <b>prêtres malabars</b> « tirent l'esprit » par des coups de baguette, des seaux d'eau froide, des huiles et encens accompagnés de prières en langue tamoule. Le malade doit effectuer une promesse (un sacrifice) et porter une amulette.

Tableau II.2 : Représentation culturelle de la maladie et thérapies selon l'influence ethnique.

Les prêtres malabars ne choisissaient pas non plus de devenir prêtres ; seules les personnes en possession de l'esprit d'un mort le devenaient, leur connaissance thérapeutique était également transmise oralement. Toutefois, pour les Indiens, presque toutes les maladies se rattachent aux relations de l'individu avec l'univers surnaturel. Ces Indiens venant de villages du sud de l'Inde ne connaissaient pas vraiment la médecine ayurvédique.

Les prêtres malabars ont eu un grand succès à la Réunion à l'époque où les hôpitaux étaient peu nombreux et dans un état déplorable, et quand les prêtres ou exorcistes chrétiens étaient rares. Tout le monde, quelle que soit l'ethnie d'origine, avait recours au prêtre hindou.

Au final, la culture créole provient de croyances populaires reconnues par tous les membres de la population, quelle que soit leur origine ethnique et religieuse. Cette unicité est maintenue par la langue commune et la naissance sur le territoire, mais chaque ethnie garde ses coutumes et traditions. L'adage réunionnais suivant le

démontre bien : « le Bon Dieu, il n'y en a qu'un, mais chacun a sa manière de pratiquer, il y a plusieurs chemins qui mènent à Dieu ».

### Situation actuelle

La médecine populaire a évolué conjointement à la société et à l'histoire. Actuellement, les deux systèmes de thérapeutique (moderne et traditionnelle) coexistent à la Réunion, ils sont considérés comme complémentaires. La thérapeutique moderne traite les symptômes physiques, soigne le corps biologique sans vraiment être à l'écoute du patient, tandis que la thérapeutique traditionnelle permet de traiter les causes de la maladie, qu'elles soient surnaturelles ou non. Elle est sollicitée lors des maux courants (refroidissement, troubles du sommeil, maux de tête) ou en automédication préventive (protection de mauvais esprits). L'existence du lien social permet de garder le succès de ce système thérapeutique ; le thérapeute (toujours nommé « tisanneur ») reste encore à l'écoute du patient et comprend ses croyances.

Les tisaneurs mélangent les croyances hindouiste et catholique et utilisent l'apport afro-malgache ayant résisté au pouvoir colonial (les plantes médicinales, les techniques divinatoires et le service pour les ancêtres). Ainsi, ils utilisent des plantes ayant des propriétés médicinales, mais aussi des plantes indispensables à l'accomplissement de certains rituels. La croyance aux esprits, au monde surnaturel est encore d'actualité à la Réunion. Le peuple réunionnais (60 à 70 % métissé) est resté très superstitieux. Ainsi, de nombreuses croyances et superstitions résident encore à la Réunion. Un bel exemple de croyances est la dévotion à Saint Expedit (prié pour tous les maux) ; on retrouve partout à la Réunion des lieux de dévotion reconnaissable par leur peinture rouge vif.

Par cette brève description anthropologique et cet aperçu historique, nous nous apercevons que l'usage des plantes à la Réunion fait partie intégrante du patrimoine culturel de la société réunionnaise, de l'identité créole. La difficulté de l'ethnopharmacologie est de différencier les plantes qui soignent de celles qui sont liées aux cultes.

## II.2. TRAVAUX ANTERIEURS EN PHARMACOGNOSIE

Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Université de la Réunion a beaucoup contribué à la valorisation des ressources naturelles de l'île. Les principaux travaux effectués sur les plantes de la Réunion constituent en :

- l'étude d'extraits lipidiques de graines de *Litchi sinensis*, *Euphorbia longana* [81] et de diverses cucurbitacées tropicales [9],
- l'étude d'huiles essentielles (notamment du vetyver bourbon, *Vetiveria zizanioides*, et du géranium bourbon, *Pelargonium graveolens*),
- de criblage phytochimique de près de 300 plantes médicinales (par J. Smadja et R.Véra [181]),
- de criblage pharmacologique de nombreuses plantes indigènes (activités antifongique, antioxydante, antiradicalaire [167], inhibitrice de l'acétylcholinestérase (maladie d'Alzheimer), antiplasmodiale, antivirale (sida) [193]).

En ce qui concerne les tests antiplasmodiaux *in vitro*, seule une étude préliminaire a été réalisée. Des extraits éthanoliques ont été mis en contact avec des érythrocytes infestés par la souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum*, FCM 29C1. Il apparaît que parmi les 14 extraits testés aucun n'était actif à la concentration de 5 µg/ml.

Suite aux résultats des divers criblages, une plante endémique a été étudiée par fractionnement bioguidé : *Melicope borbonica* renferme des coumarines, des sesquiterpènes et un lignane. Une acétophénone (la xanthozyline) et deux coumarines (la scoparone et la limettine) ont montré une activité antifongique [77].

L'Université de Maurice a également participé à des études pharmacologiques sur les plantes des Mascareignes :

- Un criblage de l'activité antidiabétique a été effectué *in vitro* sur 7 espèces végétales. Une seule espèce, *Artocarpus heterophyllus* (appelé « jaquier » à la Réunion), s'est révélée inhibitrice de l' $\alpha$ -amylase [113].
- Une évaluation de l'activité antioxydante de plantes endémiques de Maurice a révélé trois plantes sur dix ayant une activité antiradicalaire : *Badula multiflora*, *Ochna mauritiana* et *Gaertnera psychotrioides* [138].
- L'activité antimicrobienne a été recherchée sur 25 espèces végétales, et une plante, *Momordica charantia*, a été étudiée pour son activité hypoglycémique (inhibition du transport de glucose) [83].

D'autres chercheurs, en collaboration avec les équipes locales, ont aussi participé à l'élaboration de tests pharmacologiques. Une équipe danoise a étudié l'effet antihypertensif et diurétique de 80 plantes de l'île de la Réunion. Il apparaît que 35 d'entre elles inhibent l'enzyme de conversion de l'angiotensine, impliquée dans la régulation de la pression artérielle et de la diurèse [2]. L'équipe de Pharmacognosie de Rennes a étudié l'effet antiviral de 36 extraits méthanoliques de plantes médicinales réunionnaises sur deux virus, le virus de l'herpès labial (HSV-1) et le poliovirus type 2 (PV). Cinq extraits se sont avérés actifs contre l'HSV-1 et cinq contre le PV ; parmi eux, seul l'extrait de *Senecio ambavilla* inhibe les deux virus [62].

Finalement, les Laboratoires Roger Bellon, après avoir effectué divers criblages d'activité pharmacologique il y a une trentaine d'années [60], ont procédé à l'étude approfondie de quelques plantes endémiques de la Réunion [175] : (I) *Monimia rotundifolia*, plante toxique contenant des alcaloïdes (la laurotetanine étant le majoritaire) ayant une activité antiarythmique cardiaque [124], (II) *Turraea casimiriana*, utilisée traditionnellement pour la circulation et l'hypertension, les feuilles et l'écorce de tige renferment des tanins catéchiques de type flavan-3-ol ayant une forte activité sur la perméabilité capillaire, (III) *Bertiera rufa*, les feuilles comprennent des catéchines et la leucocyanidine montrant aussi une activité sur la perméabilité capillaire, (IV) L'ambaville (*Senecio ambavilla*) est utilisée en usage externe notamment contre les inflammations, l'herpès et en usage interne contre l'eczéma et diverses maladies de la peau, et comme antiulcéreux gastrique. Cette dernière utilisation a fait l'objet d'études approfondies, l'extrait aqueux des feuilles possède des propriétés antiulcéreuses remarquables. L'extrait contient notamment des composés phénoliques (hypéroside et divers dérivés de l'acide (1-hydro-4-oxocyclohexa-2,5-diényl) acétique). Le fractionnement bioguidé a permis d'isoler le composé responsable de l'activité : la lactone de l'acide 1-hydro-4-oxocyclohexa-2,5-diényl acétique.

### Le retour de l'information sur le terrain

Du point de vue des travaux ethnopharmacologiques, nous nous rendons compte que les Mascarins ont déjà bien avancé sur le terrain. Plusieurs enquêtes ethnopharmacologiques ont déjà été transcrites, des criblages chimiques et pharmacologiques ont mis en évidence des plantes potentiellement intéressantes. Comme les principaux acteurs de ces travaux se trouvent sur place, l'exploitation des résultats a été plus rapide et profitable aux Réunionnais. L'identité culturelle créole a également joué un rôle dans la mise en place de structures ou organismes valorisant les plantes médicinales et endémiques. Diverses études économiques ont montré la volonté aux niveaux politique, économique et scientifique de développer une filière « Plantes Aromatiques et Médicinales » (PAM) à la Réunion. Plusieurs associations existent déjà pour aider à réglementer la culture et l'usage des plantes médicinales. A titre d'exemple, l'APLAMEDOM (association pour les plantes aromatiques et médicinales de la Réunion) réalise des colloques, des formations en phytothérapie, des bases de données botaniques et pharmacologiques, établit des collaborations avec les agriculteurs et industriels locaux, et fait partie d'un réseau PAM national (TRAMIL aux caraïbes, IRD, Universités).

### Etude phytochimique préalable des six espèces sélectionnées lors de nos tests *in vitro*

Le criblage antiplasmodial *in vitro*, réalisé lors de ce travail, a mis en évidence six espèces prometteuses. Un compte rendu des connaissances phytochimiques de chacune des plantes est présenté ci-dessous :

- *Aphloia theiformis* : trois saponines [78] et une xanthone, l'aphloiol (plus connu sous le nom de mangiférine) [173] ont déjà été décrites dans les feuilles. La présence de flavonoïdes, de proanthocyanidols, de phénols et de tanins catéchiques a été mise en évidence par un criblage phytochimique des feuilles [122]. Mais aucune étude n'a été réalisée sur l'écorce.

- *Lantana camara* : cette espèce cosmopolite fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Des criblages des feuilles ont mis en évidence la présence de composés phénoliques, de flavonoïdes, d'alcaloïdes, de tanins, de triterpènes, de saponines [174]. Plusieurs triterpènes ont été isolés [39, 40] et la composition de l'huile essentielle des feuilles a également été étudiée [172].

- *Nuxia verticillata* : le screening phytochimique réalisé par Smadja et Véra [181] a révélé la présence de stérols et de triterpènes parmi les composés apolaires des feuilles.

- *Psiadia arguta* : cette plante est une espèce menacée de l'archipel et des études de micropropagation ont été menées par l'équipe d'un de nos collaborateurs afin de lutter contre l'extinction de cette espèce endémique. Le succès de prolifération par bourgeons axillaires cotylédonaire a permis la transplantation en serre [110]. L'échantillon que nous avons récolté provient d'une de ces transplantations. La possibilité de cultiver cette plante reste un avantage pour une éventuelle utilisation thérapeutique. Au niveau phytochimique, les feuilles contiennent une huile essentielle composée principalement d'isoeugénol (67 %). Cette huile essentielle possède une activité antifongique [79]. Une autre étude a montré la présence de composés phénoliques [195].

- *Psiadia dentata* : la littérature reporte la présence de coumarines et de méthoxyflavones [61, 97] et aussi la présence du flavonoïde 3-méthylkaempférol (possédant une activité antipoliiovirale) [176]. Un screening phytochimique détecte la présence de flavonoïdes, de saponosides et de tanins galliques dans les feuilles [62].

- *Terminalia bentzoe* : selon Smaja et Véra [179], les feuilles de cet arbre contiendraient des saponosides, des phénols, des triterpènes et des stérols.

## II.3. Travaux personnels

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence des extraits de plantes des Mascareignes ayant une activité antiplasmodiale spécifique (*in vitro*), mais aussi d'évaluer l'activité antimalarique (*in vivo*) des extraits actifs. Les extraits possédant un effet antimalarique et non cytotoxique pourraient alors être sujet de tests pharmacologiques plus approfondis et d'études phytochimiques complètes dans l'optique de développer des médicaments traditionnellement améliorés ou de déceler de nouvelles molécules antiplasmodiales puissantes.

### II.3.A. Sélection des plantes et préparation d'extraits

De nombreuses enquêtes ethnopharmacologiques ont déjà été menées auparavant sur l'île de la Réunion [14, 27, 122]. Ces documents nous ont servi pour sélectionner les plantes utilisées contre les fièvres et plus précisément pour soigner le paludisme. Comme l'éradication de la malaria est récente (cf. § I.1.E.), le savoir traditionnel a pu être retranscrit avant qu'il ne disparaisse. L'urgence réside maintenant dans l'étude en laboratoire des plantes renseignées. Car comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent (§ II.1.A.), la disparition des espèces végétales indigènes est très rapide. Une valorisation de ces végétaux permettra peut-être de réduire cette tendance.

Au final, vingt espèces ont été sélectionnées pour le criblage antiplasmodial. Parmi ces espèces, la moitié est endémique des Mascareignes (tableau II.3). Certaines de ces espèces ne possèdent pas d'utilisation traditionnelle connue, mais notre intérêt s'est porté sur leur endémicité puisque les nombreuses plantes endémiques des Mascareignes sont encore peu connues du point de vue pharmacologique ou phytochimique, mais pourraient renfermer des composés originaux. D'autres espèces ont été sélectionnées par chimiotaxonomie (*Asteraceae* comme *Artemisia annua* ; *Loganiaceae* comme les *Strychnos* largement étudiés dans notre laboratoire et *Rubiaceae* comme *Cinchona sp.*).

Le but de cette étude étant de valoriser les plantes indigènes et trouver des candidats pour des études phytochimique et antipaludique plus approfondies, notre récolte s'est également basée sur des espèces non médicinales et pour lesquelles nous avons une autorisation de récolte. Le tableau II.3. présente les espèces sélectionnées, leur nom vernaculaire, leurs usages médicaux traditionnels et leur origine botanique.

Famille (suite)	Espèce	Nom vernaculaire	Usages traditionnels [1, 121-123]	Origine
Acanthaceae	<i>Justicia gendarussa</i> Burm. f.	Ayapana marron, natchouli	Feuilles : myorelaxantes, anti-hypertensives, antirhumatismales. <u>A Maurice et en Inde</u> : anti-rhumatismales, fébrifuges et vomitives	Inde, Indonésie
Aphloiaceae	<i>Aphloia theiformis</i> (Vahl) Benn.	Change écorce, goyave marron	Ecorce : auparavant, utilisée comme vomitif et soignant les plaies. Actuellement, elle est utilisée dans les dérangements d'estomac. Feuilles : contre les fièvres palustres.	Afrique de l'Est, Madagascar, <b>Mascareignes</b> et Seychelles
Apocynaceae	<i>Ochrosia borbonica</i> J.F. Gmel.	Bois jaune (Maurice: quinquina pays)	Ecorce : fébrifuge surtout pour les fièvres intermittentes, dépurative contre les coliques d'estomac, vermifuge.	<b>Mascareignes</b>
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Herbe à bouc	Feuilles : vermifuges, anti-hypercholestérolémiantes, contre les maux d'estomac.	Amérique
	<i>Eupatorium ayapana</i> Vent. (= <i>E. triplinervis</i> Vahl.)	Ayapana	Dépuratif, sudorifique, anti-cholérétique, antinauséeux, contre la grippe et la fièvre.	Amazonie
	<i>Eupatorium riparium</i> Regel (= <i>Ageratina riparia</i> (Regel) R.M. King & H. Rob.	Ortochifon, herbe la tension	Feuilles : antihypertensives et cholagogues	
	<i>Psiadia arguta</i> Voigt	Baume de l'île Plate	Expectorant, cicatrisant dermique	<b>Maurice</b>
	<i>Psiadia dentata</i> D.C.	Bois collant, ti-mangue	Feuilles : en cataplasme contre les furoncles	<b>Mascareignes</b>
Combretaceae	<i>Terminalia bentzoe</i> L.	Benjoin	Ecorce: dépurative, sudorifique, contre les diarrhées et la dysenterie, contre les refroidissements et les fièvres paludéennes	<b>Mascareignes</b>
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum laurifolium</i> Lam.	Bois de rongue	Ecorce : diurétique, astringente, contre les fièvres et les problèmes liés à l'appareil urinaire (calculs, coliques néphrétiques)	<b>Mascareignes</b>
Fabaceae	<i>Cassia fistula</i> L.	Cytise indienne	Fruit: vermifuge et laxatif	Inde, Egypte
Loganiaceae	<i>Buddleja salviifolia</i> (L.) Lam.			Afrique du Sud
	<i>Geniostoma borbonicum</i> Spreng.	Bois de piment		<b>Mascareignes</b>
	<i>Nuxia verticillata</i> Lam.	Bois maigre	Ecorce : dépurative, contre les maladies vénériennes. Feuilles : contre l'excès d'urée dans le sang et l'albuminurie	<b>Mascareignes</b>
Malpighiaceae	<i>Hiptage benghalensis</i> Kurz	Liane papillon	Epilepsie	Inde
Rhamnaceae	<i>Scutia commersonii</i> Brogn. (= <i>S. myrtina</i> (Burm. f.) Kurz.)	Bois de sinte	Purgative, utilisée en cas de fièvre paludéenne	<b>Réunion</b>
Rosaceae	<i>Rubus rosifolius</i> Sm.	Framboisier	Fièvre paludéenne ; anti-diarrhéique ; astringent ; anti-inflammatoire	<b>Maurice</b>
Rubiaceae	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Noni	Feuilles avec de l'huile appliquées sur les entorses et foulures	Inde



Rutaceae	<i>Toddalia asiatica</i> (L.) Lam. (= <i>Paullinia asiatica</i> L.)	Liane patte poule	Racine: contre les diarrhées et les fortes fièvres, utilisée comme adjuvant de la quinine. Feuilles : traitent les séquelles du paludisme, les menstruations douloureuses, sont dépuratives	Chine
Verbenaceae	<i>Lantana camara</i> L.	Galabert, corbeille d'or	Feuilles: febrifuges et sudorifiques	

Tableau II.3 : Tableau ethnopharmacologique des espèces retenues et récoltées. *Le nom créole « marron » signifie « semblable à ».*

Diverses récoltes ont eu lieu à des moments de l'année et à des endroits différents sur l'île Maurice et sur l'île de la Réunion. En effet, certaines espèces se retrouvent dans des strates de végétation bien particulières telle qu'*Erythroxylum laurifolium* typique des forêts tropicales humides des bas. D'autres espèces, comme *Aphloïa theiformis*, sont réparties sur plusieurs strates.

Sur l'île de la Réunion, les récoltes se sont déroulées dans six lieux représentant les trois types de forêts rencontrés sur l'île (fig. II.5). Ainsi, « La Montagne » et « La Providence » (proches de Saint-Denis) font partie des forêts mégathermes semi-xérophiles ; « Mare-Longue » et « Saint-André » sont inclus dans les forêts mégathermes hygrophiles ; « Plaines des Palmistes » et « Plaines des fougères » se situent dans les forêts mésothermes hygrophiles.

Pour certaines espèces, plusieurs échantillons se différenciant par la partie du végétal (drogue), par le mode de séchage, par le lieu ou la date de collecte ont été récoltés. Certains de ces échantillons ont immédiatement été cryogénisés (notés « cryo ») dans l'azote liquide et d'autres séchés à température ambiante dans un endroit sec à l'abri de la lumière (notés « RT » dans le tableau II.4.). En effet, des substances chimiques peuvent se transformer au contact de l'air. Certaines plantes sont pour cela utilisées à l'état frais comme *Eupatorium ayapana*. Lors de la collecte, ce type d'échantillon est directement cryogénisé. D'autres plantes sont au contraire préférentiellement utilisées à l'état sec. A titre d'exemple, la distillation de feuilles fraîches d'*Ageratum conyzoides* fournit 0,02 % d'huile essentielle tandis que les feuilles sèches en fournissent 8 fois plus [121]. Au final, 33 échantillons ont été collectés.

Espèce	Lieux de récolte	Date de récolte	Séchage	drogues
<i>Ageratum conyzoides</i>	Maurice: Gaulettes Serrées (400 m)	Février 2008	RT	Parties aériennes
<i>Aphloïa theiformis</i>	Réunion: Plaines des Fougères (1200 m)	Septembre 2006	cryo	Feuilles (L1)
	Réunion: La montagne (650 m)	Septembre 2006	cryo	Feuilles (L2), Ecorce de tronc (L3)
<i>Buddleja salviifolia</i>	Réunion: Plaine des Fougères (1200 m)	Septembre 2006	cryo	Feuilles (L1), Ecorce de tronc (L2), fleurs (L3)
<i>Cassia fistula</i>	Maurice: Terre Rouge	Février 2008	cryo	Feuilles
<i>Erythroxylum laurifolium</i>	Réunion: La Montagne (650 m)	Février 2008	cryo	Feuilles
<i>Eupatorium ayapana</i>	Réunion: Saint André	Janvier 2007	cryo	Parties aériennes

<i>Eupatorium riparium</i>	Réunion: La Montagne (650 m)	Février 2008	RT	Parties aériennes (L1)
		Mars 2009	cryo	Feuilles (L2)
<i>Geniostoma borbonicum</i>	Réunion: Plaine des Palmistes (1000 m)	Juin 2006	cryo	Feuilles (L1), Ecorce de tronc (L2)
	Réunion: Grand Etang (500 m)	Septembre 2006	cryo	Feuilles (L3)
<i>Hiptage benghalensis</i>	Réunion: La Montagne (650 m)	Février 2008	cryo	Feuilles
<i>Justicia gendarussa</i>	Réunion: Saint-André (100 m)	Janvier 2007	cryo	Parties aériennes
<i>Lantana camara</i>	Réunion : La Montagne (650 m)	Septembre 2006	cryo	Feuilles (L1-var. fleurs rose (L2-var. fleurs orange)
<i>Morinda citrifolia</i>	Réunion: La Providence (250 m)	Février 2008	cryo	Feuilles (L1)
			RT	Fruits (L2)
<i>Nuxia verticillata</i>	Réunion: Mare-Longue (350 m)	Janvier 2007	cryo	Feuilles (L1)
	Réunion : La Montagne (650 m)	Janvier 2008	cryo	Ecorce de tronc (L2)
	Réunion : La Montagne (650 m)	Janvier 2008	RT	Feuilles (L3)
	Maurice: Gaulettes Serrées (400 m)	Février 2008	RT	Feuilles (L4)
<i>Ochrosia borbonica</i>	Réunion: La Montagne (650m)	Février 2008	RT	Feuilles
<i>Psiadia arguta</i>	Réunion: Fac de Sciences (75 m)	Novembre 2006	cryo	Feuilles
<i>Psiadia dentata</i>	Réunion: La Montagne (650 m)	Février 2008	cryo	Parties aériennes
<i>Rubus rosifolius</i>	Maurice: Gaulettes Serrées (400 m)	Février 2008	cryo	Parties aériennes
<i>Scutia commersonii</i>	Maurice: Gaulettes Serrées (400 m)	Février 2008	RT	Feuilles
<i>Terminalia bentzoe</i>	Réunion: Fac des Sciences (75 m)	Novembre 2006	RT	Feuilles (L1)
		Mars 2007		Feuilles (L2)
		Février 2008		Ecorce de tronc (L3)
<i>Toddalia asiatica</i>	Maurice: Gaulettes Serrées (400 m)	Février 2008	cryo	Feuilles

Tableau II.4 : Récapitulatif des diverses drogues récoltées et leur mode de séchage.

Afin de séparer les constituants chimiques des drogues en composés polaires et apolaires et ainsi avoir une orientation sur les classes phytochimiques responsables de l'activité éventuellement perçue, chaque échantillon a été macéré sous agitation magnétique dans du dichlorométhane et dans du méthanol (cf. § VI.1.A.2). Les extraits DCM et MeOH ainsi préparés ont été soumis aux tests pharmacologiques antipaludiques préliminaires qui permettent de faire le tri parmi les lots récoltés.

## II.3.B. Tests pharmacologiques

Pour des raisons éthiques, la première sélection pharmacologique d'extraits de plantes commence toujours par des tests *in vitro*, quand des protocoles sont disponibles.

Bien que nous savons que les symptômes de malaria peuvent être soulagés par divers types de molécules (antalgique, anti-inflammatoire), notre étude s'attachera uniquement à une activité antiplasmodiale spécifique afin de viser de nouvelles molécules ciblant directement le parasite responsable de la maladie.

### II.3.B.1. Tests *in vitro*

Le criblage pharmacologique s'effectue sur l'activité antiplasmodiale du cycle érythrocytaire du *Plasmodium falciparum*. La souche chloroquino-sensible, 3D7, est testée en premier lieu. Ensuite, si l'activité est présente ( $CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ ), les extraits actifs sont testés sur la souche chloroquino-résistante, W2. Finalement, pour les échantillons possédant une activité prometteuse ( $CI_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$ ), la sélectivité de l'effet antiplasmodial observé est calculée par rapport à l'effet de l'extrait vis-à-vis de cellules humaines saines. Des tests de cytotoxicité sont donc pratiqués sur une lignée de fibroblastes humains (WI-38). Selon l'OMS, une sélectivité peut être affirmée quand l'index de sélectivité ( $IS = CI_{50} \text{ cellules humaines} / CI_{50} \text{ Plasmodium falciparum}$ ) est supérieur à 10 pour une substance pure [165].

Le tableau II.5. présente les valeurs des  $CI_{50}$  des extraits prometteurs retenus ainsi que la valeur de l'index de sélectivité (IS). Cet index a été calculé en tenant compte des valeurs les plus petites parmi les deux souches de Plasmodium testées. Ainsi l'index calculé montre la meilleure sélectivité pour un extrait donné.

Les extraits ne figurant pas dans ce tableau ont une  $CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ ; les espèces *Ageratum conyzoides*, *Cassia fistula*, *Erythroxylum laurifolium*, *Eupatorium ayapana*, *Geniostoma borbonicum*, *Hiptage benghalensis*, *Justicia gendarussa*, *Morinda citrifolia*, *Rubus rosifolius*, *Scutia commersonii* et *Toddalia asiatica* ne sont donc pas retenues. Notons que dans la littérature, certaines de ces espèces possèdent des activités analgésique (*Justicia gendarussa* [44], *Rubus rosifolius* [105], *Toddalia asiatica* [85]) et anti-inflammatoire (*Ageratum conyzoides*, *Hiptage benghalensis*, *Geniostoma borbonicum*, *Justicia gendarussa*, *Morinda citrifolia*, *Rubus rosifolius*, *Scutia commersonii*, *Toddalia asiatica* [103]) décrites qui pourraient en partie expliquer l'usage traditionnel. De plus, des variations de réponse aux tests pharmacologiques peuvent dépendre de beaucoup de facteurs (variation de composition chimique en fonction de l'environnement écologique, de l'âge ou du stade de développement du végétal), les espèces non actives ne doivent donc pas être immédiatement considérées comme inactives contre le Plasmodium; tout dépend des lots récoltés. Dans le même esprit, les nouveaux lots des espèces choisies pour l'étude approfondie devront être récoltés au même endroit et à la même période que les lots donnant des résultats prometteurs lors des tests préliminaires.

Parmi les six plantes utilisées traditionnellement contre le paludisme, également dénommées sous l'usage « contre les fièvres intermittentes » (*Aphloia theiformis*, *Ochrosia borbonica*, *Rubus rosifolius*, *Scutia commersonii*, *Terminalia bentzoe*, *Toddalia asiatica*), seules deux espèces (*Aphloia* et *Terminalia*) ont montré un effet *in vitro*. Parmi

les vingt espèces récoltées, six démontrent une activité antiplasmodiale prometteuse sur le cycle érythrocytaire du *Plasmodium falciparum* (partie grisée dans le tableau II.5). Et parmi les neuf espèces endémiques récoltées, quatre sont pourvus d'une activité antiplasmodiale prometteuse.

Espèce	Lot (partie)	Extrait	3D7	W2	WI-38	IS
<i>Aphloia theiformis</i>	L1 (F)	DCM	21,0 ± 1,6	22,7 ± 2,9		
	L3 (E)	DCM	16,1 ± 2,7	18,2 ± 2,7		
		MeOH	13,3 ± 0,8	11,0 ± 3,1	58,3 ± 5,5	5,3
<i>Buddleja salviifolia</i>	L1 (F)	DCM	29,7 ± 12,6	18,6 ± 5,8		
	L2 (E)	DCM	49,9 ± 9,6			
<i>Eupatorium riparium</i>	L1 (PA)	DCM	25,5 ± 5,3	20,0 ± 2,0		
	L2 (F)	DCM	30,5 ± 0,6	21,3 ± 5,1		
		MeOH	30,1 ± 1,9	24,9 ± 4,9		
<i>Lantana camara</i>	L1 (F)	DCM	8,7 ± 1,0	5,7 ± 1,6	69,5 ± 12,1	12,2
	L2 (F)	DCM	14,1 ± 8,4	12,2 ± 2,9	97,2 ± 2,4	8,0
<i>Nuxia verticillata</i>	L1 (F)	DCM	26,7 ± 9,8	19,6 ± 7,0	70,9 ± 12,8	3,6
	L2 (E)	DCM	27,4 ± 6,6			
		MeOH	36,9 ± 5,7			
	L3 (F)	DCM	10,9 ± 1,8	8,8 ± 1,2	33,7 ± 6,5	3,8
		MeOH	32,7 ± 7,4			
L4 (F)	DCM	22,9 ± 3,1	25,6 ± 11,8			
<i>Ochrosia borbonica</i>	(F)	DCM	23,0 ± 2,9	34,2 ± 2,5		
		MeOH	43,0 ± 18,6			
<i>Psiadia arguta</i>	(F)	DCM	10,1 ± 1,2	8,4 ± 1,1	16,3 ± 6,3	1,9
		MeOH	22,4 ± 2,2	26,1 ± 6,5		
<i>Psiadia dentata</i>	(PA)	DCM	7,1 ± 0,4	7,9 ± 1,2	89,7 ± 1,2	12,6
		MeOH	14,6 ± 2,2	15,0 ± 2,1		
<i>Terminalia bentzoe</i>	L1 (F)	DCM	47,9 ± 1,5			
		MeOH	24,8 ± 4,9	49,1 ± 6,8		
	L2 (F)	DCM	42,7 ± 3,2	21,0 ± 2,1		
		MeOH f.p.	12,8 ± 2,9	12,8 ± 3,5	133,4 ± 26,2	10,4
		MeOH	25,1 ± 5,2	26,2 ± 0,8	115,5 ± 22,9	4,6
L3 (E)	MeOH	8,1 ± 1,3	27,3 ± 4,5	51,9 ± 4,1	6,1	

Tableau II.5 :  $Cl_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) des extraits actifs vis-à-vis des deux souches de *Plasmodium falciparum* et leur index de sélectivité (IS) calculé par rapport à la  $Cl_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) sur des fibroblastes humains, WI-38. ( $n \geq 3$ ). F = feuilles ; E = écorce ; PA = parties aériennes. Les échantillons grisés sont ceux possédant une activité prometteuse.

Du point de vue de la sélectivité basée sur une seule lignée humaine, il apparaît que les extraits DCM de *Lantana camara*, de *Psiadia dentata* et l'extrait MeOH fraîchement préparé des feuilles de *Terminalia bentzoe*, sont nettement sélectifs vis-à-vis de *Plasmodium falciparum*. Les extraits MeOH d'*Aphloia theiformis* et DCM de *Nuxia verticillata* sont modérément sélectifs. Par contre, l'extrait DCM de *Psiadia arguta* est seulement deux fois plus antiplasmodial que cytotoxique. Avant de confirmer ces résultats par des tests *in vivo*, quelques remarques doivent être décrites pour chacune des espèces retenues :

*Aphloia theiformis*

La partie la plus active d'*Aphloia theiformis* est l'extrait polaire de l'écorce de tronc. Le suber de cette espèce s'exfolie spontanément du tronc avec le temps. La récolte de l'écorce n'est donc pas néfaste à l'arbre. De plus, cet arbre se rencontre dans toutes les strates de la végétation (sauf celle du littoral et celle des hautes altitudes) ; cette vaste répartition pourrait s'expliquer par l'ornithochorie. Parmi les échantillons de feuilles, seul celui récolté à plus haute altitude dans la forêt hygrophile montre une légère activité. Le lieu de récolte est donc important pour cette espèce. De plus, à notre connaissance, aucune étude antipaludique n'a encore été publiée pour *Aphloia theiformis*. Ceci renforce l'intérêt de l'espèce.

*Lantana camara*

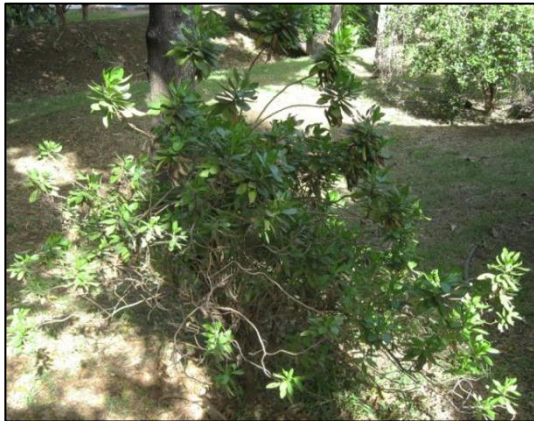
Les deux variétés (à fleurs orange et à fleurs rose) contiennent des composés non polaires potentiellement prometteurs pour une activité antiplasmodiale. Cependant, cette espèce cosmopolite fait

l'objet de nombreuses études pharmacologiques et notamment antiplasmodiales. L'effet de l'extrait DCM des feuilles avait déjà été démontré sur une souche chloroquino-sensible ( $CI_{50} = 11 \mu\text{g/ml}$ ) [38] ; ce qui concorde avec nos résultats. Des études *in vivo* ont également déjà été publiées, montrant une faible inhibition parasitaire de 8 % [84]. Récemment, une légère activité hémolytique a été démontrée pour l'extrait chloroformique (5 % à 125  $\mu\text{g/ml}$ ) [174]. Cette plante ne sera donc pas investiguée dans la suite de l'étude.

*Nuxia verticillata*

Seuls les extraits DCM de *Nuxia verticillata* montrent une certaine activité ; le meilleur extrait étant celui des feuilles récoltées à 650 m d'altitude dans une forêt semi-xérophile et séchées à température ambiante. Selon nos résultats, cette plante donne une grande variabilité de réponse selon le lieu de récolte, ou le mode de séchage. Il semble que les lieux humides tels que Mare-Longue (Réunion) et Gaulettes Serrées (Maurice) ne soient pas favorables à la biosynthèse des composés antiplasmodiaux.



*Psiadia arguta*

Les deux extraits de cette plante présentent une activité antiplasmodiale ; cependant, seul l'extrait DCM, plus actif, a été retenu. Une étude a montré la présence de flavonoïdes possédant des propriétés



antimicrobienne, antivirale, mais aussi cytotoxique contre des fibroblastes humains [195]. Cette dernière information indique que

notre extrait MeOH pourrait également avoir un effet sur la prolifération de la lignée WI-38 ; d'autant plus que l'extrait DCM testé montre une cytotoxicité ( $CI_{50} = 16,3 \mu\text{g/ml}$ ). De plus, une de nos études a montré que la toxicité des extraits DCM et MeOH touche également d'autres lignées cancéreuses humaines [103] (cf. Annexe V). Cette plante pourrait donc faire l'objet d'études antitumorales. L'index de sélectivité calculé étant faible (1,9), les personnes utilisant traditionnellement cette plante devraient être mises en garde contre sa potentielle toxicité. Dans ce cas, l'usage de l'extrait sous forme de *totum* est peu recommandé ; un fractionnement bioguidé permettra de vérifier si les composés cytotoxiques et antiplasmodiaux sont différents.

*Psiadia dentata*

Les extraits polaire et apolaire présentent une activité prometteuse et la cytotoxicité est beaucoup plus faible que chez *P. arguta*. Cette espèce n'a pas beaucoup été investiguée ;

elle semble être un bon candidat pour des études approfondies.

*Terminalia bentzoe*

Les extraits méthanoliques des feuilles et de l'écorce présentent une activité antiplasmodiale prometteuse. Les feuilles ont été récoltées à deux saisons différentes et l'échantillon récolté durant l'été austral est le plus actif. Il semble toutefois sensible à l'oxydation puisque seul l'extrait fraîchement préparé est actif. Quant à l'écorce, elle



semble plus active sur la souche chloroquino-sensible. L'index de sélectivité des deux parties est relativement élevé, montrant une sélectivité de l'activité antiplasmodiale. Aucune étude pharmacologique n'a été publiée sur cette espèce. Cependant, le

genre *Terminalia* est connu pour son utilisation antipaludique traditionnelle dans divers pays d'Afrique. Un chercheur rwandais de notre laboratoire étudie d'ailleurs *Terminalia mollis* pour son action antimalarique. Plusieurs autres études scientifiques [135, 178] ont déjà été menées sur différentes espèces de *Terminalia*, l'extrait polaire d'écorce étant souvent le plus actif *in vitro*. Au niveau phytochimique, l'activité est imputée aux terpènes, aux saponines et aux flavonoïdes détectés dans diverses espèces.

### II.3.B.1. Tests *in vivo*

Afin de confirmer l'activité observée *in vitro* sur les extraits prometteurs, des tests sur souris infestées par *P. berghei* ont été réalisés. Ainsi, les espèces *Aphloïa theiformis*, *Nuxia verticillata*, *Psiadia arguta*, *Psiadia dentata* et *Terminalia bentzoe* ont été retenues et des extraits ont été fraîchement préparés afin de vérifier si leur administration aux souris infestées améliore leur état (diminution de parasitémie). Notons qu'à part *Aphloïa theiformis* que l'on retrouve sur la côte de l'Afrique de l'Est, les autres espèces sont toutes endémiques de l'archipel des Mascareignes. *Lantana camara*, qui a déjà été étudiée sur le plan antipaludique, n'a pas été incluse dans nos tests (afin d'éviter l'usage inutile d'animaux). Par contre, *Psiadia arguta*, malgré un index de sélectivité faible, a été jointe à l'étude *in vivo*, car la cytotoxicité sur fibroblastes humains n'est pas obligatoirement corrélée à une toxicité aiguë.

L'évaluation de la parasitémie est réalisée par des frottis effectués avec une goutte de sang de la queue de chaque souris. Les lames sont fixées et colorées au May-Grunwald et au Giemsa, puis analysées au microscope. La parasitémie est calculée en comptant au moins 500 érythrocytes par lame et en faisant le rapport des érythrocytes parasités et non parasités.

Chaque extrait a été testé sur un groupe de 5 souris. Les extraits ont été injectés dans le péritoine à raison de 200 mg/kg/jour pendant quatre jours. L'extrait MeOH d'*Aphloïa theiformis* n'étant pas complètement soluble à cette concentration, il a été administré par gavage. La survie des souris a été suivie pendant deux semaines.

Pour chaque groupe de souris, la moyenne des parasitémies comptées et la variance (écart-type) ont été calculées. Ce sont ces données qui sont généralement utilisées en statistique afin de comparer des échantillons indépendants. Ainsi, la comparaison avec le contrôle négatif (injection du véhicule : eau contenant 10 % de Tween 80/ Ethanol (7:3)) permet de vérifier si l'effet de réduction de parasitémie des extraits testés est significative.

Le protocole a été établi sur la base du « 4-days suppressive test » [57]. Les résultats de parasitémie sont premièrement exposés dans la chronologie des périodes de tests. Ensuite, afin de discuter et de comparer plus aisément les extraits réunionnais, l'inhibition parasitaire a été calculée en fonction des résultats du témoin négatif de chaque test et a été exposé dans un même graphique (fig. II.8).

#### Première série

Durant ce premier test, les extraits méthanoliques de l'écorce d'*Aphloïa theiformis* et des feuilles de *Terminalia bentzoe*, ainsi que l'extrait dichlorométhanique des feuilles de *Psiadia arguta* ont pu être testés.

L'utilisation de chloroquine comme contrôle (témoin positif) est recommandé par le « 4-days suppressive test ». Un test statistique de t-student a permis de comparer les moyennes du groupe témoin négatif avec les échantillons testés afin de confirmer une différence statistiquement significative. Seul l'extrait MeOH de *Terminalia bentzoe* à la dose de 50 mg/kg possède un  $p < 0,05$  (fig. II.6.). Cet extrait diminue donc significativement la parasitémie chez la souris infestée par *P. berghei* par rapport au groupe contrôle négatif.

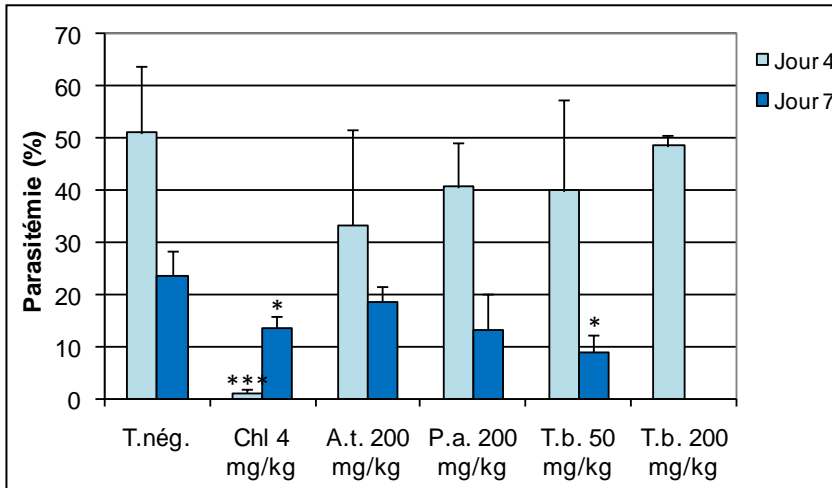


Figure II.6 : Moyenne et écart-type du pourcentage en parasitémie des groupes testés. Les extraits ont été administrés par voie intrapéritonéale sauf pour A.t. par voie orale. Chl = chloroquine ; A.t. = *Aphloia theiformis* ; P.a. = *Psiadia arguta* ; T.b. = *Terminalia bentzoe* ; \* =  $P < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ .

### Deuxième série

Les extraits méthanoliques des feuilles de *Psiadia dentata* et les extraits dichlorométhaniques des feuilles de *Nuxia verticillata* et de *Psiadia dentata* ont pu être testés lors de cette deuxième expérience sur souris. Cette fois, l'extrait méthanolique de quinquina a été choisi comme contrôle (témoin positif) car la chloroquine, étant une substance pure, pourrait avoir une pharmacocinétique trop différente de celle des extraits de plantes.

Le test de t-student a mis en évidence les extraits statistiquement significatifs. Il apparaît que tous les extraits testés à la dose utilisée inhibent la parasitémie par rapport au groupe témoin négatif (fig. II.7).

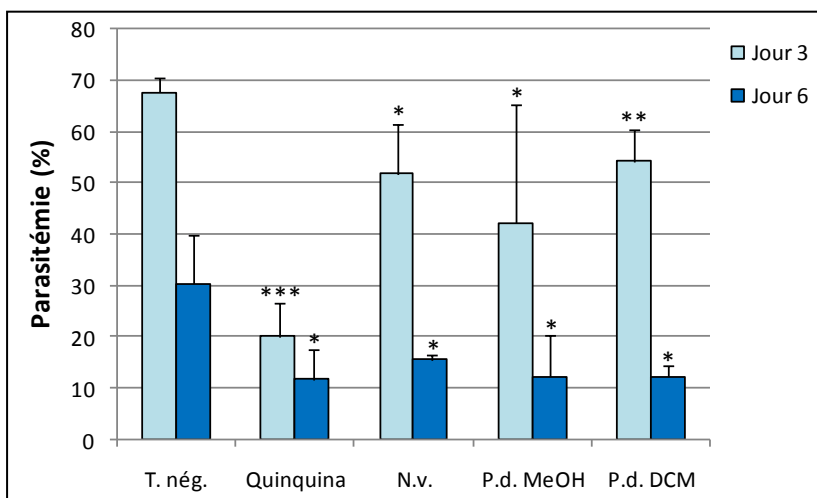


Figure II.7 : Moyenne et écart-type du pourcentage en parasitémie des groupes testés. Les extraits ont été administrés par voie intrapéritonéale à 200 mg/kg. N.v. = *Nuxia verticillata* ; P.d. = *Psiadia dentata* ; \* =  $P < 0,05$  ; \*\* =  $p < 0,005$  ; \*\*\* =  $p < 0,0005$ .



### Comparaison des extraits selon l'inhibition parasitaire calculée en fonction des témoins négatifs

L'intérêt des tests préliminaires *in vivo* est de vérifier si l'extrait a tendance à inhiber la parasitémie et si les souris survivent plus longtemps que les souris du groupe témoin négatif. Pour chaque série de tests, l'inhibition de la parasitémie d'un extrait est calculée par rapport à la parasitémie du témoin négatif au même jour.

La figure II.8. expose les résultats obtenus pour chaque extrait ; l'inhibition parasitaire du témoin négatif de chaque test valant 0 n'a pas été incluse dans le graphique.

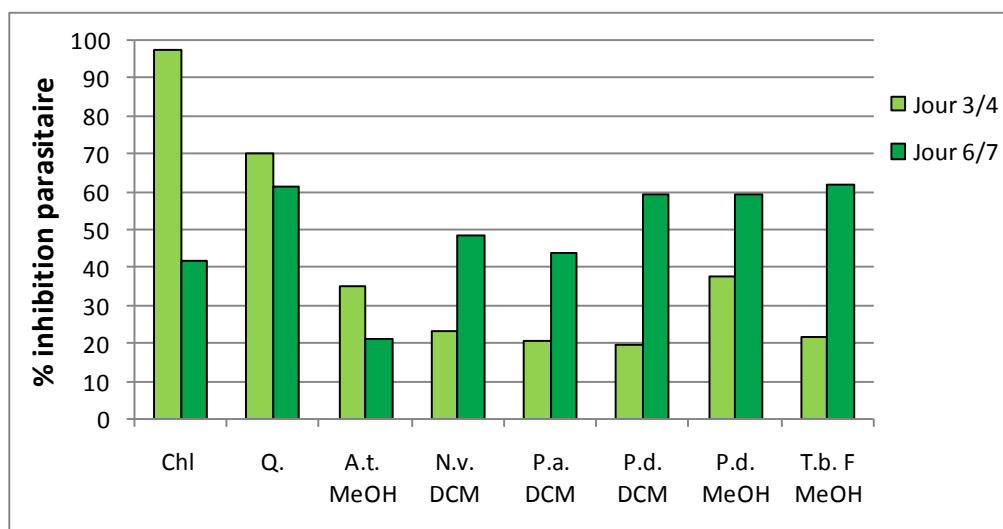


Figure II.8 : Comparaison de l'activité inhibitrice des extraits de plantes des Mascareignes vis-à-vis de *Plasmodium berghei*. Les extraits ont été administrés en I.P. sauf A.t. per os. Chl = chloroquine (4 mg/kg) ; Q. = Quinquina (150 mg/kg) ; A.t. = *Aphloïa theiformis* (200 mg/kg) ; N.v. = *Nuxia verticillata* (200 mg/kg) ; P.a. = *Psiadia arguta* (200 mg/kg) ; P.d. = *Psiadia dentata* (200 mg/kg) ; T.b. F = *Terminalia bentzoe* Feuilles (50 mg/kg).

Le test réalisé est un test préliminaire ne prenant pas en compte la pharmacocinétique (encore inconnue) de la drogue végétale. Nous remarquons que contrairement au témoin positif utilisé (chloroquine et extrait MeOH de quinquina), la plupart des extraits testés sont plus actifs au jour 6/7. Ces variations de parasitémie peuvent être dues à de nombreux facteurs variables d'une drogue à l'autre, tels que métabolisation et vitesse d'élimination. Le système immunitaire pourrait également jouer un rôle dans cette variation. Les extraits de plantes pourraient avoir un effet immunomodulateur. Le test standard « 4-day suppressive test » utilisé ne permet donc pas de distinguer la cause, mais uniquement l'effet observé (diminution ou inhibition parasitaire).

Au final, quatre extraits réduisent la parasitémie significativement : l'extrait DCM de *Nuxia verticillata*, les extraits MeOH et DCM de *Psiadia dentata* et l'extrait MeOH de *Terminalia bentzoe* à 50 mg/kg. La dose de 200 mg/kg a un effet toxique tant pour l'extrait MeOH des feuilles que pour celui de l'écorce de tronc de *T. bentzoe* ; les souris présentaient une paralysie des membres inférieurs, des poils ébouriffés et une mort précoce (avant la fin du traitement).

Les souris infestées par *Plasmodium berghei* et non-traitées (témoin négatif) meurent après environ 8 jours. Le suivi de la survie des souris peut donner une indication sur l'éventuelle toxicité d'un extrait. Ainsi, si un groupe meurt avant le groupe négatif ou avant la fin du traitement (qui dure quatre jours), cela peut signifier que l'extrait est toxique.

En analysant la survie des souris contrôlées pendant deux semaines (fig. II.9.), il semble que l'extrait DCM de *P. dentata* à 200 mg/kg ait un léger effet toxique ou affaiblit les souris puisque les souris meurent un peu avant celles du témoin non traité. Les groupes traités par les extraits d'écorce et de feuilles de *Terminalia bentzoe* à 200 mg/kg/jour meurent après 3-4 jours, révélant une toxicité. Les seuls extraits permettant la survie des souris pendant 14 jours sont l'extrait d'*Aphloia theiformis* à 200 mg/kg et celui de *Terminalia bentzoe* à 50 mg/kg. L'extrait MeOH de *Psiadia dentata* a permis la survie de 60 % des souris pendant 12 jours.

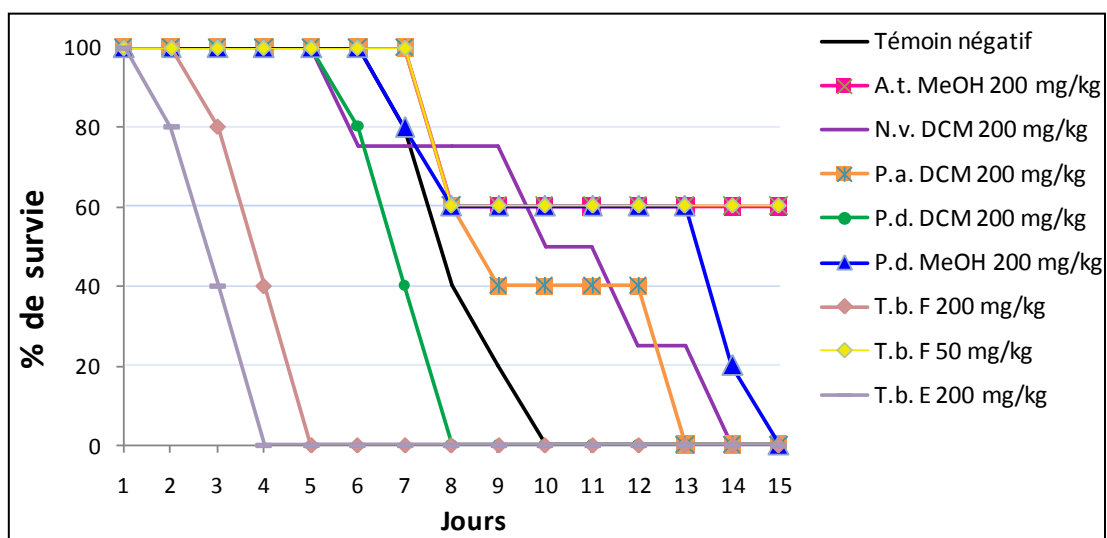


Figure II.9 : Pourcentage de survie des souris dans chaque groupe pendant 14 jours.  
Légende : cf. fig. II.8 ; T.b. E (*Terminalia bentzoe* Ecorce).

En résumé, les extraits validés par les tests *in vivo* pour leur réponse positive tant au niveau de la réduction parasitaire qu'au niveau de survie sont l'extrait MeOH de *Psiadia dentata* et l'extrait MeOH de *Terminalia bentzoe*. Il est évident que ce test préliminaire permet uniquement une sélection d'extraits les plus intéressants aux doses testées et que les extraits n'étant pas retenus lors de ces tests ne sont pas pour autant inactifs. Il faudrait utiliser différentes doses et un mode d'administration par voie orale pour le confirmer.

### II.3.C. Conclusion

L'île de la Réunion, grâce à sa géomorphologie et sa variété de climats, offre une végétation des plus diversifiées allant d'espèces côtières à des espèces altimontaines en passant par des espèces tropicales. L'installation tardive de l'homme sur l'île (à partir du 17<sup>e</sup> siècle) a permis le développement et le maintien de nombreuses espèces végétales endémiques. L'île fait d'ailleurs partie, avec Rodrigues, Maurice et Madagascar, des 34 hotspots en biodiversité mondiale. La Réunion, grâce à ses altitudes élevées, a cependant

réussi à maintenir 30 % de sa forêt primaire. Actuellement, de nombreuses structures locales aident à la conservation et à la découverte de cette flore exceptionnelle.

L'île de la Réunion a également une caractéristique intéressante au niveau ethnologique. Les habitants actuels de la Réunion sont issus de diverses sociétés qui ont cohabité et fini par former une identité culturelle unique. La médecine populaire créole s'est également créée par interaction entre les divers groupes sociaux (Français, Afro-Malgaches et Indiens hindouistes). Au final, cette médecine traditionnelle est une synthèse magico-religieuse entre les croyances catholiques, indiennes et les pratiques de guérisseurs afro-malgaches. Les apports phytothérapeutiques proviennent essentiellement des Afro-Malgaches reconnaissant la flore de chez eux. Les agents de santé locaux utilisant les plantes sont appelés « tisaneurs ». Ces tisaneurs sont encore souvent sollicités par la population, car ils font partie de la culture créole et restent pour le peuple réunionnais une identité culturelle. De nombreux mouvements émis par toutes les strates de la population existent sur l'île pour valoriser et régulariser l'usage des plantes médicinales (associations, laboratoires universitaires, politique régionale, agriculteurs).

Au niveau d'étude de laboratoire, les plantes des Mascareignes ont déjà fait l'objet de nombreux criblages pharmacologiques et chimiques donnant pour certains d'excellents résultats. Cependant, très peu de plantes ont été étudiées de manière approfondie. Des efforts auprès des organismes de recherche devraient donc être fournis pour poursuivre les études et aboutir au final à l'élaboration de monographies permettant l'utilisation d'extraits de plantes standardisés ou la découverte de nouveaux médicaments qui pourraient être valorisés au niveau international.

Dans ce contexte, notre recherche de plantes à activité antiplasmodiale a permis de sélectionner des candidats intéressants pour des études approfondies (qui pourraient être réalisées grâce au maintien de notre collaboration avec l'Université de la Réunion).

Au total, 33 échantillons issus de 20 espèces différentes ont été collectés. Des tests pharmacologiques préliminaires *in vitro* ont permis de définir les extraits les plus actifs vis-à-vis du *Plasmodium falciparum*. Sur les 66 extraits méthanoliques et dichlorométhaniques testés, 9 extraits (issus de 6 espèces différentes) possèdent une activité antiplasmodiale prometteuse. Les tests *in vivo* ont confirmé l'intérêt de deux plantes : *Psiadia dentata* et *Terminalia bentzoe*, deux espèces endémiques de l'archipel des Mascareignes. Ces résultats soulignent l'importance du maintien de la biodiversité.

Notons que pour ces deux espèces, l'extrait polaire est le plus intéressant au niveau pharmacologique, mais l'extrait de *T. bentzoe* semble contenir des composés instables puisque l'activité *in vitro* diminue avec le temps. De plus, à 200 mg/kg/jour, l'extrait semble engendrer une toxicité pour les souris par voie intrapéritonéale. Cependant d'autres espèces de *Terminalia* sont étudiées dans la lutte contre la malaria, ce qui confirme l'intérêt de cette espèce.

Des coumarines et des flavonoïdes ont déjà été isolés des feuilles de *Psiadia dentata*, mais cette espèce n'a jamais été étudiée pour une activité antimalarique. Ces deux plantes sont donc les candidates prioritaires pour des études phytochimiques et pharmacologiques approfondies. Notons que les autres espèces étudiées ne doivent pas

être directement considérées comme inactives contre le Plasmodium puisque la variation de principes actifs au sein d'un même individu est bien connue. Il faudrait récolter d'autres lots d'une même espèce à des endroits différents et à des périodes différentes pour compléter l'étude antiplasmodiale. L'idéal serait de tester également des extraits aqueux des plantes utilisées traditionnellement et de les administrer à des souris par voie orale.

## **PARTIE 2 : LES PLANTES DU CAMBODGE**



## CHAPITRE III :

### Contribution à l'étude de *Fagraea fragrans* Roxb.

---

#### III.1. INTRODUCTION : TRAVAUX ANTERIEURS

##### III.1.A. Criblage antiplasmodial préliminaire

*Fagraea fragrans* Roxb. a été sélectionné suite à des enquêtes ethnobotaniques menées au Cambodge en 2002, 2003 et 2004 auprès de la population locale en compagnie d'un tradipraticien, d'un botaniste et d'un pharmacien de l'Université de Phnom Penh [37]. Ils ont interrogé la population sur les plantes utilisées traditionnellement pour traiter des fièvres, notamment d'origine paludéenne. L'équipe a sélectionné vingt-huit plantes indigènes. Une fois récoltées et séchées au Cambodge, les plantes ont été testées *in vitro* à l'Université d'Aix-Marseille II sous forme d'extraits polaires (eau et méthanol) et apolaires (dichlorométhane) sur la souche chloroquino-résistante (W2) du *Plasmodium falciparum* afin de retenir les extraits actifs et ainsi sélectionner les plantes à étudier.

Les résultats obtenus pour *F. fragrans* semblaient assez prometteurs avec des IC<sub>50</sub> de 13 et 33 µg/ml pour les extraits DCM et MeOH de branches (écorce et bois) respectivement, et de 21 µg/ml en ce qui concerne l'extrait DCM de feuilles (l'extrait MeOH de feuilles ayant une IC<sub>50</sub> supérieure à 50 µg/ml était considéré inactif) [91].

##### III.1.B. Données botaniques

La systématique (classement de taxons) est en constante évolution de par les techniques développées dans le domaine et les nouvelles espèces végétales découvertes. Actuellement, dans l'embranchement des Angiospermes (qui comprend les espèces terrestres les plus abondantes), deux systèmes de classification sont officiellement acceptés : la classification classique (dite de Cronquist, 1981) qui se base sur les caractères anatomiques, morphologiques des plantes et qui est encore utilisée par ITIS (Integrated Taxonomic Information System). Le deuxième système est la classification phylogénétique (dite APG III - Angiosperm Phylogeny Group, 2009) qui se base principalement sur le séquençage de gènes chloroplastiques et/ou ribosomiaux mais inclut aussi les caractères anatomiques, morphologiques, chimiques et palynologiques (étude des grains de pollen et spores de plantes fossiles ou actuelles). Grâce à cela, l'embranchement des Angiospermes n'est plus divisé selon le nombre de cotylédons (monocotylées ou dicotylées dans la classification classique), mais selon le nombre de pores des grains de pollen (ouvertures). La principale différence entre les deux systèmes de classification réside dans le groupe des « dicotylées ».

La classification classique est encore fortement utilisée, car elle correspond à la dernière version acceptée du point de vue de l'observation macroscopique. Pour de nombreux taxons, elle rejoint la systématique moléculaire, mais lorsque les espèces sont séparées récemment dans l'histoire de l'évolution, il y a divergence d'opinions. En effet, la

classification phylogénétique comporte quelques difficultés supplémentaires quant à l'interprétation de l'importance d'une mutation et de son apparition. Ainsi, le poids d'un caractère est interprété différemment par les différentes écoles taxonomiques.

Dans le cas de *Fagraea fragrans*, il est intéressant de constater que, selon l'une ou l'autre classification, cette espèce ligneuse fait partie de la famille des Loganiaceae ou des Gentianaceae (tableau III.1). Du point de vue morphologique et anatomique, ces deux familles sont en effet très proches. Elles font toutes les deux parties de l'ordre des gentianales (plantes ligneuses ou herbacées, souvent lactificères, à feuilles simples, entières et opposées ; les fleurs sont isostémones, souvent actinomorphes, en entonnoir et à corolle à préfloraison tordue, à ovaire supère).

Classification classique	Classification phylogénétique
Règne : Plantae	Règne : Plantae
Sous-règne : Tracheobionta	Sous-règne : Tracheobionta
Embranchement : Magnoliophyta, contient 2 classes	Division : Magnoliophyta (angiospermes, plantes à fleurs)
Classe : Magnolopsida (dicotylédones), contient 6 sous-classes	Clade : Eudicotyledone (dicotylédones vraies)
	Eudicotylédones supérieures (Noyaux des dicotylédones vraies)
Sous-classe : Asteridae, contient 9 ordres	Clade : Astéridées
	Clade : Lamidées (euastéridées I)
Ordre : Gentianales, contient les familles Apocynaceae, Asclepiadaceae, Gentianaceae, Loganiaceae	Ordre : Gentianales, contient les familles Apocynaceae, Gelsemiaceae, Gentianaceae, Loganiaceae, Rubiaceae
Famille : Loganiaceae, contient 8 sous-familles	Famille : Gentianaceae, contient 6 tribus
Sous-famille : Potalieae	Tribu : Potalieae, contient 3 subtribus
	Subtribus : Potaliinae, contient 3 genres (inclus avant dans les Loganiaceae)
Genre : <i>Fagraea</i>	Genre : <i>Fagraea</i>

Tableau III.1 : Hiérarchie taxonomique de *Fagraea fragrans* selon les deux types de classification actuelle.

Les Gentianaceae ont une distribution cosmopolite et sont une famille très variée : plantes herbacées ou ligneuses, à feuilles généralement opposées-décussées, simples et entières, à nervation pennée, dépourvues de stipule ; inflorescence en cyme ou fleur solitaire ; fleurs 4 ou 5-mères cycliques, gamopétales, généralement actinomorphes ; étamines 4-(12) insérées sur le tube de la corolle et alternant avec les lobes de celle-ci. Gynécée formé de deux carpelles soudés avec un disque glanduleux à la base ; ovaires supères, placentation pariétale ; fruits généralement des capsules déhiscentes à une loge, graines nombreuses et petites.



Mais ces caractéristiques peuvent se retrouver également chez les Loganiaceae. C'est pourquoi l'historique de la taxonomie du genre *Fagraea* (ainsi que deux autres genres proches : *Anthocleista* et *Potalia*) est complexe.

MEISNER (1840)	BENTHAM (1856)	BENTHAM & HOOKER f. (1876)	LEENHOUTS (1963)
I SPIGELIOIDEAE (as Spigeliaceae) Spigelia	I <b>Antonieae</b> Antonia Usteria Norrisia	I <b>Gelsemieae</b> Gelsemium Mostuea Plocosperma	I <b>Potalieae</b> 1 Potalia 2 Anthocleista 3 Fagraea
II STRYCHNOIDEAE (as Strychnaceae) <b>Labordieae</b> Labordia <b>Strychneae</b> (as Eustrychneae) Strychnos Ignatia (Rubiaceae at present) <b>Gardnerieae</b> Gardneria <b>Antonieae</b> Antonia	II <b>Loganieae</b> (as Euloganieae) Geniostoma Spigelia Mitreola Mitrascacme Polypremum Logania Gomphostigma Nuxia Chilianthus (= Buddleja) Buddleja	II <b>Loganieae</b> (as Euloganieae) <i>Spigeliinae</i> (as Spigeliaceae) Spigelia Mitreola Mitrascacme <i>Buddlejiniae</i> (as Buddleieae) Polypremum Logania Geniostoma Labordia Gomphostigma Nuxia Chilianthus (= Buddleja) Buddleja Emorya Nicodemia (= Buddleja) <i>Fagraeinae</i> (as Fagraeeae) Desfontainia Fagraea Potalia Anthocleista	II <b>Buddlejeae</b> 4 Peltanthera 5 Sanango 6 Nuxia 7 Androya 8 Gomphostigma 9 Buddleja 10 Emorya 11 Adenoplusia (= Buddleja) 12 Adenoplea (= Buddleja)
III LOGANIOIDEAE (as Loganieae) <b>Usterieae</b> Usteria <b>Loganieae</b> (as Euloganieae) Logania Haemospermum (= Geniostoma) Geniostoma <b>Fagraeeae</b> Fagraea Cyrtophyllum (= Fagraea) Picrophleus (= Fagraea) <b>Gaertneraeae</b> (Rubiaceae at present)	III <b>Fagraeeae</b> Desfontainia Fagraea Potalia Anthocleista Strychnos Brehmia (= Strychnos) Labordia Nicodemia (= Buddleja)	III <b>Antonieae</b> 13 Bonyunia 14 Antonia 15 Norrisia 16 Usteria	III <b>Antonieae</b> 13 Bonyunia 14 Antonia 15 Norrisia 16 Usteria
IV POTALIOIDEAE (as Potalieae) Potalia Anthocleista	IV <b>Gaertneraeae</b> (as Gaertnerieae) Gardneria Pagamea (Rubiaceae at present) Gaertnera (Rubiaceae at present)	IV <b>Gaertneraeae</b> (as Gaertnerieae) Gardneria Pagamea (Rubiaceae at present) Usteria Norrisia Antonia Bonyunia Peltanthera <i>Strychninae</i> (as Strychneae) Strychnos Couthovia (= Neuburgia)	IV <b>Gelsemieae</b> 17 Gelsemium 18 Mostuea V <b>Strychneae</b> 19 Strychnos 20 Gardneria 21 Neuburgia
		III <b>Gaertneraeae</b> Gaertnera (Rubiaceae at present) Pagamea (Rubiaceae at present) Gardneria	VI <b>Loganieae</b> 22 Geniostoma 23 Labordia 24 Logania VII <b>Spigeliaceae</b> 25 Polypremum 26 Cynoctonum (= Mitreola) 27 Spigelia 28 Mitrascacme Doubtful Retzia Desfontainia

Tableau III.2 : Historique de la classification du genre *Fagraea*. Source Bisset et al. [23].

Au début de la découverte de *Fagraea*, PERSOON (1805) inclut le genre chez les apocynacées (faisant également partie des gentianales), puis en 1810 Robert BROWN d'abord le plaça chez les Gentianaceae et 4 ans plus tard chez les Loganiaceae. En 1837,

G. DON créa une nouvelle famille (Potaliaceae) pour regrouper uniquement les genres *Fagraea*, *Anthocleista* et *Potalia*, mais plaça les genres *Picrophleus* et *Cyrtophyllum* (considérés actuellement comme deux synonymes de *Fagraea*) dans une famille parallèle, les Strychnaceae. Peu de temps après (tableau III.2), MEISNER (1840) regroupe ces 3 synonymes dans la tribu des Fagraeae (sous famille des Loganioideae), mais les sépare des deux autres genres proches (sous-famille des Potalioideae). Son collègue BENTHAM corrige l'erreur en 1856. Bien plus tard, LEENHOUTS (1963) replace les trois genres dans la tribu des Potalieae.

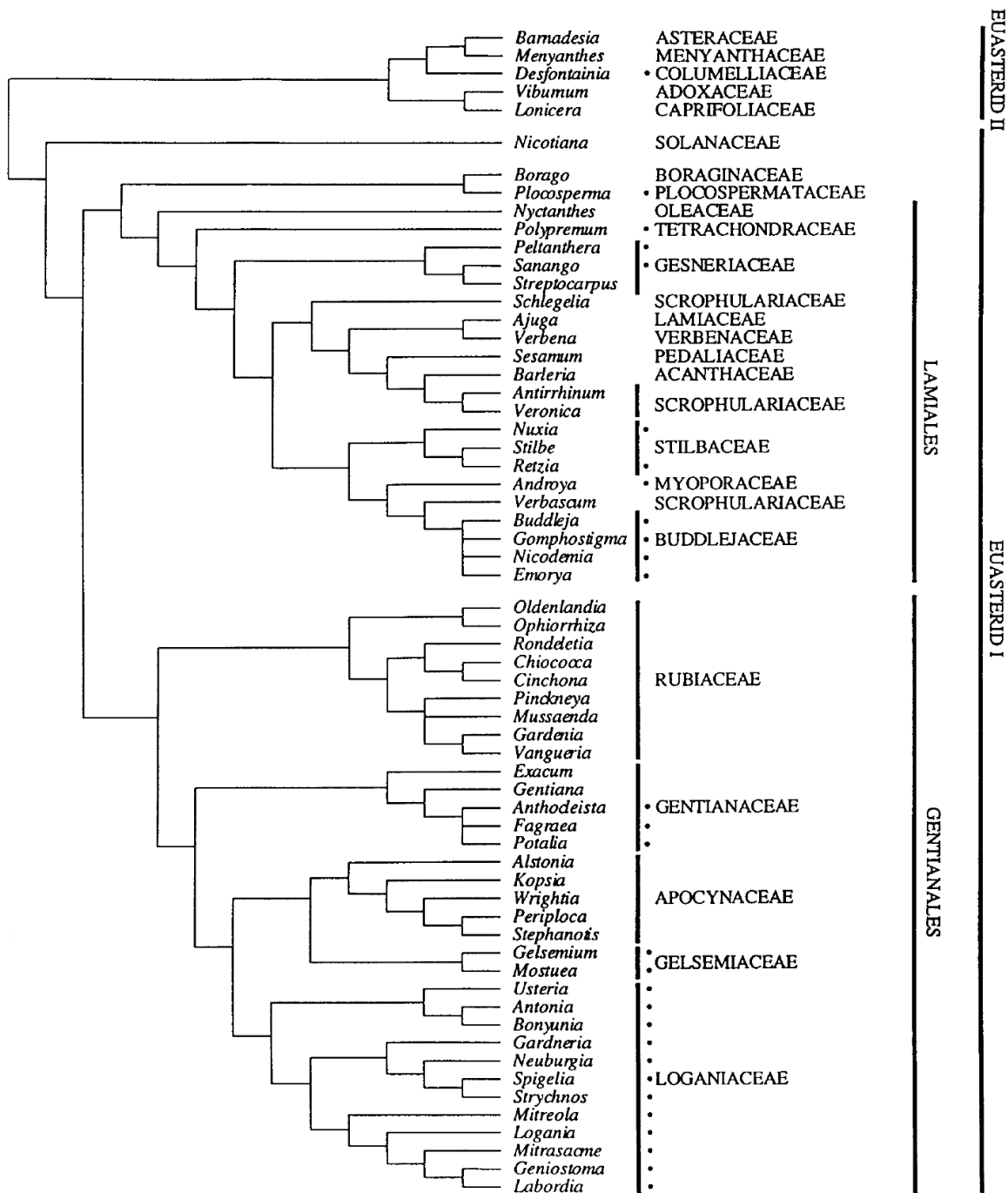


Figure III.1 : Arbre phylogénétique des lamiales et des gentianales (issu d'un consensus entre 12 arbres équitablement parcimonieux). Les taxa indiqués par un point (•) étaient classés chez les Loganiaceae par Leeuwenberg et Leenhouts. Source Backlund et al. [10].

Finale­ment pour LEEUWENBERG (1980), les Loganiaceae sont divisées en 10 tribus dont celle des Potalieae [23]. Bien que quelques-uns de ses collègues (Foserg et Sachet, 1974) et prédécesseurs (Bureau, 1956) aient toujours placé les Potalieae dans les Gentianaceae, Cronquist garde la classification de Leeuwenberg. Cette classification est reprise dans la classification classique (tableau III.1).

Grâce à l'analyse gé­né­ti­que, de nouveaux caractères moléculaires ont permis de bien distinguer la famille des Loganiaceae et celle des Gentianaceae et leurs tribus respectives (fig. III.1). Suite à l'analyse des gènes *rbcL* et *ndhF* du gé­nome chloroplastique en utilisant la méthode du maximum de parcimonie, les auteurs confirment la présence du genre *Fagraea* dans la famille des Gentianaceae ; hypothèse appuyée par des synapomorphies (caractères dérivés communs entre des groupes) morphologiques qui avaient déjà été mises en évidence [10].

