UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques, Chimie du Vivant
UMR INRA 1282 Infectiologie et Santé Publique
Equipe Recherche et Innovation en Chimie Médicinale

THÈSE présentée par :

Daniel AGOSTINHO

soutenue le **: 24 Juin 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline / Spécialité : Pharmacognosie / Sciences de la Vie et de la Santé

Investigation Phytochimique de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Mozambique :

Ptaeroxylon obliquum Radlk.

Pyrenacantha kaurabassana Baill.

Monadenium lugardiae N.EBr.

THÈSE dirigée par :

Mme ENGUEHARD-GUEIFFIER Cécile	Professeur, Université François Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. RENAULT Jean-Hugues	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne
Mme COLLOT Valérie	Professeur, Université de Caen Basse-Normandie

JURY :

M. ALLOUCHI Hassan	MCU, HDR, Université François Rabelais de Tours
Melle BOUDESOCQUE Leslie	MCU, Université François Rabelais de Tours
Mme COLLOT Valérie	Professeur, Université de Caen Basse-Normandie
Mme ENGUEHARD-GUEIFFIER Cécile	Professeur, Université François Rabelais de Tours
M. GUILLARD Jérôme	Professeur, Université de Poitiers
M. RENAULT Jean-Hugues	Professeur, Université de Reims Champagne-Ardenne

DEDICACES

Au nom de Dieu, le clément ; le Miséricordieux !

Nous dédions ce travail à :

Docteur Sozinho Francisco ESTEFANE et sa famille :

Vous m'avez aidé pendant les périodes difficiles. Que Dieu tout puissant, le clément, le miséricordieux vous protège, merci infiniment.

Nos mamans :

Ana Maria MUSSOCO et Lucia NGADZAI. Vous m'avez appris la fraternité et accompagné moralement tout au long de ma vie et de ce travail. Que Dieu tout puissant, le miséricordieux vous protège, merci infiniment.

Ma femme :

Isabel da C. FRANCISCO, merci de m'avoir accompagné jusqu'à la concrétisation de ce travail. Saches que je t'aime profondément, que Dieu, le clément, le misércordieux bénisse notre union.

Nos enfants :

Paula Cristina, Nigel, Daniel et Yune. Merci pour votre bénédiction, vous êtes les dignes enfants de ce travail. Que Dieu, le clément, le Miséricordieux vous donne une longue vie.

REMERCIEMENTS

Nos remerciements vont d'abord au Service de la Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France à Maputo (Mozambique) pour nous avoir donné les moyens financiers nécessaires pour effectuer quatre stages au laboratoire de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie P. Maupas Université F. Rabelais de Tours.

Ensuite au ***Campus France*** –Agence française pour la promotion de l'enseignement supérieur, l'accueil et la mobilité internationale à Paris pour son bon encadrement durant nos séjours en alternance à Tours.

Nous tenons à remercier spécialement,

- Pr Cécile ENGUEHARD-GUEIFFIER, notre Directrice de thèse qui nous a fait confiance en nous acceptant dans son Laboratoire et a suivi avec beaucoup d'attention l'évolution de notre thèse ; qui a relu et critiqué toutes les parties de ce travail ; pour son aide et sa disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail ; vous nous avez appris le sens de la rigueur dans le travail, ses encouragements et suggestions ne nous ont jamais fait défaut.

- Pr Alain GUEIFFIER, qui a accepté de nous accueillir et de nous encadrer pendant ces trois années à l'Ecole doctorale et dans son Laboratoire de chimie thérapeutique et a pris toutes les dispositions pour que nos stages se déroulent dans les meilleures conditions. Nous tenons également à remercier toute l'équipe du Laboratoire pour l'attention particulière qu'elle nous a portée et pour sa collaboration.

- Pr Rogério J. UTHUI, le Recteur de l'Université Pédagogique de Mozambique qui nous a autorisé et bien voulu que ce travail se réalise dans le cadre de la promotion de l'enseignement supérieur.

- Dr Leslie BOUDESOCQUE, Maître de conférences qui a relu et critiqué certaines parties de ce travail et pour son aide dans la partie expérimentale tout au long de ce travail.

- Dr Hassan ALLOUCHI, Maître de conférences, qui a analysé les composés isolés tout au long de ce travail dans son laboratoire de cristallographie.

- Dr Joséphine NGO MBING, qui a m'assisté et m'a encouragé pendant le premier stage au laboratoire durant ces études.

- Dr Jacques POTHIER, Maître de conférences, pour m'avoir assisté lors de certaines analyses de CCM et encouragé.

- Dr Samuel MICHEL Maître de conférences Paris 8, qui a organisé dans le cadre de la coopération entre Paris 8 et l'Université Pédagogique de Mozambique, mon encadrement à l'Université F. Rabelais.

Notre gratitude va enfin à tout le personnel du Laboratoire de pharmacognosie et chimie thérapeutique notamment : Isabelle THERY-KONE, Mélanie POUVREAU, Joceline DOLLET et Joëlle DORAT par sa collaboration et encouragement tout au long de ce travail.

A l'herbier de l'IIAM, le botaniste Hermenegildo MATIMELE et leur personnel du Département ont participé aux déterminations de plantes analysées dans ces études.

Je tiens à remercier ma famille pour son soutien tout au long de cette épreuve en particulier ma femme Isabel da Conceição FRANCISCO et nos enfants Paula Cristina, Nigel, Daniel et Yune.

Muito obrigado por terem aguentado toda a responsabilidade familiar durante a minha ausência que Deus vos dê mais forças e longa vida !

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

AMETRAMO - Association des médecins traditionnels du Mozambique

DMP - département de médecine traditionnelle

[α]D - Pouvoir rotatoire

δH - Déplacement chimique du proton

δC - Déplacement chimique du carbone

J - Constante de couplage

λ - Longueur d'onde

m/z - rapport masse/charge atomique

AcOEt - Acétate d'éthyle

MeOH - Méthanol

Me - méthyle

Ac - acétate

ADN - Acide désoxyribonucléique

GPP - Geranyl pyrophosphate

CH_2Cl_2 - Dichlorométhane

C_6H_{12} - Cyclohexane

CLHP - Chromatographie liquide haute performance

CPC - Chromatographie de partage centrifuge

CPT - Camptothecine

CC - Chromatographie sur colonne

CCM - Chromatographie sur couche mince

$CDCl_3$ - Chloroforme deutéré

CI_{50} - Concentration Inhibitrice à 50%

COSY - Spectroscopie corrélée (Correlated spectroscopy)

DMSO-*d*6 - Diméthylsulfoxyde deutéré.

ESI - Ionisation par électrospray (Electrospray ionization)

HMBC - Correlation hétéronucleaire de liaison multiple (Heteronuclear multiple bond correlation)

HRMS - Spectrométrie de masse haute résolution (High Resolution Mass spectrometry)

HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence.

IR - Infrarouge.

FC - Flash chromatographie

NOESY - Spectroscopie nucléaire d'effet Overhauser (Nuclear Overhauser effect spectroscopy)

OMS - Organisation Mondiale de la Santé

WHO - world health organization

ppm - partie par million

m.p - melting point

p.f - point de fusion

RMN - Résonance magnétique nucléaire du proton

UV - Ultraviolet

VIH - virus de l'immunodeficience humaine

IIAM - Institut d'investigation agronomique de Mozambique

SNC –système nerveux central

SIDA –syndrome d'immunodéficience acquise

Résumé :

Les travaux menés dans cette thèse s'inscrivent dans une démarche ethno-pharmacologique visant à valoriser des plantes utilisées traditionnellement en médecine au Mozambique. Cette étude a comme but principal d'apporter des éléments chimio taxonomiques concernant des espèces végétales peu décrites et de préciser la composition métabolique de parties de plante utilisées en médecine traditionnelle, pour aboutir potentiellement à de nouvelles molécules utilisables en thérapeutique. Le travail est ainsi découpé en trois parties distinctes, chacune portant sur une plante différente.

La **Partie 1**présente l'étude phyto-chimique des racines sèches de *Ptaeroxylon obliquum* Radlk (Rutaceae). L'étude phyto-chimique de l'extrait chloroformique des racines de *P. obliquum* a permis l'isolement de cinq composés appartenant à la famille des coumarines ou de chromones dont un totalement original : un meroterpène de type chromone, le Ptaerobliquol. Les structures de ces composés ont été élucidées par différentes techniques analytiques de pointes (RMN, Spectrométrie de masse) et diffraction des rayons X.

La **Partie 2** porte sur l'étude phyto-chimique des écorces de tubercules de *Pyrenacantha kaurabassana* (Icacinaceae). Cette plante n'a été que très peu étudiée d'un point de vue phytochimique. Un criblage des métabolites présents a été réalisé, montrant la présence prépondérente de composés de la famille des quinones et des flavonoïdes. Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des écorces de tubercule a abouti à l'isolement et l'identification de 4 métabolites, dont 2 totalement originaux, appartenant à la famille des xanthones.

Enfin la **Partie 3** porte sur l'étude phytochimique des tiges de *Monadenium lugardiae* ou *Euphorbia lugardiae* (Euphorbiaceae). Le fractionnement de l'extrait chloroformique des tiges a permis l'isolement et l'identification de deux métabolites jamais décrits dans cette plante, le jolkinolide B, l'Hélioscopinolide F, conjointement avec la scopoletine.

Mots-clés : *P.obliquum* ; *P.kaurabassana*; *M. lugardiae* ; phyto-chimie ; chromone ; coumarine ; xanthone ; RMN.

Abstract :

This PhD work is part of an ethno-pharmacological approach to enhance plant used in traditional medicine in Mozambique. The aim of this work is to elucidate major metabolites through a chemo-taxonomic approach and clarify the phytochemical composition of plant used in traditional medicine, leading potentially to new molecules of therapeutical interest. The work is thus cut into three parts, each focusing on a different plant.

The Part 1describes the phytochemical study of dry roots of *Ptaeroxylon obliquum* Radlk (Rutaceae). The phytochemical study of the chloroform extract of the roots of P. obliquum resulting in the isolation of five compounds belonging to coumarin or chromone. A totally original meroterpenoid chromone was then isolated and elucidated: the Ptaerobliquol. Structures of these metabolites were elucidated by various analytical techniques (NMR, mass spectrometry) and X-ray diffraction.

Part 2 focuses on the phyto-chemical study of bark tubers of *Pyrenacantha kaurabassana* (Icacinaceae). Few phytochemical data were available about this plant in the litterature. Screening of metabolites was so carried out, showing the preponderant presence of compounds belonging to the family of quinones and flavonoids. The study of the ethyl acetate extract of the bark of tuber resulted in the isolation and identification of four metabolites, including two totally original, belonging to the family of xanthones.

Finally, Part 3 focuses on the phytochemical study of stems of *Monadenium lugardiae* or *Euphorbia lugardiae* (Euphorbiaceae). Fractionnation of the chloroform extract of the stems has led to the isolation and identification of two metabolites never described in this plant, jolkinolide B, the Hélioscopinolide F, together with scopoletin.

Keywords *: P. obliquum* ; *P. kaurabassana* ; *M. lugardiae* ; phytochemistry ; chromon ; coumarin ; xanthone ;

SOMMAIRE

Introduction..... p11

Chapitre 1: *Ptaeroxylon obliquum* Radlk. p14

I. LA FAMILLE DES PTAEROXYLACEAE p15

I.1. Présentation p15

I.2. Intérêt économique et pharmacologique p15

I.3. Chimie des Ptaeroxylaceae p16

I.3.1. Cedrelopsis grevei p16

I.3.2. Cedrelopsis gracilis p20

I.3.3. Cedrelopsis microfoliata..... p21

I.3.4. Cedrelopsis longibracteata..... p22

II. LE GENRE *PTAEROXYLON* ET L'ESPECE *Ptaeroxylon obliquum*..... p23

II.1. Présentation p23

II.2. Classification p23

II.3. Description botanique p23

II.4. Localisation géographique du lieu de récolte du matériel végétal et présentation de l'herbier p24

II.5. Revue de la littérature sur la phytochimie de *Ptaeroxylon obliquum* p25

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *Ptaeroxylon obliquum* REALISEE AU LABORATOIRE p28

III.1. Extraction des racines de *P.obliquum* Radlk. p28

III.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique p29

III.2.1. La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) p29

III.2.1.1. Définition p29

III.2.1.2. Paramètres clés p30

III.2.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique par CPC p31

III.2.2.1. Sélection du système biphasique de solvants p31

III.2.2.2. Fractionnement par CPC p32

III.2.3. Fractionnement de la fraction F_X p34

III.2.3.1. Sélection du système biphasique de solvants p34

III.2.3.2. Purification par CPC p35

III.3. Purification et identification des métabolites majoritaires des fractions d'intérêt p36

III.3.1. Purification des métabolites p36

III.3.2. Identification des différents composés isolés p38

III.3.2.1. Identification des composés 2 à 4 ..... p38

III.3.2.2. Analyse structurale du composé 1 ..... p39

III.3.3. Analyse phylogénétique et biosynthèse du Ptaerobliquol p45

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES p47

V. PARTIE EXPERIMENTALE p48

V.1. Le matériel végétal p48

V.1.1. Récolte et séchage p48

V.1.2. Extraction p49

V.2. Techniques de fractionnement et purification p49

V.2.1. Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)..... p49

V.2.1.1. Appareillage p49

V.2.1.2. Sélection du système biphasique de solvants p50

V.2.1.3. Conditions opératoires CPC p51

V.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte p52

V.3. Techniques analytiques p53

V.3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM) p53

V.3.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) p53

V.3.3. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)..... p53

V.3.4. Spectrométrie infra-rouge p53

V.3.5. Spectrométrie UV p53

V.3.6. Point de fusion p54

V.3.7. Spectrométrie de masse p54

V.3.8. Polarimétrie p54

V.3.9. Diffraction des rayons X p54

V.4. Description des composés isolés p55

V.4.1.7a,8,9,9a,9b,10a-heptahydro-4H-10,10-diméthyl-1,7-dioxa-5-hydroxy-2-hydroxyméthylcyclobutyl[1,2,3:3,3a,4]indeno[5,6-a]naphtalèn-4-one, Ptaerobliquol (1) p55

V.4.2. 8-[(acétyloxy)méthyl]-6,9-dihydro-5-hydroxy-2-méthyl-4H-pyrano[3,2-h][1]benzoxepin-4-one, acétate de ptaeroxylinol (2) p55

V.4.3. 6-hydroxy-7-[(3-méthyl-2-buten-1-yl)oxy]-2H-1-benzopyran-2-one, Prenyletine (3) p55

V.4.4. 7-dihydroxy-2-méthyl-6-(3-méthyl-2-buten-1-yl)-4H-1-benzopyran-4-one; Peucenine (4) p56

V.4.5. 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one, Scopoletin (5) p56

VI. BIBLIOGRAPHIE p56

Annexe 1…… p62

Annexe 2…… p63

Annexe 3…… p64

Annexe 4…… p65

Chapitre 2: *Pyrenacantha kaurabassana* Baill..... p66

I. LA FAMILLE DES ICACINACEAE p67

I.1. Présentation p67

I.2. Intérêt économique et pharmacologique p67

I.2.1. Humirianthera ampla Miers p67

I.2.2. Genre Icacina..... p67

I.2.3. Gomphandra tetranda p68

I.3. Chimie des Icacinaceae..... p68

II. LE GENRE *PYRENACANTHA* ET L'ESPÈCE *Pyrenacantha kaurabassana*..... p72

II.1. Présentation p72

II.2. Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre *Pyrenacantha*... p73

II.3. Quelques métabolites secondaires d'intérêt isolés du genre *Pyrenacantha*..... p74

II.4.Classification ……. p76

II.5. Description botanique..... p77

II.6. Utilisation en médecine traditionnelle..... p78

II.7. Travaux antérieurs sur *Pyrenacantha kaurabassana* Baill..... p78

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *Pyrenacantha kaurabassana* REALISEE AU LABORATOIRE- RESULTATS ET DISCUSSION..... p79

III.1. Criblage préliminaire de familles de métabolites présents..... p79

III.1.1. Caractérisation des Alcaloïdes..... p79

III.1.2. Caractérisation des Quinones..... p79

III.1.3. Caractérisation des Flavonoïdes..... p80

III.1.4. Caractérisation des Iridoïdes p81

III.1.5. Caractérisation des Tanins p81

III.1.6. Caractérisation des Stérols..... p82

III.1.7. Caractérisation des Saponosides..... p82

III.1.8. Caractérisation des Cardénolides..... p83

III.1.9. Résultats du criblage phytochimique..... p83

III.2. Extraction des écorces de tubercule de *P. kaurabassana*..... p84

III.3. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle..... p85

III.3.1. Pré-fractionnement par CPC..... p85

III.3.1.1. Sélection du système biphasique de solvants..... p85

III.3.1.2. Fractionnement par CPC..... p85

III.3.2. Purification des fractions issues du pré-fractionnement..... p87

III.3.2.1. Fraction PK-CPC1-1..... p87

III.3.2.2. Fraction PK-CPC2-1..... p87

III.3.2.3. Fraction PK-CPC2-2..... p87

III.3.2.4. Fraction PK-CPC2-4..... p88

III.3.3. Identification des composés isolés..... p89

III.3.3.1. PKA..... p89

III.3.3.2. PKB..... p89

III.3.3.3. PKC..... p90

III.3.3.4. PKD..... p91

IV. CONCLUSION..... p99

V. PARTIE EXPERIMENTALE..... p99

V.1. Le matérial végétal..... p99

V.1.1. Récolte et séchage..... p99

V.1.2. Extraction p99

V.2. Criblage préliminaire des métabolites..... p100

V.2.1. Préparation des extraits..... p100

V.2.2. Réalisation des tests..... p100

V.2.2.1. Alcaloïdes..... p100

V.2.2.2. Quinones..... p100

V.2.2.3. Saponosides..... p101

V.2.2.4. Stérols..... p101

V.2.2.5. Cardénolides..... p101

V.2.2.6. Iridoïdes..... p102

V.2.2.7. Composés phénoliques..... p102

V.3. Techniques de fractionnement et purification..... p103

V.3.1. Fractionnement par CPC..... p103

V.3.1.1. Appareillage..... p103

V.3.1.2. Sélection du système biphasique de solvant..... p103

V.3.1.3. Conditions opératoires CPC..... p104

V.3.2. Chromatographie colonne ouverte..... p105

V.3.3. Chromatographie flash..... p105

V.3.4. Chromatographie sur couche mince préparative..... p106

V.4. Techniques analytiques..... p106

V.4.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)..... p106

V.4.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)..... p106

V.4.3. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)..... p106

V.4.4. Spectrométrie infra-rouge..... p107

V.4.5. Spectrométrie UV..... p107

V.4.6. Point de fusion..... p107

V.4.7. Spectrométrie de masse..... p107

V.4.8. Diffraction des rayons X..... p107

V.5. Description des composés isolés..... p108

V.5.1. PK_A, émodine ou 3-méthyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone…… p108

V.5.2. PK_B, physcion ou 3-méthoxy-6-méthyl-1,8-dihydroxyanthraquinone…. p108

V.5.3. PK_C: acide 6,7,11-trihydroxy-10-méthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12H-benzo[b]xanthène-4-carboxylique…… p108

V.5.4. PK_D..... p108

VI. BIBLIOGRAPHIE..... p108

Annexes……. p114

Chapitre 3: *Monadenium lugardiae* N.E. Brown..... p119

I. LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE p120

I.1. Présentation p120

I.2. Intérêt nutritionnel, commercial et pharmacologique p120

I.3. La chimie des Euphorbiaceae..... p123

1.3.1. Diterpénoïdes de structure abiétane..... p125

1.3.2. Diterpénoïdes de structure ingénane p127

1.3.3. Diterpénoïdes de structure tigliane..... p128

1.3.4. Diterpénoïdes de structure ent-kaurane..... p129

1.3.5. Diterpénoïdes de structure lathyranes..... p129

1.3.6. Les triterpénoïdes..... p130

II. LE GENRE MONADENIUM ET L'ESPECE *Monadenium lugardiae*..... p131

II.1. Présentation..... p131

II.2. Classification..... p132

II.3. Description botanique..... p133

II.4. Revue de la littérature sur des activités biologiques de *Monadenium lugardiae*..... p133

II.5. La chimie de *Monadenium lugardiae*..... p134

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *MONADENIUM LUGARDIAE* REALISEE AU LABORATOIRE..... p134

III.1. Extraction des racines de *Monadenium lugardiae*..... p134

III.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique et isolement des métabolites..... p135

III.2.1. Fractionnement de la fraction F_1 par chromatographie Flash p135

III.2.2. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.2}$ par chromatographie Flash.. p136

III.2.3. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.3}$ par chromatographie Flash.. p136

III.2.3.1. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.3.2}$ par chromatographie Flash..... p136

III.2.3.2. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.3.3}$ par chromatographie Flash..... p136

III.2.4. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.4}$ par chromatographie Flash... p136

III.3. Identification des métabolites isolés..... p138

III.3.1. Composé MLb..... p138

III.3.2. Composé MLc..... p139

III.3.3. Composé MLe..... p140

IV. CONCLUSION..... p140

V. PARTIE EXPERIMENTALE..... p140

V.1. Le matériel végétal..... p140

V.1.1. Récolte et séchage..... p140

V.1.2. Extraction..... p141

V.2. Techniques de fractionnement et purification..... p141

V.2.1. Chromatographie sur colonne ouverte..... p141

V.2.2. Chromatographie Flash..... p141

V.3.Techniques analytiques..... p142

V.3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)..... p142

V.3.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)..... p142

V.3.3. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)..... p143

V.3.4. Spectrométrie infra-rouge..... p143

V.3.5. Spectrométrie UV..... p143

V.3.6. Point de fusion..... p143

V.3.7. Spectrométrie de masse..... p143

V.3.8. Diffraction des rayons X..... p144

V.4. Description des composés isolés..... p145

V.4.1. MLb: 17-hydroxyjolkinolide B..... p145

V.4.2. MLc : hélioscopinolide F..... p145

V.4.3. MLe : scopolétine..... p145

VI. BIBLIOGRAPHIE..... p145

Conclusion générale…… p155

Introduction :

Les substances naturelles végétales sont recherchées en raison de leurs activités biologiques nombreuses qui promeuvent des effets positifs sur la santé. Ces activités comprennent des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, insecticides, antipaludiques, antioxydantes et anticancéreuses utilisées dans les secteurs industriels pharmaceutiques et de l'agriculture.

Aujourd'hui, l'importance pharmacologique des métabolites végétaux augmente en raison des découvertes continues sur leur rôle potentiel dans les soins de santé, de l'apparition de résistance à certaines classes d'agents anti-infectieux et du problème de sous-développement d'une grande partie de la population mondiale.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 80% de la population africaine ont toujours recours à la médecine traditionnelle pour les soins de santé primaire (WHO, 2002), d'où l'intérêt que suscite cette médecine au sein des organisations africaines et internationales, et en particulier l'investigation phytochimique des ressources végétales de la médecine traditionnelle. Cette médecine est la plus accessible en termes économique, géographique et culturel.

En effet, l'organisation mondiale de la santé définit la médecine traditionnelle comme : '' *the sum total of all the knowledge and practices, whether explicable or not, used in diagnosis, prevention and elimination of physical, mental or social imbalance and relying exclusively on practical experience and observation handed down from generation to generation, whether verbally or in writing*'' (UNESCO, 1994).

Au Mozambique, comme dans la plupart des pays en voie de développement, l'utilisation thérapeutique des plantes fait partie intégrante des traditions. Le Mozambique, ainsi que les autres pays africains, est un réservoir important de diversité génétique et biologique des espèces végétales. Selon Krog *et al.* (2006), environ 15% des ressources végétales du Mozambique (environ 5 500 espèces) sont utilisées par la communauté à des fins thérapeutiques. Le Mozambique est riche d'une flore très diversifiée, qui demeure très peu exploitée. Ces espèces végétales pourraient constituer une voie alternative intéressante de découverte de nouvelles substances bioactives naturelles.

C'est ainsi que le Mozambique a fondé depuis quelques années l'Association des MEdecins TRAditionnels du MOzambique (AMETRAMO), qui collabore avec le Département de Médecine Traditionnelle (DMT) du Ministère de la Santé, pour valoriser les ressources végétales du pays à des fins médicales, de la mise au point de nouvelles thérapeutiques à la validation d'usage de certaines plantes médicinales traditionnelles.

Le présent travail s'inscrit donc dans ce domaine d'étude phytochimique de plantes utilisées par les ''tradipraticiens'' du sud du Mozambique. La sélection des espèces est basée sur des considérations d'usages traditionnels mozambicains et africains en général. Nous avons choisi les trois espèces suivantes : *Ptaeroxylon obliquum*, *Pyrenacantha kaurabassana* et *Monadenium lugardae*.

Pour mener à bien ce travail, nous avons réalisé une recherche bibliographique approfondie sur les famille Ptaeroxylaceae, Icacinaceae et Euphorbiaceae, et plus particulièrement sur les espèces des genres *Ptaeroxylon*, *Pyrenacantha* et *Monadenium*.

Le présent travail est constitué de trois chapitres :

- le premier chapitre traite des généralités sur la famille des Ptaeroxylaceae et l'espèce *Ptaeroxylon obliquum* Radlk. ainsi que de mes travaux personnels ;

- le deuxième chapitre est consacré aux généralités sur la famille des Icacinaceae, l'espèce *Pyrenacantha kaurabassana* Baill. et à mes résultats sur l'étude phytochimique de cette espèce ;

- le troisième chapitre est consacré aux généralités sur la famille des Euphorbiaceae et l'espèce *Monadenium lugardae* N. E. Br. et à mes travaux personnels.

Chapitre 1:

Ptaeroxylon obliquum Radlk.

I. LA FAMILLE DES PTAEROXYLACEAE

I.1. Présentation

Les Ptaeroxylaceae représentent une famille propre à l'Afrique australe et à Madagascar. Cette famille est principalement constituée de trois genres :

- Le genre monospécifique *Ptaeroxylon* confiné à l'Afrique australe (Transvaal, Sud du Mozambique et Angola) qui ne comprend que l'espèce *Ptaeroxylon obliquum*,

- Le genre *Bottegoa*, dont la seule espèce *Bottegoa insignis* Chiov. est retrouvée en Ethiopie, au Kenya et au sud de la Somalie (Van Der Ham *et al.*, 1995 ; Rabarison *et al.*, 2010),

- Le genre *Cedrelopsis* qui regroupe huit espèces, *Cedrelopsis procera* J.F. Leroy, *C. gracilis* J.F. Leroy , *C. rakotozafyi* J.F. Leroy, *C* . *ambanjensis* Cheek & Lescot, *C. longibracteata* J.F. Leroy, *C. trivalvis* J.F. Leroy, *C. microfoliolata* J.F. Leroy et *C. grevei* Baillon, toutes localisées à Madagascar (Leroy, 1959, 1960 ; Leroy et Lescot, 1991).

Cette famille est considérée comme appartenant au clade Spatelioidaea-Ptaeroxylon des Rutaceae *stricto sensu* **(**Appelhans *et al.*, 2011).

I.2. Intérêt économique et pharmacologique

Les Ptaeroxylaceae sont connues pour leur intérêt économique et pharmacologique. Nous pouvons citer :

- *Cedrelopsis grevei* H. Baillon (espèce endémique de Madagascar)

Le bois est imputrescible, inattaquable par les insectes et il était utilisé dans la fabrication des tombeaux royaux (Sakalaves). Cet arbre est également utilisé comme bois de construction et en thérapeutique traditionnelle par les Malgaches (Leroy et Lescot, 1991).

La décoction d'écorce possède des propriétés anti-dysenteriques, fébrifuges, toniques et fortifiantes, certains lui attribuent même des vertus aphrodisiaques (Leroy et Lescot, 1991 ; Paris et Debray, 1972).

Les feuilles en décoction sont également utilisées pour traiter la fragilité capillaire, les maux de tête et les maux de gorge. La décoction est aussi utilisée pour améliorer le goût et l'arôme du rhum (Boiteau, 1986).

- *Ptaeroxylon obliquum* Radlk.

Le bois est très apprécié pour la construction d'habitations. Au Mozambique, il est utilisé pour la confection des touches de xylophones traditionnels (Archer et Reynolds, 2001). Il est également utilisé pour les traverses de chemin de fer et la fabrication d'objets divers. La poudre de son écorce et la fumée du bois sont utilisées contre les maux de tête. Les infusions d'écorce et de bois sont également utilisées pour soigner le rhumatisme, l'arthrite et les troubles cardiaques (Lemmens, 2008).

En médecine traditionnelle mozambicaine, les racines de *P. obliquum* sont utilisées dans le traitement des troubles gastro-intestinaux (Ribeiro *et al.*, 2010). Cette plante est revendiquée également par les tradipraticiens locaux comme puissant médicament contre la malaria, le rhumatisme et les dyspepsies.

Des études récentes sur l'extrait dichlorométhanolique des racines, des feuilles et des tiges de la même plante ont montré une activité anti-insecticide modérée à l'encontre du vecteur du paludisme *Plasmodium spp. in vitro* (Maharaj *et al.*, 2011). Cette plante a été également étudiée par Moyo et Masika (2009) comme insecticide sur les animaux domestiques. Les mêmes propriétés insecticides ont été réportées par Archer et Reynolds en 2001.

L'extrait acétonique des feuilles de *Ptaeroxylon obliquum* a montré également une activité excellente contre différentes souches de bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*) et deux espèces de mycobactéries (*Mycobacterium smegmatis* et *M. fortuitum)* (Mayekiso *et al.*, 2008). Enfin, l'espèce *Ptaeroxylon obliquum* ne semble pas toxique mais est connue pour provoquer des complications respiratoires telles que des crises d'asthme et des rhinites (Anderson et Mark, 2000).

I.3. Chimie des Ptaeroxylaceae

L'étude de la littérature portant sur la phytochimie des Ptaeroxylaceae montre une grande variabilité de la composition chimique au sein de cette famille en fonction de la localisation géographique de la plante (Randrianarivelojosia *et al.*, 2005). Leur composition chimique est caractérisée par la présence de quatre principales classes de produits naturels: les chromones, les chalcones, les coumarines et les terpènes.

Au sein de la famille des Ptaeroxylaceae, deux genres ont été plus particulièrement étudiés, les genres *Ptaeroxylon* et *Cedrelopsis.* Des huit espèces du genre *Cedrelopsis*, quatre espèces ont fait l'objet d'une étude phytochimique. Il s'agit de *Cedrelopsis gracilis* J.F. Leroy, *C. longibracteata* J.F. Leroy, *C. microfoliata* J.F. Leroy et *C. grevei* Baill.

I.3.1. Cedrelopsis grevei

- Les chromones :

L'espèce *Cedrelopsis grevei* de Madagascar est riche en constituants du type chromones (Figure 1), isolés dans des extraits d'écorces et de bois (Dean et Taylor, 1966 ; Dean et Robinson, 1971), et représentés par :

- Des composés isoprénylés tels que la peucénine, l'hétéropeucénine et l'éther méthylique de la peucénine.

- Des composés tricycliques tels que l'éther méthylique de l'isohétéropeucénine, l'alloptaeroxyline, l'éther méthylique de l'alloptaeroxyline ou perforatine A, le greveiglycol, le greveichromenol, la ptaeroxyline, le ptaeroxylinol.

Le ptaeroxylinol (Mulholland *et al.*, 1999) et la perforatine A ont été retrouvés dans les feuilles (Langenhover *et al.*, 1988 ; Dean and Robinson, 1971).

Les travaux de Koorbanally *et al.* (2003) sur les extraits dichlorométhaniques des feuilles et des graines de *Cedrelopsis grevei* ont identifié la *O*,*O*-diméthylpinocembrine ou 5,7-diméthoxyflavanone (Figure 1).

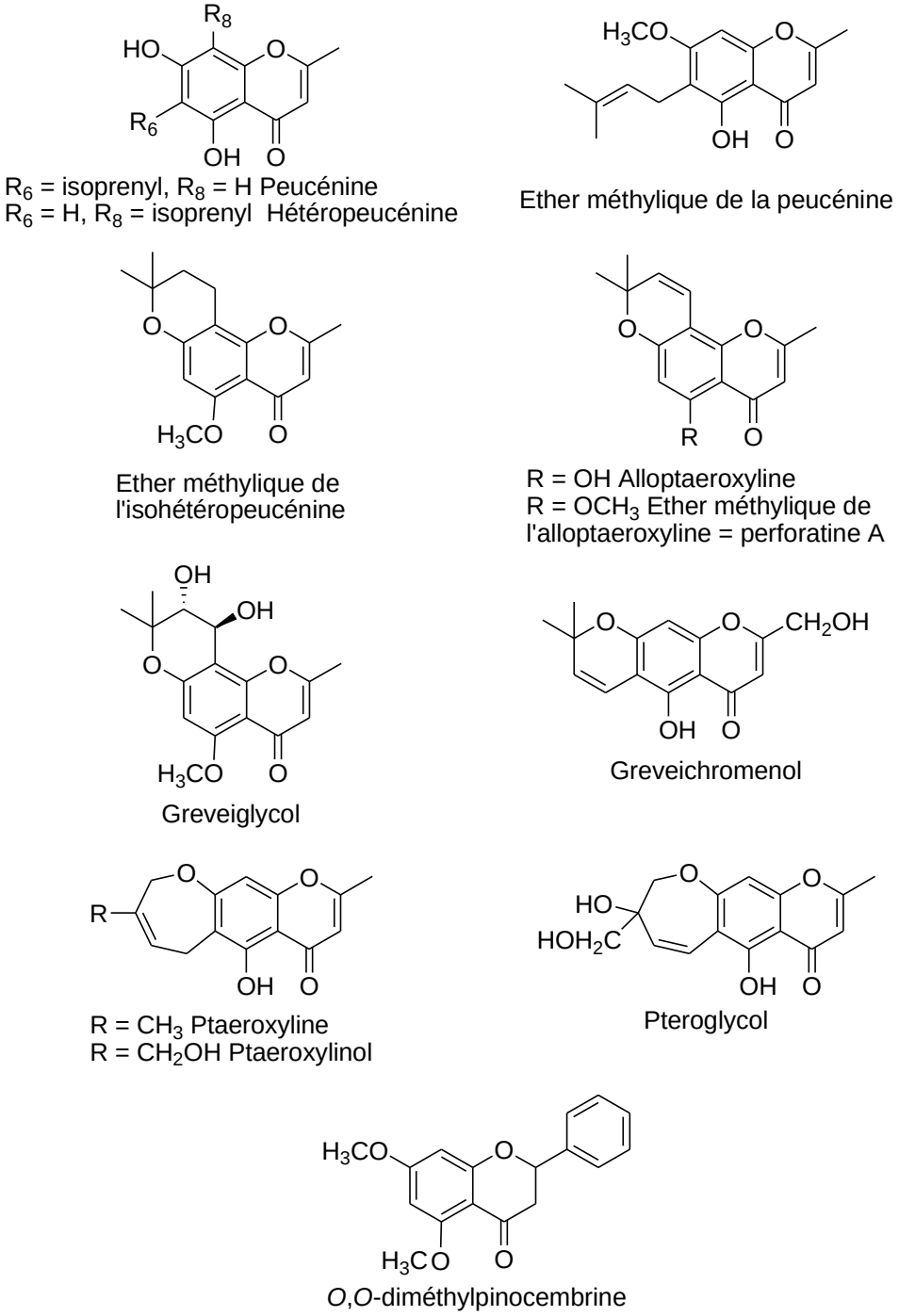


Figure 1. Structure des chromones présentes dans *Cedrelopsis grevei*.

La perforatine A a également été isolée d'espèces de la famille Cneoraceae (*Cneorum tricoccum* et *Neochamaelea pulverulenta*) et enfin de *Harrisonia perforata* (Simaroubaceae) (Gonzales *et al.*, 1983) (Figure 1).

D'autres travaux ont mis en évidence le pteroglycol dans *Cedrelopsis grevei* (Dean et Robinson, 1971) mais également dans une autre espèce de la famille Cneoraceae, *Neochamaelea pulverulenta* (Epe *et al.*, 1981) (Figure 1).

- Les chalcones :

Les fruits et les graines de l'espèce *Cedrelopsis grevei* sont riches en chalcones. Plusieurs études ont été réalisées sur les extraits dichlorométhaniques des feuilles et des graines de *Cedrelopsis grevei*. Parmi celles-ci, les travaux de Koorbanally *et al.* (2003) ont identifié six chalcones : l'uvangoletine (2',4'-dihydroxy-6'-méthoxy-dihydrochalcone), la cardamonine, la flavokavine B (2'-hydroxy-4',6'-diméthoxychalcone), la 2'-méthoxyhelikrausichalcone, la cedreprenone et la cedrediprenone (Figure 2).

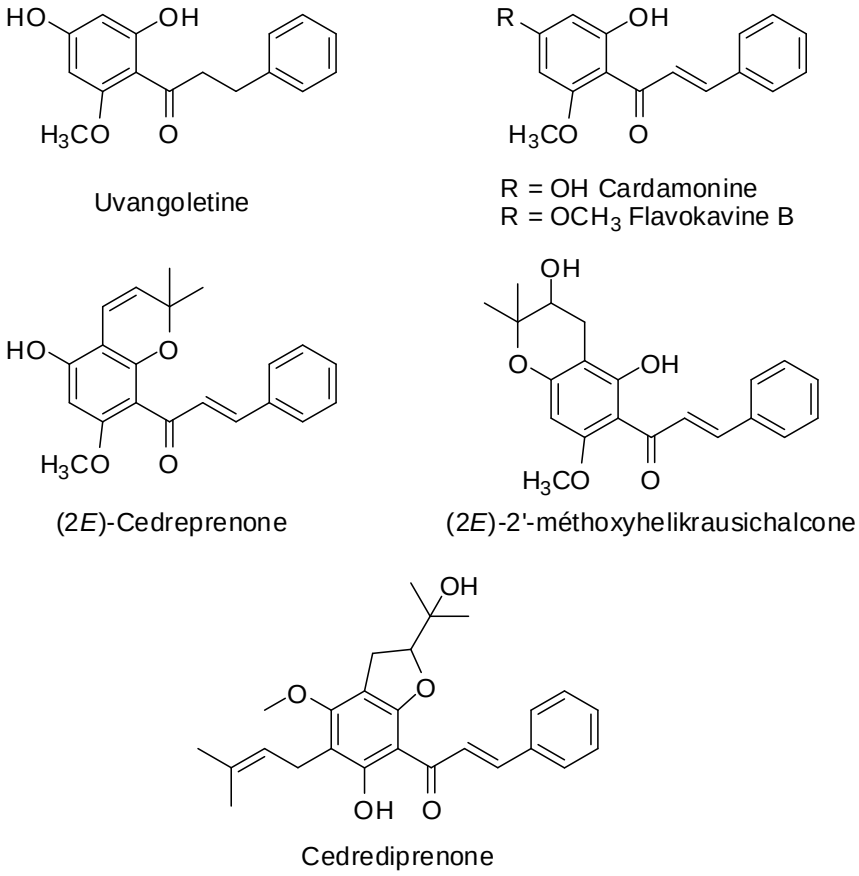


Figure 2. Structure des chalcones présentes dans *Cedrelopsis grevei*.

- Les coumarines :

Des études réalisées sur des extraits de bois et d'écorces de *Cedrelopsis grevei* du sud-ouest de Madagascar ont permis d'isoler diverses coumarines : la scoparone, la cedrecoumarine B ou microfolicoumarine, la cedrelopsine, l'*O*-méthylcedrelopsine et la cedrecoumarine A (Mulholland *et al.*, 1999, 2002) (Figure 3).

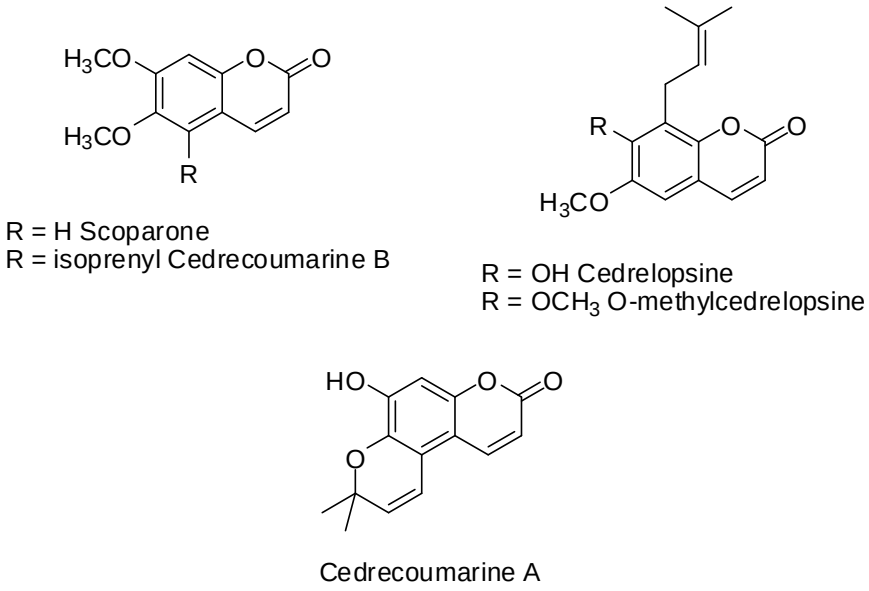


Figure 3. Structure des coumarines de *Cedrelopsis grevei*.

- Les composés terpéniques :

Les extraits d'écorce et de bois de *Cedrelopsis grevei* du nord-ouest de Madagascar ont été analysés par Mulholland *et al.* (1999, 2002, 2003) et ont révélé la présence de limonoïdes, tels que la cedmiline et la cedashnine (hexanortriterpénoïdes), et le cedmilinol (pentanortriterpénoïde). Le quassinoïde, cedphiline, et le triterpénoide pentacyclique, β-amurine, ont également été isolés de la même plante (Figure 4).

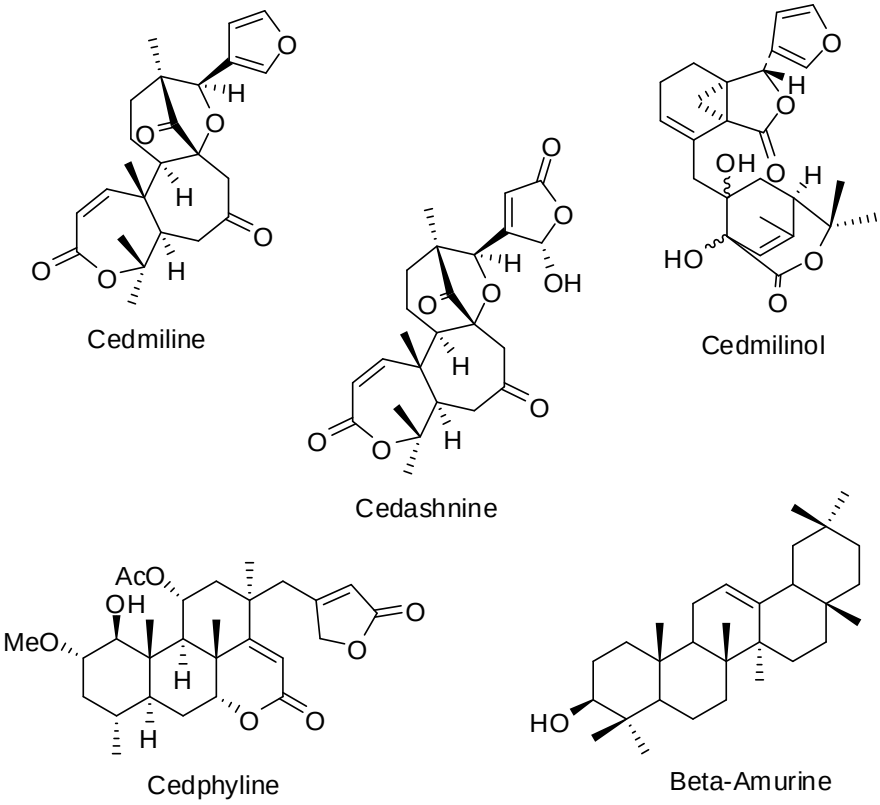


Figure 4. Structure des composés terpéniques de *Cedrelopsis grevei*.

1.3.2. Cedrelopsis gracilis

- Les chromones :

La présence des chromones, perforatine A, ptaerochromenol et umtatine, a été mise en évidence dans l'extrait dichlorométhanique d'écorces de *Cedrelopsis gracilis* de Madagascar (Mulholland *et al.*, 2004). La chromone perforatine A a été retrouvée précédemment dans les espèces *C.grevei* (Dean et Robinson, 1971) et *P. obliquum* (Langenhover *et al.*, 1988) et dans une autre espèce de la famille Cneoraceae, *Cneorum tricoccum* (Gonzalez *et al.*, 1974) (Figure 5).

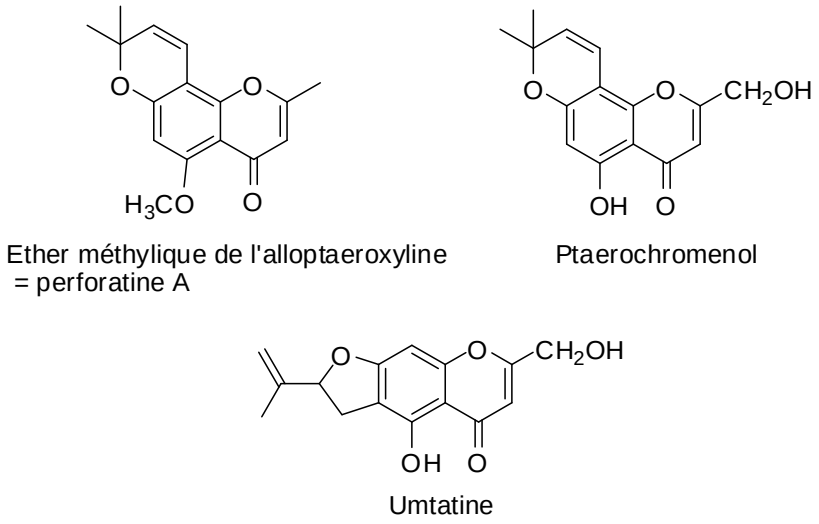


Figure 5. Chromones de *Cedrelopsis gracilis*.

- les composés terpéniques :

Le travail de Mulholland *et al.* (2004) a permis d'isoler deux nouveaux composés dérivés de terpénoïdes (pentanortriterpénoïdes), cedkathryne A et cedkathryne B dans l'extrait dichlorométhane d'écorces de *Cedrelopsis gracilis* (Figure 6).

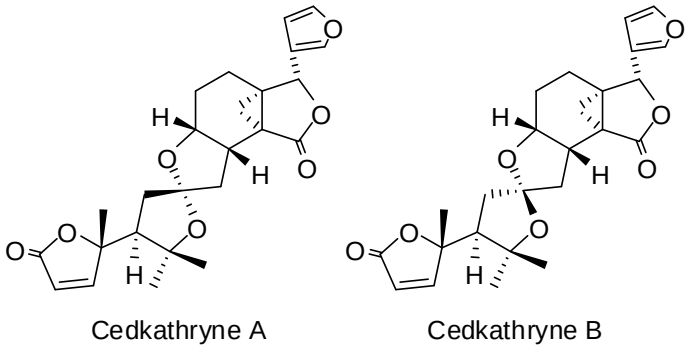


Figure 6. Composés terpéniques de *Cedrelopsis gracilis*.

1.3.3. Cedrelopsis microfoliata

- Les chalcones et flavanones :

Une étude réalisée sur l'écorce de *C. microfoliata*, a permis l'identification d'une chalcone prénylée, la microfoliane, et de deux flavanones prénylées, la microfolione et l'agrandol, (Koorbanally *et al*., 2002) (Figure 7).

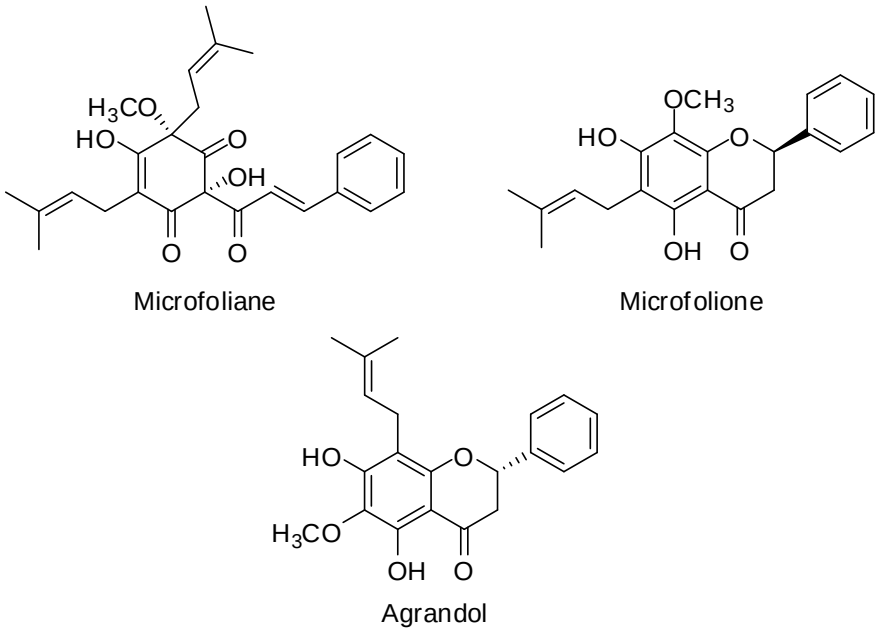


Figure 7. Chalcone et flavanones de *Cedrelopsis microfoliata.*

- Les coumarines :

Trois coumarines ont été isolées de l'espèce *C. microfoliata* : la cedrecoumarine B ou microfolicoumarine, la cedrecoumarine A et l'obliquine (Koorbanally *et al*., 2002) (Figure 8). La cedrecoumarine et l'obliquine sont retrouvées dans deux espèces de la même famille, *C. grevei* et *P. obliquum* respectivement.

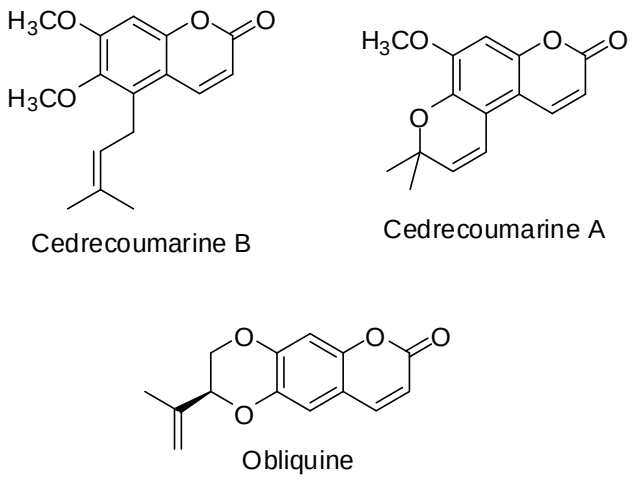
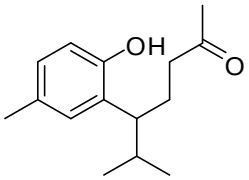


Figure 8. Coumarines de *Cedrelopsis microfoliata.*

- Les composés terpéniques :

C. microfoliata présente un sesquiterpénoïde, le sesquichamaenol (Koorbanally *et al*., 2002) (Figure 9).



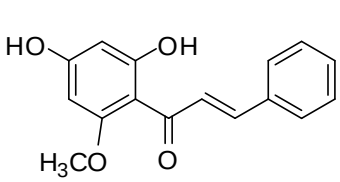
Sesquichamaenol

Figure 9. Composé terpénique de *Cedrelopsis microfoliata.*

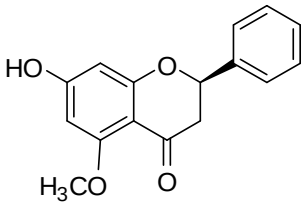
1.3.4. Cedrelopsis longibracteata

- Les chalcones et flavanones :

Une chalcone, la cardamonine, et une flavanone, l'alpinetine, sont présentes dans les extraits dichlorométhaniques d'écorces et de bois de *Cedrelopsis longibracteata*. La cardamonine a déjà été citée dans la composition de *Cedrelopsis grevei.* L'alpinetine a été identifiée dans une autre espèce, *Alpina speciosa* (Itokawa *et al.,* 1981) (Figure 10).



Cardamonine

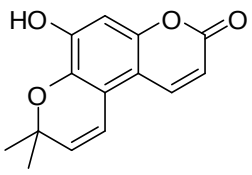


Alpinetine

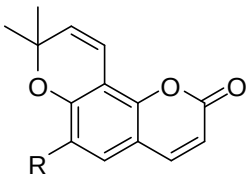
Figure 10. Chalcone et flavanone de *Cedrelopsis longibracteata*.

- Les coumarines :

Les extraits dichlorométhaniques d'écorces et de bois de *Cedrelopsis longibracteata* J.F. Leroy de Madagascar ont également révélé la présence de trois coumarines (Randrianarivelojosia *et al.,* 2005) : la brayline, la cedrecoumarine A et la norbrayline. Les deux coumarines, cedrecoumarine A et norbrayline, avaient été identifiées précédemment dans l'espèce *C. grevei*. La brayline est présente dans d'autres espèces, *Flindersia brayleana* et *Pitaria punctata* (Itokawa *et al.,* 1981) (Figure 11).



