THÈSE PRESENTÉE À L'INSTITUT DE LA VISION
POUR L'OBTENTION DU GRADE
DE
DOCTEUR EN SCIENCE DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE – PARIS 6 –
ÉCOLE DOCTORALE ED3C
Cerveau, Cognition, Comportement

Mme Alexandra Lyor BOUAZIZ

IDENTIFICATION DE METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES, PROTECTEURS DES PHOTORÉCEPTEURS À CONES POUR LE TRAITEMENT DE LA RÉTINOPATHIE PIGMENTAIRE

SOUTENUE PUBLIQUEMENT DEVANT LES MEMBRES DU JURY COMPOSÉ DE :

Dr. Isabelle DUSART	**présidente du jury**	**Université Pierre et Marie Curie**
Pr. Dominique LAURAIN-MATTAR	**rapporteur**	**Université de Lorraine**
Dr. Julien DAIROU	**rapporteur**	**Université Paris Diderot- Paris 7**
Mr. Marc LITAUDON	**examinateur**	**Institut de Chimie des Substances Naturelles**
Dr. Franck HIMBERT	**examinateur**	**GreenPharma**
Dr. Éric DUPLUS	**examinateur**	**Université Pierre et Marie Curie**
Dr. Thierry LÉVEILLARD	**directeur de thèse**	**Institut de la Vision**

AVERTISSEMENT

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction partielle ou totale de cette œuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur (Loi n° 92-597 du 01/07/1992, parue au Journal Officiel du 02/07/1992).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur José-Alain Sahel, directeur de l'Institut de la Vision de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr Thierry Léveillard mon directeur de thèse pour sa patience sans limites, son soutien, son encadrement et son enthousiasme sans commune mesure. Je lui suis reconnaissante pour l'ensemble des enseignements qu'il a su me transmettre tout au long de mon parcours. Grâce à lui j'ai eu l'honneur d'intégrer l'univers passionnant des substances naturelles et de la vision. Lorsque la molécule sera dans nos mains j'espère toujours effectuer mon voyage au Burkina Faso.

Je tiens à remercier nos collaborateurs orléanais, Philippe Bernard et Franck Himbert de Greenpharma pour m'avoir co-encadrée et initiée à l'extraction des substances naturelles. Je suis reconnaissante pour le savoir qui m'a été transmis et pour le soutien et l'investissement de l'ensemble de l'équipe à mon égard (Philippe, Émilie, Mathieu, Quoc-tuan, Florence, Sylvain, Christelle).

Je remercie mes rapporteurs et examinateurs d'avoir accepté de me relire et de m'avoir donné leur temps et leurs précieux conseils. Je remercie également les examinateurs ainsi que la présidente du jury pour leur participation et leur présence.

Je tiens à remercier tout particulièrement Géraldine Millet Puel alias GMP-Cyclique mon amie et ma plus proche collaboratrice dans ce bioguidage. Sa participation active, son investissement, son implication, sa vivacité d'esprit, son caractère combatif ainsi que ses connaissances ont amené ce projet où il en est à ce jour.

Je remercie les membres de l'équipe S7 pour leur investissement et soutien durant ma thèse : Emmanuelle Clérin pour son organisation, sa présence et son sourire, Frédéric Blond alias KBaSS man pour son soutien, son calme et sa participation au cours de ma rédaction de thèse, Vanessa Ferracane et Mei Xin pour leur contribution sur PFKFB2, et mon amie Najate Ait Ali alias Maamri pour son style et sa classe naturelle, Ram Fridlich alias toda kapara et Manuela Argentini pour le rayon de soleil qu'ils apportent au bureau, et les autres membres de l'équipe : Kristo Kole, Hawa Camara, Farah Ouechtati, Ghizlane Elachouri, Adeline, Ying Yang.

Je remercie Émeline Nandrot pour l'ensemble des fous rires et nos longues discussions sur MerTK qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie mes collègues de bureau Cataldo, Élise, Marion, Said, Miguel, Stefania, Francesco, Pavol, Sabine, Katie, Yvrick … pour leurs présences.

Merci à l'ensemble de l'Institut de la Vision qui m'a fait vivre quatre années intenses et enrichissantes. Ce fut un plaisir de travailler, collaborer et avancer avec vous vers un futur meilleur.

Je dédicace cette thèse à mes parents Léa ALLAL et Prosper BOUAZIZ pour m'avoir fourni les briques élémentaires qui ont permis de construire ce que je suis aujourd'hui.

Merci à mes frères, Isabelle et mes neveux pour m'avoir donné de grandes joies et les meilleurs moments de ma vie.

Merci à Philippe, mon frère cadet, avec qui j'ai fait mes études de biochimie et préparé mes examens.

Je remercie l'ensemble de mes amis, de leur soutien et leur contribution (Gaëlle, Selma, Loreen, Catherine, Armelle, Philippe, Hilaire, Céline, Tristan, Émeline…)

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations I

Liste des figures V

Liste des tables VIII

RESUME IX

1 INTRODUCTION 1

I.1 Origine et terrestrialisation des plantes 3

I.1.1 Coévolution et adaptation 7

I.1.2 Darwin et la théorie de l'évolution 7

I.2 Les métabolites secondaires 9

I.2.1 L'origine des métabolites secondaires 9

I.2.2 Rôles des métabolites secondaires des plantes dans les interactions plantes - herbivores 13

I.2.3 Les métabolites secondaires : classification, propriétés chimiques et biologiques 19

I.2.3.1 Les composés phénoliques 19

I.2.3.1.1 Synthèse des composés phénoliques par la voie des shikimates 19

I.2.3.1.2 Les acides phénoliques 21

I.2.3.1.3 Biosynthèse des acides phénoliques 21

I.2.3.1.4 Rôle des acides phénoliques 21

I.2.3.1.5 Les flavonoïdes et flavanoïdes 24

I.2.3.1.5.1 Biosynthèse des flavonoïdes et des flavanoïdes 24

I.2.3.1.5.2 Rôle des flavonoïdes et des flavanoïdes 27

I.2.3.1.6 Les stilbénoïdes 29

I.2.3.1.6.1 Biosynthèse des stilbénoïdes 29

I.2.3.1.6.2 Rôle des stilbénoïdes 29

I.2.3.1.7 Les tanins 31

I.2.3.1.7.1 Biosynthèse des tanins 31

I.2.3.1.7.2 Rôle des tanins 31

I.2.3.1.8 Les lignines 33

I.2.3.1.8.1 Biosynthèse des lignines 33
I.2.3.1.8.2 Rôle des lignines 33
I.2.3.2 Les terpénoides 35
I.2.3.2.1 Voies de synthèse des terpénoïdes 37
I.2.3.2.2 Rôle des terpénoïdes 37
I.2.3.2.2.1 Monoterpènes 37
I.2.3.2.2.2 Sesquiterpénoïdes 40
I.2.3.2.2.3 Diterpènes ou les biterpénoïdes 45
I.2.3.2.2.4 Triterpénoïdes 45
I.2.3.2.2.5 Tetraterpénoïdes 47
I.2.3.2.2.6 Polyterpénoïdes 47
I.2.3.3 Les alcaloïdes 49
I.2.3.3.1 Voies de synthèse des alcaloïdes 49
I.2.3.3.2 Rôle des alcaloïdes 55
I.3 L'ethnopharmacologie 55
I.3.1 Utilisation instinctive des plantes 55
I.3.2 Usage de plantes médicinales depuis l'homme de Néandertal 56
I.3.3 Évolution de la pharmacopée au cours de l'histoire 56
I.3.4 Isolation de la quinine 60
I.3.5 Isolation d'un anti-cancéreux par criblage : la vinblastine 62
I.3.6 Industrialisation du procédé d'extraction 64
I.4 La rétine 65
I.4.1 Anatomie de la rétine neurale 65
I.4.2 Les Photorécepteurs 67
I.4.3 Phototransduction 69
I.4.4 L'épithélium pigmentaire rétinien 69
I.5 La rétinopathie pigmentaire 71
I.5.1 Génétique de la rétinopathie pigmentaire 71

I.5.2 Approches thérapeutiques de la rétinopathie pigmentaire 72

II Matériels et Méthodes 79

II.1 Préparation d'extraits de plantes médicinales 81

II.1.1 Fabrication d'extraits méthanol polyamide, acétate éthyle, acétate éthyle appauvri et méthanol appauvri 81

II.1.2 Fabrication d'un extrait méthanol polyamide à plus grande échelle. 83

II.1.2.1 Extrait méthanol polyamide 83

II.1.2.2 Extrait charbon 85

II.2 Préparation des cultures enrichies en cônes d'embryons de poulet 85

II.3 Test des extraits et fractions de plantes médicinales sur les cônes de la souris *rd1* . 87

II.4 Fractionnement bioguidé des molécules actives contenues dans les extraits de plantes médicinales 89

II.4.1 L'extraction en phase solide 89

II.4.2 Analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance 91

II.5 Analyse par spectrométrie de masse 92

II.6 Production en masse de fractions actives d'*Uvaria chamae* 95

II.7 Optimisation du procédé de fabrication et caractérisation des métabolites 96

II.7.1 Extraction liquide-liquide des fractions polaires alcaloïdes et apolaires de la fraction d'*Uvaria chamae UcAC*3F8 96

II.7.2 Ultrafiltration de la fraction d'*Uvaria chamae Uc*SUCF1 98

II.7.3 Ultracentrifugation de la fraction d'*Uvaria chamae Uc*SUCF1 98

II.7.4 Protéolyse de la fraction d'*Uvaria chamae Uc*SUCF1 98

II.7.5 Déglycosylation des fractions d'*Uvaria chamae Uc*SUCF2 et *UcAC*3F8f3S4 98

II.8 Identification de la cible et de la voie de signalisation 99

II.8.1 Étude de compétitivité entre les domaines extracellulaires exBSG1 et les sous-fractions actives 99

II.8.2 Chromatographie par affinité exBSG1 de la fraction *UcAC*3F8f3S4 99

II.8.3 Essai d'incorporation de glucose en présence des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 100

II.8.4 Étude de l'expression de PFKFB2 dans la rétine de la souris 100
III RESULTATS 103
III.1 Les plantes comme source de molécules biologiquement actives 105
III.2 Méthodes de criblages 105
III.2.1 Comparaison des deux méthodes 105
III.2.2 Avantage du criblage à haut contenu dans l'isolation d'un facteur trophique ..107
III.3 Preuve de concept : Deux plantes médicinales à activité protectrice des cônes 107
III.3.1 *Ruta graveolens* 109
III.3.2 Lycium barbarum 113
III.4 Criblage à haut contenu (HCS) d'une extraithèque de 200 plantes 119
III.4.1 Étude de la biodiversité de l'extraithèque 119
III.4.2 Optimisation des conditions du HCS et des cultures enrichies en cônes 123
III.4.3 Analyse des résultats 126
III.4.3.1 Critères de classification des plantes 126
III.4.3.2 Prioritisation des plantes à fractionner 130
III.4.3.2.1 Exemple de *Wendlandia glabrata* 130
III.4.3.2.2 Fractionnement bioguidé d'*Uvaria chamae* 139
III.4.3.3 Uvaria chamae 139
III.4.3.3.1 Descriptions botaniques 139
III.4.3.3.2 Récolte, préparation et obtention de la fraction *UcAC*3 143
III.4.3.3.3 Analyse de la fraction *UcAC*3 143
III.4.3.3.3.1 Purification de la molécule active d'*UcAC*3 par RP-HPLC 143
III.4.3.3.3.2 Validation de l'activité trophique d'*UcAC*3F8 148
III.4.4 Mise en évidence de l'activité trophique de la fraction *UcAC*3F8 d'*Uvaria chamae* sur un modèle animal de rétinopathie pigmentaire 154
III.4.5 Analyse de la fraction *UcAC*3F8 par spectrométrie de masse 154
III.4.6 Analyse chimique de la fraction *UcAC*3F8 160
III.4.7 Fractionnement HPLC d'*UcAC*3F8 en trois fractions *UcAC*3F8f1, 2 et 3 164

III.4.8 Fractionnement HPLC d'*UcAC*3F8f3 en huit fractions *UcAC*3F8f3S1 à *UcAC*3F8f3S8 164

III.4.9 Fractionnement de la fraction *UcAC*3F8f3S2 168

III.4.10 Fractionnement de la fraction *UcAC*3F8f3S4 174

III.4.11 Bilan des masses obtenues des fractions actives *UcAC*3F8f3S2 (A2-A3) et *UcAC*3F8f3S2B4 178

III.5 Scale up 181

III.5.1 Production d'extraits actifs à partir de 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae* 181

III.5.1.1 Approvisionnement, validation biologique et affinage du scale up 181

III.5.1.2 Validation biologique de l'extrait UcSUC..... 183

III.5.1.3 Fractionnement et validation d'UcSUC en pilote et passage à l'échelle scale up 183

III.5.1.4 Bilan du processus de « scale up » 190

III.6 *Uvaria chamae* et la signalisation du facteur trophique RdCVF 190

III.7 Caractérisation du métabolite actif sur la survie 204

III.7.1 Séparation par taille des fractions actives d'*Uvaria chamae* 204

III.7.2 Effet de la déglycosylation 209

IV Discussion et Perspectives 213

IV.1 Où en sommes-nous? 213

IV.2 Où allons-nous? 218

V Bibliographie 222

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA : Acide Abscissique

ACT-B : Anticorps monoclonal anti-actine-B

ACS : American chemical society

ABA : Acide Abscissique

ACS : American chemical society

ACT-B : Anticorps monoclonal anti-actine-B

AD: Alzheimer disease

ADN : Acide di nucléotidique

ADNc : ADN complémentaire

AE : Acétate d'éthyle

AEA : Acétate d'éthyle appauvri

AGP: Arabinogalactoprotéines

AMM: Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messager

ASE : Accelerated Solvent Extraction (extraction accélérée par solvant)

ATP : adénosine triphosphate

BAK1: Brassinosteroid Associated receptor Kinase-1

BRI1 : Brassinosteroid Insensitive-1

BSG1 : basigin protéine transmembranaire isoforme 1(ou CD147)

CAS : Chemical abstracts service

CCD: charge-coupled device

CCSRC : Centre national de chimiothérapie anticancéreuse

CHS : Chalcone synthétase

CNRS: Centre National de Recherché Scientifique

CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor

Da : Daltons

DEDL: détecteur évaporatif à diffusion de lumière

DMAPP : Diméthylallyl-pyrophosphate

DMEM: Dulbecco modified Eagle medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ECL: Enhanced chemoluminescence

EdCVF : Epithelium-derived cone viability factor

ENSAIA: École nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires

EP/AE: éther de pétrole / acétate d'éthyle

EPHE : École pratique des hautes études

EPR : Épithélium Pigmentaire Rétinien

ERG: Électrorétinogramme

ESI : Electrospray ionisation

ExBSG: basigin protéine transmembranaire isoforme 1 soluble

F26BP: fructose 2,6-bisphosphate

FFB : Foundation fighting blindness

FRET: fluorescence resonance energy transfer

FV: Facteur de viabilité

GDNF : Glial cell line Derived Neurotrophic Factor

GID1 : Gibbérelline Insensitive Dwarf-1

GLUT1 : glucose transporter 1

GPS : Global positioning system

GST : Glutathione-S-transferase

HCS : Criblage à haut contenu (High content screening)

HK : Hexokinase

Hk2: ARNm de l'hexokinase 2

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance

HTS: High throughput screening (ou criblage a haut débit)

IPP : Isopentényl pyrophosphate

J.C : Jésus Christ

KBaSS : Knowledge Base for Sensory Systems (développé à l'Institut de la Vision)

LBP: liposaccharide binding protein

MA : Méthanol appauvri

Ma : Millions d'années

Malonyl CoA : malonyl-coenzyme A

mAu : milli unités d'absorbance

MCCD : Milieu de composition chimique défini

MP : Méthanol polyamide

MPC: transporteurs mitochondriaux du pyruvate

MS : Spectromètre de masse

NCI : National Cancer Institute

ND : non déterminé

Ni-NTA : chromatographie d'affinité résine d'agarose -acide nitrolotriacétique (NTA) -nickel(Ni)

Nxnl1: Gene nucleoredoxin-like 1

Nxnl2: Gene nucleoredoxin-like 2

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PAL : Phénylalanine ammonia-lyase

PBS : Phosphate Buffer Saline

p-coumaroyl-CoA : Coumaroyl-coenzyme A

PES : Polyéther sulfone

PFA : Paraformaldéhyde

PFK: phosphofructokinase

PFKFB2 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases isoforme 2.

Pfkfb2 : ARNm du 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2

PFKFB2: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase

PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases isoforme 3.

PMSF: Fluorure de phénylméthylsulfonyle

PN21: Post natal 21 jours.

PN35 : Post natal 35 jours.

PNA: Peanuts agglutinines

PR: Photorécepteurs

rd1 : mutation sur la phosphodiestérase des photorécepteurs à bâtonnets induisant la dégénérescence

RdCVF : Rod-derived Cone Viability Factor

RdCVFc : Rod-derived Cone Viability Factor forme courte

RdCVFL : Rod-derived Cone Viability Factor forme longue

Re : Récepteurs aux estrogènes

RE : Rendement d'extraction

RhO : *Rhodopsine*

RP : Rétinopathie pigmentaire

Rpm: Rotation par minute

RTI: Research Triangle Institute

SAB : Sérum albumine bovine

SiRNA: short interfering RNA (ARN intefrants)

SM : Spectrométrie de masse

SNRK2 : Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2

SPE : Solide phase extraction (extraction sur phase solide)

SPM : Élément mobile

TAU : Tubules Associated Unit (Protéine associée aux microtubules)

TLCK: Tosyllysil chloromethyl ketone hydrochloride

Tm : Toxicité maximale

tR : Temps de rétention

***Uc*MP :** Extrait méthanol d'*Uvaria chamae*

UK5099 : Acide 2-cyano-3-(1-phényl-1H-indol-3-yl)-2-propénoïque

Ultraviolet A et B : UV-A et B

USDA : Ministère de l'agriculture des États-Unis

VAA: Virus adéno-associé

VISI : Visinine

***Wg*C1, *Wg*C2, *Wg*C3 :** *Wendlandia glabrata* collecte 1, 2 et 3.

Wt : Wild-type

2-NBDG : 2-N-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Amino-2-Deoxyglucose

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les algues vertes selon Ernst Haeckel en 1904.
Figure 2 : Évolution de la vie dans un contexte géologique.
Figure 3 : Émergence des premières plantes et colonisation de la terre.
Figure 4 : Illustration d'une forêt marécageuse à charbon de la fin du Carbonifère.
Figure 5 : Gregor Mendel.
Figure 6 : Géographie de dispersion et caractéristiques des plantes.
Figure 7 : Diversité des Pytoestrogènes.
Figure 8 : Allélopathie interactions et molécules.
Figure 9 : Cycle allélopathique du chaparral californien.
Figure 10 : Structure chimique et représentation de la surface électrostatique de la molécule de phénol.
Figure 11: Voie du shikimate.
Figure 12 : La Phénylalanine Ammonia-Lyase PAL.
Figure 13 : Structures chimiques des acides phénoliques.
Figure 14 : Classification des flavonoïdes.
Figure 15 : Voie de synthèse des flavonoïdes et son contrôle par ARN interférence.
Figure 16 : Les transposons et le contrôle de l'expression de la chalcone synthétase chez le maïs.
Figure 17 : Propriété phytoalexinique des stibénoïdes.
Figure 18 : Le chimiste allemand Emil Fischer.
Figure 19 : Tanins hydrolysables et condensés.
Figure 20 : Les différents types de lignines produits par couplage oxydatifs d'alcools.
Figure 21: La voie de biosynthèse des terpènoïdes.
Figure 22 : Diversification et cyclisation des térpènoïdes.
Figure 23 : Rôle biologique du myrcène dans la pollinisation.
Figure 24 : La défense des plantes contre les herbivores via l'attraction d'un prédateur.
Figure 25 : Les biterpènoïdes.
Figure 26 : La signalisation des gibbérellines.
Figure 27 : La signalisation des brassinostéroïdes.
Figure 28 : L'acide abscissique.
Figure 29 : a. Le cis-1,4-polyisoprène donne sa texture au latex.
Figure 30 : Proto-alcaloïdes et pseudo-alcaloïdes.
Figure 31 : Classification structurale des alcaloïdes.
Figure 32 : Accumulation d'alcaloïdes dans divers tissus végétaux.
Figure 33 : Évidence de l'utilisation de plantes thérapeutiques et psychotropes durant la préhistoire.
Figure 34 : Le mal des ardents ou feu de Saint Antoine.
Figure 35 : La renaissance signe une ouverture d'esprit.
Figure 36 : La quinine.
Figure 37 : La vinblastine.
Figure 38 : La rétine.
Figure 39 : Morphologie des bâtonnets et des cônes.
Figure 40 : Fonction de l'épithélium pigmenté rétinien.
Figure 41 : Identification de RdCVF par criblage haut contenu d'une banque d'expression sur un modèle de cultures primaires enrichies en cônes.
Figure 42 : Relation structuro-fonctionnelle du gène Nxnl1.
Figure 43 : Les embryons de poulets.
Figure 44 : Fabrication d'extraits par « Accelerated Solvent Extraction ».
Figure 45 : L'extraction en phase solide (SPE).
Figure 46 : Composants du système RP-HPLC.
Figure 47 : Principe de l'électronébulisation de l'analyse par spectrométrie de masse des métabolites contenu dans les fractions actives.
Figure 48 : Nomenclature de fractionnement de la plante *Uvaria chamae*.
Figure 49 : Obtention des factions polaires, apolaires et alcaloïdes de la plante *Uvaria chamae* par extraction liquide liquide.
Figure 50 : Les plantes comme source de molécules biologiquement actives.
Figure 51 : Caractéristiques du criblage haut contenu (HCS) et du criblage haut débit (HTS).
Figure 52 : Neuroprotection des cônes des extraits de feuilles de *Ruta graveolens*.
Figure 53 : Comparaison de l'effet trophique de trois différentes espèces de *Ruta*.

Figure 54 : Effet trophique de *Ruta montana* sur les cônes d'un modèle animal de rétinopathie pigmentaire, la souris rd1.
Figure 55 : Identification d'une activité trophique envers les cônes dans deux extraits différents de *Fructus barbarum.*
Figure 56 : Mise en évidence de l'effet protecteur de l'extrait de *Fructus barbarum* extrait par de l'acétate d'éthyle sur la morphologie des cônes.
Figure 57 : Absence d'effet de la zéaxanthine et de la lutéine sur la survie des cônes *in vitro*.
Figure 58 : Fractionnement de l'extrait acétate éthyle de *Fructus barbarum*.
Figure 59 : Absence d'activité biologique des extraits de *Fructus barbarum* préparés à l'acétate d'éthyle et issus de cinq nouveaux lots de diverses origines.
Figure 60 : Caractéristiques de l'extraithèque utilisée lors du criblage haut contenu.
Figure 61 : Spécificités des cultures enrichies en cônes préparées à partir de rétine d'embryons de poulet.
Figure 62 : Plan des plaques 96 puits pour le criblage haut contenu.
Figure 63 : Paramètres d'analyse des résultats du criblage haut contenu.
Figure 64 : *Helicteres hirsuta.*
Figure 65 : Représentation des effets toxiques des extraits lors du criblage des 800 extraits de plantes médicinales, représentant un total de 12 800 essais.
Figure 66 : Classement des 30 plantes positives selon leur facteur moyen de viabilité et de la présence d'une activité toxique à 100 µg/ml.
Figure 67 : Phylogénie des plantes criblées et des plantes positives identifiées.
Figure 68 : Validation de l'effet protecteur des extraits de *Wendlandia glabrata*.
Figure 69 : Fractionnement de l'extrait méthanol appauvri de *Wendlandia glabrata.*
Figure 70 : Activité trophique des fractions issues de l'extraction sur phase solide (SPE) de *Wendlandia glabrata.*
Figure 71 : *Uvaria chamae*.
Figure 72 : Extraction des métabolites secondaires des feuilles d'*Uvaria chamae* et validation biologique.
Figure 73: Fractionnement en phase solide (SPE) de l'extrait méthanol polyamide (*Uc*MP) d'*Uvaria chamae*.
Figure 74: La fraction *UcAC*3 d'*Uvaria chamae* protège les cônes de manière dose dépendante entre 0,5 et 3 µg/ml.
Figure 75 : Principe de la purification des molécules actives contenues dans les feuilles d'*Uvaria chamae*.
Figure 76 : Optimisation du gradient de fractionnement d'*UcAC*3.
Figure 77 : Mise au point du gradient de fractionnement HPLC semi préparatif de la sous fraction *UcAC*3.
Figure 78 : Effet des 8 fractions issues du fractionnement d'*UcAC*3 sur la viabilité des photorécepteurs à cônes.
Figure 79 : Effet combinatoire des fractions *UcAC*3F1-F8 sur la viabilité des photorécepteurs.
Figure 80 : Effet dose-réponse des fractions *UcAC*3F1, *UcAC*3F7 et *UcAC*3F8 sur la survie des cônes.
Figure 81: Effet dose de la fraction *UcAC*3F8 sur la viabilité des cônes.
Figure 82 : Effet trophique de la fraction UcAC3F8 d'*Uvaria chamae* sur les cônes de la souris rd1.
Figure 83: Analyse par spectrométrie de masse de la fraction *UcAC*3F8 d'*Uvaria chamae*.
Figure 84 : Fractionnement liquide-liquide de la fraction *UcAC*3F8.
Figure 85 : Optimisation du gradient de fractionnement d'*UcAC*3F8.
Figure 86 : Activité trophique des fractions UcAC3F8f1, *UcAC*3F8f3 et *UcAC*3F8f3.
Figure 87 : Effet de la fraction UcAC3F8f3 d'*Uvaria chamae* sur la morphologie des cônes.
Figure 88 : Activité trophique des fractions UcAC3F8f3S1 à UcAC3F8f3S8 d'*Uvaria chamae.*
Figure 89 : Absence de synergie des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4.
Figure 90 : Hypothèse expliquant l'activité biologique portée par les fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4.
Figure 91 : Validation biologique de la nouvelle préparation de la fraction *Uc*MP.
Figure 92 : Activité trophique des fractions UcAC3F8f3S2A1 à UcAC3F8f3S2A8 d'*Uvaria chamae.*
Figure 93 : Profils chromatographiques comparatifs entre *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S2A3.
Figure 94 : Effets de la fraction UcAC3F8f3A3 sur la survie et morphologie des cônes.
Figure 95 : Fractionnement d'UcAC3F8f3S4 en UcAC3F8f3S4B1 à *UcAC*3F8f3S4B8 d'*Uvaria chamae***.**
Figure 96 : Activité trophique des fractions UcAC3F8f3S4B2, UcAC3F8f3S4B3 et UcAC3F8f3S4B4**.**
Figure 97 : Effet combinatoire des fractions UcAC3F8f3S2A2 UcAC3F8f3S2A3 et UcAC3F8f3S4B4.
Figure 98 : Validation des effets trophiques des 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae* en provenance du Burkina Faso.
Figure 99 : Mise en place du processus de « Scale up ».
Figure 100 : Fractionnement de l'extrait *Uc*SUCF1 suivant la solubilité dans l'eau et le poids moléculaire apparent**.**
Figure 101 : Mise en place du ratio de dilution optimal des insolubles *Uc*SUCF1InR1 à *Uc*SUCF1InR4.
Figure 102 : Fractionnement par chromatographie HPLC de la fraction *Uc*SUCF1InR4 en *Uc*SUCF1InR4D1 à *Uc*SUCF1InR4D7.
Figure 103 : Profils chromatographiques comparatifs des fractions *UcAC*3F8f3 et *Uc*SUCF1In4D7.
Figure 104 : La signalisation RdCVF.
Figure 105 : Inhibition de l'activité trophique d'*Uvaria chamae* par l'oxamate de sodium.
Figure 106 : Effet de l'oxamate sur l'activité trophique d'*Annona senegalensis* et de *Zanthoxylum zanthoxyloide.*
Figure 107 : Action de l'inhibiteur du transporteur mitochondrial du pyruvate (UK5099) sur l'activité trophique d'*Uc*SUCF1.

Figure 108 : Induction de l'incorporation du glucose par la fraction *UcAC*3F8f3S2 et S4.
Figure 109 : Test de l'implication de BSG1 dans l'effet trophique des fractions d'*Uvaria chamae*.
Figure 110 : La glycolyse aérobie lors de la différenciation des photorécepteurs chez la souris.
Figure 111 : Expression de PFKFB2 dans des rétine de souris wt et *rd.*
Figure 112 : Ultrafiltration des fractions du « scale up » *Uc*SUCF1 et des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 sur filtre de 3 kDa.
Figure 113 : Ultrafiltration d*'Uc*SUCF1 avec des filtres d'exclusion de taille de 3, 10, 30, 100 kDa.
Figure 114 : Ultracentrifugation de la fraction UcSUCF1.
Figure 115 : Effet de la déglycosylation des fractions UcMCPC3F8f3S4 et UcSUCF1 sur la survie des cônes**.**
Figure 116 : Différence du mécanisme de renouvellement des segments externes des bâtonnets et les cônes**.**
Figure 117 : Nombre de termes médicaux associés aux plantes de l'extraithèque criblée.
Figure 118 : Répartition géographique des plantes apparentées à *Uvaria chamae.*
Figure 119 : Les magnoliacées comme source potentielle de métabolites secondaires trophiques pour les études précliniques.

LISTE DES TABLES

Table 1 : Métabolites secondaires impliqués dans les interactions plantes-animaux.
Table 2 : Cycles d'extraction par la méthode « accelerated solvent extraction »
Table 3 : Inventaire des 200 plantes utilisées pour la préparation des 800 extraits
Table 4 : Les trente plantes positives du criblage haut contenu.
Table 5 : Les caractéristiques des sept plantes sélectionnées pour le fractionnement.
Table 6 : Résultats des essais de fractionnement par extraction en phase solide des sept plantes selectionnées.
Table 7 : Molécules identifiées dans la fraction *Uc*Ac3F8 d'*Uvaria chamae* par spectrométrie de masse.
Table 8 : Liste des masses des fractions *Uc*Ac3F8f3s2, *Uc*Ac3F8f3s4, *Uc*Ac3F8f3s2a3 et *Uc*Apc3F8f3s4b4 (m/z pour z = 1).
Table 9 : Simulation des étapes de purification et de la quantité de matériel biologique nécessaire à la caractérisation des molécules actives contenues dans les feuilles d'*Uvaria chamae*.
Table 10: Bilan du fractionnement de 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae*.

RÉSUMÉ

Une proportion significative des 57 gènes responsables de la rétinopathie pigmentaire (RP), la dégénérescence rétinienne héréditaire la plus commune est exprimée sélectivement par les bâtonnets. Chez la plupart des mammifères, dont l'homme, les bâtonnets représentent 95% des photorécepteurs, les 5% restant étant des cônes. Les bâtonnets n'ont qu'un rôle accessoire à la vision utile qui est tributaire très largement des photorécepteurs à cônes. Ceci n'explique donc pas directement pourquoi les cônes dégénèrent après les bâtonnets dans une seconde phase débilitante et incurable de cette pathologie cécitante.

Le gène *NXNL1* code pour le facteur de survie des cônes RdCVF et aussi, par épissage alternatif, pour la thiorédoxine RdCVFL. Il est exprimé sélectivement par les photorécepteurs. RdCVF est normalement sécrété et protège les cônes et leur fonction en activant un récepteur à leur surface. La mutation causale entrainant la mort des bâtonnets dans la RP provoque donc une réduction importante de la concentration rétinienne de RdCVF. Ceci est dommageable aux cônes qui ne sont plus protégés et dégénérèrent. L'administration de RdCVF est destinée à inverser ce dernier phénomène et ainsi maintenir la vision centrale chez les patients atteints de RP, indépendamment du gène causal.

Nous avons mis à profit la technologie de criblage à haut contenu sur des cultures primaires enrichies en cônes ayant conduit à l'identification de RdCVF par clonage par expression pour identifier, parmi une collection d'extraits de plantes utilisées en médecine traditionnelle, des métabolites secondaires ayant la capacité de promouvoir la survie des cônes. Ceux-ci serviraient à développer une seconde génération d'agents thérapeutiques pour le traitement de la RP.

Le criblage de 800 extraits a conduit à l'identification de 30 plantes ayant une activité protectrice des cônes. Nous nous sommes concentrés sur les métabolites secondaires des feuilles d'une annonacée, *Uvaria chamae*, une plante médicinale originaire du Burkina Faso qui présentait une activité de survie robuste. Le fractionnement bioguidé de 5 kg d'extrait de feuilles d'*Uvaria chamae* a permis, après six étapes de purification incluant quatre chromatographies en phase inverse, la production de 140 µg d'une fraction ayant une activité spécifique très élevée. Cette quantité de matière étant jugée insuffisante pour caractériser la(es) molécule(s) active(s), nous avons réitéré le processus de purification à partir de 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae* qui ont été récoltés spécialement pour ce programme à la saison des pluies au Burkina Faso.

Ce second fractionnement a été initié par une étape quasi industrielle compte tenu de la quantité de matière traitée, et nous avons pu retrouver l'activité de survie des cônes précédemment identifiée. Après quatre étapes successives de purification menées avec succès, et en prenant en compte la quantité de matière utilisée, nous pensons être en mesure de purifier jusqu'à homogénéité et de caractériser les molécules actives. Celles-ci seront ensuite validées chez la souris modèle de la pathologie rétinienne avant d'initier des études précliniques.

À l'aide des fractions les plus actives, et en profitant des outils développés pour l'étude des mécanismes d'action du facteur trophique RdCVF, nous avons pu montrer que l'extrait d'*Uvaria chamae* induit la survie des cônes en stimulant la glycolyse aérobie, aussi connue sous le nom d'effet Warburg. Ceci a aussi pu être démontré pour une seconde annonacée issue du criblage. Cet effet ne repose pas sur le récepteur de surface de RdCVF qui active l'effet Warburg par stimulation de l'entrée du glucose à travers un de ses transporteurs, GLUT1. La(es) molécule(s) ne sont pas des molécules agonistes du récepteur de RdCVF. Il semble que l'entrée du glucose et l'effet Warburg soient stimulés par *Uvaria chamae* par interaction avec une cible intracellulaire. À l'aide de données transcriptomiques, nous avons pu mettre en évidence l'expression spécifique par les photorécepteurs d'une enzyme de la famille des 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases, PFKFB2 qui produit un activateur allostérique de la glycolyse. Les études par ARN interférence en cours devraient permettre de valider cette cible et ainsi identifier les points de convergence entre le facteur de survie RdCVF et les métabolites secondaires des extraits de feuilles d'*Uvaria chamae*.

I

INTRODUCTION

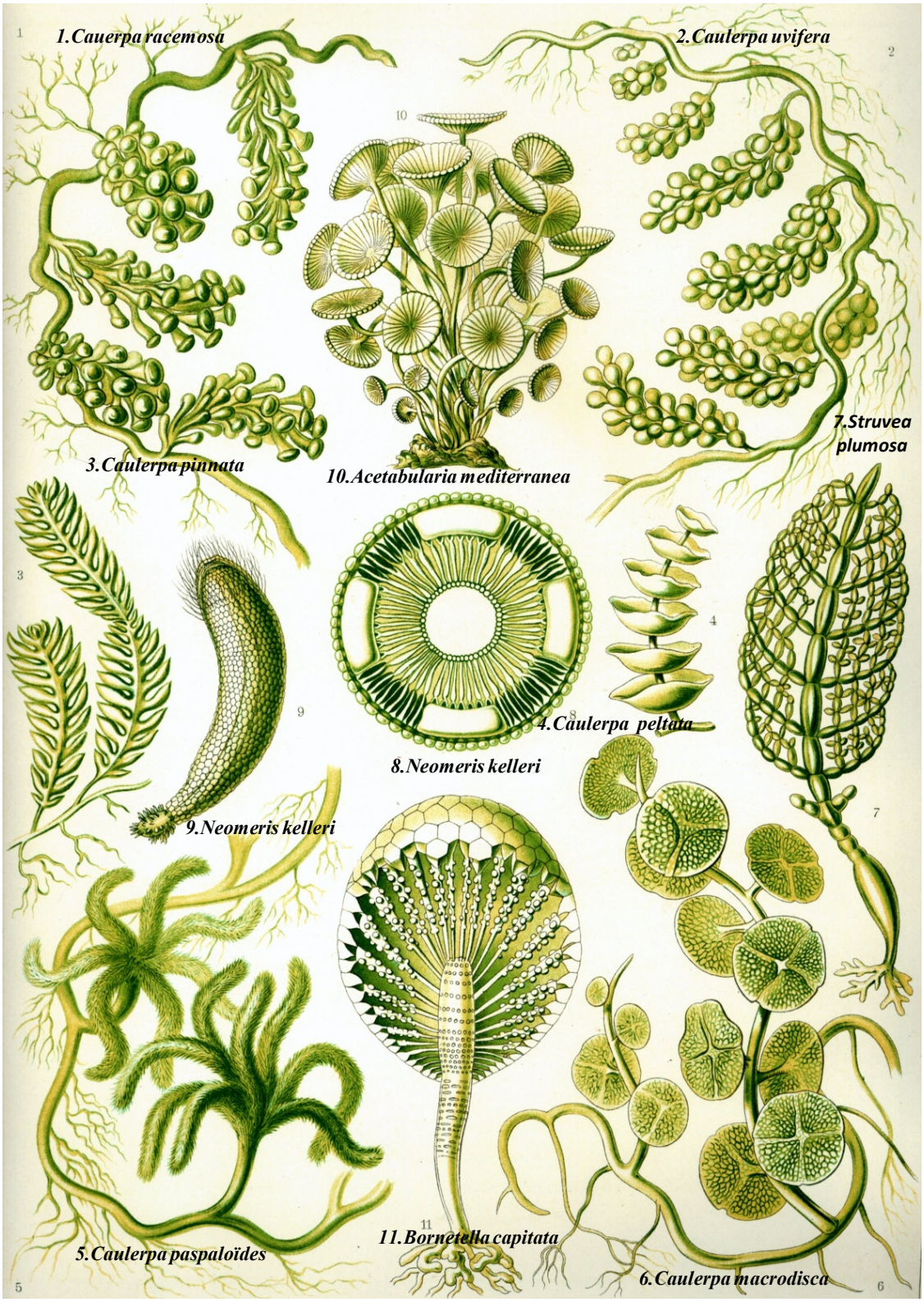


Figure 1: Les algues vertes selon Ernst Haeckel en 1904. La contribution la plus connue d'Ernst Haeckel est le concept selon lequel l'ontogenèse récapitule la phylogenèse. C'est pour illustrer clairement son propos, qu'Ernst Haeckel a clandestinement modifié les dessins d'embryons d'animaux.

I INTRODUCTION

I.1 ORIGINE ET TERRESTRIALISATION DES PLANTES

À l'origine des végétaux, une algue verte a évolué conduisant à l'apparition des premières plantes terrestres, les embryophytes (**Fig. 1**). Ce qui est communément appelé plantes vertes regroupe en réalité les plantes terrestres et les algues vertes. Les plantes terrestres sont apparues il y a plus de 446 millions d'années (Ma), au début de l'Ordovicien (Kenrick *et al.*, 2012). Il est probable que les algues vertes avaient antérieurement été émergées suivant le cycle des marées, offrant ainsi les conditions de sélection de caractères propices à la vie aérienne. Ce processus de terrestrialisation fut accompagné de l'acquisition de gamètes leur permettant de se reproduire, de tissus fonctionnels pour s'irriguer comme la lignine, ou encore de tissus protecteurs tels que les cuticules empêchant leur déshydratation lors du passage d'un milieu aquatique à un milieu aérien. A l'ère tardive Ordovicienne, les plantes ont acquis des systèmes racinaires leur permettant de puiser des ressources dans le substrat terrestre (Waters, 2003). L'apparition des plantes terrestres a modifié la composition atmosphérique qui était alors riche en méthane et en gaz carbonique. Aujourd'hui, l'intégralité de l'oxygène atmosphérique provient des organismes à photosynthèse oxygénique. Ces derniers se distinguent des organismes à photosynthèse anoxygénique, un mécanisme archaïque de production d'énergie retrouvé chez les bactéries pourpres sulfureuses. Dans ce dernier cas, la source d'électrons n'est pas l'atome d'oxygène, mais celui du fer, de l'hydrogène ou d'un ion, le sulfite d'hydrogène ou hydrogène sulfuré, H_2S. Les organismes autotrophes, par opposition aux organismes hétérotrophes, assurent la synthèse des molécules organiques carbonées essentielles à leur survie à partir de précurseurs inorganiques, un processus qui libère de l'oxygène. Les premières cellules eucaryotes effectuant la photosynthèse à oxygène apparurent après endosymbiose d'une cyanobactérie par une cellule eucaryote ancestrale (McFadden, 1999). Le taux d'oxygène dans l'atmosphère terrestre a augmenté de 1 à 2% de manière graduelle entre -2,5 et -2 milliard d'années pour atteindre sa stabilisation il y a 855 Ma. L'apparition de nombreuses espèces à photosynthèse oxygénique, telles que les algues, les mousses, et les plantes terrestres fut suivie d'une augmentation drastique de l'oxygène atmosphérique, de l'ordre de 20% (Holland, 2006) (**Fig. 2**). Cette élévation du taux atmosphérique de l'oxygène fut accompagnée par la diminution de celui du CO_2 au regard du bilan global de la photosynthèse ($CO_2 + H_2O$ + photons (γ) > $CH_2O + O_2$). L'augmentation du lessivage des roches par les intempéries, la libération d'acides organiques par les racines des plantes vasculaires, ainsi que l'accumulation de matière organique due à la décomposition des végétaux ont contribué très tôt à la formation des sols terrestres (Gensel and Edwards, 2001) (**Fig. 3**). L'augmentation de l'oxygène atmosphérique traduit l'évolution des mécanismes cellulaires et métaboliques conduisant à l'exploitation optimale de l'oxygène et du rayonnement solaire. Au cours de leur évolution, les plantes vertes ont acquis des macromolécules telles que l'hème, les quinones et les clusters ferreux permettant de fixer l'oxygène atmosphérique, mais aussi des chlorophylles et d'autres facteurs optimisant le processus de capture des photons. Ces changements climatiques, induits par la terrestrialisation des plantes vertes, furent propices à la propagation de la vie sur terre ferme, dont celle des animaux.

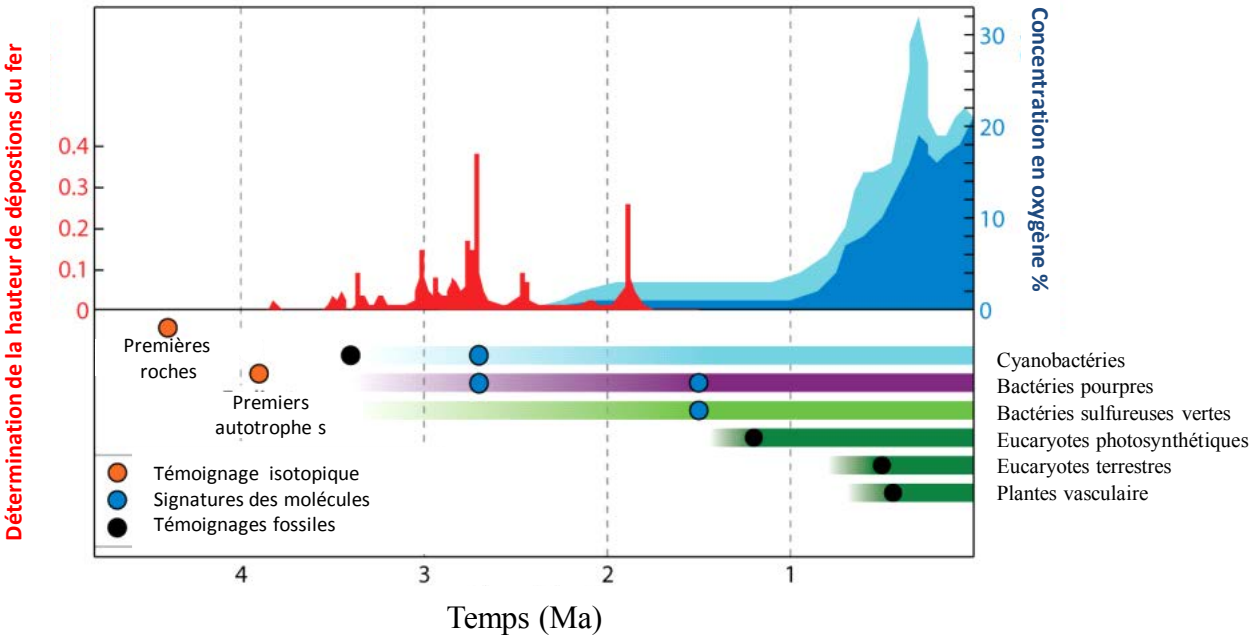


Figure 2: **Évolution de la vie dans un contexte géologique.** Emergence des organismes photosynthétiques à oxygène. Minimum et maximum en concentration d'oxygène en bleu clair et bleu foncé respectivement. En rouge, données référentielles de la déposition en fer. Adapté de Hohmann-Marriott & Blankenship, *Annu. Rev Plant Biol.* **62**, 515-48 (2011).

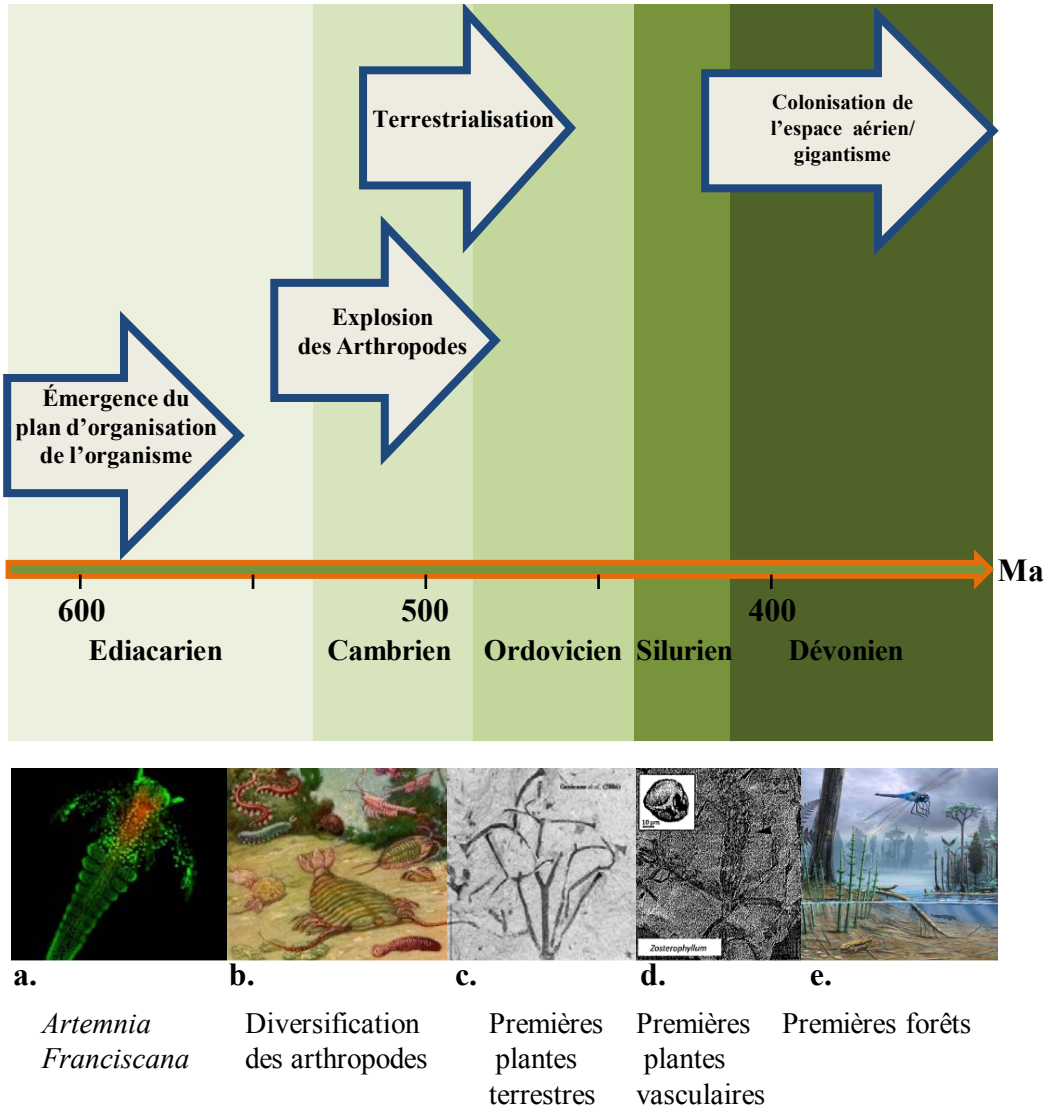


Figure 3: **Émergence des premières plantes et colonisation de la terre**. Images relatant les modifications évolutives accompagnant la terrestrialisation des plantes. **a.** *Arthemia fransciscana*, Jens Rydell & Ingela Danielsson. **b.** Peinture de Charles Knight (1940). **c.** *Cooksonia paranensis* Gerrienne et coll. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **142**, 123 (2006). **d.** Spore fossilisé de *Zosterophyllum* Diane Edwards *New Phytol.* **68**, 923 (1969). **e.** Illustration d'Alain Bénéteau (Muséum de Toulouse). Adapté de Omar Rota-Stabelli, *Current Biology* **23**, 392 (2013).



Figure 4: Illustration d'une forêt marécageuse à charbon de la fin du Carbonifère. Les plantes de gauche à droite, un arbre à calamite (Spénopsides, proches des prêles), deux cordaites (les ancêtres des conifères), une fougère arborescente, un lycopode (mousse géante pouvant atteindre 30 mètres) et un arbre des mangroves. Source: Barton et coll., 2007 Evolution, New York, NY, USA Cold Spring Harbor Laboratory Press.



Figure 5: Gregor Mendel à l'origine des lois de la transmission des gènes.

I.1.1 COÉVOLUTION ET ADAPTATION

Les arthropodes sont apparus à la frontière de l'Ediacarien et du Cambrien (-541 Ma) et se sont diversifiés tout au long du Cambrien (-541 à -485 Ma). Par la suite, les arthropodes ont colonisé la terre conjointement avec les plantes terrestres. Leur diversification a conduit à l'apparition des insectes volants et des nématodes qui pourraient être liés à l'évolution des plantes vasculaires et à l'implantation de forêts. L'une des étapes cruciales du développement des plantes terrestres fut l'acquisition de racines et de structures vasculaires permettant le transport de l'eau des racines vers les autres organes de la plante (Dolan, 2009). Il est intéressant de noter ici que l'on a retrouvé parmi les fossiles de *Cooksonia*, la première plante vasculaire datant de -425 Ma, des arthropodes s'étant nourris de celle-ci. Ces innovations ont permis l'apparition de forêts denses dans les zones humides (**Fig**. **4**). Ces forêts ont formé des masses importantes de charbon en Europe et en Amérique du nord en raison de l'accumulation de matière organique morte. Le piégeage du carbone dans les sols a produit une accumulation du surplus d'oxygène dans l'atmosphère. Sa teneur a pu atteindre 35% à certaines périodes, contre 21% aujourd'hui. Ces niveaux très élevés d'oxygène ont probablement contribué au gigantisme des arthropodes, des insectes et des amphibiens du carbonifère, animaux dont la taille est limitée par la capacité de leur appareil respiratoire à distribuer l'oxygène dans tout l'organisme (Berner, 1999; Dorrington, 2012). Ce synchronisme sous-tend une origine très ancienne des interactions complexes, négatives et positives, entre les plantes terrestres, les insectes et les nématodes qui sont sans doute le moteur, ou plus justement la pression de sélection conduisant au développement des métabolites secondaires chez les plantes.

I.1.2 DARWIN ET LA THEORIE DE L'EVOLUTION

La terrestrialisation des plantes a donc conduit à une modification importante de l'environnement abiotique et biotique, modifiant les paramètres de la pression sélective qui assure la seule survie des espèces adaptées. Bien que le processus en œuvre, la sélection naturelle, ait été mis en évidence de manière magistrale par Charles Darwin au XIXème siècle, en partie en s'inspirant de la sélection exercée par les éleveurs sur leur bétail, c'est en fait l'étude des plantes qui fut à l'origine de l'autre composante de la théorie actuelle de l'évolution, la règle de la transmission du patrimoine génétique, étudiée très patiemment par Gregor Mendel chez le petit pois (*Pisum sativum*) (**Fig**. **5**). La communication de ses travaux s'est tenue le 8 février et le 8 mars 1865 et l'œuvre majeure de Darwin a été publiée le 22 novembre 1859. Pourtant, l'intégration de la théorie de l'origine des espèces et des lois de la génétique dans la théorie moderne de l'évolution mettra longtemps à s'imposer à l'ensemble de la communauté scientifique du fait des bouleversements importants de la pensée que cette nouvelle théorie imposait (Barton, 2007). L'adaptation des végétaux à leur environnement résulte de modifications de leur patrimoine génétique (duplication, transposition, mutation et hybridation) (Staley, 2002). La biodiversité ainsi produite a donné lieu à la progression des plantes des zones humides colonisées en premier, aux habitats des hautes terres (Dolan, 2009). Mais du fait de leur incapacité à fuir leurs prédateurs, les végétaux ont mis en place une batterie de petites molécules chimiques assurant leur défense : les métabolites secondaires (Pichersky and Lewinsohn, 2011).

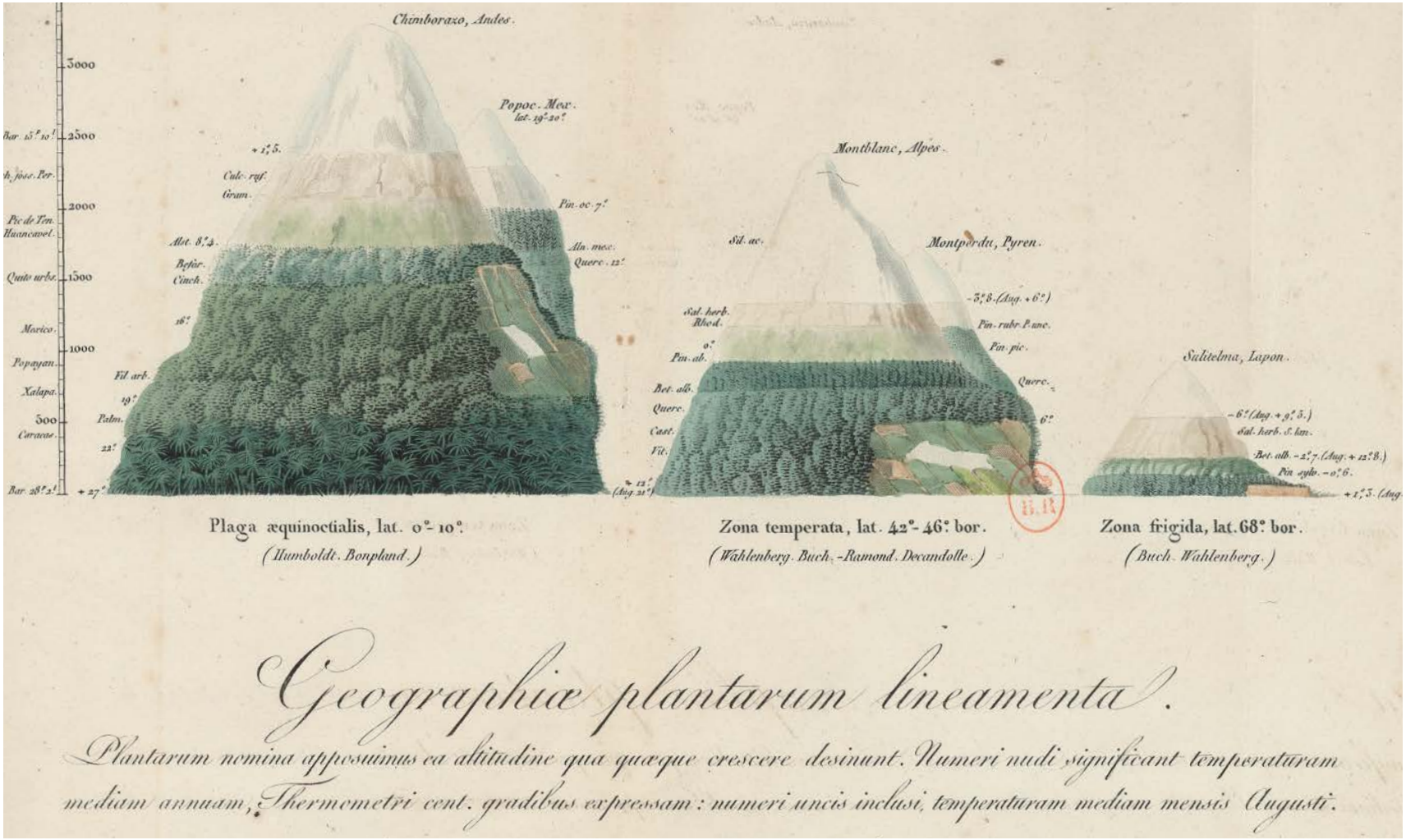


Figure 6: **Géographie des caractéristiques des plantes.** Les plantes ont été dessinées à l'altitude à laquelle elles se développent. Les chiffres non encadrés indiquent la température moyenne de l'année exprimée en degrés centigrades. Les chiffres entre crochets représentent la température moyenne au mois d'août. bnf cliché NQ-C-050227

I.2 LES MÉTABOLITES SECONDAIRES

De manière similaire aux cellules animales, et par opposition aux métabolites secondaires, les métabolites primaires regroupent les molécules synthétisées par l'organisme qui jouent un rôle direct dans les fonctions vitales comme la nutrition, la croissance et la reproduction. Constitués d'atomes tels que le carbone, l'oxygène et l'azote, les métabolites primaires sont classés en quatre grandes catégories selon leurs propriétés biochimiques: les glucides, les lipides, les acides aminés et les acides nucléiques (Kliebenstein, 2012). L'Arabette des dames (*Arabidobsis thaliana*) qui possède le plus petit génome entièrement séquencé dédie 50% de celui-ci à la synthèse des métabolites primaires. Leur nombre est estimé à 8 000 pour les espèces les plus évoluées, et dépasse rarement 10 000. En plus de leur rôle dans les processus vitaux, ces métabolites sont pour la plupart des précurseurs des voies de synthèse des métabolites secondaires.

I.2.1 L'ORIGINE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES

Le terme de métabolite secondaire a été forgé originellement par défaut, comme étant la classe des composés qui sont présents dans certaines espèces végétales et pas dans d'autres. Par conséquent ils ne peuvent pas être impliqués dans le métabolisme basal en œuvre dans chaque plante. Il est apparu ensuite clairement que ces métabolites secondaires représentent des marqueurs de l'adaptation des végétaux aux différentes conditions écologiques. Les plantes qui évoluent dans un environnement similaire ont subi la même pression de sélection. Ceci peut s'observer de par leur répartition en fonction de l'altitude et de la latitude (**Fig. 6**). Elles sont distribuées en zones de végétations apparentées depuis les pôles jusqu'à l'équateur comme l'a montré initialement le géographe Alexander von Humboldt en 1815. Le type de végétaux composant la toundra se trouvant au niveau de la mer dans l'arctique (Zona frigida, latitude 68°), se regroupent entre 800 et 1 000 mètres dans les milieux tempérés (Zona temperata, latitude 42-46°) et à plus de 1 500 mètres d'altitude dans la zone équinoxiale, près de l'équateur (Plaga aequinoctialis, latitude 0-10°). A 1 917 m d'altitude, au sommet du mont Washington dans le New Hampshire (USA), à la latitude de Bordeaux (44° Nord), le climat est celui des régions boréales situées à plus de 1 000 km au nord, comme à Fermont au nord du Québec. Le mont Washington détient le record du monde du vent le plus violent avec 372 km/h mesuré le 12 Avril 1934.

L'estimation du nombre total de métabolites secondaires dans l'ensemble du règne végétal varie de 200 000 à plus de 500 000 selon les auteurs (Mithofer and Boland, 2012; Wu and Baldwin, 2010). Chaque espèce synthétise une petite fraction du nombre total de métabolites secondaires présents dans tout le règne, La plante modèle *Arabidobsis thaliana* en synthétise par exemple entre 1 750 et 3 500. Du fait de leur diversité, et pour paraphraser la situation des immunoglobulines, ces petites molécules de faible poids moléculaire ont la potentialité d'interagir avec l'ensemble des macromolécules cellulaires. Les métabolites secondaires constituent donc une source intarissable d'agents bioactifs (Galis et al., 2010). Généralement impliquées dans les réponses adaptatives des plantes aux facteurs abiotiques de leur environnement tels que la température, l'hydrométrie, l'hygrométrie, l'exposition au rayonnement dans le spectre visible et ultraviolet (UV), la concentration en oxygène, la

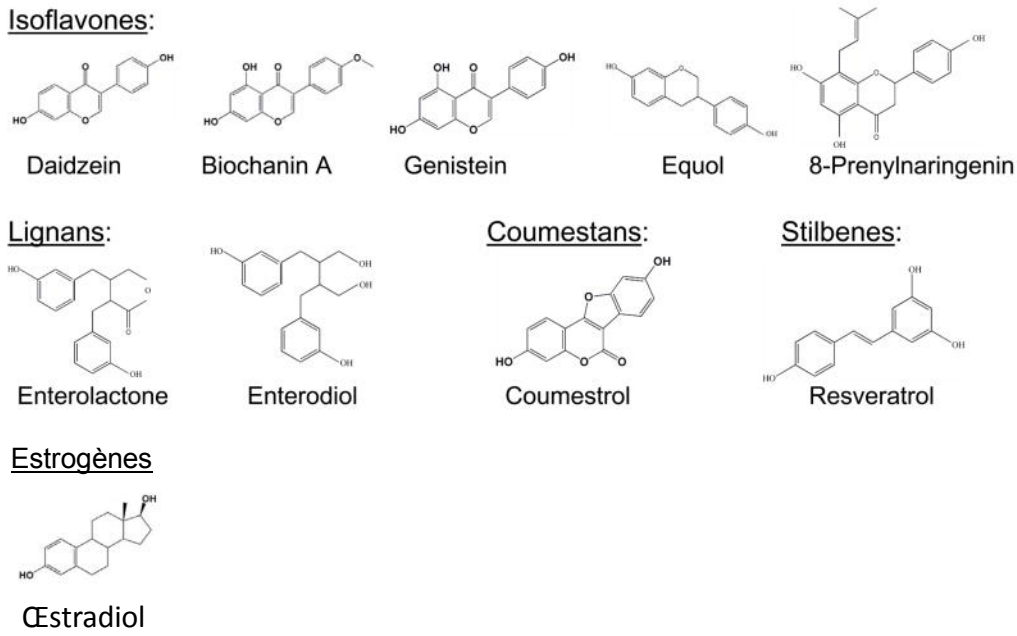


Figure 7: Comparaison de la structure de plusieurs phytoestrogènes avec celle de l'œstradiol, l'estrogène contrôlant la fertilité des femelles chez les vertébrés. Adapté de Oseni *et coll.*, *Planta Med.* **74**, 1656-65 (2008).

pression atmosphérique, etc, ces molécules jouent un rôle essentiel dans la défense contre les prédateurs des plantes, et tout particulièrement les animaux herbivores (Fraenkel, 1959). Dans cette optique, les métabolites secondaires sont tout aussi importants que les métabolites primaires pour la survie de l'espèce (Pichersky and Lewinsohn, 2011).

Les métabolites secondaires sont le produit de la sélection naturelle, Les insectes et les plantes ayant coexistés pendant 350 MA, ces dernières ont développé des mécanismes de défense efficaces. Ceux-ci sont les témoins d'une lutte comparable à la surenchère qui a accompagné le conflit atomique entre l'URSS et les Etats-Unis à la fin du siècle dernier. Un important corpus de données existe sur les molécules non comestibles et les insecticides utilisés par les plantes pour réduire la prédation par les insectes. Les plantes exercent aussi un contrôle de la reproduction des insectes et y trouvent là leur compte à plus long terme. Cette dernière interaction existe aussi entre les plantes et les vertébrés. Les phytoestrogènes sont des métabolites secondaires qui miment chimiquement les estrogènes et perturbent la reproduction des animaux. Les estrogènes, et en particulier l'estradiol, sont essentiels à la reproduction des vertébrés. Les phytoestrogènes majeurs appartiennent aux familles chimiques des isoflavones (génistéine, la daidzéine, glycitein et formononetin), des flavones (lutéoline), des coumestans (coumestrol), des stilbènes (resvératrol) et des lignanes (secoisolariciresinol, matairésinol, pinorésinol, et lariciresinol) (Moutsatsou, 2007) (**Fig**. **7**). C'est par évolution convergente que des composés différents acquièrent une même fonction. Comme leur nom l'indique, les phytoestrogènes peuvent interagir avec les récepteurs aux estrogènes (RE) qui relaient la signalisation intracellulaire en aval. L'affinité des phytoestrogènes pour les récepteurs REα et REβ est généralement faible par rapport à l'estradiol, mais ils peuvent néanmoins agir comme agonistes ou antagonistes selon que l'estradiol soit présent ou non (Shanle and Xu, 2011). Ces interactions plantes-vertébrés sont parfois génétiquement complexes faisant intervenir des modifications biochimiques par le microbiome intestinal de l'hôte comme dans le cas de l'équol qui est produite à partir de la daidzéine par l'action de la flore intestinale chez seulement 30% de la population humaine (Adlercreutz, 2002),

Table 1: MÉTABOLITES SECONDAIRES IMPLIQUÉS DANS LES INTERACTIONS PLANTES-ANIMAUX

Classes	Nombres de structures	Distribution ou répartition	Activité physiologique
Composés phénoliques			
Phénols simples	200	Toujours dans les feuilles et souvent autres organes	Antimicrobiens
Flavonoïdes	4 000	Chez les Angiospermes et gymnospermes	Coloration
Quinones	800	Répartition large mais spécifique des Rhamnacées.	Coloration
Terpénoïdes			
Monoterpènes	1 000	Composés majoritaires des huiles essentielles	Odeur plaisante
Sesquiterpènes lactones	3 000	Abondant des Astéracées, mais de plus en plus présents dans d'autres angiospermes.	Amertume, toxicité et allergénicité
Diterpènoïdes	2 000	Répartition large plus spécifiquement dans les latex et résines.	Toxicité
Saponines	600	Dans plus de 70 familles.	Hémolytique
Limonoïde	100	Rutacées, Méliacées et Simaroubacées.	Amertume, toxicité
Cucurbitacine	50	Famille des Cucurbitaceae.	Amertume
Cardénolide	150	Scrophulariaceaes, Apocynacées et Asclépiadacées,	Amertume, toxicité
Caroténoïdes	600	Dans les feuilles, parfois les fleurs et les fruits..	Coloration
Composés azotés			
Alcaloïdes	10 000	Chez les angiospermes au niveau des racines, fruits et feuilles.	Amertume, toxicité
Amines	100	Chez les angiospermes au niveau des organes floraux,	Odeur répulsive Hallucinogènes
Acides aminés (non protéiques)	400	Abondant dans les graines, mais globalement distribués.	Toxicité
Glycosides cyanogènes	40	Distribution préférentielle dans les fruits et les feuilles	Poisons (équivalent à l'acide cyanhydrique)
Glucosinolates	80	Cruciféracées et dix autres familles.	Amertume, goût piquant
Autres			
Polyacétylènes	650	Spécifiques des Astéracées et présent dans les espèces ombellifères (Apiacées).	Toxicité

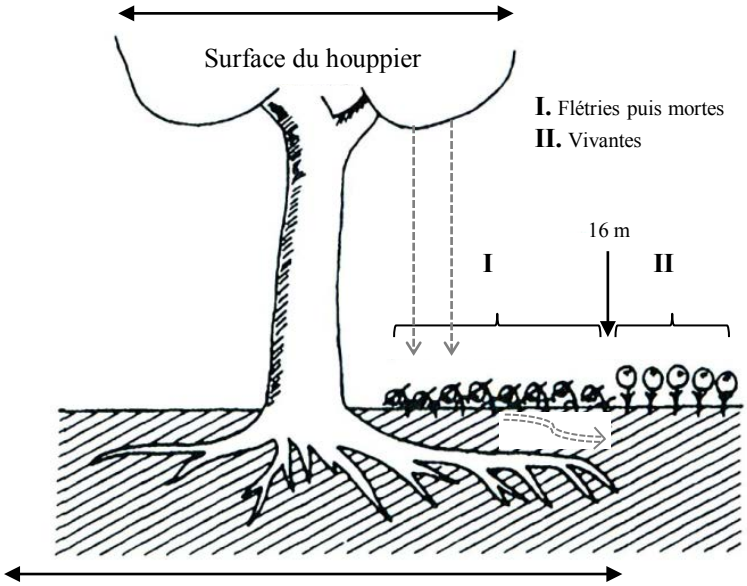
I.2.2 ROLES DES METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES DANS LES INTERACTIONS PLANTES - HERBIVORES

L'interaction des plantes avec leurs prédateurs, avec au premier plan les insectes, est le moteur de la diversité des métabolites secondaires. Selon la théorie de coévolution, formulée suite à des études de biochimie écologique, le phénomène est d'ailleurs le facteur déterminant de la diversification des plantes terrestres, mais aussi de celle des herbivores (Harborne, 1988). L'immense variété et le nombre global des métabolites secondaires correspondent donc à la non moins immense variété de relations entre les insectes herbivores et les plantes consommées par ceux-ci (Fraenkel, 1959). En effet, l'apparition des plantes à fleurs au Crétacé inférieur coïncide avec diverses adaptations morphologiques et physiologiques chez les insectes et les plantes qui signalent l'interdépendance des insectes et des plantes à fleurs. Bien que certaines des interactions entre plantes et insectes soient mutuellement bénéfiques, comme la pollinisation, l'interaction la plus courante est la prédation des plantes par les insectes et en réponse, la défense des plantes contre les insectes herbivores. Ainsi, chaque espèce de plante est la proie d'au moins une espèce d'insectes. Le mécanisme de base de défense des plantes contre les insectes résulte de la synthèse de métabolites secondaires, même en l'absence d'attaques d'herbivores. Ceci requiert la spécialisation des voies de biosynthèse de composés souvent complexes, pour répondre aux parades mises en œuvre par les insectes prédateurs (**Table 1**).

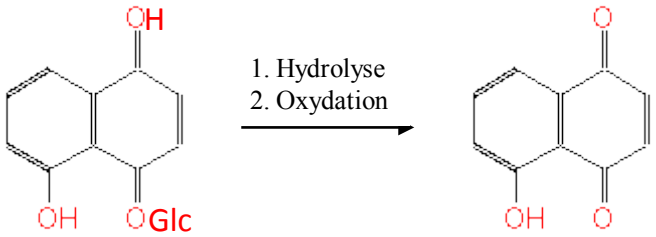
L'activité des métabolites secondaires fut mise en évidence pour la première fois par Ernest Stahl en 1888 (Hartmann, 2008). Ce chercheur étudiait les habitudes alimentaires de diverses espèces d'escargots envers des espèces végétales. Il mit en évidence une espèce d'herbivores généralistes (*Helix pomatia*) avec un régime alimentaire incluant sans distinction l'ensemble des végétaux, mais avec une nette préférence pour les plantes mortes ou bien en décomposition. Il les compara à d'autres espèces d'escargots herbivores, spécialistes de la consommation d'une espèce végétale particulière, préférablement vivante. Son trait de génie fut d'interpréter ses résultats en termes de molécules toxiques envers lesquelles les espèces spécialistes se seraient adaptées, les transformant en stimulant alimentaire. Pour donner corps à son idée de molécules répulsives, cet expérimentaliste mit en présence les herbivores généralistes avec des fractions des plantes vivantes répulsives après extraction par des solvants polaires ou apolaires. Il observa que différentes fractions avaient des effets distincts sur le comportement alimentaire de ces herbivores généralistes. Ce résultat lui permit de caractériser les activités dissuasives des extraits comme contenant des tanins ou des huiles essentielles. Il poursuivit son étude par l'observation des organes spécialisés des plantes (poils, trichomes, glandes) localisés à la surface des végétaux, et réalisa qu'ils sont en fait des organes qui favorisent la dispersion de ces molécules répulsives,

Ce n'est que 87 ans plus tard que les travaux d'Ernest Stahl furent reconnus comme pierre angulaire d'une nouvelle discipline scientifique, la chimie écologique. Celle-ci prit naissance lors de la publication du premier numéro du « Journal of Chemical Ecology » en 1975. La chimie écologique se définit comme l'ensemble des interactions d'un organisme avec son environnement abiotique et biotique (Harborne, 1993). Les plantes dans leur environnement sont en compétition avec les autres plantes de l'écosystème pour l'exposition à la lumière du soleil, l'humidité et les éléments minéraux du sol. L'interaction entre plantes impliquant la libération dans l'environnement de molécules chimiques médiatrices a été

a.



b.



4 Glucoside 1,4,5 trihydroxynaphtalene

Juglone

Figure 8: a. Représentation des effets allélopathiques du noyer (*Juglans nigra*) sur les plants de tomates. **b.** Structure du 1,4,5 trihydroxynaphtalène et la Juglone ou 5-hydroxy-1,4-n aphthoquinone résultant de son hydrolyse et de son oxydation. Adapté de Harborne, 1993

dénommée allélopathie. Le terme a donné lieu à de multiples définitions, que l'allélopathie soit restreinte aux interactions entre plantes ou bien qu'elle inclut la participation de micro-organismes du sol ou bien même d'animaux. L'allélopathie reste aujourd'hui un concept dont le rôle dans les écosystèmes est débattu (Glinwood *et al.*, 2011; Reigosa Roger *et al.*, 2006). L'exemple le plus clair d'allélopathie concerne l'effet toxique du noyer (*Juglans nigra*) sur toute une gamme de plantes de son environnement immédiat, phénomène connu depuis longtemps par les horticulteurs. Le mécanisme sous-jacent a été étudié en 1925 par Arthur Massey qui a démontré que le noyer produisait des toxines qui tuaient les plants de tomates lorsque ceux-ci se situaient à moins de seize mètres de son tronc (Harborne, 1993). L'aire de l'effet allélopathique correspond donc à la largeur du houppier (feuillage) augmentée de la surface du lixiviat, le transport de la molécule dans le sol par ruissellement (**Fig**. **8a**). Le 4-Glucoside 1,4,5 trihydroxynaphtalène est produit par les feuilles du noyer. La molécule toxique, la juglone, est ensuite obtenue après hydrolyse et oxydation dans le sol (**Fig**. **8b**).

Le chaparral californien est un exemple d'allopathie dans un écosystème non perturbé qui a été défendu de manière convaincante par Muller *et coll*, (Muller *et al.*, 1964). Les arbustes qui composent le chaparral californien comprennent entre autres des espèces endémiques comme l'armoise (*Artemisia californica*) et la sauge aromatique (*Salvia leucophylla*). L'observation longitudinale du chaparral californien montre que les herbacées sont exclues d'une aire qui s'étend de 2 à 9 m de la surface couverte par le houppier de ces arbustes (**Fig**. **9a,d**). Les feuilles de ces arbres émettent des molécules allélopathiques volatiles, notamment le 1,8-cinéole (un monoterpénoïde) qui se dépose sous forme de rosée sur l'ensemble de cette aire et persiste dans le sol. Ces molécules inhibent efficacement la germination des herbacées annuelles telles que la folle-avoine (*Avena fatua*) et le concombre (*Cucumis sativus*). L'écosystème méditerranéen auquel appartient le chaparral californien est régulé par les incendies qui se produisent en moyenne tous les 25 ans. Le 1,8-cinéole avec son noyau aromatique est efficacement éliminé lors de ces épisodes (**Fig**. **9b**). Ceci laisse donc une fenêtre temporelle aux herbacées pour dominer et se propager sur l'ensemble du paysage pendant plusieurs années (**Fig**. **9c**). Ce paysage persiste jusqu'à ce que la chaparral se régénère, produise du cinéole qui provoque le nettoyage de la zone (**Fig**. **9d**). Bien que de nombreuses données expérimentales supportent ce scénario, il est néanmoins contesté par des spécialistes qui avancent d'autres hypothèses pour expliquer les observations. Ce débat est inhérent aux études de terrain pour lesquelles l'ingérence directe sur un écosystème d'un phénomène comme l'allélopathie, en excluant l'intervention d'autres interactions indirectes avec les ressources, prédateurs, ou d'autres espèces concurrentes est hors de portée. Du fait de leur appartenance à la famille des métabolites secondaires, les agents allélopathiques dériveraient de molécules étant apparues initialement chez les plantes comme réponse à la pression des herbivores.

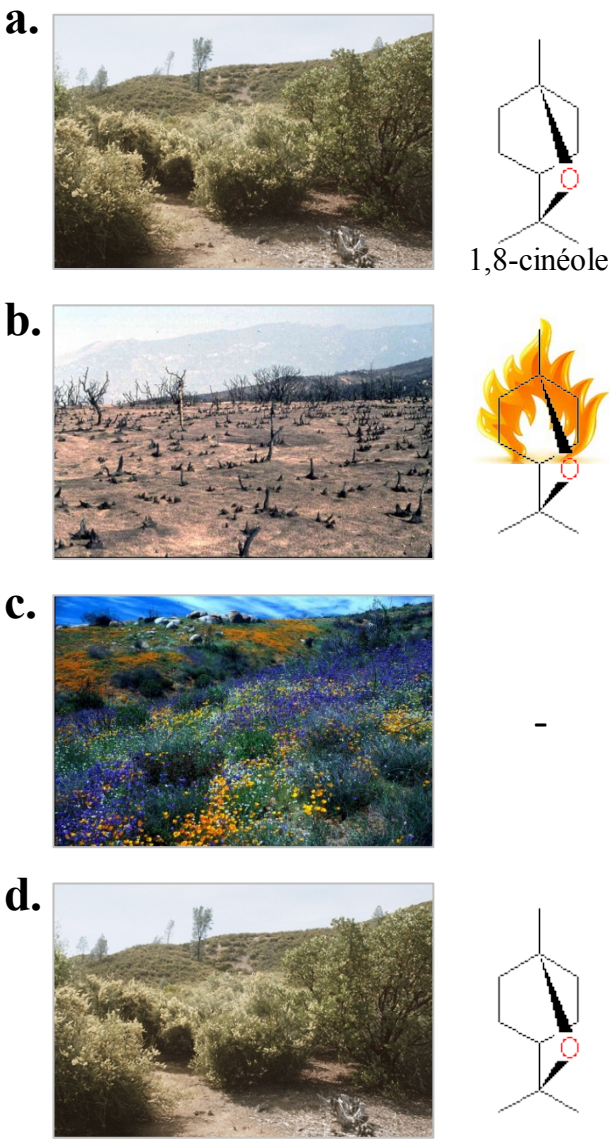


Figure 9: Cycle allélopathique du chaparral californien. Le chaparral Californien est constitué d'arbustes qui produisent des substances allélopathétiques volatiles comme le 1,8-cinéole qui inhibent la croissance des herbacées. Ces substances sont détruites par le feu permettant ainsi aux herbacées de se développer durant la période qui précède le rétablissement du chaparral.

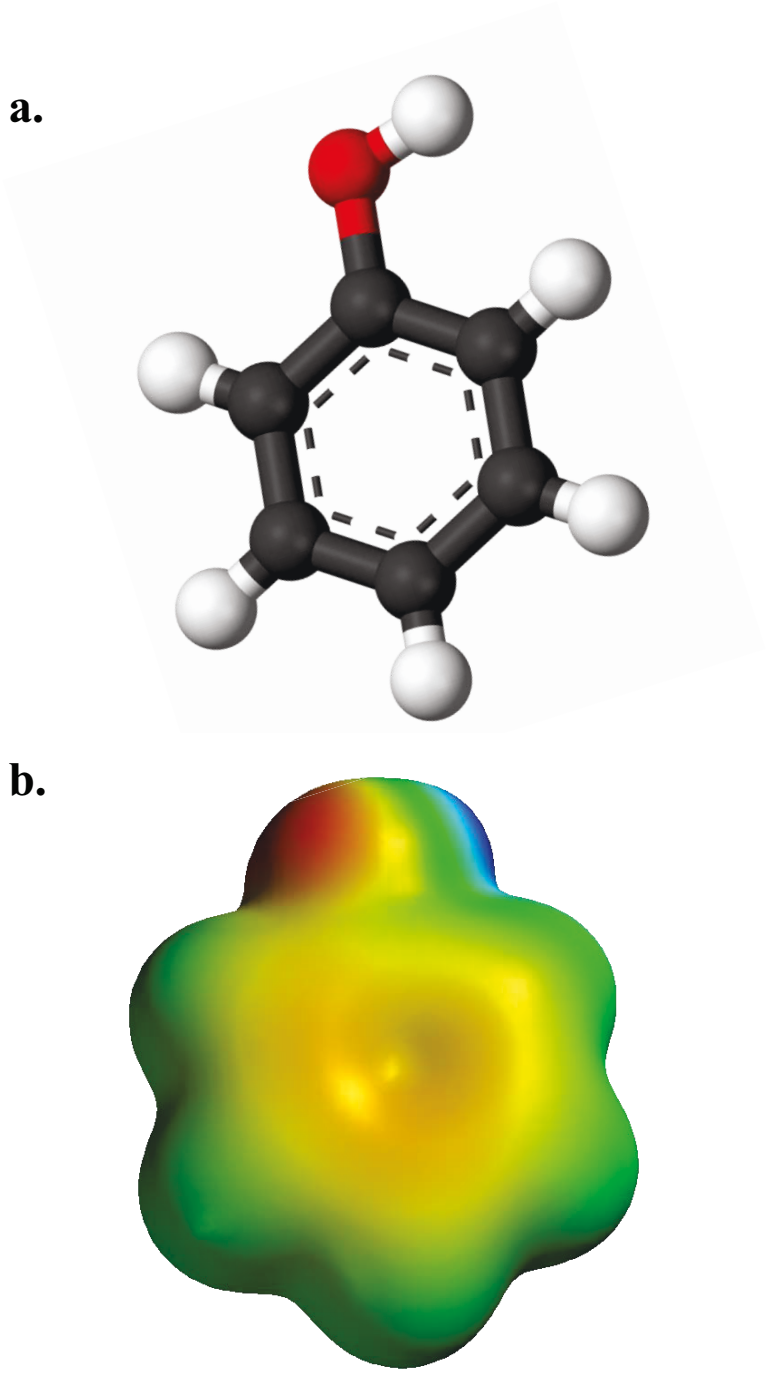


Figure 10: Structure chimique et représentation de la surface électrostatique de la molécule de phénol. a. Les six noyaux de carbones sont teintés en gris foncé, les atomes d'hydrogène en blanc et l'atome d'oxygène en rouge. La délocalisation des électrons en résonance est représentée par un cercle en pointillé. **b.** Les régions neutres sont coloriées en vert, les zones électronégatives en rouge-orange, et le proton phénolique électropositif en bleu. Dessinées par Ben Mills et postées sur le web les 30 Avril (a.) et 8 Juillet (b.) 2007.

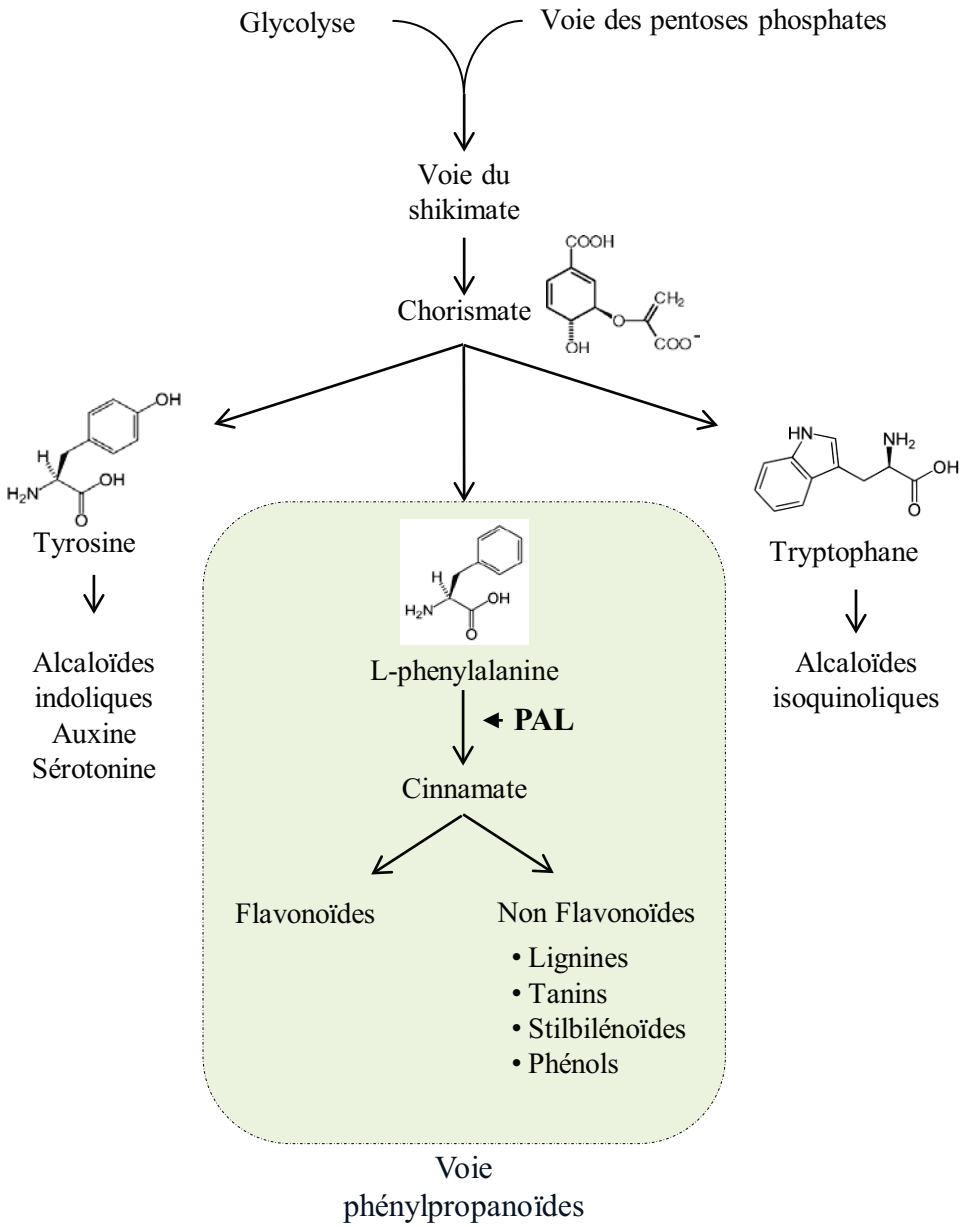


Figure 11: **Voie du shikimate.** Le chorismate est le précurseur des acides aminés aromatiques, phénylalanine, tryptophane et tyrosine. La phénylalanine est le précurseur des flavonoïdes via la voie des phénylpropanoïdes. Le tryptophane et la tyrosine sont les précurseurs de nombreux métabolites secondaires. Adapté de Maeda & Dudareva, *Annu.Rev. Plant Biol.*, **63**, 73 (2012).

I.2.3 LES METABOLITES SECONDAIRES : CLASSIFICATION, PROPRIETES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES

La classification des métabolites secondaires des plantes repose sur leurs propriétés chimiques et les rassemblent en trois groupes de molécules: les composés phénoliques, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Dans l'exposé, nous avons suivi ce plan en relatant pour chaque groupe, leurs propriétés chimiques, leurs voies de biosynthèse et enfin leurs propriétés biologiques dans le contexte de leur apparition.

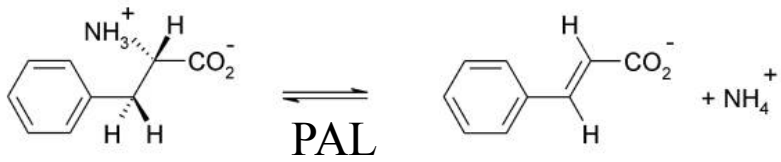
I.2.3.1 LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les composés phénoliques sont concentrés dans les fruits et légumes (amandes), les breuvages (thé, vin…) et de nombreux autres produits alimentaires. Avec plus de 8 000 composés, les composés phénoliques représentent l'une des familles les plus importantes de métabolites secondaires, (Kyselova, 2011). Structurellement, ces composés se caractérisent par un noyau benzénique (B, ou noyau aromatique) portant un groupement hydroxyle (B-OH) pouvant être libre ou engagé dans une liaison ester (B−C(=O)O−R) ou éther (B−O−R). Ce noyau présente une grande rigidité et une forte réactivité chimique du fait de la délocalisation d'électrons en résonance dans le plan du cycle formé par les six atomes de carbone (**Fig**. **10**).