De plus, selon la chimi­to­xa­no­mie, les Loganiaceae sont reconnues pour renfermer des alcaloïdes et des iridoïdes, et les Gentianaceae, des iridoïdes uniquement. Ceci confirme la position de *Fagraea* (plus généralement la tribu Potalieae) dans les Gentianaceae [98].

De notre point de vue et sans rentrer dans les détails de la taxonomie évolutive, nous optons pour la classification APG III qui nous semble la plus poussée et la plus complète. Nous adoptons, dès lors, cette classification pour l'ensemble de cette thèse.

### Description botanique

*Fagraea fragrans* Roxb. est un arbre qui peut atteindre 15 à 30 m de hauteur. L'écorce est caracté­ri­sée par de profondes fissures. Les feuilles sont entières, elliptiques ou oblancéolées, courtement et brusquement acuminées au sommet, rétrécies à la base, à marge faiblement ondulée et repliée à l'état sec. Les fleurs sont réunies en corymbes axillaires ou terminaux très ramifiés, composés de 20 à 30 fleurs. Les fruits sont bacciformes, presque globuleux, rougeâtres, atteignant au plus 1 cm de diamètre. La floraison a lieu de février à mars et la fructification se déroule de mai à juin. Les feuilles et les fruits sont très amers [157].



**Synonymes :** *Fagraea cochinchinensis* A. Chev. ; *Fagraea peregrina* Bl. ; *Cyrtophyllum giganteum* Ridl. ; *Cyrtophyllum fragrans* A. DC. ; *Cyrtophyllum peregrinum* Blume

### Répartition géographique et habitat

On retrouve *Fagraea fragrans* en Inde, en Indonésie, en Malaisie et en Nouvelle Calédonie. Cet arbre est très commun au Cambodge et au Sud-Vietnam. Il pousse surtout dans des forêts secondaires où le sol est régulièrement inondé mais jamais dans des endroits d'eau stagnante. Il a également la capacité de se développer dans des zones incendiées [168]. *F. fragrans* est cultivé pour le bois à Java et en Malaisie ; sa croissance est très lente et l'arbre ne peut être abattu qu'après 30 ans, ce qui en fait un bois noble.

### III.1.C. Utilisations ethnobotaniques

Le bois étant robuste, il est utilisé en construction dans les régions où il croît. En Birmanie, il est considéré comme bois sacré et est utilisé pour faire les poteaux des temples bouddhiques [51]. L'écorce serait irritante et provoquerait des dermatites ; cet effet n'est pas observé avec le bois dépourvu de son écorce [134].

#### Usages en médecine traditionnelle

Au Cambodge : on l'utilise pour le traitement de la fièvre paludique. L'infusion de l'écorce est prise par les personnes âgées pour assurer la longévité. La décoction des feuilles est utilisée pour laver la gale. Les feuilles et les rameaux en décoction sont utilisés comme hémostatique dans le traitement de dysenteries hémorragiques [49, 157].

En Malaisie : la décoction de l'écorce est utilisée contre le paludisme et celle des feuilles et des petites branches est utilisée pour le traitement de la dysenterie [194].

A Bornéo : les feuilles et les fruits sont utilisés contre les fièvres [156]

Aux Philippines : *Fagraea fragrans* est utilisé comme fébrifuge [156].

#### Mode de préparation traditionnelle au Cambodge

Nom vernaculaire cambodgien : Tatrao, Trai

Il n'y a aucune contrainte saisonnière et temporelle pour la récolte de la drogue. En effet, le climat du Cambodge étant bisaisonnier (saison des pluies et saison sèche), les arbres gardent leurs feuilles toute l'année. Aucune contrainte n'existe non plus quant à la personne autorisée à la cueillette ; le système de médecine traditionnelle est applicable par tous car il n'existe aucun rituel magico-religieux lié à la récolte ou à l'utilisation.

Pour le séchage, les drogues végétales (écorce et feuilles) sont placées dans un endroit sec, à l'ombre, à température ambiante (~ 30° C). Une fois séchées, elles sont coupées en petits morceaux ou broyées si des outils le permettent. Elles peuvent être conservées 1 an à l'abri de l'humidité. Le mode d'administration est une décoction à boire chaude.

### III.1.D. Données phytochimiques

Bien que son utilisation traditionnelle soit souvent mentionnée et qu'il ait une certaine renommée dans les régions où il croît [134], *Fagraea fragrans* n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études scientifiques. Les premiers travaux phytochimiques, effectués



dans les années 60, décrivaient la présence d'un alcaloïde monoterpénique, la gentianine, extraite à partir des feuilles par ajout d'ammoniaque et de chloroforme [194]. Dix ans plus tard, l'équipe de Wan a réisolé cet alcaloïde à partir des jeunes branches de l'arbre, mais ils supposaient qu'il s'agissait d'un artefact d'extraction par l'ammoniaque produit probablement à partir du gentiopicroside [136]. A l'époque, ce séco-iridoïde n'avait encore jamais été décrit dans le genre *Fagraea*.

Ce n'est qu'à partir des années 90 que des chercheurs ont isolé le gentiopicroside et le swéroside, un autre séco-iridoïde abondant chez les Gentianaceae, dans différentes espèces de *Fagraea* : *F. gracilipes* [30], *F. obovata* et *F. ceylanica* [98]. De nouveaux iridoïdes (les bluméosides) ont également été décrits dans une autre espèce, *F. blumei* [41]. Des lignanes et des phénols ont été retrouvés dans *Fagraea racemosa* [145]. Une autre classe phytochimique est aussi présente dans le genre *Fagraea* : des chercheurs ont isolé un flavonoïde, la swertisine, à partir de *F. obovata* [169] et de *F. blumei* [41]. Dernièrement, le stigmasterol et le  $\beta$ -sitosterol ont été isolés à partir d'un extrait chloroformique d'écorce de tronc de *Fagraea fragrans* provenant de Singapour [130].

En conclusion, seul un artefact (la gentianine) et deux phytostérols ont été clairement décrits dans l'espèce *Fagraea fragrans*. Une étude phytochimique approfondie était donc nécessaire pour qualifier son contenu afin de posséder une empreinte phytochimique spécifique de cette espèce. A priori, en se basant sur la chimiotaxonomie, nous pouvions retrouver des iridoïdes, des flavonoïdes, des phénols et des lignanes.

### III.1.E. Données pharmacologiques

Aucune étude pharmacologique d'un extrait de *Fagraea fragrans* n'avait été publiée avant le criblage antiplasmodial des plantes cambodgiennes [91]. Par contre, l'équipe de Natarajan avait testé la gentianine, isolée à partir des feuilles de *Fagraea fragrans*, *in vivo* vis-à-vis de *Plasmodium berghei* et *in vitro* contre *Entamoeba invadens*. Ils ont conclu que la gentianine n'avait aucune activité antimalarique ni anti-amibienne [136].

Par ailleurs, deux études ont été menées sur d'autres espèces de *Fagraea*. La première étude portait sur l'activité anti-oxydante de *F. blumei*. Les bluméosides contenus dans l'extrait méthanolique ont une activité antiradicalaire démontrée sur le DPPH [41]. La deuxième étude investiguait l'effet analgésique de l'extrait polaire de *F. racemosa* ; cette espèce est traditionnellement utilisée pour soigner les fièvres. L'activité analgésique (*Tail pressure test*, *Acetic acid induced writhing test*) et un effet relaxant sur des contractions induites de l'aorte, observé dans l'extrait, ont été attribués à un lignane [145].

Au vu des utilisations traditionnelles et des recherches pharmacologiques réalisées sur ces espèces du genre *Fagraea*, *F. fragrans* pourrait aussi faire l'objet de plusieurs types d'études pharmacologiques dans les domaines suivants : antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, anti-oxydant, antiparasitaire et antimicrobien. Dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons aux tests antipaludiques. Nous avons cependant eu l'occasion de tester quelques fractions des extraits dichlorométhaniques des feuilles et de l'écorce de *F. fragrans* en présence de macrophages murins stimulés par des LPS. Cela nous a permis de calculer l'inhibition de la surproduction d'oxyde nitrique et ainsi

évaluer une activité anti-inflammatoire *in vitro* (résultats présentés dans l'annexe V : posters)

## III.2. TRAVAUX PERSONNELS

### III.2.A. Etude phytochimique

#### III.2.A.1. Criblage phytochimique

Comme *Fagraea fragrans* est très peu connu sur le plan phytochimique, un criblage a été réalisé pour obtenir une première indication des classes phytochimiques contenues dans cette plante. Gardons à l'esprit que cet examen a une sensibilité moindre et met en évidence les classes majoritaires uniquement.

Les résultats obtenus se trouvent dans le tableau III.3. L'extrait méthanolique d'écorce de tronc contiendrait principalement des iridoïdes, des acides phénols, des tanins galliques et catéchiques. L'extrait dichlorométhane contiendrait des terpènes. La présence d'alcaloïdes n'étant détectée que lorsque la drogue est macérée avec de l'ammoniaque, il s'agit probablement de la gentianine dont la présence a déjà été reportée comme artéfact d'extraction. En ce qui concerne les feuilles, l'extrait dichlorométhane ne renfermerait que quelques terpènes, la majorité des constituants étant des chlorophylles. L'extrait polaire des feuilles renfermerait des iridoïdes, des flavonoïdes, des tanins galliques et peut-être des saponines.

Classe phytochimique	Ecorce de tronc	Feuilles
<i>Alcaloïdes</i>	+	-
<i>Flavonoïdes</i>	-	+++
<i>Acides phénols</i>	+++	-
<i>Anthraquinones</i>	-	-
<i>Anthocyanes</i>	-	-
<i>Tanins galliques</i>	+++	+++
<i>Tanins catéchiques</i>	+++	-
<i>Iridoïdes</i>	+	+
<i>Saponines</i>	-	+
<i>Coumarines</i>	-	-
<i>Hétérosides cardiotoniques</i>	-	-
<i>Terpènes</i>	+++	+

Tableau III.3 : Classes phytochimiques présentes dans l'écorce de tronc et les feuilles de *Fagraea fragrans*.

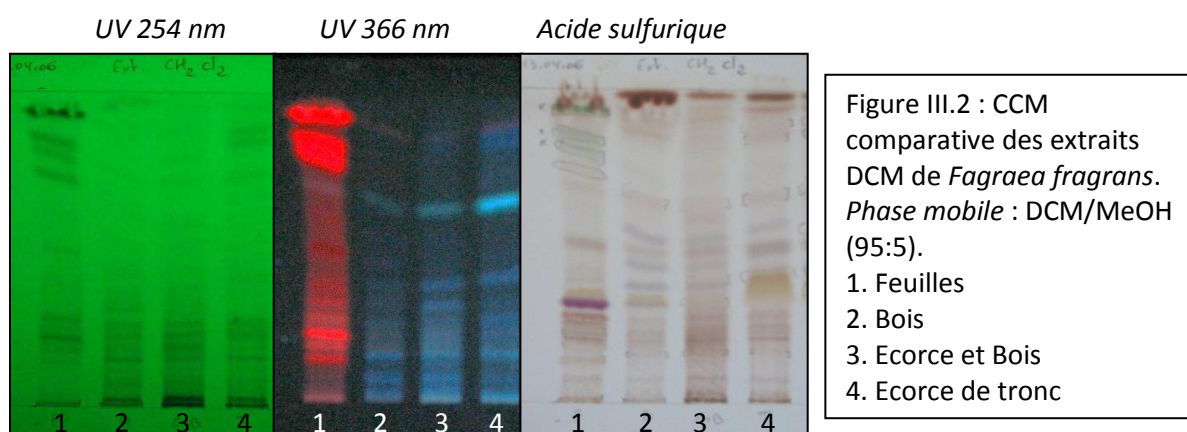
Le groupe des tanins, vu leur propriété de former des complexes avec les macromolécules (précipitation des protéines), ne montre généralement aucune spécificité d'action biologique (inhibiteur enzymatique) et n'est généralement pas

absorbé par l'organisme (biodisponibilité très faible). Leur utilisation thérapeutique reste difficile, c'est pourquoi nous n'allons pas chercher à les isoler dans ce travail. De même, les acides phénols sont des composés généralement instables surtout en milieu alcalin [120] et sont rarement considérés être les principes actifs de plantes médicinales fébrifuges ou antiparasitaires.

### CCM comparatives

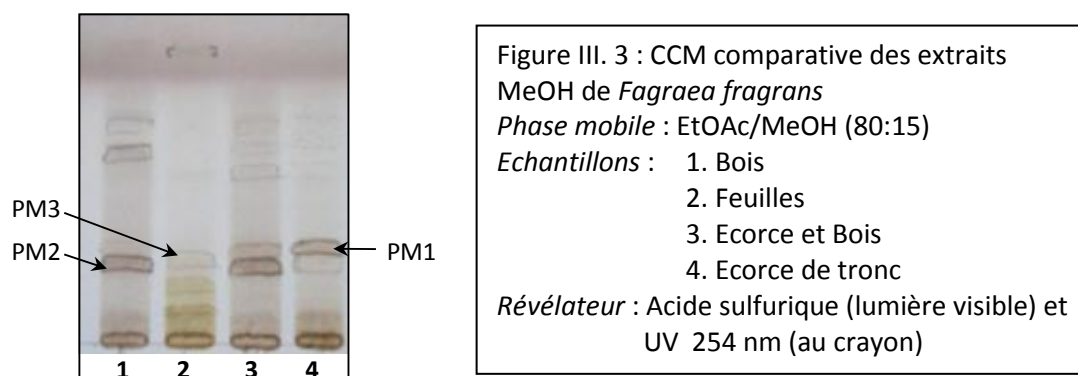
Les extraits au dichlorométhane et au méthanol ont été comparés sur plaque de CCM suivant la partie de la plante, afin de vérifier s'il existait des composés majoritaires communs.

#### A) Extraits DCM



La répartition des composants apolaires des différentes parties de la plante sur toute la chromatographie (fig. III.2) donne un aperçu de la richesse de chaque extrait en composé. De plus, la CCM permet de visualiser la différence de compositions entre les feuilles (contenant surtout des chlorophylles, rouges à 366 nm) et l'écorce de tronc. Un composé mauve est mis en évidence dans les feuilles lors de la pulvérisation de la plaque CCM par l'acide sulfurique.

#### B) Extraits MeOH



Cette phase mobile convient pour observer la présence des séco-iridoïdes, les tanins restant sur la bande de dépôts. Il apparaît que les feuilles et le tronc ne contiennent pas les mêmes composés (le *R<sub>f</sub>* de PM3 est différent de ceux de PM1 et PM2, fig. III.3). Le bois et l'écorce semblent renfermer des composés majoritaires identiques mais à des proportions variables (PM1 et PM2).

### III.2.A.2. L'écorce de tronc

L'écorce de tronc a été étudiée en premier lieu car elle présentait dans l'étude préliminaire une meilleure activité antiplasmodiale que les feuilles. L'extrait apolaire est privilégié pour entreprendre l'isolement des composés responsables de l'activité pharmacologique observée mais l'extrait polaire est également étudié pour l'enrichissement des connaissances phytochimiques. Notons que pour notre étude phytochimique, l'écorce a été séparée du bois contrairement à ce qui fut fait lors de l'étude préliminaire, car dans la plupart des plantes ligneuses, l'écorce contient plus de métabolites secondaires que le bois.

#### Extrait polaire

Un extrait méthanolique (68,5 g) a été obtenu par lixiviation (cf. chapitre VI : § VI.1.A.2) à partir de 500 g de poudre préalablement épuisée par du dichlorométhane. Une aliquote de l'extrait méthanolique (1,2 g) a été fractionnée sur colonne ouverte de silice en utilisant une phase mobile constituée d'une solution d'EtOAc/MeOH (85:15) en mode isocratique.

Deux fractions voisines contenaient chacune un produit sous forme de poudre blanche. Selon la littérature, la plante contiendrait du gentiopicroside. Ce séco-iridoïde a été utilisé comme témoin en CCM. Parmi les deux composés purs, l'un (nommé PM1) semble correspondre au gentiopicroside (*R<sub>f</sub>* et couleur à la vanilline sulfurique identique). Le second composé, largement majoritaire et nommé PM2, est légèrement plus polaire que le gentiopicroside (fig. III.3). Les poids importants obtenus (**PM1** : 38 mg (rendement : ~ 3 %) et **PM2** : 86 mg (rendement : 6%)) ont permis une étude structurale (cf. § III.2.B.2.).

#### Extrait apolaire

Une lixiviation a été réalisée avec du dichlorométhane sur 500 g de poudre d'écorce de tronc. Le rendement d'extraction est de 1,25 % (obtention de 6,25 g d'extrait DCM).

Un premier essai de fractionnement de l'extrait a été réalisé sur colonne ouverte de silice. La plaque de CCM récapitulative (fig. III.4) montre le profil des 6 fractions obtenues.

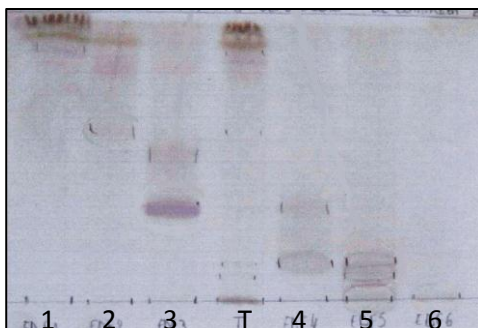


Figure III.4 : CCM du 1<sup>er</sup> essai de fractionnement de l'extrait DCM de l'écorce de tronc.

Phase mobile : EtOAc/MeOH (80:15)

Révélation : acide sulfurique 20 % MeOH

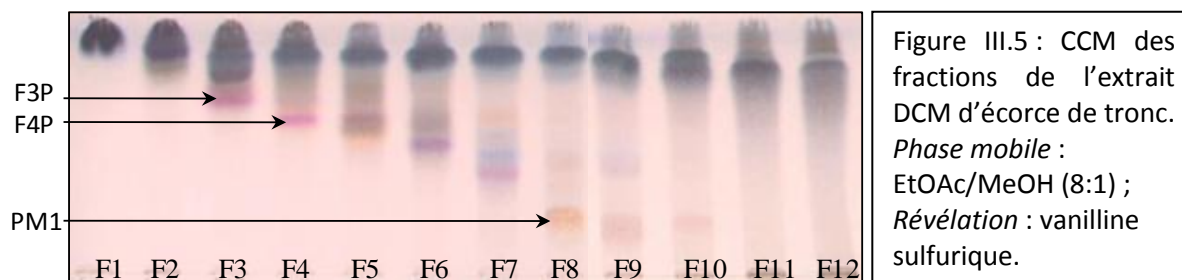
1=EDCM1 ; 2=EDCM2 ; 3=EDCM3 ; T=extrait DCM écorce ; 4=EDCM4 ; 5=EDCM5 ; 6=EDCM6. Source : Capel [32].

Ces fractions ont été testées vis-à-vis de la souche W2 du *Plasmodium falciparum* afin d'orienter l'isolement vers la fraction la plus active (résultats dans le schéma de séparation, fig. III.9). Les  $CI_{50}$  obtenues ne sont pas encourageantes puisque l'activité a diminué par rapport à celle de l'extrait brut ( $CI_{50} = 13 \mu\text{g/ml}$ ). La seule fraction ayant



une activité semblable à l'extrait est la fraction EDCM3 (fig.III.4). Celle-ci renferme un composé coloré en mauve avec l'acide sulfurique.

Un nouvel essai de fractionnement a été réalisé sur une quantité plus importante d'extrait. La séparation se fait par la même méthode que le premier essai mais en utilisant une pente de gradient plus progressif. La CCM des 12 fractions obtenues montre une meilleure séparation par rapport au premier fractionnement (fig. III.5).



Grâce à un réactif à la vanilline sulfurique pulvérisé sur les plaques CCM, deux bandes colorées en rose vif et deux bandes colorées en mauve sont détectées dans quatre fractions différentes (F3-F4 et F6-F7) en plus d'une bande de couleur bleu foncé omniprésente dans les chromatogrammes (fig. III.5). La couleur rose vif est souvent rencontrée dans la classe des iridoïdes. Ces fractions F3, F4, F6, F7 vont faire l'objet de séparations sur colonne ouverte de silice (voir schéma de séparation, fig. III.9).

#### Fractionnement de la fraction F3 :

La fraction F3 a été séparée sur colonne ouverte de silice. Ensuite, le produit majoritaire (F3P), coloré en rose avec la vanille sulfurique a été isolé sur plaque de CCM préparative de silice. Au final, 7,6 mg du composé F3P est récupéré.

Une analyse CLHP a été réalisée afin de vérifier la pureté du composé isolé. Un pic majoritaire élué après 18,9 min possède un maximum d'absorption à 210 nm. Un autre pic, 2,5 fois moins intense, possède quant à lui un maximum d'absorption vers 335 nm et est élué après 13,4 min. Cela indique que l'échantillon n'est pas suffisamment pur pour des analyses spectrales.

Par ailleurs, il semble que le produit F3P soit un composé instable, car l'échantillon maintenu au frigo à l'état sec pendant quelques jours présentait, en CCM, une bande rose beaucoup moins intense que précédemment, accompagnée de l'apparition de nouveaux constituants. Une vérification faite par CLHP montre que le pic élué à 18,9 min a pratiquement disparu et des composés sortant vers 13 minutes et absorbant principalement à 254 nm sont apparus (fig. III.6). Il est dès lors difficile de purifier ce produit instable.

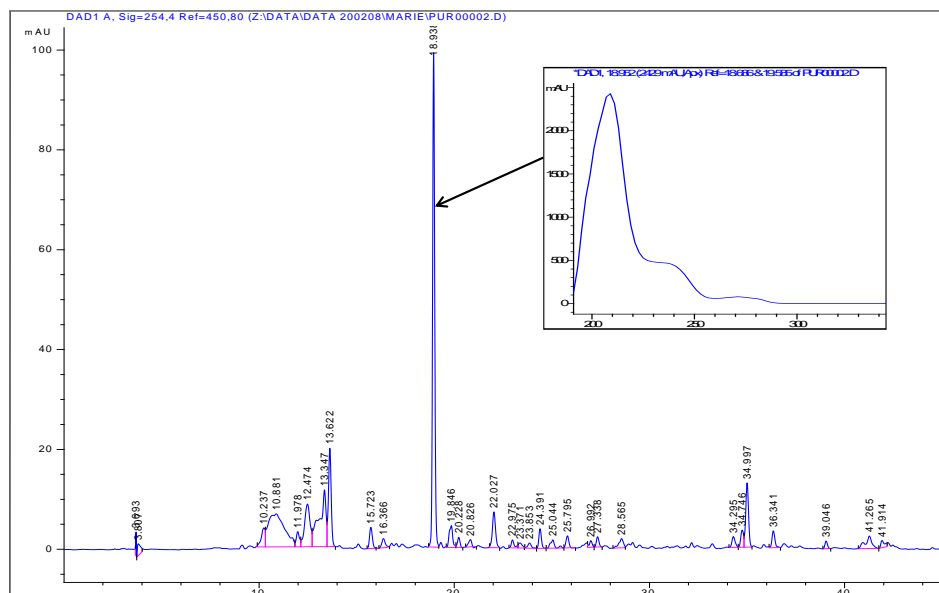


Figure III.6 : Profil chromatographique CLHP à 254 nm du produit isolé F3P maintenu quelques jours au frigo. Colonne : Hypersil ODS (C18) ; phase mobile en mode gradient : ACN/TFA 0,05 % (ACN 5 → 100 ; TFA 95 → 0 en 45 minutes) ; débit : 1ml/min.

#### Fractionnement de la fraction F4 (fig. III.5) :

La fraction F4 a été séparée sur colonne ouverte de silice. Puis, le composé majoritaire révélé en rose vif par la vanilline sulfurique et visible à 254 nm, a été purifié par CCM préparative de silice. Cette étape a permis d'obtenir 17 mg du composé d'intérêt nommé F4P. Sa pureté a été vérifiée par CLHP.

Le chromatogramme mesuré à 254 nm ( $\lambda$  non-spécifique) montre un seul pic (fig. III.7). La pureté du pic de 99 % démontre la présence d'un seul composé, le composé isolé est bien pur. Cette molécule se présente sous forme de poudre amorphe jaune pâle. Des analyses spectrales ont été réalisées afin de déterminer sa structure (cf. § III.2.B.1.).

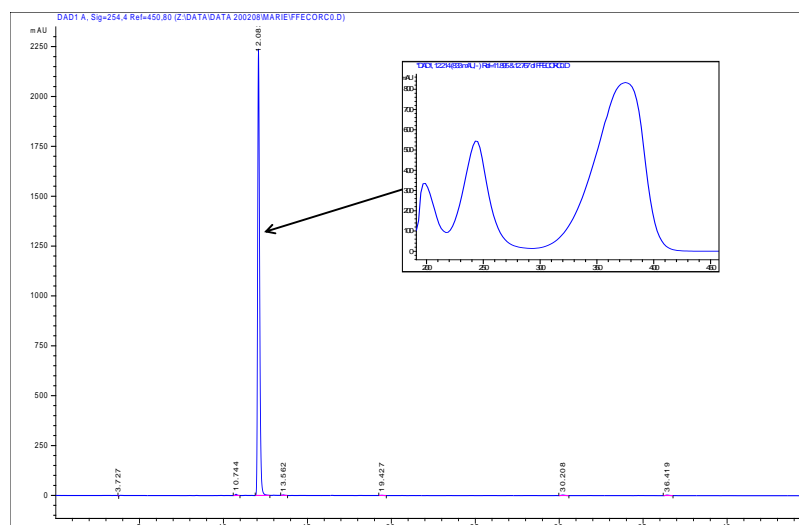


Figure III.7 : Profil chromatographique à 254 nm du produit isolé F4P. Colonne : Hypersil ODS (C18) ; phase mobile : ACN de 5 à 100 %/TFA 0,05 % de 95 à 0 % en 45 min ; débit : 1ml/min.

Fractionnement de la fraction F6 (fig. III.5) :

La fraction F6 a été séparée sur colonne ouverte de silice. Le composé de couleur mauve après révélation par la vanilline sulfurique se trouve dans la sous-fraction F6d. Cependant, la seule sous-fraction ayant une activité antiplasmodiale modérée vis-à-vis de la souche chloroquino-résistante est la F6b (cf. fig. III.9).

Aucune purification n'a pu être poursuivie à cause de la faible quantité obtenue. Par contre, les fractions ont été analysées par spectrométrie de masse (LC/MS) dans l'espoir de pouvoir retrouver la masse exacte des composés majoritaires et de déterminer leur formule brute. Le tableau III.4. présente les ions majoritaires obtenus en mode positif [MS<sup>+</sup>] et négatif [MS<sup>-</sup>] dans les fractions de F6.

Sous-fractions	TR	MS <sup>-</sup>	MS2 <sup>-</sup>	MS <sup>+</sup>	MS2 <sup>+</sup>	Composition élémentaire possible	Classe phytochimique éventuelle
F6b, F6c	27,96	613,2293	489,37 258,44			C <sub>32</sub> H <sub>37</sub> O <sub>12</sub>	Triterpène
F6c, F6d, F6e	3,33			201,1129	189,09 173,08 165,09 155,07 147,08 137,06	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub>	Monoterpène
F6c	21,08			208,1338	135,04	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N	
F6c	82,25			394,34839	323,26	C <sub>25</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	Sesterterpène
F6d	20,20			219,10237	201,09 189,09 165,09 131,09	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub> (C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> )	Monoterpène
F6d, F6e	24,50	561,10	515,13 367,01	563,17627	369,12 207,07	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>13</sub> C <sub>34</sub> H <sub>27</sub> O <sub>8</sub>	
F6d	26,78			389,16068	371,15	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> O <sub>7</sub>	Diterpène
F6d, F6e	28,51	385,1145		387,1449	369,13 351,12	MS <sup>+</sup> : C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> O <sub>7</sub> ; MS <sup>-</sup> : C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	
F6d	61,01	517,3541	471,35 380,56 272,10			C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>6</sub>	Triterpène

Tableau III.4 : Ions majoritaires et leurs fragments filles (MS2) retrouvés dans les sous-fractions de F6. TR = temps de rétention.

Au vu de ces résultats, il semble que la fraction F6 renferme principalement des terpènes sans chromophore puisqu'aucun composé n'absorbe aux UV (en CCM). La présence de quelques composés azotés semble également possible. Par ailleurs, la littérature évoquait la présence de stigmastérol et β-sitostérol dans l'écorce de tronc.

Par conséquent, une analyse des spectres de masse des différentes sous-fractions a été réalisée. Elle n'a pas permis de mettre en évidence les deux stérols précités.

La sous-fraction F6d contient apparemment six ions, il est dès lors difficile de discerner celui correspondant au produit se colorant en mauve. Cependant, un seul ion est détecté dans la sous-fraction F6b ; le composé responsable de l'activité antiplasmodiale modérée semble donc être un triterpène de formule brute  $C_{32}H_{37}O_{12}$ .

#### Fractionnement de la fraction F7 (fig. III.5) :

L'échantillon F7 a été fractionné sur une colonne sephadex G-25. Deux fractions ont pu être purifiées par CCM préparative de silice. Mais, seule la deuxième fraction a conduit à la détection par spectre de masse (UCL) de deux ions de  $m/z$  respective de 359,1342 et de 169,1105. Les spectres RMN du mélange montrent des signaux qui se chevauchent dans la zone blindée, il n'a donc pas été possible d'élucider les deux structures. Cependant, il semblerait que le composé  $[M+H]^+$  à  $m/z$  359,1342 soit un hétéroside de formule brute  $C_{16}H_{22}O_9$  vu les signaux caractéristiques du glucose en RMN. Il se pourrait qu'il appartienne à la classe des iridoïdes mais sa structure serait différente de ceux décrits ailleurs dans ce mémoire (cf. § III.2.B.2.).

#### Analyse de la fraction F8 (fig. III.5) :

La fraction F8 contient un composé majoritaire au bas de la plaque (fig III.5.) moins apolaire que les autres composés et ayant une couleur brunâtre (quand la plaque est pulvérisée à la vanilline sulfurique) suggérant un séco-iridoïde. Une analyse CCM a été réalisée dans une phase mobile adaptée à cette classe phytochimique et en utilisant un témoin de gentiopicroside (fig. III.8). Cette méthode indique la présence de gentiopicroside dans l'extrait apolaire. Ce constituant se retrouve en beaucoup plus grande quantité dans l'extrait méthanolique où sa présence est plus habituelle.

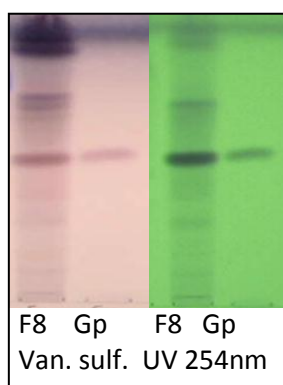


Figure III.8 : CCM de la fraction F8 et du témoin gentiopicroside (Gp).

*Phase mobile* : EtOAc/MeOH/eau (77:15:8),

*Révélation* : vanilline sulfurique et UV à 254 nm.

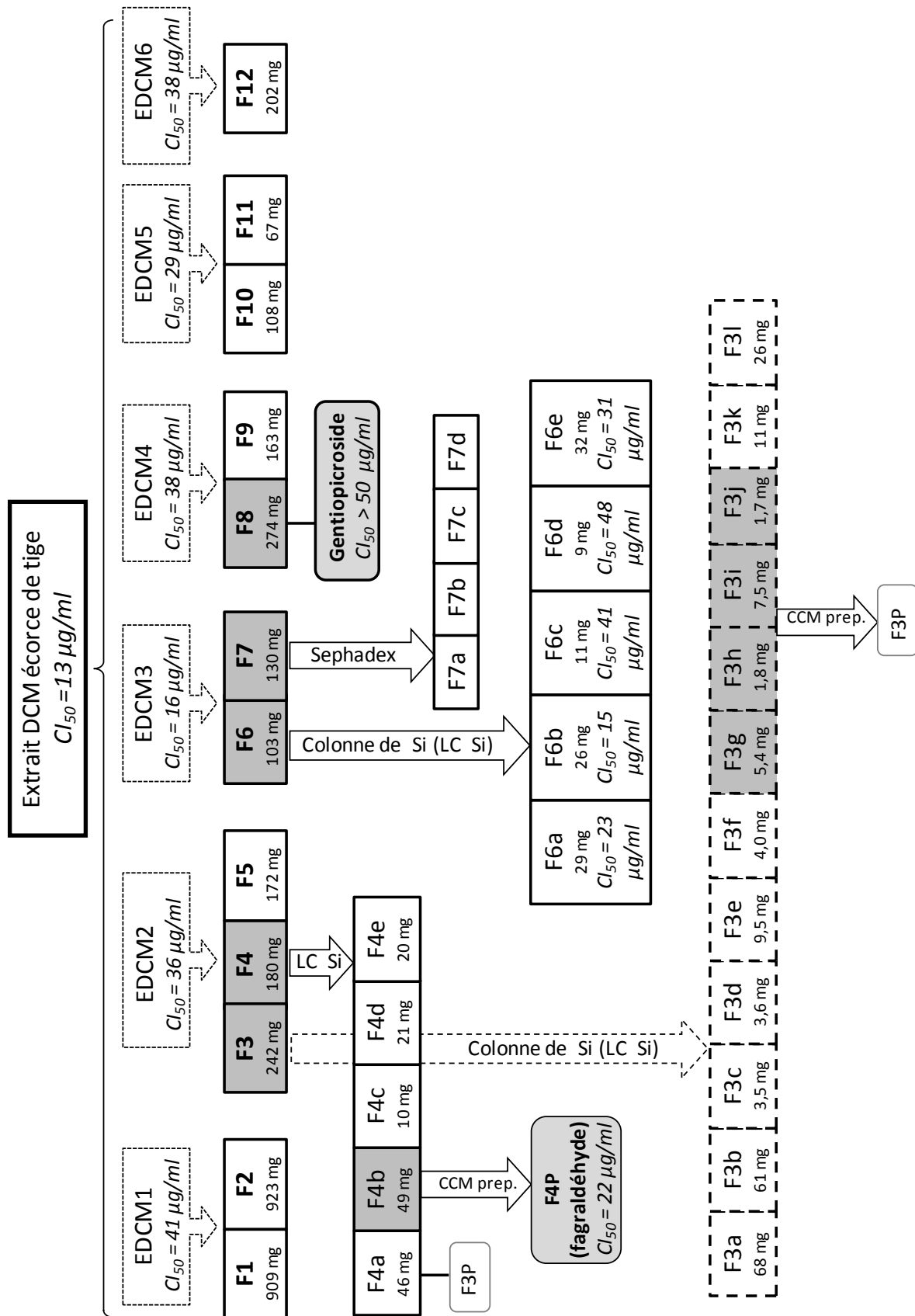


Figure III.9 : Schéma de fractionnement de l'extrait DCM d'écorce de tronc de *Fagraea fragrans* incluant les composés identifiés. Activité antiplasmodiale sur la souche W2 ( $Cl_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ).

### III.2.A.3. Les feuilles

#### Extrait polaire

En comparant les extraits méthanoliques des feuilles et de l'écorce (fig. III.3), il apparaît que le composé majoritaire des feuilles est différent des produits majoritaires rencontrés dans l'écorce (PM1 et PM2), mais se situe dans la même gamme de polarité. Son isolement a donc été réalisé selon la même procédure que pour l'extrait d'écorce. La fraction la plus pure, a permis d'isoler 4,7 mg du composé, en partant de 100 mg d'extrait brut. Ce composé, nommé **PM3**, d'une couleur blanche à l'état sec, est observable à 254 nm. Des analyses spectrales ont été réalisées pour la détermination de structure (cf. § III.2.B.2).

#### Extrait apolaire

Au vu de la plaque CCM du criblage chimique (fig. III.2), les composés apolaires des feuilles semblent très différents de ceux de l'écorce. De plus, l'extrait DCM des feuilles présente une activité antiplasmodiale prometteuse vis-à-vis de la souche chloroquino-sensible. Une lixiviation est donc exécutée pour réaliser un fractionnement de l'extrait. Un extrait dichlorométhane de 9,77 g a été obtenu par lixiviation à partir de 201,88 g de poudre de feuilles. Le rendement de 4,8 % est assez élevé pour un extrait apolaire ; ceci est principalement dû à la présence de chlorophylles.

Un premier fractionnement a été réalisé par CPC. Neuf fractions ont été obtenues (fig. III.10) et leur activité antiplasmodiale a été testée *in vitro* sur la souche 3D7 (fig. III.14).

La fraction la plus active et ayant une  $CI_{50}$  similaire à celle de l'extrait brut était la première fraction (F1), les deux fractions suivantes montraient une activité moindre mais non négligeable. C'est donc F1 qui a été choisie pour poursuivre le fractionnement ; cette fraction semble également plus riche en composés que les autres.

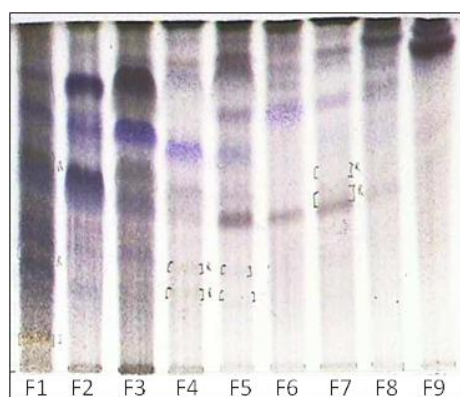
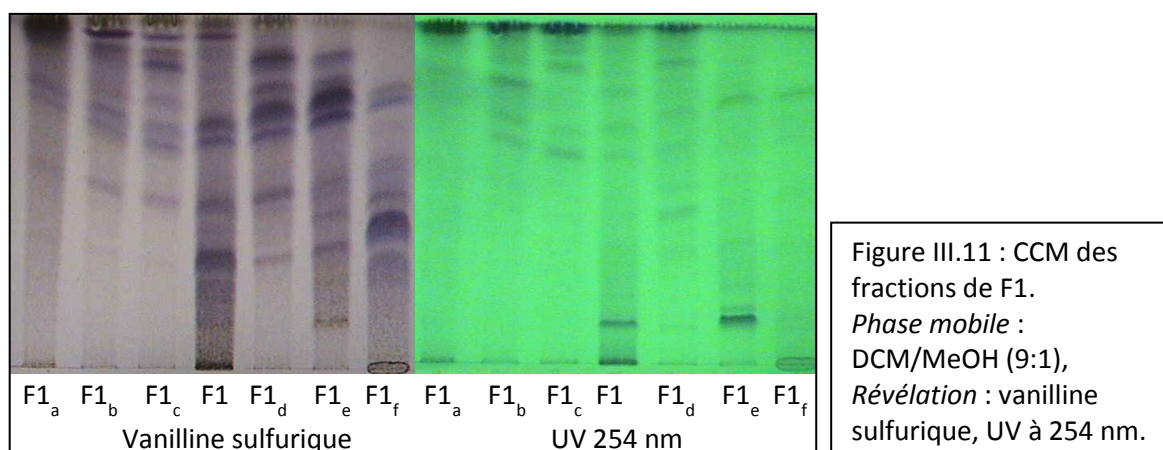


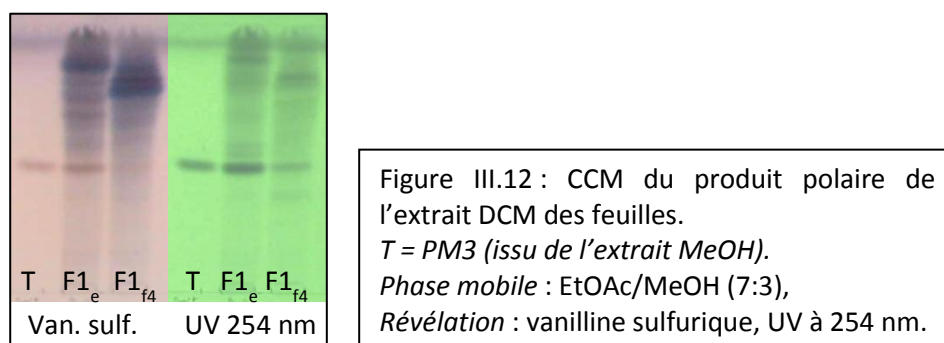
Figure III.10 : CCM des fractions de l'extrait DCM des feuilles.  
Phase mobile : DCM/MeOH (9:1),  
Révélation : vanilline sulfurique.

#### Fractionnement de la fraction F1 :

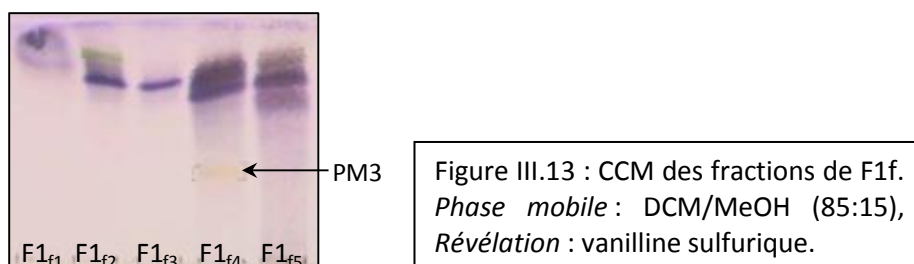
L'échantillon F1 a été fractionné en CLHP préparative de silice. Six sous-fractions ont été obtenues (fig. III.11) et le bioguidage effectué a indiqué de poursuivre le fractionnement sur F1f qui présentait une activité antiplasmodiale similaire à celle de F1.



Toutefois, F1e, qui contient un produit polaire majoritaire à 254 nm et se colorant en brun par la vanilline sulfurique, a été analysé par CCM dans la phase adaptée aux séco-iridoides. Ce composé est le même que le produit majoritaire de l'extrait polaire (PM3). Il est également présent en trace dans la sous fraction F1f4 (fig. III.12).



La sous-fraction F1f a été séparée sur colonne ouverte de silice. Les cinq sous-fractions obtenues (fig. III.13), de poids très faibles, ne permettent pas de poursuivre la séparation. Mais une analyse de masse exacte (LC/MS) a permis de cataloguer les produits mauves à la vanilline sulfurique.



Les ions obtenus ainsi que leurs fragments filles (MS2, tableau III.5) ont été comparés à des références disponibles au laboratoire de l'UCL : des phytostérols (ergostérol, campestérol,  $\beta$ -sitostérol, stigmastérol, lupéol, bétuline) et des triterpènes (acide glycyrréthinique, acide ursolique, acide oléanolique, acide bétulinique).

L'analyse de masse exacte a permis de proposer des classes phytochimiques pour les composés principaux des fractions apolaires des feuilles. Il s'agirait pour la plupart de

triterpènes possédant peu d'insaturations. Au vu des fragments filles (MS2), F3 (fig. III.10) contiendrait l'acide oléanolique ou l'acide bétulinique.

Il est intéressant de noter que l'acide bétulinique possède une légère activité antiplasmodiale *in vitro* (CI<sub>50</sub> = 19,6 µg/ml) [184] qui pourrait expliquer la faible activité de la fraction. Ce point sera repris dans le paragraphe III.2.C.2. La présence du composé PM3 est confirmée dans la fraction F1f4 ; il s'agit bien entendu de traces car les hétérosides sont quasi insolubles dans les extraits apolaires.

Fractions	TR	MS <sup>-</sup>	MS2 <sup>-</sup>	MS <sup>+</sup>	MS2 <sup>+</sup>	Composition élémentaire possible	Classe phytochimique éventuelle
F2, F3	49,59			437,3421	419,33 381,28 325,22 259,17	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>2</sub>	Triterpène
F2	51,27			323,2127	201,16	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> ON <sub>2</sub>	
F3	59,43			439,3577	421,35 393,35 315,23 203,18 191,18	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub>	Triterpène de type acide oléanolique ou acide bétulinique dépourvu d'un OH (les MS2 sont identiques)
F3	65,08			457,3685	439,36 421,35 393,35 315,23 203,18 191,18	C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O <sub>3</sub>	Acide bétulinique ou oléanolique
F7, F9	69,81	591,08	573,39 559,09 515,26	593,2767	515,31 391,29	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>14</sub> C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> O <sub>9</sub>	
F7	72,32	591,09	573,33 559,25 515,33	593,2776	565,28 533,26 515,25 391,29	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>14</sub> C <sub>34</sub> H <sub>41</sub> O <sub>9</sub>	
F9	67,23	367,2643	214,37 177,13			C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub>	
F1f4	3,31			375,1306	357,12 199,10	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>	Swertiamarine
F1f4	44,18			455,3521	437,34 419,33 327,23	C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub>	Triterpène
F1f4	49,27			453,3376	435,33 417,32 325,29	C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>3</sub>	Triterpène (proche du précédent)

Tableau III.5 : Ions majoritaires et leurs fragments filles (MS2) retrouvés dans diverses fractions apolaires des feuilles. TR = temps de rétention ; EDL = équivalent de double liaison.



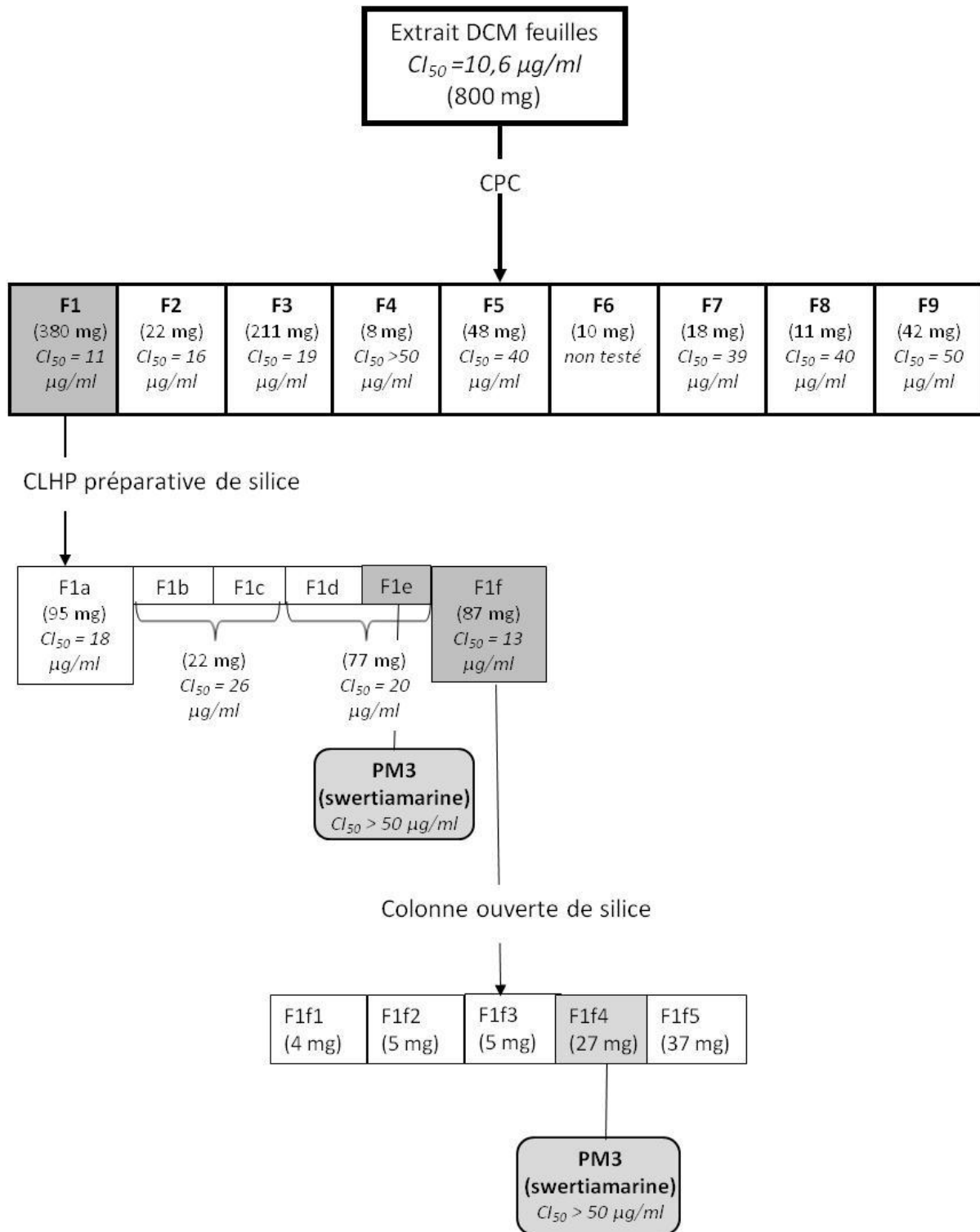


Figure III.14 : Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de feuilles de *Fagraea fragrans* incluant les composés identifiés. Activité antiplasmodiale sur la souche 3D7 ( $Cl_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ )

### III.2.A.4. Récapitulatif des composés isolés

Le tableau III.6 reprend les composés qui ont été isolés dans les différentes parties de *Fagraea fragrans*. Les étapes de purification sont présentées dans les figures III.9 et III.14.

Produit isolé	Origine	Nom
F4P	Extrait DCM d'écorce de tronc	Fagraldéhyde
PM1	Extrait MeOH d'écorce de tronc	Gentiopicroside
PM2	Extrait MeOH d'écorce de tronc	Swéroside
PM3	Extrait MeOH des feuilles	Swertiamarine

Tableau III.6 : Récapitulatifs des composés isolés chez *Fagraea fragrans*.

## III.2.B. Elucidation structurale et biosynthèse

### III.2.B.1. Composé apolaire de l'écorce de tronc

#### Composé F4P

##### Spectre UV-vis

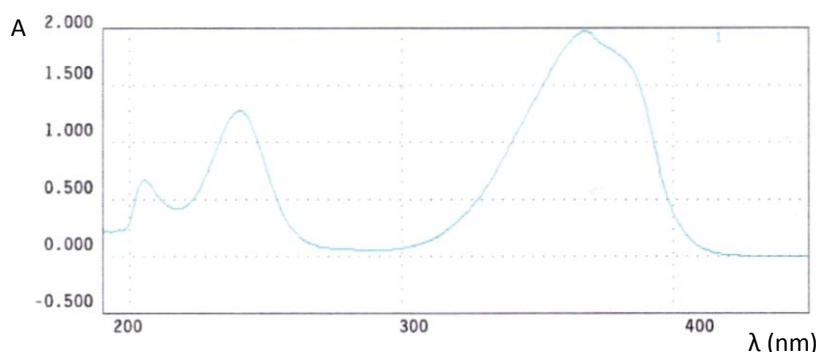


Figure III.15 : Spectre UV-vis du composé F4P dans le méthanol.

Les maxima d'absorption, se situant à 205, 241 et 368 nm, révèlent la présence d'un chromophore hautement conjugué.

##### Spectre IR

Le spectre IR (fig. III.16), mesuré dans le tétrachloroéthylène, révèle quelques signaux caractéristiques. Les bandes de faible intensité se situant à 1596,84 et 3708,10  $\text{cm}^{-1}$  correspondent au signal de l'eau. Un autre signal facilement interprétable est la bande à 2927,87  $\text{cm}^{-1}$  qui montre la présence de CH aliphatique. Dans les signaux caractéristiques, notons également les vibrations C=O à 1682,10 et 1718,40  $\text{cm}^{-1}$  pouvant correspondre à un aldéhyde insaturé lié à un autre groupement insaturé et à une  $\delta$ -lactone respectivement.

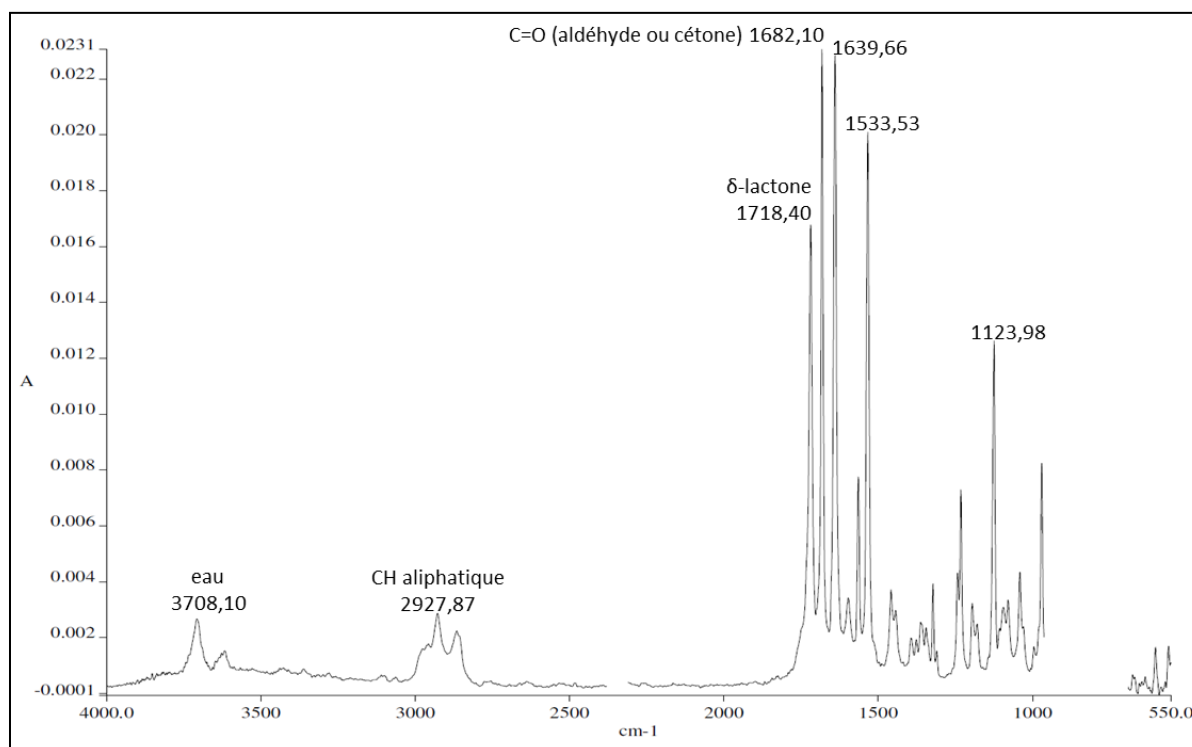


Figure III.16 : Spectre IR du composé F4P dans le tétrachloroéthylène.

### Spectre de masse haute résolution (spectropôle de Marseille)

L'ionisation électrospray en mode positif a généré principalement un ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  193,0499, ce qui est compatible avec une composition élémentaire  $C_{10}H_9O_4$  qui comporte 7 insaturations ou cycles. Le composé F4P possède donc une formule brute  $C_{10}H_8O_4$ , soit une masse monoisotopique calculée de 192,0423 (erreur inférieure à 5 ppm). La décomposition de l'ion parent en MS/MS présente des ions filles caractéristiques (l'intensité relative est notée en indice) :  $m/z$  175<sub>32</sub> (-  $H_2O$ ) ;  $m/z$  147<sub>27</sub> (- $HCOOH$ ) ;  $m/z$  119<sub>100</sub> (- $HCOOH -CO$ ) ;  $m/z$  91<sub>15</sub> ( $CO-CHCH_2$ ).

### Spectre RMN

Les données du spectre RMN du composé F4P mesuré dans le chloroforme deutéré sont reprises dans le tableau III.7.

Le spectre proton montre 6 signaux dont l'intégration représente 8 protons. Le plus déblindé à 10,2 ppm correspond à un proton aldéhydique (déjà pressenti par le spectre IR). Sur le spectre carbone, on dénombre 10 carbones. Ces premières données concordent parfaitement avec la formule brute obtenue. Le spectre HSQC permet d'identifier un méthyle à  $\delta_H$  1,7 /  $\delta_C$  19,8 ppm, 5 méthines dont l'aldéhydique à  $\delta_H$  10,2 /  $\delta_C$  190,8 ppm et 4 carbones quaternaires dont un ester à  $\delta = 165,7$  ppm. Le spectre COSY montre que le méthyle est lié à un CH à  $\delta_H$  5,27 /  $\delta_C$  70,5 (C-8) et que les méthines C-6 et C-7 sont liés.

Les corrélations HMBC permettent de positionner les différents groupements. Ainsi, en partant de l'aldéhyde, les corrélations entre C-3, C-4, C-5 et H-11 sont détectées mais pas entre C-7 ou C-6 et H-11. Ce qui signifie que l'aldéhyde n'est pas lié au C-6 mais au C-4. Les corrélations C-7/H-1 et C-1/H-7 confirment le lien entre C-1 and C-7, leur déplacement chimique correspondant à une oxyméthine.

N°	$\delta_H$ (J en Hz)	HSQC	COSY H/H corr.	NOESY H/H corr.	$\delta_C$	HMBC C→H corr.
1	7,61 (d, 1,4)	CH	8	8, 10	146,9	7, 8
3		Cq			165,6	8, 10, 11
4		Cq			104,0	11, 6
5		Cq			145,0	7, 11, 1, 8, 10
6	8,37 (d, 5,7)	CH	7	7	109,2	7
7	7,63 (d, 5,7)	CH	6	6	153,4	1, 6
8	5,27 (qd, 6,5; 1,4)	CH	10, 1	1, 10	70,5	10, 1
9		Cq			121,2	1, 8, 6, 10, 11
10	1,70 (d, 6,5)	CH <sub>3</sub>	8	8, 1,11	19,8	8
11	10,22 (s)	CH		10	190,8	

Tableau III.7 : Déplacements chimiques ( $\delta$ ) en ppm et corrélations (corr.) des signaux obtenus pour le composé F4P. *d* = doublet ; *qd* = quadruplet de doublet ; *s* = singulet.

En analysant plus attentivement les déplacements des protons H-6 et des oxyméthines, il apparaît que H-6 ( $\delta_H$  8,4 ppm) est plus déblindé que H-1 et H-7. Par contre, dans le spectre carbone, C-1 et C-7 sont plus déblindés que C-6 ( $\delta_C$  109 ppm). Cet effet peut être expliqué par l'anisotropie du carbonyle causé par la proximité spatiale du groupement aldéhyde. Cette hypothèse est confirmée par l'absence de corrélation entre H-6 et H-11 dans le spectre NOESY, indiquant une orientation du carbonyle vers H-6.

### Structure plane déduite

Les informations recueillies dans les différents spectres analysés permettent de conclure à la structure plane du composé F4P dessinée dans la figure III.17. Il s'agit d'un séco-iridoïde aglycone possédant un squelette bicyclique tout à fait original. Pour une comparaison biosynthétique plus aisée, la numérotation adoptée a été basée sur la numérotation classique des séco-iridoïdes. A cause de la fonction aldéhyde (peu courante dans cette classe de composés), le nom fagraldéhyde a été attribué au composé F4P.

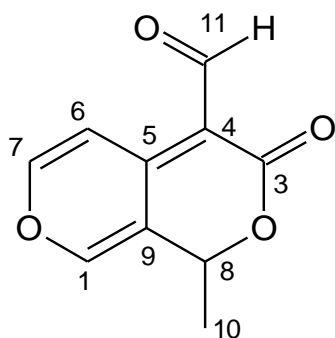


Figure III.17 : Structure 2D du composé F4P (fagraldéhyde).

En reprenant les ions filles exprimés dans l'analyse MS/MS, le schéma repris dans la figure III.18 peut être proposé pour une compréhension plus aisée des pertes ioniques obtenues.

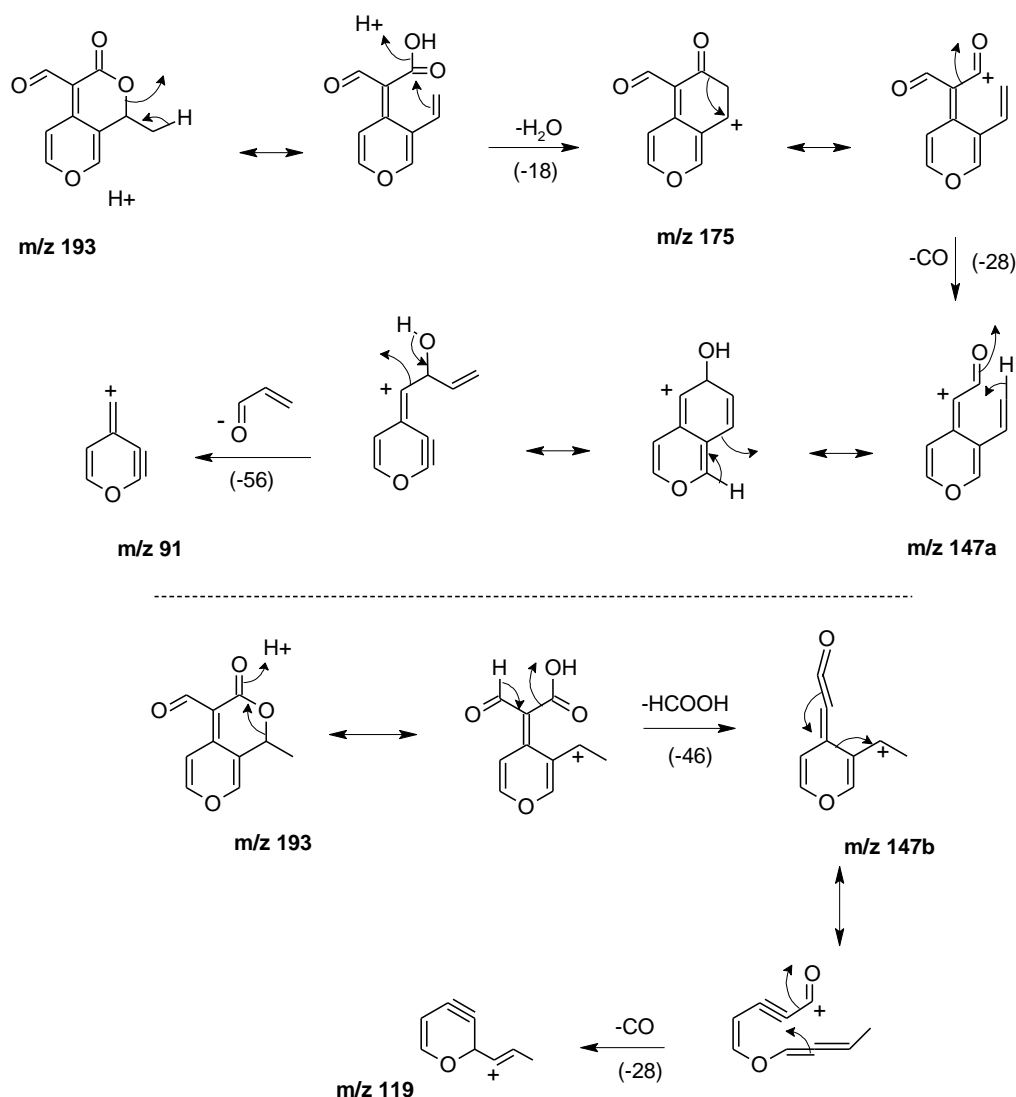


Figure III.18 : Les différentes voies de fragmentation proposées suite aux ions filles obtenus dans le spectre MS/MS du fagraldéhyde.

### Pouvoir rotatoire

La présence d'un carbone asymétrique implique le caractère chiral de la molécule. Ainsi, par la mesure du pouvoir rotatoire, il est possible de déterminer de quel énantiomère il s'agit. Dans notre cas, le pouvoir rotatoire spécifique du fagraldéhyde,  $[\alpha]_D^{20} = 0$ . Puisque le composé isolé est optiquement inactif, on peut conclure à un mélange racémique. Un essai de séparation sur colonne CLHP chirale a été effectué mais sans succès.

### Artéfact d'isolement ou présence dans la plante ?

Au vu de l'originalité de structure de ce composé, se pose la question de savoir s'il ne serait pas produit lors de l'isolement. Pour vérifier que ce composé n'est pas un artéfact, une étude CLHP a été réalisée en phase normale.

Le spectre a été enregistré à 368 nm (maximum d'absorbance du fagraldéhyde). Cependant, un détecteur à barrettes de diodes a permis d'obtenir un spectre UV complet. Le produit est

élué à 18,1 minutes. Un pic de l'extrait DCM de l'écorce (récoltée en juillet 2006) sortant à 17,2 min possède un spectre UV identique, ce qui pourrait correspondre au fagraldéhyde présent dans l'extrait.

Afin de confirmer ce résultat, une solution  $\text{CDCl}_3$  de fagraldéhyde et un extrait  $\text{CDCl}_3$  de l'écorce préparé extemporanément ont été soumis à une analyse de RMN  $^1\text{H}$ . En observant les signaux se trouvant dans la zone déblindée qui est une zone moins encombrée, on s'aperçoit que les signaux à  $\delta_{\text{H}}$  8,4 et  $\delta_{\text{H}}$  10,2 ppm du fagraldéhyde se retrouvent également dans le spectre de l'extrait (fig. III.19). Nous pouvons dès lors affirmer que le nouveau composé est bien synthétisé par la plante.

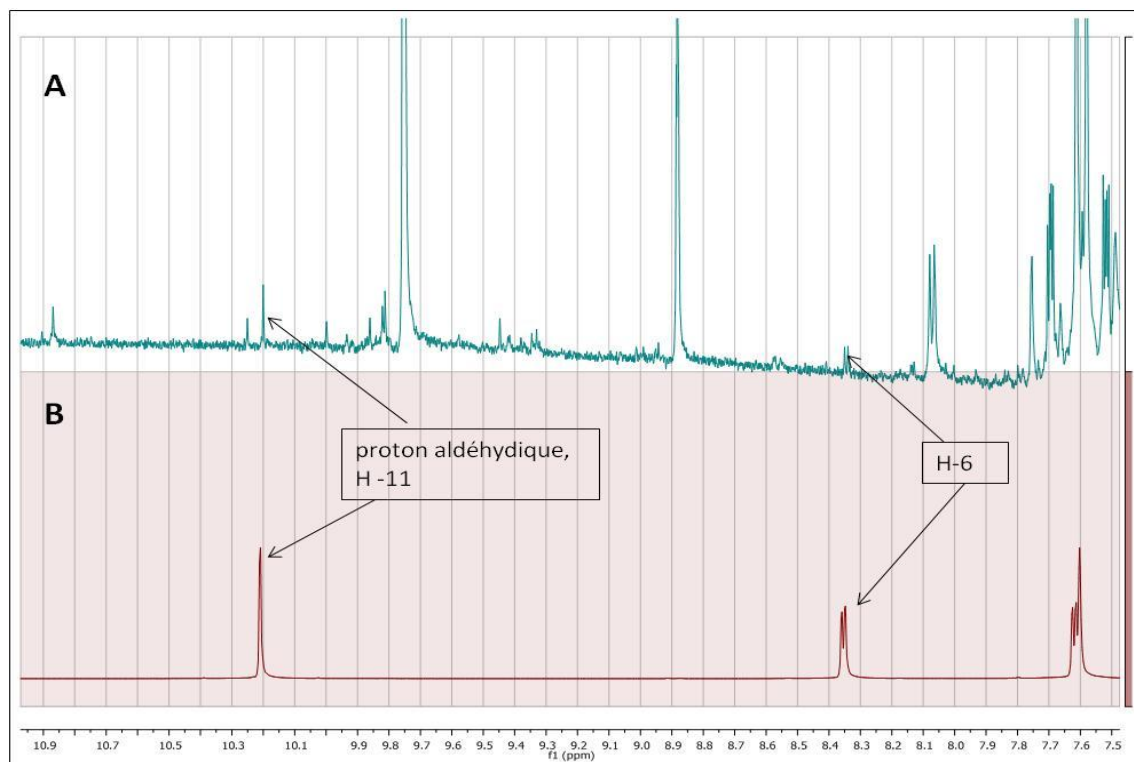


Figure III.19 : Zoom sur la zone déblindée du spectre RMN du proton de l'extrait DCM (A) et du fagraldéhyde (B) dans le  $\text{CDCl}_3$ .

### Stereochimie et modélisation moléculaire

Un point reste encore obscur en ce qui concerne la structure de la molécule : il reste à identifier sa stéréochimie. Les seules positions qui pourraient provoquer diverses conformations sont l'aldéhyde en libre mouvement rotatif et le centre stéréogénique en C-8. Ce centre chiral lié à l'oxygène du cycle lactonique peut donner deux conformations spatiales différentes. Le reste de la structure est plane par la conjugaison qui existe entre le cycle pyrane et la liaison C-4 et C-5 (le système est stabilisé par la délocalisation électronique).

Pour élucider la conformation probable du fagraldéhyde, nous avons eu recours à la modélisation moléculaire. Le premier type de conformation abordé concerne le rotamère aldéhydique (fig. III.20). Une rotation de l'aldéhyde a été effectuée par pas de 10 degrés à la recherche de points stationnaires. Deux points critiques ont été localisés : un 1<sup>er</sup> minimum plaçant l'oxygène aldéhydique vers le cycle pyrane et un second

minimum orientant le carbonyle à 170 degrés par rapport au 1<sup>er</sup> minimum. Ce dernier arrangement est moins stable de 5,65 kcal/mole. La rotation d'un minimum à l'autre s'effectue par le passage de la barrière d'activation obtenue lors de l'optimisation du second extremum. Cet état de transition se situe à 8,32 kcal/mole du premier minimum.

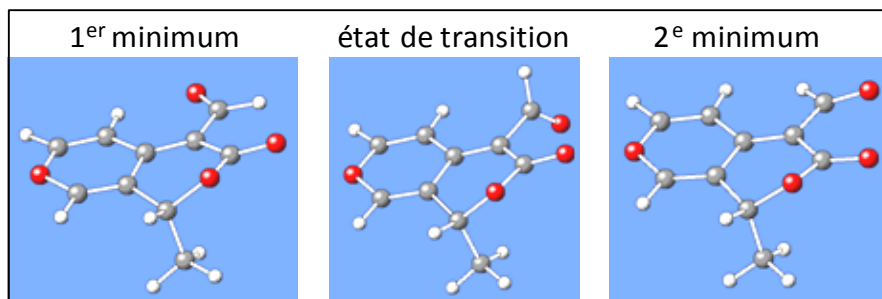


Figure III.20 : Géométrie optimum calculée pour le rotamère aldéhydique.

Cette différence d'énergie de stabilisation du 1<sup>er</sup> minimum est due à deux ponts hydrogènes : le premier entre le carbonyle de l'aldéhyde et le H-6 (2,17Å) ; le second entre l'H aldéhydique et le carbonyle de la lactone (2,40 Å). Le premier lien hydrogène est également confirmé dans les spectres RMN. Ainsi, dans le spectre du proton, le déblindage anormal de l'H-6 est dû à l'effet d'anisotropie du carbonyle, et dans le spectre NOESY, aucune corrélation n'est révélée entre les protons H-6 et H-11.

Venons-en maintenant à la conformation du cycle lactonique : puisque ce cycle n'est pas plan, la conformation présentant l'oxygène vers l'avant du plan sera appelée I. La conformation II sera donc celle présentant l'oxygène à l'arrière du plan. Par la présence du C-8 chiral, pour chaque conformation, il y a un couple d'énantiomères : R\_I/ S\_I et R\_II/S\_II (fig. III.21).