Cedrecoumarine A



R = OH Norbrayline
R = OCH_3 Brayline

Figure 11. Coumarines de *Cedrelopsis longibracteata.*

II. LE GENRE *PTAEROXYLON* ET L'ESPECE *Ptaeroxylon obliquum*

II.1. Présentation

Le genre *Ptaeroxylon* qui est monospécifique, fut d'abord situé dans les Meliaceae et les Sapindaceae, pour finalement apparaître dans les Rutaceae dans des flores plus récentes. Dans les années 1970, ce genre a été retiré des Rutaceae pour former une famille à part entière, les Ptaeroxylaceae. Il est retrouvé dans trois zones différentes : le long de la côte angolaise et dans le nord de la Namibie, dans le nord-est de la Tanzanie, au Zimbabwe, et au sud du Mozambique jusqu'à l'est de l'Afrique du sud. Dans les deux premières zones, cette espèce semble être peu connue du fait de l'érosion génétique et parce qu'il s'agit d'un arbre protégé en Afrique du Sud (Lemmens, 2008).

II.2. Classification

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Rosides

Sous-classe : Zingiberidae

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Clade : Spathelioidaeae-Ptaeroxylon

Genre: *Ptaeroxylon*

Espèce: *Ptaeroxylon obliquum (*Thunb.) Radlk.

II.3. Description botanique

La figure 12 présente les différentes parties morphologiques de la plante : les écorces et feuilles, les fleurs et les fruits.



Figure 12. *Ptaeroxylon obliquum.*

Sources: http://www.mountmorelandconservancy.co.za/Plant-lists-for-Mount-Moreland/Tree-list-for-Mount-Moreland.html, TopTropicals.com, http://www.bioculturaldiversity.co.za/news.php?nid=43 (14/05/2013)

Ptaeroxylon obliquum (Thunb.) Radlk. H. est l'espèce endémique du Mozambique et de certains pays de l'Afrique australe. Cet arbre du nom vernaculaire ''Ndzharhi'' peut atteindre jusqu'à 20 mètres voire 45 mètres de hauteur. Il présente des rameaux à écorce gris blanchâtre, des feuilles opposées, composées pennées à 3-8 paires de folioles et asymétriques (« obliques »).

Les fleurs sont unisexuées et régulières et les fruits sont des samares d'environ 2 cm sur 1 cm. La floraison s'étale d'août à décembre. Cette espèce est surtout présente dans les forêts denses sèches ou le bush, et dans les forêts de montagne, du niveau de la mer jusqu'à 2000 mètres d'altitude. Il tolère la sècheresse et supporte un gel modéré. Il accepte également différents types de sols : sableux ou rocailleux et bien drainés (Lemmens, 2008).

II.4. Localisation géographique du lieu de récolte du matériel végétal et présentation de l'herbier (Figure 13).

Les racines de *Ptaeroxylon obliquum* ont été récoltées en mars 2010 dans le village de Canhane du district de Massingir, au sud du Mozambique, et identifiées botaniquement. Un échantillon (N° 4157) a été déposé à l'herbier de l'Institut d'Investigation Agronomique du Mozambique à Maputo.



Figure 13. Canhane (région de récolte des échantillons, à gauche) et Herbier (Institut d'Investigation Agronomique du Mozambique – IIAM, à droite).

II.5. Revue de la littérature sur la phytochimie de *Ptaeroxylon obliquum*

La chimie de l'espèce *Ptaeroxylon obliquum* (Thunb.) Radlk., est caractérisée par la présence de différentes classes de composés telles que les coumarines prénylées, les chromones et les limonoïdes (Dean *et al.*, 1966, 1967a, 1967b, 1967c ; McCabe *et al.*, 1967 ; Mulholland *et al.*, 1999). La majorité de ces composés présente une grande similitude structurale avec des composés d'autres espèces de la famille Ptaeroxylaceae. Cependant, la plante *P. obliquum* contient également des composés non retrouvés dans les autres espèces de cette famille, tels que les dérivés du type méroterpénoïdes.

Parmi les composés isolés de *P.obliquum*, nous retrouvons de nombreuses chromones : l'O-méthylalloptaeroxyline ou perforatine A isolée dans les feuilles (Langenhover *et al.*, 1988), l'alloptaeroxyline, la ptaeroxyline (desoxykarenine), le ptaeroxylinol, la karenine, ainsi que des composés analogues de la karenine (dihydrodesoxykarenine et dihydrokarenine), qui ont été identifiés dans le bois (Dean et Taylor, 1966 ; McCabe *et al.*, 1967). La perforatine A a également été isolée dans d'autres espèces de la famille Ptaeroxylaceae, dans l'écorce de *C. gracilis* (Mulholland *et al.*, 2004) et dans le bois de *C. grevei* (Dean and Robinson, 1971).

Le même composé a été également isolé dans d'autres espèces de la famille *Cneoraceae* (*Cneorum tricoccum* et *Neochamaelea pulverulenta*) et enfin, de *Harrisonia perforata* (*Simaroubaceae*) (Gonzales *et al.*, 1974) (Figure 14).

D'autres chromones, pteroglycol, ptaerochromenol, dehydroptaeroxyline, ptaeroxylone et umtatine, ont été isolées du bois de *Ptaeroxylon obliquum* du sud de l'Afrique (Dean *et al.*, 1967a,b,c). La chromone umtatine a été trouvée dans une autre espèce *Neochamaelea pulverulenta* de la famille Cneoraceae (Mondon et Callsen, 1975).

La Peucénine (5,7-hydroxy-6-isopentyl-2-méthylchromone) est le composé majoritaire isolé du bois de *P. obliquum* (Pachler et Roux, 1967).

D’autres composés tels que l’allopeucénine, l’isopeucénine et d’autres analogues de la peucénine (éther méthylique de la peucénine, dihydropeucénine, éther méthylique de la dihydropeucénine, dihydrohétéropeucénine et éther méthylique de la dihydrohétéropeucénine) ont été retrouvés dans cette plante (Dean et Taylor, 1966 ; Dean et Robinson, 1971). La peucénine a été également isolée des racines de *Peucedanum ostruthium* Koch (*Umbelliferae*) par Robinson (1963) (Figure 14).

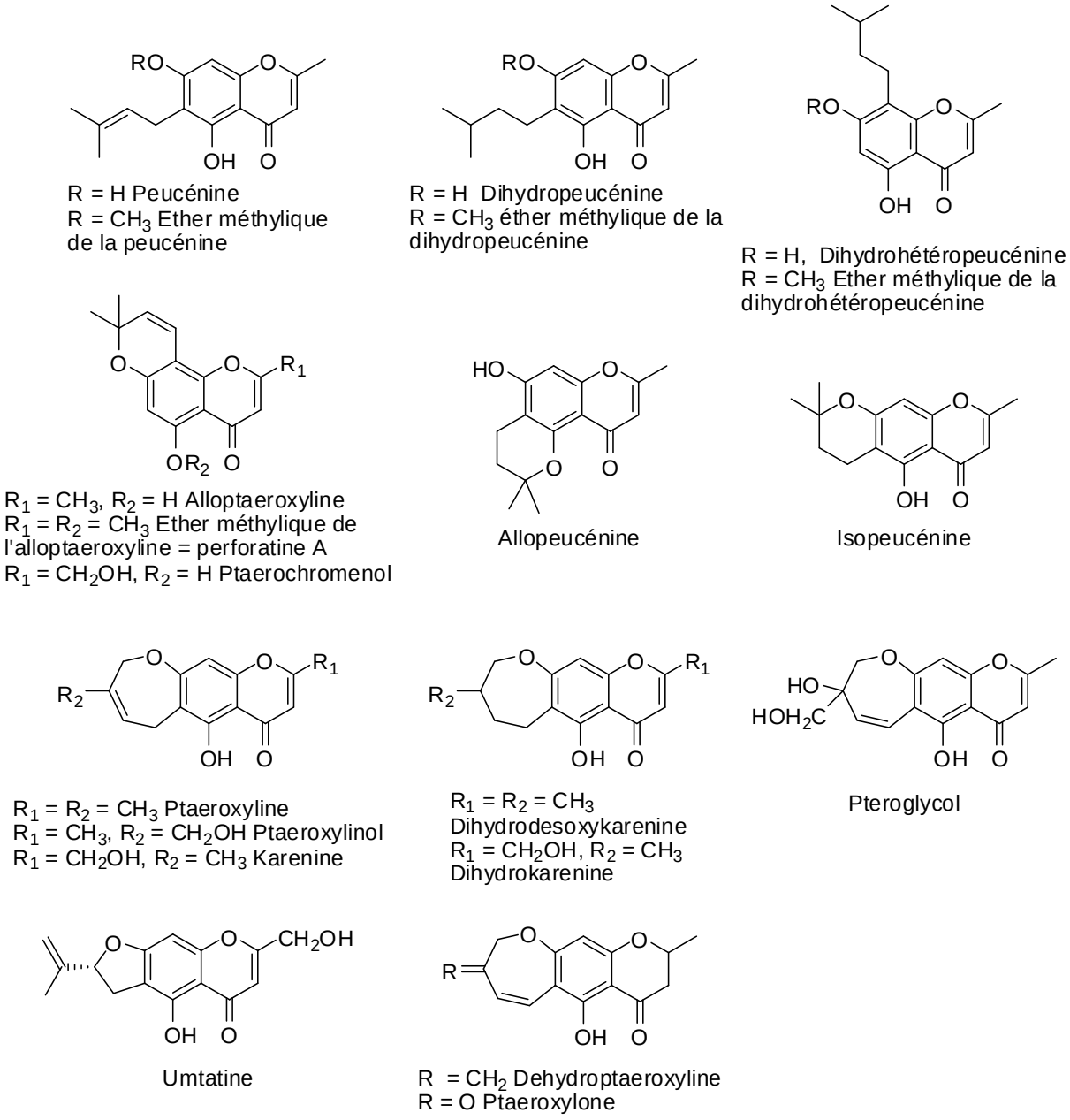


Figure 14. Structure des chromones de *Ptaeroxylon obliquum.*

- Les coumarines :

Les coumarines représentent la deuxième classe de métabolites secondaires largement présents dans la famille Ptaeroxylaceae et plus particulièrement dans l’espèce *Ptaeroxylon*

obliquum. Ainsi, des coumarines phénoliques telles que la scopoletine, la 7-*O*-prénylscopoletine ou éther méthylique de la prényletine, l'obliquetine, l'obliquetol, la 7-*O*-prénylaesculetine ou prényletine, l'obliquine, l'obliquol, la norbrayline, la nieshoutine (cyclo-obliquetine) et le nieshoutol, ont été mises en evidence dans l'espèce *Ptaeroxylon obliquum* (McCabe *et al.*, 1967 ; Dean *et al.*, 1967 ; Razdan *et al.*, 1987) (Figure 15).

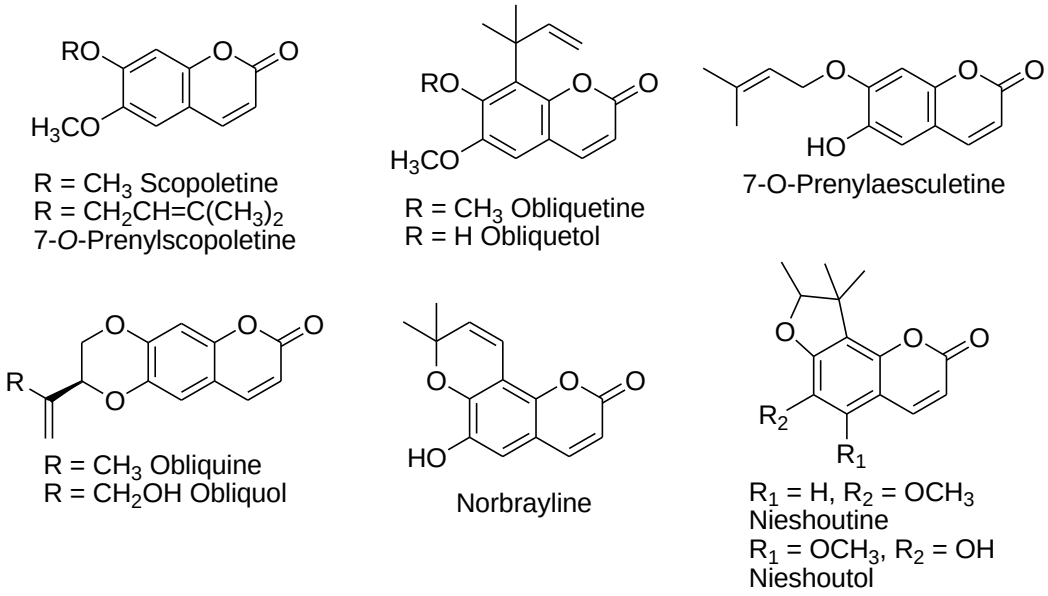
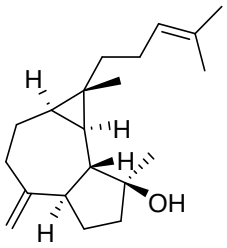


Figure 15. Coumarines présentes dans *P. obliquum*.

- Les composés terpéniques :

Une autre étude réalisée par Mulholland et Mahomed (2000) sur l'extrait hexanique de l'écorce de *P. obliquum*, a permis l'identification d'un diterpénoïde ''inhabituel'' possédant le squelette de l'aromadendrane (dont l'un des deux méthyles géminés est prenylé), la cnéorubine X. Selon ces auteurs, ce linoïde a été aussi retrouvé dans l'espèce *Cneorum tricoccon* et dans le genre *Sinularia*. ainsi que dans les feuilles d'une Meliaceae brézilienne, *Guarea guidonia* (Brochini et Roque, 2000) (Figure 16).



Cneorubine X

Figure 16. Composé terpénique de *P. obliquum*.

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *PTAEROXYLON OBLIQUUM* REALISEE AU LABORATOIRE

Malgré les nombreux travaux publiés sur le bois, l'écorce et les feuilles de *Ptaeroxylon obliquum* (Dean *et al.*, 1967a; Dean *et al.*, 1967b; Dean *et al.*, 1967c; Mc Cabe *et al.*, 1967), à notre connaissance les racines de cette plante n'ont fait l'objet d'aucune étude chimique. L'objectif principal de cette étude est d'isoler et d'élucider les composés majoritaires contenus dans les racines de *P. obliquum* et ainsi d'identifier de nouveaux métabolites potentiellement biologiquement intéressants.

III.1. Extraction des racines de *P.obliquum* Radlk.

Les racines de *P. obliquum* Radlk. ont été extraites après pulvérisation par contacts multiples avec du méthanol dans un appareil de Soxhlet. Le méthanol a été choisi pour son pouvoir d'extraction élevé. Une partie de l'extrait méthanolique obtenu (72,6 g) est ensuite fractionnée par extraction liquide liquide en utilisant des solvants de polarité croissante : cyclohexane puis chloroforme. Trois extraits ont été ainsi obtenus :

- Un extrait cyclohexanique, contenant les cires, des pigments lipophiles et des graisses résiduelles (4,5 g) soit un rendement de 6,2 %;
- Un extrait chloroformique (19,4 g), contenant la majeure partie des chromones et coumarines soit un rendement de 26,7 % ;
- Le résidu méthanolique, contenant les composés les plus polaires (48,7 g) soit un rendement de 67,0 %.

Le protocole d'extraction est récapitulé dans la figure ci-après.

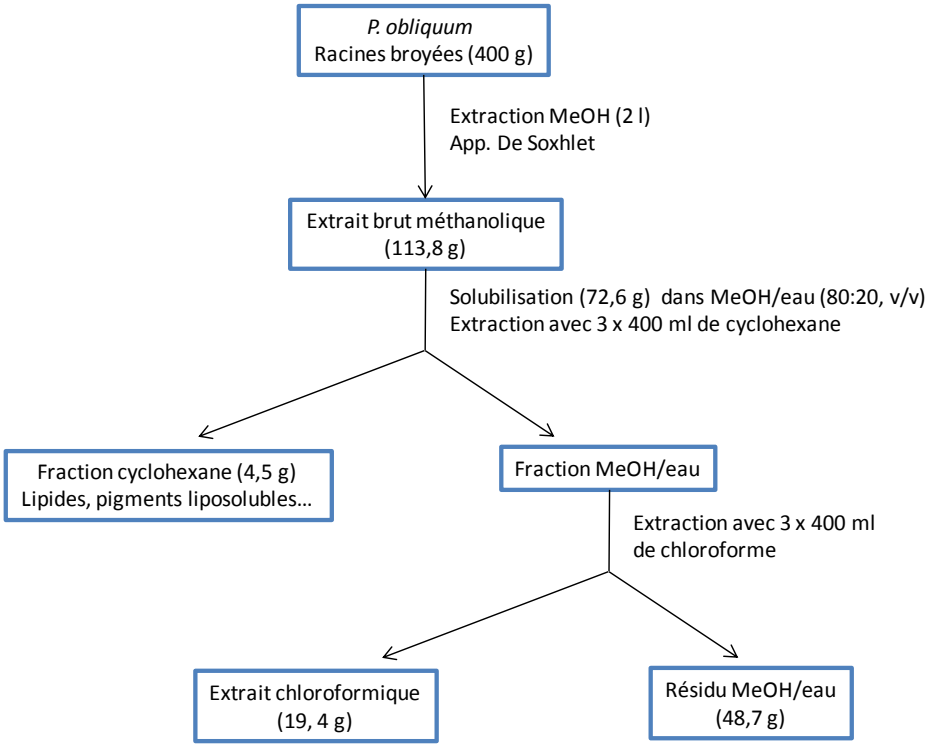


Figure 17: Protocole d'extration utilisé pour la préparation des extraits.

Nous avons alors procédé au fractionnement et à la purification des analytes contenus dans l'extrait chloroformique.

III.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique

L'analyse par CLHP de l'extrait a montré une complexité de composition élevée, comme habituellement observé en phytochimie (Figure 18).

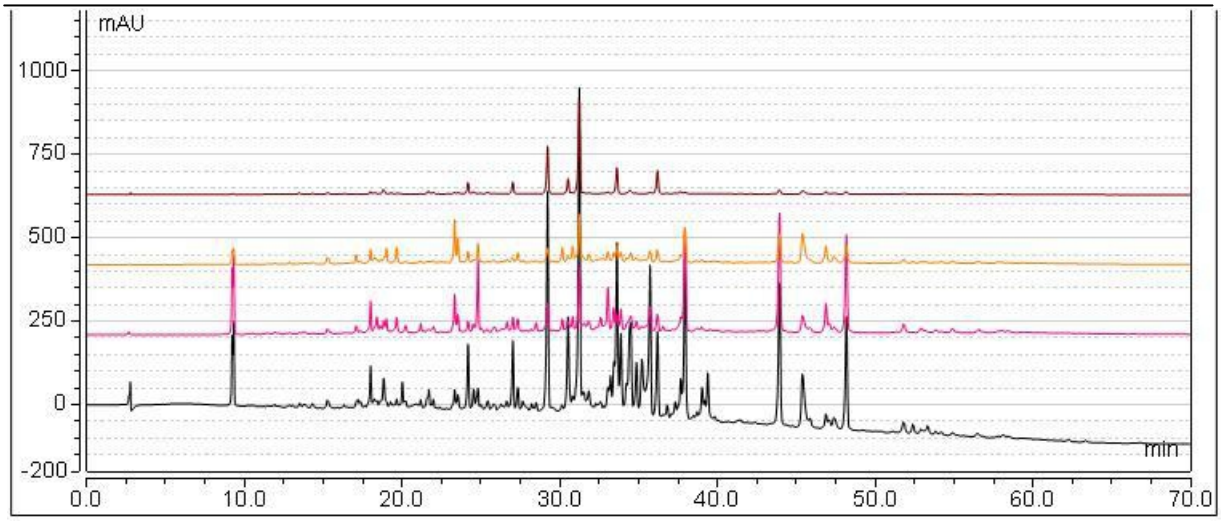


Figure 18 : Chromatogramme CLHP de l'extrait chloroformique à 210 (noir), 254 (rose), 280 (orange) et 365 nm (brun).

Pour faciliter l'accès aux composés purs, nous avons choisi de réaliser un préfractionnment de l'extrait en utilisant une technique chromatographique particulière : la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Cette technique chromatographique est particulièrement employée pour le fractionnement d'extraits végétaux complexes, permettant l'obtention rapide de fractions chimiquement simplifiées (Pauli *et al.*, 2007).

Pour la compréhension de la suite des résultats il est nécessaire de réaliser un bref rappel de la définition et des paramètres clés utilisés en CPC.

III.2.1. La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

III.2.1.1 Définition

La CPC est une méthode de chromatographie liquide/liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles d'un même système biphasique de solvants. Une phase liquide, appelée phase stationnaire, est maintenue dans la colonne par un champ de forces centrifuge, généré par la mise en rotation de la colonne chromatographique. L'autre phase liquide, *i.e.* la phase mobile, est alors pompée au travers de la phase stationnaire. Les solutés se partagent entre les deux phases en fonction de leurs constantes de distribution respectives (Foucault, 1995).

Des paramètres propres aux techniques chromatographiques à contre-courant sans support solide nécessitent d'être définies pour la compréhension de la suite du manuscrit.

III.2.1.2. Paramètres clés

- Mode de pompage

La nature liquide des phases mobile et stationnaire autorise deux modes de pompage différents, suivant la nature de la phase stationnaire retenue.

La phase mobile est pompée en mode **ascendant** lorsque la phase **stationnaire** est la phase la **plus dense** du système biphasique. Le jet de phase mobile progresse alors dans le sens contraire du champ de force centrifuge.

A l'inverse, le mode **descendant** est employé lorsque la phase la plus **dense** est **mobile**, ainsi le jet de phase mobile progresse dans le même sens que la force centrifuge (Foucault, 1995).

- Rétention de phase stationnaire

Le taux de rétention de phase stationnaire S_f est un paramètre caractéristique des techniques chromatographiques sans support solide. Il représente le volume de phase stationnaire restant dans la colonne une fois l'état d'équilibre atteint.

Pour atteindre cet état, la phase mobile est pompée, dans le mode sélectionné ascendant ou descendant pour les techniques hydrostatiques, au travers de la colonne remplie avec la phase stationnaire et mise en rotation, jusqu'à atteindre un état stable. Le remplissage partiel de la colonne qui en découle peut être décrit comme suit:

$$S_f = \frac{V_{stat}}{V_{col}}$$

Avec S_f : taux de rétention de la phase stationnaire

V_{stat} : volume de phase stationnaire

V_{col}: volume total de la colonne

Le taux de rétention de phase stationnaire conditionne en grande partie la qualité de la séparation des analytes, *i.e.* la résolution. Il est généralement admis que le taux de retention de phase stationnaire doit être au minimum de 50 % pour être considéré comme satisfaisant.

- Constante de distribution (K_D)

La constante de distribution K_D est une constante physique caractéristique d'une substance chimique dans un état donné (ionisé, neutre, complexé...) au sein d'un système biphasique de solvants donné. A l'équilibre, cette constante est régie par la loi de Nernst (1891): une substance chimique dissoute se répartit à l'équilibre entre deux phases liquides non miscibles selon un ratio constant et reproductible. Elle peut ainsi se définir par le rapport des concentrations d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile d'un système biphasique (Foucault, 1995).

$$K_D = \frac{C_{stat}}{C_{mob}}$$

Avec K_D : constante de distribution du soluté dans le système de solvants

C_{stat} : concentration du soluté dans la phase stationnaire

C_{mob} : concentration du soluté dans la phase mobile

En pratique, pour que ce paramètre demeure constant quelque soit le mode de pompage choisi, cette constante est plus généralement définie par le rapport des concentrations de l'analyte dans la phase supérieure du système biphasique de solvants (organique à l'exception des systèmes contenant des solvants chlorés) et dans la phase inférieure (aqueuse à l'exception des systèmes contenant des solvants chlorés), soit

$$K_D = \frac{C_{sup}}{C_{inf}}$$

Avec K_D : constante de distribution du soluté dans le système de solvants

C_{sup} : concentration du soluté dans la phase supérieure

C_{inf} : concentration du soluté dans la phase inférieure

Pour un pré-fractionnement par CPC en mode élution, la première étape consiste en l'évaluation de la constante de distribution des analytes dans les systèmes biphasiques testés.

Idéalement, les K_D des analytes les plus abondants devraient s'approcher d'une valeur de 1, pour permettre un fractionnement intéressant.

III.2.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique par CPC

III.2.2.1. Sélection du système biphasique de solvants

Pour sélectionner le système biphasique de solvants à utiliser pour fractionner un extrait complexe, le but est d'obtenir des fractions chimiquement simplifiées contenant un produit majoritaire, pour accéder facilement à ce dernier par purification par chromatographie sur colonne ouverte par exemple.

Les composés semblants les plus abondants ont servi d'étalons pour apprécier le système ; nous avons ainsi sélectionné arbitrairement les produits dont le rapport frontal en CCM est de 0,34, 0,43 et 0,49 (éluant Cyclohexane/AcOEt (60:40, v/v)). La concentration des analytes dans chaque phase a été évaluée par mesure densitométrique sous UV 366 nm.

La sélection des systèmes a débuté par le criblage de la gamme Arizona (Berthod *et al.*, 2005) qui est une gamme de solvants de polarité moyenne semblant adaptée pour les molécules contenues dans notre extrait. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-après.

Système	Composition Heptane/AcOEt/MeOH/eau	Produit Rf = 0,34	Produit Rf = 0,43	Produit Rf = 0,49
A	0 :1 :0 :1, v/v	>10	>10	>10
G	1 :4 :1 :4, v/v	>10	>10	>10
M	5 :6 :5 :6, v/v	2,1	6,0	1,9
N	1 :1 :1 :1, v/v	1,4	2,9	0,8
P	6 :5 :6 :5, v/v	1,0	1,5	0,7
U	4 :1 :4 :1, v/v	0,16	0,2	0
Z	1 :0 :1 :0, v/v	0,16	0,1	0

Tableau 1 : Systèmes biphasiques testés et constantes de distribution obtenues pour les composés principaux de l'extrait chloroformique.

Les systèmes P et N, de polarité intermédiaire, ont permis d'obtenir une répartition intéressante des trois composés majoritaires. Les K_D obtenus sont en effet assez différents pour espérer une séparation des trois analytes. Parmi ces deux systèmes de solvants, le système P a été retenu car les valeurs de K_D sont plus compatibles avec un temps d'expérience plus court.

III.2.2.2. Fractionnement par CPC

Après des essais préliminaires, environ 1 g de l'extrait chloroformique a été fractionné en utilisant le système de solvants Arizona P (expérience PO-CPC3). Les conditions expériementales sont regroupées dans la partie expérimentale du manuscrit (Partie 1 – VI)

Les différentes fractions sont regroupées selon leur profil chromatographique en CCM. Dix fractions ont ainsi été obtenues, le bilan massique ainsi que les profils CLHP des fractions sont présentés ci-après.

Fraction	**Masse (mg)**	**Rendement (%)**
F_I	150	12,0
F_{II}	26	2,1
F_{III}	22	2,0
F_{IV}	26	1,8
F_V	46	3,7
F_{VI}	86	6,9
F_{VII}	21	1,7
F_{VIII}	26	2,1
F_{IX}	60	4,8
F_X	667	53,4

Tableau 2 : Bilan massique des fractions obtenues après fractionnment par CPC.

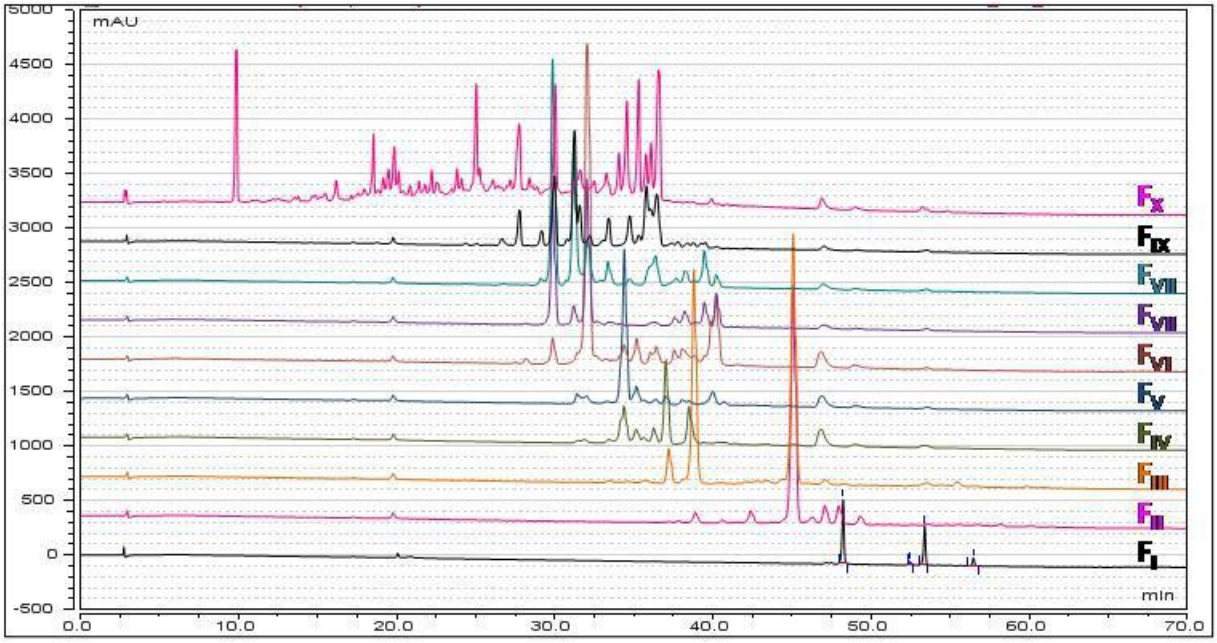


Figure 19 : Chromatogrammes CLHP des différents fractions obtenues après fractionnement par CPC (UV 210 nm).

Le fractionnement par CPC nous a permis d'obtenir en une étape des fractions chimiquement très simplifiées, contenant pour la plupart un composé de façon prépondérante, en particulier les fraction F_I, F_{II}, F_{III} et F_{VI} (voir composition Tableau 3).

Les spectres UV, extraits des chromatogrammes CLHP, montrent pour ces composés majoritaires des maxima d'absorption vers 210, 254 et/ou 260 nm, compatibles avec des structures de type chromone ou coumarine, métabolites abondants dans cette espèce.

Ces fractions ont ensuite été soumises à une chromatographie sur colonne ouverte pour accéder aux composés majoritaires purs.

La fraction F_X représente près de la moitié de l'extrait brut mais reste de nature très complexe, contenant les composés les plus polaires de l'extrait. Pour faciliter la purification des métabolites de cette fraction, nous avons procédé à une seconde purification par CPC.

Fraction F_I		**Fraction F_{II}**		**Fraction F_{III}**		**Fraction F_{VI}**	
Temps de rétention (min)	Aire sous la courbe relative (%)	Temps de rétention (min)	Teneur en % Aire sous la courbe	Temps de rétention (min)	Teneur en % Aire sous la courbe	Temps de rétention (min)	Teneur en % Aire sous la courbe
48,2	56,4	38,9	3,3	37,2	6,1	28,1	0,7
52,4	2,4	42,4	3,2	38,1	0,6	29,6	0,1
53,4	34,3	45,1	81,2	38,8	41,1	29,9	3,3
56,5	7,0	46,2	1,4	44,5	0,7	31,4	1,3
		47,1	2,7	45,1	51,5	32,0	54,2
		47,9	5,6			32,6	1,3
		49,3	2,6			33,2	0,9
						33,7	0,5
						34,2	0,8
						34,4	2,6
						35,2	4,0
						36,0	1,3
						36,4	2,3
						37,6	1,9
						38,1	1,5
						38,2	2,1
						38,8	1,5
						39,9	1,2
						39,9	4,5
						40,2	10,9
						46,9	3,1

Tableau 3 : Composition CLHP (210 nm) des fractions F_I, F_{II}, F_{III} et F_{VI}.

III.2.3. Fractionnement de la fraction F_X

III.2.3.1. Sélection du système biphasique de solvants

Les composés de la fraction F_X étant les plus polaires, nous avons testé en première intention les systèmes les plus polaires de la gamme Arizona. Les substances cibles choisies pour l'évaluation de la constante de distribution sont les composés de Rf égal à 0,64, 0,53 et 0,42 (éluant Cyclohexane/AcOEt (30 :70, v/v)). Les constantes de distribution obtenues pour chaque analyte sont regroupées dans le tableau ci-après.

Système	Composition Heptane/AcOEt/MeOH/eau	Produit Rf = 0,42	Produit Rf = 0,53	Produit Rf = 0,64
A	0 :1 :0 :1, v/v	>10	>10	>10
J	2 :5 :2 :5, v/v	2	3	5
K	1 :2 :1 :2, v/v	0,8	1,5	2
L	2 :3 :2 :3, v/v	0,5	0,7	1
M	5 :6 :5 :6, v/v	0,3	0,5	0,8
N	1 :1 :1 :1, v/v	0,1	0,2	0,3

Tableau 4 : Systèmes biphasiques testés et constantes de distribution obtenues pour les composés principaux de la fraction F_X.

Au vu des constantes de distributions obtenues, nous avons retenu le système Arizona L pour procéder à la purification de la fraction.

III.2.3.2. Purification par CPC

Après des essais préliminaires, environ 500 mg de F_X de l'extrait chloroformique a été fractionné en utilisant le système de solvants Arizona L (expérience PO-CPC5). Les conditions expérimentales sont regroupées dans la partie expérimentale (Partie 1 – VI).

Les fractions des différentes sont regroupées selon leur profil chromatographique en CCM. Huit fractions ont ainsi été obtenues, le bilan massique ainsi que les profils CLHP des fractions sont présentés ci-après.

Fraction	**Masse (mg)**	**Rendement (%)**
F_{X1}	82	16,5
F_{X2}	55	11,1
F_{X3}	13	2,4
F_{X4}	35	7,0
F_{X5}	20	4,0
F_{X6}	15	3,0
F_{X7}	23	4,6
F_{X8}	235	47,4

Tableau 5 : Bilan massique des fractions obtenues après fractionnement de la fraction F_X.

Les fractions obtenues sont des mélanges toujours complexes de produits, de temps de rétention très proches en chromatographie sur silice ou silice à polarité de phase inversée. Néanmoins, la fraction F_{X8} présente un pic majoritaire et est disponible en quantité suffisante pour envisager une purification ultérieure.

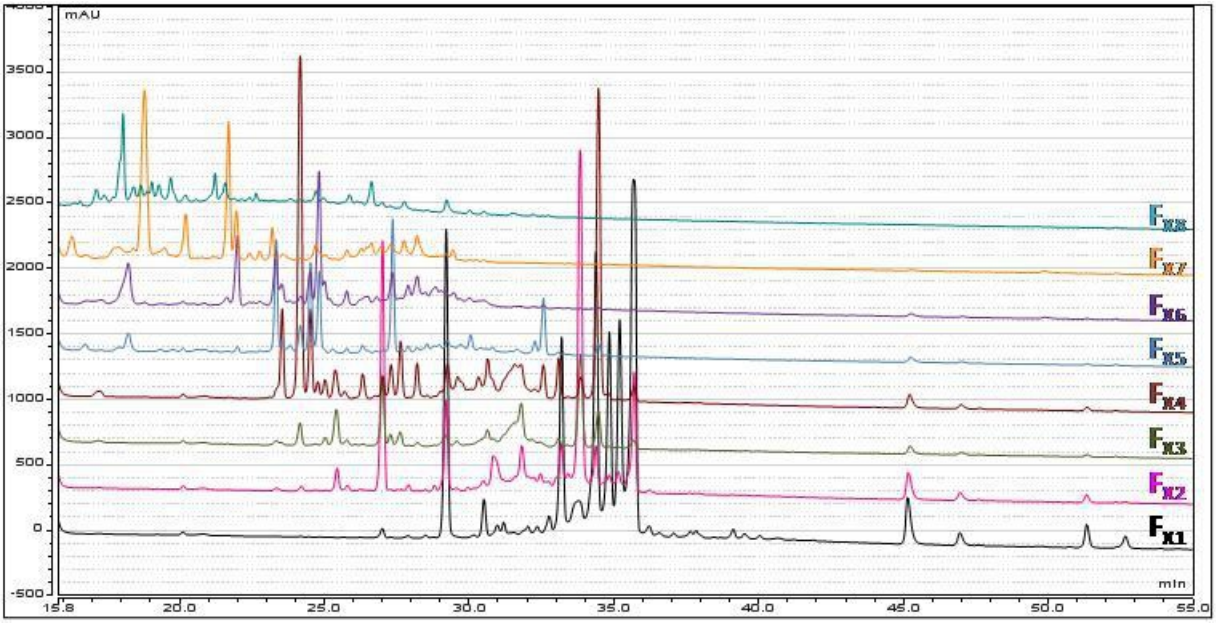


Figure 20 : Chromatogrammes CLHP (210 nm) des fractions issues du fractionnement de la fraction F_X.

III.3. Purification et identification des métabolites majoritaires des fractions d'intérêt

III.3.1. Purification des métabolites

Les fractions F_I, F_{II}, $F_{III,}$ F_{VI} et F_{X8} ont été purifiées par chromatographie sur gel de silice en utilisant des gradients cyclohexane/acétate d'éthyle ou dichloromométhane/méthanol selon le comportement des analytes sur plaque CCM avec ces mêmes mélanges.

Le composé **1** (20 mg et 7 mg) a ainsi été isolé des fractions F_{II} et F_{III} avec une pureté CLHP de 95 et 91 % respectivement.

Le composé **2** (19 mg) a été isolé de la fraction F_I, avec une pureté de 95 %.

Le composé **3** (10 mg) a été isolé de la fraction F_{VI}, avec une pureté de 97 %.

Le composé **4** (10 mg) a été isolé de la fraction F_{III}, avec une pureté de 99 %.

Le composé **5** (15 mg) a été isolé de la fraction F_{X8}, avec une pureté de 92 %.

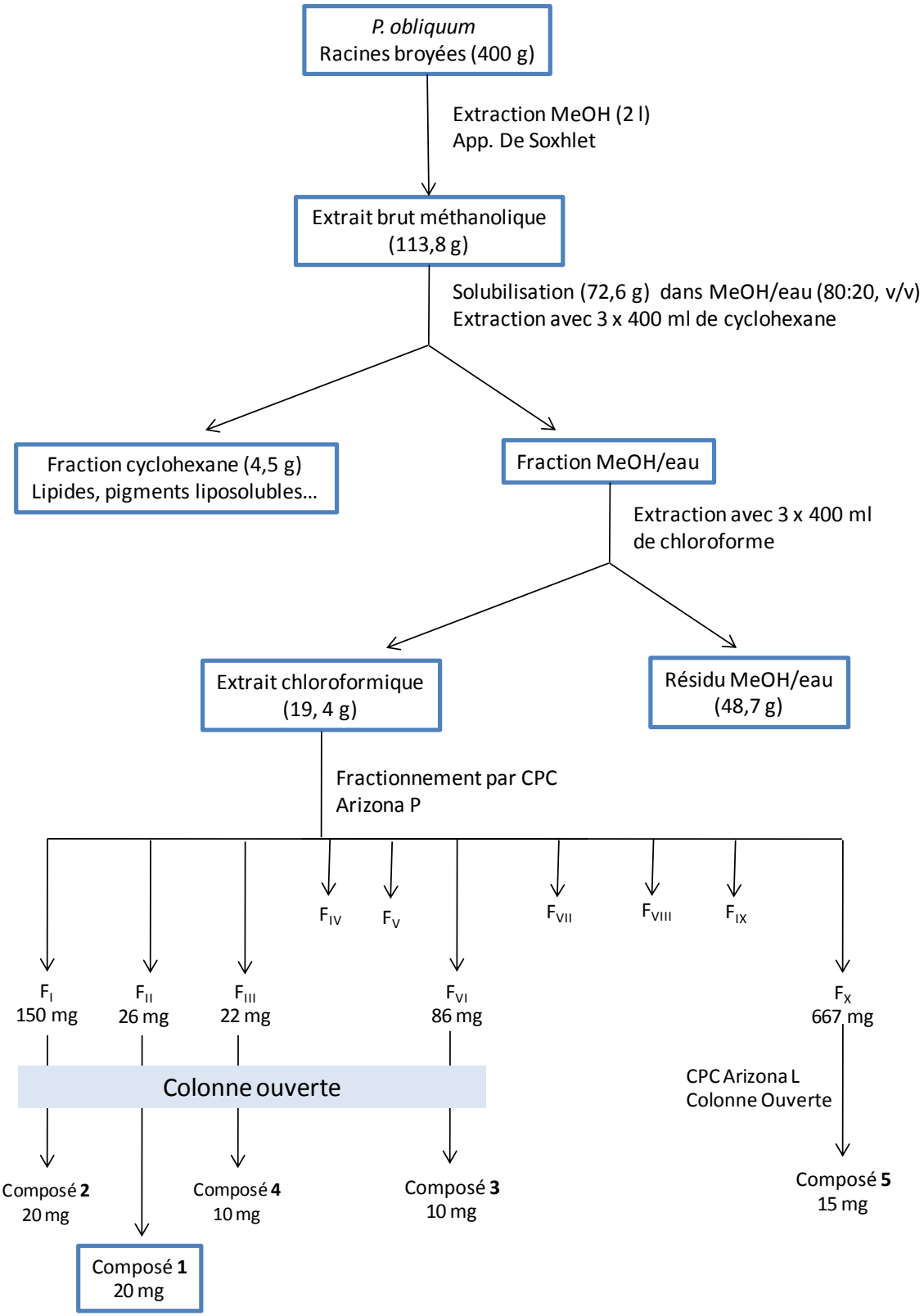


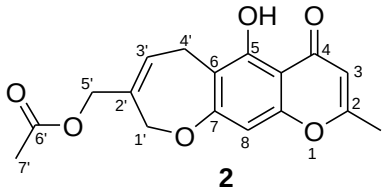
Figure 21 : Schéma récapitulatif d'extraction, des racines aux composés **1** à **5** purs.

III.3.2. Identification des différents composés isolés

III.3.2.1. Identification des composés **2** à **4**

- Composé **2**

Les analyses par RMN du ^{13}C et du ^{1}H du composé **2** indiquent respectivement la présence de 17 carbones et de 16 protons. L'analyse par spectrométrie de masse révèle la présence d'un ion moléculaire m/z 316 $[M]^+$. Ces données nous permettent de proposer la formule brute $C_{17}H_{16}O_6$ avec un degré d'insaturation de 10. La comparaison des données RMN obtenues (Partie 1. VI) avec celles de la littérature (Epe *et al.*, 1981) sont identiques à celles de l'acétate de ptaeroxylinol (Figure 22).



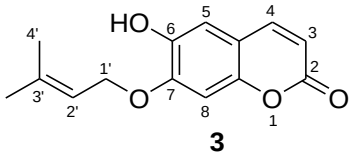
2

Figure 22 : Structure de l'acétate de ptaeroxylinol **2**.

Ce métabolite a déjà été décrit dans des plantes du genre *Cedrelopsis* mais est ici isolé pour la première fois de *P. obliquum*.

- Composé **3**

Les analyses par RMN du ^{13}C et du ^{1}H du composé **3** indiquent respectivement la présence de 14 carbones et de 14 protons. L'analyse par spectrometrie de masse révèle la présence d'un ion moléculaire m/z 246 $[M]^+$. Ces données nous permettent de proposer la formule brute $C_{14}H_{14}O_4$ avec un degré d'insaturation de 8. La comparaison des données RMN obtenues (Partie 1. VI) avec celles de la littérature (Razavi *et al.*, 2008) sont identiques à celles de la prenyletine (Figure 23).



3

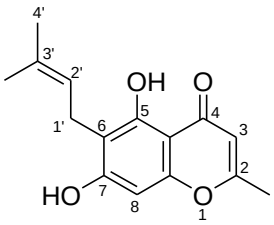
Figure 23 : Structure de la prenyletine **3**.

La prenyletine a déjà été isolée des parties aériennes de *P. obliquum*.

- Composé **4**

Les analyses par RMN du ^{13}C et du ^{1}H du composé **4** indiquent respectivement la présence de 15 carbones et de 16 protons. L'analyse par spectrometrie de masse révèle la présence d'un ion moléculaire m/z 260 $[M]^+$. Ces données nous permettent de proposer la formule brute $C_{15}H_{16}O_4$ avec un degré d'insaturation de 8. La comparaison des données RMN obtenues

(Partie 1. VI) avec celles de la littérature (Thadaniti *et al.*,1994) sont identiques à celles de la peucenine (Figure 24).



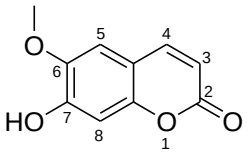
4

Figure 24 : Structure de la peucenine **4**.

Tout comme la prenyletine, la peucenine a été isolée précédement des parties aériennes de *P. obliquum*, il n'est donc pas suprenant de retrouver ce métabolite dans les racines.

- Composé **5**

Les analyses par RMN du ^{13}C et du ^{1}H du composé **5** indiquent respectivement la présence de 10 carbones et de 8 protons. L'analyse par spectrometrie de masse révèle la présence d'un ion moléculaire m/z 192 $[M]^+$. Ces données nous permettent de proposer la formule brute $C_{10}H_8O_4$ avec un degré d'insaturation de 7. La comparaison des données RMN obtenues (Partie 1. VI) avec celle de la littérature (Sankar *et al.*,1982) sont identiques à celles de la scopoletine (Figure 25).



5

Figure 25 : Structure de la scopoletine **5**.

La scopoletine a été déjà isolée du bois de *P. obliquum* par Mulholland *et al*. (1999).

III.3.2.2. Analyse structurale du composé **1**

Le spectre de masse haute résolution en mode positif, donne un pic moléculaire d'un ion $[M+H]^+$de 343.15412 (calc. 343.15400). Cet ion correspond à une formule brute la plus probable de $C_{20}H_{23}O_5$ (Figure 26).

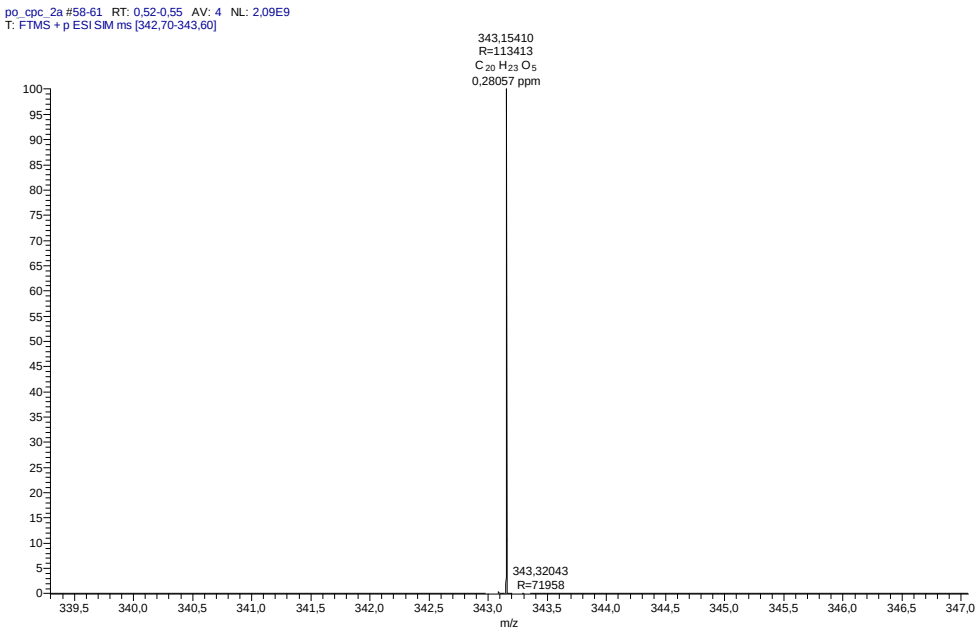


Figure 26 : Spectre de masse haute résolution du composé **1**

L'analyse de spectre IR montre la présence d'un groupement hydroxyle (OH) à 2949 cm^{-1}, d'une fonction carbonyle chélatée à 1658 cm^{-1} et d'un cycle aromatique à 1576 cm^{-1}.

Les maxima d'absortion observés en spectrométrie UV, à λ_{max} 210, 261 et 296 nm, suggèrent la présence d'un motif de type chromone ou coumarine, qui sont les métabolites secondaires les plus abondants (Epe *et al.*, 1981). En comparant les premières données avec la littérature, aucune molécule précédemment décrite ne correspond à la formule brute obtenue par HRMS.

L'analyse des spectres RMN du ^{13}C et du ^{1}H indiquent la présence de 20 carbones et de 23 protons, confirmant la formule brute de $C_{20}H_{23}O_5$. L'ensemble des données RMN du composé **1** sont rassemblées dans le Tableau 6.

L'analyse du spectre RMN du ^{13}C (Figure 27) présente :

- un signal à δ 182,7 ppm correspondant à un groupement carbonyle ;
- des signaux de déplacement chimique δ 167,7 ; 159,9 ; 159,7 ; 155,2 ; 105,8 et 102,7 ppm correspondant à six carbones sp^2 quaternaires ;
- des signaux à δ 106,9 ; 101,4 ppm correspondant à deux carbones tertiaires sp^2 liés à un oxygène ;
- de signaux à δ 85,0 ; 38,9 ppm représentant deux carbones quaternaires sp^3, dont un lié à oxygène ;
- trois signaux à δ 46,4 ; 36,9 ; 35,4 ppm correspondant à des carbones tertiaires sp^3 ;
- des signaux à δ 61,3 ; 38,3 ; 25,6 ppm correspondant à trois carbones secondaires sp^3, dont un lié à oxygène ;
- trois signaux à δ 33,8 ; 27,5 ; 18,2 ppm correspondant à trois carbones primaires sp^3.

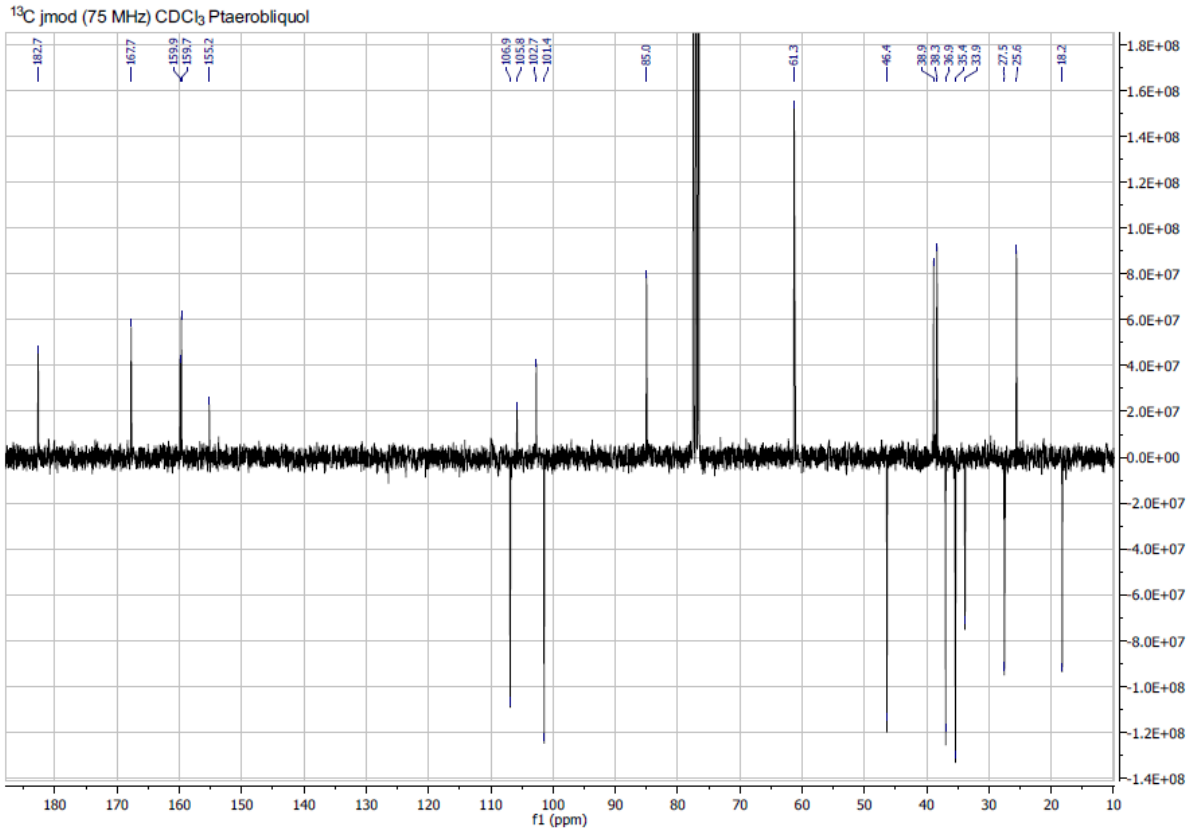


Figure 27 : Spectre RMN ^{13}C jmod (75 MHz, $CDCl_3$) du composé **1**.

Le signal du carbonyle à δ 182,7 ppm (sp^2), suggère également la présence d'un cycle aromatique avec groupe cétonique intracyclique, nous orientant plutôt vers une structure de type chromone. En effet, les structures de type coumarine présentent un pic de groupement carbonylé de déplacement chimique moins élevé (autour de 160 ppm), correspondant au groupement lactone.

Le nombre de carbones sp^3 présents (10) suggère la présence d'un substituant aliphatique plus grand que le substituant isoprényle habituellement décrit dans la littérature (Mc Cabe *et al.*, 1967). La présence d'un substituant de type monoterpène est alors envisagé.

A ce stade, nous envisageons ainsi une structure de type chromone substituée par un groupement monoterpénique.