I.2.3.1.1 SYNTHESE DES COMPOSES PHENOLIQUES PAR LA VOIE DES SHIKIMATES

La voie des shikimates correspond à la voie de synthèse des acides aminés aromatiques de type tryptophane, phénylalanine, tyrosine. Cette voie est le point d'intersection entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire chez les plantes. La genèse des acides aminés aromatiques débute par la condensation d'une unité de phosphoenolpyruvate issue de la glycolyse avec l'érythrose-4-phosphate produit lors de la phase non oxydative de la voie des pentoses phosphates produisant le 3 dehydroshikimate, qui à son tour est réduit en shikimate. Ce dernier subit une phosphorylation, suivie d'une condensation avec un groupement phosphoenolpyruvate pour produire le chorismate (**Fig**. **11**). Ce dernier est le précurseur des acides aminés aromatiques. La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyse l'élimination non oxydative de l'ammoniac à partir de L-phénylalanine pour donner du trans-cinnamate (**Fig**. **12a**). Directement connectée au métabolisme primaire, la PAL joue un rôle essentiel dans la synthèse de milliers de composés phénoliques. De nombreuses études ont permis d'établir une corrélation entre le niveau d'expression et l'activité de PAL et la concentration des composés phénoliques des tissus végétaux. Le cinnamate est le précurseur de nombreux composés phénylpropanoïdes qui remplissent une multitude de rôles chez les plantes, tels que celui de support mécanique (lignine), de protecteur contre des stress biotiques (phytoalexines, des antipathogènes) et abiotiques (antioxydants, substances absorbant les UV-B), de pigments (anthocyanes) et de facteurs de nodulation (flavonoïdes). La structure de l'enzyme indique que son origine est antérieure à la séparation des plantes et des champignons (Ritter and Schulz, 2004) (**Fig**. **12b**).

a.



Phénylalanine trans-Cinnamate

b.

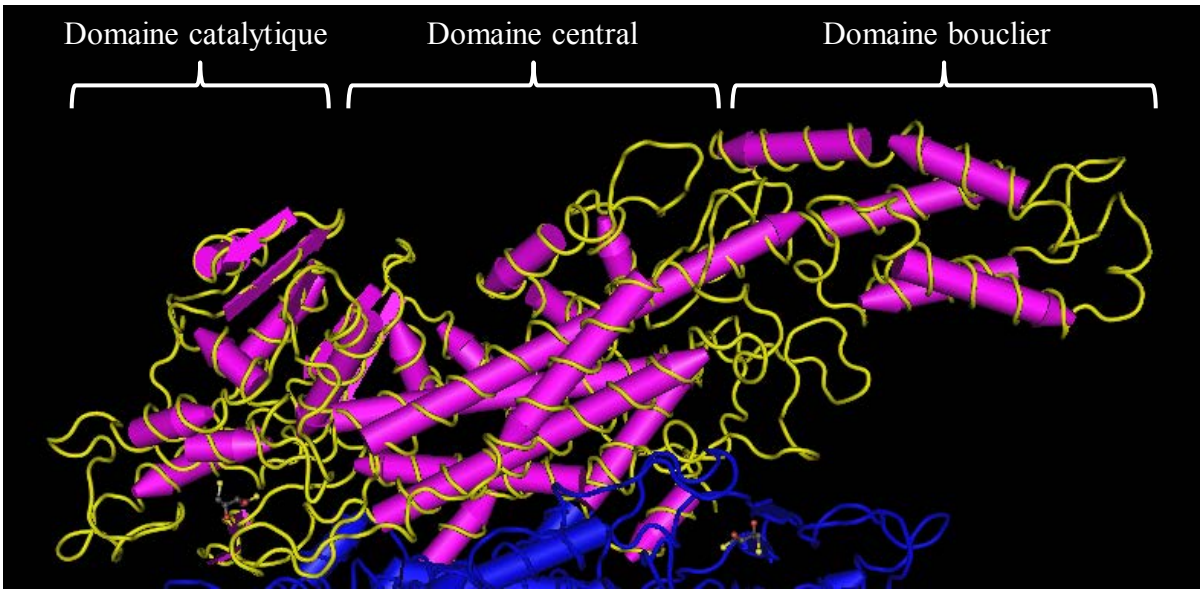


Figure 12: La Phénylalanine Ammonia-Lyase PAL. a. Réaction de déamination non oxydative de la phénylalanine. **b**. Structure de l'enzyme et du domaine catalytique 4-méthylidene-imidazole-5-one (MIO), central et bouclier. La chaine peptidique apparait en jaune et les hélices-α, en rose. En bas de la figure, les structures en bleu correspondent à la structure de la seconde unité de l'homodimère. Adapté de Ritter & Schulz *Plant Cell*. **16**, 3426-36 (2004). PDB n° 1W27.

I.2.3.1.2 LES ACIDES PHÉNOLIQUES

Les acides phénoliques sont des entités biochimiquement résistantes qui peuvent être transformées dans le sol par certains micro-organismes qui ont la capacité de les utiliser comme source de carbone. Des composés phénoliques simples, tels que les acides méthoxy et hydroxy benzoïques et l'acide cinnamique, sont généralement formés dans les végétaux en décomposition. La plupart des composés phénoliques libérés des graines, des racines ou suite à la décomposition des tissus, peuvent agir contre les pathogènes du sol et des insectes (Mandal *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que la défense des plantes contre les pathogènes du sol, tels que les nématodes et les insectes rhizophages, repose sur la libération et l'accumulation de composés phénoliques dans les sols environnants.

I.2.3.1.3 BIOSYNTHÈSE DES ACIDES PHÉNOLIQUES

Les acides phénoliques sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes et ont une structure simple constituée d'un noyau aromatique substitué par différents groupements de types alcools à différentes positions du cycle aromatique ainsi que d'un groupement carboxylique terminal (**Fig**. **13**).

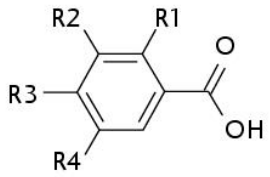
I.2.3.1.4 RÔLE DES ACIDES PHÉNOLIQUES

Il existe un type de relation beaucoup plus fusionnel entre certaines bactéries du sol et les plantes légumineuses (*Fabacées*). Les nodules sont des structures racinaires élaborées lors de la relation symbiotique entre les légumineuses et des bactéries du genre *Rhizobium*. Ces plantes libèrent des acides phénoliques par leurs racines au cours de la germination des graines et la croissance des semis. Suite à l'accumulation de dérivés particuliers d'acides phénoliques, certaines souches spécifiques de *Rhizobium* répondent à ces signaux. La plante fournit de son coté un avantage concurrentiel à ces souches de bactéries par la nodulation. Les *Rhizobiums* répondent aux acides phénoliques produits par les racines de la plante en libérant des lipo-chito-oligosaccharides qui entrainent un changement morphologique des cheveux racinaires des légumineuses. Ceci facilite l'infection et ainsi le développement du nodule. Les *Rhizobiums* libèrent aussi des signaux moléculaires d'induction des gènes de nodulation (*NODs*) de la plante qui contrôlent l'organogenèse du nodule. Au final, ces bactéries utilisent les acides phénoliques en tant que source de carbone, alors que les légumineuses bénéficient de l'activité métabolique de leur symbiote pour fixer l'azote du sol.

I.2.3.1.5 LES FLAVONOÏDES ET FLAVANOÏDES

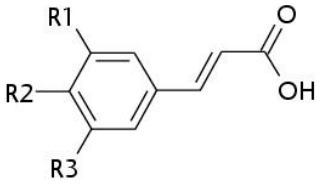
Les flavonoïdes et les flavanoïdes sont des métabolites secondaires polyphénoliques synthétisés exclusivement par les plantes. Le rôle le plus connu des flavonoïdes est la production de la couleur des fleurs et de couleurs vives reconnues par les pollinisateurs des plantes (Harborne and Williams, 2000). Les pigments qui colorent les fruits, légumes et graines sont aussi constitués principalement de flavonoïdes. Ces métabolites secondaires présentent une distribution large chez les végétaux et leur nombre ne cesse de croître, dont 6 467 molécules identifiées en 1999 qui se repartissent en neuf sous-classes principales (Harborne and Baxter, 1999) (**Fig**. **14**). De par leur structure, les flavanoïdes sont apparentés au chromane et comprennent les flavanols, les flavonones et les isoflavanoïdes. Les

Acides hydroxybenzoïques



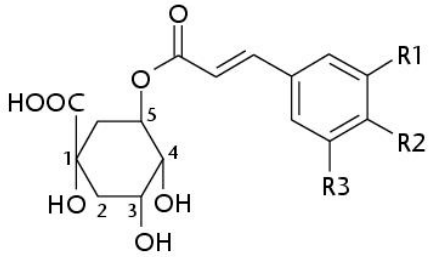
R1=R2=R3=R4=H	Acide benzoïque (non phénolique)
R1=R4=H, R2=R3=OH	Acide protocatéchique
R1=H, R2=R3=R4=OH	Acide gallique
R1=OH, R2=R3=R4=H	Acide salicylique
R1=R4=OH, R2=R3=H	Acide gentisique

Acides hydroxycinnamiques



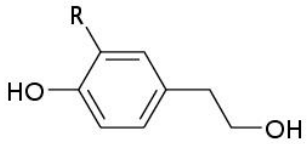
R1=R2=R3=H	Acide cinnamique (non phénolique)
R1=R3=H, R2=OH	Acide *p*-coumarique
R1=R2=OH, R3=H	Acide caféique
R1=OCH_3, R2=OH, R3=H	Acide férulique
R1=R3=OCH_3, R2=OH	Acide sinapique

Hydroxycinnamates (acides chlorogéniques)



R1=R2=OH, R3	Acide caféoylquinique
R1=R3=H, R2=OH	Acide *p*-coumaroylquinique
R1=OCH_3, R2=OH,R3=H	Acide féruloylquinique
R1=R3=OCH_3, R2=OH	Acide sinapoylquinique

Alcools phénoliques



R=H	Tyrosol
R=OH	Hydroxytyrosol

Figure 13: **Structure chimique des acides phénoliques.** Présents dans les nodules racinaires, ils assurent la croissance des rhizomes et des nodules (ou croissance racinaire), L'acide cinnamique présent chez le riz lui confère une résistance contre le champignon *Rhizoctonia.* L'acide gallique présent au niveau des nodules racinaires du soja a un rôle d'antioxydant. L'acide benzoïque est un chimioattractant régulant l'environnement des plantes hôtes.

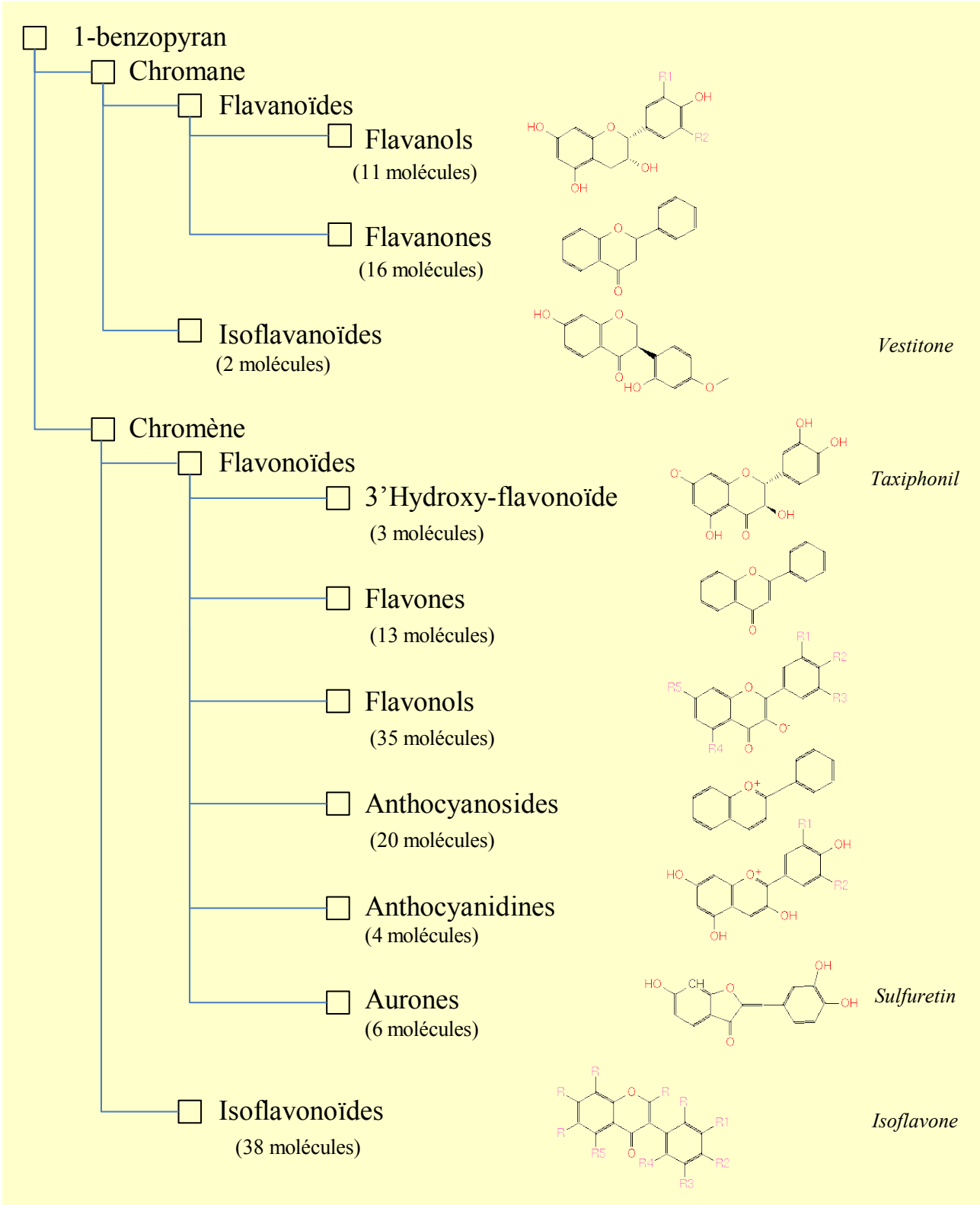


Figure 14: Classification des flavonoïdes. En fonction de l'état d'oxydation du noyau central pyrannique, les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs sous-catégories. Les flavanoïdes sont proches structurellement. Les structures et les formules chimiques proviennent de la base de données « Plant Metabolic Network » http://www.plantcyc.org/

flavonoïdes sont apparentés, quant à eux, au chromène et regroupent les 3'hydroxy-flavonoïdes, les flavones, les flavonols, les anthocyanosides, les anthocyanidines, les aurones et les isoflavonoïdes. Les légumes synthétisent de manière préférentielle des isoflavonoïdes, alors que des fruits comme les raisins et les cacahouètes sont enrichis en stilbènoïdes, un groupe distinct de composés phénoliques (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010). La pigmentation des fleurs résulte de la présence de chalcones, d'aurones et des flavonols jaunes. Les anthocyanosides assurent la pigmentation rouge, bleue ou violette qui est perçue par les insectes pollinisateurs. La couleur bleue est généralement due à la présence d'un anthocyanoside (delphinidine) et d'un co-pigment (flavone) dans les pétales. Les abeilles sont principalement attirées par la couleur bleue, phénomène qui peut être corrélée à l'évolution vers la couleur bleue des flores des régions tempérées où la pollinisation par les abeilles est déterminante. La couleur bleue des fleurs est limitée aux angiospermes, les plantes les plus évoluées (Gottlieb, 1982). Cela ne signifie cependant pas que toutes les plantes soient en mesure de produire des fleurs bleues en réponse à l'abondance des abeilles dans leur habitat, mais que seules les espèces appartenant à des groupes de plantes évoluées ont des fleurs bleues, une restriction directement liée à l'évolution de voies métaboliques spécialisées (Gottlieb, 1982).

I.2.3.1.5.1 BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES ET DES FLAVANOÏDES

La structure des flavonoïdes (**Fig**. **15a**) résulte de l'élongation et la condensation de trois molécules de la malonyl Co-enzyme A (CoA) formant le noyau A et de la p-coumaroyl-CoA de la voie de synthèse des phénylpropanoïdes qui produit le noyau C (**Fig**. **15b**). L'élongation fait intervenir la fonction thiol de la coenzyme A, alors que la condensation est catalysée par la chalcone synthétase qui produit les flavonoïdes et la stilbène synthétase qui produit les stilbénoïdes (polyphénol non flavonoïdes), ceci à partir d'un intermédiaire réactionnel commun. Le produit de la chalcone synthétase est cyclisé par une enzyme stéréospécifique, la chalcone isomérase, qui provoque la fermeture du cycle aboutissant au flavanone (Harborne and Williams, 2000). Le flavanone subit ensuite une série de modifications par le biais de différentes enzymes, telles que des réductases, isomérases, hydroxylases, di-oxygénases. Le squelette chimique ABC est le substrat des transférases qui lui ajoutent des groupements glycosyls, méthyles, O-acyles et influencent les propriétés physicochimiques des métabolites de la famille des flavonoïdes (Martens *et al.*, 2010).

L'ARN interférence est un phénomène très largement utilisé en biologie qui a été découvert par hasard en 1990 par une équipe de botanistes qui souhaitaient intensifier la couleur des pétales du pétunia (Napoli et coll,, 1990). Pour intensifier la couleur, ils introduisirent, par transgénèse, des copies supplémentaires du gène de la chalcone synthétase (*CHS*) à l'origine de la synthèse des flavonoïdes, dans le but d'augmenter la synthèse des anthocyanosides, responsables de la coloration violette des pétales. A la grande surprise de ces chercheurs, le phénotype des fleurs obtenues se révéla opposé au résultat attendu : 42% des fleurs transgéniques étaient blanches ou anormalement pâles (**Fig**. **15c**). Non seulement la protéine transgènique CHS n'était pas exprimée, mais le transgène inhibait l'expression du gène *CHS* endogène. La concentration de l'ARN messager (ARNm) du gène *CHS* des fleurs blanches était réduite par rapport aux fleurs non-transgéniques. L'introduction du transgène *CHS* inhibait donc l'expression du gène endogène, entraînant l'absence de la protéine CHS,

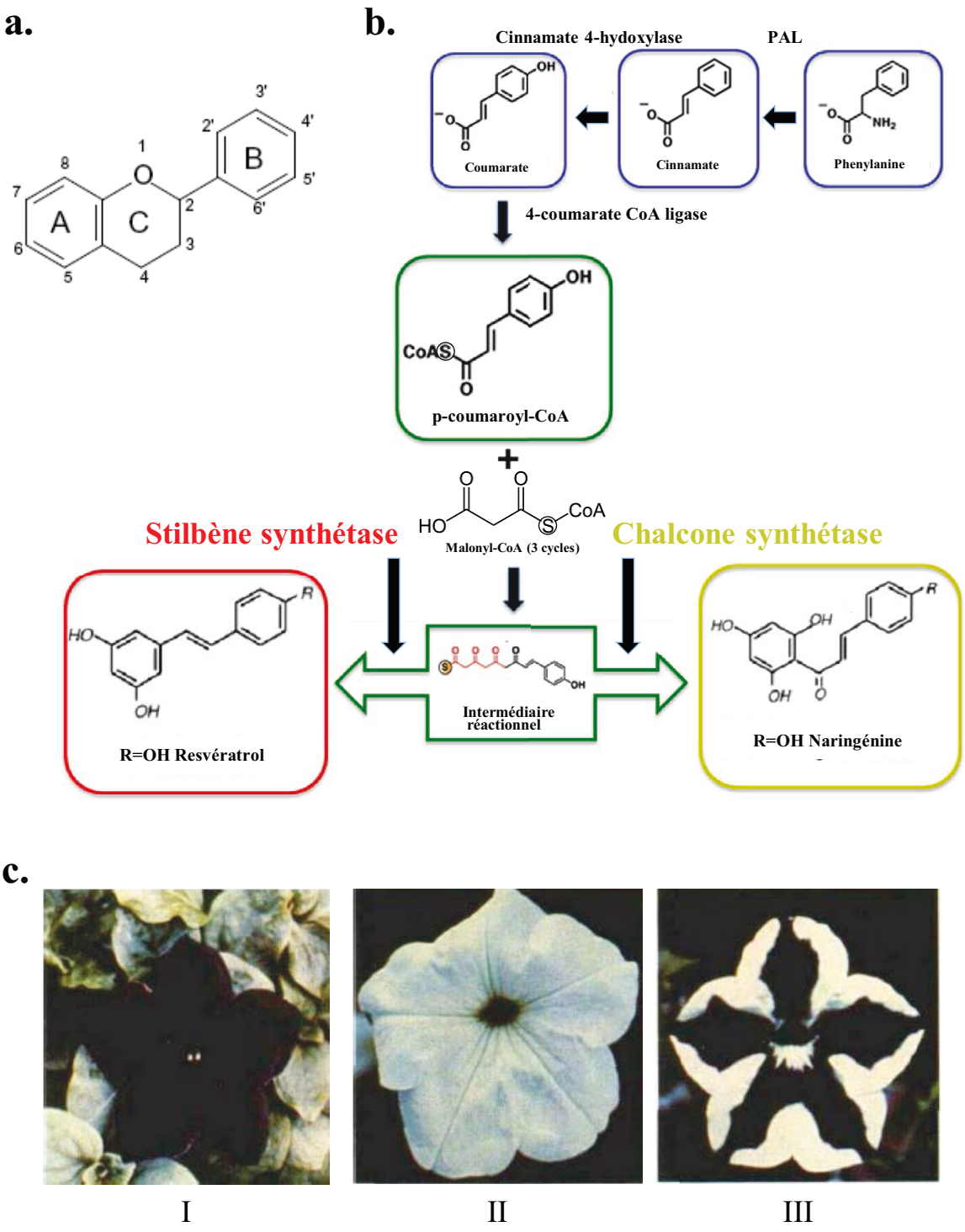


Figure 15: Voie de synthèse des flavonoïdes et son contrôle par ARN interférence. **a.** Structure des flavénoïdes. **b.** Voie de synthèse des flavonoïdes via la chalcone synthétase qui produit entres autres la naringénine du pamplemousse et de celle des stilbénoïdes (non flavonoïdes) via la stilbène synthétase qui produit entre autres le resvératrol de la vigne, ceci à partir du métabolisme des phénylpropanoïdes. PAL, Phénylalanine Ammonia-Lyase. **c.** Phénotype de pétunias obtenus après introduction d'une copie du gène la chalcone synthétase (*CHS*). I, Fleur non-transgénique. II et III, deux exemples de phénotypes obtenus après introduction du transgène *CHS*.

a.



b.

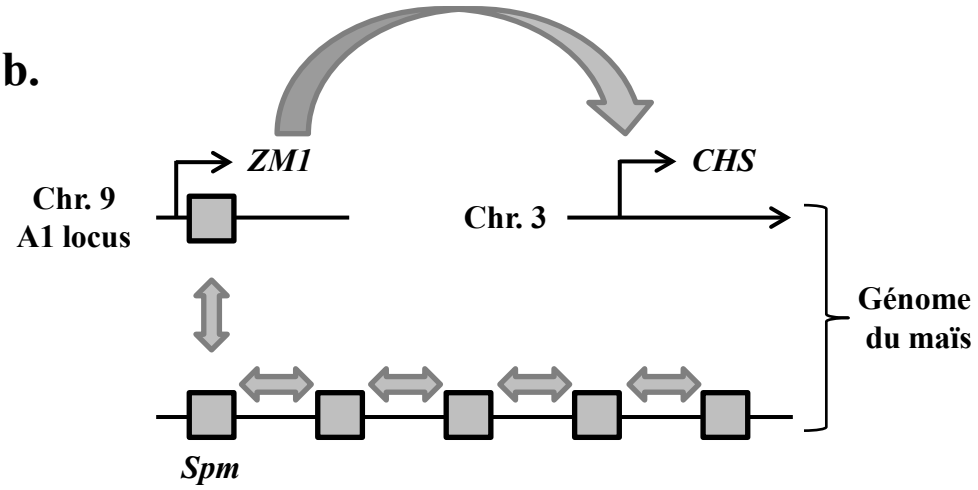


Figure 16: Les transposons et le contrôle de l'expression de la chalcone synthétase chez le maïs. a. Un épi de maïs tel qu'observé par Barbara Mac Clintock avec des grains colorés en violet et d'autres pas. La couleur de ces derniers résulte de la mobilisation d'un élément transposable. La flèche indique la présence d'un clone de cellules révertantes. **b.** Mécanisme de contrôle de l'expression de la chalcone synthétase par le transposon *Spm* via le facteur de transcription ZM1. Les doubles flèches indiquent les transpositions.

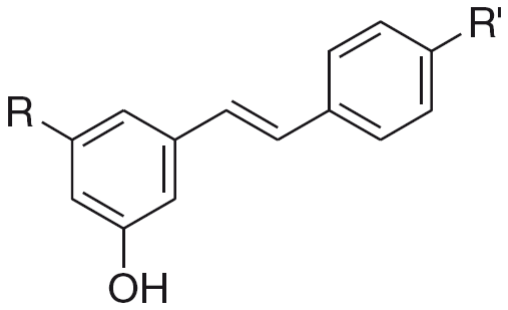
ce qui réduisait la concentration d'anthocyanosides et la coloration de la fleur transgénique. Ce phénomène fut appelé alors co-suppression pour signifier l'existence d'une communication entre loci non liés génétiquement, mais homologues. Aujourd'hui, nous savons qu'un ARN introduit dans les cellules de nombreuses espèces peut entraîner la dégradation par un mécanisme génétiquement contrôlé de dégradation de l'ARN par l'enzyme DICER (Shannon *et al.*, 2003). Le phénomène a été rebaptisé ARN interférence.

I.2.3.1.5.2 ROLE DES FLAVONOÏDES ET DES FLAVANOÏDES

Du fait de leur spectre d'absorption dans la partie la plus énergétique du rayonnement UV (UV-B, 280-315 nm) qui peut endommager les plantes à la surface de la terre, l'occurrence des flavonoïdes est reliée par de nombreux auteurs à la terrestrialisation des plantes à l'Ordovicien, ceci même si les gènes de la synthèse des flavonoïdes ont pu apparaître plus tôt durant l'évolution. Une démonstration expérimentale du rôle photo-protecteur des flavonoïdes est fournie par l'étude du mutant *tt5* d'*Arabidopsis thaliana* qui est incapable de synthétiser les flavonoïdes. Les plants de ce mutant sont hypersensibles au rayonnement UV-B artificiel, effet exacerbé par fumigation d'ozone (Rao *et al.*, 1996). Sur le terrain, il a été observé que la concentration des flavonoïdes photo-protecteurs dans les mousses en Antarctique était corrélée avec le taux d'ozone stratosphérique, mesuré entre 1965 et 1989. Les concentrations les plus élevées de flavonoïdes ont été enregistrées aux périodes de plus faible teneur en ozone (Gensel and Edwards, 2001). Les flavonoïdes sont aussi liés à la capacité des végétaux de s'adapter à l'altitude où les radiations UV-B sont importantes. Les feuilles du maïs (*Zea mays*) cultivé à haute altitude accumulent une flavone glycosylée et ses précurseurs de synthèse, la maysine et la rhamnosylisoorientine qui protègent des dommages causés par les UV-B (Falcone Ferreyra *et al.*, 2010).

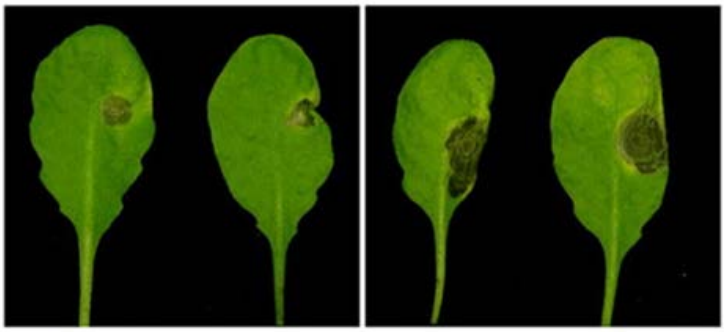
Dans les années 1940, Barbara Mc Clintock a découvert les éléments transposables en étudiant la transmission de la couleur des grains de maïs. Les éléments transposables sont des fragments d'ADN qui peuvent s'insérer dans de nouveaux loci sur les chromosomes. Ils codent souvent pour une transposase qui leur permet de se déplacer sur le génome. Contrairement aux lois de transmission des gènes établis par Gregor Mendel, Barbara Mc Clintock mit en évidence des variations liées à un élément mobile (*Spm*) qui se déplace sur le génome, lorsque les cellules se divisent et se multiplient. Cet élément inhibe parfois l'expression des gènes de pigmentation des grains à l'intérieur de l'épi même, créant des mosaïques de couleurs jaune et mauve (Barton, 2007; McClintock, 1950) (**Fig**. **16a**). Barbara Mc Clintock obtint le prix Nobel en 1983 pour ses travaux. Le facteur de transcription ZM1 de la famille du proto-oncogène *Myb* est localisé au locus A1 sur le chromosome 9. ZM1 contrôle l'expression de gènes de synthèse des flavonoïdes, notamment la chalcone synthétase qui produit la coloration violette du grain (Cone *et al.*, 1986; Paz-Ares *et al.*, 1987). Chez les grains, le transposon actif *Spm* se trouve localisé sur le locus A1 et entrave l'expression de *ZM1* et donc la synthèse d'anthocyanosides, les grains ont une couleur jaune (**Fig**. **16b**). Pour les grains présentant une pigmentation pointillée de tâches violettes, l'élément transposable a été mobilisé au cours du développement. En effet, les plantes présentent un développement clonal, avec des zones chez la plante adulte issues uniquement de quelques cellules méristématiques. Ainsi, les secteurs du tissu révertant pigmenté résultent de l'excision de l'élément transposable durant le développement embryonnaire provoquant la

a.



R= OH, R'= H: Pinosylvine
R= OH, R'= OH: Resvératrol

b.



Plante sauvage Mutant *mpk3*

Figure 17: Propriété phytoalexinique des stibénoïdes. a. La structure chimique du noyau stilbène (*trans*-1,2-diphényléthylène), la pynosylvine et la resvératrol. **b.** Plantes d'*Arabidopsis thaliana* trois jours après leur inoculation avec des spores du champignon *Botrytis cinerea*. Le mutant *mpk3* est moins résistant.

restauration de l'activité du gène *ZM1* et de la coloration des grains. Des travaux ultérieurs ont montré que l'activité du transposon *Spm* est régulée au niveau de l'ADN par un processus épigénétique de méthylation, lui même contrôlé par des ARN interférents. Les éléments transposables ont certainement contribué à la diversification des voies de synthèse des métabolites secondaires de par leur capacité à modifier le patrimoine génétique des plantes. Néanmoins, la plupart des exemples de tels événements concerne la domestication des plantes qui opère à une échelle de temps beaucoup plus réduite (Lisch, 2013).

En plus de leur capacité à filtrer les UV-B, les flavonoïdes sont aussi de puissants antioxydants. Ils neutralisent les espèces radicalaires produites par la réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$) (Agati *et al.*, 2013).

I.2.3.1.6 LES STILBÉNOÏDES :

De même que les flavonoïdes, les stilbénoïdes sont des composés phénoliques possédant deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène, c'est-à-dire les bibenzyles et les stilbènes. Les stilbènes ont pour structure de base le 1,2-diphényléthylène (C6-C2-C6). Majoritairement sous forme *trans* (E), les stilbènes peuvent être libres ou complexés à un hétéroside, parfois même sous forme polymérique (**Fig**. **17a**). La distribution des stilbénoïdes n'est pas ubiquitaire chez les embryophytes. Les stilbénoïdes sont retrouvés chez 72 espèces de plantes non apparentées réparties dans 31 genres et 12 familles incluant les *Vitacées* (dont la vigne, *Vitis vinifera*), les *Fagacées* (le hêtre, *Fagus sylvatica*), les *Liliacées* (la tulipe, *Tulipa sylvestris*), les *Moracées* (le figuier, *Ficus carica*), les *Myrtacées* (le giroflier, *Caryophyllus aromaticus*), les *Papilionacées* (le trèfle, *Trifolium pratense*), les *Pinacées* (le pin sylvestre, *Pinus sylvestris*) et les *Poacées* (le seigle, *Secale cereale*). On ne les retrouve pas dans les plantes telles que le blé ou le maïs (Riviere *et al.*, 2012).

I.2.3.1.6.1 BIOSYNTHÈSE DES STILBÉNOÏDES

Les stilbénoïdes (non-flavonoïdes) et les flavonoïdes composent la famille des métabolites polycétides, produits du métabolisme des phénylpropanoïdes (**Fig**. **15b**). Les stilbénoïdes sont retrouvés à des concentrations très faibles dans des conditions physiologiques normales, mais leur synthèse est communément induite par de nombreux stress abiotiques ou biotiques. Ces stress augmentent l'expression des gènes de la biosynthèse des stilbénoïdes et des flavonoïdes comme la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la cinnamate 4-hydroxylase (**Fig**. **15b**).

I.2.3.1.6.2 RÔLE DES STILBÉNOÏDES

Les stilbénoïdes sont pour la plupart pourvus d'une activité antibactérienne et antifongique. La surexpression de la stilbène synthétase semble être impliquée dans les mécanismes de défense des plantes contre ces pathogènes. Il faut souligner que pour les plantes en milieu naturel, contrairement aux plantes cultivées, les pathologies sont rares : soit ces plantes sont résistantes aux attaques microbiennes soit elles coexistent avec les parasites dans une relation symbiotique, sans apparition de symptômes visibles (Harborne, 1993). Les métabolites secondaires produits par les plantes suite à l'atteinte par des pathogènes sont dénommés phytoalexines. Cette signalisation met en œuvre la voie des MAP kinases (Ren *et*

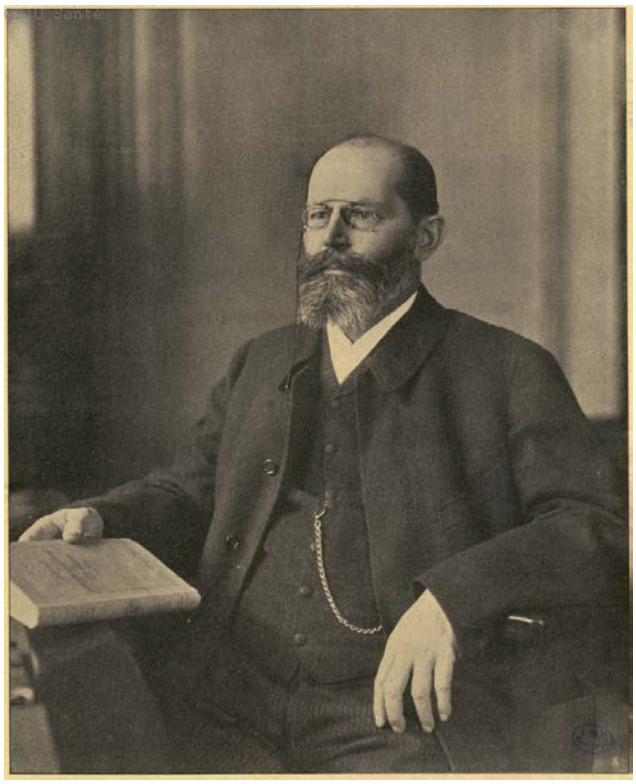


Figure 18: Le chimiste allemand Emil Fischer qui a élucidé la structure du tanin et réalisé sa synthèse.

al., 2008). Ces molécules appartiennent à différentes classes de métabolites secondaires et ne sont donc pas l'apanage des stilbénoïdes. En fait, la pisatine, la première phytoalexine identifiée en 1960 à partir du pois (*Pisum sativum*) infecté par un champignon pathogène (*Sclerotinia fructicola*) est un flavonoïde (Cruickshank and Perrin, 1960). Les phytoalexines peuvent aussi être constitutives des tissus végétaux. Ainsi, le bois du cœur des arbres qui est généralement résistant à la dégradation naturelle, présente une accumulation frappante de métabolites secondaires (terpénoïdes et composés phénoliques) et plus particulièrement d'hydroxystilbénoïdes, comme la pinosylvine (3,5-dihydroxy-trans-stilbène) chez le pin. L'expression de la pinosylvine synthétase est d'ailleurs augmentée chez le pin malade d'une flétrissure résultant de l'invasion du ver nématode *Bursaphelenchus xylophilus* qui ravage les forêts d'Asie (Shin *et al.*, 2009). Le traitement des conidies, les spores responsables de la multiplication asexuée des champignons, avec des stilbénoïdes provoque des modifications membranaires des conidies et l'arrêt de la respiration. Une démonstration directe des effets antifongiques de la pinosylvine a été obtenue chez le blé, plante qui ne synthétise pas de stilbénoïdes. L'expression par transgénèse de la pinosylvine synthétase chez le blé lui confère une résistance à la rouille provoquée par le champignon *Puccinia recondita* (Serazetdinova *et al.*, 2005).

I.2.3.1.7 LES TANINS

Les tanins sont des métabolites secondaires les plus abondants des plantes, représentant de 5% à 10% poids sec des feuilles d'un l'arbre. Le nom dérive de *tan,* produit obtenu à partir de l'écorce du chêne. Réduit en poudre, l'écorce du chêne est utilisée depuis le Moyen Âge pour la préparation du cuir. La description chimique de ce procédé a été étudié par le chimiste allemand Emil Fischer (prix Nobel 1902) qui a élucidé la composition du tanin et en a réalisé la synthèse. Néanmoins, ce procédé n'a pas conduit à une application industrielle, car non viable commercialement (Thuau, 1921) (**Fig**. **18**).

I.2.3.1.7.1 BIOSYNTHÈSE DES TANINS

Il existe deux grandes catégories de tanins: les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables sont le résultat de la réaction d'une molécule de glucose ou d'un sucre apparenté issu de la glycolyse, avec une ou plusieurs molécules d'acide phénolique. Il s'agit de l'acide gallique pour les tanins galliques et de l'acide chébulique pour les tanins ellagiques. Ces acides sont produits par la voie des shikimates (**Fig**. **11**). Les tanins condensés, connus sous le nom de proanthocyanidines, sont des oligomères ou polymères de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ol liées entre elles par des liaisons C-C. Il s'agit habituellement de la catéchine (catéchol) et de l'épicatéchine (épicatéchol), mais aussi d'autres composés phénoliques comme les para-coumarates. Les tanins s'accumulent préférentiellement dans les vacuoles ainsi que les couches épidermiques des feuilles et des fruits. En revanche, les tanins hydrolysables se concentrent dans la paroi cellulaire (**Fig**. **19**).

I.2.3.1.7.2 RÔLE DES TANINS

Les activités biologiques des tanins résultent pour une part de leurs propriétés anti-oxydantes, bénéfiques aux plantes, et d'autre part à des propriétés pro-oxydantes et toxiques, nuisibles aux herbivores. L'action protectrice contre le stress oxydatif est commune avec

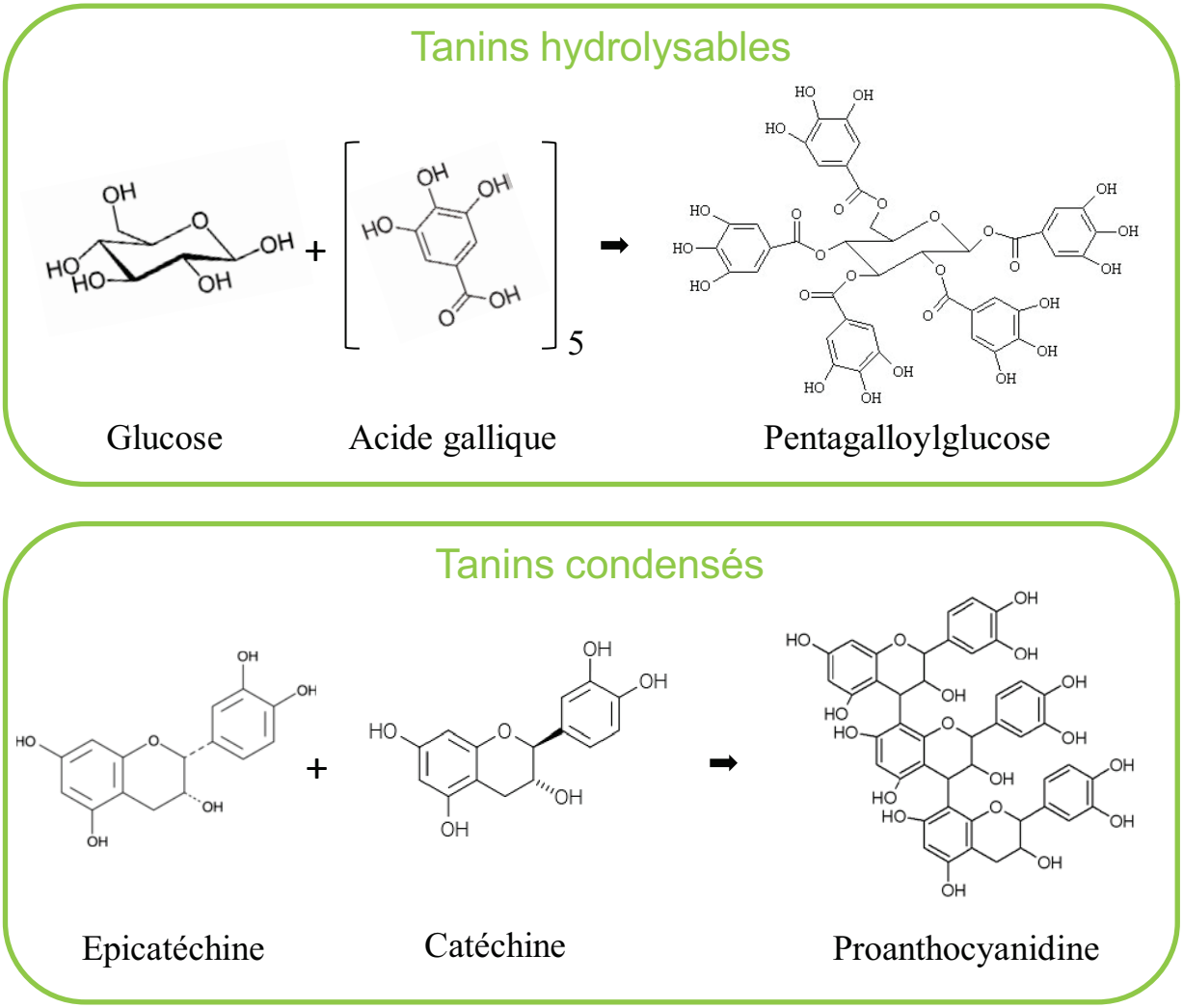


Figure 19: Tanins hydrolysables et condensés. Le pentagalloylglucose est le produit de réaction des acides galliques sur une molécules de glucose. Le proanthocyanidine est produit par la polymérisation des unités épicatéchines et catéchines.

celle déjà évoquée pour les flavonoïdes. Pour les herbivores, la présence des tanins provoque un phénomène de répulsion chez de nombreuses espèces de vertébrés et d'invertébrés. La formation de dérivés réactifs de l'oxygène et le stress oxydatif engendré au niveau de l'intestin par les tanins hydrolysables ingérés avec les feuilles des arbres sont responsables de lésions chez les insectes herbivores (Barbehenn *et al.*, 2010). Par contre, contrairement aux insectes, les vertébrés sont sensibles aux effets toxiques des tanins condensés. De manière surprenante, les espèces végétales communément consommées par les ruminants possèdent des concentrations significatives de tanins condensés. Chez les ovins, une alimentation contenant des doses élevées de tanins condensés provoque une réduction de la prise d'aliments à 6 jours et, au-delà, à des lésions sévères de l'intestin qui conduisent à la formation d'ulcères (Hervas *et al.*, 2003).

I.2.3.1.8 LES LIGNINES

Suite à l'apparition des plantes terrestres à l'Ordovicien, les végétaux supérieurs ont acquis la capacité de polymériser les phénylpropanoïdes en lignine au Silurien (-443-416 MA). La lignine produite au sein des parois cellulaires des plantes vasculaires a facilité leur domination des écosystèmes terrestres. La lignine a en effet rigidifié les plantes et renforcé le phénomène de transport de l'eau par capillarité conduisant à l'augmentation de la taille des plantes. La lignification correspond donc à l'accumulation de métabolites secondaires produits par le métabolisme des phénylpropanoïdes dans ce que l'on désigne par le terme de puits de carbone des plantes. Cette réserve de carbone représente 30% de la biomasse totale produite dans la biosphère (**Fig**. **4**).

I.2.3.1.8.1 BIOSYNTHÈSE DES LIGNINES

Les différents types de lignines résultent de la polymérisation de monolignols (alcools phénoliques) produits par le métabolisme des phénylpropanoïdes. Il s'agit de l'alcool paracoumarylique pour la lignine hydroxyphénylique, de l'alcool conifèrylique pour la lignine guaiacylique, et de l'alcool sinapylique pour la lignine syringylique (**Fig**. **20**). La biosynthèse des lignines est un processus combinatoire non enzymatique, contrôlé uniquement par les propriétés chimiques et les concentrations de ses constituants et des conditions environnementales locales. Ceci suggère que la voie de biosynthèse des lignines soit apparue chez les plantes vasculaires par détournement de molécules précédemment utilisées par les plantes avasculaires comme molécules protectrices contre les radiations UV-B de l'atmosphère terrestre (Weng and Chapple, 2010).

I.2.3.1.8.2 RÔLE DES LIGNINES

La nature chimique et le caractère aléatoire des liens moléculaires entre les différents monomères entrant dans la composition des lignines font de ce biopolymère l'un des plus difficiles à dégrader. Cette caractéristique fait d'eux une barrière de défense idéale contre les agents pathogènes et les herbivores ayant co-évolué avec des plantes vasculaires. Les plantes vasculaires se distinguent aussi des plantes avasculaires par la présence de cellules allongées, les trachéides, spécialisées dans le transport de l'eau et des sels minéraux. Suite à leur maturation, les cellules trachéides se sclérifient par un processus de dégénérescence cytoplasmique programmée, produisant la formation de parois composées de xylème lignifié.

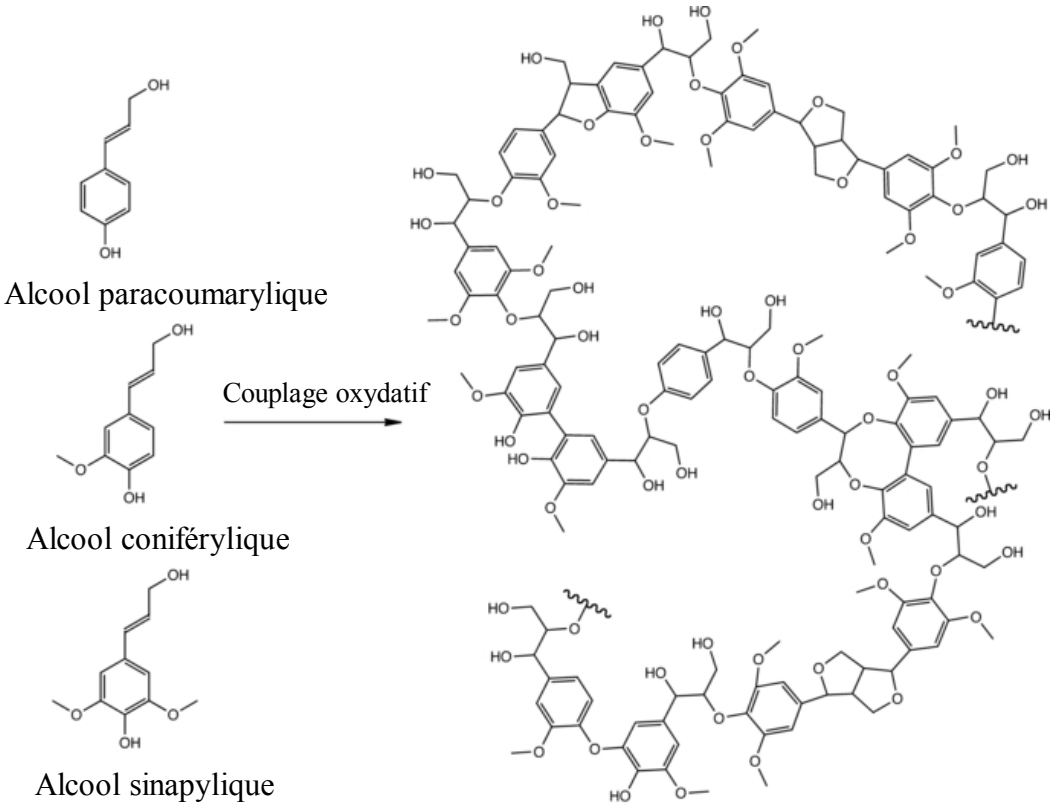


Figure 20: Les différents types de lignines produites par couplage oxydatif d'alcools. Le couplage de l'alcool paracoumarylique pour la lignine H (hydroxyphénylique), celui de l'alcool coniférylique pour la lignine G (guaiacylique) et celui de l'alcool sinapylique pour la lignine S (syringylique). Adapté de Weng & Chapple *New Phytol*. **187**, 273 (2010)

Ce matériel possède des propriétés physico-chimiques optimales à la conduction par capillarité de l'eau, des racines vers les structures les plus aériennes. Selon une hypothèse récemment proposée, la lignification serait apparue au cours de l'Ordovicien et du Silurien suite à l'augmentation de la concentration en oxygène atmosphérique favorisant le couplage oxydatif des monolignols et la synthèse des lignines (**Fig**. **20**).

I.2.3.2 LES TERPÉNOIDES

Les terpénoïdes sont des métabolites essentiels à tous les organismes vivants. D'ailleurs, la capacité de synthétiser leur précurseur, l'isopentényl-pyrophosphate (hemiterpène), est omniprésente chez les archéobactéries, les eubactéries et les eucaryotes. Ces derniers l'ont acquis par endosymbiose. Les terpénoïdes ont donné lieu à une expansion extrêmement diversifiée. Chez les plantes terrestres, le groupe des terpénoïdes des plantes comprend aujourd'hui au moins 30 000 entités chimiques distinctes. Elles sont divisées en sous-classes selon le nombre d'atomes de carbone de leur chaine carbonée en hemi- (C5) mono- (C10), sesqui- (C15), di- (C20), tri- (C30) tetra- (C40) et poly- (C > 40). Les huiles essentielles (monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes) sont le plus souvent responsables de l'odeur si caractéristique des plantes et agissent comme métabolites répulsifs pour les insectes. Les gibbérellines (diterpénoïdes) sont des hormones végétales essentielles à la germination des graines, l'allongement des tiges, la croissance des feuilles, la maturation du pollen et l'induction de la floraison. Les brassinostéroïdes (triterpénoïdes cycliques) sont des hormones stéroïdiennes végétales qui régulent le développement et la physiologie de l'ensemble des plantes terrestres. Les caroténoïdes (tetraterpénoïdes) sont des métabolites secondaires qui donnent la couleur jaune, orange et rouge à de nombreux fruits, légumes et fleurs. Les flavonoïdes (polyphénols) donnent eux les couleurs allant du rouge au violet en passant par le bleu. La chlorophylle est quant à elle responsable de la couleur verte dominante des plantes. Le latex, un polyterpénoïde, présente une texture collante lui permet d'engluer ces prédateurs lors d'une agression mécanique.

I.2.3.2.1 VOIES DE SYNTHÈSE DES TERPÉNOÏDES

L'unité de base des terpénoïdes est un isoprène aliphatique, isopentényl-pyrophosphate, mais en raison de nombreuses variations de son état de polymérisation, les terpénoïdes comprennent des composés avec des propriétés physico-chimiques et biologiques très variées. Ils peuvent être lipophiles ou hydrophiles, volatiles ou non volatiles, cycliques ou acycliques. Les enzymes de la famille des prényltransférases ou terpènoïde synthétases occupent une position centrale au sein du réseau de biosynthèse des terpénoïdes. Le séquençage du génome de l'eucalyptus (*Eucalyptus grandis*) a permis de mettre en évidence 113 gènes codant pour des terpène synthétases (Myburg *et al.*, 2014). La grande majorité des terpénoïdes est issue de précurseurs produits alternativement par l'une des trois terpènes synthétases, mono-, sesqui- et diterpène synthétases, qui produisent respectivement le géranyl pyrophosphate (C10), le farnésyl pyrophosphate (C15) et le géranyl-géranyl pyrophosphate (C20). Chaque précurseur correspond à la condensation de diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) avec une ou plusieurs molécules d'isopentényl pyrophosphate (IPP), produites par la glycolyse via le pyruvate et le glycéraldéhyde-3-phosphate (Bohlmann *et al.*, 1998). Le DMAPP est lui issu du métabolisme énergétique via la voie du mévalonate et par

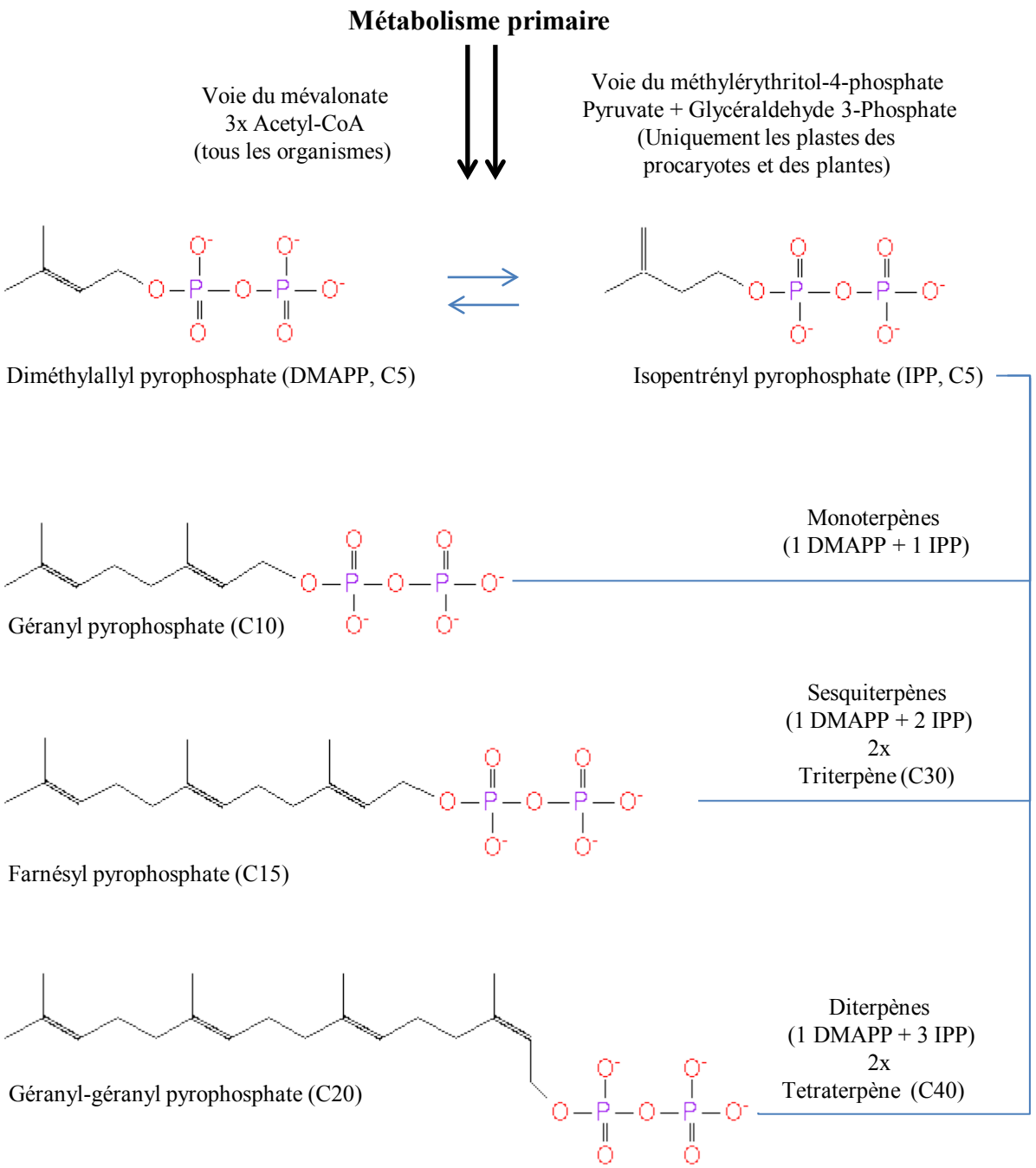


Figure 21: La voie de biosynthèse des terpénoïdes. La condensation de diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) avec une ou plusieurs molécules d'isopentényl pyrophosphate (IPP) produit respectivement les monoterpénoïdes (1 IPP), les sesquiterpénoïdes (2 IPP) et les diterpénoïdes (3 IPP). Les tri- (C30) et tetraterpénoïdes (C40) sont produits respectivement par condensation de farnésyl pyrophosphate (C15) et de géranyl-géranyl pyrophosphate (C20).

condensation de trois molécules d'acétyl-CoA. Alternativement et uniquement chez les plantes et les procaryotes, le DMAPP provient aussi du métabolisme du méthylérythritol-4-phosphate des plastes (**Fig**. **21**). Les tri- (C30) et tetraterpénoïdes (C40) sont produits respectivement par condensation de farnésyl pyrophosphate (C15) et de géranyl-géranyl pyrophosphate (C20). La polymérisation d'un nombre indéfini d'hemiterpénoides (C5) produit les polyterpénoïdes (Bohlmann and Keeling, 2008). Les précurseurs (C5-C40) peuvent en outre être fonctionnalisés par divers cytochrome P450 oxydases, réductases, déshydrogénases ou transférases. La diversité chimique des milliers de terpénoïdes des plantes résulte de la combinaison de l'action des terpénoïde synthétases et d'enzymes de modification. Du fait de leur insaturation, les terpénoïdes peuvent aussi, après condensation, être cyclisés. Ainsi, deux molécules de sequiterpénoïdes peuvent être condensées en squalène, dont la source la plus abondante est le foie de requin, riche en squalène synthétase. Après activation, l'oxydosqualène est cyclisé par différentes oxydosqualène cyclases d'origine végétale, dont la cycloarténol cyclase, formant ainsi les différents squelettes des phytostéroïdes. Ces terpènes cyclisés sont les précurseurs de phytohormones dont les brassinostéroïdes (**Fig**. **22**). La structure cyclique des phytostéroïdes en fait des molécules particulièrement adaptées à la signalisation intercellulaire.

I.2.3.2.2 RÔLE DES TERPÉNOÏDES

I.2.3.2.2.1 MONOTERPÈNES

La majorité des terpénoïdes constitue des agents de défense contre les herbivores. Les monoterpènes et les sesquiterpènes ont une pression de vapeur saturante élevée à température ambiante et se volatilisent facilement. Ils peuvent donc agir à distance à partir de la plante émettrice. Ces signaux peuvent avoir des activités attractives ou répulsives sur les insectes. Les monoterpènes véhiculent les odeurs florales qui ont sans donc évolués d'un rôle protectif vers celui d'attracteur d'animaux pollinisateurs chez les angiospermes. Des composés monoterpéniques tels que l'ocimène et le myrcène, contribuent de manière significative aux odeurs florales de nombreuses espèces végétales. La production de myrcène par les fleurs du genre *Antirrhinum* est contrôlée par le rythme circadien avec un pic d'émission dans la journée, entre 11 et 18 heures (Dudareva *et al.*, 2003) (**Fig**. **23a**). La réponse électrophysiologique mesurée par électroantennographie de l'insecte pollinisateur des cycades, des gymnospermes, est induite par la fraction contenant le myrcène. Celui-ci a été obtenu pour l'expérience par fractionnement d'un extrait de pollen par chromatographie en phase gazeuse (Terry *et al.*, 2007) (**Fig**. **23b**).

I.2.3.2.2.2 SESQUITERPÉNOÏDES

Les plantes se défendent contre les herbivores essentiellement par la production de métabolites secondaires qui affectent directement les herbivores. Cependant, des études ont révélé que les plantes qui sont attaquées par les herbivores libèrent aussi des signaux chimiques volatiles qui sont perçues par les ennemis naturels des herbivores eux-mêmes. Ces substances volatiles étaient émises initialement par les plantes en cas d'attaque par les herbivores mais ces signaux chimiques ont ensuite été exploités par les ennemis des herbivores pour localiser leurs victimes (Turlings *et al.*, 1995). La première description

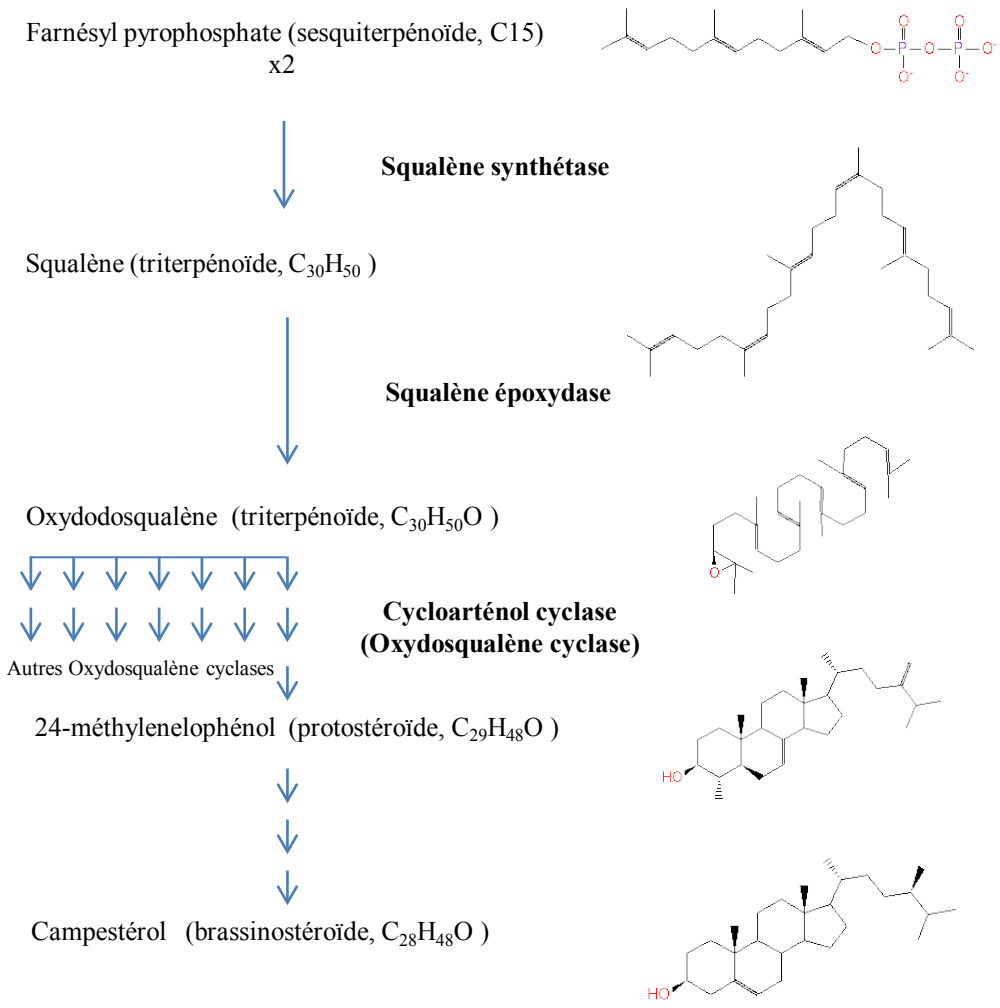


Figure 22: Diversification et cyclisation des térpènoïdes. Cette diversification procède via une chaine de réactions enzymatiques successives de synthétases, époxydases et de cyclases, conduisant, pour cette illustration, à l'hormone stéroïdienne brassinostéroïde.

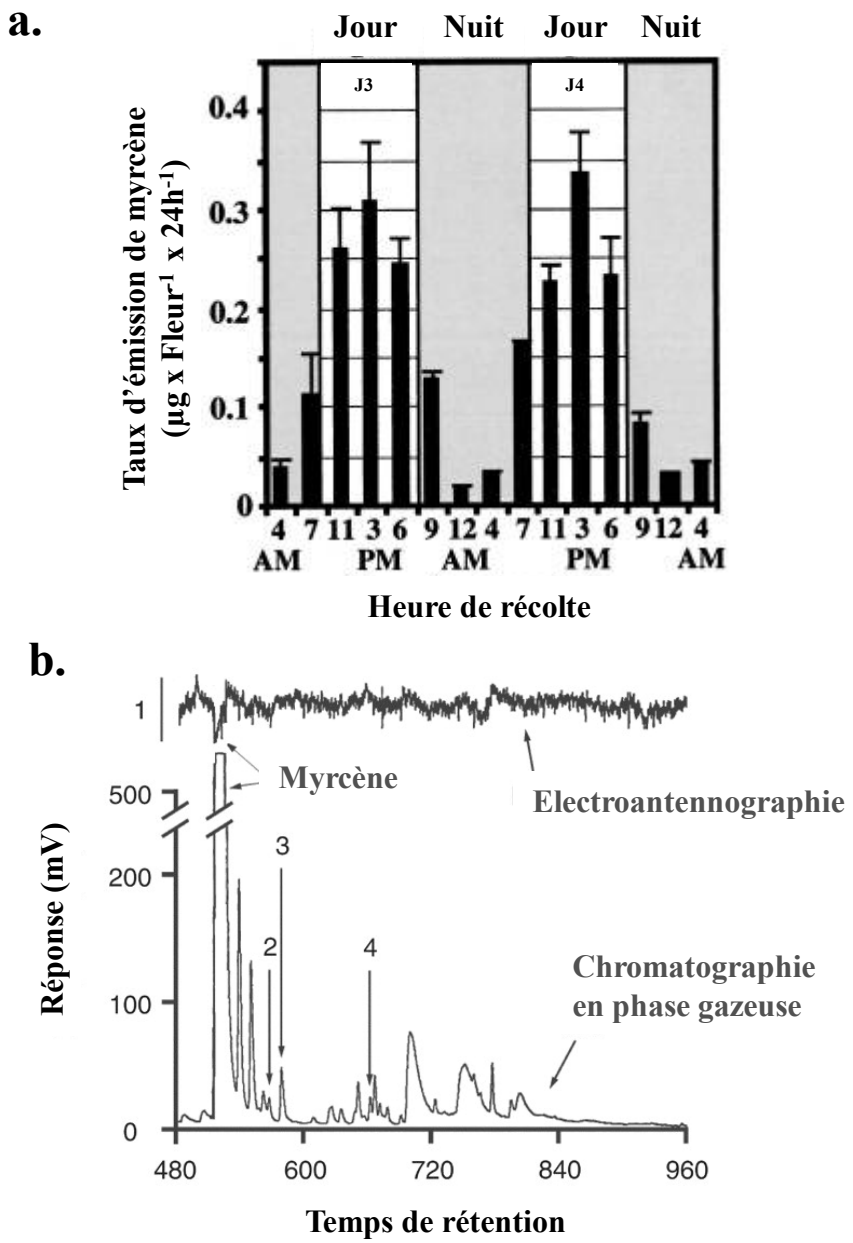


Figure 23: Rôle biologique du myrcène dans la pollinisation. a. L'émission du myrcène sous le contrôle du cycle circadien comme l'indique le taux de myrcène pendant deux cycles de jour/nuit du jour 3 (J3) au jour 4 (J4) à sept différentes tranches horaires. **b.** Réponse électrophysiologique de l'insecte pollinisateur soumis à l'émission de myrcène. Spectre chromatographique en phase gazeuse des monoterpènes émis par les fleurs de muflier (*Antirrhinum majus*). D'après Dudareva *et coll.*, *The Plant cell* **15**, 1227-41 (2003).

détaillée montre que lorsque les feuilles de maïs sont ingérées par les chenilles (larves) du papillon de nuit (*Spodoptera exigua*), la plante libère des terpénoïdes volatils, tels les sesquiterpénoïdes bergamotène, farnesène et le dérivé de sesquiterpène nérolidol. Ces substances attirent la guêpe parasitoïde (*Cotesia marginiventris*) qui pond entre les plaques de l'exosquelette de la chenille. Juste après leur éclosion, les larves affamées se nourrissent des tissus de la chenille, la détruisant (Turlings *et al.*, 1990) (**Fig**. **24**). Le phénomène implique que la guêpe parasitoïde a appris à associer les odeurs des sesquiterpénoïdes avec la présence de la chenille, sa proie.

I.2.3.2.2.3 DITERPÈNES OU LES BITERPÉNOÏDES

Les conifères produisent des terpénoïdes qui sont toxiques pour les insectes ou ont une incidence négative sur leur physiologie et celle de leur descendance. L'oleorésine, sécrétée principalement par les conifères, est composée d'un mélange équimolaire de monoterpénoïdes et de diterpénoïdes, plus de petites quantités de sesquiterpénoïdes. Les monoterpènes et sesquiterpènes, volatils, s'évaporent avec le temps alors que les diterpénoïdes non volatils sont oxydés pour former des acides. L'acide abiétique est ainsi formé par trois oxydations successives du copalyl pyrophosphate par les cytochrome-P450 mono-oxygénases (**Fig**. **25a**). Ces acides polymérisent et forment une masse durcie, la résine. Celle-ci scelle les plaies du tissu végétal, emprisonnent les envahisseurs et agit comme barrière physique contre les insectes herbivores. Ce mécanisme de défense des plantes terrestres contre la prédation des insectes est très ancien. Les traces fossiles du premier insecte, *Rhyniognatha hirsti*, inclues dans la résine montrent que les insectes herbivores sont les hôtes des conifères depuis au moins 220 Ma (Engel and Grimaldi, 2004). L'oléorésine s'accumule dans des structures anatomiquement spécialisées, conduits et ampoules de résine qui agissent comme des réservoirs de stockage d'oléorésine sous pression. Lorsqu'un conifère est attaqué par un insecte, la résine est expulsée et engloutit l'insecte (Zulak and Bohlmann, 2010) (**Fig**. **25b**).

Les gibbérellines sont des diterpénoïdes qui ont des effets hormonaux essentiels au développement des organes des plantes. Les gibbérellines sont synthétisées par une voie analogue à celle de l'acide abiétique, mais faisant intervenir six étapes d'oxydation par les cytochrome-P450 mono-oxygénases. Il existe 136 gibbérellines de plantes, de champignons et de bactéries (Gibberellins, WEB-page), toutes n'étant pas biologiquement actives car certaines sont uniquement des intermédiaires de synthèse. Les acteurs de la voie de signalisation des gibbérellines ont été identifiés par des approches génétiques. Ainsi, des plantes mutantes de riz, incapables de répondre à la stimulation exercée par les gibbérellines, sont naines (**Fig**. **26a**). Ce sont des mutants de l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) qui ont permis d'identifier le premier acteur, DELLA, produit du gène *GAI*, un inhibiteur de transcription (Peng *et al.*, 1997). Cette approche a aussi permis d'identifier chez le riz un récepteur soluble des gibbérellines, Gibberillin Insentive Dwarf-1 (*GID1*) (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005). La protéine DELLA inhibe la croissance cellulaire des plantes en réprimant la transcription. En réponse aux stimuli de croissance et de développement, les gibbérellines actives synthétisées se lient à GID1 et induisent un changement de conformation du complexe formé entre GID1 et DELLA. Ceci provoque l'ubiquitination et la dégradation du

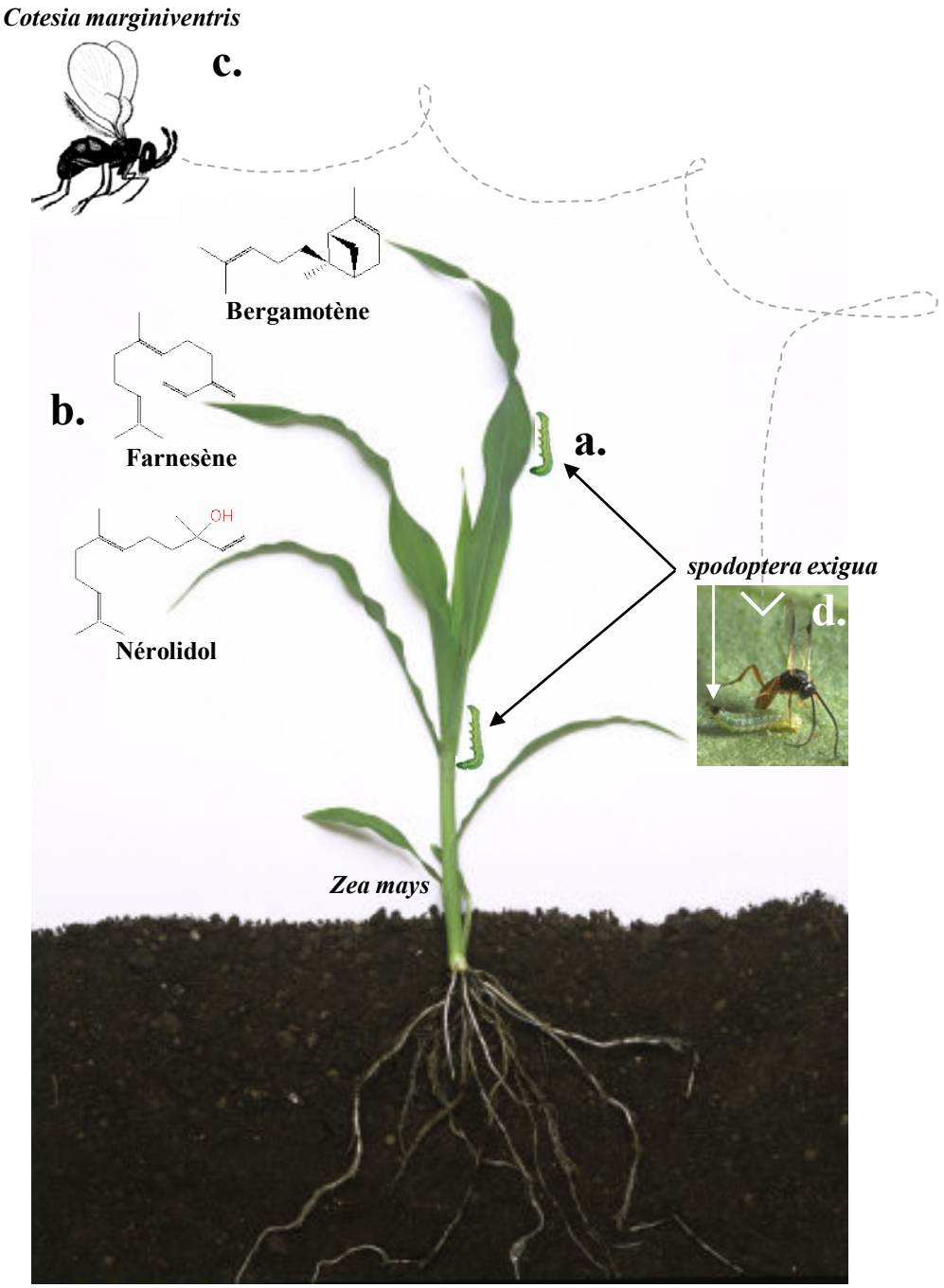


Figure 24 : La défense des plantes contre les herbivores via l'attraction d'un prédateur. a. L'attaque d'un plant de maïs par la chenille du pavillon *spodoptera exigua* provoque (**b.)** l'émission par la plante de sesquiterpénoïdes (bergamotène, farnesène et un dérivé, nérolidol). **c.** Ceux-ci sont utilisés par la guêpe parasitoïde (*Cotesia marginiventris*) comme signaux signalant la présence de sa proie. **d.** La guêpe pond ses œufs sur la proie, les larves détruiront la chenille après leur éclosion.

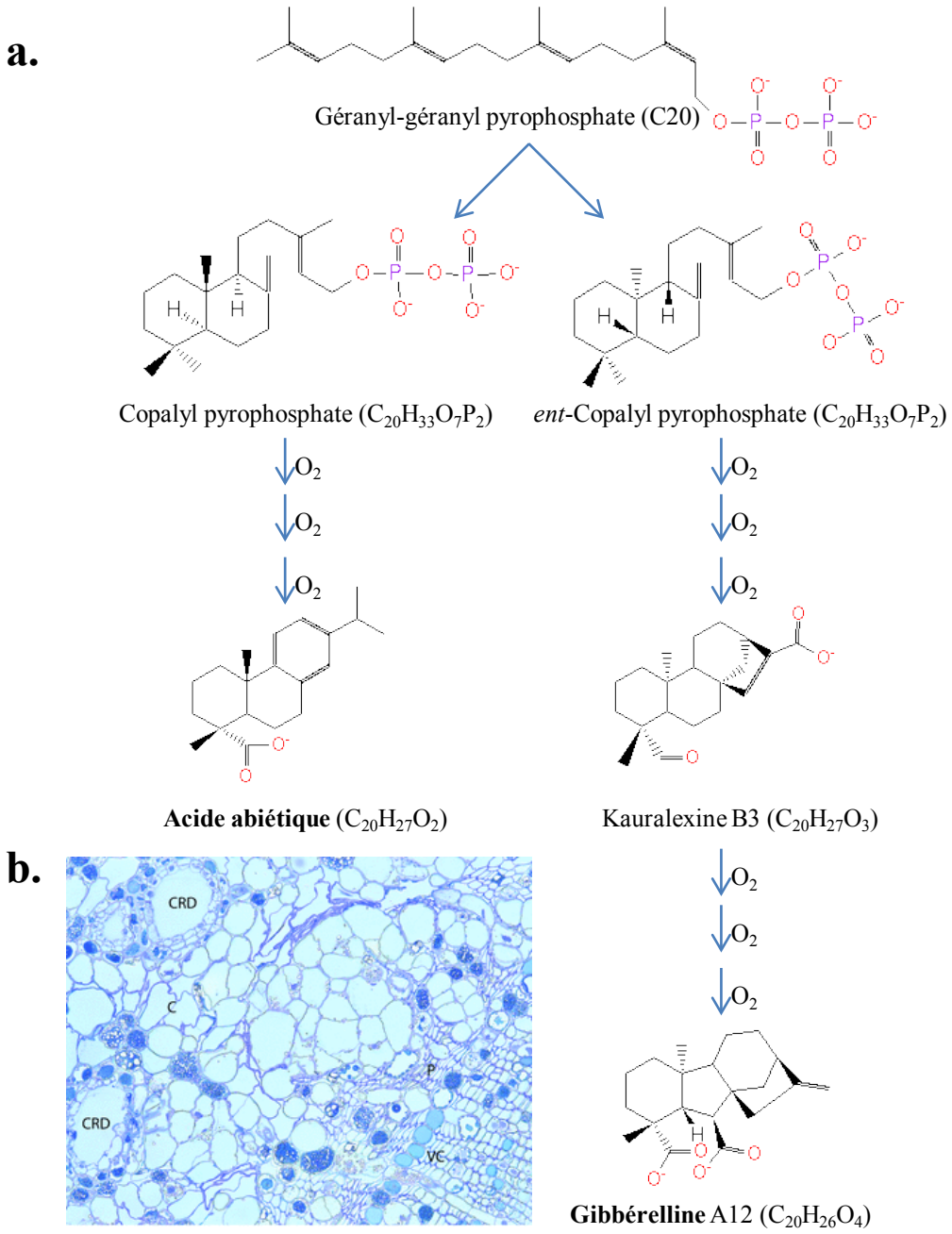


Figure 25: Les biterpénoïdes. **a.** Voie de synthèse de l'acide abiétique, constituant de l'oléorésine et de la gibbérelline, une phytohormone, par oxydation de diterpénoïdes par les cytochrome-P450 mono-oxygénases. **b.** Concentration de l'oléorésine dans des structures spécialisées chez les conifères. C, cortex, CRD, conduit de résine constitutive; P, phloème secondaire; VC, cambium vasculaire; X, xylème secondaire.

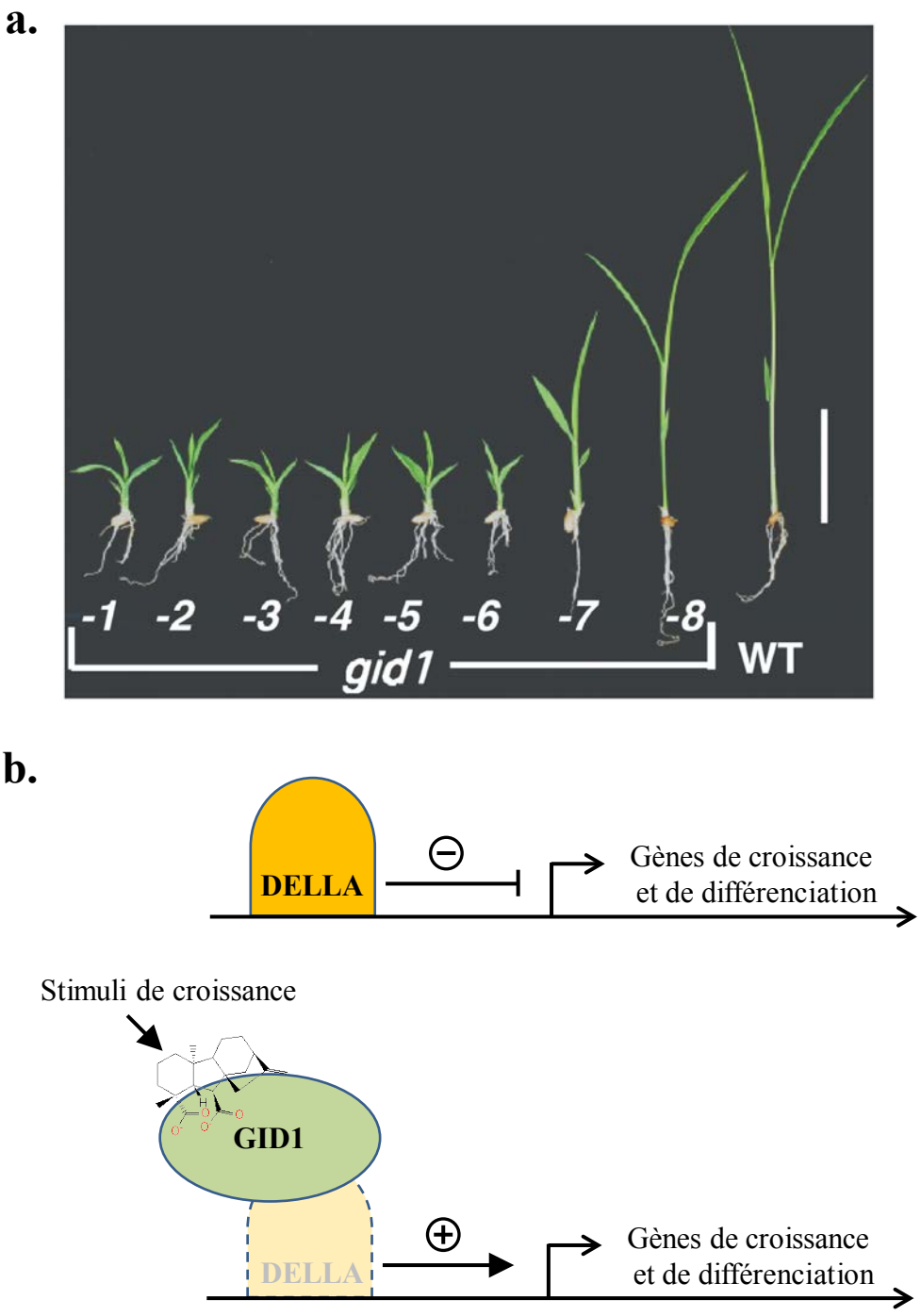


Figure 26: La signalisation des gibbérellines. a. Plants mutants (*gidx*) de riz (*Oryza sativa)* incapables de répondre à la stimulation de croissance induite par les gibbérellines. WT; plant normal. D'après Ueguchi-Tanaka *et coll.*, *Nature* **437**, 693-8 (2005). **b.** Rôle du récepteur, répresseur de la transcription DELLA et du récepteur soluble des gibbérellines, GID1.

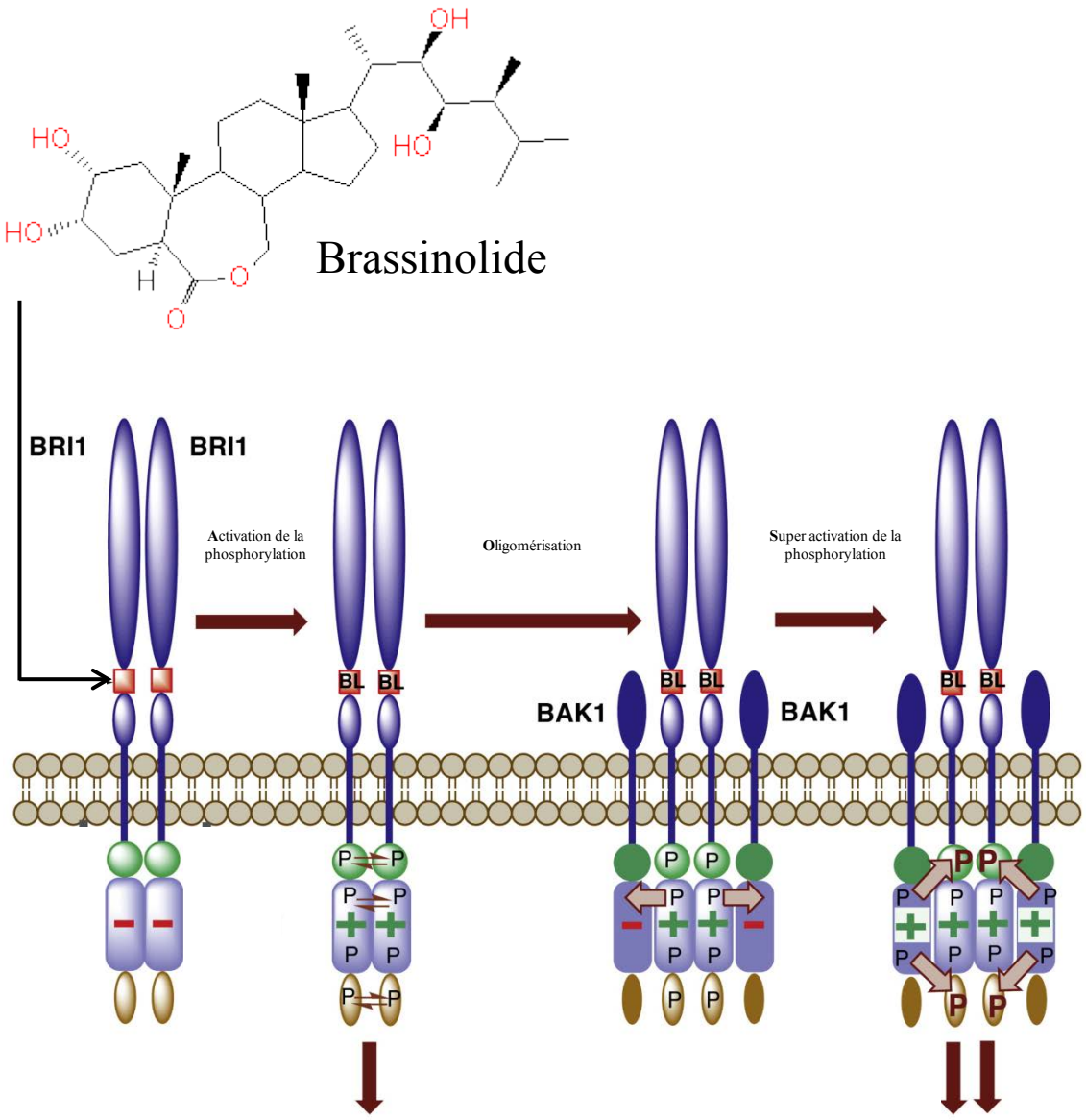


Figure 27: La signalisation des brassinostéroïdes. L'interaction des brassinostéroïdes avec leur récepteur BRI1 induit la trans-phosphorylation des domaines intracellulaires. La kinase BAK1 est recrutée, phosphorylée par BRI1 (oligomérisation) et phosphoryle à son tour BRI1 pour une activation maximale de la voie. Adapté de Wang *et coll.*, *Dev Cell.* **15**, 220-35 (2008).

répresseur DELLA par le protéasome, permettant ainsi la croissance végétale (Daviere and Achard, 2013) (**Fig**. **26b**).