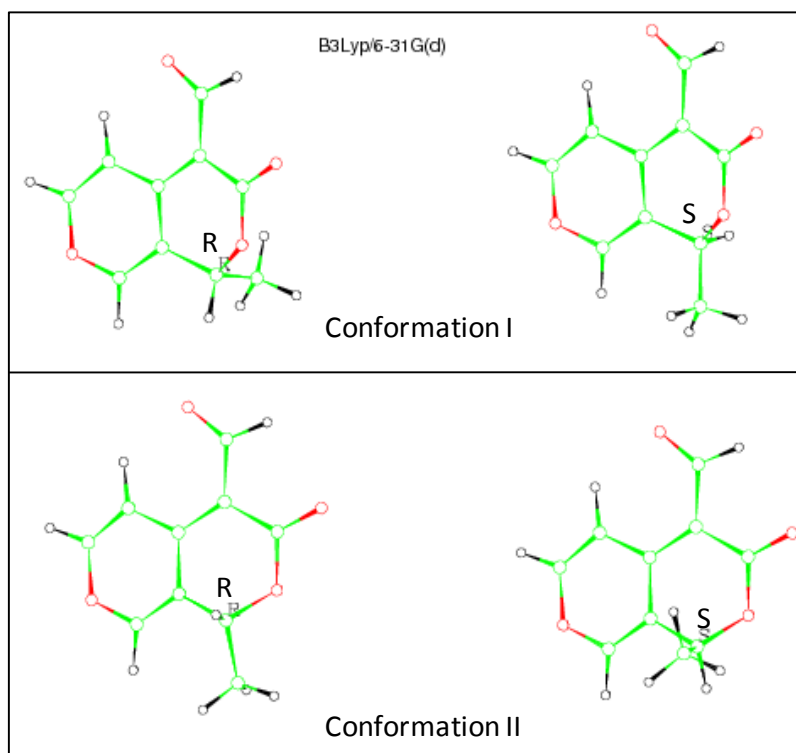


Figure III.21 : Conformations possibles du cycle lactonique.

Notons que les configurations R\_I ou S\_II sont détectées dans le spectre NOESY. En effet, les H-11 et H-10 sont corrélés. Ceci ne pourrait pas être possible dans les deux autres configurations puisque la distance spatiale entre ces deux protons serait trop grande ( $> 5 \text{ \AA}$ ) pour être observable par l'effet NOE.

La stabilité des deux conformères du cycle lactonique a été calculée : la différence d'énergie entre la forme R\_I et la forme S\_II est de 0,40 kcal/mole. Donc le couple d'énantiomères le plus stable est R\_I/ S\_I (fig. III.22). Le racémate isolé serait représenté par ce conformère.

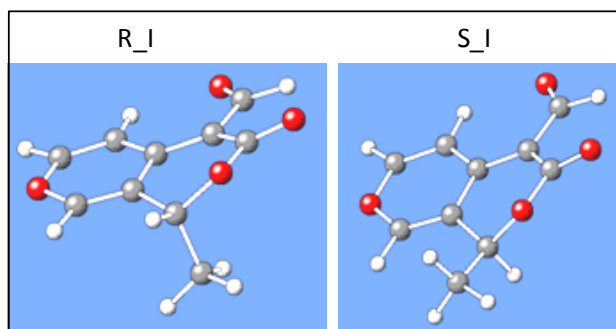


Figure III.22 : Conformation du cycle lactonique la plus stable.

Avec un calcul plus précis, il est possible d'obtenir des spectres IR, UV, CD théoriques. Ce faisant, on remarque que l'accord des spectres IR théoriques et expérimentaux est excellent. En effet, les vibrations de l'aldéhyde et de la lactone insaturée sont respectivement de 1760,1 et 1809,8  $\text{cm}^{-1}$ . La littérature a calibré un facteur correctif qui est dû à la corrélation électronique mal décrite dans le modèle de l'électron indépendant (cf. Annexe II) et qui vaut 0,9613, ce qui corrige les valeurs à 1692 et 1740  $\text{cm}^{-1}$ , c'est-à-dire très proches des valeurs expérimentales.

L'accord des spectres UV théorique/expérimental est également bon. Notons un léger déplacement hypsochrome du spectre théorique (fig. III.23) ; cet effet peut être dû au calcul réalisé dans le vide (sans tenir compte d'un solvant).

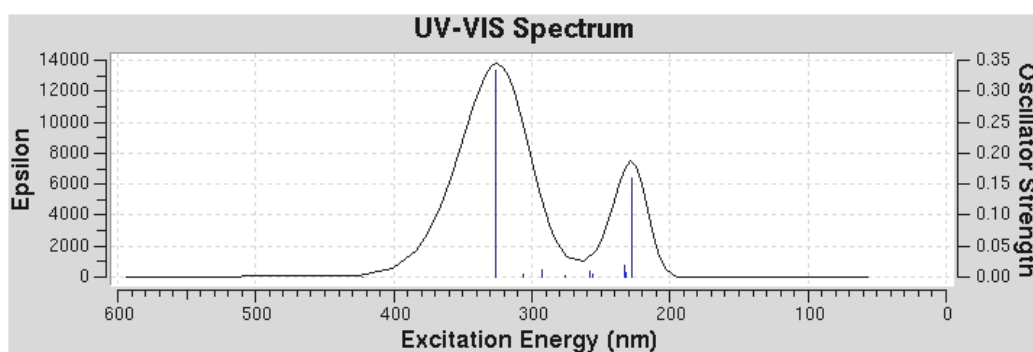


Figure III.23 : Spectre UV-vis calculé à la géométrie B3LYP/6-31G(d) au niveau de 10 états excités suivant la méthode TD avec la base étendue aug-cc-PVDZ (soit 394 fonctions de base ; base double avec fonctions diffuses et de polarisation).

Vu qu'il s'agit d'un mélange racémique, il n'est pas possible de mesurer un spectre de dichroïsme circulaire (DC) car les spectres des deux isomères s'annulent. Toutefois les



calculs ont permis d'obtenir un spectre théorique pour les deux configurations (fig. III.24 et III.25).

Il faut garder à l'esprit que le calcul des états excités est très complexe dans la mesure où il faut tenir compte d'un ensemble de configurations électroniques. De plus, différentes méthodes de calculs existent pour l'optimisation des états excités, le choix de l'une ou l'autre méthode pouvant donner de légères variations dans les spectres calculés. Toutefois, l'allure des spectres reste la même. Les spectres DC présentés sont ceux de la méthode TD qui donne une échelle équivalente pour les deux configurations.

Il est rassurant de constater que les courbes DC des deux configurations sont d'allures différentes ; il y a une inversion de signaux dans la zone des 240-290 nm.

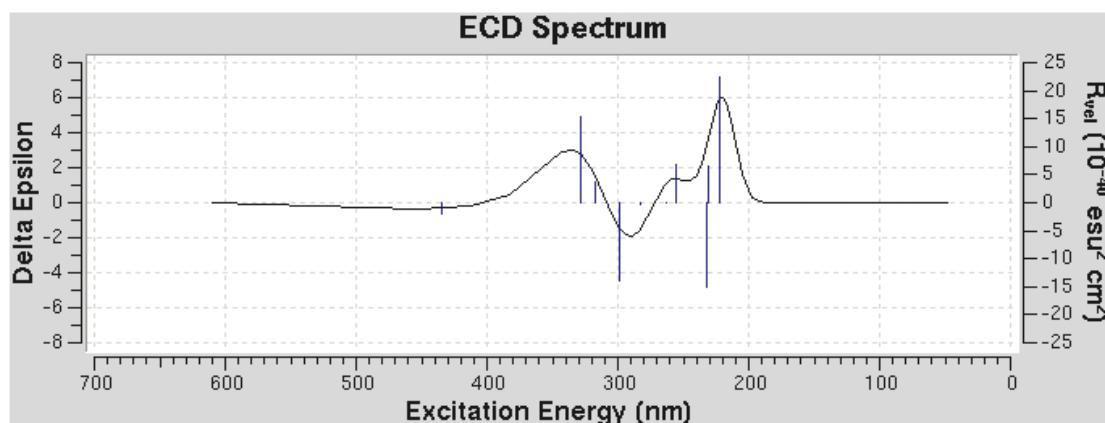


Figure III.24 : Spectre DC de la configuration R calculé à la géométrie B3LYP/6-31G(d) au niveau de 10 états excités suivant la méthode TD avec la base étendue aug-cc-PVDZ (soit 394 fonctions de base ; base double avec fonctions diffuses et de polarisation).

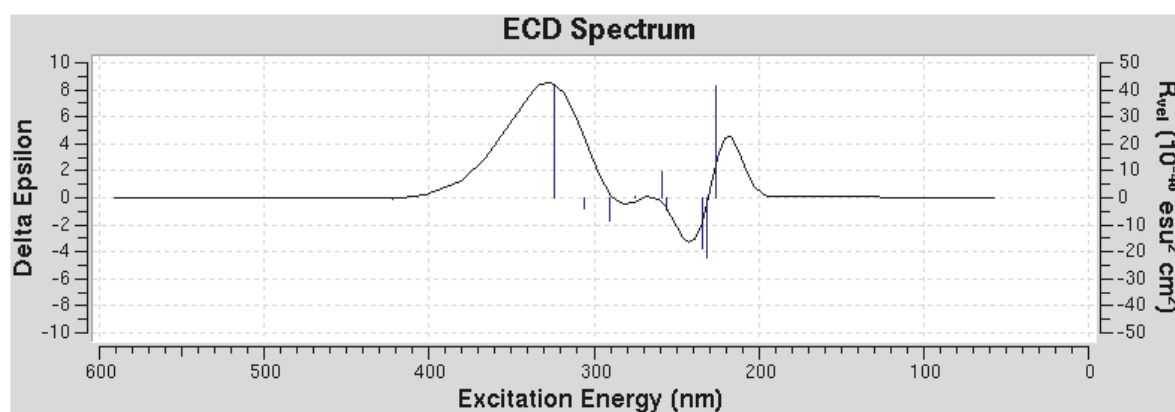


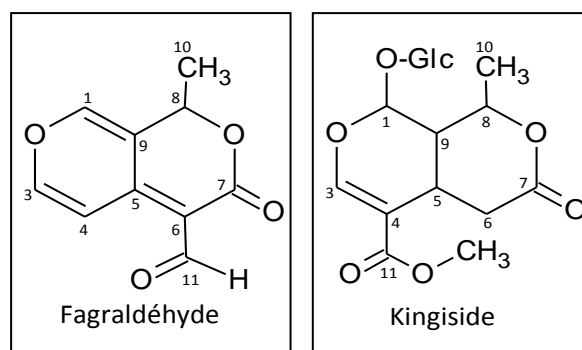
Figure III.25 : Spectre DC de la configuration S calculé à la géométrie B3LYP/6-31G(d) au niveau de 10 états excités suivant la méthode TD avec la base étendue aug-cc-PVDZ (soit 394 fonctions de base ; base double avec fonctions diffuses et de polarisation).

Il est intéressant d'avoir ces spectres théoriques car lors d'une prochaine obtention de fagraldéhyde, il sera aisé de reconnaître la configuration majoritaire isolée si la molécule ne se présente pas sous forme d'un mélange racémique.

### Hypothèse biosynthétique

Etant donné l'originalité du squelette bicyclique, une hypothèse biosynthétique du fagraldéhyde a été postulée.

A première vue, le type de squelette fait penser au kingiside. Toutefois, aucun substituant du fagraldéhyde ne se situe sur le C-4 mais bien sur le C-6 selon la numérotation du kingiside. La voie biosynthétique n'est donc pas la même.



Les étapes menant à la formation d'iridoïdes et séco-iridoïdes sont présentées dans le paragraphe « biosynthèse » et dans la figure III.30. Toutefois, une précision doit être apportée quant à l'ordre des réactions qui s'opèrent. Il a bien été démontré que l'oxydation du géraniol s'effectue avant sa cyclisation menant à l'iridodial, puisque l'enzyme géraniol-10-hydroxylase a été trouvée [144]. Cependant, contrairement aux séco-iridoïdes classiques, le clivage oxydatif du cyclopentane au niveau des C-7 et C-8 pourrait se faire avant la formation de l'acide loganique, c'est-à-dire avant que le cycle hétéroatomique ne se forme (fig. III.26). Ainsi l'iridotrial ou l'iridodial serait en libre rotation par la liaison C5-C9, mais une meilleure stabilité serait provoquée par la répulsion électrostatique des oxygènes aldéhydiques. Le fagraldéhyde serait formé après oxydation, cyclisation et déshydratation de la forme la plus stable, celle où les aldéhydes sont éloignés. Ceci expliquerait le réarrangement original du fagraldéhyde. La lactone serait formée au niveau du C-3 contrairement au kingiside où elle se forme au C-7, mais le C-8 se retrouve tout de même dans le cycle lactonique. Ainsi le substituant en C-4 du kingiside reste en C-4 aussi dans le fagraldéhyde.

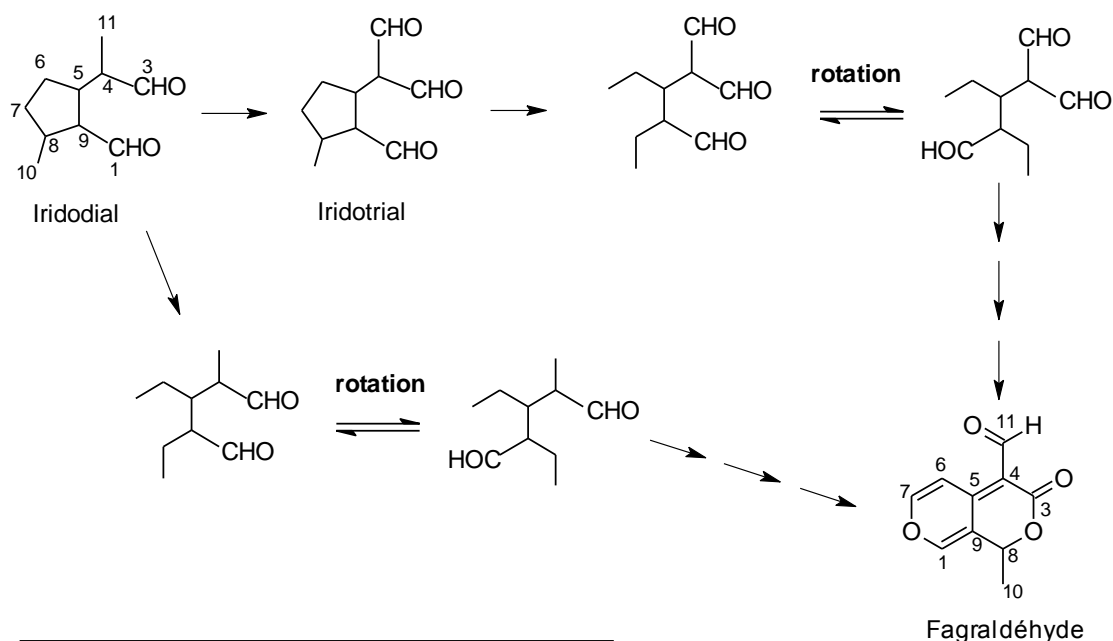


Figure III.26 : Hypothèse biosynthétique du fagraldéhyde à partir de l'iridodial.

Dans cette hypothèse biosynthétique, deux voies sont envisagées : soit il n'y a pas de passage par l'iridotrial et l'oxydation pour former l'aldéhyde se déroule à la fin, soit l'oxydation se déroule sur l'iridodial pour former l'iridotrial. De toute manière, il faudrait entreprendre des expériences *in vivo* par incorporation de composés radioactifs afin de déterminer les précurseurs réels du fagraldéhyde.

Au vu de cette hypothèse, le fagraldéhyde peut être qualifié de séco-iridoïde aglycone, puisqu'il y a bien ouverture du cycle pentanique (« seco » provenant du verbe latin *secare* = couper).

### III.2.B.2. Composés polaires majoritaires de l'écorce de tronc et des feuilles

Grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D, nous avons pu identifier les composés polaires isolés. Un tableau comparatif avec les données des spectres du proton ( $^1\text{H}$ ) et du carbone 13 ( $^{13}\text{C}$ ) de chaque composé a été réalisé pour faciliter l'analyse (tableau III.8).

#### Composé PM1 (issu de l'extrait MeOH d'écorce de tronc)

Le témoin utilisé en CCM indiquait que le composé était probablement le gentiopicoside. Nous avons pu facilement comparer les déplacements des signaux RMN obtenus avec les données se trouvant dans la littérature [24].

Le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  mesuré permet de dénombrer seize carbones, dont six ayant des déplacements chimiques à 62,8 ; 71,5 ; 74,6 ; 78,0 ; 78,4 et 100,2 ppm attribués aux carbones du glucose. Le carbone quaternaire qui résonne à 166,3 ppm est caractéristique d'un carbonyle d'un groupement ester. Le carbone méthylénique résonnant à 118,5 est typique d'un  $\text{CH}_2$  conjugué.

Le spectre de RMN du proton est caractéristique d'un séco-iridoïde. En effet, on observe les signaux attribuables au  $\beta$ -D-glucose entre 4,64 et 3,14 ppm, le doublet à 4,64 ppm étant caractéristique du proton anomérique (H-1'). Le proton le plus déblindé (7,44 ppm) indique qu'il est conjugué et proche d'un oxygène. On observe également trois signaux dans une zone déblindée entre 5,5 et 6 ppm qui est la zone des CH conjugués ou proche d'un oxygène. Les signaux observés sur les spectres de RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  sont en accord avec ceux donnés dans la littérature pour le gentiopicoside ayant une formule brute  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$ . (fig. III.27).

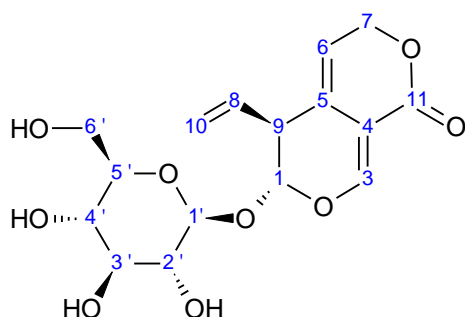


Figure III.27 : Structure 2D du composé PM1 (gentiopicoside).

### Composé PM2 (issu de l'extrait MeOH d'écorce de tronc)

En comparant les signaux de ce composé majoritaire avec ceux du gentiopicoside, nous constatons qu'ils sont très proches ; il s'agit donc d'un autre séco-iridoïde.

En effet, sur le spectre du  $^{13}\text{C}$ , on observe également la présence de seize pics. Les déplacements chimiques sont pratiquement identiques à ceux du gentiopicoside pour quatorze des carbones. Par contre, les carbones C-5 et C-6 résonnent dans la zone blindée, à 28,4 et 25,9 ppm respectivement et tous deux sont protonés et saturés, ce qui signifie que la double liaison 5-6 a disparu. Cette structure correspond donc à celle du swéroside (fig. III.28), autre séco-iridoïde abondant dans les Gentianaceae. Le swéroside a une formule brute  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$ .

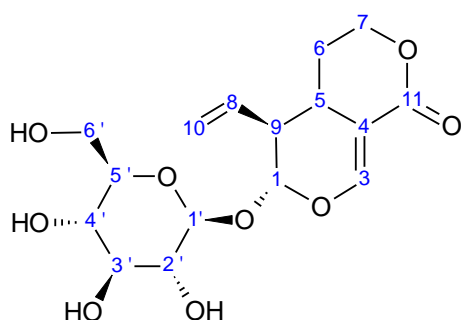


Figure III.28 : Structure 2D du composé PM2 (swéroside).

### Composé PM3 (issu de l'extrait MeOH des feuilles)

Le spectre de masse exacte en mode positif (ULg) a généré un ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  à  $m/z$  397,1461 qui est compatible avec une composition élémentaire correspondant à  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}\text{Na}$ . Le composé analysé pourrait avoir une formule brute  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ , soit une masse monoisotopique calculée de 374,1212. On constate que par rapport à la formule brute du swéroside, il y aurait un groupement hydroxyle en plus. La décomposition de l'ion parent en MS/MS présente un ion fille caractéristique à  $m/z$  357,1185 qui démontre la perte d'un groupement hydroxyle.

L'analyse du spectre RMN, par comparaison aux deux autres séco-iridoïdes, montre des signaux de déplacements équivalents. Il s'agirait d'un troisième séco-iridoïde. La seule différence avec le swéroside réside au niveau du C-5 devenu quaternaire et qui résonne à 74,2 ppm. En se référant aux tables, cela signifie que le nouveau substituant est un hydroxyle. En conclusion, la structure de ce composé majoritaire des feuilles est la swertiamarine (fig. III.29). L'identification est confirmée par les données se trouvant dans la littérature [108].

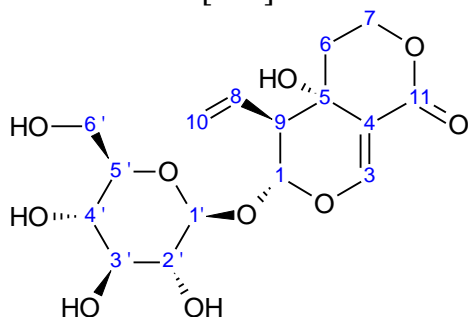


Figure III.29 : Structure 2D du composé PM3 (swertiamarine).

N°	PM1			PM2			PM3		
	<sup>13</sup> C	APT	<sup>1</sup> H (m, J en Hz)	<sup>13</sup> C	APT	<sup>1</sup> H (m, J en Hz)	<sup>13</sup> C	APT	<sup>1</sup> H (m, J en Hz)
1	98,5	CH	5,66 (d; 3,1)	98,0	CH	5,55 (d;1,6)	99,2	CH	5,73 (d;1,6)
2									
3	150,6	CH	7,44 (m)	153,9	CH	7,59 (d; 2,7)	154,9	CH	7,63 (s)
4	104,9	Cq		106,0	Cq		109,0	Cq	
5	127,0	Cq		28,4	CH	3,15 (m)	74,2	Cq	
6	117,2	CH	5,61 (m)	25,9	CH <sub>2</sub>	1,77 (m) 1,69 (qd; 12,8; 4,4)	33,9	CH <sub>2</sub>	1,74 (d; 11,7) 1,91 (td; 13,6; 5,0)
7	70,9	CH <sub>2</sub>	5,06 (m)  4,98 (m)	69,7	CH <sub>2</sub>	4,45 (m)  4,36 (td; 11,9; 2,2)	66,1	CH <sub>2</sub>	4,75 (ddd; 2,5; 11,0; 13,0) 4,35 (ddd; 1,9; 5,1; 10,9)
8	135,0	CH	5,75 (ddd; 17,2;10,2;6,8)	133,3	CH	5,54 (m)	133,9	CH	5,45 (m)
9	46,6	CH	3,31 (m)	43,8	CH	2,70 (m)	52,1	CH	2,91 (dd; 9,5; 1,3)
10	118,5	CH <sub>2</sub>	5,23 (td; 17,2; 1,1) 5,20 (td; 10,2; 1,1)	120,8	CH <sub>2</sub>	5,31 (dd; 17,0; 1,3) 5,27 (dd; 10,4; 1,3)	121,3	CH <sub>2</sub>	5,36 (dd; 17,0; 2,2) 5,29 (dd; 9,8; 2,2)
11	166,3	Cq		168,5	Cq		168,2	Cq	
1'	100,2	CH	4,64 (d; 8)	99,7	CH	4,68 (d; 8)	100,4	CH	4,64 (d; 8)
2'	74,6	CH	3,14 (dd; 8; 9)	74,7	CH	3,18 (dd; 8; 9)	74,6	CH	3,18 (dd; 8; 9)
3'	78,0	CH	3,34 (t; 9)	77,9	CH	3,36 (t; 9)	78,0	CH	3,36 (t; 9)
4'	71,5	CH	3,23 (t; 9)	71,5	CH	3,26 (t; 9)	71,6	CH	3,31
5'	78,4	CH	3,32 (m)	78,4	CH	3,34 (m)	78,7	CH	3,31
6'	62,8	CH <sub>2</sub>	3,89 (dd; 11,9; 2,2) 3,64 (dd; 11,9; 6,4)	62,7	CH <sub>2</sub>	3,89 (dd; 11,9; 2,2) 3,65 (dd; 11,9; 6,2)	62,7	CH <sub>2</sub>	3,89 (dd; 11,9; 2,2) 3,66 (dd; 11,9; 6,0)

Tableau III.8 : Comparaison des déplacements chimiques ( $\delta$ , en ppm) des trois séco-iridoïdes dans le MeOD.

## Biosynthèse

La biogenèse des séco-iridoïdes a été longuement décrite dans la littérature (fig. III.30). La biosynthèse commune aux iridoïdes commence par le géraniol provenant du précurseur commun à tous les monoterpènes, le géraniol pyrophosphate (GPP). Le géraniol est hydroxylé en C-10, les hydroxyles s'oxydent en aldéhydes, puis une cyclisation s'opère au niveau des carbones insaturés (par addition de Michael) pour former l'iridodial. Ce dernier s'oxyde en iridotrial qui se cyclise. Le squelette méthylcyclopentapyranique caractéristique des iridoïdes est ainsi formé. Une oxydation, une glycosylation et une estérification conduisent au précurseur des séco-iridoïdes, l'acide loganique. Un clivage oxydatif s'opère dans le cycle pentanique au niveau des C-7 et C-8 (qui gardent tous deux leur proton) par un mécanisme encore inconnu, qui mène au séco-iridoïde. Il a été démontré que la formation du gentiopicroside passe d'abord par le swéroside puis la swertiamarine [92]. Ces trois séco-iridoïdes sont les iridoïdes les plus

courants dans la famille des Gentianaceae. La présence des trois séco-iridoïde dans *Fagraea fragrans* n'est donc pas si étonnante.

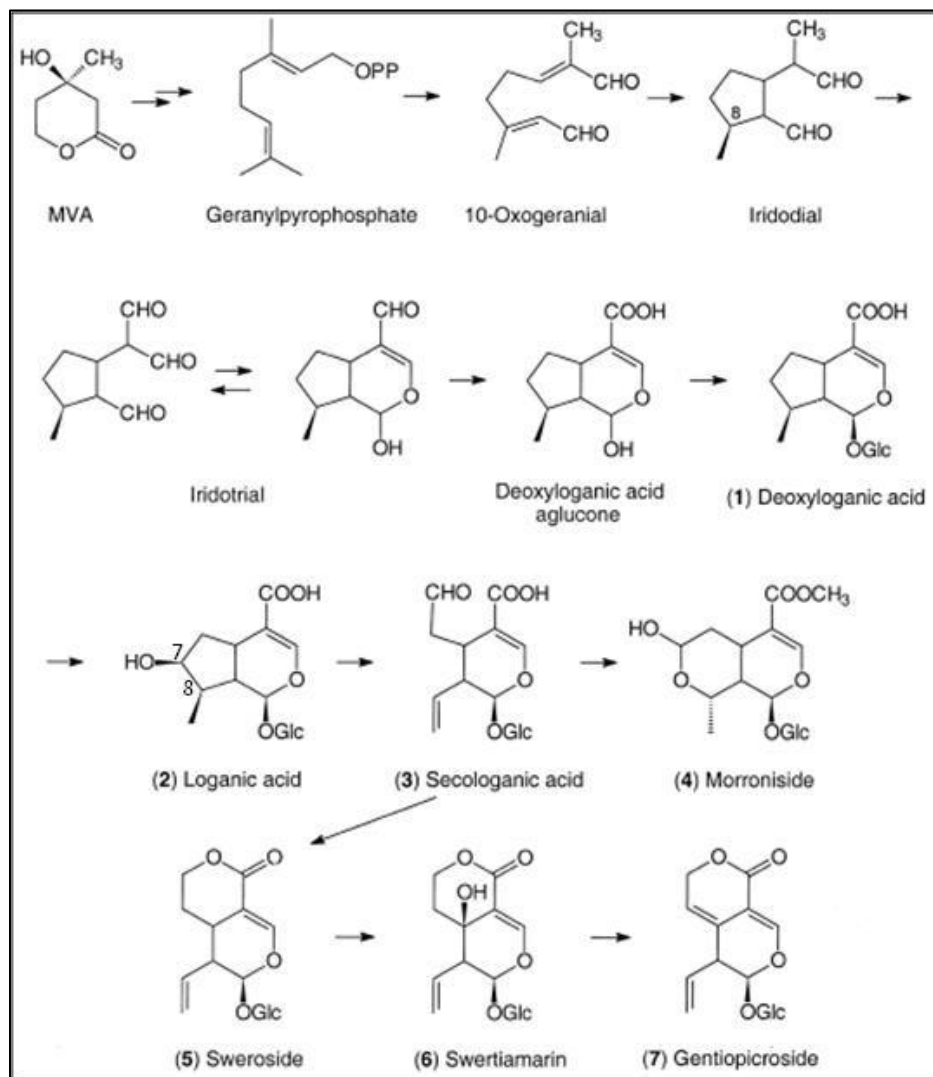


Figure III.30 : Schéma biosynthétique des séco-iridoïdes (MVA = mevalonolactone. Source : Jensen et al. [100].

Une étude qualitative et semi-quantitative des séco-iridoïdes en CLHP a été réalisée sur les extraits de feuilles, de bois et d'écorce de tronc afin de vérifier leur répartition dans la plante. Les témoins swertiamarine et gentiopicroside ont permis de localiser les pics sur le chromatogramme (fig. III.31). La swertiamarine (TR = 6,8 min) est majoritairement présente dans les feuilles mais elle se rencontre également à l'état de traces dans le bois et l'écorce. Le gentiopicroside (TR = 8,2 min) et le swéroside (TR = 9,1 min) sont abondants dans l'écorce et le bois mais aussi présents à l'état de traces dans les feuilles. Toutefois, le swéroside est plus abondant dans le bois.

Le rôle exact des iridoïdes dans les plantes n'est pas certain. Cependant, l'amertume de ces composés pourrait leur conférer le rôle de répulsifs pour des herbivores [99].

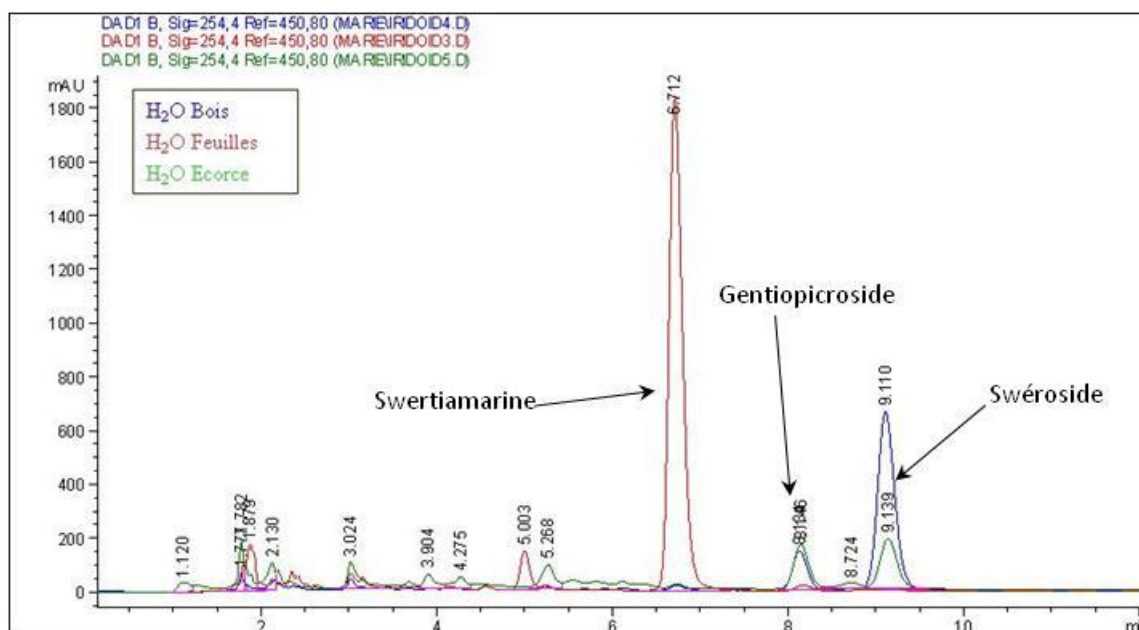


Figure III.31 : Profil chromatographique des extraits aqueux de bois de tronc, d'écorce de tronc et de feuilles de *F. fragrans*.

### III.2.C. Activités biologiques

#### III.2.C.1. Tests antiplasmodiaux *in vitro*

##### Extraits polaires et transformations

Bien que les extraits polaires n'aient présenté aucune activité antiplasmodiale, et ce tant lors de l'étude préliminaire [91] que dans nos travaux personnels (tableau III.9), nous avons jugé intéressant d'analyser les extraits après les avoir soumis à des hydrolyses acides et alcalines dans le but de simuler une métabolisation.

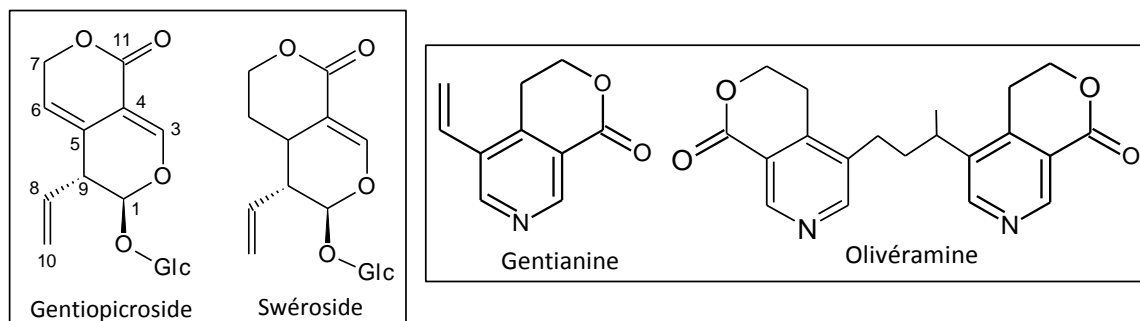
Drogue	Extrait MeOH Cl <sub>50</sub> (µg/ml)	Extrait DCM Cl <sub>50</sub> (µg/ml)
Bois	> 50 (131)	41
Ecorce de tronc	> 50 (59)	20
Feuilles	> 50 (77)	11

Tableau III.9 : Activité antiplasmodiale des extraits de *Fagraea fragrans* vis-à-vis de la souche chloroquino-sensible 3D7 du *Plasmodium falciparum*.

##### Transformation chimique

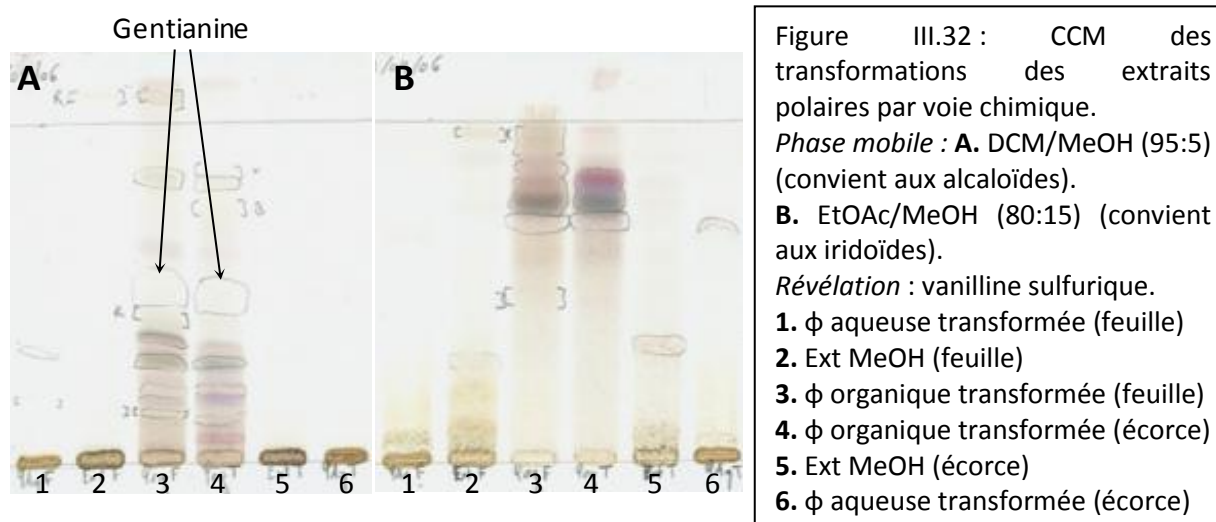
Il est à noter que les iridoïdes, étant des molécules instables, se transformeraient facilement en composés qui pourraient être plus actifs du point de vue pharmacologique. Des travaux ont montré que le gentiopicroside, par exemple, pouvait être transformé par l'organisme animal [207] : après une administration orale de cet iridoïde chez le rat, la gentianine et le gentianal sont apparus dans le sérum aux dépens d'une diminution de gentiopicroside. La flore du tractus gastro-intestinal jouerait donc un rôle significatif dans l'activation métabolique de ces composés. De ce fait, les iridoïdes peuvent être considérés comme des prodrugs, précurseurs de composés azotés.

A cette fin, nous avons transformé par voie chimique le gentiopicroside et le swéroside. Il apparaît que ces deux iridoïdes, différant d'une double liaison en 5,6 dans la fonction lactone, peuvent être transformés en la même molécule à savoir la gentianine, et que le swéroside, étant plus instable par l'absence de cette double liaison, forme également l'olivéramine, dimère de la gentianine [102].



Ces deux alcaloïdes pyridiniques ont également été testés contre *Plasmodium falciparum* mais leur activité est faible (olivéramine), voire inexistante (gentianine) (tableau III.10). Ce dernier résultat est d'ailleurs conforté par l'étude de Natarajan *et al.* [136].

Les extraits MeOH ont également été transformés chimiquement afin de vérifier si d'autres composés réagissaient. Les produits de transformation obtenus dans l'extrait de feuilles et d'écorce de tronc sont assez nombreux, mais la gentianine est le produit de transformation majoritaire, que ce soit à partir des feuilles ou des écorces (fig. III.32). On peut en déduire que la swertiamarine (produit majoritaire de l'extrait polaire des feuilles) se transforme également en cet alcaloïde. D'ailleurs des études *in vivo* ont montré la biotransformation des trois iridoïdes en gentianine [53, 54].



Au vu des activités antiplasmodiales (tableau III.9), l'extrait d'écorce transformé est nettement plus actif que celui des feuilles. D'autres produits de transformation doivent donc être formés. La différence de composition se traduit dans des produits visibles aux UV, mais produisant dans le visible des couleurs mauve et violette après pulvérisation à la vanilline sulfurique (fig. III.32).



Echantillons à transformer	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Produit(s) de transformation	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
Gentiopicroside	> 50	Gentianine	> 50
Swéroside	> 50	Gentianine et olivéramine	> 50 et 22
Ext. MeOH écorce de tronc	33	Mélange complexe	7
Ext. MeOH feuilles	> 50	Mélange complexe	24

Tableau III.10 : Activité antiplasmodiale vis-à-vis de la souche chloroquino-résistante W2 avant et après transformation chimique.

### Hydrolyse acide

Une hydrolyse acide a été réalisée sur l'extrait MeOH d'écorce de tronc et sur un mélange de gentiopicroside et swéroside afin de vérifier si leur génine ne se retrouvait pas dans l'extrait DCM. La CCM B (fig. III.33 : # 1, 2, 6, 7) permet de vérifier l'efficacité de l'hydrolyse ; les sucres présents dans les phases aqueuses sont de couleur jaune à la vanilline sulfurique. Nous constatons qu'il reste des iridoïdes non hydrolysés à l'état de traces dans les phases aqueuses. En analysant la CCM A (fig. III.33 : # 3, 4, 5), aucun composé des phases organiques et de l'extrait DCM n'est commun. Les génines des séco-iridoïdes ne sont donc pas présentes dans l'extrait DCM.

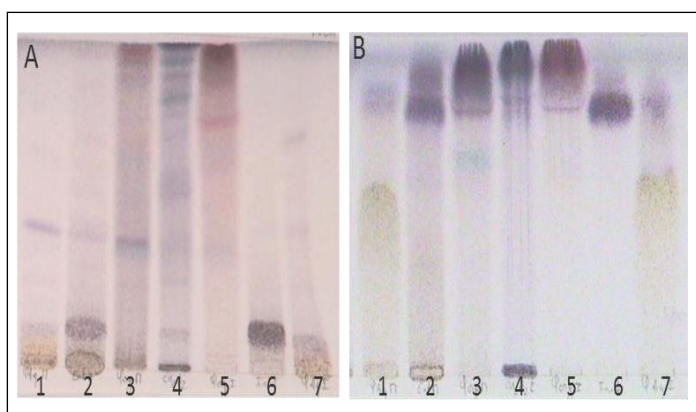


Figure III.33 : CCM des hydrolyses acides. Phase mobile : **A.** DCM/MeOH (9:1) ; **B.** EtOAc/MeOH (1:1).  
Révélation: vanilline sulfurique.  
**1.** Ext. MeOH écorce hydrolysé (φ aqueuse) ; **2.** Ext. MeOH écorce ; **3.** Ext. MeOH écorce hydrolysé (φ organique) ; **4.** Ext. DCM écorce ; **5.** Iridoïdes hydrolysés (φ organique) ; **6.** Iridoïdes (swéroside et gentiopicroside) ; **7.** Iridoïdes hydrolysés (φ aqueuse).

Concernant l'activité antiplasmodiale (tableau III.11), nous constatons que les génines formées ne possèdent pas une activité remarquable *in vitro* (Ext. MeOH écorce et iridoïdes hydrolysés) puisque les phases organiques extraites après l'hydrolyse acide présente des valeurs de CI<sub>50</sub> autour des 18 à 26 µg/ml. De plus, l'ajout d'ammoniaque lors de la transformation chimique est primordial pour obtenir une activité antiplasmodiale puisque l'activité de l'échantillon « hydrolyse acide » de l'extrait MeOH écorce de tronc (possédant la même étape de chauffage en milieu acide) est trois fois moins importante que celle de la transformation chimique de l'extrait MeOH écorce (CI<sub>50</sub> = 7 µg/ml ; cf. tableau III.10).

Echantillons	CI <sub>50</sub> (W2)	CI <sub>50</sub> (3D7)
Ext. MeOH écorce hydrolysé (φ organique)	18 µg/ml	23 µg/ml
Iridoïdes hydrolysés (φ organique)	22 µg/ml	26 µg/ml
Ext. DCM écorce	13 µg/ml	20 µg/ml

Tableau III.11 : Activité antiplasmodiale des hydrolyses acides vis-à-vis des deux souches.

Suite à ces résultats, nous pouvons conclure que les séco-iridoïdes, sous forme hétérosidique ou aglycone, ou leurs produits de transformation, ne présentent pas d'activité antiplasmodiale érythrocytaire intéressante. Il se pourrait cependant que l'extrait MeOH renferme des composés minoritaires également instables qui se transformeraient en composés actifs *in vitro* en présence d'ammoniaque. Mais, étant donné qu'aucun composé de ce type n'a pu être isolé de l'extrait MeOH, il est difficile de concevoir l'isolement des produits provenant de leur transformation car la thématique de cette thèse serait alors orientée vers l'hémisynthèse et non vers l'isolement de produits naturels.

Le gentiopicroside, le swéroside et la swertiamarine ont fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques. Les principales activités sont résumées dans le tableau III.12.

Nous constatons que, parmi les effets cités, un effet analgésique est prouvé non seulement pour le gentiopicroside, mais aussi et surtout pour la swertiamarine. Cette dernière possède de surcroît une activité anti-inflammatoire et un effet sédatif. Ces propriétés pourraient en partie expliquer l'utilisation traditionnelle du *Fagraea fragrans* pour traiter les fièvres. Par conséquent, même si ces séco-iridoïdes ne soignent pas le paludisme, ils pourraient aider à soulager quelques uns de ses symptômes.

Activité	Gentiopicroside	Swéroside	Swertiamarine
Cicatrisante	Effet cicatrisant démontré <i>in vitro</i> sur des fibroblastes : le composé actif doit augmenter (1) la prolifération des fibroblastes, (2) l'activité mitotique, (3) le nombre de cellules polygonales (formes actives de la cicatrisation), (4) la production de collagène et (5) avoir un effet cytoprotecteur [147].	Peu cicatrisant mais cytoprotecteur : (1) - (2) - (3) +++ (4) +++ (5) ++	Très cicatrisant et cytoprotecteur : (1) +++ (2) +++ (3) +++ (4) ++ (5) +++
Anti-spasmodique	Action bloquante de l'entrée de Ca <sup>++</sup> (contraction induite par KCl et BaCl <sub>2</sub> ), mais effet modéré pour les contractions histaminergique et cholinergique [177].	Inhibition significative de contractions de l'iléum (induites électriquement) à une DE <sub>50</sub> = 400 µM [8].	Effet anticholinergique (contractions du colon induites par du carbachol [205], par Ach, BaCl <sub>2</sub> et histamine [75]).
Anti-bactérienne	Antibactérien sur <i>Serratia marcescens</i> (MIC = 6 µg/ml), <i>Bacillus cereus</i> (MIC = 25 µg/ml), <i>B. subtilis</i> (MIC = 100 µg/ml), <i>Citrobacter freundii</i> (MIC = 25 µg/ml), <i>Enterococcus faecalis</i> (MIC = 25 µg/ml), <i>E. coli</i> (MIC = 25 µg/ml), <i>Klebsiella aerogenes</i> (MIC = 50 µg/ml), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MIC = 100 µg/ml), <i>Proteus mirabilis</i> (MIC = 100 µg/ml), <i>Staphylococcus aureus</i> (MIC = 100 µg/ml), <i>S. hominis</i> (MIC = 50 µg/ml) [115].	Antibactérien modéré (MIC = 1 mg/ml) contre Gram + : <i>Bacillus cereus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Micrococcus kistinae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , et Gram - : <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> [90]. Antibactérien sur <i>Bacillus cereus</i> (MIC = 20 µg/ml), <i>B. subtilis</i> (MIC = 200 µg/ml), <i>Citrobacter freundii</i> (MIC = 10 µg/ml), <i>E. coli</i> (MIC = 200 µg/ml), <i>S. epidermidis</i> (MIC = 200 µg/ml); pas d'effet sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella goldcoast</i> [114].	Antibactérien sur <i>Bacillus cereus</i> (MIC = 20 µg/ml), <i>B. subtilis</i> (MIC = 200 µg/ml), <i>Citrobacter freundii</i> (MIC = 5 µg/ml), <i>E. coli</i> (MIC = 200 µg/ml), <i>Proteus mirabilis</i> (MIC = 200 µg/ml), <i>Serratia marcescens</i> (MIC = 20 µg/ml); pas d'effet sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella goldcoast</i> [114].
Gastro-protectrice	Aucune protection significative contre des ulcères induits chez le rat (DI <sub>50</sub> > 250 mg/kg) [141]		Faible protection contre des ulcères induits chez le rat (DI <sub>50</sub> = 167 mg/kg) [141]
Hépatoprotectrice	Action sur l'inhibition de production de TNF (tumor necrosis factor) lors de toxicité hépatique induite chimiquement (par CCl <sub>4</sub> ) et immunologiquement (par BCG/LPS) [112]. Hépatoprotecteur modéré lors de toxicité induite par galactosamine/LPS [86].	Hépatoprotecteur contre deux types de toxiques : Cd (Cadmium) et CCl <sub>4</sub> mais aucun effet contre l'acétaminophène, ni l'alcool allyl [126]. Hépatoprotecteur modéré lors de toxicité induite par galactosamine/LPS [86].	Hépatoprotecteur sur des toxicités hépatiques induites par du CCl <sub>4</sub> et de la galactosamine [75]. Effet hépatoprotecteur (200 mg/kg), probablement de type anti-oxydant, équivalent à la silymarine (100 mg/kg) pour une toxicité induite à la galactosamine chez le rat. [95].

Activité (suite)	Gentiopicroside	Swéroside	Swertiamarine
Antitumorale	L'aglycone possède une légère activité anti-leucémique chez la souris. [93].	L'aglycone possède une activité modérée anti-leucémique chez la souris [93].	Légère inhibition de la formation d'ARN et de la synthèse de protéine dans des cellules tumorales murines (sarcome 180) [75].
Analgésique	Inhibition d'une allodynie mécanique en diminuant l'expression des récepteurs NR2B dans le cortex cingulaire antérieur [36].		Effet analgésique sur souris équivalent à 10 mg/kg de morphine mais avec une plus longue durée d'action [75]. Potentialisation de l'effet analgésique de la morphine, mais n'a aucune action analgésique seule [18]. Effet antinociceptif central (« hot-plate test » et « tail immersion ») et effet antinociceptif périphérique (induction par acide acétique) à 200 mg/kg meilleur que le paracétamol à 100 mg/kg <i>per os</i> chez la souris [96].
Sédative			Induction d'hypothermie, diminution du tonus musculaire chez la souris. Action anticonvulsivante chez des souris hyperactives induite par la mangiférine [18].
Antioxydante	Effet antioxydant (test au DPPH) peu marqué [115].	Pas d'effet antioxydant (test au DPPH) [114].	Pas d'effet antioxydant (test au DPPH). Pas d'inhibition de la peroxydation lipidique, ni sur la déoxyribose mais effet antioxydant marqué contre le peroxyde d'hydrogène et le cation ABTS <i>in vitro</i> [94].
Antifongique	Aucune activité vis-à-vis de <i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Trichoderma viride</i> [186].	Aucune activité vis-à-vis de <i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Trichoderma viride</i> [186].	
Anti-inflammatoire, anti-arthritique			Effet anti-oedématogénique (à 200 mg/kg <i>per os</i> chez le rat, meilleur que le témoin) perçu sur des oedèmes induits par le carraghénane, l'histamine et la formaline (utilisée pour des tests anti-arthritique) [94].
Anti-hyperlipidémique			Diminution significative du taux de triglycérides et de cholestérols LDL et VLDL dans le sérum de rat après administration <i>per os</i> (50 mg/kg) [192].

Tableau III.12 : Principales activités pharmacologiques testées des séco-iridoïdes isolés (gentiopicroside, swéroside et swertiamarine).

### Extraits apolaires

Les extraits au dichlorométhane, quant à eux, présentent une certaine activité antiplasmodiale (tableau III.9) mais la partie de la plante la plus active s'inverse selon la souche utilisée. Dans le screening préliminaire, l'activité antiplasmodiale vis-à-vis de la souche chloroquino-résistante (W2) était plus marquée avec l'extrait DCM d'écorce de tronc. Cependant, dans le cas de la souche chloroquino-sensible (3D7), l'extrait apolaire des feuilles démontre une meilleure activité. Dès lors, il se peut que le mécanisme d'action des composés actifs des feuilles soit du même type que celui de la chloroquine, et les composés actifs de l'écorce possède un mécanisme d'action différent.

Vu cette différence d'activité, les deux extraits apolaires ont été investigués. Les tests pour le bioguidage ont donc été réalisés sur l'une ou l'autre souche responsable de l'activité. Les résultats exprimés en  $CI_{50}$  se trouvent dans les schémas de fractionnement (fig. III.9 et III.14). L'activité des fractions de l'extrait d'écorce ne s'accroît pas et ne se retrouve que dans une fraction comprenant F6 et F7. Malheureusement, les sous-fractions ne sont pas plus actives. La même observation se remarque sur l'activité antiplasmodiale *in vitro* de l'extrait DCM des feuilles : l'activité ne s'améliore pas au cours des différents fractionnements. On pourrait donc penser que l'activité prometteuse observée dans les extraits bruts de départ soit due à des composés labiles qui se détériorent lors des chromatographies (cas du composé F3P). L'autre explication probable peut être la présence de plusieurs composés minoritaires qui agiraient en synergie. Au vu des analyses de quelques fractions en masse exacte, on pourrait en déduire qu'il s'agit probablement de triterpènes.

Par ailleurs, plusieurs terpènes (sesqui-, di-, tri-terpènes et des stéroïdes) ont été décrits comme possédant une activité antiplasmodiale [13]. Une revue [16] démontre d'ailleurs que parmi les classes phytochimiques rapportant une activité antiplasmodiale prometteuse *in vitro*, figurent les diterpènes et les triterpènes. Malheureusement, aucun des composés actifs décrits dans la littérature ne provient de plantes issues de la famille des Gentianaceae. Plusieurs autres revues décrivent les composés antiplasmodiaux naturels des 20 dernières années mais, à nouveau, aucun ne provient des Gentianaceae [17, 20, 31, 107, 179]. De plus, si on se réfère à la valeur d'une activité prometteuse permettant d'isoler des molécules actives (cf. chapitre VI : VI.2.A.4), les fractions obtenues ne rentrent pas dans cet intervalle, elles sont considérées comme peu actives.

En se référant à la classification habituelle pour une activité antiplasmodiale de composés purs (cf. chapitre VI : § VI.2.A.4), le fagraldéhyde ne possède pas non plus d'activité prometteuse :  $CI_{50}$  (W2) = 117  $\mu$ M ; 22,4  $\pm$  1,8  $\mu$ g/ml et  $CI_{50}$  (3D7) = 200  $\mu$ M ; 38,4  $\mu$ g/ml. Ces résultats ne sont donc pas favorables à la découverte d'un nouveau composé antiplasmodial des stades intra-érythrocytaires de *Plasmodium falciparum* à partir de *Fagraea fragrans*.

### III.2.C.2. Tests cytotoxiques *in vitro*

Le criblage préliminaire a également porté sur un test de cytotoxicité sur la lignée de monocytes humains, THP1. Au vu des résultats, les extraits polaires ne semblent pas cytotoxiques, par contre les extraits DCM des feuilles et d'écorce rapportaient une  $CI_{50}$  de 61 et 55  $\mu$ g/ml respectivement.

Grâce à plusieurs collaborations, nous avons pu tester les extraits bruts, quelques fractions et un produit pur sur différentes lignées humaines. Les résultats préliminaires concernant les extraits bruts ont été confirmés sur trois autres lignées : les extraits polaires ne présentaient aucune activité sur les lignées WS1 (fibroblastes de peau), DLD-1 (adénocarcinome colorectal) et A-549 (carcinome de poumon). Par contre les extraits DCM montraient une activité modérée, surtout sur la lignée A-549 (tableau III.13).

Echantillons écorce	WS1	DLD1	A549	IS par rapport à la $CI_{50}$ la plus petite
Ext DCM	145	132	29	2,2
F4c	> 200	> 200	> 200	/
F4e	127	174	108	/
F6a	> 200	> 200	> 200	> 10
F6b	176	> 200	170	11,3
F6c	197	165	> 200	4,0
F6e	> 200	195	> 200	6,3

Tableau III.13 : Activité cytotoxique ( $CI_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ) des fractions d'écorce de *F. fragrans* vis-à-vis de 3 lignées cellulaires humaines.

Les fractions testées de l'écorce (les plus actives vis-à-vis de *Plasmodium*) ne sont pas cytotoxiques. Il semble donc que le(s) composé(s) responsable(s) de la toxicité sur la lignée A-549 soi(en)t présent(s) dans les fractions non- antiplasmodiales.

Le fragraldéhyde ne montre aucune cytotoxicité, tant sur la lignée de fibroblastes de poumon, WI-38, que sur la lignée de carcinome colorectal, HCT-116 mais présente une  $CI_{50}$  de 18  $\mu\text{g/ml}$  sur la lignée THP1. Il semble donc que l'activité antiplasmodiale perçue ne soit pas spécifique et que probablement le fragraldéhyde présente une activité cytotoxique modérée sur certaines lignées cellulaires.

En ce qui concerne les fractions des feuilles, une certaine toxicité est remarquée, surtout dans la fraction F2 (tableau III.14).

Echantillons feuilles	WS1	DLD1	A549	IS par rapport à $CI_{50}$ la plus petite
Ext DCM	179	120	58	5,5
F1	50	32	53	2,9
F1a	25	19	32	1,0
F1b + F1c	97	96	92	3,5
F1d + F1e	55	53	72	2,7
F2	12	16	23	1,0
F3	44	62	57	2,3
F7	55	70	57	1,4
F9	156	> 200	171	3,1

Tableau III.14 : Activité cytotoxique ( $CI_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ) des fractions de feuilles de *F. fragrans* vis-à-vis de 3 lignées cellulaires humaines.

Rappelons que dans les fractions F2 et F3, les produits majoritaires sont des triterpènes. Peut-être même que l'acide bétulinique est présent dans F3. La littérature démontre une activité cytotoxique de l'acide bétulinique allant de 3 à 17 µg/ml selon la lignée testée [55, 125]. L'activité antiplasmodiale décrite n'est donc pas spécifique. Les sous-fractions de F1 ne présentent pas non plus un bon index de sélectivité (IS) qui, selon l'OMS, devrait être supérieur à 10. Il semble donc que les terpènes que nous voulions purifier suivant le bioguidage antiplasmodial ne soient pas spécifiques de cette activité.

### III.2.C.3. Tests d'hémolyse *in vitro*

Des tests d'hémolyse ont été réalisés afin de vérifier l'absence de faux positifs lors des tests antiplasmodiaux *in vitro* qui se réalisent avec des érythrocytes humains. En effet, si l'échantillon engendre une hémolyse, le parasite ne peut se développer correctement et donc l'effet antiplasmodial mesuré ne reflèterait pas l'action de l'échantillon sur le plasmodium.

Les extraits au méthanol et au dichlorométhane des feuilles et de l'écorce de tronc de *Fagraea fragrans* ont donc été testés à deux concentrations : 100 µg/ml et 50 µg/ml. Un pouvoir hémolytique se définit si le pourcentage d'hémolyse est supérieur à 5 %. Dans le cas des échantillons de *F. fragrans*, seul l'extrait DCM d'écorce engendre une légère hémolyse de 10,2 % à la concentration de 100 µg/ml. Mais comme la  $CI_{50}$  vis-à-vis de la souche W2 est nettement plus basse (13 µg/ml), nous pouvons conclure que les résultats obtenus lors des tests antiplasmodiaux ne sont pas influencés par cette faible action hémolytique.

### III.2.C.4. Tests antipaludiques *in vivo*

Dans l'optique de confirmer une activité antimalarique d'une décoction d'écorce de *Fagraea fragrans* décrite par la population cambodgienne, l'extrait aqueux a été testé sur une souche plasmodiale murine, *Plasmodium berghei*. Comme la biodisponibilité de l'extrait et la dose utilisée traditionnellement ne sont pas connues, nous avons procédé au test préliminaire approuvé par l'OMS, le « 4-Day Suppressive Test » [57].

Deux doses de l'extrait aqueux ont été utilisées chez la souris afin de voir s'il existait une relation dose/effet. Un groupe de 5 souris a été traité par une dose de 50 mg/kg/jour et un autre groupe avec une dose de 300 mg/kg/jour pendant 4 jours *per os*, pour se rapprocher de l'utilisation traditionnelle. Les souris ont été observées pendant leur survie, et la parasitémie a été contrôlée le 4<sup>e</sup> jour, le 5<sup>e</sup> jour et le 7<sup>e</sup> jour après le premier traitement (fig. III.34).

L'observation des souris annonçait que le traitement ne faisait pas beaucoup d'effet dans aucun des deux groupes. A vrai dire, les deux groupes se sont comportés de la même manière : au lendemain du dernier traitement, les souris semblaient faibles, leur queue était blanche (indiquant une probable anémie) et leurs poils ébouriffés. Le 5<sup>e</sup> jour, 3 souris de chaque groupe de l'extrait *F. fragrans* sont mortes et le 6<sup>e</sup> jour encore 1 souris de chaque groupe est morte.

En analysant les parasitémies (fig. III.34), nous constatons que, bien que la plupart des souris soient mortes deux jours après le dernier traitement (J5), la parasitémie a

diminué significativement par rapport au témoin négatif (sérum physiologique). Les deux seules souris encore vivantes le 7<sup>e</sup> jour (J7) montraient une parasitémie minimale (4 fois plus petite que le témoin négatif). Vu l'effectif trop petit des groupes, le test statistique ne permet pas de valider ce résultat comme statistiquement significatif. Nous pouvons simplement observer que le nombre de globules rouges parasités est beaucoup plus faible que le témoin négatif (inhibition parasitaire de 73 %) mais que la mortalité est néanmoins élevée. De plus, comme aucun effet dose-dépendant n'est observé, on ne peut conclure à aucun effet antiplasmodial important chez la souris.

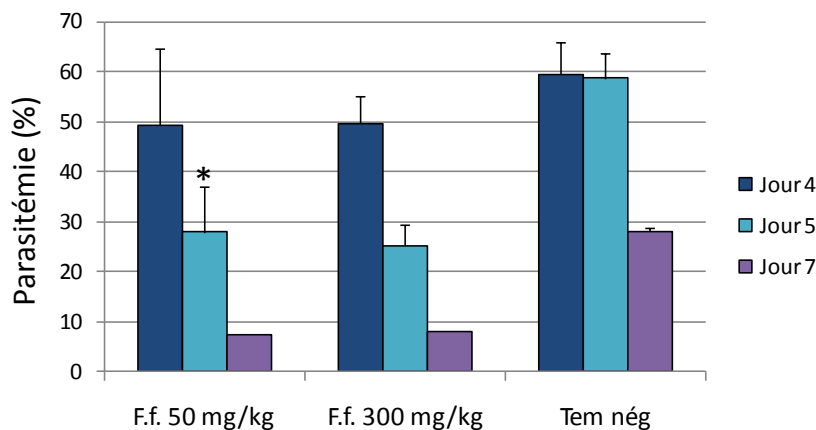


Figure III.34 : Parasitémie chez la souris infestée par *Plasmodium berghei* et traitée par l'extrait aqueux de l'écorce de *F. fragrans* (F.f.) administré *per os* aux doses de 50 et 300 mg/kg/jour. \* =  $p < 0,05$ .

Notons toutefois que le tradipraticien cambodgien utilise une poudre végétale conservée maximum un an (§ III.1.C) et que pour ce test nous avons utilisé une poudre datant de 4 ans.

Par ailleurs, l'extrait aqueux ne montrait aucune activité antiplasmodiale *in vitro* ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ )[91] et, comme les métabolismes murin et humain sont différents, on ne peut exclure un effet plus important chez l'homme. Une autre hypothèse qui expliquerait cette différence serait la stimulation de l'éryptose qui induirait la clairance plus rapide des érythrocytes infestés [111]. En effet, l'éryptose est l'exposition de phosphatidylsérine sur la surface des globules rouges (suite au dommage laissé par l'entrée du parasite par exemple) qui induit leur phagocytose par des macrophages. L'éryptose est inhibée par l'oxyde nitrique (NO) qui est synthétisé lors de l'inflammation induite dans ce cas par une infection parasitaire. Il se pourrait dès lors que l'extrait de *F. fragrans* inhibe la production de NO, menant ainsi à une éryptose.

### III.2.D. Conclusion

Suite à des enquêtes ethnopharmacologiques, *Fagraea fragrans* Roxb. (Gentianaceae) a été renseignée comme curative des états fébriles, surtout d'origine paludéenne, dans différentes régions du Cambodge. L'introduction de ce chapitre démontre que les connaissances scientifiques sur l'espèce *Fagraea fragrans*, couramment utilisée dans les régions où elle croit, sont peu importantes tant du point de vue phytochimique que pharmacologique.



Grâce à diverses techniques chromatographiques, les extraits d'écorce de tronc et de feuilles ont pu être fractionnés et quelques composés ont pu être isolés. Un nouveau séco-iridoïde aglycone jamais décrit auparavant a été mis en évidence dans l'écorce. Cet iridoïde, nommé fagraldéhyde, possède un squelette tout à fait original. Une hypothèse biosynthétique a d'ailleurs été postulée : la coupure oxydative du cycle pentanique typique des séco-iridoïdes serait dans ce cas-ci apparue plus tôt que pour les séco-iridoïdes classiques, permettant un réarrangement différent du cycle hétéroatomique. Le fagraldéhyde obtenu se présente sous forme de mélange racémique. Grâce à la modélisation moléculaire et à l'analyse NOESY en RMN, la stéréochimie et le couple d'énantiomères présents a été défini. La modélisation moléculaire a également permis le calcul d'un spectre DC théorique pour chaque configuration. Ce dernier pourrait être utile lors d'une détermination de configuration d'un échantillon de fagraldéhyde nouvellement purifié (qui serait énantiomériquement pur).

Trois autres séco-iridoïdes ont également été isolés : le swéroside, la swertiamarine et le gentiopicroside. Notons que la présence de swertiamarine est ici décrite pour la première fois dans le genre *Fagraea*. En outre, ce travail a permis de confirmer la présence de gentiopicroside chez *F. fragrans* et de découvrir le swéroside dans cette même espèce. Bien que ces trois séco-iridoïdes soient des précurseurs biosynthétiques directs les uns des autres, leur distribution dans les organes de la plante diffère. La swertiamarine est majoritaire dans les feuilles tandis que le gentiopicroside et le swéroside se retrouvent principalement dans le bois et l'écorce de tronc.

D'un point de vue chimiotaxonomique, notre étude démontre la présence de séco-iridoïdes et l'absence d'alcaloïdes. Dès lors, nous rejoignons les conclusions obtenues par les méthodes phylogénétiques quant à la classification de *Fagraea* dans les Gentianaceae qui sont connues pour ne pas biosynthétiser des alcaloïdes contrairement aux Loganiaceae.

Du point de vue pharmacologique, les trois séco-iridoïdes précités ne possèdent aucune activité antiplasmodiale. Toutefois, au vu de leur activité décrite dans la littérature, ils pourraient participer aux soulagements de quelques symptômes ressentis lors d'une crise de malaria (douleur, fièvre). Le fagraldéhyde possède une faible activité antiplasmodiale mais cette activité n'est pas sélective puisqu'une certaine cytotoxicité est également perçue *in vitro* sur certaines lignées de cellules humaines.

L'hypothèse de biotransformation des iridoïdes a aussi été envisagée. Le produit de transformation chimique des iridoïdes, la gentianine, n'a aucune activité antiplasmodiale. L'extrait méthanolique transformé chimiquement possède cependant une activité prometteuse ; il se pourrait que d'autres composés minoritaires se transforment en composé actifs *in vitro*. Enfin, une action synergique de plusieurs composés modérément actifs pourrait aussi être évoquée.

L'un des objectifs de cette thèse, à savoir la découverte de nouveaux composés antiplasmodiaux agissant sur le cycle érythrocytaire du *Plasmodium falciparum*, n'a pu être atteint en étudiant *Fagraea fragrans*. Le bioguidage n'a pas abouti à l'isolement de principes actifs puisque l'activité antiplasmodiale n'a pas augmenté lors du fractionnement. De surcroît, les fractions actives de l'extrait DCM des feuilles se sont également révélées cytotoxiques, ce qui pourrait être attribué à des triterpènes tel

l'acide bétulinique, également connu pour ses propriétés antitumorales. Par contre, certaines fractions de l'extrait DCM d'écorce, renfermant principalement des triterpènes, possèdent une activité antiplasmodiale modérée sélective (IS >10). Mais, cet extrait DCM d'écorce semble renfermer également des composés instables se dégradant au cours du fractionnement et pourraient d'ailleurs être responsables de l'activité perçue dans l'extrait DCM brut. Cette hypothèse renforce l'utilisation de la plante *in totum*.

La vérification de l'effet des plantes utilisées en médecine traditionnelle contre le paludisme peut également s'effectuer *in vivo*. L'extrait aqueux, administré oralement chez la souris à une dose de 50 mg/kg et de 300 mg/kg pendant quatre jours, n'a montré aucun effet dose-dépendant et les souris sont mortes à peu près aux mêmes moments que les souris du groupe négatif. La décoction d'écorce de tronc de *F. fragrans* ne semble pas pouvoir éliminer le parasite de l'organisme.

Cependant, il se pourrait que *Fagraea fragrans* ait une activité anti-inflammatoire qui inhiberait les mécanismes pro-inflammatoires du plasmodium ou qui stimulerait l'éryptose. La littérature actuelle ne présente pas de modèles *in vivo* adéquats pour vérifier la première hypothèse. Cependant, des tests anti-inflammatoires classiques devraient être envisagés pour les extraits de *F. fragrans*. Cette activité pharmacologique semble encourageante : un test préliminaire a été réalisé sur quelques fractions d'extraits DCM de *F. fragrans* à la recherche d'une activité anti-inflammatoire. Les résultats *in vitro* obtenus sur ce plan étaient en effet très prometteurs (cf. Annexe V : poster). Mais comme cette activité ne rentre pas dans la thématique de cette thèse, l'étude n'a pas été portée plus loin.

D'autres perspectives pourraient être également envisagées, il se pourrait que la plante ait d'autres activités thérapeutiques indiquées par l'utilisation traditionnelle, telles qu'antipyrétique, analgésique. Des tests de toxicité devraient également être mis en œuvre pour confirmer l'absence de risque pour la population utilisant l'écorce de *Fagraea fragrans*.

## CHAPITRE IV :

### Contribution à l'étude de *Strychnos nux-vomica* L.

---

#### IV.1. INTRODUCTION : TRAVAUX ANTERIEURS

##### IV.1.A. Bref historique des *Strychnos* au Laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg

Le genre *Strychnos* est étudié dans le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège depuis les années 50 et a fait l'objet d'une dizaine de thèses de doctorat pour l'étude des alcaloïdes et de diverses activités pharmacologiques (curarisante, cytotoxique, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, antiplasmodiale principalement).

Le genre *Strychnos* a une distribution géographique assez large car il se retrouve dans les régions tropicales de trois continents sous forme de lianes, d'arbustes et d'arbres : l'Amérique latine (~ 71 espèces), l'Afrique (~ 75 espèces) et l'Asie (~ 45 espèces). De nombreuses espèces sont utilisées en médecine traditionnelle. La pulpe de fruit de la plupart des espèces arbustives est comestible. Cependant, leurs graines sont souvent toxiques et sont d'ailleurs utilisées traditionnellement comme poison de chasse, de pêche ou d'ordalie [21, 22]. Leur toxicité est due soit à une action tétanisante soit curarisante selon la structure des alcaloïdes responsables (cf. § IV.1.F).

L'étude de l'activité antiplasmodiale dans le laboratoire de l'ULg débuta grâce à une collaboration anglaise qui permit d'évaluer les activités antiprotozoaires (*Entamoeba histolytica*, *Plasmodium* sp.) [202]. Les bons résultats obtenus en particulier pour les alcaloïdes de *Strychnos usambarensis* (strychnopentamine et dihydrousambarensine) vis-à-vis du *Plasmodium falciparum* incitèrent les chercheurs liégeois à une prospection étendue [201]. La plupart des espèces étudiées provenaient d'Afrique, mais dans les années 90, le laboratoire reçut par un de ses collaborateurs un lot de racine de *Strychnos nux-vomica* provenant d'Inde.

Les chercheurs de l'époque, et plus particulièrement Madame Rose Gadi BIALA, entreprirent l'analyse de l'écorce de cette racine qui comportait à sa surface des proéminences oranges-rouges. Les principaux constituants du suber rouge se sont révélés être des alcaloïdes indoliques dont certains absorbant la lumière au-delà de 400 nm et devenant bleu une fois la CCM pulvérisée par le réactif à base d'un mélange chlorure ferrique/acide perchlorique. Ces caractéristiques permirent de localiser et d'isoler un alcaloïde bisindolique nouveau, appelé strychnochrysinine à cause de sa fluorescence orangée [19]. Le décès accidentel de Madame BIALA a stoppé les recherches sur ce sujet. Grâce à la collaboration avec le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de la Méditerranée, le sujet a pu être repris. Ce laboratoire, ayant des contacts au Cambodge, a pu nous fournir un lot d'écorce de tronc de *Strychnos nux-vomica*

### IV.1.B. Bref historique du *Strychnos nux-vomica* et plus particulièrement de son écorce

Le vomiquier est connu depuis longtemps comme poison violent surtout à cause de ses graines vénéneuses. Avant que Linné impose la nomenclature binomiale pour décrire une espèce, la nomenclature était descriptive. Des confusions entre « espèce » étaient courantes suite aux mauvaises interprétations des dialectes proches ou simplement par manque de détails dans la description. Dans bien des cas, il est difficile de faire le lien entre la description d'une espèce avant le 17<sup>e</sup> siècle et le nom binomial donné.