L'analyse du spectre RMN du proton (Figure 28) indique la présence d'un singulet à δ12,31 ppm correspondant vraisemblablement à un groupe hydroxyle engagé dans une liaison-hydrogène ainsi que deux singulets à δ 6,37 et 6,31 ppm correspondant à deux protons liés à des carbones tertiaires sp^2 aromatiques et sans voisins directs.

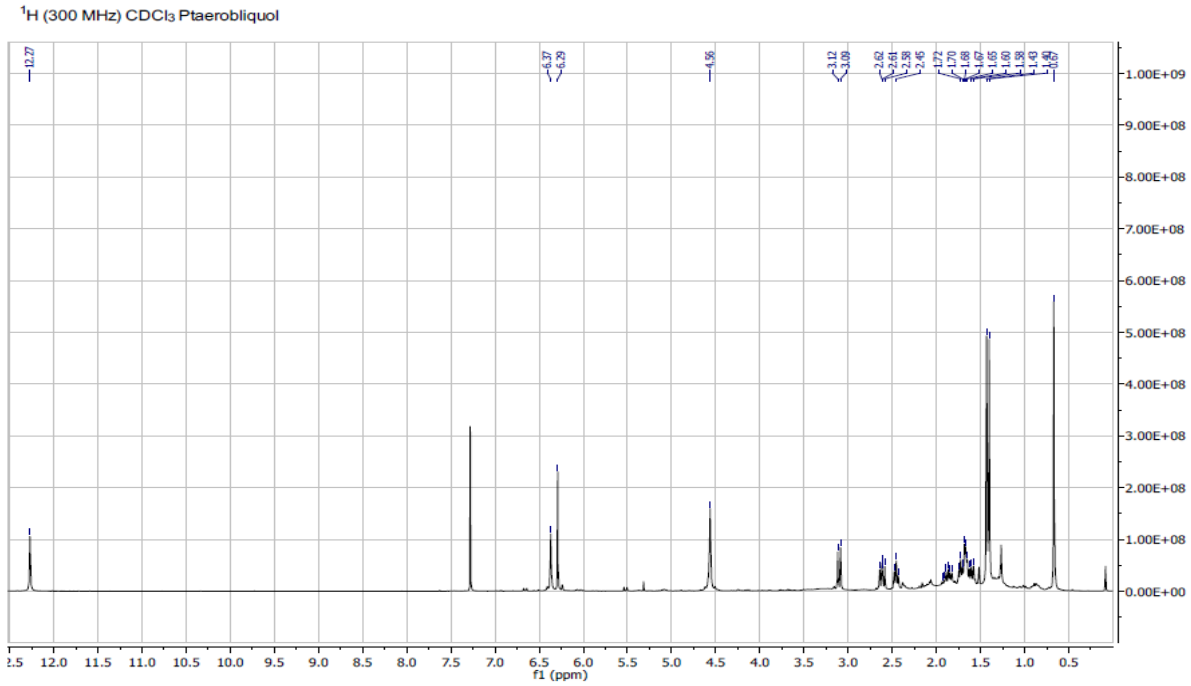


Figure 28 : Spectre RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) du composé **1**.

Le spectre présente également :

- un singulet à δ 4,59 ppm, corespondant à un groupement hydroxyle ;
- trois signaux à δ 3,12 ; 2,46 et 2,62 ppm correspondant à ces groupements CH de la partie terpénique ;
- deux signaux à δ 1,89 et 1,66 ppm correspondant à deux protons non équivalents d'un groupement CH_2 de la partie terpénique ;
- un signal à δ 1,66 ppm correspondant à un second groupement CH_2 de la partie terpénique ;
- trois singulets à δ 1,44 ; 1,41 et 0,61 ppm correspondant à trois groupements méthyle (3H, *s*), liés à des carbones quaternaires sp^3.

La structure postulée du composé **1** est la suivante :

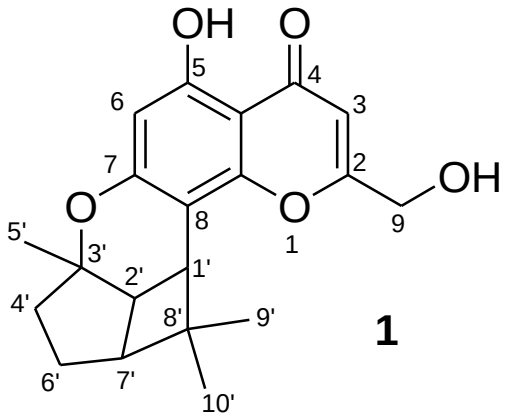


Figure 29 : Structure du composé **1**.

La présence des signaux des protons à δ_H 4,60 (2H, s) (H-9) connecté au carbone de δ_C 61,3 (C-9) ppm dans le spectre HSQC (**Annexe 1**) nous a permis de déduire la présence d'un groupement alcool secondaire. En effet, ces déplacements chimiques sont cohérents avec la présence d'un CH_2 lié à un groupe OH. La position de ce groupement en C-2 a été déduit de la corrélation dans le spectre HMBC entre le proton δ_H 4,60 (H-9) et le carbone δ_C 167,7 (C-2) et 106,9 (C-3) ppm.

La position du groupement hydroxyle aromatique en C-5 a été déduite par la corrélation entre le proton δ_H 12,31 (OH) et les carbones δ_C 159,7 (C-5), 105,8 (C-4a) et 101,4 (C-6) ppm.

La position du noyau terpénique a été confirmée par le spectre HMBC (**Annexe 2**) avec les corrélations observées entre le carbone δ_C 102,7 (C-8) et les protons δ_H 3,12 (H-1') et 2,62 (H-2'), ainsi que la corrélation entre le carbone δ_C 159,9 (C-7) et le proton δ_H 3,12 (H-1').

Le spectre COSY (**Annexe 3**) a permis d'élucider une partie de la structure de la moitié terpénique de part les corrélations observées entre les protons δ_H 3,12 (H, *d*, 9 Hz) (H-1') et 2,62 (H, *dd*, 6 et 9 Hz) (H-2'); δ_H 2,62 (H-2') et 2,46 (H, *t*, 6 Hz) (H-7'); δ_H 2,46 (H-7') et 1,66 (2H, *m*) (H-6'); δ_H 1,66 (H-6') et 1,89, 1,69 ppm (H, *t*, 6 Hz) (H-4'a et H-4'b).

La position des substituants méthyle géminés sur le carbone (C-8') a été déduit par la corrélation ^{4}J sur le spectre COSY entre les protons δ_H 1,41 (H-10') et 0,69 (H-9') ppm. Les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le carbone δ_C 38,9 (C-8') ppm et les protons δ_H 1,41 et 0,69 ppm, appuient également cette hypothèse.

La position du troisième groupement méthyle a été déduite de la corrélation sur le spectre HMBC entre le proton δ_H 1,44 (H-5') et le carbone δ_C 85,0 (C-3'). Ci-dessous sont représentées les corrélations HMBC observées (Figure 30):

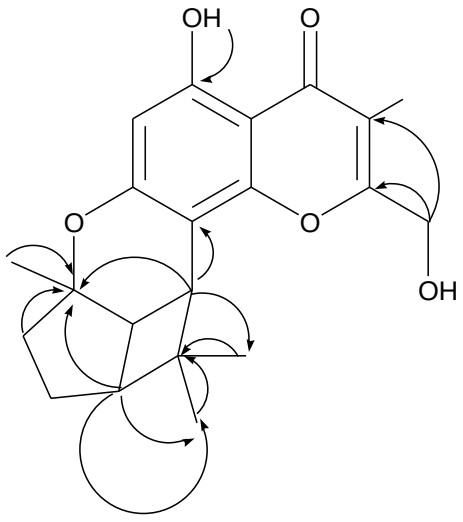


Figure 30 : Corrélations clés HMBC du composé **1**

La présence du motif cyclopentanopyrane est confirmée par les corrélations du spectre HMBC entre le carbone δ_C 85,0 (C-3') avec les protons δ_H 3,12 (H-1') et 1,89, 1,69 (H-4') ppm.

Le dernier cycle, de type cyclobutane, a été postulé grâce au spectre HMBC avec les corrélations observées entre les carbones δ_C 35,4 (C-1') et 46,4 (C-7') ppm et les protons δ_H 1,41 (H-10') et 0,69 (H-9'). Cette dernière partie nécessite d'être confirmée par des analyses complémentaires.

Dans cette optique, nous avons réalisé une analyse par diffraction des rayons X de notre composé **1**. La structure a été ainsi confirmée par l'analyse, une représentation en ORTEP est proposée (Figure 31).

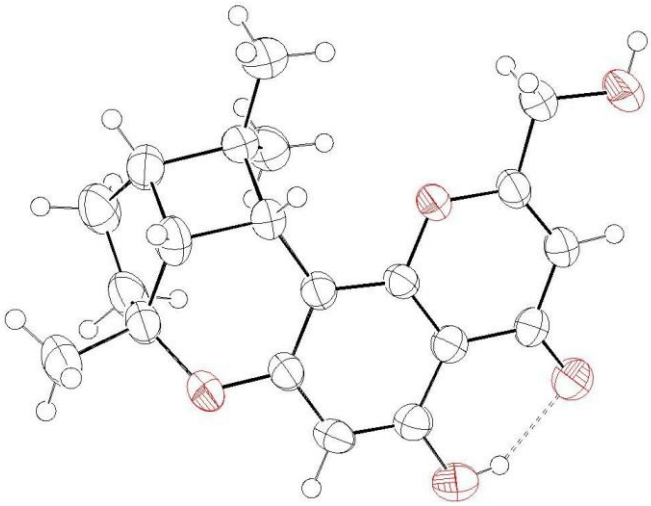


Figure 31 : Représentation ORTEP du composé **1**.

Si, à première vue, la partie tricyclique terpénique peut sembler très tendue, la mesure des longueurs de liaison nous donne des valeurs situées dans la normale, invalidant cette hypothèse. Nous pouvons également remarquer que le cycle cyclobutane est rectangulaire et plan.

Les configurations relatives des carbones assymétiques C-1', C-2', C-3' et C-7' ont été déterminées et correspondent respectivement à une configuration S*, R*, R* et S*, avec une rotation spécifique à $[\alpha]_D$=-13.4. Ces données sont en accord avec le spectre NOESY (**Annexe 4**), qui montre des corrélations homonucléaires entre les protons 10' et 1', 7' ainsi qu'entre les protons 2' et 5'.

	jmod	$\delta^{13}C$	$\delta^{1}H$, *J* en Hz	COSY	HMBC (C→H)	NOE
2	C	167,7	-		3, 9	
3	CH	106,9	6,37, *s*	9 (^{4}J)	9	
4	C	182,7	-		3	
4a	C	105,8	-		OH (5), 3, 6	
5	C	159,7	-		OH (5), 6	
6	CH	101,4	6,31, *s*		OH (5)	
7	C	159,9	-		6, 1’	
8	C	102,7	-		6, 1’, 2’	
8a	C	155,2	-		1’	
9	CH_2	61,3	4,59, *s*		3	
1’	CH	35,4	3,12, d ,9,0	2’	7’, 10’	10’
2’	CH	36,9	2,62, *dd*, 6,0 et 9,0	1’, 7’		5’
3’	C	85,0	-		1’, 4’, 5’	
4’	CH_2	38,3	1,89 et 1,69, *t*, 6,0	6’	6’	
5’	CH_3	27,5	1,44, s			2’
6’	CH_2	25,6	1,66, *m*	4’, 7’		
7’	CH	46,4	2,46, *t*, 6,0	2’, 6’	9’, 10’	10’
8’	C	38,9	-		9’, 10’	
9’	CH_3	18,2	0,69, *s*	10’ (^{4}J)	10’	
10’	CH_3	33,9	1,41, *s*	9’ (^{4}J)	1’, 9’	1’, 7’
OH (5)	-	-	12,31, *s*			

Tableau 6. Données RMN du composé **1**.

Le composé **1** est donc une molécule totalement originale, de type méroterpénoïde, que nous avons alors baptisé **Ptaerobliquol**. Nous nous sommes alors intéressés à l’analyse phylogénique ainsi qu’à la biosynthèse du ptaerobliquol.

III.3.3. Analyse phylogénétique et biosynthèse du Ptaerobliquol

Comme nous l’avons mentionné précédemment, le ptaerobliquol **1** est une nouvelle chromone de type méroterpénoïde. Les méroterpènes ont été décrits en 1968 comme des composés de différentes origines biosynthétiques présentant des éléments terpénoïdes dans leur structure (Cornforth, 1968).

Peu de méroterpènes dotés d’une partie chromone sont décrits dans la littérature. A notre connaissance, un seul exemple existe la Gerdelavine B, isolée de l’espèce Chinoise *Gerbera delavayi* de la famille Asteracées (Liu *et al.*, 2010). Il est important de noter que la structure de cette molécule est totalement différente de celle du Ptaerobliquol (Figure 32).

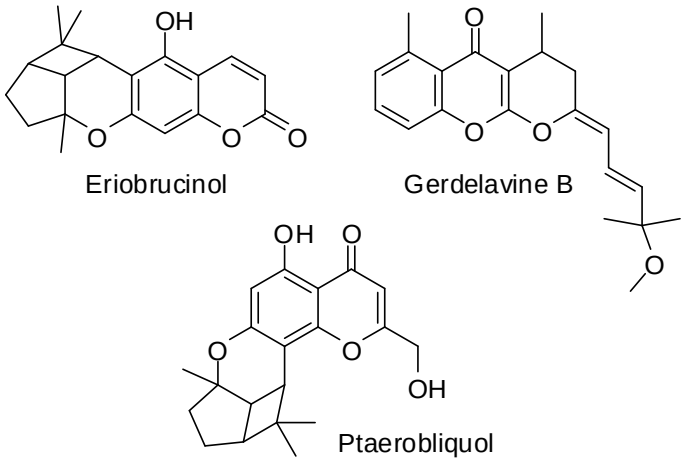


Figure 32 : Structures de l'eriobrucinol, du ptaerobliquol et de la gerdelavine B.

La présence de tels méroterpènes n'a jamais été rapportée dans le genre *Ptaeroxylon*, ni dans le clade *Spathelia-Ptaeroxylon*, ni même dans la famille des Rutacées au sens large. En revanche, une structure très semblable, l'eriobrucinol (Figure 32), a été isolée d'*Eriostemon brucei* une rutacée Australienne (Jefferies et Worth, 1973). L'eriobrucinol est un meroterpène de type coumarine, présentant une partie terpénique de structure identique au ptaerobliquol.

Ces résultats confirment l'étroite relation chimiotaxonomique entre le genre Ptaeroxylon et d'autres rutacées, ce qui est en accord avec la reconsidération taxonomique du rattachement du clade *Spatelioidaea-Ptaeroxylon* à la famille des Rutaceae *lato sensu* **(**Appelhans *et al.*, 2011).

Nous nous sommes alors intéressés à la biosynthèse du ptaerobliquol. Le schéma de biosynthèse proposé est présenté Figure 33.

La partie chromone de la molécule est classiquement issue de la voie des acétates, mais la partie terpénique tricyclique est quant à elle assez inhabituelle.

Dans la littérature, plusieurs chromones prénylées ont été isolées de *P. obliquum*, mettant en évidence la présence de prenyltransférases aromatiques dans cette plante. Néanmoins, aucun substituant dérivant du geranylpyrophosphate (GPP) n'avait été rapporté à ce jour.

Ce composé original suggère ainsi la présence de prenyltransférase aromatique spécialisée en transfert de GPP, comme la geranyltransferase isolée de *Lithospermum erythrorhizon* (Boraginaceae) (Yazaki *et al.*, 2002).

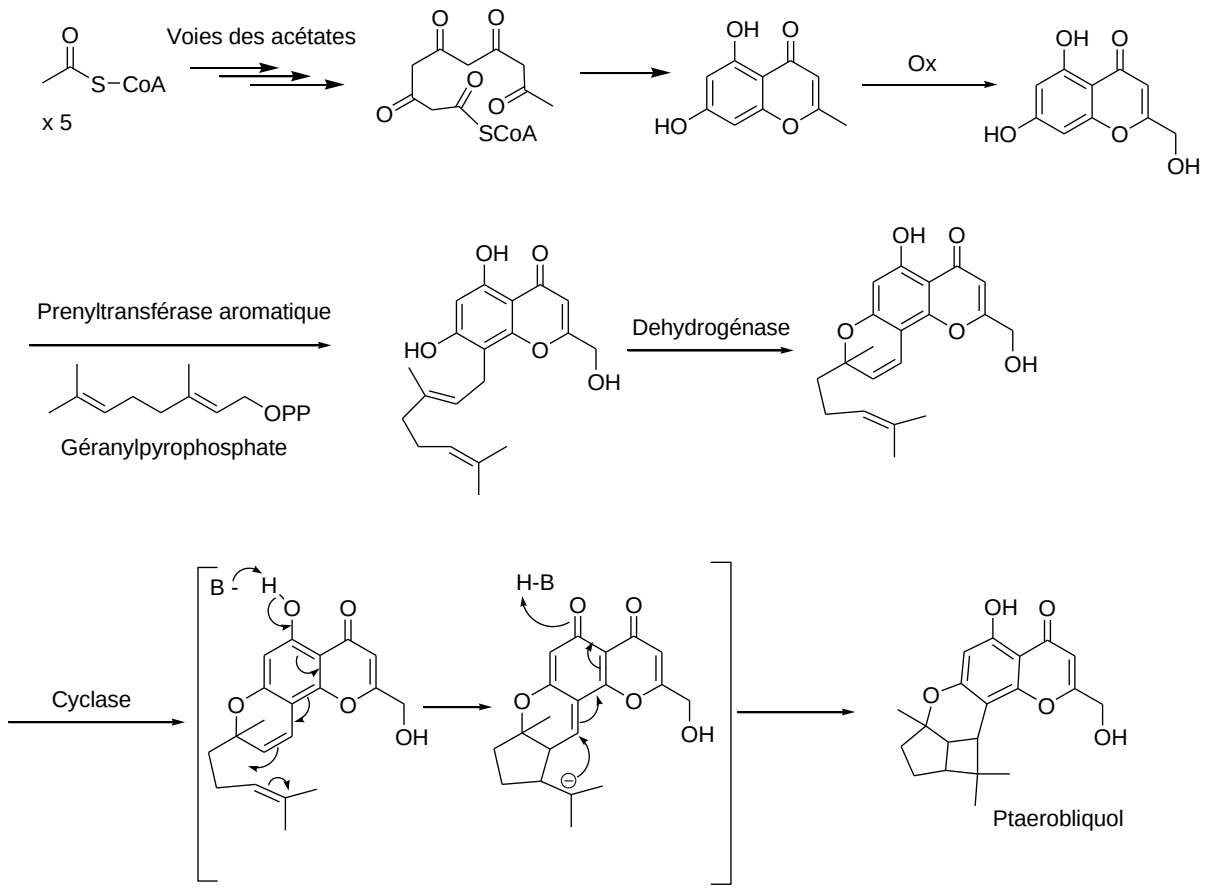


Figure 33 : Voie de biosynthèse proposée pour le ptaerobliquol.

Concernant la formation du motif cyclopentane-cyclobutane, nous avons émis l'hypothèse d'une cyclase spécifique permettant la formation de ces 2 cycles en une seule étape. La structure des deux composés eriobrucinol et ptaerobliquol étant très proche, cette cyclase spécifique doit également être présente chez *E. brucei.*

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première étude phytochimique réalisée au cours de ma thèse, porte sur *Ptaeroxylon obliquum,* une espèce médicinale décrite dans la pharmacopée traditionnelle du sud du Mozambique, pour le traitement notamment des affections stomachales, des rhumatismes et comme insecticide.

Une étude bibliographique approfondie a montré que les données phytochimiques disponibles se limitaient aux parties aériennes de la plante : écorces et feuilles. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'explorer les racines de cette plante, qui sont également utilisées par les tradipraticiens.

Au cours de nos travaux, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires à partir d'un extrait chloroformique des racines de *P. obliquum.*

La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solides-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie sur colonne de silice, chromatographie liquide de haute performance (CLHP)) et liquide-liquide, chromatographie de partage centrifuge (CPC)).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie infrarouge (IR) la spectroscopie de masse (SM), la cristallographie (rayons-X) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

Pour la spectroscopie RMN, les techniques monodimensionnelles (^{1}H, ^{13}C, DEPT, Jmod) et bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC) auxquelles nous avons fait appel, nous ont permis de réaliser la détermination structurale définitive et sans équivoque de la plupart des métabolites secondaires isolés, qui ont ensuite été confirmés par diffraction des rayons X.

Cinq composés ont été isolés :

- trois chromones : le ptaerobliquol (chromone monoterpénique originale), l'acétate de ptaeroxilinol (jamais décrite dans cette espèce) et la peucenine ;

- deux coumarines: la prenyletine et la scopoletine.

Nous souhaitons dans le futur étudier les activités biologiques de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmer les propriétés pharmacologiques attribuées à cette plante par les tradipraticiens mozambicains.

V. PARTIE EXPERIMENTALE

V.1. Le matériel végétal

V.1.1. Récolte et séchage

Les récoltes de racines de *Ptaeroxylon obliquum* (Thunb.) Radlk.ont été réalisées au mois de Mars 2010 dans leur habitat naturel situé dans la région de Canhane, province de Gaza (Sud Mozambique). La détermination botanique de l'espèce a été réalisée par les taxonomistes de l'Herbier de l'Institut de Recherche Agronomique au Mozambique à Maputo. Un échantillon portant le numéro Voucher G.4157, a été déposé au sein de cet Herbier.

Les racines ont été séchées au laboratoire à l'abri de la lumière durant 2-3 semaines à une température comprise entre 15 et 20°C. Le matériel végétal séché est ensuite réduit en poudre à l'aide d'un broyeur.

V.1.2. Extraction

400 g de poudre sèche de racines de *Ptaeroxylon obliquum* ont été extraits dans un appareil de Soxhlet au méthanol (2 l) pendant deux jours. L'extrait méthanolique brut obtenu est concentré sous pression réduite permettant l'obtention de 113,8 g d'extrait sec.

Une partie de cet extrait brut (72,6 g) a été solubilisé dans un mélange méthanol-eau (80 : 20, v/v) et soumis ensuite à des extractions liquide-liquide successives en présence de cyclohexane (3 x 400 ml), de chloroforme (3 x 400 ml). Trois extraits ont été ainsi obtenus :

- Un extrait cyclohexanique : 4,5 g ;
- Un extrait chloroformique : 19,4 g ;
- Le résidu méthanolique : 48,7 g.

V.2. Techniques de fractionnement et purification

V.2.1. Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

V.2.1.1. Appareillage

Le Chromatographe de Partage Centrifuge utilisé au laboratoire est un FCPC Preparative 200 Kromaton Technologies® (Rousselet Robatel, Annonay, France). Il s'agit d'un appareil mono axe de capacité volumique de 200 ml environ, comportant un rotor issu de l'empilement de 20 disques en Acier inox 316 L dans lesquels sont gravés 840 cellules de partage. Les principales caractéristiques de ce chromatographe sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.



Figure 34 : Photographie du chromatographe de partage centrifuge du laboratoire.

Caractéristiques	FCPC Kromaton®
Capacité de la colonne	205 ml
Volume mort	32,3 ml
Matériau du rotor	Acier Inox téflonné
Nombre de disques de Partition	20
Nombre de cellules	840
Géométrie des cellules	Twin cells
Pression maximum	60 bars

Tableau 7 : Caractéristiques du FCPC du laboratoire.

La chaîne chromatographique du laboratoire est de plus constituée des éléments classiquement retrouvés dans toutes les chaînes chromatographiques :

- une pompe gradient préparative Ecom Beta 50 Gradient (Praha, République Tchèque);
- une valve d'injection "Dual mode" préparative 3725i (Rheodyne, Rohnert Park, CA, USA) équipée d'une boucle de 10 ou 20 ml;
- un détecteur UV-visible Ecom Flash 06 DAD 600 detector ;
- un collecteur de fractions Advantec Super Fraction collector (Otowa, Japon).

V.2.1.2. Sélection du système biphasique de solvants

- Extrait chloroformique

Une petite quantité de chaque système biphasique à tester est construite en mélangeant les quantités appropriées de chaque solvant. Environ 1 ml de chaque phase sont transférés dans un pilulier. Un aliquot d'extrait est solubilisé dans chaque pilulier. Après solubilisation de l'échantillon, agitation et décantation des phases, un volume équivalent de chaque phase est déposé en chromatographie sur couche mince (CCM). Après migration dans un système cyclohexane/acétate d'éthyle (60 :40, v/v) et révélation par l'anisaldéhyde sulfurique, l'intensité des taches obtenues dans chaque phase est évaluée en lumière blanche et sous UV à 366 nm, par densitométrie. Les composés semblants les plus abondants ont servi d'étalons pour apprécier le système ; nous avons ainsi sélectionné arbitrairement les produits dont le rapport frontal est de 0,34, 0,43 et 0,49.

- Fraction F_X de PO-CPC 3

Le système adapté pour la purification de la fraction FX a été sélectionné selon le protocole décrit précédement. Les substances cibles choisies pour l'évaluation de la constante de

distribution sont les composés de Rf égal à 0,64, 0,53 et 0,42 (éluant Cyclohexane/AcOEt (30 :70, v/v).

V.2.1.3. Conditions opératoires CPC

- Fractionnement extrait chloroformique

La colonne est préalablement lavée en mode ascendant par 300 ml d'un mélange eau/MeOH (50 :50, v/v), pompé à 25 $ml.min^{-1}$ à 600 rpm.

Le système biphasique est préparé en mélangeant des volumes appropriés de chaque solvant dans une ampoule à décanter. Les phases supérieures et inférieures sont séparées après agitation et décantation. La colonne est remplie de phase stationnaire (300 ml) dans le mode de pompage adapté, à un débit de 25 $ml.min^{-1}$, à 600 rpm.

Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Expérience	PO-CPC 1	PO-CPC 2	PO-CPC 3
Système biphasique	Arizona P		
Masse injectée	99,6 mg	501,1 mg	1,25 g
Mode pompage	Ascendant		
Débit	8 $ml.min^{-1}$	8 $ml.min^{-1}$	8 $ml.min^{-1}$ 5 % de co-courant
Vitesse de rotation	1500 rpm	1400 rpm	1400 rpm
Rétention de phase stationnaire	75 %	75 %	73 %
Perte de charge	48 bars	41 bars	38 bars
Longeurs d'ondes	210, 254, 280, 365 nm		
Début de l'extrusion	50 min	53 min	60 min
Volume des fractions collectées	8 ml	4 ml	4 ml

Tableau 8 : Conditions opératoires utilisées pour le fractionnement de l'extrait chloroformique.

Les fractions des différentes CPC sont regroupées selon leur profil chromatographique en CCM.

- Fractionnement F_X de l'expérience PO-CPC 3

Les conditions opératoires utilisées pour la purification de la fraction F_X par CPC sont regroupées dans le tableau ci-après.

Expérience	PO-CPC 4	PO-CPC 5
Système biphasique	Arizona L	
Masse injectée	108 mg	495 mg
Mode pompage	Ascendant	
Débit	8 $ml.min^{-1}$	
Vitesse de rotation	1300 rpm	
Rétention de phase stationnaire	75 %	72 %
Perte de charge	32 bars	31 bars
Longeurs d'ondes	210, 254, 280, 365 nm	
Volume des fractions collectées	8 ml	4 ml

Tableau 9 : Conditions opératoires utilisées pour le fractionnement de la fraction F_X.

La purification PO-CPC 5 a permis l'obtention de 8 fractions notées F_{X1} à F_{X8}.

V.2.2. Chromatographie sur colonne ouverte.

Les colonnes ouvertes ont été réalisées sur gel de silice 60 (0,040-0,063 mm) Merck. La taille des colonnes, la masse de gel de silice ont été adaptés à la quantité et à la nature de l'échantillon à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi des purifications et le regroupement des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM. Les échantillons ont été déposés sur colonne après formation d'un amalgame par solubilisation dans le dichlorométhane, mélange avec de la silice et évaporation sous pression réduite.

La fraction $\mathbf{F_I}$ (150 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un melange cyclohexane-AcOEt de polarité croissante de 0 à 50% d'AcOEt. Le composé **2** (20 mg) a été isolé à 20 % d'AcOEt.

La fraction $\mathbf{F_{II}}$ (26 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un melange cyclohexane-AcOEt de polarité croissante de 10 à 20% d'AcOEt. Le composé **1** (20 mg) a été isolé à 10 % d'AcOEt.

La fraction $\mathbf{F_{III}}$ (22 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un melange CH_2Cl_2-MeOH de polarité croissante de 0 à 3% de MeOH. Les composés **4** (10 mg) et **1** (7 mg) ont été isolés à respectivement 1 et 2 % de MeOH.

La fraction $\mathbf{F_{VI}}$ (86 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un melange cyclohexane-AcOEt de polarité croissante de 0 à 50% d'AcOEt. Le composé **3** (10 mg) a été isolé à 5 % d'AcOEt.

La sous-fraction $\mathbf{Fx_8}$ (121 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un mélange CH_2Cl_2-MeOH de polarité croissante de 1 à 25% MeOH. Le composé **5** (15 mg) a été isolé à 10 % de MeOH.

V.3. Techniques analytiques

V.3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les analyses ont été réalisées sur plaques de silice Silicagel 60 F254 (Merck). Les éluants utilisés sont des mélanges cyclohexane/AcOEt ou CH_2Cl_2/MeOH dans des proportions appropriées. Les plaques sont examinées sous UV à 254 et 366 nm avant et après révélation par pulvérisation d'anisaldéhyde sulfurique et chauffage à 105°C.

V.3.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex UHPLC U3000RS (Dionex, ThermoFisher SA, Voisins le Bretonneux, France), équipée d'une pompe LPG-3400RS, d'un injecteur automatique RSLC WPS-300T RS, d'un enceinte à colonne thermostatée TCC-300SD et d'un détecteur à barrettes de diodes UHPLC+ DAD-3000.

La colonne utilisée est une colonne Ascentis® C_{18} (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) équipée d'une pré-colonne SuperguardTM AscentisTM C_{18} (2 cm x 4.0 mm, 5 µm) (Supelco, Bellefonte PA, USA).

La phase mobile utilisée est un mélange binaire d'eau avec 0,025% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution utilisé est le suivant : l'analyse débute à 100 % de solvant A puis la quantité de solvant B augmente progressivement jusque 100% en 60 min et maintenue à 100% de solvant B pendant 8 min, avant un ré-équillibrage de la colonne à 100 % de solvant A pendant 10 min.

La détection UV est fixée à λ=220, 254, 280 et 365 nm. La température du four à colonne est réglée à 40°C. Le volume d'injection est de 5 µL pour des solutions concentrées à 1 mg/mL.

Le pilotage de l'appareil et la gestion des données sont effectuées par le logiciel Chromeleon 7.1. Les pourcentages de pureté CLHP données sont indiqués pour λ=210 nm.

V.3.3. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été réalisés à température ambiante sur un spectromètre Brüker-Avance 300 MHz. Le solvant utilisé pour les analyses est le $CDCl_3$.

V.3.4. Spectrométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker ATR-IR alpha (Bruker Biospin, Wissenbourg, France).

V.3.5. Spectrométrie UV

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectromètre Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Les solutions à examiner ont été réalisées dans l'acétonitrile.

V.3.6. Point de fusion

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à capillaire Stuart SMP3 (Staffordshire, United kingdom).

V.3.7. Spectrométrie de masse

Les spectres de masses ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu QP 2010 par injection directe, avec une tension de cône de 70 eV.

Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre ExactivePlusOrbitrap (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne), équipé d'une sonde d'ionisation electrospray (H-ESI II). Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positif sur une plage de masse allant de 100 à 1000 Da. Le système est contrôlé par le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Les paramètres ESI et MS utilisés sont les suivants: tension de spray −4.0 kV, les températures du capillaire et du four respectivement de 260 et 350 °C, tension de lentille 100 V. « Automatic gain control » (AGC) de la valeur cible a été réglée à 1 × 106 charges et le temps d'injection maximal a été fixé à 200 ms. La résolution a été fixée à 140,000 (m/z = 200) et la durée du scan à environ 0.3 s (plus de 15 points par pic chromatographique).

V.3.8. Polarimétrie

La mesure du pouvoir rotatoire des composés a été réalisée sur un polarimètre Perkin-Elmer 241, en solution dans le chloroforme.

V.3.9. Diffraction des rayons X

- Obtention des échantillons monocristallins (cristallogénèse)

La cristallisation d'un composé moléculaire initialement en solution est un cas de passage d'une phase liquide (désordonnée) à une phase solide cristalline (ordonnée tripériodiquement). Nos composés ont été cristallisés en solution à température ambiante par évaporation lente du solvant, celui-ci étant de l'eau ou un mélange (généralement équivolumique) d'éthanol et de chloroforme, de façon à obtenir des monocristaux de dimensions (quelques dixièmes de millimètres) et de qualité appropriée à l'analyse.

- Analyse des échantillons monocristallins

L'enregistrement des diagrammes de diffraction (« collecte » des taches) a été réalisé à température ambiante ou à basse température (170 K, système cryogénique à flux d'azote), à la faculté des sciences de Brest, sur un diffractomètre Xcalibur, ou à la faculté de pharmacie de Tours, sur un diffractomètre Kappa CCD. La source de rayons X était dans les deux cas un tube à anticathode de molybdène, de longueur d'onde λ = 0,71073 Å.

- Résolution structurale et affinement

La détermination et l'affinement des mailles cristallines, l'indexation des taches et l'intégration des intensités (« réduction des données ») ont été effectuées respectivement, par les programmes CrysAlis (Oxford Diffraction, 2003) et Eval CCD (Nonius, 2001). La

résolution structurale, par méthode directe, et l'affinement, par méthode des moindres carrés, ont été réalisés à l'aide des programmes ShelxS97 ShelxL97 (Sheldrick, G. M., 1997). Les figures représentent les liaisons covalentes et les ellipsoïdes (Spek, A. L., 2003) des tenseurs de déplacement atomique (agitation thermique + incertitude, probabilité 50 %) des atomes des molécules indépendantes dans l'unité asymétrique. Les atomes d'hydrogène sont introduits en position théorique en relation avec les hétéroatomes qui les portent.

Les cristaux du ptaerobliquol, ont été obtenus dans un mélange CH_3CN/toluène à 293 K. Les dimensions des cristaux lamellaires sont: 0,45x0,15x0,10 mm.
Ptaerobliquol, $C_{20}H_{22}O_5$, Mx= 342.38 g mol^{-1} cristallise en système monoclinique avec un groupe d'espace $P2_1$ (Z=2). Les paramètres, à température ambiante T = 293K, sont: a= 9,1143(6), b = 10,0628(5) Å, c = 9,8234(8) Å et β =107,646(6)°, volume à 858,56 $(10)^{-3}$ Å.
La densité est égale à 1,324 $g.cm^{-3}$. 4261 reflections ont été collectées dont 2703 indépendantes [R(int) = 0,0580]. Les facteurs d'accord finaux (en F^2 et $I>2\sigma(I)$) sont :R_1 = 0,0547, wR_2 = 0,1162.

V.4. Description des composés isolés

V.4.1. 7a,8,9,9a,9b,10a-heptahydro-4H-10,10-diméthyl-1,7-dioxa-5-hydroxy-2-hydroxyméthylcyclobutyl[1,2,3:3,3a,4]indeno[5,6-a]naphtalèn-4-one, Ptaerobliquol (1) :

aiguilles jaunes ; m.p 150-152 °C; IRυ_{max} cm^{-1}: 2949 (OH), 1658 (C=O chélaté), 1576 (cycle aromatique); Description RMN Tableau 6; UV λ nm (log ε): 210 (3,99), 261 (3,97), 296 (3,41) CH_3CN_{max}; $[\alpha]_D^{21}$ -13.4 (c 0,358, $CHCl_3$); HREI/MS m/z 343,15410 $[M+H]^+$ (correspond à $C_{20}H_{23}O_5$ 343,15400).

V.4.2. 8-[(acétyloxy)méthyl]-6,9-dihydro-5-hydroxy-2-méthyl-4H-pyrano[3,2-h][1]benzoxepin-4-one, acétate de ptaeroxylinol (2):

cristaux blancs (CH_2Cl_2); m.p 170-171 °C (lit 160 °C); IR υ_{max} cm^{-1}: 2922 (OH), 1719 (> C=O acétate), 1655 (C=Ochélaté), 1594 (cycle aromatique); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 182.5 (C, C-4), 170,8 (C, C-6'), 167,2 (C, C-2), 167,2 (C, C-7), 158,2 (C, C-5), 154,3 (C, C-8a), 133,2 (C, C-6), 128,4 (CH, C-3'), 116,1 (C, C-2'), 114,1 (C, C-4a), 108,8 (CH, C-3), 99,4 (CH, C-8), 71,2 (CH_2, C-5'), 66,6 (CH_2, C-1'), 21,2 (CH_2, C-4'), 20,9 (CH_3, C-7'), 20,6 (CH_3, CH_3 C-2) ; RMN ^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 13,10 (1H, *s*, OH C-5), 6,56 (1H, *s*, C-8), 6,09 (CH, *t*, *J*=5,5 Hz, C-3'), 6,07 (1H, *s*, C-3), 4,67 (CH_2, *s*, C-5'), 4,48 (CH_2, C-1'), 3,60 (CH_2, *d*, *J*=5,5 Hz, C-4'), 2,38 (CH_3, *s*, CH_3 C-2), 2,08 (CH_3, *s*, C-7'); GC-MS m/z 316 $[M]^+$.

V.4.3. 6-hydroxy-7-[(3-méthyl-2-buten-1-yl)oxy]-2H-1-benzopyran-2-one, Prenyletine (3) :

aiguilles blancs (MeOH); m.p 134-135°C (lit 145-146 °C); IR υ_{max} cm^{-1}: 3538 (> isoprenyl), 2917 (OH), 1706 (lactone), 1271 (>Ar-O-CH_2); RMN^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 161,5 (C, C-2), 149,3 (C, C-8a), 149,2 (C, C-7), 143,4 (CH, C-4), 142,9 (C, C-6), 140,2 (C, C-3'), 118,0 (CH, C-2'), 113,7 (CH, C-3), 112,1 (C, C-4a), 110,7 (CH, C-5), 100,3 (CH, C-8), 66,3 (CH_2, C-1'),

25,8 (CH_3, C-4'), 18,35 (CH_3, CH_3 C-3'); RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 7,63 (1H, *d*, *J*=9 Hz, C-4), 6,98 (1H, *s*, C-5), 6,84 (1H, *s*, C-8), 6,31 (1H, *d*, *J*=9 Hz, C-3),5,68 (1H, s, OH C-6), 5,49 (1H, *t*, *J*=9 Hz, C-2'), 4,69 (1H, *d*, *J*=9 Hz, C-1'), 1,84 (3H, *s*, C-4'), 1,80 (3H, *s*, CH_3 C-3'); GC-MS m/z 246 $[M]^+$.

V.4.4. 5,7-dihydroxy-2-méthyl-6-(3-méthyl-2-buten-1-yl)-4H-1-benzopyran-4-one; Peucenine (4) :

poudre blanche; m.p 192-194 °C (lit 212 °C); IR υ_{max} cm^{-1}: 2916 (OH), 1654 (C=O chélaté); RMN^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz): δ 182,6 (C, C-4), 166,7 (C, C-2), 161,3 (C, C-8a), 159,1 (C, C-7), 156,3 (C, C-5), 135,6 (C, C-3'), 121,2 (CH, C-2'), 110,0 (C, C-4a), 108,5 (CH, C-3), 104,7 (C, C-6), 94,0 (CH, C-8), 25,8 (CH_3, CH_3 C-3'), 21,4 (CH_2, C-1'), 20,5 (CH_3, CH_3 C-2), 17,9 (CH_3, C-4'); RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 13,07 (1H, *s*, OH C-5), 6,35 (1H, *s*, C-8), 6,26 (1H, *s*, OH C-7), 6,04 (1H, *s*, C-3), 5,29 (1H, *t*, *J*=7 Hz, C-2'), 3,47 (2H, *d*, *J*=7 Hz, C-1'), 2,36 (3H, *s*, CH_3 C-2), 1,85 (3H, *s*, C-4'), 1,79 (3H, *s*, CH_3 C-3'); GC-MS m/z 260 $[M]^+$.

V.4.5. 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one, Scopoletine (5):

poudre blanche ; m.p. 198°C; Les propriétés physico-chimiques et les données RMN que nous obtenous sont conformes avec celles publiées dans la litérature (Sankar *et al.*,1982).

VI. BIBLIOGRAPHIE

Anderson C.M., Halleberg A., Hgberg T., 1996. Advances in the development of pharmaceutical antioxydants. *Adv. Drug. Res.* 28, 65-180.

Appelhans M.S., Smets E., Razafimandimbison S.G., Haevermans T., van Marle E.J., Couloux A., Rabarison H., Randriananrivelojosia M., Keßler P.J.A., 2011. Phylogeny, evolutionary trends and classification of the *Spathelia-Pteroxylon* clade: morphological and molecular insights. *Annals of Botany* 107, 1259-1277.

Berthod A., Hassoun M., Ruiz-Angel M. J., 2005. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 327–340.

Boiteau P., Médecine traditionnelle et pharmacopée : précis de matière médicale malgache, Agence de Coopération Culturelle et Technique, 1986.

Boudesocque L., Nouvelles méthodologies de purification de peptides par chromatographie de partage centrifuge: application à l'isolement et à la purification de peptides bioactifs, Thèse de doctorat soutenue le 09/12/2010, Université de Reims Champagne-Ardenne: Reims.

Brochini C.B., Roque N.F., 2000. Two new cneorubin related diterpenes from the leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *J. Brazil. Chem. Soc.* 11(4), 361-364.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Médicales. Ed. 4, Lavoisier, Paris, 895 p.

Cavaline J.F**.,** 2005. Caracterisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse, tel-00007939, version 1.

Cornforth J.W., 1968. Terpenoids biosynthesis. *Chem. Br.* 4, 102-06.

Cowan M.M., 1999. Plant products antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12 (4), 564-582.

Dean F.M., Taylor D.A.H., 1966. Extractives from East African Timbers. Part II. *Ptaeroxylon obliquum*. *J. Chem. Soc.*, 114-116.

Dean F.M., Parton B., Somvichien N., Taylor D.A., 1967a. Coumarins of *Ptaeroxylon obliquum*. *Tetrahedron Lett.* 23, 2147-51.

Dean F.M., Parton B., Price A.W., Somvichien N., Taylor D.A., 1967b. Umtatin and related chromones from the heartwood of *Ptaeroxylon obliquum*. *Tetrahedron Lett.* 29, 2737-40.

Dean F.M., Parton B., Somvichien N., Taylor D.A., 1967c. Chromones, containing an oxepin ring, from *Ptaeroxylon obliquum*. *Tetrahedron Lett.* 36, 3459-64.

Dean F.M., Robinson M.L., 1971. The heartwood chromones of *Cedrelopsis grevei*. *Phytochem.*,10, 3221-3227.

Dean F.M., Parton B.A.W., Somvichien N., Taylor D.A.H., 1967a. Umtatin and related chromones from the heartwood of *Ptaeroxylon obliquum*. *Tetrahedron Lett.* 29, 2737-40.

Dean F.M., Parton B., Somvichien N., Taylor D.A.H., 1967b. Coumarins of *Ptaeroxylon obliquum*. *Tetrahedron Lett.* 23, 2147-2151.

Debray M., Jacquemin H., Razafindrambao R.. Contribution à l'inventaire des plantes médicinales de Madagascar, Travaux et documents de l'O.R.S.T.O.M. Office de la recherche scientifique et technique, Paris, 1971.

Epe B., Oelbermann U., Mondon A., 1981. Neue Chromone aus Cneoraceen. *Chem. Ber*. 114, 757-773.

Fernandez M.A., Garcia M.D., Saenz M.T., 1996. Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *scrophularia sambucifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 53, 11-14.

Foucault A.J.P.. Centrifugal Partition Chromatography. Marcel Dekker: New York, 1995; Vol. 68.

Gonzalez A.G., Fraga M.B., Pino O., 1974. A new chromone from the stems of Cneorum tricoccon. *Phytochem.* 13, 2305-2307.

Gonzalez A.G., Darias V., Esteves E., Vivas J.M., 1983. Chemotherapeutic study of chromones from Spanish *Cneoraceae*. *J. Med. Plant Res.* 47, 56-58.

Harborne J.B., Baxter H., 1993. Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from plants. Taylor & Francis. Ltd.

Hostettman K., Chinyanganya M., Woldfender J.L., 1996. Chemistry, biological and pharmacological properties of african medicinal plants. University of Zimbabwe Publications, Harare, 327, 121-139.

Hoult J.R.S., Payá M., 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmac.* 27 (4), 713-722.

Itokawa H., Morita M., Mihashi S., 1981. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpina speciosa*. *Phytochem.* 20, 2503.

Jefferies P.R., Worth G.K.,1973. Chemistry of the Western Australian Rutaceae. VI. Two novel coumarins from *Eriostemon brucei*. *Tetrahedron* 29 (6), 903-908.

Koorbanally N.A., Randrianarivelojosia M., Mulholland D.A., van Ufford L.Q., van den Berg A.J.J., 2002. Bioactive Constituents of *Cedrelopsis microfoliata*. *J. Nat. Prod.*, 65, 1349-1352.

Koorbanally N.A., Randrianarivelojosia M., Mulholland D.A., van Ufford L.Q., van den Berg, A.J.J., 2003. Chalcones from the seed of *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochemistry* 62, 1225-1229.

Krog M., Falcão M.P., Olsen C.S.: Medicinal plant markets and trade in Maputo, Mozambique. Forest & Landscape Working Papers 16, Danish Center for forest landscaping and planning, KVL 2006.

Langenhoven J.H., Breytenbach J.C., Gerritsma-Van der Vijver L.M., Fourie T.G., 1988. An antihypertensive chromone from *Ptaeroxylon obliquum*. *Planta Med.* 54 (4), 373.

Lemmens R.H.M.J., 2008. *Ptaeroxylon obliquum* (Thumb.) Radlk. Fiche de Protabase. Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink,M. PROTA (Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageninggen, Pays Bas < http: //database.prota.org/ recherche. htm> (Visité le 25 août 2011).

Leroy J.F., 1960. Contributions à l'étude des forêts de Madagascar. Complément à la note V sur les *Ptaeroxylaceae*. *J. Agric. Trop. Bot. Appl.*7, 455-456.

Leroy J.F., 1959. Contributions à l'étude des forêts de Madagascar. Sur une petite famille de Sapindales propre à l'Afrique australe et à Madagascar : les *Ptaeroxylaceae*. *J. Agric. Trop. Bot. Appl.* 6, 106-108.

Leroy J.F., Lescot M., 1991. Flore de Madagascar et des Comores : *Ptaeroxylaceae*, Famille 107 bis, 87-117.

Liu S.-Z., Feng J.-Q., Wu J., Zhao W.-M., 2010. A New Monoterpene – Coumarin and a New Monoterpene – Chromone from *Gerbera delavayi*. *Helv. Chem. Act.* 93, 2026-2029.

Maharaj R., Maharaj V., Crouch N.R., Bhagwandin N., Folb P.I., Pillay P., Gayaram R., 2011. Screening for adulticidal bioactivity of South African plants against *Anopheles arabiensis*. *Malarial journal* 10, 233-238.

Mayekiso K., Eloff J.N., McGaw L., 2008. Screening of South African plants for antibacterial and antimycobacterial activity. African Journal of traditional, complementary and alternative medicines (AJTCAM), abstracts of the world congress on medicinal and aromatic plants, Cape Town.

McCabe P.M., McCrindle R., Murray R.D.H., 1967. Constituents of sneezewood, *Ptaeroxylon obliquum* (Thunb.) Radlk. Part I. Chromones. *J. Chem. Soc. (C)* 2, 145-51.

Mondon A., Callsen H., 1975. Extractive from Cneoraceae. IV. Chromones and coumarins from Cneorum pulverulentum. *Chem. Ber.* 108, 2005.

Mondon A., Epe B., 1983. Bitter principles of Cneoraceae. *Prog. Chem. Org. Prod.* 44, 101.

Mondon A., Epe B., Trautmann D., 1978. The bitter substance from Cneoraceae. X. *Tetrahedron Lett.* 49, 4881.

Moyo B., Masika P.J., 2009. Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 517-523.

Mulholland D.A., Kotsos M., Mahomed H.A., Randriananrivelojosia M., 1999. The chemistry of Ptaeroxylaceae, *Nig. J. Nat. Prod. Med.* 3, 15-18.

Mulholland D.A., Mahomed H., Kotsos M., Randrianarivelojosia M., Lavaud C., Massiot G., Nuzillard J.-M., 1999. Limonoid Derivatives from *Cedrelopsis grevei*. *Tetrahedron* 55, 11547-11552.

Mulholland D.A., Mahomed H.A., 2000. Isolation of Cneorubin X, an unusual diterpenoid from *Ptaeroxylon obliquum* (*Ptaeroxylaceae*). *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 713-716.

Mulholland D.A., Parel B., Coombes P.H., 2000. The Chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of Southern and Eastern Africa and Madagascar. *Curr. Org. Chem.* 4, 1011-1054.

Mulholland D.A., Kotsos M., Mahomed H.A., Koorbanally N.A., Radrianarivelojosia M., van Ufford L.Q., van den Berg A.J.J., 2002. Coumarins from *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochem.* 61, 919-922.

Mulholland D.A., Naidoo D., Randrianarivelojosia M., Cheplogoi P.K., Coombes P.H. 2003. Secondary metabolites from *Cedrelopsis grevei* (Ptaeroxylaceae). *Phytochem.* 64, 631-635.

Mulholand D.A., McFarland K., Randrianarivelojosia M., Rabarison H., 2004. Cedkathryns A and B, pentanortriterpenoids from *Cedrelopsis gracilis* (Ptaeroxylaceae). *Phytochem.* 65, 2929-2934.

Namba T., Morita O., Huang S.-L., Goshima K., Hattori M., Kakiuchi N., 1988. Studies on cardio-active crude drugs. I. Effect of coumarins on cultured myocardial cells. *Planta Med.* 54, 277-282.

Nonius, 2001. Logiciel Eval CCD. PAR Collect (Bruker AXS BV, 1997-2004) ; (Duisenberg & Schreurs 1990-2000)

Oxford Diffraction, 2003. Logiciels CrysAlis CCD et CrysAlis RED, Oxford Diffraction Ltd., (aujourd'hui : Agilent).

Pachler K.G.R., Roux D.G., 1967. Peucenin from sneezewood (*Ptaeroxylon obliquum). J. Chem. Soc. (C)* 7, 604-6.

Paris R.R., Debray M. 1972. Sur les polyphénols (acides-phénols, flavonoïdes) des feuilles de deux Méliacées malgaches : *Cedrelopsis grevei* Baillon et *Neobeguea mahafalensis* Leroy. *Plantes médicinales et phytothérapie* 6, 311-319.

Pauli G.F., Pro S.M., Friesen J.B., 2007. Countercurrent Separation of Natural Products. *J. Nat. Prod.* 71 (8), 1489-1508.

Piller N.B., 1975. A comparison of the effectiveness of some anti-inflamatory drugs on thermal oedema. *Br. J. Exp. Pathol.* 56, 554-559.

Rabarison H., Rakotondrafara A., Razafimandimbison G.S., Ratsimbason M., Rakotonandrasana S.R., Rajeriarison C., Randrianarivelojosia M., 2010. Etude écologique, *éthnobotanique* et évaluation du risque d'extinction pour établir une stratégie de conservation du genre *Cedrelopsis* (*Rutaceae-Sapindares*), endémique de Madagascar. Scripta Bot. 46 – AETFAT – Madagascar.

Randrianarivelojosia M., Mulholland D.A., McFarland K., 2005. Prenylated coumarins from *Cedrelopsis longibracteata* (Ptaeroxylaceae). *Biochem. System. Ecol.* 33(3), 301-304.

Razafimandimbison S.G., Appelhans M.S., Rabarison H., Haevermans T., Rakotondrafara A., Rakotonandrasana S.R., Ratsimbason M., Labat J.-N., Keßler P.J.A. , Smets E., Cruaud C., Couloux A., Randrianarivelojosia M., 2011. Implications of a molecular phylogenetic study of the Malagasy genus *Cedrelopsis* and its relatives (Ptaeroxylaceae). *Molec. Phylogen. Evol.* 57, 258–265.

Razavi S.M., Nazemiyeh H., Delazar A., Hajiboland R., Rahman M.M., Gibbons S., Nahar L., Sarker S.D., 2008. Coumarins from the roots of *Prangos uloptera*. *Phytochem. Letters* 1, 159.

Razdan T.K., Qadri B., Harkar S.,Waight E.S., 1987. Chromones and coumarins from Skimmia laureola. *Phytochem.* 26, 2063-2069.

Ribeiro A., Romeiras M.M., Tavares J., Faria M.T., 2010. Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: medicinal plants and traditional knowledge. *J. Ethnobio. Ethnomed.* 6, 33-48.

Robinson T., 1963. The organic constituents of higher plants. Printed in USA.

Sankar S.S., Gilbert R.D., Fornes R.E., 1982. ^{13}C NMR studies of some hydroxycoumarins and related compounds. *Org. Magn. Res.* 19 (4), 222-224.

Schulte K.E., Rücker G., Klewe U., 1973. Some Constituents of the Bark of *Cedrelopsis grevei* Baillon. *Arch. Pharmaz.* 306, 857-865.

Sheldrick G.M., 1997. SHELX-97: Program for Crystal Structure Refinement. University of Göttingen, Germany.

Spek, A. L.; 2003. *J. Appl. Cryst.* 36, 7-13.