I.2.3.2.2.4 TRITERPÉNOÏDES

Les brassinostéroïdes constituent une famille de plus de 60 triterpénoïdes stéroïdiens. Le premier brassinostéroïde, la brassinolide a été purifiée en 1979 à partir de 200 kg d'un extrait de pollen de colza (*Brassica napus*) en se guidant sur la capacité des fractions de l'extrait à favoriser l'élongation cellulaire. Ceci a permis d'en purifier 10 mg et d'en établir la structure moléculaire par diffraction des rayons X (Grove *et al.*, 1979). Les brassinostéroïdes sont présents dans l'ensemble des tissus des plantes terrestres, mais avec des concentrations plus élevées dans les pollens, les graines et les fruits. Le mode d'action des brassinostéroïdes est particulièrement intrigant car contrairement aux hormones stéroïdiennes de l'animal dont l'action physiologique est relayée par interaction avec des récepteurs nucléaires à l'intérieur de la cellule, l'action des brassinostéroïdes est relayée par un récepteur à activité sérine/thréonine kinase, « Brassinosteroid Insensitive-1 » (BRI1) exprimé à la surface des cellules végétales (Friedrichsen *et al.*, 2000; Noguchi et al., 1999), avec son partenaire « Brassinosteroid Associated receptor Kinase-1 » (BAK1) (Nam and Li, 2002) (**Fig**. **27**).

I.2.3.2.2.5 TETRATERPÉNOÏDES

Dans la nature, les plantes doivent pouvoir s'adapter continuellement aux contraintes de leur environnement. La quantité d'eau du sol est un des facteurs abiotiques qui régule la croissance des végétaux. Le dioxyde de carbone et l'eau sont indispensables, avec l'énergie lumineuse, à la photosynthèse [$6CO_2 + 6H_2O + \gamma \rightarrow$ hexose + $6O_2$]. L'acide abscissique (AAB) est l'hormone qui confère aux plantes une tolérance aux stress environnementaux et notamment à la sécheresse. Cette résistance permet aux plantes de coloniser des niches écologiques où l'eau est présente en quantité limitée ou sporadique. L'acide abscissique est un sesquiterpénoïde (C15) formé par clivage de caroténoïdes [une sous-classe de tetraterpénoïdes (C40)]. Le lycopène, un caroténoïde qui est produit par condensation du géranyl-géranyl pyrophosphate (**Fig. 21**) est cyclisé et hydroxylé pour former la zéaxanthine, puis la violaxanthine (**Fig. 28a**). La conversion de la violaxanthine en néoxanthine, catalysée par la néoxanthine synthétase est l'étape limitante lors de la synthèse de l'acide abscissique suite à la déshydratation du tissu végétal. La 9-cis-époxycarotenoïde dioxygénase catalyse ensuite le clivage du 9-cis-zéaxanthine (C40) et du 9-cis-violaxanthine (C40) en xanthoxine (C15). Il s'agit là de la première étape irréversible de la synthèse d'acide abscissique (Wasilewska *et al.*, 2008). L'acide abscissique est distribué dans toute la plante sous forme d'un ester inactif du glucose qui circule dans le xylème des racines, le phloème des feuilles (le tissu conducteur de la sève élaborée riche en glucides) et est activé *in situ*. Du fait que les plantes terrestres sont protégées par une paroi pectocellulosique, les échanges d'eau et de gaz avec l'atmosphère environnant s'effectuent par les pores des stomates (**Fig. 28b**). L'ouverture et la fermeture de ces pores sont commandées par des cellules de garde dont la morphologie est modifiée par la pression de turgescence, ou pression de l'eau intracellulaire sur la paroi pectocellulosique. La lumière du soleil provoque l'ouverture des stomates pour permettre l'entrée du CO_2 atmosphérique, alors que le manque d'eau commande leur fermeture. Lors d'une sécheresse, le stress osmotique résultant induit l'expression des enzymes de synthèse

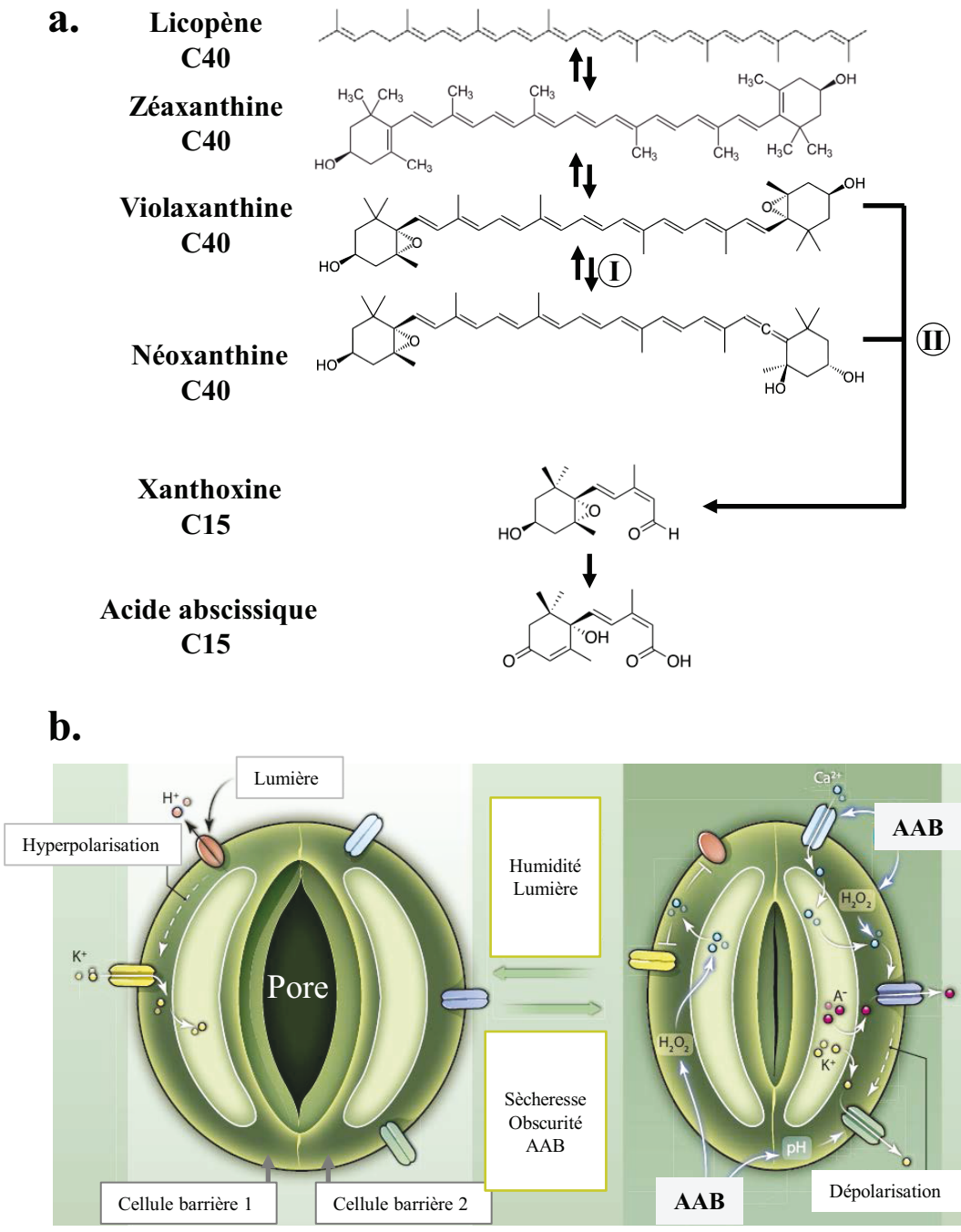


Figure 28: L'acide abscissique. a. Synthèse de l'acide abscissique (sequiterpénpoïde) à partir de caroténoïdes (tetraterpénoïdes). I, néoxanthine synthétase et II, 9-cis-époxycarotenoïde dioxygénase. **b.** Représentation d'un stomate ouvert (à gauche) et sa fermeture (à droite). Les deux cellules barrières forment un pore qui s'ouvre et se ferme selon la pression de turgescence de par l'obscurité et la sécheresse. Ce phénomène est sous le contrôle de l'acide abscissique (AAB). Adapté de Joshi-Saha *et coll.*, *Sci Signal* **4**, re4 (2011).

de l'acide abscissique telles que la néoxanthine synthétase et la 9-cis-époxycarotenoïde dioxygénase. L'acide abscissique interagit avec son récepteur cytoplamique PYR, ce qui inhibe l'activité de la phosphatase 2C, active la kinase SNRK2 et la phosphorylation de protéines ciblées par l'acide abscissique. Cet évènement produit un stress oxydatif (H_2O_2) ainsi que la dépolarisation des cellules de garde et la fermeture du pore (**Fig. 28b**) (Joshi-Saha et al., 2011).

I.2.3.2.2.6 POLYTERPÉNOÏDES

Le caoutchouc est un polyterpénoïde [poly(cis-1,4-polyisoprène)] qui procure au latex ses propriétés physico-chimiques. Le latex est une émulsion végétale contenant un grand nombre de métabolites secondaires, dont des alcaloïdes et ainsi que des protéines. Le latex est exsudé par environ 10% des espèces végétales, et plus de 20 000 espèces d'angiospermes. L'adhésivité et la couleur généralement blanche de latex sont dues au cis-1,4-polyisoprène en dispersion dans ce liquide (**Fig. 29a**). Le latex est stocké dans des cellules allongées qui forment les canaux laticifères s'étendant le long de la plante (**Fig. 29b**). Lors d'une lésion mécanique du tissu végétal, le latex libéré au niveau de la plaie peut entrer en contact avec l'herbivore, l'engluant. La biosynthèse du caoutchouc est catalysée par la « rubber » synthétase et à partir du diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) par condensation progressive de molécules d'isopentényl pyrophosphate (IPP). Ceci conduit à la formation d'un polymère de haut poids moléculaire (**Fig. 21**).

Le rôle du latex est de protéger les plantes contre les insectes herbivores. De nombreuses molécules contenues dans le latex sont toxiques, antinutritionnelles, le latex étant lui même collant. Cette dernière propriété provient du caoutchouc qui piège l'insecte herbivore ou bien colle ses pièces buccales (Mithofer and Boland, 2012). Les insectes herbivores tentent d'éviter tout contact avec le latex. Certains spécialistes taillent les feuilles en vue de rompre les canaux laticifères provoquant l'exsudation du latex par la pression interne du tissu végétal afin de se nourrir des parties de la plante débarrassées du latex (Konno, 2011). Ainsi, la larve de papillon spécialiste *Cyrestis thyodamas* pratique une entaille dans la veine de la feuille du Ficus (*Ficus virgata*) pour éliminer le latex avant de se nourrir (**Fig. 29c**).

I.2.3.3 LES ALCALOÏDES

Les alcaloïdes sont produits à partir d'acides aminés ou par transamination d'autres molécules et comportent, en général, un hétérocyclique comprenant un atome d'azote. Le terme alcaloïde provient de leur propriété chimique qui les rapprochait des substances alcalines lors de leur première description faite par Meissner en 1919 (Aniszewski, 2007). Les alcaloïdes sont synthétisés par environ 25% des plantes vertes, mais on les retrouve aussi chez les champignons, tels l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*) qui synthétise l'acide lysergique. Dans le règne animal, ils sont présents notamment chez les éponges, les millipèdes, les poissons et les amphibiens (grenouilles, crapauds et salamandres). Certaines familles de plantes sont riches en alcaloïdes comme les Solanacées (2 500 espèces dont le tabac), les Papaveracées (250 espèces dont le pavot), les apocynacées (4 555 espèces dont le laurier rose), et les Ranunculacées (1 500 espèces dont le bouton d'or). Collectivement, les plantes produisent plus de 12 000 alcaloïdes qui sont classifiés d'après leur structure

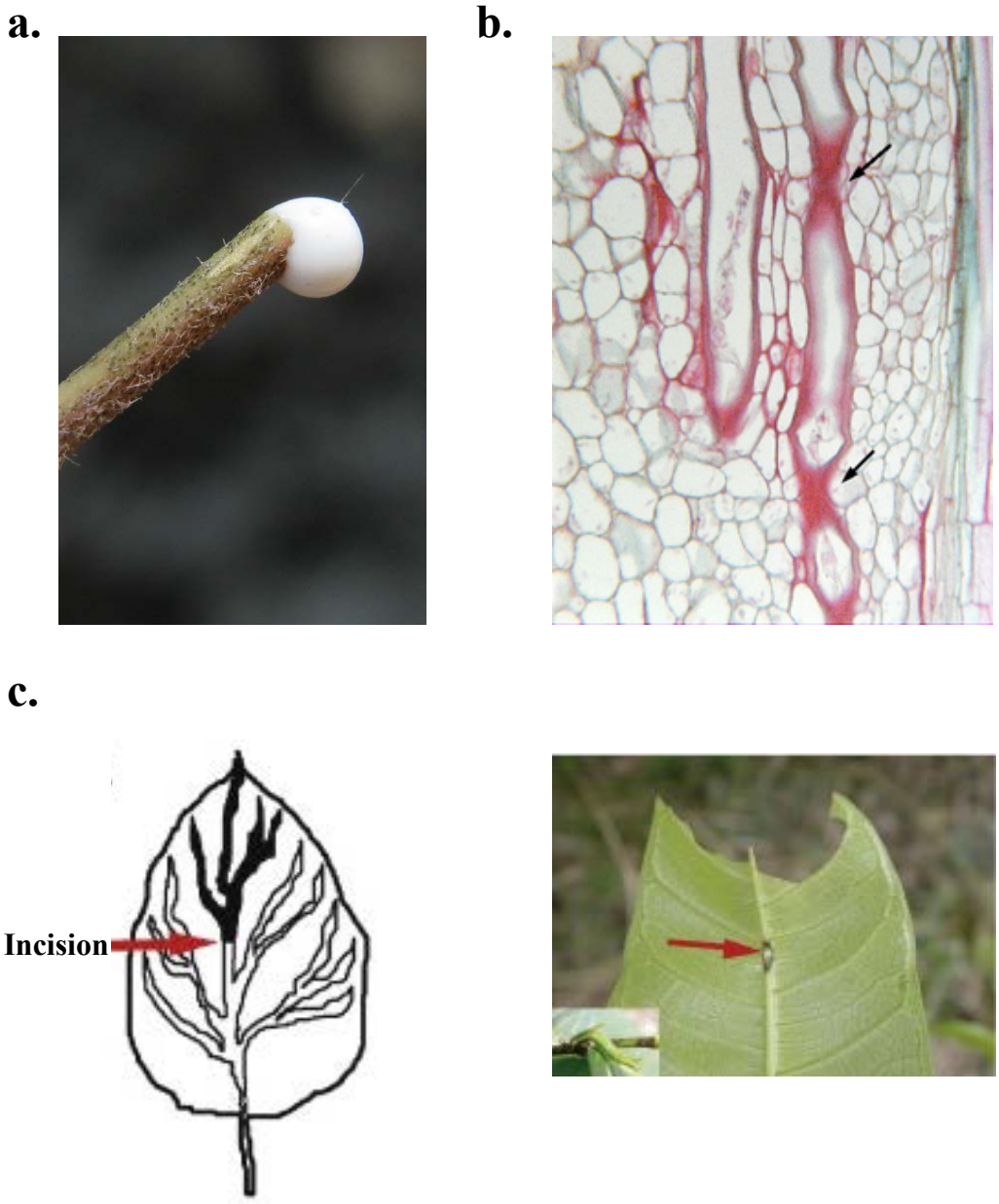


Figure 29: a. Le cis-1,4-polyisoprène donne sa texture au latex. a. La brisure d'une tige d'euphorbe (*Euphorbia*) provoque un écoulement immédiat de latex. **b.** Les canaux laticifères d'euphorbe colorés au « red oil ». Les flèches indiquent le rétrécissement des canaux. **c.** Les flèches rouges correspondent à la coupe réalisée par la larve de *Cyrestis thyodamas* sur une feuille de *Ficus virgata*. Les veines en noir à gauche correspondent à la partie ne contenant plus de latex que l'insecte a mangé (à droite). Adapté de Konno, *Phytochemistry* **72**, 1510 (2011) et (http://www.sbs.utexas.edu/mauseth/weblab/).

chimique ou bien selon leur voie de biosynthèse (Ziegler and Facchini, 2008). En effet, contrairement à la plupart des autres métabolites secondaires, chaque sous-classe d'alcaloïdes a pour origine une voie de synthèse qui lui est propre. Les alcaloïdes vrais comprennent une famille extrêmement diverse de molécules avec un hétérocycle comprenant un atome d'azote dérivé d'acides aminés lévogyres tels que lysine, histidine, phénylalanine, tyrosine, tryptophane et ornithine. Les chimistes distinguent aussi les proto-alcaloïdes avec un atome d'azote en dehors de l'hétérocycle (**Fig. 30a**) et les pseudo-alcaloïdes dont le squelette carboné ne dérive pas d'acides aminés, mais résulte d'une transamination (**Fig. 30b**).

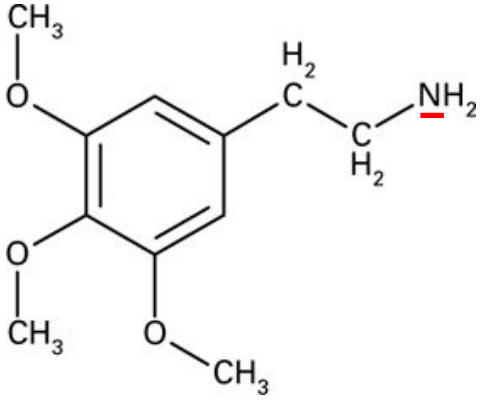
I.2.3.3.1 VOIES DE SYNTHESE DES ALCALOÏDES

Les précurseurs des alcaloïdes sont principalement les acides aminés aromatiques, phénylalanine, tyrosine pour les alcaloïdes isoquinoléiques et tryptophane pour les alcaloïdes indoliques. Ils peuvent être synthétisés à partir d'autres acides aminés comme la lysine, précurseur des alcaloïdes pipériniques et quinolizidiniques et l'ornithine, via l'acide glutamique pour les alcaloïdes pyrrolidiniques, pyrrolizidiniques et tropaniques (**Fig. 31**). Le fait que ces derniers dérivent d'un acide aminé non codé dans le génome ne retire rien au fait que la synthèse des alcaloïdes est enracinée dans celui des protéines. Le précurseur de l'ornithine est l'acide glutamique, qui possède deux codons (GAA et GAG) dans le code génétique. Le métabolisme du pyruvate est à la racine de la synthèse des alcaloïdes. La voie du shikimate est responsable de la synthèse d'acides aminés aromatiques qui sont des précurseurs des alcaloïdes mais aussi des composés phénoliques, alors que les alcaloïdes peuvent avoir comme précurseurs d'autres acides aminés non aromatiques qui ont pour origine différents métabolites de la glycolyse et du cycle de Krebs. La biosynthèse des alcaloïdes inclut ainsi un nombre très impressionnant d'intermédiaires sujets à de nombreuses réactions chimiques catalysées par des enzymes elles-mêmes codées dans le génome.

I.2.3.3.2 RÔLE DES ALCALOÏDES

Malgré les recherches intenses menées sur les alcaloïdes (401 763 entrées dans Pubmed au 21 Mai 2014), la compréhension de leur rôle biologique et leur origine évolutive reste incomplète. L'hypothèse la plus couramment admise est que les alcaloïdes sont des molécules de défense contre les prédateurs (herbivores pour les plantes supérieures). Les alcaloïdes ne deviennent toxiques qu'après modification du pH. Ils s'accumulent généralement dans des types cellulaires spécifiques en raison de leur cytotoxicité et de leur rôle dans la stratégie défensive des plantes. Par exemple, chez le pigamon jaune ou rhubarbe des pauvres (*Thalictrum flavum*), les alcaloïdes, comme la protoberbérine (isoquinoléique) s'accumulent au niveau des racines (Samanani *et al.*, 2005) (**Fig. 32a**). Chez le pavot somnifère, les opiacés et leurs enzymes de synthèse sont localisés dans les cellules adjacentes aux vaisseaux laticifères des capsules (Bird *et al.*, 2003) (**Fig. 32b**). Chez la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), les alcaloïdes, dont la vindoline sont séquestrés dans des cellules spécialisées isolées du reste du tissu végétal, les idioblastes (Ziegler and Facchini, 2008). La vindoline est ainsi isolée de la catharanthine, un second alcaloïde situé sur la surface de la feuille. En revanche, lorsque les feuilles sont endommagées, les deux molécules

a.





b.

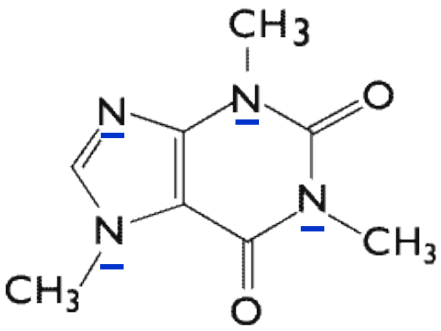




Figure 30: Proto-alcaloïdes et pseudo-alcaloïdes a. Le peyotl (*Lophophora williamsii*), un cactus originaire du nord du Mexique et du sud du Texas synthétise un proto-alcaloïde, la mescaline. L'atome d'azote souligné en rouge se trouve en dehors de l'hétérocycle **b.** Le caféier (*Coffea arabica*) est une plante tropicale de la famille des Rubiacées dont les graines contiennent un pseudo-alcaloïde, la caféine. Les atomes d'azote soulignés en bleu ne dérivent pas d'un acide aminé précurseur mais d'une transamination.

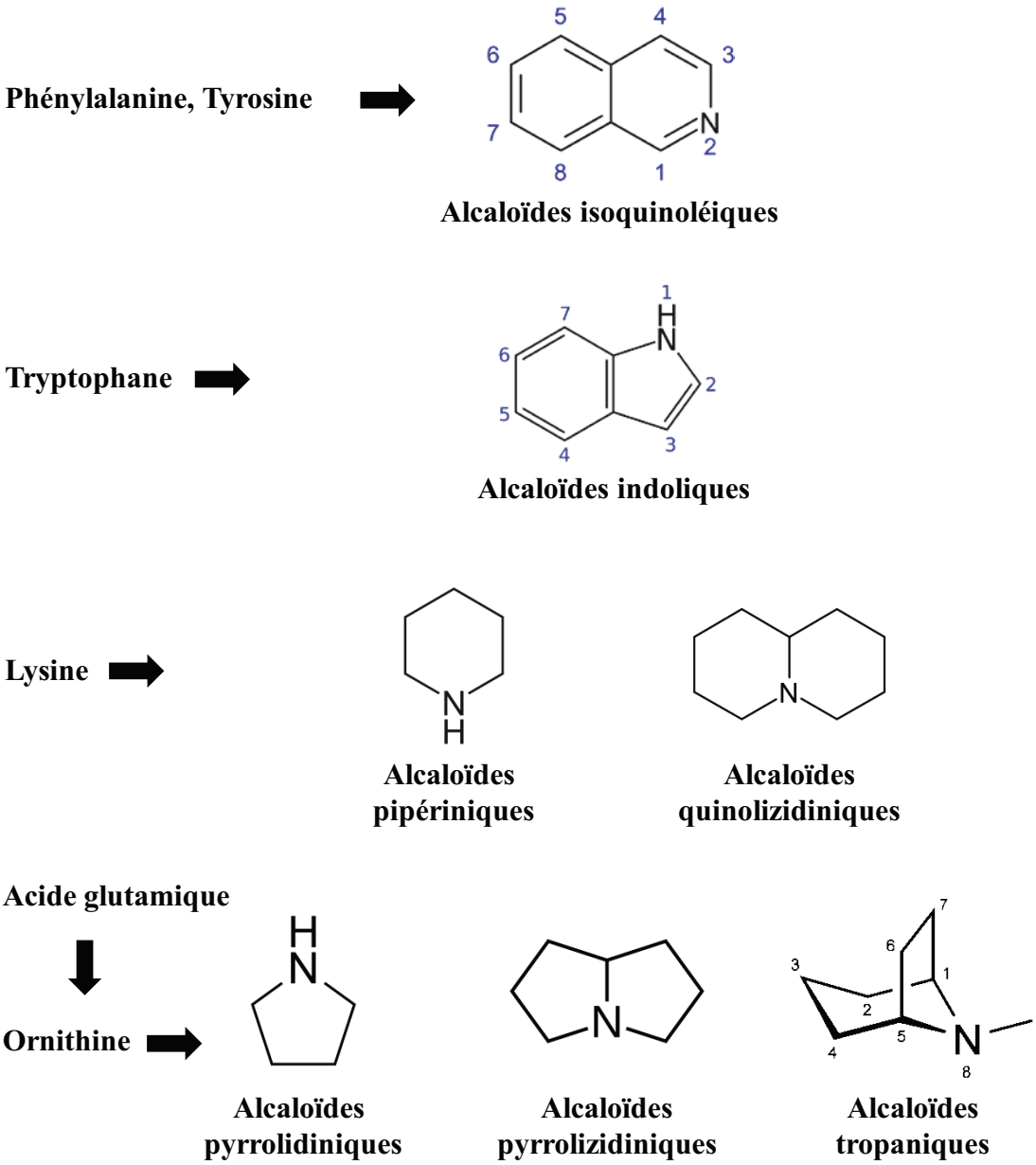


Figure 31: Classification structurale des alcaloïdes. Les acides aminés précurseurs sont indiqués à gauche.

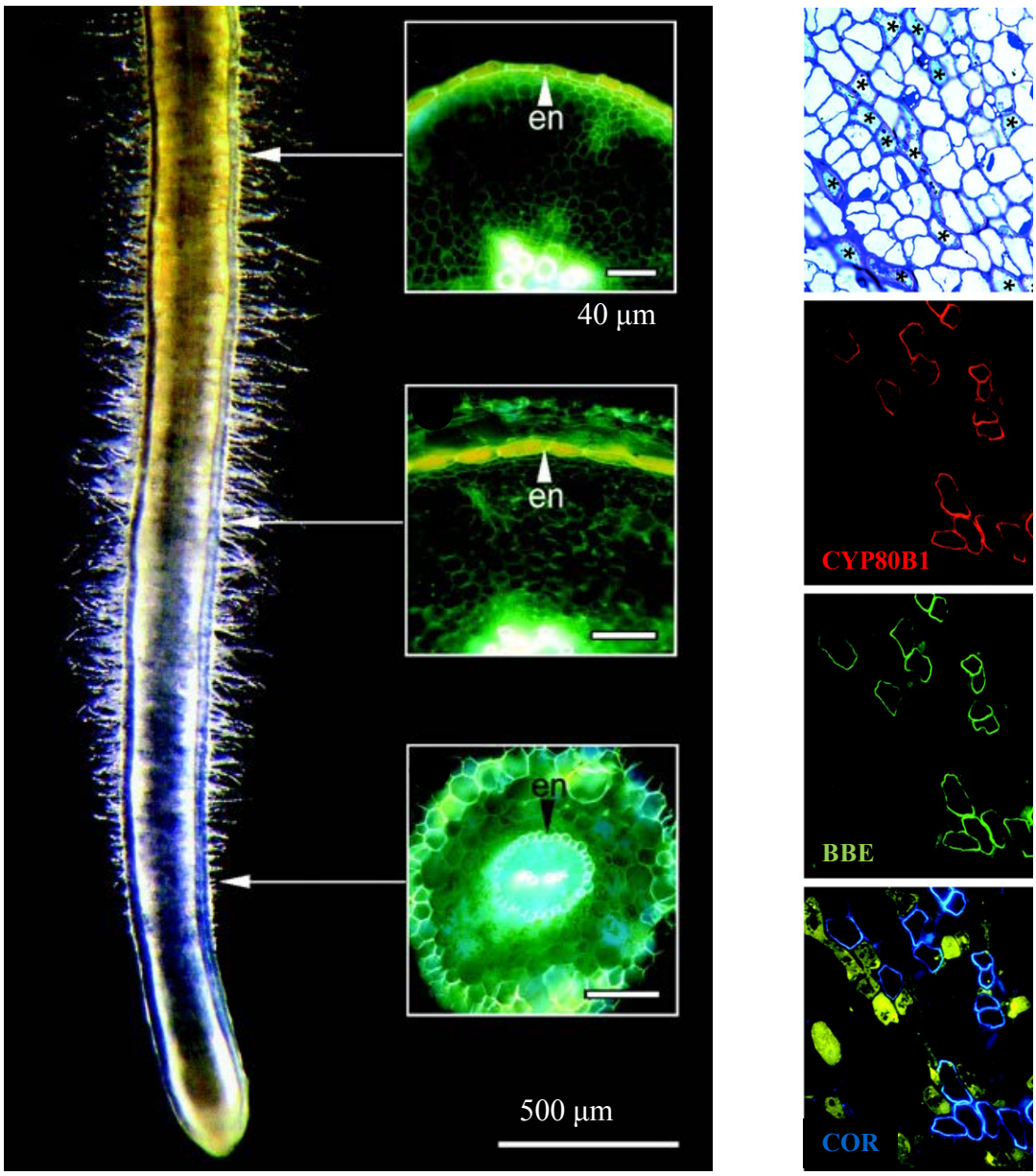
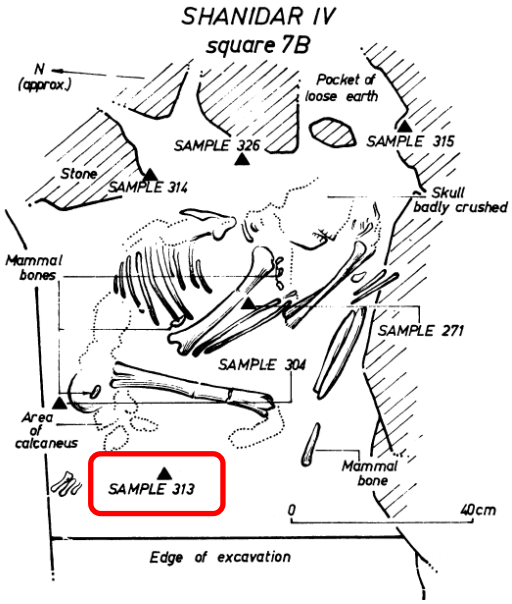


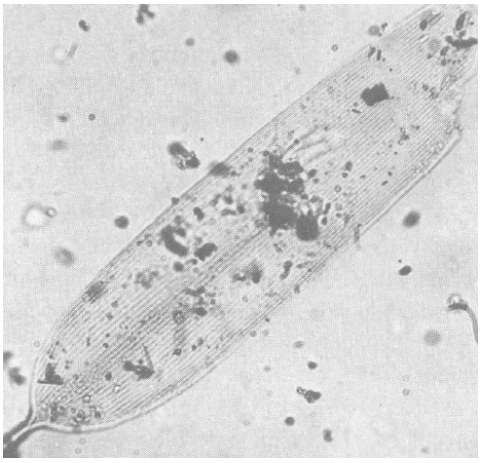
Figure 32: Accumulation d'alcaloïdes dans divers tissus végétaux. a. La protoberbérine s'accumule dans l'endoderme (en) des racines du pigamon jaune, ou rhubarbe des pauvres (*Thalictrum flavum*). En microscopie optique la protoberbérine se distingue par sa couleur jaune, alors que sur des sections de 0,5 mm de racines à différents stades de développement (haut vers le bas), la protoberbérine (émission en jaune) est révélée par microscopie à épifluorescence après illumination dans l'UV. **b.** Les enzymes de synthèse de la morphine: (S)-N-methylcoclaurine3-hydroxylase (CYP80B1, rouge), Berberine bridge enzyme (BBE, vert) et codeinone reductase (COR, bleu) sont localisées dans les cellules adjacentes aux vaisseaux laticifères des capsules du pavot somnifère. En haut, les vaisseaux laticifères après coloration au bleu de toluidine sont indiqués par des astérisques. Adaptés de Samanani *et coll.*, *Plant Cell* **17**, 915-26 (2005) et Bird *et coll.*, *Plant Cell* **15**, 2626-35 (2003).

dimérisent pour former un produit toxique pour les agresseurs de la plante, la vincristine (Courdavault *et al.*, 2014). Certains insectes ont développé la capacité de séquestrer les alcaloïdes et de les utiliser pour se défendre eux-mêmes contre leurs prédateurs. La capacité de la mite *Grammia geneura* à séquestrer des alcaloïdes de type pyrrolizidines tient au fait que ces molécules existent sous formes toxiques (des amines tertiaires) et non-toxiques (N-oxydées). Ces insectes n'accumulent que la forme non-toxique dans leurs tissus car la sénécionine N-oxygénase de leur hémolymphe convertit la forme toxique en forme non-toxique. L'acquisition de cette enzyme semble être une condition préalable à la séquestration des alcaloïdes par les espèces de mites (Hartmann et al., 2005). L'opinion selon laquelle ce mécanisme a joué un rôle dans l'évolution des voies de synthèse des alcaloïdes avait été formulée en 1888 par Ernest Stahl. Ce mécanisme est controversé et les études sur le terrain manquent encore à ce jour. Certains ont avancé des arguments qui minimisent le rôle de la sélection naturelle dans la diversification des alcaloïdes, mécanisme qui ne fait pas l'unanimité. Ainsi, il est connu qu'un nombre très restreint d'alcaloïdes ont des effets toxiques plus importants chez les invertébrés que chez les vertébrés. Parmi ceux-ci il n'y a aucune observation se rapportant à la séquestration d'alcaloïdes toxiques pour les invertébrés tels que la cinchonidine, la cincholine, la codéine, la jacobine, la lobeline ou la papavérine. Certains travaux indiquent que le rôle écologique et donc externe à la plante des alcaloïdes pourrait être secondaire à un rôle interne plus ancestral de régulation du métabolisme. Certains affirment d'ailleurs pour soutenir cette thèse que la diversité des alcaloïdes égale celle de tous les organismes vivants (Aniszewski, 2007).

a.



b.



c.



d.



Figure 33: Evidence de l'utilisation de plantes thérapeutiques et psychotropes durant la préhistoire. a. Tombe de Shanidar IV et la position de l'échantillon 313 encadré en rouge. **b.** Reste d'une aile de papillon retrouvée dans l'échantillon 313. **c**. Reproduction de la peinture rupestre « la danse des bâtons » de Kondusi en Tanzanie datant de 25 000 ans (détail, Musée national de Nairobi au Kenya). **d.** Dessin d'une peinture rupestre de l'époque des têtes rondes à Tassili n'Ajjer en Algérie illustrant les effets de champignons hallucinogènes (relief G. Samorini 1989; wara W00138).

I.3 L'ETHNOPHARMACOLOGIE

I.3.1 UTILISATION INSTINCTIVE DES PLANTES

Un grand nombre d'animaux opère un choix attentif aux plantes entrant dans leur régime alimentaire en utilisant leurs sens olfactif et gustatif. Les métabolites secondaires des plantes qui sont toxiques pour les herbivores sont en général répulsifs. Pourtant certains animaux semblent surmonter cette répulsion pour se soigner. La première évidence de l'ingestion volontaire de métabolites secondaires à des fins thérapeutiques a été faite chez les grands singes. Les primatologues de terrain ont observé que les grands singes avalaient, le matin à jeun, des feuilles sans aucune valeur nutritive. C'est l'observation du comportement d'un chimpanzé visiblement infecté par des parasites intestinaux mâchant des feuilles de *Vernonia amygdalina*, un arbuste qui pousse en Afrique tropicale, qui a conduit finalement à une démonstration dénuée d'ambiguïtés. Celui-ci épluchait méticuleusement les jeunes pousses de *Vernonia amygdalina* pour y supprimer l'écorce et les feuilles afin de mâcher la fibre pour y extraire un jus très amer contenant, entre autres, un sesquiterpénoïde, le vernodaline. Il a ensuite été constaté chez ce chimpanzé que le nombre d'œufs de ce parasite dans ses fèces était très significativement réduit (Huffman, 2003). Les effets thérapeutiques de *Vernonia amygdalina* ont depuis été validés chez l'animal et l'activité antiparasitaire de la vernodaline mise en évidence *in vitro*. De manière très intéressante, il semble que cette automédication soit transmise par les mères aux jeunes chimpanzés.

I.3.2 USAGE DE PLANTES MEDICINALES DEPUIS L'HOMME DE NEANDERTAL

Nous ne savons bien entendu pas depuis combien de temps les chimpanzés ont adopté ce comportement. La plus ancienne probable utilisation des végétaux à des fins thérapeutiques par la ligné des homininés constitue une controverse passionnante. Le préhistorien André Leroi Gourhan fut le premier à révéler la présence de fleurs déposées lors de l'enterrement d'hommes de Néandertal il y a 60 000 ans dans les tombes du site Shanidar IV des monts Zagros, dans l'actuel Irak. Il y relevait le fait remarquable de la disposition des grains de pollen normalement retrouvés isolés lors d'autres fouilles dans les grottes. Ceux-ci étaient cette fois ci regroupés avec dans certain cas des regroupements ayant conservé la forme de l'anthère de la fleur (Leroi-Gourhan, 1975). Il donna une interprétation de l'esthétique de ce geste rituel traduisant un haut degré de pensée chez l'homme de Néandertal (**Fig. 33a**). L'étude pollinique réalisée ultérieurement a montré une abondance de plantes médicinales comme *Ephedra altissima* et *Centaurea Senetio* et d'autres plantes des genres *Achillea*, *Muscari* et *Althea* dans ces restes. Ceci suggère plutôt leur utilisation par les néandertaliens à des fins thérapeutiques (Lietava, 1992). Par exemple, le naturaliste Pline l'Ancien décrit l'usage de l'herbe d'Achille (*Achillea millefolium*) pour soigner les blessures comme une panacée. Cette plante contient un alcaloïde, l'achilléine qui possède un fort pouvoir antihémorragique. La controverse a été lancée par Jeffery Sommer pour qui les plantes ont très bien pu être enterrées postérieurement par *Meriones persicus*, un petit rongeur (McDonald institute for archaeological research, 1991). Pourtant un des éléments apportés par la publication originelle semble s'opposer à cette réinterprétation. En effet, l'échantillon 313 des pollens prélevés contient les restes d'une aile de papillon (**Fig. 33b**). L'auteur relève qu'il faut peu d'imagination pour concevoir qu'un papillon se posa sur une

fleur qui fut ensuite introduite dans la tombe (Leroi-Gourhan, 1975). L'analyse du tartre dentaire des restes de l'homme de Néandertal a permis de confirmer que contrairement à ce qui était communément admit, les néandertaliens avaient un régime varié, et pas uniquement carné (Henry *et al.*, 2011). L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse réalisée sur le tartre dentaire de 5 néanderthaliens retrouvés sur le site El Sidrón au nord de l'Espagne a identifié la présence dans un cas des pigments anorexigènes au goût amer (dihydroazulène, chamazulène, et coumarine) qui sont des constituants de l'achillée (*Achillea millefolium*) et de la camomille (*Matricaria chamomilla*). Le fait que ces deux plantes soient dépourvues de qualité nutritive semble conforter l'interprétation d'un usage thérapeutique (Hardy et al., 2012).

L'art pariétal n'a laissé aucune trace de l'intérêt de l'homme de Cro-Magnon pour les plantes, même si on a pu spéculer sur leur présence dans des breuvages hallucinogènes lors de cérémonies orchestrées par les chamanes de la préhistoire (Clottes and Lewis-Williams, 2007). Les dessins de plantes sont extrêmement rares dans l'art rupestre sur tous les continents. Pourtant, en Tanzanie où l'art rupestre représente la séquence continue la plus longue dans le monde, une phase caractérisée par la présence de végétaux a pu être datée de -10 000 (+/- 2 000) ans. Une multitude de représentations végétales sont concentrées dans cette phase, alors qu'elles sont pratiquement absentes à toutes les autres périodes. Les représentations anthropomorphiques sont très stylisées (Anati and Nicolas, 2003) (**Fig. 33c**). Ce type de peintures est aussi retrouvé au Sahara central où elles semblent représenter une population dont la vie dépendait en grande partie de la collecte de plantes et qui faisait très probablement une large utilisation de drogues hallucinogènes (**Fig**. **33d**).

Les deux champignons liés par une lanière de cuir retrouvés sur le corps congelé d'Ötzi à 3 210 mètres d'altitude au Tyrol ont été interprétés comme une preuve de l'utilisation de plantes médicinales en Europe il y a 5 300 ans (Capasso, 1998). Grâce aux techniques modernes de séquençage, il a été possible de reconstituer son dernier repas, fait de gibiers et de céréales (Rollo *et al.*, 2002). Cet homme du Chalcolithique, connu comme l'âge du cuivre, est décédé dans des circonstances encore débattues aujourd'hui. Il utilisait les propriétés laxatives du champignon *Piptoporus betulinus* pour combattre une parasitose due à un nématode (*Trichuris trichiura*). La valeur thérapeutique de ce champignon fut contestée dans deux articles publiés dans la même revue prestigieuse, ce qui illustre bien la faiblesse des interprétations d'artéfacts face aux démonstrations expérimentales (Poder and Peintner, 1999; Tunon and Svanberg, 1999). Il faut concéder à l'interprétation originale que les deux champignons transportés par Ötzi devaient évidemment avoir pour lui une certaine valeur, qui semble facile à imaginer.

I.3.3 ÉVOLUTION DE LA PHARMACOPEE AU COURS DE L'HISTOIRE

L'utilisation de médicaments à base de plantes, leur préparation et leur application dans la thérapie humaine, ont été décrits pour la première fois dans l'histoire par les sumériens il y a approximativement 5 000 ans. Plus tôt, en Inde et en Chine, un système médical très sophistiqué de thérapies à base de plantes a été mis au point. Suite à la montée en puissance de ces empires, les connaissances ont été transmises vers l'ouest de l'Égypte, la Grèce et au monde arabe (Petersen and Amstutz, 2008). La médecine ayurvédique, originaire d'Inde, est sans doute la plus ancienne de toutes les traditions médicinales. Elle comprend un



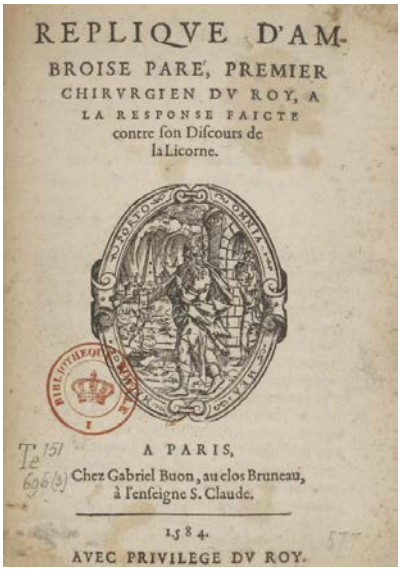
Figure 34: Le mal des ardents ou feu de saint Antoine. Les hallucinations provoquées par les alcaloïdes d'un champignon, l'ergot de seigle, survenaient sous formes d'épidémies lors de périodes particulièrement humides lors desquelles le champignon se développait sur les épis de seigle. Tableau de Pieter Brueghel le Jeune « Les pèlerins de Saint Jean qui dansent à Meulenbeeeck » (1585).

ensemble de pratiques destinées à maintenir l'équilibre et l'harmonie du corps (Gurib-Fakim, 2006). La médecine par les plantes avait aussi pris son essor en Chine sur le concept d'équilibre du yin et du yang comme l'empereur Shen Nung le relate en 2500 avant J.C. Les maladies yin correspondent à une déficience du yang et se soigne par des aliments et épicés, tandis que pour les maladies yang il faut consommer des herbes et des aliments froids. Cette théorie des équilibres associée à cinq éléments (wu xing) rappelle celle des quatre humeurs (sang, bile noire, bile jaune et phlegme) associées aux quatre éléments (air, terre, feu et eau) des Grecs. Ce concept a été utilisé jusqu'à la fin du Moyen Âge. Ces traditions se sont propagées d'est en ouest par la route de la soie. Le myrte (*Commiphora myrrha*) est cité 120 fois dans l'ancien testament comme une plante avec des effets bienfaisants, et la mandragore (*Mandragora offinarum*), une plante rare, est désignée dans la Genèse comme un remède contre la stérilité. Le papyrus d'Ebers datant de 1 500 ans avant Jésus Christ (J.C.) représente une première synthèse, réalisée en Egypte, sur les maladies et leurs remèdes. Au moins 29 espèces de plantes médicinales y sont décrites, dont un grand nombre d'épices (ail, aneth, basilic, cardamone, carvi, coriandre, curcuma, fenugrec, menthe, moutarde, persil, poivre, réglisse, tamarin, thym), mais aussi le bois de Santal, l'encens et le henné. La liste comprend aussi quelques plantes produisant des substances actives comme la belladone et le pavot (Gilbert, 2004). D'ailleurs, l'histoire de l'utilisation des plantes en médicine va de pair avec celle de leur utilisation comme poisons (Reynolds, 2005). Ceci est attesté par la mort de Socrate en 399 avant J.-C. après avoir bu de la ciguë (*Conium maculatum*). Les premières traces écrites incontestables d'un transfert est-ouest est le corpus hippocratique, un recueil d'une soixantaine de livres de médecine datant du 5ème/4ème siècle avant J.C. Hippocrate y liste explicitement les plantes médicinales comme étant originaire d'Inde (Touwaide and Appetiti, 2013). Hippocrate recommandait des remèdes à base de plantes aromatiques administrées sous forme de fumigations ou inhalations, de frictions ou de bains. Il prescrivait également l'utilisation de baies de myrte, de raclures de lotus pour la confection de cataplasmes. L'ouvrage « De materia medica » recense l'utilisation médicale de 1 600 remèdes compulsés par Dioscoride en 77 après J.C. Cet ouvrage dont la majorité des remèdes sont d'origine végétale influença les pharmacopées orientales et occidentales, et fut commenté en France jusqu'à la fin du XVIIIème siècle. La liste sera ensuite élargie et Galien (129-200/216), l'un des pères de la pharmacie, décrira en détails leur mode de préparation. La civilisation byzantine recueillit du Vème au XVème siècle les pratiques thérapeutiques grecques et romaines qui furent transmises au monde arabe et à l'occident chrétien (Houël, 2011). Les croisades permirent à l'occident de s'approvisionner en épices et autres matières premières utilisées principalement à des fins médicales. Ce commerce était contrôlé par des négociants musulmans qui exploitaient les ressources d'Extrême-Orient, convoyant les épices vers l'ouest à travers l'océan Indien, le golfe Persique et la mer Rouge, puis par des routes terrestres. Durant le Moyen Âge, la pensée de l'occident chrétien fut dominée par des principes mystiques encadrant des connaissances scientifiques héritées de l'antiquité. L'intoxication par du pain pétri à partir de farine de seigle contaminée lors d'années pluvieuses par un champignon, l'ergot de seigle (*Claviceps purpurea*) produisant des alcaloïdes polycycliques hallucinogènes, était nommée le mal des ardents ou feu de Saint Antoine (Saint Antoine est le saint-patron des ergotiques). Il était communément admis à l'époque que ces personnes étaient des victimes de sorcières ou de démons (**Fig. 34**).

a.



b.



c.

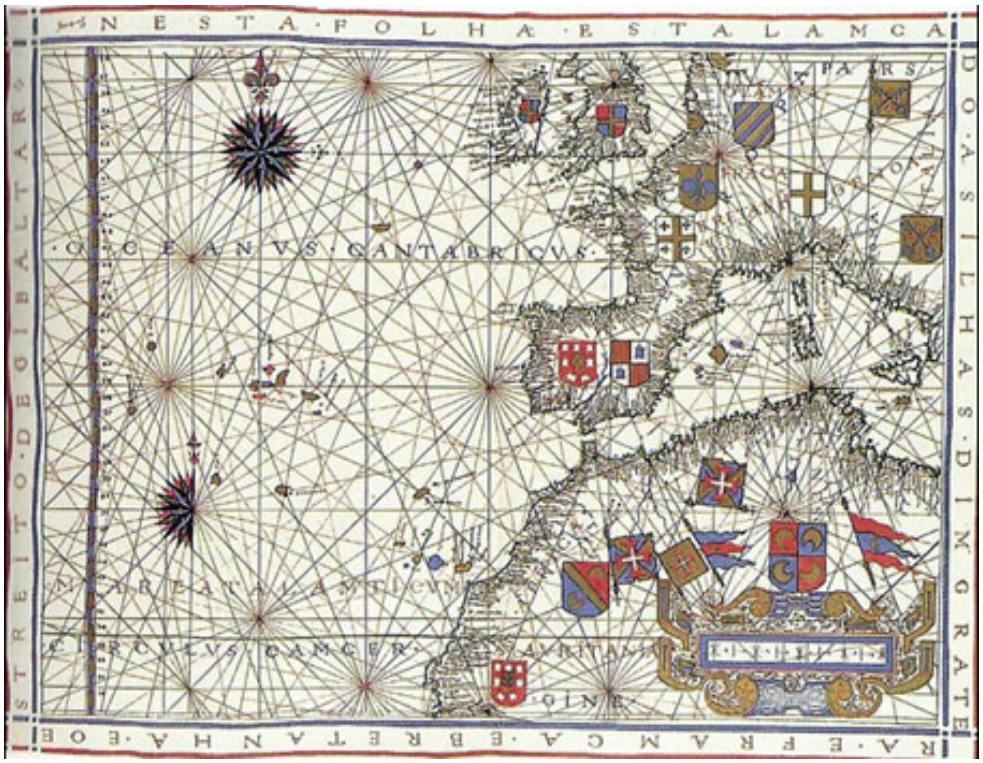


Figure 35: La renaissance signe une ouverture d'esprit. a. Portrait de Philippe Aurélien Théophraste Bombastus de Hohenheim, dit Paracelse tiré du livre «Des Hochgelerten Paracelsi etliche Tractaten ». Cologne, Arnold Birckmann-Erben (1567). **b.** Page de garde de la « Réplique d'Ambroise Paré, premier chirurgien du roi, à la réponse faite contre le discours de la licorne ». Paris G. Buon (1584). bnf ark:/12148/btv1b86082882. **c.** Carte de l'Atlantique nord. Atlas de Fernão Vaz Dourado (1571). Bibliothèque nationale du Portugal [Ca 1576].

Deux savants de la renaissance, Paracelse (1493-1541) et Ambroise Paré (1510-1590) qui ont écrit et enseigné presque simultanément, respectivement en allemand et en français, sont à l'origine d'un bouleversement de la pensée médicale. Paracelse introduit la notion de principe actif en posant les bases de la pharmacie expérimentale (**Fig. 35a**). Appelé à Bâle en 1526 comme médecin de la ville et Professeur de médecine, il exerça un contrôle sévère sur les ventes des médicaments, diminua le prix des ordonnances et sévit contre les associations coupables des médecins et des apothicaires. Ses succès médicaux provoquèrent l'envie et la jalousie. Paracelse définit ses principes dans une profession de foi révolutionnaire: «Se coller à Hippocrate, Galien, Avicenne, est sans doute un moyen très efficace d'acquérir le titre de Docteur, mais certainement pas de guérir les malades». De son coté, Ambroise Paré, un chirurgien, publia un « Discours de la momie et de la licorne » (Paré and Delacomptée, 2011) pour expliquer à son patient, le chevalier Christofle des Ursins, pourquoi il ne lui avait pas prescrit de momie, remède populaire à l'époque. La momie pouvait selon lui beaucoup plus nuire qu'aider, « à cause que c'est de la chair des corps puants et cadavéreux, et que jamais n'avais vu que ceux auxquels on en avait donné à boire, ou à manger, qu'ils ne vomissent tôt après en avoir pris, avec grande douleur d'estomac ». Il ajouta que les anciens n'ont jamais pensé faire embaumer leurs corps pour être mangés des chrétiens. Les cornes de licorne des trésors royaux ne parvinrent pas plus à vaincre son scepticisme qui renvoyait le reliquaire des apothicaires du Moyen Âge à une époque révolue, où les pratiques médicales ne se distinguaient pas vraiment de la sorcellerie. D'autant que c'était l'époque des voyages de Christophe Colomb (1451-1506), Vasco de Gama (1460/1469-1524) et Ferdinand Magellan (1480-1521) qui, en ouvrant l'ère planétaire de notre histoire, ont élargi considérablement la gamme des plantes au pouvoir thérapeutique (**Fig. 35c**).

I.3.4 ISOLATION DE LA QUININE

Au nouveau monde, les indiens Quichua utilisaient l'écorce d'un arbre qu'ils réduisaient en poudre appelé Kinakina. En 1631, la vice-reine du Pérou fut la première occidentale à être traitée et guérie d'un excès de fièvre paludique (malaria) par un chaman Quichua (Allorge-Boiteau and Ikor, 2003; Potier *et al.*, 2001). Celle-ci ramena d'Amérique du quinquina, le confia au cardinal de Lugo qui popularisera le remède auprès des cours d'Europe. Celui-ci fut introduit à Londres par un apprenti apothicaire, Robert Talbor, qui en revendit le secret au roi Louis XIV (1638-1715) pour une fortune. Louis XIV l'a alors fait publier par son médecin, Nicolas de Blégny. L'intérêt thérapeutique de l'écorce de quinquina donna lieu à une controverse religieuse puisque les missionnaires jésuites en assuraient le commerce. Ainsi, les puritains, dont Oliver Cromwell (1599-1658) se refusèrent à ingurgiter ce démoniaque filtre papiste. Le quinquina a aussi provoqué une guerre commerciale puisque les autorités coloniales espagnoles interdisaient l'exportation des graines de quinquina hors des territoires qu'ils administraient. Les propriétés antipaludiques du quinquina aiguisèrent l'intérêt de tous les pays poursuivant une entreprise coloniale dans des pays tropicaux où les fièvres intermittentes tuaient une part importante des colons chaque été (Hobhouse and Barbe-Girault, 2012). Les conséquences de la maladie à long terme sont la destruction des globules rouges conduisant à un état d'extrême faiblesse. Le terme de tombe de l'homme blanc fut d'ailleurs adopté par les colons anglais pour désigner l'Afrique sub-saharienne où la maladie était endémique. Le paludisme fut aussi probablement responsable de la victoire de Toussaint-Louverture (1743-1803) face à l'armée napoléonienne à Haïti, aux Caraïbes

a.



b.



c.

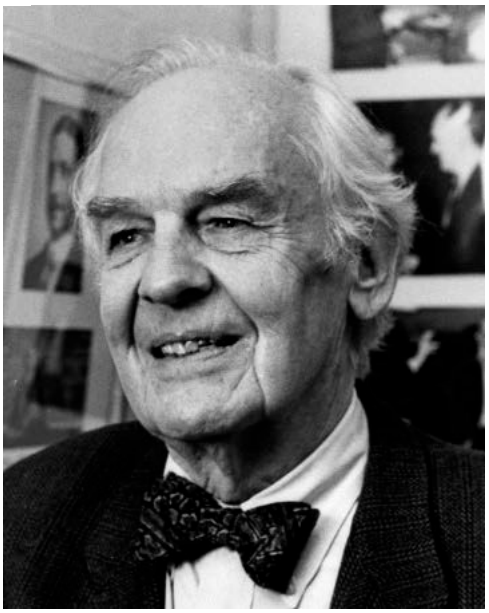


Figure 36: La quinine. a. Timbre commémoratif français de 1970 à l'adresse de Pierre Pelletier et Joseph Caventou pour l'isolement de la quinine en 1820. Etrangement, la formule de la quinine contient un noyau benzène qui n'a été découvert par Friedrich Kekulé qu'en 1860. **b.** Robert Woodward et **c.** William von Eggers Doering les artisans de la synthèse de la quinine en 1944.

(Girard, 2013). Une étude de 2012 sur des marqueurs génétiques de milliers d'échantillons de *Plasmodium falciparum* confirme l'origine africaine du parasite en Amérique du Sud (Yalcindag *et al.*, 2012). Les chimistes français Pierre Pelletier (1788-1842) et Joseph Caventou (1795-1877) de l'hôpital Saint-Antoine à Paris, réussirent en 1820 à isoler la quinine, un alcaloïde (**Fig. 36a**). Elle fut utilisée chez l'homme après un essai clinique réalisé chez le chien en 1826 (Potier *et al.*, 2001). La quinine contient des atomes de carbone asymétriques liés à quatre groupes chimiques différents permettant à la structure d'ensemble d'exister sous 16 isomères, dont un seul d'entre eux est la forme active médicalement. Il faudra donc attendre 1944 pour que le prix Nobel 1965, Robert Woodward (1917-1979) associé à William von Eggers Doering (1917-2011) en réalise la synthèse à l'université d'Harvard (**Fig. 36b et c**).

Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922), responsable en Algérie coloniale française des maladies et épidémies des armées étudiait les anomalies histologiques dans le sang des patients impaludés. En 1881, il put y identifier un parasite (*Plasmodium falciparum*) responsable du paludisme. Il reçu le prix Nobel en 1907 pour ses travaux. Ce protozoaire est transmis à l'homme par l'intermédiaire d'un moustique anophèle. Le mâle est inoffensif, mais la femelle se nourrit de sang chaud lors de la ponte de ses œufs. Le plasmodium ainsi inoculé infecte les cellules hépatiques de la victime puis circule dans le sang, colonisant les hématies et les détruisant. L'hémoglobine est digérée en acides aminés et l'hème ainsi libéré est cristallisé en hémozoïne annulant ainsi son effet toxique sur le plasmodium. La séquestration de l'hème dans l'hémozoïne est donc essentielle à la survie du parasite. Le mécanisme d'action de la quinine n'a pas été étudié au niveau moléculaire, mais il est généralement admis qu'elle agit comme un antipaludique de deuxième génération, la chloroquine, en inhibant la formation d'hémozoïne (Coronado *et al.*, 2014). L'anémie falciforme (drépanocytose) est une maladie génétique récessive résultant de mutations du gène de l'hémoglobine dans laquelle les globules rouges présentent une forme en faucille, libérant l'hème libre cytotoxique. Les individus hétérozygotes ne développent pas la maladie mais sont protégés contre la malaria. Ceci explique la forte prévalence de ces mutations dans les zones où la malaria est endémique. Les mécanismes par lesquels ces individus sont protégés font l'objet de recherches actives (Taylor *et al.*, 2013). Avec 207 millions de personnes malades et 627 000 décès en 2012, la malaria est une maladie très loin d'être endiguée (Churcher *et al.*, 2014; Newman, 2012). Ceci est principalement dû au développement de souches de plasmodium résistantes aux nombreux antipaludiques utilisés. La quinine est aujourd'hui à la base de boissons non médicales, mais est encore utilisée pour traiter les cas graves de malaria.

I.3.5 ISOLATION D'UN ANTI-CANCEREUX PAR CRIBLAGE : LA VINBLASTINE

Il aura donc fallu 195 ans pour passer de l'observation des propriétés thérapeutiques du quinquina à l'utilisation de la quinine en médecine et 313 ans pour réaliser la synthèse de son principe actif, la quinine. Ce fut néanmoins une des premières démonstrations du fait qu'un seul composé chimique était capable d'expliquer l'activité d'une drogue à base de plantes. Ces travaux ont été les précurseurs de la chimie des substances naturelles. Cette histoire extraordinaire pourrait être celle d'autres principes actifs. Etienne de Flacourt (1607-1660) importa la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) au jardin du roi, le futur

a.



b.

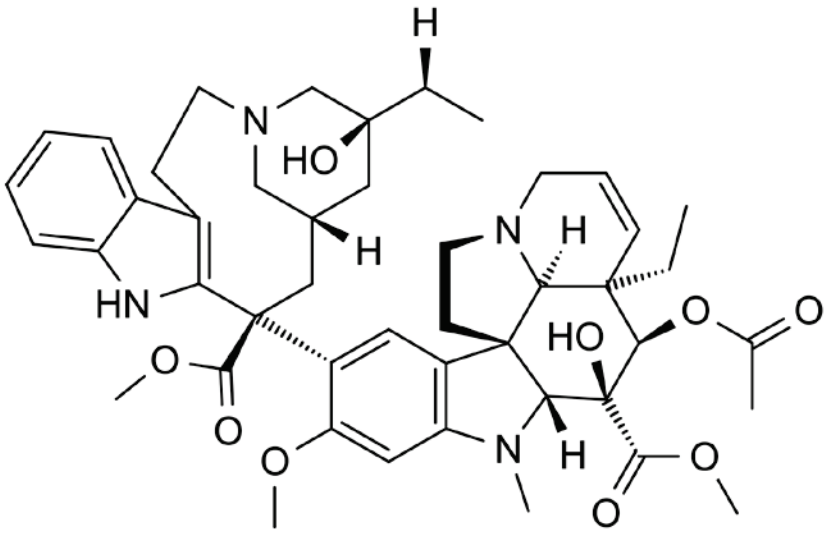


Figure 37: La vinblastine. a. Echantillon de pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) datant de 1650 conservé au Muséum national d'histoire naturel à Paris. **b.** Structure chimique de la vinblastine.

muséum d'histoire naturel (**Fig. 37a**). Mais c'est seulement en 1960 que fut découvert indépendamment par deux groupes américains les propriétés antitumorales d'un alcaloïde, la vinblastine, contenu dans la partie aérienne de la plante (Cutts *et al.*, 1960; Johnson *et al.*, 1960). Le groupe de Robert Noble (1910-1990) à l'université du Western Ontario a isolé la vinblastine après avoir étudié son action comme immunosuppresseur, alors que de son côté, le groupe de Gordon Svoboda, appartenant à la compagnie Eli Lilly à Indianapolis a criblé des extraits de plantes contenant des alcaloïdes chez l'animal sur un modèle murin de leucémie et finalement isolé la vinblastine (**Fig. 37b**). La vinblastine interagit avec la tubuline et inhibe l'assemblage des microtubules provoquant un arrêt du cycle cellulaire et donc de la prolifération cellulaire. Les méthodes de criblage cellulaire ont aussi permis d'accélérer la recherche de métabolites secondaires comme agents pharmacologiques.

I.3.6 INDUSTRIALISATION DU PROCÉDÉ D'EXTRACTION

Cette industrialisation est parfaitement illustrée par l'identification du paclitaxel (taxol) à partir de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*). En 1955, le National Cancer Institute (NCI) Américain crée un centre national de chimiothérapie anticancéreuse (CCSRC) et développe une plateforme de criblage destinée à stimuler la recherche d'agents anticancéreux (Leiter et al., 1962). Le ministère de l'agriculture des États-Unis (USDA) en collaboration avec le NCI a collecté et analysé 15 000 plantes à travers le monde. Le criblage a été réalisé sur une lignée cellulaire KB (ATCC #CCL-17) dérivée d'un carcinome du nasopharynx (Eagle, 1955). Cette lignée cellulaire a été choisie en raison de son taux de croissance rapide et de la reproductibilité de sa culture en monocouche. Il s'est avéré plus tard qu'il s'agissait d'une contamination de cellules HeLa (ATCC #CCL-2), dérivées d'un cancer du col de l'utérus. Les cellules étaient ensemencées dans le minimum essentiel d'Harry Eagle (1905-1992) en présence de sérum et de l'agent à tester, mis en solution dans l'eau, l'éthanol ou la diméthylformamide si nécessaire. Un volume de 3,9 ml de suspension cellulaire correspondant à 10-20 mg de protéine/ml était ajouté avec 0,1 ml de l'agent à tester puis le tout incubé pour 24 h à 37°C dans des tubes de culture munis d'un bouchon à vis et inclinés de 10°. La mesure de la cytotoxicité des composés testés est basée sur la mesure de l'inhibition de la synthèse protéique. Cette dernière est déterminée en comparant la concentration initiale en protéine de celle à 24 h pour la culture en présence et en absence de la molécule testée. Ceci a été réalisé par la méthode développée par Oliver Lowry (1910-1996) (Lowry *et al.*, 1951; Oyama and Eagle, 1956). Ce sont Monroe Wall (1916-2002) et Mansukh Wani qui isolèrent le paclitaxel de l'écorce de l'if après un fractionnement guidé par des essais cellulaires réalisé avec le NCI au Research Triangle Institute (RTI) en Caroline du nord. Leurs premières tentatives pour découvrir l'origine de l'activité anticancéreuse de l'if ont échoué, mais en septembre 1966, les chercheurs purent isoler une substance cristalline qu'ils nommèrent taxol. Le nom de la plante provient de l'existence prouvée d'un groupe hydroxyle comme celui de l'éthanol (Wani *et al.*, 1971). Contrairement aux autres anticancéreux tels que la vinblastine qui inhibent l'assemblage des microtubules, le paclitaxel stabilise les microtubules et empêche leur dépolymérisation bloquant ainsi la prolifération cellulaire (Schiff *et al.*, 1979). Le premier essai clinique a été initié en 1984, mais très rapidement la question de la production de paclitaxel à partir de l'if du Pacifique devint un problème majeur. La synthèse du taxol donna lieu à une compétition franco-américaine. D'un coté le groupe de Pierre Potier de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS à

Gif sur Yvette réalise en 1989 l'hémisynthèse à partir d'un if commun (*Taxus baccata*) d'un dérivé actif, le docetaxel (Mangatal *et al.*, 1989). En 1991, le groupe de Robert Holton de l'université d'état de Floride après s'être concentré sur la néosynthèse dépose un brevet sur une méthode similaire d'hémisynthèse avec un rendement plus élevé que le groupe français (Holton, 1991). Aujourd'hui, le Paclitaxel (TAXOL®, Bristol–Myers Squibb) et le docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis) sont les agents anticancéreux les plus efficaces pour le traitement des tumeurs solides.

L'if ne fait pas partie des plantes utilisées par la médecine traditionnelle, Les indiens du nord ouest américain utilisaient son bois pour fabriquer des arcs et des pagaies pour leurs canoës. Néanmoins, la majorité des molécules pharmacologiques dérive de végétaux ou d'autres produits naturels employés à l'origine comme remèdes traditionnels (Cragg and Newman, 2013b). Le « Journal of Ethnopharmacology » fut créé en janvier 1979 et la société internationale d'ethnopharmacologie fut fondée lors du premier congrès de l'ethnopharmacologie à Strasbourg en Mars 1990. Il s'agit donc d'une discipline récente à l'interface des sciences humaines (anthropologie, ethnologie) de la biologie et de la chimie, qui contribue à la recherche de nouveaux produits naturels ayant une activité biologique en évaluant le potentiel thérapeutique des médecines traditionnelles (Rivier and Bruhn, 1979). Le mouvement avait été amorcé au XIXème lorsque Paul Broca (1824-1880) fondit la première société d'anthropologie l'année même où Charles Darwin (1809-1882) publie « L'origine des espèces au moyen de la sélection naturelle » qui replace l'homme au sein du règne animal. Au XXème siècle les anthropologues et les ethnologues réhabilitent les sociétés traditionnelles, leurs valeurs et leurs richesses. En effet, pour les occidentaux du XIXème les ethnies étrangères, connues entre autre par la colonisation, ne pouvaient détenir de savoir authentique. Une première remise en cause de ses certitudes avait été annoncé bien plus tôt lorsqu'un botaniste, Antoine de Jussieu (1686-1758), interpréta les pierres que l'on croyait alors tombées avec la foudre, comme étant en fait des haches polies et de pointes de flèches en silex de nos ancêtres préhistoriques. Ces objets travaillés présentaient pour lui une analogie avec ceux utilisés par les indiens d'Amérique. L'ethnopharmacologie est un des résultats de ce renversement de perspective (Brace, 1974). L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estimait en 1985 que 65% de la population mondiale utilisait principalement pour se soigner des plantes composant des remèdes traditionnels [voir aussi (Raskin *et al.*, 2002)].

Le projet présenté ici a été conçu pour bénéficier des deux approches, les études ethnopharmacologiques et le criblage cellulaire.

I.4 LA RÉTINE

I.4.1 ANATOMIE DE LA RÉTINE NEURALE

La rétine tapisse le fond de l'œil et est composée de deux tissus, la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (**Fig. 38a**). La rétine est le lieu de traduction des photons de la lumière visible en signaux nerveux envoyés au cerveau via le nerf optique, Il s'agit d'un tissu neuronal très fin de 0,1 à 0,5 mm d'épaisseur qui est localisé entre le vitré et l'épithélium pigmentaire rétinien intégré au système nerveux central. La rétine possède une structure stratifiée dans laquelle on distingue 5 types de neurones (photorécepteurs, cellules

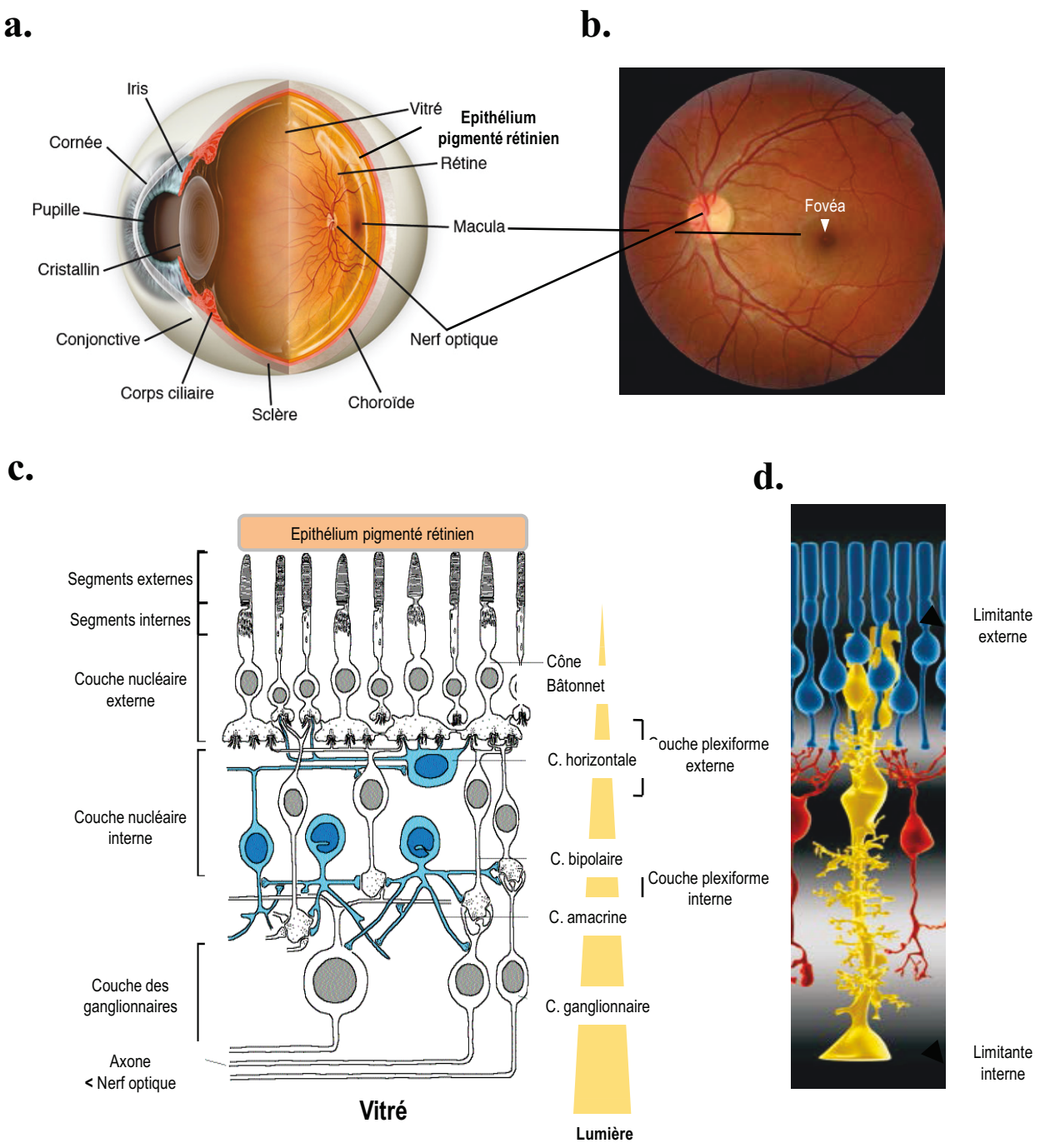


Figure 38 : **La rétine**. **a.** Schéma descriptif de l'œil et du positionnement de la rétine entre le vitré et l'épithélium pigmenté rétinien. **b.** Image du fond de l'œil par examen ophtalmoscopique chez l'homme. **c.** Les différents neurones de la rétine situés entre le vitré et l'épithélium pigmenté rétinien. Noté en jaune le chemin parcouru par la lumière au travers de la rétine jusqu'aux segments externes des photorécepteurs. **d.** Cellule gliale de Müller en jaune.

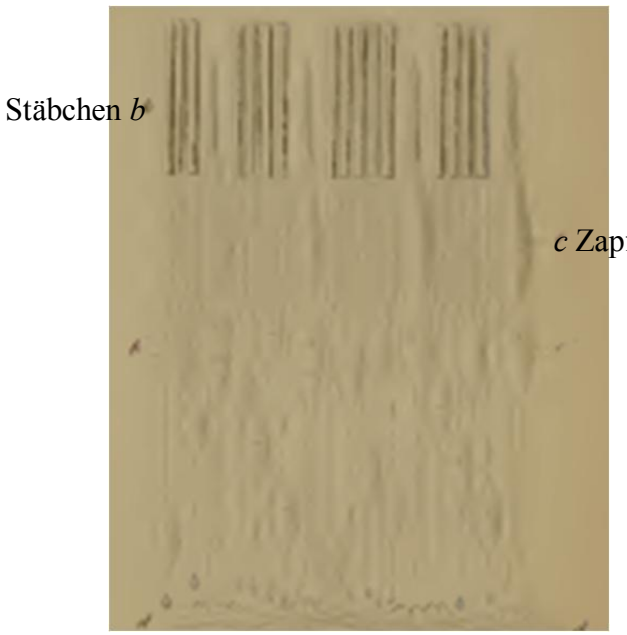
bipolaires, cellules amacrines, cellules horizontales et cellules ganglionnaires) et 3 types de cellules gliales (cellules gliales de Müller, astrocytes et microglies). Ces différents types cellulaires sont organisés en 5 couches (**Fig. 38b**). Les photorécepteurs sont des neurones qui captent directement la lumière. Il en existe deux types, les bâtonnets et les cônes, qui n'ont pas la même sensibilité spectrale. Chez les primates les cônes sont rassemblés au centre de la rétine, la fovéa (**Fig. 38c**). Les photorécepteurs transmettent cette information aux cellules ganglionnaires qui projettent leurs axones vers le cerveau à travers des interneurones appelés cellules bipolaires. Il existe plusieurs groupes de cellules bipolaires (Boycott and Wassle, 1991; Kolb *et al.*, 1992; Mariani, 1984): les bipolaires des bâtonnets, reliant plusieurs bâtonnets à une cellule ganglionnaire, et les bipolaires des cônes, reliant un ou plusieurs cônes à une cellule ganglionnaire. Les cellules horizontales sont situées au niveau de la couche plexiforme externe. Elles sont connectées latéralement à plusieurs cônes, bâtonnets et neurones bipolaires, et inhibent l'activité des cellules avoisinantes. Cette suppression sélective de certains signaux nerveux, connue sous le nom d'inhibition latérale, augmente le contraste du signal visuel. Le corps cellulaire des cellules amacrines se situe dans la couche nucléaire interne et leurs terminaisons synaptiques dans la couche plexiforme interne. Les cellules ganglionnaires constituent le dernier maillon de la chaîne neuronale rétinienne. L'ensemble des axones des cellules ganglionnaires se regroupe au niveau de la papille optique pour former le nerf optique qui propage le signal visuel au niveau du cerveau. Il existe une très grande diversité de cellules ganglionnaires.

Les cellules Gliales de Müller traversent la rétine de part en part et leurs pieds terminaux forment la couche limitante externe et la couche limitante interne (**Fig. 38d**). Ces cellules interagissent avec tous les neurones de la rétine (photorécepteurs, cellules bipolaires, cellules ganglionnaires, etc,) et jouent un rôle de maintien du métabolisme des neurones en recyclant les ions et les neurotransmetteurs. Des astrocytes situés uniquement dans la partie la plus interne de la rétine jouent un rôle dans le maintien de la barrière hématorétinienne. Enfin, les cellules microgliales ont pour fonction de phagocyter les débris cellulaires qui sont libérés lors de traumatismes rétiniens.

I.4.2 LES PHOTORÉCEPTEURS

La structure des photorécepteurs est particulière car ce type cellulaire possède une morphologie très caractéristique. Ils possèdent tous un segment externe, le siège de la phototransduction, un segment interne où se trouve toute la machinerie cellulaire, un cil connecteur qui relie le segment externe et le segment interne. A l'opposé, les terminaisons synaptiques sont en contact avec les cellules bipolaires (**Fig. 39ab**). Le cil connecteur est la seule connexion entre le cytoplasme des deux compartiments, il est donc impliqué dans le transport de nombreuses molécules, notamment des protéines (Trojan *et al.*, 2008). Le segment externe est formé d'un empilement de disques membranaires. Ces disques sont enchâssés dans la membrane de la cellule des bâtonnets, mais correspondent à un repliement de la membrane cellulaire des cônes. C'est sur ces disques que sont localisés les pigments visuels sensibles à la lumière (les opsines). Pour les bâtonnets, ce segment externe est très long et contient donc beaucoup de pigments visuels. C'est la raison pour laquelle les bâtonnets sont 1 000 fois plus sensibles à la lumière que les cônes. Ils sont donc responsables de la vision scotopique, c'est à dire à faible luminosité. Les segments externes des cônes sont

a.



b.

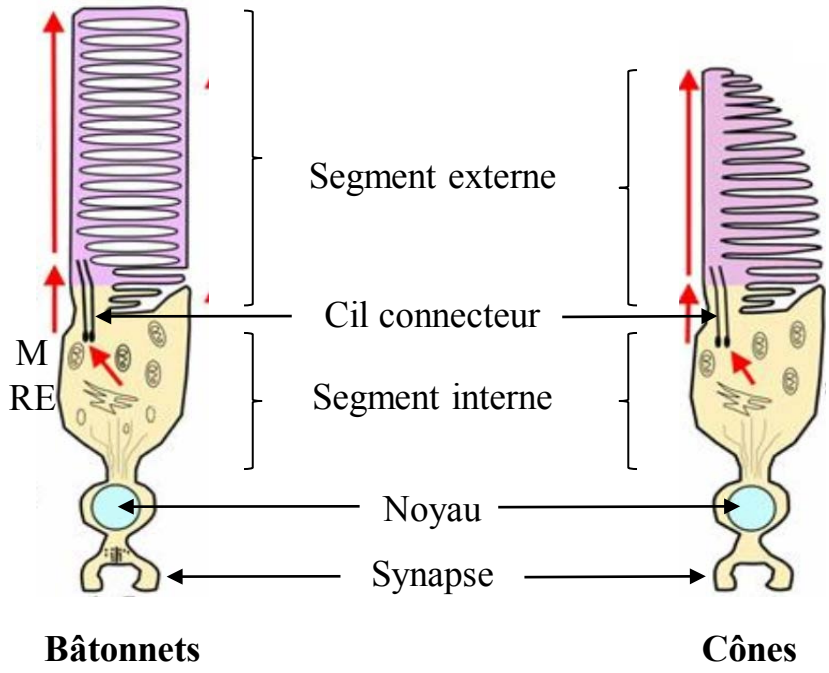


Figure 39: Morphologie des bâtonnets et des cônes. a. Les Stäbchen (bâtonnets) et les Zapfen (cônes) décrits par Max Schultze en 1866 dans Zur anatomie physiologie und der retine. **b.** Dessin de bâtonnets et les cônes du laboratoire de Brian Perkin, le segment externe en rose, le segment interne en jaune, le noyau en bleu et le cil connecteur en noir. M, les mitochondries; RE, réticulum endoplasmique. La direction du renouvellement du segment externe est donnée par les flèches verticales rouges.

plus petits et en forme effilée, formant des cônes. Les cônes sont responsables de la vision photopique, c'est à dire à très forte luminosité. Ils permettent une vision très fine chez les primates et les oiseaux, grâce à la présence de la fovéa au centre de la rétine (**Fig**. **38c**). Celle-ci ne comprend que des photorécepteurs à cônes. Les cônes permettent également la distinction des couleurs grâce aux différents types de cônes. En effet, les cônes se répartissent en trois grandes familles chez l'homme et les autres primates, L (long), M (medium) et S (short) correspondant respectivement à leur sensibilité aux longues, moyennes et courtes longueurs d'ondes (Brown and Wald, 1963).

I.4.3 PHOTOTRANSDUCTION

La phototransduction a été étudiée en détail pour les bâtonnets qui contiennent la rhodopsine au niveau des disques empilés du segment externe. Les bâtonnets n'expriment qu'un seul pigment visuel, la rhodopsine. C'est une protéine à sept domaines transmembranaires avec une liaison covalente avec le rétinal, qui n'est autre qu'un aldéhyde de la vitamine A (rétinol). La rhodopsine, qui lie le rétinal, est synthétisée dans l'appareil de Golgi dans le segment interne, puis est transportée via des vésicules jusqu'au cil connecteur où elle est incorporée dans la membrane des disques (Papermaster *et al.*, 1985). Le rétinal, produit de la vitamine A est issu de la circulation sanguine (**Fig. 40a**). La molécule de rétinal est commune aux bâtonnets et aux différents types de cônes. La réception de la lumière provoque l'isomérisation du 11-cis rétinal en all-trans rétinal, cette photoisomérisation entraîne un changement de conformation de l'opsine à laquelle le rétinal est lié et initie la phototransduction. Ce changement de conformation induit tout une cascade de réactions biochimiques qui aboutit à la fermeture de canaux sodium puis des canaux calcium, ce qui provoque l'hyperpolarisation membranaire du photorécepteur et bloque la libération d'un neurotransmetteur, le glutamate. Le signal est alors transmis aux neurones internes de la rétine.

I.4.4 L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE RÉTINIEN

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est constitué de cellules épithéliales cubiques ayant des jonctions serrées et qui émettent des microvillosités entourant les segments externes des photorécepteurs (**Fig. 40a**). Chaque cellule de l'EPR est en contact avec en moyenne 25 photorécepteurs, bâtonnets et cônes. L'EPR participe à la fonction des photorécepteurs par quatre actions principales, 1) Les disques des segments externes des photorécepteurs sont constamment renouvelés par l'EPR, les membranes et protéines membranaires qui les composent migrent donc progressivement du pôle basal du côté segment interne, où ils sont synthétisés et assemblés vers le pôle apical, où ils sont dégradés dans l'EPR. Le segment interne des photorécepteurs contient le noyau et les organites (les mitochondries, l'appareil de Golgi, etc,) indispensables au renouvellement des segments externes. Le processus de renouvellement des segments externes est sans doute lié au fait qu'étant très riches en acides gras polyinsaturés, les membranes des segments externes sont très facilement oxydées et dégradées par l'action photo-oxydante de la lumière. Les segments externes sont donc renouvelés quotidiennement selon le rythme nycthéméral, à une cadence extraordinaire de 10% par jour, et ceci tout au long de la vie de l'organisme. 2) L'EPR absorbe l'excès du rayonnement grâce à un pigment de couleur brun noir, la mélanine. Ceci

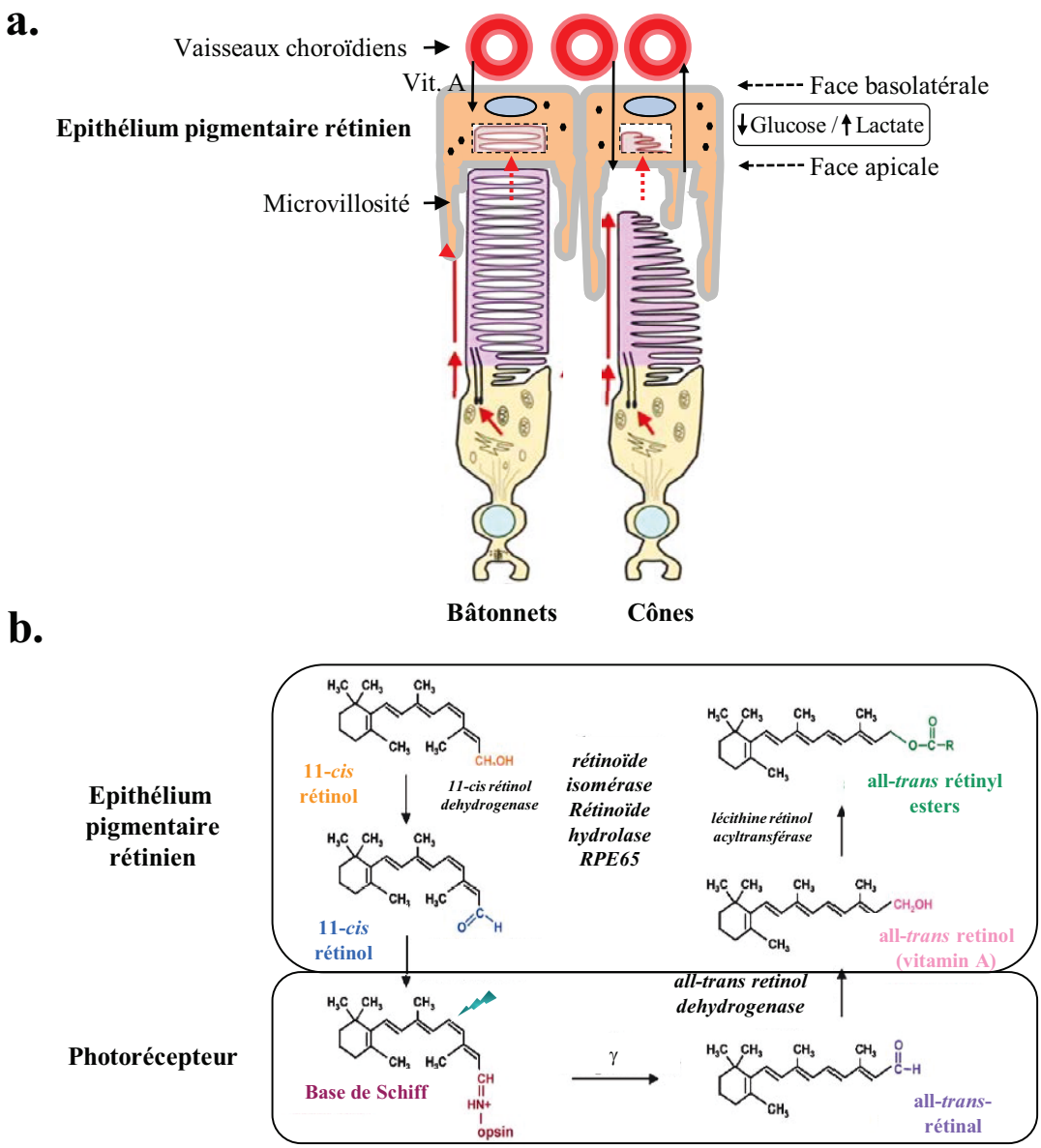


Figure 40: **Fonction de l'épithélium pigmenté rétinien. a.** Interactions entre les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et les photorécepteurs. Les hexagones en noir représentent des grains de mélanine. **b.** Cycle visuel ou cycle de la vitamine A. Le photon provoque la transisomérisation du 11-cis-rétinal en all-trans-rétinal qui est lié à une base de Schiff (liaison covalente) à la molécule d'opsine. Le all-trans-rétinal est déshydrogéné en all-trans-rétinol et transporté dans l'EPR. Dans l'EPR, il est transformé en all-trans-rétinyl ester et ensuite transisomérisé en 11-cis-rétinyl ester par un complexe enzymatique comprenant RPE65 puis transformé en 11-cis-rétinol, qui se lie ensuite à l'opsine dans le photorécepteur sous forme de 11-cis-rétinal.

limite ainsi la quantité de lumière réfléchie dans l'œil et protège donc les photorécepteurs. 3) L'EPR a un rôle essentiel au cycle de la vitamine A (**Fig. 40b**). Suite à la cascade de la phototransduction, le all-*trans* est régénéré par voie enzymatique grâce à la transisomérisation en 11-*cis*-rétinal au sein de l'EPR (Baehr *et al.*, 2003). L'EPR joue aussi un rôle de barrière hématorétinienne contrôlant l'afflux des nutriments entre la rétine et la circulation sanguine au niveau de la choroïde, sous-jacente à l'EPR (**Fig. 40a**). Dans un sens, l'EPR transporte du glucose, des ions et d'autres nutriments de la circulation sanguine vers les photorécepteurs et dans l'autre sens des électrolytes, des produits du métabolisme comme le lactate de l'espace sous rétinien vers les vaisseaux choroïdiens (Strauss, 2005). Pour transporter le glucose, l'EPR exprime des transporteurs sur sa face apicale et sa face basolatérale. Les transporteurs du glucose GLUT1 (SLC2A1) et GLUT3 (SLC2A3) sont exprimés en grande quantité dans l'EPR (Ban and Rizzolo, 2000; Sugasawa et al., 1994), ainsi que les transporteurs du lactate MCT1 (SLC16A1) et MCT3 (SLC16A8) (Daniele *et al.*, 2008). L'EPR transporte également la vitamine A (rétinol), nécessaire au renouvellement du cycle visuel (**Fig. 40 a,b**).