Cependant, *Strychnos nux-vomica* ayant des caractéristiques botanique et toxicologique distinctes, ses différentes appellations antérieures ont pu être reconnues. En Perse antique, l'arbre avait été nommé Kuchila ou Kuchula, mot d'origine sanscrit « kunch » qui signifie « se tordre », allusion au phénomène d'opisthotonos bien connu de la strychnine (cf. § IV.1.F.). Mais il semble qu'à l'époque, *Strychnos nux-vomica* n'était pas utilisé médicalement. Après la conquête arabe en Inde (à partir du 7<sup>e</sup> siècle), la noix vomique était appelé Azaráki par les médecins mahométans. L'antidote (toujours utilisé traditionnellement) de ce poison était le lait et l'huile (qui ralentissent l'absorption de la drogue). Les premières indications médicales se retrouvent sur la côte Malabar ; les racines étaient utilisées comme substituant au *Lignum Colubrinum* (*Stychnos colubrina*), appelé Nágamushidi et utilisé dans le sud de l'Inde comme tonique, antipériodique et alexipharmaque [52]. Les Indiens malabars nommaient le vomiquier Caniram, nom repris par Rheede dans son « Hortus malabarus » [158]. Il décrit aussi les utilisations médicales des plantes. Ainsi, nous constatons qu'à cette époque les écorces mais aussi les graines de *Strychnos nux-vomica*, étaient régulièrement utilisées pour différentes applications (cf. § IV.1.D). L'apparition du *S. nux-vomica* dans les manuscrits européens n'est pas claire car, déjà en 1549, Valerius Cordus en parlait dans le « Pedanii Dioscoridis Anazarbei, De Medicinali Materia Libri Sex ». A la même période, les chinois le mentionnaient dans leur « Grande Pharmacopée » [22].

En Europe, durant le 19<sup>e</sup> siècle, l'écorce du vomiquier a été appelée « fausse angusture » à la suite d'accidents mortels occasionnés par l'imprudance de marchands hollandais. A l'époque, l'écorce d'angusture (*Galipea officinalis*, *Cusparia officinalis* famille des Rutacées) était importée d'Angustura en Colombie pour soigner les fièvres intermittentes. Ces Hollandais ayant reçu un lot d'écorce venu des Indes (mais vendue par des Londoniens) soignant également les fièvres, le mélangèrent à l'angusture. Mais le mélange d'écorces empoisonna plusieurs personnes vers 1807 ; le lot, appelé « fausse angusture », fut alors analysé et le deuxième constituant fut déterminé comme étant l'écorce de *Strychnos nux-vomica* [82].

Le vomiquier, à cause de sa notoriété toxique, a toujours intéressé les chimistes. Pelletier, après avoir isolé la strychnine de la noix vomique avec son collègue Caventou, s'intéressa à l'écorce du vomiquier qui présentait selon lui un lichen de couleur ocre ferrugineuse et appartenant au genre *Chiodecton*. Il extraya ce « lichen » par l'alcool et caractérisa la matière obtenue après évaporation du solvant : poudre azotée jaune-rougeâtre, insoluble dans l'eau froide, prenant une couleur vert émeraude par l'action de l'acide nitrique. Pelletier retrouva cette matière colorante dans l'Upas tieuté, poison

de flèche de Malaisie à base de *Strychnos ignatii*, et l'appela dès lors strychochromine<sup>1</sup>. Une fois décoloré, le « lichen » avait tous les caractères de la fibre ligneuse et brûlait comme du bois [152]. A la fin du 19<sup>e</sup> siècle, l'écorce fut analysée au microscope et les scientifiques conclurent que ce « lichen » était en réalité un développement extraordinaire de la couche subéreuse d'une couleur rouge-orangé [166]. Depuis lors, et à notre connaissance, plus aucune étude botanique n'a été publiée sur cette couche extrasubéreuse du tronc.

Figure IV.1 : Photos du tronc du specimen *Strychnos nux-vomica* récolté au Cambodge et zoom sur le suber couleur rouge-ôcre.



### IV.1.C. Données botaniques

La systématique du genre *Strychnos* a été moins controversée que celle du genre *Fagraea* : les *Strychnos* ont toujours été classés chez les *Loganiaceae*. Toutefois, la circonscription des *Loganiaceae* a souvent été débattue. D'abord, pour Meisner (1840), les *Loganiaceae* incluaient 4 sous-familles dont les *Strychnoideae* séparées des *Loganioideae*. Puis en 1876, Bentham et Hooker ont rassemblés les *Loganiaceae* en 3 sous-familles dont la plus importante, les *Loganieae*, était subdivisée en 6 tribus comprenant les *Strychneae*. Bien plus tard, Leeuwenberg (1963) éclata la famille en 7 sous-familles puis, avec son collègue Leenhouts et pour refléter l'hétérogénéité de ce taxon, ils le divisèrent en 10 sous-familles renfermant 30 genres.

Selon la phylogénie moderne, cette famille *sensu* Leeuwenberg et Leenhouts est polyphylétique (ayant hérité d'un caractère convergent apparu indépendamment et ne provenant pas d'un ancêtre commun). Actuellement, grâce à la phylogénie moléculaire, la famille des *Loganiaceae* s.s. a été rendue homogène et forme un groupe monophylétique (ayant hérité d'un caractère exclusif d'un ancêtre commun) (tableau IV.1).

Elle ne comprend plus que 13 genres : *Antonia*, *Bonyunia*, *Gardneria*, *Geniostoma*, *Labordia*, *Logania*, *Mitrasacme*, *Mitreola*, *Neuburgia*, *Norrissa*, *Spigelia*, *Strychnos* et *Usteria*. Par rapport à la classification de Leeuwenberg et Leenhouts, trois genres ont été inclus chez les *Gentianaceae* (voir *Fagraea*), deux genres chez les *Gelsemiaceae* (voir l'arbre phylogénique au point III.1.B.). Par contre les 12 autres genres restant appartiennent maintenant à des ordres différents [10].

<sup>1</sup> A ne pas confondre avec la **strychnochromine** : alcaloïde tétrahydroquinoléique isolé à partir de l'écorce de racine de *Strychnos gossweileri* et nommé ainsi car parmi près des 100 alcaloïdes isolés dans le laboratoire de Pharmacognosie de Liège, il était le seul, à l'époque, à prendre diverses couleurs, persistantes après plusieurs années, suite à la pulvérisation de divers réactifs chromatographiques.

<b>Classification phylogénétique (APGIII)</b>	
Règne : Plantae	
Sous-règne : Tracheobionta	
Division : Magnoliophyta (angiospermes, plantes à fleurs)	
Clade : Eudicotyledone (dicotylédones vraies)	
Eudicotylédones supérieures (Noyaux des dicotylédones vraies)	
Clade : Astéridées	
Clade : Lamidées (euastéridées I)	
Ordre : Gentianales (contient les familles <i>Apocynaceae</i> , <i>Gelsemiaceae</i> , <i>Gentianaceae</i> , <i>Loganiaceae</i> , <i>Rubiaceae</i> )	
Famille : <i>Loganiaceae</i> (contient 13 genres)	
Genre : <i>Strychnos</i>	

Tableau IV.1 :  
Hiérarchie  
taxonomique de  
*Strychnos nux-vomica*.

### Description botanique

Le vomiquier est un arbre du Sud-Est asiatique à feuilles persistantes, opposées, simples et entières. Le pétiole mesure de 5 à 15 mm de long, le limbe est orbiculaire à largement elliptique ou ovale, de 5 à 18 cm sur 4 à 13 cm, ayant la base arrondie à cordée, l'apex courtement acuminé ou aigu, glabre et brillant sur le dessus, finement poilu en particulier sous les nervures, à 3 à 5 nervures partant de la base.

L'inflorescence est un thyrses axillaire de 3 à 7 cm de long, à nombreuses fleurs bisexuées, régulières, 5-mères. Les lobes du calice sont ovales, densément poilus à l'extérieur ; la corolle est mince en forme de tube d'environ 1 cm de long et s'évase brusquement à la gorge ; elle est glabre à l'extérieur mais garnie de poils laineux disséminés dans la partie interne inférieure ; ses lobes sont étroitement ovales, d'environ 3 mm de long, à bord épaissi et finement poilu, blanc verdâtre à blanc ; les étamines sont insérées à la gorge de la corolle, exsertes ; l'ovaire est supère, ovoïde, glabre, ayant un style atteignant 1 cm de long, le stigmate est capité.

Le fruit, baie globuleuse cortiquée à épicarpe orangé, renferme 2 à 5 graines noyées dans une pulpe blanche. La graine est discoïde légèrement renflée sur les bords. D'un diamètre de 20 à 25 mm et d'une épaisseur moyenne de 5 mm, elle a une teinte généralement gris clair et un aspect satiné dû à un duvet soyeux de poils serrés rayonnant autour d'un point central sur chacune des faces. L'une des faces est marquée par une crête radiale, le raphé.

L'écorce de tronc est rugueuse et par endroit verruqueuse. Cet arbre de 5 à 25 m de haut pousse dans les forêts claires ou à la lisière des forêts denses et dans les forêts à feuilles caduques des collines de 1300 m d'altitude [28] [146].

**Synonymes** : *Strychnos spireana* Dop., *S. vomicus* St. Lag, *S. ovalifolia* Stokes [22].

## IV.1.D. Utilisations ethnobotaniques

### Noms vernaculaires

Sanscrit : *Kupilu, Kulata, Vishamushi, Kuruchilla* ; Tamoul : *Ettimaram, Yettiekottai* ; Bengali et Hindi : *Kuchila* ; Malaisien : *Bidara-laut* ; Cambodgien : *Sleng thom*.

### Utilisation traditionnelle

La noix vomique est employée depuis fort longtemps à des fins émétiques. Sa toxicité était également connue, bien avant la dénomination du végétal par Linné. D'ailleurs ces graines étaient initialement utilisées comme poison pour faire périr les animaux nuisibles. La graine est encore utilisée en médecine ayurvédique comme stimulant digestif, nervin, tonique, aphrodisiaque et antipaludique. Elle se retrouve également dans la composition de formules utilisées en ophtalmologie [76]. En Chine, la graine séchée et subissant un procédé de détoxification est encore utilisée comme analgésique, pour soigner l'indigestion et dans le traitement du cancer du foie.

En Europe, la graine était également utilisée au 16<sup>e</sup> siècle comme tonique, fébrifuge et vermifuge [11]. Plus tard, on importait la noix vomique pour en extraire la strychnine et l'utiliser contre la paralysie saturnine et l'amaurose [188]. Du aux nombreux cas d'intoxication durant ces derniers siècles, la strychnine est utilisée de nos jours uniquement comme outil pharmacologique et la graine est utilisée en homéopathie pour de nombreuses applications.

L'utilisation de l'écorce de tronc à des fins médicales se retrouve dans de nombreux pays du Sud-Est asiatique. Au Sri Lanka et en Inde, elle était utilisée en décoction comme alexipharmaque contre les morsures de serpents, comme fébrifuge contre les fièvres intermittentes et en usage externe contre des maladies de la peau [22]. Au Népal, l'écorce était utilisée pour soigner les fièvres, la dysenterie et la dyspepsie et contre les morsures de serpent [106, 139]. Dans son ouvrage, Petit-Thouars [158] précise que le bois et les racines étaient utilisés contre les fièvres intermittentes. Au Cambodge, l'écorce est utilisée en usage interne pour soigner l'épilepsie et en usage externe en pansement des ulcères atones et la lèpre [133]. En Thaïlande et au Vietnam, l'écorce, comme toutes les autres parties de l'arbre, sont considérées toxiques. Le bois étant dur et résistant aux termites, il est utilisé en menuiserie en Inde [4].

## IV.1.E. Données phytochimiques

Le premier alcaloïde isolé dans le genre *Strychnos* est la strychnine (en 1818 par Pelletier et Caventou) mais sa structure absolue très complexe fut déterminée par Robinson (chimiste anglais, prix Nobel de Chimie en 1947) seulement 130 ans plus tard. Par la suite, de nombreux alcaloïdes indoliques monomères ont été isolés à partir de différentes parties de *Strychnos nux-vomica*. Un résumé des constituants a été effectué par Baser dans sa thèse de 1978 [11] et exposé ci-après (tableau IV.2).

Les racines renferment la strychnine, la brucine, l'isostrychnine. Plus précisément, l'écorce de racine plus riche en alcaloïdes totaux contient également la pseudostrychnine, la pseudobrucine, la vomicine et la C-mavacurarine (alcaloïde

quaternaire). Le tronc possède aussi la strychnine, la brucine, la pseudostrychnine, la pseudobrucine dans le bois et l'écorce. Mais l'écorce (plus riche en alcaloïdes) renferme de surcroît la  $\beta$ -colubrine, la vomicine, la novacine, l'icajine et la 4-hydroxystrychnine. Les principales bases tertiaires (strychnine, brucine, vomicine, novacine, icajine) ont également été retrouvées dans les feuilles.

Alcaloïdes indoliques	Graines	Fruits	Feuilles	Tronc	Racines	Jeunes pousses
Strychnine	+	+	+	+	+	+
4-hydroxystrychnine	+	+	+	+	+	
Pseudostrychnine	+	+	+	+	+	
Strychnine N <sub>b</sub> -oxyde = génostrychnine		+	+			
Brucine	+	+	+	+	+	+
Pseudobrucine	+	+	+	+	+	
Brucine N <sub>b</sub> -oxyde		+	+			
$\alpha$ -colubrine	+		+			
Pseudo $\alpha$ -colubrine	+		+			
$\beta$ -colubrine	+	+	+	+	+	
Pseudo $\beta$ -colubrine	+	+				
Icajine	+	+	+	+		
Vomicine	+	+	+	+	+	+
Novacine	+	+	+	+		
Isotrychnine	+		+		+	+
Isobrucine	+					
Protostrychnine					+	
Normacusine B			+		+	+
Normélinonine B					+	+
Condylocarpine						+
Aldéhyde de Wieland-Gumlich						+
Geissochizine						+
Geissoschizal						+
C-mavacurine					+	
Longicaudatine					+	
Strychnochrysin					+	

Tableau IV.2 : Principaux alcaloïdes décrits dans les diverses parties de *Strychnos nux-vomica*. Ne sont pas inclus les artéfacts présumés et les dérivés hydroxystrychnine et hydroxybrucine.

Selon Sefkovic et al. [180], les jeunes feuilles sont quatre fois plus riches en alcaloïdes que les feuilles plus âgées. De plus, les colubrines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et les pseudostrychnine et

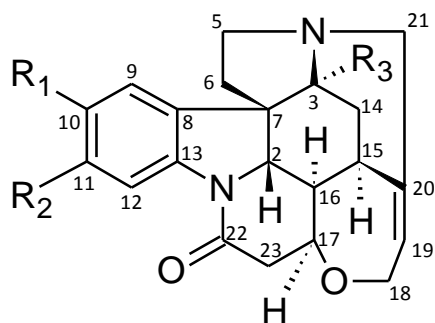


pseudobrucine ont également été décrites dans les feuilles. Les fruits renferment dans leur pulpe et leur péricarpe la strychnine, la brucine, la pseudostrychnine, la novacine, l'icajine, la vomicine, la strychnine N-oxyde, la brucine N-oxyde, la 4-hydroxystrychnine et pour la première fois décrite la cantleyine mais il est possible qu'elle soit un artéfact d'extraction avec l'ammoniaque. Le péricarpe contient en plus la  $\beta$ -colubrine et la N-méthyl-sec-pseudo- $\beta$ -colubrine. Enfin, les graines (la partie la plus étudiée historiquement) possèdent évidemment la strychnine, la brucine mais aussi les colubrines, la pseudostrychnine, la novacine, l'icajine, la 4-hydroxystrychnine, l'isostrychnine et même la pseudo- $\alpha$ -colubrine et la pseudo- $\beta$ -colubrine.

D'autres alcaloïdes ont été décrits dans les jeunes pousses : la geissoschizine, le geissoschizal, l'aldéhyde de Wieland-Gumlich, la condylocarpine et la normacusine B.

Baser quant à lui isola à partir des feuilles et des racines d'autres monomères tertiaires comprenant la protostrychnine, la normelinonine B et de nombreux dérivés de strychnine tels que la 4,16-dihydroxystrychnine, la 4,16-dihydroxy-3-méthoxystrychnine et son dérivé N-oxyde, la 2-hydroxystrychnine, la 21,22-dihydroisostrychnine, la 12-hydroxystrychnine, la 10-hydroxystrychnine. Il s'intéressa également aux alcaloïdes quaternaires mais vu les difficultés liées à leur isolement, il n'a pas pu déterminer leur structure. Les seuls ayant pu être identifiés sont l'O-méthylmacusine B et son isomère 16-epi mais selon Baser ce sont des artéfacts d'isolement indiquant toutefois la présence de macusine B (= N-méthylnormacusine B) dans la plante. Il évoque également la présence d'alcaloïdes dimériques ayant une structure semblable à l'afrocurarine et possédant des propriétés curarisantes.

Une revue de 1997 présente les alcaloïdes découverts de 1979 à 1997 [43] : à part la longicaudatine, bisindolique, les nouveaux alcaloïdes monomériques décrits sont l'isobrucine, l'isobrucine-N-oxide et l'isostrychnine-N-oxyde. Depuis, mise à part la strychnochrysin isolée à partir d'écorce de racine au laboratoire de l'ULg et récemment l'acide 4-N-hydroxyméthylstrychnidin-17-acétique et l'acide 10,11-diméthoxy-4N-hydroxyméthylstrychnidin-17-acétique, deux monoquaternaires<sup>2</sup> indoliques [206], plus aucun nouvel alcaloïde n'a été mis à jour dans le *Strychnos nux-vomica*.



Strychnine ( $R_1=R_2=R_3=H$ )

Pseudostrychnine ( $R_1=R_2=H$ ;  $R_3=OH$ )

Brucine ( $R_1=R_2=OCH_3$ ;  $R_3=H$ )

Pseudobrucine ( $R_1=R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OH$ )

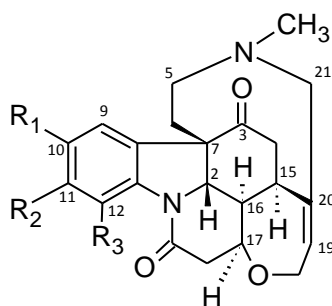
$\alpha$ -colubrine ( $R_1=H$ ;  $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=H$ )

Pseudo- $\alpha$ -colubrine ( $R_1=H$ ;  $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OH$ )

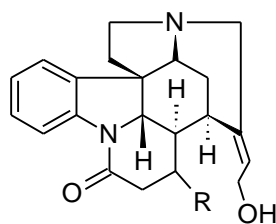
$\beta$ -colubrine ( $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=H$ )

Pseudo- $\beta$ -colubrine ( $R_1=OCH_3$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=OH$ )

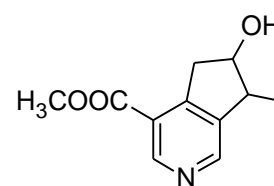
<sup>2</sup> Les auteurs de la publication ont mentionné avoir isolé des alcaloïdes bisindoliques, alors qu'en réalité, il s'agit d'alcaloïdes mono-indoliques.



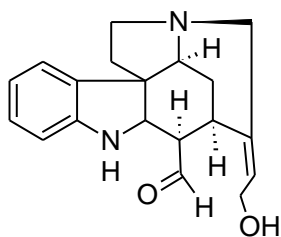
Icajine ( $R_1=R_2=R_3=H$ )  
 Vomicine ( $R_1=R_2=H$ ;  $R_3=OH$ )  
 Novacine ( $R_1=R_2=OCH_3$ ;  $R_3=H$ )



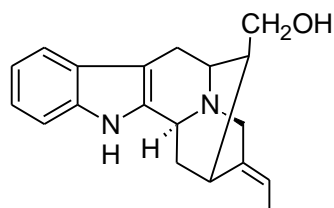
Isostrychnine ( $R=H$ )  
 Protostychnine ( $R=OH$ )



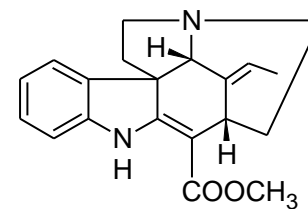
Cantleyine



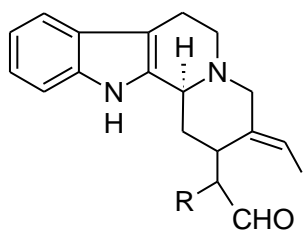
Aldéhyde Wieland-Gumlich



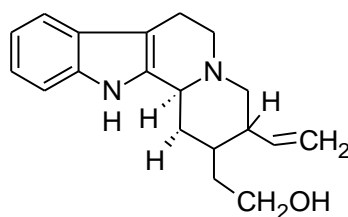
Normacusine B



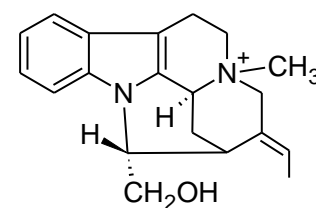
Condylocarpine



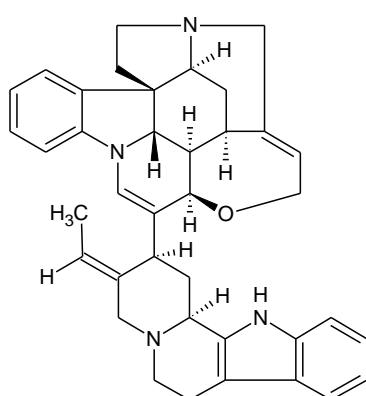
Geissoschizal ( $R=H$ )  
 Geissoschizine ( $R=COOCH_3$ )



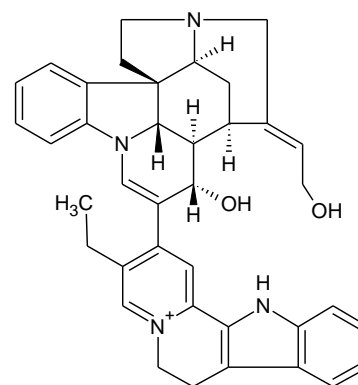
Normélinonine B



C-mavacurarine



Longicaudatine



Strychnochrysin

Figure IV.2: Structures des principaux alcaloïdes indoliques isolés du *Strychnos nux-vomica*<sup>3</sup>.

<sup>3</sup>Les alcaloïdes monomères peuvent être distingués des dimères en pulvérisant les plaques CCM par le réactif au sulfate cérique ou le réactif au chlorure ferrique. Ces deux réactifs donnent des couleurs bleutées aux alcaloïdes dimériques de type longicaudatine [11].

En plus des alcaloïdes, la loganine a été décrite dans la pulpe du fruit et les graines, et des mucilages et des sucres ont été décrits dans les graines [52]. Ces mucilages sont des galactomannanes qui ont des propriétés coagulantes [6].

### Les alcaloïdes indolo-monoterpéniques : distribution et origine

Bien que la distribution des alcaloïdes indolo-monoterpéniques soit limitée à trois familles de l'ordre des Gentianales (Apocynaceae, Loganiaceae et Rubiaceae), la diversité du groupe est une des plus vaste parmi les différents types d'alcaloïdes. Cependant, ces alcaloïdes indolo-monoterpéniques semblent avoir un précurseur unique, la strictosidine, qui provient de la condensation d'une molécule de tryptamine (métabolite primaire) et du sécologanoside (métabolite secondaire précurseur des séco-iridoïdes, voir le schéma biosynthétique fig. III.30)[28].

La strictosidine par l'incorporation du sécologanoside est glucosidique. Sa stéréochimie 3- $\alpha$  (S), 15- $\alpha$  (S), 20- $\alpha$  (R), 21- $\beta$  (S) a pu être déterminée avec certitude à la fin des années 90 [150]. La configuration du H-3 en  $\alpha$  est due à la catalyse stéréosélective de la strictosidine synthase, tandis que les trois autres configurations apparaissent lors de la biosynthèse du sécologanoside (fig. IV.3).

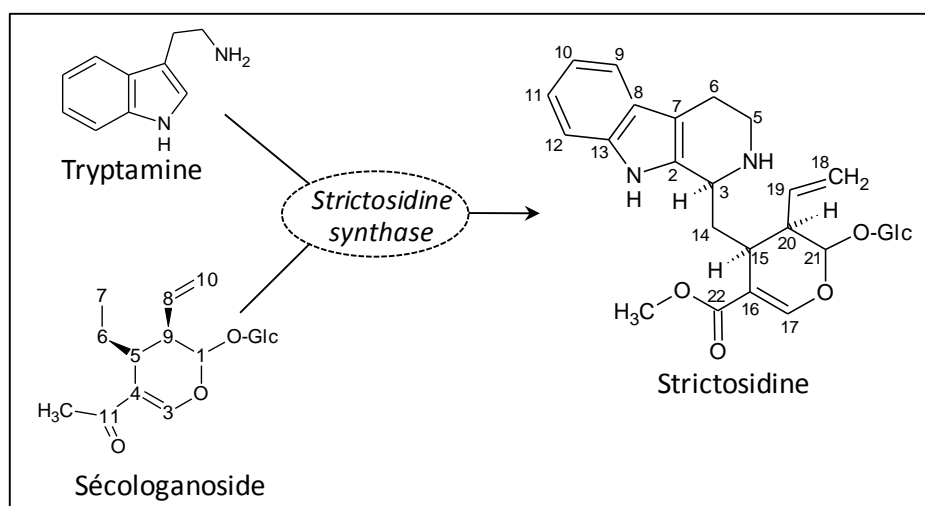


Figure IV.3 : Biosynthèse de la strictosidine

Généralement, la diversité chimique des alcaloïdes indolo-monoterpéniques est due au réarrangement du fragment monoterpénique. Le réarrangement de la tryptamine peut toutefois mener à la transformation de l'indole en quinoléine (alcaloïdes quinoléiques du Quinquina).

Les alcaloïdes indolo-monoterpéniques ont été subdivisés en types structuraux en fonction de leur biogenèse [88]. Ainsi, les alcaloïdes de type I (fig. IV.4) sans réarrangement dans l'unité monoterpénique comprennent les squelettes corynanthéane ( $I\alpha$ ), malindane ( $I\alpha$ ), vallesiachotamane ( $I\alpha$ ), vincosamane ( $I\alpha$ ), strychnane ( $I\beta$ ), et aspidospermatane ( $I\beta$ ). Ce groupe est celui qui comprend le plus grand nombre de variations structurales. Les alcaloïdes du type II (fig. IV.4), dont le partie monoterpénique subit une rupture de la liaison C-15/C-16, un déplacement du fragment C-17/C-16/C-22 aboutissant à la formation d'une liaison C-20/ C-17, constituent les groupes plumérane (aspidospermane) et éburnane. Finalement, les alcaloïdes de type III

(fig. IV.4), dont le partie monoterpénique subit aussi une rupture de la liaison C-15/C-16 mais le fragment C-17/C-16/C-22 se liant cette fois au C-14, forment les groupes ibogane et tacamane [26, 28, 185].

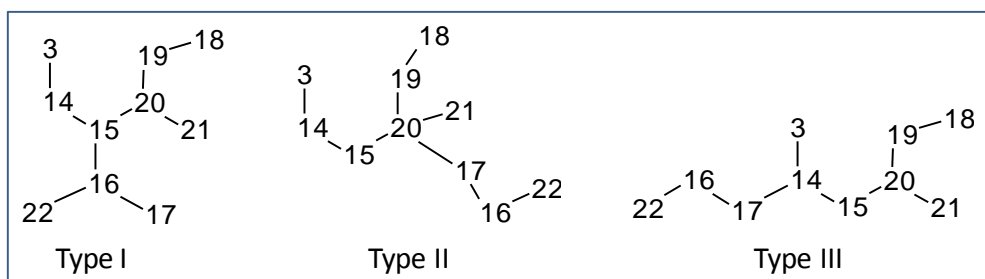


Figure IV.4: Les trois types de squelettes carbonés issus de la strictosidine, rencontrés chez les alcaloïdes indolomonoterpéniques.

Les *Loganiaceae* ne possèdent que les alcaloïdes de type I. Nous allons donc développer uniquement la biosynthèse de ce type I (figure IV.5) dont le siège se situe dans la racine du végétal.

La première étape de biosynthèse est l'élimination du glucose qui engendre une gémine dialdéhydique hautement réactive. Une condensation s'opère pour former une carbinolamine qui se déshydrate en aldéhyde 4,21-déhydrocorynanthéique. La réactivité importante de cet aldéhyde conduit à plusieurs réarrangements aboutissant aux alcaloïdes de type yohimbane, hétéroyohimbane et geissoschizine.

La formation de l'unité strychnane (type I  $\beta$ ) proviendrait d'une  $\beta$ -oxydation de l'indole dans la geissoschizine conduisant à un oxindole où peut s'établir une liaison C-2/C-16 et où une liaison C-3/C-7 remplace la liaison C-2/C-3 (formation de la préakuammicine). La préakuammicine perd le carbométhoxy pour devenir une méthylène indoline (nor-C-fluorocurarine, fig. IV.6). Puis, il y a réduction de la double liaison 2/16 pour conduire à l'aldéhyde de Wieland-Gumlich et son dérivé déshydroxylé en C-18. La strychnine est issue d'une C-alkylation de l'aldéhyde de Wieland-Gumlich par de l'acide acétique (acéto-acétyl-CoA) sous sa forme hémiacétalique, la préstrychnine (fig. IV.6) [28].

En 1973, Heimberger et Scott avaient émis une hypothèse biosynthétique incluant la protostrychnine (formée par lactamisation de la préstrychnine) comme précurseur direct de la strychnine [87]. Selon eux, ces intermédiaires ne pourraient être détectés car trop rapidement transformés. Mais depuis l'isolement dans *Strychnos nux-vomica* de la protostrychnine et des dérivés de préstrychnine substitués sur le cycle aromatique, l'hypothèse biosynthétique a été renforcée [12]. Une fois l'aldéhyde de Wieland-Gumlich formé, deux voies sont possibles (figure IV.6) : l'une commençant par l'oxydation de la préstrychnine qui peut ensuite subir une lactamisation et une autre cyclisation formant les dérivés strychnines ; l'autre débutant par une lactamisation de la préstrychnine formant la protostrychnine pouvant être oxydée et finalement cyclisée pour donner la strychnine.

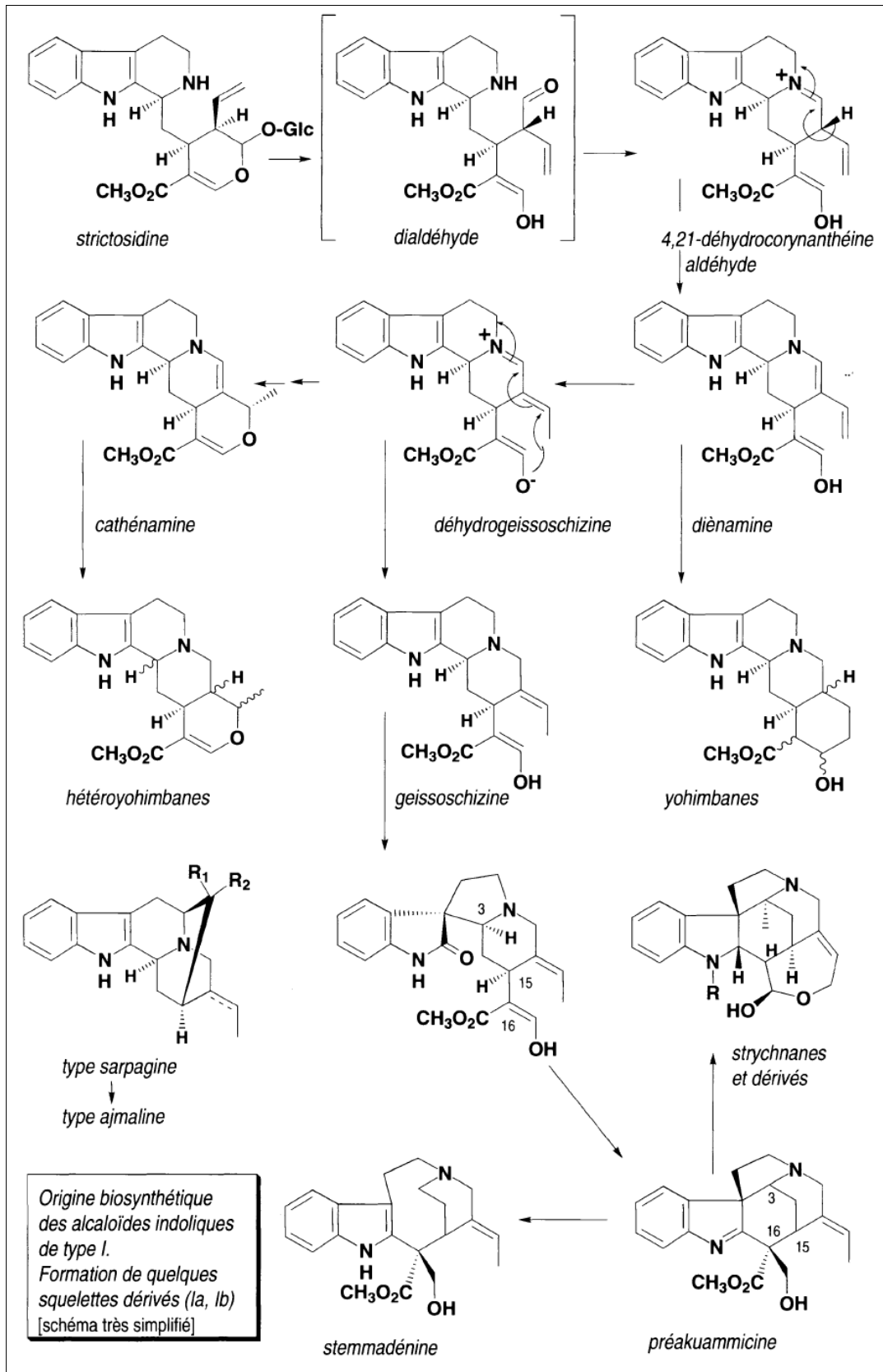


Figure IV.5 : Schéma simplifié de l'origine biosynthétique des alcaloïdes indoliques de type I. Source : Bruneton [28].

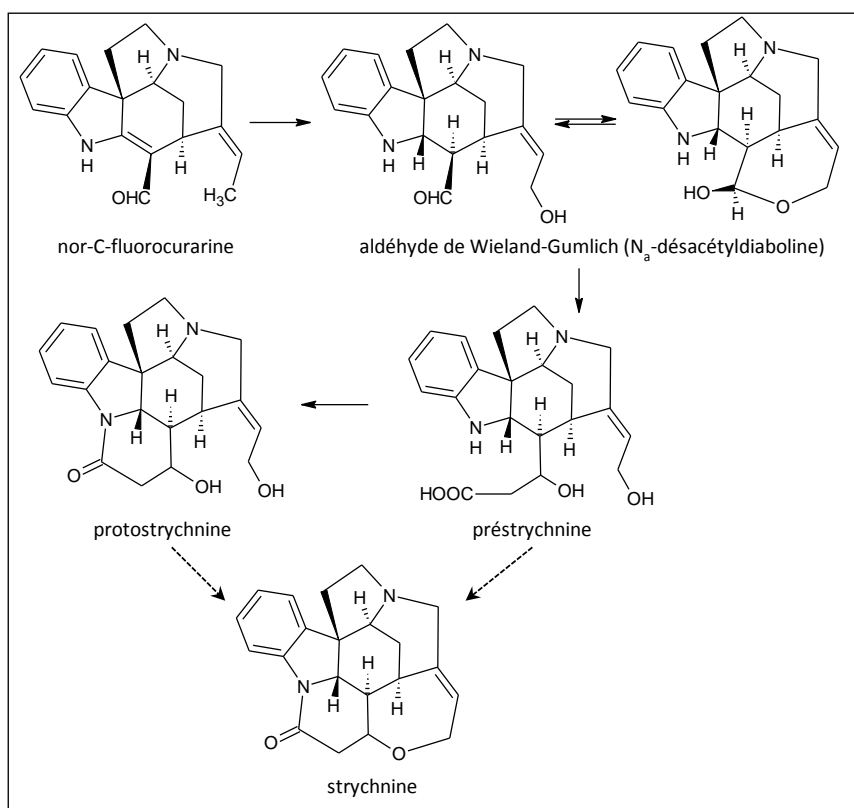


Figure IV.6 : Hypothèse biosynthétique de la formation de la strychnine.

### IV.1.F. Données pharmacologiques

Jusqu'il y a peu, les strychnos étaient classés comme convulsivants ou curarisants selon la région d'où ils provenaient : les curarisants d'Amérique du sud, les tétanisants d'Asie et les africains possédant les deux types de toxicité. Ensuite cette toxicité était définie selon l'organe de la plante utilisée : les graines et les feuilles produisaient des convulsions tandis que les écorces de tronc et de racine provoquaient une myorelaxation [11].

Finalement, les chercheurs se sont aperçus que la variation de toxicité était due à une différence structurale des alcaloïdes responsables. Ainsi, les alcaloïdes mono-indoliques (strychnine) sont plutôt convulsivants et les alcaloïdes dimériques ont plutôt une action curarisante.

#### Effet tétanisant (convulsivant)

Suite à la renommée toxique du *Strychnos nux-vomica*, la toxicité de la strychnine a été longuement étudiée. Il apparaît que cet alcaloïde est un antagoniste puissant du récepteur à la glycine. Chez les mammifères, la glycine est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC (système nerveux central) au niveau de la moelle épinière et du tronc cérébral. Ses récepteurs sont de type canaux anioniques ligand-dépendants positionnés au niveau postsynaptique. Dès que le neurotransmetteur (glycine) se lie au récepteur, celui-ci s'ouvre et déclenche un influx de  $Cl^-$  dans le cytoplasme postsynaptique conduisant ainsi à une hyperpolarisation de la membrane.

Cet état empêche la naissance d'un nouveau potentiel d'action dans le neurone jusqu'à dégradation de la glycine par des enzymes de la synapse. Ainsi, la glycine joue un rôle important dans la régulation de la fonction motrice et dans l'intégration des signaux sensoriels. Un antagoniste de son récepteur empêcherait l'hyperpolarisation membranaire, amenant à des potentiels d'action continus traduits par des convulsions.

Ces effets sont typiques des symptômes ressentis après une intoxication à la strychnine (à partir de 5 mg/kg) : tout commence par un raidissement musculaire avec anxiété, dyspnée, nausée puis des convulsions toniques menant à une paralysie (complète contracture, position d'opisthotonos) des muscles striés et finalement mort par asphyxie (dû aux contractions des muscles thoraciques et abdominaux) ou/et arrêt cardiaque. A dose thérapeutique (1 à 3 mg/kg), la strychnine augmente les réflexes spinaux, les muscles striés sont contractés mais aucun effet ne se marque au niveau respiratoire et circulatoire.

Des relations structure-activité se sont dessinées grâce à des études de binding menées avec divers dérivés de la strychnine. Il apparaît que pour obtenir une liaison au récepteur efficace, l'azote ( $N_b$ ) doit rester tertiaire (basique), les C-10 et C-11 ne doivent pas être substitués (la brucine étant beaucoup moins toxique), la double liaison C-19/C-20 est nécessaire ainsi que la présence d'un lien éther entre le C-18 et le C-17. De plus, l'affinité au récepteur est améliorée lorsque l'azote indolique ( $N_a$ ) possède un groupement acétyle. Donc parmi les alcaloïdes indolo-monoterpéniques, seuls les monomères pourvus du cycle G sont convulsivants. Les alcaloïdes dimères semblent engendrer un encombrement stérique empêchant la liaison au récepteur [163]. De plus, leur caractère hydrophile diminue leur absorption au niveau du tractus gastro-intestinal.

### **Effet curarisant (myorelaxant)**

L'effet curarisant des *Strychnos* a été étudié à la suite d'utilisations ethnobotaniques comme poison de flèche par les chasseurs indiens américains qui préparaient ces curares avec entre autres des écorces de tronc ou de racine de *Strychnos* américains. A la suite de nombreuses recherches, il apparaît que les substances actives sont des alcaloïdes bisindoliques homo ou hétérodimères comportant au moins un noyau strychnane. La présence de deux ammoniums quaternaires augmente l'activité. Et la distance séparant ces deux  $N_b$  influe aussi sur l'activité : une activité curarisante maximale est obtenue avec une distance ( $N_b^+ / N_b^+$ ) entre 8,5-9,0 Å. Oralement, ces alcaloïdes sont inactifs car ils ne sont pas absorbés dans le tractus digestif [161].

Au niveau pharmacologique, ces alcaloïdes bisindoliques sont des antagonistes compétitifs des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (ACh) situés au niveau post-synaptique de la jonction neuromusculaire. Leur action paralysante est due à un effet pachycurare qui s'oppose à l'effet dépolarisant de l'ACh et de ce fait le potentiel d'action de la plaque motrice est réduit et déprimé. L'impulsion neuromusculaire est par conséquent bloquée mais le nerf et le muscle gardent leur excitabilité directe. Cette propriété est utilisée en anesthésie pour la décontraction musculaire qui facilite certaines interventions chirurgicales [153]. Si le dosage est mal contrôlé, la mort peut survenir par paralysie des muscles respiratoires.

Suite à la présence d'un poison de flèche également en Asie (Upas tieuté), une équipe suédoise étudia l'effet myorelaxant d'un extrait d'alcaloïdes quaternaires d'écorce de racine de *S. nux-vomica* sur souris. Cet extrait possédait une forte activité curarisante, la dose létale étant de 15 à 25 mg/kg. Baser reporte également que pour avoir un effet curarisant, un extrait de *Strychnos* devrait contenir au moins 10 fois plus d'alcaloïdes dimériques que monomériques, autrement l'action convulsivante sur le SNC prime [11].

### Activité antipaludique [64]

Depuis une vingtaine d'années, l'activité antipaludique des *Strychnos* est étudiée dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège. Plusieurs screening [69, 71, 160, 202] ont été réalisés tant sur les extraits bruts que sur les alcaloïdes isolés, ce qui a permis de déduire une relation structure/activité. Il apparaît que les alcaloïdes les plus actifs sont des bisindoliques basiques. Quatre groupes d'alcaloïdes bisindoliques se distinguent :

- Alcaloïdes de type **sungucine**, possédant deux noyaux de type strychnane.
- Alcaloïdes de type **usambarensine**, possédant un noyau de type corynanthéane et un noyau de type tryptamine.
- Alcaloïdes de type **matopensine**, possédant deux noyaux de type tryptamine, les N-oxyde sont toutefois moins actifs.
- Alcaloïdes de type **longicaudatine**, possédant un noyau de type strychnane et un noyau de type corynanthéane.

Pour être plus spécifique à une activité antiplasmodiale, la partie strychnane, si elle est présente, doit posséder une fonction alcool en C-18 ou un lien éther entre C-17 et C-18 de la partie inférieure (strychnogucine B et 18-hydroxyisosungucine). Il apparaît également que l'activité diminue en présence d'ammonium quaternaire. En effet, le caractère basique faible des alcaloïdes actifs pourrait leur permettre de s'accumuler plus facilement dans la vacuole digestive acide du parasite. Cette hypothèse a été démontrée pour la chloroquine qui, à pH physiologique, diffuse librement à travers les membranes puis, arrivée dans le milieu acide de la vacuole, elle se protone et donc y reste séquestrée [56].

Le tableau IV.3. reprend les alcaloïdes indoliques les plus actifs sur *Plasmodium* isolés de diverses espèces de *Strychnos* [71]. Ce sont uniquement des alcaloïdes bisindoliques qui ont une activité prometteuse. Excepté pour la longicaudatine, l'index de sélectivité étant supérieur à 10, l'activité antiplasmodiale des alcaloïdes cités semble spécifique. Notons que la dihydrousambarensine est l'alcaloïde le plus intéressant pour son activité spécifique sur la souche chloroquino-résistante. La strychnogucine B est également sélective à la souche résistante W2. Cependant l'isostrychnopentamine (ISP) est l'alcaloïde le plus actif vis-à-vis de la souche chloroquino-sensible.

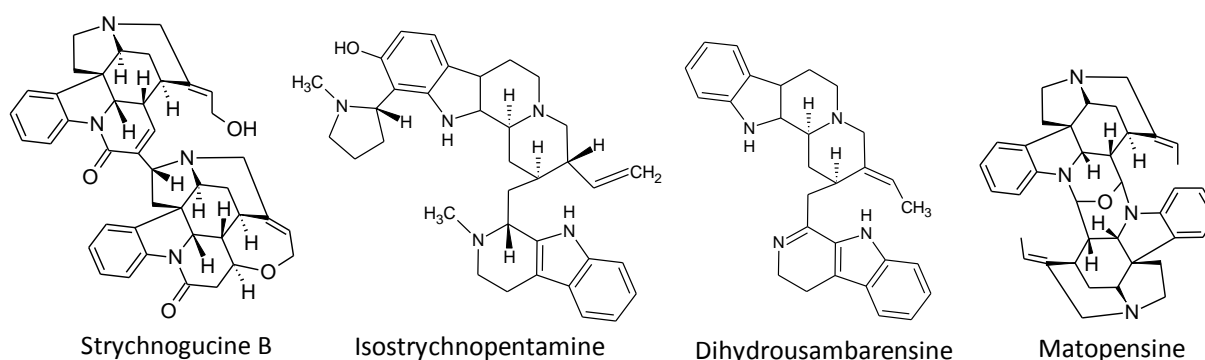
Des recherches pharmacologiques plus approfondies ont été menées sur l'ISP. L'activité est observée sur tous les stades du cycle érythrocytaire du parasite, mais l'effet antiplasmodial est plus actif sur le stade « anneau » (jeune trophozoïte). La localisation de l'ISP se situe au niveau du cytoplasme parasitaire et érythrocytaire, mais non dans la vacuole digestive. Le mode d'action est donc différent des antipaludiques quinoléiques (chloroquine et quinine) qui agissent sur les stades mûrs du parasite en inhibant la



métabolisation de l'hémoglobine dans la vacuole digestive. Testée *in vivo* sur *P. berghei* et *P. vinckei* (deux souches murines chloroquino-sensibles) à la dose de 30 mg/kg/jour en IP, l'ISP réduit respectivement de 46 % et de 62 % la parasitémie au jour 5. L'ISP présente un intérêt antimalarique certain [73].

Alcaloïdes indoliques	Chloroquino-sensible FCA20	Chloroquino-résistante W2	Chloroquino-résistante FCB1	Index de Sélectivité
<b>Type sungucine :</b>				
strychnogucine B	0,617	0,085	0,529	24-176
18-hydroxyisosungucine	0,847	0,140	0,207	19-115
Isosungucine	1,320	0,270		
<b>Type usambarensine :</b>				
Isostrychnopentamine (ISP)	0,120	0,152	0,104	49-71
dihydrousambarensine	0,857	0,032	ND	14-375
<b>Type matopensine :</b>				
matopensine	1,25	0,243	0,362	10-50
16-methoxyisomatopensine	0,54	0,122	1,54	16-200
<b>Type longicaudatine :</b>				
longicaudatine	0,986	0,569	0,560	5-9
<b>Référence :</b> chloroquine	0,011	0,284	0,0032	119-3063
quinine	0,269	0,413	0,200	ND

Tableau IV.3 :  $Cl_{50}$  ( $\mu$ M) des activités antiplasmodiales *in vitro* des alcaloïdes bisindoliques les plus actifs provenant de *Strychnos*.



L'isosungucine a également été testée *in vivo* sur *P. vinckei* à la dose de 30 mg/kg/jour en IP ; cette fois l'inhibition parasitaire équivaut à 47 % au jour 4. Par manque de matériel, les autres alcaloïdes du groupe sungucine n'ont pu être testés *in vivo* mais ce groupe semble également prometteur pour soigner la malaria [162].

Bien que les alcaloïdes monomères soient inactifs quand testés seuls, certains, utilisés en association avec les antipaludiques reconnus, ont la capacité de renverser la résistance de *Plasmodium falciparum* même *in vivo*. Par exemple, la malagashanine permet de stimuler l'influx de chloroquine dans le parasite et de limiter son efflux dans des souches

chloroquino-résistantes permettant ainsi à la chloroquine d'interférer dans la digestion de l'hémoglobine [72].

### Activité cytotoxique

En testant les alcaloïdes bisindoliques du genre *Strychnos* sur plusieurs lignées de cellules humaines pour établir l'index de sélectivité antiplasmodiale, la sungucine et ses dérivés ont montré une activité cytotoxique importante variant entre 6 et 18  $\mu\text{M}$  [64]. De plus, la sungucine, la plus active, possède une certaine sélectivité sur les lignées leucémiques. Elle induirait l'apoptose cellulaire en agissant sur l'ADN non pas en s'y intercalant mais plutôt en inhibant sa synthèse. Son mode d'action serait différent de celui d'autres alcaloïdes indoliques (vincristine, vinblastine, paclitaxel) et utiliserait une voie p53-indépendante pour induire la mort cellulaire. La sungucine serait également capable d'induire la nécrose [66, 119].

Un autre alcaloïde bisindolique a montré un intérêt dans l'étude de composés anti-tumoraux : l'isostrychnopentamine (ISP) induirait également l'apoptose par une voie p53-indépendante [67]. Elle a démontré être active sur des lignées humaines résistantes à divers stimuli pro-apoptotiques [3]. Toutefois, son mode d'action reste encore inconnu.

Certains alcaloïdes monomériques ont montré une activité cytotoxique *in vitro*. Ainsi, la matadine (base anhydronium) stimule la topoisomérase II et la bisnordihydrotoxiférine tue les cellules humaines KB. Parmi les alcaloïdes monomériques du *Strychnos nux-vomica*, l'icajine, la strychnine et la pseudostrychnine ont montré une activité cytotoxique sur les lignées KB, BGC, BGC BEL-7402 et/ou HepG2. La brucine, la plus active contre la lignée HepG2, induit l'apoptose dépendante de la voie mitochondriale dans des cellules d'hépatome humain à une concentration de 1 mM. Bien que cette concentration soit trop élevée pour approfondir les recherches comme agent anti-cancéreux, les auteurs suggèrent que cela pourrait expliquer l'utilisation traditionnelle chinoise du *Strychnos nux-vomica* dans le cancer du foie [45, 64].

### Autres activités

Les alcaloïdes du genre *Strychnos* ont fait l'objet de nombreuses autres études pharmacologiques. Certains alcaloïdes monomères (brucine, diaboline) et dimères (de type usambarensine) ont démontré des activités antimicrobiennes [33, 129]. L'activité anti-diarrhéique de la bisnordihydrotoxiférine a été reportée [189]. Des alcaloïdes indoles monomériques de type rétuline ayant un hydroxyle en C-16 ont une activité anti-inflammatoire non-stéroïdienne *in vivo*. De plus, l'isorétuline possède une activité analgésique et antispasmodique [190].

## IV.2. MOTIVATION DU TRAVAIL

La sélection de l'espèce *Strychnos nux-vomica* pour une étude portant sur l'activité antimalarique s'est réalisée sur la base de la chimiotaxonomie puisque plusieurs autres *Strychnos* contiennent des alcaloïdes bisindoliques montrant une activité antiplasmodiale prometteuse. Cette espèce a déjà été étudiée au laboratoire et des

alcaloïdes bisindoliques fluorescent en jaune ou orange ont été mis en évidence dans l'écorce de racine : la strychnochrysin étant la seule dont la détermination structurale et la stéréochimie ont pu être élucidées. La complexité de structure et la quantité minoritaire par rapport aux alcaloïdes monomériques (brucine et strychnine notamment) dans le matériel végétal réduisent les chances d'isoler et de caractériser ces alcaloïdes bisindoliques.

Le premier objectif de ce travail comporte une étude phytochimique afin d'isoler et de caractériser d'autres alcaloïdes bisindoliques mis en évidence par le Dr. Baser et Mme Biala et ainsi de contribuer à la description de la composition chimique de la couche extrasubéreuse rouge-ocre de l'écorce de tronc que ne purent solutionner Pelletier et ses successeurs. Ce travail phytochimique permettra également de vérifier la présence de la strychnochrysin dans l'écorce de tronc, et si tel est le cas, de la réisoler afin d'évaluer l'activité vis-à-vis de *Plasmodium falciparum* et la cytotoxicité vis-à-vis de lignées humaines.

Le deuxième objectif constitue l'étude pharmacologique visant à vérifier l'activité antiplasmodiale *in vitro* de l'extrait alcaloïdique du suber du tronc de *Strychnos nux-vomica* puis d'isoler par fractionnement bioguidé les alcaloïdes responsables de cette activité puisqu'une des utilisations traditionnelles de l'écorce de tronc est de soigner les fièvres intermittentes.

## IV.3. TRAVAUX PERSONNELS

### IV.3.A. Etude phytochimique

#### IV.3.A.1. Vérification de la présence d'alcaloïdes fluorescents orange ou jaune

La première étape, avant d'envisager des isolements, est de s'assurer de la présence des alcaloïdes ciblés (alcaloïdes bisindoliques) dans le suber des deux lots reçus. Une fois le suber séparé de l'écorce, les deux parties sont broyées, puis une aliquote (2 g) de chacune des parties notée P.O. (poudre du suber) et P.B. (poudre d'écorce) est prélevée pour une extraction par macération dans 50 ml d'une solution de MeOH avec 1 % d'acide acétique.

Les rendements d'extraction sont les suivants :

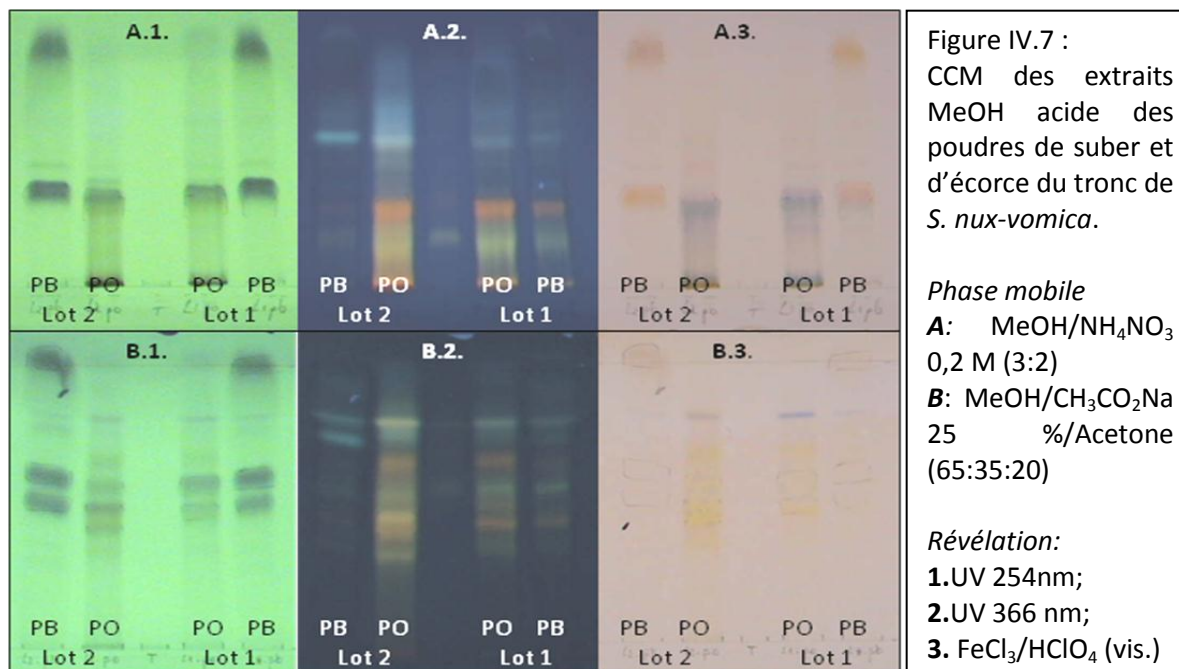
Lot 1 : Extrait P.O. = 7,1 % ; extrait P.B. = 18,4 %

Lot 2 : Extrait P.O. = 12,4 % ; extrait P.B. = 21,8 %

Un contrôle sur plaque de CCM est réalisé dans deux phases mobiles décrites par Mme BIALA (fig. IV.7). Des composés fluorescents en orange et en jaune sont bien présents dans les lots d'écorce de tronc reçus.

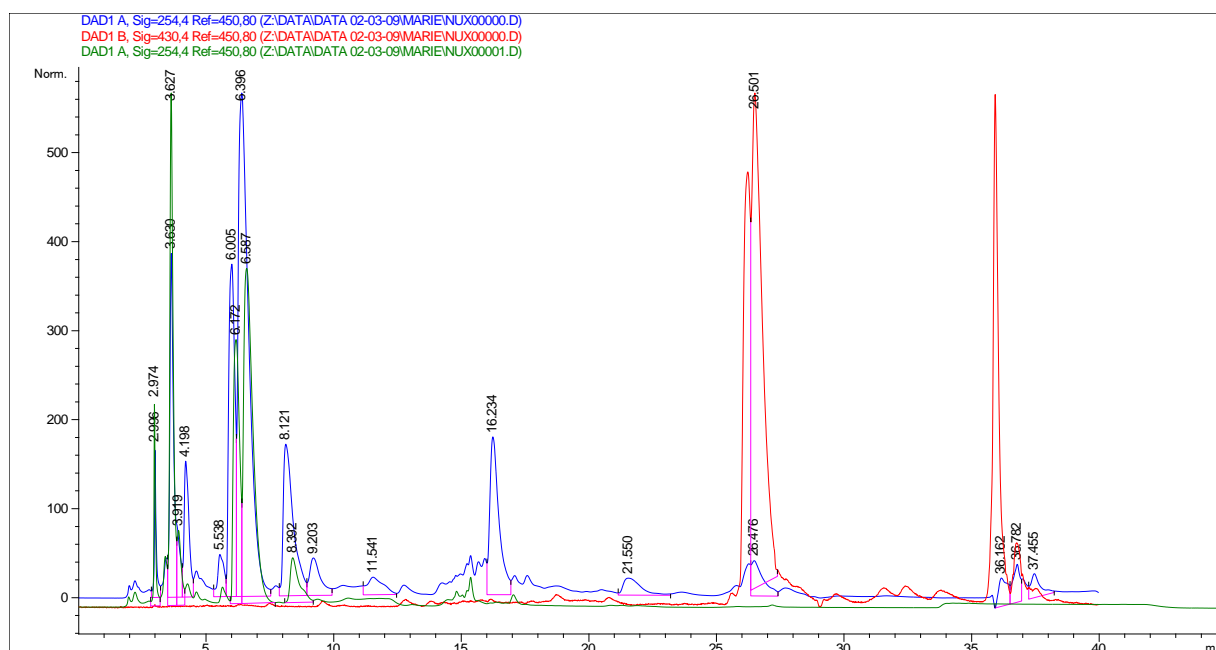
La séparation physique de la couche subéreuse de l'écorce montre que les alcaloïdes mono-indoliques (visibles à 254 nm et devenant jaunes par le réactif au chlorure

ferrique) sont plus abondants dans l'écorce (P.B.) des deux lots ; à l'inverse, les alcaloïdes bisindoliques d'intérêt sont bien présents dans le suber des deux lots : ils deviennent fluorescents en orange et en jaune à 366 nm, et le chlorure ferrique les colore en bleu-vert. Notons qu'une meilleure séparation des alcaloïdes est obtenue avec la deuxième phase mobile ; cette phase sera donc préférentiellement utilisée ultérieurement.



### Analyse des lots en CLHP

Afin de s'assurer de l'empreinte phytochimique identique des deux lots et ainsi pouvoir les rassembler, une analyse par CLHP est envisagée.



La méthode développée permet de séparer les alcaloïdes monomères (élus dans les 10 premières minutes) des dimères. Le chromatogramme (fig. IV.8) montre la présence de composés absorbant principalement à 430 nm dans l'extrait méthanolique du suber et étant élués au-delà des 20 minutes. Ces composés ne sont pas présents dans l'extrait d'écorce (chromatogramme non inclus).

Les poudres de suber des deux lots montrent un profil chromatographique similaire. Ces deux lots peuvent donc être assemblés afin d'augmenter le poids du matériel de départ (lot 1 + lot 2 = 240 g).

### IV.3.A.2. Extraction des alcaloïdes

Une extraction d'alcaloïdes a été réalisée sur la poudre de suber des deux lots (fig. IV.9).

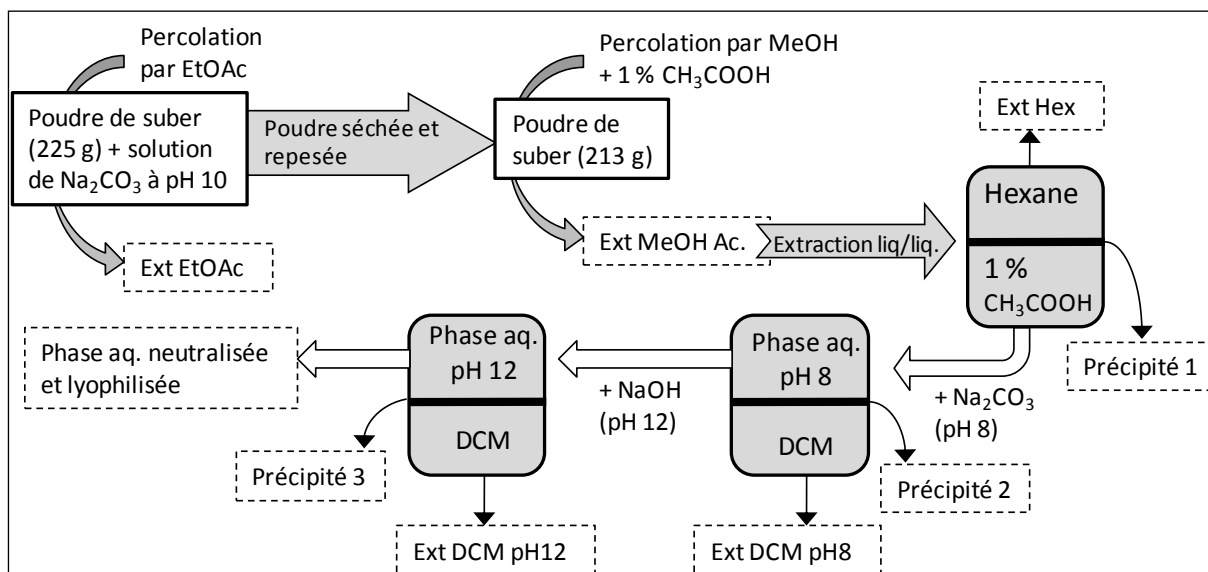


Figure IV.9 : Schéma d'extraction des alcaloïdes de la poudre de suber de *S. nux-vomica*.

Le contenu des différents extraits obtenus est comparé par CCM dans les deux phases mobiles décrites plus haut (fig. IV.10).

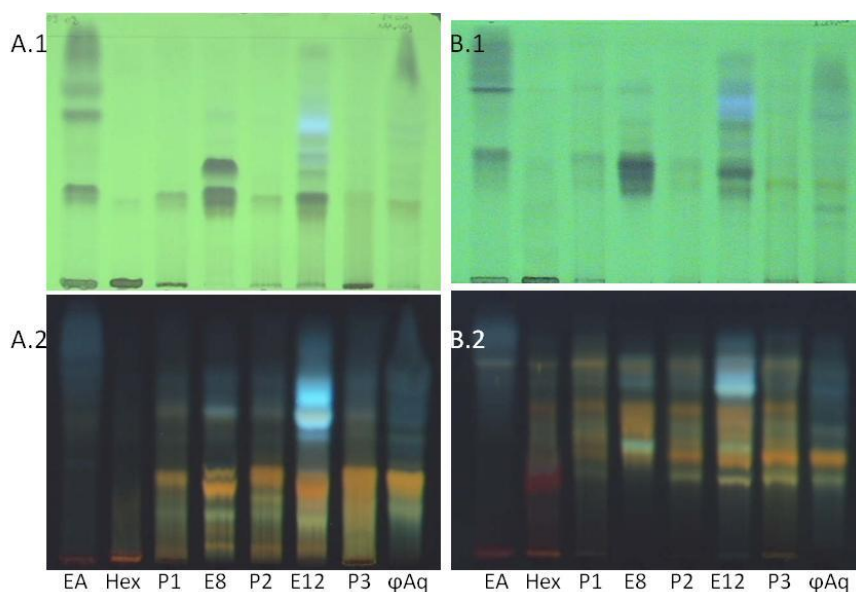


Figure IV.10 : CCM des divers extraits du suber de tronc de *Strychnos nux-vomica*.  
 A. Phase mobile : MeOH/NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0,2 M (3:2) ;  
 B. Phase mobile : MeOH/CH<sub>3</sub>COONa 25 %/Acétone (65:35:20).  
 Révélation : 1.UV 254nm ; 2.UV 366 nm.

Les extraits EtOAc (EA) et hexane (Hex) ne contenant pas les alcaloïdes d'intérêt, ils ne seront pas explorés. L'extrait DCM pH8 (E8) semble renfermer la plus grande quantité d'alcaloïdes monomères (UV 254 nm). L'extrait DCM pH12 (E12) quant à lui possède des composés particuliers ayant une fluorescence bleue tant à 366 nm qu'à 254 nm. Cette caractéristique fait penser à des bases anhydronium qui ont besoin de pH très alcalin pour être extraites dans des solvants organiques.

### IV.3.A.3. Etude du précipité à l'interphase (précipité 2)

#### Préfractionnement du précipité 2

Le précipité à l'interphase, appelé précipité 2, a été travaillé en premier lieu pour mettre au point des méthodes chromatographiques permettant d'isoler les alcaloïdes contenus dans les autres extraits et ayant des polarités similaires, sans devoir « gaspiller » l'extrait DCM pH12 (ayant un très faible rendement). De plus, cet extrait étant moins riche en alcaloïdes monomères que l'extrait DCM pH8, il serait plus aisé d'isoler les alcaloïdes dimères d'intérêt.

Un premier fractionnement est réalisé par CLHP préparative afin d'éliminer les monomères déjà bien connus. Onze fractions sont recueillies (fig. IV.11), la première contenant les bases mono-indoliques. Ce préfractionnement montre la richesse et la diversité en alcaloïdes fluorescents en orange et en jaune.

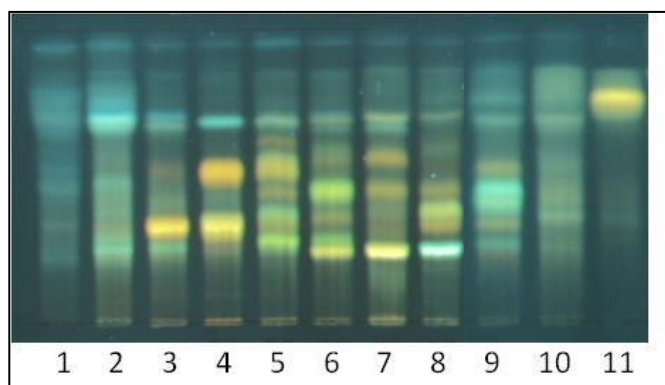


Figure IV.11 : CCM des fractions de l'extrait P2.

Phase mobile : MeOH/CH<sub>3</sub>COONa 25 %/Acetone (65:35:20).

Révélation : UV 366 nm.

#### Fraction P2P4

Nous ciblons en premier la quatrième fraction (fig IV.11 : 4 = P2P4), qui semble contenir la strychnochrysinine (identifiée par le *R<sub>f</sub>* décrit par Mme Biala dans la même phase mobile = 0,5). N'étant pas certain de l'identité de l'alcaloïde situé sur la plaque CCM au *R<sub>f</sub>* = 0,5, il est nommé OR1.

La technique CPC est choisie afin de purifier OR1 car elle permet d'éviter l'adsorption irréversible possible de certains alcaloïdes. En effet, cette technique repose sur le principe de partage de solutés entre deux phases liquides non miscibles. De plus, elle nous permet de travailler avec des pH alcalins, ce qui ne serait pas possible avec les colonnes CLHP préparative disponibles au laboratoire. Le système biphasique optimal pour répartir équitablement OR1 dans les deux phases est recherché par la technique des tests en tube (*cf.* Chapitre VI § VI.1.B.4). Le système biphasique utilisé a permis d'obtenir dix fractions (fig. IV.12) dont deux contenant des produits purs sous forme de base (nommés OR1 contenu dans la fraction 6, et BL1 contenu dans la fraction 8).

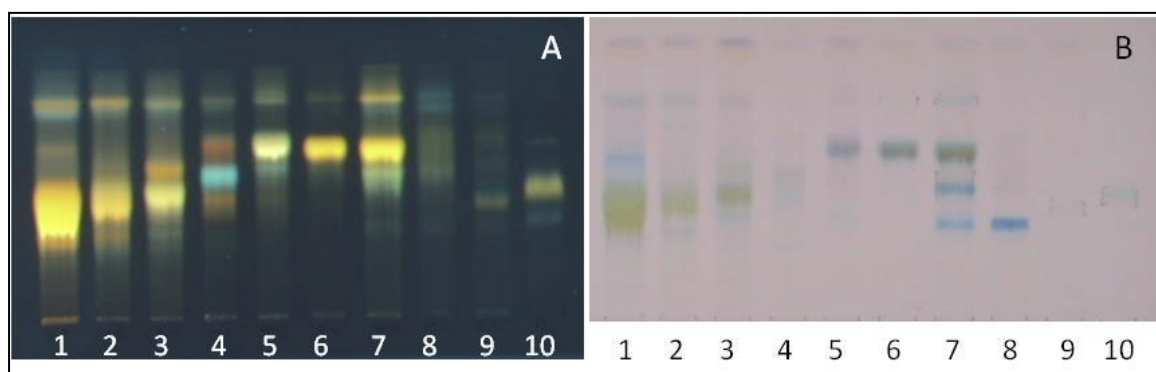


Figure IV.12 : CCM des sous-fractions de la fraction P2P4. *Phase mobile* : MeOH/CH<sub>3</sub>COONa 25 %/Acetone (65:35:20). *Révélation* : A.UV 366 nm; B. visible pulvérisé par FeCl<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub>.

OR1 se présente sous forme de poudre orange et devient orange fluorescent à 366 nm ; il se colore en bleu-vert par le réactif au chlorure ferrique tandis que BL1, ayant une très légère fluorescence jaune, a pu être détecté en révélant la plaque de CCM récapitulative avec le réactif de chlorure ferrique où il est apparu en bleu. Le poids des produits obtenus (8,1 mg et 2,9 mg respectivement) permet des analyses spectrales pour déterminer leur structure (cf. § IV.3.B.).

### Fraction P2P3

Un produit majoritaire orange à 366 nm étant contenu dans la troisième fraction (fig. IV.11 : 3 = P2P3), nous sommes tentés de le purifier par CPC. Un nouveau système biphasique est mis au point en ciblant l'alcaloïde orange. Cette fois encore, la séparation permet d'obtenir l'alcaloïde visé pur, en plus de 8 autres fractions (fig. IV.13).

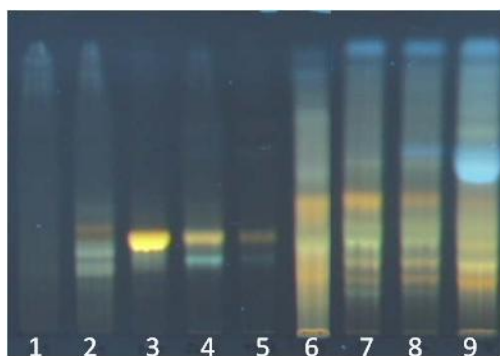


Figure IV.13 : CCM des sous-fractions de la fraction P2P3.  
*Phase mobile* : MeOH/CH<sub>3</sub>COONa 25 %/Acetone (65:35:20).  
*Révélation* : UV 366 nm.

L'alcaloïde obtenu sous forme de sel est nommé OR2 (troisième fraction), il devient jaune-or fluorescent à 366 nm ; il prend une couleur bleu-verte après pulvérisation au réactif au chlorure ferrique. Les sels de soude présents dans la fraction sont éliminés en précipitant OR2 par le réactif de Mayer. OR2, sous forme de sel de tetraiodomercurate, est ensuite passé sur résine Amberlite IRA-420 afin d'obtenir le sel chloré. Le produit obtenu (7,5 mg) sous forme de poudre orange peut ainsi être analysé spectralement (cf. § IV.3.B.3).