Thadaniti S., Archakunakorn W., Tuntiwachwuttikul P., Bremner J., 1994. Chromones from Harrisonia perforata (Blanco.) Merr. *J. Sci. Soc. Thailand* 20, 183.

Thastrup O., Knudsen J.B., Lemmich J., Winther K., 1985. Inhibitions of human platelet aggregation by dihydropyrano- and dihydrofurano-coumarins a new class of cAMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 34, 2137-2140.

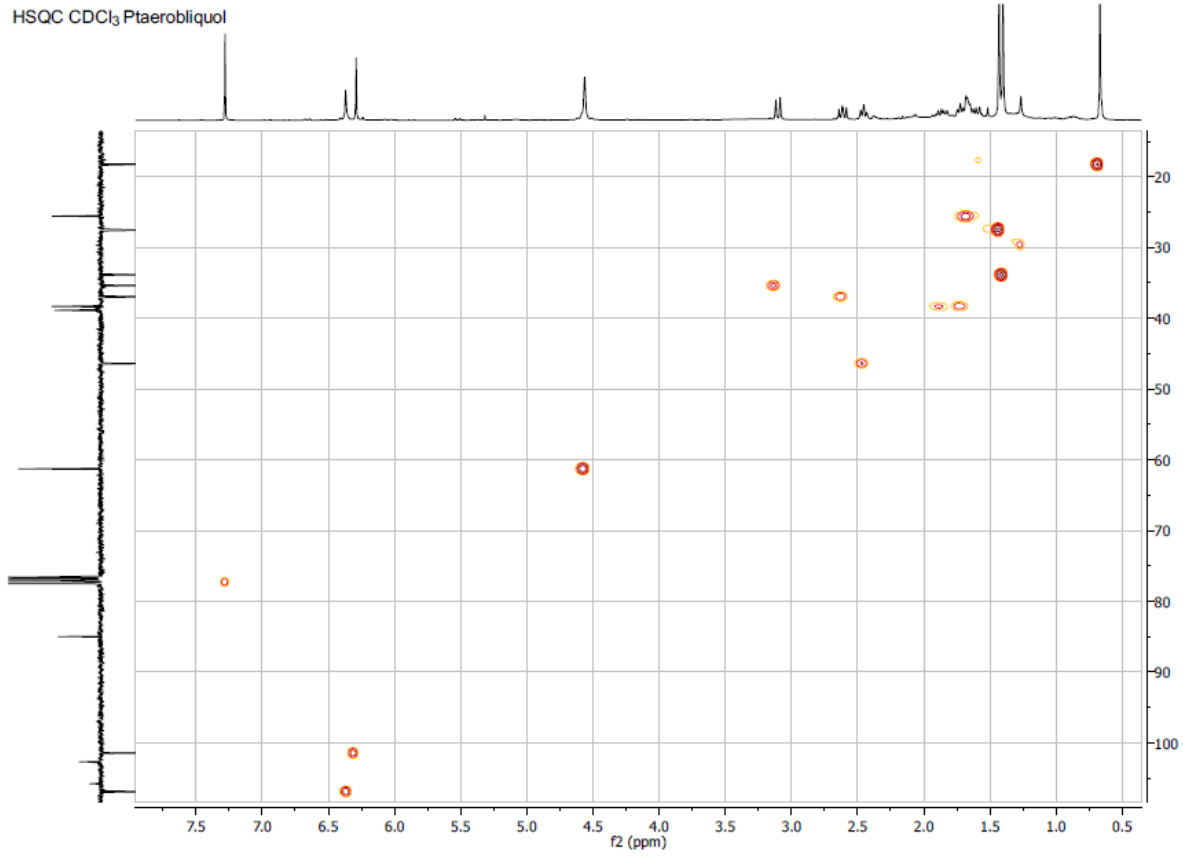
UNESCO, 1994. Traditional knowledge into the twenty-first century. Nature & Resources, Volume 30, No 2, UNESCO, Paris.

Van Der Ham R.W.J.M., Baas P., Bakker M.E., Boesewinkel F.D., Bouman F., Van Heuven B.J., Klaassen R.K.W.M., 1995. *Bottegoa* Chiov. transferred to the *Ptaeroxylaceae*. *Kew Bulletin* 50, 243-265.

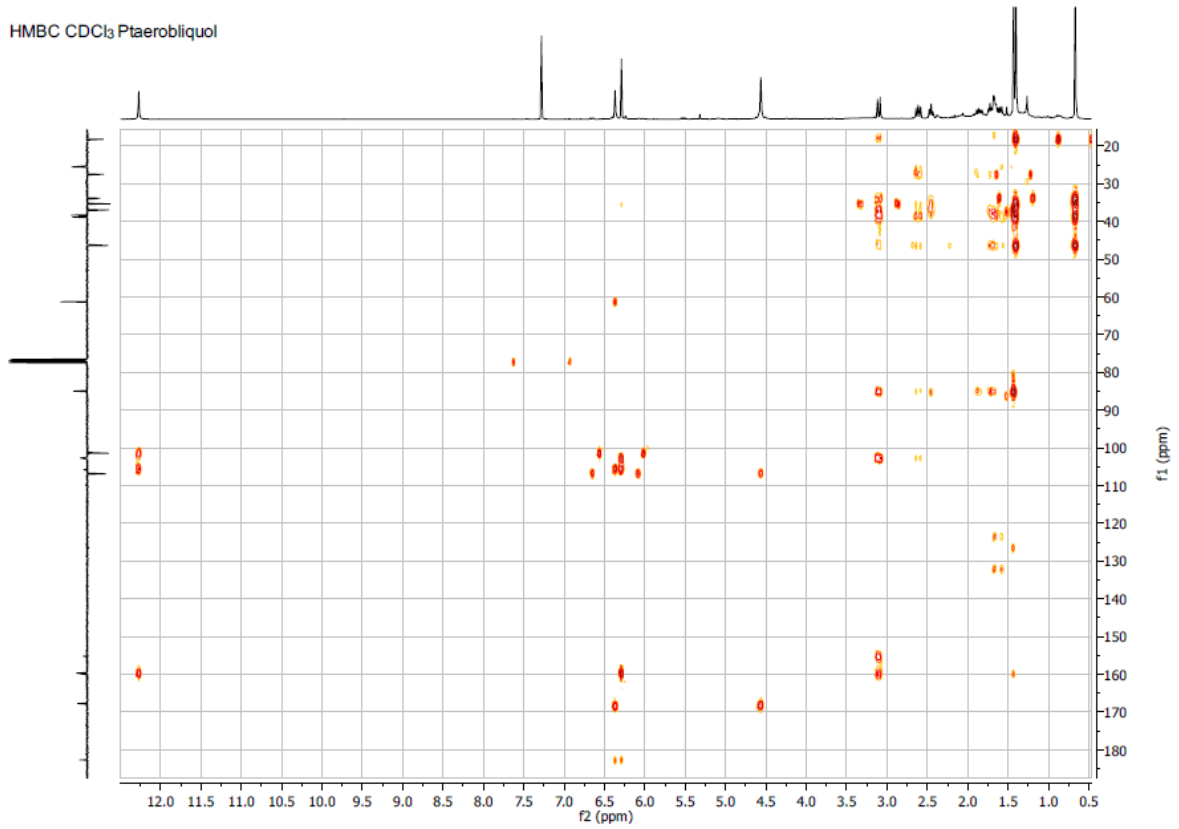
World Health Organization 2002: WHO traditional medicine strategy 2002-2005.

Yazaki K., Kunihisa M., Fujisaki T, Sato F., 2002. Geranyl Diphosphate:4-Hydroxybenzoate Geranyltransferase from Lithospermum erythrorhizon. *J. Biol. Chem.* 277 (8) 6240-6246 .

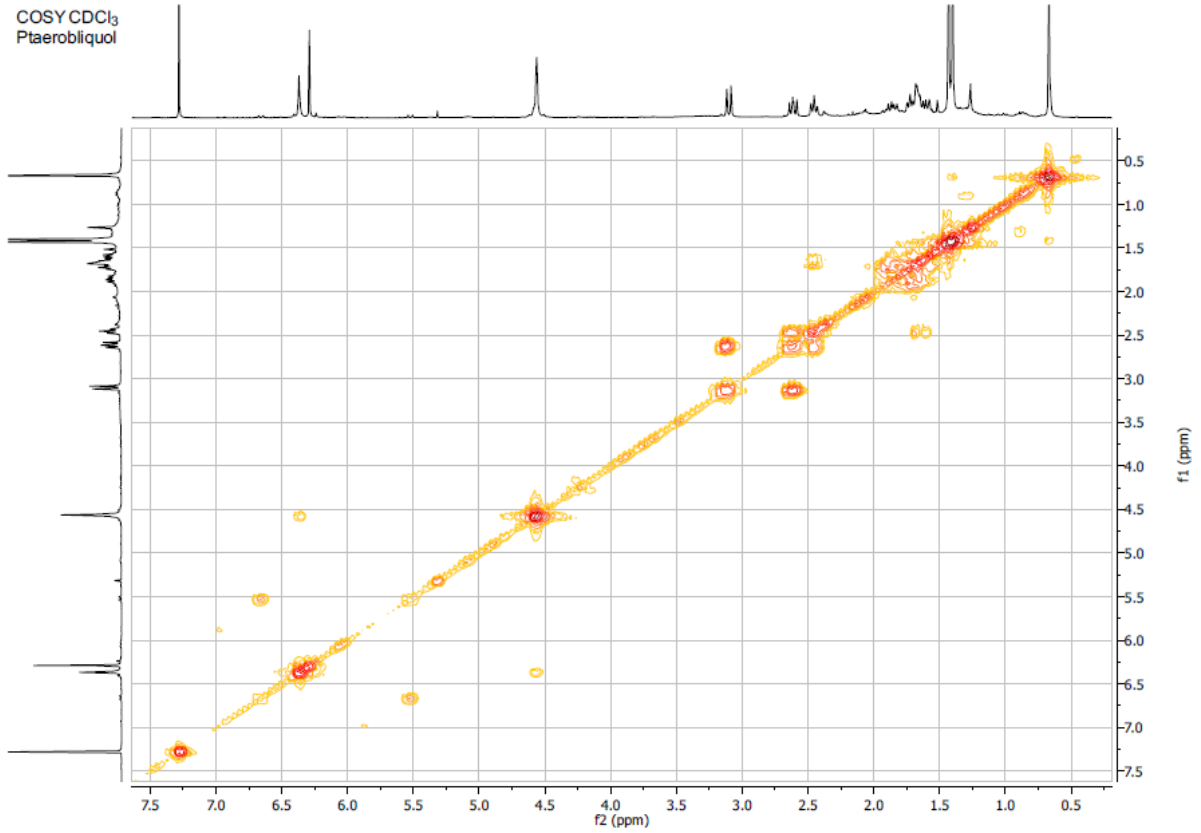
Annexe 1


HSQC CDCl3 Ptaerobliquol
20
30
40
50
60
70
80
90
100
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
f2 (ppm)

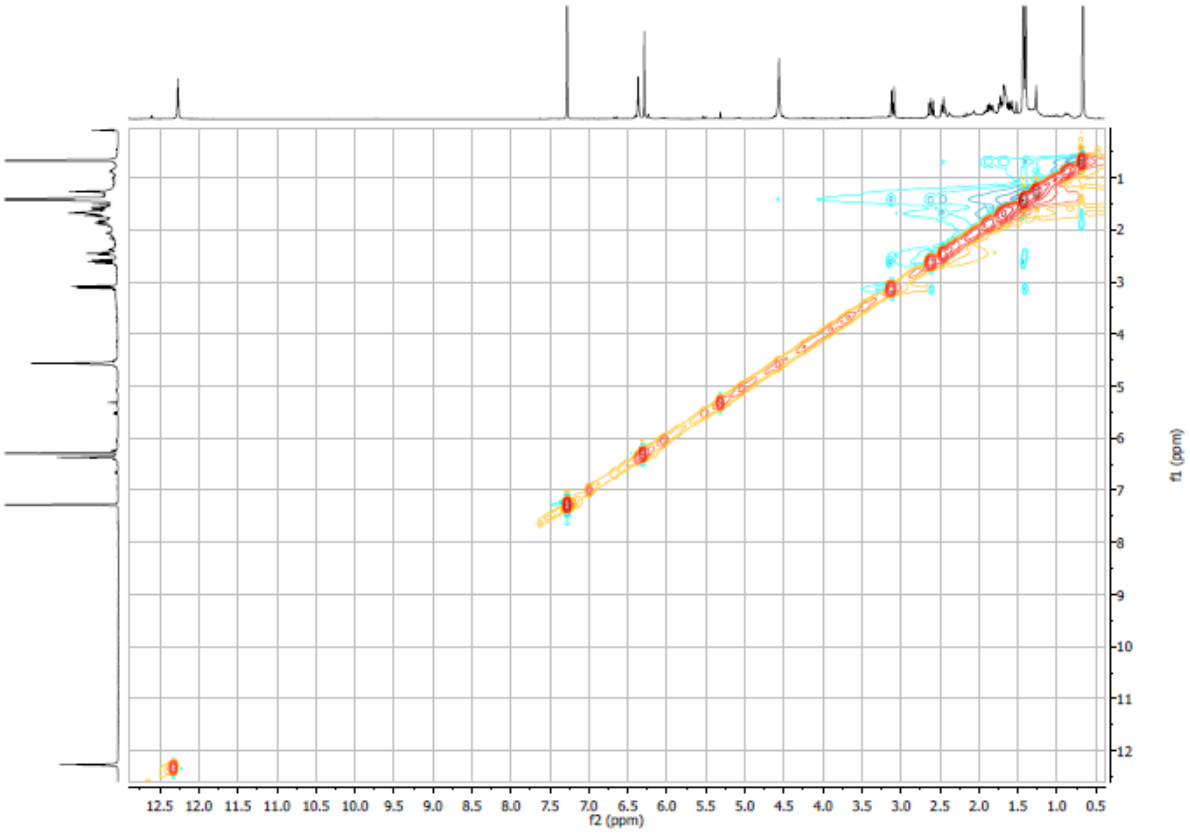
Annexe 2



Annexe 3



Annexe 4



Chapitre 2:

Pyrenacantha kaurabassana Baill.

I. LA FAMILLE DES ICACINACEAE

I.1. Présentation

Les Icacinacées représentent une famille de plantes dicotylédones comprenant 400 espèces réparties en 52 genres. Ce sont des arbres, des arbustes ou des lianes, des milieux humides ou non, des régions sub-tropicales. Les feuilles sont généralement alternes, de 7-15 cm x 2,5-5,5 cm. Les fleurs présentent 4-5 pétales blancs. Les fruits sont rouges à maturité. Certaines espèces sont utilisées pour leur bois, l'huile extraite des graines et comme plantes médicinales (Mendes, 1963).

I.2. Intérêt économique et pharmacologique

Les feuilles, graines et racines de diverses espèces de la famille sont utilisées dans l'alimentation et en médecine traditionnelle. Dans la pharmacopée traditionnelle africaine et sud-américaine, les Icacinaceae sont utilisées dans le traitement de nombreuses affections telles que les troubles intestinaux et le paludisme (Sarr *et al.*, 2011) et pour son action anti-venin dans le cas de morsure de serpent (Graebner *et al.*, 2002 ; Graebner, 2000 cité par Luiz *et al.*, 2007).

Des études scientifiques ont confirmé l'intérêt pharmacologique d'un grand nombre d'espèces de la famille des Icacinaceae.

I.2.1. Humirianthera ampla Miers

Une activite anti-nociceptive a été démontrée pour l'extrait éthanolique de racines (Luiz *et al.*, 2007). Cette plante a également présenté une activité anti-inflammatoire (Lima *et al.*, 2000). Cette action ainsi qu'une activité anti-microbienne ont été retrouvées par Graebner *et al.* lors d'études realisées en 2000 et 2002 sur l'extrait éthanolique de racines de *Humirianthera ampla*.

I.2.2. genre Icacina

Des études récentes sur les *Icacina* ont montré des activités anti-fongique, anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-convulsante, analgésique, anti-diabétique et anti-paludique intéressantes (Mbatchou et Dawda, 2012). Différentes espèces du genre *Icacina* sont utilisées en médecine traditionnelle et leur activité a été confirmée dans le traitement de diverses affections.

Dans certaines zones d'Afrique, les fruits, les graines et les tubercules du genre *Icacina* sont également utilisées dans l'alimentation (Iwu, 1983 ; Asuzu et Ugwueze, 1990 ; National Research Council, 2008 ; Udeh *et al.*, 2011).

- *Icacina trichantha*

Les feuilles et tubercules de cette plante sont utilisés en médecine traditionnelle dans certaines zones du Nigeria (Asuzu et Abubakar, 1995 ; Timothy et Idu, 2011). Cette espèce est citée comme antipaludique, anti-inflammatoire, anti-diabétique et anti-microbienne (Asuzu et Abubakar, 1995 ; Sarr *et al.*, 2011).

L'étude *in vitro* d'extraits aqueux et méthanolique de feuilles d'*Icacina trichantha* a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Aspergillus niger et Candida albicans* (Timothy et Idu, 2011). L'action antidiabétique a également été démontrée *in vivo* chez l'animal pour l'extrait méthanolique de feuilles (Ezeigbo, 2010).

- *Icacina manii*

Les tubercules de cette plante sont riches en acide cyanhydrique, acide phytique et acide oxalique. Ces composants sont significativement diminués par fermentation en présence de *Saccharomyces cerevisie* (Antai et Nkwelang, 1998).

- *Icacina oliviformis (Icacina senegalensis)*

Icacina oliviformis possède des tubercules et des graines utilisées pour produire une farine riche en amidon, utilisée comme base alimentaire de certaines populations indigènes, notamment en périodes de saison sèche (Cerighelli, 1919).

En médecine traditionnelle, les racines de *Icacina senegalensis* associées aux feuilles de *Mangifera indica* sont utilisées dans le traitement du paludisme.

L'évaluation *in vitro* de la fraction dichlorométhane de feuilles de *Icacina senegalensis* a montré des activités anti-paludiques intéressantes avec une IC_{50}< 5µg/ml (Sarr *et al*, 2011). Les feuilles de *Icacina senegalensis* sont également utilisées dans le traitement de l'épilepsie, notamment en Casamance au Sénégal (Kerhåro et Adam, 1974 ; Berhaut, 1975).

I.2.3. Gomphandra tetranda

Dans la médecine traditionnelle africaine, les racines de cette espèce sont utilisées dans les périodes de stress, contre la fatigue et la soif (Vo Van Chi, 1999).

I.3. Chimie des *Icacinaceae*

Diverses familles de composés chimiques sont retrouvées dans les Icacinacées, notamment des composés terpéniques. Nous allons citer quelques espèces à partir desquelles ces composés ont été isolés.

- *Humirianthera ampla* est une plante d'origine sud-américaine présente au Brésil, précisément dans la forêt Amazonienne. L'extrait éthanolique des racines est utilisé traditionnellement dans les contrées reculées du Brésil, pour ralentir l'effet des toxines du venin de serpent lors de morsures (Stauch *et al.*, 2013). Les racines de cette espèce se caractérisent par la présence de terpènes (diterpénoïdes, triterpénoïdes) dont l'annonalide, l'humirianthol, l'acrénol et le lupéol, et la présence de stérols, β-sitostérol et glycosylsitostérol (Graebner *et al.*, 2002 ; Luiz *et al.*, 2007) (Figure 35).

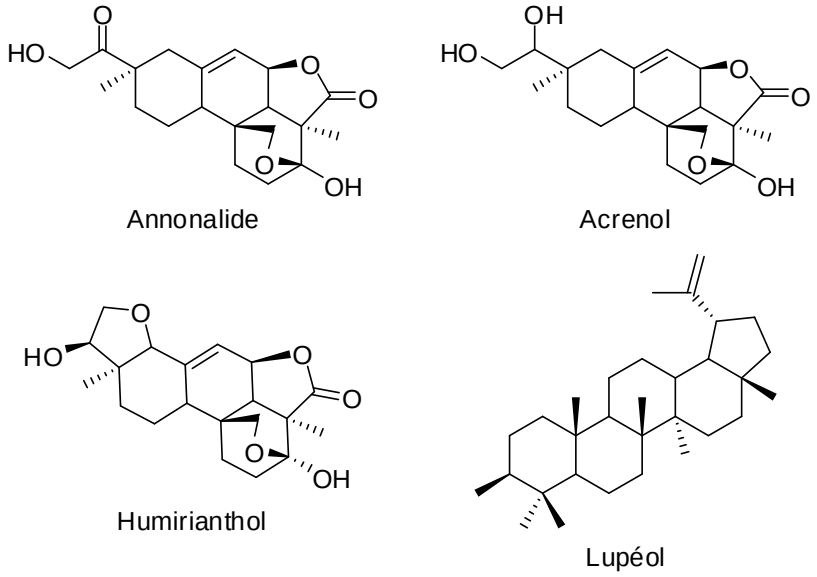


Figure 35. Structure des composés terpénoïdes issus de *Humirianthera ampla*.

- *Icacina oliviformis.* L'analyse chimique des tubercules de *Icacina oliviformis* a confirmé la présence de dérivés terpéniques, dont les principaux représentants sont l'*O*-acétylicacine et l'icacinol (Vanhaelen *et al.*, 1986 ; Dei *et al.*, 2011). Le composé diterpénique icacinol a été également isolé d'*Icacina claessensis* (On'okolo *et al.*, 1985) (Figure 36).

- *Icacina guesfeldtii.* Les analyses chimiques puis spectroscopiques des feuilles et racines de *Icacina guesfeldtii* ont révélé également la présence d'icaceine, de *N*-déméthylicaceine et de *O*-acétylicacine (On'okoko et Vanhaelen, 1980) (Figure 36).

- *Icacina manii.* Des acides phytique, cyanhydrique et oxalique, ont été isolés de la plante *Icacina manii* (Antai et Nkwelang, 1998). Elle contient également des diterpènes, dont l'icacenone (Vanhaelen *et al.*, 1985) (Figure 36).

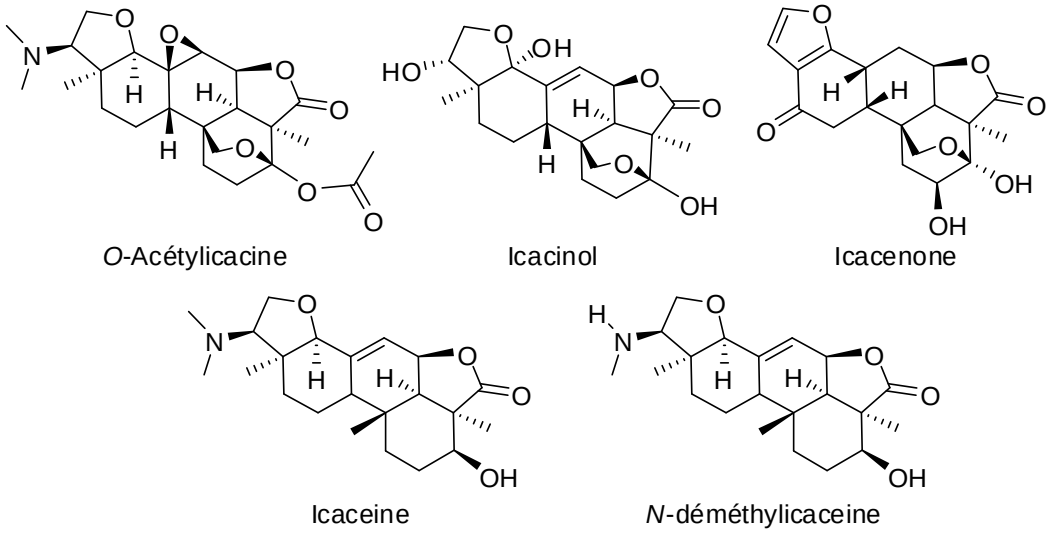


Figure 36. Structure des composés *O*-acétylicacine, icacinol, icaceine, *N*-déméthylicaceine et icacenone.

D’autres familles de composés sont retrouvées dans les Icacinaceae telles que :

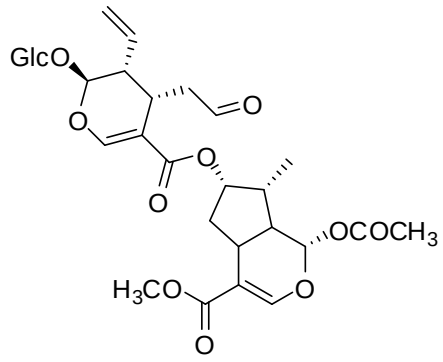
- des iridoïdes de type loganine ou des bisiridoïdes ;

- des alcaloïdes de structure indolizinoquinoline ou pyridine ;

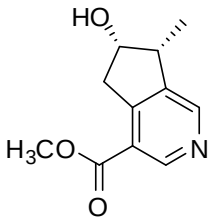
- des glycosides flavoniques.

Nous allons citer quelques espèces à partir desquelles ces composés ont été isolés. Les trois espèces de la famille Icacinaceae, *Apodytes dimidiata* du Queensland, *Cantleya corniculata* genre monospécifique de Sumatra, Malaisie et Bornéo, et *Lasianthera austrocaledonica* de Nouvelle-Calédonie, présentent des constituants de type iridoïde (Kaplan *et al.*, 1991).

- *Cantleya corniculata.* Les composés cantleyoside (iridoïde) et cantleyine (alcaloïde pyridinique) ont été retrouvés dans le bois de *Cantleya corniculata* (Kaplan *et al.*, 1991) (Figure 37).



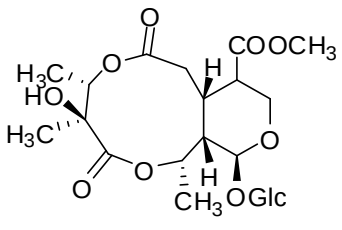
Cantleyoside



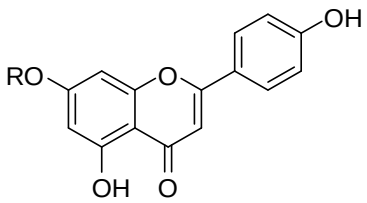
Cantleyine

Figure 37. Structure des composés cantleyoside et cantleyine

- *Gomphandra tetranda.* Les trois composés, gonocarioside A, apigenin-7-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside et apigenin-7-*O*-β-D-glucopyranoside (cosmosiine) ont été isolés des feuilles du *Gomphandra tetranda* (Kamperdick et Tran, 2002) (Figure 38). Une activité anti-VIH de la cosmosiine a été mise en évidence (Dictional of Natural Products, 1999).



Gonocarioside A



Apigenine (R= -glc-api)
Cosmosiine (R = glc)

Figure 38. Structure des composés isolés de *Gomphandra tetranda*.

- *Nothapodytes nimmoniana*. Enfin, *Nothapodytes nimmoniana* est une espèce dont la phytochimie est particulièrement intéressante, que ce soit pour son bois, ses tiges ou ses feuilles (Padmanabha *et al.*, 2006). Elle se caractérise par la présence d'alcaloïdes indoliques monoterpéniques (Camptothecines), connus pour leur activité anti-cancéreuse *via* une action inhibitrice de la topoisomérase I (Romanelli *et al.*, 1998 ; Vladu *et al.*, 2000). Les camptothecines ont également montré une activité antiparasitaire à l'encontre des *trypanosomes* et *Leishmania* (Bodley et Shapiro, 1995).

L'analyse phytochimique de cette plante a permis d'identifier et d'isoler diverses camptothecine : camptothecine, 9-méthoxycamptothecine, mappicine-20-β-glucopyranoside, 9-méthoxymappicine-20-β-glucopyranoside, 10-hydroxy-camptothecine (Ramesha, 2008) (Figure 39). Des camptothecines ont été également isolées d'autres espèces de la famille des *Icacenaceae* dont *Merriliodendron megacarpum* (Gunasekera *et al.*, 1979) et *Mappiafoetida* (Govindachari et Vishwanath, 1972).

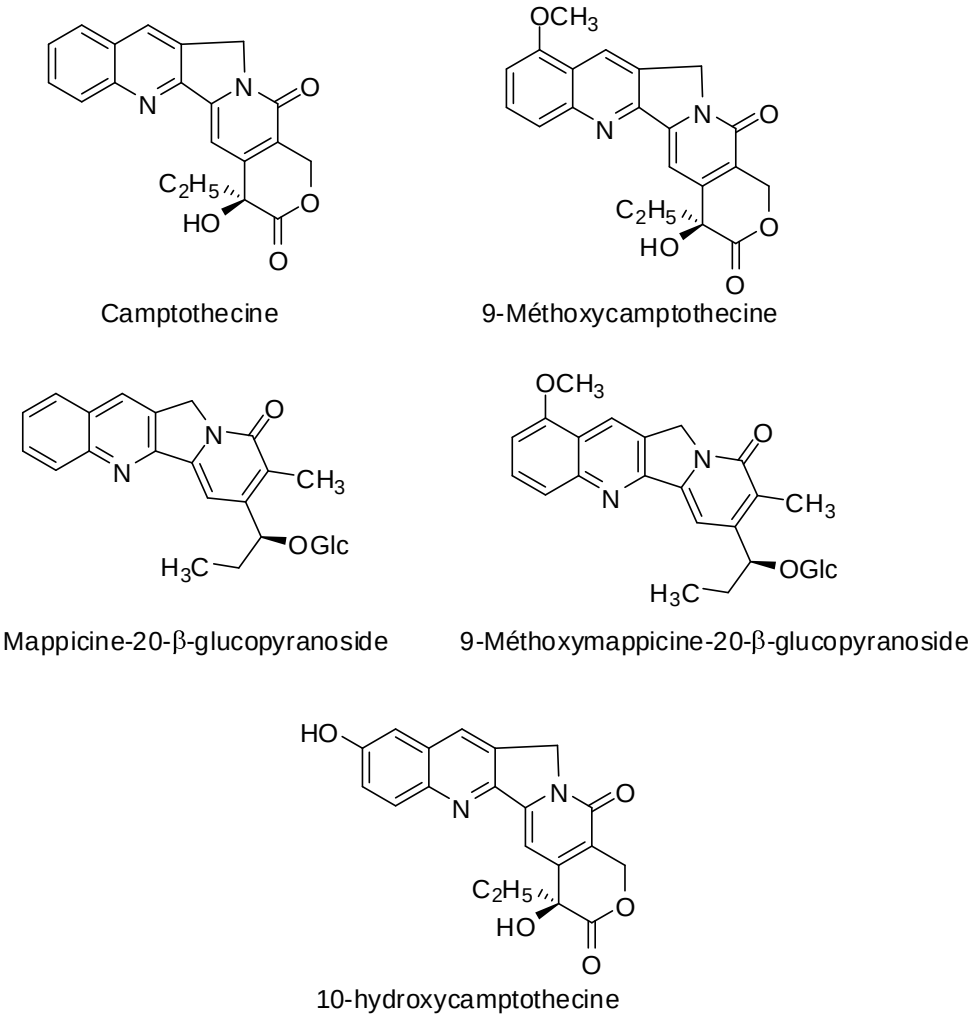


Figure 39. Structure des camptothecines isolées des espèces de la famille des Icacinaceae.

II. LE GENRE *PYRENACANTHA* ET L'ESPÈCE *Pyrenacantha kaurabassana*

II.1. Présentation

Le genre *Pyrenacantha* regroupe près d'une trentaine d'espèces, dont la plupart sont présentes en Afrique tropicale humide et à Madagascar. Ce sont des arbustes et des lianes grimpantes ou volubiles. Ces espèces sont vivaces et dioïques, très rarement monoïques.

Les feuilles ont une nervation pennée à palmée ; le limbe est entier ou très lobé, mince à peu coriace. Elles ont une disposition alterne, sont pétiolées et le pétiole est parfois volubile. Certaines espèces peuvent présenter des hydatodes.

Les fleurs ont une inflorescence en épis ou en grappe axillaire. Elles n'ont pas de calice c'est-à-dire pas de sépales. Les pétales, en général au nombre de 4 ou 5, qui forment la corolle sont soudés à la base et sont persistants. Chez la fleur mâle, les étamines alternent avec les pétales. Les filaments des étamines sont courts et les anthères plus ou moins globuleuses. La fleur femelle peut présenter des staminodes ou non. L'ovaire contenu dans le style est uniloculaire et de forme ovoïde ; à l'intérieur les ovaires sont au nombre de 2 dont l'un se nécrose. A l'extrémité du style, le stigmate est sessile et de forme sphérique.

Le fruit est une drupe charnue constituée d'un épicarpe et d'un endocarpe ligneux. Ce dernier présente à sa surface interne des sortes de spicules qui s'enfoncent dans les cotylédons. Ces spicules peuvent être de différentes formes et constituent des critères de différenciation entre les espèces de *Pyrenacantha* (Eggli 2004).

Au sud de l'Afrique, sont présentes seulement trois espèces: *P. grandiflora* Baill., *P. kaurabassana* Baill. et *P. scandens* Planch. Ces espèces sont des lianes dioïques (Potgeiter et Van Wyk, 1994 ; Labat *et al.*, 2006).

Nous donnons ci-dessous une liste non exhaustive de quelques espèces appartenant à ce genre (Tableau10).

Taxon/Espèce	Distribution	Référence
P. ambrensis *P. andapensis* *P. capitata* *P. humblotii* *P. rakotozafyi* *P. tropophila* *P. chlorantha* *P. laetevirens* *P. perrieri*	Madagascar	Labat *et al.*, 2006
P. gabonica	Gabon	Breteler et Villiers, 2000
P. kaurabassana Baill. *P. grandiflora* Baill. *P. kirkii* Baill. *P. scandens* Planch. *P. acuminata* Engl.	Est et/ou sud de l'Afrique	Potgeiter et Wyk, 1994 Mendes, 1963 Exell et al., 1963Flora Zambeziaca, vol. 2 Part 1, p340 Potgeiter et Wyk, 1994 ; Labat *et al.*, 2006
P. acunata	Afrique Centrale/Afrique de l'Ouest	Stull *et al.*, 2012
P. occidentalis	Pérou	Stull *et al.*, 2012
P. repanda	Philippines	Stull *et al.*, 2012
P. austroamericana sp.nov	Pérou	Stull *et al.*, 2012
P. staudtii	Afrique Centrale	Stull *et al.*, 2012
P. silvestris	Afrique Centrale	Stull *et al.*, 2012
Pyrenacantha sp.	Egypte	Stull *et al.*, 2012
P. volubilis	Cambodge, Inde, Sri Lanka, Vietnam, Hainan (China)	Stull *et al.*, 2012
P. densipunctata	USA	Collinson *et al.*, 2012
P. punctilinearis	Allemagne	Collinson *et al.*, 2012
P. hammenii	Amerique du Nord/Sud	Stull *et al.*, 2012

Tableau 10. Quelques espèces du genre *Pyrenacantha*.

II.2. Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre *Pyrenacantha*

Une étude bibliographique exhaustive sur le genre *Pyrenacantha* a montré que l'espèce *Pyrenacantha staudtii* est la plus étudiée du point de vue pharmacologique et phytochimique. L'espèce est utilisée traditionnellement dans le traitement des ulcères gastriques, du paludisme et des troubles gastro-intestinaux (Anosike *et al.*, 2008). Au sud ouest du Niger, les feuilles sont utilisées pour soigner les patients atteints de malaria et de cancer. Il est rapporté aussi que cette plante a des vertus dans le traitement des diarrhées, des insomnies (Awe, 2011).

Des activités anti-cancéreuse (Gill, 1992) et anti-ulcéreuse (Aguwa *et al.*, 1981) ont été mises en évidence pour cette plante, de même que des activités anti-paludique (Mesia *et al.*, 2005), anti-abortive (Falodun *et al.*, 2007; Falodun et Usifoh, 2006), et ocytocique notamment lors des dysménorrhées, spasmolytique dans le cas des coliques intestinales (Gill, 1992 ; Falodun

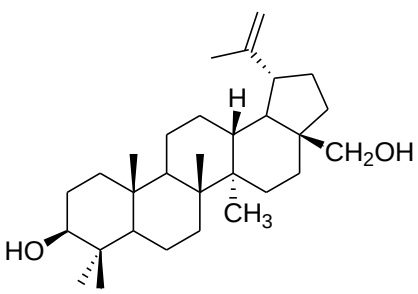
et al., 2007). Ces activités sont liées à la présence de trois types de composants : les saponosides, les flavonoïdes et les alcaloïdes (Falodun et Usifoh, 2006).

II.3. Quelques métabolites secondaires d'intérêt isolés du genre *Pyrenacantha*

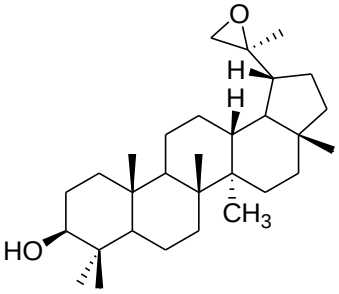
Du point de vue phytochimique, les différentes parties de l'espèce *Pyrenacantha staudtii* contiennent des alcaloïdes, des saponosides, des tanins, des flavonoïdes, des acides gras, des sucres et des résines (Falodun et Usifoh, 2006 ; Aguwa et Mittal, 1981 ; Anosike *et al.*, 2008). Une recherche phytochimique sur les feuilles de *P.staudtii* a permis de révéler la présence d'huiles essentielles dont la composition est la suivante: thujone (0,5%), camphene (0,67%), α-Pinene (0,5%), β-myrecene (3,26%), phellandrene (12,45%), Δ^3-carene, *p*-cymene (2,42%), limonene (1,25%), terpène β-caryophyllene (5,57%), camphre (0,23%), β-terpinol-4-ol (0,80%), α-terpineol, methylsalicylate (1,35%) , citronellol sp. (7,00%), α-terpènylacetate, β-caryophyllene oxide (5,54%), acide hexadecanoique (28,32%) et tetradecanoique (20,60%) (Falodun et al., 2009[b]). Les tiges et les racines de cette plante contiennent également des composants volatiles (Lasisi *et al.*, 2006).

Des triterpénoïdes, la bétuline et l'époxy-lupéol, isolés des extraits hexaniques de feuilles de cette même plante, ont revélé des activités anthelmintiques et anti-microbiennes à l'encontre d'*E.coli*, de *B. subtilis* et de *P. aeruginosa* (Lasisi *et al.*, 2011). Ont été isolés également l'acide oleanolique, la β-amurine, le kaempferol 3-*O*-*β*-rutinoside, le β-sitostérol, le sitostérol 3-*O*-β-glucopyranoside et le taraxerol, à partir des feuilles de *P.staudtii* et l'activité phytotoxique de leur extrait méthanolique a été demontrée contre *Lemna minor* L. (Falodun *et al.*, 2009[a,c]) (Figure 40).

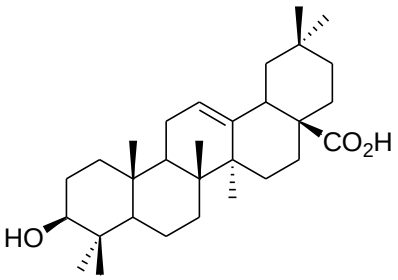
Nous reportons ci-dessous quelques métabolites isolés dans le seul répresentant étudié du genre, *Pyrenacantha staudtii* :



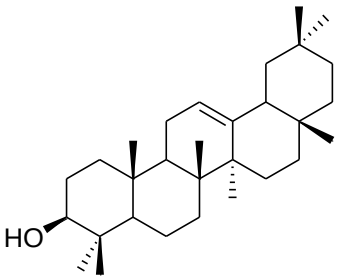
Bétuline



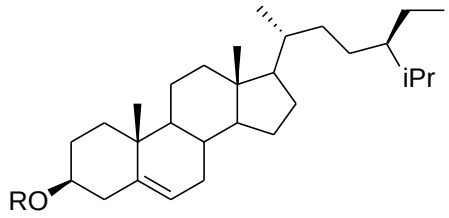
Epoxylupeol



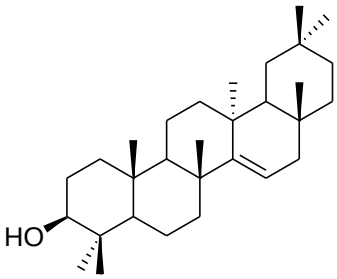
Acide oleanolique



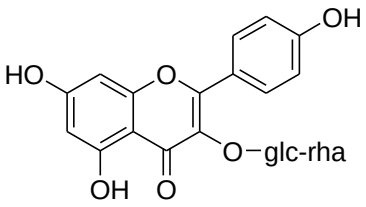
β-Amurine



R = H β-Sitostérol
R = glc β-Sitostérol-3-O-β-glucopyranoside



Taraxerol



Kaempferol 3-O-β-rutinoside

Figure 40. Quelques métabolites isolés dans le genre *Pyrenacantha* (*P. staudtii*).

II.4. Classification



Figure 41. Image de *P.kaurabassana* : feuilles et tubercule (à gauche), fleur (à droite). Source : A) Image originale, 2013 ; B) image google (*http : //www. Mozambiqueflora.com/speciesdata/ family)* (consulté le 14/01/2012).

Domaine : Eucariote

Règne : Plantae

Sous-règne : Viridaeplantae

Embranchement : Tracheophyta

Sous embranchement : Euphyllophytina

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Sous-ordre : Celastranae

Ordre : Celastrales

Famille : Icacinaceae

Genre : *Pyrenacantha*

Espèce : *Pyrenacantha kaurabassana* Baill.

II.5. Description botanique

Pyrenacantha kaurabassana Baill. est une plante herbacée, annuelle ou semi-vivace de lianes et tubercules perennes. Les tiges sont vert olive, ramifiées dès la base et grimpantes. Le limbe des feuilles est de forme variable : ovale à pentagonale. Il peut mesurer 4 à 10 cm de long et 5 à 15 cm de large. Il est constitué de 3 nervures principales qui se divisent en 5 à 7 nervures se terminant par des hydatodes. Les feuilles peuvent être formées de 3 à 5 lobes (voire 7) bien marqués qui se terminent en pointe. Leur face inférieure est très poilue et le dessus légèrement velu. Le pétiole, qui relie la feuille à la tige, mesure en moyenne de 3 à 6 cm (voire 12 cm) et est aussi recouvert de poils.

Pyrenacantha kaurabassana Baill. est une plante dioïque. L'inflorescence pédicellée apparait aux bifurcations des rameaux. Les fleurs, jaunes à orangées, ont une inflorescence en épis axillaires. Les pétales sont soudés pour former 4 lobes de 1,5 mm. Les fleurs mâles sont nombreuses et forment une masse compacte telle une pointe de 2 à 3 cm de diamètre. Le pédoncule des fleurs mâles mesure 4 à 12 cm. Les fleurs femelles, réunies en masse plus ou moins globuleuse, sont moins nombreuses et ont un pédoncule plus court. La floraison a lieu de Décembre à Juin mais surtout à la fin de la saison des pluies.

Le fruit est une drupe verte velue qui devient jaune à orange à maturité. Elle a une forme elliptique légèrement aplatie à chaque extrémité tel un petit ballon de rugby. Elle mesure 1 à 1,5 cm de long et à 1 à 1,3 cm d'épaisseur.

Le tubercule plutôt de forme globuleuse est recouvert d'une écorce brune quasiment lisse. Il peut peser plusieurs kilos (Eggli 2004).

Cette espèce est spécifiquement répandue dans certaines zones de l'Afrique tropicale : au Mozambique, en Tanzanie, au Kenya, en Ethiopie, au Soudan, au Malawe, au Zimbabwe et en Afrique du Sud (ref. Flora Zambeziaca). La carte ci-dessous présente ces différentes régions :

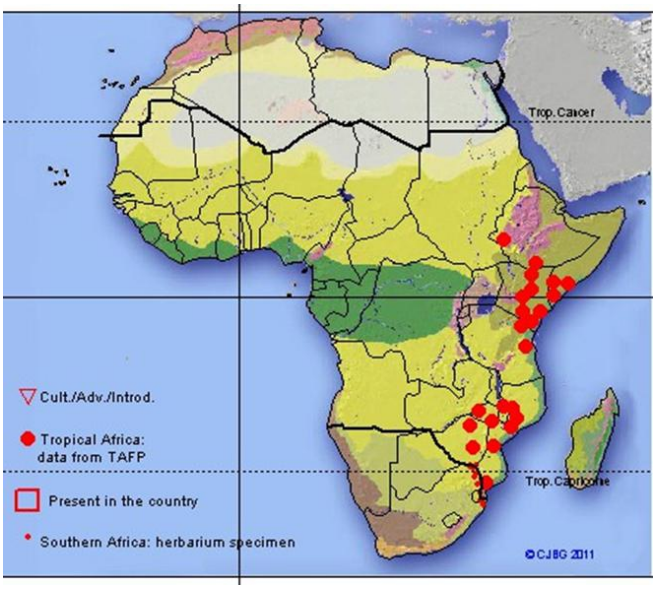


Figure 42 : Régions dans lesquelles l'espèce ***Pyrenacantha kaurabassana*** Baill. a été répertoriée (http ://www.GBIF.org, page consultée le 14/01/2012).

II.6. Utilisation en médecine traditionnelle

Il existe très peu de renseignements sur l'utilisation traditionnelle de cette espèce. *P. kaurabassana* serait utilisée par les autochtones dans le traitement de l'impuissance, la stérilité, les fausses couches, les menaces d'accouchements prématurés et de l'herpès (Omolo, 2012).

La racine, partie utilisée seule ou en association avec d'autres plantes, se décline sous différentes formes : cataplasme ou décoction.

Les investigations ethnobotaniques sur *P. kaurabassana* ont montré que cette espèce est utilisée par les tradithérapeutes dans la région du Tanga (Tanzanie) dans le traitement d'infections opportunistes pour son activité antivirale et antifongique, notamment chez les malades atteints du VIH/SIDA (Scheinman, 2004).

II.7. Travaux antérieurs sur *Pyrenacantha kaurabassana* Baill.

L'étude bibliographique realisée sur la famille des Icacinaceae nous informe que contrairement à *Pyrenacantha staudtii*, *Pyrenacantha kaurabassana* est une espèce moins étudiée. Citons l'unique étude phytochimique et biologique réalisée par Omolo *et al* en 2012 sur l'espèce. Ce groupe de chercheurs a isolé du tubercule quelques composés appartenant à la classe des xanthones et des terpènes. Une activité anti-VIH modeste a également été démontrée.

La figure ci-dessous donne la structure de ces composés: l'acide 6,7,11-trihydroxy-10-méthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12*H*-benzo[*b*]xanthene-4-carboxylique (composé A), l'acide 6,7-dihydroxy-10,11-diméthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12*H*-benzo[*b*]xanthene-4-carboxylique (composé B), (3*S*,10*S*,17*S*,14*R*,8*S*)-18-(2,2-diméthylbutyl)-8,10,14,17,23,24-hexaméthyl-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,14,15,16,17,18-hexadecahydrochrysen-3-ol (composé C).

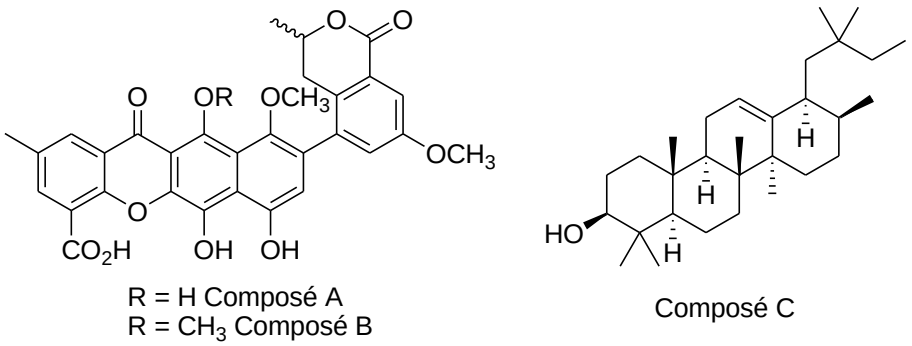


Figure 43. Quelques composés isolés de l'espèce *P. kaurabassana* en 2012.

Nous nous proposons de poursuivre cette étude d'identification en vue d'élucider les structures de nouveaux composés.

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *Pyrenacantha kaurabassana* REALISEE AU LABORATOIRE- RESULTATS ET DISCUSSION

En dehors de l'étude publiée récemment sur *P. kaurabassana* Baill. (Omolo *et al.*, 2012), à notre connaissance cette plante n'a pas fait l'objet d'une étude chimique complète. En effet, utilisant des méthodes d'extraction différentes, il semblait probable que d'autres composés seraient isolés au cours de notre travail. L'objectif principal de cette étude est d'isoler et élucider la structure de ces nouveaux composés et identifier les nouveaux métabolites secondaires biologiquement intéressants.

III.1. Criblage préliminaire de familles de métabolites présents

Le criblage phytochimique est une analyse qualitative basée sur des réactions de précipitations et / ou de colorations. Ces dernières permettent de définir la présence ou non de métabolites secondaires : alcaloïdes, quinones, flavonoïdes, iridoïdes, saponosides, tanins et stérols.

III.1.1. Caractérisation des Alcaloïdes

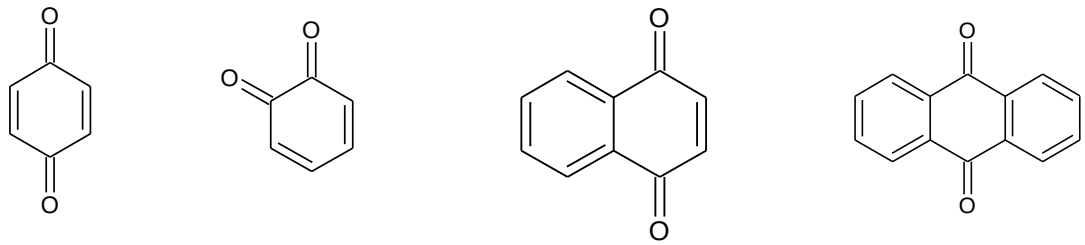
De nombreuses espèces de *Pyrenacantha* notamment *P. klaineana* possèdent divers alcaloïdes tels que la camptothecine, fameuse molécule antitumorale. Nous avons donc posé comme hypothèse de départ que l'espèce *P. kaurabassana* était susceptible de contenir cette classe de métabolites secondaires.

Le criblage est effectué en utilisant des réactifs « spécifiques » des alcaloïdes : le réactif de Valser-Mayer et le réactif de Dragendorff. Ces tests sont basés sur la propriété des alcaloïdes de former un précipité en présence de métaux lourds, ici le mercure (Valser-Mayer) et le bismuth (Dragendorff).

Aucune formation de précipité dans les deux cas. Absence d'Alcaloïdes.

III.1.2. Caractérisation des Quinones

Les quinones sont composées d'un système conjugué cyclique possédant deux fonctions carbonyles. Les principales structures à la base de tous les dérivés sont :



p-benzoquinone *o*-benzoquinone naphtoquinone anthraquinone

Figure 44. Principales structures quinoniques.

Plus de 1200 quinones sont décrites et réparties surtout dans le règne végétal. Elles sont retrouvées chez les Fabacées, Rhamnacées, Polygonacées et Rubiacées. Des composés de nature quinonique ont été décrits précédemment chez *P. kaurabassana*.

La présence de composés quinoniques est mise en évidence par la réaction de Bornträger puis confirmée par la réaction de Brismorret et Combes.
La réaction de Bornträger est basée sur la propriété des quinones à prendre une coloration rouge cerise en présence d'alcali.

Une coloration rouge significative de la présence de Quinones apparait.

Présence de Quinones.

La réaction de Brissemoret et Combes est réalisée lorsque la réaction de Bornträger est positive. Elle permet de définir le type de quinones en fonction de la couleur obtenue.

La réaction est positive s'il apparait un précipité :

- bleu indiquant la présence de benzoquinones
- rouge indiquant la présence d'anthraquinones
- violet indiquant la présence de naphtoquinones

Un précipité rouge apparaît montrant la présence d'anthraquinones. Ce précipité est néanmoins léger en comparaison avec l'intensité de la réaction obtenue avec la réaction de Bornträger suggérant des composés de structure quinonique appartenant à d'autres classes.

III. 1.3. Caractérisation des Flavonoïdes

Les hétérosides flavoniques ou flavonoïdes sont des pigments jaunes généralement polyphénoliques dont les génines sont des dérivés de la phénylchromone (Figure 45).

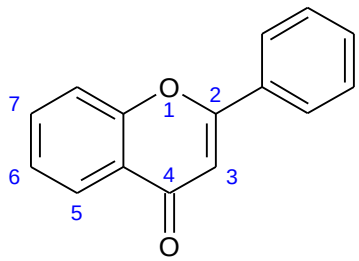


Figure 45. Noyau phénylchromone.

La présence de flavonoïdes est mise en évidence par un ensemble de réactifs différents.

Réactifs	Coloration	Interprétation
KOH	Orange	+
$FeCl_3$	Gris verdâtre	+
$AlCl_3$	Jaune citron en UV	+
Hcl+Mg (cyanidine)	Jaune or	+/-
Neu	Vert-bleu à 366nm	+

Tableau 12. Réactifs de caractérisation des flavonoïdes.

L'écorce de *Pyrenacantha kaurabassana* contient des flavonoïdes.

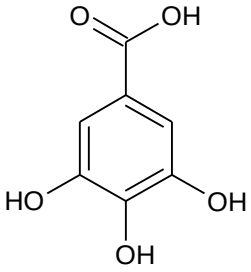
III.1.4. Caractérisation des Iridoïdes

Les iridoïdes sont des molécules composées d'un cyclopentane fusionné à un cyclohexane ; ce dernier est porteur d'un groupement carbonyle. Ils sont à la base de la biosynthèse des alcaloïdes.