I.5 LA RÉTINOPATHIE PIGMENTAIRE

I.5.1 GÉNÉTIQUE DE LA RÉTINOPATHIE PIGMENTAIRE

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires forment un ensemble hétérogène de maladies génétiques. Parmi celles-ci, la rétinopathie pigmentaire (RP) se caractérise par la dégénérescence progressive des photorécepteurs à bâtonnet de la rétine, suivie plus tardivement par celle des cônes. Il en résulte un affaiblissement irréversible de la vision périphérique puis de l'acuité visuelle, ainsi qu'un dépôt pigmentaire caractéristique et visible par examen ophtalmoscopique. Ces évènements conduisent irrémédiablement à la cécité, Ces pathologies sont des maladies rares qui affectent 40 000 personnes en France, environ 400 000 en Europe, 100 000 aux États-Unis, avec une incidence de 1/3 000 naissance en France. La RP reste la cause la plus fréquente de cécité chez des adultes d'âge moyen, dans les pays industrialisés. En 1989, le gène *RHO* sur le bras long du chromosome 3, codant pour la rhodopsine a été montré comme étant responsable de la RP dans une famille irlandaise (McWilliam *et al.*, 1989). Cette découverte marquait le point de départ des études génétiques de la RP. Quelques temps après, une mutation fut découverte dans le gène *RHO* au sein d'une famille américaine touchée par la RP (Dryja *et al.*, 1990). Ceci permit de faire des progrès importants dans la compréhension de ces pathologies. Depuis ces années, les mutations décrites pour les RP touchent principalement des gènes exprimés par les bâtonnets (Kajiwara *et al.*, 1994; McLaughlin et al., 1993; Rosenfeld *et al.*, 1992). A la date du 14 Mai 2014, 212 gènes responsables de dégénérescences rétiniennes héréditaires ont été identifiés, dont 57 gènes de RP (RetNet). Les gènes responsables de RP codent pour des protéines des photorécepteurs aux fonctions très variées allant de la cascade de phototransduction au cytosquelette, des facteurs de transcription comme CRX (Swain *et al.*, 1997) aux facteurs d'épissage comme PRPF31 (Vithana *et al.*, 2001). De plus, il existe aussi des protéines exprimées par l'EPR comme MERTK (Nandrot *et al.*, 2000) ou RPE65 qui est impliqué dans une forme grave de dégénérescence des photorécepteurs, l'amaurose congénitale de Leber (Gu *et al.*, 1997). Dans 45% des cas, la mutation est un événement sporadique mais, pour les autres cas restants (55%) elle résulte d'une transmission héréditaire. Il existe différents modes

de transmissions héréditaires dont le mode autosomique dominant (40-50% des cas), le mode autosomique récessif (30-40%), les formes liées au chromosome X (10-15%), la transmission maternelle par les gènes mitochondriaux (< 1%) et un mode digénique (1-2%). Dans ce dernier cas, l'individu est affecté par la maladie suite à la transmission de deux gènes différents de RP, l'un par son père et l'autre par sa mère. La RP représente 90 à 95% des cas de dégénérescence rétinienne héréditaire.

I.5.2 APPROCHES THERAPEUTIQUES DE LA RETINOPATHIE PIGMENTAIRE

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour guérir les patients atteints de rétinopathie pigmentaire. Quelques précautions peuvent néanmoins ralentir temporairement la progression de la maladie. Ainsi, le port de verres protecteurs et filtrants, protégeant de la luminosité et des rayons ultraviolets est recommandé car il semble que certaines pathologies soient aggravées par la lumière du soleil. Le recours à des aides optiques comme des lunettes grossissantes et des loupes peuvent sensiblement améliorer la vision des patients. Même si à ce jour cette maladie est incurable, de nombreuses recherches de traitements sont en cours d'aboutissement.

La première approche par thérapie génique corrective consiste à réintroduire une copie normale du gène muté dans des cellules cibles pour corriger le déficit dans les cas récessifs. Le transfert du gène correcteur dans les cellules cibles se fait grâce à des vecteurs viraux. Les premiers essais, prometteurs, ont été réalisés sur des modèles animaux de l'amaurose congénitale de Leber, les chiens *RPE65* ($^{mut}/^{mut}$). Les chercheurs ont injecté dans l'espace sous rétinien de chiens de 4 mois d'âge *RPE65* ($^{mut}/^{mut}$) un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (VAA) et ont obtenu une restauration de la fonction visuelle (Acland et al., 2001) mesurée par electrorétinogramme (ERG) et pupillométrie. De plus, cette même équipe a procédé à un suivi longitudinal sur 3 ans montrant que les chiens avaient conservé les fonctions visuelles et très bien toléré les vecteurs viraux (Acland et al., 2005). D'autres essais similaires ont confirmé le succès de cette technique dans ce modèle (Le Meur et al., 2007). Chez l'homme, les premiers résultats de trois essais cliniques indépendants pour l'Amaurose congénitale de Leber sont très encourageants (Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Maguire et al., 2008). Trois des patients traités présentaient, au bout de 30 jours, une augmentation significative de leur sensibilité visuelle montrant l'activation du cycle rétinoïde (Cideciyan et al., 2008). La restauration des capacités visuelles a pu être enregistrée au niveau du cortex (Ashtari et al., 2011).

La deuxième approche est la thérapie cellulaire. Celle-ci consiste à transplanter des cellules saines afin de remplacer les cellules dégénérées. Les premiers essais furent réalisés par transplantations de cellules immatures issues de tissus embryonnaires. L'hypothèse était que comme ces cellules sont immatures, elles conserveraient assez de plasticité pour s'intégrer au tissu hôte. Malheureusement, ces essais ont tous été infructueux car même si ces cellules sont capables de survivre, et de migrer dans la rétine, elles sont incapables d'établir des connections synaptiques avec les autres types cellulaires, tels les cellules bipolaires dans le cas de la RP. En revanche, ceci est possible pour les cellules prélevées à un stade bien précis du développement correspondant au pic de genèse des bâtonnets représenté par l'expression du facteur de transcription NRL. Ces cellules s'intègrent, se différencient en bâtonnets, établissent des connections synaptiques avec les autres cellules et améliorent la

fonction visuelle (MacLaren et al., 2006). Le transfert vers la clinique de ces résultats se heurte au fait que cette période utile correspond chez l'homme à la troisième semaine de développement embryonnaire (Leveillard et al., 2007). Cependant, ce travail pourrait aussi préparer une approche fondée sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires ou bien des cellules souches pluripotentes reprogrammées par le facteur de transcription NRL (Reichman et al., 2014).

Les implants rétiniens ou rétines artificielles, quant à eux, reposent sur l'observation que les cellules qui communiquent avec le cerveau via le nerf optique, appelées cellules ganglionnaires, restent en grande partie intactes et fonctionnelles dans les dégénérescences rétiniennes, même à la suite de la perte des photorécepteurs. L'idée est venue de les stimuler par une micro-prothèse rétinienne. Les premiers essais menés aux Etats-Unis chez l'homme ont montré l'aptitude des patients implantés à suivre une tache lumineuse, ou bien à visualiser des objets bien contrastés (Humayun et al., 2009).

L'approche particulière par neuroprotection a été développée au sein de l'équipe et nous approfondirons donc ici ce thème. La neuroprotection consiste à bloquer ou même simplement à ralentir la dégénérescence des photorécepteurs pour prévenir la cécité chez les patients atteints de RP. La protection est réalisée par administration de protéines sécrétées qui sont regroupées sous le vocable de facteurs trophiques. Le « Ciliary Neurotrophic Factor » (CNTF) a donné lieu à un essai clinique par utilisation d'un mode de délivrance particulier reposant sur des proteines recombinantes encapsulées (Cayouette and Gravel, 1997; Sieving et al., 2006). Cependant, cet essai clinique à été ensuite abandonné puisque l'administration de CNTF n'avait finalement aucun effet bénéfique sur la vision des patients (Birch et al., 2013). Les résultats paradoxaux du CNTF ont conduit à l'étude d'autres facteurs de croissance dont le « Glial cell line Derived Neurotrophic Factor » (GDNF). Il a donc été démontré au sein du laboratoire que celui-ci exerçait un effet neuroprotecteur, tant au niveau fonctionnel qu'au niveau histologique, sur les photorécepteurs à bâtonnets chez la souris *rd1,* un modèle animal de RP (Frasson et al., 1999).

L'approche de l'équipe repose sur les interactions trophiques entre les bâtonnets et les cônes (Leveillard, 2014). La couche des photorécepteurs de la rétine des vertébrés est constituée de millions de photorécepteurs à bâtonnet et à cône. La principale différence morphologique entre les deux classes de PR est la morphologie de leur segment externe. La proportion respective des bâtonnets et des cônes dans la rétine et leur arrangement topologique sont variables selon les espèces. Ainsi, chez les oiseaux, la rétine est dominée par les cônes alors que les espèces nocturnes comme les rongeurs tels que la souris, le rapport entre le nombre de bâtonnets et de cônes est de 98/2. L'homme, comme la plupart des primates est une espèce diurne avec une rétine riche en bâtonnets, Les cônes y sont concentrés au centre de la rétine, la fovéa située au centre de la macula (**Fig**. **38c**), mais ils ne représentent que 4 à 5% des photorécepteurs (Webvision). Pourtant, les cônes sont entièrement responsables de l'acuité visuelle et la vision des couleurs, les bâtonnets n'étant fonctionnels qu'à très basse luminescence.

Les deux étapes successives de dégénérescence des photorécepteurs lors de la RP sous-tendent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les bâtonnets et les cônes. Étant jeunes adultes, ces patients perdent la capacité de voir dans des conditions de très faible

luminosité, la vision nocturne. Ceci correspond à la dégénérescence des photorécepteurs à bâtonnet. Cette maladie progresse ensuite irrémédiablement vers la cécité par la perte de la fonction et de la dégénérescence de la seconde classe de photorécepteurs, les cônes. Le traitement par thérapie génique corrective de cette maladie incurable est aujourd'hui en développement. Néanmoins, du fait de l'extrême hétérogénéité génétique de la RP, résultant de mutations dans plus d'une cinquantaine de gènes, la thérapie génétique corrective ne pourra être efficace pour l'ensemble des patients que dans un futur éloigné. Par conséquence, la neuroprotection constitue une alternative médicalement appropriée, et même prometteuse dès lors qu'elle cible les cônes.

C'est l'étude des mécanismes de dégénérescence des cônes chez un modèle murin de RP, la souris *rd1*, qui nous a conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle les cônes meurent suite à la perte d'un signal trophique provenant des bâtonnets. Nous avons étudié la survie des cônes dans un modèle de cultures enrichies en cônes (≥70%) préparées à partir de la rétine d'embryons de poulet (Adler and Hatlee, 1989; Hewitt et al., 1990). Lorsque ces cellules isolées au 6ème jour embryonnaire [stade 29 selon (Hamburger and Hamilton, 1951)], des précurseurs de l'ensemble des cellules de la rétines, sont ensemencées à faible densité dans un milieu de culture de composition chimique dépourvu de toutes protéines, elles se différencient spontanément en photorécepteurs. Suite à la différence de leurs histoires évolutives, la rétine des oiseaux, contrairement à celle des mammifères est dominée par les cônes. Ces cultures primaires et post-mitotiques sont donc enrichies (≥70%) en cônes (Gerkema et al., 2013). Ces cônes, différenciés *in vitro*, présentent un ensemble complexe de propriétés structurelles spécifiques des photorécepteurs, comme une morphologie polarisée et l'expression des opsines. Fait intéressant, elles sont également capables de répondre à la lumière (Stenkamp and Adler, 1993). Soumises à un cycle de 12 h de lumière suivies de 12 h dans le noir, ces cellules cultivées s'allongent en réponse à la lumière, et se contractent dans l'obscurité (Stenkamp et al., 1994). Ces neurones post-mitotiques dégénèrent en une période de quelques jours. Nous avons construit une banque d'ADN complémentaires (ADNc) à partir de la rétine neurale de souris normales et réalisé un criblage haut contenu (clonage par expression) pour identifier les gènes ayant la capacité d'améliorer la survie des cônes de poulet *in vitro* (**Fig. 41**). Le criblage de l'équivalent de 210 000 clones (2 100 ensembles de 100 clones) de la banque d'ADNc nous a conduits à identifier une nouvelle protéine sécrétée par les bâtonnets ayant un effet protecteur sur les cônes, protéine désignée sous le terme de « Rod-derived Cone Viability Factor » (RdCVF). Cette protéine est codée par le gène nucleoredoxin-like (*Nxnl1*) (Leveillard et al., 2004b; Leveillard and Sahel, 2010). RdCVF est le produit d'un épissage alternatif du gène *Nxnl1*. RdCVF ne possède pas d'activité enzymatique, contrairement au second produit du gène, la thiorédoxine RdCVFL. Il est intéressant de souligner que les thiorédoxines constituent un mécanisme endogène de défense contre le stress oxydatif qui oxyde les résidus cystéines des protéines et qui est impliqué dans les neurodégénérescences telle que la RP. La souris *Nxnl1-/-* présente une dégénérescence progressive des cônes et est particulièrement sensible au stress oxydatif produit naturellement par la lumière au niveau de la rétine (Cronin et al., 2010; Lee-Rivera et al., in revision). La recherche de protéine ciblée par l'enzyme RdCVFL nous a permis de montrer qu'elle contrôlait l'état de phosphorylation et d'agrégation de la protéine TAU dans la rétine (Fridlich et al., 2009). La présence d'agrégats de la protéine TAU dans le cerveau est une

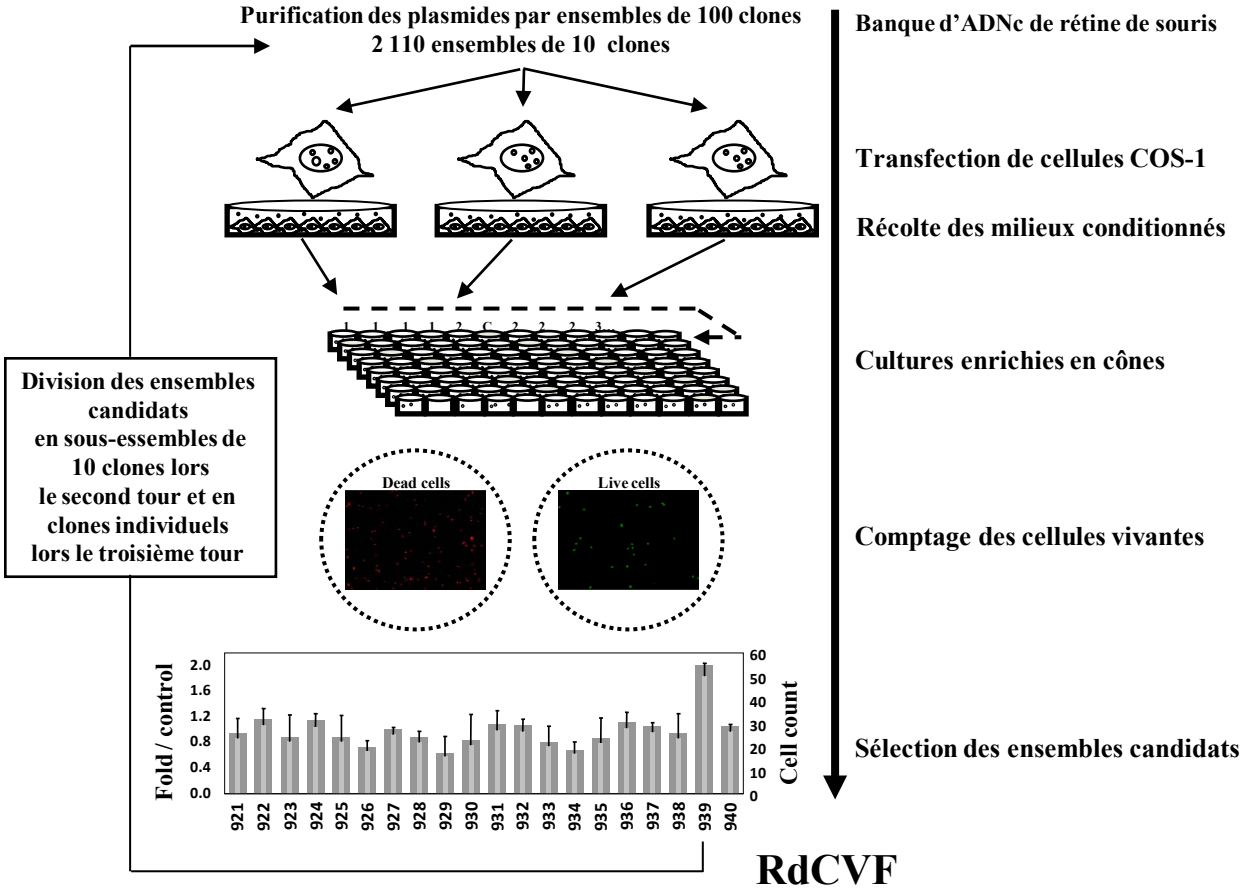


Figure 41: **Identification de RdCVF par criblage haut contenu d'un banque d'expression sur un modèle de cultures primaires enrichies en cônes.** Traduit d'après Léveillard *et coll*, *Nat Genet.* 36, 755-9 (2004).

caractéristique anatomopathologique dans la maladie d'Alzheimer (**Fig. 42**). Nous avons aussi identifié un gène paralogue, *Nxnl2* qui partage une grande partie des fonctions du gène *Nxnl1* (Chalmel et al., 2007; Jaillard et al., 2012). L'absence d'activité thioloxydoréductase de la protéine RdCVF suggère qu'elle agit sur les cônes par l'activation d'un récepteur de surface, une liaison à la surface des cônes a d'ailleurs pu être démontrée par l'utilisation de la protéine RdCVF marquée à l'iode 125 (Leveillard et al., 2014).

Position du problème et objectifs

Compte tenu du fait que la rétinopathie pigmentaire est une maladie qui n'engage pas le pronostic vital, le traitement par administration du facteur de survie des cônes RdCVF à l'aide de vecteurs viraux utilisés en thérapie génique, traitement irréversible, pourrait présenter un danger pour le patient au-delà du bénéfice qui devrait en résulter pour sa vision. Nous revenons sur un exemple qui illustre notre propos. Les enfants atteints d'immunodéficience combinée sévère liée à l'X (SCIDX1, OMIM#611291), une maladie génétique du système immunitaire contraignant leur maintien dans un environnement stérile, ont été traités par thérapie génique en France à partir de l'an 2000. Dans un premier temps, ces bébés bulles ont bénéficié largement de ce traitement mis au point par l'équipe d'Alain Fisher et Marina Cavazzana-Calvo (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Deux d'entre eux ont malheureusement développé ensuite une leucémie qui a été provoquée par l'activation d'un proto-oncogène *LMO2*, suite à l'intégration du vecteur dérivé d'un rétrovirus dans le génome de ces patients (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Les vecteurs utilisés en thérapie génique pour les dégénérescences rétiniennes, comme l'amaurose congénitale de Leber ne présentent pas ce risque car les virus associés aux adénovirus (VAA) ne semblent pas s'intégrer dans le génome de l'hôte mais persistent sous formes d'épisomes, des ADN circulaires extrachromosomiques qui peuvent se répliquer de manière autonome (Colella and Auricchio, 2012). Néanmoins, la signalisation de RdCVF qui sera abordée plus loin suggère que dans certains cas une interruption du traitement puisse se justifier.

En parallèle à l'approche de thérapie génique programmée avec RdCVF, mon projet est d'identifier et d'isoler des molécules capables de favoriser la survie des photorécepteurs à cône dans le cadre d'une approche pharmacologique destinée à développer une thérapie non invasive de la rétinopathie pigmentaire. Pour atteindre cet objectif, nous avons envisagé une stratégie basée sur les étapes suivantes (i) criblage à haut contenu sur un modèle de survie des cônes d'une collection de plus de 200 plantes médicinales, représentant un total de 800 extraits, (ii) purification et identification de(s) molécule(s) biologiquement active(s), (iii) validation des molécules actives pour leur effet protecteur sur un modèle murin de la rétinopathie pigmentaire, (iv) mise en évidence de la voie de signalisation impliquée dans l'effet protecteur de nos molécules trophiques, (v) mise au point du mode d'administration de ces molécules (vi) production à grande échelle du principe actif validé pour réaliser des études précliniques.

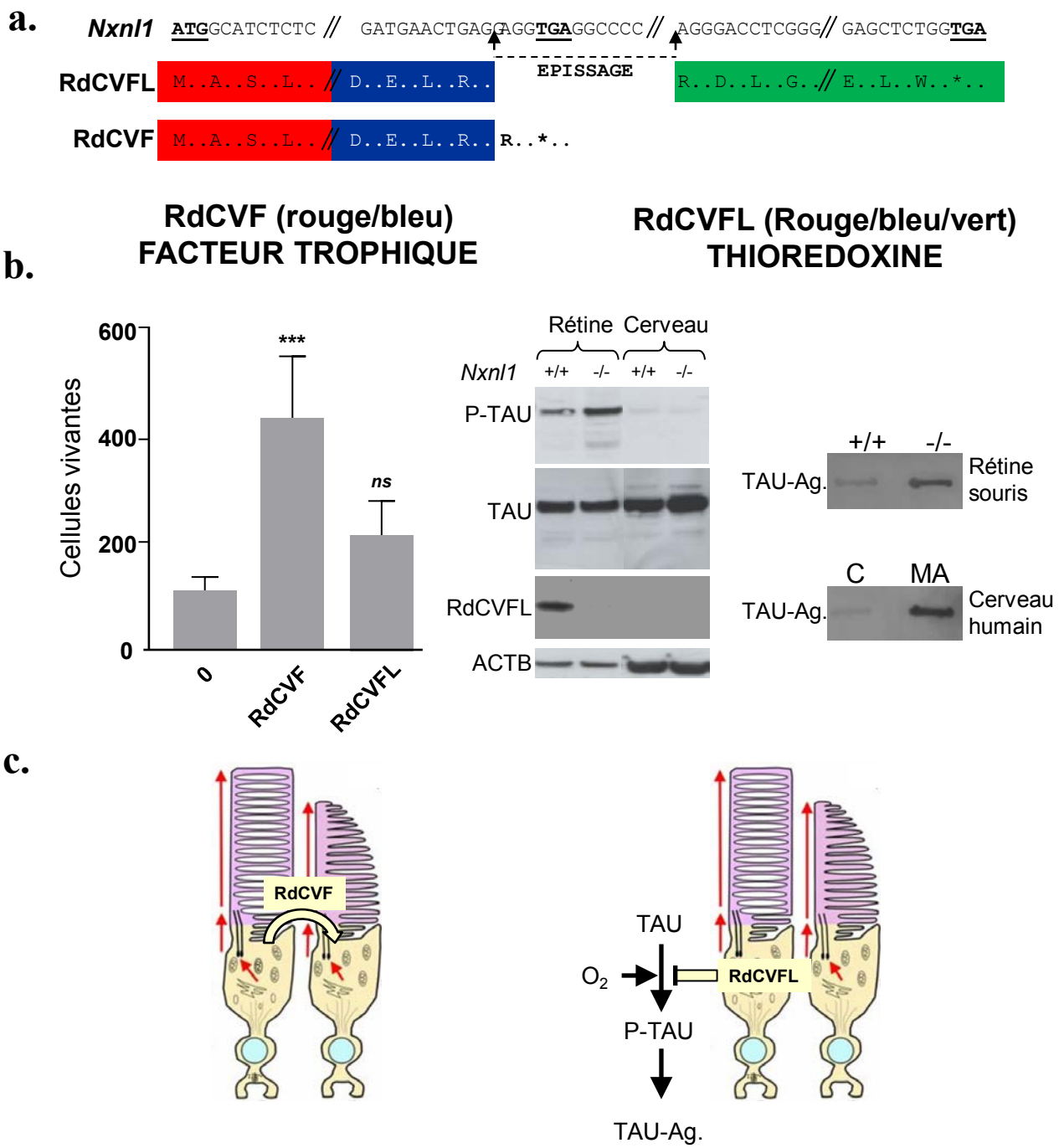


Figure 42: **Relation structuro-fonctionnelle du gènes *Nxnl1*. a.** Le gène *Nxnl1* avec les deux phases de lecture codant pour le facteur trophique RdCVF et la thiorédoxine RdCVFL. Notons que c'est l'absence d'épissage du gène et la présence d'un codant stop en phase de lecture qui permettent la production de RdCVF. **b.** Activité protectrice de RdCVF sur les cônes des cultures enrichies (à gauche) et le rôle de RdCVFL dans l'inhibition de la phosphorylation et de l'agrégation de la protéine TAU (à droite). P-TAU, TAU phosphorylé; TAU-Ag., agrégats de TAU; C, contrôle, MA, maladie d'Alzheimer. **c.** Modèles schématiques avec le rôle de l'oxygène. Adapté de Fridlich *et coll.*, *Mol Cell Proteomics* 8, 1206-18 (2009).

II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

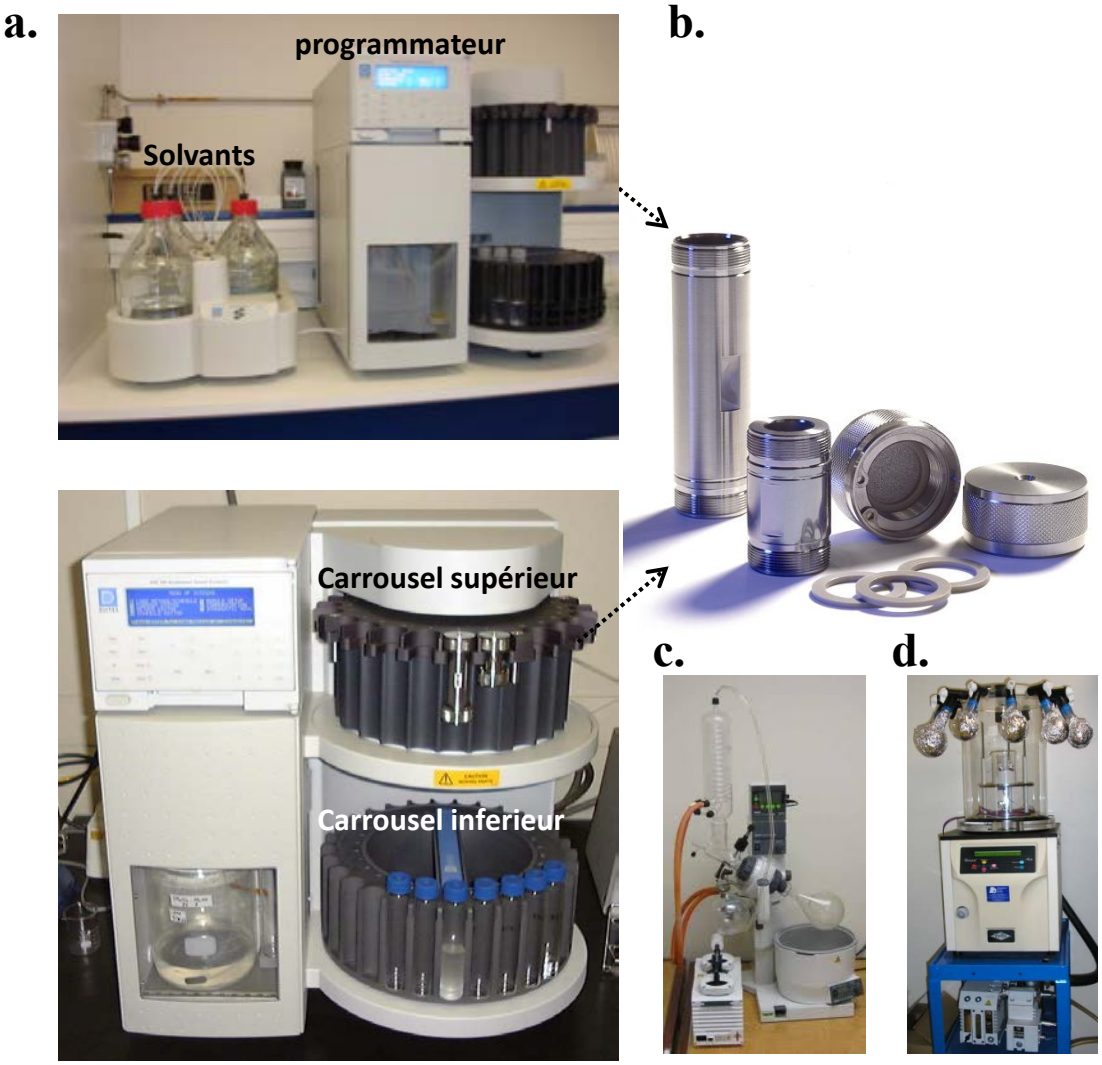


Figure 43. **Fabrication d'extraits par « Accelerated Solvent Extraction ». a.** Extracteur automatique Dionex ASE 200® avec programmateur-distributeur pour quatre solvants différents et cellules d'extraction de 5 et 11, 22 ml. **b.** La cellule est en acier inoxydable hermétique dont l'étanchéité est assurée par des joints PEEK®, les bouchons aux extrémités comportent un fritté, une membrane de cellulose ou du sable de Fontainebleau. **c.** Evaporateur rotatif de Büchi. **d.** Lyophilisateur.

II MATERIELS ET METHODES

II.1 PREPARATION D'EXTRAITS DE PLANTES MEDICINALES

Les extraits de 200 plantes (« Greenpharma Extract Library ») ont été sélectionnés pour leur usage en médecine traditionnelle et leur biodiversité. Les plantes provenant de diverses aires géographiques et de différents biotopes ont été examinées par un ethnobotaniste chargé de valider leur origine, leur famille et leur genre. Les différents organes des plantes (feuilles, racines, écorces, graines ou fruits) ont été séchés puis stockés dans une chambre noire à l'abri de la lumière et de l'humidité. Ces organes ont été vérifiés, tamisés, broyés, les graines écrasées, les feuilles et les racines découpées en petits bouts de quelques millimètres avec un sécateur ou un ciseau. Les débris ont été réduits en poudres fines à l'aide un broyeur (Retsh). En effet, les poudres brutes contiennent de nombreuses impuretés et sont donc impropres à la réalisation d'essais cellulaires. Il est donc nécessaire de les extraire de la matrice végétale.

II.1.1 FABRICATION D'EXTRAITS METHANOL POLYAMIDE, ACETATE ETHYLE, ACETATE ETHYLE APPAUVRI ET METHANOL APPAUVRI

Nous avons procédé par la méthode d'extraction de solvant accéléré [« Accelerated Solvent Extraction » (ASE)] qui est un processus d'extraction de type solide-liquide consistant à faire passer de manière continue un solvant d'extraction à travers la matière solide. Les solvants sont maintenus sous de hautes pressions et à des températures situées au-dessus de leur point d'ébullition. Ceci assure une meilleur pénétrance et diffusion dans la matrice végétale. Cette combinaison de pression et température élevées fournit un processus d'extraction rapide et efficace. Nous avons utilisé un appareil ASE 200 Dionex alimenté par de l'azote gazeux à une pression de sortie de 6-8 bar (**Fig. 43a**). La mise en route de l'appareil débute par un rinçage du système avec l'un des deux solvants organiques utilisés : le méthanol polyamide (A), l'acétate d'éthyle (AE), l'acétate d'éthyle appauvri (AEA) et le méthanol appauvri (MA). Des procédures distinctes sont appliquées à chaque solvant. La cellule métallique en acier inoxydable de l'appareil est constituée de deux embouts étanches, dont nous avons vérifié l'étanchéité à chaque utilisation (**Fig. 43b**). Une fois l'embout de la partie basse vissée à la cellule, un filtre de cellulose ou du sable y est ajouté, ce qui tend à simplifier l'étape de l'extraction, en aval. Pour l'extraction en méthanol polyamide, la cellule métallique a été remplie de 6-5g de la plante sous forme de poudre, sur 5 g polyamide (Macherey-Nagel SC6). Pour les autres extraits (AE, AEA, MA), la cellule est remplie avec 10-13g de poudre de plantes uniquement. L'incorporation de la matière dans la cellule est faite par tassage via un tube en graphite. Une fois remplie, la cellule est fermée à son extrémité supérieure par le second embout. Elle est ensuite chargée sur le carrousel supérieur où elle sera perforée en vue de l'extraction par le solvant organique la traversant de haut en bas. L'extrait chaud est chassé de la cellule d'extraction pour rejoindre le flacon collecteur sur le carrousel inférieur (**Fig. 43a)**. Le processus d'appauvrissement consiste à rincer préalablement l'extrait dans la cellule avec un alcane (**Table 2**). Ce procédé de dégraissage conduit secondairement à l'extraction par des solvants de polarités croissantes, l'acétate

Table 2: Cycles d'extraction par la méthode « Accelerated Solvent Extraction »,

Extrait / Méthode	A **Méthanol polyamide (MP)**	B **Acétate d'éthyle (AE)**	C **Acétate d'éthyle appauvri (AEA)**	D **Méthanol appauvri (MA)**
Solvant d'extraction	Méthanol (alcool)	Acétate d'éthyle (ester)	1, Heptane (alcane) 2, Acétate d'éthyle	1, Heptane (alcane) 2, Méthanol
Nombres de cycles et durée de contact	4 cycles 3 min	5 cycles 3 min	5 cycles 3 min	5 cycles 3 min
Température du solvant	60°C	60°C	60°C	60°C
Nettoyage en % de solvant	60%	60%	60%	60%
Purge	120 s	120 s	120 s	120 s

d'éthyle et le méthanol, de métabolites encore adsorbés sur la matrice végétale. Les extraits acétate d'éthyle appauvri et méthanol appauvri sont ainsi appauvris en composés hydrophobes, solubles dans l'heptane et enrichis des composés polaires ou intermédiaires. Les extraits collectés sont transférés dans des ballons tarés où ils sont séchés avec un évaporateur rotatif de Büchi à 40°C (**Fig. 43c**). De l'eau est ajoutée en fin de séchage pour optimiser l'évaporation des traces de solvants organiques et pour permettre la lyophilisation de l'extrait en 48 h (**Fig**. **43d**). Les 200 plantes de l'extraithèque ont été traitées de manière à obtenir 2 mg pour chacun des quatre solvants qui ont été mis à la disposition du laboratoire dans des piluliers de 4 ml en verre capables de supporter la congélation -80°C. Chaque pilulier a été étiqueté du code de l'extrait afin de permettre une bonne traçabilité. Le rendement d'extraction (RE), exprimé en pourcentage, est inversement proportionnel à la sélectivité de l'extraction et désigne le rapport de la masse d'extrait sec obtenu divisé sur la masse de plante utilisée.

II.1.2 FABRICATION D'UN EXTRAIT METHANOL POLYAMIDE A PLUS GRANDE ECHELLE.

II.1.2.1 EXTRAIT MÉTHANOL POLYAMIDE

Il a été nécessaire de modifier le protocole pour traiter de plus grandes quantités de l'extrait d'*Uvaria chamae* qui a été purifié. La poudre issue des feuilles d'*Uvaria chamae* a donc été macérée dans du méthanol qualité ACE (Sigma Aldrich 32213) à 10 mg/ml durant 24 h ou 48 h à température ambiante sous agitation. Le macérat de couleur vert foncé a été filtré sur Buchner avec un filtre Whatman grade 3 de porosité 6 µm, puis séché à l'évaporateur rotatif de Büchi à 40°C pour préparer un extrait méthanol brut. La matière sèche du ballon a été reprise dans 100 ml d'eau distillée en récupérant les résidus accrochés sur le ballon. L'extrait méthanol brut a ensuite été lyophilisé. Cinq cent g de cet extrait méthanol lyophilisé ont été mis en suspension dans 10 litres (l) de méthanol, soit une concentration de 50 g/l, par agitation 48 h. L'ensemble du dispositif a été recouvert d'un film plastique pour réduire le processus d'évaporation. Cet extrait a été filtré sur Buchner successivement avec un filtre Whatman de grade 4 et de porosité 20-24 µm, puis un filtre Whatman 3 de porosité 6 µm.

L'extrait méthanol polyamide (A) a alors été préparé par chromatographie sur colonne de polyamide. Dans une colonne en verre de 2,6 cm de circonférence et de 37,5 cm de hauteur, soit d'un volume équivalent à 1 litre. Un coton et 500 mg de sable fin de Fontainebleau ont été introduits comme verre fritté en sortie de colonne. Dans certains cas, la colonne utilisée était équipée d'un verre fritté de 40-100 µm d'épaisseur. 125 g de polyamide (SC6 Machery-Nagel < 0,07 mm) préalablement équilibrés dans un litre de méthanol sous agitation ont servis à remplir la colonne pour un volume mesuré de 475 ml. Cette matrice été introduite dans la colonne préalablement fixée à un support. Le robinet d'évacuation, fermé au début du remplissage, a été ouvert afin de tasser la phase stationnaire puis refermé à un 1-2 cm au-dessus du lit. Les 8 à 10 l d'extrait méthanol correspondant au volume après évaporation du solvant, ont été chargés sur la colonne (500 ml). Pour augmenter la vitesse d'élution, un dispositif imprimant une pression d'azote (0,2 bar) a été adapté à la colonne. A

a.



b.

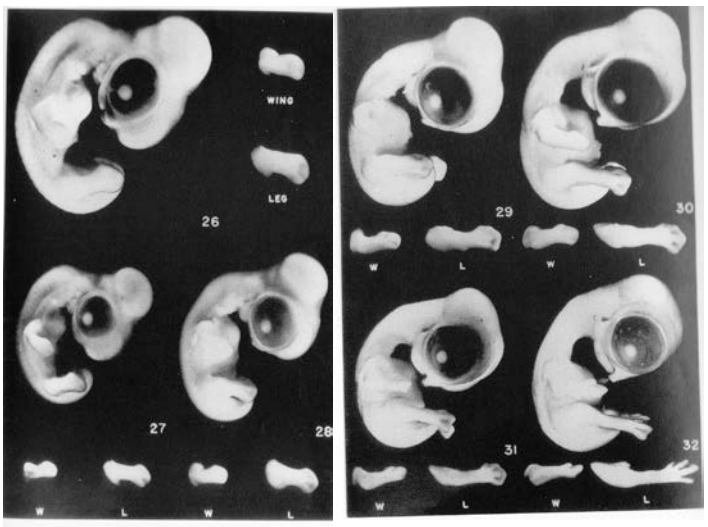


Figure 44. Les embryons de poulets a. Embryon de poulet au stade 29 utilisé pour les cultures enrichies en cônes. **b.** Caractéristiques morphologiques des embryons entre les stades 26 et 32 d'après Hamburger & Hamilton. *J. Morphol.* 88, 42-92 (1951).

l'issue des dépôts successifs, les différentes collectes d'extrait méthanol polyamide ont réunies, séchées et lyophilisées 48 h donnant l'extrait *Uc*A (voir schéma nomenclature).

II.1.2.2 EXTRAIT CHARBON

La poudre de plante d'*Uvaria chamae* est reprise à 100 mg/ml dans du méthanol. Cette solution subit une étape de macération sous agitation durant 24h ou 48h à T°C ambiante. Par la suite, elle est filtrée sur filtre Whatman 3. À cette solution verte est ajouté le charbon actif avec un rapport 1 : 1 pour plante : charbon. Elle est maintenue sous agitation durant 30 minutes à la fin desquelles une filtration au Buchner sur filtre GFB/F (0.7µm) est accomplie. Le séchage est effectué sous évaporateur rotatif (40°C) et lyophilisateur.

II.2 PREPARATION DES CULTURES ENRICHIES EN CONES D'EMBRYONS DE POULET

L'essai biologique sur lequel repose le criblage des extraits de plantes médicinales a été adapté du criblage haut contenu qui a permis d'identifier RdCVF par clonage par expression (Leveillard et al., 2004b). Les cultures primaires enrichies en cônes préparées à partir d'embryons de poulet ont été réalisées par Géraldine Millet-Puel selon le protocole décrit dans le mémoire rédigé en 2011 pour l'obtention d'un diplôme de l'école pratique des hautes études (EPHE) (Millet-Puel, 2011). Les œufs utilisés pour cette culture sont issus de poulet souche 667 label rouge de l'élevage Morizeau dans l'Eure et Loire. Ces œufs fertilisés par voie naturelle sont récoltés après ponte et maintenus à 17°C (zéro biologique) jusqu'à leur utilisation. Pour réaliser une culture, sept œufs sont incubés pour 24 h à 20°C puis 136 h à 37°C avec réversion intermittente de l'inclinaison des œufs dans une couveuse. Après 6 jours et demi d'incubation, les embryons de poulet sont au stade 29 (**Fig. 44a**). À ce stade, les œufs sont extraits de l'incubateur et leur surface est nettoyée à l'aide d'un désinfectant (Pursept A express, Fischer) avant d'être brisés. Pour réaliser cette opération, un trou est percé au dessous du sommet de la coquille avec une grande pince droite, ce qui permet de découper la coquille sur le pourtour de l'œuf et d'enlever son chapeau. L'embryon est délicatement retiré de l'œuf grâce à une pince courbe, puis transféré dans une boite de Pétri contenant du PBS préalablement chauffé à 37°C. Il est ensuite nécessaire d'enlever l'amnios qui entoure l'embryon pour examiner son stade de développement (**Fig**. **44b**). Deux embryons sélectionnés pour avoir atteint précisément le stade 29 sont décapités et énucléés grâce à une pince courbe. Les quatre yeux sont transférés dans du milieu qui conserve une valeur du pH stable à l'air ambiant, ou milieu CO_2 indépendant. L'œil est positionné pour avoir la cornée vers le bas et le nerf optique de face. Un trou est percé au niveau du nerf optique à l'aide de deux pinces droites, puis une branche de chaque pince est insérée entre la rétine et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La rétine est isolée en tirant chaque pince et en faisant tourner l'œil simultanément afin de la décoller de l'EPR. La cornée, le cristallin et le vitré sont à leur tour éliminés pour ne laisser que la rétine qui est transférée dans une solution de Ringer (NaCl 125 mM; KCl 3,6 mM; $MgCl_2$ 1,2 mM; NaH_2PO_4 25 µM; Na_2HPO_4 70 µM; Na_2SO_4 1,2 mM; Glucose 10 mM; EDTA 0,4 mM), puis découpée très finement à l'aide de deux pinces droites. Les fragments rétiniens sont lavés deux fois dans du milieu Ringer avant d'être digérés avec de la trypsine 0,25% pendant 20 minutes au bain marie à 37°C. La

digestion est stoppée avec du milieu M199 (Invitrogen) + 10% de sérum de veau fœtal, puis l'ADN libéré est digéré avec 0,012 mg d'ADN nucléase I (Sigma Ref: D4263) par rétine. Les amas cellulaires et l'ADN sont dissociés par aspirations et refoulements successifs à l'aide d'une pipette Pasteur rodée. Les cellules de la suspension sont rincées deux fois avec du milieu de composition chimique défini (MCCD) afin d'éliminer le sérum ainsi que la DNase I. Le MCCD est composé d'un volume de milieu M199 utilisé pour la culture des fibroblastes de poulet et d'un volume de « Dubelco modified Eagle medium » (DMEM, Invitrogen), le tout supplémenté d'insuline (0,86 µM), transferrine (0,07 µM), Na_2SeO_3 (0,29 µM), putrescine (182 µM), progestérone (2,0 µM), prostaglandine (0,28 µM), taurine (3 mM), cytidine 5'diphosphoholine (4,7 µM), cytidine 5'diphosphoethanolamine (2,7 µM), hydrocortisone (0,55 µM), triiodo-L-tyronine (0,03 µM), pyruvate de sodium (1 mM) et de gentamycine (20 µM). Le culot cellulaire est ensuite repris dans du MCCD et les cellules sont comptées. La concentration des cellules vivantes est mesurée sur une cellule de Malassez après coloration des cellules mortes avec le bleu de trypan. Avant de procéder à leur ensemencement, deux plaques 96 puits noires à fond transparent (Corning, 3603) sont traitées pendant au minimum 2 h à 37°C avec de la poly-L-Lysine à 32,25 µg/cm² afin d'augmenter l'adhérence des cultures, puis rincées par deux fois avec du milieu M199, 50 µl de suspension cellulaire sont déposés dans chaque puits. Les concentrations initiales utilisées correspondent à deux densités légèrement différentes d'ensemencement soient 1 x 10^5 et 2 x 10^5 cellules/cm². Les cellules sont réparties dans les plaques avec une pipette multicanaux de la droite de la plaque vers la gauche, en homogénéisant entre chaque colonne, afin que la répartition des cellules soit homogène (**Fig. 62**). Il existe un plan de plaque dont la répartition des puits tests et contrôles, très homogène sur l'ensemble de la plaque a été mise au point pour limiter l'apparition d'artefact lors de la lecture.

Les différents extraits contenant les métabolites secondaires des plantes ont été préalablement mis en solution à 1 ou 10 mg/ml dans de l'eau ultra pure (Invitrogen). Ils ont été vortexés, soumis aux ultrasons pendant 5 min et incubés à 42°C pendant 30 min. Ces extraits ont été dilués dans le MCCD et utilisés à 10 et 100 µg/ml sur nos cultures enrichies en cônes. Les plaques sont ensuite incubées pendant 7 jours à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO_2.

Le test de viabilité est réalisé après 7 jours de culture. Il consiste à marquer les cellules vivantes avec de la calcéine et les cellules mortes avec un homodimère de l'éthidium. Ces deux fluorochromes sont utilisés pour tester la perméabilité des membranes. La calcéine pénètre dans les cellules et est hydrolysée par des estérases endogènes de la cellule vivante ainsi convertie en molécules fluorescente émettant à 520 nm suite à une excitation à 485 nm. Les cellules vivantes sont imperméables aux molécules d'homodimère de l'éthidium. Néanmoins, lorsque les membranes cellulaires sont endommagées, l'homodimère de l'éthidium pénètre jusqu'au noyau, s'intercale dans l'ADN cellulaire et provoque l'émission d'une fluorescence rouge à 635 nm après une excitation à 520 nm. Il s'agit du principe du « Live/Dead assay » (Invitrogen).

Dans chaque puits des plaques contenant les cultures ont été ajoutés 2,7 µM de calcéine et 0,3 mM d'homodimère d'éthidium. Les plaques ont ensuite été incubées 1 h à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'évaluation de la viabilité cellulaire s'établit grâce à une plateforme de comptage automatisé composée d'un microscope inversé (Nikon TE 2000)

équipé d'une lampe au mercure avec deux filtres d'excitation à 485 et 520 nm, deux filtres d'émission à 520 et 635 nm, un objectif (x10), une platine motorisée contrôlée par un processeur (Multicontrol 2000, Martzauzer) et une caméra « charge-coupled device » (CCD) (Coolsnap). Cette plateforme de comptage, un prototype développé au laboratoire, est piloté par le logiciel Metamorph (Leveillard *et al*., 2004b). Cette plateforme permet d'acquérir les images des cellules mortes et des cellules vivantes simultanément pour chaque puits de la plaque 96 puits, en partant de puits A1 vers le puits A12, puis B12 vers B1, C1 vers C12 et ainsi de suite. À la fin de l'acquisition des images de l'ensemble des puits de la plaque, un traitement automatisé permet de produire les résultats en termes de nombre de cellules pour une surface donnée. Dans un premier temps, l'aire moyenne d'une cellule vivante est déterminée en examinant les 19 puits correspondant aux contrôles négatifs. Ensuite cette aire est appliquée comme paramètre à l'ensemble des puits de la plaque. Les données quantitatives des quatre puits correspondant aux répétitions des conditions initiales sont moyennées et rapportées au nombre moyen de cellules vivantes dans les 19 puits contrôles. Ces valeurs du nombre de cellules vivantes sont alors traitées en utilisant des logiciels appropriés, Excel et GraphPad.

II.3 TEST DES EXTRAITS ET FRACTIONS DE PLANTES MEDICINALES SUR LES CONES DE LA SOURIS *RD1*

Ce test est destiné à valider l'effet protecteur des cônes d'un extrait (*Ruta montana*) ou d'une fraction (*UcAC*3F8) dans un modèle *ex vivo* de rétinopathie pigmentaire chez la souris. Sept souris *rd1* (C3H*rd1*/*rd1*) de 35 jours ont été sacrifiées par élongation des cervicales, énucléées et la rétine disséquée comme suit. Une incision est effectuée au niveau de la *pars plana* à l'aide d'une aiguille de 18 Gauge (G). À partir de l'orifice ainsi obtenu, et à l'aide de micro-ciseaux, l'œil a été découpé circulairement pour libérer la chambre postérieure contenant la rétine (la cornée et le cristallin ont été éliminés). Le vitré a été délicatement retiré et des incisions aux quatre points cardinaux ont été faites pour permettre ultérieurement la mise à plat de la rétine. La rétine est alors détachée de la sclère (le blanc de l'œil), transférée et mise à plat, avec les photorécepteurs sur la face opposée à la membrane de l'insert de culture. Les inserts contenant les explants ont été placés dans les puits d'une plaque 6 puits en présence du milieu de culture neurobasal® (Lifetechnologies) à 2 mM L-glutamine et supplémenté en B27® (1/50ème, Lifetechnologies). Les extraits ou fractions de plantes médicinales ont été ajoutés au premier jour de la culture et le niveau du milieu de culture a été surveillé quotidiennement pour s'assurer que l'explant rétinien était maintenu immergé dans le milieu de culture. A l'issue des sept jours d'incubation, les rétines ont été fixées à l'aide de paraformaldehyde (PFA) 4% durant 24 h. Les explants ont ensuite été rincés 5 min dans du tampon phosphate salin (PBS) puis perméabilisés avec 0,1% de triton X-100 dans du PBS. Les rétines ont en suite été rincées à trois reprises pendant 5 min avec du PBS, puis 3 fois pendant 5 min avec 0,1% de tween 20, 1% de sérum albumine bovine (SAB) dans du PBS. La saturation des sites non spécifiques a été réalisée dans ce même tampon en présence de 10% de sérum de chèvre normal. Les explants rétiniens ont été marqués pendant la nuit à 4°C avec la lectine de cacahuète, *Arachis hypogaea* (1/40ème, Lifetechnologies) préalablement couplée à un fluorochrome (λ594 nm). Les explants ont été rincés trois fois pendant 5 min dans PBS avec 0,1%, de tween 20 et 1% de SAB, et ensuite 3 fois 5 min avec du PBS. Les explants ont été montés par quatre entre une lame et une lamelle de verre avec

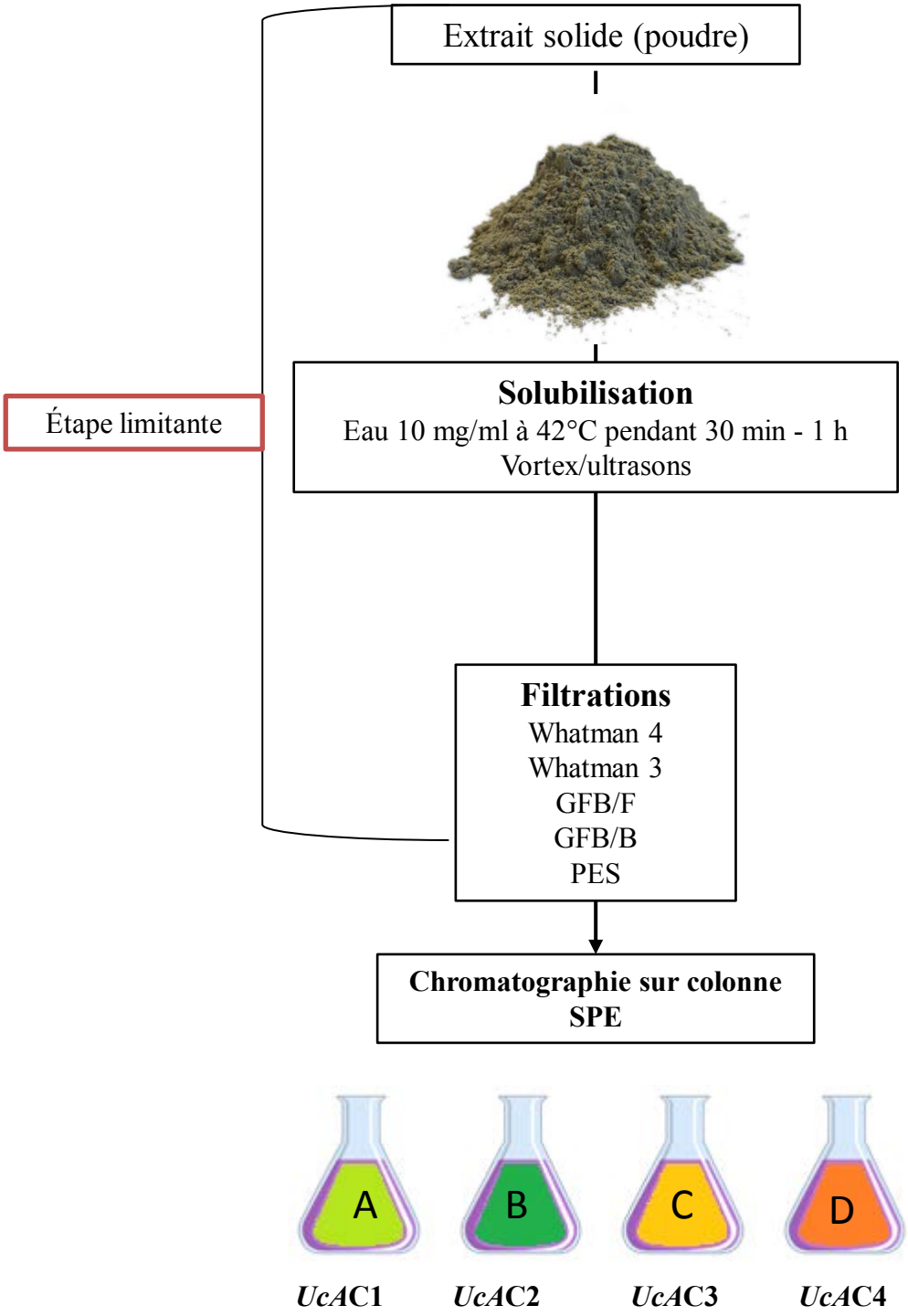


Figure 45. L'extraction en phase solide (SPE). *UcA*C1-4, les quatre fractions d'*Uvaria chamae.*

les photorécepteurs du côté de la lamelle à l'aide d'un milieu de montage spécifique (Fluoromont-G). L'acquisition automatisée des images représentant la surface de chaque explant marquée ainsi que la mesure de la densité des cônes en nombre de cônes/cm^2 ont été réalisées selon la procédure e-conome (Clerin *et al.*, 2011).

II.4 FRACTIONNEMENT BIOGUIDE DES MOLECULES ACTIVES CONTENUES DANS LES EXTRAITS DE PLANTES MEDICINALES

Le criblage primaire sur les cultures enrichies en cônes a permis d'identifier 30 plantes ayant un effet protecteur sur les cônes. Pour purifier les molécules actives de ces extraits, une batterie d'outils de fractionnement a été utilisée comme l'extraction en phase solide et la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

II.4.1 L'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE

Une analyse HPLC en phase inverse sur un gradient général a permis de définir les conditions d'élutions optimales pour le fractionnement par extraction en phase solide « solid phase extraction » (SPE). L'extraction liquide sur phase solide à basse pression est une technique chromatographique basée sur le partage des composés entre une phase liquide et une phase stationnaire. Elle permet la séparation des métabolites selon leurs affinités respectives pour le solvant d'élution ou la phase stationnaire.

L'extrait à fractionner a d'abord été mis en solution dans l'eau à la concentration de 10 mg/ml par utilisation d'un vortex et d'ultrasons pendant 5 min (**Fig**. **45**). Il a ensuite été incubé à 42°C durant 30 minutes, La procédure est répétée deux fois avant filtration. La première filtration a été réalisée sur un filtre Whatman grade 4 de porosité de 20-25 µm. Elle est suivie d'une deuxième filtration sur filtre Whatman 3 de porosité de 6 µm, elle même suivie d'une filtration sur filtre de verre (GFB/F Whatman 0,7 µm ou alternativement GFB/B 1,0 µm). Les extraits étant généralement visqueux, une troisième filtration sur membrane de polyéthersulfone (PES) de porosité 0,22 µm et 49 cm^2 de surface avec une capacité de charge 200 ml a été réalisée. Des colonnes C18-E Strata (55 µm, 70Å) de capacité de charge de 10 g/ pour 60 ml ou C18-E Strata-Giga de capacité de charge 50 g/150 ml ont été utilisées pour le processus de fractionnement. Elles subissent un conditionnement avec respectivement 100 ml de méthanol et 60 ml d'eau et 200 ml de méthanol et 150 ml d'eau. Environ 50 ml soient 500 mg ou 150-250 ml (1,5-2 g) d'extrait *Uc*MP aqueux (couleur vert foncé et odorant) ont été déposés dans le réservoir de la colonne préalablement conditionnée dans l'eau, la pompe à vide réglée à une pression de 20-40 mbar assurant une aspiration lente de l'extrait. Malgré les différentes étapes de filtration, le passage de l'extrait encore riche en impuretés n'est pas rapide, ce qui nous a conduit à augmenter la pression du vide tout en maintenant le débit d'élution. Le débit de l'extrait à travers la colonne est d'environ 1 ml/min.

Le fractionnement de l'extrait *Uc*MP a été réalisé par trois élutions successives: *UcAC*1, *UcAC*2 et *UcAC*3. La première élution de 50 ou 200 ml d'eau déminéralisée suivie de l'assèchement de la colonne produit la fraction *UcAC*1 (incolore transparente) qui est censée contenir les composés hydrophiles. L'étape de séchage par aspiration est destinée à éliminer les molécules hydrophiles pouvant être présentes dans les restes du solvant d'élution. Pour cela, nous nous sommes assuré qu'il n'y avait plus aucune goutte au niveau

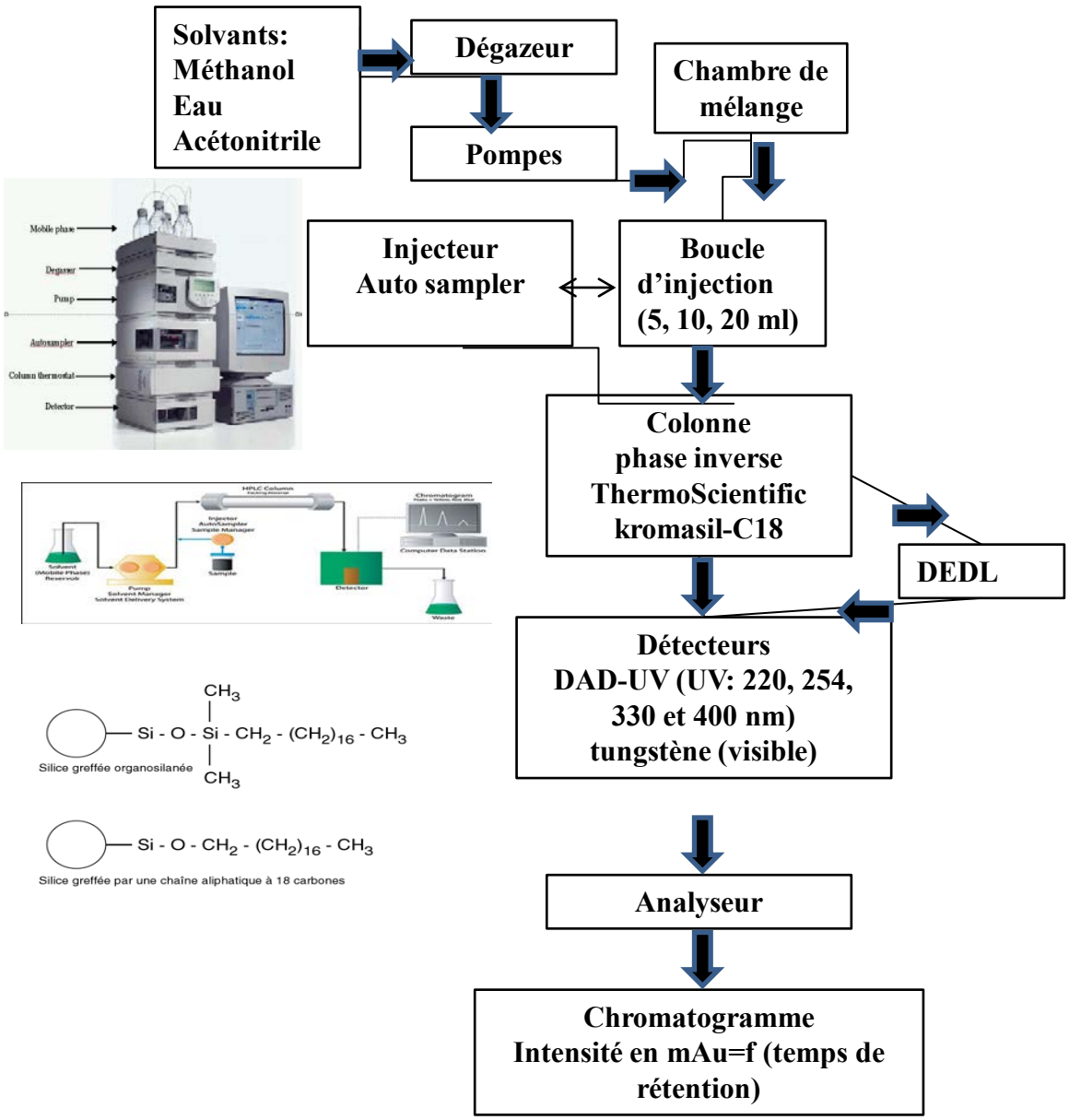


Figure 46. Composants du systèmes HPLC en phase réverse. Le solvant est aspiré par la pompe, il traverse le dégazeur, passe dans l'aiguille d'injection et la boucle d'injection, puis traverse la colonne. Cela élue les molécules et les fait entrer dans les détecteurs. Après traitement du signal dans l'analyseur, on obtient le chromatogramme.

de la sortie de la colonne. En effet, un séchage incomplet induirait la contamination de la collecte suivante. La colonne subit alors une deuxième phase d'élution avec 60 ou 300 ml (Strata-Giga) de méthanol/eau dans un rapport 40/60 (vol /vol,), suivie d'un second séchage pour produire *UcAC*2 (couleur jaune-orange). La polarité de cette fraction est intermédiaire puisque le solvant contient 40% de méthanol. La troisième élution avec 60 ou 300 ml (Strata-Giga) méthanol à 100% est enrichie en molécules hydrophobes (couleur verte intense). Pour s'assurer que tous les composés hydrophobes ont été élués, l'assèchement de la colonne a été prolongé. Une quatrième fraction *UcAC*4 (couleur bleu-vert) a été obtenue par élution avec 300 ml de méthanol à 100%. La colonne a ensuite été rincée sous vide avec 500 ml de méthanol puis stockée encore humide en vue d'une nouvelle utilisation.

La fraction *UcAC*1 a été congelée et conservée à -80°C. Les fractions *UcAC*1, *UcAC*2 et *UcAC*3 ont été évaporées à l'évaporateur rotatif Büchi sous 2 mbar à 40°C (bain marie). Au cours de l'évaporation, il a été nécessaire de réduire la pression par paliers empechant ainsi l'ébullition de la matière. La fraction *UcAC*3 contenant 100% de méthanol moussait sous 150 mbar, ce qui a nécessité l'addition d'eau et la réduction progressive de la pression et de la température. L'objectif du séchage au Büchi est d'évaporer l'intégralité du méthanol sous basses pressions (70-50 mbar). Ceci permet ensuite d'évaporer l'eau, phénomène visible sous forme de gouttelettes dans la colonne de refroidissement. Avant la fin du séchage au Büchi, 50 ml d'eau déminéralisée ont été ajoutés dans chaque ballon pour alléger la matière et libérer le peu de méthanol encore emprisonné dans la matière. Les fractions *UcAC*2, *UcAC*3 ont toutes été congelées à -80°C et évaporées au lyophilisateur.

II.4.2 ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une méthode analytique de premier plan pour identifier et quantifier les composés d'un mélange complexe sous forme liquide (**Fig**. **46**). Le principe de base repose sur l'équilibre de partition des composés du mélange entre deux phases non miscibles, l'une mobile l'autre stationnaire. Il existe plusieurs catégories de phases stationnaires (normale, inverse, chargée) qui sont empaquetées dans une colonne de manière à former un réseau homogène. En phase inverse, la phase stationnaire statique est composée de petites particules de silice (3-10 µm) auxquelles sont greffées des chaînes aliphatiques hydrophobes de 8 (C8) ou 18 atomes de carbones (C18). La phase mobile représente les molécules à séparer inclues dans un solvant. Leur séparation est déterminée par leur affinité différentielle vis-à-vis de la phase stationnaire et leur temps de passage à travers les billes poreuses de 100 Å. La progression de l'avancée des molécules à travers la phase stationnaire est conditionnée par une multitude d'états d'équilibre successifs, au cours desquels les molécules se lient et se détachent progressivement de la phase stationnaire dans la colonne en fonction de leur propriétés chimiques et de celles de l'éluant. Ces cycles d'adsorption et de désorption des molécules sont à la base de leur fractionnement. Les molécules éluées sont détectées par excitation à l'aide d'une lampe UV placée à la sortie de la colonne. Ce dispositif est parfois secondé par un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL). Ce dernier instrument permet de détecter les composés non chromophores ou ayant une absorbance faible ou inexistante (triglycérides, sucre, phospholipide et certaines substances naturelles). Le chromatogramme

résultant exprime l'absorbance (axe des y), exprimée en milli-unités d'absorbance (mAu) en fonction du temps de rétention (tR, axe des x). Idéalement, le temps de rétention devrait être indépendant de la quantité de matière injectée.

Les analyses HPLC ont été effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC (Dionex) munie d'une pompe à solvant P580 (pression max 300 bar), d'un injecteur automatique « autosampler » (Gina 50) et d'un dégazeur (Degassex). Cette chaine est couplée à une source et plusieurs détecteurs, dont une lampe deutérium pour les UV proches (< 350 nm), une lampe au tungstène pour visualiser les composés absorbants dans le spectre visible (390-780 nm) et un détecteur UV à barrette de diodes (PDA-100 photodiode détecteur Dionex DAD UV). Une seconde chaîne HPLC, constituée d'une « UltiMate 3000 » (Dionex) connectée à un DEDL Sedex 85 (réglé à la température de 40°C, pour un gain 12 sous 4 bars) a servi à l'analyse qualitative des extraits et des sous fractions. La fraction analysée a été dissoute dans du méthanol qualité HPLC (Sigma) ou dans de l'eau milli-Q (Millipore) à 1 ou 10 mg/ml. Dans le cas d'un extrait riche en composés chimiques, comme celui préparé avec du méthanol polyamide (*Uc*MP), il a été préférable d'injecter à 1 mg/ml alors que ses sous-fractions ont été injectées elles à 10 mg/ml. Pour les concentrations de 10 mg/ml, une étape préalable de centrifugation ou de filtration sur filtre seringue nylon 0,22 µm a été ajoutée avant l'injection de la fraction pour se prévenir des risques d'occlusion de la colonne. 10 ou 20 µl ont été introduits directement à l'aide d'une seringue dans la boucle d'injection qui a une capacité maximale de 5 ml. La colonne a été éluée par la phase mobile injectée à travers la colonne. Les analyses ont été réalisées en phase inverse « reverse phase » (RP) avec une colonne HPLC Kromasil 100-5C18 (Thermo Fisher Scientific, 250 x 4,6 mm), couplée en amont à une pré-colonne C-18. Cette phase stationnaire est composée de particules quasi-sphériques à répartition homogène, d'une taille 5 µm avec des pores de 100 Å. Les solvants polaires (acétonitrile/méthanol/eau) de qualité HPLC (Chromasolv®) ont été injectés à un débit de 1 ml/min dans une colonne maintenue à la température de 30°C par un four (Igloo-Cil).

Pour les chromatographies HPLC semi-préparatives, une pré-colonne C-18 a été couplée à une colonne Kromasil 100-5C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm 100 Å). Les fractions ont été collectées à l'aide d'un collecteur automatique (Foxy Jr,®). Ces appareils sont pilotés par le logiciel Chromeleon (version 6,6) qui permet de programmer le volume de 250 µl injecté, soit 2,5 mg/injection, le gradient d'élution (débit 4 ml/min) et les longueurs d'onde du détecteur UV ou en lumière visible. Ce logiciel assure la retranscription des données sous la forme de chromatogrammes exprimant l'absorbance (mAu) en fonction du temps de rétention (tR).

II.5 ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Cette technique a un très grand pouvoir de résolution et permet de séparer des molécules ionisées selon leur rapport masse sur la valence de la charge (m/z) et a donc été associée aux méthodes de fractionnement HPLC pour évaluer la nature chimique des composés présents dans les fractions actives à l'aide d'un référentiel (Allwood and Goodacre, 2010). Les fractions actives ont été préalablement acidifiées par de l'acide formique pour favoriser l'ionisation de ces constituants moléculaires. L'ionisation de ces molécules a été obtenue par électronébulisation ou « electrospray ionization » (ESI), la dispersion de la phase

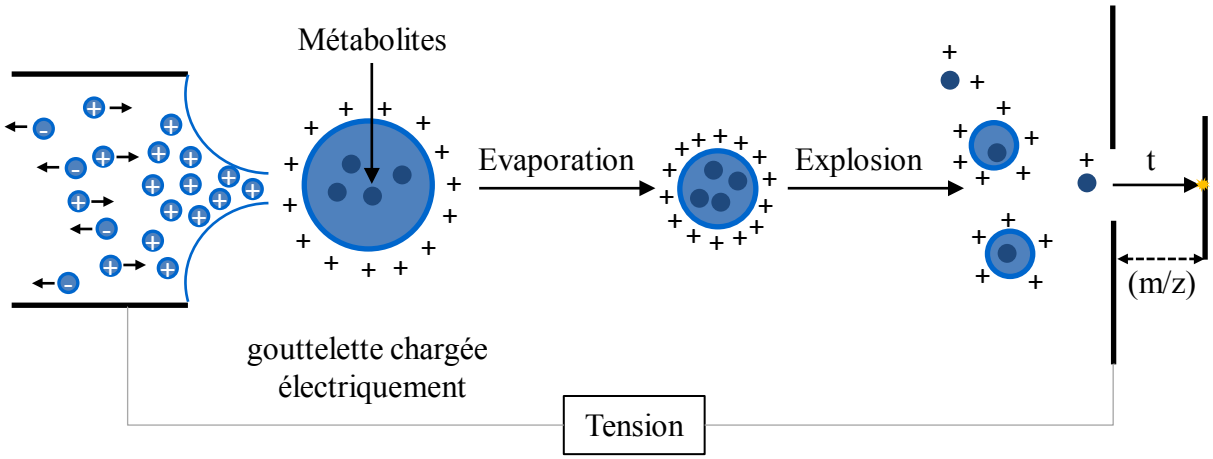


Figure 47. Principe de l'électronébulisation pour l'analyse par spectrométrie de masse des métabolites contenus dans les fractions actives. Un capillaire délivre la phase liquide sous forme de gouttelettes chargées électriquement. Elles subissent une évaporation puis une explosion, ce qui libère les métabolites sous forme d'ions chargés dont le temps de vol (t) après pénétration dans la chambre est proportionnel au rapport de la masse par la valence (m/z), et donc de la masse pour une valence de charge égale à 1. Il s'agit ici du mode positif (ESI+). Le mode négatif (ESI-) correspond à l'inversion de la polarité de la tension électrique.

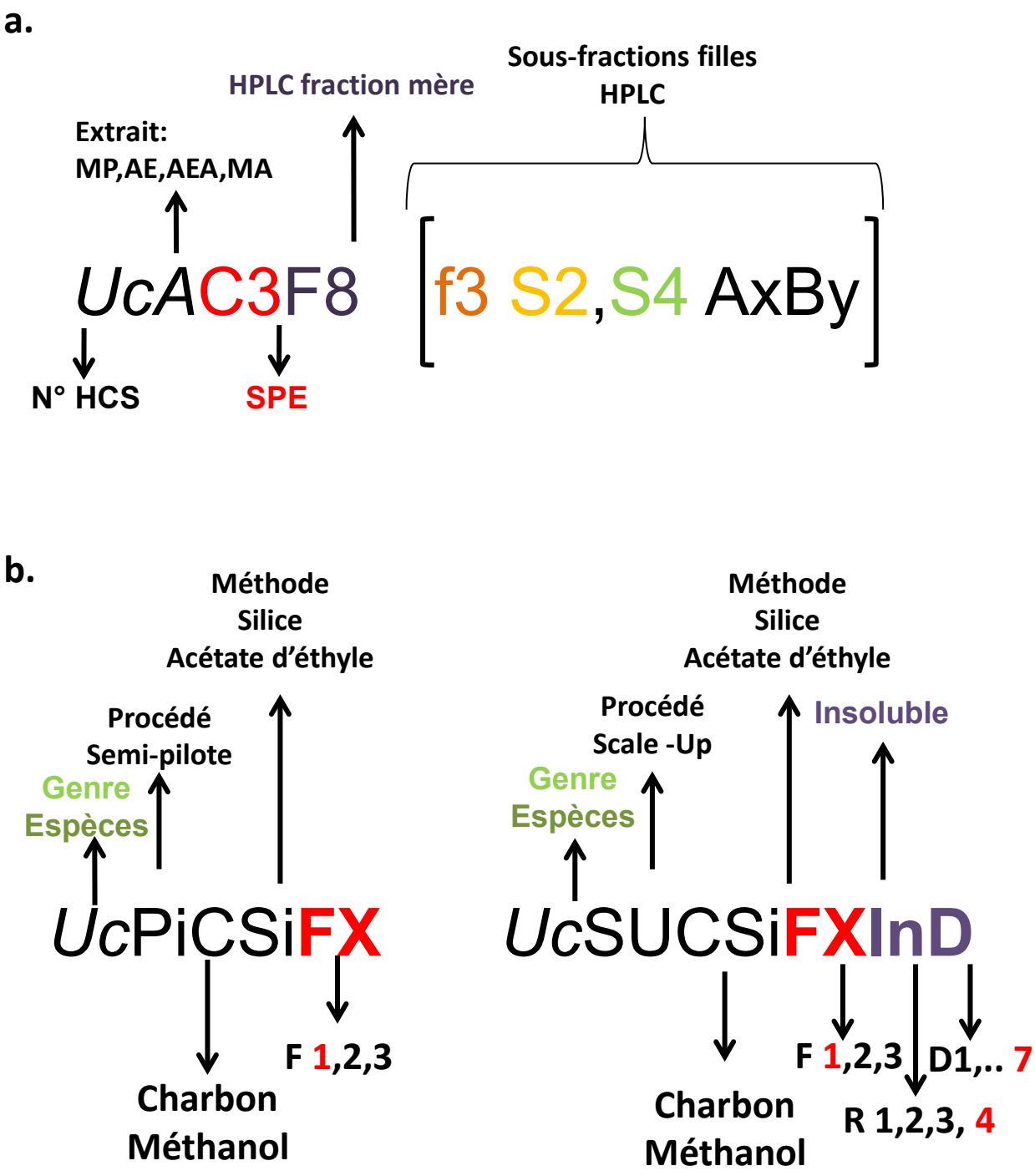


Figure 48: **Nomenclature de fractionnement de la plante *Uvaria chamae*. a.** Fractionnement classique en HPLC en phase inverse. **b.** changement d'échelle: passage en procédés pilote et « scale up » pour la purification des métabolites actifs d'*Uvaria chamae*.

liquide sous forme de gouttelettes chargées électriquement. Ces ions formés dans la source sont portés par un champ électrostatique vers la chambre de l'analyseur. Le spectromètre de masse (MS) sépare les ions selon le rapport m/z, z représentant la valence (**Fig**. **47**). La masse peut donc être déterminée pour une valence égale à un ou pour ses multiples.

Le système HPLC-MS Finnigan Mat system LCQ que nous avons utilisé est composé d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire (4 voies de solvants) P4000 débit 1 ml/min, d'un « autosampler » (AS3000) et d'un détecteur UV à barrettes de diodes (UV6000LP detector). Les absorptions aux longueurs d'onde 220, 254, 330 et 400 nm sont détectées grâce aux lampes deutérium et tungstène. La fourchette de détection se fait entre 190 et 800 nm. La phase stationnaire est une colonne de Kromasil 100-5C18 (Fisher Scientific, 5 µm, 250 x 4,6 mm), maintenue à 30°C par un four (Igloo-Cil). Les ions sont produits dans la source, qui est parcourue par un flux constant d'azote pure a 99% (Claind N_2 LC-MS) sous une pression de 6,9 bar. Le mode d'ionisation est ESI en mode positif (ESI+) et en mode négatif (ESI-). Le capillaire est maintenu à une température de 200°C. Pour faciliter ce mode d'ionisation, le solvant utilisé est acidifié à 0,01% par de l'acide formique. L'analyseur est un quadripôle en mode d'analyse MS. La détection des ions se fait par balayage des masses entre 50,00 et 2000,00 daltons (Da). Le tout est piloté par le logiciel LCQ-tune.

Lors de l'analyse, nous avons croisé les valeurs des masses avec les profils chromatographiques. L'abondance des ions est représentée sous deux modes: 1) spectre continu : tracé continue ou les signaux sont représentés par des pics plus au moins larges, 2) spectre de fragmentation : histogramme dont l'intensité des ions est exprimée en % et les valeurs m/z sont indiquées en abscisse. L'information qui est obtenue par l'analyse de ces spectres concerne la masse d'ions abondants, leur spectre d'absorption UV, leur temps de rétention, leur détection dans les modes ESI+ ou ESI-, la présence de leurs adduits sodique, formique ou de leur forme divalente ou trivalente.

II.6 PRODUCTION EN MASSE DE FRACTIONS ACTIVES D'*UVARIA CHAMAE*

Au cours de ces recherches nous avons dû augmenter largement la quantité de matériel biologique traité afin de se placer dans des conditions permettant la purification de(s) molécule(s) active(s) issue des feuilles d'*Uvaria chamae*. Nous avons donc été confrontés à la problématique du réapprovisionnement (« sourcing »). Lors du fractionnement de 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae*, il a aussi été nécessaire d'établir une table de correspondance des fractions obtenues respectivement à petite et grande échelle (**Fig**. **48**).

II.7 OPTIMISATION DU PROCEDE DE FABRICATION ET CARACTERISATION DES METABOLITES

II.7.1 EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE DES FRACTIONS POLAIRES ALCALOÏDES ET APOLAIRES DE LA FRACTION D'*UVARIA CHAMAE UCAC*3F8

La fraction d'*Uvaria chamae UcAC*3F8 a été séparée en trois fractions aux propriétés chimiques distinctes (**Fig**. **49**). Deux mg d'*UcAC*3F8 ont été repris à une concentration de 0,5 mg/ml dans de l'eau Milli-Q pour un volume final de 10 ml. Une étape d'acidification avec de l'acide chlorhydrique (HCl 1 M) a permis de ramener le pH à 4,0. Durant cette étape, les fonctions chimiques possédant un doublet électronique libre de type amine (sp3) comme les alcaloïdes se sont chargées positivement, tandis que les autres composés de nature apolaire ou intermédiaire n'ont pas subi de modification de leur charge. Cette solution à pH acide a subi trois extractions successives avec un solvant aprotique volatile, le dichlorométhane [qualité « american chemical society » (ACS), Sigma 320269]. Chaque extraction a été suivie d'une partition dans une ampoule à décanter lors de laquelle la phase organique, plus lourde, se retrouve positionnée sous la phase aqueuse, plus légère. La phase organique apolaire contenant les molécules ayant une affinité pour les solvants hydrophobes a été mise de côté. La phase aqueuse est riche en molécules chargées positivement (amines chargées) et en molécules contenant des groupements fonctionnels, comme l'alcool ou d'autres fonctions susceptibles de mettre en place des liaisons électrostatiques/hydrogènes avec l'eau, et ont donc une meilleure solubilité dans l'eau que dans le dichlorométhane. La phase aqueuse a subi une alcalinisation avec de la soude (NaOH) jusqu'à atteindre un pH de 12,5. Dans ces conditions, les groupements hydroxyles chargés négativement captent les hydrogènes des fonctions amines chargées positivement. Durant cette étape, les alcaloïdes et les molécules portant d'autres fonctions subissent une perte de charges positives, on assiste donc à une neutralisation de la charge globale des métabolites. Cette solution alcalinisée a été extraite à trois reprises avec 10 ml de dichlorométhane. Les molécules d'alcaloïdes sont préférentiellement extraites dans le dichlorométhane. Nous avons ainsi obtenu la phase alcaloïdique, alors que les autres molécules de nature polaire ou intermédiaire se retrouvent dans la phase aqueuse ou phase polaire. La phase polaire a été neutralisée par de HCl 1 M pour ramener le pH à 7,0 ce qui la rend riche en NaCl. Afin de tester cette fraction sur les cultures de cônes de poulet, une étape de dessalage a été réalisée à l'aide d'une extraction en phase solide sur une colonne de silice Stratat-C18E (Phenomenex). La colonne SrataE C18-500 mg a été conditionnée sous vide avec 3 ml de méthanol puis par 3 ml d'eau. La phase polaire (10 ml) a été ensuite déposée sur la colonne équilibrée. Une première élution avec 3 ml d'eau a été réalisée, suivie de l'assèchement de la colonne pour se débarrasser du NaCl. La seconde élution a été réalisée avec 3 ml de méthanol pour éluer préférentiellement le(s) métabolite(s) potentiellement actif(s).

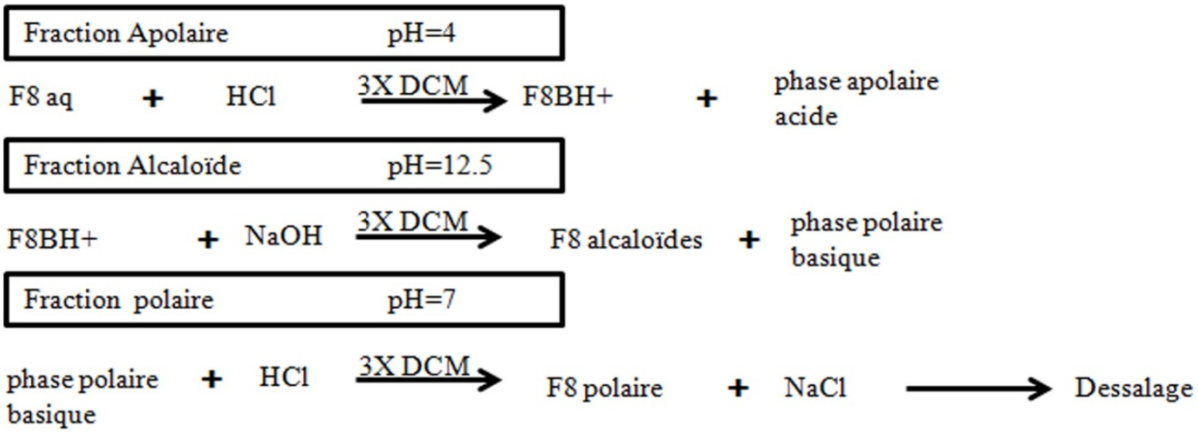


Figure 49: **Obtention des fractions polaires, apolaires et alcaloïdes de la plante *Uvaria chamae*.** F8BH+, fraction F8 acidifiée. DCM, dichlorométhane.

II.7.2 ULTRAFILTRATION DE LA FRACTION D'*UVARIA CHAMAE UC*SUCF1

La fraction *Uc*SUCF1 a été reprise dans l'eau à la concentration de 1 mg/ml par à un traitement aux ultrasons pour 15 min à deux reprises, ceci jusqu'à obtention d'une solution blanche d'aspect micellaire. La solution a été maintenue à 4°C pendant 24 h, et des aliquotes de 500 µl ont été traitées par ultrafiltration (Amicon® Ultra-0,5 centrifugal filter devices) avec des filtres de différents seuils de coupure (3, 10, 30, 50 et 100 kDa). Les aliquotes ont été centrifugées 15 min à 4°C à 13 000 rotation par min (rpm). Le rétentat représente 10% du volume initial de la fraction.

II.7.3 ULTRACENTRIFUGATION DE LA FRACTION D'*UVARIA CHAMAE UC*SUCF1

La fraction *Uc*SUCF1 a été mise en solution dans l'eau ultra pure (Invitrogen) à deux concentrations différentes, 1 mg/ml et 10 mg/ml. Son aspect huileux et pâteux a nécessité deux étapes de 15 min d'ultrasons pour une dissolution optimale. La solution présentait une couleur blanche blanc-transparent d'aspect micellaire. Nous avons pu observer de fines gouttes lipidiques jaunes-vertes flottant à la surface du liquide. Cette solution a été centrifugée dans une ultracentrifugeuse (SERVAIL de Thermo Scientific) avec un rotor à godets oscillants (rotor ST55) pendant 6 h à 50 000 rpm à 4°C. Les 970 µl du surnageant ont été prélevés délicatement et le culot a été repris dans 970 µl d'eau ultra pure (Invitrogen). Ces fractions ont été maintenues à 4°C avant d'être testées.

II.7.4 PROTEOLYSE DE LA FRACTION D'*UVARIA CHAMAE UC*SUCF1

La fraction *Uc*SUCF1 a été mise en solution dans l'eau ultra pure (Invitrogen) à la concentration de 1mg/ml et incubée en présence d'excès de protéinase K aux concentrations finales de 0,4 et 1 mg/ml. Ces solutions ont été incubées 1 h à 65°C, puis 15 min à 95°C pour inactiver la protéinase K. Ces fractions ont été maintenues à 4°C avant d'être testées.

II.7.5 DEGLYCOSYLATION DES FRACTIONS D'*UVARIA CHAMAE UC*SUCF2 ET *UCAC*3F8F3S4

Les fractions *Uc*SUCF2 et *UcAC*3F8f3S4 ont été mises en solution dans l'eau ultra pure (Invitrogen) aux concentrations respectives de 1 mg/ml et 100 ng/ml et incubées pour la nuit à 4°C. Ces deux fractions ont été déglycosylées en condition non-dénaturantes. La déglycosylation des liaisons O-glycosylées simples ou complexées et des liaisons N-glycosylées a été réalisée à l'aide d'un kit de déglycosylation (New England BioLabs P6039S). Celui-ci contient l'O-glycosidase, la PNGase (N-gycosidase), la neuroaminidase, la β1-4 galactosidase et la N-acétylgalactoaminisidase. Vingt µl de mélange enzymatique ont été ajoutés à 800 µl de chaque fraction et le milieu réactionnel amené à 50 mM en phosphate de sodium à pH 7,5. Pour contrôler la réaction, 25 µg de fétuine, une protéine sanguine, ont été traités en parallèle et analysés sur gel BIS-TRIS 4-12% (NuPage) après coloration au bleu de Coomassie. La déglycosylation des fractions *Uc*CSuSiF2 et *UcAC*3F8f3S4 a été analysée après coloration argentique du gel suivant la recette suivante. Le gel est incubé toute une nuit dans cette solution. Il est ensuite fixé 30 min dans un mélange eau/éthanol/acide acétique

65/30/5 vol,/vol, sous agitation. Le gel est rincé deux fois 10 min à l'eau distillée, puis sensibilisé par incubation 1 min dans du thiosulfate de sodium à 0,02% sous agitation. Il est ensuite rincé à deux reprises dans 10 ml d'eau distillée et immergé 20 min sous agitation dans 10 ml de solution argentique (nitrate d'argent 0,2% w/vol formaldéhyde 0,01%). Après avoir été lavé deux fois à l'eau distillée, il est incubé avec agitation dans une solution de développement (carbonate de sodium 1% w,/vol, thiosulfate de sodium 0,00125% et formaldéhyde 0,01%) à l'abri de la lumière. L'étape de développement étant critique, il est nécessaire de guetter l'apparition des bandes marron et de stopper immédiatement la réaction avec 10 ml de Tris 4% et d'acide acétique 2% pour éviter la saturation.