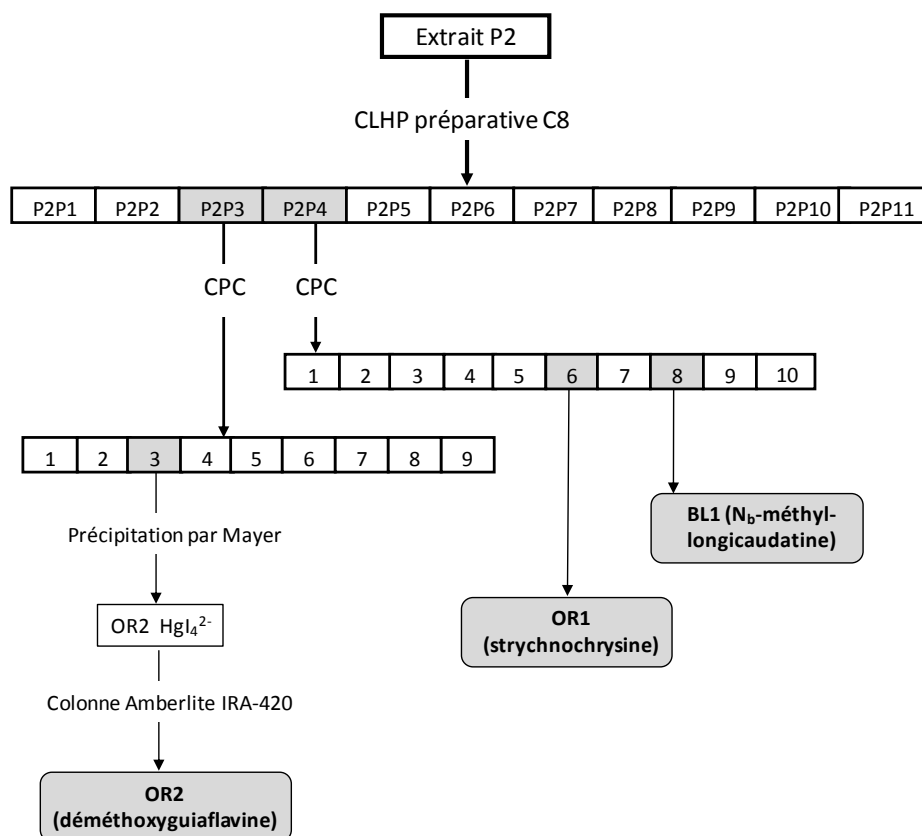


Figure IV.14 : Schéma de fractionnement de l'extrait P2 de l'écorce de tronc de *Strychnos nux-vomica* incluant les composés identifiés.

#### IV.3.A.4. Etude de l'extrait dichlorométhane pH8 (E8)

##### Préfractionnement

L'extrait DCM pH8 (E8) a subi le même préfractionnement en CLHP préparative que l'extrait P2. Les alcaloïdes monomères sont ainsi éliminés dans la première fraction.

Quatorze fractions sont obtenues (fig. IV.15). En les comparant avec celles obtenues à partir de l'extrait P2, il semble qu'OR1 soit également présent dans les fractions 4 et 5 de l'extrait DCM pH8, E8P4 et E8P5. De plus, la dernière fraction possédant un alcaloïde orange apolaire semble similaire à P2P11 (fig. IV.11 : 11). Cet alcaloïde a été isolé par CCM préparative en trop faible quantité pour permettre une détermination structurale.

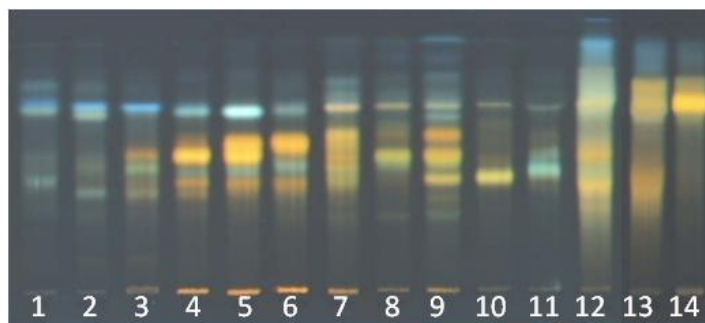


Figure IV.15 : CCM des fractions de l'extrait E8.  
Phase mobile:  
MeOH/CH<sub>3</sub>COONa  
25%/Acetone (65:35:20).  
Révélation: UV 366 nm.

Par contre, l'extrait DCM pH8 semble contenir moins d'alcaloïdes fluorescents en jaune. Cependant, la fraction E8P10 (fig. IV.15 : 10) pourrait contenir un alcaloïde presque pur.



### Fraction E8P10

La dixième fraction (fig. IV.15 : 10 = E8P10), contient principalement un alcaloïde jaune plus polaire que OR1. La CPC ayant donné de bons résultats dans les purifications antérieures, elle est à nouveau utilisée pour la fraction E8P10. Au final, dix sous-fractions ont été obtenues (fig. IV.16).

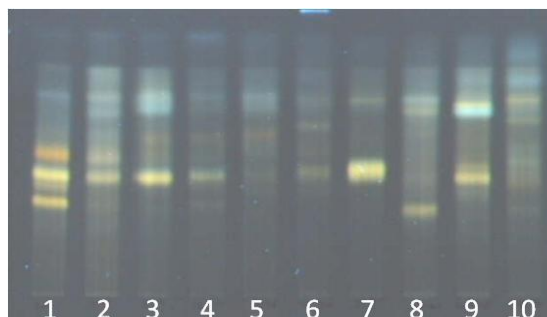


Figure IV.16 : CCM des sous-fractions de la fraction E8P10. Phase mobile: MeOH/CH<sub>3</sub>COONa 25%/Acetone (65:35:20). Révélation: UV 366 nm.

L'alcaloïde visé ayant une fluorescence jaune à 366 nm se trouve dans la fraction 7 ; il faut donc éliminer les sels contenus dans la fraction. Une élution sur colonne séphadex est réalisée avec de l'eau pour chasser les sels. Curieusement, l'alcaloïde reste accroché au séphadex même en utilisant différents solvants. Un essai de purification est alors effectué sur CCM de silice mais, à nouveau, l'alcaloïde ne peut pas être élué de la silice. Mme Biala reportait cette même problématique pour un composé non identifié. Le matériel étant perdu, un préfractionnement de l'extrait E8 est effectué de la même manière que le précédent. Cette fois, la sous-fraction 7 est purifiée sur une colonne de cellulose, matériel beaucoup plus inerte que la silice. Une fois séché, l'alcaloïde se présente sous forme de poudre orange, il est donc nommé OR3. Le poids obtenu (7,1 mg) permet des analyses spectrales (cf. § IV.3.B.4.).

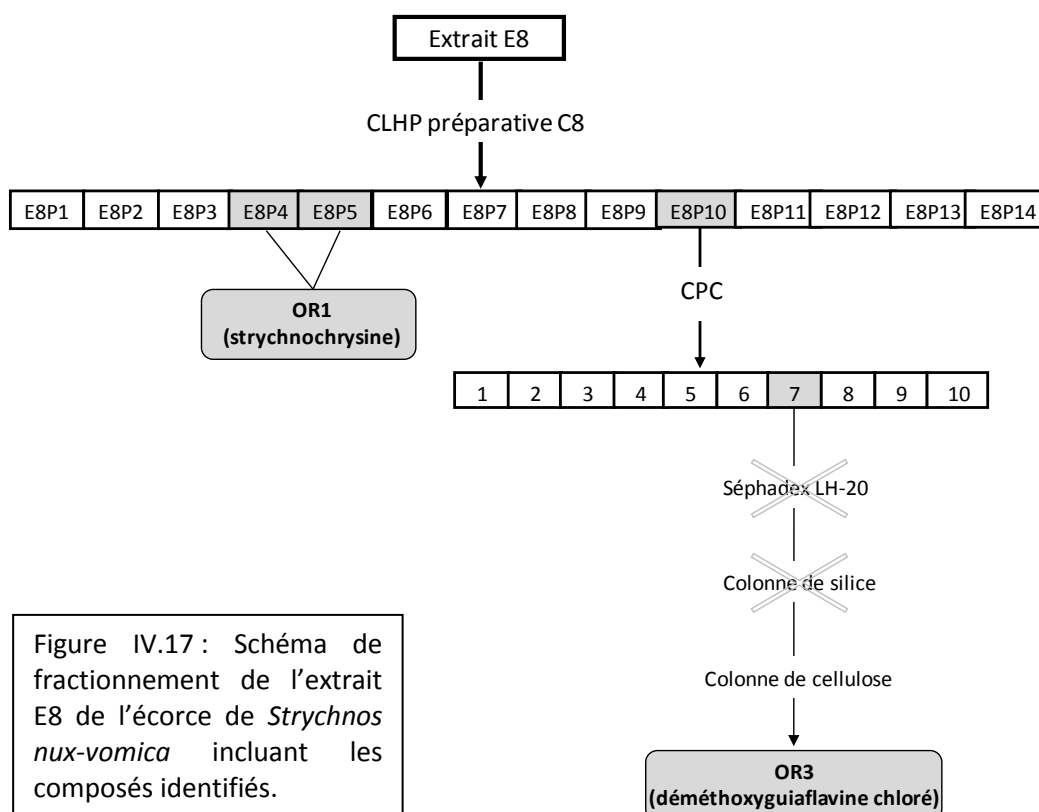


Figure IV.17 : Schéma de fractionnement de l'extrait E8 de l'écorce de *Strychnos nux-vomica* incluant les composés identifiés.

### IV.3.A.5. Etude de l'extrait dichlorométhane pH12 (E12)

Le poids de l'extrait E12 étant faible, le choix de la technique CPC s'impose pour éviter de perdre du matériel sur une phase stationnaire solide. Un nouveau système biphasique a été mis au point en évitant d'utiliser des sels qui faussent le poids des fractions récoltées. Il a permis de collecter 27 fractions (fig. IV.18).

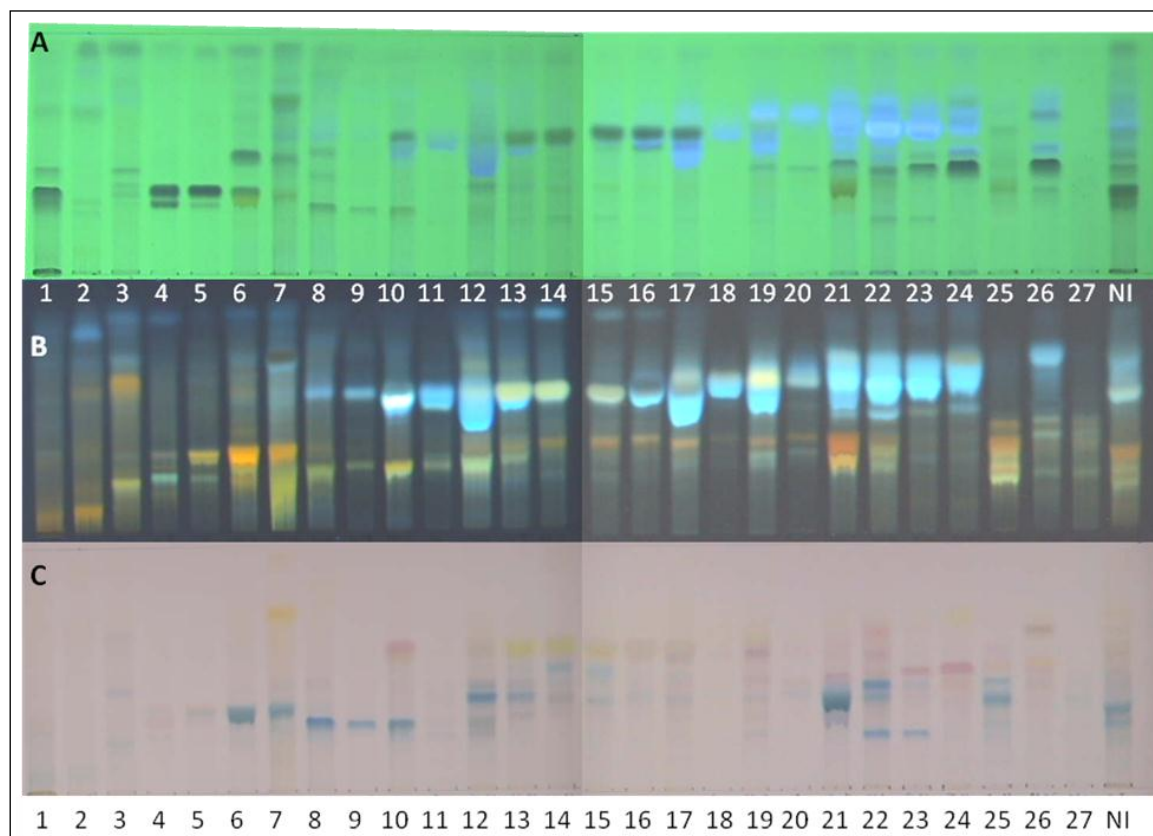


Figure IV.18 : CCM des fractions de l'extrait E12. Phase mobile : MeOH/CH<sub>3</sub>COONa 25 %/Acetone (65:35:20). Révélation : A.UV 254nm ; B.UV 366 nm ; C. visible : FeCl<sub>3</sub>/HClO<sub>4</sub>. (NI= fraction non-injectée).

En faisant la somme des poids de toutes les fractions et de l'extrait non-injecté exposés dans le tableau IV.4 (somme = 209,17 mg), nous constatons que la CPC n'engendre aucune perte de matériel (extrait E12 pesé pour la séparation par CPC = 209 mg).

Fraction	Poids	Fraction	Poids	Fraction	Poids	Fraction	Poids	Fraction	Poids
1	38,36	7	7,36	13	2,55	19	0,84		
2	4,95	8	8,78	14	2,95	20	0,49	25	21,29
3	12,21	9	1,94	15	4,1	21	4,02	26	12,73
4	25,13	10	10,34	16	3,18	22	1,43	27	2,46
5	12,35	11	0,77	17	1,38	23	3,39		
6	14,68	12	1,58	18	0,43	24	1,05	N.I.	8,43

Tableau IV.4 : Poids des fractions de l'extrait E12 (N.I.= fraction non-injectée).

Par l'analyse des plaques CCM (fig. IV.18), nous constatons la multitude de composés fluorescents bleus tant à 366 qu'à 254 nm. Malheureusement, le poids des fractions

obtenues est trop faible pour permettre des purifications postérieures. Cependant, des bases anhydronium témoins étant disponibles au laboratoire, une CCM comparative a été réalisée avec quelques fractions de l'E12 et les témoins serpentine, melinonine F et alstonine pour vérifier leur présence éventuelle dans les fractions. La première phase mobile utilisée (nBuOH/DCM/NH<sub>4</sub>OH 25% - 25:65:10) montre que ni la serpentine, ni l'alstonine (ayant le même *r<sub>f</sub>* mais une teinte différente) ne sont présentes dans les fractions. Un doute se pose avec la mélinonine F, une deuxième migration est réalisée dans un mélange de MeOH/ NH<sub>4</sub>OH 0,2M. Ceci permet de confirmer l'absence de mélinonine F dans les fractions de E12. Ainsi, aucun des témoins disponibles au laboratoire n'est présent dans les fractions pourtant riches en bases anhydronium.

#### IV.3.A.6. Récapitulatif des composés isolés

Le tableau IV.5 reprend les composés qui ont été isolés dans les différents extraits de *Strychnos nux-vomica*. Les étapes de purification sont présentées dans les figures IV.14 et IV.17.

Produit isolé	Origine	Nom
OR1	Extrait P2 de l'écorce de tronc	Strychnochryisine
BL1	Extrait P2 de l'écorce de tronc	N <sub>b</sub> -méthyl-longicaudatine
OR2	Extrait P2 de l'écorce de tronc	Déméthoxyguiaflavine
OR3	Extrait E8 de l'écorce de tronc	Déméthoxyguiaflavine chloré

Tableau IV.5 : Récapitulatifs des composés isolés chez *Strychnos nux-vomica*.

### IV.3.B. Elucidation structurale

#### IV.3.B.1. Composé OR1 (issu de l'extrait P2)

##### Spectre UV-vis

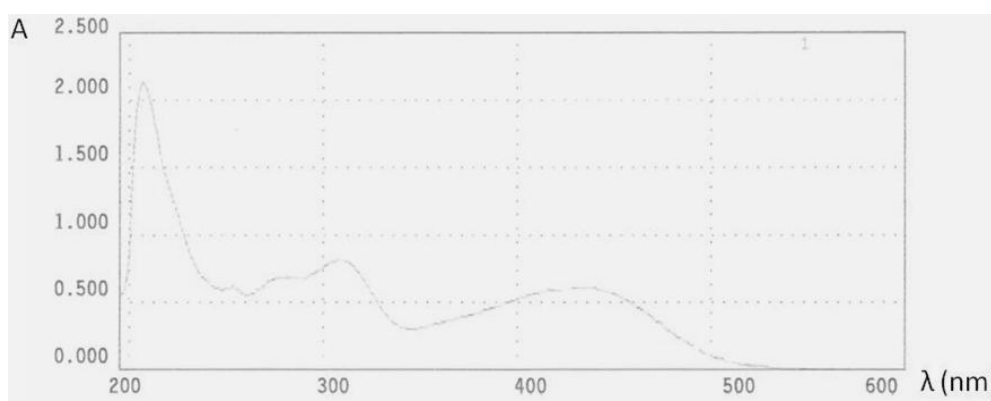


Figure IV.19 : Spectre UV-vis du composé OR1 enregistré dans le méthanol.

Le spectre UV-vis mesuré dans le méthanol (fig. IV.19) montre des maxima à 207, 253, 282, 309 et 431 nm. Aucune modification en milieu alcalin n'est observée, la présence d'une fonction phénol ou d'une base anhydronium est donc exclue.

### Spectre DC

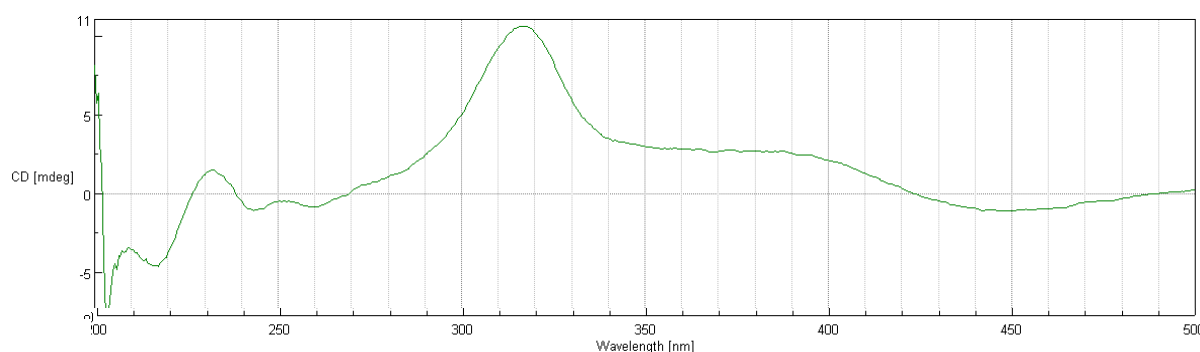


Figure IV.20 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé OR1 enregistré dans le méthanol.

DC (MeOH)  $\Delta\epsilon_{nm}$  :  $\Delta\epsilon_{217} = -2,15$  ;  $\Delta\epsilon_{232} = +0,667$  ;  $\Delta\epsilon_{243} = -0,531$  ;  $\Delta\epsilon_{260} = -0,421$  ;  $\Delta\epsilon_{317} = +4,864$  ;  $\Delta\epsilon_{387} = +1,206$  ;  $\Delta\epsilon_{447} = -0,541$ . La complexité du spectre DC (fig. IV.20) montre la présence de plusieurs centres chiraux proche d'un chromophore.

### Spectre de masse haute résolution (UCL)

L'ionisation électrospray en mode positif a généré un ion  $[M]^+$  à  $m/z$  583,3080, ce qui est compatible avec une composition élémentaire  $C_{38}H_{39}N_4O_2$ . Cette composition correspond exactement à la formule brute de la strychnochryine. Comme l'alcaloïde est naturellement ionisé, la formule brute est équivalente à la composition élémentaire et sa masse monoisotopique exacte reste la même (valeur théorique : 583,3072, erreur inférieure à 2 ppm).

### Spectres RMN

Au vu de la formule brute obtenue et du  $R_f$  similaire à celui de la strychnochryine décrite antérieurement, les spectres RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , HSQC, COSY et HMBC mesurés dans le MeOD sont comparés aux spectres mesurés dans le  $CDCl_3$  fin des années 90 et publiés par Mme Biala et ses collègues [19] (tableau IV.6).

N°	MeOD				$CDCl_3$			
	$\delta_H$ (J en Hz)	COSY	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ (J en Hz)	COSY	HMBC	$\delta_C$
2 CH	3,83 (d, 11,3)	16	C17, C6, C7, C8, C13	72,0	3,87 (d, 11,3)	16	C17, C13, C2	71,2
3 CH	3,58	14a, 14b	C2, C15, C21	62,0	3,70	14a, 14b	C2	62,2
5 CH <sub>2</sub> a	3,06	6a, 6b		54,4	3,25	5b, 6a, 6b		53,7
b	2,80	6b, 5a		54,4	2,90	5a, 6a		53,7
6 CH <sub>2</sub> a	2,51	5a, 5b, 6b	C2, C7,	45,1	2,60	6b, 5a, 5b		42,8
b	1,83	5a, 6a	C2	45,1	1,95	6a, 5a, 5b		42,8
7 C				52,3				50,8
8 C				136,0				134,8
9 CH	7,21 (d)	10	C7, C11, C13	124,3	7,24 (d)	10	C13, C11	123,3
10 CH	6,88 (t)	9	C8, C12	123,1	6,99 (t)	9, 11	C12, C8	122,0
11 CH	7,15 (t)		C9, C13	129,7	7,23 (t)	10, 12	C9, C13	128,7

12 CH	6,96 (d)		C8, C10	110,7	6,77 (d)	11	C10, C8	108,8
13 C				146,0				144,3
14 CH <sub>2</sub> a	2,10 (dt 13,7)	14b, 15, 21a	C2, C7	30,2	2,30 (13,7)	14b, 3, 15		29,6
b	1,70 (dt 13,7)	14a, 15, 21a		30,2	1,80 (13,7)	14a, 3, 15		29,6
15 CH	3,11	14a		28,6	3,24	14a, 14b		27,1
16 CH	1,79	2, 17		50,5	2,10 (11,3 ; 10,2)	2, 17		49,8
17 CH	4,54 (d, 10,2)	16	C15, C16, C16', C17'	70,4	5,15 (d, 10,2)	16, 17'		68,0
18 CH <sub>2</sub> a	4,13	19	C19, C20	57,9	4,25 (12,6 ; 6,4)	18b, 19		56,5
b	4,02	19	C19, C20	57,9	4,10 (12,6 ; 6,4)	18a, 19		56,5
19 CH	5,78 (t 6,3)		C15, C18	128,0	6,14 (t 6,4)	18a, 18b		128,5
20 C				138,7				137,6
21 CH <sub>2</sub> a	3,52 (d 15,7)	21b	C3, C15, C19, C20	58,0	3,75 (16,0)	21b	C3, C19	57,3
b	3,16 (d 15,7)	21a		58,0	3,25 (16,0)	21a		57,3
2' C				126,5				138,6
3' C				141,7				141,0
5' CH <sub>2</sub>	4,70	6'		56,4	4,55	6'		55,3
6' CH <sub>2</sub>	3,30 (t)	5'	C5', C7', C8'	20,6	3,30	5'	C7', C5'	22,7
7' C				117,9				115,5
8' C				126,3				124,8
9' CH	7,57 (d)	10'	C7', C11', C13'	121,2	7,46 (d)	10'	C11', C13', C7'	119,4
10' CH	7,05 (t)	9'	C8'	122,1	7,09 (t)	9', 11'	C12', C8'	120,8
11' CH	7,25 (t)	10', 12'	C9', C12', C13'	127,3	7,32 (t)	10', 12'	C9', C13'	126,0
12' CH	7,41 (d)	11'	C8', C10'	113,5	7,70 (d)	11'	C8', C10'	114,0
13' C				141,2				140,1
14' CH	7,95 (s)	/	C2', C3', C16', C20'	121,4	8,58 (s)	21'		122,0
15' C				158,1				156,2
16' C				121,3				119,0
17' CH	6,48 (s)	/	C2, C17, C15', C16'	134,8	7,20 (s)	17	C17, C2, C16', C15'	133,7
18' CH <sub>3</sub>	1,32	19'	C19', C20'	13,7	1,40 (t)	19'a, 19'b	C19', C20'	14,1
19' CH <sub>2</sub>	2,89	18'	C18', C20', C21'	25,5	2,90	19'b	C18'	24,5
b					2,80	19'a	C18'	24,5
20' C				139,0				135,5
21' CH	8,38 (s)	/	C20', C3', C5', C15', C19'	144,2	7,83 (s)	14', 19', 5'	C5', C15', C3'	140,8

Tableau IV.6 : Déplacements chimiques ( $\delta$  en ppm) de la strychnochrysin dans le méthanol et le chloroforme deutérés. *d* = doublet ; *t* = triplet ; *dt* = doublet de triplet ; *s* = singulet.

Mise à part la légère variation du déplacement chimique  $^1\text{H}$  dépendante du solvant deutéré utilisé, il apparaît que tous les signaux observés dans le méthanol correspondent exactement aux signaux décrits dans le chloroforme.

### Structure plane déduite

Par comparaison des différents spectres mesurés et ceux décrits dans la littérature concernant la strychnochrysin [19], il est évident que l'alcaloïde isolé sous le nom de OR1 correspond à la strychnochrysin (fig. IV.21).

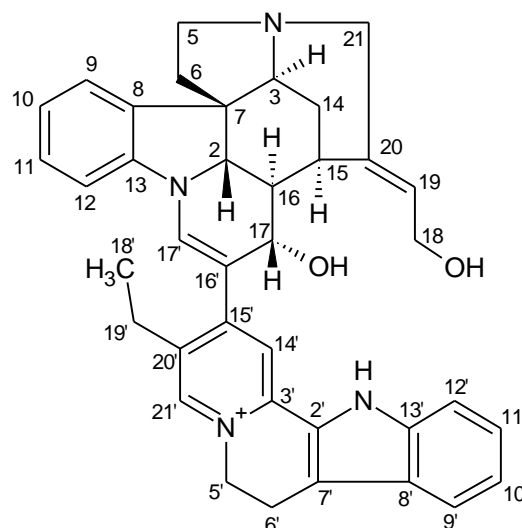


Figure IV.21 : Structure 2D du composé OR1 (strychnochrysin)

### IV.3.B.2. Composé BL1 (issu de l'extrait P2)

#### Spectre UV-vis

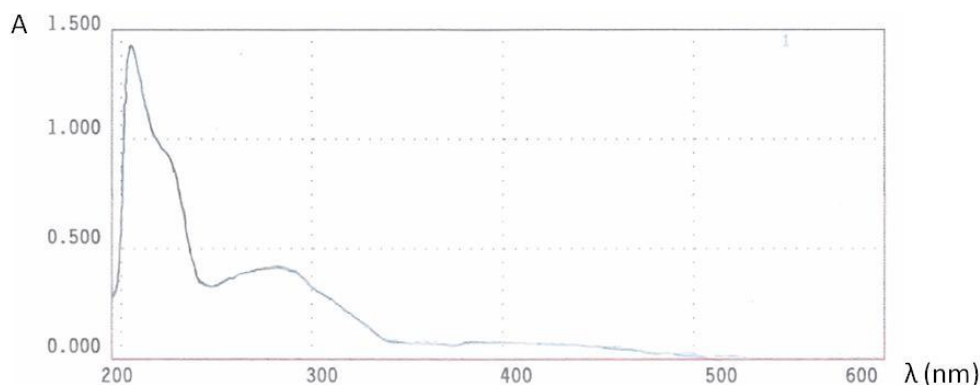


Figure IV.22 : Spectre UV-vis du composé BL1 enregistré dans le méthanol.

Le spectre UV-vis (fig. IV.22) montre seulement trois maxima à 205, 224 et 283 nm. L'absence de maxima dans les hautes longueurs d'onde démontre que le composé présente peu de liaisons conjuguées à la différence de la strychnochrysin. Aucun effet bathochrome ou hypsochrome n'est observé en milieu alcalin. Il n'y a donc pas de groupement phénol ni la présence de base anhydronium.

### Spectre DC

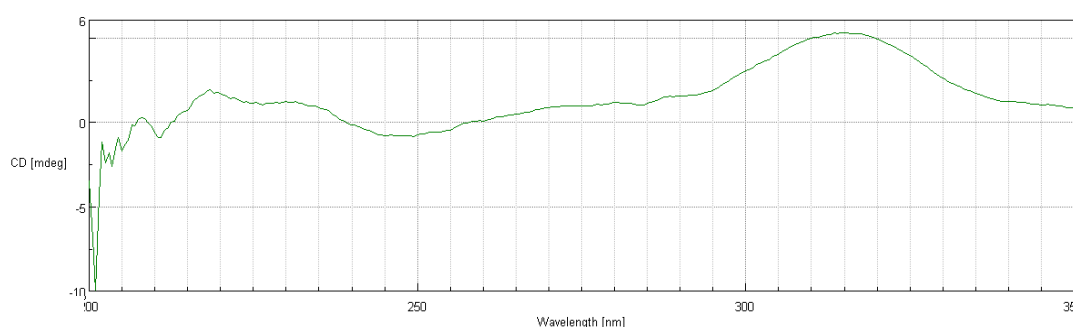


Figure IV.23 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé BL1 enregistré dans le méthanol.

DC (MeOH)  $\Delta\epsilon_{nm}$ :  $\Delta\epsilon_{218} = + 1,406$  ;  $\Delta\epsilon_{248} = - 0,627$  ;  $\Delta\epsilon_{314} = + 3,912$ . Peu d'effets Cotton sont mis en évidence, reflétant un chromophore chiral plus simple que la strychnochrysin.

### Spectre de masse haute résolution (UCL)

L'ionisation électrospray en mode positif a produit un ion  $[M]^+$  à  $m/z$  583,3426, ce qui est compatible avec une composition élémentaire  $C_{39}H_{43}N_4O$  correspondant à 21 insaturations ou cycles. La valeur théorique de la formule brute correspondant à  $C_{39}H_{43}N_4O$  vaut 583,3436 (erreur inférieure à 2 ppm). Il y aurait, par rapport à la strychnochrysin, un carbone et trois hydrogènes en plus, et un oxygène en moins. La structure serait donc proche.

### Spectres RMN

Les données des spectres proton et 2D de BL1 sont présentées dans le tableau IV.7 pour être comparées aux données de la strychnochrysin. La présence de huit signaux dans la zone aromatique du spectre proton et les corrélations HMBC correspondantes sont facilement attribuables à deux noyaux indoliques. A la différence de la strychnochrysin, aucun proton n'est présent au dessus de 8 ppm ; les carbones 14' et 21' ne seraient donc plus conjugués. Par contre, on retrouve trois autres protons conjugués à  $\delta_H$  6,48 ; 6,44 et 5,6 ppm attribués (grâce aux corrélations des spectres COSY et HMBC) respectivement aux protons 19, 17' et 19'. Notons que le carbone 19', lié à un méthyle en position  $\delta_H$  1,61 ppm (H-18'), est une méthine et non un méthylène comme dans la strychnochrysin (spectre HSQC). Cela nous indique que le cycle D' de la quinolizidine n'est plus aromatique. L'argument le plus probant est la présence de deux carbones méthiniques désignés C-3' et C-15' situés respectivement à  $\delta_C$  56,6 et 40,3 ppm, et les méthylènes C-21' et C-14' à respectivement  $\delta_C$  58,9 et 34,4 ppm. Les corrélations des spectres 2D permettent de joindre la quinolizidine à un des noyaux indoliques, formant ainsi un squelette corynanthéane.

Par l'analyse des autres signaux du spectre HSQC, il semble que, tout comme la strychnochrysin, l'alcaloïde BL1 est formé également d'une partie strychnane. Des variations existent cependant à quelques niveaux : le méthylène C-18 ( $\delta_C$  65,1 ppm), un peu plus déblindé que dans la strychnochrysin, est corrélé au C-17 lui aussi légèrement plus déblindé ( $\delta_C$  81,0 ppm) ; ceci ne peut être possible que par une déshydratation des fonctions alcooliques liées à ces deux carbones et une formation d'un cycle à 7 pièces

comprenant la liaison éther. La présence d'un seul oxygène est également signalée dans la composition élémentaire de l'ion produit en masse exacte.

Un nouveau signal correspondant à un méthyle et apparu à  $\delta_H$  3,4/  $\delta_C$  55,1 ppm ne présente aucune corrélation en COSY. Mais les corrélations HMBC avec C-3, C-5 et C-21 le placeraient sur l'azote b devenant ainsi quaternaire. D'ailleurs, l'azote devenu quaternaire entraîne un léger déplacement des protons vicinaux (H-5, H-21 et H-3) vers les hautes fréquences. La présence du méthyle supplémentaire est également confirmée par l'analyse de masse exacte.

### Structure plane déduite

L'analyse des différents spectres permet de conclure à la structure plane dessinée dans la figure IV.24. L'alcaloïde est de type indolique dimérique asymétrique beaucoup moins conjugué que la strychnochrysin, ayant un hétérocycle en plus dans sa partie strychnane, et possédant une chaîne éthylidène sur la quinolizidine. Par analogie à la structure de la longicaudatine, nous pouvons nommer ce nouvel alcaloïde N<sub>b</sub>-méthyl-longicaudatine.

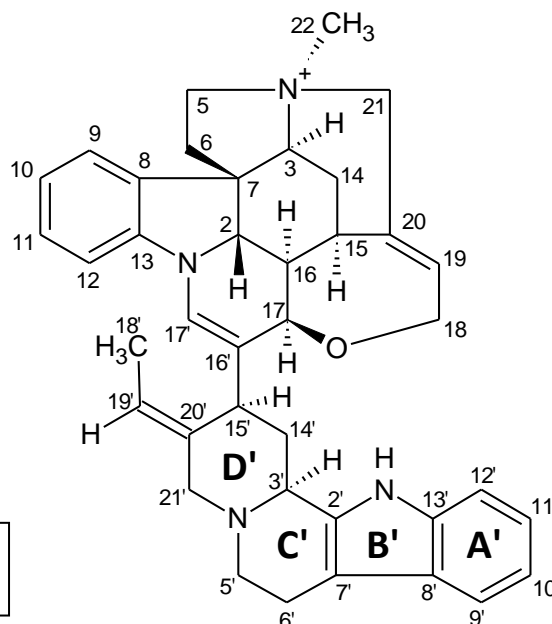


Figure IV.24 : Structure 2D du composé BL1 (N<sub>b</sub>-méthyl-longicaudatine)

### IV.3.B.3. Composé OR2 (issu de l'extrait P2)

#### Spectre UV-vis

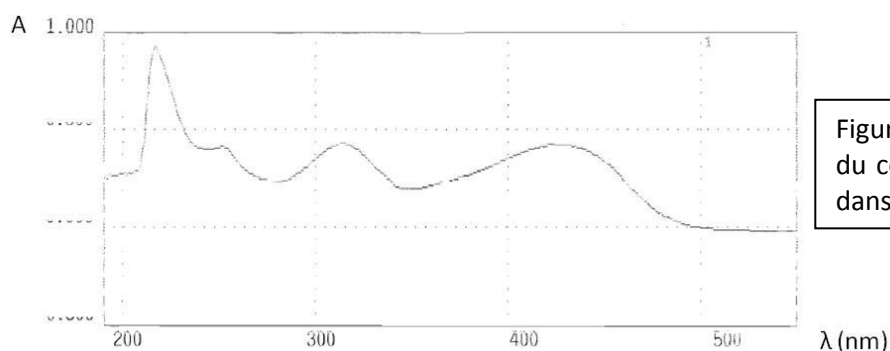


Figure IV.25 : Spectre UV-vis du composé OR2 enregistré dans le méthanol.



Le spectre UV-vis (fig. IV.25) présente des maxima d'absorption à 217, 252, 314 et 427 nm. Vu l'étendue du spectre, et tout comme la strychnochrysin, il semble que le composé soit hautement conjugué. Aucune modification n'a été observée en milieu alcalin.

### Spectre DC

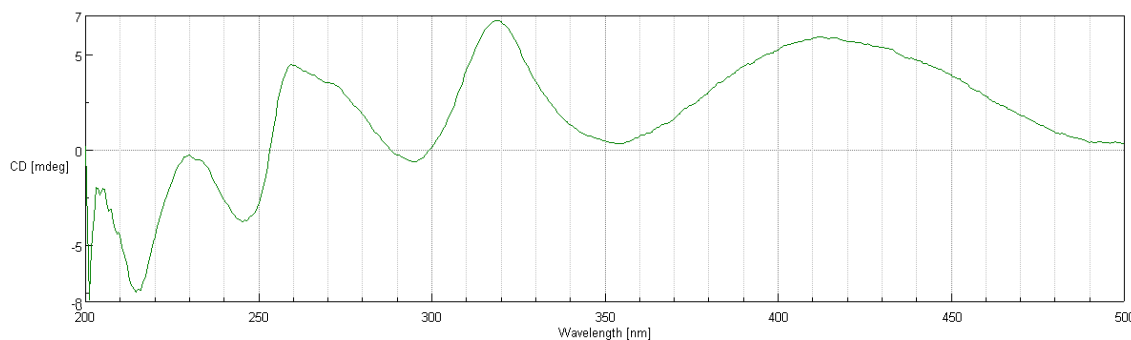


Figure IV.26 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé OR2 enregistré dans le méthanol.

DC (MeOH)  $\Delta\epsilon_{nm}$  :  $\Delta\epsilon_{216} = -4,118$  ;  $\Delta\epsilon_{245} = -2,115$  ;  $\Delta\epsilon_{259} = +2,473$  ;  $\Delta\epsilon_{294} = -0,369$  ;  $\Delta\epsilon_{319} = +3,775$  ;  $\Delta\epsilon_{412} = +3,294$ .

Quatre effets Cotton (points d'inflexion) ont été retenus dans le spectre (fig. IV.26). Une différence marquée par rapport à OR1 est l'effet Cotton positif entre 350 et 400 nm, puis négatif de 450 à 500 nm. Ces effets sont inversés aux mêmes longueurs d'onde chez OR1.

### Spectre de masse haute résolution (UCL)

L'ionisation électrospray en mode positif a généré principalement un ion  $[M]^+$  à  $m/z$  579,3109, ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{39}H_{39}N_4O$  correspondant à 23 insaturations. La valeur théorique de la formule brute correspondant à  $C_{39}H_{39}N_4O$  vaut 579,3124 (erreur inférieure à 3 ppm). La décomposition de l'ion parent en MS/MS présente les ions filles suivants:  $m/z$  551 (-  $CH_2-CH_3$ ) ;  $m/z$  497 ;  $m/z$  379 ;  $m/z$  285. Il y aurait, par rapport à la strychnochrysin, un carbone supplémentaire et un oxygène en moins.

### Spectres RMN

Les données des spectres proton et 2D d'OR2 sont présentées dans le tableau IV.7. La comparaison directe avec les signaux de la strychnochrysin indique que de nombreux signaux sont identiques. D'abord, les 12 signaux dans la zone déblindée sont en accord avec ceux de la strychnochrysin ; en vérifiant les déplacements du C-5' et du C-6' et leur nature, nous concluons qu'OR2 possède la même partie corynanthéane que la strychnochrysin.

Par contre, un méthyle apparaît à  $\delta_H$  3,39/  $\delta_C$  55,6 ppm et est corrélé avec C-3, C-5 et C-21 ; l'azote b est donc méthylé. L'ion parent obtenu en masse indique la présence d'un seul oxygène ; en analysant les corrélations du C-17 et C-18 (ayant des déplacements chimiques un peu plus déblindés que chez la strychnochrysin) existantes, une

cyclisation est vérifiée à ce niveau. Ainsi, la partie strychnane de l'alcaloïde OR2 coïncide exactement à la partie strychnane de BL1.

### Structure plane déduite

L'alcaloïde OR2 est un indolique dimérique asymétrique possédant la partie « nord » identique à celle de BL1 et la partie « sud » pareille à celle de la strychnochryrine. Cette structure nouvelle (fig. IV.27), analogue à la structure de la guiaflavine, est donc appelée déméthoxyguiaflavine.

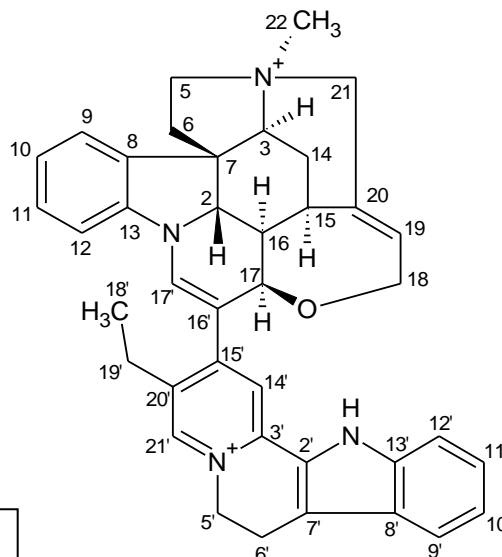


Figure IV.27 : Structure 2D du composé OR2 (déméthoxyguiaflavine)

### IV.3.B.4. Composé OR3 (issu de l'extrait E8)

#### Spectre UV-vis

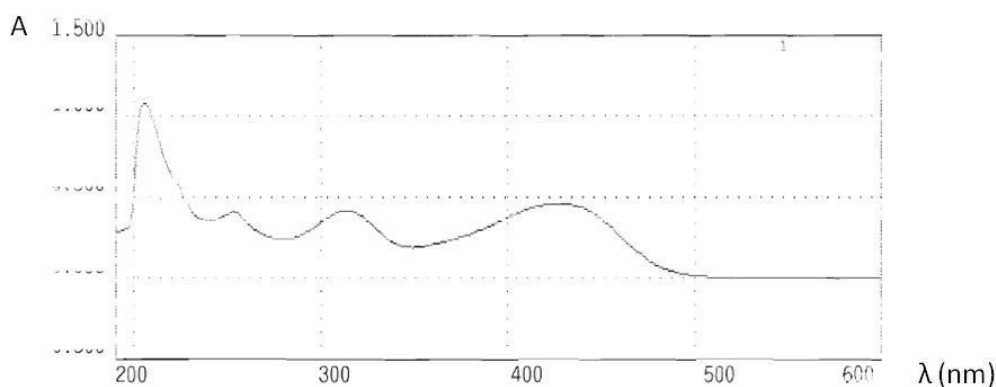


Figure IV.28 : Spectre UV-vis du composé OR3 enregistré dans le méthanol.

Le spectre UV-vis (fig. IV.28) présente des maxima d'absorption à 206, 253, 313 et 427 nm, ce qui est comparable au spectre mesuré pour OR2. Le chromophore de ces deux composés est donc identique et comprend un système extrêmement conjugué. Aucune modification n'a été observée en milieu alcalin.

### Spectre DC

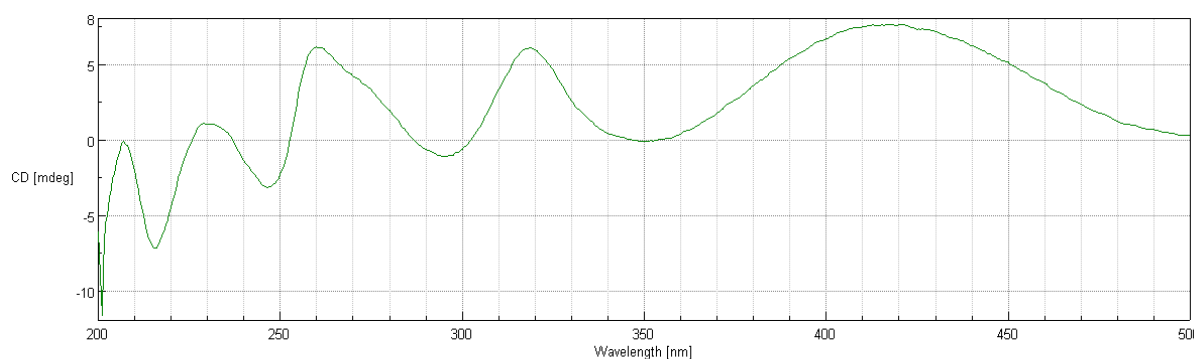


Figure IV.29 : Spectre de dichroïsme circulaire du composé OR3 enregistré dans le méthanol.

DC (MeOH)  $\Delta\epsilon_{nm}$  :  $\Delta\epsilon_{216} = - 5,154$  ;  $\Delta\epsilon_{230} = + 0,736$  ;  $\Delta\epsilon_{246} = - 2,268$  ;  $\Delta\epsilon_{260} = + 4,366$  ;  $\Delta\epsilon_{295} = - 0,814$  ;  $\Delta\epsilon_{318} = + 4,335$  ;  $\Delta\epsilon_{418} = + 5,438$ .

Le spectre DC (fig. IV.29) est identique à celui d'OR2 ; le chromophore et la stéréochimie des deux molécules sont donc égaux.

### Spectre de masse haute résolution (ULg)

L'ionisation électrospray en mode positif a généré principalement un ion  $[M]^+$  à  $m/z$  613,2995, ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{39}H_{38}N_4OCl$  correspondant à 23 insaturations. La présence de chlore est confirmée par un signal à 615, ayant l'abondance relative typique des isotopes du chlore ( $Cl^{35} = 100\%$  à 613 et  $Cl^{37} = 35\%$  à 615). La formule brute obtenue diffère de la formule brute d'OR2 uniquement par la présence de chlore et la disparition d'un proton. La décomposition de l'ion parent en MS/MS présente les ions filles suivants :  $m/z$  577(- Cl) ;  $m/z$  549 ;  $m/z$  307 ;  $m/z$  273.

### Spectres RMN

Les données des spectres proton et 2D d'OR3 sont présentées dans le tableau IV.7. Au vu de la forte ressemblance des spectres UV-vis et DC entre OR2 et OR3, les signaux RMN de ces deux composés sont directement comparés. Tous les signaux sont identiques à part celui du C-22 qui correspond à un méthylène à  $\delta_H$  5,63/  $\delta_C$  71,2 ppm chez OR3. Aucune corrélation n'est perçue ni en COSY, ni en HMBC. Toutefois, l'absence de changements dans les autres signaux et cette position fortement déblindée indiquent que ce méthylène est lié d'une part à  $N_b$  de la partie strychnane et d'autre part à un chlore (identifié par le spectre de masse).

### Structure plane déduite

L'alcaloïde bisindolique OR3 se distingue de l'alcaloïde OR2 seulement par un atome de chlore (fig. IV.30).

Il se pourrait qu'OR3 soit un artéfact d'extraction car il est rare de trouver des composés naturels pourvus de chlore. D'autre part, la formation d'artéfact pendant l'extraction d'alcaloïde en utilisant du DCM ou du chloroforme à température ambiante a déjà été décrite dans la littérature [164]. Les auteurs informent que des impuretés telles que  $CH_2ClBr$  pourraient être à l'origine de ces artéfacts, car les solvants chlorés, une fois redistillés, ne produisent plus d'artéfact chloré.

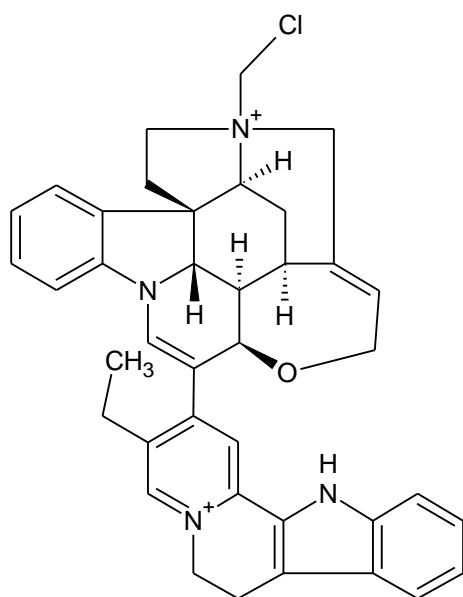


Figure IV.30 : Structure 2D du composé OR3

N°	OR1 (strychnocrisine)			OR2 (déméthoxyguiaflavine)			OR3 (dérivé chloré d'OR2)			BL1 (N <sub>6</sub> -méthyl-longicaudatine)		
	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC
2	72,0 CH	3,83 (d 11,3)	6, 7, 8, 13, 17	60,6 CH	4,12 (d 11,8)	17, 6, 8, 13	59,2 CH	4,27 (d 11,8)	8, 13, 17	60,7 CH	3,88 (d 11,3)	6, 8, 13, 17
3	63,0 CH	3,58	2, 15, 21	76,2 CH	4,38	2, 7, 15	72,9 CH	4,72	15	76,1 CH	4,28	15
5a	54,4 CH <sub>2</sub>	3,06		63,7 CH <sub>2</sub>	3,79		59,3 CH <sub>2</sub>	4,13	7	63,5 CH <sub>2</sub>	3,76	21
b	54,4	2,80		63,7	3,71	21	59,3	3,91		63,5	3,81	
6a	45,1 CH <sub>2</sub>	2,51	2, 7	38,8 CH <sub>2</sub>	2,26	2, 3	37,7 CH <sub>2</sub>	2,42	3, 5	37,4 CH <sub>2</sub>	2,09	
b	45,1	1,83	2				37,7	2,34	5			
7	52,3 C			54,1 C			52,1 C			53,2 C		
8	136,0 C			130,7 C			128,8 C			129,0 C		
9	124,3 CH	7,21 (d)	7, 11, 13	124,7 CH	7,44 (d)	7, 11, 13	123,1 CH	7,52 (d)	11, 13	123,9 CH	7,29 (d)	7, 11, 13
10	123,1 CH	6,88 (t)	8, 12	123,8 CH	6,95	8, 12	122,2 CH	7,05 (t)	12	121,2 CH	6,80 (t)	8, 12
11	129,7 CH	7,15 (t)	9, 13	131,5 CH	7,20	9, 13	130,1 CH	7,31 (t)	9, 13	130,1 CH	7,07 (t)	9, 13
12	110,7 CH	6,96 (d)	8, 10	111,8 CH	6,97	8, 10	110,3 CH	7,06 (d)	10	110,5 CH	6,48 (d)	8, 10
13	146,0 C			146,1 C			144,6 C			148,0 C		
14a	30,2 CH <sub>2</sub>	2,10 (dt 13,7)	2, 7	25,9 CH <sub>2</sub>	2,67 (dt 15,6)	20	25,4 CH <sub>2</sub>	2,74		25,8 CH <sub>2</sub>	2,57	
b	30,2	1,70 (dt 13,7)		25,9	1,75 (d 15,6)	20	25,4	1,93		25,8	1,72	
15	28,6 CH	3,11		31,3 CH	3,60		29,6 CH	3,76		31,1 CH	3,21	
16	50,5 CH	1,79		44,1 CH	1,82 (d 11,7)	2, 20	42,3 CH	1,96		42,7 CH	1,57	
17	70,4 CH	4,54 (d 10,2)	15, 16, 16', 17'	79,3 CH	4,95 (d 1,6)	2, 18, 20, 15', 16', 17'	77,7 CH	5,01 (d 1,6)	2, 15', 16', 17'	81,0 CH	4,00 (d 2,0)	2, 16'
18a	57,9 CH <sub>2</sub>	4,13	19, 20	65,5 CH <sub>2</sub>	4,25	19, 17, 20	63,8 CH <sub>2</sub>	4,35	20	65,1 CH <sub>2</sub>	4,34	17, 19
b	57,9	4,02	19, 20	65,5	4,06	19, 17, 20	63,8	4,17	17, 20	65,1	4,16	17, 19
19	128,0, CH	5,78 (t 6,3)	15, 18	137,4 CH	6,38 (t)	15, 18, 21	136,8 CH	6,54 (t)		136,6 CH	6,48	
20	138,7 C			135,2 C			132,7 C			C		
21a	58,0 CH <sub>2</sub>	3,52 (d 15,7)	3, 15, 19, 20	65,8 CH <sub>2</sub>	4,16 (d 13,6)	5, 18, 19, 20	61,4 CH <sub>2</sub>	4,44 (d 13,3)		65,5 CH <sub>2</sub>	4,15 (d 13,6)	
b	58,0	3,16 (d 15,7)		65,8	3,87 (d 13,6)	3, 5, 15, 18, 19, 20	61,4	4,03 (d 13,3)	3, 15, 20	65,5	3,91	3, 15, 19
22				55,6 CH <sub>3</sub>	3,39	3, 5, 21	69,4 CH <sub>2</sub>	5,65 (q)		55,1 CH <sub>3</sub>	3,40	5, 3, 21

Tableau IV.7 : Déplacements chimiques (δ en ppm) dans le MeOD des alcaloïdes isolés ; d = doublet ; t = triplet ; dt = doublet de triplet ; q = quadruplet. **Partie « nord ».**

N°	OR1 (strychnochryrine)			OR2 (déméthoxyguaiavine)			OR3 (dérivé chloré d'OR2)			BL1 (N <sub>6</sub> -méthyl-longicaudatine)		
	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC	δ <sub>C</sub> , mult	δ <sub>H</sub> (J in Hz)	HMBC
3'	141,7 C			141,7 C			140,1, C			56,6 CH	4,06	
5'a	56,4 CH <sub>2</sub>	4,70		56,5 CH <sub>2</sub>	4,71	3', 6', 7'	54,8 CH <sub>2</sub>	4,82	3', 6', 7', 21'	51,9 CH <sub>2</sub>	3,18	20'
5'b										51,9	2,99	
6'	20,6 CH <sub>2</sub>	3,30 (t)	5', 7', 8'	20,6 CH <sub>2</sub>	3,29	2', 5', 7', 8'	19,0 CH <sub>2</sub>	3,41	2', 5', 7'	20,1 CH <sub>2</sub>	2,71	
7'	117,9 C			118,2 C			116,4 C			C		
8'	126,3 C			126,4 C			125,3 C			128,4 C		
9'	121,2 CH	7,57 (d)	7', 11', 13'	121,3 CH	7,57 (d)	7', 11', 13'	119,7 CH	7,67 (d)	13'	118,8 CH	7,41 (d)	11', 8'
10'	122,1 CH	7,05 (t)	8'	122,2 CH	7,07	8', 12'	120,6 CH	7,17 (t)	8', 12'	119,9 CH	6,98 (t)	8', 12'
11'	127,3 CH	7,25 (t)	9', 12', 13'	127,4 CH	7,25	9', 13'	125,9 CH	7,34 (t)	9', 13'	121,9 CH	7,03 (t)	9', 13'
12'	113,5 CH	7,41 (d)	8', 10'	113,6 CH	7,41 (d)	8', 10'	112,2 CH	7,54 (d)	8'	111,6 CH	7,27 (d)	10', 8'
13'	141,2 C			141,3 C			139,8 C			137,6 C		
14'	121,4 CH	7,95 (s)	2', 3', 16', 20'	120,4 CH	8,12 (s)	2', 3', 16', 20'	119,0 CH	8,20 (s)	2', 3', 16', 20'	34,4 CH <sub>2</sub>	2,41	15', 2'
15'	158,1 C			158,0 C			156,3 C			40,3 CH	3,50 (t)	14', 16', 17', 20'
16'	121,3 C			115,9 C			114,7 C			121,0 C		
17'	134,8 CH	6,48 (s)	2, 17, 15', 16'	135,9 CH	7,34 (s)	2, 17, 15', 16'	134,0 CH	7,41 (s)	2, 17, 15', 16'	127,8 CH	6,44 (s)	2, 15', 17
18'	13,7 CH <sub>3</sub>	1,32	19', 20'	14,9 CH <sub>3</sub>	1,27	19', 20'	13,4 CH <sub>3</sub>	1,37 (t)	19'	13,7 CH <sub>3</sub>	1,61	19', 20'
19'a	25,5 CH <sub>2</sub>	2,89	18', 20', 21'	25,5 CH <sub>2</sub>	2,98 (m)	15', 18', 20', 21'	23,7 CH <sub>2</sub>	3,07 (m)	18', 20', 21'	123,4 CH	5,62 (q 6,8)	15'
19'b				25,5	2,84 (m)	15', 18', 20', 21'	23,7	2,91 (m)	15', 18', 20'			
20'	139,0 C			139,1 C			137,6 C			136,5 C		
21'a	144,2 CH	8,38 (s)	20', 3', 5', 15', 19'	145,1 CH	8,45 (s)	20', 3', 5', 15', 19'	143,3 CH	8,54 (s)	3', 5', 15', 19', 20'	58,9 CH <sub>2</sub>	3,55	
21'b											3,17	19', 20'

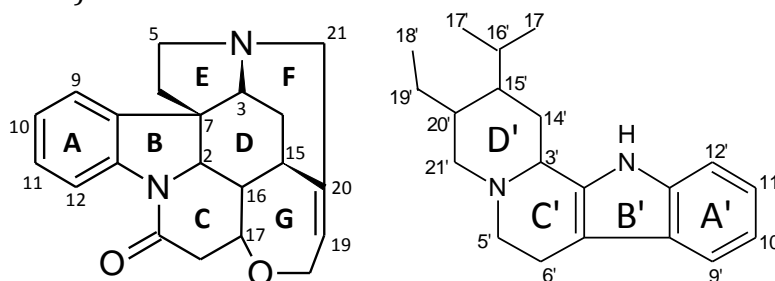
Tableau IV.7 (suite) : d = doublet ; t = triplet ; m = multiplet ; s = singulet. **Partie « sud ».**

### IV.3.B.5. Stéréochimie des alcaloïdes

Les quatre alcaloïdes isolés possèdent de nombreux centres asymétriques. Généralement, la position  $\alpha$  ou  $\beta$  de protons vicinaux se détermine par la valeur de la constante de couplage ( $J$ ) présente dans les spectres RMN  $^1\text{H}$ . La stéréochimie de la strychnochryisine avait été déduite de cette manière pour les protons H-16 ( $\alpha/16\text{R}$ ) et H-17 ( $\beta/17\text{R}$ ) et par la biogénèse en ce qui concerne les protons H-2 ( $\beta$  2S), 7 ( $\beta$ , 7R), H-3 ( $\alpha/3\text{S}$ ), H-15 ( $\alpha/15\text{R}$ ) [19]. La stéréochimie H-2  $\beta$ , 7 $\beta$ , 3 $\alpha$  et 15 $\alpha$  du squelette strychnane est aussi confirmée par l'effet Cotton positif du spectre DC vers 250 nm.

Ainsi, en accord avec l'hypothèse biogénétique, la configuration des carbones 2S, 3S, 7R et 15R est identique pour tous les alcaloïdes isolés. Par contre, la stéréochimie des protons 16 et 17 est discutée. En se référant à la valeur de la constante de couplage entre H-2 et H-16, la position de H-16 reste en  $\alpha$  dans les 4 cas ( $J = 11,3/11,8$  Hz). Par contre, la valeur de la constante de couplage entre H-17 et H-16 varie selon l'ouverture ou la fermeture du cycle G (fig. IV.31).

Figure IV.31 : Dénomination par lettres des 6 cycles de la strychnine et des 4 cycles de la partie corynanthéane (').



Lorsque le cycle G est ouvert (strychnochryisine),  $J = 10,2$  Hz ; cette grande valeur indique un angle dièdre entre les protons vicinaux d'environ  $180^\circ$ , donc H-17 est en  $\beta$  (17R), position antipériplanaire par rapport à H-16. Dans la forme fermée (BL1, OR2, OR3),  $J = 1,6/2,0$  Hz ; cette petite valeur indique cette fois un angle  $\Phi$  d'environ  $55^\circ$ , ce qui signifie que H-16 et H-17 sont dans le même plan (H-17 $\alpha/17\text{S}$ ).

Une autre approche a également été utilisée pour confirmer les configurations déduites : la modélisation moléculaire. La structure OR2 a été optimisée au niveau B3LYP avec la base double polarisée 6-31G(d) dans la forme doublement chargée induite par l'environnement des 2 azotes quaternaires. Comme l'étude portait principalement sur la configuration du C-17, les calculs ont été réalisés sur la forme ouverte (strychnochryisine N<sub>b</sub>-méthylée) et la forme fermée (déméthoxyguiaflavine) du cycle G.

Les calculs indiquent une différence énergétique marquée entre les deux configurations du C-17 dans la forme ouverte (fig. IV.32) ; il apparaît que la configuration R est 5,249 kcal plus stable que la forme S. Cette stabilité est certainement fournie par le pont hydrogène (plus court dans la configuration R). De plus, l'angle dièdre entre H-16 et H-17 vaut  $174,1^\circ$  et celui entre H-2 et H-16 vaut  $163,7^\circ$ . Ce résultat confirme la position H-17  $\beta$  de la strychnochryisine (antipériplanaire par rapport à H-16).

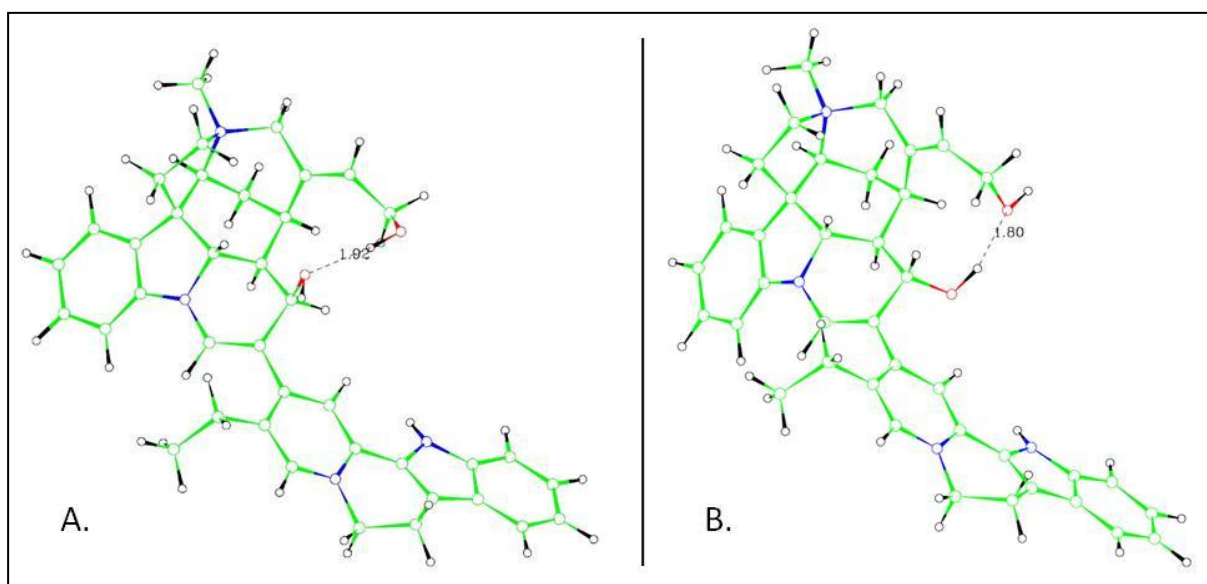


Figure IV.32 : Structures tridimensionnelles de la strychnochrysine Nb-méthylée variant au niveau de la configuration du C-17. **A.** configuration S (1,92 Å) ; **B.** configuration R (1,80 Å). Distance du lien hydrogène indiqué en pointillés.

A l'inverse, dans la structure comprenant le cycle G fermé (fig. IV.33), la différence énergétique atteint 9,135 kcal en faveur de la configuration S.

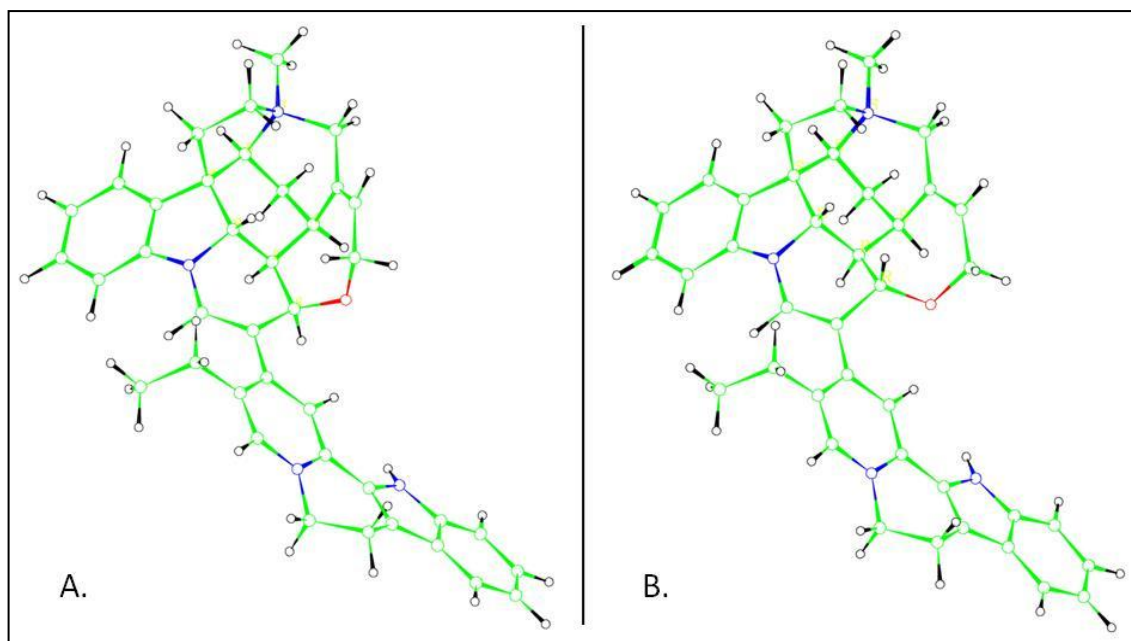


Figure IV.33 : Structures tridimensionnelles de la déméthoxyguiaflavine variant au niveau de la configuration du C-17. **A.** configuration S ; **B.** configuration R.

Ainsi, il y a inversion de configuration lorsque l'hétérocycle se forme (H-17 $\alpha$ ). Les valeurs angulaires du modèle confirment également cette stéréochimie : l'angle dièdre ( $\Phi$ ) formé entre H-16 et H-17 vaut cette fois 33,2° ( $\Phi$  H-2 et H-16 = 167,2°). Les angles  $\Phi$  mesurés dans le modèle et ceux déduits par la valeur de la constante de couplage coïncident à chaque fois.



Massiot *et al.* [131] avaient réalisé un tableau comparatif des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  pour classer les alcaloïdes selon la configuration de H-16 et du cycle pipéridinique suivant la série rétuline (16  $\beta$ , bateau) et la série isorétuline (16  $\alpha$ , chaise). Nous pouvons faire de même avec les alcaloïdes indoliques variant dans la configuration du H-17 (tableau IV.8). Le C-14 étant fortement influencé par l'ammonium quaternaire quand il est présent, n'a pas été inclus dans le tableau.

C	Strychnine (17 $\alpha$ ) [143]	Longi-caudatine (17 $\alpha$ ) [132]	Guiaflavine (17 $\alpha$ ) [154]	Proto-strychnine (17 $\beta$ ) [159]	TDL Y (17 $\beta$ ) [65]	Strychno-chrysinine (17 $\beta$ )	Guianensine (17 $\beta$ ) [170]	Guia-chrysinine (17 $\beta$ ) [155]
2	61	60,5	60,5	67,1	71,6	71,2	66,5	70,1
3	61	59,9	76,1	61,6	62,9	62,2	58,1	73,2
15	33	32,2	31,1	27,9	27,5	27,1	22,7	27,4
16	45	42,7	43,9	53,5	48,9	49,8	49,4	50,0
17	79	82,6	79,3	68,0	69,2	68,0	69,5	70,1
18	65	64,9	65,3	56,9	13,5	56,5	167,5	58,0
19	128	126,2	137,2	127,4	126,6	128,5	132,5	136,1

Tableau IV.8 : Tableau comparatif des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  (ppm) des carbones autour de C-17 de divers alcaloïdes indoliques variant selon la configuration H-17. TDL Y = *Tétradéhydrologicaudatine Y*.

Un regroupement se dessine surtout au niveau des C-2, C-16, C-17 et C-18 (quand il est substitué par un groupement alcool). La configuration du H-17 influence donc les déplacements chimiques de ces carbones. Ainsi quand H-17 est en  $\alpha$ , C-2 a des valeurs autour des 60 ppm, C-16 entre 42 et 45 ppm, C-17 vers 80 ppm et C-18 autour de 65 ppm. Par contre lorsque H-17 est en  $\beta$ , C-2 a des valeurs autour des 70 ppm, C-16 entre 48 et 53 ppm, C-17 vers 70 ppm et C-18 autour de 57 ppm. Cette classification est applicable aux nouveaux alcaloïdes isolés (cf. tableau IV.8).

De plus, en analysant les spectres DC, et comme l'indique aussi le Dr. Penelle dans sa thèse [153], on note chez les alcaloïdes ayant un squelette extrêmement conjugué (absorbant au-delà des 400 nm), un rapport entre la configuration du H-17 et un effet Cotton. Lorsque H-17 est en  $\alpha$ , l'effet Cotton est positif entre 350 et 400 nm et négatif entre 450 et 500 nm. A l'inverse, quand H-17 est en  $\beta$ , l'effet Cotton est négatif entre 350 et 400 nm et positif entre 450 et 500 nm. Cette configuration influence également la fluorescence perçue à 366 nm : elle est orange lorsque l'alcaloïde est dépourvu du cycle G (H-17  $\beta$ ) et jaune lorsque le cycle G est présent (H-17  $\alpha$ ).

En ce qui concerne la stéréochimie de la partie « sud » de BL1, deux centres stéréogéniques existent en C-3' et en C-15'. Selon l'hypothèse biogénétique, H-15' se situe en position  $\alpha$ . Le couplage H-3'/H-15' observé en NOESY (cf. Annexe III) indique que ces protons sont dans un même plan. De ce fait, H-3' est également en position  $\alpha$ . D'autres couplages NOESY confortent la position  $\alpha$  de ces deux protons : H-3'/H-14' $\alpha$  et H-15'/H-14' $\alpha$  puis le couplage H-15'/H-17 qui confirme la position  $\alpha$  du H-15' puisque H-17 est en  $\alpha$ . Une dernière confirmation de cette stéréochimie peut être notée en la comparant à la stéréochimie de l'usambarensine élucidée par rayons-X [46].

L'usambarensine possède une partie geissoschizine identique à cette partie « sud » de BL1 et où H-15' et H-3' sont en position  $\alpha$ . De plus, elle présente une conformation H-3' $\alpha$  cis (Z) montrant le cycle D' de la quinolizidine en conformation bateau légèrement déformé. Cette déformation est due à la présence du substituant encombrant (la partie strychnane) en position équatoriale ( $\beta$ ) sur le C-15'. La position H-3' cis est confirmée chez BL1 par le déplacement chimique du H-3' ( $\delta = 4,06$  ppm) déblindé par la présence de la paire d'électrons libre de N en  $\alpha$ . La position de la chaîne éthylidène en trans (E) est également équivalente à celle de l'usambarensine puisque des couplages NOESY entre H-19'/H-21' et H-15'/H-18' sont observés et aucun couplage H-18'/H-21' n'est détecté.

### IV.3.C. Activités biologiques

#### IV.3.C.1. Tests antiplasmodiaux *in vitro*

Le deuxième objectif du travail concernant *Strychnos nux-vomica* est de détecter une éventuelle activité antiplasmodiale susceptible d'expliquer l'utilisation en médecine traditionnelle. Les extraits de départ ont par conséquent été évalués sur la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum* (tableau IV.9)

Extraits	EtOAc	MeOH ac	Hex	E8	P2	E12	P3	$\phi$ Aq
Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	12,6	7,3	15,4	6,6	7,7	<b>1,9</b>	14,3	> 100

Tableau IV.9 : Activité antiplasmodiale (Cl<sub>50</sub> en  $\mu$ g/ml) des extraits du suber de l'écorce de tronc de *S. nux-vomica* vis-à-vis de la souche 3D7 de *P. falciparum*.