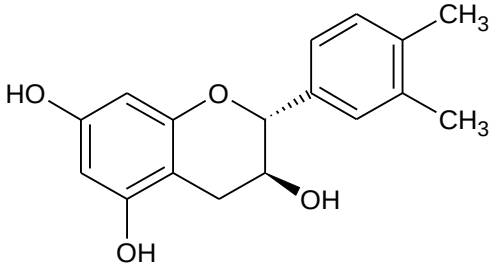
Aucun changement de couleur n'est observé.
L'écorce de *Pyrenacantha kaurabassana* est dépourvue d'iridoïdes.

III.1.5. Caractérisation des Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques de structure variée. Il existe deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (proanthocyanidols) (Figure 46).



Tanin hydrolysable : Acide gallique



Catéchine

Figure 46. Structures de base des tanins hydrolysables et des tanins condensés.

La mise en évidence des tanins repose sur la précipitation de ces derniers en présence de $FeCl_3$ et d'une solution saline de gélatine.

Dans les 2 cas, un précipité se forme en présence de notre échantillon

Présence de Tanins dans l'écorce de *Pyrenacantha Kaurabassana*

III.1.6. Caractérisation des Stérols

Les phytostérols sont des lipides composés d'un noyau stérane dont le carbone 3 porte un hydroxyle (Figure 47).

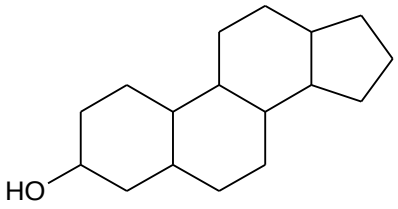


Figure 47. Noyau de base des phytostérols.

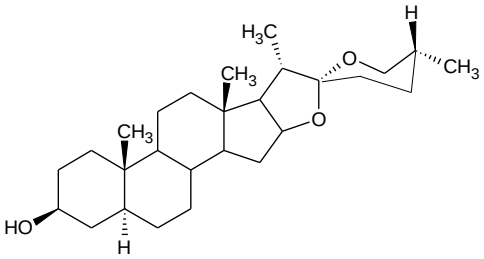
Les stérols ont comme propriété de changer de couleur en présence d'anhydride acétique.

Aucun changement de couleur avec notre échantillon.

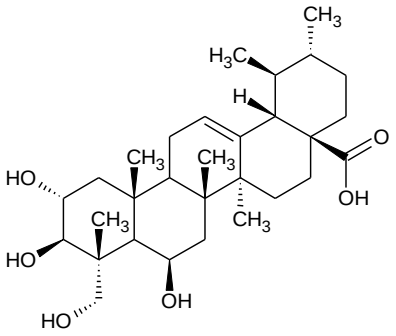
Absence de stérols dans l'écorce de *Pyrenacantha kaurabassana.*

III.1.7. Caractérisation des Saponosides

Les saponosides ou saponines sont des hétérosides de stérols ou de terpènes (Figure 48).



Génine stéroidique : la tigogénine



Génine triterpénique: acide madécassique

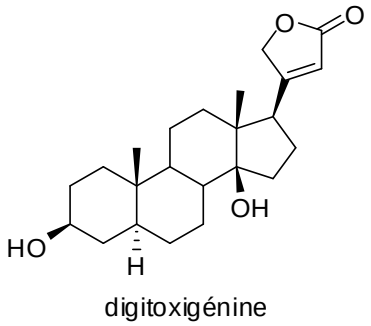
Figure 48. Exemples de sapogénines de structure stéroïdique ou triterpénique.

Les saponosides sont connus pour leurs propriétés détergentes et leur capacité moussante. La mise en évidence des saponosides repose ainsi sur leur faculté à former une mousse persistante.

Une mousse apparue (1cm) lors de l'agitation, disparait après 10 minutes de repos.
Absence de saponosides dans l'écorce de *Pyrenacantha kaurabassana.*

III.1.8.Caractérisation des Cardénolides

Les cardénolides qui sont des hétérosides cardiotoniques, possèdent une génine stéroïdique portant des hydroxyles en positions 3 et 14 et un cycle lactonique non saturé sur le C17 (Figure 49).



digitoxigénine

Figure 49. Noyau de base des cardénolides.

Les cardénolides sont présents dans plus de 200 espèces. Le plus connu est la digitaline de la digitale (Bruneton 2009).

Les cardénolides sont mis en évidence par la réaction de Kedde : cette réaction utilise un dérivé aromatique nitré qui en milieu alcalin, s'additionne sur la lactone pour former un dérivé rouge violacé.

Aucun changement de couleur.

Absence de cardénolides dans la poudre d'écorce de *Pyrenancantha kaurabassana*

III.1.9. Résultats du criblage phytochimique

Les résultats du criblage sont résumés dans le tableau ci-après.

Groupe chimique	Résultats
Alcaloïdes	Absence
Quinones	Présence
Flavonoïdes	Présence
Iridoïdes	Absence
Tanins	Présence
Cardénolides	Absence
Saponosides	Absence

Tableau 13. Résultats du criblage phytochimique de l'écorce du tubercule de *Pyrenacantha kaurabassana*

Les métabolites principaux contenus dans le tubercule de *P. kaurabassana* sont des flavonoïdes et des quinones.

III.2. Extraction des écorces de tubercule de *P. kaurabassana*.

Le séchage du matériel végétal a été effectué durant 2-3 semaines à une température comprise entre 15 et 20°C, à l'abri de la lumière. Le matériel végétal séché a été réduit en poudre à l'aide d'un broyeur.

Les écorces du tubercule de *P. kaurabassana* (452 g) ont été extraites, après pulvérisation, par contacts multiples successivement avec du cyclohexane pour éliminer les composés les plus apolaires, du dichlorométhane et du méthanol dans un appareil de Soxhlet. Trois extraits ont été ainsi obtenus :

- Un extrait cyclohexanique, contenant les cires, des pigments lipophiles et des graisses résiduelles (1,894 g) soit un rendement de 0,42 % ;
- Un extrait dichlorométhane (2,336 g), soit un rendement de 0,52 % ;
- Le résidu méthanolique, contenant les composés les plus polaires (17,029 g) soit un rendement de 3,77 %.

Une partie du résidu méthanolique (environ 11 g) est ensuite reprise dans un mélange hydrométhanolique et extraite par de l'acétate d'éthyle pour séparer les quinones et flavonoïdes, des métabolites les plus polaires.

Un extrait à l'acétate d'éthyle est ainsi obtenu (4,636 g) ainsi qu'un résidu méthanolique épuisé (7,49 g).

Les chromatogrammes CLHP des extraits obtenus sont représentés ci-dessous.

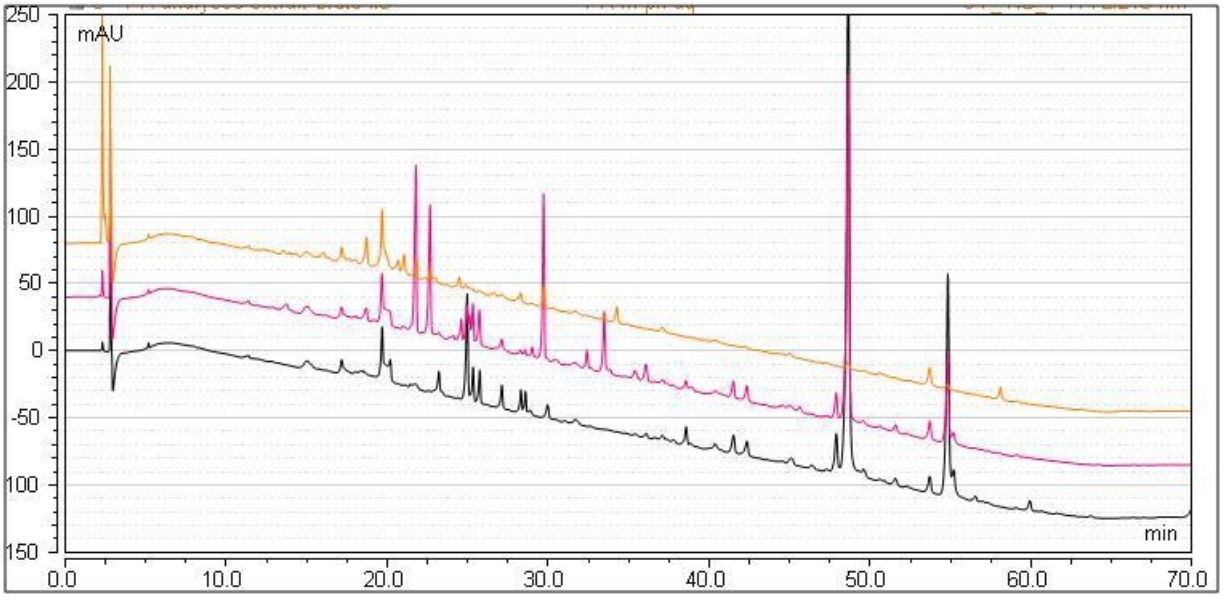


Figure 50. Chromatogramme CLHP des extraits au dichlorométhane (noir), à l'acétate d'éthyle (rose) et du résidu méthanolique (orange) à 220 nm.

L'extrait acétate d'éthyle semblant contenir les quinones et les flavonoïdes, et présentant de plus une complexité relativement faible, nous nous sommes intéressés en priorité à cet extrait.

III.3. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Pour faciliter l'accès aux composés purs, nous avons choisi de réaliser un préfractionnement de l'extrait en utilisant une technique chromatographique particulière : la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC). Cette technique chromatographique est particulièrement employée pour le fractionnement d'extraits végétaux complexes, permettant l'obtention rapide de fractions chimiquement simplifiées (Pauli *et al.*, 2007).

III.3.1. Pré-fractionnement par CPC

Le pré-fractionnement de l'extrait nécessite comme nous l'avons mentionné dans le chapitre précédent, la sélection du système biphasique de solvants.

III.3.1.1. Sélection du système biphasique de solvants

Les analytes contenus dans notre extrait étant de polarités intermédiaires, nous nous sommes orientés dans un premier temps à nouveau vers la gamme dite Arizona. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-après.

Système	Composition Heptane/AcOEt/MeOH/eau	Produit Rf = 0,45	Produit Rf = 0,79	Produit Rf = 0,86	Produit Rf = 0,93
D	1 :6 :1 :6, v/v	1,2	8	6	>10
F	1 :5 :1 :5, v/v	0,8	6	5	>10
G	1 :4 :1 :4, v/v	0,7	5	4	>10
H	1 :3 :1 :3, v/v	0,6	4	3,5	>10
J	2 :5 :2 :5, v/v	0,5	2	1,5	>10
K	1 :2 :1 :2, v/v	0,4	1,5	1	>10
L	2 :3 :2 :3, v/v	0,2	0,5	0,4	>10

Tableau 14. Systèmes biphasiques testés et constantes de distribution obtenues pour les composés principaux de l'extrait acétate d'éthyle.

Le système K, de polarité intermédiaire, permet d'obtenir une répartition intéressante des quatres composés majoritaires. Les K_D obtenus sont en effet assez différents pour espérer une séparation des trois analytes. Dans l'ensemble des systèmes testés, le métabolite avec un Rf de 0,93 est toujours uniquement réparti en phase organique ce qui est cohérent avec son apolarité supérieure aux autres analytes.

III.3.1.2. Fractionnement par CPC

Un essai préliminaire de fractionnement par CPC en utilisant le système de solvants Arizona K a été réalisé sur 500 mg d'extrait (expérience PK-CPC1). Sept fractions chimiquement simplifiées ont été obtenues. Le profil CLHP des différentes fractions est donné figure 51.

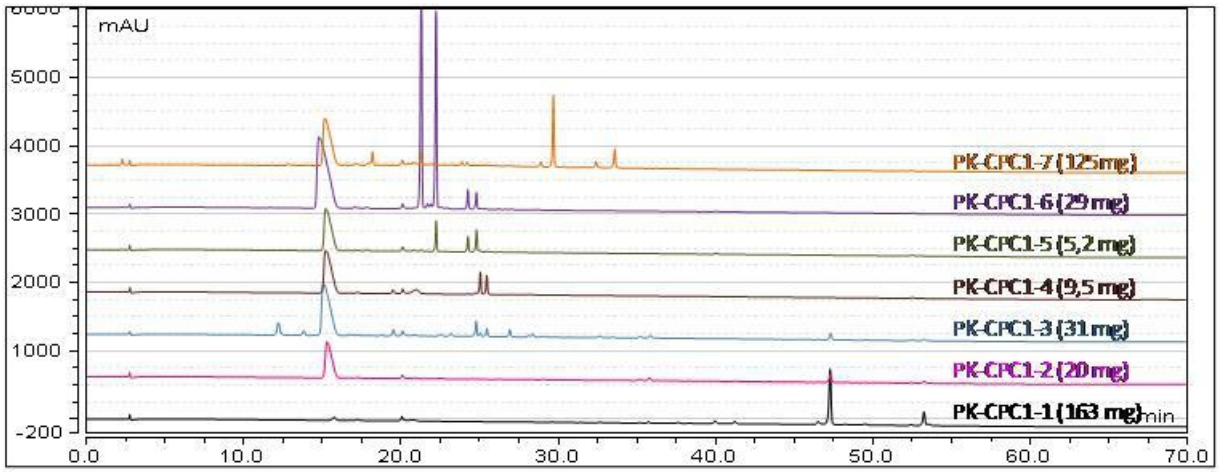


Figure 51. Profil CLHP des fractions obtenues après fractionnement CPC (PK-CPC1) à 210 nm.

Les fractions obtenues sont chimiquement bien simplifiées mais pour la plupart la masse obtenue est très faible (< 50 mg).

Une montée en échelle a été alors mise en œuvre sur environ 2 grammes d'extrait à l'acétate d'éthyle (expérience PK-CPC2). Les fractions ont été regroupées selon le profil chromatographique en CCM. Six fractions ont ainsi été obtenues de profil similaire à celles obtenues précédemment, le bilan massique ainsi que les profils CLHP des fractions sont présentés ci-après.

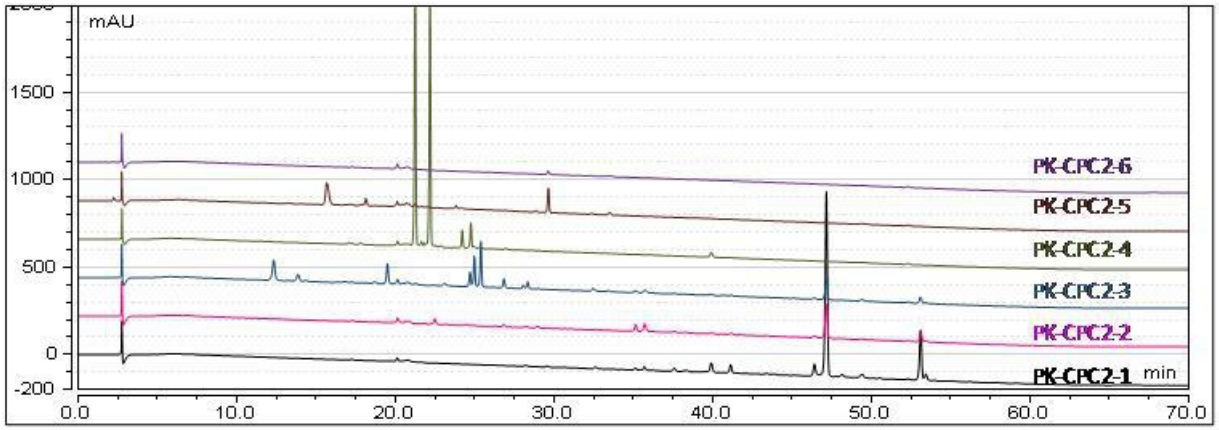


Figure 52. Profil CLHP des fractions obtenues après fractionnement CPC (PK-CPC2) à 210 nm.

Fraction	Masse (mg)	Rendement (%)
PK-CPC2-1	637,3	31,8
PK-CPC2-2	101,0	5,0
PK-CPC2-3	148,4	7,4
PK-CPC2-4	133,8	6,7
PK-CPC2-5	34,1	1,7
PK-CPC2-6	709,1	35,4

Tableau 15. Bilan massique des fractions obtenues après fractionnement par CPC.

Les fractions PK-CPC1-1 et PK-CPC2-1 sont obtenues avec une masse importante et contiennent 2 produits majoritaires. Une purification des ces fractions a donc été réalisée. La fraction PK-CPC2-2 de composition très proche de celle de PK-CPC2-1 a été soumise également à une chromatographie sur colonne ouverte.

La fraction PK-CPC2-4 contient deux produits majoritaires mais de temps de rétention très proches. Une purication par CPC a alors été réalisée.

III.3.2. Purification des fractions issues du pré-fractionnement

III.3.2.1. Fraction PK-CPC1-1

La fraction PK-CPC1-1 a été soumise à un purification sur colonne de silice utilisant dans un premier temps un gradient cyclohexane/acétate d'éthyle. Ce système d'éluant s'est avéré peu adapté entrainant une précipitation de la fraction en tête de colonne. Un système d'élution à base de dichlorométhane et de méthanol a alors été utilisé. La pente du gradient utilisé doit être très faible, sous peine d'éluer en mélange la majorité des analytes.

Deux produits ont pu être isolés directement après colonne : le produit PK_C (9 mg) avec une pureté CLHP de 95 % et le produit PK_A (5 mg) avec une pureté CLHP de 90 %.

III.3.2.2. Fraction PK-CPC2-1

La fraction PK-CPC2-1 (environ 600 mg), de composition similaire à la fraction PK-CPC1-1, a dans un premier temps été purifiée sur colonne de silice en utilisant un gradient dichlorométhane/méthanol. Sept fractions ont été obtenues notées PK-CPC2-1.1 à 7 mais aucun produit pur n'a pu être isolé en dépit d'un gradient très progressif.

La fraction PK-CPC2-1.5 (285 mg) représentant près de 50 % de la masse de la fraction initiale, a ensuite été purifiée par chromatographie flash avec un éluant moins polaire cyclohexane/acétate d'éthyle en commençant avec 2% d'acétate d'éthyle pour éviter une précipitation en tête de colonne. Sept fractions ont été obtenues notées PK-CPC2-1.5.1 à 7, toutes en mélange.

La fraction PK-CPC2-1.5.4 a ensuite été purifiée par CCM préparative avec comme éluant, un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50 :50, v/v). Le composé PK_D, de Rf = 0,5, a ainsi été isolé avec une pureté CLHP de 92 %.

Ce schéma de purification laborieux démontre essentiellement que les systèmes d'élution classiques de type cyclohexane/acétate d'éthyle et dichlorométhane/méthanol ne sont pas adaptés pour la séparation de nos analytes.

III.3.2.3. Fraction PK-CPC2-2

Suite au travail effectué sur la fraction PK-CPC2-1, de nouveaux systèmes d'élution ont été explorés. Omolo *et al.* (2012) ont utilisé comme éluant des mélanges de dichlorométhane et d'acétone pour isoler leurs composés. Ce mélange est trop « polaire » dans notre cas, de

nombreux analytes étant élués en mélange avec le dichlorométhane seul. Nous avons donc choisi un système tertiaire d'éluant : cyclohexane/dichlorométhane/acétone en partant d'un mélange (50 :50 :0, v/v) jusqu'au mélange (0 :0 :100, v/v).

Le composé PK_B (2,8 mg) a ainsi été isolé en une seule étape avec une pureté de 92 %, ainsi que le produit PK_C (5,9 mg) avec une pureté de 97 %. Egalement environ 5 mg de PK_D ont été isolés. Le gradient d'éluant est donc beaucoup plus adapté à la séparation de nos métabolites.

III.3.2.4. Fraction PK-CPC2-4

La fraction PK-CPC2-4 est composée de 2 métabolites de temps de rétention très proches en CLHP, et de rapports frontaux identiques en CCM. Une séparation de ces 2 composés a été alors envisagée par CPC.

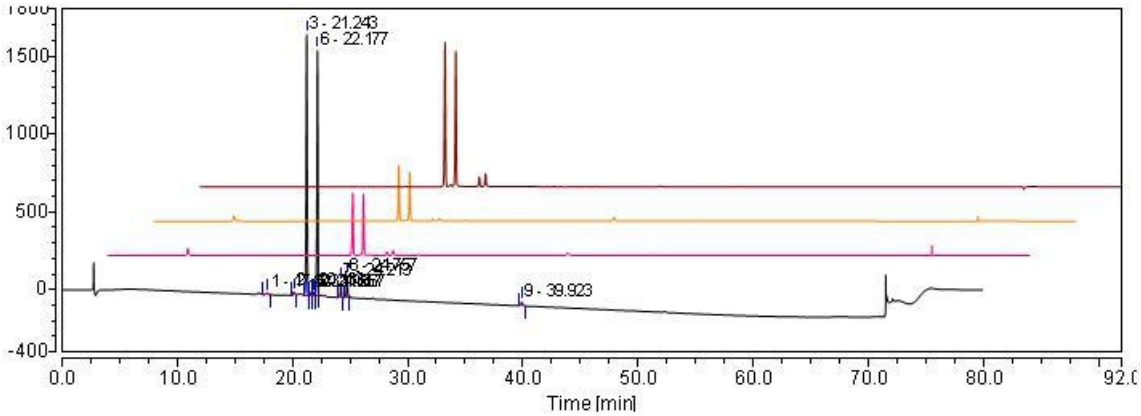


Figure 53. Chromatogramme CLHP de la fraction PK-CPC2-4 à 210 (noir), 254 (rose), 280 (orangé) et 365 nm (brun).

Le coefficient de partage K_D de ces analytes a été évalué dans les systèmes de la gamme Arizona. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-après.

Système	Composition Heptane/AcOEt/MeOH/eau	Produit Rt=21,2	Produit Rt = 22,2
A	0 :1 :0 :1, v/v	5	4,3
B	19 :1 :19 :1, v/v	2	1,8
C	9 :1 :9 :1, v/v	1,5	1,4
D	1 :6 :1 :6, v/v	0,8	0,7
G	1 :4 :1 :4, v/v	0,5	0,4
K	1 :2 :1 :2, v/v	0,3	0,2

Tableau 16. Constantes de distribution obtenues avec la fraction PK-CPC2-4

Les deux métabolites présentent des constantes de distribution très proches, et proches de l'unité dans les systèmes C et D. Nous avons donc choisi d'utiliser un système de composition intermédiaire : heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau (1 :7 :1 :7, v/v).

La fraction (133,5 mg) a ainsi été fractionnée par CPC (expérience PK-CPC3). Malheureusement les 2 analytes sont co-élués : le système ne présente pas de sélectivité

suffisante pour les séparer. Par manque de temps, nous n'avons pas pu poursuivre plus avant cette approche qui restera à finaliser.

III.3.3. Identification des composés isolés

III.3.3.1. PK_A

Les analyses du composé PK_A par RMN du ^{1}H et du ^{13}C montrent la présence de 10 protons et 15 carbones respectivement. L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence d'un ion $[M+H]^+$ à 271,1 m/z compatible avec une formule brute de $C_{15}H_{10}O_5$ avec un degré d'insaturation de 11. La comparaison des données RMN obtenues avec celles de la littérature (Choi *et al., 1996*) permet l'identification du composé : l'émodine ou 3-méthyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone (Figure 54). La structure a été également confirmée par diffraction des rayons X.

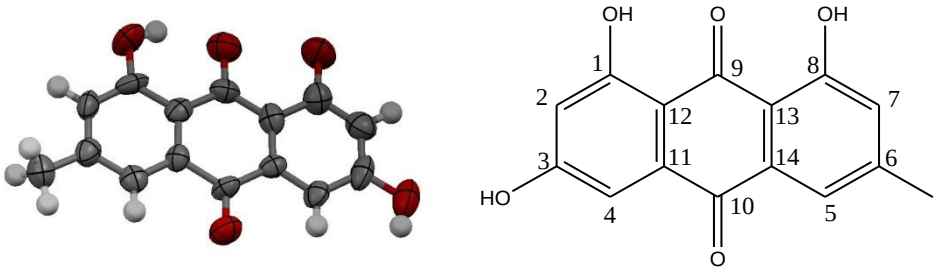


Figure 54. Représentation ORTEP (à gauche) et structure de l'émodine (à droite)

Ce métabolite a été préalablement isolé de plantes à hétérosides anthracéniques, comme les *Cassia spp*. (Fabaceae), *Rheum spp*. ou encore *Fallopia japonica* (Polygonaceae), mais n'a jamais été reporté dans les Icacinaceae.

III.3.3.2. PK_B

Les analyses du composé PK_B par RMN du ^{1}H et du ^{13}C montrent la présence de 12 protons et 16 carbones respectivement. L'analyse par spectrométrie de masse montre la présence d'un ion [M+H] à 285,1 m/z compatible avec une formule brute de $C_{16}H_{12}O_5$ avec un degré d'insaturation de 11. La comparaison des données RMN obtenues avec celles de la littérature (Choi *et al., 1996*) permet l'identification du composé : le physcion ou 3-méthoxy-6-méthyl-1,8-dihydroxyanthraquinone (Figure 55).

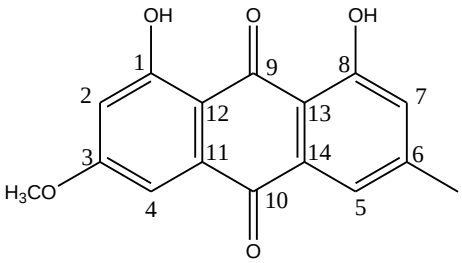


Figure 55. Structure du composé PK_B, physcion

Tout comme l'émodine, le physcion a été décrit dans les genres *Rheum*, *Cassia* etc. mais n'a jamais été isolé dans la famille des Icacinaceae.

III.3.3.3. PK_C

Les analyses par RMN du ^{1}H et du ^{13}C du composé PK_C indiquent la présence de 23 protons et 31 carbones respectivement. La comparaison des données avec celles de la littérature (Omolo *et al.*, 2012) nous a permis d'identifier le composé PK_C comme étant l'acide 6,7,11-trihydroxy-10-méthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12*H*-benzo[*b*]xanthène-4-carboxylique ou composé A décrit dans la figure 43 (Figure 56).

Figure 56. Structure des composés PK_C et PK_C-OMe

Atome n°	**PK_C** δ ^{1}H (*J* en Hz)	$\delta^{13}C$	**Atome n°**	**PK_C** δ ^{1}H (*J* en Hz)	$\delta^{13}C$
1	7,15, *s*	124,9	**1'**		171,9
2		117,0	**3'**	4,76, *m*	76,0
3	7,72, *s*	121,6	**4'**	2,66, *d* (6,2)	33,0
4		135,3	**4'a**		132,5
4a		148,9	**5'**		113,6
5a		163,1	**6'**	6,16, *d* (2,4)	98,8
6		162,7	**7'**		163,2
6a		109,0	**8'**	7,59, *s*	103,4
7		159,5	**8'a**		99,1
8	6,60, *d* (2,4)	100,6	**4-COOH**		182,0
9		108,3	**2-Me**	2,51, *s*	22,3
10		164,4	**10-OMe**	3,91, *s*	56,6
10a		119,4	**3'-Me**	1,48, *d* (4,5)	20,8
11		161,7	**7'-OMe**	3,73, *s*	55,3
11a		132,9	**6-OH**	12,0, *s*	
12		191,2	**7-OH**	9,81, *s*	
12a		139,1	**11-OH**	12,4, *s*	

Tableau 17. Données RMN du composé PK_C. Spectres réalisés dans le $CDCl_3$ à 300 MHz (^{1}H) et 75 MHz (^{13}C).

Néanmoins, par rapport aux données de Omolo *et al.* Quelques différences sont apparues lors de l'interprétation des spectres RMN (Données du tableau 17 et Spectres RMN 1D et 2D en Annexe). En effet, sur notre spectre HMBC, une corrélation a été observée entre les protons du groupement méthoxyle en position 10 à 3,91 ppm et le signal du carbone quaternaire à 164,4 ppm, permettant ainsi son attribution comme étant le carbone 10. Or ce carbone avait été identifié comme le carbone 5a par l'équipe précédente.

Egalement, des corrélations sur le spectre HMBC ont été observées entre le proton en 8' (7,59 ppm) et le carbone quaternaire à 113,6 ppm, attribuant plutôt ce signal au carbone 5' et non au carbone 2.

III.3.3.4. PK_D

Le composé PK_D présente des données RMN très proches de celles du composé B décrit par Omolo *et al.*, l'acide 6,7-dihydroxy-10,11-diméthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12H-benzo[b]xanthène-4-carboxylique (Figures 43 et 55), qui est un analogue du PK_C avec un groupement méthoxyle en position 11 (noté pour plus de facilité PK_C OMe) (Omolo *et al.*, 2012). Les données RMN du ^{1}H et ^{13}C de ces deux composés sont regroupées dans le tableau 17. L'analyse par spectrométrie de masse corrobore également cette structure, indiquant un pic moléculaire à 586 g.mol-1, cohérent avec une formule brute de $C_{32}H_{26}O_{11}$.

L'unique signal différant est un signal de groupement hydroxyle à 14,21 ppm, qui n'est pas décrit par Omolo *et al.*. Le déplacement chimique élevé permet d'attribuer ce signal à la fonction acide portée par le carbone en 4. Egalement, le signal du proton porté par le carbone 1 n'est pas visible sur le spectre RMN ^{1}H, car vraisemblablement masqué par le pic du solvant deutéré.

Pour s'assurer de la présence du signal, le spectre proton du produit PK_D a été réalisé dans l'acétone deutérée, dont le déplacement chimique n'interfère pas avec les signaux des protons aromatiques. Il est alors apparu que seuls 4 signaux correspondant à des protons aromatiques étaient présents.

Des analyses RMN plus poussées ont alors été menées. La réalisation du spectre carbone en *j*-modulé a ainsi mis en évidence la présence d'un carbone quaternaire supplémentaire en lieu et place du signal du CH en position 1 attendu (Figure 57). De plus, aucune corrélation n'a été observée sur le spectre HSQC entre ce carbone à 126,1 ppm et un proton du spectre, confirmant le type quaternaire.

Atome n°	PK_COMe δ ^{1}H (*J* en Hz)	δ^{13}C	PK_D δ ^{1}H (*J* en Hz)	δ^{13}C
1	7,19, *s* *(sous le pic du $CDCl_3$)*	125,1	*sous le pic du $CDCl_3$?*	126,1
2		116,3		117,4
3	7,94, *s*	126,1	8,03, *s*	127,2
4		133,7		134,7
4a		153,2		154,3
5a		158,4		159,4
6		160,8		161,9
6a		111,1		112,2
7		162,1		163,0
8	6,51, *d*	99,4	6,60, *d* (2,4)	100,5
9		107,3		108,4
10		162,0		163,8
10a		122,1		123,2
11		145,4		146,4
11a		131,4		132,5
12		186,3		187,4
12a		138,1		139,2
1'		178,8		171,9
3'	4,66, *m*	75,0	4,75, *m*	76,1
4'	2,66, *m*	31,9	2,68, *m*	33,0
4'a		130,8		131,9
5'		118,0		119,0
6'	6,16, *d*	97,9	6,19, *d* (2,4)	98,9
7'		162,8		163,1
8'	7,45, *s*	101,2	7,54, *s*	102,3
8'a		98,1		99,2
4-COOH		180,5		181,6
2-Me	2,42, *s*	19,7	2,45, *s*	20,7
3'-Me	1,38, *d*	15,3	1,48, *d* (6,3)	16,4
10-OMe	3,63, *s*	54,3	3,90, *s*	55,3
11-OMe	3,95, *s*	61,3	4,04, *s*	62,4
7'-OMe	3,80, *s*	55,5	3,73, *s*	56,5
6-OH	12,0, *s*		13,20, *s*	
7-OH	9,81, *s*		9,81, *s*	
X-OH			14,21, *s*	

Tableau 18. Données RMN des composés PK_C-OMe et PK_D. Spectres réalisés dans le $CDCl_3$ à 300 MHz (^{1}H) et 75 MHz (^{13}C) pour le PK_D.

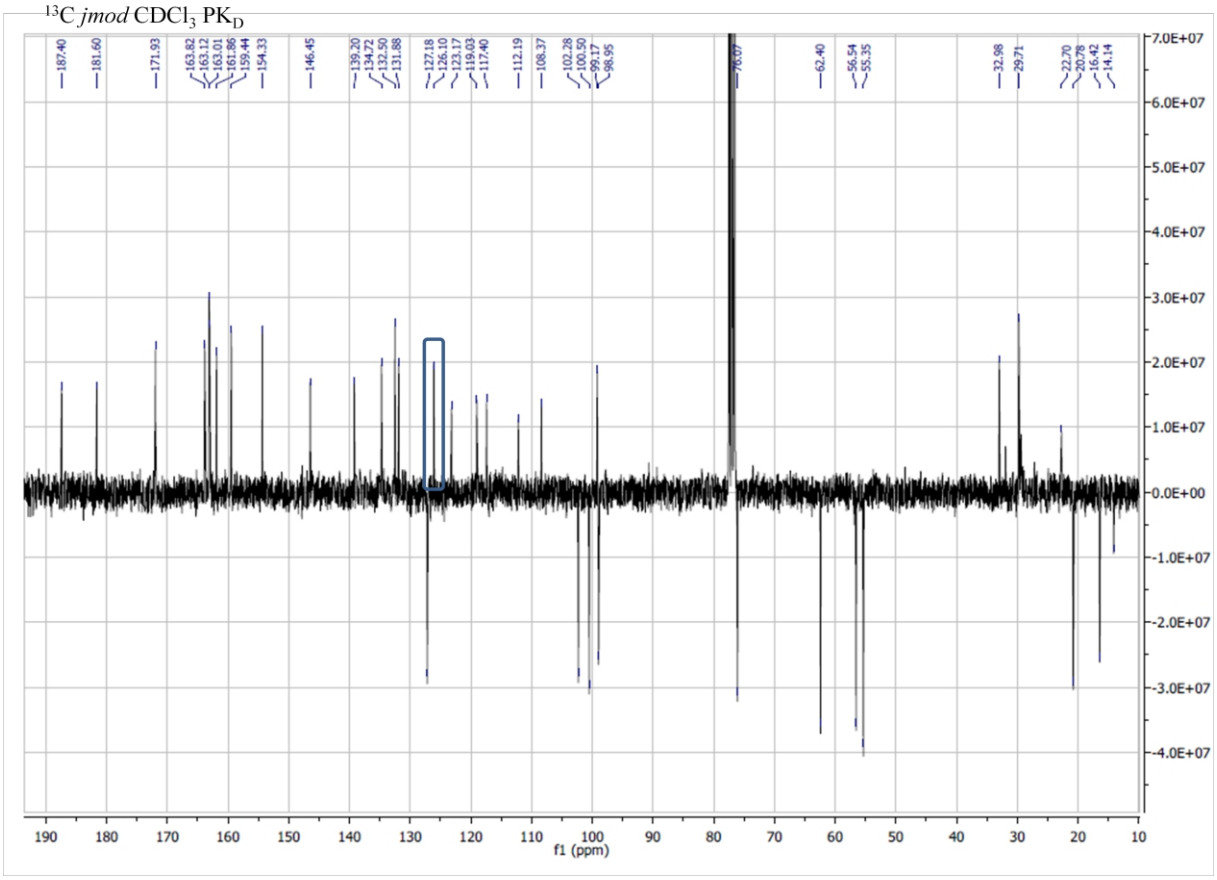


Figure 57. Spectre RMN ^{13}C *jmod* du composé PK_D ($CDCl_3$, 75 MHz)

L'analyse du spectre RMN du ^{13}C montre la présence de :

- 3 groupements carbonylés de type cétone ou acide à 187,4 et 181,6 ppm et de type ester ou lactone à 171,9 ppm;
- 8 carbones quaternaires sp^2 aromatiques liés à un hétéroatome à 163,8, 163,1, 163,0, 161, 9, 159,4, 154,3, 146,4 et 139,2 ppm;
- 10 carbones quaternaires sp^2 aromatiques à 134,7, 132,5, 131,9, 126,1, 123,2, 119,0, 117,4, 112,2, 108,4 et 99,2 ppm;
- 4 carbones sp^2 aromatiques portant un proton à 127,2, 102,3, 100,5 et 98,9 ppm;
- 1 carbone sp^3 portant un proton, voisin d'un hétéroatome à 76,1 ppm;
- 3 carbones sp^3 de type méthoxy à 62,4, 56,5 et 55,3 ppm;
- 1 carbone sp^3 de type CH_2 à 33,0 ppm;
- 2 carbones sp^3 de type méthyle à 20,8 et 16,4 ppm.

La position 1 de la molécule PK_D doit ainsi être substituée ou engagée dans un "pontage". L'hypothèse la plus simple est la substitution par un groupement hydroxyle, expliquant le groupement OH supplémentaire observé en RMN ^1H. Malheureusement, ni le déplacement chimique du carbone quaternaire nouvellement apparu (126,1 ppm) ni l'analyse par spectrométrie de masse ne sont cohérents avec la présence d'un atome d'oxygène supplémentaire, la formule brute obtenue correspondant à celle du composé PK_C-OMe, *i.e.*

$C_{32}H_{26}O_{11}$. Les données du spectre IR ainsi que les maxima d'absorption UV (225, 265, 285 et 380 nm) corroborent également la structure du composé PK_C-OMe.

Nous pouvons alors envisager trois alternatives : **1.** nous avons isolé le même composé que Omolo *et al*. et les données RMN sont atypiques ; **2.** nous avons isolé des composés différents mais de très proche parenté structurale; **3.** nous avons isolé le même composé mais l'interprétation des données RMN par Omolo *et al.* est erronée.

La solution 1 est très difficile à envisager, en effet à notre connaissance, il n'existe pas de possibilité pour qu'un groupement CH soit trié comme un groupement quaternaire et ne montre de plus aucune corrélation avec un proton en HSQC. Concernant la spectrométrie de masse, il est possible que le pic majoritaire observé ne corresponde pas à l'ion $[M+H]^+$ mais à un autre ion.

La solution 3 est envisageable, les données RMN publiées étant succinctes pour ce composé, et le seul spectre RMN ^{13}C donné étant un simple ^{13}C où la confusion entre un carbone quaternaire et un groupement CH est possible. Néanmoins, la réalisation de spectres DEPT est rapportée dans le texte, permettant d'éliminer les signaux des carbones quaternaires, rendant alors impossible toute confusion.

Les données RMN réattribuées selon l'ordre des carbones sont regroupées dans le tableau ci-après (Tableau 19).

L'analyse des données montre que le groupement hydroxyle supplémentaire (14,21 ppm) n'est pas l'hydroxyle de l'acide carboxylique. En effet, ce proton corrèle en HMBC avec le carbone en 5 et non avec le carbone 2 correspondant à la fonction acide. Le composé PK_D présente donc bien un groupement OH de plus que le composé de la publication, remettant en cause les données de spectrométrie de masse (Figure 58). Le pic identifié comme $[M+H]^+$ est peut être un pic d'ion moléculaire $[M]^+$ $C_{31}H_{23}O_{12}$obtenu après départ d'un groupement méthyle d'un méthoxy, qui est un très bon groupement partant. La formule brute serait alors $C_{32}H_{26}O_{12}$.

Atome n°	PK_D δ ^{1}H (*J* en Hz)	δ^{13}C	COSY	HMBC H→C
12		187,4		
4-COOH		181,6		
1'		171,9		
8'*		163,8		
10		163,1		
7'		163,0		
11		161,9		
7		159,4		
4a		154,3		
1*		146,4		
5a		139,2		
11a		134,7		
8'a		132,5		
2		131,9		
3	8,03, *s*	127,2	2-Me	COOH, 4a, 4, 2-Me
12a		126,1		
4		123,2		
10a		119,0		
4'a		117,4		
6a		112,2		
9		108,4		
6	7,54, *s*	102,3		COOH, 10, 11a, 10a, 6a
8	6,60, *d* (2,4)	100,5	6'	7, 9, 6'
5'		99,2		
6'	6,19, *d* (2,4)	98,9	8	7', 4'a, 9, 8
3'	4,75, *m*	76,1	3'-Me, 4'	
1-OMe	4,04, *s*	62,4		1
8'-OMe	3,90, *s*	56,5		8'
7'-OMe	3,73, *s*	55,3		7'
4'	2,68, *m*	33,0	3'	8'a, 4'a, 5'
3'-Me	1,48, *d* (6,3)	20,7	3'	3', 27
2-Me	2,45, *s*	16,4	3	4a, 2, 3
10-OH	14,21, *s*			10, 9, 5', 6'
11-OH	13,20, *s*			11, 10a, 6a
7-OH	9,81, *s*			7, 10, 9, 8

* positions interchangeables

Tableau 19. Données RMN ^{1}H, ^{13}C jmod, COSY et HMBC du composé PK_D

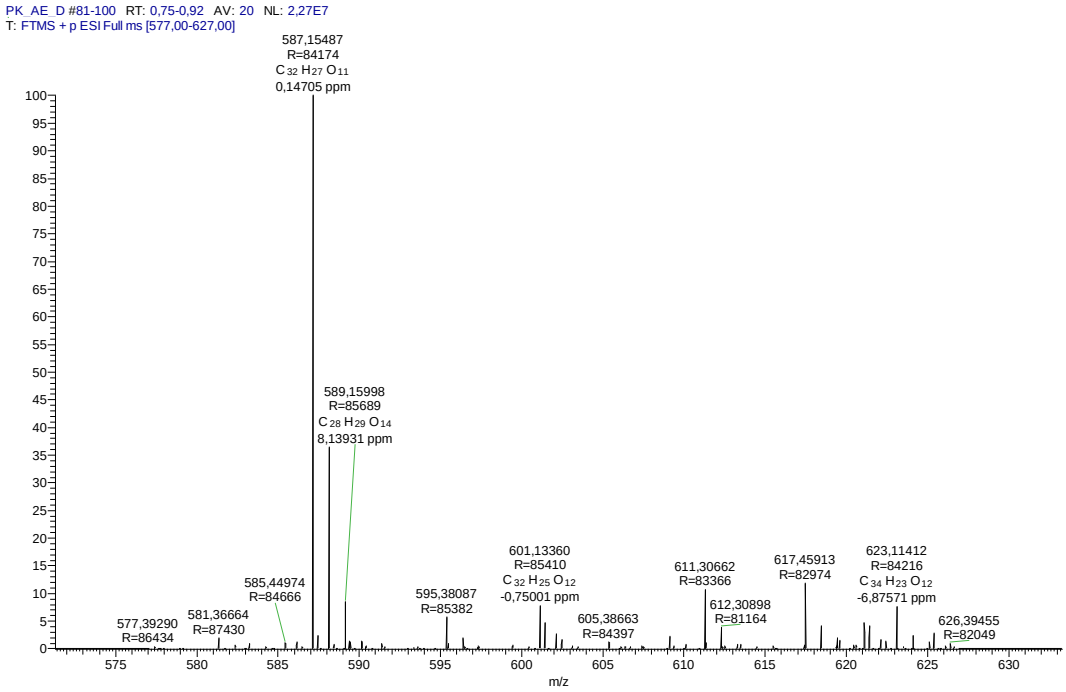


Figure 58. Spectre HRMS du composé PK_D.

Une structure proposée pour le composé PK_D est représentée figure 59.

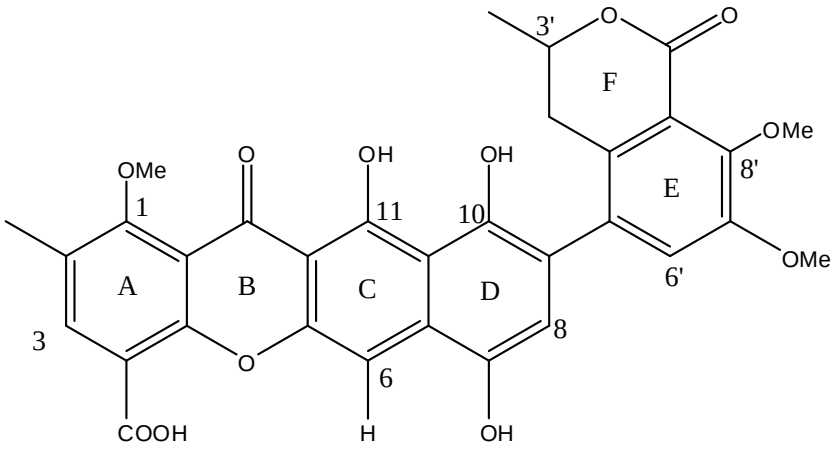


Figure 59. Structure proposée pour le composé PK_D

Les spectres COSY et HMBC sont présentés dans les figures 60 et 61.

La position du groupement méthyle en 3’ a été déduite par la corrélation COSY observée entre le méthyle et le proton en 3’. Le reste de la structure du cycle F a été déduite des corrélations COSY entre les protons 3’ et 4’ et des corrélations HMBC des protons H-4’ avec les carbones C 5’ et C 8’a.

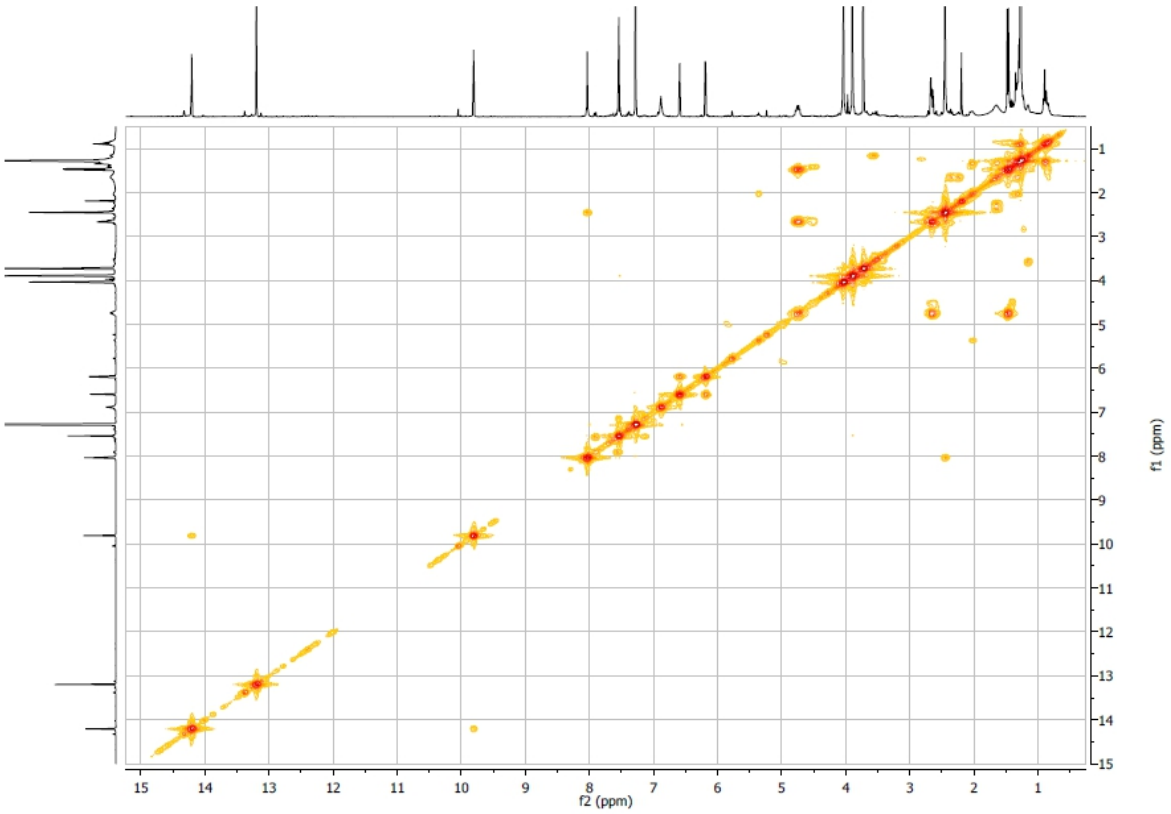


Figure 60. Spectre COSY du composé PK_D ($CDCl_3$, 300 MHz)

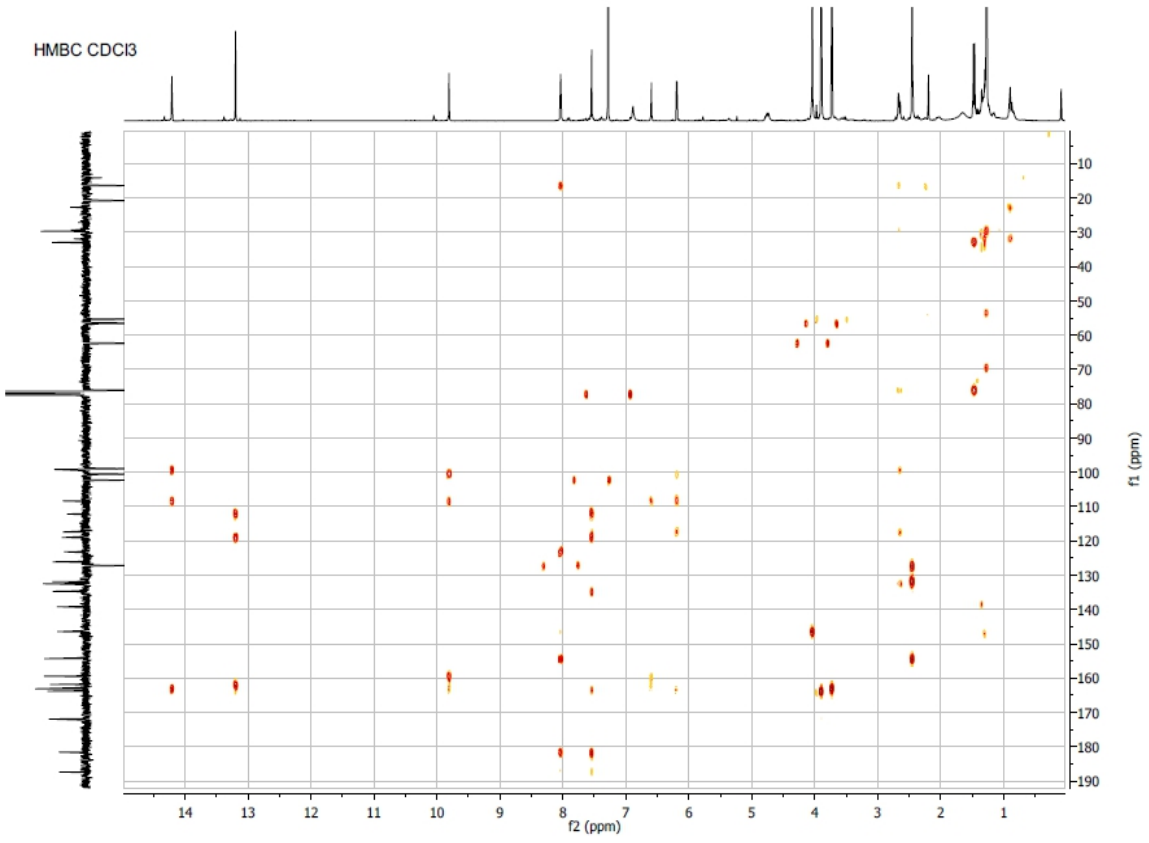


Figure 61. Spectre HMBC du composé PK_D ($CDCl_3$, 300 et 75 MHz)

La structure du cycle E a été déduite par les corrélations HMBC entre les protons H 4’ et les carbones C 4’a, C 5’, C 6’ et C 8a’ le proton H 6’ et les carbones C 7’, C 4’a. La position du groupement méthoxy en 7’ a été déduite de la corrélation HMBC entre les protons à 3,73 ppm et le C 7’. Aucune corrélation n'étant observée avec le carbone lactonique en 1’. Le déplacement chimique de C 8’ peut correspondre à la valeur de 163,8 ou 146,4 ppm.

La structure du cycle D a été déduite d'après les corrélations COSY entre les protons H 8 et H 6’. Cette corrélation longue distance est atypique mais a déjà été observée dans le composé PK_C. Egalement, les corrélations HMBC entre les protons H8 et H 6’ avec le carbone C 9 a permis de le situer à la jonction des deux cycles. La présence des groupements hydroxyles en 10 et 7 ont été déduites des corrélations HMBC entre le proton à 14,21 ppm et les carbones C 10, C 9, C 5’ et C 6’ et les corrélations entre le proton à 9,81 ppm et les carbones C 7, C 8, C 9 et C 10.

La position du proton aromatique 6 a été déduite des corrélations HMBC entre le proton H 6 et les carbones C 11a, C 10a et C 6a. De même, la position du groupement hydroxyle en 11 a été déduite des corrélations HMBC entre le proton à 13,20 ppm et les carbones C 11, C 10a et C 6a.

La structure du cycle A a enfin été déduite des corrélations COSY longue distance entre le méthyle à 2,45 ppm et le proton H 3, la position du groupement méthyle en 2 découlant de la corrélation du proton à 2,45 ppm avec le C 2 en HMBC. Les corrélations HMBC des protons du méthyle en 2 avec le C 4a et du proton H 3 avec les carbones COOH, C 4a et C 4 permettent de finir le cycle. Le substituant méthoxyle supplémentaire sur le cycle A a été là encore positionné par défaut, aucune corrélation n'étant observée. Le déplacement chimique de C 1 peut correspondre à la valeur de 163,8 ou 146,4 ppm.

La structure proposée demeure une proposition reposant sur l'hypothèse d'une analyse de spectrométrie de masse où le pic moléculaire n'est pas visible. De nombreuses corrélations sont cependant litigieuses nous amenant à remetttre en cause la structure du noyau de base des composés PK_C et PK_D. Pour confirmer la structure du composé PK_D, il est donc nécessaire de réaliser des analyses complémentaires.