II.8 IDENTIFICATION DE LA CIBLE ET DE LA VOIE DE SIGNALISATION

II.8.1 ÉTUDE DE COMPETITIVITE ENTRE LES DOMAINES EXTRACELLULAIRES EXBSG1 ET LES SOUS-FRACTIONS ACTIVES

L'ADNc de la protéine BSG1 de poulet (1-323) a été cloné dans le vecteur d'expression pcDNA et transfecté dans des cellules COS-1 par précipitation au phosphate de calcium (Leveillard *et al.*, 2004b). Ces cellules ont été maintenues en culture 48 h dans un milieu de rapport de 1/1 de M199 et DMEM et suppléments. Les cultures enrichies en cônes ont été incubées avec 50 µl du milieu de culture additionné de 25 µl de milieu conditionné de cellules COS-1 transfectées par pcDNA-BSG1 ou son contrôle négatif (pcDNA) en présence des fractions *UcAC*3F8S2, *UcAC*3F8S4 et *UcAC*3F8S8. Après 7 jours de culture, la viabilité cellulaire a été mesurée sur la plateforme de comptage cellulaire automatisé,

II.8.2 CHROMATOGRAPHIE PAR AFFINITE EXBSG1 DE LA FRACTION *UCAC*3F8F3S4

Deux ml de billes d'agarose Ni-NTA (Protino) ont été rincés et conditionnés dans un tampon de lavage (Tris pH 8,0 50 mM ; imidazole 10 mM, NaCl 300 mM) puis centrifugés 5 min 13 000 rpm à température ambiante. La préparation a été scindée en deux avec une moitié mise en présence de 800 µl de tampon de lavage et l'autre mise en présence de 300 µl de ce tampon additionné de 500 µl de protéine (His-tagged exBSG1) à 0,56 mg/ml, soit une concentration finale de 280 µg/ml. Les deux préparations ont été placées 1 h 30 min sous agitation rotative à 4°C. Après centrifugation, 20 µl du surnageant et des billes ont été analysés par électrophorèse après coloration au bleu de coomassie. Les fractions liées ont été lavées à l'aide de 300 µl de tampon de lavage puis maintenues à 4°C. Les colonnes ont été assemblées à partir de deux seringues de 1 ml, la matrice des colonnes (Ni-NTA et Ni-NTA-His-exBSG1) étant maintenue par une membrane en nylon et équilibrée de MCCD (DMEM, M199+suppléments). Quand la phase stationnaire de hauteur 1/2 cm (500 µl de billes) a été stabilisée, 1 ml de milieu de culture pour le contrôle et 1ml de la fraction *UcAC*3F8f3S4 à 150 ng/ml ont été déposés. Les fractions éluées ont été conservées à +4°C avant d'être testées.

II.8.3 ESSAI D'INCORPORATION DE GLUCOSE EN PRESENCE DES FRACTIONS *UCAC*3F8F3S2 ET *UCAC*3F8F3S4

Les cultures enrichies en cônes préparées à partir de rétine d'embryons de poulet au stade 29 ont été incubées en présence des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 à respectivement 500 ng/ml et 100 ng/ml. Après 4 jours d'incubations *in vitro*, le milieu de culture est remplacé par 100 µl de milieu sans glucose et rouge de phénol dans un milieu contenant 2 mM de glutamine et les suppléments. Après 1 h d'incubation, les cellules ont été lavées et l'analogue fluorescent du glucose, le 2-N-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-Amino-2-Deoxyglucose (2-NBDG, Life technologies) a été ajouté à la concentration finale de 150 µM. Après 10 min d'incubation à 37°C, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées. La fluorescence des cellules a été mesurée après excitation à 485 nm par l'émission à 520 nm.

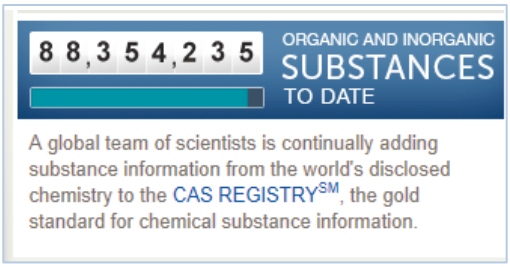
II.8.4 ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE PFKFB2 DANS LA RETINE DE LA SOURIS

La phosphofructo-2kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 2 (PFKFB2) est une enzyme qui produit un métabolite activateur allostérique de la glycolyse aérobie. La mise en évidence de la présence de cette enzyme dans les rétines a été analysée par immunoempreinte (« western blotting ») et immunohistochimie. Des souris normales « wild-type » (wt, C57BL/6@J) et *rd1* (C3H/He@N) de 21 et 35 jours ont été sacrifiées par élongation. Les yeux droits ont été réservés pour l'immunohistochimie, tandis que les rétines des yeux gauches ont été prélevées, plongées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. Ces rétines ont été lysées dans 80 µl de tampons de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% triton X-100, 1 mM fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF), 0,14 mM « tosyllysine chloromethyl ketone hydrochloride (TLCK) et un cocktail d'inhibiteurs de protéinase) puis maintenues dans la glace. Elles ont été soniquées trois fois pendant 10 s, Les extraits obtenus ont été centrifugés à 12,000 rpm pour 5 min à 4°C. Les cœurs et les cerveaux des souris ont été repris dans 1,2 ml de tampon de lyse, puis traités à l'identique. La concentration des protéines a été mesurée par dosage Bradford. Des quantités égales (40 µg) d'extraits protéiques de rétines, de cerveau et de cœur ont été déposées sur un gel BIS-TRIS 4-12% (NuPage). Le gel a été ensuite transféré sur une membrane cellulose de 0,22 µm à l'aide d'un appareil i-Blot (Invitrogen). Après saturation, les membranes ont été incubées pendant 24 h avec un anticorps polyclonal de souris dirigé contre PFKFB2 (Assay biotech Ab-483) à une dilution 1/500ème. Après rinçage, les membranes ont été incubées dans une solution de Tween-20 0,05%, Blocker 3% en présence d'un anticorps secondaire anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxidase dilué au 1/15 000ème (Jackson immunoresearch). Les membranes ont été révélées par chimioluminescence avec le réactif « Enhanced chemiluminescence » (ECL superSignal West Femto, Peribo) sur film Kodak biomax. Les bandes ont été quantifiées et normalisées en utilisant l'actine cytoplasmique ACTB selon la procédure suivante. Les membranes ont été traitées pour éliminer les anticorps fixés à l'aide d'une solution diluée au 1/10ème (Millipore), puis la membrane a été rincée. L'immunoempreinte ACTB a été réalisée avec un anticorps monoclonal anti-ACTB (ABCAM #1501, 1/10 000ème). La quantification relative de l'expression de PFKFB2 a été mesurée grâce au logiciel de traitement d'image Image J. L'analyse statistique a été exécutée avec l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 6).

III

RÉSULTATS

a.



Une équipe internationale de scientifiques met à jour le registre CAS avec toutes les informations disponibles sur les substances chimiques décrites dans le monde.

b.



c.

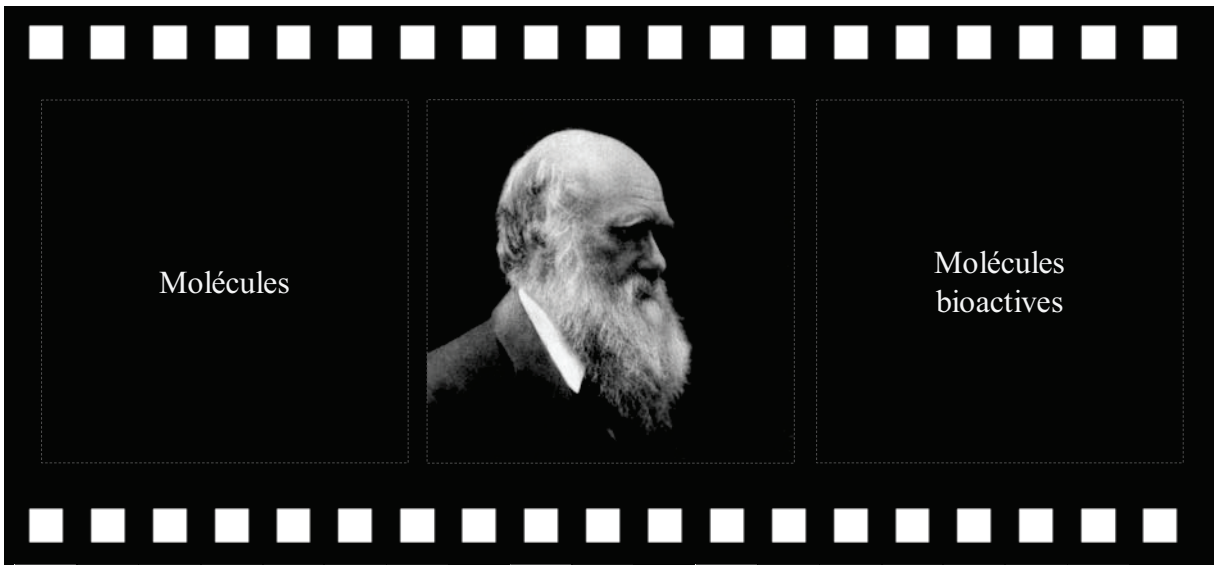


Figure 50: **Les plantes comme source de molécules biologiquement actives. a.** Le nombre total de molécules répertoriées au 27 Mai 2014. **b.** Mme Géraldine Millet-Puel, ingénieur en charge des essais biologiques préparant les cultures primaires enrichies en cônes. **c.** Pellicule cinématographique illustrant le processus de sélection des molécules bioactives durant l'évolution. Au centre un portait de Charles Darwin en 1868 au cours de ses vacances à l'île de Wight réalisé par Julia Margaret Cameron.

III RESULTATS

III.1 LES PLANTES COMME SOURCE DE MOLECULES BIOLOGIQUEMENT ACTIVES

Notre réflexion a d'abord porté sur la source de ces molécules pharmacologiques. En effet, considérant un total de 88 354 010 molécules organiques et inorganiques reportées dans la base « chemical abstracts service » (CAS) au 27 Mai 2014 (**Fig**. **50a**) et le débit maximum de 80 molécules testées par semaine par le criblage haut contenu sur des cultures primaires enrichies en cônes (**Fig**. **50b**), le criblage de l'ensemble de cette collection prendrait 23 000 ans, impensable !

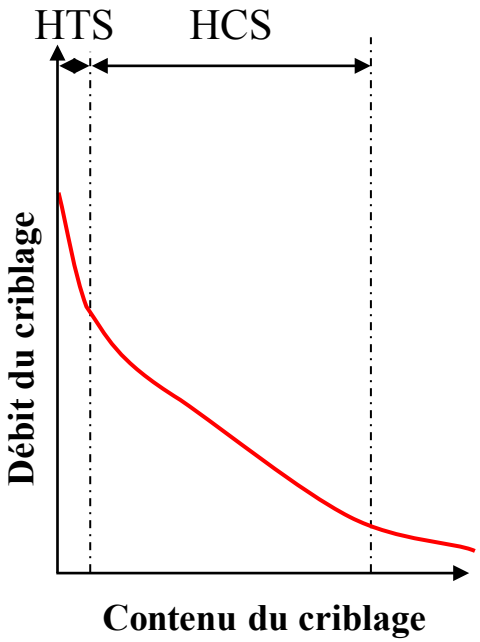
Durant l'évolution, les végétaux se sont adaptés à leurs niches écologiques et ont dû livrer un combat sans fin contre les herbivores, entre autres les insectes. Ce processus de sélection de molécules biologiquement actives à partir de métabolites secondaires issues de mutations des gènes des voies de synthèse de ces composés a fait des plantes un réservoir de molécules pharmacologiques riche d'au moins 200 000 composés (**Fig**, **50c**). C'est pour cette raison que nous avons considéré ici les extraits de plantes comme étant une collection particulièrement bien adaptée à notre capacité de criblage. Depuis l'homme de Neandertal, nous n'avons pas cessé d'explorer empiriquement avant d'étudier les plantes pour leur pouvoir thérapeutique, 80% de la population mondiale utilise encore aujourd'hui les plantes comme médicaments. Les connaissances acquises par les ethnologues sur les remèdes traditionnels de diverses sociétés de par le monde ont donné naissance à l'ethnopharmacologie. Cette science a pour objectif de répertorier les plantes utilisées en médecine traditionnelle dans le but d'en isoler les molécules actives (Sasidharan *et al.*, 2011). Les plantes utilisées dans les remèdes ancestraux contiennent différentes catégories de métabolites secondaires tels que des alcaloïdes, des terpènes, des hétérosides et des flavonoïdes qui ont le potentiel d'interagir avec les protéines de notre organisme et de modifier leur activité (Koehn and Carter, 2005).

III.2 MÉTHODES DE CRIBLAGES

III.2.1 COMPARAISON DES DEUX MÉTHODES

Le criblage d'une banque de composés chimiques, qu'il s'agisse de molécules synthétisées ou de composés naturels, est un procédé qui a séduit l'industrie pharmaceutique qui en a donc fait un métier. II existe deux types de criblages, le criblage à haut débit « high throughput screening » (HTS) et le criblage à haut contenu « high content screening » (HCS). La deuxième partie du XXème siècle a été marquée par la révolution des connaissances en biologie dont les découvertes de nombreuses cibles thérapeutiques, des récepteurs de surface, des canaux ioniques, des transporteurs, des protéines kinases et phosphatases, et des facteurs de transcription. Le séquençage complet du génome humain, achevé en 2001, a permis d'enrichir ce catalogue par le développement de la bioinformatique (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Parallèlement à ces recherches, les progrès accomplis en chimie combinatoire et chimie de synthèse ont permis l'obtention de vastes collections de petites molécules possédant une grande diversité. La robotisation des méthodes de criblage a conduit

a.



b.

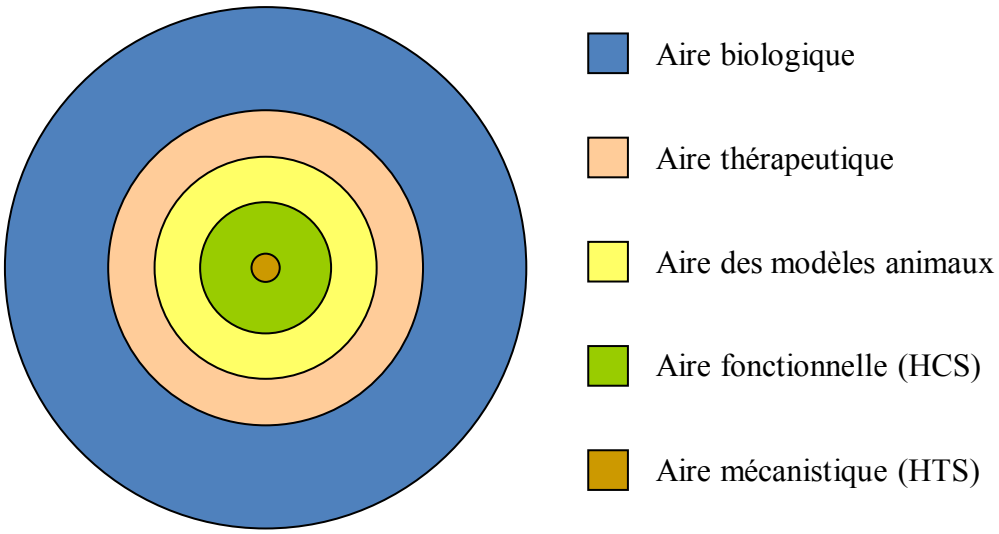


Figure 51: Les caractéristiques du criblage haut contenu (HCS) et du criblage haut débit (HTS). **a.** Une courbe théorique montrant les domaines respectifs du HTS focalisé sur le débit et le HCS qui privilégie le contenu biologique. **b**. Les différentes aires représentées sous forme d'une cible avec au centre l'aire mécanistique du HTS à l'intérieur de l'aire fonctionnelle du HCS. Adapté de Sams-Dodd F. (2006). *Drug Discov Today* 11, 465-72.

au criblage à haut débit (HTS). Ce type de criblage permet de tester plus de 250 000 molécules pures par jour à l'aide de plaques contenant chacune 1 536 puits (2 à 5 µl). Le HTS repose sur un essai simple sur une cible moléculaire bien identifiée permettant de cribler un nombre considérable de molécules pures (Cragg and Newman, 2013a). Cependant, les criblages à haut débit se sont révélés incapables d'accélérer la découverte de nouveaux médicaments, car les molécules identifiées en nombre important du fait du débit avaient souvent tendance à ne plus montrer d'activité dans des tests plus complexes comme les essais sur cultures cellulaires.

III.2.2 AVANTAGE DU CRIBLAGE A HAUT CONTENU DANS L'ISOLATION D'UN FACTEUR TROPHIQUE

Ces considérations ont conduit au développement du criblage à haut contenu (HCS) basé sur un essai biologique se rapprochant des conditions physiologiques, le contenu, au détriment du débit (Mishra and Tiwari, 2011; Sams-Dodd, 2006) (**Fig**. **51a**). En effet, considérant les possibles aires biologiques réparties concentriquement dans une cible, l'aire biologique globale se trouve à l'extérieur englobant successivement l'aire thérapeutique, celle concernant les modèles animaux, l'aire fonctionnelle puis l'aire mécanistique (**Fig**. **51b**). Une molécule identifiée par criblage haut contenu, c'est-à-dire par un essai fonctionnel, a une probabilité plus importante de rejoindre l'aire thérapeutique, qu'une autre molécule identifiée par criblage haut débit utilisant un essai mécanistique, puisque cette dernière en est plus éloignée. Ceci s'explique par le fait que l'essai mécanistique est souvent très réducteur et s'éloigne de ce fait des conditions physiologiques. Dans notre cas, l'essai de survie des cellules d'une culture enrichie en cônes préparée à partir de rétines d'embryons de poulet est suffisamment proche des conditions pathologiques chez l'homme pour que les molécules identifiées par HCS, comme RdCVF, puissent rejoindre l'aire des modèles animaux comme nous l'avons démontré chez la souris *rd1* et le rat transgénique P23H (Leveillard and Sahel, 2010). Malgré la réduction de la capacité de criblage, les molécules identifiées par criblage HCS sur cultures primaires enrichies en cônes possèdent un fort potentiel pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire (Leveillard *et al.*, 2004a).

III.3 PREUVE DE CONCEPT : DEUX PLANTES MÉDICINALES À ACTIVITÉ PROTECTRICE DES CÔNES

Les considérations théoriques précédentes ont aussi leurs limitations. Les travaux réalisés précédemment avec un modèle animal de la pathologie, la souris *rd1*, avaient permis de faire l'hypothèse de l'existence d'une protéine exprimée par les bâtonnets, capable de protéger les cônes (Fintz *et al.*, 2003; Mohand-Said *et al.*, 1998). Nous avons donc initié ce projet en évaluant la possibilité que deux plantes médicinales, *Ruta graveolens* et *Lycium barbarum*, utilisées jadis en médecine traditionnelle pour les affections oculaires, pouvaient contenir des métabolites secondaires protégeant les cônes dans les cultures enrichies préparées à partir de rétines d'embryons de poulet.

Ruta graveolens est une Rutacée méditerranéenne qui figure sous le nom de *pêganon* dans le corpus hippocratique. Elle était originellement prescrite en gynécologie et pour combattre les affections pulmonaires (Pollio *et al.*, 2008). Plus tard, dans plusieurs pays méditerranéens, des *Ruta spp*, c'est-à-dire plusieurs espèces de ce genre, ont été administrées

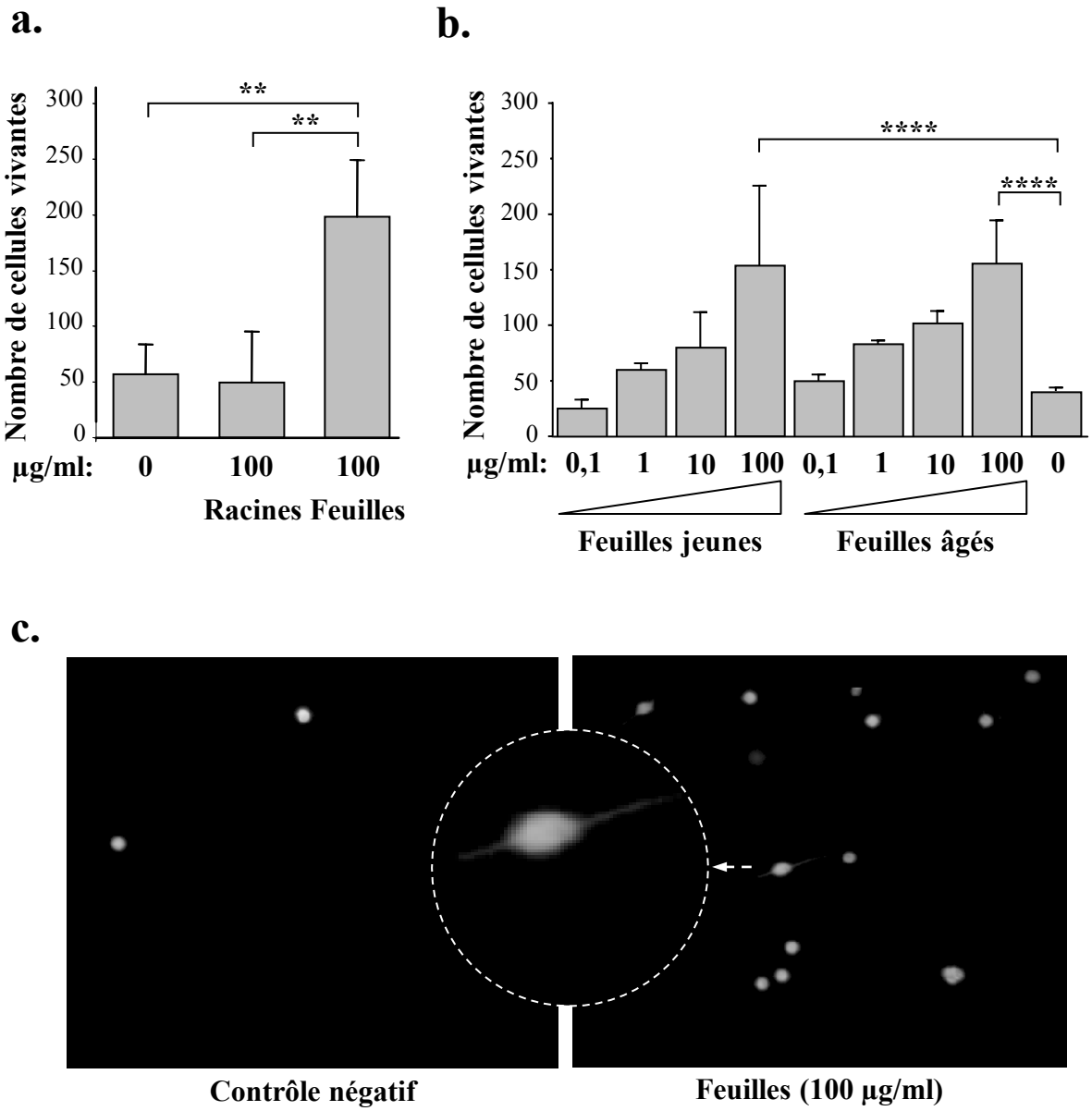


Figure 52. Neuroprotection des cônes des extraits de feuilles de *Ruta graveolens.* **a.** Effet protecteur d'un extrait méthanol de feuilles de *Ruta graveolens* sur les cônes en culture. **b.** Effet dose d'un extrait de feuilles jeunes et âgées de *Ruta graveolens*. **c**. Morphologie des cellules en présence de l'extrait de feuilles de *Ruta graveolens* (à droite) par rapport à la morphologie des cellules non traitées (0 en **a** et **b**, à gauche). L'agrandissement d'un cône au centre permet d'apprécier sa morphologie fusiforme avec deux prolongements neuritiques de part et d'autre du corps cellulaire.

de manière prédominante pour traiter les problèmes de vision. Les feuilles étaient préparées à partir de plantes fraîches ou bien administrées après décoction dans du vin ou du miel. On dit même que Michel-Ange en fit usage pour augmenter son acuité visuelle lorsqu'il peignit les fresques de la chapelle Sixtine au Vatican. Les extraits de *Ruta graveolens* nous ont été fournis généreusement par Frédéric Bourgaud de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA) de Nancy.

Lycium barbarum, une plante de famille des Solanacées, est utilisée depuis plus de 2300 ans en médecine traditionnelle chinoise pour le traitement de la vision (Chan *et al.*, 2007). Ce petit arbuste qui pousse dans les régions semi-arides produit de nombreuses petites baies brillantes de couleur rouge-orange d'aspect fuselé et allongé. Le fruit du *Lycium barbarum*, appelé aujourd'hui *Fructus barbarum* ou baie de goji, était utilisé pour traiter le diabète, le cancer, l'infertilité ainsi que pour promouvoir une homéostasie énergétique. En Chine, il est d'usage de consommer ces fruits sous forme de jus ou de vin de *Lycium barbarum*. Dans les pays occidentaux, il est consommé aujourd'hui pour ses vertus antioxydantes. Les fruits nous ont été fournis généreusement par Philippe Bernard de la société Greenpharma à Orléans.

III.3.1 RUTA GRAVEOLENS

Deux extraits, l'un des racines et l'autre des parties aériennes (les feuilles) de *Ruta graveolens*, ont été préparés dans du méthanol à partir de plantes matures (âgées) et de jeunes pousses. Ces extraits secs ont été repris dans de l'eau stérile à 10 mg/ml et testés à 100 µg/ml sur les cultures primaires enrichies à plus de 70% en cônes. Ces cultures ont été mises en présence des extraits et la viabilité cellulaire a été mesurée en comptant le nombre de cellules vivantes [voir matériels et méthodes (M&M), chapitre 4]. Nous avons observé que les feuilles âgées de cette plante augmentent la viabilité des cônes de manière significative, allant jusqu'à des augmentations de 350% (**Fig**. **52a**). L'effet de survie obtenu avec les extraits des feuilles jeunes et âgées est dépendant de la concentration de l'extrait entre 1 et 100 µg/ml (**Fig**. **52b**). Il ne semble donc pas que la synthèse de la ou les molécule(s) active(s) dépende du stade de maturation de la plante. Nous avons examiné la morphologie des cellules vivantes marquées à la calcéine 7 jours après leur mise en culture en présence de 100 µg/ml d'extraits de feuilles âgées, et comparé avec la morphologie du contrôle négatif. En présence d'extrait de *Ruta graveolens*, les cônes sont parfaitement identifiables par leur morphologie en fuseau avec deux prolongements neuritiques de part et d'autre du corps cellulaire (**Fig. 52c**). Les cônes de poulet ont des caractéristiques morphologiques bien identifiables, dont la présence d'une gouttelette lipidique discernable au centre de la cellule. La morphologie ronde, non différenciée, retrouvée dans le contrôle négatif, correspond à celle d'une cellule en souffrance.

Il existe en ethnopharmacologie plusieurs espèces du genre *Ruta* décrites comme base de remèdes traditionnels: *Ruta graveolens,* mais aussi *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis* et *Ruta corsica*. Toutes ces espèces sont des arbustes méditerranéens, avec des feuilles vertes bleutées émettant une odeur puissante et d'un goût amer (Pollio *et al.*, 2008) (**Fig**. **53a**). Il est donc concevable que l'une de ces autres espèces puisse constituer une source plus abondante de métabolites secondaires exerçant un effet trophique sur les cônes. Nous avons donc comparé l'effet protecteur d'extraits de feuilles de deux autres espèces, *Ruta chalepensis* et

Ruta montana, à celui de *Ruta graveolens*. Ces extraits ont été testés à 1, 10 et 100 µg/ml sur les cultures enrichies en cônes (**Fig**. **53b**). La concentration optimale pour obtenir l'effet protecteur est de 100 µg/ml pour chacun des extraits, *Ruta montana* augmente la survie des cônes de 300%, comparé à 240% pour *Ruta chalepensis* et 200% pour *Ruta graveolens*. Ces résultats semblent indiquer que *Ruta montana* est enrichie en métabolites secondaires actifs sur les cônes et serait donc une source adéquate pour un processus de purification et d'identification des ces métabolites. *Ruta montana* est connue pour contenir au moins six alcaloïdes distincts, dont la montanine (Touati *et al.*, 2000).

Puisque que l'extrait méthanolique de *Ruta montana* présente l'activité spécifique la plus élevée, nous avons testé cet extrait sur les cônes d'un modèle de rétinopathie pigmentaire, la souris *rd1*. Il s'agit d'un modèle récessif de la pathologie qui résulte d'une mutation dans le gène *Pde6b* codant pour la sous-unité β de la phosphodiestérase des bâtonnets (Bowes *et al.*, 1989). Le déficit en activité phosphodiestérase provoque une augmentation du contenu en cGMP des bâtonnets qui meurent par apoptose (Chang *et al.*, 1993). La phototransduction des cônes repose sur une autre sous-unité codée par le gène *Pde6c* et ceux-ci ne sont donc pas directement affectés par l'allèle *rd1*. Néanmoins, après la perte des bâtonnets, les cônes dégénèrent progressivement par un phénomène qui s'accorde avec une perte de support trophique (Punzo *et al.*, 2009). L'équipe a démontré que cette activité trophique provenait des bâtonnets par utilisation de cultures d'explants de rétine *rd1* (Mohand-Said *et al.*, 1998). C'est ce même modèle que nous avons utilisé pour tester l'effet de l'extrait méthanolique de *Ruta montana*. Les rétines neurales, c'est-à-dire débarrassées de l'épithélium pigmenté rétinien, ont été isolées à partir de souris *rd1* (C3H/He@N) âgées de 35 jours. Comme le démontre l'analyse du transcriptome de la rétine *rd1*, il n'y a à cet âge plus aucune expression du marqueur des bâtonnets, la rhodopsine (*Rho*), puisque ceux-ci ont dégénéré (**Fig**. **54a**). Ces résultats permettent de se placer dans des conditions où le facteur RdCVF exprimé par les bâtonnets n'exerce aucun effet trophique qui pourrait masquer les effets de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* (Leveillard *et al.*, 2004b). Les rétines ont été disséquées et mises en cultures sous forme d'explants rétiniens (M&M, chapitre 5) en présence ou absence d'un extrait méthanolique à la concentration de 100 µg/ml. Après 7 jours d'incubation, les cônes ont été marqués à l'aide d'agglutine de cacahuète (*Arachis hypogaea*) ou « peanut agglutinin » (PNA) couplée chimiquement à un fluorochrome (Blanks and Johnson, 1983). Celle-ci se lie spécifiquement à la matrice extracellulaire entourant le corps cellulaire du cône. La densité des cônes a été mesurée à l'aide de la procédure e-conome (Clérin *et al.*, 2011)(**Fig**. **54b**). Durant sept jours, les cônes dégénèrent *ex vivo* et présentent une densité de 1 994 cônes/mm^2 en l'absence d'extrait (**Fig**. **54c**). En revanche, leur densité est de 2 541 cônes/mm^2 en présence de l'extrait méthanolique de *Ruta montana*, soit une augmentation de 27%. Ceci montre clairement que tout comme pour le facteur RdCVF qui a été identifié par criblage haut contenu sur le modèle de culture enrichie en cônes, les métabolites secondaires extraits de *Ruta montana* sont biologiquement actifs sur les cônes *in vitro* et sont capables de protéger les cônes *ex vivo* dans un modèle de la pathologie ciblée (Leveillard *et al.*, 2014).

III.3.2 LYCIUM BARBARUM

a.



Ruta gravéolens *Ruta chalépensis* *Ruta montana*

b.

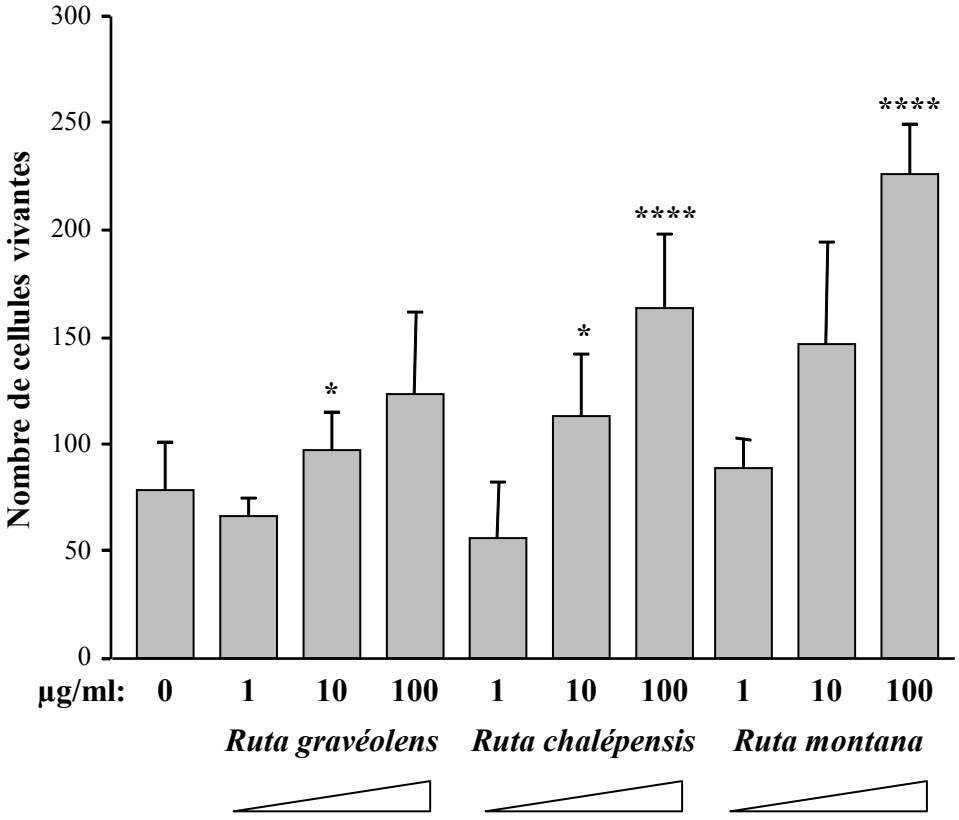
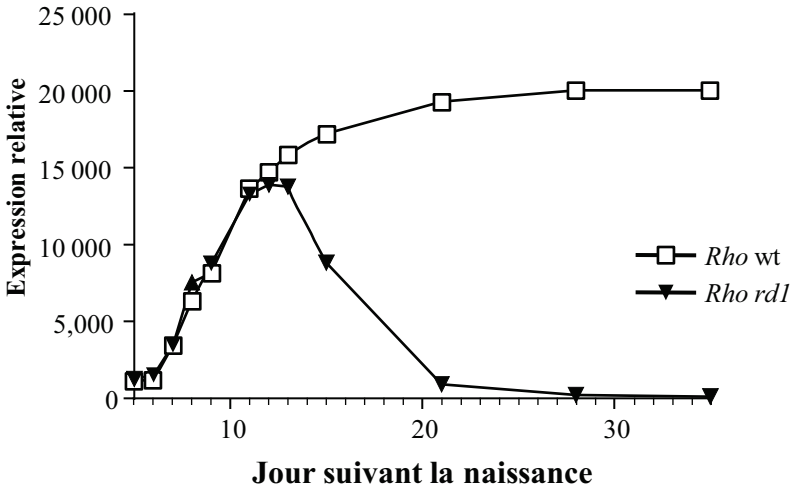
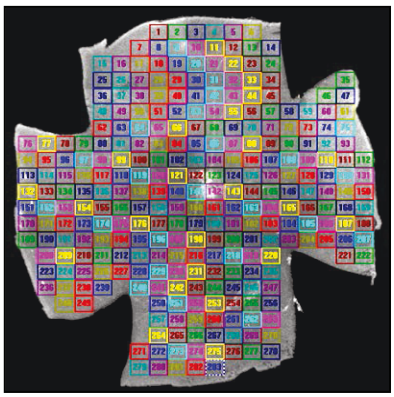


Figure 53. Comparaison de l'effet trophique de trois différentes espèces de *Ruta*. a. Les trois espèces du genre *Ruta* dans leur environnement naturel. **b.** Des extraits méthanoliques de feuilles de *Ruta graveolens, Ruta chalepensis* et *Ruta montana* ont été testés en quadruplés sur des cultures enrichies en cônes ensemencées à 2 x 10^5 cellules/cm^2. Pour le contrôle négatif (0), les cellules ont été incubées avec du milieu de culture. Les astérisques désignent la significativité statistique pour chaque condition en comparant avec 0.

a.



b.



c.

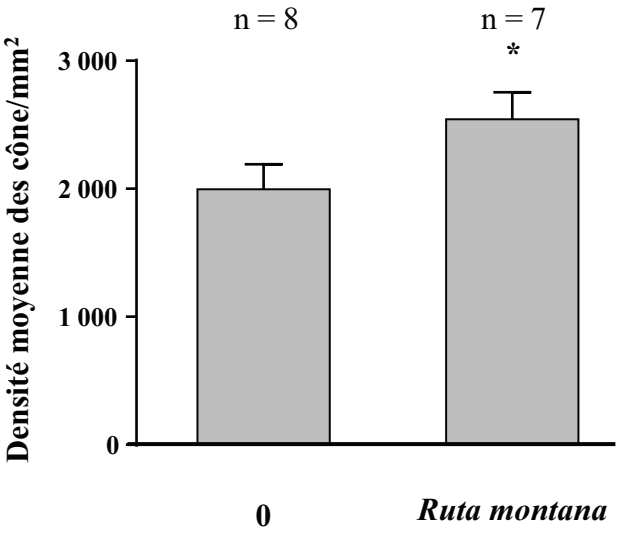


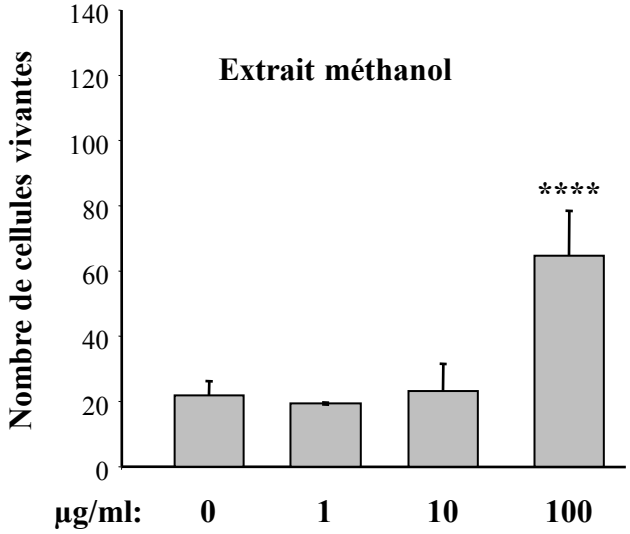
Figure 54: Effet trophique de la plante *Ruta montana* sur les cônes d'un modèle animal de rétinopathie pigmentaire, la souris *rd1*. **a.** Expression temporelle du gène de la rhodopsin (*Rho*, sonde Affymetrix 1425172_at) dans la rétine de la souris normale (wt) et celle portant une mutation récessive sur le gène *Pde6b* (*rd1*). Données provenant de KBaSS (http://kbass.institut-vision.org/KBaSS/) **b.** Illustration des champs de comptage sur l'explant de rétine *rd1* d'après la méthode e-conome. **c.** Sept explants rétiniens *rd1* (C3H/He@N) provenant de souris de 35 jours ont été incubés 7 jours en présence d'un extrait méthanolique de *Ruta montana* à 100 µg/ml ou en présence de milieu de culture (0). La densité des cônes à été mesurée par la technique e-conome (2011). Le test statistique appliqué est un t-test non apparié avec correction de Welch. La différence est significative avec une valeur de $p < 0,05$.

Les fruits de *Lycium barbarum* sont dénommés *Fructus barbarum*. Deux extraits secs de *Fructus barbarum*, l'un méthanolique et le second préparé dans l'acétate d'éthyle, ont été repris dans de l'eau stérile puis testés sur les cultures enrichies en cônes à 1, 10 et 100 µg/ml. Une activité trophique a pu être mise en évidence pour les deux types d'extraits à 100 µg/ml, L'extrait méthanolique augmente la survie des cônes de 350% (**Fig**. **55a**), et l'extrait préparé en acétate d'éthyle de 500% (**Fig**. **55b**). L'effet de l'extrait en acétate d'éthyle de *Fructus barbarum* sur la morphologie des cônes a été examiné lors d'une seconde expérience au cours de laquelle l'effet protecteur a pu être détecté aux concentrations de 10 et 100 µg/ml (**Fig**. **56a**). La différence de la dose active observée entre ces deux tests (**Fig**. **56a** versus **Fig**. **55b)** n'est pas rare pour des essais réalisés sur 7 jours avec des cultures primaires de neurones. Il faut souligner que le nombre maximal des cellules vivantes lors du premier essai était de l'ordre de 100 cellules (**Fig**. **55b**), alors que cette même valeur atteint 300 cellules pour le deuxième essai (**Fig**. **56a**). Les conditions du second essai ont donc pu être plus favorables à la survie des cônes en présence de l'extrait à 10 µg/ml. Les cellules vivantes marquées par le fluorochrome calcéine présentent un aspect fusiforme avec des extensions neuritiques (**Fig**. **56b**). Là encore, cette morphologie suggère qu'il s'agisse principalement de cônes ayant préservé leur morphologie.

L'analyse des constituants de *Fructus barbarum* ou baies de goji par des techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse a été entreprise par Amagase *et coll*, (Amagase and Nance, 2011). Elle révèle que les constituants majeurs de ces baies sont des caroténoïdes, des carbohydrates, des β-sisteroles (des phytoestrogènes), des acides aminés et des vitamines. Une analyse HPLC approfondie des caroténoïdes souligne que l'un des métabolites secondaires majoritaires de ce fruit est la zéaxanthine (**Fig**. **28a**) avec 1 761 µg par gramme de baie, suivie de la lutéine avec 50 µg/g et de la β-cryptoxanthine avec 26 µg/g. La zéaxanthine et la lutéine sont responsables de la pigmentation maculaire. C'est son aspect en tâche jaune, *macula lutea* en latin, qui est à l'origine du terme anatomique de macula **(Fig**. **57a**). La pigmentation maculaire joue un rôle de protection contre les rayons ultraviolets et ses constituants, la zéaxanthine et la lutéine, qui sont également des antioxydants majeurs au niveau rétinien (Khachik *et al*., 1997). La quantification par dosage HPLC de ces deux caroténoïdes dans l'extrait acétate éthyle du F*ructus barbarum* a révélé un taux inférieur à 0,1 µg/ml pour chacun d'entre eux. Nous avons donc testé l'effet de la zéaxanthine et la lutéine sur les cultures enrichies en cônes à 0,1 et 1 µg/ml (**Fig**. **57b**). Ces deux constituants des baies de goji, seuls ou en combinaison, ne sont pas responsables de l'activité protectrice de l'extrait de *Fructus barbarum*. Le resvératrol, un stilbénoïde extrait de la vigne, n'a pas d'avantage d'effet. Lors de ce même essai, l'extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum* augmente la survie des cônes de 290%.

Nous avons donc initié le fractionnement de cet extrait par HPLC en phase inverse, en vue de purifier les métabolites secondaires actifs (M&M, chapitre 3). Les six fractions obtenues ont été testées sur les cultures primaires enrichies en cônes à 1 et 100 µg/ml. Aucune des fractions ne présente d' activité à effet de survie statistiquement significative lors de tests de Dunnett avec multiples comparaisons $\alpha = 0,05$ (**Fig**. **58**). La fraction F3 augmente la survie des cellules de 140% à la concentration de 100 µg/ml. Des essais supplémentaires ont donc été planifiés. Pour réaliser ces essais, il a été nécessaire de se procurer assez de matière première par un nouvel approvisionnement de baies de goji. Des lots de *Fructus*

a.



b.

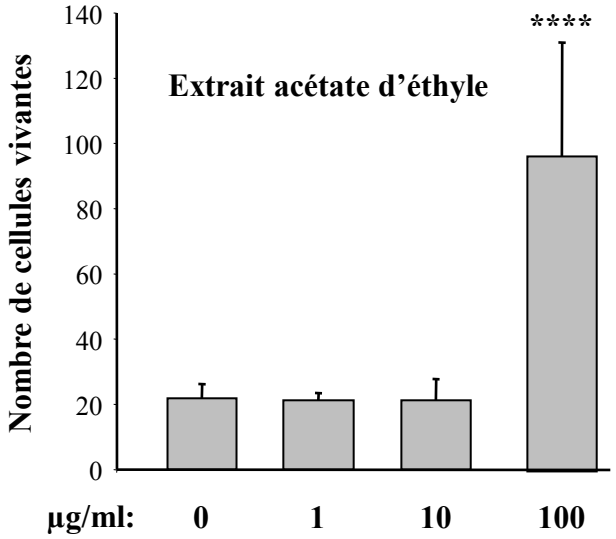


Figure 55. Identification d'une activité trophique envers les cônes dans les extraits de *Fructus barbarum*. a. Extrait méthanolique **b.** Extrait à l'acétate d'éthyle. Les astérisques désignent la significativité statistique pour chaque condition en comparant avec 0.

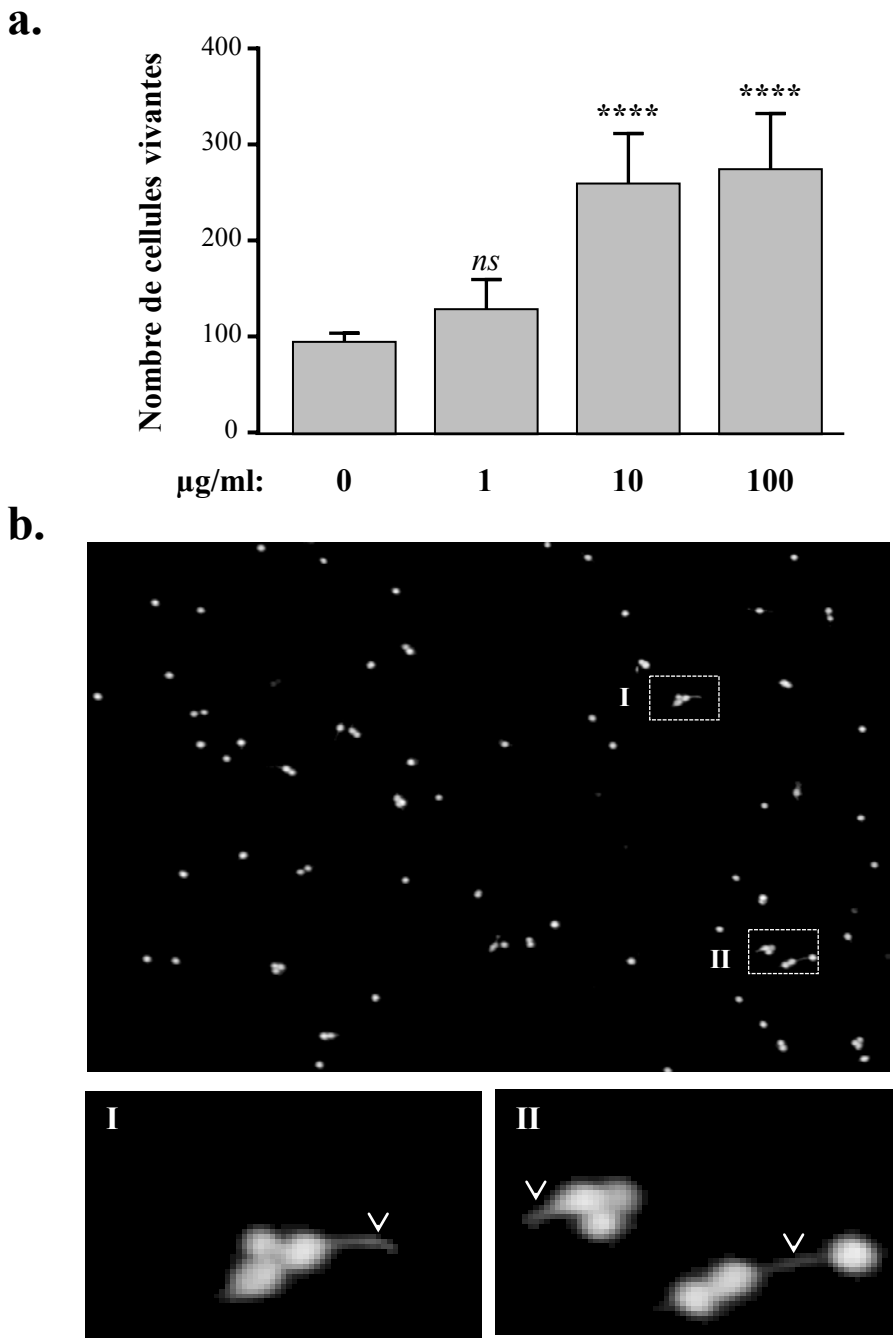
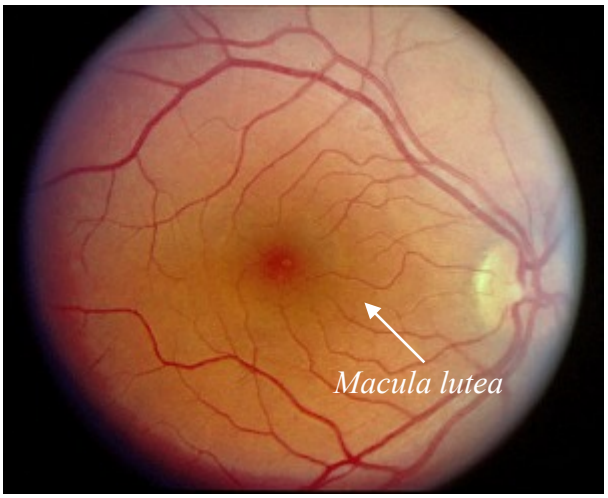


Figure 56: Mise en évidence de l'effet protecteur de l'extrait de *Fructus barbarum* préparé à partir d'acétate d'éthyle sur la morphologie des cônes. a. Effet protecteur sur les cultures enrichies en cônes. **b.** Effet de l'extrait (100 µg/ml) sur la morphologie des cellules vivantes marquées par la calcéine. Les agrandissements I et II présentent une vue des extensions neuritiques indiquées avec des pointes de flèches.

a.



b.

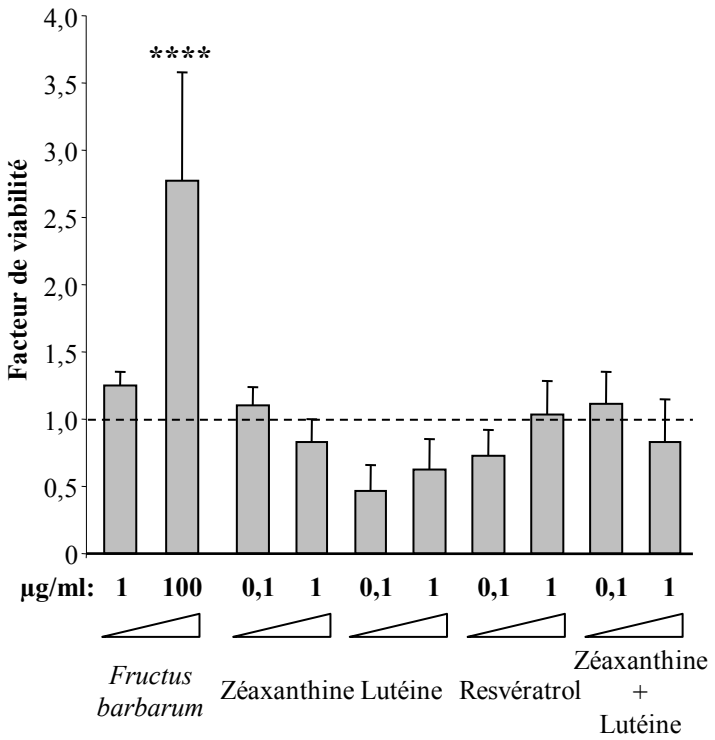


Figure 57: Absence d'effet de la zéaxanthine et de la lutéine sur la survie des cônes *in vitro*. a. La macula et sa coloration jaunâtre due à la pigmentation de la zéaxanthine et de la lutéine **b.** Absence d'effet protecteur des pigments maculaires, zéaxanthine et de la lutéine, seuls ou en combinaison, et du resvératrol, sur les cultures enrichies en cônes. Les données sont exprimées en facteur de survie, par rapport au nombre de cellules vivantes dans le contrôle négatif avec du milieu de culture.

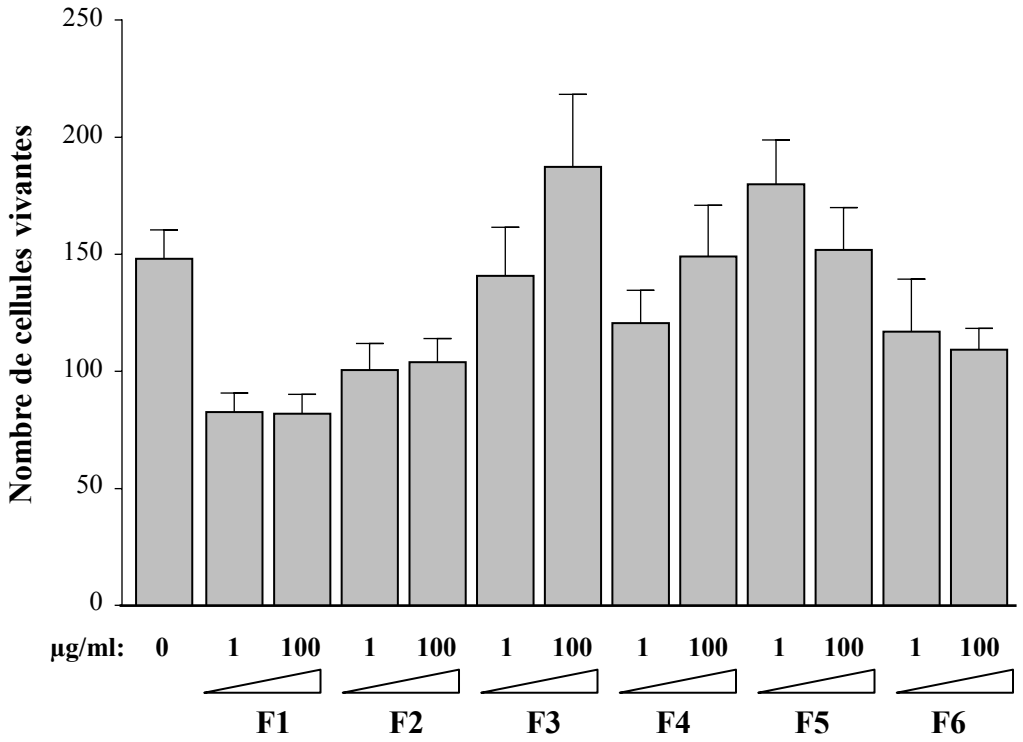


Figure 58: Fractionnement de l'extrait de *Fructus barbarum* préparé à l'acétate d'éthyle. Les six fractions obtenues par HPLC en phase inverse ont été testées sur les cultures enrichies en cônes.

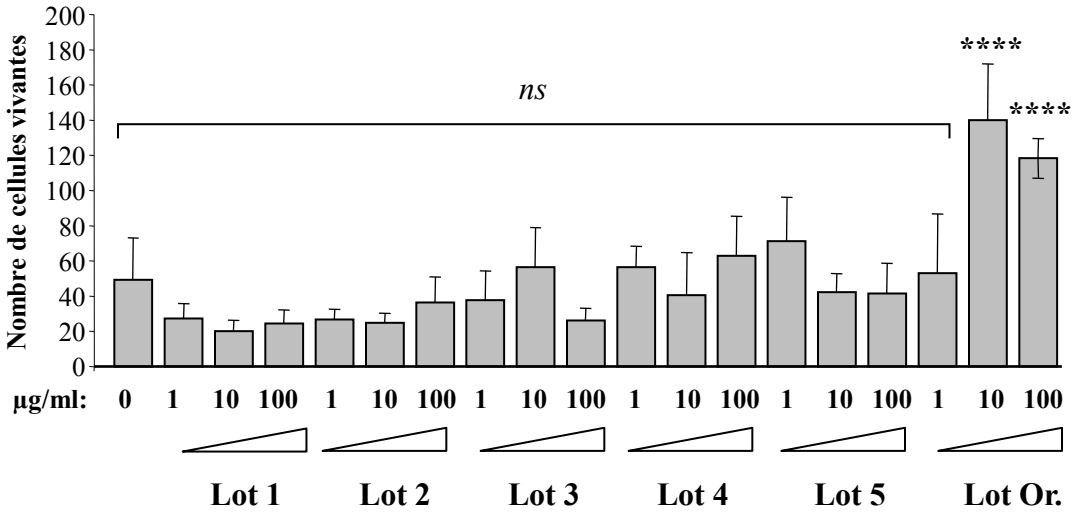


Figure 59: Absence d'activité biologique des extraits de *Fructus barbarum* préparés à l'acétate d'éthyle et issus de cinq nouveaux lots de diverses origines. Lot Or., extrait préparé avec de l'acétate d'éthyle à partir du lot original.

barbarum de cinq provenances différentes ont été extraits à l'acétate éthyle et testés dans les mêmes conditions que précédemment. Alors que l'extrait original augmente la survie des cônes de manière significative à 10 et 100 µg/ml, aucun des cinq nouveaux lots ne présente d'activité dans cet essai (**Fig**. **59**). Le problème rencontré ici est probablement lié au fait que la composition en métabolites secondaires de fruits varie selon leur mûrissement qui dépend bien sûr de la saison, de la géographie, de l'environnement, mais aussi du biotope. Ainsi le rapprochement de *Lycium barbarum*, d'une autre espèce proche, *Lycium ruthenicum* modifie la composition en anthocyanines de leurs fruits (Zeng et al., 2014). Des difficultés d'ordre génétique ont aussi été observées lors de la mise en culture de l'armoise annuelle (*Artemisia annua*), une plante originaire de Chine dont on extrait de ses feuilles l'artémisinine, un traitement efficace contre la malaria (Graham et al., 2010).

Bien entendu, cette déconvenue aurait dû nous conduire à nous reporter sur le fractionnement et la purification des métabolites actifs contenus dans l'extrait méthanolique de *Ruta montana*. C'est à ce stade du projet que nous avons eu l'opportunité de faire financer cette recherche par la fondation américaine « foundation fighting blindness » (FFB) en déposant un projet basé sur la preuve de principe ou « proof of concept » que nous avions établie. Ce dossier a été retenu à la condition explicite que l'intégralité de la propriété intellectuelle reste dans le domaine public. On peut comprendre que les donateurs de cette organisation de patients atteints de dégénérescences rétiniennes héréditaires refusent de financer des industriels. Comme nous avions signé des accords avec « Plant Advanced Technologies », dont Frédéric Bourgaud est fondateur, et Greenpharma, le financement de ce projet par FFB excluait de fait que nous puissions travailler avec ces fonds sur les espèces de *Ruta* et sur *Lycium barbarum*. Ayant fait la preuve que deux plantes médicinales contenaient des métabolites secondaires capables de protéger les cônes, aussi bien *in vitro* qu'*ex vivo* dans un modèle animal de rétinopathie pigmentaire, nous avons donc pris le pari que ce type de molécules actives pouvait être présent dans d'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle.

III.4 CRIBLAGE A HAUT CONTENU (HCS) D'UNE EXTRAITHEQUE DE 200 PLANTES

III.4.1 ÉTUDE DE LA BIODIVERSITE DE L'EXTRAITHEQUE

Pour identifier ces plantes, nous avons donc entrepris un criblage haut contenu (HCS) d'une extraithèque de plantes en utilisant les cultures primaires enrichies en cônes préparées à partir de la rétine d'embryons de poulet (M&M, chapitre 4). L'utilité du travail précédemment entrepris résidait aussi dans le fait que nous disposions de quantités suffisantes d'extrait d'acétate d'éthyle de *Fructus barbarum* pour l'utiliser comme contrôle positif au cours du HCS. Nous avons opté pour l'extraithèque « Greenpharma Extract Library » commercialisée par Greenpharma et donc libre de droit. Cette extraithèque comprend les extraits de 200 plantes sélectionnées pour leur usage en médecine traditionnelle et leur biodiversité (**Fig**. **60a, Table 3**). Compte tenu du nombre limité d'annotations qui nous ont été fournies (17 plantes, 8,5%), nous avons effectué des recherches dans deux bases de données spécialisées, « Royal botanic gardens » et celle développée par le Docteur Duke (Duke, 2014; Royal_botanic_gardens, 2014). La base du docteur Duke contient les 9

Famille	Genre	Espèce	Nom binomial
ACANTHACEAE	Justicia	spicigera	*Justicia spicigera*
	Lepidagathis	anobrya	*Lepidagathis anobrya*
ANACARDIACEAE	Amphipterygium	adstringens	*Amphipterygium adstringens*
	Buchanania	reticulata	*Buchanania reticulata*
	Lannea	microcarpa	*Lannea microcarpa*
		velutina	*Lannea velutina*
	Melanorrhoea	laccifera	*Melanorrhoea laccifera*
	Ozoroa	pulcherrima	*Ozoroa pulcherrima*
	Rhus	javanica	*Rhus javanica*
	Sclerocarya	birrea	*Sclerocarya birrea*
	Semecarpus	cochinchinensi	*Semecarpus cochinchinensis*
	Spondias	pinnata	*Spondias pinnata*
ANNONACEAE	Annona	senegalensis	*Annona senegalensis*
	Hexalobus	monopetalus	*Hexalobus monopetalus*
	Polyalthia	luensis	*Polyalthia luensis*
	Uvaria	chamae	*Uvaria chamae*
	Xylopia	vielana	*Xylopia vielana*
APOCYNACEAE	Landolphia	heudelotii	*Landolphia heudelotii*
	Leptadenia	hastata	*Leptadenia hastata*
	Strophanthus	sarmentosus	*Strophanthus sarmentosus*
ARALIACEAE	Cussonia	barteri	*Cussonia barteri*
ASCLEPIADACEAE	Calotropis	procera	*Calotropis procera*
ASTERACEAE	Brickellia	grandiflora	*Brickellia grandiflora*
	Eupatorium	odoratum	*Eupatorium odoratum*
	Mikania	guaco	*Mikania guaco*
	Tagetes	erecta	*Tagetes erecta*
	Tithonia	diversifolia	*Tithonia diversifolia*
BERBERIDACEAE	Mahonia	nepalensis	*Mahonia nepalensis*
BIGNONIACEAE	Markhamia	stipulata	*Markhamia stipulata*
	Stereospermum	kunthianum	*Stereospermum kunthianum*
BIXACEAE	Cochlospermum	planchonii	*Cochlospermum planchonii*
BOMBACACEAE	Bombax	costatum	*Bombax costatum*
BORAGINACEAE	Cordia	boissieri	*Cordia boissieri*
		myxa	*Cordia myxa*
BUDDLEJACEAE	Buddleja	asiatica	*Buddleja asiatica*
BURSERACEAE	Boswellia	dalzielii	*Boswellia dalzielii*
	Commiphora	africana	*Commiphora africana*
CAESALPINIACEAE	Berlinia	grandiflora	*Berlinia grandiflora*
	Burkea	africana	*Burkea africana*
	Detarium	microcarpum	*Detarium microcarpum*
	Isoberlinia	doka	*Isoberlinia doka*
	Piliostigma	reticulatum	*Piliostigma reticulatum*
	Swartzia	madagascarie	*Swartzia madagascariensis*
CAPPARACEAE	Cadaba	farinosa	*Cadaba farinosa*
	Capparis	corymbosa	*Capparis corymbosa*
		micrantha	*Capparis micrantha*
		pyrifolia	*Capparis pyrifolia*
	Cleome	viscosa	*Cleome viscosa*
CAPPARIDACEAE	Crateva	religiosa	*Crateva religiosa*
CAPRIFOLIACEAE	Sambucus	hookeri	*Sambucus hookeri*
CELASTRACEAE	Maytenus	senegalensis	*Maytenus senegalensis*
CHENOPODIACEAE	Chenopodium	ambrosoides	*Chenopodium ambrosoides*
CHRYSOBALANACEAE	Parinari	annamensis	*Parinari annamensis*
		curatellifolia	*Parinari curatellifolia*
CLUSIACEAE	Calophyllum	calaba	*Calophyllum calaba*
	Garcinia	benthami	*Garcinia benthami*
		gaudichaudii	*Garcinia gaudichaudii*
	Pentadesma	butyraceae	*Pentadesma butyraceae*
COMBRETACEAE	Anogeissus	leiocarpus	*Anogeissus leiocarpus*
	Combretum	glutinosum	*Combretum glutinosum*
	Guiera	senegalensis	*Guiera senegalensis*
	Pteleopsis	suberosa	*Pteleopsis suberosa*
	Terminalia	laxiflora	*Terminalia laxiflora*
CONNARACEAE	Connarus	cochinchinensi	*Connarus cochinchinensis*
CONVOLVULACEAE	Ipomoea	stans	*Ipomoea stans*

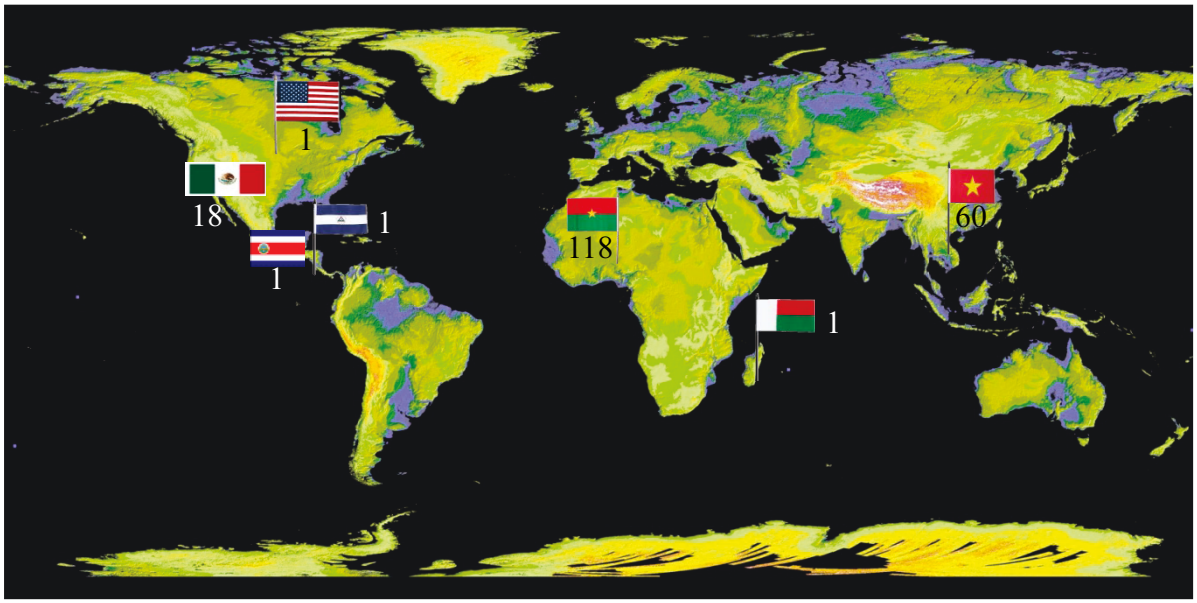
Famille	Genre	Espèce	Nom binomial
CYPERACEAE	Fimbristylis	littoralis	*Fimbristylis littoralis*
DILLENIACEAE	Dillenia	scabrella	*Dillenia scabrella*
DIPTEROCARPACEAE	Monotes	kerstingii	*Monotes kerstingii*
	Shorea	guiso	*Shorea guiso*
	Vatica	odorata	*Vatica odorata*
EBENACEAE	Diospyros	malabarica	*Diospyros malabarica*
		mespiliformis	*Diospyros mespiliformis*
ERYTHROXYLACEAE	Erythroxylon	cambodianum	*Erythroxylon cambodianum*
EUPHORBIACEAE	Antidesma	venosum	*Antidesma venosum*
	Aporusa	microstachya	*Aporusa microstachya*
		tetrapleura	*Aporusa tetrapleura*
	Bridelia	ferruginea	*Bridelia ferruginea*
	Euphorbia	hirta	*Euphorbia hirta*
	Mallotus	philippinensis	*Mallotus philippinensis*
	Sapium	discolor	*Sapium discolor*
	Securinega	virosa	*Securinega virosa*
	Uapaca	togoensis	*Uapaca togoensis*
FABACEAE	Acacia	macrostachya	*Acacia macrostachya*
	Albizia	chinensis	*Albizia chinensis*
	Alysicarpus	rugosus	*Alysicarpus rugosus*
	Archidendron	turgidum	*Archidendron turgidum*
	Bauhinia	rufescens	*Bauhinia rufescens*
	Cajanus	kerstingii	*Cajanus kerstingii*
	Cassia	sieberiana	*Cassia sieberiana*
	Entada	africana	*Entada africana*
	Erythrina	variegata	*Erythrina variegata*
	Eysenhardtia	adenostylis	*Eysenhardtia adenostylis*
	Indigofera	macrocalyx	*Indigofera macrocalyx*
	Lonchocarpus	cyanescens	*Lonchocarpus cyanescens*
	Milletia	diptera	*Milletia diptera*
	Pericopsis	laxiflora	*Pericopsis laxiflora*
	Prosopis	africana	*Prosopis africana*
	Pterocarpus	santalinoides	*Pterocarpus santalinoides*
	Sindora	siamensis	*Sindora siamensis*
	Tephrosia	mossiensis	*Tephrosia mossiensis*
	Xeroderris	stuhlmannii	*Xeroderris stuhlmannii*
	Zornia	glochidiata	*Zornia glochidiata*
FLACOURTIACEAE	Flacourtia	flavescens	*Flacourtia flavescens*
GESNERIACEAE	Kohleria	deppeana	*Kohleria deppeana*
GUTTIFERAE	Psorospermum	febrifugum	*Psorospermum febrifugum*
HIPPOCRATEACEAE	Hippocratea	excelsa	*Hippocratea excelsa*
HYMENOCARDIACEAE	Hymenocardia	acida	*Hymenocardia acida*
HYPERICACEAE	Cratoxylon	formosum	*Cratoxylon formosum*
ICACINACEAE	Gonocaryum	lobbianum	*Gonocaryum lobbianum*
KRAMERIACEAE	Krameria	secundifolia	*Krameria secundifolia*
LAMIACEAE	Hyptis	suaveolens	*Hyptis suaveolens*
LAURACEAE	Cassytha	filiformis	*Cassytha filiformis*
	Cinnamomum	curvifolium	*Cinnamomum curvifolium*
		iners	*Cinnamomum iners*
	Machilus	odoratissimus	*Machilus odoratissimus*
LECYTHIDACEAE	Careya	arborea	*Careya arborea*
LOGANIACEAE	Anthocleista	djalonensis	*Anthocleista djalonensis*
	Strychnos	spinosa	*Strychnos spinosa*
LORANTHACEAE	Tapinanthus	dodoneifolius	*Tapinanthus dodoneifolius*
MALVACEAE	Hibiscus	mesnyi	*Hibiscus mesnyi*
	Malva	rotundifolia	*Malva rotundifolia*
	Urena	lobata	*Urena lobata*
	Wissadula	amplissima	*Wissadula amplissima*
MELASTOMATACEAE	Dissotis	eliotii	*Dissotis eliotii*
	Memecylon	edule	*Memecylon edule*
MELIACEAE	Khaya	senegalensis	*Khaya senegalensis*
	Pseudocedrela	kotschyi	*Pseudocedrela kotschyi*
	Trichilia	emetica	*Trichilia emetica*
MORACEAE	Ficus	glumosa	*Ficus glumosa*
MYRISTICACEAE	Knema	globularia	*Knema globularia*
MYRTACEAE	Syzygium	guineense	*Syzygium guineense*

Famille	Genre	Espèce	Nom binomial
NAUCLEACEAE	Mitragyna	inermis	*Mitragyna inermis*
	Nauclea	latifolia	*Nauclea latifolia*
		officinalis	*Nauclea officinalis*
NYCTAGINACEAE	Boerhavia	repens	*Boerhavia repens*
OCHNACEAE	Lophira	lanceolata	*Lophira lanceolata*
OLACACEAE	Ximenia	americana	*Ximenia americana*
ONAGRACEAE	Ludwigia	octovalvis	*Ludwigia octovalvis*
OXALIDACEAE	Biophytum	petersianum	*Biophytum petersianum*
PAPILIONACEAE	Moghania	faginea	*Moghania faginea*
PEDALIACEAE	Ceratotheca	sesamoides	*Ceratotheca sesamoides*
POACEAE	Acroceras	zizanoides	*Acroceras zizanoides*
	Andropogon	pseudapricus	*Andropogon pseudapricus*
	Aristida	kerstingii	*Aristida kerstingii*
	Brachiaria	xantholeuca	*Brachiaria xantholeuca*
	Digitaria	horizontalis	*Digitaria horizontalis*
	Hackelochloa	granularis	*Hackelochloa granularis*
	Leersia	hexandra	*Leersia hexandra*
	Panicum	laetum	*Panicum laetum*
	Paspalum	scrobiculatum	*Paspalum scrobiculatum*
	Schoenfeldia	gracilis	*Schoenfeldia gracilis*
	Setaria	pallidifusca	*Setaria pallidifusca*
POLYGALACEAE	Securidaca	longepeduncul	*Securidaca longepedunculata*
RHAMNACEAE	Ziziphus	mauritiana	*Ziziphus mauritiana*
RHIZOPHORACEAE	Carallia	brachiata	*Carallia brachiata*
ROSACEAE	Maranthes	polyandra	*Maranthes polyandra*
RUBIACEAE	Canthium	dicoccum	*Canthium dicoccum*
		multiflorum	*Canthium multiflorum*
	Coutarea	latiflora	*Coutarea latiflora*
	Crossopteryx	febrifuga	*Crossopteryx febrifuga*
	Feretia	apodenthera	*Feretia apodenthera*
	Gardenia	sokotensis	*Gardenia sokotensis*
	Haldina	cordifolia	*Haldina cordifolia*
	Macrosphyra	longistyla	*Macrosphyra longistyla*
	Randia	dasycarpa	*Randia dasycarpa*
	Wendlandia	glabrata	*Wendlandia glabrata*

Famille	Genre	Espèce	Nom binomial
RUTACEAE	Casimiroa	edulis	*Casimiroa edulis*
	Evodia	lepta	*Evodia lepta*
	Ruta	graveolens	*Ruta graveolens*
	Talauma	mexicana	*Talauma mexicana*
	Zanthoxylum	zanthoxyloides	*Zanthoxylum zanthoxyloides*
SAPINDACEAE	Allophylus	africanus	*Allophylus africanus*
	Dimocarpus	longan	*Dimocarpus longan*
	Paullinia	pinnata	*Paullinia pinnata*
SAPOTACEAE	Donella	lanceolata	*Donella lanceolata*
	Malacantha	alnifolia	*Malacantha alnifolia*
	Manilkara	multinervis	*Manilkara multinervis*
	Pachystela	pobeguiniana	*Pachystela pobeguiniana*
	Vittelaria	paradoxa	*Vittelaria paradoxa*
SELAGINELLACEAE	Selaginella	lepidophylla	*Selaginella lepidophylla*
SIMAROUBACEAE	Brucea	javanica	*Brucea javanica*
	Castela	tortuosa	*Castela tortuosa*
	Quassia	amara	*Quassia amara*
		undulata	*Quassia undulata*
SMILACACEAE	Smilax	officinalis	*Smilax officinalis*
SOLANACEAE	Lycium	barbarum	*Lycium barbarum*
SONNERATIACEAE	Duabanga	sonneratioides	*Duabanga sonneratioides*
STERCULIACEAE	Cola	laurifolia	*Cola laurifolia*
	Guazuma	ulmifolia	*Guazuma ulmifolia*
	Helicteres	hirsuta	*Helicteres hirsuta*
	Sterculia	setigera	*Sterculia setigera*
	Waltheria	indica	*Waltheria indica*
THEACEAE	Eurya	turfosa	*Eurya turfosa*
TILIACEAE	Grewia	mollis	*Grewia mollis*
	Triumfetta	pentandra	*Triumfetta pentandra*
ULMACEAE	Celtis	integrifolia	*Celtis integrifolia*
VERBENACEAE	Lippia	chevalieri	*Lippia chevalieri*
	Vitex	glabrata	*Vitex glabrata*
VITACEAE	Cissus	quadrangularis	*Cissus quadrangularis*
XANTHOPHYLLACEAE	Xanthophyllum	annamense	*Xanthophyllum annamense*
ZYGOPHYLLACEAE	Balanites	aegyptiaca	*Balanites aegyptiaca*

Table 3: Inventaire des 200 plantes utilisées pour la préparation des 800 extraits. Le tableau se décompose en 4 colonnes, Famille, Genre, Espèce et Nom binomial (pour plus d'informations sur leur usage traditionnel, se référer à la table supplémentaire 1)

a.



b.

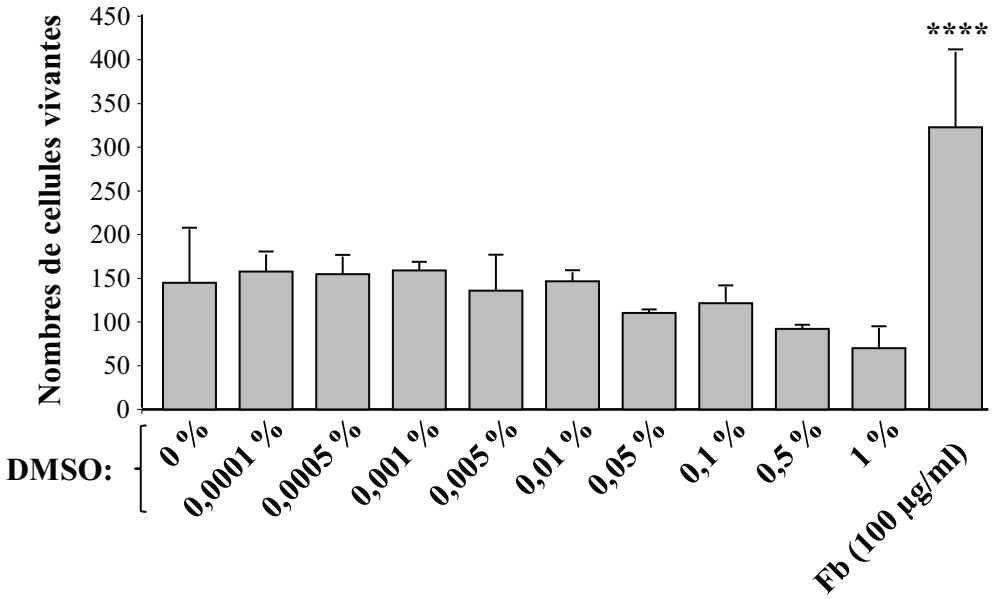


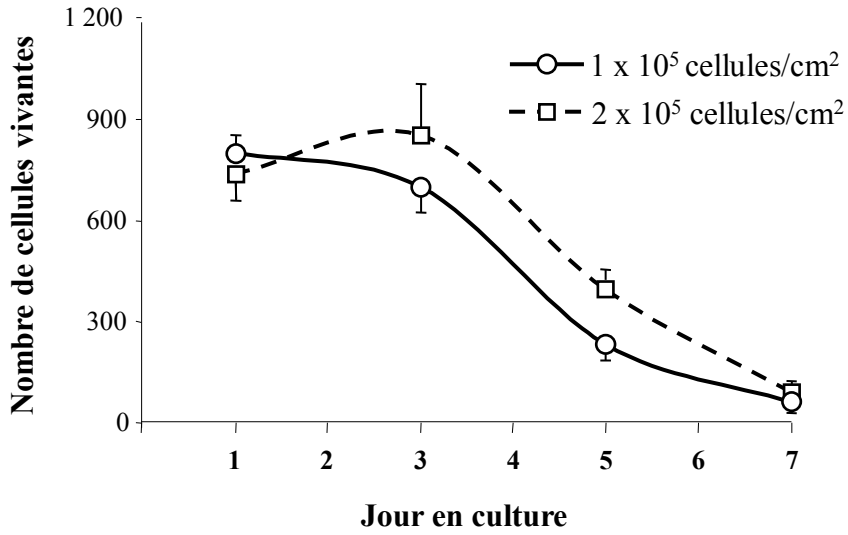
Figure 60: Caractéristiques de l'extraithèque utilisée lors du criblage haut contenu. a. Origines géographiques des plantes: Burkina Faso, 118; Vietnam, 60; Mexique, 18; Etats-Unis, 1; Madagascar, 1; Costa Rica, 1 et Nicaragua, 1. **b.** Effet dose du diméthylsulfoxyde (DMSO) sur la viabilité des cellules des cultures enrichies en cônes. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*.

annotations « ophthalmia » et 4 « eye » pour un total de 12 plantes. Nous avons aussi relevé que 18 plantes étaient annotées avec le terme poison et que le terme « evil eye », éloigné de nos préoccupations dans ce cadre apparaît deux fois. Nous avons aussi fait des recherches bibliographiques dans Pubmed. Nous n'avons trouvé aucune annotation pour 33 plantes (16,5%). Nous avons pu identifier 1 455 articles, dont 194 articles dans des journaux dont le nom comprend ethno. Ceux-ci concernent 85 plantes, soit 50% des plantes ayant des annotations, ce qui révèle clairement le caractère ethnopharmacologique de cette extraithèque. L'ensemble des données a permis de construire une base de données d'ethnopharmacologie, accessible depuis la base de données de connaissance KBaSS à l'Institut de la Vision (KBaSS, 2014). Nous avons remarqué qu'à l'exception de *Bauhinia rufescens* qui est spécifiquement indiquée pour traiter les affections oculaires, les plantes utilisées en médecine traditionnelle sont destinées à un spectre très large d'indications. Ainsi, *Ruta graveolens*, *Urena lobata*, *Euphorbia hirta* et *Paullinia pinnata* sont prescrites pour respectivement 58, 56, 54 et 51 indications. Ceci montre que le criblage d'une collection de plantes médicinales destinées aux seules affections oculaires est un objectif illusoire.

III.4.2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DU HCS ET DES CULTURES ENRICHIES EN CONES

Cette extraithèque est habituellement fournie sous forme de plaque de 96 puits contenant 2 mg d'extraits en solution dans 200 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO), soit une concentration de 10 mg/ml. Le DMSO ayant des effets toxiques sur les cultures enrichies en cônes lorsque sa teneur dépasse 0,01%, la concentration maximale à laquelle le criblage pouvait être réalisé dans ces conditions était de 100 µg/ml (**Fig**. **60b**). Nous avons choisi de nous procurer les extraits sous forme de poudres conditionnées dans des piluliers et de les mettre en solution dans l'eau stérile, nous écartant ainsi de cette valeur limite des 100 µg/ml pour plus de sécurité. Dans ces conditions, certains métabolites, du fait de leur faible solubilité dans l'eau ont été éliminés physiquement du criblage. Néanmoins, nous avons pris en considération que les molécules issues de ce programme pourraient être administrées chez l'homme par voie systémique ou bien plus probablement par voie topique sous forme d'un collyre. Dans ce cas, les molécules testées ont l'avantage d'être a minima partiellement solubles dans l'eau, une propriété essentielle à leur transfert en clinique (Hosoya *et al.*, 2011). Les organes des 200 plantes (feuilles, racines, écorces, graines ou fruits) ont été séchés, tamisés puis broyés, découpés ou écrasés (M&M, Chapitre 1). Chaque plante a été utilisée pour préparer quatre extraits en utilisant quatre solvants, le méthanol polyamide (A), l'acétate d'éthyle (AE), l'acétate d'éthyle appauvri (AEA) et le méthanol appauvri (MA), soit 800 extraits testés. Chaque extrait a été testé à deux concentrations, 10 et 100 µg/ml, soit 1 600 tests. Les cultures primaires enrichies en cônes sont réalisées sans sérum mais en présence d'un cocktail de suppléments, dans des conditions où ces neurones dégénèrent rapidement (Leveillard *et al.*, 2004a). En l'absence de stimulation, la plupart des cellules meurent sur une période de 7 jours (**Fig**. **61a**). Les cônes qui peuvent être identifiés grâce à des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la visinine (VISI), un marqueur des photorécepteurs chez le poulet, suivent la même tendance dans ces cultures (Fintz *et al.*, 2003) (**Fig**. **61b**). Notre expérience nous indique qu'il est nécessaire de procéder à deux densités d'ensemencement très légèrement distinctes, 1 x 10^5 et 2 x 10^5 cellules/cm^2 pour s'assurer d'avoir encore des cellules vivantes dans les 19 puits qui correspondent au contrôle

a.



b.

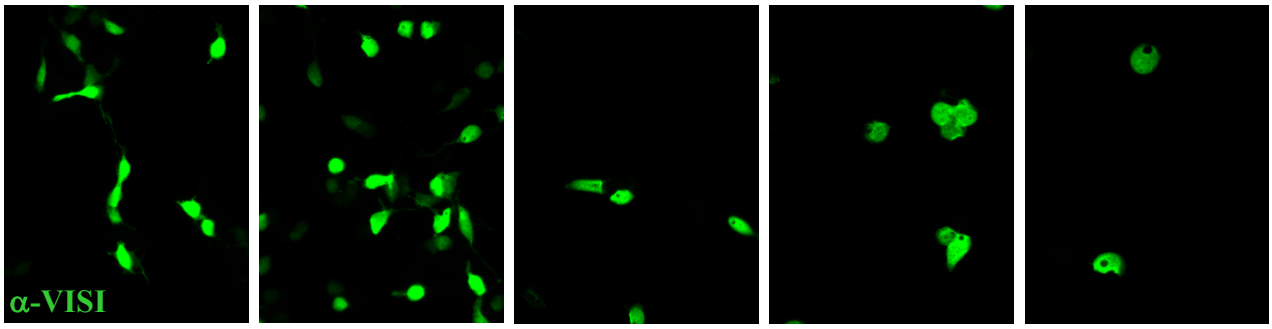


Figure 61: Caractéristiques des cultures enrichies en cônes préparées à partir de rétine d'embryons de poulet. a. Cinétique de viabilité cellulaire mesurée en l'absence d'agents protecteurs par la sonde calcéine **b.** Cinétique d'expression d'un marqueur des photorécepteurs chez le poulet, la visinine, réalisé par immunocytochimie (α-VISI).