Selon les critères d'activité exposés dans le chapitre VI (cf. § VI.2.A.4), tous les extraits sont considérés comme prometteurs sauf l'extrait aqueux. Ceci est facilement explicable par le fait que cet extrait contenant une quantité majoritaire de sels, le poids et donc la concentration des alcaloïdes présents sont sous-évalués lors du test. Pour cette même raison, les fractions des extraits P2 et E8 obtenues par CLHP préparative n'ont pas été évaluées. Seuls les alcaloïdes isolés de ces extraits ont pu être testés contre le Plasmodium.

Parmi tous les extraits testés, l'extrait E12 possède une activité qui pourrait même être qualifiée de puissante, ce qui est intéressant pour un bioguidage. Certaines fractions obtenues par CPC ont donc été évaluées quand la quantité le permettait. Pour ne pas épuiser toutes les fractions, celles ayant des similarités de composition n'ont pas été testées. Au vu des résultats (tableau IV.10), les fractions plus polaires (25 et 26) n'ont pas d'activité prometteuse. Une seule fraction montre une activité puissante identique à l'extrait de départ : la fraction 12.

Fractions	2	3	4	6	7	10	<b>12</b>	14	17	21	23	25	26
Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)	6,1	6,8	48,5	11,2	22,3	8,2	<b>1,8</b>	6,2	6,0	7,0	4,0	39,3	21,9

Tableau IV.10 : Cl<sub>50</sub> de quelques fractions de l'extrait dichlorométhane pH12 (E12) vis-à-vis de la souche 3D7 de *Plasmodium falciparum*.

Sa composition présentée sur la plaque CCM (fig. IV.18) semble complexe et son poids (1,6 mg) ne permet aucun isolement. La particularité de l'extrait E12 est qu'il contient des composés bleus à 254 et 366 nm faisant penser à des bases anhydronium. La caractéristique des bases anhydronium réside dans leur structure qui oscille entre un cycle à 6 pièces non aromatique et l'existence d'un dipôle, dans une solution à pH alcalin. En effet, la structure instable subit des réarrangements des doubles liaisons menant à la formation d'un sextet aromatique, d'une part, et à une neutralisation des charges du dipôle, d'autre part (fig. IV.34). Les bases anhydronium sont des bases fortes caractérisables par un déplacement bathochrome sur le spectre UV-vis quand elles sont placées dans un milieu alcalin [149].

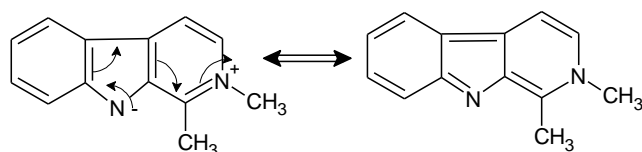


Figure IV.34 : Forme aromatique dipolaire (à gauche) et forme neutre (à droite) des bases anhydronium (application à la mélinonine F)

Les bases anhydronium issues du genre *Strychnos* sont toutes dérivées de la  $\beta$ -carboline. Il existe des monomères : la serpentine et son isomère l'alstonine, les mélinonines E, F et G, la dihydroflavopereirine, la matadine, reportant une fluorescence bleue à 254 nm et 366 nm. Il existe également des dimères mais ils sont plutôt orange ou jaune fluorescents aux hautes longueurs d'onde : la guianensine, la 3',4',5',6'-tetradéhydrolongicaudatine Y, la 5',6-déhydroguiachrysine et la 5',6-déhydroguiaflavine.

Plusieurs bases anhydronium sont pourvues d'activité antiplasmodiale (tableau IV.11) ; il est dès lors probable que l'activité de la fraction 12 soit due à la présence de bases anhydronium.

Alcaloïdes bases anhydronium	CI <sub>50</sub> en $\mu$ M (souche testée)
Alstonine sulphate (monomère)	35,00 (K1)
Melinonine F chloride (monomère)	5,13 (K1)
Serpentine hydrogenotartrate (monomère)	5,74 (K1)
Cryptolepine hydrochloride (monomère)	0,11 (K1)
Tetradéhydrolongicaudatine Y (dimère)	1,24 (FCA20) et 0,96 (W2)
Guianensine (dimère)	5,92 (FCA20) et 7,31 (W2)

Tableau IV.11 : Principales bases anhydronium pourvues d'activité antiplasmodiale *in vitro* vis-à-vis de souches chloroquino-résistantes (K1 et W2) et chloroquino-sensibles (FCA20). Source : Wright *et al.* [204], Frédéric *et al.* [69].

En ce qui concerne les alcaloïdes bisindoliques isolés, si on se réfère au classement réalisé par Frédéric (cf. § IV.1.F., tableau IV.3), ils font partie des alcaloïdes de type longicaudatine possédant un noyau strychnane et un noyau corynanthéane. D'après les observations antérieures, pour détenir une activité antiplasmodiale importante, la partie strychnane devrait posséder sur le C-18 soit un groupement hydroxyle soit un lien éther

avec le C-17. Comme OR1, OR2, OR3 et BL1 possèdent tous cette caractéristique, ils ont été testés vis-à-vis des deux souches de *Plasmodium falciparum* disponibles actuellement au laboratoire (ULg), 3D7 et W2 (tableau IV.12).

	3D7	W2
Strychnochryrine (OR1)	4,94 ± 1,06 µg/ml (8,5 ± 1,8 µM)	6,00 ± 2,37 µg/ml (10,3 ± 4,1 µM)
Déméthoxyguiaflavine (OR2)	7,89 ± 5,05 µg/ml (13,6 ± 8,7 µM)	7,33 ± 0,78 µg/ml (12,7 ± 1,3 µM)
Dérivé chloré d'OR2 (OR3)	13,72 ± 2,79 µg/ml (22,4 ± 4,5 µM)	7,13 ± 4,73 µg/ml (11,6 ± 7,7 µM)
Méthyl-longicaudatine (BL1)	> 50 µg/ml	> 30 µg/ml
Artémisinine	6 ± 2 ng/ml (0,022 ± 0,007 µM)	3 ± 0,5 ng/ml (0,011 ± 0,002 µM)

Tableau IV.12 :  $CI_{50}$  sur *Plasmodium falciparum* des alcaloïdes bisindoliques isolés du suber de tronc de *Strychnos nux-vomica*.

En suivant le classement des activités, il apparaît que BL1 est dépourvu d'activité antiplasmodiale, OR2 et OR3 possèdent une faible activité tandis qu'OR1 a une activité modérée. Il a déjà été mentionné que les ammoniums quaternaires diminuaient l'activité, ce qui explique les résultats d'OR2, OR3 et BL1 possédant deux ammoniums quaternaires. En effet, le passage à travers les membranes plasmiques est plus difficile pour des substances chargées. OR1, possédant un seul ammonium quaternaire et un groupement hydroxyle sur le C-18, a une activité comparable à la longicaudatine F ( $CI_{50}$  entre 7,7 et 9,6 µM selon la souche [71]). Dès lors, il pourrait participer à l'activité modérée des extraits. Il est à noter que parmi les quatre composés, OR1 est le seul restant stable dans du DMSO à -20°C pendant au moins 10 jours. Les autres, ayant en commun le cycle G fermé, voient leur activité diminuée au fil des jours. Il semble donc que la forme non-cyclisée permette une meilleure stabilité de structure.

### IV.3.C.2. Tests cytotoxiques *in vitro*

La spécificité d'action antiplasmodiale a été évaluée pour les produits isolés. L'activité des alcaloïdes sur la lignée de fibroblastes (WI-38) permet de calculer un index de sélectivité (IS). L'index a été calculé en divisant la valeur de  $CI_{50}$  de la lignée humaine avec la valeur de  $CI_{50}$  la plus élevée des souches parasitaires.

L'observation des cellules au microscope, juste avant la réaction colorimétrique, permet d'avoir une idée sur l'effet cytotatique ou cytotoxique du produit testé. Ainsi, les cellules en contact avec une concentration de 200 µg/ml de strychnochryrine (OR1) semblaient mortes (aspect rond et plus petit que les cellules témoins) ; cela correspond à un effet cytotoxique. Par contre, les autres alcaloïdes à la même concentration ont plutôt un effet cytotatique puisque les cellules avaient la même forme que le groupe témoin positif mais en plus petit nombre. A nouveau, OR1, présentant une légère toxicité, est le seul alcaloïde possédant le cycle G du noyau strychnane ouvert et  $N_b$  non quaternarisé.

	WI-38 ( $\mu\text{g/ml}$ )	IS
OR1	75,82 $\pm$ 2,08	12,64
OR2	> 200	> 25
OR3	> 250	>18
BL1	> 250	> 4
Camptothécine	0,038 $\pm$ 0,009	

Tableau IV.13 : Activité antiproliférative ( $CI_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ ) des alcaloïdes bisindoliques isolés vis-à-vis de fibroblastes humains (WI-38).

L'activité antiproliférative a été quantifiée par la méthode spectrophotométrique utilisant le WST-1 ; les résultats sont exposés dans le tableau IV.13. L'effet cytotoxique observé au microscope est confirmé par la valeur de la  $CI_{50}$  calculée (76  $\mu\text{g/ml}$ ), mais, vu son index de sélectivité élevé (> 10), l'action de la strychnochrysin sur le plasmodium est bien spécifique.

### IV.3.C.3. Activité convulsivante ou curarisante.

Aucune étude de toxicité aiguë n'a été menée sur les extraits ou les produits obtenus à partir du suber de tronc du *Strychnos nux-vomica*. Toutefois, suite aux relations structure/activité décrites dans la littérature (cf. § IV.1.F.), plusieurs hypothèses peuvent être tirées. La première concerne l'activité strychnine-like de type convulsivante : les alcaloïdes isolés étant tous des dimères, il semblerait difficile, à cause de l'encombrement stérique engendré, qu'ils se lient aux récepteurs à la glycine [163]. Il est donc peu probable que des convulsions surviennent par injection de ces alcaloïdes.

Cependant, ces alcaloïdes étant tous quaternaires et bisindoliques et pourvus d'un noyau strychnane, il se pourrait qu'ils aient une certaine activité curarisante. En plus, la distance mesurée sur le modèle moléculaire indique que les  $N_b^+$  sont éloignés de 9,92 Å. Cette valeur est proche de la valeur rapportant une activité myorelaxante maximale (8,5 à 9,0 Å).

En ce qui concerne les extraits obtenus, à part l'extrait aqueux final qui contient presque uniquement des alcaloïdes quaternaires, ils contiennent en majorité les bases mono-indoliques. Selon Baser, la toxicité de ces extraits serait plutôt convulsivante au vu de la faible proportion des alcaloïdes bisindoliques. Ainsi, l'utilisation des extraits ou des produits purs devrait être extrêmement bien contrôlée et limitée en thérapeutique.

### IV.3.D. Conclusion

L'étude phytochimique a montré qu'outre la présence majoritaire d'alcaloïdes mono-indoliques tels que brucine et strychnine, le suber de tronc de *Strychnos nux-vomica* contient également de nombreux alcaloïdes bisindoliques. Ces alcaloïdes sont facilement repérables sur plaque CCM à l'aide du réactif au chlorure ferrique pulvérisé par lequel ils prennent une couleur bleutée. En plus de la strychnochrysin (déjà isolée à partir des racines), deux nouveaux alcaloïdes biquaternaires et un artéfact ont été isolés à partir du suber du tronc. Ces alcaloïdes, encore jamais décrits, ont été nommés  $N_b$ -

méthylongicaudatine et déméthoxyguiaflavine. Les quatre alcaloïdes isolés sont tous de type longicaudatine comprenant un noyau strychnane et un noyau corynanthéane. Leur stéréochimie a été étudiée et l'attribution de la configuration  $\alpha$  ou  $\beta$  du proton H-17 de la partie strychnane a été déterminée par plusieurs techniques. Un rapport entre cette configuration et la présence du cycle G avait déjà été pressentie auparavant par Penelle (guiachryrine/guiaflavine). Notre étude permet de décrire une règle observée pour la configuration du H-17. Lorsque le cycle G est formé dans la partie strychnane, le proton 17 est en position  $\alpha$ , la configuration s'inverse dans le cas du noyau strychnane dit « ouvert » (cas de la strychnochryrine). Cette configuration a été déterminée par l'analyse du spectre RMN proton en mesurant les constantes de couplage entre H-17/H-16 et H-16/H-2. L'information peut être aussi déduite selon les valeurs des déplacements chimiques obtenus des carbones C-2, C-16, C-17, C-18 (supportant un groupement hydroxyle ou inclus dans un lien éther) :

Position	C-2	C-16	C-17	C-18
H-17 en $\alpha$	~ 60 ppm	42-45 ppm	~ 80 ppm	~ 65 ppm
H-17 en $\beta$	~ 70 ppm	48-53 ppm	~ 70 ppm	~ 57 ppm

Pour les alcaloïdes comportant un squelette hautement conjugué (la partie strychnane conjuguée avec la quinolizidine et l'indole du noyau corynanthéane), une différence de la configuration H-17 est observable sur plaque CCM sous UV longs où la forme cyclisée est fluorescente en jaune tandis que la forme « ouverte » est fluorescente en orange. Cette différence est également observable dans le spectre DC où un effet Cotton positif se note entre 350 et 400 nm et devient négatif entre 450 et 500 nm lorsque H-17 est en  $\alpha$ . A l'inverse, quand H-17 est en  $\beta$ , l'effet Cotton est négatif entre 350 et 400 nm et positif entre 450 et 500 nm.

En ce qui concerne l'activité antiplasmodiale, l'alcaloïde le plus actif des quatre est la strychnochryrine possédant une  $CI_{50}$  comprise entre 8,5 et 10,3  $\mu M$  selon la souche utilisée (elle semble également plus stable dans le DMSO). Vu son activité modérée, il n'est pas intéressant de poursuivre l'étude pour le développement d'un nouvel antipaludique. Cependant, les alcaloïdes bisindoliques présents peuvent participer à l'activité modérée observée dans l'extrait DCM pH 8 et dans l'extrait dénommé P2. La relation structure/activité antiplasmodiale décrite dans la littérature reste applicable aux quatre alcaloïdes bisindoliques isolés. Leur spécificité d'action antiplasmodiale par rapport à des fibroblastes humains a également été prouvée *in vitro*.

L'extrait de suber de tronc le plus actif au niveau antiplasmodial reste l'extrait DCM pH12 ( $CI_{50} = 1,8 \mu g/ml$ ). Cet extrait semble contenir en majorité des alcaloïdes bases anhydronium (différents de la serpentine, l'alstonine et la melinonine F) qui pourraient expliquer cette activité. Pour le prouver, il faudrait obtenir du matériel végétal en plus grande quantité car le faible rendement obtenu n'a pas permis de poursuivre l'isolement phytochimique.

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES**





## CHAPITRE V :

### Conclusions et perspectives générales

---

Le paludisme est une maladie qui continue à sévir dans les régions les plus pauvres du monde. Cette maladie a pu être éradiquée dans l'hémisphère nord de la planète grâce à l'utilisation massive et contrôlée d'insecticides, par l'assèchement de certains gîtes larvaires et par une meilleure observance des traitements utilisés à l'époque par les patients. La réussite de la manœuvre a également été facilitée par la rudesse du climat tempéré qui n'est pas favorable au développement continu du parasite ou du vecteur, ni à sa réintroduction.

Les régions tropicales et subtropicales du globe, par contre, sont des sites privilégiés au développement de la maladie. De plus, la population y habitant n'a pas toujours l'accès immédiat aux antipaludéens développés par les industriels du nord ; leur coût reste encore élevé et l'utilisation de médicaments contrefaits ou sous-dosés est monnaie courante. La problématique du diagnostic de la maladie (trop lent ou mauvais) est également fréquente et le suivi des patients reste difficile par manque d'infrastructures médicales dans les villages. Tous ces facteurs permettent la sélection involontaire de parasites résistants aux antimalariques actuels.

Ainsi, pour diminuer l'impact du paludisme, de nouveaux médicaments facilement accessibles à la population tropicale et subtropicale doivent impérativement être développés. Les populations du sud savent profiter de la richesse de la nature qui les entoure. Bien souvent, les ruraux font appel aux tradipraticiens pour se soigner. Ces derniers ont un savoir phytothérapeutique acquis depuis des générations. Dans ce contexte, il nous semble plus judicieux de valider scientifiquement l'usage de plantes que de chercher à isoler de nouveaux principes actifs. Plusieurs études scientifiques ont d'ailleurs montré l'intérêt des extraits de plantes par rapport aux substances pures dans le cas de maladies touchant les pays du sud.

L'approche la plus opportune pour atteindre cet objectif est l'ethnopharmacologie qui fait intervenir les membres des sociétés du nord et du sud et qui encourage des collaborations avantageuses pour tous. Les sociétés du sud pourront produire leurs propres MTA qui remplaceront les médicaments importés. Et, celles du nord, auront l'occasion d'étudier les plantes sur le plan phytochimique et peut-être de découvrir de nouveaux composés qui pourraient être utilisés dans diverses maladies ou comme outils pharmacologiques.

Cette thèse a été menée dans l'optique de participer à la recherche de nouveaux antipaludiques provenant de plantes et d'explorer phytochimiquement et pharmacologiquement les extraits utilisés en médecine traditionnelle dans l'archipel des Mascareignes et au Cambodge. La méthodologie employée consiste en : (I) la sélection de plantes via des enquêtes ethnopharmacologiques, (II) un criblage antiplasmodial et cytotoxique des extraits de plantes, (III) des études pharmacologiques préliminaires sur souris, (IV) des études phytochimiques (fractionnement bioguidé, isolement et

élucidation structurale de composés purs), et (V) des tests pharmacologiques des composés purs.

La première partie du travail présente les premières étapes de la démarche ethnopharmacologique classique. Vingt espèces végétales ont été sélectionnées et trente-trois échantillons ont été récoltés dans l'archipel des Mascareignes. Le criblage antiplasmodial, effectué *in vitro* sur les extraits au méthanol et au dichlorométhane, a mis en évidence neuf extraits prometteurs issus de six espèces différentes : *Aphloia theiformis* (Vahl) Benn (Aphloiaceae), *Lantana camara* L. (Verbenaceae), *Nuxia verticillata* Lam. (Loganiaceae), *Psiadia arguta* Voigt (Asteraceae), *Psiadia dentata* D.C., *Terminalia bentzoe* L. (Combretaceae). A part *Lantana camara* qui a une distribution cosmopolite et *Aphloia theiformis* qui se trouve également en Afrique de l'Est, les quatre autres espèces sont endémiques de l'archipel des Mascareignes. Une étude bibliographique a montré que ces espèces sont d'ailleurs peu étudiées sur le plan phytochimique et pharmacologique.

Des tests *in vivo* ont confirmé l'intérêt de deux plantes : *Psiadia dentata* et *Terminalia bentzoe*. La littérature nous informe que *P. dentata* contiendrait des saponosides, des flavonoïdes et des tanins galliques dans les feuilles et *T. bentzoe* renfermerait des terpènes, des saponines et des flavonoïdes dans l'écorce. Ces composés sont susceptibles de posséder une activité antipaludique. Par ailleurs, les revues reprenant les extraits ou les composés de plantes ayant une activité antiplasmodiale prometteuse ( $CI_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$  ou  $< 11 \mu\text{M}$ ) montrent que les flavonoïdes et les terpènes sont des classes phytochimiques intéressantes ; de plus, la famille des Combretaceae mais surtout celle des Asteraceae sont déjà à l'origine de composés antiplasmodiaux prometteurs. Ces deux plantes sont donc de bons candidats pour des études phytochimique et pharmacologique approfondies pouvant peut-être aboutir dans quelques années à des études cliniques.

La deuxième partie du travail présente des études phytochimiques approfondies d'espèces végétales du Cambodge. La première, *Fagraea fragrans* Roxb. est un arbre retenu lors d'un criblage antiplasmodial antérieur ; les extraits au dichlorométhane des feuilles et de l'écorce de tronc possédaient une activité prometteuse. Bien que cette espèce soit fort répandue dans le Sud-Est asiatique, elle est très peu connue sur le plan scientifique. Seuls deux phytostérols communs (stigmastérol et  $\beta$ -sitostérol) et un artéfact d'isolement, la gentianine, ont été décrits au niveau phytochimique. En ce qui concerne les études pharmacologiques, une seule étude a démontré que la gentianine, provenant certainement d'une transformation du gentiopicroside, est inactive vis-à-vis de *Plasmodium berghei* (*in vivo*) et d'*Entamoeba invadens* (*in vitro*).

Notre contribution à l'étude de cette espèce a mené à l'enrichissement des connaissances phytochimiques de *Fagraea fragrans*. Elle a permis d'isoler les composés majoritaires des extraits méthanoliques des feuilles et de l'écorce de tronc. Il s'agit de séco-iridoïdes communs chez les Gentianaceae : le gentiopicroside et le swéroside qui sont majoritairement présents dans l'écorce de tronc, et la swertiamarine qui est surtout présente dans les feuilles. Ces trois séco-iridoïdes ne possèdent pas d'activité antiplasmodiale prometteuse *in vitro* ( $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ ) et leurs produits de transformation, la gentianine et, son dimère, l'oliveramine, non plus. Toutefois, il semblerait que d'autres composés minoritaires présents dans l'extrait polaire pourraient se transformer en

produits détenant une activité antiplasmodiale. Ces produits ne seraient pas de simples génines lysées de leur sucre mais des composés réagissant avec l'ammoniaque.

Ce travail a également contribué à l'isolement à partir de l'écorce de tronc d'un nouveau composé monoterpénique qui possède un squelette inusuel. Il a été nommé fagraldéhyde (fig. III.17) par la présence peu commune d'une fonction aldéhydique dans la classe des iridoïdes. Une hypothèse biosynthétique a, d'ailleurs, été postulée : contrairement aux séco-iridoïdes classiques, le clivage oxydatif du cyclopentane au niveau des C-7 et C-8 s'effectuerait avant la formation de l'acide loganique. Du point de vue pharmacologique, le fagraldéhyde ne possède pas une activité antiplasmodiale sélective. Cependant, les extraits apolaires de l'écorce et des feuilles renfermeraient des di- et tri-terpènes et des composés labiles qui pourraient être responsables de l'activité antiplasmodiale perçue dans les extraits. De plus, la perte d'activité lors du fractionnement présagerait l'existence de composés minoritaires agissant en synergie.

En somme, cette plante ne semble pas renfermer de composés antiplasmodiaux stables et facilement identifiables. Le test sur souris effectué avec la décoction d'écorce montre un effet antimalarique limité. La présence des séco-iridoïdes (surtout la swertiamarine) et l'activité anti-inflammatoire perçue *in vitro* dans certaines fractions apolaires pourraient expliquer l'utilisation traditionnelle de *Fagraea fragrans* contre les fièvres (la swertiamarine a montré une activité analgésique).

Au final, si cet arbre devait être exploité, ce serait sous forme d'extrait standardisé (dans lequel les séco-iridoïdes isolés pourraient être utiles pour le contrôle de qualité). Bien qu'il ne semble pas agir directement sur la forme sanguine du plasmodium, il pourrait contribuer à soulager d'autres symptômes ressentis lors d'un accès palustre (fièvre, douleur, inflammation) et peut-être limiter le développement des accès pernicieux de malaria, ou agir à un autre stade du développement du parasite.

La deuxième plante du Cambodge étudiée est le *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae). Le genre *Strychnos* est étudié dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg depuis les années 50. Plusieurs alcaloïdes bisindoliques ont démontré posséder une puissante activité antimalarique ( $CI_{50} < 1 \mu M$ ). *S. nux-vomica* a beaucoup été étudié auparavant et de nombreux alcaloïdes mono-indoliques ont déjà été décrits et étudiés sur le plan pharmacologique, le plus connu étant la strychnine provoquant des convulsions. Cependant, seuls deux alcaloïdes bisindoliques ont jusqu'à présent été décrits dans le *Strychnos nux-vomica* dû à leur présence minoritaire par rapport aux mono-indoliques : la longicaudatine, possédant une bonne activité antiplasmodiale, et la strychnochrysine.

Notre contribution à l'étude de l'écorce de tronc de *Strychnos nux-vomica* a permis d'isoler trois nouveaux alcaloïdes bisindoliques et de réisoler la strychnochrysine. La technique utilisée pour ce faire a été la chromatographie de partage centrifuge qui a l'avantage de ne pas retenir de composés sur la phase stationnaire puisque celle-ci est liquide et elle permet d'utiliser une grande échelle de pH (acide et fortement basique).

L'étude structurale des nouveaux composés (fig. IV.24, IV.27 et IV.30) a montré qu'ils sont tous formés d'un noyau strychnane et d'un noyau corynanthéane. L'étude de la stéréochimie a révélé une particularité du noyau strychnane : quand le cycle G est formé, l'hydrogène H-17 (17 R) est en position  $\beta$  tandis que lorsque le C-17 n'est pas inclus

dans un cycle, la configuration est inversée. Cette tendance est confirmée en analysant d'autres alcaloïdes possédant un noyau strychnane. Nous pouvons dès lors établir une règle générale pour la configuration du H-17 dans le noyau strychnane qui peut être déduite par différentes méthodes : (I) les valeurs de certaines constantes de couplages sur le spectre de RMN du proton ; (II) les déplacements chimiques de certains carbones sur le spectre RMN ; (III) pour les alcaloïdes bisindoliques comportant un squelette hautement conjugué, une inversion de signal entre 350-400 nm et 450-500 nm est perçue dans le spectre de DC selon la configuration ; (IV) une fluorescence différente des alcaloïdes sous lampe UV à 366 nm.

En ce qui concerne les tests pharmacologiques, il apparaît que, parmi les quatre alcaloïdes isolés (strychnochrysin, N<sub>b</sub>-méthyl-longicaudatine, déméthoxyguiaflavine et dérivé chloré de la déméthoxyguiaflavine), la N<sub>b</sub>-méthyl-longicaudatine est dépourvue d'effet antiplasmodial (CI<sub>50</sub> > 50 µM), tandis que la déméthoxyguiaflavine et son dérivé possèdent une activité antiplasmodiale faible (CI<sub>50</sub> entre 11 et 23 µM) ; par contre, la strychnochrysin est pourvue d'une activité antiplasmodiale modérée (CI<sub>50</sub> < 11 µM). Cette dernière est la seule structure possédant une fonction alcool en C-18. Nous confirmons donc la relation de structure-activité établie par nos prédécesseurs. La cytotoxicité a également été évaluée et confirme la sélectivité d'action des alcaloïdes isolés. Cependant, leur activité antiplasmodiale n'est pas suffisante pour être considérés comme des prototypes de nouveaux antipaludiques, particulièrement si on les compare à d'autres alcaloïdes bisindoliques préalablement étudiés dans le laboratoire.

Toutefois, l'écorce de tronc de *S. nux-vomica* regorge encore de nombreux alcaloïdes et notamment des bases anhydronium qui seraient responsables de l'excellente activité antiplasmodiale observée dans l'extrait les renfermant (CI<sub>50</sub> = 1,8 µg/ml). Il serait dès lors intéressant de les isoler en partant d'une quantité importante de poudre (au moins 1kg).

En suivant la méthodologie classique (sélection d'extraits par criblage *in vitro* puis fractionnement bioguidé, étude pharmacologique et toxicologique, préparation de formes galéniques appropriées et finalement essais cliniques), il faut de nombreuses années de recherche et d'abondantes collaborations entre laboratoires pour la sélection d'une plante aboutissant au développement d'un MTA (phytomédicament) ou à l'isolement de principes actifs.

Une nouvelle tendance est récemment apparue pour développer des phytomédicaments standardisés ; certains l'appellent la « pharmacologie inverse » [200]. Elle permet un gain de temps et d'argent dans le développement de thérapie antimalarique. Sa méthodologie fait toujours appel à une équipe ethnopharmacologique pluridisciplinaire mais les étapes sont agencées autrement par rapport à la méthodologie classique : des études cliniques sont réalisées dès la première étape de la recherche et l'isolement de composés est, quant à lui, réalisé en dernier lieu. Ces études cliniques peuvent être conduites à moindre coût [80] et sont éthiquement correctes si elles suivent les recommandations exactes du praticien.

Toutes ces observations mettent en évidence l'intérêt de l'ethnopharmacologie dans la recherche de nouveaux antipaludéens d'origine naturelle. Cela étant, la réussite de l'opération dépend de la qualité des collaborations concrètes et variées puisque le

travail est pluridisciplinaire. Au niveau régional, les politiques devraient faciliter la création de pharmacopées nationales (ou internationales) et encourager la production locale de phytomédicaments. La population locale aurait ainsi le sentiment de participer activement à la lutte de la malaria et de la pauvreté. Les laboratoires scientifiques du Nord comme du Sud, exerçant chacun leur spécialité, devraient s'unir pour que l'efficacité et la sécurité soient testées par des experts. Ceci permettrait la validation rapide et complète des phytomédicaments comme traitements alternatifs à la malaria.



# **MATERIELS ET METHODES**





# CHAPITRE VI :

## Matériels et méthodes

---

### VI.1.PHYTOCHIMIE

#### VI.1.A. Matériel végétal, extraction et criblage phytochimique

##### VI.1.A.1. Identification, récolte et séchage

###### Plantes des Mascareignes

Un tableau exposé dans la section II.2.A. et incluant la date, le lieu de collecte et le mode de séchage résume les diverses récoltes effectuées par le Dr. Hippolyte Kodja et le Dr Michel Frédérick. Grâce au Dr Joyce Govinden-Soulange de l'Université de Maurice, six espèces ont été collectées sur l'île Maurice en compagnie de Mr Kersley Pynee et identifiées par Dr. Claudia Baidier, responsable de l'Herbier de Maurice au MSIRI (Mauritius Sugar Industry Research Institute).

Quatorze espèces ont été récoltées sur l'île de la Réunion en compagnie de Mr Jacques Fournel et identifiées par le Pr. Dominique Strasberg et le Dr. Laurence Humeau, biologistes de l'Université de la Réunion. Des échantillons d'herbier ont été déposés dans l'Herbarium de l'Université de la Réunion à Saint-Denis. Le séchage du matériel est réalisé sur place, soit à température ambiante à l'abri de la lumière, soit directement cryogénisé dans de l'azote liquide.

###### Plantes du Cambodge

*Fagraea fragrans* Roxb. a été récolté deux fois dans la province de Koh Kong sur le même individu et séché au Cambodge à température ambiante à l'abri de la lumière. La plante a été identifiée par Dr Sovanoly Hul, botaniste du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) et un échantillon d'herbier a été déposé au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de la Méditerranée sous le numéro FFKK05. Les feuilles et l'écorce de bois ont été broyées dans ce laboratoire.

*Strychnos nux vomica* L. a également été récolté deux fois mais dans des régions différentes. La première récolte a été réalisée en juillet 2007 sur un individu âgé dans la province de Kompong Speu par le Dr. Sok-Siya Bun accompagnée du Pr. Sun Kaing CHENG, botaniste qui a identifié l'espèce. La deuxième récolte a été réalisée en octobre 2007 par le Dr. Sothavireak BORY accompagné du Pr. Sun Kaing CHENG dans la province de Takéo. Des planches d'herbier ont été déposées au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de la Méditerranée sous les numéros SNVET.CaKS.07et SNVET.CaTa.07. L'individu de la deuxième récolte était également âgé puisqu'il mesurait plus d'une dizaine de mètres et le diamètre du tronc était de 1 à 1,5 m. Il poussait dans un environnement de type rizière avec peu d'arbres autour de lui. Les échantillons récoltés

ont été séchés au Cambodge à température ambiante à l'abri de la lumière. Le suber a été séparé manuellement de l'écorce et broyé dans le laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège.

## VI.1.A.2. Préparation des extraits

### Extraction par macération

Pour préparer les extraits qui sont criblés chimiquement ou pharmacologiquement, 2 g de poudre végétale sont extraits à trois reprises sous agitation magnétique dans 25 ml de solvant (MeOH ou DCM) à température ambiante pendant 30 minutes puis filtrés sur papier Whatman. Les filtrats sont réunis et évaporés à siccité sous pression réduite à 40 °C.

### Extraction par décoction

5 g de poudre végétale sont chauffés dans 75 ml d'eau portée à ébullition pendant 10 minutes puis filtrés à chaud sur ouate. Le filtrat est congelé puis lyophilisé.

### Extraction par lixiviation (ou percolation)

La poudre végétale est macérée durant une nuit dans une colonne de percolation avec suffisamment de solvant pour qu'elle soit imbibée. Le lixiviat (ou percolat) est récupéré goutte à goutte et du solvant neuf est ajouté afin d'épuiser la poudre. Pour réaliser des lixiviations en série, la poudre est extraite par le solvant le moins polaire puis séchée et lixiviée à nouveau avec des solvants de polarité croissante.

### Test d'extraction des alcaloïdes

Afin d'obtenir le meilleur rendement pour l'extraction des alcaloïdes de *Strychnos nuxvomica*, différents essais de solvants ont été réalisés sur 100 mg de poudre de suber :

- 1) 1,5 ml de méthanol acidifié par 1% acide acétique (Ext 1)
- 2) 1,5 ml d'EtOAc + 0,3 ml d'une solution Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH10 (Ext 2)
- 3) 1,5 ml de DCM + 0,3 ml d'une solution Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH10 (Ext 3)

Les solutions ont été vortexées pendant 15 minutes puis soniquées pendant 15 minutes et centrifugées pendant 3 minutes (13000 tours/min). Le surnageant a ensuite été évaporé et le rendement calculé : Ext 1 = 4,9 % ; Ext 2 = 0,7 % ; Ext 3 = 1,9 %.

Une CCM contrôle permet de conclure que l'extraction par EtOAc (Ext 2) entraîne les alcaloïdes monomères mais qu'aucun dimère n'est extrait par ce solvant. Pour une élimination partielle d'alcaloïdes monomères, une extraction préalable par EtOAc est donc envisagée. Le MeOH acidifié, quant à lui semble, extraire en abondance les alcaloïdes bisindoliques colorés. De plus, il permet un meilleur rendement d'extraction. Ce solvant sera donc utilisé pour la percolation (extraction des alcaloïdes).

### Extraction des alcaloïdes

Le caractère basique des alcaloïdes leur donne une solubilité différentielle selon qu'ils soient sous forme de sel ou de base. Cette caractéristique est exploitée pour l'extraction ciblée des alcaloïdes de la poudre de suber de *S. nuxvomica*. La poudre végétale (225 g) est macérée durant une nuit dans une colonne de percolation avec 300 ml d'une solution aqueuse amenée à pH 10,4 à l'aide de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, puis percolée avec 3 l d'EtOAc. Le percolat

est évaporé à siccité sous pression réduite à 40 °C, l'extrait obtenu est appelé Ext. EtOAc (2,96 g). La poudre végétale est récupérée, séchée et pesée (213 g), puis soumise à une macération dans 300 ml d'une solution méthanolique contenant 1 % d'acide acétique pendant au moins une nuit, puis lixiviée avec 3,5 l du même mélange. Le percolat est évaporé à siccité sous pression réduite à 40 °C.

L'extrait obtenu, appelé Ext MeOH (25,66 g), est redissous dans une solution d'acide acétique 1 % pour être extrait en ampoule à décanter par de l'hexane. Ce faisant, un précipité (Précipité 1 = 1,50 g) se forme à l'interface. La phase organique est évaporée à siccité sous pression réduite à 40 °C et l'extrait obtenu est appelé Ext. Hex (0,40 g). La phase aqueuse est récupérée pour être alcalinisée par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jusqu'à pH 8, puis extraite par du DCM. Ce faisant, un précipité (Précipité 2 = 3,56 g) se forme à l'interface. La phase organique est évaporée à siccité sous pression réduite à 40 °C et l'extrait obtenu est appelé Ext DCM pH8 (E8 = 8,50 g). La phase aqueuse est à nouveau récupérée pour être alcalinisée à pH 12 à l'aide d'une solution de NaOH 1M, puis extraite par du DCM (ext DCM pH12). Ce faisant, un nouveau précipité (Précipité 3) se forme à l'interface. La phase organique est évaporée à siccité sous pression réduite à 40 °C et l'extrait obtenu est appelé Ext DCM pH12 (E12 = 0,21 g). La phase aqueuse finale a été neutralisée (pH 7,3) par de l'acide acétique puis lyophilisée. Le schéma d'extraction est présenté dans la figure IV.9.

### VI.1.A.3. Évaporation des solvants

#### Évaporation par lyophilisation

Les solvants aqueux sont d'abord congelés à - 20 °C pendant au moins une nuit dans des plateaux de lyophilisation puis lyophilisés à l'aide d'un appareil (alpha, Chriss services) pendant 18 à 36 h.

#### Évaporation sous vide

Les solvants organiques sont évaporés sous vide avec un évaporateur rotatif à pression contrôlée (vacuum controller B-721, Rotavapor R, BÜCHI) et à température ne dépassant pas 40 °C afin d'éviter des détériorations de composés. Afin de s'assurer de l'assèchement de l'échantillon, ce dernier peut être placé dans une étuve à vide (Heraeus) pendant au moins une nuit à température ambiante.

### VI.1.A.4. Criblage phytochimique

Des tests en tube ou sur plaque CCM sont réalisés sur la poudre végétale afin de déterminer de manière préliminaire les classes phytochimiques contenues dans la plante analysée. La présence des principales classes phytochimiques est classée comme suite : + + + = présence certaine

+ = présence incertaine

- = absence

#### Flavonoïdes et acides phénols

##### Réaction de coloration

La présence de flavonoïdes est mise en évidence par la réaction de Shinoda (ou réaction dite à la cyanidine). 0,2 g de poudre de drogue sont macérés par 10 ml de MeOH sous

agitation magnétique pendant 5 minutes et filtrés. 1 ml d'HCl conc. et 0,2 g de poudre de Mg sont ajoutés au filtrat. Une coloration orange à rouge apparaît en présence de flavonoïdes dans la drogue.

### CCM

1 g de drogue pulvérisée est extrait sous agitation magnétique par 5 ml de MeOH durant 10 minutes, puis filtré. 20 µl de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM en utilisant comme témoin la rutine (5 mg/ml méthanol ; dépôt : 10 µl).

*Phase mobile* : EtOAc/ HCOOH/ CH<sub>3</sub>COOH/ H<sub>2</sub>O (100:11:11:26 V/V/V/V).

*Révélation* : pulvérisation à l'aide du réactif DPBAE/PEG (mélange (1:1) d'une solution de diphénylborate d'aminoéthanol à 10 g/l dans le méthanol et d'une solution de macrogol 400R à 50 g/l dans le méthanol) et attente de 30 minutes avant d'observer sous UV à 366 nm. La présence de flavonoïdes se marque par la présence de spots fluorescents intenses : jaune, vert, orange. Les fluorescences bleues sont souvent dues aux acides phénols ou aux dérivés coumariniques.

## **Alcaloïdes**

### Test général en milieu acide (test de Mayer)

Ce test est une réaction de précipitation fondée sur la capacité des alcaloïdes à se combiner avec des métaux et des métalloïdes tels que bismuth, mercure, tungstène.

0,3 g de poudre de drogue végétale sont macérés sous agitation pendant 30 minutes avec 3 ml d'acide chlorhydrique dilué à 5 % puis filtrés. 5 gouttes de réactif de Mayer (tétraiodomercurate de potassium) sont ensuite ajoutées à 1 ml de filtrat. La présence d'alcaloïdes se marque par l'apparition d'un précipité ou trouble blanc.

### CCM

1 g de poudre de drogue est imbibé d'environ 1 ml d'ammoniaque à 10 %. 5 ml d'acétate d'éthyle (ou méthanol pour extraire les alcaloïdes quaternaires) sont ajoutés et la solution est agitée pendant 30 minutes puis filtrée. 20 µl du filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM en utilisant comme témoin la quinine (0,5 mg/100 µl ; dépôt: 10 µl).

*Phase mobile* : CH<sub>3</sub>Cl/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 25 % (8:2:0,5).

Le chromatogramme, une fois développé et séché, est observé sous UV à 254 et 366 nm puis pulvérisé à l'aide du réactif de Dragendorff (solution diluée 1/4<sup>e</sup> dans du méthanol préparée extemporanément, à partir d'une solution stock : agiter 1,7 g de sous-nitrate de bismuth et 20 g d'acide tartrique dans 40 ml d'eau, ajouter 40 ml d'une solution à 40 % (p/v) d'iodure de potassium, mélanger 1 h puis filtrer), et observé en lumière visible. La présence d'alcaloïdes se marque par la présence de bandes allant du jaune-orangé au jaune brun.

## **Iridoïdes**

1 g de drogue pulvérisée est extrait sous agitation par 5 ml de méthanol durant 10 minutes puis filtré. 20 µl de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM en utilisant comme témoin le loganoside (0,5 mg/100 µl méthanol ; dépôt : 10 µl).

*Phase mobile* : EtOAc/MeOH/ H<sub>2</sub>O (77:15:8).

*Révélation* : Acide sulfurique à 5 % dans l'éthanol. Chauffage 10 minutes à 100 °C. Les iridoïdes vrais donnent de vives colorations. Les séco-iridoïdes se colorent en brun, noir.

## **Anthraquinones (hétérosides anthracéniques)**

### Réaction de coloration

La réaction de Bornträger est basée sur la coloration intense que fournissent les quinones lorsqu'elles sont en milieu fortement alcalin.

100 mg de drogue pulvérisée sont chauffés au bain-marie avec 50 ml d'eau et 2 ml d'HCl concentré pendant 15 min. Une fois refroidie, la solution est agitée avec 40 ml d'éther. La couche étherée est récupérée et séchée sur sulfate sodique anhydre puis évaporée à siccité. 5 ml d'ammoniaque diluée (41 g d'ammoniaque concentrée diluée à 100 ml avec de l'eau) sont ajoutés au résidu. En cas de réaction positive, il se développe une coloration jaune ou orangée due aux formes anthraquinoniques libres (génines oxydées). Si cette solution est chauffée au bain-marie pendant 2 minutes, il se développe une coloration violet-rouge.

### CCM

1 g de drogue pulvérisée est extrait sous agitation par 5 ml de méthanol durant 10 minutes puis filtré. 20 µl de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM en utilisant comme témoin le franguloside ou un autre O-hétéroside anthracénique (0,5 mg/100 µl MeOH ; dépôt : 10 µl).

*Phase mobile* : EtOAc/MeOH/ H<sub>2</sub>O (100:13,5:10).

*Révélation* : Observation sous UV à 254 et 366 nm. Pulvérisation de KOH éthanolique à 10 %. Les anthraquinones sont colorées en rouge et donnent une fluorescence rouge à 366 nm. Les anthrones donnent une couleur jaune.

## **Terpènes**

1 g de drogue pulvérisée est extrait sous agitation par 10 ml de dichlorométhane durant 15 minutes sous reflux et filtré. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est dissous dans 0,5 ml de toluène. 20 µl de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM en utilisant comme témoin le thymol (0,5 mg/100 µl MeOH ; dépôt : 10 µl).

*Phase mobile*: Tol./ EtOAc (93:7).

*Révélation*: Vanilline sulfurique. Chauffage 10 minutes à 100 °C. Les terpènes donnent diverses couleurs avec ce réactif.

## **Coumarines**

Les coumarines s'extraient de la même manière que les terpènes. 20 µl de filtrat sont utilisés pour l'analyse CCM en utilisant comme témoin la scopolétine (0,5 mg/100 µl MeOH ; dépôt : 10 µl).

*Phase mobile* : Tol./éther (1:1, saturé avec du CH<sub>3</sub>COOH 10 %). Mélanger 10 ml de toluène, 10 ml d'éther et 10 ml d'acide acétique à 10 % dans une ampoule à décanter. La phase inférieure est éliminée ; la phase supérieure est utilisée comme phase mobile.

*Révélation* : Observation sous UV à 254 et 366 nm. Pulvérisation de KOH éthanolique à 10 %. Les coumarines donnent une fluorescence bleue.

## **Saponines ou saponosides**

### Test général (Détermination de l'indice de mousse)

La mise en évidence des saponosides est basée sur leurs propriétés tensio-actives dues à leur caractère amphotère.

0,5 g de poudre sont portés à ébullition sous reflux dans 50 ml d'eau durant 30 minutes. La solution est ensuite refroidie puis filtrée. Dans deux tubes à essai de 16 mm de

diamètre et de 16 cm de haut, 1 et 10 ml de décocté sont mesurés et ajustés à 10 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont agités pendant 15 secondes en bouchant avec le pouce et laissés reposer 15 minutes. La hauteur de mousse est mesurée. La présence de saponoside se marque par une hauteur de mousse supérieure à 1 cm.

### CCM

Un volume de 3 à 4 ml de la solution méthanolique obtenue pour le test général est réduit à 0,5 ml et mélangé avec 1 ml d'eau. Les saponines sont extraites par 3 ml de n-butanol saturé d'eau. 20 µl de cette solution sont utilisés pour la CCM en utilisant comme témoin l'aescine (0.5 mg/100 µl MeOH ; dépôt : 20 µl).

*Phase mobile* : DCM/CH<sub>3</sub>COOH glacial/MeOH/ H<sub>2</sub>O (64:32:12:8).

*Révélation* : Observation sous UV à 254 et 366 nm. Puis la vanilline sulfurique est vaporisée. Chauffage 10 minutes à 100 °C. Les saponines donnent diverses couleurs (bleu, bleu-violet, rouge) avec ce réactif.

### **Tanins galliques ou catéchiques**

La solution d'extraction obtenue pour les saponosides est utilisée pour la détection des tanins.

#### Test général

Quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1 % sont ajoutées à 2 ml de la solution d'extraction. La présence de tanins se marque par une coloration bleu foncé, noire ou verte.

#### Réaction spécifique (dite de Stiasny)

15 ml du réactif de Stiasny (formol 30%/HCl conc 2:1) sont ajoutés à 30 ml de la solution d'extraction. Un chauffage au bain-marie à 90 °C provoque la précipitation quantitative des tanins catéchiques (précipité rose). Après filtration, le filtrat saturé d'acétate sodique est additionné de quelques gouttes de chlorure ferrique à 1 % (présence de tanins galliques si l'on obtient une teinte bleue ou noire).

### **Anthocyanes**

Leur présence confère au décocté une coloration rouge qui s'accroît par l'addition d'un acide et qui vire au bleu violacé-verdâtre lors de l'alcalinisation par l'ammoniaque.

### **Hétérosides cardiotoniques**

0,5 g de poudre sont mélangés à 5 ml de MeOH à 50 % et 10 ml d'acétate de plomb (II) à 2 % et chauffés 10 minutes à 60 °C puis filtrés. Le filtrat est refroidi puis extrait 2 fois avec 10 ml de DCM. L'extrait est évaporé à sec et le résidu est redissous dans 200 µl de DCM et 200 µl de MeOH. 100 µl sont déposés sur plaque de CCM en utilisant comme témoin la digitoxine ou la digoxine (5mg/ml MeOH ; dépôt : 10 µl).

*Phase mobile* : EtOAc/MeOH/ H<sub>2</sub>O (100:13,5:10).

*Révélation* : Pulvérisation du réactif de Kedde (mélange (1:1) d'une solution fraîchement préparée d'1 % acide 3,5-dinitrobenzoïque avec une solution éthanolique de NaOH à 2M). Des colorations fugaces rose, bleu, violet apparaissent par la présence d'hétérosides cardiotoniques sauf les bufadiénolides qui ne réagissent pas. Les cardénolides donnent des couleurs rouge-violacées assez stables.

## VI.1.B. Techniques chromatographiques liquides

### VI.1.B.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

#### CCM analytique

La phase stationnaire utilisée est un gel de silice d'épaisseur de 0,2 mm avec indicateur de fluorescence sur plaque de plastique (Silice 60 F<sub>254</sub>, Merck, 105735). Les dépôts d'échantillons se réalisent sur 1 cm espacé de 0,5 cm à l'aide de capillaires (Micropipettes, BLAUBRAND®, intraMark). Le volume (5-60 µl) dépend de la concentration de l'échantillon solubilisé dans le solvant adéquat. Les plaques de CCM sont observées à 254 nm et à 366 nm et éventuellement pulvérisées avec le réactif adéquat. Un dispositif DESAGA (SARSTEDT-GRUPP) muni d'une chambre noire CabUVIS et d'une caméra Color video camera CCD-400 (MITSUBISHI), contrôlé par le logiciel DESAGA ProViDoc, était à disposition pour prendre des photographies des plaques CCM sous lumière visible ou UV à 366 nm ou 254 nm.

Les réactifs de pulvérisation les plus utilisés durant cette thèse sont :

Vanilline sulfurique : réactif universel. 100 ml d'une solution de vanilline à 1 % (m/v) sont dissous dans l'éthanol, puis 2 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés goutte à goutte à la solution. Après pulvérisation, la plaque de CCM est chauffée 5 à 10 minutes à 110 °C.

Chlorure ferrique : solution de chlorure ferrique III 0,2 M dans l'acide perchlorique à 35 %. Il donne des colorations diverses avec les alcaloïdes indoliques, observables en lumière visible.

Mayer : dissolution de 1,35 g de chlorure mercurique (HgCl<sub>2</sub>) dans 50 ml d'eau, auxquels sont ajoutés 5 g d'iodure potassique (KI) avant de compléter à 100 ml avec de l'eau.

#### CCM préparative

Des plaques de verre sont couvertes à l'aide du dispositif DESAGA par 1,5 mm d'épaisseur d'une suspension de gel de silice 60 PF<sub>254</sub> (Merck, 107747) préparée comme suit : 200 g/480 ml d'eau. Les plaques sont ensuite séchées à température ambiante pendant au moins 48 h. Pour être utilisées, les plaques doivent être auparavant activées à l'étuve à 120 °C pendant 2 h. Le dépôt de l'échantillon se réalise sur la longueur de plaque excepté les marges de 1,5 cm. Une fois développée, la plaque est séchée sous hotte. La bande d'intérêt est repérée (sous UV ou visible) et grattée. La silice ainsi récupérée est éluée par le solvant adéquat via un filtre Büchner. Le produit d'intérêt se trouve en solution dans le solvant qu'il faudra évaporer (à l'évaporateur rotatif sous vide) afin de conserver le produit à l'état sec.

Si le produit n'est pas coloré ou ne possède pas de chromophore, la plaque est couverte de papier pour ne laisser apparaître qu'un centimètre de la bande éluée. La plaque peut être pulvérisée avec le révélateur adéquat et, si nécessaire, chauffée au sèche-cheveux uniquement sur la partie à révéler.

### VI.1.B.2. Chromatographie liquide sur colonne ouverte

La phase stationnaire (silice ou cellulose) est placée dans une colonne en verre de diamètre et hauteur variables selon la quantité de produits à séparer et selon la

résolution voulue (en général 100 g de phase stationnaire pour 1 g d'extrait). L'échantillon dissous dans la phase mobile de départ est déposé au sommet de la colonne et élué par la phase mobile qui s'écoule sous l'effet de la gravité. L'éluant est recueilli dans des tubes à analyser par CCM afin de rassembler les fractions similaires. Une fois les tubes similaires rassemblés, l'éluant est évaporé à l'évaporateur rotatif.

Si l'échantillon ne se dissout pas dans la phase mobile de départ, on procède à un dépôt sec : l'échantillon est dissous dans un minimum de solvant adéquat et absorbé sur silice (ou cellulose) dans un verre de montre, le solvant est évaporé sous hotte puis la poudre de silice (ou cellulose) récupérée est déposée au sommet de la colonne.

**Silice** : Lichroprep Si 60 (40-63  $\mu\text{m}$ ) (Merck, 113905)

**Cellulose** : Cellulose Microgranular (Sigma, C6413)

### VI.1.B.3. Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

#### Analytique

Différentes phases stationnaires ont été utilisées, mais les colonnes étaient toutes de même dimension (25 cm de long et 4,6 mm de diamètre) :

- Silice : Lichrospher Si 60, 5  $\mu\text{m}$  (Merck) ;
- Silice greffée en C8 : Lichrospher 60 RP-Select B, 5  $\mu\text{m}$  (Merck) ;
- Silice greffée en C18 : Hypersil ODS (C18), 5  $\mu\text{m}$  (Alltech).

La chaîne de chromatographie liquide haute performance (CLHP) utilisée est pourvue d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur, d'un injecteur automatique (HEWLETT PACKARD series 1100), d'un détecteur DAD et d'un thermostat (Agilent Technologies 1200 series), et est contrôlée par le logiciel Agilent Chemstation. Un détecteur ELSD (Alltech 3300) pourvu d'un générateur d'azote (Alltech) est également disponible pour détecter les substances sans chromophore.

#### Préparative

Nous avons utilisé le matériel suivant : une pompe quaternaire ARMEN Instrument AP100 supportant jusqu'à 90 bars, une valve d'injection manuelle (6Port-3Channel valve, KNAUER) pourvue d'une boucle d'injection de 10 ml maximum, et un collecteur automatique (Fraction collector C-660, BUCHI). Les colonnes sont remplies par nos soins avec le « self packing device for 25mm column » (Merck).

Les phases stationnaires utilisées dans ce travail étaient les suivantes :

- Silice : Lichrospher Si 60, 15  $\mu\text{m}$  (Merck) ;
- Silice greffée en C8 : Lichrospher 60 RP-Select B, 12  $\mu\text{m}$  (Merck).

### VI.1.B.4. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

L'appareil utilisé est le FCPC modèle 200 (Kromaton technologies).



### **Développement par élution en mode isocratique et en mode dual**

La mise au point des systèmes de solvant (mélange ternaire ou quaternaire) est réalisée dans des tubes à essai (test en tubes). L'échantillon est dissous dans le mélange des deux phases et un dépôt sur plaque CCM est réalisé pour chaque phase (volume égal). Une fois la plaque développée dans la phase mobile adéquate et séchée, on peut estimer visuellement le coefficient de partage ( $K_D$ ) de chaque composé. Le composé à purifier doit être réparti de façon comparable dans les deux phases. Ensuite, une fois le système CPC mis au point, le choix de la phase stationnaire (mode ascendant ou descendant) est déterminé en fonction de la phase qui retient le plus de constituants.

### **Développement par déplacement en mode pH-zone refining**

Le choix du système à utiliser s'inspire de la littérature et est testé en tube à essai. On mélange dans un premier temps la phase stationnaire avec le reteneur et la phase mobile. Si le système convient, l'extrait doit rester dans la phase stationnaire, puis doit passer totalement (ou presque) dans la phase mobile lorsque le déplaceur est ajouté dans le mélange.

## **VI.1.B.5. Autres types de chromatographie liquide utilisés**

### **Chromatographie d'exclusion**

La phase stationnaire utilisée dans des colonnes en verre est le séphadex LH 20 (lipophilic sephadex, Sigma, LH20100) et le séphadex G-25 fine (Pharmacia Biotech). La phase mobile est composée du solvant adéquat pour dissoudre l'échantillon.

### **Chromatographie échangeuse d'ions**

Phase stationnaire utilisée dans des colonnes en verre est la résine échangeuse d'anions, Amberlite IRA 420 (Cl<sup>-</sup>) (BDH, 551734). La phase mobile utilisée est un mélange acétone/éthanol/eau (6:2:1). La phase stationnaire est préalablement rincée par ce mélange afin d'éliminer les amines.

## **VI.1.C. Etude phytochimique des extraits de *Fagraea fragrans* Roxb.**

### **VI.1.C.1. Fractionnements de l'extrait DCM d'écorce de tronc**

Un premier essai de fractionnement a été réalisé avec une aliquote (1 g) de l'extrait sur colonne ouverte de silice en utilisant une phase mobile constituée au départ d'EtOAc/MeOH (100:0) et en augmentant la quantité de MeOH au cours du temps jusqu'à 50 %.

Un nouvel essai de fractionnement a été réalisé sur une quantité plus importante d'extrait (2,5 g). La séparation se fait par la même méthode que le premier essai mais en utilisant une pente de gradient plus progressif. Pour accumuler du matériel, une troisième colonne est réalisée dans les mêmes conditions que la deuxième. Les

rendements accumulés des douze fractions sont exposés dans le schéma de séparation (fig. III.9).

#### **Fractionnement de la fraction F3**

La fraction F3 (240 mg) a été séparée sur colonne ouverte de silice avec une phase mobile composée d'Hex/EtOAc de polarité croissante au cours du temps : ~ 60 ml à 85:15 (élution de la sous-fraction F3a), ~ 110 ml à 80:20 (élution des sous-fractions F3b-F3j), ~ 25 ml à 75:25 (élution des sous-fractions F3k-F3l), 50:50 (lavage). Les fractions récoltées ont été analysées par CCM éluee avec une solution d'EtOAc/Hex (85:15) et révélée par pulvérisation à la vanilline sulfurique. Les fractions ont été rassemblées selon la similarité de leur contenu. Douze sous-fractions (notées F3a- F3l, fig. III.6) sont obtenues et une perte de ~ 40 mg est constatée.

Le produit majoritaire (F3P), coloré en rose avec la vanilline sulfurique et détecté à 254 nm, se retrouve dans quatre sous-fractions (F3g-F3i). Une fois rassemblé (16,4 mg) et dissous dans de l'EtOAc, un dépôt est réalisé sur une plaque de CCM préparative de silice et élué dans une phase mobile constituée d'EtOAc/Hex (7:3). Au final, 7,6 mg du produit F3P est récupéré.

#### **Fractionnement de la fraction F4**

La fraction F4 (180 mg) a été séparée sur colonne ouverte de silice avec une phase mobile composée de DCM/EtOH (98:2) en mode isocratique. Cinq sous-fractions (notées F4a, F4b, F4c, F4d, F4e) sont obtenues et une perte de ~30 mg est constatée.

La sous-fraction F4a, renfermant le produit F3P, n'a pas été purifiée à cause de l'instabilité déjà observée. La sous-fraction F4b, contenant un produit révélé en rose vif par la vanilline sulfurique et visible à 254 nm, a été purifié par CCM préparative (phase mobile : EtOAc/MeOH (80:2)). Au final, 17 mg du composé F4P est récupéré.

#### **Fractionnement de la fraction F6**

L'échantillon (103 mg) a été séparé sur colonne ouverte de silice avec une phase mobile composée de DCM/EtOH (97:3) puis (90:10). Cinq sous-fractions (notées F6a, F6b, F6c, F6d, F6e) sont obtenues et une perte de ~15 mg est constatée.

Le composé majoritaire a été élué par le mélange (90:10) et se trouve dans la sous-fraction F6d. Il est de couleur mauve après révélation par la vanilline sulfurique, mais ne se détecte pas aux UV. La sous-fraction F6b, ayant une légère activité antiplasmodiale, a été éluee par le mélange (97:3). Cependant, aucune purification n'a pu être poursuivie à cause de la faible quantité des sous-fractions obtenues.

#### **Fractionnement de la fraction F7**

Environ 100 mg de l'échantillon F7 ont été fractionnés sur colonne sephadex G-25 en éluant par un mélange DCM/MeOH de polarité croissante au cours du temps : (99:1), (95:5) puis (90:10). Au final, quatre fractions ont été obtenues : F7a contenant principalement des graisses (40 mg) ; F7b contenant un produit majoritaire révélé en mauve par la vanilline sulfurique (12 mg), F7c (27 mg) et F7d (9 mg).

Une CCM préparative a été réalisée sur la fraction F7b avec comme phase mobile un mélange EtOAc/MeOH (90:10), une bande mauve est grattée et ~ 3 mg du composé sont

récupérés. Un spectre RMN  $^1\text{H}$  a été mesuré afin de vérifier la pureté mais les signaux étaient ininterprétables à cause du bruit de fond trop important.

La fraction F7c a également été purifiée sur CCM préparative et cette fois une bande observée à 254 nm est récupérée. Mais l'analyse de spectrométrie de masse en ionisation positive démontre la présence de deux composés. La faible quantité obtenue (~ 2 mg) ne permet pas de purifier ces deux substances.

### VI.1.C.2. Fractionnements de l'extrait DCM des feuilles

Un premier fractionnement de l'extrait DCM des feuilles a été réalisé par chromatographie de partage centrifuge (CPC) en utilisant un système d'heptane/DCM/ACN (5:1:4). Afin d'obtenir suffisamment de matériel, trois essais reproductibles ont été réalisés, et les fractions identiques ont été rassemblées. Au final, neuf fractions ont été obtenues. Les rendements accumulés des neuf fractions sont exposés dans le schéma de séparation (fig. III.14).

#### Fractionnement de la fraction F1

Vu la difficulté à solubiliser la fraction dans des solvants polaires, une méthode CLHP a été développée en phase normale en utilisant le détecteur ELSD pour les composés n'absorbant pas dans la gamme UV-vis. Une phase mobile composée de DCM/ACN +10% MeOH/MeOH en proportion variable au cours du temps a été utilisée selon le gradient suivant :

Temps (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0	100	0
10	90	10
20	90	10
29	80	20
30	68	32
39	68	32
41	60	40

L'échantillon F1 (320 mg) a ensuite été fractionné sur CLHP préparative de silice. Six sous-fractions ont été obtenues. La sous-fraction F1f (80 mg) a été séparée sur colonne ouverte de silice avec une phase mobile composée de DCM/MeOH de polarité croissante au cours du temps : 100:0 → 97:3 (élution de la sous-fraction F1f1), 95:5 → 94:6 (élution de la sous-fraction F1f2), 92:8 (élution de la sous-fraction F1f3), 89:11 → 85:15 (élution de la sous-fraction F1f4), 80:20 → 70:30 (élution de la sous-fraction F1f5) et 50:50 (lavage). Les cinq sous-fractions obtenues, de poids très faibles, ne permettent pas de poursuivre la séparation.

### VI.1.C.3. Analyse CLHP des composés isolés

#### Fagraldéhyde, racémate

Plusieurs essais de séparation sur colonne CLHP chirale Sepapak-4 (250 x 4,6 mm) de chez Sepaserve GmbH ont été effectués mais sans succès (phase mobile à proportion variable d'ACN et Hex, avec 0,1% d'acide trifluoroacétique ou sans, avec 0,1 % de diéthylamine ou sans).

### Fagraldéhyde, artefact d'isolement ou présence dans la plante ?

Pour vérifier que le fagraldéhyde n'est pas un artefact produit lors de l'isolement, une étude CLHP a été réalisée sur colonne Lichrospher Si 60 (5 $\mu$ m) (Merck). La phase mobile utilisée était du DCM (phase A) avec un mélange ACN (90 %) + MeOH (10%) (Phase B) en mode gradient (100:0  $\rightarrow$  80:20) en 30 minutes (débit = 1 ml/min).

### Répartition des séco-iridoïdes dans la plante

La méthode utilisée a été inspirée par la méthode décrite par Jiang *et al.* [101]. La colonne hypersil ODS (C18) avec une phase mobile isocratique de MeOH/H<sub>2</sub>O (30:70) a permis de séparer les séco-iridoïdes.

## VI.1.C.4. Transformation chimique

### Transformation par l'ammoniaque

Les séco-iridoïdes et les extraits MeOH d'écorce de tronc et de feuilles ont été transformés par voie chimique par macération dans une solution d'ammoniaque concentré pendant une nuit, puis hydrolyse acide puis remise à pH 10 par une solution d'ammoniaque et extraction par EtOAc (fig. VI.1).

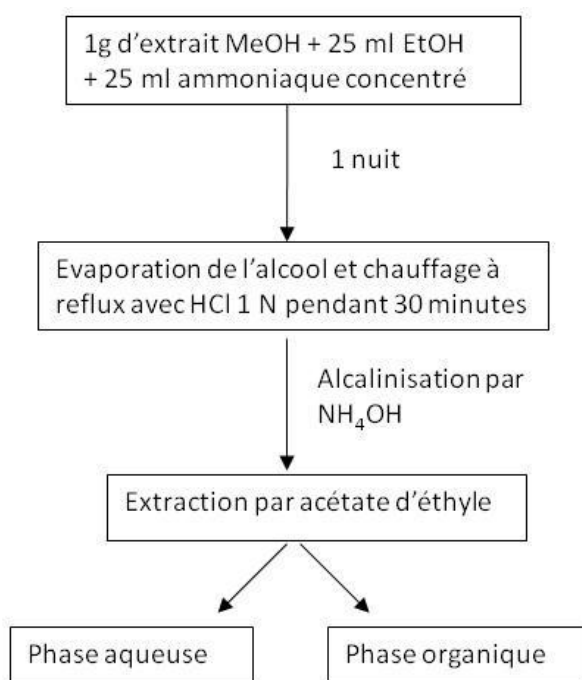


Figure VI.1 : Schéma du protocole de la transformation chimique des extraits polaires de *Fagraea fragrans*.

### Hydrolyse acide

Une hydrolyse acide a été réalisée sur l'extrait MeOH d'écorce de tronc et sur un mélange de gentiopicroside et de swéroside. La manipulation consista à dissoudre 100 mg d'échantillon dans 2 ml d'acide trifluoroacétique à 100 g/l et à chauffer pendant 1 h à 120 °C. Une fois la solution refroidie, les génines sont extraites trois fois par de l'EtOAc. Les phases organiques sont récupérées ensemble et évaporées à siccité.

## VI.1.D. Etude phytochimique des extraits de *Strychnos nux-vomica* L.

### VI.1.D.1. Analyse des lots en CLHP

Afin de s'assurer de l'empreinte phytochimique identique des deux lots reçus et ainsi pouvoir les rassembler, une analyse par CLHP est envisagée. Mme Biala avait décrit dans ses cahiers de laboratoire une méthode séparant les alcaloïdes bisindoliques. Elle utilisait une colonne C8 RP select B et une phase mobile en mode isocratique d'ACN/Acétate sodique 25 mM ajusté à pH 3,5 par H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (3:7). Dans ce système, les alcaloïdes sont élués en front de solvant. Un gradient a donc été adapté et est repris ci-dessous :

Temps (min)	ACN (%)	Acétate sodique (%)
0	19	81
10	19	81
11	26	74
21	26	74
22	30	70
30	30	70
31	50	50
39	50	50

Cette méthode permet de séparer les alcaloïdes monomériques, s'éluant dans les dix premières minutes, des alcaloïdes dimériques se séparant entre la 12<sup>e</sup> et la 35<sup>e</sup> minute.

### VI.1.D.2. Fractionnements de l'extrait P2

Un premier fractionnement est réalisé par CLHP préparative afin d'éliminer les alcaloïdes monomériques déjà bien connus. Le gradient décrit plus haut a été modifié comme suit :

Temps (min)	ACN (%)	Acétate sodique (%)
0	20	80
10	20	80
11	25	75
26	35	65
31	35	65
32	65	35
40	65	35

#### Fraction P2P4

La CPC est utilisée pour purifier les alcaloïdes visés. Un système biphasique est mis au point par la méthode de test en tubes (cf § VI.1.B.4). Le système ternaire constitué de DCM/MeOH/Tampon phosphate pH 7,5 (5:3:2) est sélectionné. Afin de déterminer quelle phase sera la phase mobile du système, il suffit de vérifier laquelle contient le moins de composés en CCM. Dans ce cas, la phase organique (phase inférieure) est adoptée comme phase mobile ; on travaille donc en mode descendant.

### **Fraction P2P3**

Le composé visé étant fortement alcalin et polaire, un nouveau système biphasique est mis au point. Un système ternaire plus polaire que le précédent avec un pH alcalin constitué de BuOH/EtOAc/NaOH 20 mM (3:2:5) est sélectionné. La phase mobile, celle entraînant le moins de composés, est dans ce cas la phase aqueuse (phase inférieure). Le mode adopté est donc le mode descendant.

### **VI.1.D.3. Fractionnements de l'extrait DCM pH 8**

Un préfractionnement est réalisé par CLHP préparative avec la même méthode que celle développée pour l'extrait P2 afin de concentrer les alcaloïdes monomériques dans les premières fractions.

#### **Fraction E8P10**

La CPC ayant donné de bons résultats dans les purifications antérieures, elle est à nouveau utilisée pour la fraction E8P10. Le système employé dans ce cas est un système ternaire composé de DCM/MeOH/Tampon phosphate pH 7,5 (4,5:3:1,5) en mode ascendant (la phase mobile est la phase aqueuse).

La CPC permet de nombreux types d'utilisation. Elle permet, entre autres, une inversion phase stationnaire/phase mobile au cours de la même séparation. En effet, lorsque la phase mobile choisie au départ n'entraîne plus de composés, on peut inverser le mode et ainsi séparer ce qui reste dans la phase stationnaire. Cette caractéristique est utilisée lors de la séparation de la fraction E8P10. Ainsi, les sept premières fractions sont obtenues en mode ascendant et les trois dernières en mode descendant.

L'alcaloïde visé se trouve dans une fraction éluée par la phase aqueuse contenant des phosphates. Différentes techniques sont utilisées pour éliminer ces sels. Premièrement, une élution sur colonne séphadex est réalisée avec de l'eau pour chasser les sels. Curieusement, l'alcaloïde reste accroché au séphadex même en utilisant différents solvants. L'unique manière de l'élué a été une solution NaOH 1N /EtOAc (1:50). Un essai de purification est alors effectué sur CCM de silice mais, à nouveau, l'alcaloïde ne peut pas être élué de la silice. Le matériel étant perdu, un préfractionnement de l'extrait E8 est effectué de la même manière que le précédent.

Cette fois, la sous-fraction contenant l'alcaloïde visé est purifiée sur une colonne de cellulose, matériel beaucoup plus inerte que la silice. La phase mobile utilisée est un mélange d'EtOAc/pyridine/eau (75:23:16,5) inspiré de la littérature [7].

### **VI.1.D.4. Etude de l'extrait dichlorométhane pH12**

Un nouveau système biphasique a été mis au point en évitant d'utiliser des sels qui faussent le poids des fractions récoltées. Afin de couvrir une large gamme de polarité, le système suivant composé de quatre solvants a été sélectionné : DCM/MeOH/iPrOH/eau (5:6:1:4). Dans le test en tube, quelques composés sont répartis équitablement dans les deux phases tandis que d'autres sont principalement présents dans une seule phase. Pour faciliter l'évaporation du solvant des fractions recueillies, la phase comprenant le DCM est choisie comme phase mobile ; l'élution se fait donc en mode descendant. Par ce

système, 24 fractions ont été récupérées, puis une inversion de mode a permis de récupérer encore trois autres fractions et ainsi épuiser la phase stationnaire.

## VI.1.E. Techniques spectroscopiques et spectrométriques

### VI.1.E.1. Spectroscopie ultraviolet (UV)-visible (vis)

Le spectre UV-vis des composés purs dissous dans du MeOH a été mesuré sur un spectrophotomètre Kontron UVIKON 922, au moyen de cuvettes en quartz de 10 mm d'épaisseur.

### VI.1.E.2. Spectroscopie infra-rouge (IR)

Le spectrophotomètre utilisé est un GX Perkin Elmer équipé d'un détecteur MIRTGS (Laboratoire de Chimie Analytique, ULg). Les substances ont été analysées en solution à 1mg/ml dans le tétrachloroéthylène (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>).

### VI.1.E.3. Spectrométrie de masse (MS)

Plusieurs instruments ont été utilisés pour déterminer la masse exacte des composés isolés : un spectromètre de masse haute résolution QStar Elite (Applied Biosystems SCIEX) pourvu d'une source électrospray positif (ESI) et d'un analyseur temps de vol (TOF) au spectropôle de Marseille ; un spectromètre de masse haute-résolution Thermo Scientific LTQ orbitrap XL pourvu d'une source APCI en mode positif au Laboratoire de Pharmacognosie (Unité CHAM) de l'Université Catholique de Louvain. Les données ont été acquises et traitées par le logiciel Xcalibur. Le département de Pharmacie de l'Université de Liège a également accès à un spectromètre de masse haute résolution Micromass Q-ToF II pourvu d'une source électrospray (ESI).

L'analyse LC/MS des fractions de *Fagraea fragrans* a été effectuée à l'UCL par un système comprenant une pompe, un injecteur automatique et un DAD Thermo Accela. La colonne utilisée était une colonne Phenomenex Licrospher C18, 4 × 250 mm (5 μm). La phase mobile était un mélange binaire composé de : solvant A, H<sub>2</sub>O/ACN (9:1) et 0,1 % HCOOH ; solvant B, ACN avec 0,1 % HCOOH (débit = 800 μl/min) selon le gradient suivant :

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	100	0
5	0	100
85	0	100
86	100	0
90	100	0

Le détecteur de masse haute-résolution était le même que pour les substances isolées, à savoir un spectromètre Thermo Scientific LTQ orbitrap XL pourvu d'une source APCI en mode positif et négatif.