Nous avons alors amorcé la cristallisation du composé pour confirmer la structure par diffraction des rayons X. Malheureusement, malgré les différents systèmes de solvants testés, aucune cristallisation satisfaisante n'a été pour le moment obtenue. Les seuls cristaux ont été observés en présence de solvants chlorés mais la cinétique d'évaporation trop rapide ne permet pas d'obtenir des cristaux de taille adaptée.

IV. CONCLUSION

Une première étude phytochimique de *Pyrenacantha kaurabassana* a donc été amorcée. Un criblage préliminaire des métabolites majoritaires est ainsi reporté pour la première fois, montrant la présence de quinone, notamment d'anthraquinone, de flavonoïdes et de saponosides.

Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle obtenu à partir des écorces de tubercule a permis d'isoler 4 métabolites :

- deux anthraquinones connues, l'émodine et le physcion, jamais décrites dans cette plante;
- deux métabolites de type xanthone : un déjà isolé par une équipe sud africaine, l'acide 6,7,11-trihydroxy-10-méthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12*H*-benzo[*b*]xanthène-4-carboxylique, et un second métabolite de proche parenté structurale dont la structure doit être confirmée.

La confirmation de structure du composé PK_D ainsi que la poursuite des travaux de fractionnement sur les extraits au dichlorométhane et au méthanol sont actuellement toujours à l'étude.

V. PARTIE EXPERIMENTALE

V.1. Le matériel végétal

V.1.1. Récolte et séchage

Des récoltes de parties aériennes et de tubercule de *Pyrenacantha kaurabassana* Baill., ont été réalisées au mois de Mars 2010 dans leur habitat naturel situé dans la région de Canhane, province de Gaza (Sud Mozambique). La détermination botanique de l'espèce a été réalisée par les taxonomistes de l'Herbier de l'Institut de Recherche Agronomique à Maputo au Mozambique. Un échantillon attribué d'un numéro de Voucher (G.3333) a été déposé au sein du même Herbier.

V.1.2. Extraction

452 g de poudre sèche de tubercule de *Pyrenacantha kaurabassana* ont été extraits en deux fois dans un appareil de Soxhlet au cyclohexane (1,2 l), au dichlorométhane (1 l) et méthanol (1 l) successivement pendant 48 heures. Les extraits obtenus sont regroupés et concentrés sous pression réduite. 1,894 g d'extrait au cyclohexane, 2,336 g d'extrait au dichlorométhane et 17,029 g d'extrait au méthanol sont ainsi obtenus.

11,597 g d'extrait méthanolique sont ensuite remis en solution dans un mélange eau/méthanol (85 : 15, v/v) et extraits 6 fois par 300 ml d'acétate d'éthyle. Les extraits obtenus sont concentrés sous vide et lyophilisés pour donner 4,636 g d'extrait à l'acétate d'éthyle et 7,49 g d'extrait méthanolique.

V.2. Criblage préliminaire des métabolites

V.2.1. Préparation des extraits

Quatre extraits sont réalisés à partir de la poudre de tubercule finement broyée :

a) 1 g de poudre est trituré avec 10 ml d'acide chlorhydrique à 5% et une pincée de sable de Fontainebleau. Le tout est ensuite filtré sur filtre plissé. La filtration est recommencée jusqu'à obtenir une solution limpide.

b) Sur 2 g de poudre placés dans un bécher de 100 ml sont versés 40 ml d'eau distillée portée à ébullition. L'infusion est poursuivie pendant une heure avant filtration sur coton.

c) Dans un flacon bouché hermétique, 1 g de poudre est mis à macérer avec 10 ml d'éther diéthylique pendant 2 à 3 h. La solution obtenue est ensuite filtrée sur filtre plissé.

d) Dans un flacon bouché hermétique, 1 g de poudre est mis à macérer avec 10 ml d'éthanol à 50% pendant 2 à 3 h. La solution obtenue est ensuite filtrée sur filtre plissé.

V.2.2. Réalisation des tests

Les tests sont répétés 3 fois.

V.2.2.1. Alcaloïdes

La macération chlorhydrique est répartie dans 3 tubes à hémolyse. Dans deux tubes, sont ajoutées quelques gouttes de réactif de Valser-Mayer (tétra-iodomercurate de potassium) dans l'un et quelques gouttes de réactif de Dragendorff (iodobismuthate de potassium) dans l'autre. Le troisième tube est conservé comme témoin. La formation d'un précipité qui n'est pas solubilisé par addition d'éthanol atteste de la présence d'alcaloïdes.

Il n'y a pas de formation de précipité ni avec le réactif de Valser-Mayer, ni avec le réactif de Dragendorff.

V.2.2.2. Quinones

Réaction de Bornträger : quelques millilitres de macération éthérée sont versés dans un tube à hémolyse et additionnés de quelques gouttes d'une solution d'ammoniaque. Après agitation, l'apparition d'une teinte rouge à violette indique la présence possible de quinones libres.

Notre échantillon donne une coloration **rouge cerise intense**, signant la présence de quinones.

Réaction de Brissemoret et Combes : quelques millilitres de macération éthérée sont versés dans un tube à hémolyse, puis additionnés du même volume d'alcool. Quelques gouttes d'une solution à 5 % d'acétate de Nickel sont ensuite ajoutées. En présence de quinones, les coloration suivantes se forment :

- Bleue en présence de benzoquinones
- Violette en présence de naphtoquinones
- Rouge en présence d'anthraquinones

Notre échantillon donne une coloration **rouge légère**, signant la présence d'anthraquinones.

V.2.2.3. Saponosides

15 ml d'infusion sont placés dans un tube à essai de diamètre de 16 mm et de 160 mm de hauteur. Après agitation vigoureuse de 10 secondes environ, la hauteur de mousse formée est relevée en cm. Cette hauteur est relevée une seconde fois après repos de 10 min. Si la formation de mousse est importante et perdure après les 10 min de repos, cela révèle la présence de saponosides, en quantité d'autant plus importante que la hauteur de mousse persiste après repos.

Après agitation, une hauteur d'un centimètre de mousse se forme qui disparait après 10 min de repos : l'échantillon ne contient pas de saponosides.

V.2.2.4. Stérols

Réaction de Liebermann-Burchard : Quelques millitres de macération éthérée sont mis à évaporer dans deux verres de montre. Un des résidus obtenus est ensuite repris par deux gouttes d'anhydride acétique. Une goutte d'acide sulfurique concentré est ensuite ajoutée à chaque verre de montre. Une coloration mauve tirant au vert après quelques minutes apparait dans le verre de montre traité à l'anhydride acétique, signant la présence de stérols. L'apparition de coloration dans le verre de montre traité uniquement à l'acide sulfurique révèle la présence d'autres métabolites : coloration rouge en présence de dérivés terpéniques, coloration bleue en présence de dérivés caroténoïdes.

Dans notre cas, une légère coloration **jaune** apparait dans le verre de montre traité avec l'anhydride acétique.

V.2.2.5. Cardénolides

Quelques millilitres de macération alcoolique sont versés dans deux verres de montre. Dans le premier, quelques gouttes du réactif de Kedde (acide dinitro-3,5-benzoïque en milieu potassique) sont ajoutées. La formation d'une coloration mauve à violette atteste de la présence de cardénolides. En parallèle, le second verre de montre est additionné de potasse pour vérifier l'absence de quinones qui pourraient se colorer en rouge et perturber la réaction.

Dans notre cas, aucune coloration violette n'apparait avec le réactif de Kedde. Une coloration orangée apparait en présence de potasse. L'échantillon ne contient donc pas de cardénolides.

V.2.2.6. Iridoïdes

Une fraction de l'infusé est additionnée d'acide chlorhydrique concentré pour se trouver en milieu 2N, puis le mélange est versé dans 3 tubes à essai. Les tubes sont ensuite plongés dans un bain marie bouillant. Une coloration bleu-noir ou vert-noir se développe dans les premières minutes en présence d'iridoïdes.

Aucun changement de couleur n'est constaté avec notre échantillon, signant l'absence d'iridoïdes.

V.2.2.7. Composés phénoliques

Recherche de tanins

Quelques millilitres de l'infusion sont versés dans deux tubes à hémolyse. Le premier tube est additionné de quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 1 % et le second tube est additionné de gélatine salée (solution aqueuse à 1 % de gélatine et 10% de chlorure de sodium). En présence de tanins, il se forme un précipité dans les deux tubes.

En présence de chlorure ferrique, un précipité vert-brun apparait. Avec la solution de gélatine salée, un léger précipité apparaît. Ces deux résultats attestent la présence de tanins.

Recherche de flavanes

Quelques gouttes de l'infusé sont déposées sur une bande de papier Whatman 3 MM. Après séchage, la bande de papier est trempée dans un verre de montre contenant une solution de vanilline à 1 % dans l'acide chlorhydrique concentré. En présence de flavanes, une coloration rouge-vif fugace apparait.

Notre échantillon ne donne aucune coloration avec la vanilline ce qui signe l'absence de flavanes.

Recherche de flavonoïdes

Quelques millilitres de macération alcoolique sont versés dans un tube à essai. Quelques gouttes d'alcool chlorhydrique sont additionnées à cette solution ainsi que quelques copeaux de magnésium (Réaction dite de la cyanidine). En présence de flavonoïdes, les colorations suivantes se développent :

- Rouge cerise pour les noyaux de type flavonol ;
- Orangé pour les noyaux de type flavone ;
- Violet pour les noyaux de type flavanone.

Notre échantillon donne une coloration **jaune d'or intense**, ne correspondant à aucune classe de flavonoïdes.

Quelques gouttes de macération alcoolique sont également déposées sur cinq bandes de papier Whatmann. Une bande est conservée comme témoin. Une bande est trempée dans une solution de chlorure d'aluminium. Une fluorescence intense sous UV à 365 nm se développe en présence de flavonoïdes : fluorescence jaune avec des flavones et flavanones ; verte avec les aurones et xanthones ; orangée avec les chalcones. Une seconde bande est plongée dans de la potasse alcoolique : une coloration jaune-orange se développe en présence des flavonoïdes.

Notre échantillon présente une fluorescence **jaune intense** en présence de chlorure d'aluminium et prend une **teinte orangée** en présence de potasse alcoolique.

V.3. Techniques de fractionnement et purification

V.3.1. Fractionnement par Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

V.3.1.1. Appareillage

L'appareillage utilisé est celui décrit précédement (Partie 1 V.2.1.1).

V.3.1.2. Sélection du système biphasique de solvant

Extrait à l'acétate d'éthyle

Une petite quantité de chaque système biphasique à tester est construite en mélangeant les quantités appropriées de chaque solvant. Environ 1 ml de chaque phase est transféré dans un pilulier. Un aliquot d'extrait est solubilisé dans chaque pilulier. Après solubilisation de l'échantillon, agitation et décantation des phases, un volume équivalent de chaque phase est déposé en chromatographie sur couche mince (CCM). Après migration dans un système n-butanol/acide acétique/eau (77 :8 :15, v/v), l'intensité des taches obtenues dans chaque phase est évaluée sous lumière UV à 366 nm, par densitométrie. Les composés semblant les plus abondants ont servi d'étalons pour apprécier le système ; nous avons ainsi sélectionné arbitrairement les produits dont le rapport frontal est de 0,45, 0,79, 0,86 et 0,93.

Fraction PK-CPC2-4

Une petite quantité de chaque système biphasique à tester est construite en mélangeant les quantités appropriées de chaque solvant. Environ 1 ml de chaque phase est transféré dans un pilulier. Un aliquot d'extrait est solubilisé dans chaque pilulier. Après solubilisation de l'échantillon, agitation et décantation des phases, un volume équivalent de chaque phase est déposé en chromatographie sur couche mince (CCM). Après migration dans un système dichlorométhane/méthanol (90 :10, v/v), l'intensité des taches obtenues dans chaque phase est évaluée sous lumière UV à 366 nm, par densitométrie. Les composés majoritaires de rapport frontal de 0,2 ont servi d'étalons pour apprécier le système.

V.3.1.3. Conditions opératoires CPC

Fractionnement extrait à l'acétate d'éthyle

La colonne est préalablement lavée en mode ascendant par 300 ml d'un mélange eau/MeOH (50 :50, v/v), pompé à 25 $ml.min^{-1}$ à 600 rpm. Le système biphasique est préparé en mélangeant des volumes appropriés de chaque solvant dans une ampoule à décanter. Les phases supérieures et inférieures sont séparées après agitation et décantation. La colonne est remplie de phase stationnaire (300 ml) dans le mode de pompage adapté, à un débit de 25 $ml.min^{-1}$ avec une vitesse de rotation de 600 rpm. Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Expérience	PK-CPC 1	PK-CPC 2
Système biphasique	Arizona K	
Masse injectée	517,4 mg	2,00 g
Mode pompage	Ascendant	
Débit	8 $ml.min^{-1}$	8 $ml.min^{-1}$
Vitesse de rotation	1300 rpm	1300 rpm
Rétention de phase stationnaire	76 %	70 %
Perte de charge	34 bars	28 bars
Longeurs d'ondes	220, 264, 285, 375 nm	
Début de l'extrusion	54 min	75 min
Volume des fractions collectées	4 ml	4 ml

Tableau 20. Conditions opératoires utilisées pour le fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle.

Les fractions des différentes CPC sont regroupées selon leur profil chromatographique en CCM. L'expérience PK-CPC 1 a permis l'obtention de 8 fractions, notées PK-CPC1-1 à 8 ; l'expérience PK-CPC 2 a permis l'obtention de 6 fractions, notées PK-CPC2-1 à 6.

Fractionnement de la fraction PK-CPC2-4

Les conditions opératoires utilisées pour la purification de la fraction PK-CPC2-4 par CPC sont regroupées dans le tableau ci-après.

Expérience	PK-CPC 3
Système biphasique	Heptane/AcOEt/MeOH/eau (1 :7 :1 :7, v/v)
Masse injectée	133,5 mg
Mode pompage	Ascendant
Débit	8 $ml.min^{-1}$
Vitesse de rotation	1300 rpm
Rétention de phase stationnaire	74 %
Perte de charge	25 bars
Longeurs d'ondes	220, 264, 285, 375 nm
Début de l'extrusion	45 min
Volume des fractions collectées	8 ml

Tableau 21. Conditions opératoires utilisées pour le fractionnement de la fraction PK-CPC2-4.

V.3.2. Chromatographie colonne ouverte

Les colonnes ouvertes ont été réalisées sur gel de silice 60 (0,040-0,063 mm) Merck. La taille des colonnes, la masse de gel de silice ont été adaptées à la quantité et à la nature de l'échantillon à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi des purifications et le regroupement des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM. Les échantillons ont été déposés sur colonne après formation d'un amalgame par solubilisation dans le dichlorométhane, mélange avec de la silice et évaporation sous pression réduite.

La fraction PK-CPC1-1 (163 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante de 0 à 10% de méthanol. Le composé $\mathbf{PK_D}$ (9 mg) et le composé $\mathbf{PK_A}$ (5 mg) ont été isolés à 100% de dichlorométhane.

La fraction PK-CPC2-1 (588,3 mg) a été soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante de 0 à 50% de méthanol. Sept fractions ont été ainsi obtenues notées PK-CPC2-1.1 à 7 et soumises à des purifications supplémentaires.

V.3.3. Chromatographie flash

La chaîne chromatographique utilisée est une chaîne Flashsmart one (AIT, Houilles, France) équipée de deux pompes isocratiques monopiston (débit maximum 40 $ml.min^{-1}$), d'un détecteur UV et d'un collecteur de fractions.

Les colonnes utilisées sont des colonnes de silice Interchim PF-30-SiHP de masse adaptée à l'échantillon déposé. Les échantillons ont été déposés sur colonne après formation d'un amalgame par solubilisation dans le dichlorométhane, mélange avec de la silice et évaporation sous pression réduite.

La fraction PK-CPC2-1-5 (284,7 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle de polarité croissante de 10 à 100% d'acétate d'éthyle, à un débit de 15 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les minutes. Six fractions ont été ainsi obtenues notées PK-CPC2-1.1.1 à 6 et soumises à des purifications supplémentaires.

La fraction PK-CPC2-2 (97,4 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange cyclohexane/dichlorométhane de polarité croissante de 50 à 100% de dichlorométhane puis par un mélange dichlorométhane/acétone de polarité croissante de 0 à 100 % d'acétone, à un débit de 12 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les 30 secondes. Le composé $\mathbf{PK_B}$ (6,0 mg) a été isolé par le mélange cyclohexane/dichlorométhane (30 :70, v/v) et le composé $\mathbf{PK_C}$ (5,6 mg) a été isolé par de dichlorométhane/acétone (98 :2, v/v).

V.3.4. Chromatographie sur couche mince préparative

Les séparations ont été effectuées sur des plaques de silice 20 x 20 cm avec zone de concentration PLC Silica Gel 60 F_{254} (Merck). L'épaisseur de la couche de silice est de 0,5 mm avec une zone de concentration de 20 x 4 cm. L'éluant utilisé est le mélange toluène/ formiate d'éthyle/acide formique (50 :20 :10, v/v). Les bandes sont sélectionnées sous lumière UV à 254 et 366 nm. La séparation des analytes de la silice est effectuée après « grattage » de la bande et macération dans l'acétone sous agitation pendant 2 heures. La suspension est ensuite filtrée sur papier et concentrée sous pression réduite.

V.4. Techniques analytiques

V.4.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les analyses ont été réalisées sur plaques de silice Silicagel 60 F254 (Merck). Les éluants utilisés sont des mélanges cyclohexane/acétate d'éthyle ou dichlorométhane/méthanol dans des proportions appropriées. Les plaques sont examinées sous UV à 254 et 366 nm avant et après révélation par pulvérisation d'anisaldéhyde sulfurique et chauffage à 105°C.

V.4.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex UHPLC U3000RS (Dionex, ThermoFisher SA, Voisins le Bretonneux, France), équipée d'une pompe LPG-3400RS, d'un injecteur automatique RSLC WPS-300T RS, d'un enceinte à colonne thermostatée TCC-300SD et d'un détecteur à barrettes de diodes UHPLC+ DAD-3000 .

La colonne utilisée est une colonne Ascentis® C_{18} (25 cm x 4.6 mm, 5µm) équipée d'une pré-colonne SuperguardTM AscentisTM C_{18} (2 cm x 4.0 mm, 5µm) (Supelco, Bellefonte PA, USA).

La phase mobile utilisée est un mélange binaire d'eau avec 0,025% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) (solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution utilisé est le suivant : l'analyse débute à 100 % de solvant A puis la quantité de solvant B augmente progressivement jusque 100% en 60 min et maintenue à 100% de solvant B pendant 8 min, avant un ré-équillibrage de la colonne à 100 % de solvant A pendant 10 min.

La détection UV est fixée à λ = 220, 254, 280 et 365 nm. La température du four à colonne est réglée à 40°C. Le volume d'injection est de 5 µL pour des solutions concentrées à 1 mg/mL.

Le pilotage de l'appareil et la gestion des données sont effectuées par le logiciel Chromeleon 7.1. Les pourcentages de pureté CLHP donnés sont indiqués pour λ = 220 nm.

V.4.3. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C ont été réalisés à température ambiantesur un spectromètre Brüker-Avance 300 MHz. Le solvant utilisé pour les analyses est le $CDCl_3$.

V.4.4. Spectrométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker ATR-IR alpha (Bruker Biospin, Wissenbourg, France).

V.4.5. Spectrométrie UV

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectromètre Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Les solutions à examiner ont été réalisées dans l'acétonitrile.

V.4.6. Point de fusion

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à capillaire Stuart SMP3 (Staffordshire, United kingdom).

V.4.7. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu QP 2010 par injection directe, avec une tension de cône de 70 eV.

Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre ExactivePlusOrbitrap (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne), équipé d'une sonde d'ionisation electrospray (H-ESI II). Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation positif sur une plage de masse allant de 100 à 1000 Da. Le système est contrôlé par le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Les paramètres ESI et MS utilisés sont les suivants : tension de spray −4.0 kV, les températures du capillaire et du four respectivement de 260 et 350 °C, tension de lentille 100 V. « Automatic gain control » (AGC) de la valeur cible a été réglée à 1 × 106 charges et le temps d'injection maximal a été fixé à 200 ms. La résolution a été fixée à 140,000 (m/z = 200) et la durée du scan à environ 0.3 s (plus de 15 points par pic chromatographique).

V.4.8. Diffraction des rayons X

Les cristaux du PK_A, ont été obtenus dans un mélange acétonitrile/éthanol à 293 K. Les cristaux sont sous forme de lamelles dont les dimensions sont : 0,60 x 0,05 x 0,04 mm.

PK_A, $C_{15}H_{11}O_6$, Mx= 287,24 g mol^{-1} cristallise en système monoclinique au groupe d'espace P21/n (Z=4). Les paramètres sont : a= 3,7858(5), b = 15,5353(13)Å, c = 21,616(2) Å and β =90,494(10) °, volume à 1271.3(2)$^{-3}$ Å.

La densité est égale à 1.501 g cm^{-3}, le coefficient linéaire d'absortion est μ = 0.118 mm^{-1} pour la longueur d'onde λ (Mo Kα) de molybdène (λ = 0,71073 Å).

Nous avons collecté 3386 réflections dont 935 indépendants [R(int) = 0.0353]. Les facteurs de confiance sont : R = 0,0665, wR = 0,1681 [I > 2σ(I)] et S=1,032 en F^2. Le minimum et maximum de densité résiduelle sont -0,154 et 0,256 e$Å^{-3}$.

V.5. Description des composés isolés

V.5.1. PK_A, émodine ou 3-méthyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone:

aiguilles oranges ; $RMN^{13}C$ (acétone-D_6, 75 MHz) : δ 189,5 (C, C-9), 181,3 (C, C-10), 165,5 (C, C-6), 165,4 (C, C-8), 162,4 (C, C-1), 148,7 (C,C-3), 135,7 (C, C11), 133,3 (C, C-14), 124,1 (CH, C-2), 120,6 (CH, C-4),113,2 (C, C-13), 108,8 (CH, C-5 et C-12), 107,9 (CH, C-7), 21,1 (CH_3, 3-CH_3); RMN^1H (acétone-D_6, 300 MHz) : δ 12,19 (1H, *s*, OH C-1), 12,07 (1H, *s*, OH C-8), 7,57 (CH, *s*, C-4), 7,26 (1H, *s*, C-2), 7,14 (CH, *s*, C-5), 6,67 (CH, C-7), 2,47 (CH_3, *s*, 3-CH_3); EI/MS m/z 271,059 $[M+H]^+$ (correspond à $C_{15}H_{10}O_5$).

V.5.2. PK_B, physcion ou 3-méthoxy-6-méthyl-1,8-dihydroxyanthraquinone:

Aiguilles oranges ; $RMN^{13}C$ ($CDCl_3$, 75 MHz) : δ193,1 (C, C-9), 182,5 (C, C-10), 167,2 (C, C-3), 166,2 (C, C-1), 157,9 (C, C-8), 135,3 (C, C-11), 133,2 (C, C-14), 124,5 (CH, C-7), 121,3 (CH, C-5), 113,7 (C, C-13), 110,2 (C, C-12), 108,3 (CH, C-4), 106,7 (CH, C-2), 56,1 (CH_3, 3-OCH_3), 22,1 (CH_3, C-6); RMN^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ12,35 (1H, *s*, OH C-1), 12,15 (1H, *s*, OH C-8), 7,66 (CH, *s*, C-4), 7,40 (1H, *s*, C-4), 7,10 (CH, *s*, C-7), 6,72 (CH, C-2), 3,96 (CH_3, *s*, 3-OMe), 2,47 (CH_3, *s*, CH_3 C-6) ; ESI-MS m/z 285,0753 $[M+H]^+$ (correspond à une formule brute de $C_{16}H_{13}O_5$).

V.5.3. PK_C: acide 6,7,11-trihydroxy-10-méthoxy-9-(7-méthoxy-3-méthyl-1-oxoisochroman-5-yl)-2-méthyl-12-oxo-12*H*-benzo[*b*]xanthène-4-carboxylique

Solide brun; $RMN^{13}C$ ($CDCl_3$, 75 MHz) et RMN^1H ($CDCl_3$, 300 MHz) : voir Tableau 17;ESI-MS m/z 571,5 $[M]^+$.

V.5.4. PK_D

Solide brun; m.p. 224-225 °C; IR υ_{max} cm^{-1}: 2920 et 2850 (OH), 1585 (C=O); $RMN^{13}C$ ($CDCl_3$, 75 MHz) et RMN^1H ($CDCl_3$, 300 MHz): voir tableau 18 et 19; UV λ nm (log ε): 228 (4,42), 266 (4,51), 286 (4,51) et 381 (4,07) CH_3CN_{max} GC-MS m/z 260 $[M]^+$.

VI. BIBLIOGRAPHIE

Aguwa C.N., Mittal G.C., 1981. Study of antiulcer activity of aqueous extract of leaves of *Pyrenacantha staudtii (Icacinaceae)* using various models of experimental gastric ulcer in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 74, 215-219.

Anosike C.A., Ugwu U.B., Nwakanma O., 2008. Effect of ethanol extract of *Pyrenacantha staudtii* leaves on carbontetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Biokemistri* 20(1), 17-22

Antai S.P., Nkwelang G., 1998. Reduction of some toxicants in *Icacina mannii* by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae. Plant Food Hum. Nutr.* 53, 103-111.

Asuzu I.U., Ugwueze E.E., 1990. Screening of *Icacina trichantha* extracts for pharmacological activity. *J. Ethnopharmacol.* 28, 151-156.

Asuzu I.U., Abubakar I.I., 1995. The effects of *Icacina trichantha* tuber extract on the nervous system. *Phytother. Res.* 9, 21-25.

Awe E.O., Kolawole S.O., Wakeel K.O., Abiodun O.O., 2011. Antidiarrheal activity of *Pyrenacantha staudii* Engl. (Icacinaceae) aqueous leaf extract in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 137, 148-153.

Berhaut J., 1975. Flore illustrée du Sénégal IV. Gouvernement du Sénégal, Dakar.

Bodley A.L., Shapiro T.A., 1995. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a toposisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 3726-3730.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Médicales. Ed. 2, Lavoisier, Paris, p. 895.

Cerighelli M.R., 1919. La farine des graines et la fécule des tubercules de *l'Icacina senegalensis. Ann. Inst. Bot.-Grol. Colon.* 3, 169-178.

Collinson M.E., Manchester S.R., Wilde V., 2012. Fossil fruits and seeds of the Middle Eocene Messel biota, Germany. *Abhandlungen der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung* 570, 1-249.

Dei H.K., Bacho A., Adeti J., Rose S.P., 2011. Nutritive value of false yam (*Icacina oliviformis*) tuber meal for broiler chickens. *Poultry Sci.* 90, 1239-1244.

Dictional of Natural Products on CD-ROM, Chapman & Hall, 1999, Release 8 : 1.

Eggli, U. Dicotyledons. 2ème éd. Berlin: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co.K; 2004: 287 (Illustrated Handbook of Succulent Plants)

Exell A., Fernandes A. and Wild H., 1963. Flora Zambeziaca, vol 2, Part 1, 340

Ezeigbo I.I., 2010. Antidiabetic potential of methanolic leaf extracts of *Icacina trichantha* in alloxaninduced diabetic mice. *Int. J. Diabetes Dev. C.*30, 150-152.

Falodun A., Usifoh C.O., 2006. Isolation and Characterization Of 3-Carboxymethypyridine from the Leaves of *Pyrenacantha Staudtii* (Hutch and Dalz) (Icacinaceae). *Acta Pol. Pharm.-Drug Research.* 63(3), 235-237.

Falodun A.,Usifoh C.O., 2007. Isolation and Characterization of hexahydroxylcyclohexane from the leaves of *Pyrenacantha staudtii* (Hutch and Dalz). *J. Pharm. Sci. & Pharm. Pract.* 8(3), 60-63.

Falodun A., Chaudhry A.M.A., Choudhary M.I., 2009[a]. Phytotoxic and Chemical Investigation of a Nigerian Medicinal Plant. *Res. J. Phytochem.* 3(1), 13-17.

Falodun A., Siraj R., Choudhary M.I., 2009[b]. GC-MS Analysis of Insecticidal Leaf Essential Oil of *Pyrenacantha Staudtii* Hutch and Dalz (Icacinaceae). *Trop. J. Pharm. Res.*, 8(2), 139-143.

Falodun A., Irfan M., Choudhary M.I., 2009[c]. Isolation and characterization of xanthine oxidase inhibitory constituents of *Pyrenacantha staudtii. Acta Pharmaceut. Sin.* 44(4) : 390-394.

Fernandez M.A., de las Heras B., Garcia M.D., Saenz M.T., Villar A., 2001. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 1533-1539.

Gill L.S., 1992. Medicinal plants in Nigeria. In : Ethnomedical uses of plants in Nigeria, Gills, L.S. (Ed.), Uniben Press, 143.

Govindachari T.R., Viwanathan N., 1972. Alkaloids of *Mappia foetida. Phytochem.* 11, 3529-3531.

Graebner I.B., Morel A.F., Burrow R.A., Mostardeiro M.A., Ethur E.M., Dessoy E.C.M., Scher A., 2002. Diterpenos isolados de *Humirianthera ampla. Miers. Rev. Bras. Farmacogn.* 12, 80-81.

Gunasekera S.P., Badawi M.M., Cordell G.A., Farnsworth N.R., Chitnis M., 1979. Plant anticancer agents. X. Isolation of camptothecin and 9-methoxycamptothecin from *Ervatamia bryntana. J. Nat. Prod.* 42, 475-477.

Harborne J.B., 1984. Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. 2nd Ed. Chapman and Hall, USA, 46.

Hernandez-Perez M., Rabanal R.M., de la Torre M.C., Rodriguez B., 1995. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effects of aethiopinone, an *o*-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta Med.* 61, 505-509.

Houghton P.J., Raman A., 1998. Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. Chapman et Hall, Londres, 1ère éd., 29-31.

Iwu M.M., 1983. Traditional Igbo Medicine, Report of a project sponsored by the Institute of African Studies, University of Nigeria, Nsukka, 48.

Kamperdick C., Tran V.S., 2002. Constituents from *Gomphandra tetranda* (Icacinaceae). *Tap. Chi. Hoa. Hoc.* 40(3), 108-110.

Kaplan M.A.C., Ribeiro J., Gottlieb O.R., 1991. Plant chemosystematics and phylogeny. Part 34. Chemogeographical evolution of terpenoids in Icacinaceae. *Phytochem.* 30(8), 2671-2676.

Kerharo J., Adam J.G., 1974. La pharmacopée Sénégalaise traditionnelle, plantes médicales et toxiques. Vigot Freres, Paris.

Labat J.-N., El-Achkar E., Rabevohitra R., 2006. Révision synoptique du genre *Pyrenacantha* (Icacinaceae) à Madagascar. *Adansonia*, sér. 3, 28(2), 389-404.

Lasisi A.A., Ogunwande I.A., Walker M.T., Setzer W.N., 2006. Volatile Constituents of the stem and root bark of *Pyrenacantha standtii* Engl. *Nat. Prod. Commun.*, 2(6), 681- 684.

Lasisi A., Ojo D.A., Darel E.O., Olayiwola M.A., Adebisi S.A., 2011. In-vitro Anthelmintic and Antibacterial Properties of the Leaf Hexane Isolates of *Pyrenachantha staudtii* EngL (ICACINACEAE*). Journal of Herbal Practice and Technology* 1, 6-12.

Lima L.M., Graebner I.B., Morel A.F., Carvalho J.T.C., 2000. Estudo da atividade anti-inflamatória da espécie *Humirianthera ampla.* XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil-ET56.

Liu C.F., Lin N., 2006. Progress in research on mechanisms of anti-rheumatoid arthritis of triptolide. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31, 1575-1579.

Luiz A.P., Moura J.V., Meotti. F.C., Guginski G., Guimaraes C.L.S., Azevedo M.S., Rodrigues A.L.S., Santos A.R.S., 2007. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. *J. Ethnopharmacol.* 114, 355-363.

Mbatchou V.C., Dawda S., 2012. Phytochemical and pharmacological profile of genus *Icacina. Phytopharmacol.* 2(2), 135-143.

Mendes E. J., Icacinaceae. Royal Botanic Gardens, Kew; Flora Zambeziaca, vol.2, 1963,Part 1.

Mesia G.K., Toma G.L., Penge O., Lusakibanza M., Nanga T.M., Cimanga R.K., Apers S., Van M.S., Totte J., Pieters L., Vlietinck A.J., 2005. Antimalarial activities and toxicities of three plants used as traditional remedies for malaria in the Democratic Republic of Congo: *Croton mubango, Nuclea pobeguinii* and *Pyrenacantha staudtii*. *Ann.trop. med. parasit.* 99(3), 345-357.

National Research Council. 2008. Lost Crops of Africa: Volume III: Fruits. 281-289. Available at http://www.nap.edu/catalog/11879.html (20/11/2011).

Omolo J.J., Maharaj V., Naidoo D., Klimkait T., Malebo H.M., Mtullu S., Lyaruu H.V.M., Charles B. de Koning C.B., 2012. Bioassay-Guided Investigation of the Tanzanian Plant *Pyrenacantha kaurabassana* for Potential Anti-HIV-Active Compounds. *J. Nat. Prod.*, 75, 1712-1716.

On'Okoko P., Vanhaelen M., Vanhaelen-Fastre R., 1985. The constitution of icacinol, a new diterpene with a pimarane skeleton from *Icacina claessensis*. *Tetrahedron*, 41, 745-748.

On'okoko P., Vanhaelen M., 1980. Two new diterpene-based alkaloids from *Icacina guesfeldtii*. *Phytochem.* 19, 303-305.

Padmanabha B.V., Chandrashekar M., Ramesha B.T., Hombe Gowda H.C, Gunaga R.P., Suhas S., Vasudeva R., Ganeshaiah K.N., Shaanker R.U., 2006. Patterns of accumulation of camptothecin, an anti-cancer alkaloid in *Nothapodytes nimmoniana* Graham., in the Western Ghats, India: Implications for identifying high-yielding sources of the alkaloid. *Curr. Sci.*, 90, 95-100.

Pantazis P., Han Z., Chatterjee D., Wyche J., 1999. Water-insoluble camptothecin analogues as potential antiviral drugs. *J. Biomed.* 6, 1-7.

Pauli G.F., Pro S.M., Friesen J.B., 2007. Countercurrent Separation of Natural Products. *J. Nat. Prod.* 71(8), 1489-1508.

Potgeiter M.J., van Wyk A.E., 1994. Fruit structure of the genus Pyrenacantha Hook. (Icacinaceae) in southern Africa. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 35, 105-113.

Ramesha B.T., 2008. Molecular and chemical characterization of *N. nimmoniana* (Icacinaceae) and its related genera : towards identifying high yielding sources of anticancer alkaloid, Camptothecin. P^{h}D Thesis. Bangalore. 174.

Romanelli S.P., Perego G., Pratesi N., Carenini M., Tortoreto Z.F., 1998. In *vitro* and in *vivo* interaction between cisplatin and topotecan in ovarian carcinoma systems. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 41, 385-390.

Sarr S.O., Perrotey S., Fall I., Ennahar S., Zhao M., Diop Y.M., Candolfi E., Marchioni E., 2011. *Icacina senegalensis* (Icacinaceae), traditionally used for the treatment of malaria, inhibits in vitro *Plasmodium falciparum* growth without host cell toxicity. *Malaria J.* 10, 85.

Scheinman D., 2004. Traditional Medicine in Tanga Today. Indigenous Knowledge: Local Pathways to Global Development; The World Bank.

Spessoto M.A., Ferreira D.S., Crotti A.E., Silva M.L., Cunha W.R., 2003. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine* 10, 606-609.

Stauch M.A., Tomaz M.A., Monteiro-Machado M., Ricardo H.D., Cons B.L., Fernandez F.F.A., El-Kik C.Z., Azevedo M.S., Melo P.A., 2013. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. *J. Ethnopharmacol.* 145, 50-58.

Stull G.W., Herrera F., Manchester S.R., Jaramillo C., Bruce H., 2012. The Phytocreneae (Icacinaceae) are a tribe of scrambling shrubs and lianas presently distributed in tropical Africa, Madagascar, and Indo-Malesia (Fruits of an "Old World" tribe Phytocreneae; Icacinaceae) from the Paleogene of North and South America. *Syst. Bot.* 37(3), 784-794.

Timothty O., Idu M., 2011. Preliminary phytochemistry and *in vitro* antimicrobial properties of aqueous and methanol extracts of *Icacina trichantha* Oliv. Leaf. *International Journal of Medicinal Aromatic Plants* 1,1-5.

Udeh N.E., Nwaehujor C.O., 2011. Antioxidant and hepatoprotective activities of ethyl acetate leaf extract of *Icacina trichantha* on paracetamol-induced liver damage in rats. *Continental J. Animal and Veterinary Research* 3, 11-15.

Vanhaelen M., Planchon C., Vanhaelen-Fastre R., On'Okoko P., 1986. Terpenic constituents from *Icacina senegalensis. J. Nat. Prod.*50, 312.

Vanhaelen M., On'Okoko P., Vanhaelen-Fastre R., Declercq J.P., Van Meerssche M., 1985. Icacenone, a furanoditerpene with a pimarane skeleton from *Icacina mannii*. *Phytochem.* 24,

2452-2453.

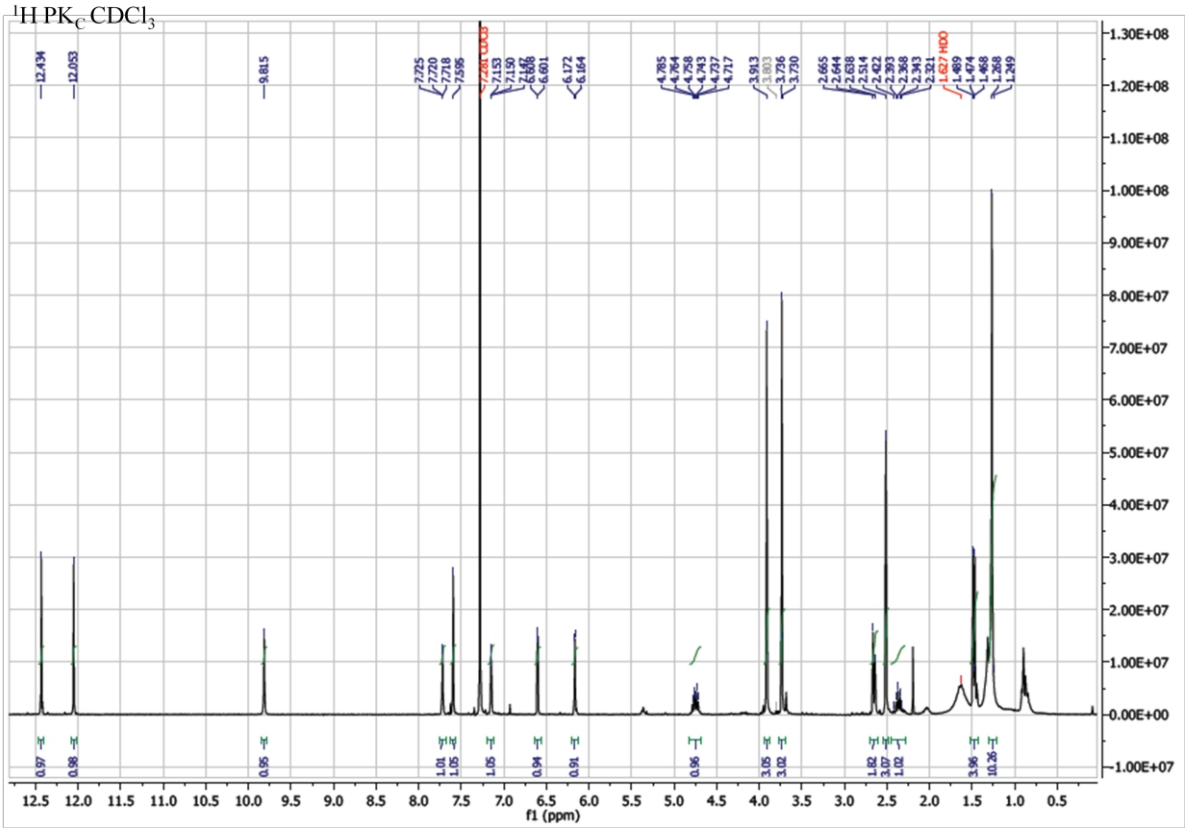
Vladu B., Woynarowski J.M., Manikumar G., Wani M.C., Wall M.E., Von Hoff D.D., Wadkins R.M., 2000. 7- and 10-substituted camptothecins : dependence of topoisomerase I-DNA cleavable complex formation and stability on the 7- and 10-substituents. *Mol. Pharmacol.* 57, 243-251.

Vo Van Chi, Tu dien Cay thuoc Viet Nam. 1999. Dicionary of Vietnamese medicinal Plants. Medical Publisher, 118.

Yamashita K., Lu H., Lu J., Chen G., Yokoyama T., Sagara Y., Manabe M., Kodama H., 2002. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta* 325, 91-96.

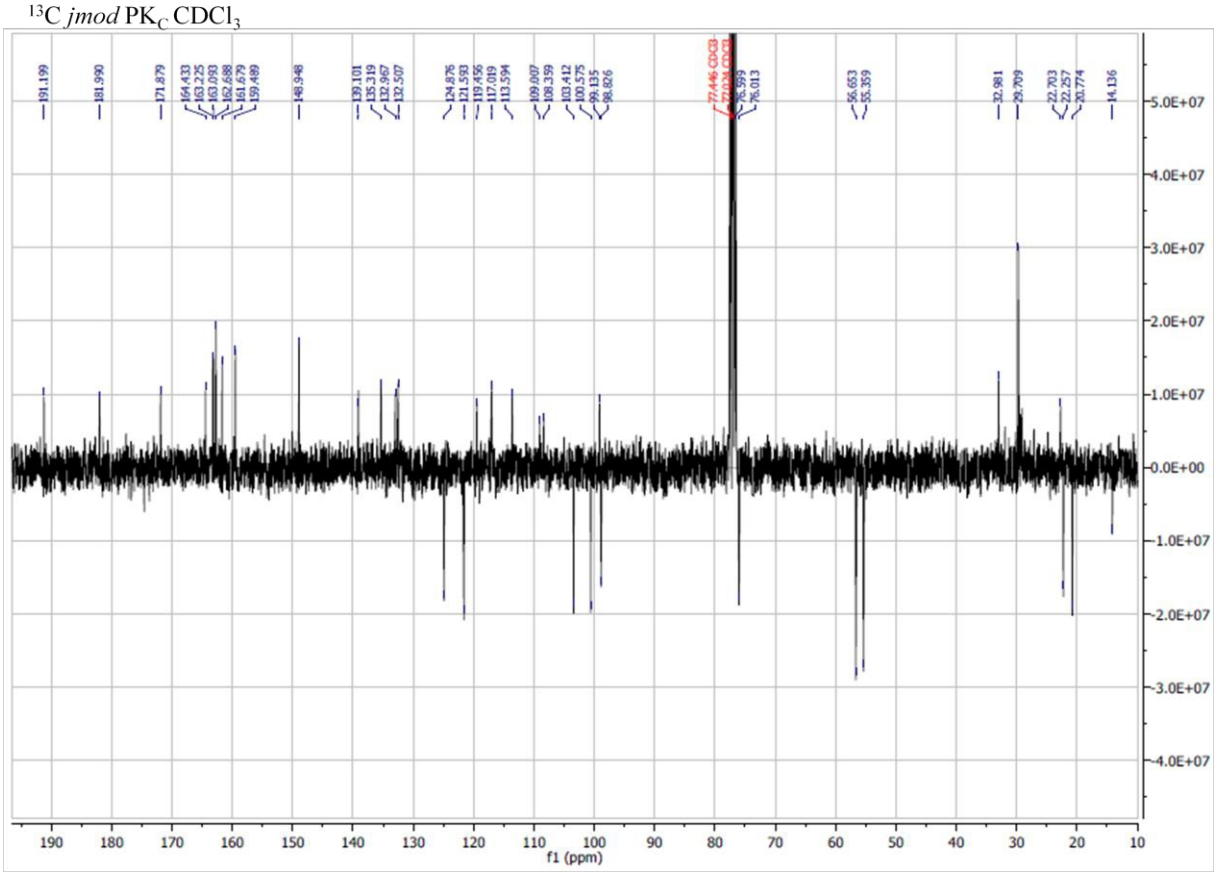
Annexes

Proton PKC

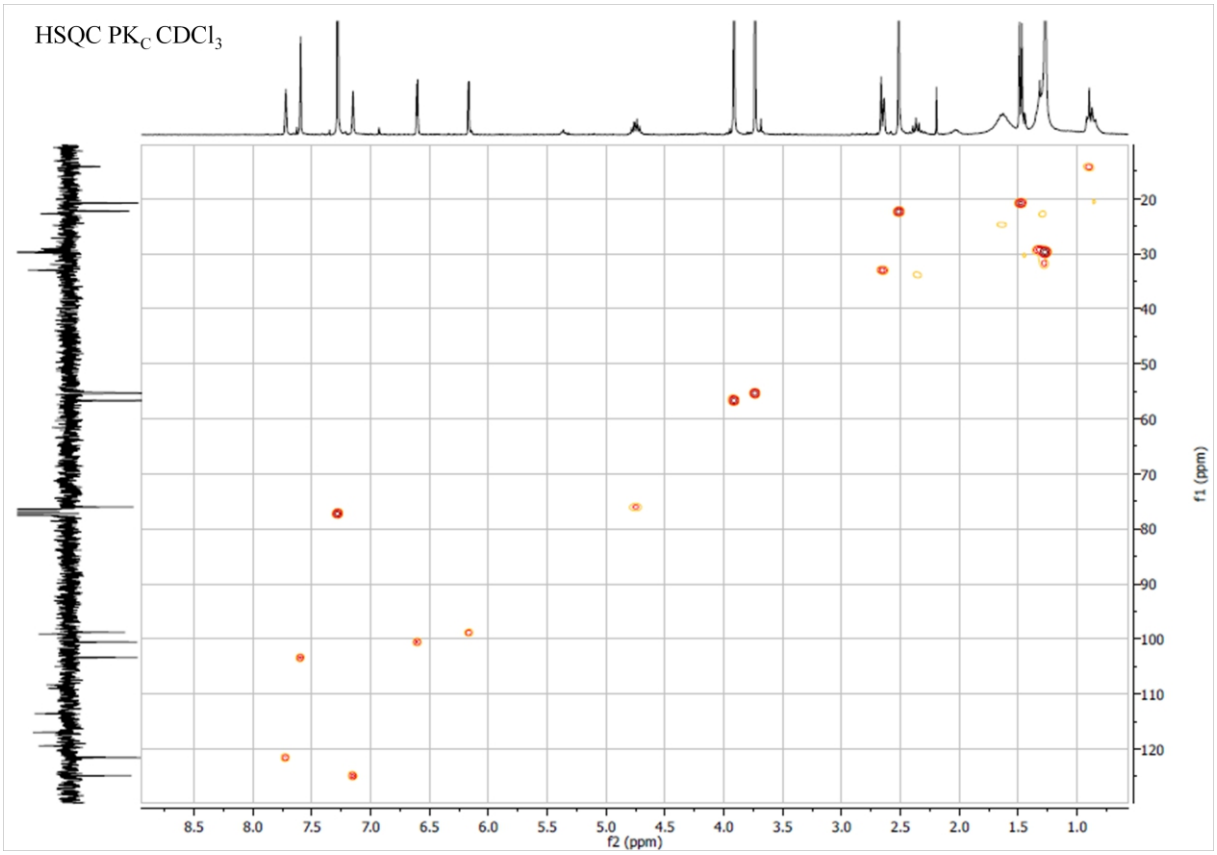


Jmod PKC

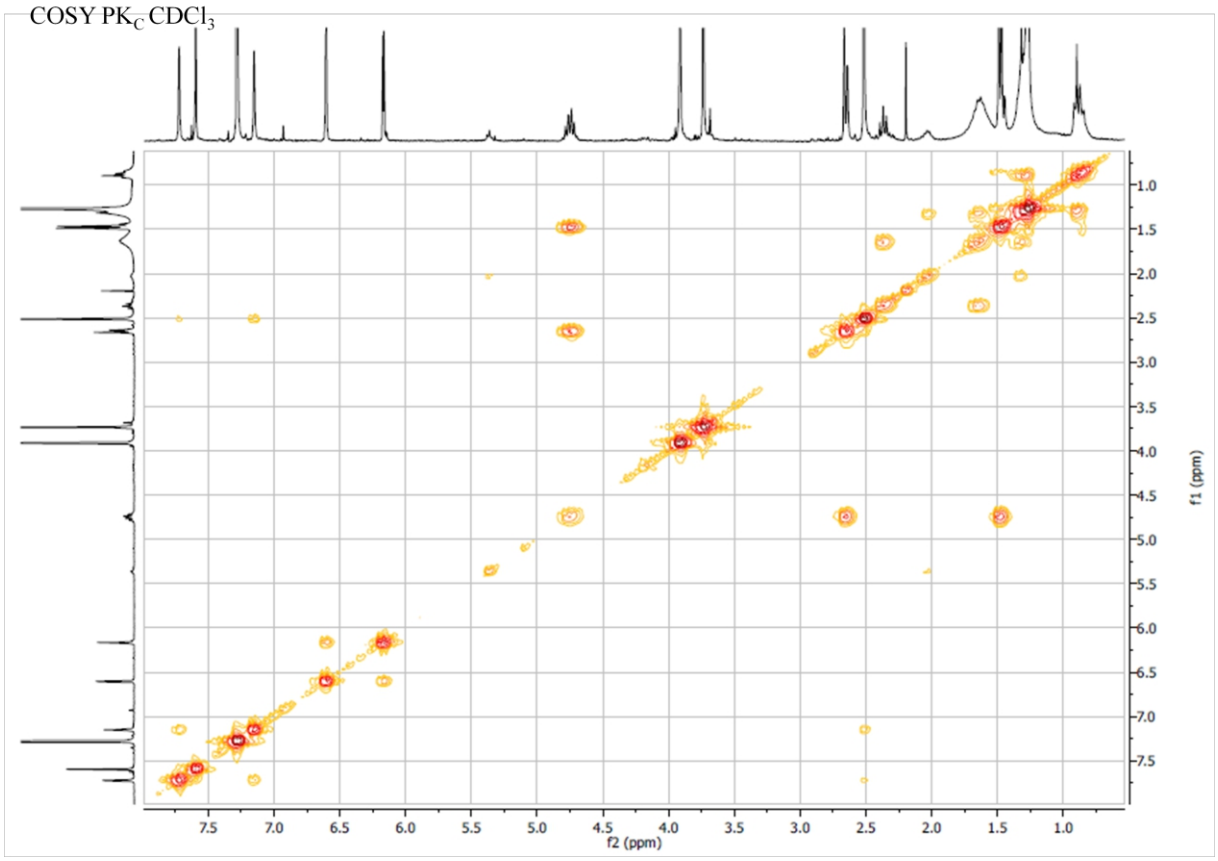
^{13}C *jmod* PK_C $CDCl_3$



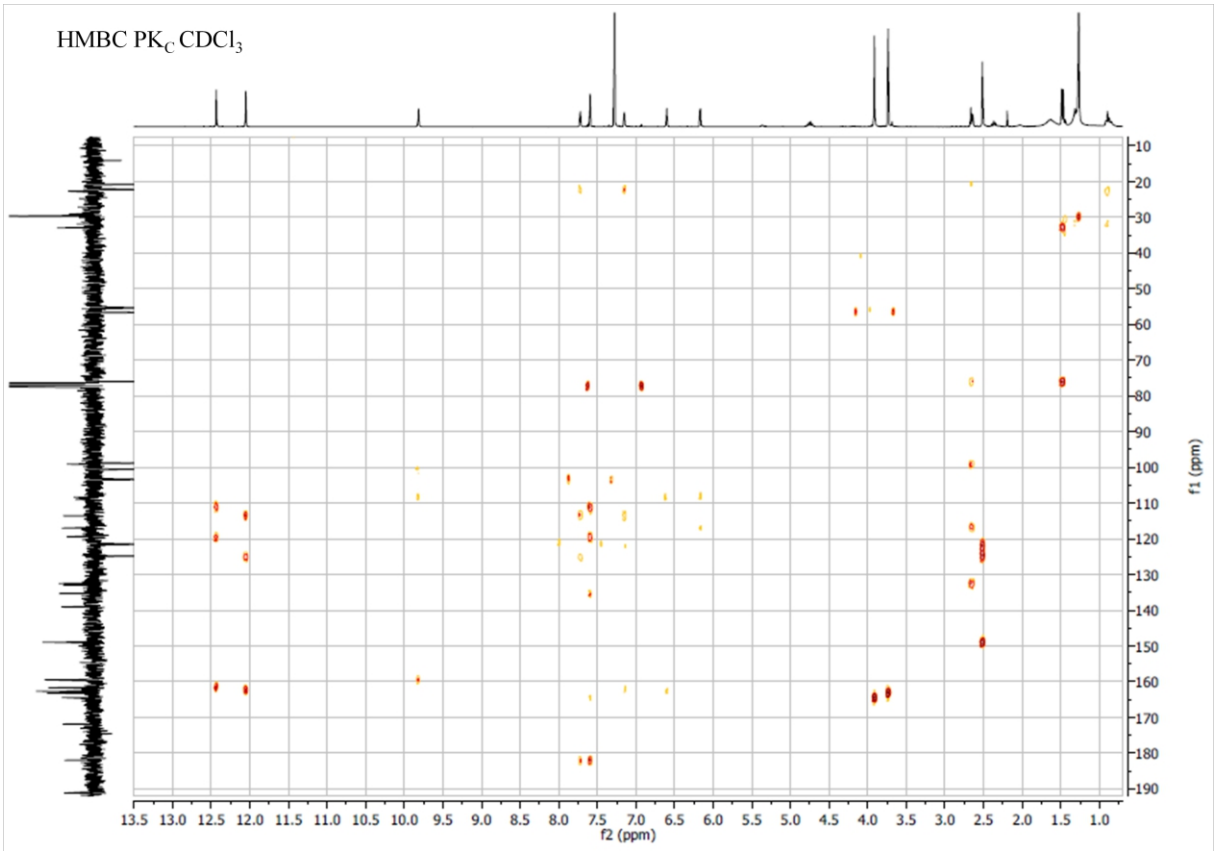
HSQC PKC



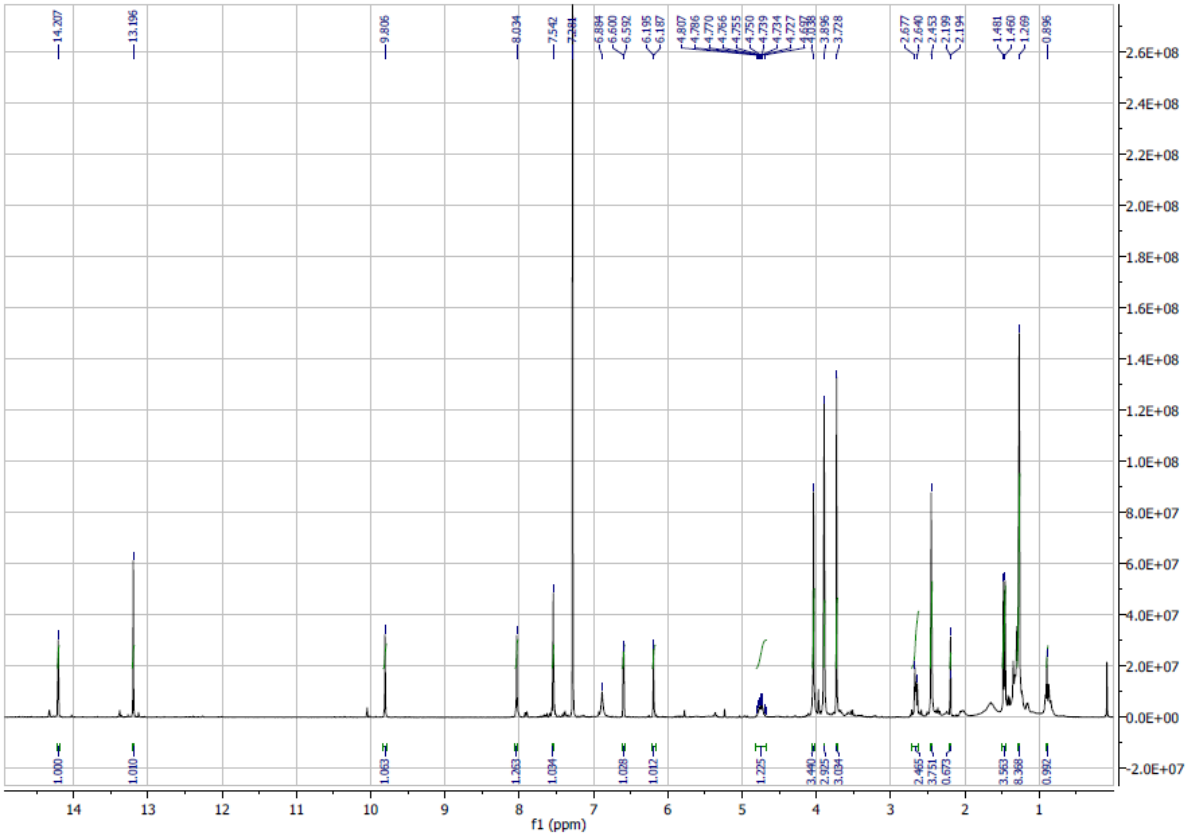
COSY PKC



HMBC PKC



Proton PK_D


14.207
13.196
9.806
8.034
7.542
7.281
6.884
6.600
6.592
6.195
6.187
4.807
4.786
4.770
4.766
4.755
4.750
4.739
4.734
4.727
3.896
3.728
2.677
2.640
2.453
2.199
2.194
1.481
1.460
1.269
0.896
1.000
1.010
1.063
1.263
1.094
1.028
1.012
1.225
3.440
2.925
3.094
2.465
3.751
0.673
3.563
8.368
0.992
f1 (ppm)

Chapitre 3:

Monadenium lugardiae

N.E. Brown.

I. LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE

I.1. Présentation

Les Euphorbiaceae constituent une grande famille de plantes à fleurs composée de cinq sous-familles, de 49 tribes, de 317 genres et d'environ 8 000 espèces présentes dans toutes les flores du globe. Selon la classification phylogénique, la famille est subdivisée en cinq sous-familles : les Acalyphoideae, les Crotonoideae, les Euphorbioideae, les Phyllanthoideae et les Oldfieldoiideae (Webster, 1975).

Les Euphorbiaceae sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, lianes, arbustes ou arbres dont certaines espèces sont succulentes ou cactiformes (Defelice, 1967).

Les feuilles sont généralement alternes et simples, souvent très réduites chez les espèces succulentes. Certains genres et espèces possèdent cependant des feuilles opposées et palmées (ex : les *Ricinus communis* et *Manihot esculenta*). Les fleurs sont très réduites sans périanthe, et disposées en racèmes, épis ou panicules cymeuses.

Les fruits tiennent une place importante dans la classification générique de la famille et se présentent généralement sous forme d'une capsule à parfois 2, rarement 4-30 loges contenant chacune une seule graine.

La majorité des études phytochimiques réalisées sur ces plantes expliquent leur intérêt nutritionnel, commercial et pharmacologique. Plusieurs genres de cette famille sont caracterisés par la présence dans leurs tissus de latex, de protéines et acides aminés, de terpènes et de caoutchouc. Certains de ces constituants majeurs comme le latex, contiennent des substances responsables de la toxicité et des propriétés pharmacologiques de ces plantes (protéases, glucosides, alcaloïdes, terpènes etc…) (Ponsinet et Ourisson, 1965).

Le genre *Euphorbia* dans la famille des Euphorbiaceae constitue un groupe numériquement très important avec environ 2 000 espèces connues (Jassbi, 2006), pour lequel nous nous concentrerons sur les activités pharmacologiques et la composition chimique. Les quelques études ont montré que ces plantes présentent des propriétés thérapeutiques prometteuses, mais aussi une toxicité (Hohmann et Molnár, 2004).

I.2. Intérêt nutritionnel, commercial et pharmacologique

Les Euphorbiaceae sont une ressource importante pour la médecine humaine, vétérinaire et pour l'agriculture (Mwine et Van Damme, 2011 ; Webster, 1994). Elles ont été fréquemment utilisées dans les pharmacopées traditionnelles dans de nombreuses régions, notamment dans le traitement des maladies gastrointestinales (Hernandez *et al.*, 2003). En Afrique, certaines espèces d'Euphorbiaceae sont utilisées comme anthelminthiques et hémostatiques (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962), comme purgatifs (Mampane *et al.*, 1987) et comme contraceptifs (List et Horhammer, 1979).

Les Euphorbiaceae sont également utilisées dans le traitement du paludisme (Spencer *et al.*, 1947), des rhumatismes, des réactions inflammatoires et dans le traitement de la syphilis (Chabra *et al.*, 1990).

Ces espèces ont démontré *in vivo* des propriétés cicatrisantes (Esmeraldino *et al.*, 2005) et anti-infammatoires (Mavar *et al.*, 2004).

L'*Euphorbia sudanica*, associée à des feuilles de *Nauclea latifolia* en décoction, est employée comme médicament de la lèpre et servirait aussi dans le traitement des pneumonies ; l'infusion prise avec du lait serait dépurative.

La majorité des Euphorbiaceae sont toxiques. Leur consommation provoque des vomissements, des nausées et des diarrhées. L'ingestion de fortes doses provoque des sensations de brûlures intenses dans la bouche, la gorge et l'estomac, une hypersyalorrhée, des convulsions et parfois le coma et la mort (watt & Breyer-Brandwuk, 1962).

Dans certaines régions d'Afrique, les arachides sont trempées dans du latex qui est très caustique avant de les semer, pour empêcher les singes et les chacals d'en manger (Berhaut, 1971).

Plusieurs espèces de la famille des Euphorbiaceae sont cultivées et utilisées par l'Homme pour diverses finalités. On peut citer certains exemples d'espèces très connues.

L'espèce *Manihot esculenta* Crantz (manioc, cassava), est l'une des plantes alimentaires les plus anciennement employées par l'Homme et est très connue de la majorité de la population des zones tropicales du globe.

La prodution mondiale de manioc en 2007 a été d'environ 228 millions de tonnes provenant de différents pays comme le Nigeria, le Brésil, l'Indonésie, la Thailande, le Zaire, le Ghana, l'Angola, la Tanzanie, le Mozambique, le Vietnam, l'Ouganda (Bruneton, 2009).

Le tubercule pelé, frais, renferme 35% d'amidon, 0,5-1,5 % de protéines et 0,3 % de lipides (Bruneton, 2009). Les tubercules riches en amidon sont la base alimentaire de nombreuses populations, plus particulièrement africaines. Le tubercule de la plante *Manihot esculenta* sert à la préparation de repas et il est également destiné à la préparation de farines, de chips et d'amidons bruts et transformés (tapiocas) (Bruneton, 2009).

Au Mozambique, les feuilles ‘‘matapa’’ ainsi que les tubercules ‘‘mudzumbula’’ de la même plante sont la base alimentaire de nombreuses familles, notamment dans la zone sud du pays.

Certaines varietés ou cultivars de *Manihot esculenta* sont toxiques, elles contiennent des hétérosides cyanogènes responsables de l'apparition de certains troubles neurologiques. La fréquence des goitres observée dans certaines régions d'Afrique serait dûe à l'activité antithyroïdienne des thiocyanates issus du métabolisme des cyanures. C'est pourquoi il est recommandé de consommer le tubercule après épluchage, hachage et torréfaction, ce qui diminue fortement la teneur en substances toxiques.

Deux autres plantes de la famille des Euphorbiaceae très connues de longue date au niveau mondial pour leur intérêt commercial sont l'*Havea brasiliensis* et le *Ricinus communis*. La plante *Havea brasiliensis* est cultivée pour la prodution de caoutchouc, un produit industriel.

Le *Ricinus communis* a été recherché pour ses propriétés laxatives, son huile est considérée comme un purgatif violent. L'huile de ricin obtenue à partir des graines est aussi un constituant majeur des graisses lubrifiantes des moteurs d'avion. L'espèce est également utilisée dans le secteur industriel, dans la fabrication du nylon (Bruneton, 2009).

Il existe d'autres usages commerciaux des Euphorbiaceae, avec la production de biodiesel notamment à partir d'*Euphorbia tirucalli* (Duke, 1983 ; Van Damme, 2001), *Euphorbia lathyris* (Duke, 1983), *Jatropha curcas* (Achten *et al.*, 2008 ; de Oliveira *et al.*, 2009 ; Kaushik *et al.*, 2007 ; Kumar et Sharma, 2005), *Manihot esculenta* (Adeniyi *et al.*, 2007), *Ricinus communis* (Benavides *et al.*, 2007 ; Meneghetti *et al.*, 2007).

Dans la médecine traditionnelle, *Ricinus communis* est utilisé pour traiter le diabète. L'huile de ricin fut utilisée dans la médecine égyptienne classique et grecque dès le VIème siècle avant Jésus-Christ (Olsnes *et al.*, 1976). Les résultats d'une étude biologique réalisée par Dhar *et al*. (1968) sur l'extrait éthanolique à 50% de racines, de tiges et de feuilles de *Ricinus communis*, a montré une activité hypoglycémique chez des animaux sains et une activité antihyperglycémique chez des animaux diabétiques.

Dans la médecine Indienne, les feuilles, les racines et l'huile des graines de cette plante étaient utilisées pour soigner les pathologies inflammatoires et les troubles hépatiques (Rao *et al.*, 2010).

Dans la médecine traditionnelle ayurvédique, les Euphorbiaceae, *Croton tiglium* Willd. et *Croton oblongifolius* étaient utilisées dans le traitement de nombreuses affections telles que les troubles hépatiques, les rhumatismes, l'asthme, les tumeurs, les morsures de serpent et comme purgatif (Kapoor, 1989).

Hooper (2002) a également rapporté l'usage d'*Euphorbia polycarpa, Euphorbia hirta* et *Acalypha indica* en médecine ayurvédique.

Dans l'ancienne médecine chinoise, Lai *et al* (2004) ont dénombré 33 espèces dans les 17 genres des Euphorbiaceae, utilisées en phytothérapie.

D'autres études similaires ont rapporté l'utilisation de diverses Euphorbiaceae dans le système ancien de médecineYucatane ; l'*Euphorbia ptercineura* dans le traitement de l'asthme et de la toux, le *Croton peraeruginosus* dans le traitement des éruptions cutanées et le *Phyllanthus micrandrus* Mür. Arg. dans le traitement des plaies, inflammations et infections (Ankli *et al.*, 1999).

L'*Euphorbia tirucalli* est connue pour ses propriétés médicinales contre les verrues, certains cancers, la gonorrhée, les arthrites, l'asthme, la toux, les névralgies, les rhumatismes, les parodontopathies (Cataluna and Rates, 1999 ; Duke, 1983 ; Van Damme, 1989). L'*Euphorbia*

thymifolia est utilisée comme antivirale contre le virus Herpes simplex de type 2 (Gupta *et al.*, 2007).

Des études biologiques réalisées sur l'extrait méthanolique d'*Euphorbia fusiformis* ont montré une activité contre la bactérie *S. aureus* (Natarajan *et al.*, 2005).

Les fractions de l'extrait dans l'alcool isopropylique des feuilles d'*Euphorbia caracasana* a montré également une activité contre *S. aureus* (Rojas *et al.*, 2008). D'autres études similaires sur des extraits méthanoliques d'*E. hirta* et *E. tirucalli* ont montré une activité contre *S. epidermidis* (Parekh *et al.*, 2005).

I.3. La chimie des Euphorbiaceae

Un grand nombre d'espèces de la famille des Euphorbiaceae sont dangereuses. Certaines sont urticantes (*Caperonia*, *Dalechampia*, *Platygyna*, *Tragia*…), d'autres sont très toxiques, majoritairement des Crotonoideae (*Aleurites*, *Croton*) et surtout des Euphorbioideae (*Euphorbia*, *Excoecaria*, *Hippomane*, *Hura*, *Jatropha*, *Sapium*…). Chez tous ces espèces, la toxicité est liée à la présence d'esters diterpéniques de structure complexe (tiglianes, daphnanes, ingénanes) (Figure 62) (Bruneton, 2005). Selon Evans et Taylor (1983), ces diterpénoïdes sont responsables des irritations cutanées et des muqueuses, et de l'induction de tumeurs. Leur toxicité par voie orale est importante chez les animaux, et aussi chez l'Homme (Bruneton, 2009). Dans le monde végétal, ces classes de composés présentent une distribution restreinte à deux familles, les Euphorbiaceae et les Thymelæaceae.

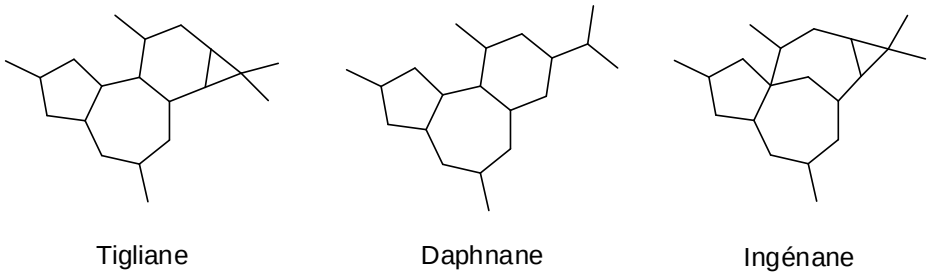


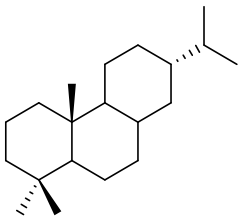
Figure 62. Structure de base des esters diterpéniques présents chez les Euphorbiaceae

Une revue de la composition chimique des Euphorbiaceae indique que plus de 400 diterpénoïdes de plus de 23 squelettes ont été isolés. Les diterpènes toxiques sont présents dans 14 des 300 genres que compte la famille des Euphorbiaceae : *Aleurites, Croton, Excoecaria, Euphorbia, Hippomane, Hura, Jatropha, Sapium*, etc.

D'autres Euphorbiaceae doivent leur toxicité à des lectines (ricin) ou à des hétérosides générateurs d'acide cyanhydrique (manioc) (Bruneton, 2005).

Différentes études réalisées sur les espèces du genre *Euphorbia*, ont constaté leur forte teneur en composés diterpénoïdes, triterpénoïdes tétracycliques, triterpénoïdes pentacycliques, composés phénoliques dont les flavonoïdes, esters aromatiques, huile essentielle, stéroïdes, cérébrosides, et glycérols (Ahmad *et al.*, 2002a, 2002b, 2005 ; Feizbakhsh *et al.*, 2004 ; Shi *et al.*, 2008).

Les composés systématiquement retrouvés dans les espèces du genre *Euphorbia* et les plus pertinents du point de vue de la toxicité et de l'activité biologique, sont les diterpènes et plus précisément les dérivés de l'abiétane, du tigliane et de l'ingénane (Shi *et al.*, 2008) (Figure 63). Les diterpènes lactoniques de structure abiétane ont démontré une activité anticancéreuse (Duarte *et al.*, 2008).



Abiétane

Figure 63. Structure de l'abiétane.

La composition chimique des Euphorbiaceae est variable et complexe. Ces constituants sont responsables des propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment la présence de :

- diterpènes : reconnus pour leurs effets anti-tumoraux (Duarte *et al.*, 2008 ; Konoshima *et al.*, 2001 ; Krebs *et al.*, 2004), antibactériens (El-Bassuony, 2007 ; Li *et al.*, 2008 ; Mathabe *et al.*, 2008), antifongiques (Salah *et al.*, 2003), anti-plasmodiques (Attioua *et al.*, 2007) et anti-ulcéreux (Hiruma-Lima *et al.*, 2002).

- triterpènes : aux propriétés anti-infammatoires (Canelon *et al.*, 2008) et analgésiques (Nkeh *et al.*, 2003).

- flavonoïdes : responsables des activités anti-malariques (Liu *et al.*, 2007) et anti-inflammatoires (Ekpo et Pretorius, 2007).

- alcaloïdes : qui possèdent des propriétés anti-microbiennes (Dias *et al.*, 2007 ; Gressler *et al.*, 2008) et anti-tumorales (Suarez *et al.*, 2004).

- saponosides : porteurs d'activités cytotoxiques (Kiem *et al.*, 2009) et anti-ulcéreuses (Ukwe, 1997).

- tanins : avec des propriétés anti-virales (Bessong *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 1999), anti-mutagéniques (Rossi *et al.*, 2003) et anti-fongiques (Hwang *et al.*, 2001).

- composés phénoliques : aux propriétés anti-tumorales (Yu *et al.*, 2005) et anti-oxydantes (Yang *et al.*, 2007).

Nous allons maintenant présenter la structure de divers composés diterpéniques retrouvés dans de nombreuses espèces de la famille des Euphorbiaceae. Nous commencerons par décrire les helioscopinolides et jolkinolides. Ces diterpènes sont caractérisés par la présence dans leur structure d'un noyau γ-lactone-α,β-insaturé (Uemura *et al.*, 1976).

1.3.1. Diterpénoïdes de structure abiétane

- E. calyptrata, E. pubescens, E. semiperfoliata, E. helioscopia et E. characias.

Des composés diterpénoïdes du type abiétane tels que l'helioscopinolide F, l'helioscopinolide B, l'helioscopinolide I (Crespi-Perellino *et al.*, 1996), l'helioscopinolide D et l'helioscopinolide E (Borghi *et al.*, 2004), ont été isolés d'*Euphorbia calyptrata*. L'helioscopinolide A et l'helioscopinolide B ont également été isolés d'autres espèces du même genre : *E. pubescens, E. semiperfoliata, E. helioscopia* et *E. characias* (Valente *et al.*, 2004 ; Appendino *et al.*, 1998 ; Shizuri *et al.*, 1983 ; Appendino *et al.*, 2000) (Figure 64).

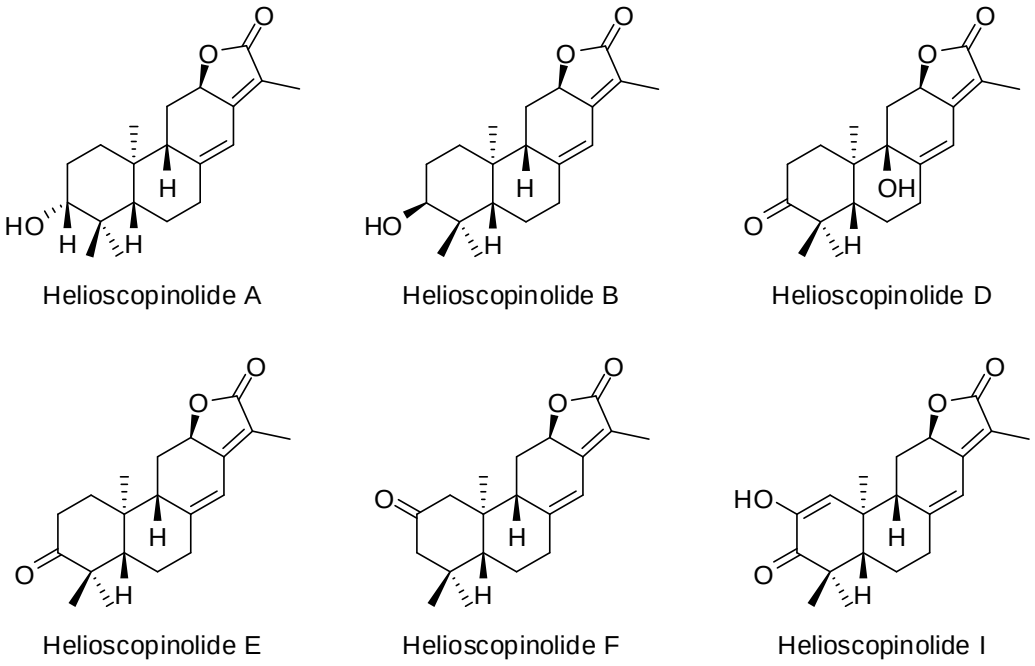


Figure 64. Structure d'helioscopinolides isolés d'espèces du genre *Euphorbia.*

- E. fischeriana, E. fijiana, E. sessiliflora, E. guyoniana et E. portulacoides.

Des composés abiétanes ont été identifiés de différentes espèces du genre *Euphorbia*, notamment le jolkinolide A et le jolkinolide B (Pan *et al.*, 2004), le 17-hydroxyjolkinolide B et le 17-acétoxyjolkinolide B (Wang *et al.*, 2006), le 17-acétoxyjolkinolide A et le 17-hydroxyjolkinolide A (Che *et al.*, 1999), isolés d'*E. fischeriana*.

Le composé 17-hydroxyjolkinolide A a été également isolé d'*E. fijiana* (Lal *et al.*, 1990), le jolkinolide B isolé d'*E. sessiliflora* (Sutthivaiyakit *et al.*, 2000) et le jolkinolide A a été identifié dans les espèces *E. fijiana et E. guyoniana* (Lal *et al.*, 1990 ; Haba *et al.*, 2007).

Les composés 11,16-époxy-*ent*-abieta-8,11,15-trien-13-14-dione et le 11-hydroxy-*ent*-abieta-8,11,13-trien-15-one ont été isolés d'*E. guyoniana* (Haba *et al.*, 2007). Le 8β,11β-dihydroxy-12-oxo-*ent*-abieta-13,15(17)-dien-16-oate de méthyle a été isolé d'*E. portulacoides* (Morgenstern *et al.*, 1996) (Figure 65).

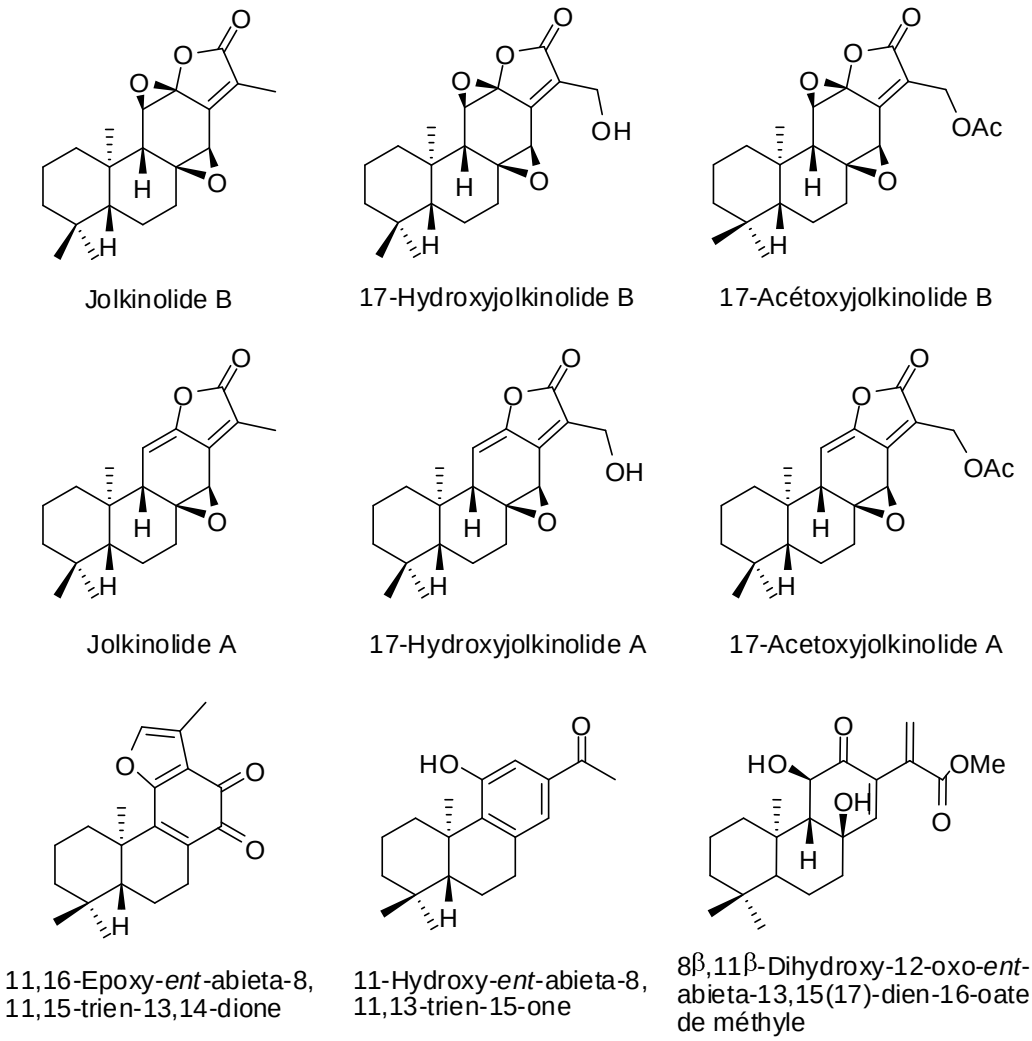


Figure 65. Structure de quelques abiétanes du genre *Euphorbia.*

- E. retusa

Une autre étude réalisée par Haba *et al* (2009) sur l'extrait dichlorométhanique des racines de *E. retusa*, a permis d'identifier six composés diterpénoïdes de squelette abiétane lactonique : le rétusolide A, le rétusolide B, le rétusolide C, le rétusolide D, le rétusolide E et le rétusolide F (Figure 66).

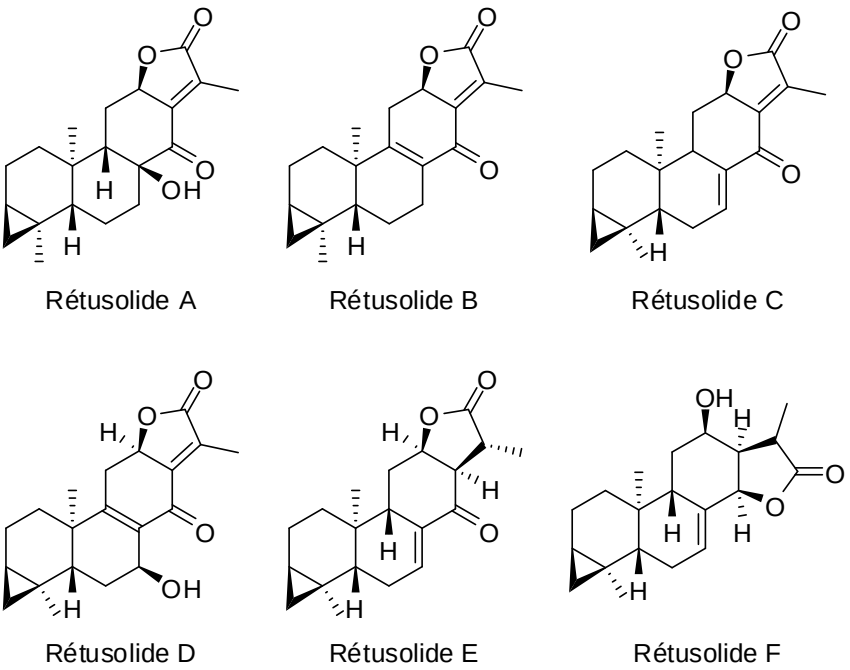


Figure 66. Structure de diterpénoïdes abiétanes isolés d'*Euphorbia retusa.*

1.3.2. diterpénoïdes de structure ingénane

- *E. kansui* et *E. iberica*

D'autres composés diterpénoïdes du type ingénane ont été isolés du genre *Euphorbia* : l'ingenol, le 3,5,20-*O*-triacétylingenol, isolés de *E. kansui* (Shi *et al.*, 2008), le 20-eicosanoate d'ingenol isolé de *E. iberica* (Oksuz *et al.*, 1999) et le tétracétate de 17-hydroxyingenol (Connoly *et al.*, 1984). Des études ont montré que ces diperpénoïdes sont responsables d'activités antinématodes et termiticides (Shi *et al.*, 2008a,b) (Figure 67).

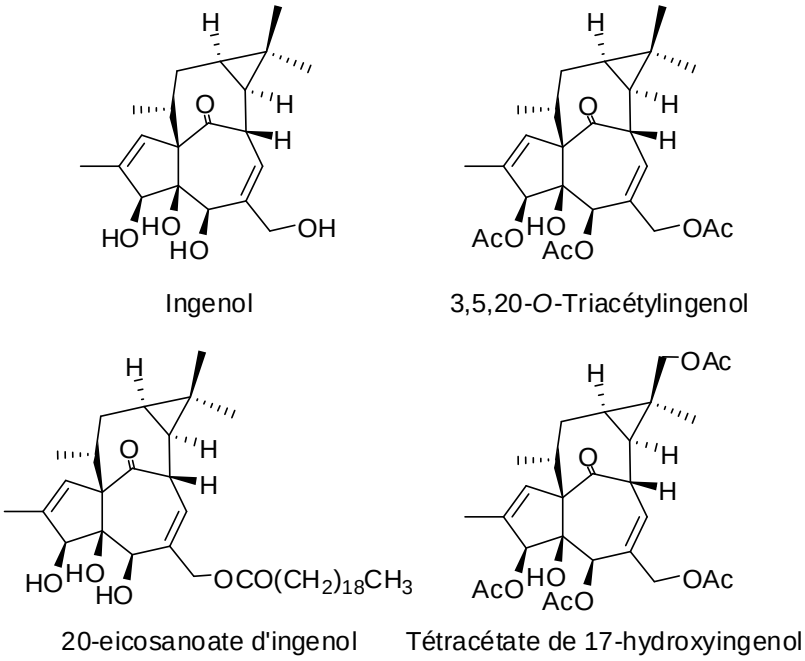


Figure 67. Quelques diterpénoïdes ingénanes isolés de *E. kansui* et *E. iberica*

1.3.3. Diterpénoïdes de structure tigliane

- E. fischeriana, E. pithyusa sp et E. broteri

Des composés diterpénoïdes macrocycliques du type tigliane se retrouvent dans les différents organes du genre *Euphorbia* : grain, racine, latex et écorces. Ces composés font partie des constituants responsables des propriétés urticantes, proinflammatoires et inductrices de tumeur (Betancur *et al.*, 2003; Ott et Hecker, 1981 ; Wu *et al.*, 1994).

Quelques diterpénoïdes du type tigliane, ont été isolés de différentes espèces du genre *Euphorbia*, tels que la prostratine (13-acetoxy-12-désoxyphorbol) isolée d'*E. fischeriana* (Liu *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2006) et ses analogues isolés d'*E. pithyusa subsp* (Wu *et al.*, 1992) et d'*Euphorbia broteri* (Urones *et al.*, 1988) (Figure 68).

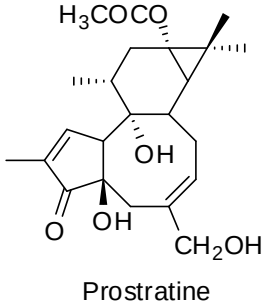
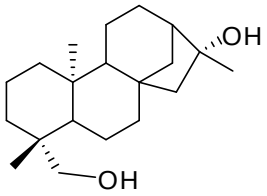


Figure 68. Diterpénoïde de type tigliane isolé du genre *Euphorbia.*

1.3.4. Diterpénoïdes de structure ent-kaurane

- E. hirta

Dans l'extrait éthanolique d'*Euphorbia hirta*, trois composés diterpénoïdes de type *ent*-kaurane ont été isolés, dont le 16α,19-dihydroxy-*ent*-kaurane ou kaurane-16,18-diol (Yan *et al.*, 2011) (Figure 69).



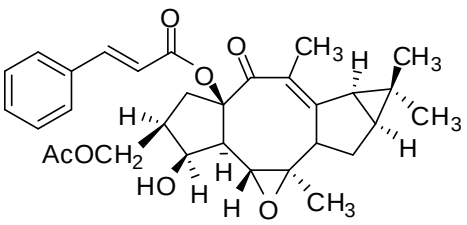
16α,19-Dihydroxy-*ent*-kaurane

Figure 69. Diterpénoïde *ent*-kaurane de *Euphorbia hirta*.

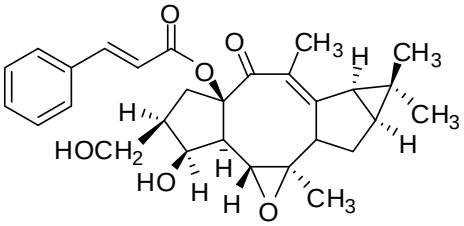
1.3.5. Diterpénoïdes de structure lathyrane

- Euphorbia lagascae

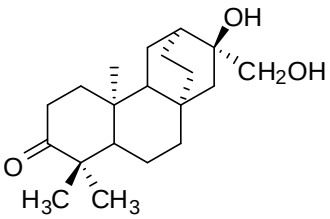
Une autre étude réalisée par Duarte *et al* (2006) sur l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*Euphorbia lagascae*, a permis l'identification des latilagascene A et B, l'*ent*-16α,17-dihydroxyatisan-3-one et l'*ent*-16α,17-dihydroxykauran-3-one (Figure 70).



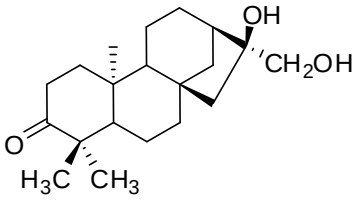
Latilagascene A



Latilagascene B



ent-16α,17-dihydroxyatisan-3-one



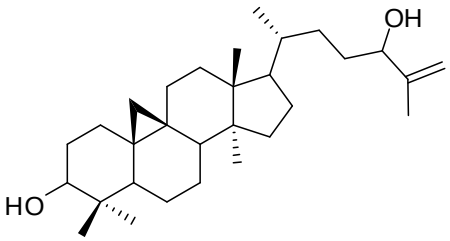
ent-16α,17-dihydroxykauran-3-one

Figure 70. Structure des composés diterpéniques lathyranes.

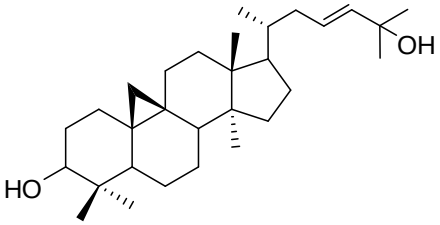
1.3.6. Les triterpénoïdes

- Euphorbia schimperi

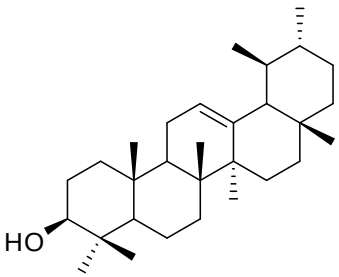
Trois composés triterpénoïdes, cycloart-25-ene-3β,24-diol, cycloart-23-ene-3β,25-diol ou (+)-sterculine A, et α-amyrine ont été isolés pour la première fois par Abdel-Monem *et al.* (2008), à partir des fractions chloroformiques d'extraits alcooliques de parties aériennes d'*Euphorbia schimperi* C. Presl (Figure 71).



cycloart-25-en-3β,24-diol



cycloart-23-en-3β,25-diol



α-amyrine

Figure 71. Triterpénoïdes isolés d' *Euphorbia schimperi.*

- Andrachne aspera

Andrachne aspera Spreng présente dans sa composition des stérols, stigmasterol et β-sitosterol, et des triterpènes, tels que l'acétate de lupeol, le lupeol, l'α-amyrine, la β-amyrine, l'α-taraxerol, l'acide oleanolique et le germanicol (Kamal, 2001) (Figure 72).

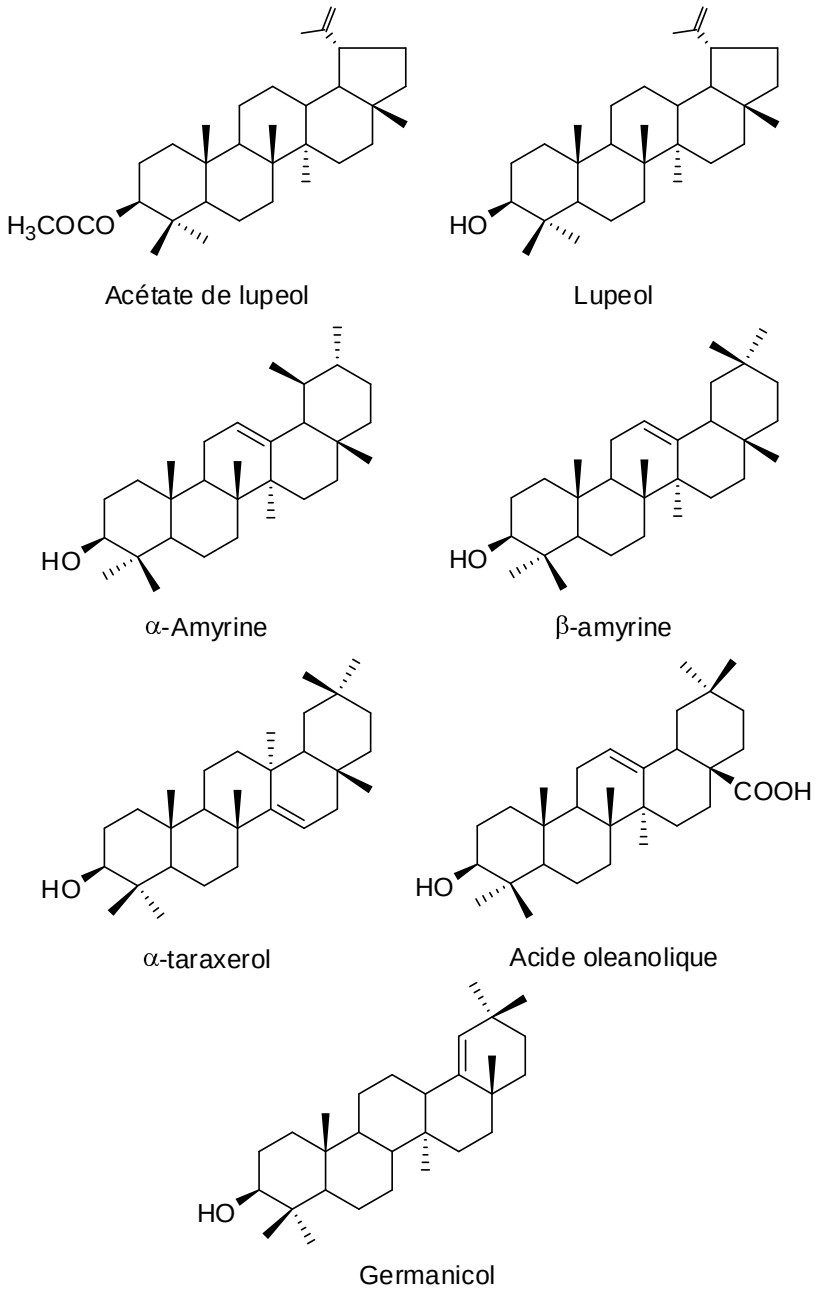


Figure 72. Terpènes de *Andrachne aspera* (Euphorbiaceae).

II. LE GENRE MONADENIUM ET L'ESPECE *Monadenium lugardiae*

II.1. Présentation

Le genre *Monadenium* qui comprend environ 70 espèces sur le continent africain, a toujours été maintenu séparé du genre *Euphorbia,* mais des analyses moléculaires et phylogénétiques récentes menées sur le genre *Euphorbia largo sensu,* ont mis en évidence une plus grande proximité entre les *Monadenium* et certaines *Euphorbia*, et ont montré que *Monadenium* était imbriqué dans *Euphorbia*. Alors, le genre *Monadenium* est devenu une simple section du sous-genre dans un méga-genre *Euphorbia* (Bruyns *et al.*, 2006 ; Schmelzer, 2008).

II.2. Classification



Figure 73. Photo *Monadenium lugardiae*

Position de *Monadenium lugardiae* dans la systématique (INPI).

Domaine : Eucariote

Regne : Plantae

Sousregne : Tracheobionta

Embranchement : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Malpighiales

Famille : Euphorbiaceae

Sous famille : Euphorbioideae

Tribe : Euphorbieae

Sous tribe : Euphorbiinae

Genre: *Monadenium*

Espèce: *Monadenium lugardiae* N.E.Br.

Synonyme : *Euphorbia lugardiae* (N.E.Br.) Bruyns

II.3. Description botanique

Monadenium lugardiae est un petit arbuste succulent, monoïque de 20 à 60 cm de haut, aux branches qui sont dès la base, érigées ou légèrement retombantes.

Les tiges sont cylindriques et charnues, atteignant 3 cm de diamètre. Les feuilles sont vertes charnues et oblongues de 9 cm de long sur 4 cm de large, finement pubescentes, subsessiles et disposées en spirale et groupées vers l'apex de la tige.

Les fleurs sont vert jaunâtre en cyme, à pédoncule de 5-8 cm de long et rameaux de 2-4 mm de long. Les fleurs sont unisexuées : les fleurs mâles sont sessiles à bractéoles d'environ 2,5 mm de long, frangées, Les fleurs femelles sont à pédicelle atteignant 8 mm chez le fruit.

Les fruits sont capsulaires à trois lobes d'environ 6 mm x 6 mm. Les graines sont oblongues, d'environ 3,5 mm x 1,5 mm. Elles sont finement rugueuses et de couleur gris brunâtre pâle (Schmelzer, 2008).

Habitat : L'espèce *Monadenium lugardiae* est présente sur les affleurements rocheux granitiques et sur les sols sableux dans les savanes arborées et dans les forêts claircemées à 100-1100 m d'altitude (Schmelzer, 2008).

Répartition : L'espèce *Monadenium lugardiae est* rencontrée au Mozambique, Zimbabwe, Malawi, Botswana, en Zambie et en Afrique du Sud.

II.4. Revue de la littérature sur des activites biologiques de *Monadenium lugardiae*

Au Mozambique, les tiges de cette espèce végétale sont utilisées pour traiter les maux d'estomac et comme purgatif, selon les tradipraticiens.

Monadenium lugardiae est utilisée sous forme d'extraits dans la pharmacopée traditionnelle d'Afrique centrale et du sud, comme purgatif, émétique, poison et anesthésique. La plante est également utilisée dans le traitement des maladies telles que les rhumatismes, la gonorrhée (Gundidza, 1989).

L'espèce *Monadenium lugardiae* a été largement employée en médecine traditionnelle dans la région de Piet Rief de l'est Transvaal. La consommation des racines de cette plante était révendiquée par les divins locaux comme provoquant des visions et permettant de prophétiser sous son influence. La racine quand elle est consommée en quantités suffisantes, produit des hallucinations et un délire (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962 ; Watt, 1967).

En Afrique du sud, également les cendres de la plante sont utilisées pour traiter les douleurs rhumatismales. Au Zimbabwe et en Afrique du Sud, quelques gouttes du latex des tiges ou racines de la plante sont mélangées dans la bouillie ou du lait pour soigner l'ascite, les maux d'estomac, les douleurs thoraciques, les maux de tête, la rougeole, la pneumonie, l'asthme et le latex est également utilisé à des fins abortives. Le jus de *Monadenium lugardiae* en

association avec *Portulaca quadrifida* L. entre également dans le traitement de la gonorrhée (Schmelzer, 2008).

II.5. La chimie de *Monadenium lugardiae*

Peu d'études phytochimiques ont été effectuées sur cette espèce végétale. Un criblage phytochimique de la plante a été réalisé montrant la présence d'alcaloïdes, d'anthranoïdes, de polyphénols et de cardénolides (Gundidza, 1985). Néanmoins, les composés actifs de ces classes de métabolites n'ont pas été isolés jusqu'à présent.

III. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *Monadenium lugardiae* REALISEE AU LABORATOIRE

L'analyse bibliographique a mis en évidence plusieurs usages dans la pharmacopée traditionnelle de l'espèce *Monadenium lugardiae* (N.E.Br.). Malgré ses propriétés intéressantes, aucune étude phytochimique n'a été réalisée à ce jour.

Il nous est donc apparu pertinent de réaliser ce travail afin d'isoler les principaux constituants phytochimiques de la tige de *M. lugardiae* pour identifier les métabolites potentiellement porteurs d'activité pharmacologique en lien avec les usages des tradipraticiens.

III.1. Extraction des tiges de *Monadenium lugardiae*

Les tiges de *Monadenium lugardiae* (N.E.Br.), appelée également *Euphorbia lugardiae* Bruyns, ont été broyées puis extraites par contacts multiples avec du méthanol dans un appareil de Soxhlet.

Le méthanol a été choisi pour son pouvoir d'extraction élevé. L'extrait brut méthanolique obtenu (129 g) est ensuite fractionné par extraction liquide/liquide en utilisant des solvants de polarité croissante : cyclohexane puis chloroforme et acétate d'éthyle. Quatre extraits ont été ainsi obtenus :

- Un extrait cyclohexanique, contenant les cires, des pigments lipophiles et des graisses résiduelles (30,4 g) soit un rendement de 23,5 %;
- Un extrait chloroformique (19 g), contenant la majeure partie des métabolites apolaires et de polarité intermédiaire soit un rendement de 14,7 % ;
- Un extrait acétate d'éthyle (1,6 g), contenant les composés de polarité plus élevée soit un rendement de 1,2 % ;
- Le résidu méthanolique, contenant les composés les plus polaires (78 g) soit un rendement de 60,5 %.

Le protocole d'extraction est récapitulé dans la figure ci-après.

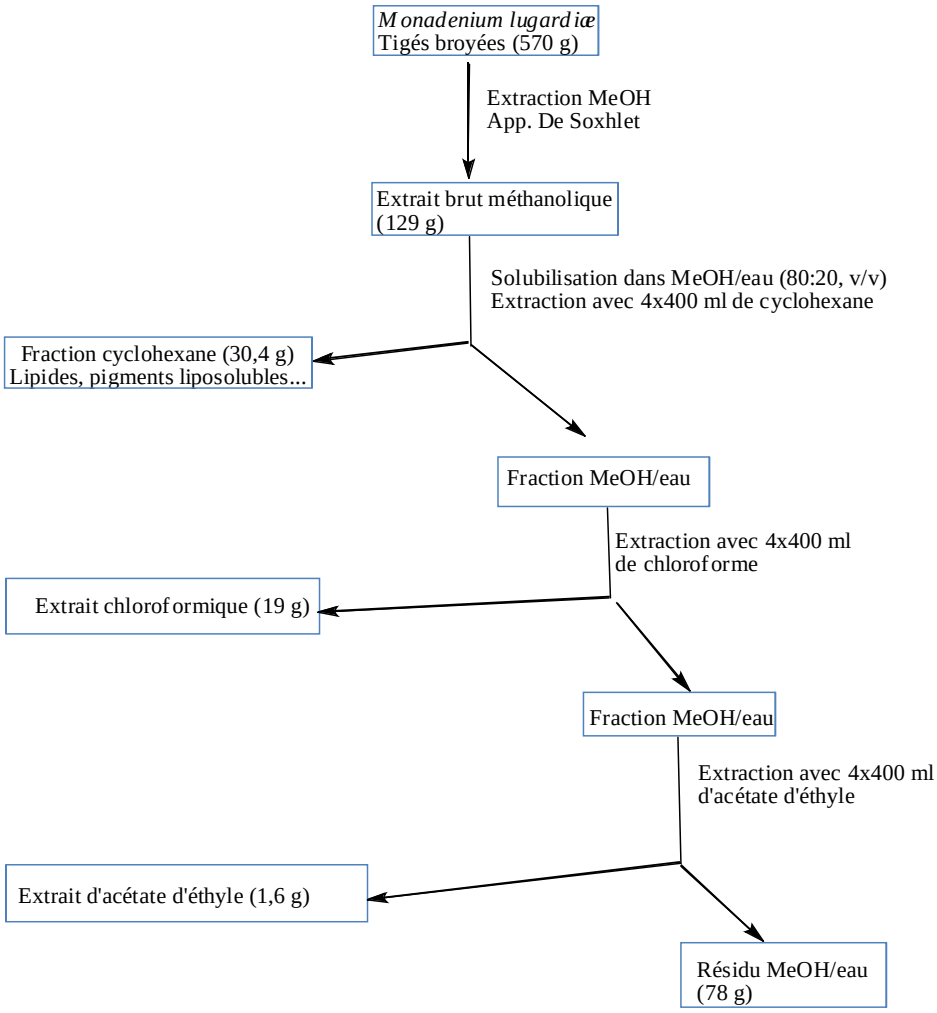


Figure 74: Protocole d'extration utilisé pour la préparation des extraits.

Nous avons alors procédé au fractionnement et à la purification des analytes contenus dans l'extrait chloroformique.

III.2. Fractionnement de l'extrait chloroformique et isolement des métabolites

La fraction chloroformique obtenue (19 g) a subi un premier fractionnement par chromatographie sur colonne ouverte de silice en utilisant un gradient de polarité croissante de dichlorométhane et méthanol pour donner 3 fractions F_1 (10 g), F_2 (3 g) et F_3 (0,5 g).

Pour faciliter l'accès aux composés purs, nous avons choisi de réaliser une purification par chromatographie Flash. L'intérêt de cette technique chromatographique est de diminuer le temps de purification et d'obtenir une meilleure séparation des produits.

III.2.1. Fractionnement de la fraction F_1 par chromatographie Flash

L'analyse en CCM (UV 365 nm, éluant cyclohexane /AcOEt (50 :50, v/v)) de la fraction F_1 a indiqué que cette fraction contient principalement 3 composés majoritaires de Rf 0,51, 0,6 et 0,67. La fraction F_1 a donc été fractionnée par flash chromatographie sur colonne de silice éluée avec un gradient de polarité croissante obtenu par mélange de cyclohexane-acétate

d'éthyle pour donner 4 sous-fractions $F_{1.1}$ (3 mg), $F_{1.2}$ (309 mg), $F_{1.3}$ (534 mg) et $F_{1.4}$ (623 mg). Ces fractions ont à leur tour été purifiées par chromatographie Flash pour accéder aux métabolites principaux.

III.2.2. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.2}$ par chromatographie Flash

La sous-fraction $F_{1.2}$ a été purifiée sur colonne flash en gradient de polarité croissante de dichlorométhane et méthanol. Le composé **MLb** (25,5 mg) a ainsi été isolé avec une pureté CLHP de 97 %.

III.2.3. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.3}$ par chromatographie Flash

Cette fraction est été soumise à une chromatographie Flash réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment. Nous avons ainsi pu accéder aux composés majoritaires : un obtenu pur dans la fraction $F_{1.3.1}$ (**MLc** 3,7 mg) et deux sous-fractions contenant 2 métabolites en mélange $F_{1.3.2}$ (50 mg) et $F_{1.3.3}$ (34 mg).

Les fractions $F_{1.3.2}$ (50 mg) et $F_{1.3.3}$ (34 mg) étant obtenues en quantité suffisante, nous les avons purifié pour tenter de séparer les 2 métabolites majoritaires.

III.2.3.1. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.3.2}$ par chromatographie Flash

La sous-fraction $F_{1.3.2}$, soumise à une chromatographie Flash réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, a permis d'isoler les deux composés majoritaires. Nous avons ainsi isolé à nouveau le composé **MLc** dans la fraction $F_{1.3.2.1}$ (31 mg) avec une pureté CLHP de 98 % mais le second composé n'a été obtenu qu'en mélange dans la fraction $F_{1.3.2.2}$ (5 mg).