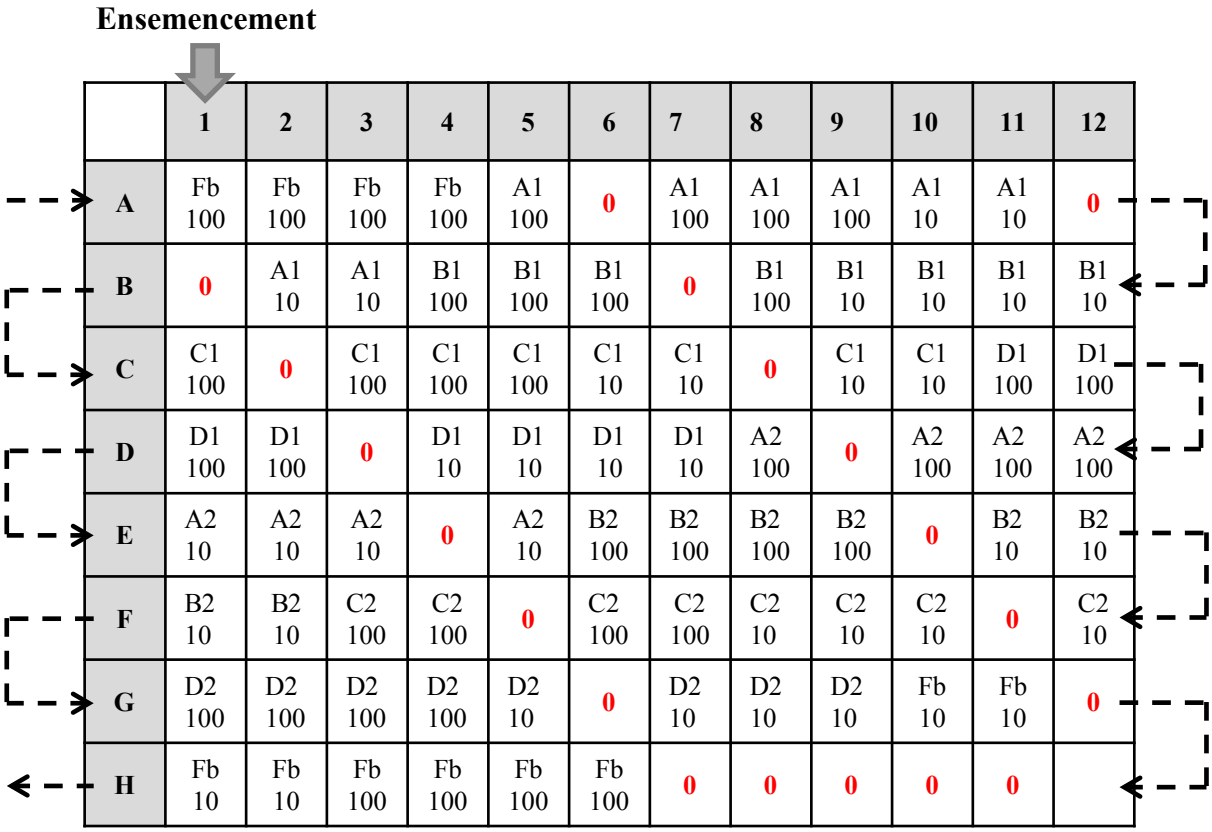


Figure 62: Plan des plaques 96 puits pour le criblage haut contenu. Les cellules sont ensemencées à l'aide d'une pipette à 8 canaux selon de rangées verticales A1-H1, A2-H2,… La lecture sur la plateforme motorisée se fait à l'horizontal selon les flèches en pointillé A1-A12 puis B12-B1,... La disposition des 19 puits contrôles négatifs (0, en rouge) minimise les artéfacts lors de l'ensemencement et la capture automatisée des images

négatif dans chaque plaque 96 puits lors du criblage. En effet, en l'absence de cellules vivantes dans les puits contrôles, aucun effet sur la viabilité ne peut être mesuré pour les 3 200 essais à réaliser. Comme chaque extrait est testé dans quatre puits indépendants pour permettre un traitement statistique, cela porte le total à 12 800 essais. Les deux plaques de 96 puits ensemencées quotidiennement aux deux densités cellulaires permettent de cribler les quatre extraits de deux plantes, ceci à un débit maximal de 8 plantes par semaine (**Fig**, **62**). Le criblage a donc nécessité 50 semaines de travail, 200 plaques de culture 96 puits et 700 œufs fertilisés. L'ensemble de ces cultures, ainsi que les essais biologiques lors des fractionnements, a été réalisé par Mme Géraldine Millet-Puel, ingénieur au sein de l'équipe (**Fig**. **50b**).

III.4.3 ANALYSE DES RÉSULTATS

III.4.3.1 CRITÈRES DE CLASSIFICATION DES PLANTES

Les résultats ont été analysés en tenant compte pour chaque plaque de culture le nombre de cellules vivantes en présence de chaque extrait dans les quatre puits testés et en le comparant au nombre de cellules vivantes dans les 19 puits représentant les contrôles négatifs. Compte tenu de la variabilité inhérente aux cultures primaires de neurones réalisées par dissection de la rétine, aux variations non maîtrisables de leur cinétique de dégénérescence, il n'a pas été possible d'établir une unité de survie qui soit applicable à l'ensemble des essais sans ambiguïté. Le facteur de viabilité, qui est l'expression la plus rationnelle des résultats est calculé en divisant la moyenne du nombre de cellules vivantes des quatre puits par la moyenne du nombre de cellules vivantes dans les 19 puits contrôles (**Fig**. **63**). La règle de classification, dépend du facteur de viabilité (FV) ou ratio de viabilité. Un extrait de plante ayant un facteur supérieur FV ≥ 2 (soit >200%) a été considéré comme positif. Cette valeur de référence correspond à l'effet trophique du facteur RdCVF sur ce modèle cellulaire (Chalmel *et al.*, 2007). Parmi les 200 plantes, 24 ont donc été retenues selon ce critère (**Table 4**). Les plantes *Piliostigma reticulatum* [FV maximum (max) = 1,75], *Uapaca togoensis* (FV max = 1,87) et *Archidendron turgidum* (FV max = 1,77) ne passent pas ce critère de viabilité mais ont été retenues sur la base de l'effet de l'extrait sur la morphologie cellulaire après examen des images acquises durant le criblage. Trois autres plantes *Quassia amara* (FV max = 1,96), *Sambucus hookeri* (FV max = 1,63) et *Helicteres hirsuta* (FV max = 1,67) ont été sélectionnées sur la base de la comparaison avec le facteur de viabilité obtenu pour le contrôle positif *Fructus barbarum* soit un total de 30 plantes sélectionnées (**Fig**. **64**). D'autres critères ont ensuite été appliqués pour prioritiser les plantes pour les essais de fractionnement. En premier lieu, la valeur de FV max conduit à l'ordre suivant : *Lophira lanceolata* (FV max = 9,97), *Casimiroa edulis* (FV max = 7,65), *Uvaria chamae* (FV max = 7,57) et *Vatica odorata* (FV max = 4,82). Nous avons aussi pris en compte le nombre d'essais conduisant à des FV max ≥ 2, ce qui conduit l'ordre suivant : *Casimiroa edulis* (12) puis *Wendlandia glabrata* et *Uvaria chamae* (6) et enfin *Psorospermum febrifugum*, *Acacia macrostachya*, *Hyptis suaveolens* et *Grewia mollis* (4). Nous avons aussi quantifié visuellement l'effet sur la morphologie car ce critère indique que les cellules survivantes sont bien des cônes. Ceci conduit à l'ordre suivant : *Annona senegalensis* et *Uapaca togoensis* (***), suivis de *Psorospermum febrifugum*, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, et *Carallia brachiata* (**). Enfin nous avons considéré l'enrichissement de

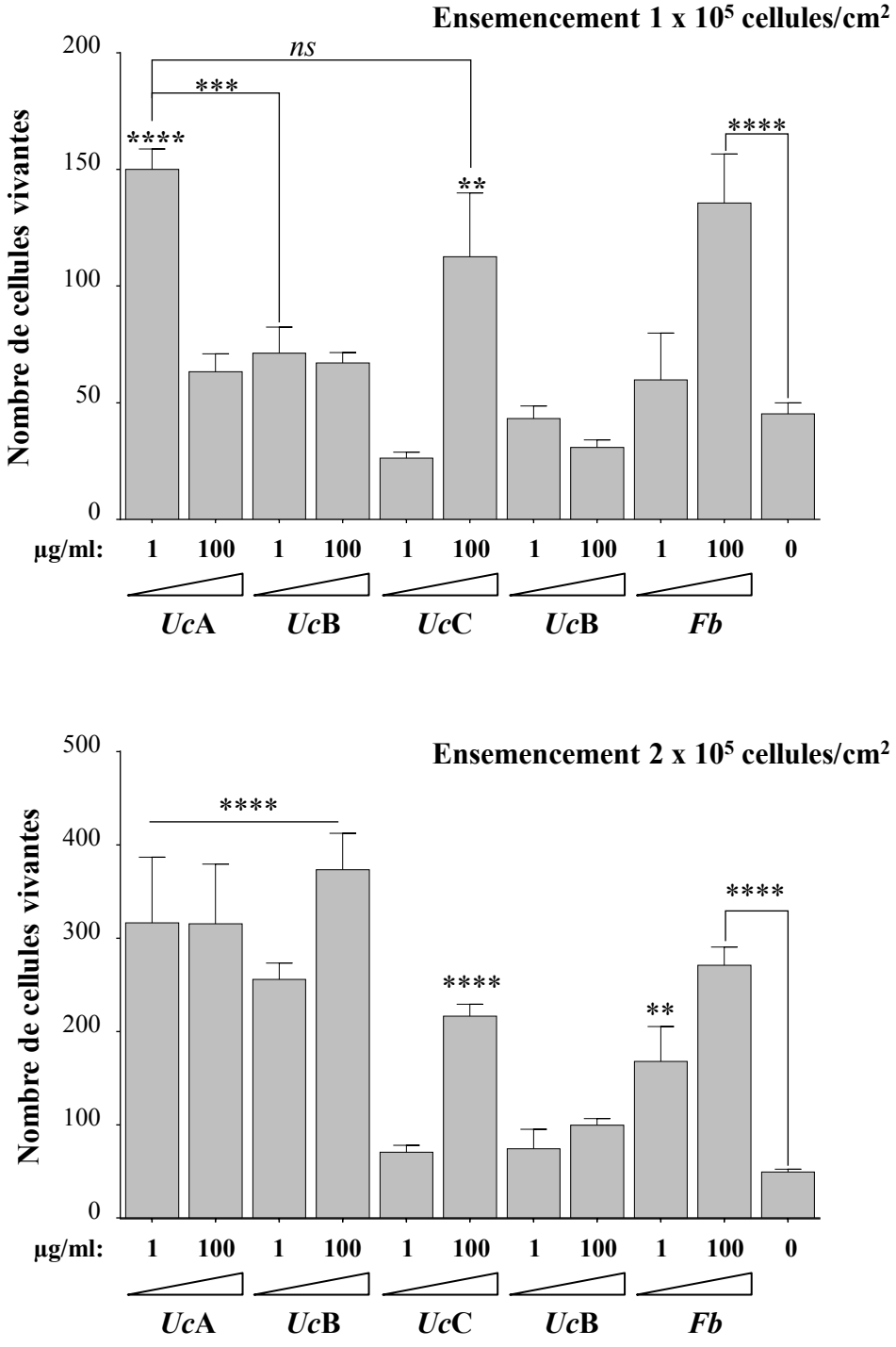


Figure 63:. **Paramètres d'analyse des résultats du criblage haut contenu.** Résultats obtenus avec les extraits d'*Uvaria chamae* (*Uc*) aux deux densités d'ensemencement, 1 x 10^5 cellules/cm^2 et 2 x 10^5 cellules/cm^2. A: méthanol polyamide, B: acétate d'éthyle, C: acétate d'éthyle appauvri, D: méthanol appauvri. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*.

Table 4: LES TRENTE PLANTES POSITIVES DU CRIBLAGE HAUT CONTENU. Les données sont exprimées en facteur de viabilité, le rapport de la moyenne du nombre de cellules vivantes sur la moyenne du nombre de cellules vivantes pour les seize puits contrôles avec uniquement du milieu de culture. Les solvants d'extractions utilisés sont A: méthanol polyamide, B: acétate d'éthyle, C: acétate d'éthyle appauvri, D: méthanol appauvri. Les valeurs avec un facteur de viabilité ≥ 2 sont en gras. Les astérisques représentent les critères morphologiques après examen des images des cellules marquées à la calcéine. La morphologie typique des cônes peut présenter des neurites courts*, moyens ** ou longs*.**

	Densité d'ensemencement	1 x 10^5 cellules/cm^2								2 x 10^5 cellules/ cm^2							
	[conc,] µg/ml	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100
	SOLVANT	A		B		C		D		A		B		C		D	
N°	PLANTE	FACTEUR DE VIABILITE															
1	*Canthium multiflorum*	1,10	0,90	1,10	0,90	1,40	0,70	**2,40**	0,80	1,00	0,70	1,05	0,80	1,00	0,90	1,50	0,90
2	*Piliostigma reticulatum* *	1,49	0,83	0,04	1,16	1,20	0,97	1,37	0,06	1,28	1,00	0,14	0,87	1,57	1,39	1,75	0,20
3	*Psorospermum fefrifugum* **	**2,19**	0,23	1,64	0,23	**2,31**	0,97	1,73	0,00	**2,10**	0,61	1,66	0,30	1,38	1,53	2,23	0,01
4	*Lophira lanceolata*	1,27	0,86	**2,13**	**4,17**	0,93	0,34	1,84	0,00	0,36	0,62	**9,97**	**3,55**	1,77	0,46	5,59	0,00
5	*Annona senegalensis* ***	0,79	0,86	0,39	1,64	0,80	1,36	1,23	0,20	1,25	1,56	0,73	**2,14**	1,07	1,42	0,74	0,87
6	*Acacia macrostachya* *	**2,06**	**2,06**	0,69	1,11	**2,08**	1,21	1,77	**2,20**	1,53	0,81	1,20	1,25	1,17	0,67	1,25	1,28
7	*Sterculia setigera* *	1,37	1,07	1,77	2,53	1,04	1,95	**3,16**	1,54	0,80	1,05	1,49	1,14	1,40	1,96	1,75	0,95
8	*Zanthoxylum zanthoxyloides* **	1,36	1,63	1,22	1,19	0,90	1,04	1,74	0,21	1,56	**2,53**	1,41	1,19	1,45	1,53	**3,05**	0,59
9	*Casimiroa edulis*	**3,71**	1,14	**2,45**	**3,50**	1,11	**4,26**	**2,28**	**2,55**	1,99	**3,76**	**7,38**	1,67	**7,00**	**7,65**	**3,01**	**3,89**
10	*Ipomoea stans* *	1,29	0,00	0,65	0,00	0,71	0,00	1,22	0,68	1,55	0,00	0,92	0,00	1,18	0,00	**2,29**	0,31
11	*Quassia amara*	1,10	0,96	1,19	1,25	1,01	1,35	1,79	1,96	1,60	1,19	1,02	1,34	0,97	1,63	1,71	1,97
12	*Sambucus Hookeri*	1,07	1,22	1,63	1,09	1,36	0,81	1,08	1,29	1,07	0,91	1,60	1,30	1,42	1,03	1,29	0,94
13	*Xylopia vielana*	1,22	0,28	**2,32**	1,74	0,88	1,20	**2,84**	0,24	1,60	0,03	1,72	1,36	1,15	0,99	**2,11**	0,38
14	*Wendlandia glabrata*	**2,58**	0,63	**2,00**	**3,65**	**2,37**	0,85	**3,81**	0,00	0,64	0,63	1,37	1,33	1,42	0,63	**2,14**	0,00
15	*Gonocaryum lobbianum*	1,26	0,04	2,00	0,46	1,60	0,16	**3,07**	0,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	*Carallia brachiata* **	1,38	0,77	**2,70**	1,38	1,33	1,62	1,66	0,00	0,87	0,67	1,63	1,04	1,34	1,08	1,32	0,00
17	*Uapaca togoensis* ***	1,15	0,95	1,18	1,17	1,52	1,87	1,20	0,00	1,23	0,90	1,18	1,24	1,52	1,33	1,00	0,00
18	*Erythroxylon cambodiamun**	1,62	1,10	0,77	**2,28**	1,41	**2,79**	1,57	0,00	0,88	0,58	0,95	0,98	1,21	1,80	1,01	0,00
19	*Archidendron turgidum* *	0,00	0,00	1,77	0,88	0,75	1,04	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	0,92	1,21	1,38	0,00	0,00
20	*Helicteres hirsuta*	1,67	0,18	1,21	1,60	1,07	1,81	1,51	0,27	1,37	0,48	1,48	1,16	1,03	1,86	1,36	0,66
21	*Walhteria indica*	0,55	0,40	0,89	1,29	0,52	0,49	1,95	1,44	0,86	1,36	1,75	1,89	1,36	1,36	**2,04**	2,88
22	*Hyptis suaveolens*	**2,32**	0,59	1,22	1,78	**3,22**	1,09	1,31	0,19	**2,50**	0,09	0,67	0,68	**2,88**	0,32	0,49	0,71
23	*Feretia apodenthera*	**2,11**	0,56	1,40	0,72	0,45	0,00	0,98	1,99	**2,40**	0,22	1,14	0,78	1,25	0,00	1,41	1,26
24	*Pterocarcus santalinoides* *	**2,33**	0,70	1,40	1,09	1,24	1,11	1,21	1,35	**2,33**	0,85	1,23	1,04	1,38	0,91	1,13	1,16
25	*Lippia Chevalieri*	**2,05**	0,26	1,16	1,41	0,93	1,28	1,05	0,09	**2,22**	0,33	1,53	1,30	1,18	1,36	1,05	0,45
26	*Uvaria chamae* *	**3,32**	1,40	1,58	1,48	0,58	2,49	0,96	0,68	**6,41**	**6,39**	**5,19**	**7,57**	1,43	**4,39**	1,50	**2,02**
27	*Grewia mollis*	**2,71**	1,44	0,85	1,70	1,27	1,16	**2,50**	0,82	**2,11**	**2,91**	1,22	1,26	1,43	1,07	1,34	0,93
28	*Vatica odorata*	1,99	1,13	1,95	1,06	1,66	0,00	1,32	0,50	4,82	1,59	**2,22**	0,99	1,79	0,00	**2,53**	1,81
29	*Albizia Chinensis*	**2,14**	1,23	1,13	1,77	1,06	1,49	1,26	1,32	1,88	1,20	0,95	1,49	1,31	1,37	1,31	1,08
30	*Garcinia gaudichaudii*	**2,36**	0,34	1,48	0,38	**2,20**	0,43	1,22	0,24	**2,13**	0,36	1,32	0,35	1,78	0,68	1,36	0,34

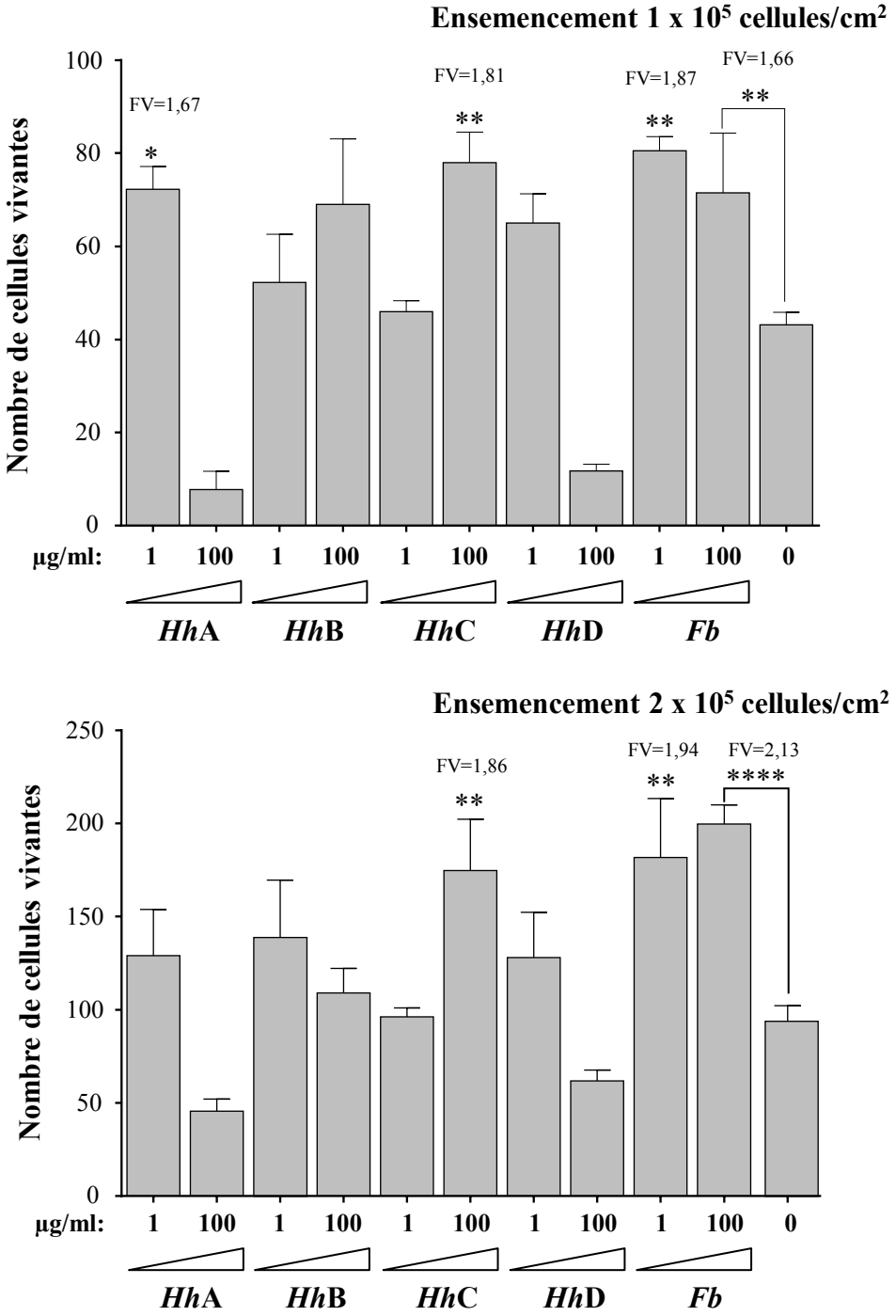


Figure 64:. **Activité des extraits d'*Helicteres hirsuta* (*Hh*).** Les tests ont été réalisés aux deux densités d'ensemencement, 1 x 10^5 cellules/cm^2 et 2 x 10^5 cellules/cm^2. A: méthanol polyamide, B: acétate d'éthyle, C: acétate d'éthyle appauvri, D: méthanol appauvri. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. Noter que la plante a été retenue bien que le facteur de viabilité (FV) maximal soit inférieur à 2. Elle a été retenue car dans cet essai le contrôle positif présente lui aussi un FV assez bas de 1,66 en haut et de 2,13 en bas.

l'activité dans un des quatre solvants car celui-ci peut être un indicateur de la facilité avec laquelle l'extrait peut être fractionné, ce qui conduit à l'ordre suivant : *Lophira lanceolata* (acétate d'éthyle) et *Gonocaryum lobbianum* (méthanol appauvri). L'examen de l'ensemble des résultats du criblage montre que contrairement à l'expertise acquise lors du HCS d'une banque d'expression, une proportion significative des plantes présente des effets cytotoxiques même à 10 µg/ml (**Fig**. **65**). Pour chacun des solvants, et pour chaque densité d'ensemencement, les facteurs de viabilité exprimés sous forme logarithmique montrent une baisse entre 10 et 100 µg/ml, signant la présence de métabolites ayant ces effets cytotoxiques. Lors de l'identification de RdCVF, et ici celle d'un autre facteur trophique, « epithelium-derived cone viability factor » (EdCVF) identifié par criblage d'un banque d'expression de l'épithélium pigmenté rétinien, la plupart des 2 100 ensembles testés n'avait aucun effet sur la viabilité des cônes (Leveillard *et al.*, 2004b). Ainsi, un effet protecteur à 10 µg/ml associé à un effet toxique (T) à 100 µg/ml est un indicateur, mais pas une preuve, de l'existence de deux activités distinctes dans l'extrait, l'une positive mise en évidence à 10 µg/ml et l'autre négative mise en évidence à 100 µg/ml si les deux sont portées par des entités chimiques distinctes (**Fig**. **66**). *Vatica odorata* fournit l'extrait méthanol polyamine le plus toxique (T = -3,23), *Lophira lanceolata* pour les extraits acétate d'éthyle (T = -6,42) et méthanol appauvri (T = -5,59) et *Hyptis suaveolens* pour l'acétate d'éthyle appauvri (T = -2,56).

III.4.3.2 PRIORITISATION DES PLANTES À FRACTIONNER

La combinatoire complexe de ces paramètres nous a conduit à envisager le développement du fractionnement de sept extraits. Ils sont cités ici dans l'ordre du criblage (indiqué entre parenthèse pour des valeurs théoriques de 1 à 30, car les essais de fractionnement ont été développés au fur et à mesure de l'obtention des résultats) : *Psorospermum febrifugum* (3), *Casimiora edulis* (9), *Wendlandia glabrata* (14), *Gonocaryum lobbianum* (15), *Carallia brachiata* (16), *Uapaca togoensis* (17) et *Uvaria chamae* (26) (**Table 5**). L'analyse des familles auxquelles appartiennent les 30 plantes positives issues du criblage ne semble pas indiquer que les métabolites secondaires actifs sont issus d'une voie métabolique restreinte à une famille de plantes (Chae *et al.*, 2014). Les 30 plantes sont dispersées phylogénétiquement à l'exception notable des deux Annonacées, *Annona senegalensis* et *Uvaria chamae* (**Fig. 67**).

Des essais de fractionnement par extraction en phase solide « solid phase extraction » (SPE) (M&M, chapitre 3a) ont été réalisés pour les sept plantes et pour les quatre solvants, puis les fractions ont été testées sur les cultures enrichies en cônes à 10 et 100 µg/ml (**Table 6**). Pour ne pas alourdir l'exposé, nous reportons ici les résultats obtenus avec deux plantes, *Wendlandia glabrata*, qui est la première plante à avoir été étudiée et *Uvaria chamae*, qui sera amplement développée par la suite.

III.4.3.2.1 EXEMPLE DE *WENDLANDIA GLABRATA*

Dans un premier temps, nous avons tenté de reproduire l'effet protecteur des quatre extraits issus des feuilles de *Wendlandia glabrata*, une Rubiacée. Les essais ont donc été réalisés en quadruplé lors de trois essais consécutifs sur les cultures enrichies en cônes aux densités de 1 x 10^5 et 2 x 10^5 cellules/cm^2 et avec 10 et 100 µg/ml de chacun des quatre extraits. L'ensemble des résultats de ces trois tests indépendants illustre la prudence avec

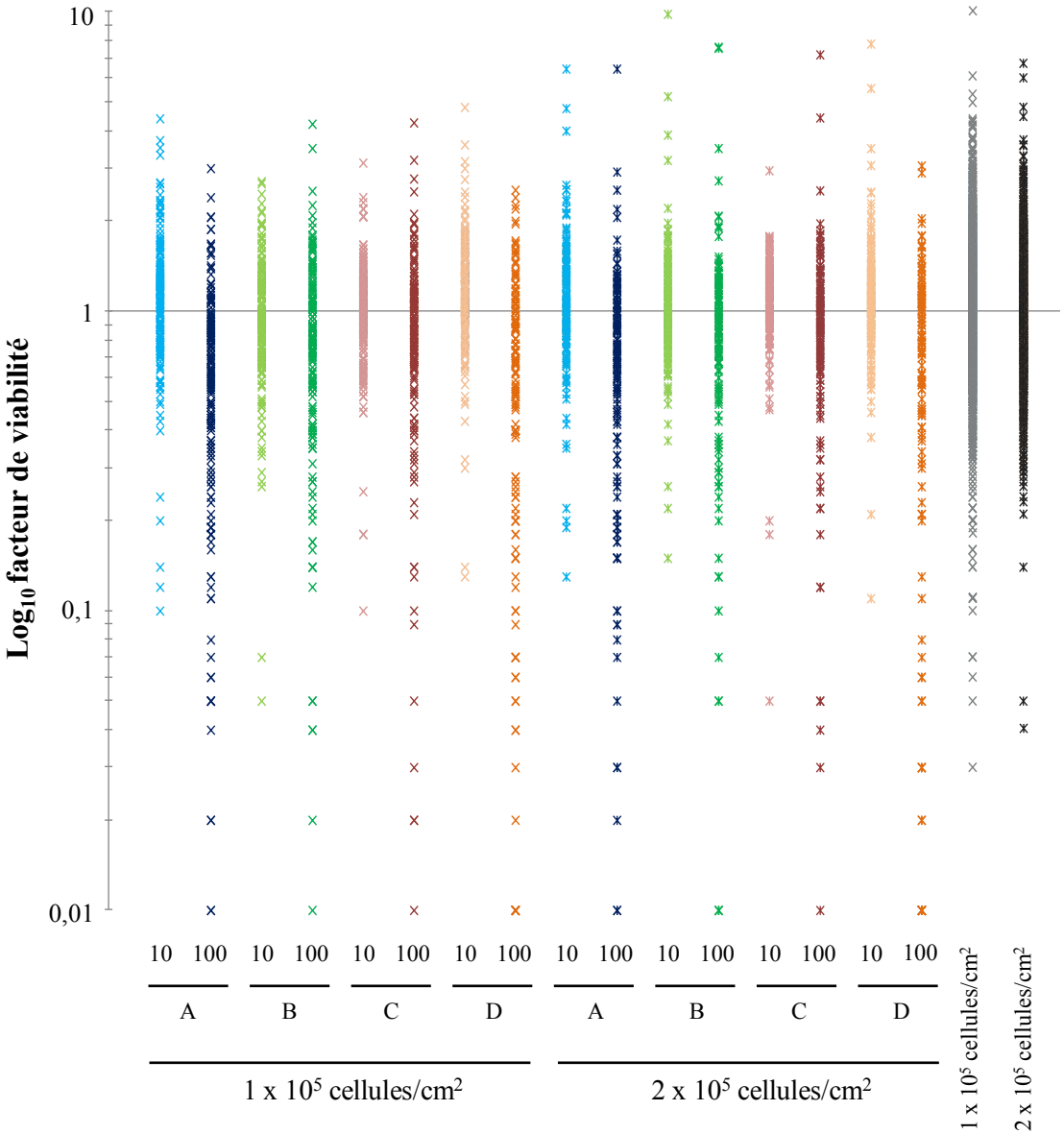


Figure 65:. Les effets toxiques des métabolites secondaires lors du criblage des 800 extraits de plantes médicinales. L'ensemble représente un total de 12800 essais. A: méthanol polyamide, B: acétate d'éthyle, C: acétate d'éthyle appauvri, D: méthanol appauvri. La figure donne une vue d'ensemble du criblage.

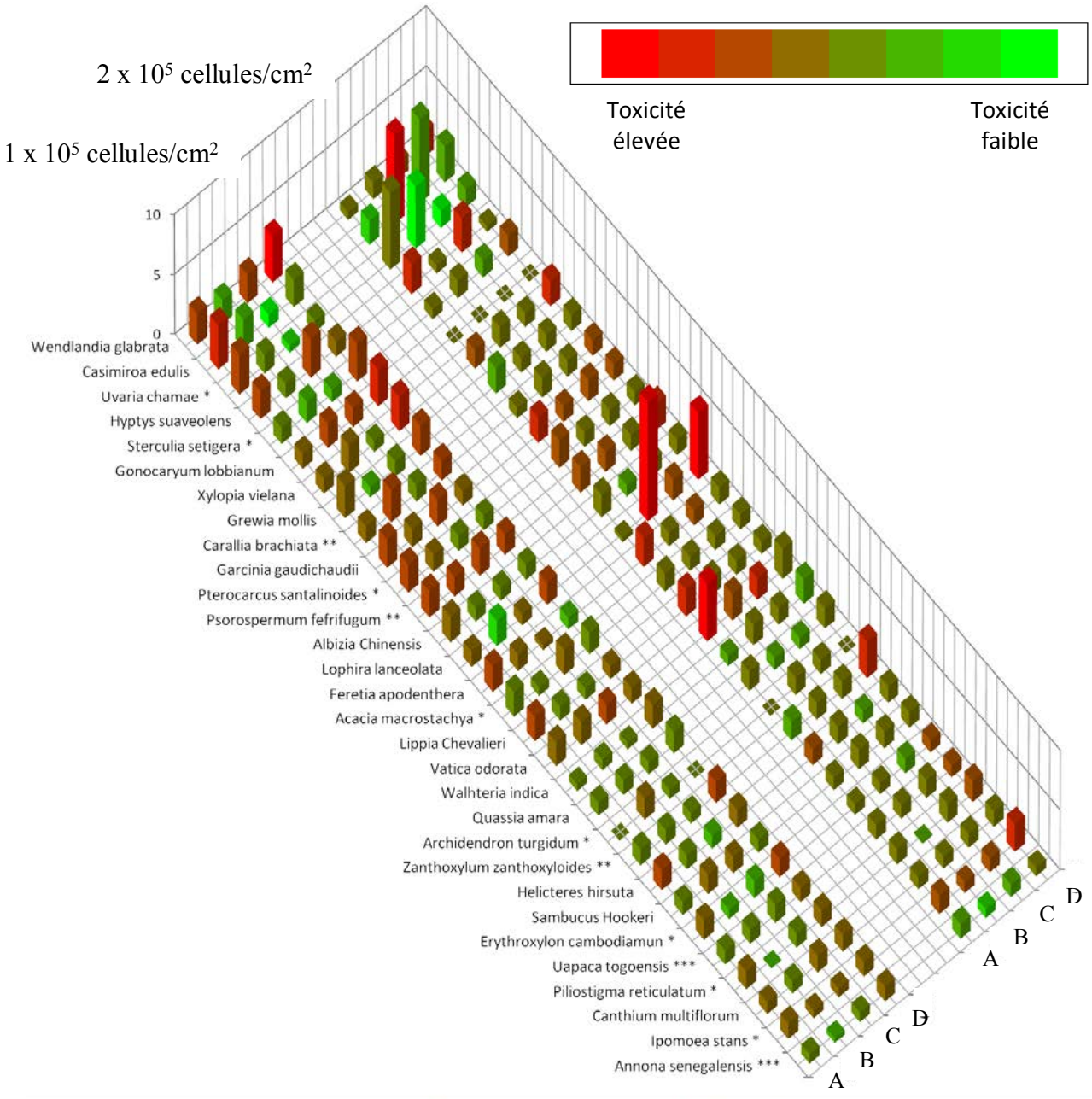


Figure 66: Classement des 30 plantes positives selon leur facteur moyen de viabilité et de la présence d'une activité toxique à 100 µg/ml. L'amplitude des histogrammes représente le facteur de viabilité de chaque extrait. Les verts clairs plus intenses sont les extraits des plantes actives avec une toxicité faible à 100 µg/ml. Les couleurs rouges de plus en plus intenses indiquent le niveau de toxicité. Cette dernière se définit par le rapport T = moyenne FV 100µg-moyenne FV à 10µg. A: méthanol polyamide, B: acétate d'éthyle, C: acétate d'éthyle appauvri, D: méthanol appauvri. Les plantes sont classées suivant un FV max pour les essais réalisés à 1 x 10^5 cellules/cm^2.

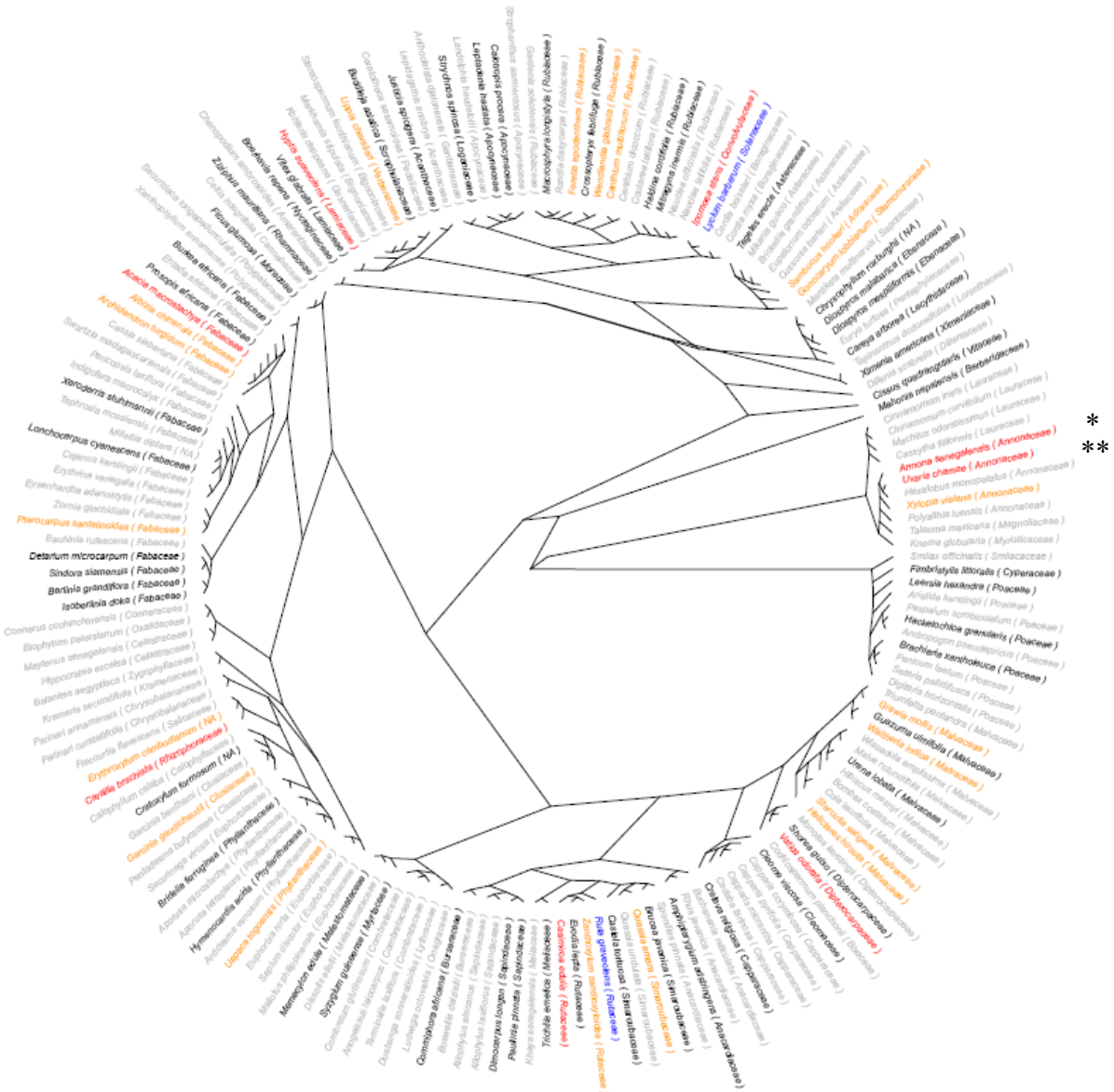

Ipomoea stans (Convolvulaceae)
Lycium barbarum (Solanaceae)
Annona senegalensis (Annonaceae)
Uvaria chamae (Annonaceae)
Ruta graveolens (Rutaceae)
Zanthoxylum zanthoxyloides (Rutaceae)
Evodia hebta (Rutaceae)
Casimiroa edulis (Rutaceae)
Melochia corchorifolia (Malvaceae)
Urena lobata (Malvaceae)
Grewia mollis (Malvaceae)
Guazuma ulmifolia (Malvaceae)
Waltheria indica (Malvaceae)
Uapaca kirkiana (Phyllanthaceae)
Bridelia ferruginea (Phyllanthaceae)
Hymenocardia acida (Phyllanthaceae)
Securidaca longepedunculata (Polygalaceae)
Vitex doniana (Lamiaceae)
Vitex ghatalon (Lamiaceae)
Hyptis suaveolens (Lamiaceae)
Ximenia americana (Ximeniaceae)
Olax subscorpioidea (Olacaceae)
Cissus quadrangularis (Vitaceae)
Cissus populnea (Vitaceae)
Combretum glutinosum (Combretaceae)
Terminalia laxiflora (Combretaceae)
Combretum micranthum (Combretaceae)
Anogeissus leiocarpus (Combretaceae)
Guiera senegalensis (Combretaceae)
Terminalia avicennioides (Combretaceae)
Lannea microcarpa (Anacardiaceae)
Sclerocarya birrea (Anacardiaceae)
Ozoroa insignis (Anacardiaceae)
Spondias mombin (Anacardiaceae)
Mangifera indica (Anacardiaceae)
Pseudocedrela kotschyi (Meliaceae)
Khaya senegalensis (Meliaceae)
Azadirachta indica (Meliaceae)
Entada africana (Fabaceae)
Piliostigma reticulatum (Fabaceae)
Bauhinia rufescens (Fabaceae)
Piliostigma thonningii (Fabaceae)
Afzelia africana (Fabaceae)
Burkea africana (Fabaceae)
Pterocarpus erinaceus (Fabaceae)
Pterocarpus santalinoides (Fabaceae)
Daniellia oliveri (Fabaceae)
Isoberlinia doka (Fabaceae)
Detarium microcarpum (Fabaceae)
Sindora siamensis (Fabaceae)
Berlinia grandiflora (Fabaceae)
Hymenostegia afzelii (Fabaceae)
Erythrophleum suaveolens (Fabaceae)
Cassia sieberiana (Fabaceae)
Cassia singueana (Fabaceae)
Cassia siamea (Fabaceae)
Cassia sieberiana (Fabaceae)
Cassia tora (Fabaceae)
Cassia obtusifolia (Fabaceae)
Cassia mimosoides (Fabaceae)
Cassia occidentalis (Fabaceae)
Cassia mimosoides (Fabaceae)
Cassia occidentalis (Fabaceae)
Cassia tora (Fabaceae)
Cassia obtusifolia

TABLE 5: LES CARACTERISTIQUES DES SEPT PLANTES SELECTIONNEES POUR LE FRACTIONNEMENT, les plantes sont ordonnées selon le processus de criblage, vfmax et le critère morphologique correspondent aux critères appliqués dans la table 4, la toxicité maximale (tm) provient de la figure 66,

N°	Plantes	Origine	VF max	Morphologie	Toxicité max (Tm)
3	*Psorospermum fefrifugum*	Burkina Faso	A: 2,19	**	D: -2,22
9	*Casimiroa edulis*	Mexico	C: 7,65		B: -5,71
14	*Wendlandia glabrata*	Vietnam	D: 3,85		D: -2,74
15	*Gonocaryum lobbianum*	Vietnam	D: 3,07		D: -2,27
16	*Carallia brachiata*	Vietnam	B: 2,70	**	D: -1,32
17	*Uapaca togoensis*	Burkina Faso	C: 1,87	***	C: -0,19
26	*Uvaria Chamae*	Burkina Faso	B: 7,60	*	C: 0

laquelle il faut interpréter les résultats d'un criblage. En effet, seul l'extrait méthanol appauvri testé à 10 µg/ml sur des cellules ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2 fait preuve d'un effet protecteur robuste. Nous observons un tassement des valeurs, entre le facteur de viabilité (FV) de cet extrait de 3,81, le plus élevé lors du criblage, à 2,08 en moyenne pour les trois essais de validation (**Fig**. **68a**). Ce tassement est aussi apparent lors d'ensemencement à 2 x 10^5 cellules/cm^2 (**Fig**. **68b**). Par contre, l'effet toxique de ce même extrait testé à 100 µg/ml est parfaitement reproductible du criblage à la validation (**Table 4 et Fig**. **68b et d**). Un effet protecteur atténué est aussi visible pour l'acétate d'éthyle à 100 µg/ml pour lequel le FV de 3,65 au criblage est de 1,42 en moyenne ici (**Fig**. **68b**). Les valeurs moyennes du facteur de viabilité obtenues avec le contrôle positif, *Fructus barbarum,* montrent que l'ensemble de ces essais sont valides. C'est donc l'extrait méthanol appauvri que nous avons retenu pour le fractionnement.

L'extrait méthanol appauvri de *Wendlandia glabrata* a été déposé sur une colonne SPE et élué soit par l'eau (C1) 40% (C2) ou 100% (C3) de méthanol. L'analyse HPLC en phase inverse des factions obtenues a été réalisée selon un gradient allant de 20% à 100% en méthanol après injection à 20% méthanol. Le profil chromatographique de l'extrait déposé dans la colonne SPE (extrait dépôt) ressemble à la somme des profils C1-3, observés par absorbance à 300 nm (**Fig**. **69a**). Les fractions C1, C2 et C3 partagent un certain nombre de pics, mais la différence d'amplitude des pics montre une séparation adéquate des métabolites de l'extrait selon leur nature chimique. Dans la fraction C1 (bleu) éluée à l'eau, on retrouve des composés hydrophiles élués avec des temps de rétention (tR) compris entre 0 et 5 min du gradient d'analyse soit à 80% d'eau. La fraction C2, éluée à 40% méthanol (vert), est appauvrie en métabolites polaires et enrichie en composés de polarité intermédiaire. Les tR des pics sont principalement compris entre 9 et 14 min et sont donc séparés des composés hydrophiles. La fraction C3 (rouge) éluée à 100% de méthanol contient les métabolites les plus hydrophobes élués avec des tR entre 12 et 17 min. La SPE est une méthode de pré-fractionnement qui permet de débarrasser l'extrait, de composés de hauts poids moléculaires, tels que les tanins et autres impuretés comme les cires (Hussain *et al.*, 2013), Le bilan matière de ce processus d'extraction est de 53%, soit une perte de 47% de la matière (**Fig**. **69b**).

L'activité biologique des trois fractions (C1, C2 et C3) a été mesurée sur les cultures enrichies en cônes ensemencées aux densités de 1 x 10^5 cellules/cm^2 et avec 10 et 100 µg/ml de chacune des fractions. L'activité de survie de l'extrait de *Wendlandia glabrata* préparé au méthanol appauvri (D) a un facteur de viabilité moyen étant inférieur à 1 aussi bien à 10 et 100 µg/ml (**Fig**. **70a,b**). Aucune des fractions ne présente une activité trophique statistiquement significative sur les cônes. Dans les mêmes essais, l'extrait d'acétate d'éthyle de *Fructus barbarum* montre un facteur de viabilité supérieur à 2 à 100 µg/ml, ce qui valide ces essais. La fraction C2 présente un léger enrichissement en activité protectrice à 10 µg/ml. Durant le criblage haut contenu, la fraction D de *Wendlandia glabrata* est signalée par la présence d'une activité toxique à 100 µg/ml (**Fig**. **66**) qui semble interférer avec les essais réalisés ici. Notons que la fraction C1 (H_2O) enrichie en molécules polaires présente la plus importante toxicité, ce qui suggère que le métabolite responsable de la toxicité est de nature polaire et donc a une affinité préférentielle pour l'eau. Nous avons donc produit un extrait aqueux directement à partir *Wendlandia glabrata* préparé au méthanol appauvri (D) qui a ensuite été évalué sur les cultures enrichies en cônes. La fraction aqueuse (SnD) présente un

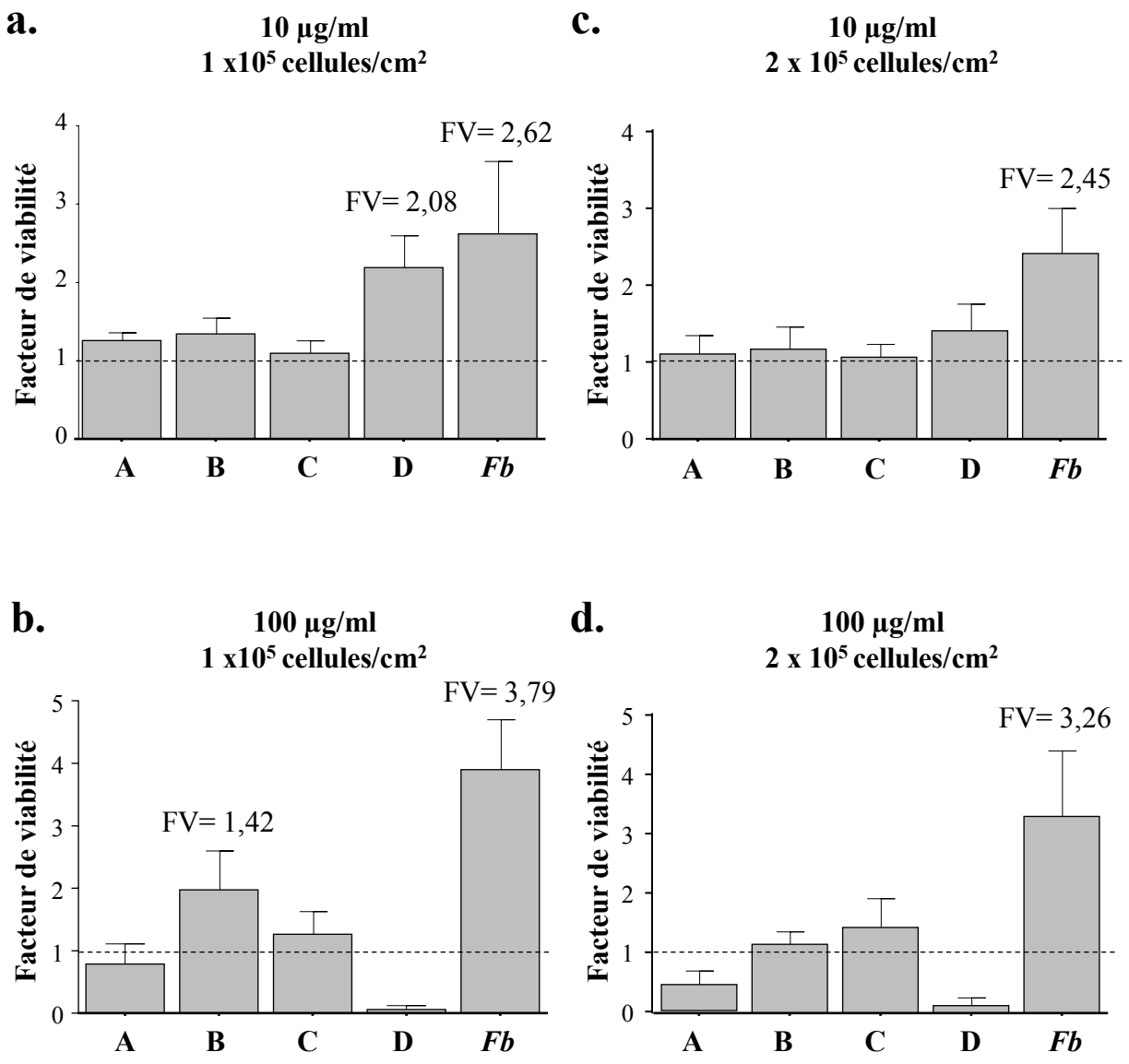
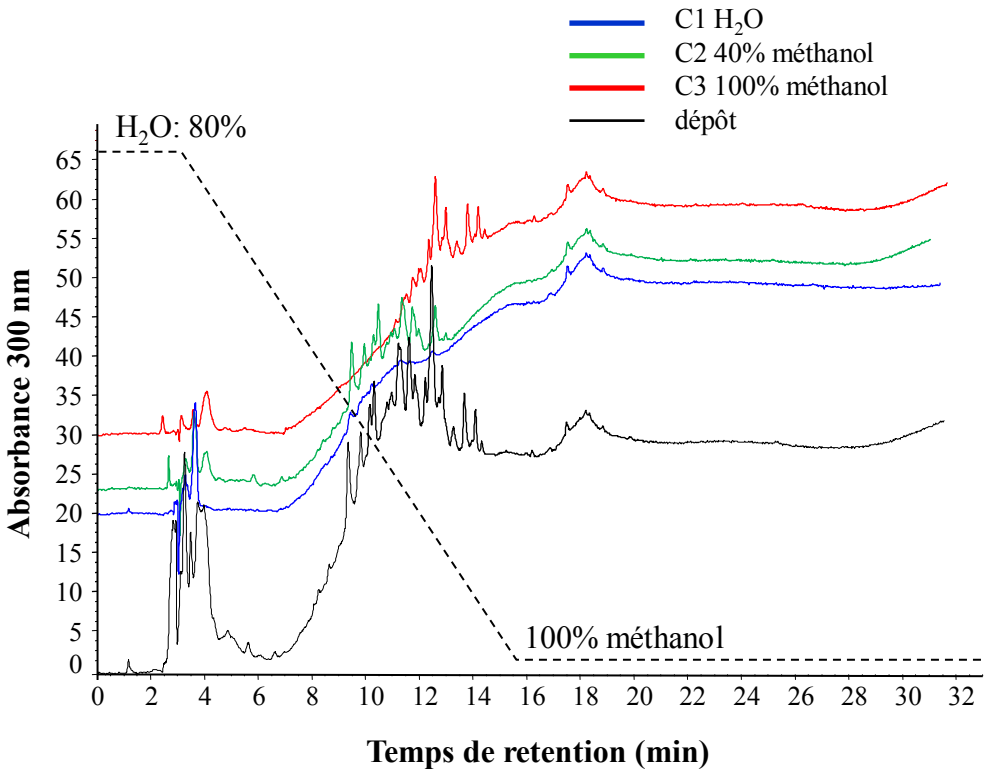
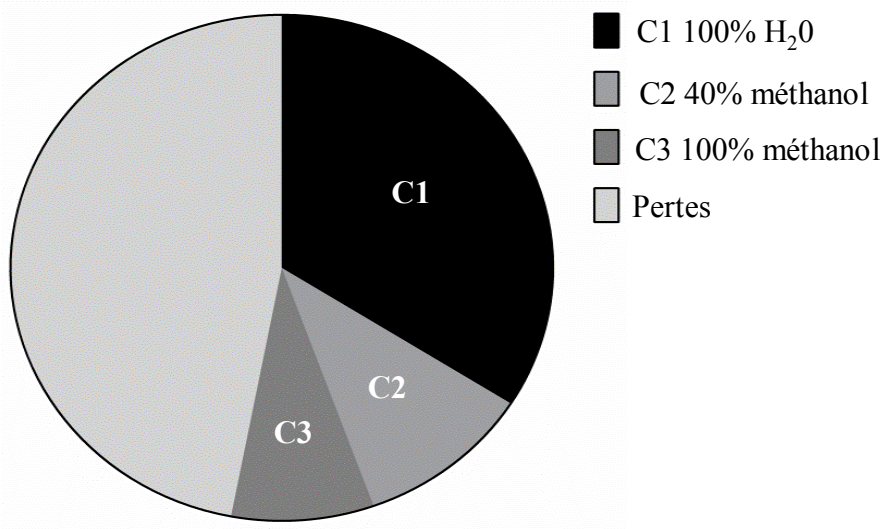


Figure 68. Validation de l'effet protecteur des extraits de la plante *Wendlendia glabrata*. Les résultats représentent la moyenne de 3 tests indépendants réalisés avec 10 (**a**, **c**) et 100 µg/ml (**b**, **d**) d'extrait sur les cultures enrichies en cônes à la densité d'ensemencement de 1 x 10^5 (**a**, **b**) et 2 x 10^5 cellules/cm^2 (**c**, **d**). Les facteurs de viabilité ont été calculés en divisant le nombre moyen de cellules vivantes pour chaque condition par le nombre de cellules vivantes dans les contrôles négatifs avec du milieu de culture. A: méthanol polyamide, B: acétate d'éthyle, C: acétate d'éthyle appauvri, D: méthanol appauvri. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité.

a.



b.



Rendements globale
d'extraction 53%

Figure 69: **Fractionnement de *Wendlandia galbrata*: a.** Chromatogrammes illustrant le fractionnement sur phase solide C18 (SPE) de la plante *Wendlandia glabrata*. En bleu le spectre de la C1 hydrophile, en C2 (vert) spectre composé de métabolites à polarité intermédiaire en C3 (rouge), métabolites plus hydrophobes **b.** Rendement matière du fractionnement SPE.

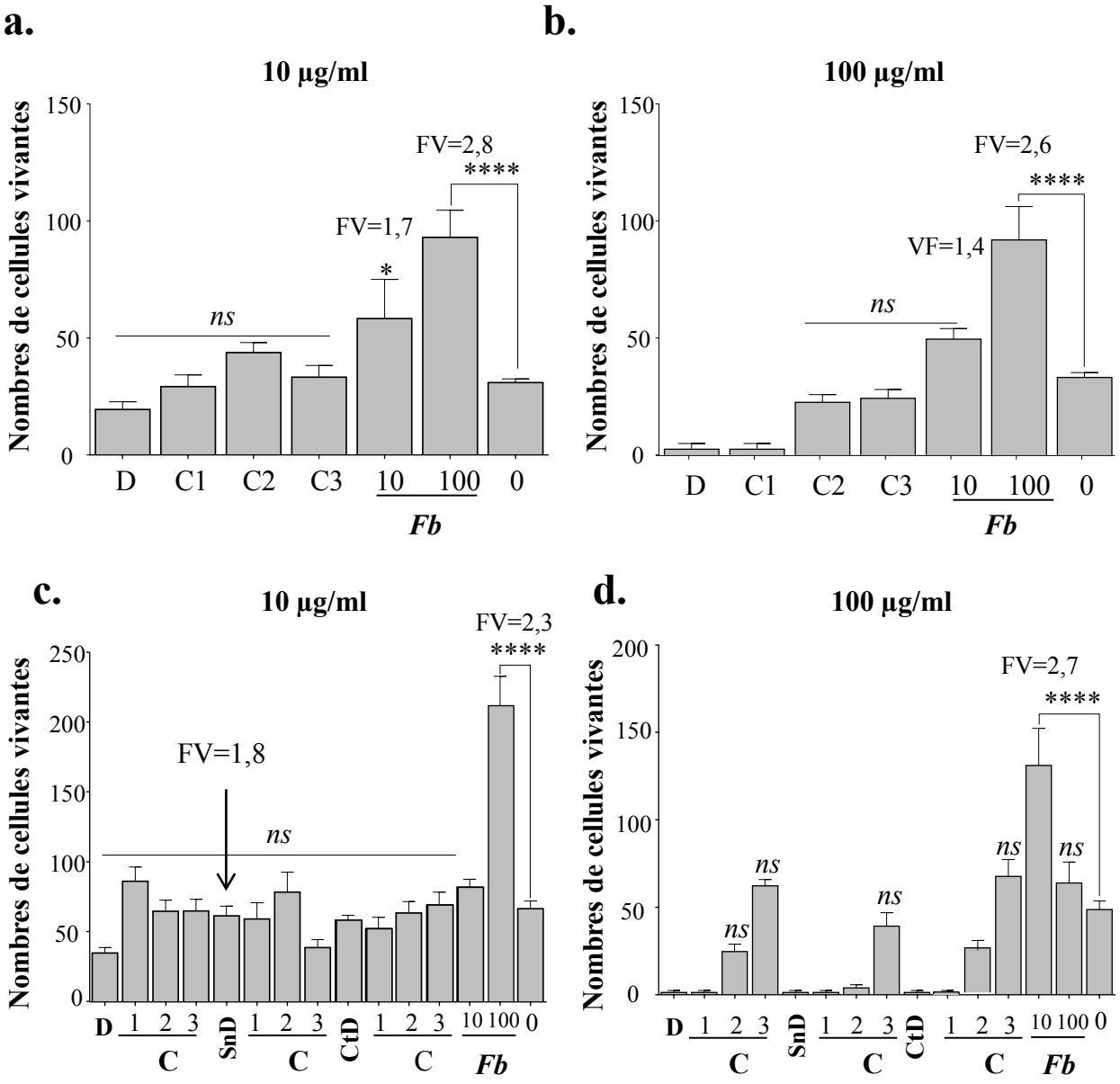


Figure 70: Activité trophique des fractions issues de l'extraction en phase solide (SPE) de la plante *Wendlandia glabrata*. a. Effet de l'extrait méthanol appauvri et les fractions SPE (C1, eau; C2: 40% méthanol, C3: 100% méthanol) à 10 µg/ml, et en **b.** à 100 µg/ml. Les fractions ont été testées sur des cultures de cônes à 10^5 cellules/cm^2. **c.** Mise en évidence d'une activité toxique des fractions aqueuses du surnageant (SnD), culot (CtD) et de l'extrait méthanol appauvri (D) et de leurs fractions SPE pour 10^5 cellules à 10 µg/ml, et en **d.** à 100 µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité.

facteur de viabilité moyen de 1,8 à la concentration de 10 µg/ml (**Fig**. **70 c**). Cette fraction aqueuse SnD a elle-même été fractionnée sur phase solide donnant les fractions C1 (H_2O), C2 (40% méthanol) et C3 (100% méthanol). Les tests sur ces fractions à 10 µg/ml donnèrent des résultats homogènes avec des facteurs de viabilité inférieurs à 1,5. À la concentration de 100 µg/ml, la faction polaire C1 semble concentrer l'activité toxique (**Fig**. **70 d)**. Pour un ensemble de huit tests, réalisés avec l'extrait méthanol appauvri de *Wendlandia glabrata*, nous avons mis en évidence une toxicité importante d'un composé pouvant être de nature polaire, impossible à séparer de l'activité trophique métabolite actif. La morphologie des cellules est équivalente au témoin négatif.

III.4.3.2.2 FRACTIONNEMENT BIOGUIDÉ D'*UVARIA CHAMAE*

Cette déconvenue aurait pû nous conduire à reconsidérer la fraction acétate d'éthyle (**Fig**. **68 b**). Néanmoins, la morphologie des cellules mises en présence des extraits de *Wendlandia glabrata* étant équivalente à celle du témoin négatif, nous avons préféré évaluer les autres extraits dans l'ordre de leur identification par le criblage haut contenu. Ainsi les extraits de *Psorospermum febrifugum* (3), *Casimiroa edlulis* (9), *Gonocaryum lobbianum* (15), *Carallia brachiata* (16), *Upaca togoensis* (17) et *Uvaria chamae* (26) préparés par les quatre solvants ont été fractionnés en phase solide (SPE). Seules les plantes *Gonocaryum lobbianum* et *Uvaria chamae* ont permis de mettre en évidence une activité trophique avec une valeur du facteur de viabilité supérieur à 2 pour les 196 tests de viabilité réalisés (**Table 6**). Il semble bien que cette étape du fractionnement soit difficile, soit que les plantes sélectionnées sont en fait des faux positifs, ce que contredit l'effet sur la morphologie des cônes, soit plutôt que les effets toxiques masquent l'effet protecteur polluant ainsi les résultats.

L'analyse de ces résultats nous a conduit à sélectionner la fraction C3 de l'extrait méthanol polyamide d'*Uvaria chamae* comme étant notre meilleure piste. En effet, il présente un effet sur la morphologie contrairement à l'extrait de *Gonocaryum lobbianum* (**Table 4**). De plus, cette fraction ne présente pas ou peu d'activité toxique lors de tests réalisés à 100 µg/ml (**Table 6**).

III.4.3.3 UVARIA CHAMAE

III.4.3.3.1 DESCRIPTIONS BOTANIQUES

Uvaria chamae est un arbuste persistant, grimpant haut de 2 à 5 m aux rameaux pubescents (**Fig**. **71a**). Les feuilles à partir desquelles les extraits criblés ont été réalisés sont ovales à elliptiques et font de 6 à 15 cm de long sur 2,5 à 6,5 cm de large. Lors de la floraison de novembre à janvier, l'arbuste se pare des fleurs jaune verdâtre d'un diamètre de 25 à 30 mm (**Fig**. **71b**). Les fruits de 20 à 40 mm de long et de 15 mm de diamètre ressemblent à de petites bananes et sont consommées comme denrées alimentaires au Burkina Faso, ce qui a valu à cette plante le surnom de banane de singe ou banane de buisson ou encore racine de doigts à cause de la forme de ses carpelles qui ressemblent à des doigts (**Fig**. **71c**). Les feuilles d'*Uvaria chamae* sont utilisées entres autres pour traiter les affections oculaires, dans les et pour faire baisser la fièvre (**Table 3**).

Table 6: RESULTATS DES ESSAIS DE FRACTIONNEMENT PAR EXTRACTION EN PHASE SOLIDE DES SEPT PLANTES SELECTIONNEES, Les plantes apparaissent dans l'ordre des essais de fractionnement qui ont été réalisés pour chacun des quatre solvants, Le nombre d'essais figure en bas du tableau, Les facteurs de viabilité (FV) sont les moyennes des différents tests réalisés, Les valeurs en gras correspondent aux FV ≥ 2, Le dépôt correspond au matériel déposé sur la colonne, Tm indique les fractions présentant une activité toxique sur les cellules en culture à 1 x 105 cellules/cm2, ND, non déterminé,

7		*Wendlandia glabrata* (14)		*Casimiroa edulis* (9)		*Psorospermum fefrifugum* (3)		*Gonocaryum lobbianum* (15)		*Uapaca togoensis* (17)		*Carallia brachiata* (16)		*Uvaria chamae* (26)	
Nature de l'extrait	**Fractions**	**Facteur de viabilité (FV)**													
[Concentration] µg/ml		10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100
A Méthanol polyamide	dépôt	0,90	0,60	1,40	0,30 Tm	1,20	0,70 Tm	1,20	0,20 Tm	1,10	1,20	1,20	0,90 Tm	1,90	1,35 Tm
	C1	1,00	0,70	0,80	0,70	1,10	0,50 Tm	0,90	0,30 Tm	1,00	0,90	1,50	0,70 Tm	0,98	0,95
	C2	1,00	0,80	1,00	0,70	ND	ND	1,50	1,10	0,90	1,00	0,20	1,20	1,30	0,85
	C3	0,90	0,90	0,70	0,20 Tm	1,00	0,10 Tm	1,20	0,00 Tm	0,70	0,80	0,70	0,80	**2,03**	**2,00**
B Acétate éthyle	dépôt	1,10	0,80	0,80	0,90	1,20	0,30 Tm	1,30	0,70 Tm	1,00	1,00	0,80	0,80	1,70	1,30
	C1	0,80	1,30	0,50	0,70	ND	ND	1,00	1,30	ND	ND	0,50	1,00	1,15	1 ,00
	C2	1,30	1,20	0,90	0,80	1,60	1,10 Tm	1,00	0,70	0,90	1,10	0,80	0,70	1,65	0,90 Tm
	C3	0,70	0,90	0,90	0,40 Tm	1,10	0,30 Tm	1,30	0,00 Tm	0,90	0,80	0,70	0,90	1,20	1,10
C Acétate éthyle appauvri	dépôt	0,80	**2,40**	ND	ND	2,00	0,40 Tm	ND	ND	0 ,60	1,00	0,70	1,00	1,45	0,70 Tm
	C1	1,70	1,20 Tm	ND	ND	0,80	0,70	ND	ND	ND	ND	1,80	0,80 Tm	1,20	1,00
	C2	1,00	1,00	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,90	1,00	1,20	1,30 Tm	1,85	1,45
	C3	1,20	0,70 Tm	ND	ND	1,30	0,40 Tm	ND	ND	1,10	1,20	1,00	1,00	1,28	0,58 Tm
D Méthanol appauvri	dépôt	0,60	0,00 Tm	1,30	0,20 Tm	1,20	0,10 Tm	0,80	0,00 Tm	1,20	0,00 Tm	1,20	0,20 Tm	1,20	0,53 Tm
	C1	0,90	0,00 Tm	0,80	0,90	1,30	0,50 Tm	**2,60**	0,10 Tm	0,80	0,60	1,10	1,50	1,30	0,25 Tm
	C2	1,30	0,60 Tm	1,10	0,80 Tm	1,60	0,70 Tm	0,80	0,00 Tm	ND	ND	1,50	0,90 Tm	1,50	**2,08**
	C3	1,00	0,70	1,50	0,70 Tm	1,20	0,80	1,30	0,00 Tm	1,00	1,20	1,00	1,60 Tm	1,60	1,25
Lycïum barbarum	moyenne	1,55	2,70	1,70	1,50	1,55	4,10	1,25	1,70	0,95	1,70	2,10	2,65	1,53	2,03
Nombres d'essais réalisés		2		1		1		1		1		1		4	

a.



b.



c.



Figure 71: ***Uvaria chamae*****. a.** Dans son environnement écologique au Burkina Faso. **b.** Une fleur lors de la floraison qui dure novembre à janvier. **c.** Les fruits consommés. Photographie de Jörn Germer (2006).

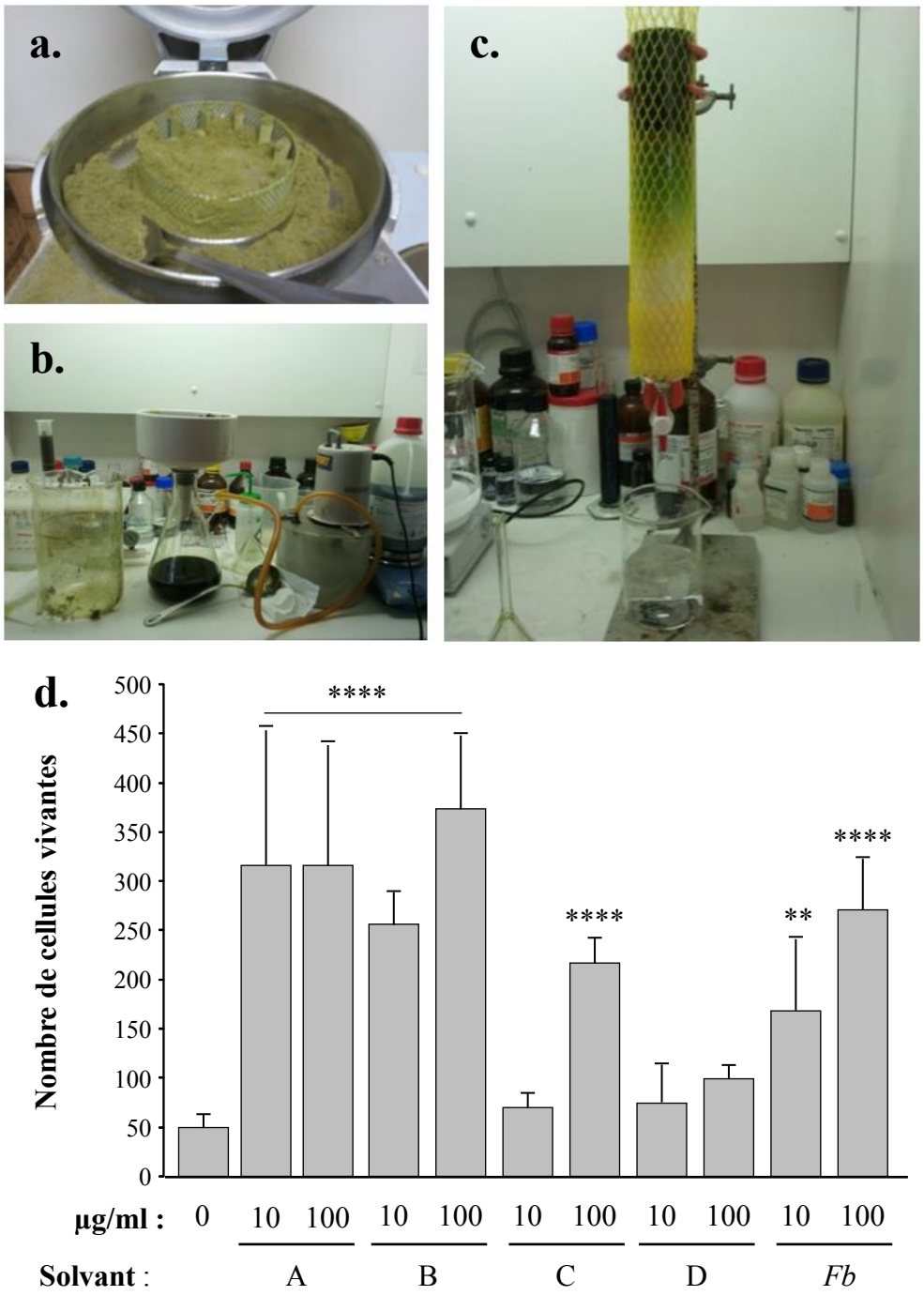


Figure 72: Extraction des métabolites secondaires des feuilles d'*Uvaria chamae*. **a.** Broyage**. b.** Filtration du broyat. **c.** Extraction avec le méthanol polyamide par chromatographie sur colonne de polyamide. **d.** Activité biologique des quatre fractions lors du criblage haut contenu pour les cellules ensemencées à 2 x 10^5 cellules/cm^2. A: extrait méthanol polyamide, B: extrait acétate éthyle, C : extrait acétate éthyle appauvrie, D : extrait méthanol appauvrie. Pour le contrôle négatif (0) les cellules ont été incubées avec du milieu de culture. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*.

III.4.3.3.2 RECOLTE, PREPARATION ET OBTENTION DE LA FRACTION *UCAC3*

Les feuilles d'*Uvaria chamae* ont été récoltées à la saison des pluies de juin à octobre au Burkina Faso, découpées (M&M, chapitre 1), puis broyées (**Fig**. **72a**), le résidu filtré (**Fig**. **72b)** et les métabolites secondaires ont été extraits avec le méthanol polyamide par chromatographie sur colonne de polyamide ((M&M, chapitre 3, **Fig**. **72c**). L'activité biologique enregistrée lors du criblage haut contenu est maximale pour le méthanol polyamide et l'acétate d'éthyle (**Fig**. **72 d**). L'extrait méthanol polyamide (*Uc*MP) a été fractionné selon la procédure sur phase solide pour produire les fractions *UcAC*1, *UcAC*2 et *UcAC*3 (**Fig**, **73a**). Les tests biologiques montrent clairement que la fraction la moins polaire, *UcAC*3 (en rouge), éluée à l'aide de méthanol pur contient entièrement l'activité trophique contenu dans la fraction méthanol polyamide (*Uc*MP) (**Fig**. **73b**). La fraction *UcAC*3 présente un facteur de viabilité de 2,6 et 2,4 lorsque testée à la concentration de 10 et 100 µg/ml respectivement. Un essai dose-réponse a ensuite été réalisé avec cette fraction *UcAC*3. A la dose de 3 µg/ml la fraction *UcAC*3 présente un facteur de viabilité de 3,2, ceci pour deux essais dupliqués (**Fig**. **74**). On remarquera aussi qu'alors l'activité biologique de la fraction *UcAC*3 est égale à celle de la fraction *Uc*MP à 100 µg/ml, *UcAC*3 étant plus active lorsque testée à 3 µg/ml. De plus, les résultats de la duplication montrent clairement la robustesse de l'essai biologique.

III.4.3.3.3 ANALYSE DE LA FRACTION *UCAC3*

Ces résultats nous ont donc encouragés à purifier le(s) métabolite(s) secondaire(s) d'*Uvaria chamae* responsable(s) de l'effet trophique sur les cônes par une procédure rappelant par certains aspects le criblage par expression qui a conduit à l'identification de RdCVF (**Fig. 75**). La différence principale entre cette stratégie et le criblage haut contenu d'une banque d'expression (**Fig**. **41**) est que le matériel ne peut être amplifié comme le sont les plasmides d'une banque d'expression, le matériel biologique étant limité.

III.4.3.3.3.1 PURIFICATION DE LA MOLECULE ACTIVE D'*UCAC3* PAR RP-HPLC

Nous avons donc initié le processus de purification par le fractionnement de l'extrait *UcAC*3 par une chromatographie haute performance (HPLC) sur phase inverse. L'HPLC permet de séparer les constituants d'un mélange selon leurs affinités différentielles pour la colonne et le solvant d'élution (M&M, chapitre 3b) (Marston, 2007). Les différentes fractions collectées sont enrichies en molécules chimiquement dissemblables et ont ensuite été testées sur les cultures enrichies en cônes. Nous avons premièrement procédé à une optimisation du gradient de séparation de la fraction *UcAC*3. Pour cela, l'élution ne débute plus à 20% mais à 40% de méthanol durant 3 minutes (**Fig**. **76**). L'accroissement du pouvoir éluant de départ permet de dissoudre un massif de pics aux temps de rétention s'étalant entre 7 et 15 min lors de l'application d'un gradient non optimisé (en noir) correspondant à une zone d'élution de 40%-100% méthanol (**Fig**. **77a**). L'accroissement de la durée du gradient de 12 à 19,5 min réduit la pente d'élution qui est donc plus douce, ce qui produit une meilleure séparation des métabolites. Le redressement de la pente à 22,5 min avec gradient de 68% à 100% de méthanol permet de concentrer et de séparer les pics de faible intensité, localisés en fin de

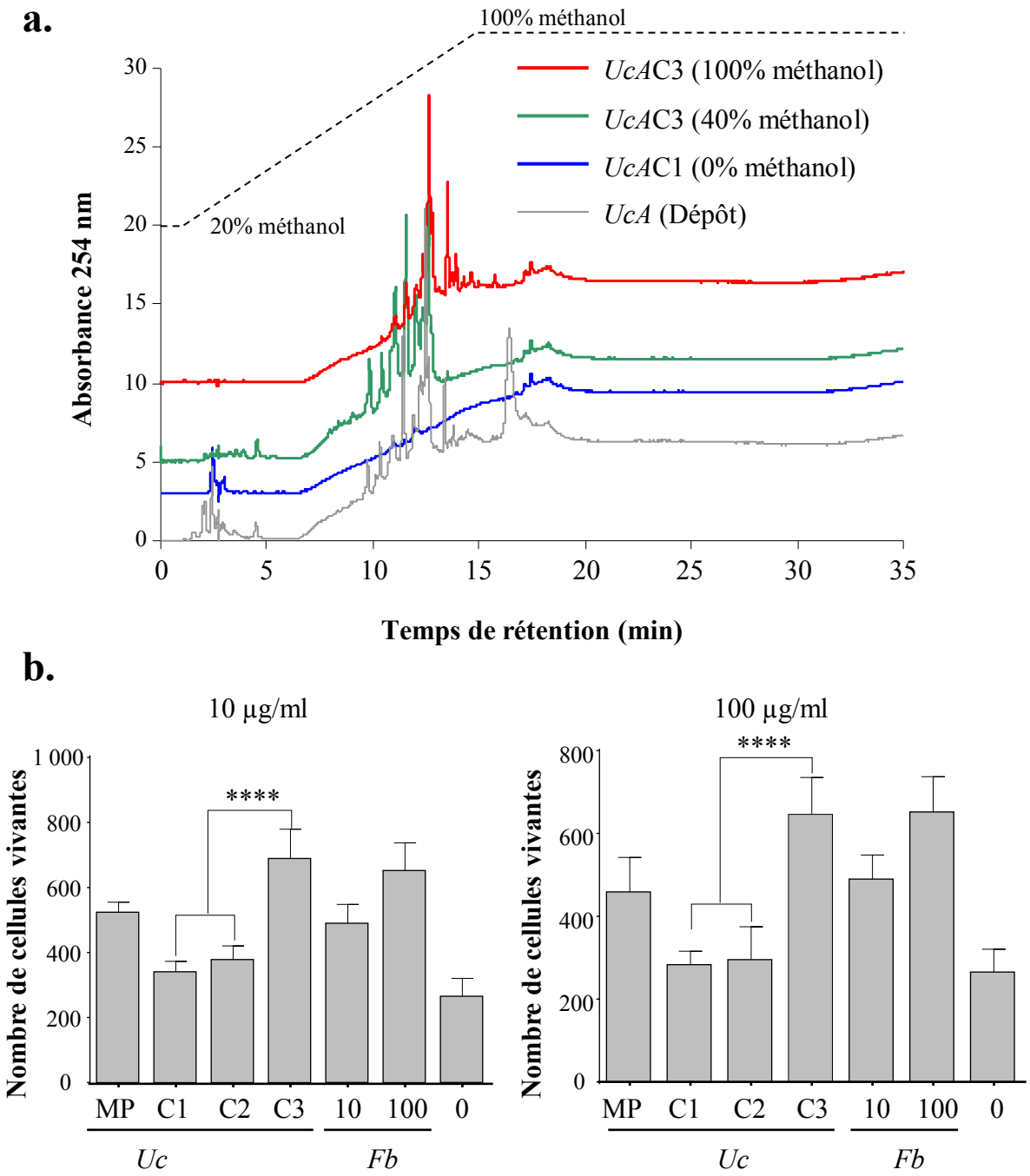


Figure 73: Fractionnement en phase solide (SPE) de l'extrait méthanol polyamide (MP) d'*Uvaria chamae*. a. Profils chromatographiques des fractions SPE: C1 eau, C2, élution 40% méthanol et C3, 100% méthanol. HPLC en phase réverse sur colonne Dionex C18 avec un gradient linéaire débutant à 80% méthanol de 0-3 min, suivi d'une augmentation linéaire durant 13 min jusqu'à 100% de méthanol puis maintien à 100% méthanol durant 22 min. **b.** Activité trophique des fractions testées à 10 et 100 µg/ml avec un ensemencement de 2 x 10^5 cellules/cm^2. *Uc*, *Uvaria chamae*; *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*.

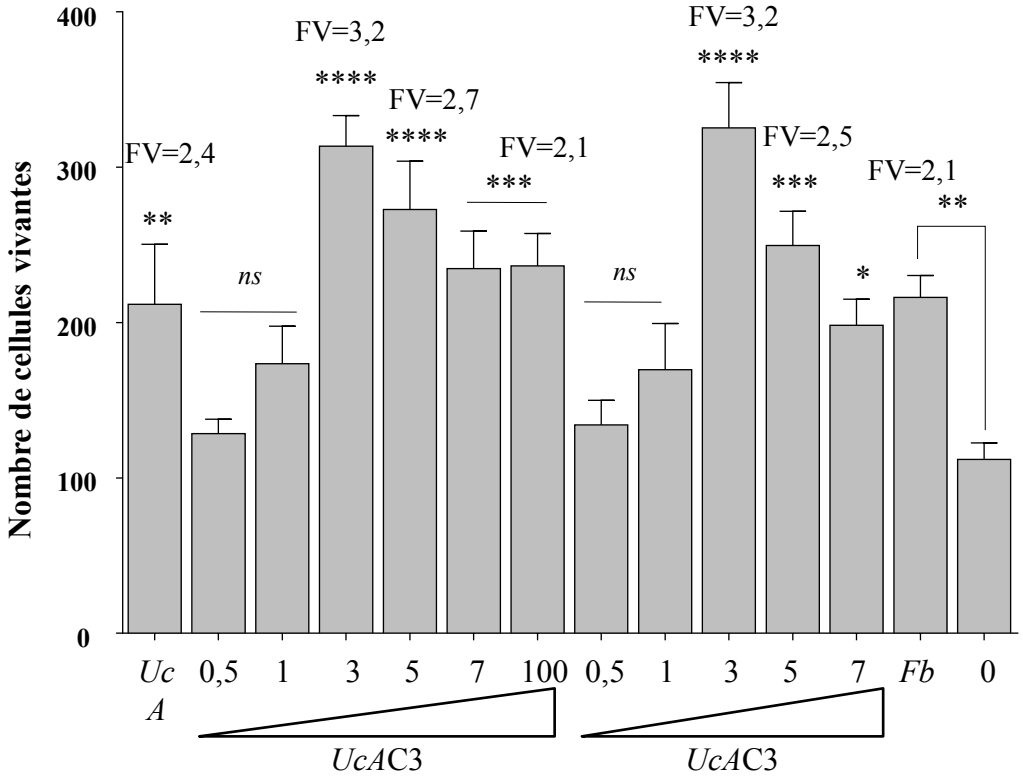


Figure 74: La fraction *UcA*C3 d'*Uvaria chamae* protège les cônes de manière dose dépendante entre 0,5 et 3 µg/ml. Les cultures enrichies en cônes ont été ensemencées à 10^5 cellules/cm^2. Le contrôle interne, l'extrait *UcA*, a été testé à 100 µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. L'essai a été dupliqué. Statistique Anova test de Dunett pour les différentes fractions et le contrôle négatif 0. FV, facteur de viabilité.

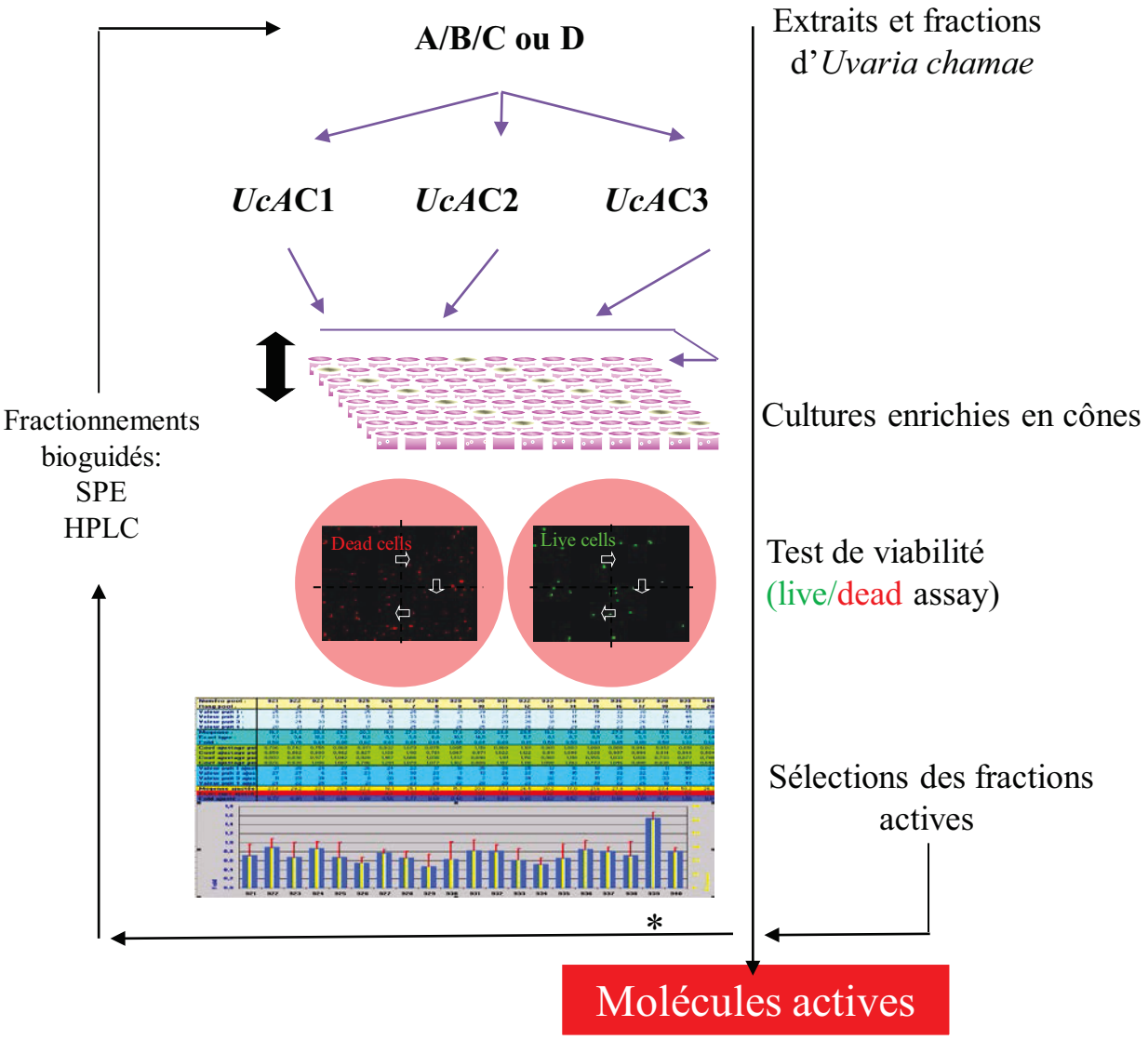


Figure 75: Principe de la purification des molécules actives contenues dans les feuilles d'*Uvaria chamae*. Les fractions actives sont obtenues par divers techniques dont l'extraction en phase solide (SPE) et les chromatographies à haute performance (HPLC) jusqu'à l'isolement des composés actifs. Dans ce schéma, la faction active est indiqué par un astérisque sous le graphe des résultats. Voir aussi M&M, chapitre 2.

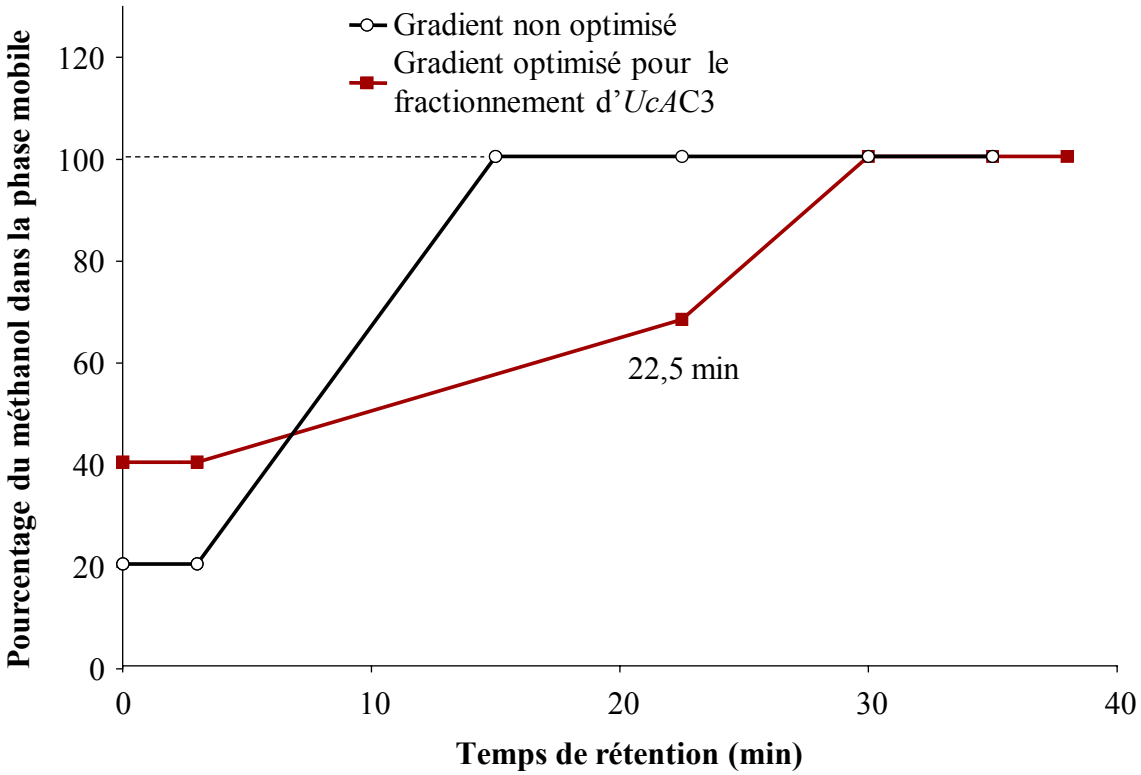


Figure 76: Optimisation du gradient de fractionnement de *UcA*C3. En noir le gradient non optimisé. En rouge, le gradient de fractionnement optimisé *UcA*C3 qui produit un meilleur étalement des pics.

gradient. La phase suivante à 100% méthanol pendant plus de 5 min permet de récupérer l'ensemble des molécules (**Fig**. **77b**). Ce gradient nous a permis de préparer 8 fractions (**Fig**. **78a**). L'activité biologique de ces huit fractions a été testée à la concentration de 1 µg/ml. Les fractions *UcAC*3F1 à *UcAC*3F7 présentent des facteurs de viabilité faible s'échelonnant entre 0,3 à 0,6 suggérant l'existence de molécules potentiellement toxiques (**Fig**. **78b**). La fraction *UcAC*3F8 augmente significativement la viabilité des photorécepteurs à cônes de 310% (FV=3,1), la fraction *UcAC*3 testée à 10 µg/ml présentant un ratio de viabilité de 3,6. Notre contrôle positif *Fructus barbarum* déposé à sa concentration optimale de 100 µg/ml accroît la viabilité des cônes de plus de 420%. Notons que la dose d'*UcAC*3F8 administrée à une concentration 100 fois moindre nous donne un facteur de viabilité équivalent au contrôle positif interne *UcAC*3, ce qui signe l'avancement dans le processus de purification et un enrichissement de cette fraction en molécules. Ces résultats indiquent que les molécules actives sont préférentiellement éluées avec un solvant composé de 68% à 100% de méthanol.