#### VI.1.E.4. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance DRX 500 ( $^1\text{H}$  à 500MHz et  $^{13}\text{C}$  à 125 MHz) équipé depuis février 2010 d'une crysonde. L'échantillon (0,5-5 mg) est dissous dans 600  $\mu\text{l}$  de solvant deutéré adéquat (Euriso-Top). Les spectres ont été traités grâce au logiciel MestReNova.

#### VI.1.E.5. Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire spécifique est déterminé par la loi de Biot :  $[\alpha]_D^{T^\circ} = \frac{\alpha}{l.c}$

où  $\alpha$  = angle de rotation mesuré (en degrés) ;  $l$  = longueur de la cellule polarimétrique contenant la solution (en dm) ;  $c$  = concentration de la solution (en g/ml) ;  $T^\circ$  = température (20 °C) ;  $D$  = longueur d'onde donnée (longueur d'onde de la raie D du sodium, 589 nm).

Le polarimètre utilisé est un polarimètre automatique AA-10 Optical Activity LTD (Analis, Namur, Belgium) du Laboratoire d'Analyse des Médicaments (ULg). La cellule utilisée contenait un volume de 0,5 ml (Laboratoire de Chimie Pharmaceutique, ULg). L'échantillon est dissous dans du méthanol à raison de 5 mg/ml.

#### VI.1.E.6. Dichroïsme circulaire (DC)

Les spectres DC ont été enregistrés dans du méthanol sur un spectropolarimètre JASCO J-810 (du Laboratoire d'enzymologie et repliement des protéines, ULg) avec des cuvettes en quartz de 10 mm d'épaisseur. La longueur d'onde de chaque maximum d'absorption est exprimée en nm et son intensité positive ou négative est calculée en litre.mole $^{-1}$ .cm $^{-1}$ ,

suivant l'équation :  $\Delta\varepsilon = \frac{A_L - A_R}{c.l}$

où  $\Delta\varepsilon$  = dichroïsme circulaire molaire ;  $A_L$  = absorbance de la lumière polarisée circulaire gauche ;  $A_R$  = absorbance de la lumière polarisée circulaire droite ;  $c$  = concentration de la solution (mol/litre) ;  $l$  = trajet optique de la cellule traversée (cm).

#### VI.1.F. Modélisation moléculaire (réalisée par le Dr. G. Dive)

La géométrie des molécules isolées a été calculée par le programme Gaussian 03 [74] et visualisée par le logiciel MOLDEN. Elle a été entièrement optimisée suivant tous les degrés de liberté par la méthode de chimie quantique Hatree-Fock utilisant la base de fonctions minimales MINI-1' [187] [47]. Puis, elle a été réoptimisée au niveau de la méthode DFT B3LYP [15] utilisant la base double 6-31G(d) [63] augmentée de fonctions D sur les atomes de la seconde période. La théorie de ces deux méthodes est expliquée plus en détail dans l'annexe II.



## VI.2. PHARMACOLOGIE

### VI.2.A. Tests antiplasmodiaux (*in vitro*)

La plupart des tests ont été réalisés dans le Laboratoire de Pharmacognosie de l'ULg qui évalue la parasitémie par la méthode colorimétrique résultant de l'activité de lactate déhydrogénase. Quelques tests ont également été réalisés dans le Laboratoire de Parasitologie de l'Université de la Méditerranée où l'évaluation de la parasitémie s'effectue par cytométrie en flux.

#### VI.2.A.1. Culture de *Plasmodium falciparum*

La méthode de culture *in vitro* se base sur celle décrite par Trager W. et Jensen J.B. [191]. La culture concerne uniquement les stades érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*, et fait intervenir du sérum et des hématies humaines. Toutes les manipulations sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical (Gera filtration technology).

##### **Souches de *Plasmodium falciparum***

La souche W2, utilisée dans le laboratoire de Marseille, chloroquino-résistante et originaire du Vietnam, a été fournie par l'Unité de Parasitologie de l'Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées (IMTSSA), Parc du Pharo, Marseille. La  $CI_{50}$  moyenne de la chloroquine est comprise entre 0,6 et 0,8  $\mu\text{M}$ .

La souche W2, utilisée dans le laboratoire de Liège, chloroquino-résistante et originaire d'Indochine, a été fournie par le Pr Le Bras (Hôpital Bichat-Claude Bernard, Laboratoire de Parasitologie, Centre National de Référence de la Chimiosensibilité du Paludisme, Paris). Dans nos conditions expérimentales, la  $CI_{50}$  moyenne de la chloroquine est comprise entre 0,7 et 0,8  $\mu\text{M}$ .

La souche 3D7, utilisée dans le laboratoire de Liège, chloroquino-sensible, apparemment originaire d'Afrique de l'Ouest, a été fournie par le Pr Grellier (Muséum d'Histoire Naturelle de Paris). Dans nos conditions expérimentales, la  $CI_{50}$  moyenne de la chloroquine est comprise entre 0,020 et 0,025  $\mu\text{M}$ .

##### **Erythrocytes humains**

Les globules rouges de groupes sanguins A+ ou O+ utilisés provenaient du centre de transfusion sanguine de la Croix Rouge de Belgique. Le centre nous fournissait soit des poches de concentré érythrocytaire à utiliser directement et à conserver à 4 °C pendant 1 mois maximum après le prélèvement, soit des poches de sang total. Dans ce cas, les globules rouges étaient lavés au moins trois fois dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO) et récupérés par centrifugation à 2000 t/min pendant 5 minutes. Les érythrocytes étaient ensuite stockés à un hémocrite de 50 % dans du milieu RPMI 1640 (GIBCO) et conservés à 4 °C maximum 1 mois après le prélèvement.

### Milieu de culture

**Milieu stock**: 500 ml de milieu RPMI 1640 (GIBCO) contenant 25nM HEPES et L-Glutamine est supplémenté de 10 ml d'une solution de glucose 100 g/l et hypoxanthine 2,5 g/l.

**Milieu complet**: 10 ml de plasma décomplémenté (chauffé 45 minutes à 56 °C puis centrifugé 5 min à 3500 t/min) et 0,2 ml de gentamycine (GIBCO, stock à 50 mg/ml) sont ajoutés à 90 ml de milieu stock. Ce milieu se conserve 7 à 10 jours à 4 °C. Le plasma de groupe A+ ou O+ provient du centre de transfusion sanguine de la Croix Rouge de Belgique.

### Culture *in vitro*

Le stade érythrocytaire asexué du *P. falciparum* est cultivé à un hématocrite de 3 % dans le milieu complet à 37 °C dans un environnement réduit en oxygène (5 % CO<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub>, 90 % N<sub>2</sub> insufflés dans le flacon de culture). Afin de maintenir une parasitémie d'environ 4 %, la culture est contrôlée par des frottis sanguins. Ces frottis sont fixés 3 minutes avec du May-grünwald (Merck, 101424), qui permet également une précoloration, et colorés 10 à 15 minutes avec du Giemsa (Merck, 109204) 6 % dans du tampon phosphate à pH 7,4 (Sigma, P4417). La parasitémie est calculée en comptant le nombre de globules rouges parasités par rapport au nombre de globules rouges non parasités au microscope optique (G100X). Les dilutions de la culture se font tous les 2 à 3 jours en fonction du taux de croissance de chaque souche et en fonction de la parasitémie voulue.

### Synchronisation

Certains tests requièrent la synchronisation de la culture (tous les parasites au même stade). Le Plasmodium au stade de schizonte mûr est capable de perméabiliser la membrane cellulaire afin de garantir l'accès aux métabolites plasmatiques. Ceci provoque une fragilité membranaire qui est plus sensible aux chocs osmotiques. C'est selon ce principe que Lambros C et Vanderberg JP [118] ont développé la méthode de synchronisation par sorbitol. Le sorbitol provoque par choc osmotique la lyse des globules rouges parasités aux stades schizontes. Les formes anneaux (jeunes trophozoïtes) sont donc les seules à survivre.

Pour synchroniser une culture, il faut une parasitémie supérieure à 5 %. La culture est centrifugée à 2000 t/min pendant 5 minutes, le volume de surnageant est remplacé par un même volume d'une solution de sorbitol 5 % (dans l'eau distillée stérile) et incubée 10 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps. La suspension est ensuite centrifugée et le culot est lavé 3 fois avec du milieu complet. Après la dernière synchronisation, l'hématocrite est ajusté à 3 %.

## VI.2.A.2. Test de chimiosensibilité *in vitro*

Ce test consiste à quantifier l'effet d'un échantillon (extrait végétal ou composé pur) sur l'inhibition de la prolifération parasitaire dans les érythrocytes humains restés 48 h en culture. L'activité (quantification de l'effet) est exprimée en concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>), qui est la concentration de l'échantillon à laquelle 50 % de la croissance parasitaire est inhibée. Cette CI<sub>50</sub> est déterminée par régression linéaire établie entre le pourcentage d'hématies parasitées par rapport au témoin et aux différentes concentrations de produits testées. Chaque échantillon est testé au moins trois fois indépendamment.

### Dissolution des échantillons

Les extraits de plantes sont dissous dans du DMSO ou du MeOH (1 mg/50 µl de solvant). Cette solution mère est ensuite diluée à 1/10<sup>e</sup> dans du milieu de culture complet (2 mg/ml dont 10 % de DMSO ou MeOH). La même solution mère est préparée pour les produits purs mais elle est ensuite diluée à 1/20<sup>e</sup> dans du milieu de culture complet.

### Mise en culture

Les tests se réalisent dans des microplaques 96 puits (Nunc, 167008). Huit concentrations de chaque échantillon testé sont placées dans 2 colonnes de plaque (pour être testées en dupliquata). Ces concentrations sont préparées par dilutions successives 1/3<sup>e</sup> : 36 µl de la solution mère diluée (2 mg/ml) est placée dans le premier puits d'une colonne de la plaque. Les puits suivants contiennent 24 µl de milieu de culture. 12 µl du premier puits sont placés dans le 2<sup>e</sup> puits et mélangés pour prélever 12 µl à placer dans le puits suivant et ainsi de suite jusqu'au 8<sup>e</sup> puits. 225 µl de culture parasitaire, ajustée à 2 % de parasitémie et 1 % d'hématocrite, sont ajoutés dans tous les puits. 250 µl de témoin négatif (sang non parasité à un hématocrite de 1 %) et de témoin positif (sang parasité à 2 % et à un hématocrite d'1 %) sont chacun placés dans 8 puits d'une colonne. Le témoin contrôle utilisé est soit l'artémisinine (98 %, Sigma) soit la chloroquine (diphosphate, sigma, C6628) soit la quinine base (90 %, Sigma) en 8 concentrations et testée en duplicata. La plaque est placée dans une boîte hermétique contenant un sachet de gaz GENbox microaer (BioMérieux, 96125) puis mise dans l'incubateur à 37 °C pendant 48 h. La concentration finale la plus haute en DMSO ou MeOH est de 1 % ce qui évite la toxicité cellulaire (vérification faite).

## VI.2.A.3. Evaluation de la parasitémie

### Méthode colorimétrique

**Principe :** La croissance parasitaire est évaluée en fonction de l'activité d'une enzyme parasitaire, la lactate déshydrogénase (LDH). Cette enzyme, dont une forme analogue est aussi présente dans les cellules humaines et intervenant dans la glycolyse anaérobie, est capable de transformer le pyruvate en L-lactate en utilisant comme coenzyme le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Dans notre cas, le NAD<sup>+</sup> est remplacé par un analogue, le 3-acétyl pyridine adénine dinucléotide (APAD), qui a 300 fois plus d'affinité pour la LDH parasitaire que pour la LDH humaine [128]. Pour effectuer une mesure au spectrophotomètre, un sel de tétrazolium est ajouté à la solution.

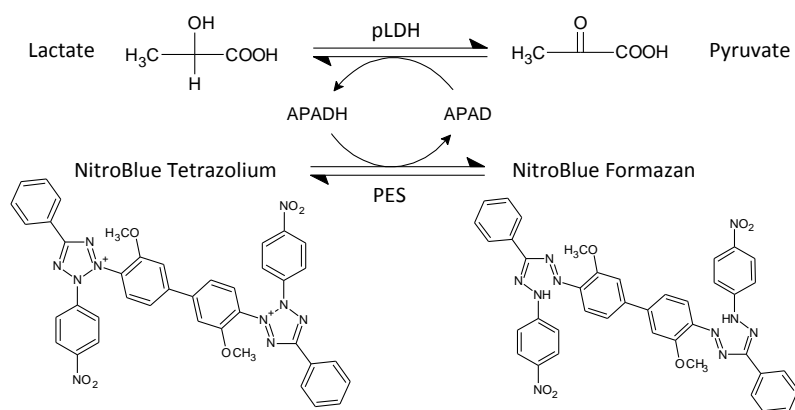


Figure VI.2 : Réactions redox menant au colorant formazan.

Ce sel est alors réduit par l'APAD réduite durant la transformation du lactate en pyruvate pour former un colorant, le formazan (fig. VI.2). L'absorbance du colorant mesurée est dès lors proportionnelle à la quantité d'enzymes, donc de parasites présents dans la solution.

**Mode opératoire :** Les manipulations n'ont plus besoin d'être réalisées dans un environnement stérile. Les plaques de test sont congelées une nuit à -20 °C après 48 h d'incubation. Elles sont ensuite décongelées et 20 µl de chaque contenu de puits homogénéisé sont transférés dans une nouvelle plaque. 100 µl d'une solution contenant 1 ml de Triton X-100 (Sigma, X100), 10 mg de saponine (Alfa Aesar, A18820), 1 g de lithium L-lactate (Sigma, L2250) et 200 mg d'APAD (Sigma, A5251)/ 100 ml de tampon TRIS pH8 (Sigma, T6664) sont additionnés dans les puits et laissés incuber 15 minutes à 37 °C. Ensuite, 20 µl d'une solution contenant un mélange, préparé extemporanément, d'1 ml d'une solution de 20 mg NTB (Nitrotetrazolium blue chloride, Sigma, N6639)/ml de tampon TRIS pH8 et d'1 ml d'une solution d'1 mg de PES (Phenazine ethosulfate, Sigma, P4544)/ml de tampon TRIS pH8 sont ajoutés à l'abri de la lumière et incubés 30 à 45 minutes. L'absorbance est enfin mesurée au spectrophotomètre (Stat Fax 2100) à 630 nm.

### **Méthode cytométrique en flux**

**Principe :** La cytométrie en flux est définie comme l'étude, par un faisceau lumineux, de cellules isolées entraînées par un flux liquide. La lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) permet de classer et trier la population suivant plusieurs critères. Dans notre cas, les parasites sont marqués par un fluorochrome et les érythrocytes peuvent être triés selon qu'ils sont vivants ou morts. Le marquage sélectif des parasites vivants a été obtenu par l'utilisation d'hydroéthidine (Interchim), fluorochrome métabolisé dans l'obscurité par les parasites vivants en bromure d'éthidium qui s'incorpore aux bases de l'ADN. Le cytomètre permet donc un comptage précis et sélectif de globules rouges parasités.

**Mode opératoire :** Après 48 heures d'incubation, les plaques sont centrifugées (rotor à microplaques) pendant 5 minutes à 1500 tours/min ; le surnageant de chaque puits de culture est remplacé par 200 µl d'une solution d'hydroéthidine (solution mère à 10 mg/ml de DMSO, diluée au 1/200<sup>e</sup> dans du tampon phosphate (PBS)). Après 20 min d'incubation à l'obscurité à 37 °C, la plaque est centrifugée et le surnageant est éliminé en retournant la plaque d'un geste vif dans un récipient destiné aux déchets cancérogènes (contenant du charbon actif). Les érythrocytes sont lavés 3 fois avec du PBS pour éliminer l'hydroéthidine en excès. Après le dernier lavage, les 200 µl de PBS sont maintenus dans les puits. 10 µl de cette dernière suspension sont introduits dans un tube adapté à la lecture par cytométrie en flux en présence d'1 ml de PBS. Le cytomètre utilisé est de type FACS (Fluorescence-activated cell sorter) sort (Becton-Dickinson), équipé d'un laser argon d'une puissance de 15 mWatt qui émet à une longueur d'onde de 488 nm. La lecture de la fluorescence porte sur 10 000 globules rouges par puits.

### VI.2.A.4. Classification de l'activité antiplasmodiale

Suite aux résultats obtenus par nos équipes ayant déjà réalisés plusieurs criblages antiplasmodiaux d'extrait de plantes ou de substances pures et suite aux données de la littérature [16, 17], l'effet antiplasmodial a été classé selon les valeurs des  $CI_{50}$ .

En ce qui concerne les extraits végétaux :

- $CI_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$ , l'extrait est rejeté car considéré comme inactif ;
- $15 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ , l'effet est modéré ;
- $5 < CI_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$  : l'effet est prometteur ;
- $CI_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$  : l'effet est puissant.

En ce qui concerne les substances pures :

- $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ , le composé est considéré comme inactif ;
- $11 < CI_{50} < 50 \mu\text{M}$ , le composé est peu actif ;
- $2 < CI_{50} < 11 \mu\text{M}$ , le composé est actif ;
- $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$ , le composé est très actif et peut être considéré comme un "*lead compound*".

### VI.2.B. Tests cytotoxiques (*in vitro*)

Les tests cytotoxiques ont été réalisés sur plusieurs lignées humaines selon la disponibilité des laboratoires qui nous ont accueillis. Nous avons eu l'opportunité d'utiliser la lignée HCT-116 (carcinome colorectal) et WI38 (fibroblastes de poumon) dans le laboratoire de Chimie Médicale, unité GIGA de l'ULg. Le laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE) de l'Université de Québec à Chicoutimi (UQAC), nous a permis de tester les lignées WS1 (fibroblastes de peau), DLD-1 (adénocarcinome colorectal) et A-549 (carcinome de poumon). Enfin, la souche THP1 (monocytes leucémiques) est utilisée à l'Université de la Méditerranée. Toutes les manipulations sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire.

#### Culture cellulaire

Toutes les lignées sont maintenues en culture dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère contrôlée à 5 % de  $\text{CO}_2$ , 90 % de  $\text{N}_2$  et 90 % d'humidité. Tous les trois à cinq jours, les cellules sont repiquées par une dilution dans du milieu frais, en fonction du nombre de cellules comptées sur un hématimètre et préalablement colorées au bleu de trypan (0,4 % dans PBS, dilué 1/2 avec la suspension cellulaire). Le milieu de culture utilisé pour la lignée WI38 est le DMEM (LONZA) supplémenté de 10 % de sérum foetal bovin (FBS) décomplémenté, 1 % de L-glutamine (200 mM, LONZA), 1 % de pénicilline (100 UI/ml)-streptomycine (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Lonza). La lignée HCT-116 croît dans le milieu Mc Coy's (Lonza) également supplémenté de 10 % FBS, 1 % de glutamine et 1 % de pen-strep. Le laboratoire LASEVE utilise le milieu DMEM (Mediatech Cellgro) supplémenté de 10 % de sérum foetal de veau décomplémenté (FCS, Hyclone), 1 % de pyruvate sodique, 1 % d'acides aminés non-essentiels, 1 % de pénicilline (100 UI/ml)-streptomycine (100  $\mu\text{g/ml}$ ) (Mediatech Cellgro). La lignée THP1 quant à elle croît dans du milieu RPMI 1640 (Eurobio, Paris, France) supplémenté de 10 % de FBS (Eurobio, Paris, France), 25 mM HEPES, 25 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , et 1 % de mélange de 200 mM de L-glutamine, 10000 UI/ml pénicilline, 10  $\text{mg/ml}$  streptomycine (Sigma).

## Ensemencement des microplaques 96-puits

Les cellules humaines sontensemencées dans des plaques à raison de 200 µl/puits. Le nombre de cellules diffère pour chaque lignée selon leur vitesse de division : WI-38 = 8000 cellules/puits, HCT116 et THP1 = 10 000 cellules/puits, WS1 = 7500 cellules/puits, DLD-1 et A-549 = 5000 cellules/puits. Les microplaques sont placées à l'incubateur pendant 24 h pour que les cellules adhèrent dans le fond des puits. Ensuite, le milieu est remplacé par des concentrations croissantes de l'échantillon (de 1 à 200 µg/ml contenant maximum 1 % de DMSO) en triplicat, ou par les solutions témoins (témoin positif = cellule + milieu ; témoin négatif = milieu, témoin contrôle). Le témoin contrôle utilisé est soit la camptothécine (de 0,007 à 70 µM) (Sigma, C9911), soit l'étoposide (de 0,4 à 50 µM) (Sigma, E1383). Les plaques sont incubées pendant 48 h à 37 °C.

## Evaluation de la cytotoxicité

### Microscope optique

L'évaluation de la prolifération cellulaire a été visualisée au microscope confocal après 24 h et 48 h d'incubation. Le développement cellulaire est comparé entre le témoin positif et les échantillons testés. Un effet cytotoxique est observé lorsque les cellules ont un aspect rond et petit (les cellules sont donc mortes). Par contre, un effet cytostatique est observé lorsque les cellules gardent le même aspect mais sont beaucoup moins nombreuses que les cellules des témoins positifs. Les concentrations auxquelles un effet cytotoxique ou cytostatique est observé sont notées puis comparées aux résultats obtenus avec les méthodes colorimétriques.

### Méthode spectrophotométrique

La viabilité cellulaire est établie suite à l'activité des déshydrogénases mitochondriales qui clivent un sel de tetrazolium en formazan (fig. VI.3), colorant dont l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 450 nm. Cette activité est observable uniquement dans les cellules vivantes et métaboliquement actives.

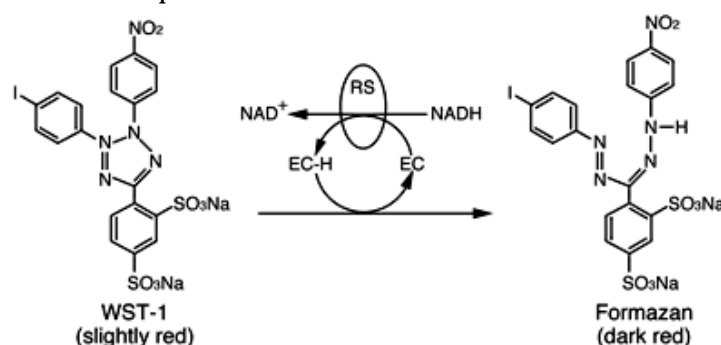


Figure VI.3 : Clivage du sel de tetrazolium WST-1 en formazan. Source : <http://www.vincibiochem.it/CellProliferation.htm> (EC = electron coupling reagent, RS = mitochondrial succinate-tetrazolium-reductase system).

Le sel de tetrazolium utilisé est le WST-1 (Roche) ; son produit est soluble dans le milieu de culture. Le milieu de culture de chaque puits est remplacé par une solution de WST-1 diluée au 1/10<sup>e</sup> et incubée entre 30 et 60 minutes à 37 °C puis l'absorbance est lue à 450 nm.

### Méthode fluorimétrique

Le laboratoire LASEVE utilise deux méthodes fluorimétriques pour mesurer la prolifération cellulaire dans les puits ; la fluorescence est lue avec le Fluoroskan Ascent FL-Thermo plate reader (Labsystem).

La *première méthode* fait appel à l'activité d'enzymes mitochondriales se manifestant uniquement dans les cellules métaboliquement actives. L'environnement réduit du cytosol des cellules vivantes permet la réduction de la résazurine en résorufine, hautement fluorescente et hydrosoluble (fig. VI.4). Une solution stock de résazurine (Sigma, R7017) est préparée à une concentration de 1,25 mg/ml dans du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Hyclone, SH3001503). Le milieu de culture est remplacé par 2 % (v/v) de solution stock et les plaques sont incubées 60 minutes à 37 °C. La longueur d'onde d'excitation est de 530 nm et celle d'émission est 590 nm.

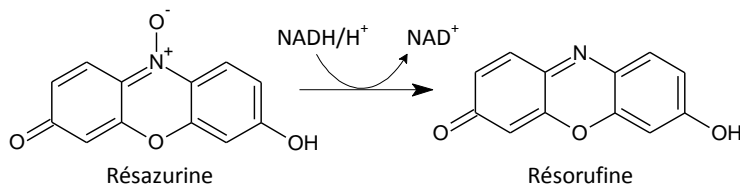


Figure VI.4 : Réduction de résazurine en résorufine.

La *deuxième méthode*, par l'intermédiaire d'une coloration chromosomique, prend en compte la quantité d'ADN présente dans les puits. Un colorant va directement se lier sur les sillons mineurs de la double hélice pour devenir fluorescent. Ce colorant, le bisbenzimidazole (solution de Hoechst), reconnaît spécifiquement une séquence d'au moins 4 paires de nucléotides Adénine-Tyrosine de l'ADN.

Directement après la révélation par la résazurine, les plaques sont congelées à -80 °C pendant au moins une nuit. Une fois les plaques décongelées, les cellules sont lavées pendant 3 h par une solution de SDS 0,01 % (Sodium dodecyl sulfate, sigma, L3771) qui dénature les protéines. Puis, les plaques sont à nouveau congelées à -80 °C pendant au moins une nuit. Le bisbenzimidazole se manipule à l'obscurité car il est sensible à la lumière. Une solution mère de Hoechst (Bisbenzimidazole, Sigma, B2261) est préparée à une concentration de 1 mg/ml eau distillée. Cette solution mère est diluée avec du TNE 2X (10 mM Tris-HCL; 1 mM EDTA ; 4 M NaCl ajusté le tout à pH 7,4 et filtré) pour obtenir une concentration finale de 30 µg/ml. 100 µl de la solution sont ajoutés dans chaque puits et incubés 2 h à température ambiante. Les plaques sont ensuite lues avec une longueur d'onde d'excitation de 355 nm et une émission à 460 nm.

### Expression de la cytotoxicité

La cytotoxicité est exprimée en concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>), qui est la concentration de l'échantillon à laquelle 50 % de la croissance cellulaire est inhibée. Cette CI<sub>50</sub> est déterminée par régression linéaire établie entre le pourcentage de cellules métaboliquement actives (déterminé par la valeur d'absorbance ou de fluorescence) par rapport au témoin et aux différentes concentrations de produits testées.

## **VI.2.C. Tests d'hémolyse (*in vitro*)**

La littérature montre que ce test n'est jamais présenté dans les criblages antiplasmodiaux ; alors que le protocole est simple et rapide. S'il était inclus dans le

protocole des tests antiplasmodiaux *in vitro*, il pourrait éviter la réalisation de fractionnements bioguidés inutiles par la détection de résultats « faux positifs ».

Les tests d'hémolyse se réalisent avec des érythrocytes humains (voir tests antiplasmodiaux *in vitro*, § VI.2.A.1). Les globules rouges sont dilués à 10 % (v/v) dans du PBS à température ambiante.

Afin de vérifier que ces derniers sont encore entiers, 10 µl de PBS sont placés dans un tube eppendorff et 10 µl de Triton X-100 (20 % dans l'eau, v/v) dans un deuxième tube eppendorff. Ensuite, 190 µl sont ajoutés aux deux tubes eppendorff. Le tube « Triton » ne doit pas avoir de culot après 3 minutes de centrifugation à 2200 t/min, tandis que le tube « PBS » doit présenter un culot rouge et un surnageant transparent.

Une solution mère des échantillons à tester est préparée dans le solvant adéquat (eau, MeOH, DMSO) à une concentration 20 fois supérieure à la concentration testée en tenant compte que le MeOH ou le DMSO ne doit pas être supérieur à 1 % dans la solution finale.

Pour réaliser le test d'hémolyse à proprement parler, 10 µl de solution mère sont placés dans un tube eppendorff et mélangés avec 190 µl de globules rouges à 10 %. Des solutions témoins sont également préparées : une comprenant le véhicule (solvant) des échantillons testés + 190 µl de globules rouges à 10 %, le témoin négatif comprenant 10 µl de PBS + 190 µl de globules rouges à 10 %, et le témoin positif comprenant 10 µl de Triton X-100 à 20 % + 190 µl de globules rouges à 10 %. Chaque échantillon est testé en triplicat (y compris les solutions témoins) et incubé pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente.

Finalement, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 2200 t/min et 150 µl de surnageant sont placés dans une plaque 96-puits. L'absorbance est lue à 570 nm.

La formule suivante est utilisée pour calculer le pourcentage d'hémolyse obtenu :

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{A(\text{échantillon testé}) - A(\text{véhicule})}{A(\text{Témoin positif}) - A(\text{Témoin négatif})} * 100 \text{ où } A \text{ est l'absorbance à } 570 \text{ nm.}$$

### VI.2.D. Tests antipaludiques (*in vivo*)

Fidock et al (2004) [57] ont décrit un test préliminaire pour évaluer l'efficacité de composés ou d'extraits supposés antimalariques. Ce test est le « Rodent Malaria 4-Day Suppressive Test » de Peters. Des souris femelles Swiss (10 semaines, 20 ± 3 g, Charles River Laboratoires, Bruxelles) sont infestées par une solution de 50 µl de sang parasité par *Plasmodium berghei* à une parasitémie de 30 % et de 50 µl de sérum physiologique en injection intrapéritonéale (IP). Le nombre de souris utilisées est de 5 par groupe. Il existe autant de groupes que d'extraits à tester en plus des groupes témoins positifs et témoins négatifs. 4 heures après l'infestation, les souris sont traitées par des solutions d'extraits à des doses de 50 ou 200 mg/kg/jour, en injection IP de 200 µl. Ces solutions sont réalisées en préparant une solution à 70 % de Tween 80 et 30 % d'éthanol qui est ensuite diluée au 1/10<sup>e</sup> avec de l'eau distillée stérile. Le traitement est répété pendant 4 jours une fois par jour. Au 5<sup>e</sup> et au 8<sup>e</sup> jour après l'infestation, des frottis sanguins sont réalisés avec une goutte de sang prélevée de la queue, fixés sur lame au May-Grünwald, et colorés au Giemsa afin de compter la parasitémie au microscope (min. 500



érythrocytes comptés). La survie des souris est contrôlée pendant 15 jours. Le témoin négatif utilisé est du sérum physiologique et le témoin positif est la chloroquine à 4 mg/kg ou un extrait MeOH d'écorce de quinquina (*Cinchona succirubra*) à 150 mg/kg (quinine dosée à 3,07 %). L'inhibition de la parasitémie est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{P(\text{Tém.nég}) - P(\text{gp.traîté})}{P(\text{Tém.nég})} \cdot 100$$

où P = moyenne de la parasitémie du groupe ; Tém.nég = le groupe du témoin négatif.

Des tests de t-Student sont réalisés par rapport au témoin négatif afin d'évaluer la signifiante statistique des résultats obtenus avec les extraits testés (logiciel STATISTICA).



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Adjanohoun, E.J. *et al.* (1983) *Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques à Maurice (Iles Maurice et Rodrigues)*. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris. 214.
2. Adersen, A. and Adersen, H. (1997) *Plants from Reunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects - an experimental and ethnobotanical evaluation*. Journal of Ethnopharmacology, 58(3): 189-206.
3. Aguilar-Medrano, R.; Frederich, B.; De Luna, E.; Balart, E.F. (2011) *Patterns of morphological evolution of the cephalic region in damselfishes (Perciformes: Pomacentridae) of the Eastern Pacific*. Biological Journal of the Linnean Society, 102(3): 593-613.
4. Ambasta, S.P. (1986) *The useful plants of India*. Publications & Information Directorate, New Delhi.
5. Andoche, J. (1984) *Pratiques de guérissage et culture populaire créole à l'île de la Réunion*, Mémoire de maîtrise, Université de Paris V - René Descartes.
6. Angenot, L. (1973) *Contribution à l'étude du Strychnos usambarensis Gilg., principal constituant d'un poison de flèche curarisant africain.*, Thèse de doctorat, Université de Liège.
7. Angenot, L.; Dubois, M.; Ginion, C.; van Dorsser, W.; Dresse, A. (1975) *Chemical structure and pharmacological (curarizing) properties of various indole alkaloids extracted from an African Strychnos*. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 215(2): 246-58.
8. Aquino, R.; Capasso, A.; De Simone, F.; Garofalo, L.; Pizza, C.; Sorrentino, L. (1996) *Inhibiting activity of some gucoindolalkaloids and iridoids from Sickingia williamsii on electrically induced contractions of isolated guinea-pig ileum*. Phytotherapy Research, 10: 161-66.
9. Armougom, R.; Grondin, I.; Smadja, J. (1998) *Fatty acid composition of lipid extracts of some tropical cucurbit seeds*. Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides, 5(4): 323-328.
10. Backlund, M.; Oxelman, B.; Bremer, B. (2000) *Phylogenetic relationships within the Gantiales based on ndhF and rbcL sequences, with particular reference to the Loganiaceae*. American Journal of Botany, 87(7): 1029-1043.
11. Baser, K.H. (1978) *Alkaloids of Strychnos nux-vomica*, University of London, 222.
12. Baser, K.H.; Bisset, N.G.; Hylands, P.J. (1979) *Protostrychnine, a new alkaloid from Strychnos nux-vomica*. Phytochemistry, 18: 512-514.
13. Batista, R.; Silva, A.D.; de Oliveira, A.B. (2009) *Plant-Derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phytomedicines. Part II. Non-Alkaloidal Natural Products*. Molecules, 14(8): 3037-3072.

14. Beaulieu, A. (2003) *Guérir à la Réunion: ethnologie contemporaine de la maladie et du soin*. Ethnologie(s) en herbe. Université Paris VII - Denis Diderot, Paris.
15. Becke, A.D. (1993) *Density-functional thermochemistry .3. The role of exact exchange*. Journal of Chemical Physics, 98(7): 5648-5652.
16. Bero, J.; Frederich, M.; Quetin-Leclercq, J. (2009) *Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 61: 1401-33.
17. Bero, J. and Quetin-Leclercq, J. (2011) *Natural products published in 2009 from plants traditionnally used to treat malaria*. Planta Medica.
18. Bhattacharya, S.K.; Reddy, P.K.; Ghosal, S.; Singh, A.K.; Sharma, P.V. (1976) *Chemical constituents of Gentianaceae XIX: CNS-depressant effects of swertiamarin*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 65(10): 1547-9.
19. Biala, R.G.; Tits, M.; Penelle, J.; Frederich, M.; Brandt, V.V.; Prosperi, C.; Llabres, G.; Angenot, L. (1998) *Strychnochrysin, a New Bisindole Alkaloid from the Roots of Strychnos nux-vomica*. Journal of Natural Products, 61(1): 139-41.
20. Bilia, A.R. (2006) *Non-nitrogenous plant-derived constituents with antiplasmodial activity*. Natural product Communications, 1(12): 1181-1204.
21. Bisset, N.G. (1970) *The African species of Strychnos. I. The ethnobotany*. Lloydia, 33(2): 201-43.
22. Bisset, N.G. (1974) *The Asian species of Strychnos. Part III. The ethnobotany*. Lloydia, 37(1): 62-101.
23. Bisset, N.G. (1980) *Useful plants*, dans *Engler and Prantl's Die natürlichen Pflanzenfamilien, Angiospermae : Ordnung Gentianales, Fam. Loganiaceae*, A.J.M. Leeuwenberg, Editor., Duncker and Humblot: Berlin. p. 238-244.
24. Boros, C.A. and Stermitz, F.R. (1991) *Iridoids. An updated review, part II*. Journal of Natural Products, 54(5): 1173-1246.
25. Boulet, V. (2006) *La flore vasculaire de l'île de la Réunion*. Ethnopharmacologia, 37: 13-23.
26. Brandt, V.; Geerlings, A.; Tits, M.; Delaude, C.; van der Heijden, R.; Verpoorte, R.; Angenot, L. (2000) *New strictosidine beta-glucosidase from Strychnos mellodora*. Plant Physiology and Biochemistry, 38(3): 187-192.
27. Broche, M.-C. (1995) *Approche ethnobotanique - Utilisation des plantes médicinales de l'île de la Réunion chez les petits blancs*, Thèse de doctorat, Université de Montpellier I.
28. Bruneton, J. (2009) *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 4e ed, ed. T. DOC. Lavoisier, Paris. 1269.
29. Cadet, T. (1977) *La végétation de l'île de la Réunion: étude phytoécologique et phytosociologique*, Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille III.

30. Cambie, R.C.; Lal, A.R.; C.E.F., R.; Tanaka, N. (1990) *Chemistry of Fijian Plants. V. Constituents of Fagraea gracilipes A. Gray*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 38(7): 1857-1861.
31. Caniato, R. and Puricelli, L. (2003) *Review: natural antimalarial agents (1995-2001)*. Critical Reviews in Plant Sciences, 22(&): 79-105.
32. Capel, M. (2007) *Phytochemical study of Fagraea fragrans an antimalarial plant used in traditional medicine in Cambodia*, Rapport de stage (Master 2), Université de Liège.
33. Caron, C.; Hoizey, M.J.; Lemenolivier, L.; Massiot, G.; Zeches, M.; Choisy, C.; Lemagrex, E.; Verpoorte, R. (1988) *Antimicrobial and Antifungal Activities of Quasi-Dimeric and Related Alkaloids*. Planta Medica, (5): 409-412.
34. CDC. *Malaria*. 2010, Centers for Disease Control and Prevention; disponible sur: [www.cdc.org/malaria](http://www.cdc.org/malaria); consulté en avril 2011.
35. Chaudenson, S. (1987) *Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle à l'île de la Réunion*, Thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille II.
36. Chen, L. *et al.* (2008) *Down-regulation of NR2B receptors partially contributes to analgesic effects of Gentiopicroside in persistent inflammatory pain*. Neuropharmacology, 54(8): 1175-81.
37. Cheng, S.K.; Chea, A.; Hout, S.; Bun, S.S.; Jonville, M.C.; Balansard, G.; Timon-David, P.; Dumenil, G. (2007) *Approche ethnopharmacologique de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Cambodge dans le traitement des maladies infectieuses, des fièvres et du paludisme*. Ethnopharmacologia, 40: 56-70.
38. Clarkson, C. *et al.* (2004) *In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa*. Journal of Ethnopharmacology, 92: 177-191.
39. Conseil de l'Europe, D. (2008) *Pharmacopée Européenne 6.0.*, Strasbourg.
40. Crabbé, P. (1968) *Applications de la dispersion rotatoire optique et du dichroïsme circulaire optique en chimie organique*. Gauthier-Villars, Paris.
41. Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O.; Dyatmiko, W. (1997) *Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acta, 80(4): 1144-1152.
42. Cuidet, Y. *Introduction à la flore vasculaire de la Réunion*. 2010, Conservatoire Botanique National de Mascarin; disponible sur: [http://flore.cbnm.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2&Itemid=2](http://flore.cbnm.org/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=2); consulté en janvier 2011.
43. De, B. (1997) *Alkaloids of Strychnos nux-vomica*. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences, 19: 432-439.
44. Delporte, C. *et al.* (2005) *Analgesic-antiinflammatory properties of Proustia pyrifolia*. Journal of Ethnopharmacology, 99(1): 119-24.

45. Deng, X.K.; Yin, F.Z.; Lu, X.Y.; Cai, B.C.; Yin, W. (2006) *The apoptotic effect of brucine from the seed of Strychnos nux-vomica on human hepatoma cells is mediated via Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> involved mitochondrial pathway*. Toxicological Sciences, 91(1): 59-69.
46. Dideberg, O.; Dupont, L.; Angenot, L. (1975) *Détermination de la structure cristalline et de la configuration absolue d'un dérivé de l'usambarensine*. Acta Crystallographica, B 31(6): 1571-1575.
47. Dive, G.; Dehareng, D.; Ghuysen, J.M. (1993) *Energy analysis on small to medium-sized H-bonded complexes*. Theoretica Chimica Acta, 85(6): 409-421.
48. Dos Santos, J.R. and Fleurentin, J. (1990) *L'ethnopharmacologie: une approche pluridisciplinaire*, dans *Ethnopharmacologie: sources, méthodes, objectifs*, ORSTOM-SFE, Editor: Paris-Metz. p. 26-39.
49. Douk, P. (1966) *Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cambodge*. , Thèse de doctorat, Paris, 264.
50. Druilhe, P.; Brandicourt, O.; Chongsuphajaisiddhi, T.; Berthe, J. (1988) *Activity of a combination of three cinchona bark alkaloids against Plasmodium falciparum in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 32(2): 250-4.
51. Dy Phon, P. (2000) *Dictionnaire des Plantes utilisées au Cambodge*, I. Olympic, Editor: Phnom Penh.
52. Dymock, W.; Warden, C.J.H.; Hooper, D. (1976) *Pharmacographia indica. A history of the principal drugs of vegetable origin, met within in British India*. Vol. II. Periodical Experts, Delhi.
53. el-Sedawy, A.I.; Hattori, M.; Kobashi, K.; Namba, T. (1989) *Metabolism of gentiopicroside (gentiopicrin) by human intestinal bacteria*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 37(9): 2435-2437.
54. el-Sedawy, A.I.; Hattori, M.; Kobashi, K.; Namba, T. (1990) *Metabolism of sweroside from Swertia japonica by human intestinal bacteria*. Shoyakugaku Zasshi, 44(2): 122-126.
55. Faujan, N.H.; Alitheen, N.B.; Yeap, S.K.; Ali, A.M.; Muhajir, A.H.; Ahmad, F.B.H. (2010) *Cytotoxic effect of betulinic acid and betulinic acid acetate isolated from Melaleuca cajuput on human myeloid leukemia (HL-60) cell line*. African Journal of Biotechnology, 9(38): 6387-6396.
56. Fidock, D.A.; Eastman, R.T.; Ward, S.A.; Meshnick, S.R. (2008) *Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research*. Trends in Parasitology, 24(12): 537-544.
57. Fidock, D.A.; Rosenthal, P.J.; Croft, S.L.; Brun, R.; Nwaka, S. (2004) *Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening*. Nature Reviews Drug Discovery, 3(6): 509-520.
58. Fleurentin, J. et al. (2004) *Ethnopharmacologie appliquée. Pharmacopées traditionnelles et plantes médicinales*,
59. Fleurentin, J. and Mortier, F. (1997) *Les médicaments traditionnels, de l'évaluation scientifique au projet de développement intègre: une méthodologie à réinventer?*, dans



- Health and disease, Courses and projects*, A. Guerci, Editor., Erga Edizioni: Genova. p. 261-275.
60. Forgacs, P.; Buffard, G.; Desconclois, J.F.; Jehanno, A.; Provost, J.; Tiberghien, R.; Touche, A. (1981) *Etudes phytochimiques et activités biologiques des plantes endémiques de l'île de la Réunion et de l'île Maurice*. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 15(2): 80-91.
  61. Fortin, H.; Tomasi, S.; Jaccard, P.; Robin, V.; Boustie, J. (2001) *A prenyloxy coumarin from *Psidium dentatum**. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49(5): 619-621.
  62. Fortin, H.; Vigor, C.; Lohezic-Le Devehat, F.; Robin, V.; Le Bosse, B.; Boustie, J.; Amoros, M. (2002) *In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Reunion Island*. *Fitoterapia*, 73(4): 346-350.
  63. Francl, M.M.; Pietro, W.J.; Hehre, W.J.; Binkley, J.S.; Gordon, M.S.J.; DeFrees, D.J.; Pople, J.A. (1982) *Self-consistent molecular orbital methods. XXIII. A polarization-type basis set for second-row elements*. *Journal of Chemical Physics*, 77: 3654-3666.
  64. Frederich, M. (2007) *Contribution à l'étude de substances naturelles à potentialités antiplasmodiales et cytotoxiques*, Thèse d'agrégation, Université de Liège, 302.
  65. Frédéricich, M. (2000) *Isolement et détermination de structure d'alcaloïdes indoliques. Etude de leur activité sur Plasmodium falciparum.*, Thèse de doctorat, Université de Liège, 218.
  66. Frederich, M.; Bentires-Ali, M.; Tits, M.; Angenot, L.; Heinen, E.; De Pauw-Gillet, M.C. (2003) *Apoptosis induction in human cancer cells by sungucine from *Strychnos icaia* root*. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 367(3): 260-5.
  67. Frederich, M.; Bentires-Alj, M.; Tits, M.; Angenot, L.; Greimers, R.; Gielen, J.; Bours, V.; Merville, M.P. (2003) *Isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from *Strychnos usambarensis*, induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(3): 1103-10.
  68. Frédéricich, M.; Dogné, J.M.; Angenot, L.; De Mol, P. (2002) *New trends in anti-malarial agents*. *Current Medicinal Chemistry*, 9: 1435-1456.
  69. Frederich, M.; Hayette, M.P.; Tits, M.; De Mol, P.; Angenot, L. (1999) *In vitro activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9): 2328-2331.
  70. Frederich, M.; Hayette, M.P.; Tits, M.; De Mol, P.; Angenot, L. (2001) *Reversal of chloroquine and mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* by the two monoindole alkaloids, icajine and isoretuline*. *Planta Medica*, 67(6): 523-527.
  71. Frederich, M. et al. (2002) *Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species*. *Journal of Natural Products*, 65(10): 1381-1386.
  72. Frederich, M.; Tits, M.; Angenot, L. (2008) *Potential antimalarial activity of indole alkaloids*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(1): 11-19.

73. Frederich, M.; Tits, M.; Goffin, E.; Philippe, G.; Grellier, P.; De Mol, P.; Hayette, M.P.; Angenot, L. (2004) *In vitro and in vivo antimalarial properties of isostrychnopentamine, an indolomonoterpenic alkaloid from Strychnos usambarensis* *Planta Medica*, 70(6): 520-525.
74. Frisch, M.J. *et al.* (2004) *Gaussian 03, Revision C.02*. Gaussian Inc.: Wallingford, CT.
75. Ghisalberti, E.L. (1998) *Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids*. *Phytomedicine*, 5(2): 147-163.
76. Giboin, L. (1949) *Epitomé de botanique et de matière médicale de l'Inde et spécialement des établissements français en Inde*, Thèse de doctorat, Université de Marseille.
77. Girard-Valenciennes, E.; Poullain, C.; Smadja, J. (2006) *Etude d'une rutacée médicinale de la Réunion: Melicope borbonica (Bory) T.G. Hartley*. *Ethnopharmacologia*, 37: 53-58.
78. Gopalsamy, N.; Vargas, D.; Gueho, J.; Ricaud, C.; Hostettmann, K. (1988) *Saponins from leaves of Aphloia theiformis*. *Phytochemistry*, 27(11): 3593-5.
79. Govinden-Soulange, J.; Magan, N.; Gurib-Fakim, A.; Gauvin, A.; Smadja, J.; Kodja, H. (2004) *Chemical composition and in vitro antimicrobial activities of the essential oils from endemic Psidium species growing in Mauritius*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(11): 1814-8.
80. Graz, B.; Elisabetsky, E.; Falquet, J. (2007) *Beyond the myth of expensive clinical study: Assessment of traditional medicines*. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3): 382-386.
81. Grondin, I.; Smadja, J.; Farines, M.; Soulier, J. (1997) *The tryacylglycerols of two Sapindaceae seed oils: study of Litchi sinensis Sonn. and Euphoria longana Lam. lipids*. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides*, 4(4): 295-300.
82. Guibourt, N.J.-B.G. (1849) *Histoire Naturelle des Drogues Simples*. Quatrième édition ed, ed. J.-B. Baillière. Vol. Tome deuxième, Paris.
83. Gurib-Fakim, A.; Subratty, H.; Narod, F.; Govinden-Soulange, J.; Mahomoodally, F. (2005) *Biological activity from indigenous medicinal plants of Mauritius*. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1): 41-51.
84. Hakizamungu, E. and Weri, M. (1988) *L'usage des plantes médicinales dans le traitement du paludisme en médecine traditionnelle rwandaise*. *Bulletin de Médecine Traditionnelle et Pharmacopée*, 2(1): 11-17.
85. Hao, X.Y.; Peng, L.; Ye, L.; Huang, N.H.; Shen, Y.M. (2004) *[A study on anti-inflammatory and analgesic effects of alkaloids of Toddalia asiatica]*. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2(6): 450-2.
86. Hase, K.; Li, J.X.; Basnet, P.; Xiong, Q.B.; Takamura, S.; Namba, T.; Kadota, S. (1997) *Hepatoprotective principles of Swertia japonica MAKINO on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(11): 1823-1827.
87. Heimberger, S.I. and Scott, A.I. (1973) *Biosynthesis of strychnine*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 6: 217-218.

88. Herbert, R. (1983) *Structural and biosynthetic relationships*, dans *Indoles - The monoterpene indole alkaloids*, J.E. Saxton, Editor., Interscience: New York. p. 1-46.
89. Hommel, M. *E-module d'enseignement sur le paludisme*. 2002-2011, Sanofi-aventis; disponible sur: <http://en.impact-malaria.com/iml/cx/fr/layout.jsp?scat=BB17A2DB-3876-4F53-BFE3-A0EB9F43B82D>; consulté en mai 2011.
90. Horn, M.M.; Drewes, S.E.; Brown, N.J.; Munro, O.Q.; Meyer, J.J.M.; Mathekga, A.D.M. (2001) *Transformation of naturally-occurring 1,9-trans-9,5-cis sweroside to all trans sweroside during acetylation of sweroside aglycone*. *Phytochemistry*, 57(1): 51-56.
91. Hout, S.; Chea, A.; Bun, S.S.; Elias, R.; Gasquet, M.; Timon-David, P.; Balansard, G.; Azas, N. (2006) *Screening of selected indigenous plants of Cambodia for antiplasmodial activity*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1): 12-18.
92. Inouye, H.; Ueda, S.; Nakamura, Y. (1970) *Studies on monoterpene glucoside. XII. Biosynthèse of gentianaceous secoiridoid glucosides*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 18(10): 2043-49.
93. Ishiguro, K.; Yamaki, M.; Takagi, S.; Ikeda, Y.; Kawakami, K.; Ito, K.; Nose, T. (1988) *Studies on Iridoid-Related Compounds .5. Antitumor-Activity of Iridoid Derivs Periodate-Oxidation Products*. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 11(2): 131-136.
94. Jaishree, V. and Badami, S. (2009) *Antiedematogenic and free radical scavenging activity of swertiamarin isolated from *Enicostemma axillare**. *Planta Medica*, 75: 12-17.
95. Jaishree, V. and Badami, S. (2010) *Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin from *Enicostemma axillare* against D-galactosamine induced acute liver damage in rats*. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(1): 103-106.
96. Jaishree, V.; Badami, S.; Kumar, M.R.; Tamizhmani, T. (2009) *Antinociceptive activity of swertiamarin isolated from *Enicostemma axillare**. *Phytomedicine*, 16(2-3): 227-232.
97. Jakobsen, T.H.; Marcussen, H.V.; Adersen, A.; Strasberg, D.; Smitt, U.W.; Jaroszewski, J.W. (2001) *3-Methoxyflavones and a novel coumarin from *Psiadia dentata**. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(9): 963-965.
98. Jensen, S.R. (1992) *Systematic implications of the distribution of iridoids and other chemical compounds in the Loganiaceae and other families of the Asteridae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79: 284-302.
99. Jensen, S.R.; Franzyk, H.; Wallander, E. (2002) *Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers*. *Phytochemistry*, 60: 213-231.
100. Jensen, S.R.; Schripsema, J.; Struwe, L.; Albert, V.A. (2002) *Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae*, dans *Gentianaceae: Systematics and Natural History*. Cambridge University Press: Cambridge. p. 573-631.
101. Jiang, R.W.; Wong, K.L.; Chan, Y.M.; Xu, H.X.; But, P.P.H.; Shaw, P.C. (2005) *Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis*. *Phytochemistry*, 66(22): 2674-2680.
102. Jonville, M.C. (2005) *Etude d'une plante utilisée en médecine traditionnelle au Cambodge : *Fagraea fragrans* (Gentianacée)*, Mémoire de D.E.A., Université de Liège.

103. Jonville, M.C.; Kodja, H.; Strasberg, D.; Pichette, A.; Ollivier, E.; Frederich, M.; Angenot, L.; Legault, J. (2011) *Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago*. Journal of Ethnopharmacology, 136: 525-531.
104. Julvez, J.; Mouchet, J.; Ragavoodoo, C. (1990) *Epidémiologie historique du paludisme dans l'archipel des Mascareignes (Océan Indien)*. Annales de la Société belge de médecine tropicale, 70: 249-261.
105. Kanegusuku, M.; Sborgs, D.; Bastos, E.S.; de Souza, M.M.; Cechinel-Filho, V.; Yunes, R.A.; Delle Monache, F.; Niero, R. (2007) *Phytochemical and analgesic activity of extract, fractions and a 19-hydroxyursane-type triterpenoid obtained from Rubus rosaefolius (Rosaceae)*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 30(5): 999-1002.
106. Kapoor, L.D. (1990) *CRC Handbook of Ayurvedic Medicinal Plants*. CRC Press, Florida.
107. Kaur, K.; Jain, M.; Kaur, T.; Jain, R. (2009) *Antimalarials from nature*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17(9): 3229-3256.
108. Kikuchi, M. and Kikuchi, M. (2004) *Studies on the Constituents of Swertia japonica Makino I. On the Structures of New Secoiridoid Diglycosides*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 52(10): 1210-1214.
109. Kiszewski, A.; Mellinger, A.; Spielman, A.; Malaney, P.; Sachs, S.E.; Sachs, J. (2004) *A global index representing the stability of malaria transmission*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70(5): 486-498.
110. Kodja, H.; Govinden-Soulange, J.; Gurib-Fakim, A.; Robene-Soustrade, I.; Humeau, L.; Figier, J. (1998) *Micropropagation of Psidium arguta through cotyledonary axillary bud culture*. Plant Growth Regulation, 25: 75-80.
111. Koka, S.; Lang, C.; Niemoeller, O.M.; Boini, K.M.; Nicolay, J.P.; Huber, S.M.; Lang, F. (2008) *Influence of NO synthase inhibitor L-NAME on parasitemia and survival of Plasmodium berghei infected mice*. Cellular Physiology and Biochemistry, 21(5-6): 481-488.
112. Kondo, Y.; Takano, F.; Hojo, H. (1994) *Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice*. Planta Medica, 60(5): 414-416.
113. Kotowaroo, M.I.; Mahomoodally, M.F.; Gurib-Fakim, A.; Subratty, A.H. (2006) *Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects in vitro*. Phytotherapy Research, 20(3): 228-231.
114. Kumarasamy, Y.; Nahar, L.; Cox, P.J.; Jaspars, M.; Sarker, S.D. (2003) *Bioactivity of secoiridoid glycosides from Centaureum erythraea*. Phytomedicine, 10(4): 344-347.
115. Kumarasamy, Y.; Nahar, L.; Sarker, S.D. (2003) *Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of Centaureum erythraea*. Fitoterapia, 74(1-2): 151-154.
116. Kurtz, D.W. et al. (2003) *High precision with the Whole Earth Telescope: Lessons and some results from XCoV20 for the roAp star HR 1217*. Baltic Astronomy, 12(1): 105-117.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

117. Kwiatkowski, D. and Perlmann, P. (1999) *Inflammatory process in the pathogenesis of malaria*, dans *Malaria. Molecular and clinical aspects*, M.W.a.P. Perlmann, Editor., harwood academic publishers: Amsterdam.
118. Lambros, C. and Vandenberg, J. (1979) *Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture*. Journal of Parasitology, 65(3): 418-420.
119. Lansiaux, A.; Bailly, C.; Houssier, C.; Colson, P.; De Pauw-Gillet, M.C.; Frederich, M.; Tits, M.; Angenot, L. (2002) *Apoptosis of HL-60 leukemia cells induced by the bisindole alkaloids sungucine and isosungucine from Strychnos icaia*. Planta Med, 68(7): 591-5.
120. Lantz, R.L. (1960) *Reaction of hydroxyhydroquinone with ammonia*. Compt. rend., 251: 2045-47.
121. Lavergne, R. (1983) *Fleurs de Bourbon, Tome 8*. cazal. 288.
122. Lavergne, R. (2001) *Tisaneurs et plantes médicinales indigènes de La Réunion*. Orphie ed. Orphie, Saint-Denis de La Réunion. 523.
123. Lavergne, R. and Véra, R. (1989) *Etude ethnobotanique des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle à la Réunion*. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris.
124. Leboeuf, M.; Cave, A.; Provost, J.; Tiberghien, R.; Forgacs, P. (1980) *Alkaloids of Monimia rotundifolia Pet.-Th.; preparation of laurotetanine derivatives with antiarrhythmic properties* Annales Pharmaceutiques Françaises, 38(6): 537-44.
125. Lee, S.M.; Min, B.S.; Lee, C.G.; Kim, K.S.; Kho, Y.H. (2003) *Cytotoxic triterpenoids from the fruits of Zizyphus jujuba*. Planta Med, 69(11): 1051-4.
126. Liu, J.; Liu, Y.; Klaassen, C.D. (1994) *The effect of Chinese hepatoprotective medicines on experimental liver injury in mice*. Journal of Ethnopharmacology, 42(3): 183-91.
127. Louis, F.; Girod, R.; Julvez, J. *Le paludisme à La Réunion*. Action Scientifique en Milieu Tropical 2001, Institut de Médecine tropicale du Service de Santé des Armées; disponible sur: <http://asmt.louis.free.fr/lareunion.html>; consulté en 2007.
128. Mackler, M.T.; Palmer, C.J.; Ager, A.L. (1998) *A review of practical techniques for the diagnosis of malaria*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 92(4): 419-433.
129. Mallikharjuna, P.B. and Seetharam, Y.N. (2009) *In Vitro Antimicrobial Screening of Alkaloid Fractions from Strychnos potatorum*. E-Journal of Chemistry, 6(4): 1200-1204.
130. Manoharan, K.P. (2006) *Isolation, characterisation and/or evaluation of plant extracts for anticancer potential*. , National University of Singapore, 174.
131. Massiot, G.; Massoussa, B.; Jacquier, M.J.; Thépénier, P.; Le Men-Olivier, L.; Delaude, C.; Verpoorte, R. (1988) *Alkaloids from roots of Strychnos matopensis*. Phytochemistry, 27(10): 3293-3304.
132. Massiot, G. et al. (1983) *Occurrence of Longicaudatine, a New Type of Bis-Indole Base and Bisnor-C-alkaloid H in Strychnos Species*. Journal of Organic Chemistry, 48: 1869-72.
133. Menaut, B. (1930) *Matière Médicale Cambodgienne*. Imprimerie d'Extrême Orient, Hanoi.

134. Motley, T.J. (2004) *The Ethnobotany of Fagraea Thunb. (Gentianaceae): The Timber of Malesia and the Scent of Polynesia*. *Economic Botany*, 58(3): 396-409.
135. Mustofa, V.A.; Benoit-Vical, F.; Pélisier, Y.; Koné-Bamba, D.; Mallié, M. (2000) *Antiplasmodial activity of plant extracts used in west African traditional medicine*. *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (1-2): 145-151.
136. Natarajan, P.N.; Wan, A.S.C.; Zaman, V. (1974) *Antimalarial, antiamebic and toxicity tests on gentianine*. *Planta Medica*, 25: 258-260.
137. Ndifor, A.M.; Howells, R.E.; Bray, P.G.; Ngu, J.L.; Ward, S.A. (1993) *Enhancement of Drug Susceptibility in Plasmodium-Falciparum Invitro and Plasmodium-Berghei Invivo by Mixed-Function Oxidase-Inhibitors*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(6): 1318-1323.
138. Neergheen, V.S.; Bahorun, T.; Jen, L.S.; Aruoma, O.I. (2007) *Bioefficacy of mauritian endemic medicinal plants: Assessment of their phenolic contents and antioxidant potential*. *Pharmaceutical Biology*, 45(1): 9-17.
139. Nepal, H.M.G.o. (1970) *Medicinal Plants of Nepal*. *Bulletin of the Departement of Medicinal Plants*, 3: 30.
140. Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007) *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. *Journal of Natural Products*, 70(3): 461-477.
141. Niiho, Y.; Yamazaki, T.; Nakajima, Y.; Yamamoto, T.; Ando, H.; Hirai, Y.; Toriizuka, K.; Ida, Y. (2006) *Gastroprotective effects of bitter principles isolated from Gentian root and Swertia herb on experimentally-induced gastric lesions in rats*. *Journal of Natural Medicine*, 60: 82-88.
142. Noedl, H.; Se, Y.; Schaecher, K.; Smith, B.L.; Socheat, D.; Fukuda, M.M. (2008) *Evidence of artemisinin-resistant malaria in Western Cambodia*. *The New England Journal of Medicine*, 359(24): 2619-2620.
143. Nyberg, N.T.; Duus, J.O.; Sorensen, O.W. (2005) *Heteronuclear two-bond correlation: suppressing heteronuclear three-bond or higher NMR correlations while enhancing two-bond correlations even for vanishing 2J(CH)*. *Journal of the American Chemical Society*, 127(17): 6154-5.
144. O'Connor, S.E. and Maresh, J.J. (2006) *Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis*. *Natural Product Reports*, 23: 532-547.
145. Okuyama, E.; Suzumura, K.; Yamazaki, M. (1995) *Pharmacologically active components of Todopon Puok (Fagraea racemosa), a medicinal plant from Borneo*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 43(12): 2200-4.
146. Oudhia, P. *Strychnos nux-vomica L. [Internet] Fiche de Protabase*. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale) 2008, <http://database.prota.org/recherche.htm>; disponible sur; consulté en 23/03/2011.
147. Ozturk, N.; Korkmaz, S.; Ozturk, Y.; Baser, K.H. (2006) *Effects of gentiopicroside, sweroside and swertiamarine, secoiridoids from gentian (Gentiana lutea ssp. symphyandra), on cultured chicken embryonic fibroblasts*. *Planta Med*, 72(4): 289-94.

148. Pages, F.; Orlandi-Pradines, E.; Corbel, V. (2007) *Vecteurs du paludisme : biologie, diversité, contrôle et protection individuelle*. *Medecine et maladies infectieuses*, 37(3): 153-61.
149. Paoloni, L. and Marini-Bettolo, G.B. (1957) *Structure of anhydronium bases*. *Nature*, 179: 41-42.
150. Patthy-Lukats, A.; Karolyhazy, L.; Szabo, L.F.; Podanyi, B. (1997) *First direct and detailed stereochemical analysis of strictosidine*. *Journal of Natural Products*, 60: 69-75.
151. Payet, F. (2008) *Le paludisme à la Réunion, au lendemain de la départementalisation (1946-1962)*, dans *Epidémies et pharmacopée traditionnelle dans l'histoire des îles de l'océan Indien*, S. FumaetJ. Chanlow, Editors., Université de la Réunion: Saint-Denis.
152. Pelletier, J. (1819) *Journal de Pharmacie et des sciences accessoires*. Vol. Tome V. Colas, L., Paris.
153. Penelle, J. (2001) *Contribution à l'étude du Strychnos guianensis, plante toxique d'Amazonie. Isolement et détermination de structure de nouveaux alcaloïdes indoliques curarisants.*, Thèse de doctorat, Université de Liège, 263.
154. Penelle, J.; Tits, M.; Christen, P.; Brandt, V.; Frederich, M.; Angenot, L. (1999) *Guiaflavine, a new bisindole quaternary alkaloid from the stem bark of Strychnos guianensis*. *J Nat Prod*, 62(6): 898-900.
155. Penelle, J.; Tits, M.; Christen, P.; Molgo, J.; Brandt, V.; Frederich, M.; Angenot, L. (2000) *Quaternary indole alkaloids from the stem bark of Strychnos guianensis*. *Phytochemistry*, 53(8): 1057-66.
156. Perry, L.M. and Metzger, J. (1980) *Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses*. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England.
157. Pételot, A. (1953) *TOME II: Caprifoliacées à Plantaginacées*, dans *Les plantes médicinales du Cambodge, du Laos et du Vietnam*, A.d.r.a.e.p.a. Vietnam, Editor., I.D.E.O. Saigon Ed.: Saigon. p. 164-175.
158. Petit-Thouars, A.A. (1806) *Notice historique dur le genre Caniram, ou Strychnos de Linnaeus*. Levrault, F.G., Strasbourg.
159. Philippe, G. (2006) *Le genre Strychnos dans la recherche antipaludique: Contribution à l'étude du Strychnos icaja Baill., plante toxique à alcaloïdes antiplasmodiaux*, Thèse de doctorat, Université de Liège, 244.
160. Philippe, G.; Angenot, L.; De Mol, P.; Goffin, E.; Hayette, M.P.; Tits, M.; Frederich, M. (2005) *In vitro screening of some Strychnos species for antiplasmodial activity*. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3): 535-539.
161. Philippe, G.; Angenot, L.; Tits, M.; Frederich, M. (2004) *About the toxicity of some Strychnos species and their alkaloids*. *Toxicon*, 44(4): 405-16.
162. Philippe, G.; De Mol, P.; Angenot, L.; Tits, M.; Frederich, M. (2007) *In vivo antimalarial activity of isosungucine, an indolomonoterpenic alkaloid from Strychnos icaja*. *Planta Medica*, 73(5): 478-9.

163. Philippe, G.; Nguyen, L.; Angenot, L.; Frederich, M.; Moonen, G.; Tits, M.; Rigo, J.M. (2006) *Study of the interaction of antiplasmodial strychnine derivatives with the glycine receptor*. European Journal of Pharmacology, 530(1-2): 15-22.
164. Phillipson, J.D. and Bisset, N.G. (1972) *Quaternisation and oxidation of strychnine and brucine during plant extraction*. Phytochemistry, 11: 2547-2553.
165. Pink, R.; Hudson, A.; Mouries, M.A.; Bendig, M. (2005) *Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery*. Nature Reviews Drug Discovery, 4(9): 727-40.
166. Planchon, G. and Collin, E. (1895) *Les Drogues Simples d'origine végétale*, ed. O. Doin. Vol. Tome premier, Paris.
167. Poullain, C.; Girard-Valenciennes, E.; Smadja, J. (2004) *Plants from Reunion Island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities*. Journal of Ethnopharmacology, 95: 19-26.
168. PROSEA. *AgroForestryTree Database*. International Center for Research in Agroforestry; disponible sur: <http://www.worldagroforestrycentre.org/Sea/Products/AFDbases/AF/asp/SpeciesInfo.asp?SpID=18199>; consulté en décembre 2010.
169. Qasim, M.A.; S.K., R.; M., K.; M., I. (1987) *A new glycosyl flavone from Fagraea obovata Wall.* Phytochemistry, 26(10): 2871-2872.
170. Quetin-Leclercq, J.; Llabres, G.; Warin, R.; Belem-Pinheiro, M.L.; Mavar-Manga, H.; Angenot, L. (1995) *Guianensine, a zwitterionic alkaloid from Strychnos guianensis*. Phytochemistry, 40(5): 1557-1560.
171. Rafatro, H.; Ramanitrahasimbola, D.; Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Urverg, S.; Rakoto-Ratsimamanga, A.; Frappier, F. (2000) *Reversal activity of the naturally occurring chemosensitizer malagashanine in Plasmodium malariae*. biochemical Pharmacology, 59: 1053-61.
172. Rasoanaivo, P.; Wright, C.W.; Willcox, M.L.; Gilbert, B. (2011) *Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions*. Malaria Journal, 10(Suppl. 1 ): S4.
173. Rene, R. and Etchepare, S. (1964) *The structure of aphloiol: the relation of this xanthone to mangiferin*. Comptes rendus, 258(21): 5277-9.
174. Réunion, P.n.d.L. (2008) *Dossier de candidature au patrimoine mondial de l'UNESCO: pitons, cirques et remparts de l'île de la Réunion*, UNESCO, Editor: Saint-Denis. 559.
175. Riviere, M. (2006) *Les plantes endémiques. Patrimoine historique, culturel et scientifique de l'île de la Réunion*. Ethnopharmacologia, 37: 31-34.
176. Robin, V.; Irurzun, A.; Amoros, M.; Boustie, J.; Carrasco, L. (2001) *Antipoliiovirus flavonoids from Psiadia dentata*. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 12(5): 283-91.
177. Rojas, A.; Bah, M.; Rojas, J.I.; Gutierrez, D.M. (2000) *Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from Gentiana spathacea*. Planta Medica, 66(8): 765-7.



178. Sanon, S. *et al.* (2003) *Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicine in Burkina Faso*. Journal of Ethnopharmacology, 86: 143-147.
179. Schwikkard, S. and van Heerden, F.R. (2002) *Antimalarial activity of plant metabolites*. Natural Product Reports, 19: 675-692.
180. Sefkovic, P.; Dubravkova, L.; Torto, F.G. (1968) *Die alkaloiide der blätter von Strychnos nux vomica L.* . Planta Medica, 16(2): 143-146.
181. Smadja, J. and Véra, R. (1991) *Essai préliminaire sur quelques plantes de la Réunion*. Plantes médicinales et phytothérapie, 25(4): 212-41.
182. Solary, E. *et al.* (2000) *Phase I study of cinchonine, a multidrug resistance reversing agent, combined with the CHVP regimen in relapsed and refractory lymphoproliferative syndromes*. Leukemia, 14(12): 2085-94.
183. Srivastava, I.K. and Vaidya, A.B. (1999) *A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(6): 1334-1339.
184. Steele, J.C.; Warhurst, D.C.; Kirby, G.C.; Simmonds, M.S. (1999) *In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial*. Phytotherapy Research, 13(2): 115-9.
185. Szabo, L.F. (2008) *Rigorous biogenetic network for a group of indole alkaloids derived from strictosidine*. Molecules, 13(8): 1875-1896.
186. Tan, R.X. and Kong, L.D. (1997) *Secoiridoids from Gentiana siphonantha*. Phytochemistry, 46(6): 1035-1038.
187. Tatewaki, H. and Huzinaga, S. (1980) *A systematic preparation of new contracted Gaussian-type orbital sets. III. Second-row atoms from Li through Ne*. Journal of Computational Chemistry, 1(3): 205-228.
188. Thibaut, D. (1886) *Des alcaloïdes des Strychnées*, Thèse de doctorat, Université de Lille, 131.
189. Thomas, G.; Diniz, M.D.F.M.; Mukherjee, R. (1992) *Further-Studies on the Antidiarrheal Activity of Bisnordihydrotoxiferine, a Tertiary Indole Alkaloid in Rodents*. Phytotherapy Research, 6(2): 84-88.
190. Tits, M.; Damas, J.; Quetinleclercq, J.; Angenot, L. (1991) *From Ethnobotanical Uses of Strychnos-Henningsii to Antiinflammatories, Analgesics and Antispasmodics*. Journal of Ethnopharmacology, 34(2-3): 261-267.
191. Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) *Human malaria parasites in continuous culture*. Science, 190: 673-675.
192. Vaidya, H.; Rajani, M.; Sudarsanam, V.; Padh, H.; Goyal, R. (2009) *Antihyperlipidaemic activity of swertiamarin, a secoiridoid glycoside in poloxamer-407-induced hyperlipidaemic rats*. Journal of Natural Medicine, 63: 437-42.
193. Valenciennes, E. (1997) *Etude d'hétérocycles azotés : contribution à l'étude de la réaction d'imino-diols-alder asymétrique et étude de plantes médicinales endémiques et indigènes de l'île de la Réunion.*, Thèse de doctorat, Université de Paris Sud.