III.2.3.2. Fractionnement de la sous-fraction $F_{1.3.3}$ par chromatographie Flash

La sous-fraction $F_{1.3.3}$ présente un mélange de composés difficile à séparer par les systèmes classiques d'éluants. En effet, des tentatives de purification avec les mélanges de solvants CH_2Cl_2/MeOH et cyclohexane/acétate d'éthyle ont été expérimentés sans résultats concluant.

III.2.4. Fractionnement de sous-fraction $F_{1.4}$ par chromatographie Flash

Une purification de la sous-fraction $F_{1.4}$ par Flash chromatographie avec une élution par un gradient de polarité croissante CH_2Cl_2/MeOH, a permis l'isolement du composé **MLe** (8 mg).

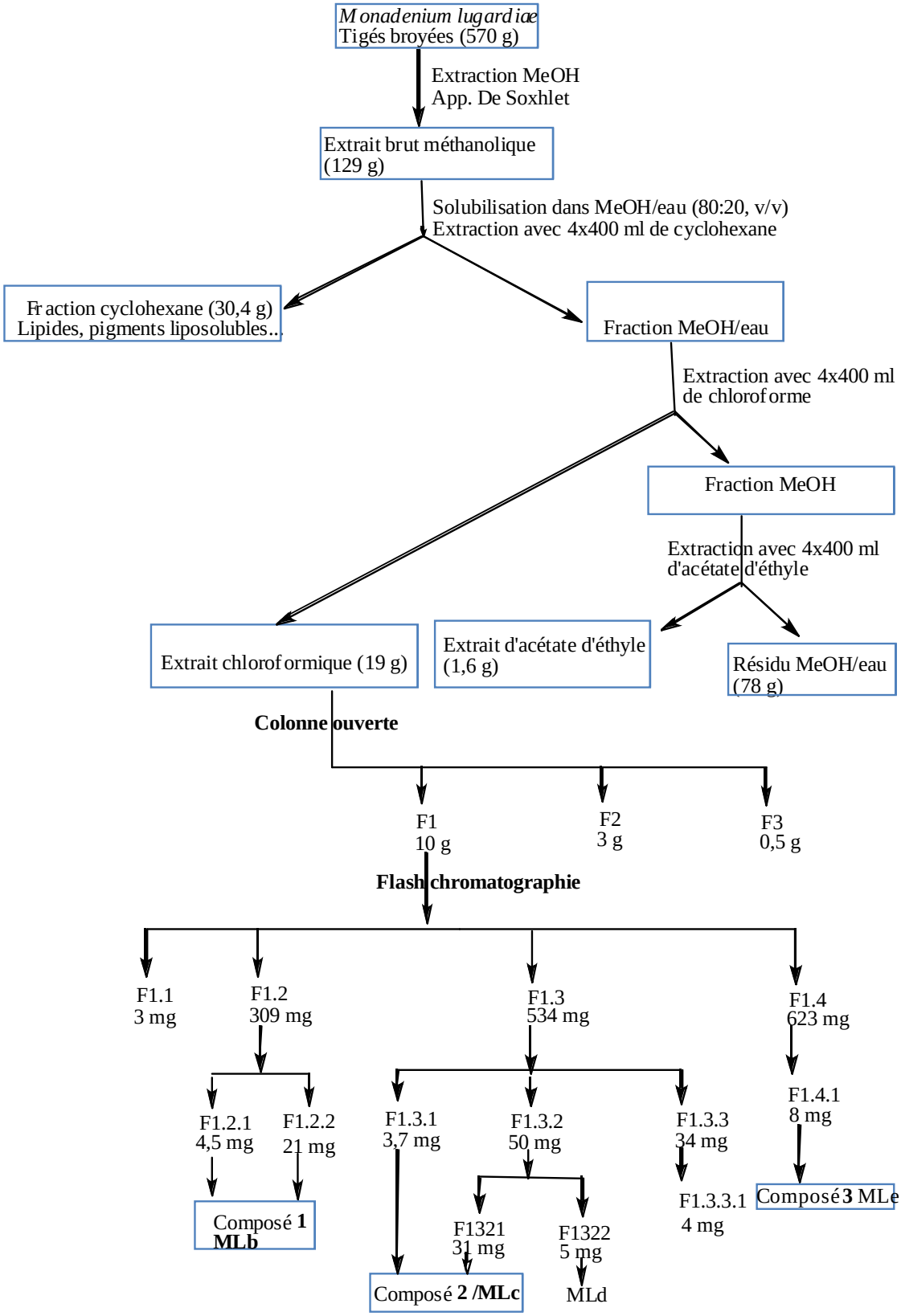


Figure 75 : Schéma récapitulatif du protocole d'extraction des tiges.

III.3. Identification des métabolites isolés

Trois métabolites ont pu être isolés de l'extrait chloroformique avec une pureté suffisante pour permettre leur identification : **MLb**, **MLc** et **MLe**.

III.3.1. Composé MLb

L'analyse des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **MLb** indiquent respectivement la présence de 26 protons et de 20 carbones. Le spectre RMN du ^{13}C montre une abondance importante de carbones hydridés sp^3, *i.e.* de déplacements chimiques inférieurs à 80 ppm. Les données RMN sont résumées dans le tableau ci-après. Les premiers élements sont ainsi en faveur d'une structure de type terpénoïde. Le spectre RMN du proton, comme cela est souvent le cas pour les composés terpéniques, est très peu résolu rendant difficile son interprétation.

N°	^{13}C (ppm)	N°	^{13}C (ppm)
1	41,3	**11**	61,5
2	18,4	**12**	85,4
3	39,2	**13**	151,0
4	33,5	**14**	53,5
5	53,5	**15**	133,0
6	20,8	**16**	168,1
7	35,6	**17**	56,5
8	66,7	**18**	33,5
9	47,8	**19**	21,9
10	39,1	**20**	15,5

Tableau 22. Données RMN du ^{13}C du composé **MLb** ($CDCl_3$, 75 MHz)

Des analyses par diffraction de rayons X ont donc été menées. La structure du composé **MLb** a ainsi pu être élucidée (Figure 76) : il s'agit d'un diterpène di-époxyde possédant une structure du type abiétane et caracterisé par la présence du cycle γ-lactone entre les carbones C-12 et C-13 et deux ponts époxyde entre les carbones C-8, C-14 et C-11 et C-12. Ces données nous permettent de proposer la formule brute $C_{20}H_{26}O_5$.

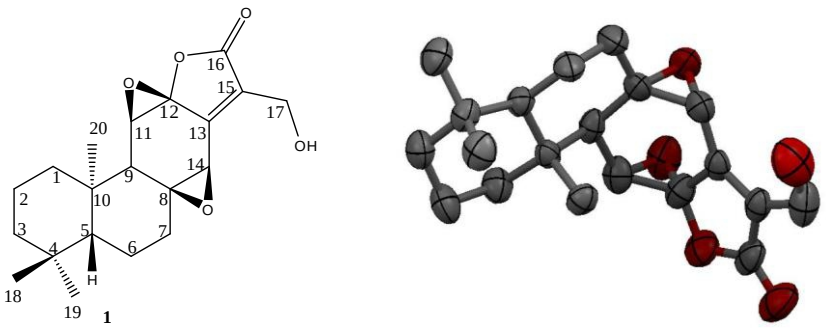


Figure 76 : Structure et représentation ORTEP du 17-hydroxyjolkinolide B (MLb).

La comparaison de ces données avec celles de la littérature indiquent que le composé **MLb** est le 17-hydroxyjolkinolide B (Che *et al.*, 1999).

Ce composé a déjà été décrit antérieurement dans l'espèce *Euphorbia fischeriana* Steud (Che *et al*., 1999) mais est ici isolé pour la première fois de *Monadenium lugardiae*.

III.3.2. Composé MLc

L'analyse des spectres RMN ^{1}H et ^{13}C du composé **MLc** indique la présence de 26 protons et de 20 carbones. Le spectre RMN ^{13}C montre là encore une prépondérance de carbone hybridés sp_3 et quelques carbones sp_2. Egalement les carbones à 209,9 et 175,0 ppm montrent la présence de deux groupements carbonylés respectivement de type cétone et ester. Le composé **MLc** semble être lui aussi un dérivé terpénique. Le spectre RMN ^{1}H est plus résolu que précédemment et permet d'obtenir des indications supplémentaires (données RMN Tableau ci dessous). La présence de 3 groupements méthyle a ainsi été mise en évidence.

N°	^{13}C (ppm)	^{1}H (δ, multiplicité)
1	56,0	2,37 (1 H, *m*, 1-ax) et 2,56 (1 H, *m*, 1-eq)
2	209,9	
3	54,1	2,46 (1 H, *m*, 3-ax) et 2,25 (1 H, *m*, 3-eq)
4	38,8	
5	54,5	1,77 (1 H, *m*, 5-ax)
6	23,7	1,43 (1 H, *m*, 6-ax) et 2,21 (1 H, *m*, 6-eq)
7	36,5	2,29 (1 H, m, 7-ax)
8	149,7	
9	51,3	
10	46,4	
11	27,7	1,56 (1 H, *m*, 11-ax) et 2,56 (1 H, *m*, 11-eq)
12	75,5	4,86 (1 H, m, 12-ax)
13	155,2	
14	115,0	6,35 (1 H, *s*)
15	117,3	
16	175,0	
17	33,7	1,12 (3 H, *s*)
18	23,2	0,86 (3 H, *s*)
19	17,5	0,96 (3 H, *s*)
20	8,3	1,85 (3 H, *s*)

Tableau 23. Données RMN du ^{1}H et ^{13}C du composé **MLc** ($CDCl_3$, 300 et 75 MHz)

Des analyses par diffraction des rayons-X ont permis de déterminer la structure du composé : il s'agit d'un diterpène de structure de type abiétane caractérisé également par la présence du cycle γ-lactone entre les carbones C-12 et C-13. Ces données nous permettent de proposer la formule brute $C_{20}H_{26}O_3$. La comparaison des données avec celles de la littérature indiquent que le composé **MLc** est l'hélioscopinolide F.

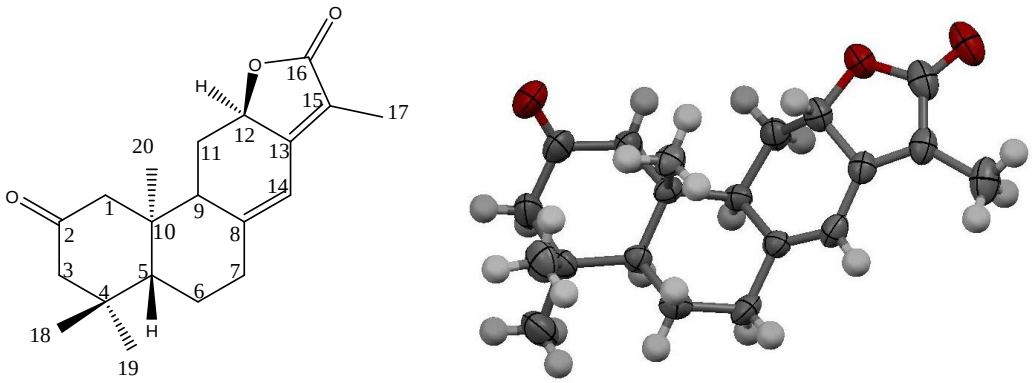


Figure 77 : Structure et représentation ORTEP de l'hélioscopinolide F.

Ce composé a déjà été décrit antérieurement dans l'espèce *Euphorbia calyptrata* (Crespi-Perellino et al., 1996)) mais est ici isolé pour la première fois de *Monadenium lugardiae*.

III.3.3- Composé MLe

L'analyse du spectre RMN ^{1}H du composé **MLe** est cohérent avec un composé de type coumarine. La comparaison des données obtenues avec celles de la littérature (Li et Seeram, 2010) permet de conclure que le composé **MLe** est de la scopolétine, ce qui a été confirmé par analyse par diffraction des rayons X.

IV. CONCLUSION

Nos travaux ont ainsi permis l'isolement de deux dérivés terpéniques de type Abiétane : l'helioscopinolide F et le jolkinolide B. Ces deux composés sont décrits pour la première fois dans l'espèce *Monadenium lugardiae*, mais ont déjà été isolés précédemment de diverses *Euphorbia sp*. Il est intéressant de noter que ces deux composés ont montré des potentialités comme agent anti-tumoral, sur des cellules lymphoblastiques résistantes (helioscopinolide F) et sur plusieurs lignées cancéreuses de souris ou humaines (jolkinolide B).

L'étude phytochimique est loin d'être complète, et nous pouvons penser que d'autres analogues triterpéniques, dont certains potentiellement inédits, restent à isoler. *Monadenium lugardiae* représente peut être une source potentielle de nouveaux anti-tumoraux.

V. PARTIE EXPERIMENTALE

V.1. Le matériel végétal

V.1.1. Récolte et séchage

Les récoltes de tiges de *Monadenium lugardiae* N.E.Br. ont été réalisées au mois de Mars 2010 dans leur habitat naturel situé dans la région du Bela vista-Porto Henrique (Matutuine) province de Maputo (sud Mozambique). La détermination botanique de l'espèce a été réalisée

par les taxonomistes de l'Herbier de l'Institut de Recherche Agronomique au Mozambique à Maputo. Un échantillon, numéro de Voucher (G. 4503), a été déposé au sein de cet herbier.

Les racines ont été séchées au laboratoire à l'abri de la lumière durant 2-3 semaines à une température comprise entre 15 et 20°C. Le matériel végétal séché est ensuite réduit en poudre à l'aide d'un broyeur.

V.1.2. Extraction

570 g de poudre sèche de tiges de *Monadenium lugardiae* N.E.Br. ont été extraits dans un appareil deSoxhlet au méthanol (2 l) pendant deux jours. L'extrait méthanolique brut obtenu est concentré sous pression réduite permettant l'obtention de 129 g d'extrait sec.

Cet extrait brut a été solubilisé dans un mélange méthanol-eau (80 : 20, v/v) et soumis ensuite à des extractions liquide-liquide successives en présence de cyclohexane (4 x 400 ml), de chloroforme (4x400 ml) et d'acétate d'éthyle (4x400 ml). Quatre extraits ont été ainsi obtenus :

- Un extrait cyclohexanique : 30,4 g ;
- Un extrait chloroformique : 19,0 g ;
- Un extrait acétate d'éthyle : 1,6 g;
- Le résidu méthanolique :78 g.

V.2. Techniques de fractionnement et purification

V.2.1. Chromatographie sur colonne ouverte.

Les colonnes ouvertes ont été réalisées sur gel de silice 60 (0,040-0,063 mm) Merck. La taille des colonnes, la masse de gel de silice ont été adaptées à la quantité et à la nature de l'échantillon à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi des purifications et le regroupement des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM. Les échantillons ont été déposés sur colonne après formation d'un amalgame par solubilisation dans le dichlorométhane, mélange avec de la silice et évaporation sous pression réduite.

L'extrait chloroformique (19 g) a été soumis à une chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice en utilisant comme éluant un mélange CH_2Cl_2/MeOH de polarité croissante (0 à 100 % de MeOH). Les fractions sont regroupées selon leur profil en CCM (éluant CH_2Cl_2/MeOH (90 :10, v/v)). Trois fractions ont été obtenues notées F_1 (10 g), F_2 (3 g) et F_3 (0,5 g).

V.2.2. Chromatographie Flash.

La chaîne chromatographique utilisée est une chaîne Flashsmart one (AIT, Houilles, France) équipée de deux pompes isocratiques monopiston (débit maximum 40 $ml.min^{-1}$), d'un détecteur UV et d'un collecteur de fractions.

Les colonnes utilisées sont des colonnes de silice Interchim PF-30-SiHP de masse adaptée à l'échantillon déposé. Les échantillons ont été déposés sur colonne après formation d'un amalgame par solubilisation dans le dichlorométhane, mélange avec de la silice et évaporation sous pression réduite.

La fraction F_1 (2 g) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle de polarité croissante de 0 à 100 % d'acétate d'éthyle, à un débit de 15 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les minutes. Quatre fractions ont été ainsi obtenues notées $F_{1.1}$ à $F_{1.4}$ de masses respectives 3, 309, 534 et 623 mg.

La fraction $F_{1.2}$ (309 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante de 0 à 100 % de méthanol, à un débit de 12 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les minutes. Le composé **MLb** (25,5 mg) a été isolé par le mélange dichlorométhane/méthanol (95 :5, v/v).

La fraction $F_{1.3}$ (534 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante de 0 à 100 % de méthanol, à un débit de 12 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les minutes. Le composé **MLc** (3,7 mg) a été isolé par le mélange dichlorométhane/méthanol (95 :5, v/v). Deux autres fractions $F_{1.3.2}$ (50 mg) et $F_{1.3.3}$ (34 mg) contenant un mélange de MLc et d'autres métabolites ont également été obtenues.

La fraction $F_{1.3.2}$ (50 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante de 0 à 100 % de méthanol, à un débit de 12 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les minutes. Le composé **MLc** (31 mg) a été isolé par le mélange dichlorométhane/méthanol (95 :5, v/v).

La fraction $F_{1.4}$ (623 mg) a été soumise à une chromatographie flash sur colonne de gel de silice éluée par un mélange dichlorométhane/méthanol de polarité croissante de 0 à 100 % de méthanol, à un débit de 12 $ml.min^{-1}$. Le temps de collecte est fixé à 1 tube toutes les minutes. Le composé **MLe** (8,2 mg) a été isolé par le mélange dichlorométhane/méthanol (85 :15, v/v).

V.3. Techniques analytiques

V.3.1. Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les analyses ont été réalisées sur plaques de silice Silicagel 60 F254 (Merck). Les éluants utilisés sont des mélanges cyclohexane/AcOEt ou CH_2Cl_2/MeOH dans des proportions appropriées. Les plaques sont examinées sous UV à 254 et 366 nm.

V.3.2. Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

Les analyses CLHP ont été effectuées sur une chaîne Dionex UHPLC U3000RS (Dionex, ThermoFisher SA, Voisins le Bretonneux, France), équipée d'une pompe LPG-3400RS, d'un

injecteur automatique RSLC WPS-300T RS, d'un enceinte à colonne thermostatée TCC-300SD et d'un détecteur à barrettes de diodes UHPLC+ DAD-3000 .

La colonne utilisée est une colonne Ascentis® C_{18} (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) équipée d'une pré-colonne SuperguardTM AscentisTM C_{18} (2 cm x 4.0 mm, 5 µm) (Supelco, Bellefonte PA, USA).

La phase mobile utilisée est un mélange binaire d'eau avec 0,025% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA)(solvant A) et d'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'élution utilisé est le suivant : l'analyse débute à 100 % de solvant A puis la quantité de solvant B augment progressivement jusque 100 % en 60 min et maintenue à 100 % de solvant B pendant 8 min, avant un ré-équillibrage de la colonne à 100 % de solvant A pendant 10 min.

La détection UV est fixée à λ = 220, 254, 280 et 365 nm. La température du four à colonne est réglée à 40°C. Le volume d'injection est de 5 µL pour des solutions concentrées à 1 mg/mL.

Le pilotage de l'appareil et la gestion des données sont effectuées par le logiciel Chromeleon 7.1. Les pourcentages de pureté CLHP données sont indiqués pour λ = 210 nm.

V.3.3. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton ^{1}H et du carbone ^{13}C ont été réalisés à température ambiante sur un spectromètre Brüker-Avance 300 MHz. Le solvant utilisé pour les analyses est le $CDCl_3$.

V.3.4. Spectrométrie infra-rouge

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectromètre Brüker ATR-IR alpha (Bruker Biospin, Wissenbourg, France).

V.3.5. Spectrométrie UV

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectromètre Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, Courtaboeuf, France). Les solutions à examiner ont été réalisées dans l'acétonitrile.

V.3.6. Point de fusion

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil à capillaire Stuart SMP3 (Staffordshire, United kingdom).

V.3.7. Spectrométrie de masse

Les spectres de masses ont été enregistrés sur un spectromètre Shimadzu QP 2010 par injection directe, avec une tension de cône de 70 eV.

Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre ExactivePlusOrbitrap (Thermo Fisher Scientific, Brême, Allemagne), équipé d'une sonde d'ionisation electrospray (H-ESI II). Les analyses ont été réalisées en mode d'ionisation

positif sur une plage de masse allant de 100 à 1000 Da. Le système est contrôlé par le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Les paramètres ESI et MS utilisés sont les suivants: tension de spray −4.0 kV, les températures du capillaire et du four respectivement de 260 et 350 °C, tension de lentille 100 V. « Automatic gain control » (AGC) de la valeur cible a été réglée à 1 × 106 charges et le temps d'injection maximal a été fixé à 200 ms. La résolution a été fixée à 140,000 (m/z = 200) et la durée du scan à environ 0.3 s (plus de 15 points par pic chromatographique).

V.3.8. Diffraction des rayons X

Les données cristallographiques et conditions expérimentales de la collecte sont rassemblées dans le tableau suivant :

Composé	**MLb**	**MLc**	**MLe**
Formule brute	C_{21} $H_{25}O_4$	C_{20} $H_{26}O_3$	C_{10} $H_{16}O_3$
masse (g/mole)	341,41	314,41	184.23
système	orthorhombique	orthorhombique	triclinique
groupe d'espace	P 212121	P 212121	P -1
Z	4	4	2
a (Å)	10.6548(8)	8,6662(7)	6,8602(19)
b (Å)	12.3651(9)	12,9587(8)	7,645(3)
c (Å)	13.1676(11)	15,0961(11)	8,815(4)
α (°)	90	90	110,00(3)
β (°)	90	90	91,08(3)
γ (°)	90	90	99,20(3)
volume (A^3)	5834,8(6)	1695,3(2)	427,5(3)
température de mesure (K)	293(2)	293(2)	293(2)
dimensions cristal (mm)	0,36 x 0,14 x 0,13	0,24 x 0,18 x 0,07	0,14 x 0,08 x 0,05
densité (g/cm^3)	1,307	1,232	1,431
coefficient d'absorption μ (mm^{-1})	0,089	0,162	0,104
radiation Mo(Kα)	0,71073	0,71073	0,71073

Nbres réflexions mesurées	18244	17270	3417
Nbres réflexions indépendantes	5473	5130	1787
Nbres réflexions observées ($I>2\sigma(I)$)	5473	5130	1787
R	0,0574	0,0470	0,0782
wR	0,0901	0,0544	0,1435
S	0,753	0,732	0.942
densité résiduelle (max : min) (e/A^3)	0,111 : -0,37	0,114 : -0,120	0,190 : -0,168

Tableau 24. Données cristallographiques et conditions expérimentales de la collecte pour **Mlb**, **Mlc**, **Mle**.

V.4. Description des composés isolés

V.4.1. MLb: 17-hydroxyjolkinolide B

solide blanc ; m.p 185-190 °C; Description RMN Tableau 22.

V.4.2. MLc : helioscopinolide F

solide blanc; m.p 210-214 °C ; Description RMN Tableau 23.

V.4.3 MLe : scopolétine

Solide blanc ; m.p. 170-174 °C ; RMN^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) : δ 7,57 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz), 6,90 (1H, *s*), 6,83 (1H, *s*), 6,24 (1H, *d*, *J* = 9,6 Hz), 3,93 (3H, *s*)

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Monem A.R., Abdel-Sattar E., Harraz F.M., Petereit F., 2008. Chemical investigation of *Euphorbia schimperi* C. Presl. *Rec. Nat. Prod.* 2(2), 39-45.

Achten W.M.J., Verchot L., Franken Y.J., Mathijs E., Singh V.P., Aerts R., Muys B., 2008. Jatropha bio-diesel production and use. *Biomass and Bioenergy* 32(12), 1063-1084.

Adeniyi O.D., Kovo A.S., Abdulkareem A.S., Chukwudozie C., 2007. Ethanol fuel production from cassava as a substitute for gasoline. *J. Disper. Sci. Technol.* 28, 501-504.

Ahmad V.U., Hussain H., Hussain J., Jassbi A.R., Bukhari I.A., Yasin A., Choudhary M.I., Dar A., 2002a. New bioactive diterpenoid from *Euphorbia decipiens. Z. Naturforsch.* 57b, 1066-1071.

Ahmad V.U., Zahid M., Khan T., Asim M., Ahmad A., 2002b. Chemical constituents of *Euphorbia heteradenia. Proc. Pak. Acad. Sci. 39,*201-206.

Ahmad V.U., Hussain J., Hussain H., Farooq U., Ullah F., Lodhi M.A., Choudhary M.I., 2005. Twonew diterpene polyesters from *Euphorbia decipiens. Nat. Prod. Res.* 19, 267-274.

Aiyelaagbe O.O., Adesogan K., Ekundayo O., Gloer J.B., 2007. Antibacterial diterpenoids from *Jatropha podagrica* Hook. *Phytochem.* 68, 2420-2425.

Amir R.J., 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolitesin Euphorbia from Iran. *Phytochem.* 67, 1977-1984.

Ankli A., Sticher O., Heinrich M., 1999. Medical ethnobotany of the Yucatec Maya : Healersconsensus as a quantitative criterion. *Econ. Bot.* 53, 144-160.

Appendino G., Jakupovic S., Tron G.C., Jakupovic J., Milon V., Ballero M., 1998. Macrocyclicditerpenoids from *Euphorbia semiperfoliata. J. Nat. Prod.* 61, 749-756.

Appendino G., Belloro E., Tron G.C., Jacupovic J., Ballero M., 2000. *Fitoterapia* 69, 967.

Attioua B., Weniger B., Chabert P., 2007. Antiplasmodial activity of constituents isolated from *Croton lobatus*. *Pharm. Biol.* 45, 263-266.

Baloch I.B., Baloch M.K., Saqib Q.N., 2005. Tumor-Promoting Diterpene Esters from Latex of *Euphorbia cauducifolia* L.. *Helv. Chim. Acta* 88, 3145-3150.

Baloch I.B., Baloch M.K., Saqib Q.N.U., 2006. Cytotoxic macrocyclic diterpenoid esters from *Euphorbia cornigera*. *Planta Med.* 72, 830-834.

Benavides A., Benjumea P., Pasova V., 2007. Castol oil biodiesel as an alternative fuel for diesel engines. *Dyna-Colombia* 74, 141-150.

Berhaut J., 1971. Flora illustrée du Sénégal. Tome 1, Editions Clair Afrique. Dakar.

Bessong P.O., Rojas L.B., Obi L.C., Tshisikawe P.M., Igunbor E.O., 2006. Further screening of venda medicinal plants for activity against HIV type 1 reverse transcriptase and integrase. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 526-528.

Betancur-Galvis L., Palomares E., Marco J.A., Estornell E., 2003. Tigliane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia* with inhibitory activity on the mammalian mitochondrial respiratory chain. *J. Ethnopharmacol*. 85, 279-282.

Borghi D., Baumer L., Ballabio M., Arlandini E., Perellino N.C., Minghetti A., Vincieri F.F., 2004. Structure elucidation of helioscopinolides D and E from *Euphorbia calyptrata* cell cultures. *J. Nat. Prod*. 54, 1503-1508.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie. 4^{e} Edition. TEC & DOC. Lavoisier, p 1269.

Bruyns P.V., Mapaya R.J., Hedderson T., 2006. A new subgeneric classification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa based on ITS and *psbA-trnH* sequence data.

Taxon 55(2), 397-420.

Canelon D.J., Suarez A.L., De Sanctis J., Mijares M., Compagnone R.S., 2008. New anti-inflammatory cycloart-23-ene-3 beta-ol from *Senefelderopsis chibiriquetensis. Nat. Prod. Commun.* 3, 895-897.

Cataluna P., Rate S.M.K., 1999. The traditional use of the latex from *Euphorbia tirucalli* Linnaeus (Euphorbiaceae) in the treatment of cancer in south Brazil. Second World congress on Medicinal and Aromatic plants for Human Welfare Wocmap-2, 501, 289-295.

Chhabra S.C., Mahunnah R.L.A., Mshiu E.N., 1990. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. III. Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). *J. Ethnopharmacol.* 28(3), 255-283.

Che C.T., Zhou T.X., Ma Q.G., Qin G.W., Williams I.D., Wu H.M., Shi Z.S., 1999. Diterpenes andaromatic compounds from *Euphorbia fischeriana. Phytochem.* 52, 117-21.

Connoly J.D., Facunle C.O., Rycroft D.S., 1984. Five ingol esters and a 17-hydroxyingenol ester from the latex of *Euphorbia kamerunica.* Assignment of esters using 13C-NMR. methods. *Tetrahedron Lett*. 25, 3773-3776.

Crespi-Perellino N., Garofano L., Arlandini E., Pinciroli V., Minghetti A., Vincieri F.F., Danieli B., 1996. Identification of new diterpenoids from *Euphorbia calyptrata* cell cultures. *J. Nat. Prod.* 59, 773-776.

Defelice L.P., 1967. Guide pour l'étude de quelques plantes tropicales. Gauthier-Villars. Paris.

De Oliveira J.S., Leite P.M., De Sousa L.B., Mello V.M., Silva E.C., Rubim J.C., Meneghetti, S.M.P., Suarez P.A.Z., 2009. Characteristics and composition of *Jatropha gossypiifolia* and *curcas* L. oils and application for biodiesel production. *Biomass and Bioenergy* 33(3), 449-453.

Devappa R.K., Makkar H.P.S., Becker K., 2010. Jatropha toxicity : areview. *J. Toxicol. Environ. Health* 13, 476-507.

Devappa R.K., Makkar H.P.S., Becker K., 2011. Jatropha Diterpenes : a Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, 301-322.

Dhar M.L., Dhar M.M., Dhawan B.N., Mehrotra B.N., Ray C., 1968. Screening of Indian plants for biological activity, Part I. *Indian J. Exp. Biol.* 6, 232-247.

Dias G.O.C., Porto C., Stuker C.Z., Graessler V., Burrow R.A., Dalcol I., da Silva U.F., Morel A.F., 2007. Alcaloids from *Melochia chamaedrys*. *Planta Med.* 73, 289-292.

Duarte N., Gyémánt N., Abreu P.M., Molnár J., Ferreira M-J.U., 2006. New macrocyclic lathyrane diterpenes, from *Euphorbia lagascae* as inhibitors of multidrug resistance of tumour cells. *Planta Med.* 72, 162-168.

Duarte N., Lage H., Ferreira M.J.U., 2008. Antiproliferative activity of *ent*-abietane lactones against resistant human cancer cell lines. *Planta Med.* 74, 984-985.

Duke J.A., 1983. Handbook of energy crops. Purdue university centre for new crops and plant products. www.puedue.educ. Accessed on 1 March 2009.

Ekpo O.E., Pretorius E., 2007. Asthma, *Euphorbia hirta* and its anti-inflammatory properties. *S. Afr. J. Sci.* 103(5/6), 201-203.

El-Bassuony A.A., 2007. Antibacterial activity of new polyesterditerpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Asian J. Chem.* 19, 4553-4562.

Esmaraldino L.E., Sousa A.M., Sampa S.V., 2005. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine* 12(8), 570-576.

Evans F., Taylor S., 1983. Pro-inflammatory, tumor promoting and antitumor diterpene of the plant families Euphorbia and Thymaeaceae. In : Herz W, Grisebach H, Kirby G. (Eds), Progress in Chemistry of Organic Natural Products 44. Springer-Verlag, New York, p1-99.

Falodun A., Ali S., Quadir I.M.I., 2008. Phytochemical and biological investigation of chloroform and ethylacetate fractions of *Euphorbia heterophylla* leaf (Euphorbiaceae). *J. Med. Plants Res.* 2, 365-369.

Feizbakhsh A., Bighdeli M., Tehrani M.S., Rustaiyan A., Masoudi S., 2004. Chemical constituents of essential oil of *Euphorbia teheranica* Boiss., a species endemic to Iran. *J. Essen. Oil Res*. 16, 40-41.

Goel G., Makkar H.P.S., Francis G., Becker K., 2007. Phorbol esters : structure, biological activity and toxicity in animals. *Int. J. Toxicol.* 26, 279-288.

Gundidza M., 1985. Phytochemical screening of some Zimbabwean medicinal plants. *The Central African Journal of Medicine* 31(12), 238-239.

Gundidza M., 1986. Insecticidal activity of *Monadenium lugardiae* latex. *Planta Medica* 558.

Gundidza M., 1989. Activity of citric acid extract from *Monadenium lugardiae* on Guinea Pig Ileum. *Planta Medica* 55.

Gupta B., Rasmi S., Radha G., 2007. Therapeutic uses of *Euphorbia thymifolia :* a review. *Pharmacogn. Rev.* 1, 299-304.

Haba H., Lavaud C., Harkat H., Magid A.A., Marcourt L., Benkhaled M., 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochem.* 68(9), 1255-1260.

Haba H., Lavaud C., Magid A.A., Benkhaled M., 2009. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia retusa*. *J. Nat. Prod.* 72(7), 1258-1264.

Hernández T., Canales M., Avila J.G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar A., Lira R., 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las salinas, Puebla (Mexico). *J. Ethnopharmacol.* 88, 181-188.

Hiruma-Lima C.A., Toma W., Gracioso J.D., de Almeida A.B.A., Batista L.M., Magri L., de Paula A.C.B., Soares F.R., Nunes D.S., Brito A., 2002. Natural trans-crotonin : the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 452-456.

Hohmann J., Molnár J., 2004. Euphorbiaceae diterpenes : plant toxins or promising molecules for the therapy. *Acta Pharm. Hung.* 74, 149-157.

Hooper M., 2002. Major hebs of Ayurveda. *Elsevier Health Sciences*, The Netherlands, p 340.

Hwang E.L., Ahn B.T., Lee H.B., Kim Y.K., Lee K.S., Bok S.H., Kim Y.T., Kim S.U., 2001. Inibitory activity for chitin synthase II from *Saccharomyces cerevisiae* by tannins and related compounds. *Planta Med.* 67, 501-504.

Jassbi A.R., Zamanizadehnajari S., Tahara S., 2004. Chemical constituents of *Euphorbia marschalliana* Boiss. *Z. fuer Naturforsch.* 59(1/2), 15-18.

Jassbi A.R., 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites. *Phytochem.* 67, 1977-1984.

Kamal A., 2001. Studies in chemical constituents of *Andrachne aspera* Spreng (Euphorbiaceae). Thése de doctorat. University of Karachi. Karachi.

Kapoor L.D., 1989. Hand book of Ayurdev medical plants. In L.D. Kapoor, (ed.). Med. Plants. CRC Press.

Kaushik N., Kumar K., Kumar S., 2007. Potential of *Jatropha curcas* for biofuels. *J. Biobased Mater. Biol.* 1, 301-314.

Kiem P.V., Thua V.K., Yen P.H., Nhien N.X., Tung N.H., Cuong N.X., Minh C.V., Huong H.T., Hyun J.H., Kang H.K., Kim Y.H., 2009. New triterpenoid saponins from *Glochidion eriocarpum* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 102-105.

Konoshima T., Konishi T., Takasaki M., Yamazoe K., Tokuda H., 2001. Anti-tumor-promoting activity of the diterpene from *Excoecaria agallocha. Biol. Pharm. Bull.* 24, 1440-1442.

Krebs H.C., Duddeck H., Malik S., Beil W., Rasoanaivo P., Andrianarijaona M., 2004. Chemical composition and antitumor activities from *Givotia madagascariensis. J. Chem. Sci.* 59, 58-62.

Kumar K., Sharma P.B., 2005. *Jatropha curcas* – A sustainable source for production of biodiesel. *J. Sci. Ind. Res. India* 64, 883-889.

Lai X.Z., Yang Y.B., Shan,X.L., 2004. The investigation of Euphorbiaceous medicinal plants in southern China. *Econ. Bot.* 58, 307-320.

Lal A.R., Cambie R.C., Rutledge, P.S., Woodgate P.D., 1990. Chemistry of fijian plants. 6. Entpimaraneand *ent*-abietane diterpenes from *Euphorbia fidjiana. Phytochem.* 29, 2239-2246.

Li A., Seeram N.P., 2010. Maple Syrup Phytochemicals Include Lignans, Coumarins, a Stilbene, and Other Previously Unreported Antioxidant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11673-11679

Li B., Wang X., Chen R., Huangfu W.G., Xie G.L., 2008. Antibacterial activity of chitosan solution against xanthonas pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohyd. Polym.* 72, 287-292.

List P.H., Horhammer L., 1979. Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Springer, Berlin.

Liu K., Lin M.T., Lee S.S., Chiou J.F., Ren S.J., Lien E.J., 1999. Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. *Planta Med.* 65, 43-46.

Liu W.Z., Wu X.Y., Yang G.J., Ma Q.G., Zhou T.X., Tang X.C., Qin G.W., 1996. 12-deoxyphorbolesters from *Euphorbia fischeriana*. *Chin. Chem. Lett*. 7, 917-918.

Liu X., Ye W., Yu B., Zhão S.X., Wu H.M., Che C.I., 2004. Two new flavonol glycosides from *Gymnema sylvestre* and *Euphorbia ebracteolata*. *Carbohydrate Res.* 339, 891-895.

Liu Y., Murakami N., Ji H., Abreu P., Zhang S., 2007. Antimalarial flavonolglycosides from *Euphorbia hirta*. *Pharm. Biol.* 45, 278-281.

Lombard S., Helmy M.E., Pieroni G., 2001. Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids. *Biochem. J.* 358, 773-781.

Mampane K.J., Joubert P.H., Hay I.T., 1987. *Jatropha curcas* : use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. *Phytotherapy Research* 1, 50-51.

Mathabe M.C., Hussein A.A., Nikolova R.V., Basson A.E., Meyer J.J.M., Lall M., 2008. Antibacterial activity and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*. *J. Ethnopharmacol.* 116, 194-197.

Mavar M.H., Brick D., Marie D.E.P., Quetin-Leclercq J., 2004. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 92(2/3), 209-214.

Meneghetti S.A.P., Meneghetti M.R., Serra T.A., Barbosa D.C., Wolf C.R., 2007. Biodiesel production from vegetable oil mixtures : cottonseed, soybeans and castor oils. *Energ. Fuel*

21, 3746-3747.

Morgenstern T., Bittner M., Silva M., Aqueveque P., Jakupovic J., 1996. Diterpenes and phloracetophenones from *Euphorbia portulacoides*. *Phytochem.* 41, 1149-1153.

Mwine J.T., Van Damme P., 2011. A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *J. Med. Plants Res.* 5(5), 652-662.

Natarajan D., Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C., Perumal G., 2005. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*. A rare medical herb. *J. Ethnopharmacol.* 102, 123-126.

Nishimura H., Wang L.Y., Kusano K., Kitanaka S., 2005. Flavonoids that mimic human ligands from the whole plant. *Chem. Pharm. Bull.* 53(3), 305-308.

Nkeh B.C.A., Njamen D., Wandji J., Fomum Z.T., Dongmo A., Ngelefack T.B., Wansi D., Kamanyi A., 2003. Anti-inflammatory and analgesic effects of drypemolundein A, a sesquiterpene lactone from *Drypetes molunduana*. *Pharm. Biol.* 41, 26-30.

Oksuz, S., Ulubelen A., Barla A., Kohlbau H.J., Voelter W., 1999. Triterpenoids and a diterpene from *Euphorbia iberica*. *Planta Med*. 65, 475-477.

Olsnes S., Sandvig K., Refsnes K., Pihl A., 1976. Rates of different steps involved in the inhibition of protein synthesis by the toxic lectins abrin and ricin. *J. Biol. Chem.* 257, 3985-3992.

Ott H.H., Hecker E., 1981. Highly irritant ingenane type diterpene esters from *Euphorbia cyparissias* L. *Experientia* 37, 88-91.

Pan Q., Shi M.F., Min Z.D., 2004. Studies on the 2D NMR spectra of Jolkinolide diterpenoids from *Euphorbia fischriana. J. Chin. Pharm. Univ.* 35, 16-19.

Parekh J., Jadeja D., Chandra S., 2005. Efficacity of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turk. J. Biol.* 29, 203-210.

Pertino M., Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J.A., Theoduloz C., 2007a. Gastroprotective effect and cytotoxicity of semisynthetic jatropholone derivatives. *Planta Med*. 73, 1095-1100.

Pertino M., Schmeda-Hirschmann G., Rodriguez J.A., Theoduloz C., 2007b. Gastroprotective effect and cytotoxicity of diterpenes from the Paraguayan crude drug ‘‘yagua rova’’ (*Jatropha isabelli*). *J. Ethnopharmacol*. 111, 553-559.

Ponsinet G., Ourisson G., 1965. Etudes chimio-taxonomiques dans la famille des Euphorbiaceae-I. Introduction générale et séparation et identification des triterpènes tétracycliques monohydroxylés naturels. *Phytochem.* 4, 799-811.

Rao M.U., Screenivasulu M., Chengaiah B., Reddy K.J., Chetty C.M., 2010. Herbal medicines for diabetes *mellitus* : A review. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2(3), 1883-1892.

Rojas J., Velasco J., Morales A., Diaz T., Meccia G., 2008. Evaluation of antibacterial activity on different solvent extracts of *Euphorbia caracasana* Boiss and *Euphorbia cotinifolia* L. *Bol. Lat. Plant Med. Y Arom.* 7(4), 199-201.

Rossi D., Bruni R., Biachi N., Chiarabelli C., Gambari R., Medici A., Lista A., Paganetto G., 2003. Evaluation of mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* (Muell. Arg.) latex. *Phytomed.* 10, 139-144.

Salah M.A., Bedir E., Toyang N.J., Khan I.A., Harries M.D., Wedge D.E., 2003. Antifungal clerodane diterpenes from *Macaranga monandra* (L) Muell. et Arg. (Euphorbiaceae). *J. Agr. Food Chem.* 51, 7607-7610.

Santos A.F.D., Sant-Ana A.E.G., 1999. Molluscicidal activity of the diterpenoids jatrophone and jatropholones A and B isolated from Jatropha elliptica (Pohl) Muell. Arg. *Phytother. Res.* 13, 660-664.

Schmeda-Hirschmann G., Razmilic I., Sauvain M., Moretti C.,Munoz V., Ruiz E., Balanza E., Fournet A., 1996. Antiprotozoalactivity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytother. Res.* 10, 375-378.

Schmelzer G.H., 2008. Euphorbia lugardiae (N.E.Br.). Bruyns. [Internet]. Fiche de Protabase. Schmelzer G.H. & Gurib-Fakim A. (Editeurs). PROTA (Plant Resources of Tropical Africa /Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Pays Bas. http://database.prota.org./recherche.htm. Visité le 6 juin 2011.

Shi J.S., Li Z.X., Nitoda T., Minoru I., Hiroshi K., Naomichi B., Kazuyoshi K., Shuhei N., 2008a. Antinematodal activities of ingenane diterpenes from *Euphorbia kansui* and their derivatives against the pine wood nematode. *Z. Naturforsch.* 63, 59-65.

Shi J.X., Li Z.X., Izumi M., Baba N., Nakajima S., 2008b. Termiticidal activity of diterpenes from the roots of *Euphorbia kansui*. *Z. Naturforsch*. 63, 51-58.

Shi Q.W., Su X.H., Kiyota H., 2008. Chemical and pharmacological research of plants in genus *Euphorbia*. *Chem. Rev.* 108, 4295-4327.

Shizuri Y., Kosemura S., Yamamura S., Ohba S., Ito M., Saito Y., 1983. Isolation and structures of helioscopinolides, new diterpenes from *Euphorbia helioscopia* L. *Chem. Lett*. 12, 65-68.

Singla A.K., Kamala P., 1990. Phytochemistry of Euphorbia species. *Fitoterapia* 61, 483-516.

Spencer G.F., Koniuszy F.R., Roger E.F., 1947. Survey of plants for antimalarial activity. *Lloydia* 10, 145-174.

Su B.N., Park E.J., Mbwambo Z.H., Santarsiero B.D., Mesecar A.D., Fong H.H.S., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D., 2002. New chemical constituents of *Euphorbia quinquecostata* and absolute configuration assignment by a convenient mosher ester procedure carried out in NMR tubes. *J. Nat. Prod.* 65, 1278-1282.

Suarez A.L., Blanco Z., Delle Monache F., Compagnone R.S., Arvelo F., 2004. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Nat. Prod. Res.* 18, 421-426.

Sutthivaiyakit S., Thapsut M., Prachayasittikul V., 2000. Constituents and bioactivity of the tubers of *Euphorbia sessiliflora. Phytochem.* 53, 947-950.

Taylor M.D., Smith A.B., Furst G.T., Gunasekara S.P., Bevelle C.A., Cordell G.A., Farnsworth N.R., Kupchan S.M., Uchida H.,Branfman A.R., Dailey R.G. Jr., Sneden A.T., 1983. New antileukemic jatrophone derivatives from *Jatropha gossypifolia* : structural and stereochemical assignment through nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc*. 105, 3177-3183.

Uemura D., Nakayama Y., Shizuri Y., Hirata Y., 1976. The structure of new lathyrane diterpenes, Jolkinols A, B, C and D from *Euphorbia jolkini* Boiss. *Tetrahedron Lett.* 17, 4593-4596.

Ukwe C.V., 1997. Antiulcer activity of aqueous stembark extract of *Hymenocardia acida* TUL (Euphorbiaceae). *Int. J. Pharmacogn.* 35, 354-357.

Urones J.G., Barcala P.B., Cuadrado M.J.S., Marcos I.S., 1988. Diterpenes from the Latex of *Euphorbia broteri*. *Phytochem.* 27, 207-212.

Valente C., Pedro M., Duarte A., Nascimento M.S.J., Abreu P.M., Ferreira M.J.U., 2004. Bioactive diterpenoids, a new jatrophane and two ent-abietanes, and other constituents from Euphorbiapubescens. *J. Nat. Prod.* 67, 902-904.

Van Damme P., 1989. Het traditioneel gebruik Van *Euphorbia tirucalli*. *Afr. Focus* 5, 176-203.

Van Damme P.L.J., 2001. *Euphorbia tirucalli* for high biomass production, in : A. Schlissel and D. Pastermak (Eds), Combating desertification with plants. *Kkluwer academic Pub.* 169-187.

Wang Y.B., Huang R., Wang H.B., Jin H.Z., Lou L.G., Qin G.W., 2006. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana. J. Nat. Prod.* 69, 967-970.

Watt J.M., Breyer-Brandwijk M.G., 1962. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. Second Edition. E & S. Livingstone, Ltd. p1457.

Watt J.M., 1967. ‘‘African plants potentially useful in mental health’’. *Lloydia* 30(1), 1-22.

Webster G.L., 1994. Classification of the Euphorbiaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 81, 3-32.

Webster G.L., 1975. Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. *Taxon* 24,

593-601.

Wu D.G., Sorg B., Adolf W., Seip E.H., Hecker E., 1992. Oligo- and macrocyclic diterpenes in Thymelaeaceae and Euphorbiaceae occurring and utilized in Yunnan (Southwest China). 2. Ingenane type diterpene esters from *Euphorbia nematocypha* Hand.-Mazz. *Phytother. Res.* 6, 237-240.

Wu D.G., Sorg B., Hecker E., 1994. Oligocyclic and macrocyclic diterpenes in thymelaeaceae and Euphorbiaceae occurring and utilized in Yunnan (Southwest China). 6. Tigliane type diterpene esters from latex of *Euphorbia prolifera*. *Phytother. Res*. 8, 95-99.

Wu Q.-C., Tang Y.-P., Ding A.-W., You F.-Q., Zhang L., Duan J.-A., 2009. 13C-NMR Data of Three Important Diterpenes Isolated from *Euphorbia* Species. *Molecules* 14, 4454-4475.

Yan S., Ye D., Wang Y., Zhao Y., Pu J., Du X., Luo L., Zhao Y., 2011. *Ent*-kaurane diterpenoids from *Euphorbia hirta*. *Rec. Nat. Prod.* 5(4), 247-251.

Yang X.W., Wang J.S., Ma Y.L., Xiao H.T., Zuo Q., Lin H., He H.P., Li L., Hao X.J., 2007. Bioactive Phenols from the leaves of *Baccaurea ramiflora*. *Planta Med.* 73, 1415-1417.

Yu F.R., Lian X.Z., Guo H.Y., McGuire P.M., Li R.D., Wang R., Yu F.H., 2005. Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitor effects on the human SGC-7901 cells. *J. Pharm. Sci.* 8, 528-535.

Conclusion Générale:

Ce travail a été réalisé dans le but de valoriser les connaissances de la médecine traditionnelle appliquée au Mozambique. L'étude phytochimique a été réalisée sur trois plantes : *Ptaeroxylon obliquum, Pyrenacantha kaurabassana et Monadenium lugardiae*, espèces médicinales utilisées dans la pharmacopée traditionnelle au sud du Mozambique, dans le traitement de diverses pathologies, en particulier les affections gastro-intestinales, les rhumatismes, le paludisme et comme purgatif.

L'étude bibliographique approfondie a montré que les données phytochimiques disponibles pour *Ptaeroxylon obliquum*, se limitaient aux parties aériennes de la plante : écorces, bois et feuilles. Pour l'espèce *P. kaurabassana,* malgré des études récentes menées sur le tubercule, notre étude montre que ces résultats ne sont pas complets. L'espèce *M. lugardiae* a été également choisie après une étude bibliographique approfondie qui a montré que les données disponibles se limitaient aux études de criblages phytochimique et biologique du latex de la plante. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'explorer les racines, les tubercules et les tiges de ces plantes, qui sont utilisées par les tradipraticiens.

L'étude phytochimique de ***Ptaeroxylon obliquum*** à partir d'un extrait chloroformique des racines, a fourni cinq molécules dont trois chromones : le ptaerobliquol, une chromone monoterpénique originale, l'acétate de ptaeroxilinol, encore jamais décrite dans cette espèce et la peucenine. Deux coumarines, la prenyletine et la scopoletine, ont également été isolées. De plus, nous avons proposé la biosynthèse de la molécule originale, le ptaerobliquol.

Les résultats du criblage phytochimique de l'écorce du tubercule de ***Pyrenacantha kaurabassana*** ont montré que les métabolites principaux de cette plante sont des **flavonoïdes et des quinones.** Quatre composés ont été isolés dont deux anthraquinones, l'émodine (PK_A) et le physcion (PK_B) et deux xanthones, PK_C et PK_D, dont la structure reste à confirmer.

Au cours de nos travaux sur ***Monadenium lugardiae***, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires à partir d'un extrait chloroformique de tiges. Deux composés déjà connus, mais jamais décrits dans cette espèce, ont été isolés. Il s'agit de deux diterpénoïdes lactoniques, le 17-hydroxyjolkinolide B et le helioscopinolide F.

La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie sur colonne de silice, chromatographie liquide de haute performance (CLHP)) et liquide-liquide, chromatographie de partage centrifuge (CPC).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie infrarouge (IR) la spectroscopie de masse (SM), la cristallographie (rayons-X) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN).

Pour la spectroscopie RMN, les techniques monodimensionnelles (^{1}H, ^{13}C, DEPT, Jmod) et bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC) auxquelles nous avons fait appel, nous ont permis

de réaliser la détermination structurale définitive et sans équivoque de la plupart des métabolites secondaires isolés, qui ont ensuite été confirmés par diffraction des rayons X.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Poursuivre la purification d'autres métabolites secondaires des espèces *M. lugardiae* et de *P. kaurabassana* contenus dans les extraits.

- Etudier les activités biologiques de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmer les propriétés pharmacologiques attribuées à cette plante par les tradipraticiens mozambicains.

Résumé :

Les travaux menés dans cette thèse s'inscrivent dans une démarche ethno-pharmacologique visant à valoriser des plantes utilisées traditionnellement en médecine au Mozambique. Cette étude a comme but principal d'apporter des éléments chimio taxonomiques concernant des espèces végétales peu décrites et de préciser la composition métabolique de parties de plante utilisées en médecine traditionnelle, pour aboutir potentiellement à de nouvelles molécules utilisables en thérapeutique. Le travail est ainsi découpé en trois parties distinctes, chacune portant sur une plante différente.

La **Partie 1**présente l'étude phyto-chimique des racines sèches de *Ptaeroxylon obliquum* Radlk (Rutaceae). L'étude phyto-chimique de l'extrait chloroformique des racines de *P. obliquum* a permis l'isolement de cinq composés appartenant à la famille des coumarines ou de chromones dont un totalement original : un meroterpène de type chromone, le Ptaerobliquol. Les structures de ces composés ont été élucidées par différentes techniques analytiques de pointes (RMN, Spectrométrie de masse) et diffraction des rayons X.

La **Partie 2** porte sur l'étude phyto-chimique des écorces de tubercules de *Pyrenacantha kaurabassana* (Icacinaceae). Cette plante n'a été que très peu étudiée d'un point de vue phytochimique. Un criblage des métabolites présents a été réalisé, montrant la présence prépondérente de composés de la famille des quinones et des flavonoïdes. Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle des écorces de tubercule a abouti à l'isolement et l'identification de 4 métabolites, dont 2 totalement originaux, appartenant à la famille des xanthones.

Enfin la **Partie 3** porte sur l'étude phytochimique des tiges de *Monadenium lugardiae* ou *Euphorbia lugardiae* (Euphorbiaceae). Le fractionnement de l'extrait chloroformique des tiges a permis l'isolement et l'identification de deux métabolites jamais décrits dans cette plante, le jolkinolide B, l'Hélioscopinolide F, conjointement avec la scopoletine.

Mots-clés : *P.obliquum* ; *P.kaurabassana*; *M. lugardiae* ; phyto-chimie ; chromone ; coumarine ; xanthone ; RMN.