Pour nous assurer que l'activité trophique sur les cônes était intégralement contenue dans la fraction *UcAC*3F8, nous avons réalisé un essai combinatoire dans lequel les fractions *UcAC*3F1 à *UcAC*3F7 ont été testées individuellement ou bien en combinaison avec la fraction active *UcAC*3F8. Dans cet essai, les fractions *UcAC*3F1 à *UcAC*3F7 ne permettent pas d'augmenter l'activité de la fraction active *UcAC*3F8 (**Fig**. **79**). Notons d'ailleurs que la combinaison des fractions *UcAC*3F1 à *UcAC*3F5 avec la fraction active *UcAC*3F8 réduit le facteur de viabilité de cette dernière se qui suggère fortement la présence de molécules toxiques (négatives) dans *UcAC*3F1-F5, résolument distinctes des molécules actives (positives) de la fraction *UcAC*3F8. Le même constat peut être fait en notant que la reconstitution de la fraction *UcAC*3 par réunion des fractions *UcAC*3F1-8 présente un facteur de viabilité inférieur à la fraction *UcAC*3F8 prise isolément.

III.4.3.3.3.2 VALIDATION DE L'ACTIVITE TROPHIQUE D'*UCAC*3F8

Après avoir identifié la fraction *UcAC*3F8 comme étant celle contenant les métabolites secondaires protégeant les cônes, nous avons réalisé un essai dose-réponse. Les fractions *UcAC*3F1, *UcAC*3F5 et *UcAC*3F8 ont été testées entre 0,1 et 10 µg/ml. Il est très intéressant de noter que la fraction *UcAC*3F8 présente un facteur de viabilité de 3,1, même à la concentration de 0,1 µg/ml, concentration au delà de laquelle l'effet trophique semble atteindre un plateau (**Fig**. **80**). Ce plateau suggérant que l'activité trophique de la fraction *UcAC*3F8 puisse être enregistrée à des concentrations plus faibles, nous avons procédé à un second essai entre 1 ng/ml et 10 µg/ml en réalisant l'essai deux fois simultanément. Les résultats de ces deux essais montrent une augmentation progressive de l'effet trophique entre 1 et 100 ng/ml (**Fig**. **81**). Dans ces essais, le facteur de viabilité maximal est de 2,6 à 100 ng/ml, soit inférieur au 3,1 mesuré dans l'essai précédent. N'oublions pas cependant que du fait de la décroissance du nombre de cellules vivantes sur 7 jours (**Fig**. **61**), il est probablement incorrect de comparer strictement deux essais réalisés à des dates différentes. L'effet dose réponse suit une gaussienne avec comme maxima les concentrations 50-100ng/ml alors que la fraction *UcAC*3 a un facteur de viabilité de 2,3 à 100 µg/ml (**Fig**. **81**). Ce parallélisme suggère que la fraction *UcAC*3F8 est enrichie à plus de 1 000 et 2 000 fois en molécules actives. L'activité spécifique de la fraction *UcAC*3F8 peut être estimée de la manière suivante. La dose optimale d'*Uc*MP est une concentration située entre 10 et 100

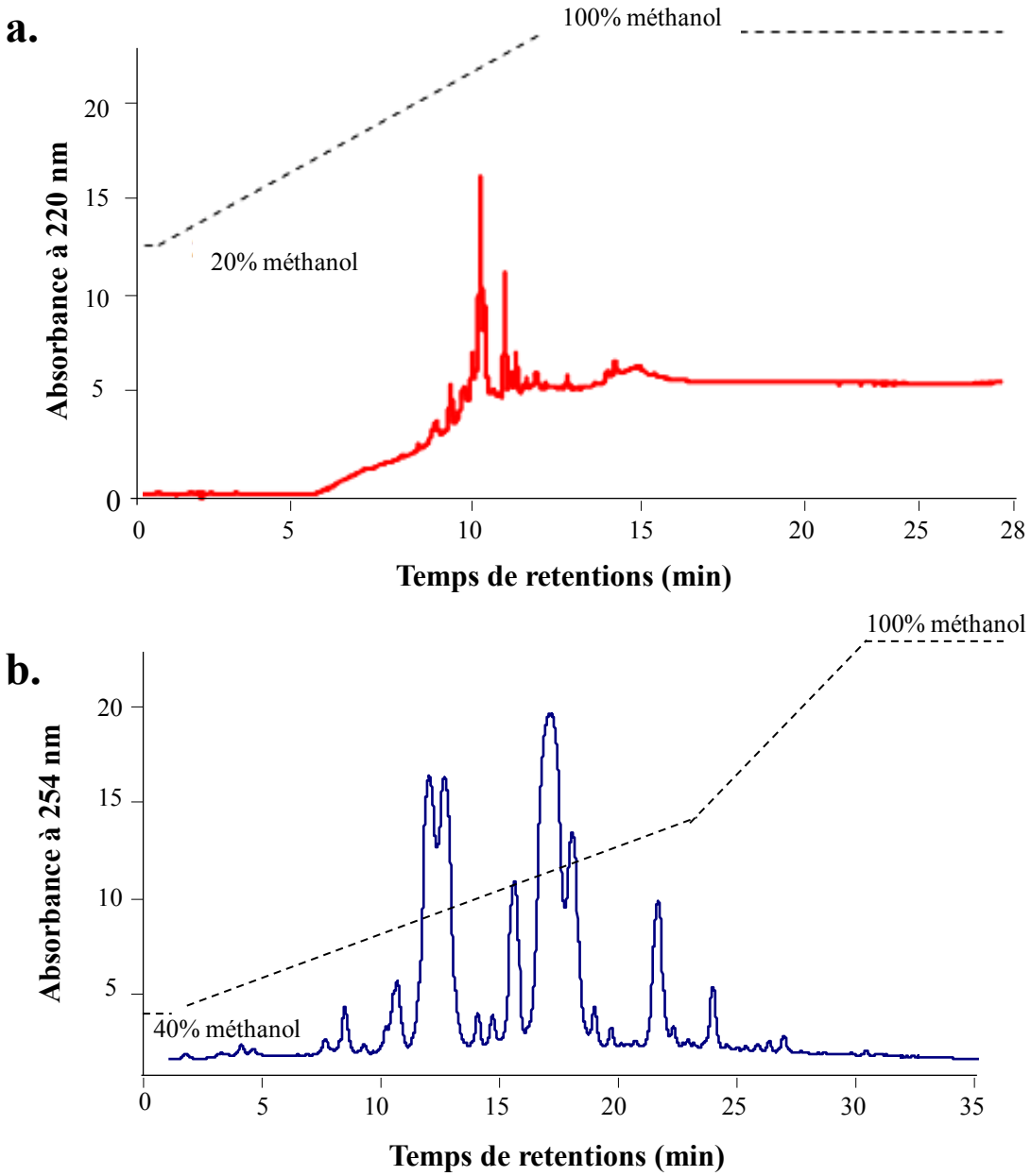


Figure 77: Mise au point du chromatogramme de fractionnement HPLC semi préparatif de la fraction *UcA*C3. **a.** Profil d'élution lors de l'analyse de la fraction *UcA*C3 avec le gradient non optimisé (en noir dans la figure 75). **b.** Profil d'élution avec le gradient optimisé du fractionnement HPLC en phase inverse semi préparatif à un débit de 4 ml/min. Notez que la différence de profil ne provient pas de la différence de la longueur d'onde utilisée.

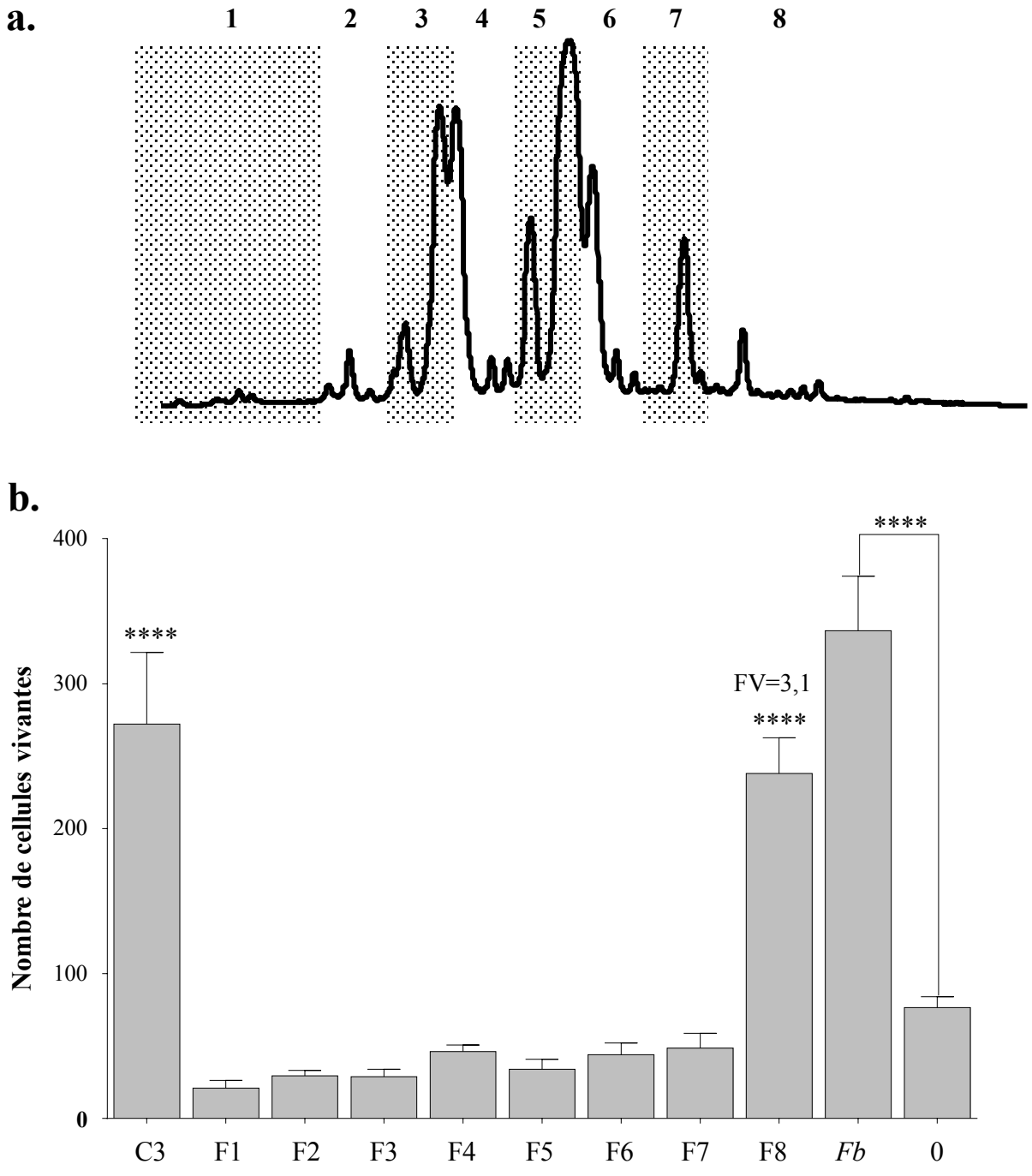


Figure 78: Effet des 8 fractions issues du fractionnement d'*UcA*C3 sur la viabilité des photorécepteurs à cônes: a. Profil chromatographique lors du fractionnement de la fraction *UcA*C3 par HPLC semi préparatif en phase inverse**. b.** Activité trophique des fractions *UcA*C3F1-F8 testées à 1 µg/ml sur les cultures enrichies en cônes et ensemencées à 10^5 cellules/cm^2. La fraction d'origine, *UcA*C3 (C3) a été testée à 10 µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum* testé à 100 µg/ml. Test statistique ANOVA, test de Dunnet multiple comparatif test **, valeur de $p < 0,0001$

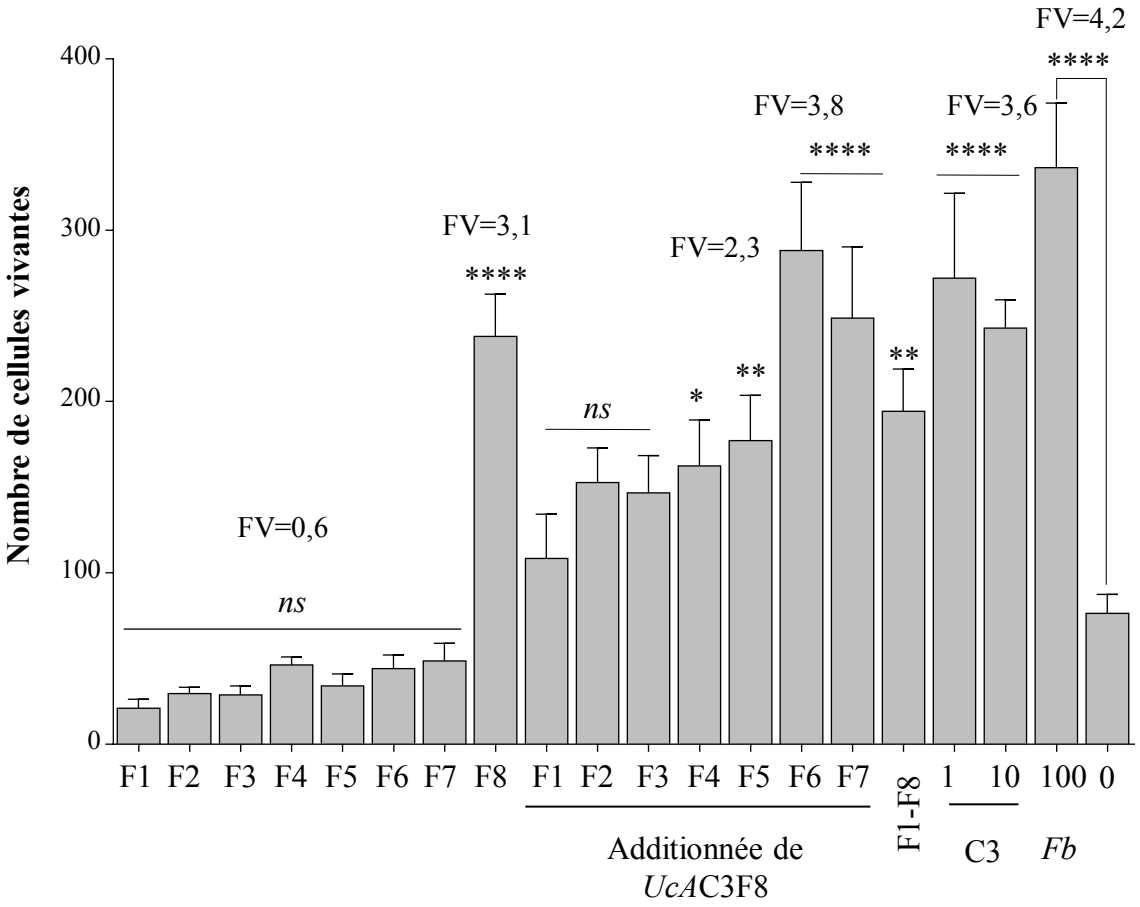


Figure 79: Effet combinatoire des fractions *UcA*C3F1-F8 sur la viabilité des photorécepteurs. Essai combinatoire des fractions *UcA*C3F1 à *UcA*C3F8 testées 1 µg/ml seul ou en combinaison avec *UcA*C3F8 un à un afin de valider la fraction trophique sur des cultures enrichies en cônes ensemencées à 2 x 10^5 cellules/cm^2. *UcA*C3 a été reconstitué par réunion des fractions de F1 à F8 et testé à 1 µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité.

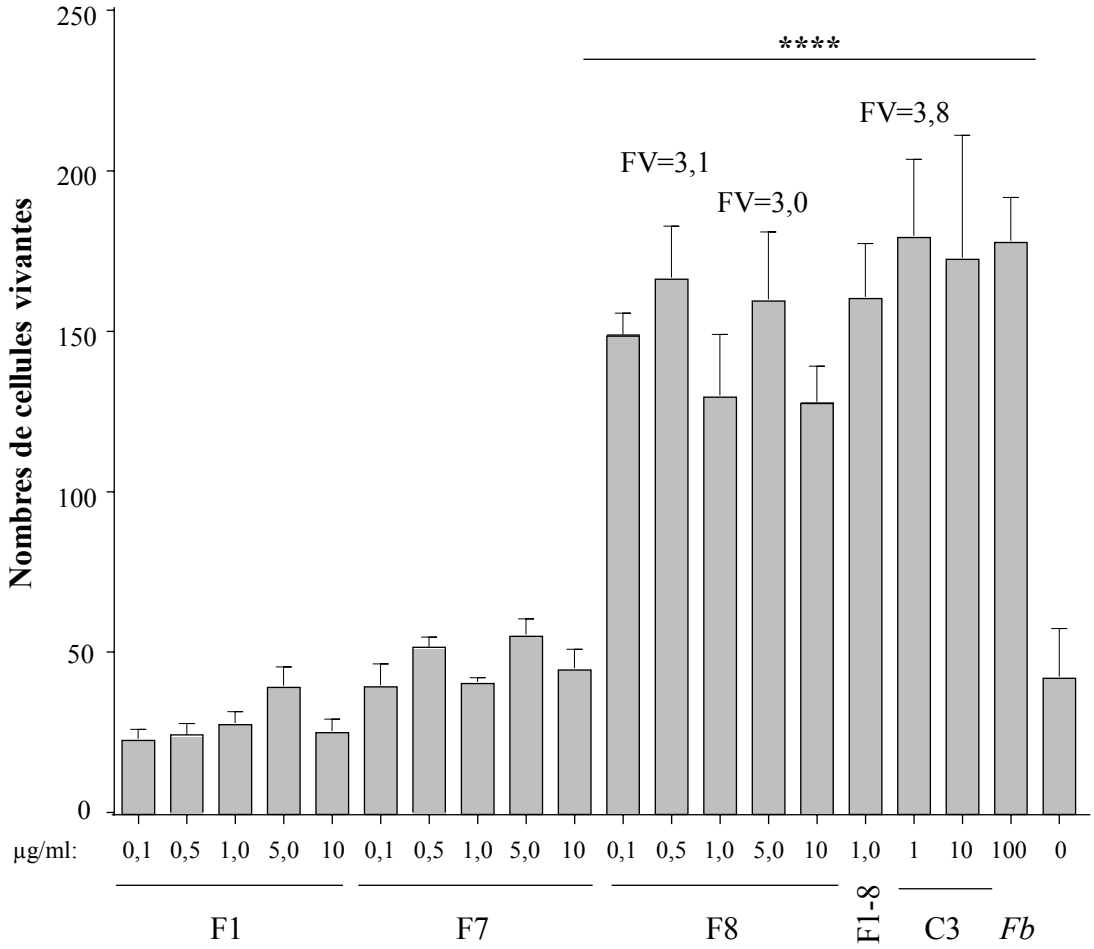


Figure 80: Effet dose-réponse des fractions *UcA*C3F1, *UcA*C3F7 et *UcA*C3F8 sur la survie des cônes. Les fractions ont été testées dans une gamme de concentration de 0,1 à 10 µg/ml sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. Analyse statistique option comparaisons multiples dans un test de Dunnett. (****), valeur de $p < 0,0001$.

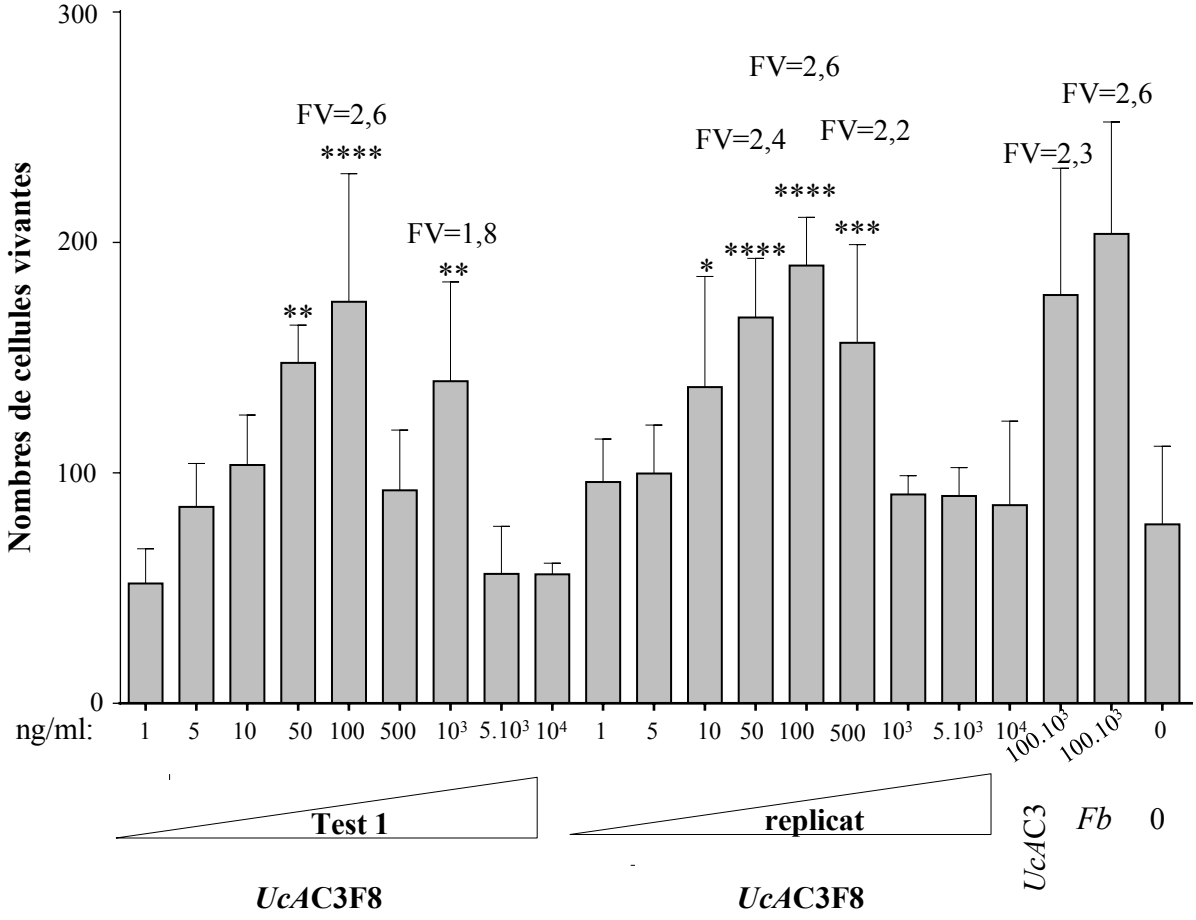


Figure 81: Effet dose de la fraction *UcA*C3F8 sur la viabilité des cônes. *UcA*C3F8 a été testée dans une gamme de concentration de 1 ng/ml à 10 µg/ml sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 2 x 10^5cellules/cm^2. Le témoin de fractionnement est la fraction *UcA*C3 à 100µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité.

µg/ml avec un rendement de fractionnement de 10 à 12%. La dose optimale d'*UcAC*3 est 3 µg/ml avec un rendement de fractionnement de 12%. La dose optimale d'*UcAC*3F8 est 50 à 100 ng/ml avec un rendement de fractionnement de 12%.

III.4.4 MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE TROPHIQUE DE LA FRACTION *UCAC*3F8 D'*UVARIA CHAMAE* SUR UN MODELE ANIMAL DE RETINOPATHIE PIGMENTAIRE

Nous avons jugé qu'à ce stade du projet, et pour éviter un investissement non productif dans la plante *Uvaria chamae*, qu'il était judicieux de tester l'activité de la fraction *UcAC*3F8 sur le modèle murin de la rétinopathie pigmentaire, la souris *rd1* (M&M, chapitre 5 et **Fig**. **54**). Brièvement, des rétines de souris *rd1* (C3H/He@N) âgées de 35 jours ont été disséquées et incubées sous forme d'explants rétiniens pendant 7 jours avec la fraction *UcAC*3F8 à la concentration de 0,5 µg/ml. Pour chacun des deux groupes 7 rétines ont été traitées, Après marquage des cônes, la mesure de la densité des cônes a été réalisée grâce à e-conome (Clérin *et al.*, 2011). La dose testée sur ces explants excède de cinq fois la dose optimale pour les cultures enrichies en cônes car nous avons pris en considération que le tissu rétinien était potentiellement capable d'adsorber une partie des molécules actives **(Fig**. **81**). Notre choix était guidé par notre expérience des deux systèmes expérimentaux, même si on peut concevoir que ce choix comporte un risque. L'effet trophique de la fraction *UcAC*3F8 pour une concentration de 0,5 µg/ml est difficilement discernable du fait de la présence d'une valeur aberrante dans le groupe témoin (**Fig**. **82a**). La densité des cônes est pourtant plus élevée pour les explants traités (2 549 ± 121) que pour les explants contrôles (2 439 ± 124). L'application de la fonction « identified outlier » autorise l'exclusion de la valeur aberrante en réduisant une valeur pour chacun des deux groupes. L'application d'un test-t non appariés avec une correction de Mann-Whitney démontre que la fraction d'*UcAC*3F8 présente un effet tropique significatif sur la survie des cônes de la souris *rd1* (**Fig**. **82b**). La densité des cônes est significativement plus élevée pour explants traités (2 659 ± 60) que pour les explants contrôles (2 317 ±31). Ces résultats justifient l'énergie investie dans la poursuite de la purification des molécules actives contenues dans les feuilles d'*Uvaria chamae*.

III.4.5 ANALYSE DE LA FRACTION *UCAC*3F8 PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

À ce stade du fractionnement, nous avons voulu évaluer la complexité de la fraction *UcAC*3F8 en mesurant les masses des molécules contenues dans cette fraction par « electrospray ionization » (ESI) (M&M, chapitre 4, **Fig**. **47**). Nous avons dans un premier temps optimisé la séparation de 38 entités chimiques contenues dans cette fraction (**Fig**. **83**). Les masses des molécules contenues dans les 38 pics avec des temps de rétention entre 4,56 et 46,99 min ont été mesurées par spectrométrie de masse en utilisant l'ionisation par électronébulisation (ESI). Cette analyse a conduit à la conclusion que la fraction F8 contient au moins 85 molécules avec des masses nominales allant de 328 à 1 284 Da (**Table 7**). Afin d'extraire les informations publiquement accessibles, nous avons recueilli de la base de données bibliographiques SciFinders tous les composés naturels qui ont été trouvés dans des extraits d'*Uvaria chamae*. Un filtre a été appliqué pour ne retenir que les molécules ayant une structure connue (100% de résolution structurelle) correspondant à des molécules ayant un

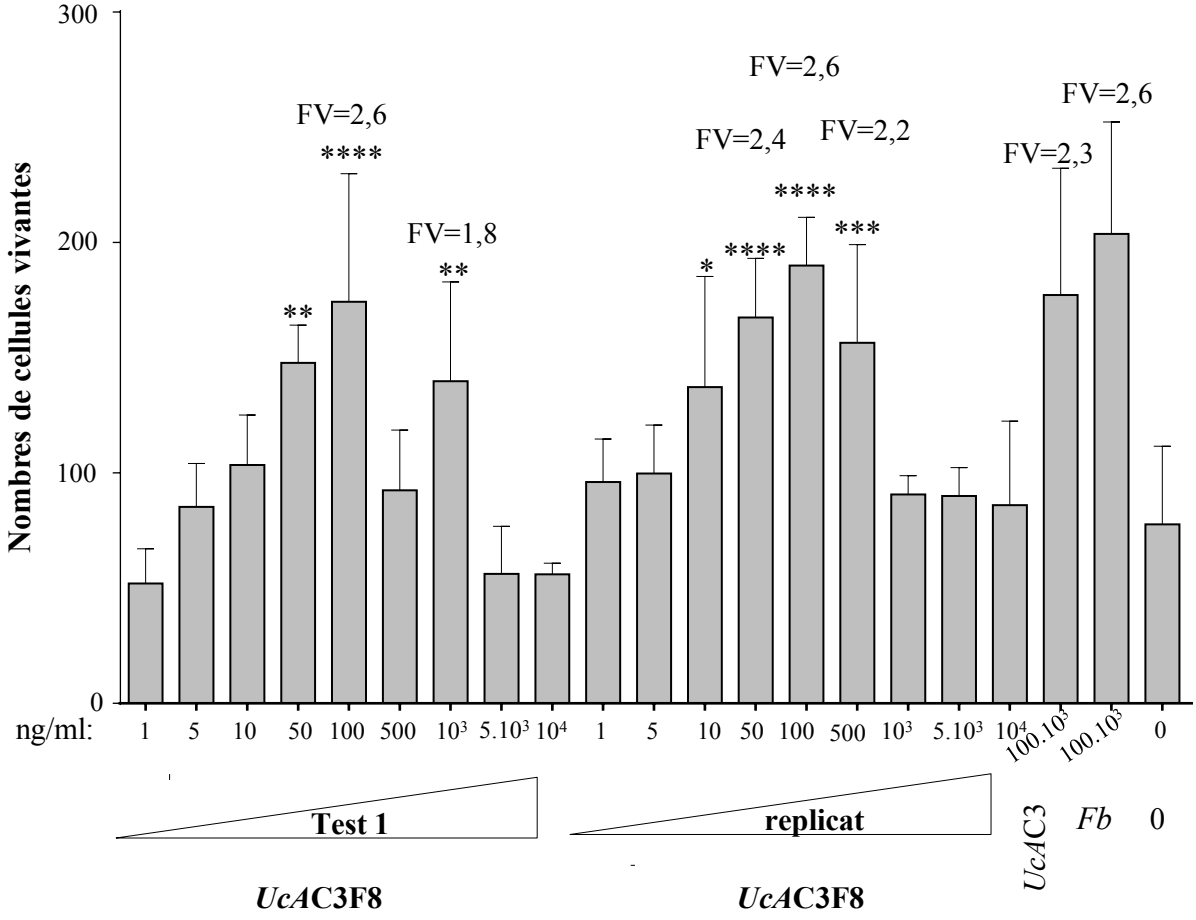


Figure 81: Effet dose de la fraction *UcA*C3F8 sur la viabilité des cônes. *UcA*C3F8 a été testée dans une gamme de concentration de 1 ng/ml à 10 µg/ml sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 2 x 10^5cellules/cm^2. Le témoin de fractionnement est la fraction *UcA*C3 à 100µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité.

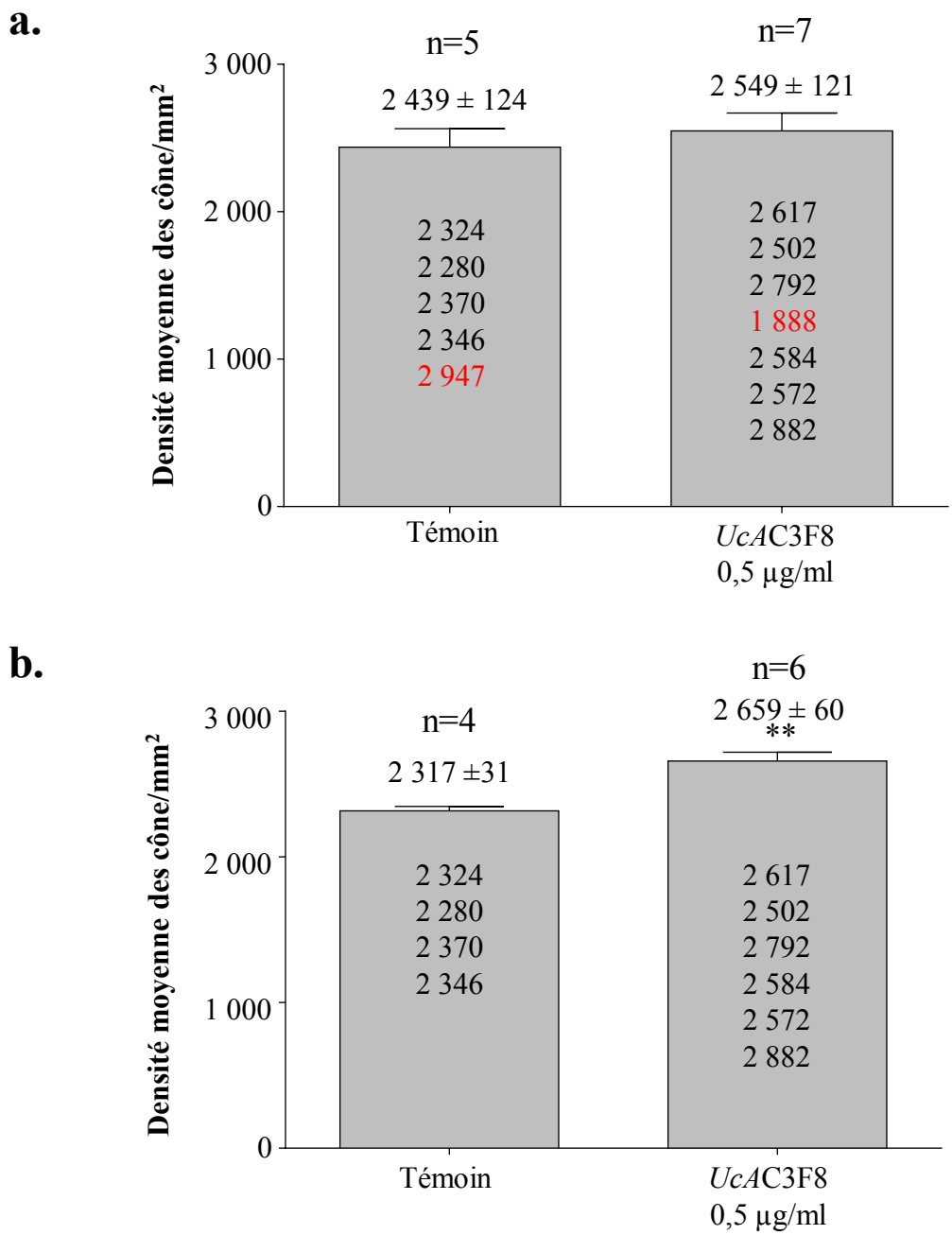


Figure 82: Effet trophique de la fraction UcAC3F8 d'*Uvaria chamae* sur les cônes de la souris *rd1*. a. Densité des cônes des explants de la souris *rd1*, sept jours après culture en présence ou en en absence de la fraction *UcA*C3F8 à 0,5 µg/ml pour la moyenne des explants. Les valeurs aberrantes sont indiquées en rouge. **b.** Densité des cônes des explants de la souris *rd1*, sept jours après culture en présence ou en en absence de la fraction *UcA*C3F8 à 0,5 µg/ml pour la moyenne des 6 explants après exclusion de deux valeurs aberrantes, exclusion autorisée par la fonction « identified outlier » de graphpad. Test statistique de Welch non apparié t-test, valeur de p = 0,0014.

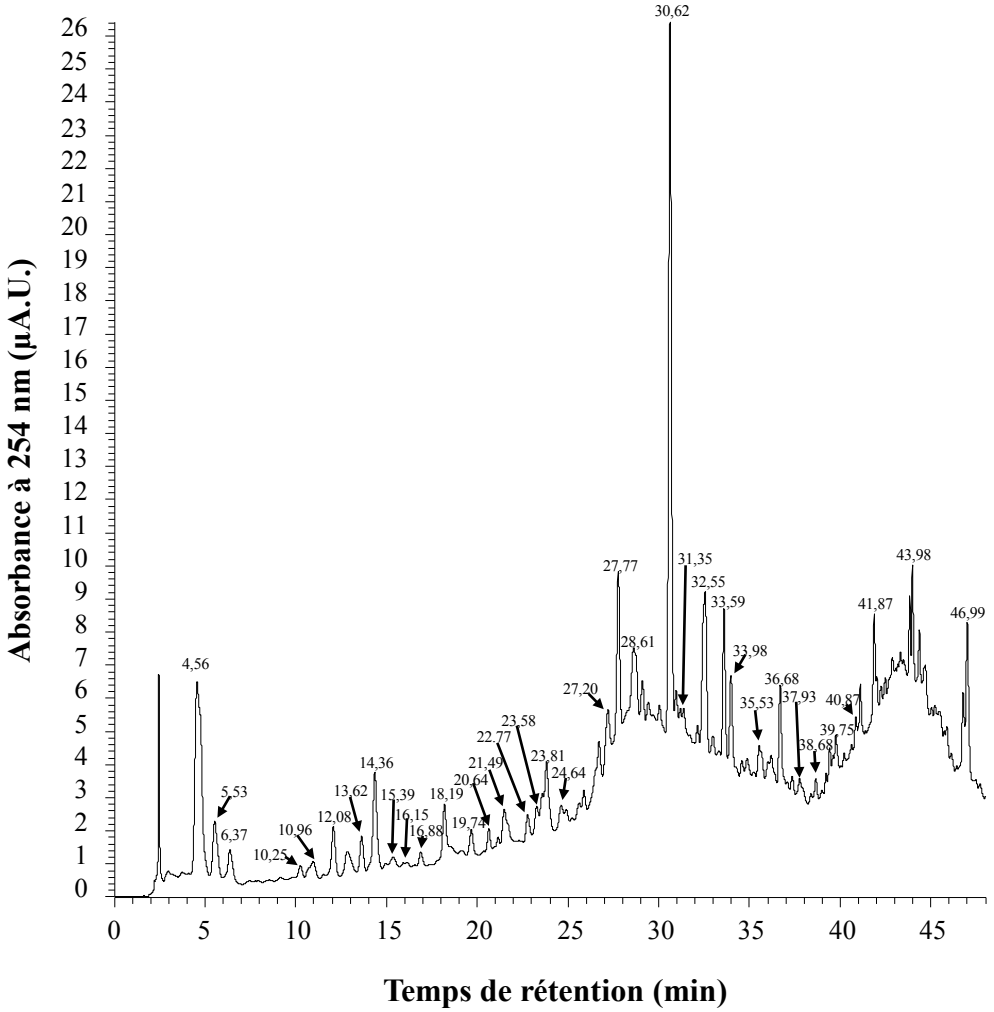


Figure 83: Analyse par spectrométrie de masse de la fraction *UcA*C3F8 d'*Uvaria chamae*. Profil HPLC qui a permis de caractériser 38 entités chimiques distinctes. Les chiffres sur le profil indiquent les temps de rétention des différents pics analysés par « electrospray ionization » (ESI).

Table 7: MOLECULES IDENTIFIEES DANS LA FRACTION UCAC3F8 D'UVARIA CHAMAE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE, Les identifications ont été réalisées en utilisant une combinaison de temps de rétention, du rapport m/z et des informations publiquement disponibles, *Le spectre d'absorption UV confirme l'identité de composé,

Temps de rétention (min)	UV 254 nm	Min/Max UV Absorbance	m/z	m/z-H^+ Hypothèse 1	1.1.1 m/z-Na^+ 1.1.2 Hypothesis 2 1.1.3	1.1.4 MS Intensité 1.1.5	1.1.6 Bibliographie
4,56	+++	257/317/366	328	327	305		
			750	749	727		
			423	422	400		
			522	521	499		
			650	649	627		
5,53	+	342/403	471	470	448	++	
			773	772	750		
			387	386	364		
			257	256	234		*(S)-5,dihydroxyflavanone ***(Antimicrobien)*** Benzene, 1-methoxy-2-[(phenylmethoxy)methyl]- o-Methoxybenzyl benzyl ether ***(Antitumoral)***
6,37		236/274/300	422	421	399	+	
10,25	+		360	359	337	+	
			242	243	219		o-Anisyl benzoate
			450	449	427		
10,96	+	265/312/349	281	280	258		3-phenyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanone
			370	369	347		
			656	655	633		
12,08	+	236/273/343	323	322	300	++	Anguvetin ***(Antimicrobien, cytotoxique)***
			392	391	369		
12,76		270/315/383	323	322	300	+	1-(2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylphenyl)-3-phenyl-1-propanone ***(Antitumoral)***
			670	669	647		
13,62		271/318/379	757	756	734		
			371	370	348		
			365	364	342		
14,36	++	314/366/409	373	372	350		
			745	744	722	++	
15,39		273/305/365	670	669	647		
			464	463	441		
			536	535	513		
16,15		273/360/402	536	535	513	++	
			815	814	792		
			390	389	367		
16,88		273/318/376	670	669	647		
17,80		233/312/379	712	711	689		
18,19	+	274/314	365	364	342	+++	
			751	750	728		
			305	304	282		
19,74		234/307/412	337	336	314		
			727	726	704		
20,64			791	790	768		

21,49		322/379	712	711	689		
			873	872	850		
22,77			365	364	342		
			434	433	411		
23,58			857	856	834		
23,81	++	308/415	379	378	356		
			319	318	296		
			769	768	746		
24,64		269/310	578	577	555	+	*Diepoxyrollin ***(Antitumoral)**
			407	406	384		
			915	914	892		
27,20		265/300	557	556	534		
			620	619	597		
			702	701	679		
			279	278	256		
27,77	+++		385	384	362	++++	(S)-chamanetin, flavonoid ***(Antitumoral)***
			712	711	689		
28,61			724	723	701		
30,06		276/310	668	667	645		
			476	475	453		
30,62	+++++ +++	259/408	641	640	618	+	
31,35			507	506	484		Diuvaretin, Flavonoid ***(Bactéricide, Antiseptique)***
32,55	++	565/646/ 663/490	427	426	404	+++	
33,59	++		325	324	302		Nornantenine Alkaloid ***(Cytotoxique)***
33,98	+	444/565/ 644	640	639	617		
			766	765	743		
			1039	1038	1016		
			373	372	350		
			333	332	310		
			723	722	700		
35,53			653	652	630		
			329	328	306		
			799	798	776		
36,68	+		749	748	726		
37,93		271/390	635	634	612		
			553	552	530		
			641	640	618		
			859	858	836		
38,68	++	274/382	611	610	588		Tripoxyrollin, Acetogenin ***(Antitumoral)***
39,75		276/390	627	626	604	++	Chamuvarinin, Acetogenin ***(Antitumoral)***
41,87	++		1001	1000	978		
			1001	1000	978		
43,98	++		1015	1014	992	+	
46,99	+++		1144	1143	1121	+	
			1284	1283	1261		
			792	791	769		

numéro d'accession dans « chemical abstracts service » (CAS), et rejeter tous les dérivés de molécules avec une définition structurelle incomplète. De 188 molécules associées à *Uvaria chamae* dans la base de données publique, le filtre a sélectionné 97 molécules constituant l'*Uvaria*-Database. Des rapports m/z avec les deux hypothèses concernant les adduits (H+ ou Na+), nous avons pu identifier 12 molécules (**Table7**). Nous avons ensuite utilisé l'intensité relative de l'absorbance à 254 nm, le temps de rétention et le spectre d'absorption minimale et maximale pour s'assurer que la masse retenue était en accord avec le temps de rétention et le spectre UV. Six des 12 molécules sont connues pour leur activité antitumorale, deux portent une activité antimicrobienne ou bactéricide et deux autres molécules sont cytotoxiques. Aucune des douze molécules n'est associée à une activité neuroprotectrice. L'alcaloïde nornantenine est cytotoxique pour la lignée cellulaire de fibroblastes L929 (Philipov *et al.*, 2000). Des 85 espèces moléculaires identifiées par leur masse, nous avons remarqué la très grande proportion 50/85 (59%) de la molécule de masse monoisotopique impaire (**Table 7**). Selon la règle de l'azote, une molécule organique impaire contient un nombre impair d'atomes d'azote, tandis qu'une molécule organique sans atome d'azote ou avec les deux atomes d'azote a une masse paire (par exemple $C_6H_{12}O_6$, m = 180). Cette règle provient du fait que, mis à part l'azote, la plupart des éléments présents dans les molécules présentent une valence et une masse de même parité. Ainsi le carbone a une masse de 12 pour une valence de 4, un atome d'hydrogène de masse 1 a une valence de 1 et l'oxygène 16 une valence de 2. Cependant l'azote de masse 14 a une valence de 3. L'existence d'une grande proportion de masses impaires suggère la présence de molécules comportant un atome d'azote, probablement des alcaloïdes qui sont des molécules basiques facilement ionisés dans le mode ESI+ (**Fig**. **47**).

III.4.6 ANALYSE CHIMIQUE DE LA FRACTION *UCAC*3F8

Afin d'évaluer la nature chimique des molécules biologiquement actives de la fraction *UcAC*3F8 nous avons utilisé un procédé d'extraction liquide-liquide pour la fractionner en trois fractions ayant des propriétés chimiques différentes (M&M, chapitre 6). *UcAC*3F8a est une fraction apolaire contenant des composés tels que les terpénoïdes et les flavonoïdes, *UcAC*3F8b est une fraction enrichie en alcaloïdes et *UcAC*3F8c, une fraction polaire. Avant d'être testées sur des cultures enrichies en cônes, la fraction apolaire *UcAC*3F8a a été scindée en sa composante soluble (apolaire) et insoluble (non testée) dans l'eau. De cet essai, il ressort que la fraction *UcAC*3F8b enrichie en alcaloïdes est active à 10 ng/ml avec un facteur de viabilité de 3,5 alors que la faction apolaire soluble (apolaire + alcaloïdes) est active à 1 µg/ml avec un facteur de viabilité de 2,5 (**Fig**. **84a**). Ces résultats ont pu être confirmés lors d'un deuxième essai totalement indépendant pour lequel les facteurs de viabilité à 100 ng/ml ont été mesurés à 2,3 et 2,9 pour les fractions alcaloïdes et (apolaire + alcaloïdes) respectivement (**Fig**. **84b**). Cette dernière différence n'est pas significative. Ainsi, globalement, ces résultats indiquent que les molécules actives sur les cônes sont probablement des alcaloïdes ou des molécules ayant les mêmes propriétés chimiques.

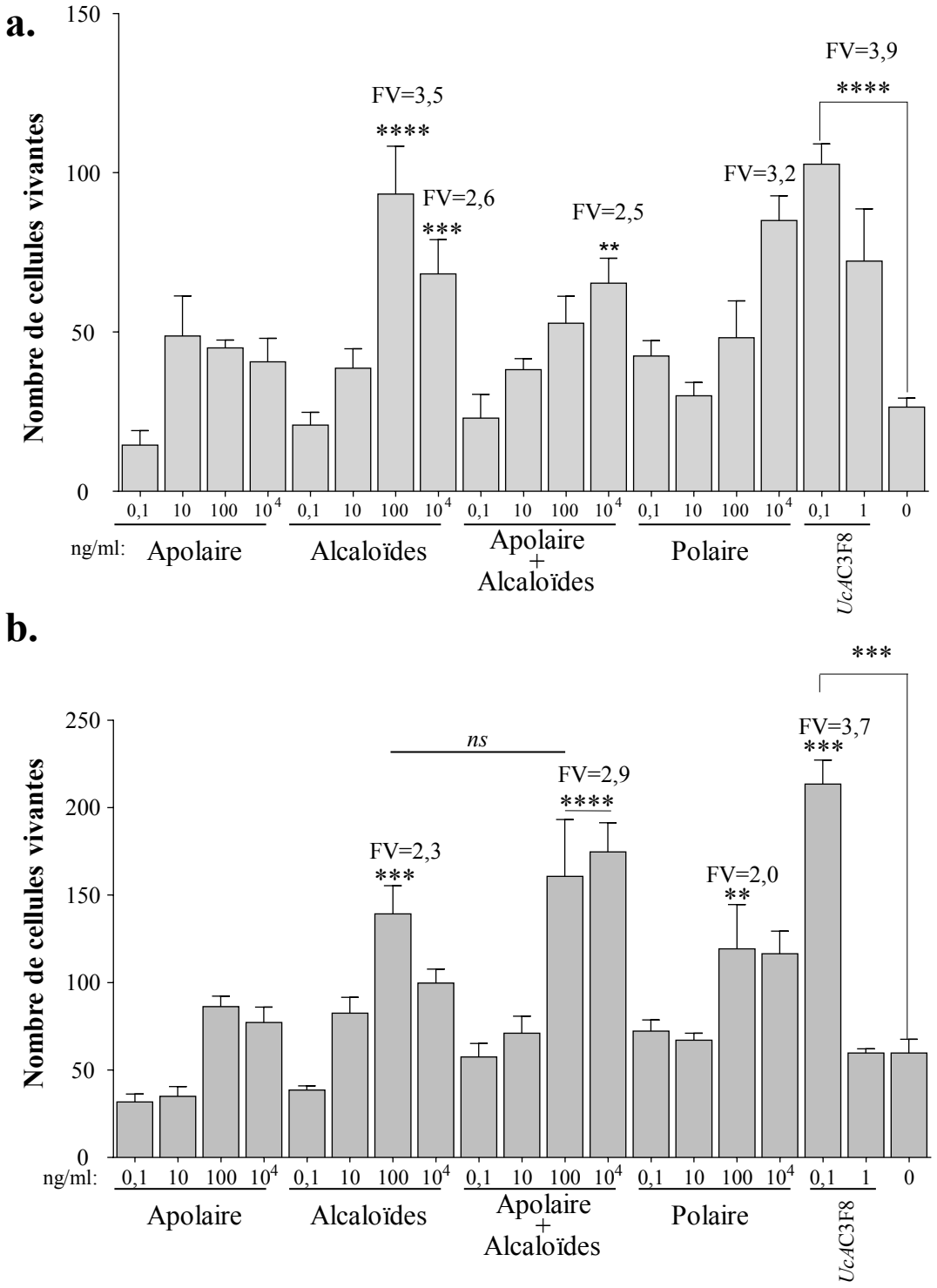


Figure 84: Fractionnement liquide-liquide de la fraction *UcA*C3F8. La fraction *Uc*F8MPC3F8 a été séparée en trois fractions apolaire, polaire et enrichie en alcaloïdes. L'activité de ces fractions sur les cultures enrichies en cônes et ensemencées à 10^5 cellules/cm^2. Les fractions apolaire et enrichie en alcaloïdes ont aussi été testées ensemble selon un mélange 1/1. **a.** Test 1. **b.** Test 2. Analyse statistique option multiple comparaison test de Dunnett. (****), valeur de $p < 0,0001$.

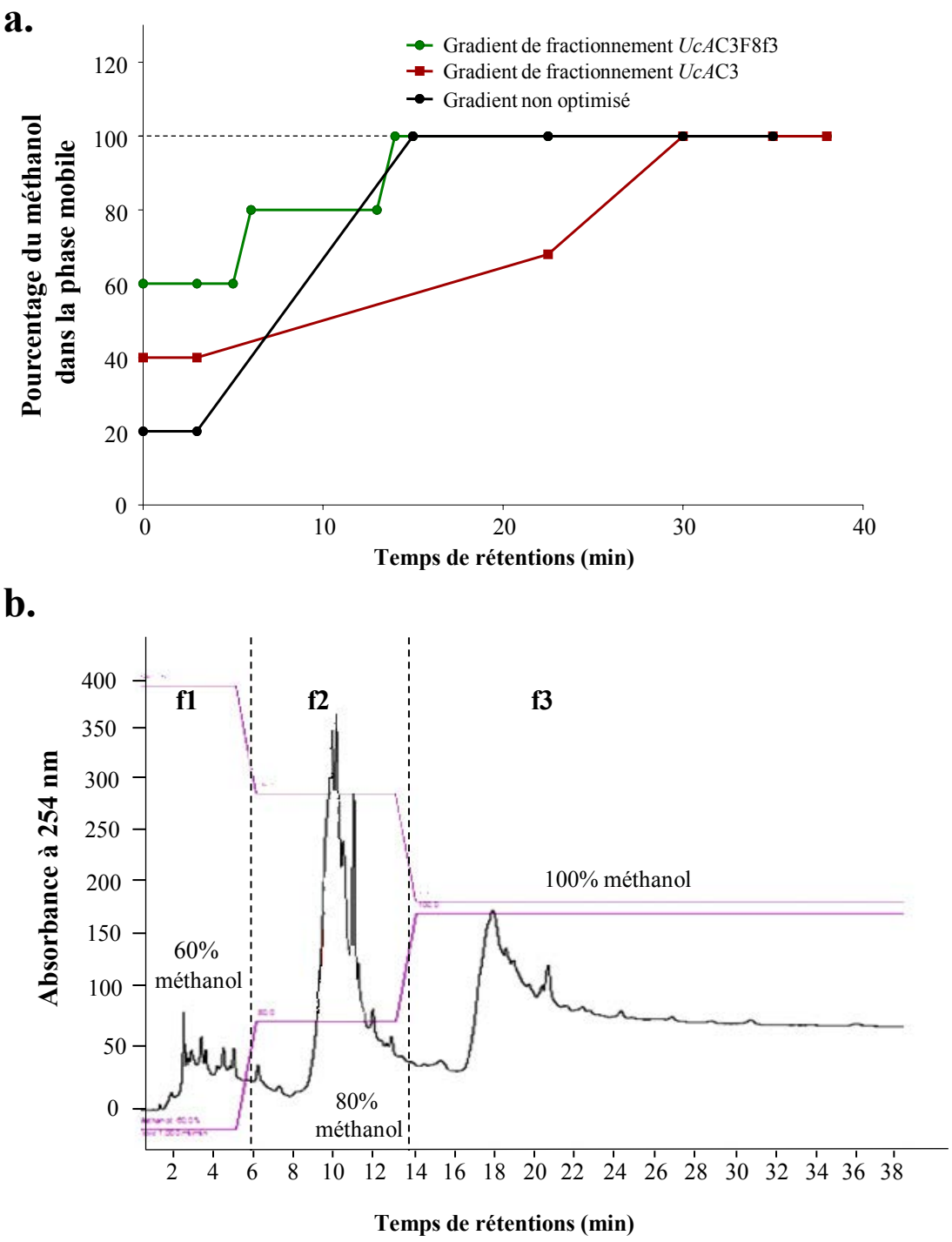


Figure 85. Optimisation du gradient de fractionnement d'*UcA*C3F8. a. Optimisation du gradient de fractionnement en escalier d'*UcA*C3F8 en vert comparé au gradient non optimisé (noir) et celui utilisé pour fractionner *UcA*C3 (rouge). **b.** Profil chromatographique du fractionnement d'*UcA*C3F8 et le contenu des fractions *UcA*C3F8f1, *UcA*C3F8f2 et *UcA*C3F8f3.

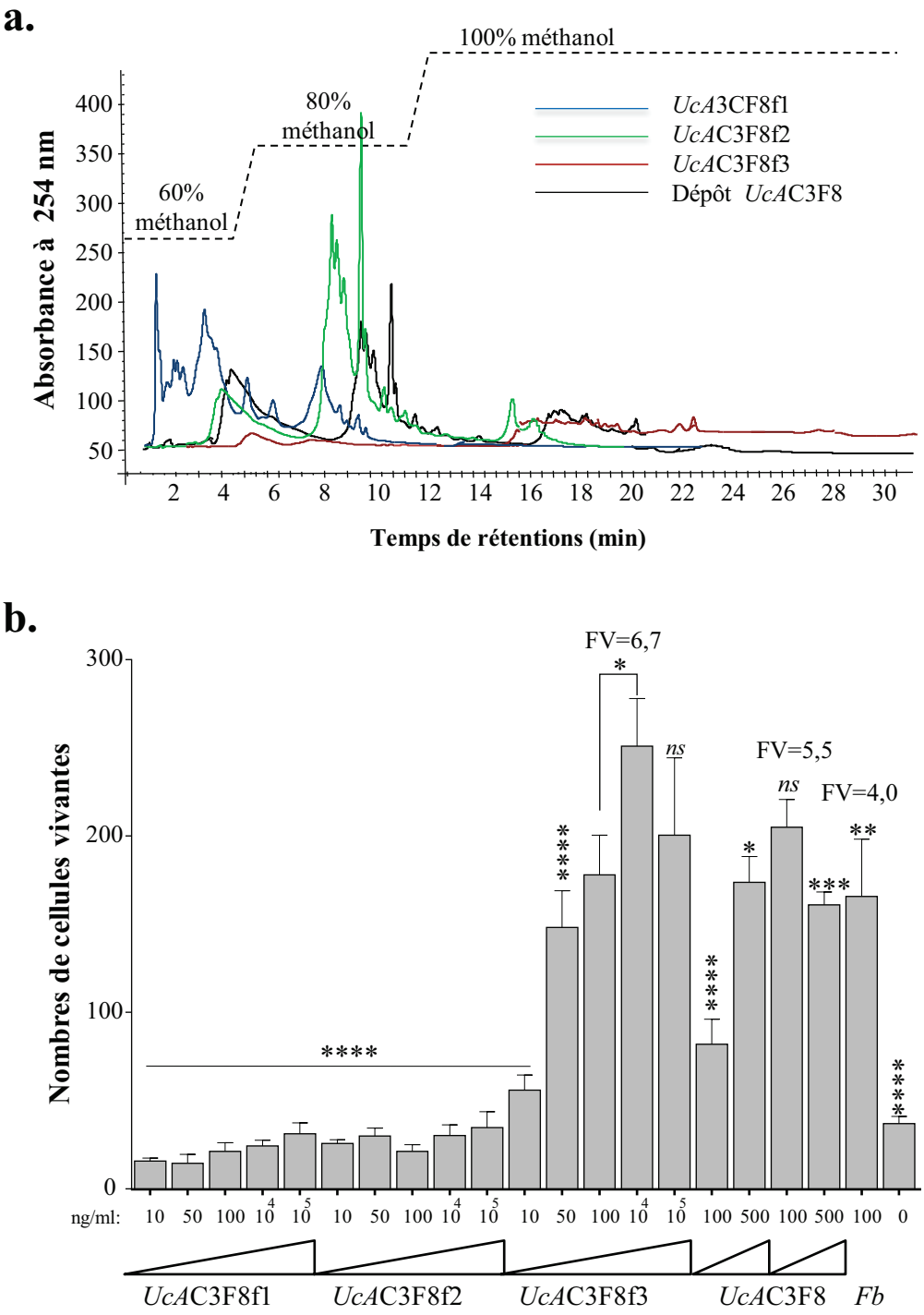


Figure 86: Activité trophique des fractions *UcA*C3F8f1, *UcA*C3F8f3 et *UcA*C3F8f3. a. Profils chromatographiques des trois fractions après collecte. **b.** Effet trophique des fractions *Uc*MC3F8f1,2,3 sur des cultures de cônes ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. Le résultat *Fb* à droite correspondent à une nouvelle préparation de l'extrait *Fb*. FV, facteur de viabilité. L'analyse statistique répartit les valeurs en les comparant à la fraction donnant un FV de 6,7.

III.4.7 FRACTIONNEMENT HPLC D'*UCAC*3F8 EN TROIS FRACTIONS *UCAC*3F8F1, 2 ET 3

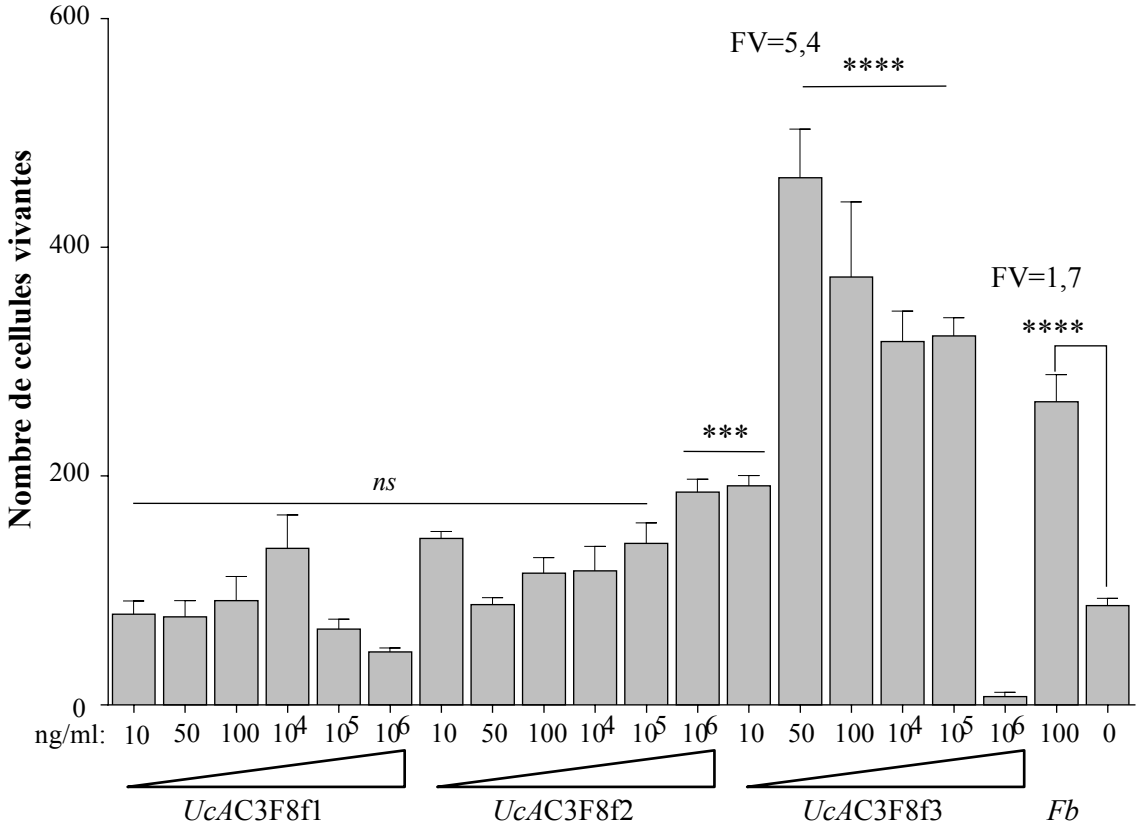
L'analyse chimique n'ayant pas conduit à une partition sans ambiguïté de l'activité trophique, nous avons poursuivi la purification des molécules actives par HPLC en phase inverse. L'optimisation du gradient en vue de fractionnement de la fraction *UcAC*3F8 a été obtenue par augmentation progressive du pourcentage de méthanol par paliers. Un gradient en escalier constitué de trois paliers dont un premier de 5 min à 60% en méthanol est suivi d'une augmentation brusque sur une minute du pourcentage de méthanol jusqu'au second palier de 7 min à 80% en méthanol. Un saut supplémentaire d'une minute permet d'atteindre le palier final de 26 min à 100% en méthanol (**Fig**. **85a**). L'examen du profil chromatographique indique une séparation des composés en trois fractions distinctes f1, f2, f3 selon leurs propriétés chimiques (**Fig**. **85b**). Ceci est confirmé par l'analyse HPLC des trois fractions (**Fig. 86a**). Le fractionnement de l'activité trophique est très tranchée, les fractions *UcAC*3F8f1 et *UcAC*3F8f2 ne possèdent pas d'effet protecteur des cônes. La fraction *UcAC*3F8f3 elle est active à une concentration de 50 ng/ml avec un rendement de production de 49% (**Fig**. **85b**). *UcAC*3F8f3 a une activité protectrice des cônes à la concentration optimale 1 µg/ml avec un facteur de viabilité de 6,7 sur les cultures enrichies en cônes ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. Mais cette même concentration optimale peut être aussi basse que 50 ng/ml avec un facteur de viabilité de 5,4 sur les cultures enrichies en cônes ensemencées à 2 x 10^5 cellules/cm^2, lors d'un essai indépendant (**Fig**. **87a**). La morphologie des cellules marquées à l'aide de la calcéïne dans ce dernier essai montre que les cellules protégées ont les caractéristiques morphologiques des cônes avec leur forme fusoïde et la présence de neurites (**Fig**. **87b**).

III.4.8 FRACTIONNEMENT HPLC D'*UCAC*3F8F3 EN HUIT FRACTIONS *UCAC*3F8F3S1 A *UCAC*3F8F3S8

L'établissement du gradient de fractionnement d'*UcAC*3F8f3 a nécessité l'introduction en début de gradient et pour 12 min d'un solvant organique tertiaire, l'acétonitrile (C_2H_3N), suivi d'un accroissement entre 12 à 30 min pour atteindre un palier de 20 min à 100% méthanol. La nécessité d'introduire l'acétonitrile en début de gradient et non à la fin est à l'opposé des pratiques courantes d'élution consistant à introduire le solvant le plus éluant, c'est-à-dire l'acétonitrile, à la fin. Grâce à cette entorse, les métabolites composants la fraction *UcAC*3F8f3 ont été élués en début de gradient. La longueur de la pente a permis d'étirer le chromatogramme. Le choix et la durée des paliers ont été établis pour permettre une séparation optimale des pics, La fraction *UcAC*3F8f3 a été séparée en huit fractions *UcAC*3F8f3S1 à *UcAC*3F8f3S8 (**Fig**. **88a**). L'essai fonctionnel mesurant indique que les fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 présentent une activité trophique à la concentration optimale de 0,5 et 1 µg/ml respectivement pour des facteurs de viabilité de 2,8 et 3,6 (**Fig**. **88b**). Les rendements de production d'*UcAC*3F8f3S2 et d'*UcAC*3F8f3S4 sont respectivement de 2,5% et de 5,8%. La fraction *UcAC*3F8f3S2 présente un optimum d'activité à 100 ng/ml, tandis que la fraction *UcAC*3F8f3S4, qui est peu miscible dans l'eau et possède un aspect lipidique, a son optimum à 1 µg/ml (**Fig**. **89a**).

À ce stade, deux hypothèses ont été émises. Pour la première, *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 contiennent deux métabolites secondaires différents qui protègent les cônes.

a.



b.

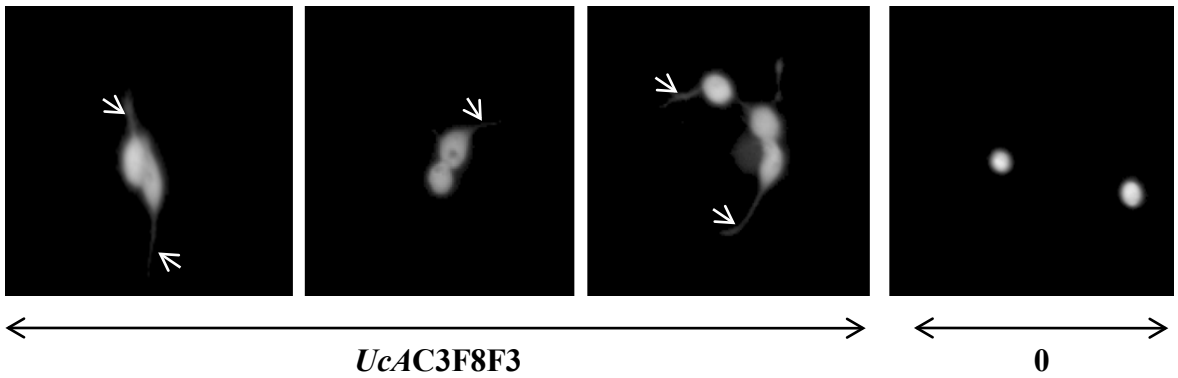


Figure 87: Effet de la fraction *UcA*C3F8f3 d'*Uvaria chamae* sur la morphologie des cônes. a. Effet trophique de la fraction *UcA*C3F8f3 sur les cultures enrichies en cônes et ensemencées à 2 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. Analyse statistique test de Dunnett, valeur de p = 0,001. **b.** Analyse comparative entre la morphologie des cellules en présence et absence d'*UcA*C3F8f3. Notez la présence de neurites (flèches blanches) et l'aspect fusiforme des cellules vivantes marquées à l'aide de la calcéïne.

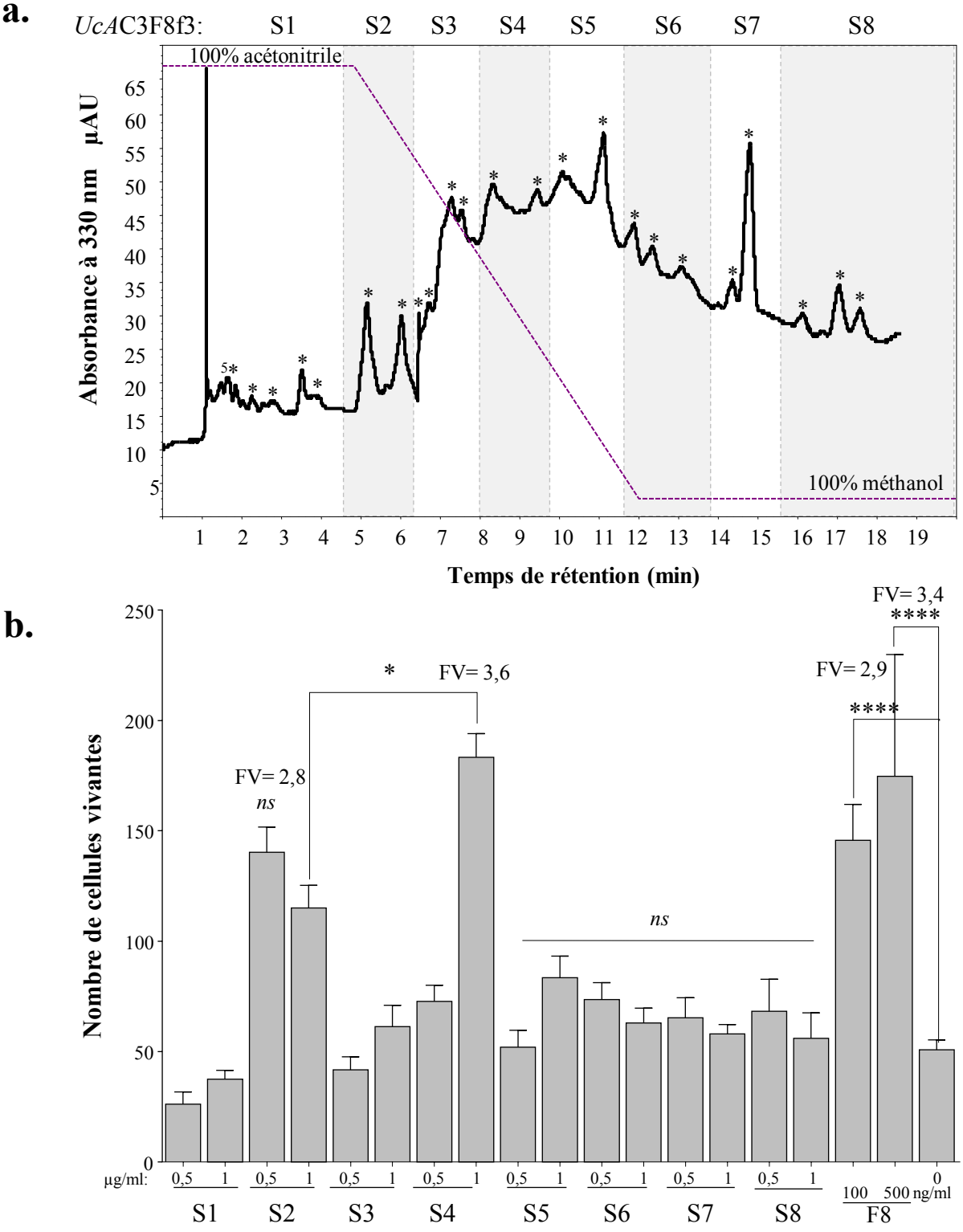


Figure 88: Activité trophique des fractions *UcA*C3F8f3S1 à *UcA*C3F8f3S8 d'*Uvaria chamae*. a. Profil chromatographique du fractionnement d'*UcA*C3F8f3. Les astérisques indiquent la présence d'au moins 27 pics. **b.** Activité trophique des fractions *UcA*C3F8f3S1 à *UcA*C3F8f3S8 sur les cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5cellules/cm^2. Les fractions ont été testées à 0,5 (500) et 1 µg/ml. La fraction *UcA*C3F8 a été testée aux doses optimales de 100 et 500 ng/ml.

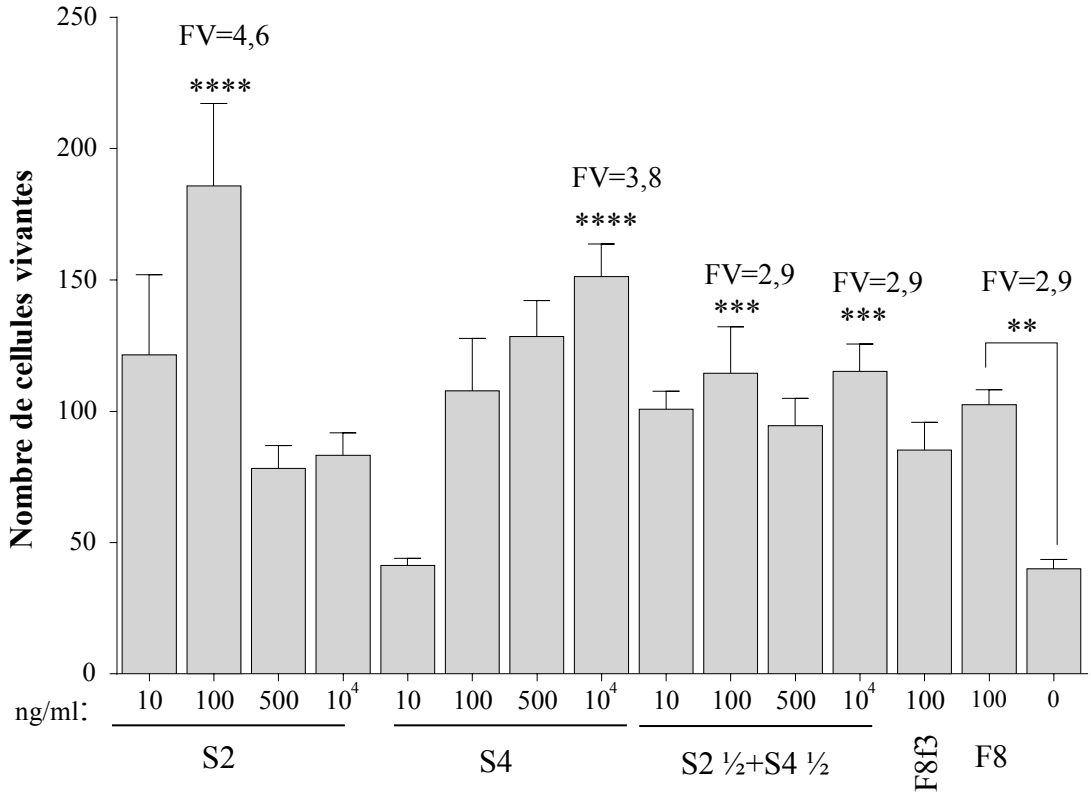


Figure 89: Absence de synergie des fractions *UcA*C3F8f3S2 et *UcA*C3F8f3S4. Les fractions *UcA*C3F8S2 et S4 ont été testées séparément ou conjointement à 10, 100, 500 ng/ml et 1 µg/ml sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. F8 (*UcA*C3F8) et F8f3 (*UcA*C3F8f3): contrôles positifs.

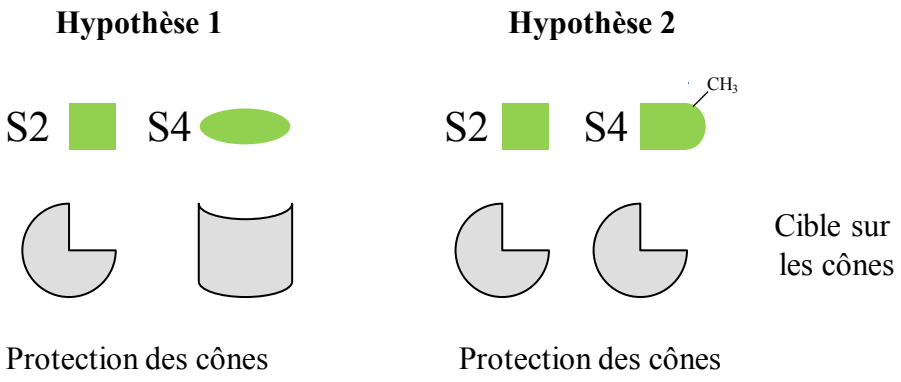
Pour la seconde, la même molécule active est présente dans deux fractions. Pour répondre à cette question nous avons comparé les effets trophiques des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 testées individuellement ou conjointement (rapport en masse 1/1). Aucune synergie n'est observée entre les deux fractions. L'analyse montre donc que nous résultats sont compatibles avec l'hypothèse 2 (**Fig**. **90a**). L'analyse comparative des profils chromatographiques d'*UCAC*3F8F3S4 et *UCAC*3F8F3S2 à 254 nm montre des massifs de pics avec la même dispersion mais dans un axe de temps de rétention différent (**Fig**. **90b**). Ceci pourrait indiquer qu'*UcAC*3f8F3S2 et *UcAC*3F8f3S4 contiendraient certains métabolites communs, dont la molécule active. Mais comme aucune activité trophique n'a pu être observée avec la fraction *UcAC*3F8f3S2, il apparaît que les deux fractions contiendraient plutôt une molécule active (*eg.* S2) et un dérivé ayant des propriétés chromatographiques distinctes mais avec la même activité biologique (*eg.* S4-CH_3), relayée par la même cible sur les cônes (**Fig**. **90a**). Dans ce dernier cas, les deux fractions seraient équivalentes pour ce qui concerne ici notre objectif principal.

Les faibles rendements de fabrication des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4, respectivement 2,5% et 5,8% à partir de la fraction *UcAC*3F8f3, nous ont conduits à répéter la préparation de ces fractions en plus grande quantité pour poursuivre la purification des molécules actives contenues dans les feuilles d'*Uvaria chamae*. Nous avons donc initié une nouvelle préparation à partir de 2,5 kg de feuilles. À ces fins deux lots de 1,5 et 1 kg nous ont été envoyés du Burkina Faso. Chacun de ces lots a servi à préparer des extraits méthanol polyamide à l'aide de la méthode ASE. Ces nouvelles fractions *Uc*MP ont été validées pour la présence d'une activité protectrice des cônes (**Fig**. **91a**). Ce nouvel extrait a été produit avec un rendement de fabrication de 12,6% ce qui équivaut au rendement de fabrication de l'ancien extrait de 12%. Ce nouvel extrait *Uc*MP a été fractionné par extraction en phase solide (SPE) pour produire deux fractions *UcAC*3 (I et II). L'activité biologique de la fraction UcAC3 a été validée aux concentrations optimales 3 µg /ml avec des facteurs de viabilité de 3,4 et 3,3 (**Fig**. **91b**).

III.4.9 FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION *UCAC*3F8F3S2

L'objectif est de casser le massif de pics d'*UcAC*3F8f3S2 élué avec les temps de rétention les plus faibles. Le gradient a donc été modifié par l'inclusion d'une phase de 25 min d'élution avec un mélange constitué de 8% d'eau et 92% d'acétonitrile en début d'élution. Entre 25 à 30 min, le pourcentage de méthanol passe de 0 à 100%. Le chromatogramme à 220 nm d'absorbance montre une séparation optimale ce qui nous a permis de collecter huit sous-fractions *UcAC*3F8f3S2A1 à *UcAC*3F8f3S2A8 (**Fig. 92a**). Des pics absorbant à 400 nm aux temps de rétention 10-18 minutes ont été collectés en A3 (voir **Fig. 93**). L'absorbance de composés à 400 nm peut signifier la présence de molécules de faible absorbance UV, possédant un fort déplacement électronique suivant les transitions Π - Π ou σ-Π, comme les chlorophylles et les carotenoides. Nous avons ainsi remarqué que les fractions actives avaient une coloration jaune (*UcAC*3F8f3S2) et verte (*UcAC*3F8f3S4) avec une odeur d'huile. À ce stade du processus de purification, il est néanmoins hasardeux d'établir un lien entre cette observation et la nature des molécules actives. Lors des tests biologiques réalisés sur les cultures enrichies en cônes, les fractions *UcAC*3F8f3S2A2, A3, A6, A7 montrent la présence de molécules protectrices **(Fig**. **92b)** et semblent avoir une

a.



b.

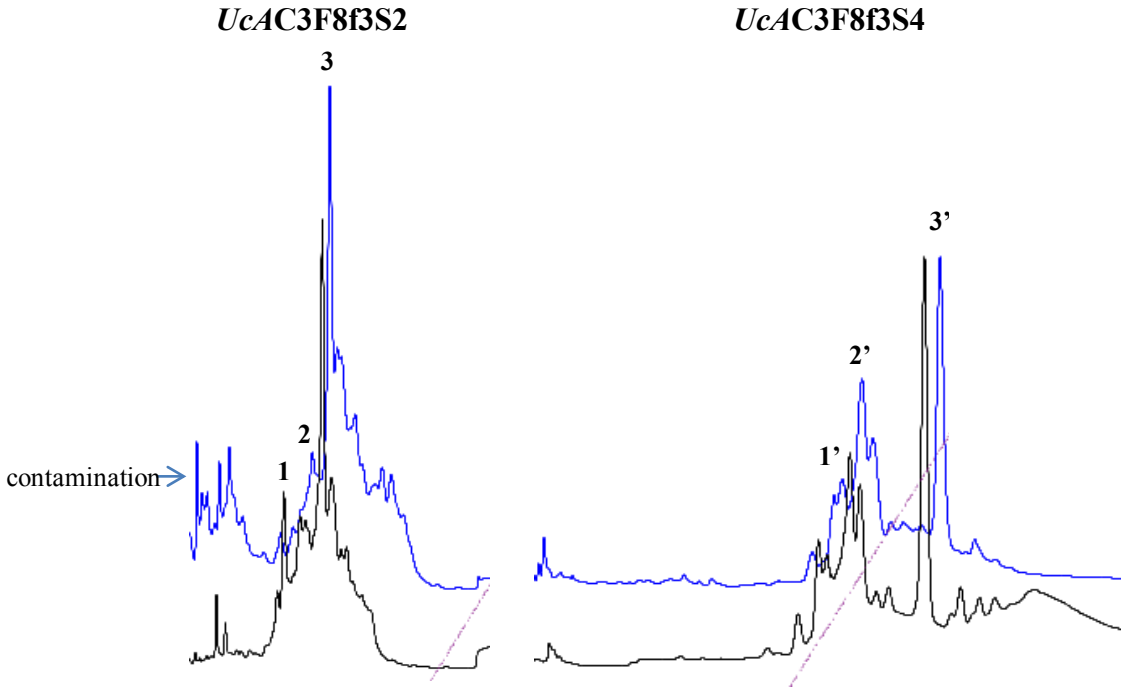


Figure 90. Hypothèse expliquant l'activité biologique portée par les fractions *UcA*C3F8f3S2 et *UcA*C3F8f3S4. a. Schématisation des deux hypothèses formulées. Le groupement alkyl CH3 n'interfère pas avec l'activité du dérivé de la molécule active. **b.** Comparaison des profiles chromatographiques des fractions *UcA*C3F8f3S2 et *UcA*C3F8f3S4 à 254 nm. Deux productions différentes des deux fractions (noir et bleu) ont été analysées. Les pics et massifs de pics similaires entre les fractions S2 et S4 sont numérotés, 1, 1'; 2, 2'; 3, 3'.

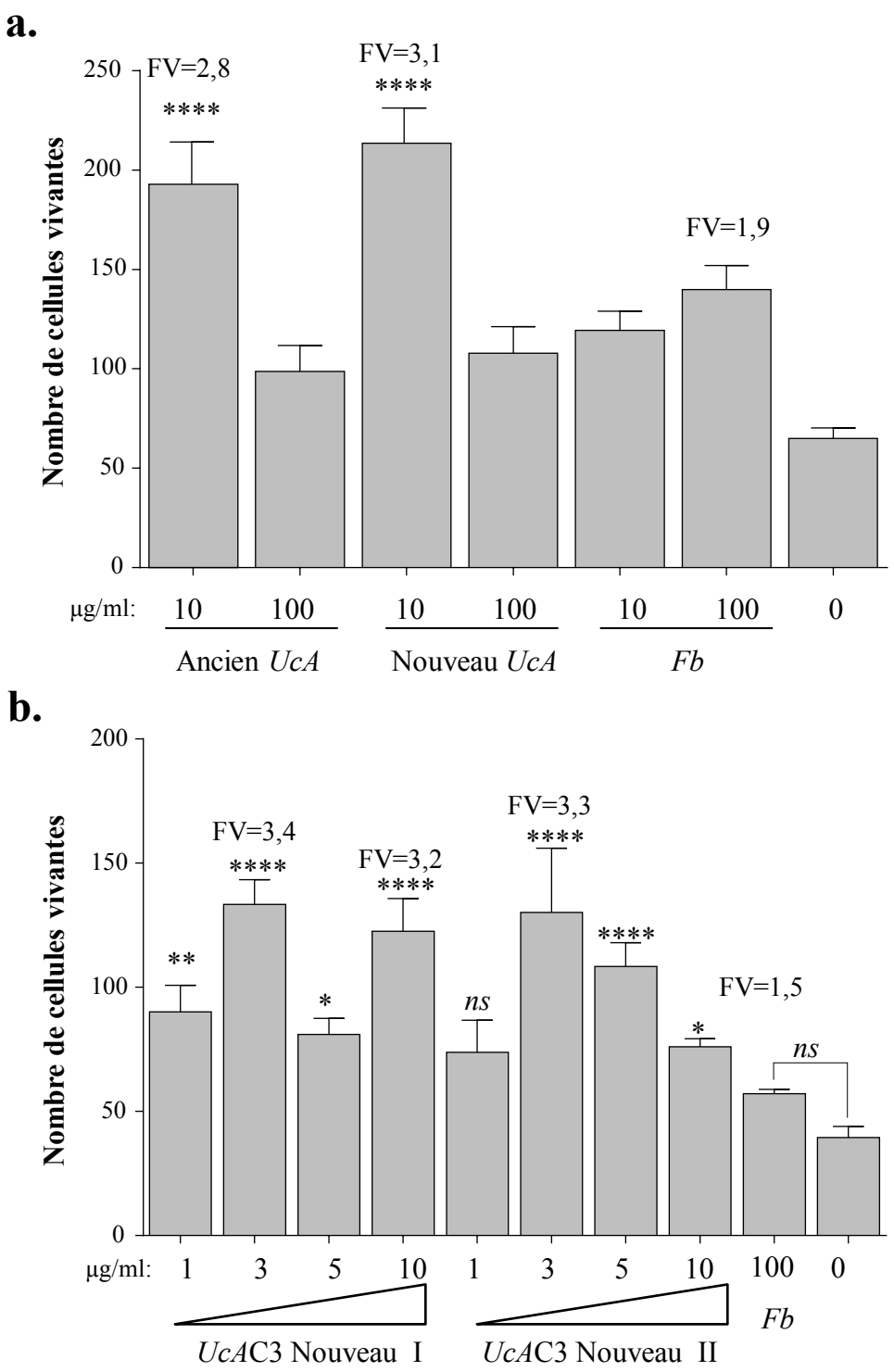


Figure 91: Validation biologique de la nouvelle préparation de la fraction *UcA*. a. Validation de l'effet trophique de la nouvelle préparation de la fraction *UcA*. **b.** Validation de l'effet trophique des deux nouvelles préparations des la fractions *UcA*C3 (I et II). Les tests ont été réalisés sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité.