194. Wan, A.S.C. and Chow, Y.L. (1964) *Alkaloids of Fagraea fragrans Roxb.* Journal of Pharmacy and Pharmacology, 16: 484-486.
195. Wang, Y. and Hostettmann, K. (1990) *Polyphenols from Psidium trinervia (Asteraceae)* Bulletin de liaison-groupe polyphenols, 15 167-170.
196. Wéry, M. (1995) *Protozoologie médicale.* De Boeck Université, Bruxelles.
197. WHO (2005) *Review of the malaria drug efficacy situation in 10 countries of the WHO Western Pacific Region, 1987 - 2003.*, World Health Organization.
198. WHO (2010) *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010.*, World Health Organization.
199. WHO. *Malaria. Fact sheet N°94.* 2010, World Health Organisation; disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>; consulté en avril 2011.
200. Willcox, M.L.; Graz, B.; Falquet, J.; Diakite, C.; Giani, S.; Diallo, D. (2011) *A "reverse pharmacology" approach for developing an anti-malarial phytomedicine.* Malaria Journal, 10.
201. Wright, C.W. *et al.* (1994) *Selective antiprotozoal activity of some Strychnos alkaloids.* Phytotherapy Research, 8(3): 149-152.
202. Wright, C.W.; Bray, D.H.; Oneill, M.J.; Warhurst, D.C.; Phillipson, J.D.; Quetinleclercq, J.; Angenot, L. (1991) *Antiamoebic and Antiplasmodial Activities of Alkaloids Isolated from Strychnos-Usambarensis.* Planta Medica, 57(4): 337-340.
203. Wright, C.W.; Linley, P.A.; Brun, R.; Wittlin, S.; Hsu, E. (2010) *Ancient Chinese methods are remarkably effective for the preparation of artemisinin-rich extracts of Qing Hao with potent antimalarial activity.* Molecules, 15(2): 804-12.
204. Wright, C.W.; Phillipson, J.D.; Awe, S.O.; Kirby, G.C.; Warhurst, D.C.; QuetinLeclercq, J.; Angenot, L. (1996) *Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydronium bases.* Phytotherapy Research, 10(4): 361-363.
205. Yamahara, J.; Kobayashi, M.; Matsuda, H.; Aoki, S. (1991) *Anticholinergic action of Swertia japonica and an active constituent.* Journal of Ethnopharmacology, 33(1-2): 31-5.
206. Yang, G.M.; Tu, X.; Liu, L.J.; Pan, Y. (2010) *Two new bisindole alkaloids from the seeds of Strychnos nux-vomica.* Fitoterapia, 81(7): 932-6.
207. Yang, X. and Song, C. (2000) *Studies on metabolism of gentiopicroside by rat intestinal flora.* Zhongguo Zhongyao Zazhi, 25(11): 673-676.

# **ANNEXES**



# ANNEXE I : TABLEAUX DETAILLES DES EXPERIENCES IN VIVO

## Extraits MeOH ou DCM des plantes de la Réunion

### Première série

	Témoïn nég. (I.P.)		Chl 4 mg/kg (I.P.)		A.t. MeOH (per os)		P. a. DCM (I.P.)		T.b. MeOH Feuilles (I.P.)		
	200 mg/kg		200 mg/kg		200 mg/kg		200 mg/kg		50 mg/kg		200 mg/kg
Souris	J4	J7	J4	J7	J4	J7	J4	J7	J4	J7	J3
1	59,8	18,9	0,4	13,9	29,7		49,1		54,0		50,0
2	68,2	28,4	1,4	10,3	53,4	15,8	45,3		36,8	8,2	46,8
3	38,5	23,8	2,4	13,5	45,4	21,2	41,0	11,9	12,7	6,4	
4	49,9		1,1	16,1	32,3		40,8	20,7	56,4		
5	39,3		0,7	14,9	5,3	19,1	26,6	7,4	40,2	12,4	
<b>Moyenne</b>	<b>51,1</b>	<b>22,0</b>	<b>1,2</b>	<b>13,7</b>	<b>33,2</b>	<b>18,7</b>	<b>40,5</b>	<b>13,3</b>	<b>40,0</b>	<b>9,0</b>	<b>48,4</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>12,9</b>	<b>7,4</b>	<b>0,8</b>	<b>2,2</b>	<b>18,4</b>	<b>2,7</b>	<b>8,5</b>	<b>6,8</b>	<b>17,4</b>	<b>3,1</b>	<b>2,2</b>

Légende : Parasitémie pour chaque souris encore vivante lors du frottis (en %). Chl = chloroquine ; A.t. = *Aphloïa theiformis* ; P.a. = *Psiadia arguta* ; T.b. = *Terminalia bentzoe*. Frottis le lendemain du dernier traitement (J4) et 3 jours plus tard (J7).

### Deuxième série

Souris	Témoïn nég.		Quinquina MeOH		<i>N. verticillata</i> DCM		<i>P. dentata</i> MeOH		<i>P. dentata</i> DCM	
	J3	J6	J3	J6	J3	J6	J3	J6	J3	J6
1	68,2	24,5	27,1	7,9	50,5	16,8	53,2	11,7	60,5	14,3
2	68,7	31,1	22,0	5,3	47,0	15,0	6,6	23,4	59,6	
3	69,1	18,6	11,0	9,9	43,7		65,4		45,2	12,5
4	69,4	33,9	20,3	16,8	65,6	15,0	53,2	10,3	53,1	10,1
5	62,7	43,8		18,9			32,6	3,7	53,2	
<b>Moyenne</b>	<b>67,6</b>	<b>30,4</b>	<b>20,1</b>	<b>11,7</b>	<b>51,8</b>	<b>15,6</b>	<b>42,2</b>	<b>12,3</b>	<b>54,3</b>	<b>12,3</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>2,8</b>	<b>9,6</b>	<b>6,7</b>	<b>5,8</b>	<b>9,8</b>	<b>1,0</b>	<b>23,1</b>	<b>8,2</b>	<b>6,2</b>	<b>2,1</b>

Légende : Parasitémie pour chaque souris encore vivante lors du frottis (en %). Les extraits ont été administrés à 200 mg/kg par voie intrapéritonéale. Frottis quelques heures après le dernier traitement (J3) et 3 jours plus tard (J6).

**Décoction d'écorce de tronc de *Fagraea fragrans***

Parasitémie	F.f. 50 mg/kg			F.f. 300 mg/kg			Témoin négatif		
	J4	J5	J7	J4	J5	J7	J4	J5	J7
souris 1	64,3	38,8		50,2	28,2		63,2		
souris 2	62,0	27,7		55,8	illisible		52,4	62,3	27,5
souris 3	42,3	17,2	7,4	illisible	illisible				
souris 4	27,1	21,1		50,0	illisible				
souris 5	51,6	34,9		42,3	22,1	7,9	63,1	55,2	28,4
<b>Moyenne</b>	<b>49,5</b>	<b>27,9</b>	<b>7,4</b>	<b>49,6</b>	<b>25,2</b>	<b>7,9</b>	<b>59,6</b>	<b>58,7</b>	<b>28,0</b>
Ecart-type	15,3	9,1		5,5	4,3		6,2	5,0	0,6

Légende : Parasitémie, au 4<sup>e</sup> (J4), 5<sup>e</sup> (J5) et 7<sup>e</sup> (J7) jour après le premier traitement *per os*, pour chaque souris infestée par *P. berghei*. F.f = extrait aqueux de l'écorce de *F. fragrans*.

## ANNEXE II : LA MODELISATION MOLECULAIRE

---

La modélisation moléculaire est l'utilisation de méthodes théoriques de chimie quantique pour obtenir des modèles qui peuvent prédire et comprendre les structures, les propriétés et les interactions moléculaires. Dans notre cas, elle a permis de résoudre des problèmes de stéréochimie des nouvelles molécules isolées en résolvant des problèmes de stabilité énergétique.

La plupart des calculs d'énergie sont réalisés dans le cadre de la mécanique moléculaire sur des systèmes de très grande taille atteignant plusieurs milliers d'atomes. Celle-ci décrit les molécules comme l'assemblage de petites entités dont les paramètres sont tirés de l'expérience comme la force de rappel d'une liaison à partir de la spectroscopie infra-rouge. Dans ce contexte, l'énergie d'un système est calculée comme la somme des contributions de termes décrivant les déviations des distances, des angles de valence et des angles dièdres par rapport à leur valeur à l'équilibre. Par définition, cette approche simple ne peut décrire que des minimas locaux de la fonction d'énergie et non des espèces transitoires comme les points stationnaires que sont les états de transition d'un système en réaction.

Les méthodes de chimie quantique basées sur l'équation de Schrödinger permettent le calcul explicite de la valeur absolue de l'énergie minimum. L'équation de Schrödinger décrit le mouvement d'un ensemble d'électrons et d'atomes sous la forme d'une équation d'onde. Une des premières méthodes décrites pour résoudre cette équation est la méthode de Hartree-Fock qui décompose la fonction d'onde en produit de fonctions mono-électroniques.

La plupart des méthodes utilisées aujourd'hui dans le cadre Hartree- Fock (HF) repose sur deux approximations majeures. La première est celle dite du modèle de l'électron indépendant considérant chaque électron plongé dans le champ électrique généré par tous les autres. Cette approche a des conséquences immédiates : pour connaître ce champ, il faut savoir quelle est la distribution électronique qui rend l'énergie minimum. La résolution de l'équation prenant en compte les contributions des interactions cinétiques et potentielles électrons-électrons et électrons-noyaux sera donc obtenue par itérations successives « affinant » à chaque pas la qualité du champ dans lequel chaque électron est plongé. Dans ce cadre, le principe de Pauli basé sur le fait que deux électrons de même spin ne peuvent occuper le même domaine de probabilité de présence n'empêche pas que deux électrons de spin opposé soient très proches : la répulsion électronique est donc surestimée. Cette différence entre l'énergie exacte (non connue) et l'énergie calculée est appelée énergie de corrélation puisque le mouvement de chaque électron n'est pas corrélé avec celui de chacun des autres, mais est lié à leur champ moyen. La seconde approximation est liée à la forme donnée aux domaines de probabilité dans lesquels les électrons se meuvent. Ce domaine, étant en théorie infini, a pris tout naturellement la forme de celui des orbitales atomiques connues analytiquement en combinant leurs contributions pour former les orbitales moléculaires doublement occupées par les électrons. Cette base de fonctions peut être minimale

(pour le carbone : une fonction 1s, une fonction 2s, 3 fonctions 2p (suivant X, Y et Z)), double, triple, quadruple...

Grâce aux progrès de l'analyse numérique et des procédés d'intégration de fonctions, la théorie de la « densité fonctionnelle » (DFT) a une approche différente de celle de Hartree-Fock puisqu'elle envisage comme point de départ du processus de recherche des orbitales moléculaires, la densité électronique globale du système, et non plus le modèle de l'électron indépendant. D'emblée, elle prend donc en compte une part significative de la corrélation électronique. Plus d'une centaine de fonctionnelles (fonction de fonction) sont disponibles aujourd'hui.

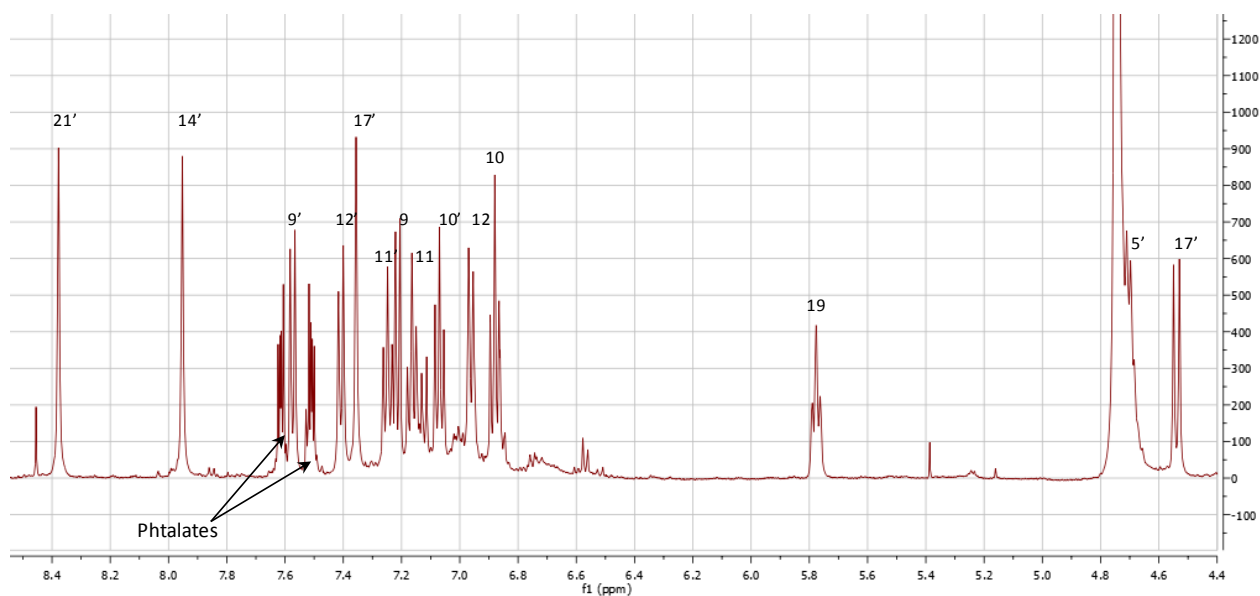
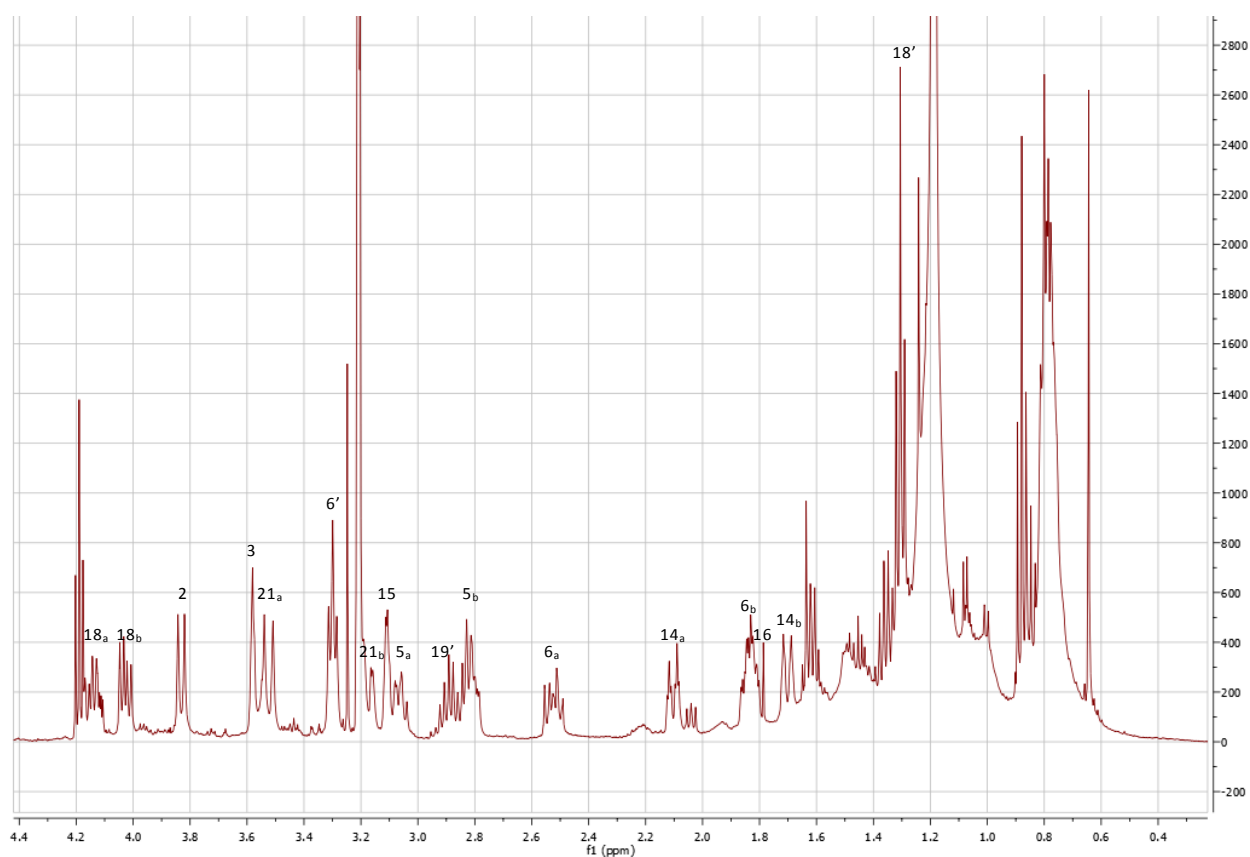
Les deux types de méthodes de calcul HF et DFT fournissent la valeur absolue de l'énergie d'un ensemble d'atomes formant une molécule à une géométrie donnée. L'optimisation de géométrie a pour but de rechercher les différents arrangements possibles conduisant à des points stationnaires comme différents conformères ou des structures à l'état de transition, points où la dérivée première de la fonction d'énergie est nulle dans toutes les directions données par les distances interatomiques, les angles de valence et les angles dièdres.



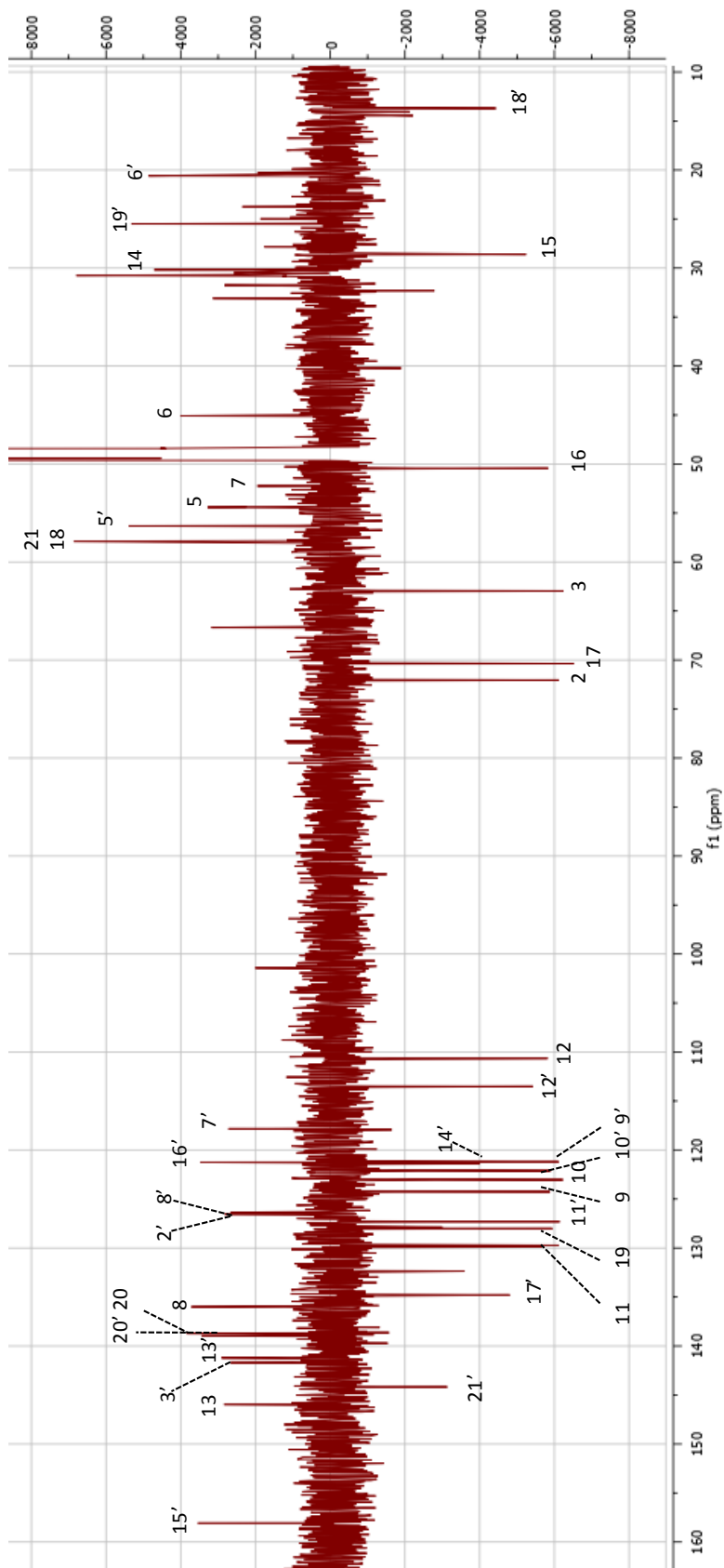
# ANNEXE III : QUELQUES SPECTRES RMN DES ALCALOÏDES BISINDOLIQUES ISOLES

## Spectres RMN de la strychnochrysine (OR1)

Spectre  $^1\text{H}$  mesuré dans le méthanol deutéré

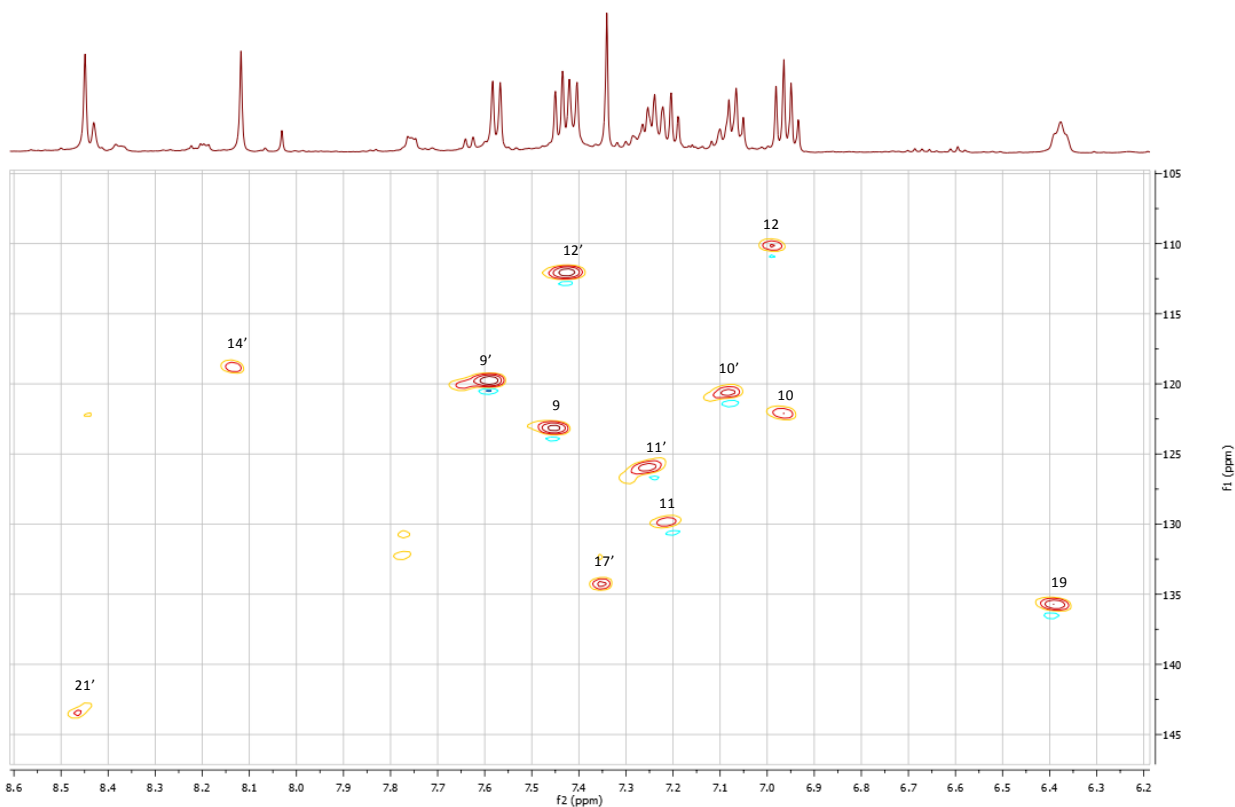
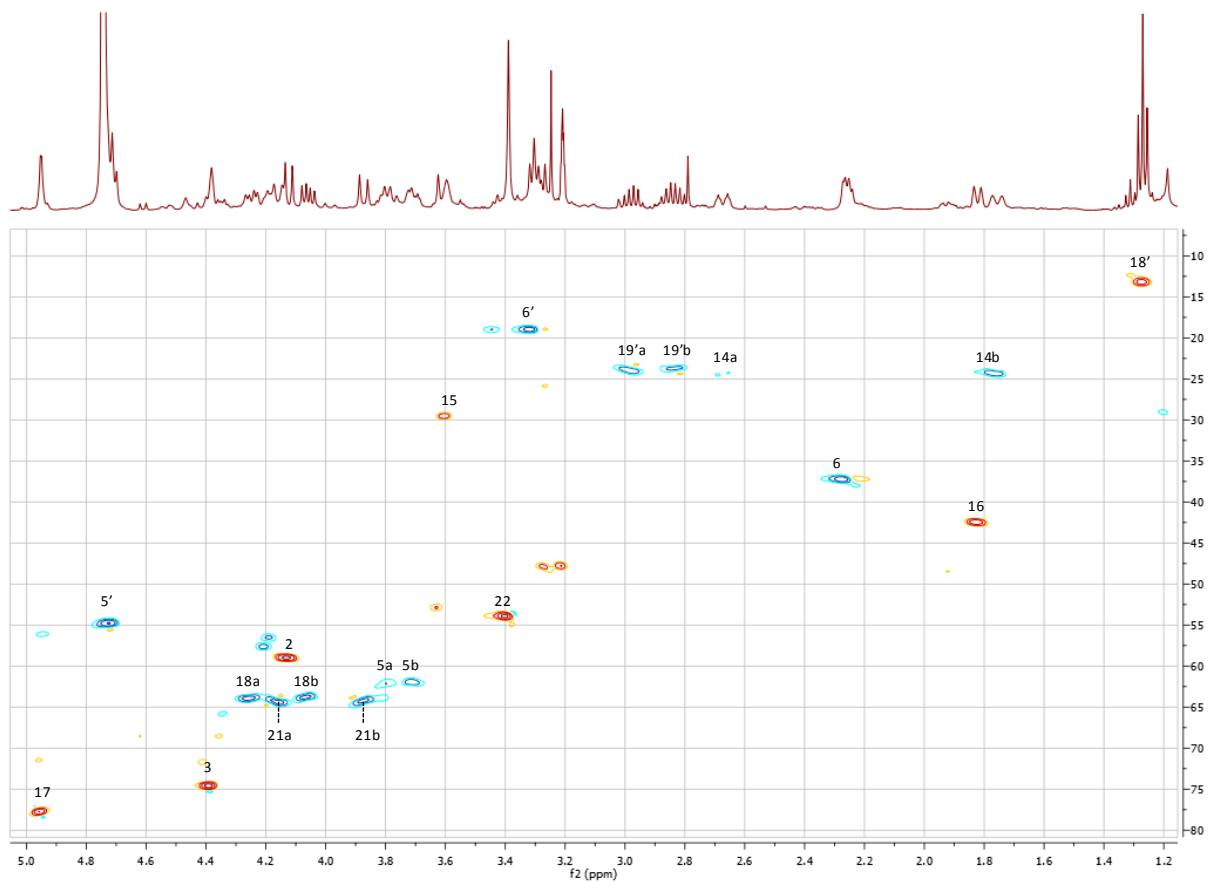


Spectre  $^{13}\text{C}$  - APT (Attached Proton Test) mesuré dans le méthanol deutéré



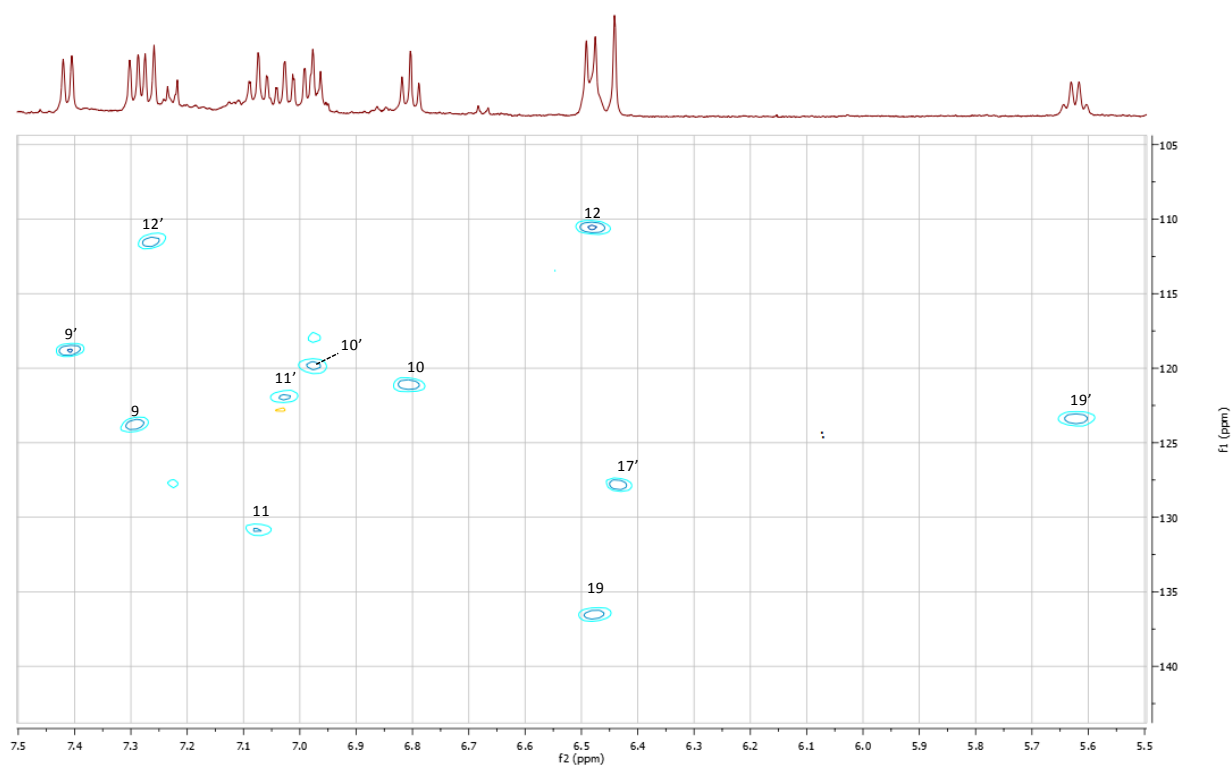
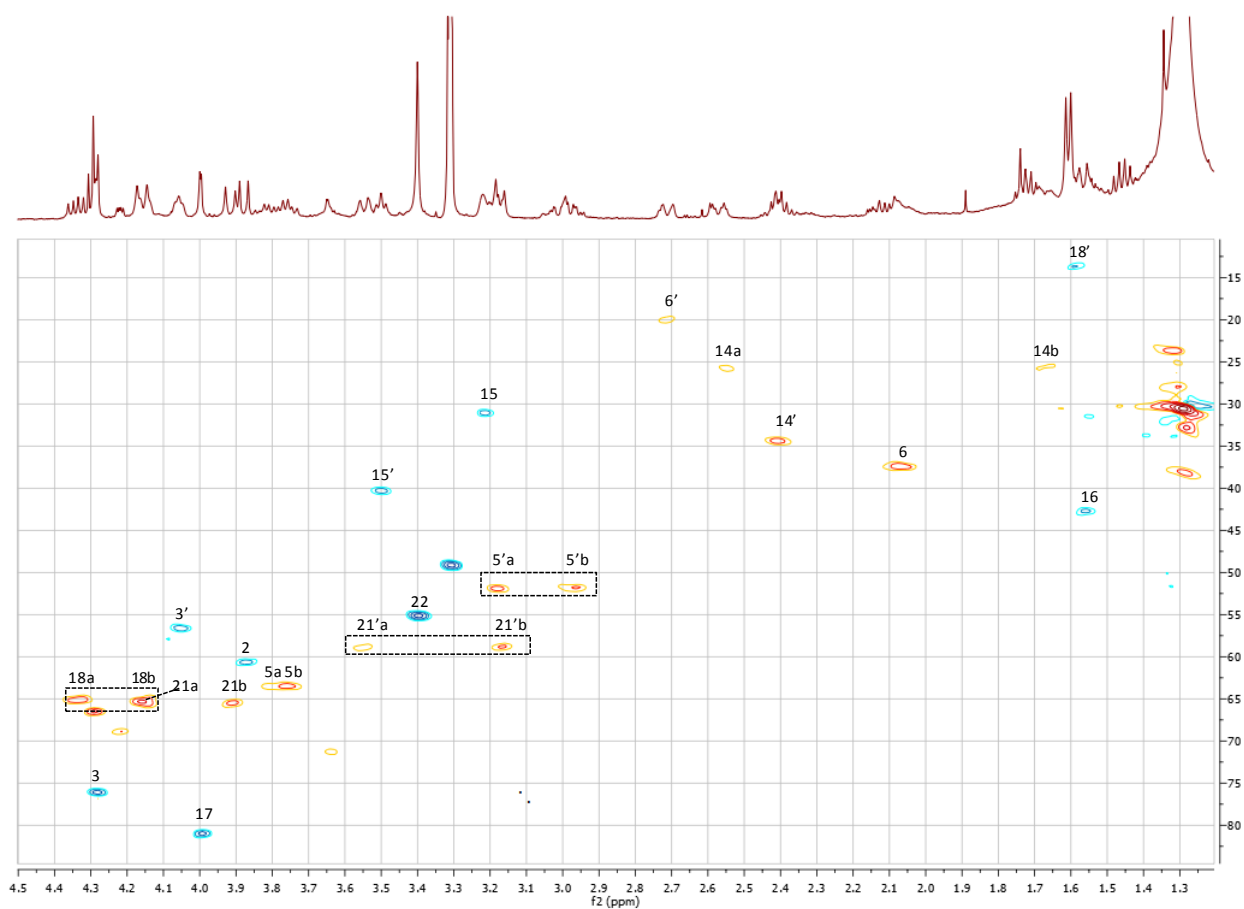
## Spectre RMN de la déméthoxyguaiaflavine (OR2)

Spectre HSQC mesuré dans le méthanol deutéré

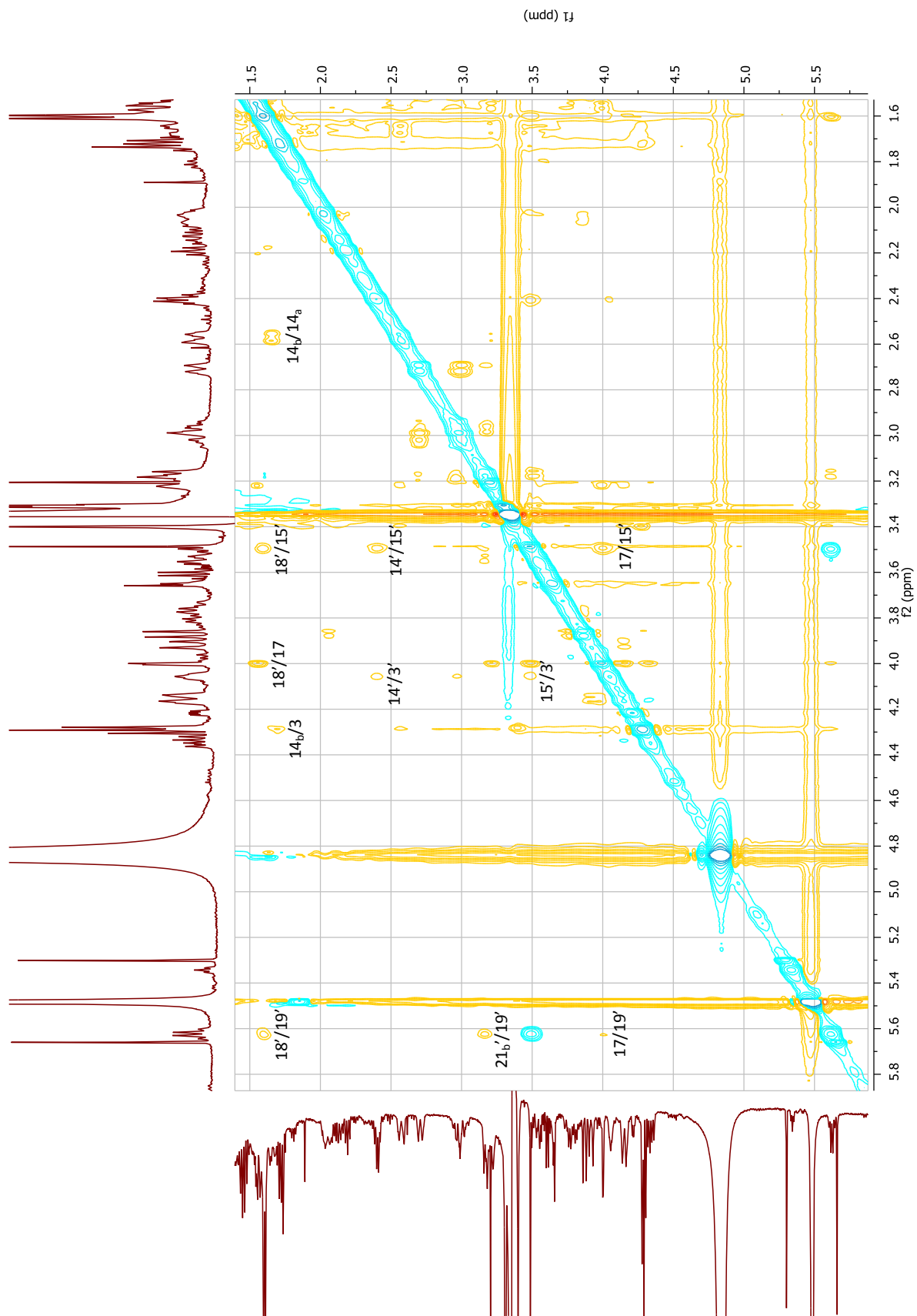


### Spectres RMN de la N<sub>b</sub>-méthyl-longicaudatine (BL1)

Spectre HSQC mesuré dans le méthanol deutéré



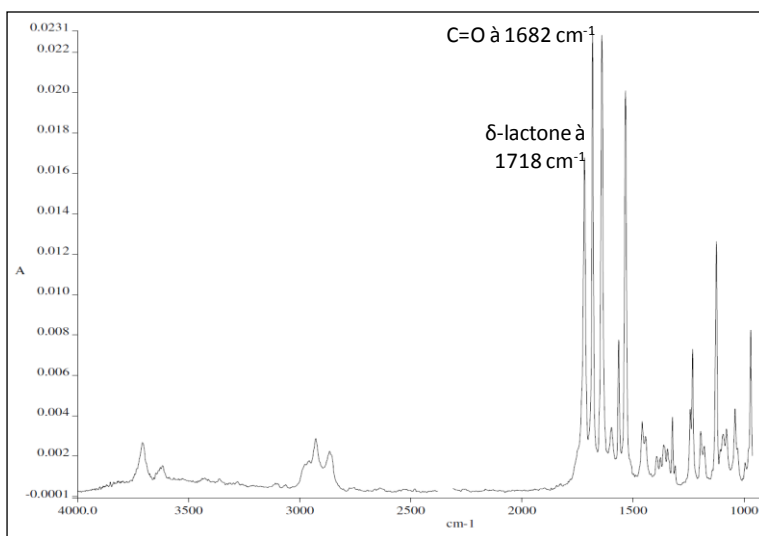
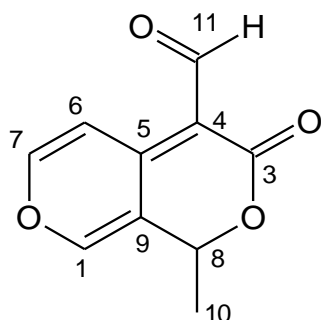
Spectre NOESY mesuré dans le méthanol deutéré



## ANNEXE IV : FICHES ANALYTIQUES DES TROIS COMPOSES ISOLES POUR LA PREMIERE FOIS DANS LE REGNE VEGETAL

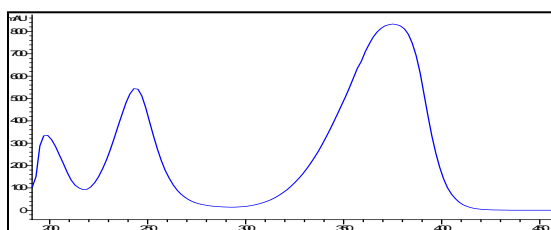
---

- 1) Le **fagraldéhyde**, séco-iridoïde isolé à partir de l'écorce de tronc de *Fagraea fragrans* Roxb. (Gentianaceae).
  
- 2) La **N<sub>b</sub>-méthyl-longicaudatine**, alcaloïde bisindolique isolé à partir de l'écorce de tronc de *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae)
  
- 3) La **déméthoxyguiaflavine** alcaloïde bisindolique isolé à partir de l'écorce de tronc de *Strychnos nux-vomica* L. (Loganiaceae)

**Fiche analytique : fagraldéhyde**

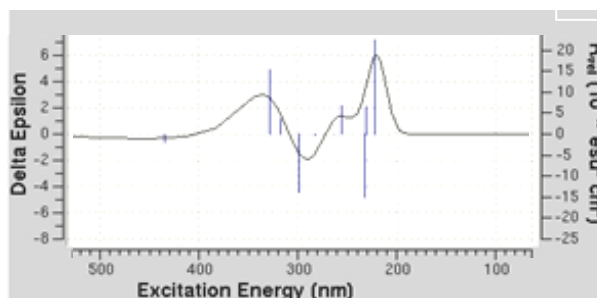
Spectre IR mesuré dans le tétrachloroéthylène.

N°	$\delta_H$ (J en Hz)	HSQC	COSY H/H corr.	NOESY H/H corr.	$\delta_c$	HMBC C→H corr.
1	7,61 (d, 1,4)	CH	8	8, 10	146,9	7, 8
3		Cq			165,6	8, 10, 11
4		Cq			104,0	11, 6
5		Cq			145,0	7, 11, 1, 8, 10
6	8,37 (d, 5,7)	CH	7	7	109,2	7
7	7,63 (d, 5,7)	CH	6	6	153,4	1, 6
8	5,27 (qd, 6,5; 1,4)	CH	10, 1	1, 10	70,5	10, 1
9		Cq			121,2	1, 8, 6, 10, 11
10	1,70 (d, 6,5)	CH <sub>3</sub>	8	8, 1,11	19,8	8
11	10,22 (s)	CH		10	190,8	

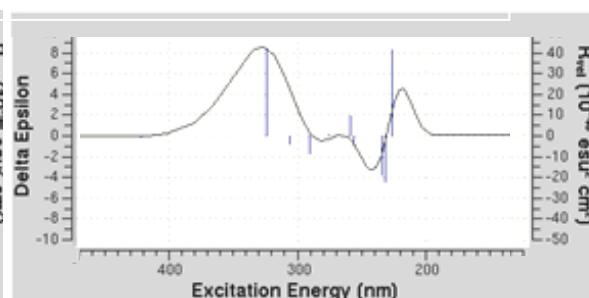
Données RMN mesurées dans le CDCl<sub>3</sub>.

Masse moléculaire =  
192,04 Da

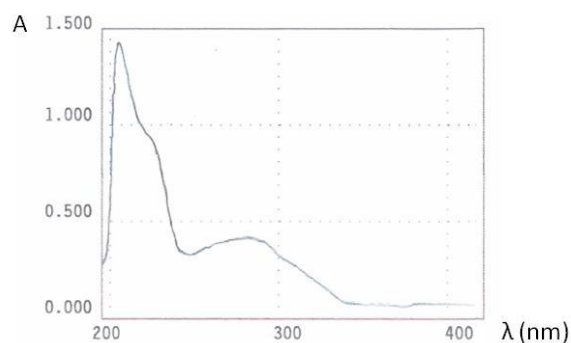
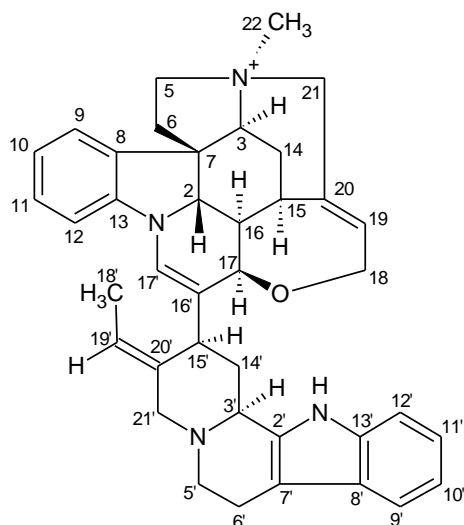
Spectre UV (MeOH) : 205, 241, 368 nm.



Spectre DC calculé de la configuration R.

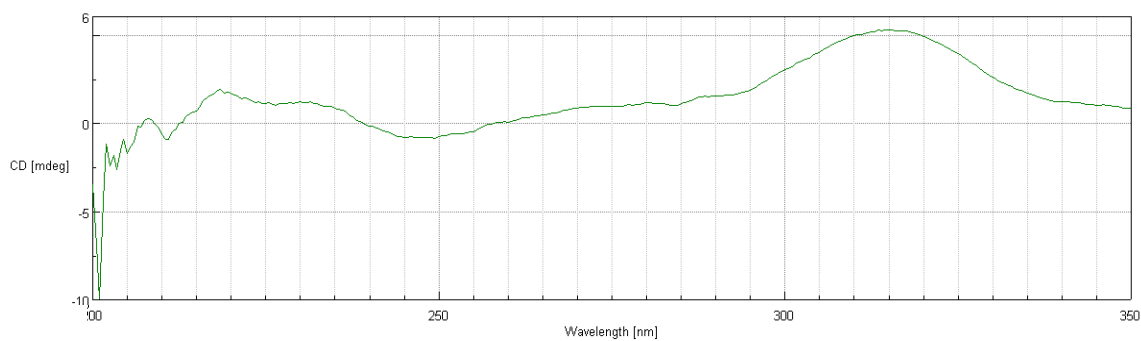


Spectre DC calculé de la configuration S

**Fiche analytique : Nb-méthyl-longicaudatine**

Spectre UV (MeOH) : 205, 224, 283 nm

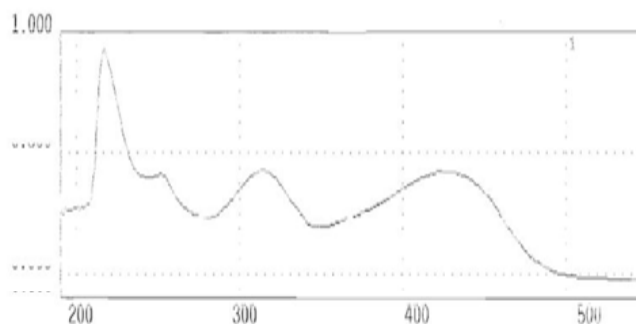
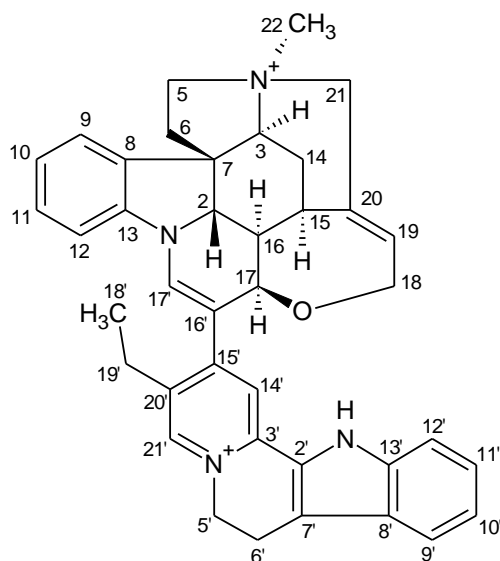
Masse moléculaire : 583,34 Da

Spectre DC (MeOH)  $\Delta\epsilon_{nm}$  :  $\Delta\epsilon_{218} = +1,406$  ;  $\Delta\epsilon_{248} = -0,627$  ;  $\Delta\epsilon_{314} = +3,912$ .

N°	$\delta_H$	$\delta_C$	N°	$\delta_H$	$\delta_C$	N°	$\delta_H$	$\delta_C$
2	3,88 (d)	60,67	16	1,57	42,74	8'		128,40
3	4,28	76,12	17	4,00 (d)	80,99	9'	7,41 (d)	118,84
5a	3,80	63,46	18a	4,16	65,12	10'	6,98 (t)	119,90
b	3,76	63,46	b	4,34	65,12	11'	7,03 (t)	121,94
6	2,09	37,38	19	6,48	136,6	12'	7,27 (d)	111,56
7		53,15	20			13'		137,63
8		129,01	21a	3,91 (d)	65,45	14'	2,41	34,39
9	7,29 (d)	123,91	b	4,15	65,45	15'	3,50 (t)	40,29
10	6,80 (t)	121,17	22	3,40	55,10	16'		120,98
11	7,07 (t)	130,07	2'		135,87	17'	6,44 (s)	127,84
12	6,48 (d)	110,52	3'	4,06	56,61	18'	1,61	13,72
13		147,95	5'a	3,18	51,85	19'	5,62 (q)	123,40
14a	2,57	25,82	b	2,99	51,85	20'		136,47
b	1,72	25,82	6'	2,71	20,08	21'a	3,55	58,87
15	3,21	31,08	7'			b	3,17	58,87

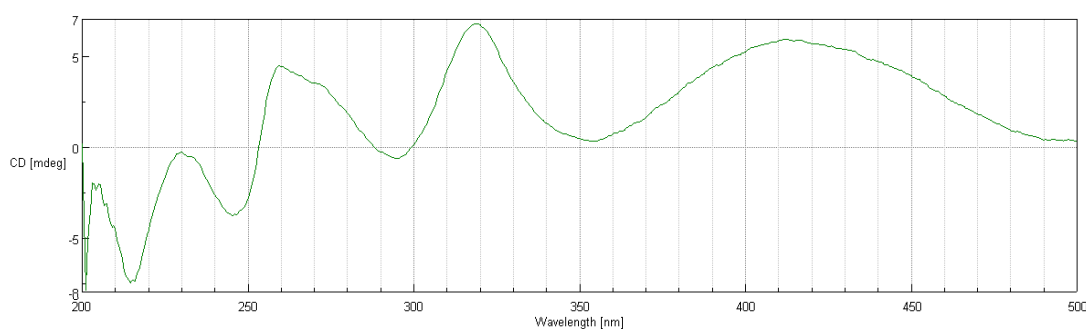
Données RMN 1D (MeOD),  $\delta$  en ppm.



**Fiche analytique : Déméthoxyguiaflavine**

Spectre UV (MeOH) : 217, 252, 314 et 427 nm.

Masse moléculaire : 579,31 Da

Spectre DC (MeOH)  $\Delta\epsilon_{nm}$  :  $\Delta\epsilon_{216} = -4,118$  ;  $\Delta\epsilon_{245} = -2,115$  ;  $\Delta\epsilon_{259} = +2,473$  ;  $\Delta\epsilon_{294} = -0,369$  ;  $\Delta\epsilon_{319} = +3,775$  ;  $\Delta\epsilon_{412} = +3,294$ .

N°	$\delta_H$	$\delta_C$	N°	$\delta_H$	$\delta_C$	N°	$\delta_H$	$\delta_C$
2	4,12 (d)	60,60	16	1,82	44,11	9'	7,57 (d)	121,31
3	4,38	76,23	17	4,95 (d)	79,32	10'	7,07	122,24
5a	3,79	63,68	18a	4,25	65,49	11'	7,25	127,44
b	3,71	63,68	b	4,06	65,49	12'	7,41 (d)	113,59
6	2,26	38,80	19	6,38 (t)	137,35	13'		141,31
7		54,11	20		135,18	14'	8,12 (s)	120,44
8		130,68	21a	4,16 (d)	65,81	15'		158,02
9	7,44 (d)	124,68	b	3,87 (d)	65,81	16'		115,87
10	6,95	123,81	22	3,39	55,60	17'	7,34 (s)	135,87
11	7,20	131,54	2'		126,64	18'	1,27	14,88
12	6,97	111,79	3'		141,70	19'a	2,98 (m)	25,52
13		146,10	5'	4,71	56,45	19'b	2,84 (m)	25,52
14a	2,67(dt)	25,94	6'	3,29	20,63	20'		139,09
b	1,75 (d)	25,94	7'		118,23	21'	8,45 (s)	145,11
15	3,60	31,25	8'		126,42			

Données RMN 1D (MeOD) ;  $\delta$  en ppm.

## ANNEXE V : PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

---

### Posters

“Evaluation of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activities” MC\_Jonville, H Kodja, L Humeau, J Fournel, A Chariot, P De Mol, M Cao, L Angenot, M Frédérick. 7<sup>th</sup> Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 3-8 août 2008, Athènes, Grèce. **Planta Medica** (2008) 9 (74): 1002

“Anti-inflammatory potency of the traditionally used antimalarial plant *Fagraea fragrans*” MC\_Jonville, B Baghdikian, E Ollivier, L Angenot, M Frédérick, J Legault. 58<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 29 août- 2 septembre 2010, Berlin, Allemagne. **Planta Medica** (2010) 12 (76): 1171

### Publications

“Approche ethnopharmacologique de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Cambodge dans le traitement des maladies infectieuses, des fièvres et du paludisme” S K Cheng, A Chea, S Hout, SS Bun, MC Jonville, G Balansard, P Timon-David, **Ethnopharmacologia** (2007) 40 : 56-70

“Fagraldehyde, a Secoiridoid Isolated from *Fagraea fragrans*” MC Jonville, M Capel, M Frederich, L Angenot, G Dive, R Faure, N Azas, and E Ollivier, **Journal of Natural Products** (2008) 71(12): 2038-40

“Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity” MC Jonville, H Kodja, L Humeau, J Fournel, P De Mol, M Cao, L Angenot , M Frédérick, **Journal of Ethnopharmacology** (2008) 120: 382–386

“Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic assays on plants from Mascareignes Archipelago” MC Jonville, H Kodja, A Pichette, E Ollivier, D Strasberg, M Frédérick, L Angenot, J Legault, **Journal of Ethnopharmacology** (2011) 136 : 525-531



# Evaluation of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity

Jonville MC<sup>1</sup>, Kodja H<sup>2</sup>, Humeau L<sup>2</sup>, Fournel J<sup>2</sup>, Chariot A<sup>3</sup>, De Mol P<sup>4</sup>, Cao M<sup>1</sup>, Angenot L<sup>1</sup>, Frédérick M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Liège, CIRM, Laboratory of Pharmacognosy (B36), Av de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium  
<sup>2</sup>Université de la Réunion, UMR PVBMT, Av René Cassin, 15, BP7151, 97717 Saint Denis, France  
<sup>3</sup>Université de Liège, GIGA-R, Laboratory of Medical Chemistry (B34), Av de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium  
<sup>4</sup>Université de Liège, CIRM, Laboratory of Medical Microbiology (B23), Av de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium



7<sup>th</sup> Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. Athens, 3-8 August 2008

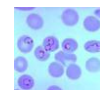
Abstract N°

## INTRODUCTION

This study was led with the aim of providing original antimalarial agents to thwart the parasite drug resistance. There are still many plants that have not been analyzed phytochemically and that are seriously endangered, especially in tropical flora. To prevent the extermination of valuable species it is important to report the usefulness of plants in medicine and to prove their action. Up to 30 % of the vegetation on Reunion Island is endemic and could contain new antiplasmodial compounds. Therefore, 9 plants from this island, selected using ethnopharmacology and chemotaxonomy, were investigated for their potential antimalarial activity.

*In vitro* antiplasmodial activity classified as followed (4,6) :

- IC<sub>50</sub> ≤ 15 µg/ml, promising activity
- IC<sub>50</sub> = 15-50 µg/ml, low activity
- IC<sub>50</sub> > 50 µg/ml, inactive



IC<sub>50</sub> = plant extract concentration capable of inhibiting 50 % of the *Plasmodium falciparum*

Description of the selected plants from Reunion Island used to treat fever and malaria

Species (Family)	Endemicity	Population (altitude)	Drying procedure	Plant part
<i>Aphloia theiformis</i> (Vahl) Benn. (Aphloiaceae)	/	Plaines des Fougères (1200m) La montagne (650 m)	Freeze-dried Freeze-dried	Leaves (1) Leaves (2) Bark
<i>Buddleja salvi folia</i> (L) Lam (Loganiaceae)	/	Plaine des Fougères (1200 m)	Freeze-dried	Flowers Leaves Bark
<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl (Asteraceae)	/	Saint-André (100m)	Freeze-dried	Aerial part
<i>Geniostoma barbonicum</i> Spreng. (Loganiaceae)	Reunion	Plaine des Palmistes (1000 m) Grand Etang (500 m)	Freeze-dried Freeze-dried	Bark Leaves (1) Leaves (2)
<i>Justicia gendarussa</i> Burm f. (Acanthaceae)	/	Saint-André (100 m)	Freeze-dried	Aerial part
<i>Lantana camara</i> L. (Verbenaceae)	/	La montagne (650 m) La montagne (650 m)	Freeze-dried Freeze-dried	Leaves « pink flower » (1) Leaves « orange flower » (2)
<i>Nuxia verticillata</i> Lam. (Loganiaceae)	Reunion Mauritius	Mare longue (350m) La montagne (650 m)	Freeze-dried Air-dried	Leaves (1) Leaves (2) Bark
<i>Psidium arguta</i> Voigt (Asteraceae)	Mauritius	Fac des Sciences (75 m)	Freeze-dried	Leaves
<i>Terminalia bentzoe</i> L. (Combretaceae)	Reunion	Fac des Sciences (75 m) Fac des Sciences (75 m)	Freeze-dried Air-dried	Leaves (1) Leaves (2)

Areas of plant's collection: I. Plaine des Fougères; II. La Montagne; III. Saint-André; IV. Plaine des palmistes; V. Grand Etang; VI. Mare longue; VII. Fac des Sciences



Plants kept for further investigations:

*Nuxia verticillata* Lam.



The leaves of this tree contain flavonoids, saponins, tannins<sup>(6)</sup>.

*Terminalia bentzoe* L.



The bark is traditionally used against diarrhea and dysentery, and as a sudorific<sup>(6)</sup>.

*Aphloia theiformis* (Vahl) Benn.



In Reunion, the tree is used to treat fever, pains, malaria, inflammation, and as a depurative. In Mauritius, the leaves are used as a febrifuge<sup>(6)</sup>. The leaves contain saponins, xanthone (aphloiol)<sup>(6)</sup>.

## METHODOLOGY

• **Plant extracts:** 5 g of plant powder was macerated 3 times in 50 ml solvent for 30 min with constant shaking and evaporated to dryness.

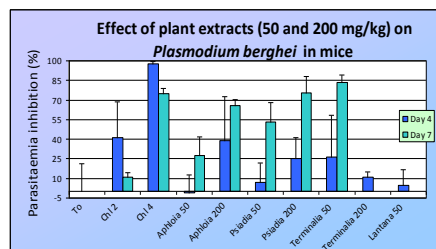
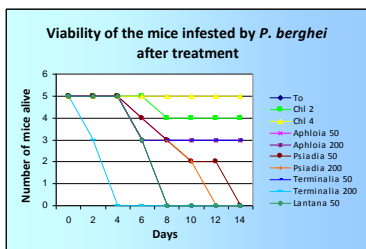
• ***In vitro* antiplasmodial assays:** continuous cultures of *Plasmodium falciparum*, chloroquine sensitive (3D7) and resistant (W2) strains, were assessed following the procedure already described in Frédérick et al. (6). Each extract sample was applied in a series of eight 3-fold dilutions (0.09 - 200 µg/ml) on 2 rows of a 96-well microplate and was incubated with a parasitic suspension (Hematocrit= 1%, parasitaemia = 2%) for 48h at 37°C, under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Parasite growth was estimated by determination of lactate dehydrogenase activity as described by Kenmogne et al. (6).

• ***In vitro* cytotoxic assays:** human normal fetal lung fibroblasts (WI-38) were maintained in continuous culture in a humid atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium. After 24h incubation of a 96-well microplate seeded with 200 µl medium containing 8000 cells/well, the medium was replaced by six 3-fold dilutions of plant extract (0.82-200 µg/ml). After 48h incubation, cell viability was determined by colorimetric method using WST-1 cleaved by cellular enzymes (absorbance at 450 nm).

• ***In vivo* antiplasmodial assays,** based on the 4-day suppressive test of Peters<sup>(4)</sup>: Female Swiss mice (5 mice/group) were infested by *Plasmodium berghei* NK173 4h before treatment. Treatment doses (50 and 200 mg/kg of plant extract) were given intraperitoneally once daily from Day0 to Day3. On Day 4 and 7, thin mouse tail blood smears were prepared and stained with Giemsa. Parasitaemia was determined counting at least 500 erythrocytes under microscope. Mortality was controlled during 15 days. Chloroquine (Chl) at 2 and 4 mg/kg doses was used as a positive control and physiological serum (T0) was used as a negative control.

IC<sub>50</sub> values expressing promising therapeutic activity toward *P. falciparum* (3D7 and W2 strains) and Selectivity Index (SI) corresponding to the ratio between cytotoxic (WI-38) and antiparasitic (W2) activity.

Species	Plant part	Extract	Yield (%)	3D7, IC <sub>50</sub> (µg/ml)	W2, IC <sub>50</sub> (µg/ml)	WI-38, IC <sub>50</sub> (µg/ml)	SI
<i>Aphloia theiformis</i>	Bark	MeOH	12.5	13.3 ± 0.8	11.0 ± 3.1	58.3 ± 5.5	5.3
<i>Lantana camara</i>	Leaves (1)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.7	8.7 ± 1.0	5.7 ± 1.6	69.5 ± 12.1	12.2
	Leaves (2)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.8	14.1 ± 8.4	12.2 ± 2.9	97.2 ± 2.4	7.9
<i>Nuxia verticillata</i>	Leaves (2)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5.1	10.9 ± 1.8	8.8 ± 1.2	33.7 ± 6.5	3.8
<i>Psidium arguta</i>	Leaves	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	16.0	10.1 ± 1.2	8.4 ± 1.1	16.3 ± 6.3	1.9
<i>Terminalia bentzoe</i>	Leaves (2)	MeOH	21.8	12.8 ± 2.9	12.8 ± 3.5	133.4 ± 26.2	10.4



## CONCLUSION


In the end, 2 plants showed interesting antimalarial activity with good selectivity: *Aphloia theiformis* and *Terminalia bentzoe*. *Nuxia verticillata* still needs to be tested *in vivo*, with a new batch of plant material. *Psidium arguta* seems to be toxic; people should be careful when using the extracts of this medicinal plant. Later on, bioguided chromatographic fractionation will be used to isolate the compounds responsible for the activity.

## References

a. Frédérick M., Jacquier M.J., Thepenier P., De Mol P., Tits M., Philippe G., Delaude C., Angenot L., Zeches-Hanrot M. (2002) Antiplasmodial activity of alkaloids from various *Strychnos* species. *Journal of Natural Products* 65, 1381-1386.  
 b. Kenmogne M., Prost E., Harakat D., Jacquier M.J., Frédérick M., Sondengam L.B., Zeches M., Waffo-Toguo P. (2006) Five labdanol diterpenoids from the seeds of *Aframomum zambesiacum*. *Phytochemistry* 67, 433-438.  
 c. Fidock D.A., Rosenthal P.J., Croft S.L., Brun R., Nwaka S. (2004) Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Reviews Drug Discovery* 3, 509-520.  
 d. Philippe G., Angenot L., De Mol P., Goffin E., Hayette M.P., Tits M., Frédérick M. (2005) *In vitro* screening of some *Strychnos* species for antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 535-539.  
 e. Pink R., Hudson A., Mouries M.A., Bendig M. (2005) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 4, 727-740.  
 f. Fougères R., Buffard G., Desconclois J.F., Jehanno A., Provost J., Tibergien R., Touche A. (1981) Etudes phytochimiques et activités biologiques des plantes endémiques de l'île de la Réunion et de l'île Maurice. *Plantes médicinales et phytothérapie* 15, 80-91.  
 g. Lavergne R. (1983) Fleurs de Bourbon, Tome 8. Cazal (Eds), Saint-Denis, La Réunion, p.288.  
 h. Lavergne R., Véra R. (1989) Etude ethnobotanique des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle à la Réunion. Agence de Coopération Culturelle et Technique, Paris, p. 238.  
 i. Lavergne R. (2004) Plantes médicinales réunionnaises. Available at [http://chring.club.fr/lavergne\\_medicine.html](http://chring.club.fr/lavergne_medicine.html). Accessed Nov. 20, 2007.

**Acknowledgements:** the Belgian Fund for Scientific Research (FNRS, grant N° 3452005) and the Ministère d'Outre-Mer Français (MOM N° 06REU5) are greatly acknowledged. M.F. is research associate from the FNRS.

**Corresponding author:** Tel +3243664336, Fax +3243664332, E-mail address: MC.Jonville@ulg.ac.be




Université de Liège

## Anti-inflammatory potency of the traditionally used antimalarial plant *Fagraea fragrans*

**Jonville M<sup>C</sup>, Baghdikian B<sup>2</sup>, Ollivier E<sup>2</sup>, Angenot L<sup>1</sup>, Frédéric M<sup>1</sup>, Legault J<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Université de Liège, CIRN, Laboratoire de Pharmacognosie (B36), Av de l'Hôpital, 1, 4000 Liège, Belgium  
<sup>2</sup>Laboratoire de Pharmacognosie, EA 864, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France  
<sup>3</sup>Université du Québec à Chicoutimi, Laboratoire LASEVE, Bld. de l'Université, 555, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H2B1



Berlin, Germany  
29 August – 2 September 2010

*Fagraea Fragrans* Roxb. (Gentianaceae), distributed in Southeast Asia, is an evergreen tree that grows up to 25 m in open and swampy lowland forests. The trunk has a deeply fissured dark brown bark and a heavy, durable hardwood that is often used locally in construction and furniture. The leaves are simple, opposite with oblanceolate shape and the apex is broadly acuminate.

Medicinal uses of this plant have been reported in various regions where it grows. The bark is used to treat malaria in India, Cambodia, and Malaysia, and used as a febrifuge in Philippines. The leaves are used to control dysentery in Malaysia and Cambodia and to wash scabies in Cambodia. (1,2)

The plant was selected on the basis of an ethnobotanical survey in Cambodia, according to local population knowledge to treat fever. Previous to our work, only the presence of gentiopicroside was reported (3) and no pharmacological assays were described.

**Aim of the study:** to prevalidate the traditional use in infectious disease using antiplasmodial and anti-inflammatory *in vitro* assays, and to possibly identify the active compounds.

**Classification of the *in vitro* activities and IC<sub>50</sub> values (µg/ml) of the controls used:**

Activities	Anti-plasmodial	Cytotoxic	Anti-inflammatory
Promising activity	< 15 µg/ml	< 50 µg/ml	< 50 µg/ml
Moderate activity	15-50 µg/ml	50-100 µg/ml	50-130 µg/ml
Inactive	> 50 µg/ml	> 100 µg/ml	>130 µg/ml
Controls	Artemisinin: 0.006	Etoposide: 18	L-NAME: 129


**METHODOLOGY**

**Phytochemical methods:** seco-iridoids were isolated from methanol extracts (MeOH) by silica gel column chromatography using EtOAc/MeOH (80:15) as mobile phase. The mobile phase for isolating fagraldehyde was EtOAc/MeOH (100→90: 0 → 10) gradient. Structure determinations are described in Jonville *et al.*, 2008 (4). Bark dichloromethane (DCM) extract was fractionated using silica gel column chromatography using a gradient of EtOC/MeOH (99→60: 1 → 40). Leaves dichloromethane (DCM) extract was fractionated by CPC (centrifugal partition chromatography) using the solvent system of heptane/DCM/MeCN (5:1:4).

***In vitro* pharmacological methods** described in Jonville *et al.*, 2010 (5). Briefly, antiplasmodial assays (**Plas**) against 3D7 chloroquine sensitive strains were evaluated by the lactate dehydrogenase method; cytotoxicity assays (**Cyto**) on WS1 human skin fibroblast were estimated by determination of mitochondrial oxidoreductase activity with resazurin (fluorometric method); anti-inflammatory assays (**Infl**) were assessed by calculating the inhibition of Nitric Oxide (NO) overproduction on LPS-stimulated murine macrophages Raw 264.7. All the activities are expressed in IC<sub>50</sub> (µg/ml).




○ Area of plant collection



MeOH Extract		
Plas	Cyto	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 100	> 130

DCM Extract		
Plas	Cyto	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 100	126



MeOH Extract		
Plas	Cyto	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 100	> 130

DCM Extract		
Plas	Cyto	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 100	119

Fractions	1	2	3	4	5
Plas, IC <sub>50</sub> (µg/ml)	41	36	16	38	38

Sub-fractions	Cyto	Infl
3a	> 100	70
3b	> 100	19
3c	> 100	37
3d	> 100	39

Gentiopicroside	
Plas	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 130

Sweroside	
Plas	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 130

Sub-fractions	Cyto	Infl
2a	> 100	35
2b	> 100	114

Fagraldehyde	
Plas	Infl
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	> 130

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IC <sub>50</sub> (µg/ml)	12	18	19	41	40	37	> 100	48	9

**DISCUSSION**

The isolation of sweroside, swertiamarin and the novel secoiridoid aglycone, fagraldehyde extends the phytochemical knowledge of *Fagraea fragrans*. They could be used for quality control of the plant. In the genus *Fagraea*, only two species had a pharmacological activity described: *F. blumei* contains iridoid glucoside with free radical scavenging properties (6), and *F. racemosa* possesses lignans with analgesic properties (7).

The preliminary antiplasmodial promising activity of the dichloromethane extracts could be due to synergy of minor compound. In fact, the fractionation did not lead to an increase of activity.

However, the non-polar fractions obtained had unexpected high inhibition of nitric oxide overproduction, especially the leaves fractions. It could be valuable to purify the active compound(s), probably terpenoids, and also to perform other anti-inflammatory assays to validate the use of the leaf extract.

In fact, although swertiamarin had no activity in our assay, it shows similar results to positive control (diclofenac sodium) on carrageenan and formalin-induced paw oedemas in rats (8).

In this study, the cytotoxic results allow to predict the selectivity of the anti-plasmodial or anti-inflammatory activity observed.

**CONCLUSION**

*Fagraea fragrans* purified extract expressed *in vitro* anti-inflammatory potential. As inflammation is a complex mechanism involving a series of signalling events, various assays could be carried out to test the safety and efficacy of the extract that could lead to the later development of improved traditional drugs (ITD) more affordable to tropical population than pure compounds.

Nevertheless pure compounds are useful to determine the chemical fingerprint of the species employed for quality control. The leaf fractions will then be purified to provide tracers or to determine active compounds.

**Acknowledgements:** the Belgian National Fund for Scientific Research (FNRS) (grant N° 3452005) and the Samuel de Champlain convention between France and Quebec (n° 62 103) are greatly acknowledged.

**Références**

- Perry L.M. and Metzger J. (1980) Medicinal Plants of East and Southeast Asia: Attributed Properties and Uses. The MIT Press, Cambridge, MA, USA and London, England, p. 243
- Wan, A.S.C. and Chow, Y.L.(1964) Alkaloids of *Fagraea fragrans* Roxb. J. Pharm. Pharmacol. 16, 484-486.
- Natarajan, P.N. *et al.* (1974) Antimalarial, antiamoebic and toxicity tests on gentianine. Planta Med. 25, 258-260.
- Jonville, M.C. *et al.* (2008) Fagraldehyde, a secoiridoid isolated from *Fagraea fragrans*. J. Nat. Prod. 71, 2038-2040.
- Jonville M.C. *et al.* (2010) Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago. J. Ethnopharmacol. In Press (doi:10.1016/j.jep.2010.06.13).
- Cuendet M. *et al.* (1997) Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. Helv. Chim. Acta 80, 1144-1152.
- Okuyama E. *et al.* (1995) Pharmacologically active components of Todopon Puok (*Fagraea racemosa*), a medicinal plant from Borneo. Chem. Pharm. Bul. 43(12), 2200-2204.
- Jaishree V. and Shrishailappa B. (2009) Antiedematogenic and free radical scavenging activity of swertiamarin isolated from *Elicostemma axillare*. Planta Med. 75, 12-17.

Corresponding author: E-mail address: [MC.Jonville@ulg.ac.be](mailto:MC.Jonville@ulg.ac.be), Tel +3243664336, Fax +3243664332