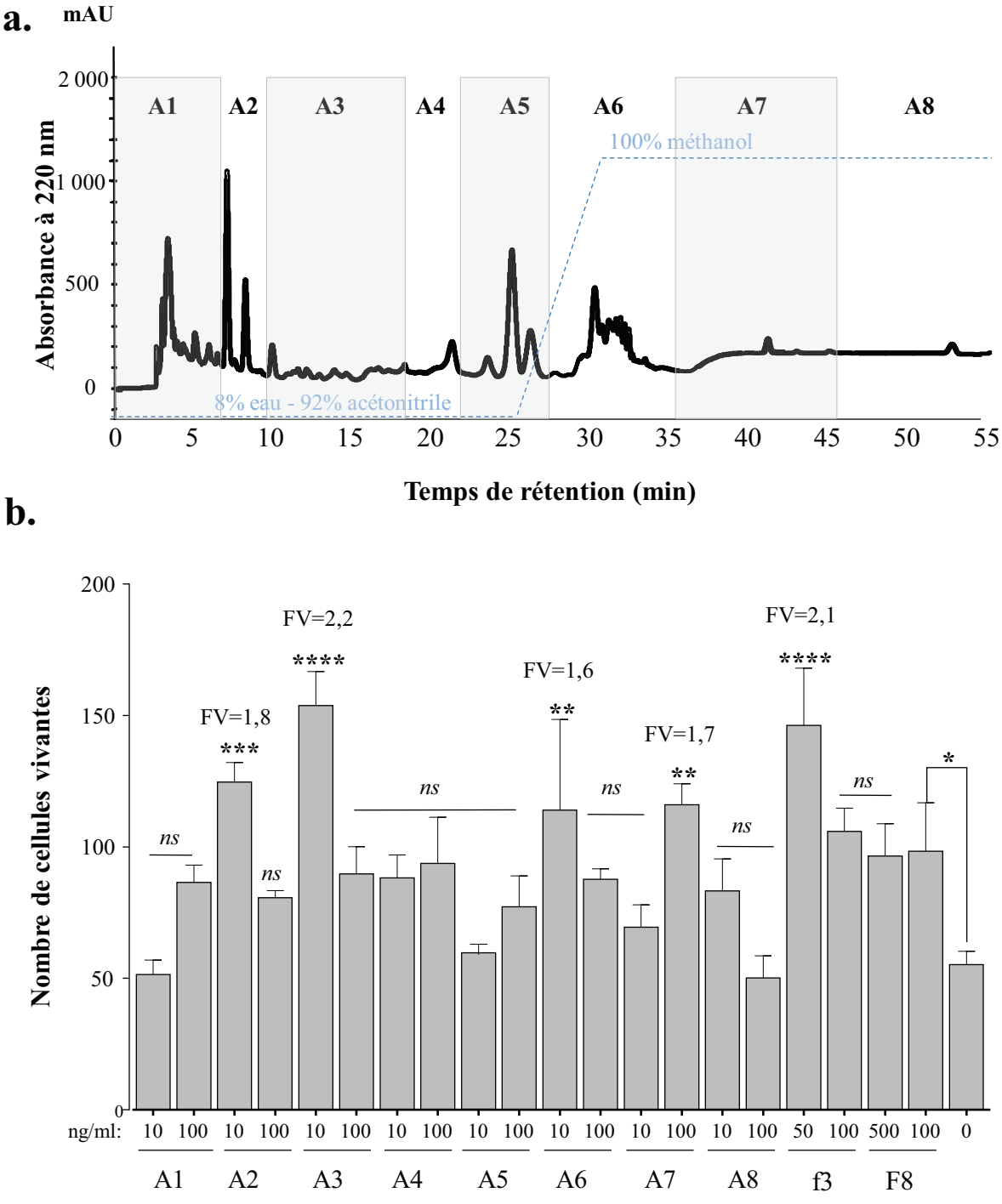


Figure 92: Activité trophique des fractions *UcA*C3F8f3S2A1 à *UcA*C3F8f3S2A8 d'*Uvaria chamae*. **a.** Profil chromatographique du fractionnement d'*UcA*C3F8f3S2 par absorbance à 220 nm **b.** Activité trophique des fractions *UcA*C3F8f3S2A1 à *UcA*C3F8f3S2A8 sur les cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. F8, *UcA*C3F8 et f3 *UcA*C3F8f3.

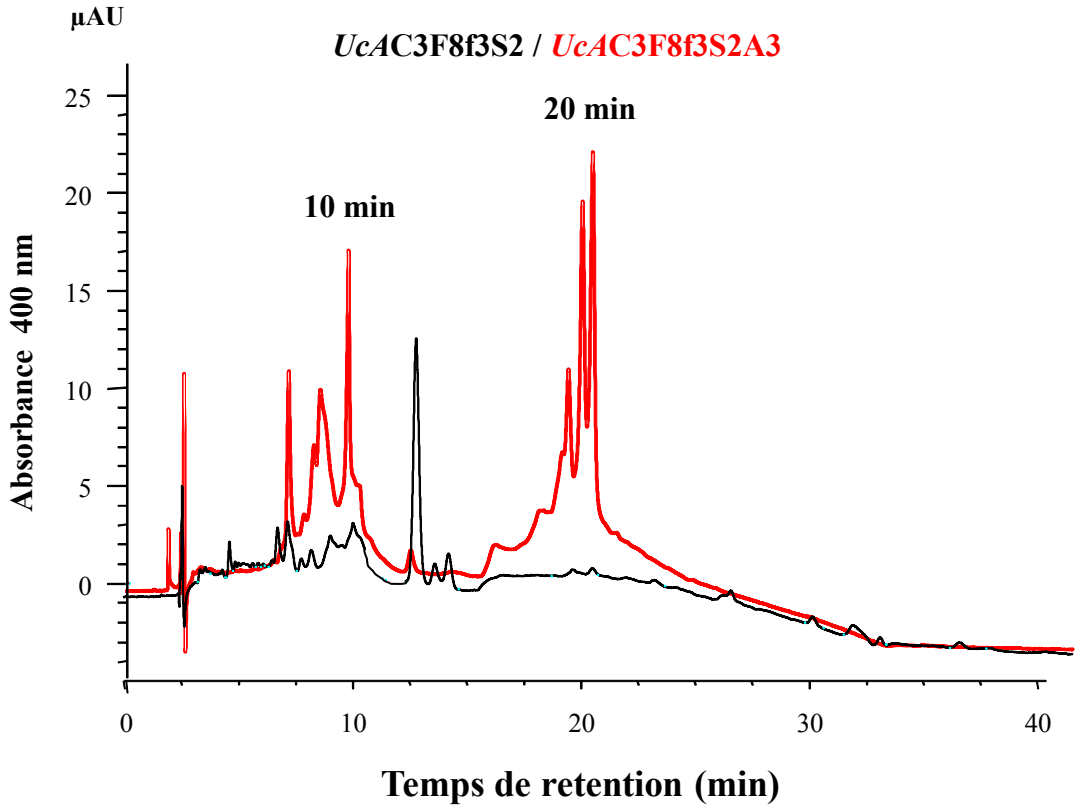


Figure 93: Profils chromatographiques comparatifs des fractions *UcA*C3F8f3S2 et *UcA*C3F8f3S2A3. Le profil d'absorbance à 400 nm de la fraction *UcA*C3F8f3A3 (rouge) présente un enrichissement par rapport au profil d'absorbance de la fraction *UcA*C3F8f3 (noir) aux temps de rétention 10 et 20 min**.**

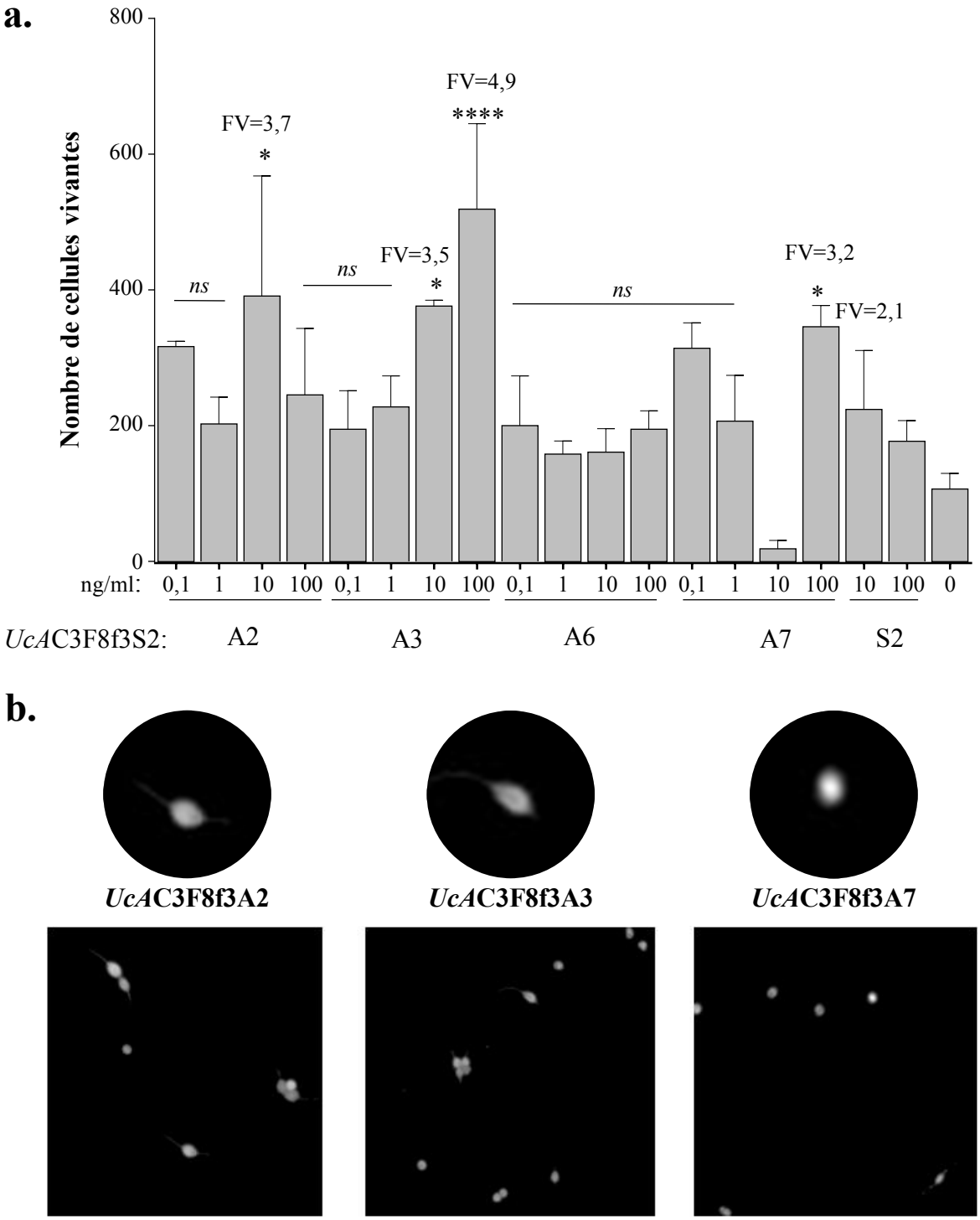


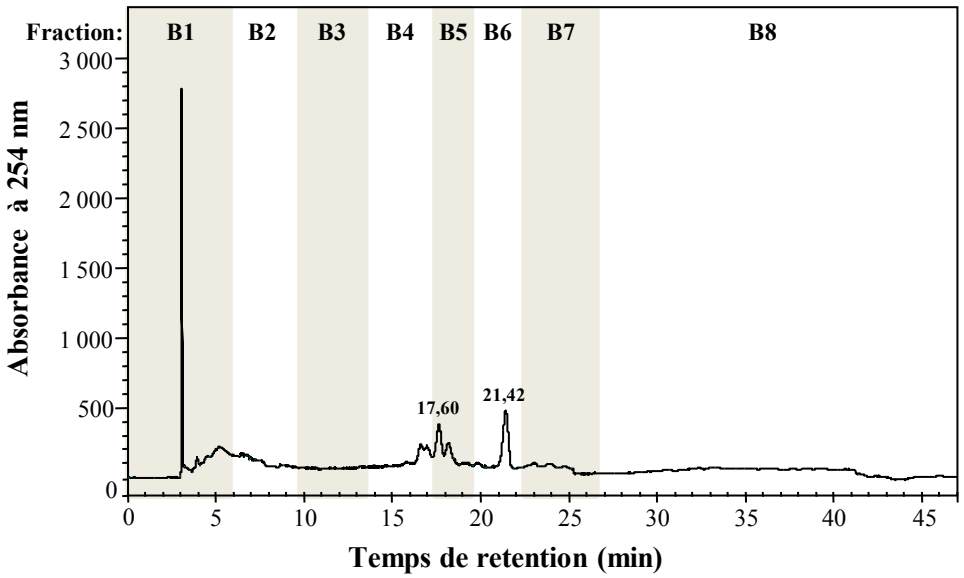
Figure 94: Effets sur la morphologie des cônes de la fraction *UcA*C3F8f3A3. a. effet trophique des fractions *UcA*C3F8f3S2A2, *UcA*C3F8f3S2A3, *UcA*C3F8f3S2A6 et *UcA*C3F8f3S2A7 actives sur les cônes. **b.** Morphologie des cellules vivantes après marquage à la calcéine pour les fractions *UcA*C2F8f3S2A3, *UcA*C2F8f3S2A2 et *UcA*C2F8f3S2A7. Noter la morphologie fusiforme des cellules en A2 et A3 et la morphologie arrondie en A7.

activité protectrice sur la survie des cônes. Les fractions *UcAC*3F8f3S2A2 et *UcAC*3F8f3S2A3 présentent un facteur de viabilité de 1,8 et 2,2 lors des tests à 10 ng/ml. La fraction *UcAC*3F8f3S2A7 n'est active qu'à 100 ng/ml. Lors d'essais réalisés avec des concentrations plus faibles avec les fractions positives, les fractions *UcAC*3F8f3S2A2 et *UcAC*3F8f3S2A3 présentaient un facteur de viabilité de 3,5 et 4,9 aux doses de 10 et 100 ng/ml, alors que la fraction *UcAC*3F8f3S2A6 s'est révélée négative (**Fig**. **94a**). L'étude de la morphologie des cellules vivantes marquées par la calcéine conforte ce résultat en démontrant que la morphologie fusiforme est associée uniquement aux fractions *UcAC*3F8f3S2A2 et *UcAC*3F8f3S2A3 et pas à la fraction *UcAC*3F8f3S2A7 (**Fig**. **94b**). Le rendement de fabrication de la fraction *UcAC*3F8f3S2A3 est de 20%. Un enrichissement de molécules avec des temps de rétention de 10 et 20 min de la fraction *UcAC*3F8f3S2A3 sont clairement identifiés par absorbance à 400 nm lors d'une analyse ultérieure (**Fig**. **93**).

III.4.10 FRACTIONNEMENT DE LA FRACTION *UCAC*3F8F3S4

Le fractionnement d'*UcAC*3F8f3S4 a été réalisé avec un gradient en escalier d'une durée de 38 min démarrant à 100% d'acétonitrile. On a un premier palier de 3-8 minutes à 90% acétonitrile, puis un second palier à 75% acétonitrile / 25% méthanol est atteint en 4 min et a une durée de 3 min et enfin, le palier final est atteint suite à un saut durant 7 min en 45% : 65% acétonitrile : méthanol suivi d'un second saut de 3 min menant au palier à 100% méthanol. *UcAC*3F8f3S4 a donc été fractionné en huit fractions, *UcAC*3F8f3S4B1 à *UcAC*3F8f3S4B8 (**Fig**. **95a**). Les fractions B4 à B7 contiennent des molécules ayant une forte absorbance à 254 nm, et nous avons procédé à la séparation des massifs de pics entre B4 et B5. De plus, la fraction mère *UcAC*3F8f3S4 présente un massif de pics absorbant entre 15-17 min à 220 nm, correspondant au temps de rétention de B4 (non communiqué). L'analyse spectrométrique du pic B4 indique la présence de deux pics avec une absorption maximale à 233 nm suggérant la présence de plusieurs chromophores. L'étude des propriétés biologiques de ces fractions sur les cultures enrichies en cônes montre que les métabolites actifs se trouvent dans les fractions *UcAC*3F8f3S4B2, B3 et B4 et dans une moindre mesure dans la fraction *UcAC*3F8f3S4B8 (**Fig**. **95b**). Lors d'un second essai, aucun effet synergistique n'a été observé lors de la combinaison des fractions *UcAC*3F8f3S4B2, B3 et B4 (**Fig**. **96a**). De plus, c'est la fraction *UcAC*3F8f3S4B4 qui contient les molécules actives à leur plus haute concentration. L'analyse de la morphologique des cellules vivantes en présence des fractions *UcAC*3F8f3S4B2, B3 et B4 montre que B4 induit une morphologie typique des cônes, mais pas les fractions B2 et B3 (**Fig**. **96b**). Une analyse HPLC comparée de la fraction mère *UcAC*3F8f3S4 avec *UcAC*3F8f3S4B4 montre un enrichissement pour les temps de rétention de 13,9 à 17,0 min avec des pics majeurs à 13,93 - 14,37 - 15,14 et 15,57 (**Fig**. **96c**). Nos résultats indiquaient l'existence d'une molécule active (A2-A3) et d'un de ces dérivés (B4) contenus dans les feuilles d'*Uvaria chamae*. Ces deux composés ont été séparés dans les fractions S2 et S4. Pour confirmer cette interprétation, nous avons testé en combinaison les fractions actives A2, A4 issues du fractionnement de S2, et B4, issues de B4. Le facteur de viabilité de l'essai A2/A3/B4 dans un rapport 1/1/1 (4,2) n'est pas significativement différent de celui obtenu avec B4, pris individuellement (3,7) à 100 ng/ml, mais légèrement plus élevé à 10 ng/ml pour A3 (2,7) et la combinaison A2/A3/B4 (3,7) (**Fig**. **97a**). Ces résultats confortent l'hypothèse 2 (**Fig**. **90a**). L'examen de la morphologie des cellules vivantes montre la présence de cellules globalement fusiformes, regroupées par paires ou en amas

a.



b.

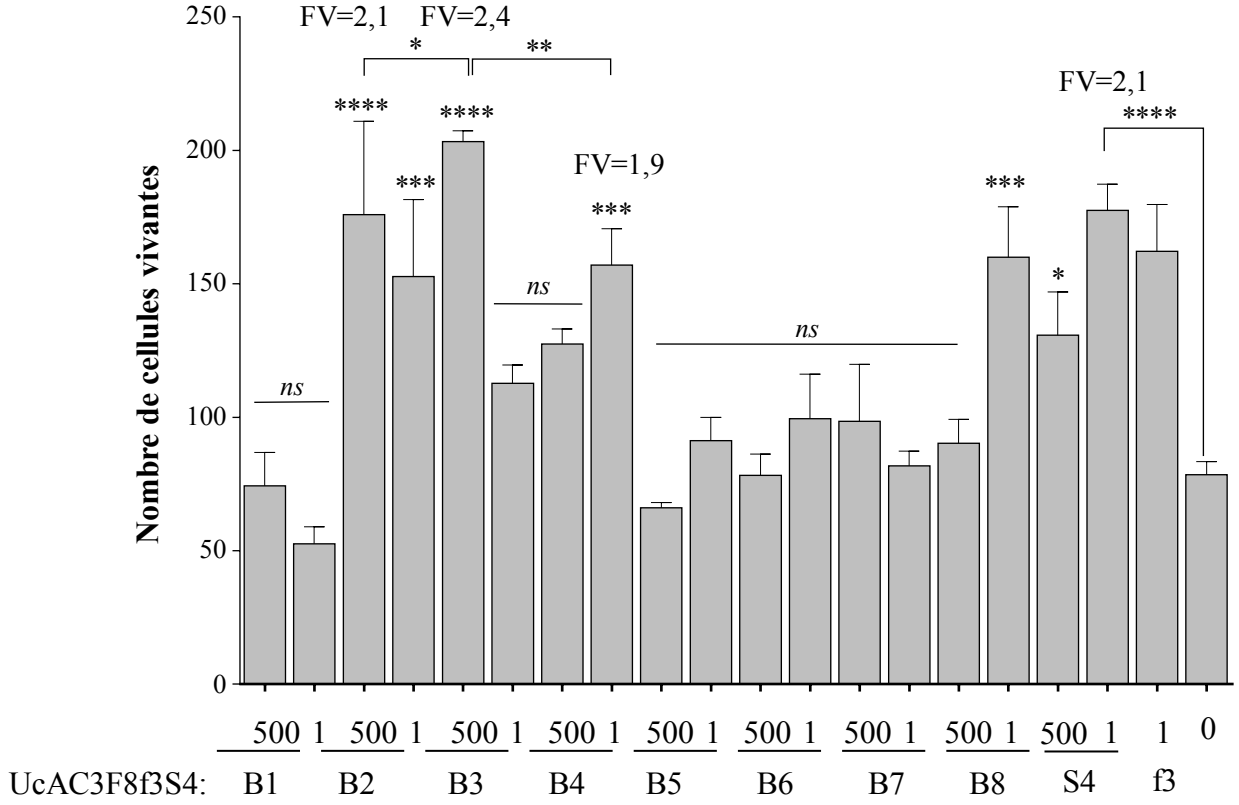


Figure 95: Fractionnement d'*UcA*C3F8f3S4 en *UcA*C3F8f3S4B1 à *UcA*C3F8f3S4B8 d'*Uvaria chamae*. a. Profile chromatographique d'absorbance à 254 nm des huit fractions *UcA*C3F8f3S4B1 à *UcA*C3F8f3S4B8. **b.** Effet trophique des fraction *UcA*C3F8f3S4B1 à *UcA*C3F8f3S4B8 sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10 ^{5}cellules/cm^{2}.

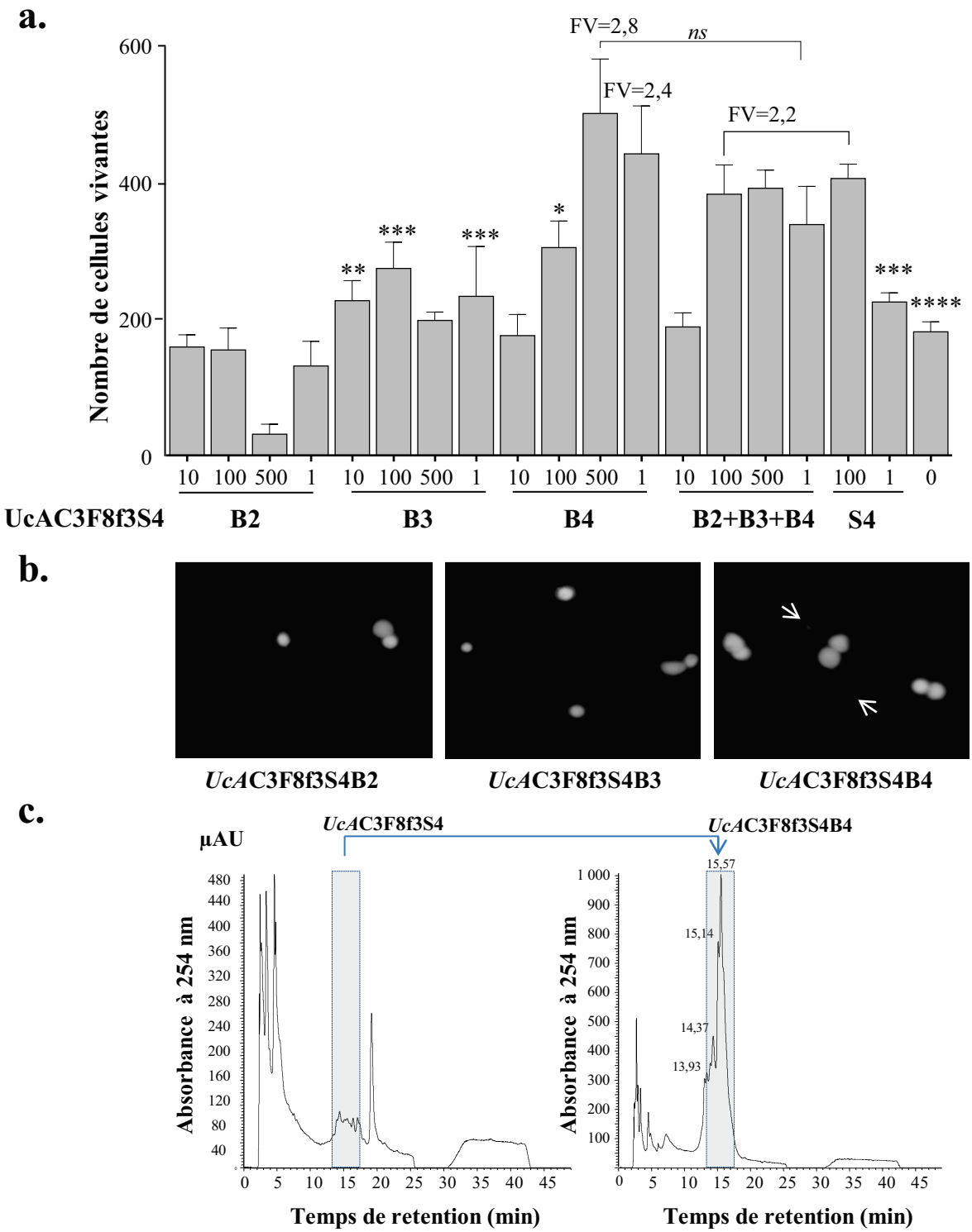
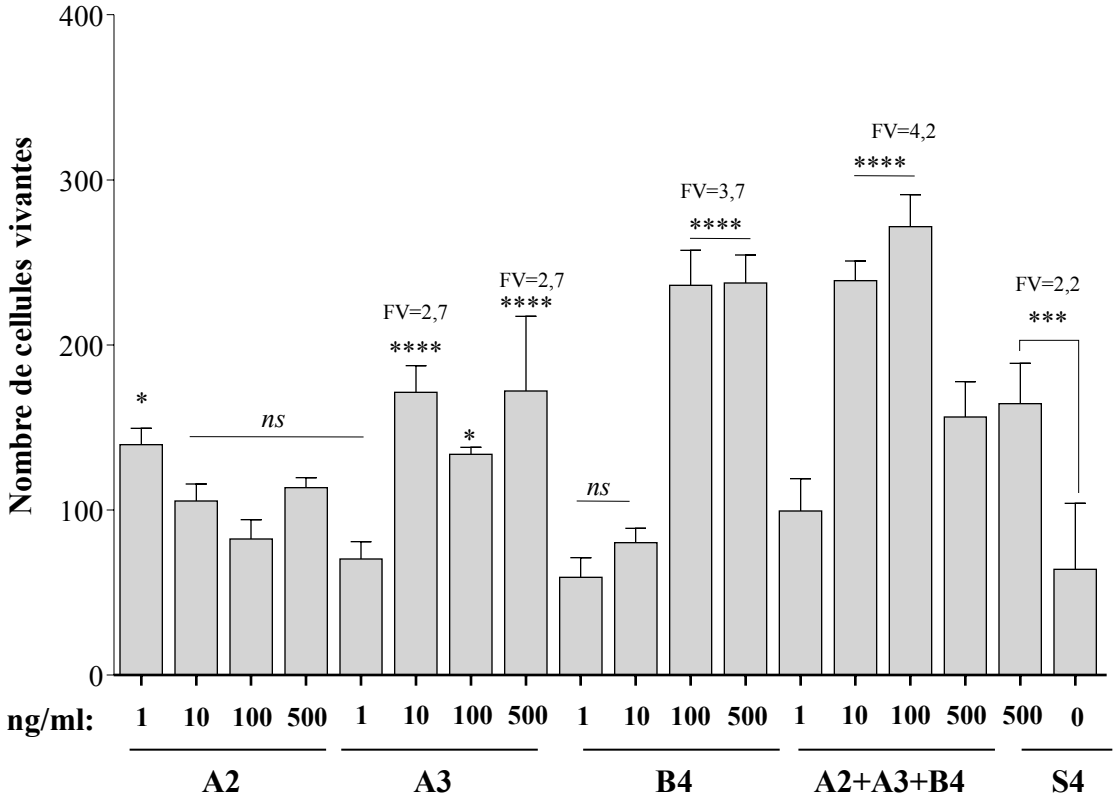


Figure 96: Activité trophique des fractions *UcA*C3F8f3S4B2, *UcA*C3F8f3S4B3 et *UcA*C3F8f3S4B4. a. Activité trophique des fractions B2, B3, B4 et de leur combinaison (1/1/1) sur des cultures enrichies en cônes. L'analyse statistique compare chaque valeur à celle obtenue avec la fraction B4 à 500 ng/ml. **b.** Morphologie des cellules vivantes en présence des fractions B2, B3 et B4 aux concentrations optimales. Les flèches indiquent les neurites. **c.** Analyse HPLC comparative des fractions *UcA*C3F8f3S4 et *UcA*C3F8f3S4B4 montrant un enrichissement dans la zone grisée.

a.



b.

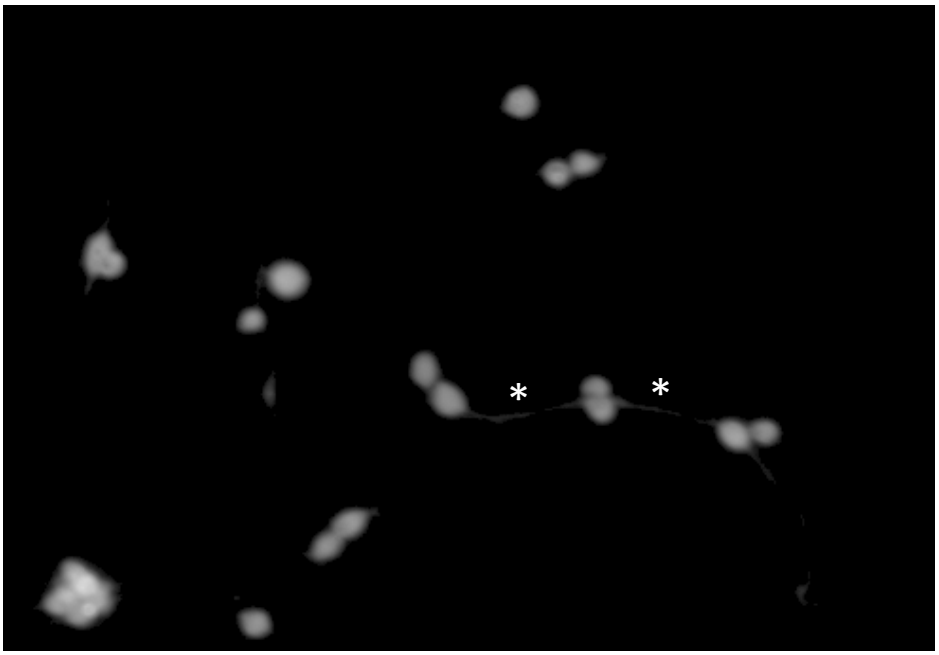


Figure 97. Effet combinatoire des fractions *UcA*C3F8f3S2A2 *UcA*C3F8f3S2A3 et *UcA*C3F8f3S4B4. a. Les fractions actives A2, A3 et B4 ont été testées individuellement ou en combinaison sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. **b.** Morphologie des cellules vivantes marquées à la calcéine de la combinaison des fractions A2/A3/B4. Noter la morphologie fusiforme, l'appariement des cellules par paires et les contacts intercellulaires incluant ceux réalisés à travers des prolongements neuritiques indiqués par des astérisques.

avec des prolongements neuritiques établissant des contacts intercellulaires (**Fig**. **97b**). Ces caractéristiques sont celles de cônes physiologiquement matures.

III.4.11 BILAN DES MASSES OBTENUES DES FRACTIONS ACTIVES *UCAC*3F8F3S2 (A2-A3) ET *UCAC*3F8F3S2B4

Les fractions *UcAC*3F8f3S2, *UcAC*3F8f3S2, *UcAC*3F8f3S2A3 et *UcAC*3F8f3S2B4 ont été analysées par spectrométrie de masse. L'ionisation des molécules a été obtenue par électronébulisation (ESI, M1M, chapitre 4). Des molécules de masse (m/z pour z = 1) de 1 778,30 à 141 ont pu être identifiées (**Table 8**). Considérant au pire une précision de 0,5 Da de nos analyses, le nombre de masses distinctes est de 109 pour *UcAC*3F8f3S2, 87 pour *UcAC*3F8f3S4, 89 pour *UcAC*3F8f3S2A3 et 54 pour *UcAC*3F8f3S4B4. Bien entendu, le nombre de molécules n'est pas directement proportionnel à celui présent dans chaque fraction puisque les fractions les plus pures ont été analysées avec plus de précision. Considérant une masse moyenne de 598 pour les 89 molécules de la fraction *UcAC*3F8f3S2A3 active à 10 ng/ml (**Fig. 97a**), la molécule, si elle est unique, est active à la concentration de 0,188 nM. Considérant l'activité de RdCVF observable à la concentration de 1 ng/ml pour une masse de 12 756, il est actif à la concentration de 0,078 nM.

Du fait des rendements peu élevés de production des fractions actives *UcAC*3F8f3S2A2, A3 et *UcAC*3F8f3S2B4, la quantité de matière résiduelle, 20 mg de fraction *UcAC*3F8f3S2A3 et 15 mg de fraction *UcAC*3F8f3S4B4 ne laissait que très peu de chance de mener le projet jusqu'à la caractérisation de la ou les molécules actives (**Table 9**). Bien que la pinocembrine de masse 256,3 (**Table 7**) se trouve potentiellement présente dans les fractions *UcAC*3F8f3S2A2, il est impossible de se focaliser sur les molécules présentes dans les extraits *UcAC*3F8f3S2A2, A3 et *UcAC*3F8f3S2B4 sans courir le risque de passer à côté des molécules à l'origine de l'activité trophique détectée dans les feuilles d'*Uvaria chamae*. Nous avons donc réalisé une simulation destinée à déterminer quelle quantité de matériel biologique était nécessaire à la purification et la caractérisation des molécules actives (**Table 9**). Nous avons ajouté deux étapes supplémentaires avec des rendements fictifs de 10% pour atteindre le degré de pureté nécessaire à la caractérisation des molécules actives contenues respectivement dans les fractions *UcAC*3F8f3S2A2, A3 et *UcAC*3F8f3S2B4. Le constat est que la quantité totale de fractions pures est en dessous d'un seuil de 1 mg qui nous autorise à aborder sereinement la caractérisation chimique. En ajoutant une marge de sécurité à cette stimulation, nous sommes donc arrivés à la conclusion que nous nécessitions d'aborder l'étape suivante en traitant 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae*, processus que nous avons appelé « scale-up ».

Table 8: LISTE DES MASSES DES FRACTIONS UcAC3F8f3S2, UcAC3F8f3S4, UcAC3F8f3S2A3 et UcAC3F8f3S4B4 (m/z pour z = 1).

*UcAC*3F8f3S2			*UcAC*3F8f3S4			*UcAC*3F8f3S2A3			*UcAC*3F8f3S4B4		
143,87	362,40	662,27	141,00	327,27	632,13	143,93	498,20	682,40	218,13	445,00	667,00
151,07	376,80	662,40	181,90	327,80	641,20	213,00	514,00	683,33	219,00	492,00	668,00
158,00	383,60	666,53	190,00	337,00	646,27	219,13	525,87	685,60	221,70	492,00	682,00
170,87	412,20	668,60	193,93	337,13	647,93	222,07	584,30	686,53	250,00	532,00	682,40
172,94	426,27	670,53	207,13	337,20	652,40	222,60	586,93	687,30	250,00	570,00	684,00
195,64	427,20	672,47	218,13	337,33	654,40	224,80	594,33	688,53	256,00	586,00	686,00
202,13	446,47	682,33	218,20	337,33	662,20	241,27	600,80	688,70	267,00	588,00	699,00
214,33	449,53	682,40	222,40	337,33	662,27	261,27	606,13	700,67	267,00	588,00	700,60
215,27	454,13	682,47	222,54	337,33	662,27	261,40	606,20	704,33	276,00	596,00	704,00
218,40	468,27	683,20	222,67	347,20	664,33	269,90	606,27	704,40	278,13	604,00	714,00
224,47	493,33	683,47	228,00	347,27	672,07	275,27	610,07	710,07	295,00	604,30	750,00
241,13	506,27	686,40	234,60	351,13	682,00	278,13	610,27	714,07	302,00	606,00	791,00
241,27	518,20	688,40	235,13	352,07	682,27	278,30	612,40	716,60	310,00	614,00	812,00
244,13	520,40	694,20	241,33	352,20	682,33	281,27	612,87	720,47	321,00	623,00	863,50
256,87	544,07	700,53	247,57	352,27	682,40	282,00	628,53	730,13	327,00	627,00	903,00
261,40	550,30	701,40	248,00	366,00	692,27	297,13	630,60	730,93	327,00	628,00	904,00
272,13	554,20	706,40	250,00	370,20	699,02	308,53	638,47	739,60	327,07	630,00	947,00
278,13	582,30	710,07	267,13	370,21	714,27	310,07	642,00	744,73	336,00	649,00	1035,00
288,80	586,40	712,60	267,33	444,27	714,33	310,20	642,67	752,40	350,00	667,00	1210,00
297,00	588,33	714,27	278,00	466,13	714,40	319,53	642,80	760,33	370,00		1228,00
297,27	600,60	715,33	278,07	476,20	720,20	324,53	644,73	760,53	370,20		1228,71
301,00	603,47	720,27	278,13	480,33	724,47	327,20	650,53	766,53	374,80		1286,00
310,00	604,33	722,33	278,20	494,13	726,33	330,07	656,80	780,53	443,27		
310,30	605,13	728,13	278,27	494,27	742,00	335,40	658,53	788,67			
321,13	606,27	734,47	285,87	498,47	744,13	336,13	658,55	804,53			
324,67	608,33	752,53	287,33	518,27	765,27	347,33	662,13	804,60			
325,33	608,40	754,07	288,57	524,27	794,13	352,13	662,33	854,47			
327,20	612,60	758,40	293,87	530,27	834,27	352,27	662,40	884,60			
327,40	614,47	877,40	301,33	542,47	864,40	352,27	669,40	903,00			
335,27	614,53	904,93	309,27	550,13	898,27	357,13	672,33	906,20			
335,53	616,33	926,20	310,00	574,07	903,33	370,13	672,70	947,33			
335,80	616,47	926,93	310,13	582,20	904,40	455,00	678,20	958,53			
336,27	622,40	1142,00	310,93	592,20	909,87	482,27	682,20	980,60			
342,13	624,27	1166,07	321,07	606,00	927,27		682,33	991,60			
344,40	628,53	1195,00	323,20	606,13	930,01			1035,60			
347,30	630,47	1243,33	326,93	606,20	950,05			1079,47			
352,20	632,00	1266,00	327,07	606,47	968,87			1084,80			
352,53	632,47	1545,53		612,33	1014,13			1084,80			
361,47	636,70	1607,13		614,00	1614,27			1142,80			
362,27	637,40	1778,30		614,40							
	640,27			623,53							
	642,60			628,53							
	648,47			630,27							
	660,33			632,13							
	662,00										

Table 9: SIMULATION DES ÉTAPES DE PURIFICATION ET DE LA QUANTITÉ DE MATÉRIEL BIOLOGIQUE NÉCESSAIRE À LA CARACTÉRISATION DES MOLÉCULES ACTIVES CONTENUES DANS LES FEUILLES D'UVARIA CHAMAE. Les trois premières colonnes indiquent, dans l'ordre de fractionnement, le nom des fractions obtenues et leur rendement matière. Les étapes 7, 7', 8 et 8' sont des projections (I et II). La colonne quatre indique les quantités de matière produits avec 5 kg de feuilles et la colonne cinq ces mêmes quantités pour 100 kg de feuilles. Les astérisques indiquent que les rendements sont fictifs.

Étapes	Fractions	Rendements	Quantité de matière obtenue pour 5 kg	Quantité de matière estimée lors pour 100 kg
1	*Uc*A	12,5%	625 g	12 500 g
2	*Uc*AC3	12%	75 g	1 500 g
3	*UcAC*3F8	8%	6 g	120 g
4	*UcAC*3F8f3	62,5%	3,75 g	75 g
5	*UcAC*3F8f3S2	2,4%	90 mg	1,8 g
5'	*UcAC*3F8f3S4	5,6%	210 mg	4,2 g
6	*UcAC*3F8f3S2A2-A3	21%	18,9 mg	378 mg
6'	*UcAC*3F8f3S4B4	7%	14,7 mg	294 mg
7	*UcAC*3F8f3S2A2-A3 (I)	[~10%]*	1,89 mg	37,8 mg
7'	*UcAC*3F8f3S4B4 (I)	[~10%]*	1,47 mg	29,4 mg
8	*UcAC*3F8f3S2A2-A3 (I) + (II)	[~10%]*	189 µg	3,78 mg
8'	*UcAC*3F8f3S4B4 (I) + (II)	[~10%]*	147 µg	2,94 mg

III.5 SCALE UP

III.5.1 PRODUCTION D'EXTRAITS ACTIFS A PARTIR DE 100 KG DE FEUILLES D'*UVARIA CHAMAE*.

III.5.1.1 APPROVISIONNEMENT, VALIDATION BIOLOGIQUE ET AFFINAGE DU SCALE UP

La première étape a constitué à rassembler le matériel nécessaire. À la différence de *Fructus barbarum*, *Uvaria chamae* appartient aux plantes médicinales pour lesquelles GreenPharma a établi un réseau de collecteurs. Ainsi, l'herboriste en charge du Burkina Faso a été contacté pour la commande des 100 kg de feuille d'*Uvaria chamae* avec la consigne de se fournir dans les même zones géographiques et à la même saison que précédemment. La géolocalisation des cultures est assurée par « global positioning system » (GPS). Il a fallu attendre la saison des pluies aux mois de Juin pour récolter les feuilles d'*Uvaria chamae* qui ont été envoyées en France en deux lots de 50 kg. Dès réception des lots de feuilles, 1 kg ont été prélevé et traité au méthanol polyamide pour fabriquer l'extrait *Uc*MPSU nouveau (M&M, chapitre 3a). Son activité trophique a été testée sur des cultures enrichies en cônes ensemencés aux deux densités cellulaires 1 x 10^5cellules/cm^2 (**Fig. 98a**). La comparaison entre l'extrait méthanol polyamide *Uc*MP initial et l'extrait méthanol polyamide issu d'un nouvel approvisionnement (*Uc*MPSU) démontre l'existence d'une activité biologique très similaire avec des facteurs de viabilité de 2,0 et 2,2 pour l'ancien versus le nouveau à 1,1 µg/ml. Notons aussi que lors de cet essai, ces facteurs de viabilité se sont révélés être du même ordre de grandeur que le contrôle positif, *Fructus barbarum* (2,5 à 10 µg/ml). Le problème posé par la fabrication d'un extrait méthanol polyamide à grande échelle *Uc*MPSU réside dans la difficulté de construction d'une colonne polyamide de capacité de charge très élevée. À cela s'ajoutent les inconvénients liés aux quantités très importantes de solvants organiques et de polyamide nécessaires. Ces considérations nous ont conduits à l'élaboration d'une procédure alternative d'extraction réalisable à cette échelle. Nous avons donc procédé à une première phase de fractionnement à l'aide de charbon de l'extrait fabriqué dans du méthanol. Le charbon est une matière adsorbante qui interagit avec certains composés présents en large proportion dans l'extrait, tels que les tanins, les chlorophylles et les lignines, et permet ensuite de les éliminer par décantation, puis filtration. Un premier extrait charbon pilote a été fabriqué en mélangeant 90 g de feuilles d'*Uvaria chamae* réduites en poudre et incubées 24 ou 48 h dans 900 ml de méthanol. 90 g de poudre très fine de charbon actif ont été ajoutés et incubés 30 minutes sous agitation avec un barreau aimanté, puis le tout a été filtré (M&M, chapitre 3b). Il est important de noter que cet extrait n'est plus coloré en vert mais est transparent et tend à virer vers le jaune orange à forte concentration. L'analyse HPLC a montré que ce processus était reproductif et plus sélectif que l'extraction méthanol polyamide (**Fig. 98b**). En effet, *Uc*SUC présente moins de pics qu'*Uc*MP avec des rendements respectifs de 5,5% (*Uc*SUC) versus 12% (*Uc*MP). Cette réduction du rendement de prés de 5% est indicatrice d'une plus grande sélectivité de l'extrait charbon. De plus, l'extraction est réalisée par simple macération du charbon actif peu coûteux dans du méthanol, solvant utilisé initialement pour réaliser la colonne polyamide. Ce procédé réduit aussi de 50% la consommation des solvants organiques ce qui s'accorde avec le principe d'une chimie verte.

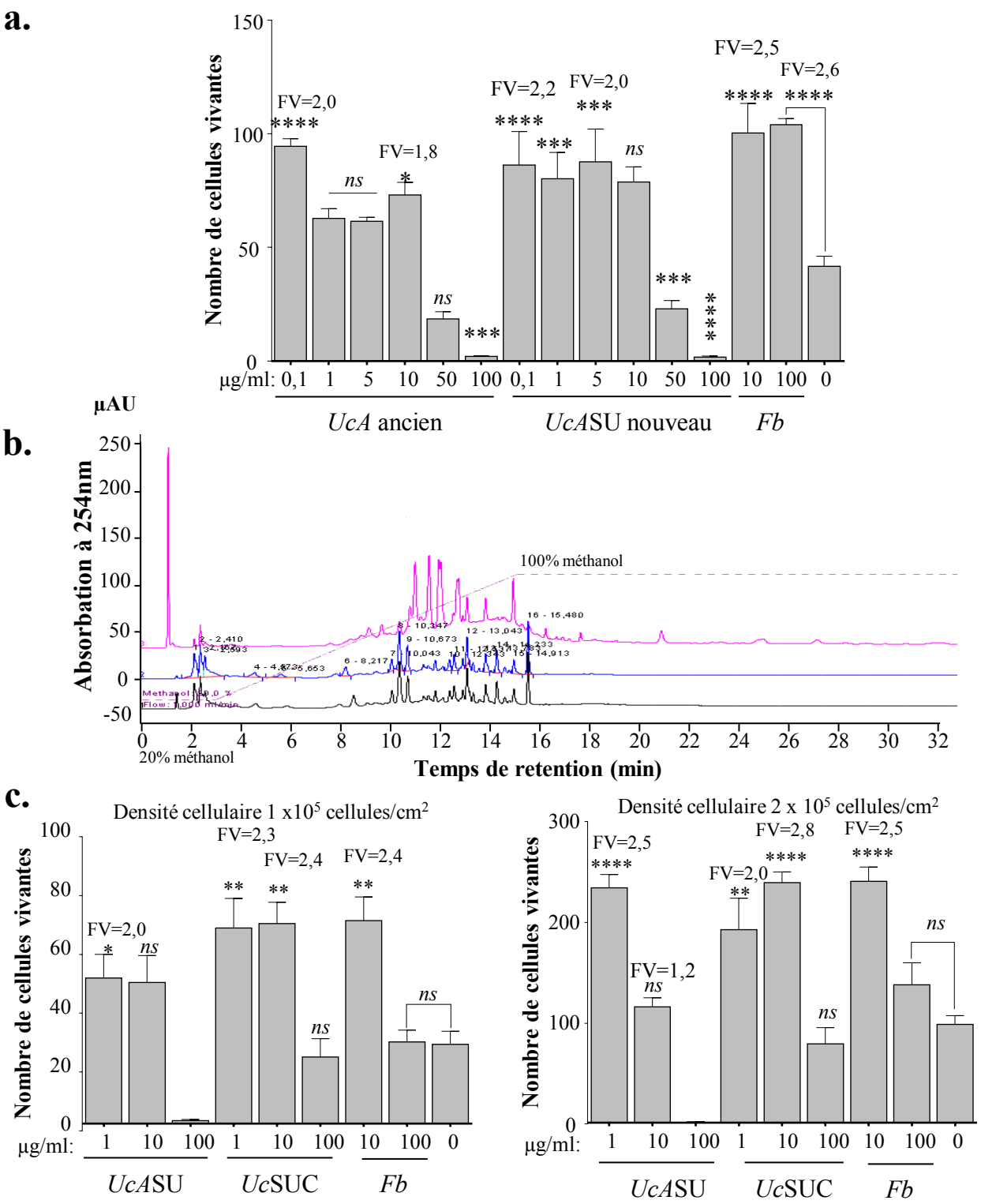


Figure 98: Validation des effet trophiques des 100 kg de feuilles d'*Uvaria chamae* en provenance du Burkina Faso. a. Activité trophique de la fraction *UcA*SU, la fraction méthanol polyamide issues des 100 kg de feuilles sur les cultures enrichies en cônes (1 x 10^5 cellules/cm^2). **b.** Profil chromatographique de la fraction *UcA* (en rose) et de son substitut pilote l'extrait charbon, *Uc*SUC (en bleu et en noir). **c.** Activité trophique *UcA* et *Uc*SUC sur les cultures enrichies en cônes.

III.5.1.2 VALIDATION BIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT *UC*SUC

L'activité biologique de l'extrait pilote charbon *Uc*SUC a été testée sur les cultures enrichies en cônes à 1 et 2 x 10^5 cellules/cm^2 (**Fig. 98c**). Une augmentation de la survie cellulaire avec des facteurs de viabilité de 2,0 et 2,5 a été observée pour 1 µg/ml de fraction sur les cellules respectivement ensemencées à 1 et 2 x 10^5 cellules/cm^2. Nous avons aussi observé une activité toxique à 100 µg/ml, mais celle ci s'est avérée moins importante pour l'extrait charbon que pour l'extrait méthanol polyamide, ce qui permet de conclure à un enrichissement de la fraction charbon en molécules protectrices. À ce stade de la purification, il est très probable que l'activité toxique soit le résultat de l'action d'entités chimiques distinctes de celles produisant l'effet trophique. Comme nous l'avons relevé précédemment, il y a une tendance générale vers la mise en évidence d'effet toxique en augmentant la concentration de l'extrait (**Fig. 65**). Nous proposons ici que certains métabolites secondaires présents dans l'extrait brut d'*Uvaria chamae* aient une activité toxique qui est révélée à partir d'une certaine concentration, et que ces molécules soient inactives au-dessous d'une concentration seuil, où les métabolites secondaires de l'extrait sont en capacité d'exercer leur activité protectrice mais où l'activité des molécules toxiques est dominante par rapport à l'activité protectrice. Par exemple, on peut imaginer qu'une certaine concentration d'agents toxiques tue toutes les cellules, alors que l'action des molécules protectrices est de ralentir la dégénérescence des cônes observés *in vitro* (**Fig. 61a**). Ce mécanisme explique que les molécules protectrices ne peuvent agir si toutes les cellules sont détruites. Ainsi, en plus d'un enrichissement des molécules actives, le processus doit s'accompagner d'un appauvrissement en molécules toxiques ce qui le distingue complètement du protocole de clonage par expression utilisé pour identifier l'ADNc codant pour RdCVF.

III.5.1.3 FRACTIONNEMENT ET VALIDATION DE *UC*SUC EN PILOTE ET PASSAGE A L'ECHELLE SCALE UP

La substitution de l'extrait *Uc*MP par *Uc*SUC se situe à la première étape du procédé de purification (**Table 9**). La seconde étape a consisté à remplacer l'extraction en phase solide SPE qui produisit la fraction *UcAC*3. La difficulté est ici de substituer la matrice C18 par une autre matrice de fonctionnalité équivalente. Lors d'un essai pilote (Pi, **Fig. 48**), l'extrait charbon (*Uc*PiC) a été remis en suspension avec un ratio de 1/100 et 1/500 (poids/volume) dans du méthanol puis fixé sur des billes de silice. Le méthanol évaporé, les molécules adsorbées ont été extraites à trois reprises avec de l'acétate éthyle en *Uc*PiCF1, *Uc*PiCF2, *Uc*PiCF3. Ces fractions exercent un effet protecteur avec une augmentation du facteur de viabilité de 2,1 pour *Uc*PiCF3 de valeur similaire à l'extrait charbon source, *Uc*PiC (**Fig. 99a**). La validation du procédé pilote a conduit à sa mise à l'échelle pour produire les trois fractions *Uc*SUCF1, F2 et F3. Un premier résultat indique que la fraction *Uc*SUCF1 est biologiquement active avec un facteur de viabilité de 2,7 (**Fig. 99b**). Lors d'un deuxième essai la fraction la plus active du procédé pilote *Uc*PiCF3 a un facteur de viabilité de 2,0 à 100 µg/ml. Les fractions *Uc*SUCF1 et *Uc*SUCF2 présentent des facteurs de viabilité de 1,7 et 2,1 à 10 µg/ml (**Fig. 99c**). Le rendement de 0,66% en matière de la fraction *Uc*SUCF1 nous a conduits à sélectionner cette fraction pour la poursuite de la purification (**Fig. 99d**).

L'étude des voies de signalisation menée en parallèle à la purification semblait indiquer que les molécules actives se caractérisent par un haut poids moléculaire apparent

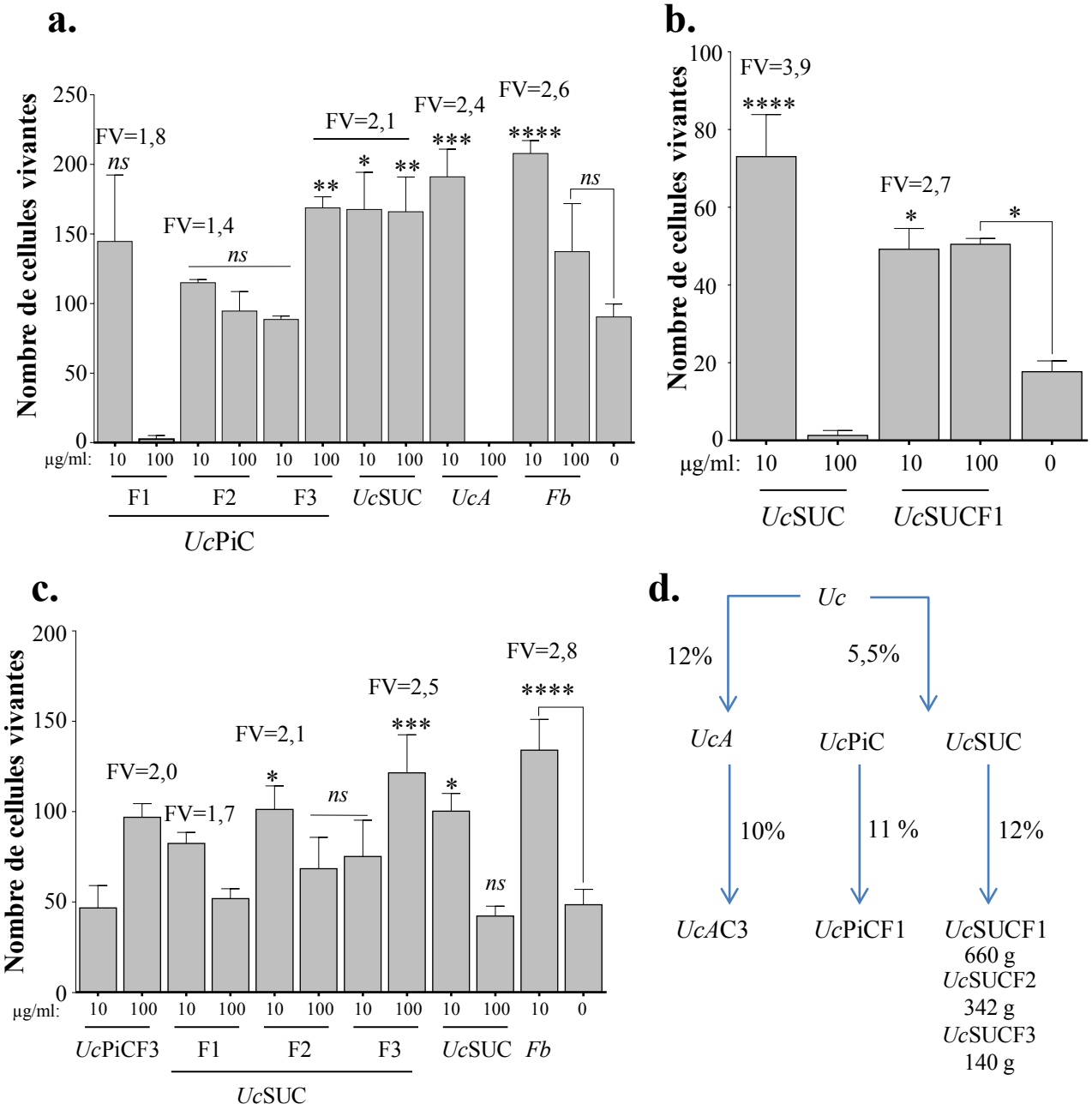


Figure 99: Mise en place du processus de « Scale up ». a. Action trophique des fractions *Uc*PiF1, F2 et F3 issues de l'essai pilote provenant de l'extrait charbon extrait à trois reprises à l'acétate éthyle. **b.** Effet trophique de la fraction *Uc*SUCF1 comparé à la fraction mère *Uc*SUC sur des cultures à 1 x 10^5 cellules/cm^2. **c.** Action trophique des fractions « scale up » *Uc*SUF1, F2 et F3 sur les cultures. **d.** Rendement des procédés de fractionnement et les quantités de matière produites.

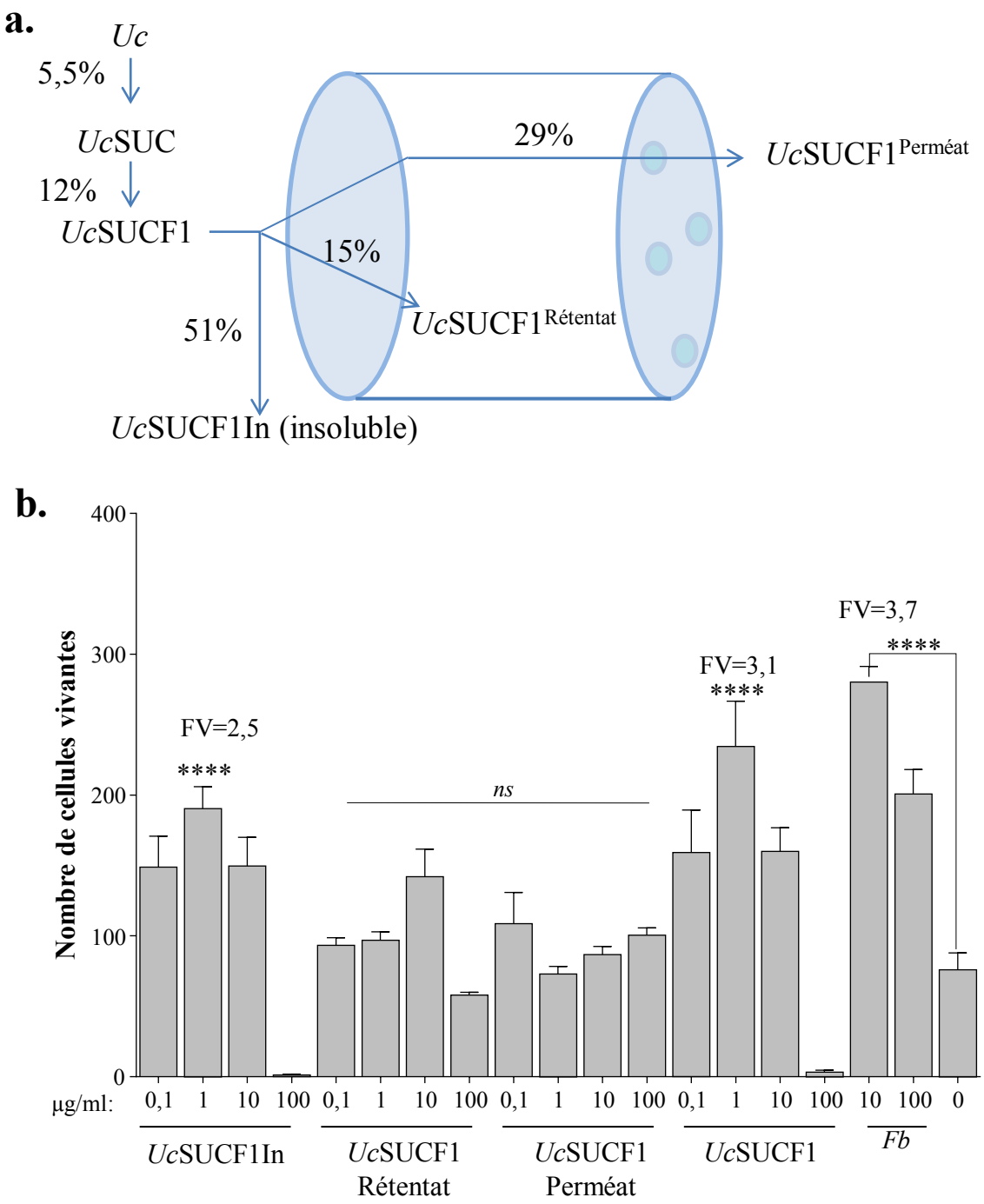


Figure 100: Fractionnement de l'extrait *Uc*SUCF1 suivant la solubilité dans l'eau et le poids moléculaire apparent. a. Schéma de fractionnement menant à la fraction *Uc*SUCF1In (insoluble) et *Uc*SUCF1^{Filtrat} et *Uc*SUCF1^{Rétentat} par dialyse. **b.** Activité trophique des fractions *Uc*SUCF1In, *Uc*SUCF1^{Perméat} et *Uc*SUCF1^{Rétentat} sur les cultures enrichies en cônes et ensemencées à 2 x 10^5cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. Statistique ANOVA test de Dunnett avec comparaisons multiples. Valeur de p <0,0001.

résultant de la formation d'agrégats ou de nanoparticules en solution. Ce résultat, amené à simplifier le processus de purification, fut transposé au procédé de fractionnement. Ainsi l'extrait acétate éthyle *Uc*SUCF1 a été mis en solution dans l'eau à la concentration de 1 g/l. Ceci a permis de le fractionner en deux avec la fraction insoluble correspondant aux molécules précipitées dans ces conditions. La fraction soluble a ensuite été dialysée avec un seuil de coupure de 3 500 Da. Le rétentat correspond aux espèces moléculaires ayant un poids moléculaire apparent les empêchant de passer à travers les pores à ce seuil de coupure, et le perméat correspond aux entités chimiques capables de passer ces pores (**Fig. 100a**). L'essai biologique réalisé sur les cultures enrichies en cônes montre que les molécules actives se trouvent dans la fraction insoluble dès 0,1 µg/ml et avec un facteur de viabilité de 2,5 à 1 µg/ml (**Fig. 100b**). Pour optimiser la production de fractions actives à partir de *Uc*SUF1In nous avons une gamme de mise en suspension de la fraction *Uc*SUCF1In dans l'eau avec des ratios (poids/volume) de 1/100 à 1/1 000 conduisant aux fractions *Uc*SUCF1InsR1 à 4. Lors des tests biologiques à la densité de 1 x 10^5 cellules/cm^2, les fractions *Uc*SUCF1InsR1 et *Uc*SUCFInsR2 présentaient des facteurs de viabilité de 2,5 et 2,8 respectivement à 1 µg/ml (**Fig. 101**). Dans le même essai réalisé à la densité de 2 x 10^5 cellules/cm^2, la fraction *Uc*SUCF1InsR2 présentait un facteur de viabilité de 3,9. La fraction *Uc*SUCF1InsR4 présentait un facteur de viabilité de 3,6 et 4,4 à 10 µg/ml respectivement pour chaque densité dans l'ordre croissant. Ainsi, bien que la fraction *Uc*SUCF1InsR2 présente la meilleure activité spécifique, la fraction *Uc*SUCF1InsR4 est active à 10 µg/ml avec une dilution minimale (1/100) dans l'eau, c'est sur cette dernière fraction que nous avons donc concentré nos efforts.

*Uc*SUCF1InR4 a donc été fractionnée par chromatographie sur colonne de silice. L''élution a été réalisée avec un mélange éther de pétrole / acétate d'éthyle (EP/AE). Lors d'une expérience pilote, 1 g d'*Uc*SUF1InR4 est fractionné en *Uc*SUCF1InR4D1 à *Uc*SUCF1R4D5 avec le mélange EP/AE 1/1 (vol./vol.), les fractions *Uc*SUCF1InR4D6 et *Uc*SUCF1InR4D7 ont été éluées avec du méthanol. Du fait de l'existence probable d'une activité toxique en plus de l'activité trophique, les fractions ont été testées aux concentrations de 0,1, 1, 10 et 100 µg/ml sur les cultures enrichies en cônes. La fraction *Uc*SUCF1InR4D7 présente un facteur de viabilité de 3,9 à 0,1 µg/ml et de 3,0 à 1 µg/ml, alors que dans ces conditions les fractions D1 à D6 sont inactives (**Fig. 102a**). Lors des essais à 100 µg/ml toutes les fractions, y compris *Uc*SUCF1InR4D7 montrent des effets cytotoxiques (**Fig. 102b**). Il semble bien qu'une partie des molécules trophiques contenues dans la fraction D7 débordent dans la fraction D6, car cette dernière présente un facteur de viabilité de 1,8 lors du test à 10 µg/ml.

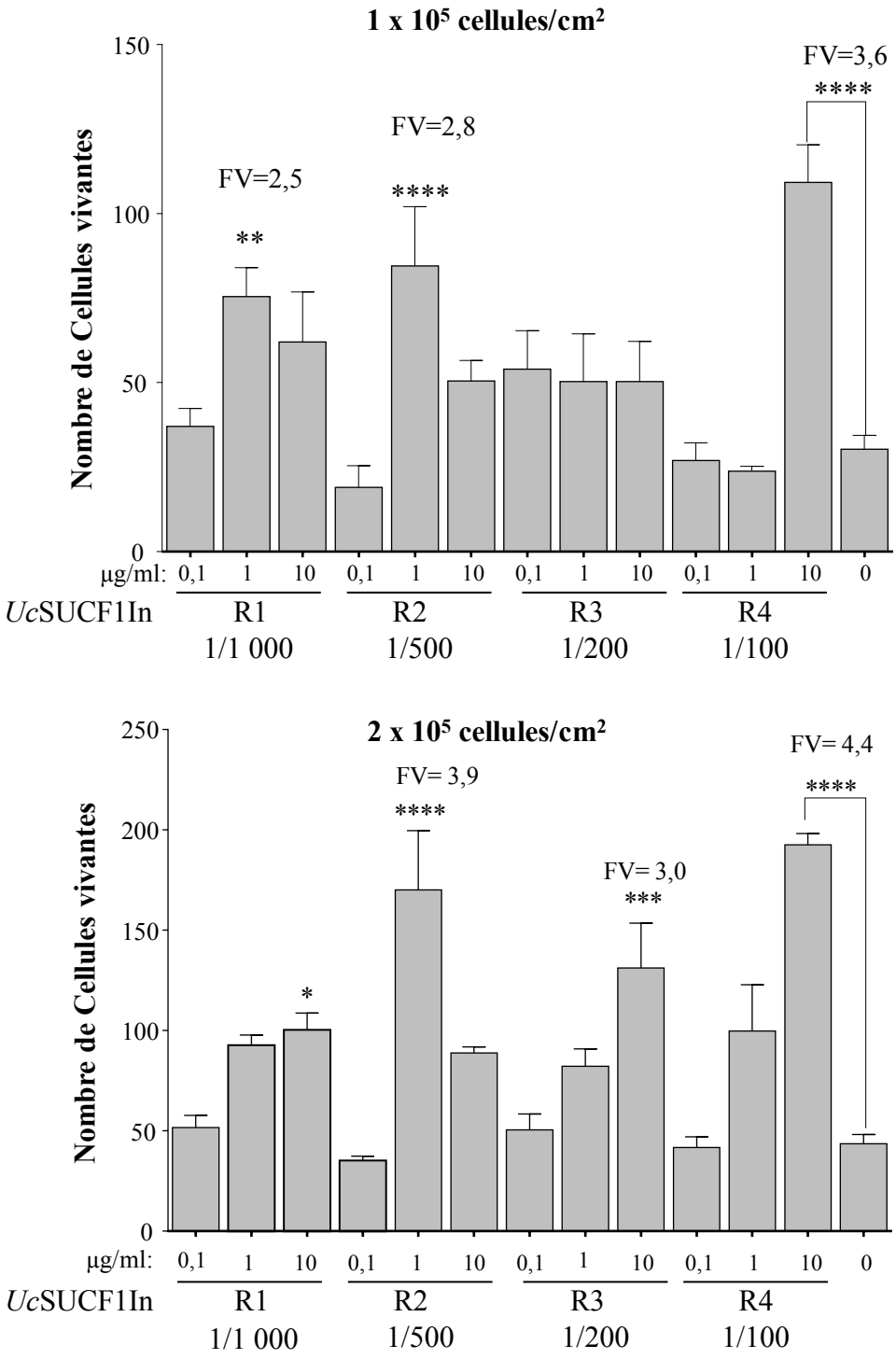


Figure 101: Mise en place du ratio de dilution optimal des insolubles *Uc*SUCF1InR1 à *Uc*SUCF1InR4. Effet trophique des fractions *Uc*SUCF1InR1 à *Uc*SUCF1InR4 sur la survie cellulaire à 1 x 10^5cellules/cm^2 et 2 x 10^5cellules/cm^2. FV, facteur de viabilité. Statistique ANOVA test de Dunnett avec comparaisons multiples. Valeur de p <0,0001.

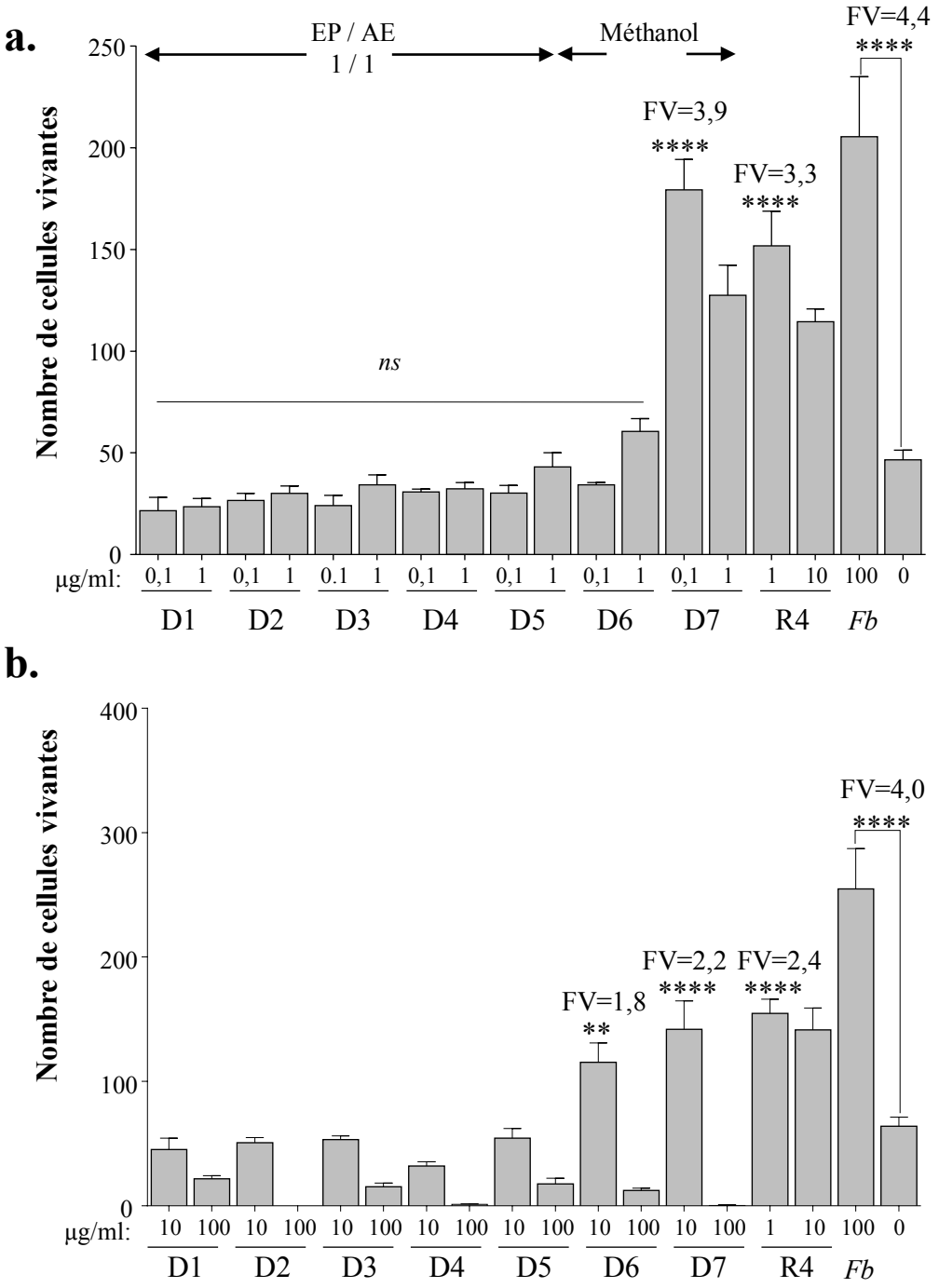


Figure 102: Fractionnement par chromatographie HPLC de la fraction *Uc*SUCF1InR4 en *Uc*SUCF1InR4D1 à *Uc*SUCF1InR4D7. a. Activité trophique des fractions *Uc*SUCF1InR4D1 à *Uc*SUCF1InR4D7 à 0,1 et 1 µg/ml. **b.** Activité trophique des fractions *Uc*SUCF1InR4D1 à *Uc*SUCF1InR4D7 à 10 et 100 µg/ml. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. EP / AE, éther de pétrole / acétate d'éthyle

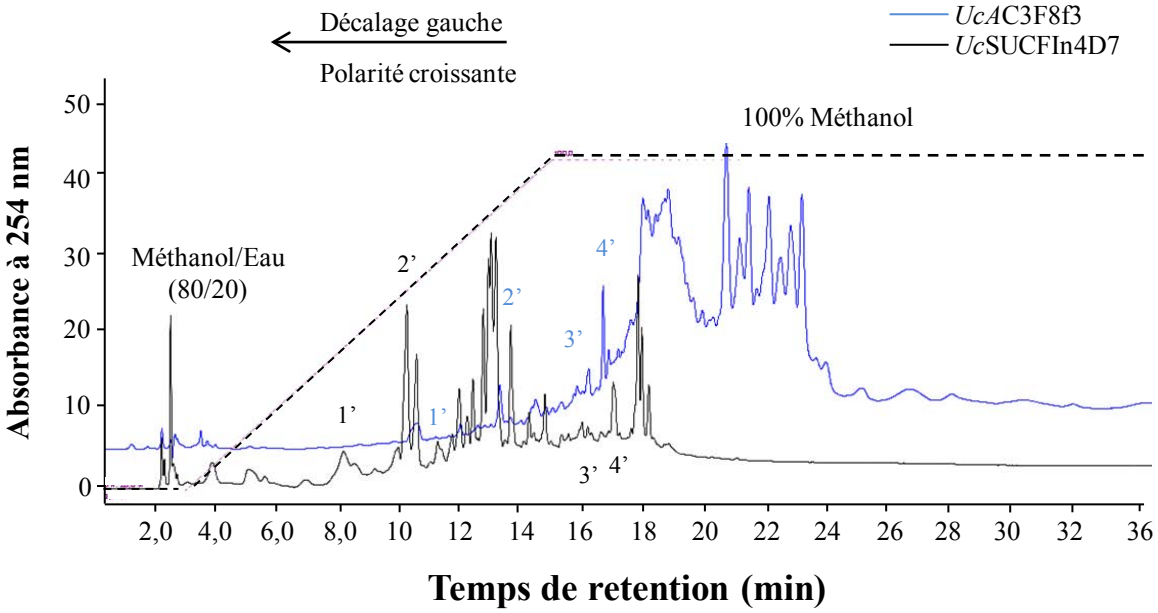


Figure 103: Profils chromatographiques comparatifs des fractions *UcA*C3F8f3 et *Uc*SUCF1In4D7. Noter qu'une quantité dix fois plus importante de la fraction a été analysée.

III.5.1.4 BILAN DU PROCESSUS DE « SCALE UP »

En résumé, au stade où se trouve actuellement le processus de « scale up », nous sommes en possession de 33,3 g de la fraction la plus pure *Uc*SUCF1InR4D7 obtenue par quatre étapes successives. Les rendements de ces quatre étapes sont de 5,5% pour *Uc*SUC, 12% pour *Uc*SUCF1, 51% pour *Uc*SUCF1InR4 et 9,9% pour *Uc*SUCF1InR4D7 (**Table 10**). L'alignement avec les rendements obtenus lors des essais réalisés avec 5 kg de matériel indique que nous avons probablement atteint avec *Uc*SUCF1InR4D7 l'équivalent de la fraction *UcAC*3F8f3. La quantité disponible de fraction *Uc*SUCF1InR4D7 serait dans ces conditions environ deux fois inférieure à notre simulation (75 versus 33,3 g, **Table 9**). Néanmoins, nous pouvons estimer avec une certaine assurance que comme la première étape a un rendement de 5,5%, et qu'elle nous a permis de nous débarrasser des impuretés donnant une colorant verte, la fraction *Uc*SUCF1InR4 est plus pure. Nous avons aussi comparé les profils chromatographiques de la fraction *Uc*SUCF1InR4D7 et son équivalent, la fraction *UcAC*3F8f3 (**Fig. 103**). On retrouve un ensemble de pics communs aux deux fractions entre 14 et 20 min. On observe pour *Uc*SUCF1InR4D7 un décalage des pics vers les temps de rétention courts, indicateur d'une plus forte polarité des composés élués avec 80% d'eau. Certains pics ont été éliminés au moins en partie, probablement lors du traitement sur charbon qui a plus d'affinité pour les composés peu polaires.

III.6 *UVARIA CHAMAE* ET LA SIGNALISATION DU FACTEUR TROPHIQUE RDCVF

Durant le déroulement de ce projet, l'équipe a pu identifier la signalisation du facteur trophique RdCVF. Nous avons donc comparé cette signalisation avec celle des métabolites secondaires contenus dans les feuilles d'*Uvaria chamae*. La démonstration de l'existence d'une liaison de RdCVF à la surface des cônes nous a conduit à identifier à partir de fractions membranaires de rétines riches en cônes du poulet, les protéines interagissant avec RdCVF sous la forme de « glutathione-S-transferase « (GST)-RdCVF produit chez *Escherichia coli* (Leveillard et al., 2014). Une méthode par « far-western blotting » (Leveillard et al., 1996) nous a permis de mettre en évidence une liaison spécifique de RdCVF avec une protéine de 45 kDa. La bande du gel correspondant à cette masse a été découpée et les protéines identifiées par spectrométrie de masse. Parmi les 80 protéines identifiées, seules deux possédaient un domaine transmembranaire. Nous avons pu en écarter l'une et nous avons validé l'interaction de RdCVF avec BSG1. La protéine BSG1 est un variant d'épissage du gène *Bsg* spécifique à la rétine (Ochrietor et al., 2003). Cette protéine possède un domaine transmembranaire et trois domaines immunoglobulines, dont un est spécifique de BSG1. L'autre variant d'épissage code pour la protéine BSG2 qui n'en possède que deux et dont l'expression est ubiquitaire. L'inactivation de *Bsg* chez la souris entraine entre autres déficits, une perte de fonction des photorécepteurs (Ochrietor et al., 2002). Le domaine extracellulaire soluble de BSG1 entre en compétition avec l'action trophique ectopique de RdCVF, et la réduction de l'expression de BSG1 par ARN interférence abolit l'activité trophique de RdCVF sur les cônes. Grâce à un anticorps, nous avons pu identifier par co-immunoprécipitation et analyse par spectrométrie de masse que BSG1 interagit avec GLUT1, le transporteur du glucose. Cette dernière interaction a pu être validée par la méthode « fluorescence resonance energy transfer » (FRET). Nous avons développé un protocole qui

Table 10: BILAN DU FRACTIONNEMENT DE 100 KG DE FEUILLES D'*UVARIA CHAMAE*.

Ét.	Fractions	Quantité de matière obtenue pour 5 kg	Rd.	Fractions	Quantité de matière obtenue pour 100 kg	Rd. « scale up »
1	*Uc*A	625 g	12,5%	*Uc*SUC	5 500 g	5,5%
2	*Uc*AC3	75 g	12%	*Uc*SUCF1	660 g	12%
3	*UcAC*3F8	6 g	8%	*Uc*SUCF1InR4	337 g	51%
4	*UcAC*3F8f3	3,75 g	62,5%	*Uc*SUCF1InR4 D7	33,3 g	9,9%
5	*UcAC*3F8f3S2	90 mg	2,4%			
5'	*UcAC*3F8f3S4	210 mg	5,6%			
6	*UcAC*3F8f3S2A2-A3	18,9 mg	21%			
6'	*UcAC*3F8f3S4B4	14,7 mg	7%			

nous a permis de montrer que RdCVF stimule l'entrée du glucose dans les cônes via BSG1 et GLUT1. Le mécanisme implique une modification de l'activité du transporteur lui-même et nécessite la formation d'un complexe entre RdCVF, BSG1 et GLUT1. Nous avons ensuite montré qu'un variant ponctuel de RdCVF identifié chez des patients souffrant d'une dégénérescence sévère des photorécepteurs, l'amaurose congénital de Leber (Hanein et al., 2006) était déficient dans sa capacité à faire survivre les cônes, *in vitro* et *in vivo* par thérapie génique chez la souris *rd1*. Ce variant est incapable de stimuler l'entrée de glucose dans les cônes alors que son expression est similaire à la forme normale de RdCVF. Nous avons cherché à établir un lien entre l'entrée du glucose et la survie des cônes. Grâce à des inhibiteurs des voies métaboliques, et notamment l'oxamate qui inhibe la lactate déshydrogénase, nous avons pu démontrer que la survie était associée à la stimulation de la glycolyse aérobie, ou effet Warburg (**Fig. 104**). Par respirométrie, nous avons pu montrer que les cônes métabolisaient le glucose par cette voie, *in vitro*. Chez la souris, nous avons aussi pu montrer l'expression spécifique par les photorécepteurs de l'hexokinase (HK) spécifiquement impliquée dans la glycolyse aérobie (HK2). L'expression préférentielle de BSG1 au niveau de la fovéa chez l'homme a pu être démontrée grâce à des anticorps que nous avons produits. Fait intéressant, BSG1 est exprimé par le segment interne des cônes, structure qui contient l'ensemble de la machinerie nécessaire au renouvellement des segments externes qui comportent la molécule captant la lumière, l'opsine. Ainsi, chez un spécimen post-mortem atteint de rétinopathie pigmentaire, nous avons pu retrouver l'expression de BSG1 dans des cônes dépourvus de segment externe.

Le renouvellement des segments externes des photorécepteurs est renouvelé selon le rythme circadien à un rythme quotidien extraordinaire de 10% de sa longueur. Ceci requiert une synthèse très importante de macromolécules telles que les lipides à partir du glucose. Ainsi, en l'absence de RdCVF, soit après la perte des bâtonnets dans le cas de rétinopathie pigmentaire, l'absence de stimulation du transport du glucose entraînerait la réduction de la taille des segments externes des cônes, et donc à la perte de la capacité de l'opsine à transmettre le signal lumineux. Il est ici intéressant de noter que ce mécanisme implique que l'on puisse augmenter la taille des segments externes des cônes chez les patients souffrant de rétinopathie pigmentaire par administration de RdCVF. Comme dans l'exemple cité plus haut ceci concernerait les patients ayant conservé des segments internes des cônes et l'expression de BSG1. Ce scénario envisage donc que l'administration du facteur RdCVF par thérapie génique puisse restaurer la vision des patients atteints de rétinopathie pigmentaire et pas simplement la stabiliser comme à l'origine du projet.

Pour précéder à la comparaison, ne disposant pas de métabolites actifs purs, nous avons utilisé les fractions les plus actives d'*Uvaria chamae* au cours de leur élaboration. Nous avons dans un premier temps testé le rôle de la glycolyse aérobie dans les effets trophiques des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4. Pour ceci nous avons utilisé un analogue du pyruvate l'oxamate qui inhibe l'activité de la lactate déshydrogénase (**Fig. 105a**), l'enzyme qui différencie la glycolyse aérobie de la phosphorylation oxydative (**Fig. 104**). Les cultures enrichies en cônes ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2 ont été incubées avec les fractions d'*Uvaria chamae* à 100 ng/ml (S2) et 1 µg/ml (S4). L'effet protecteur de RdCVF sur ces cultures étant inhibé à 12,5 nM d'oxamate, nous avons réalisé un essai avec des concentrations d'oxamate dans la même gamme. L'activité trophique de la fraction

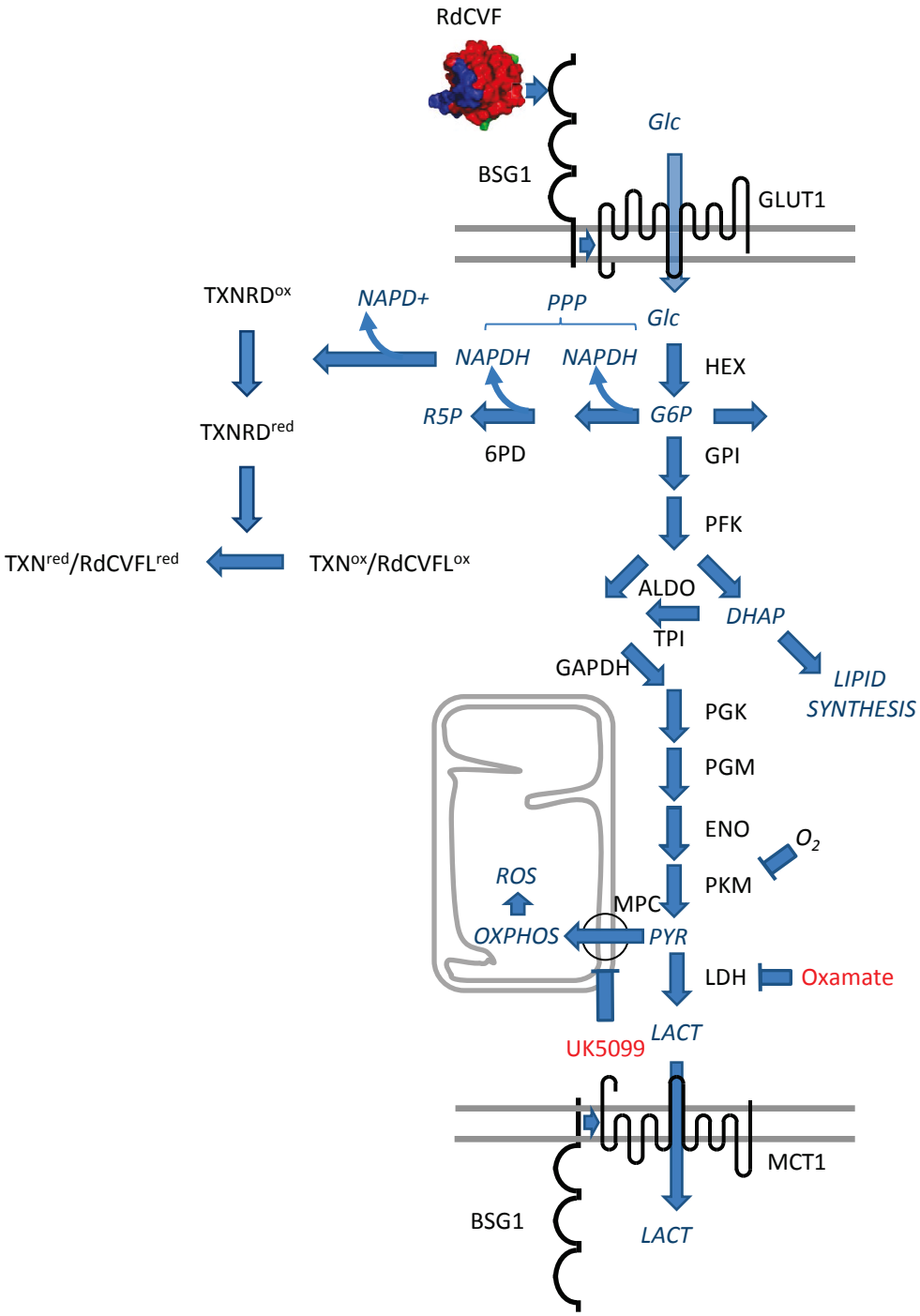
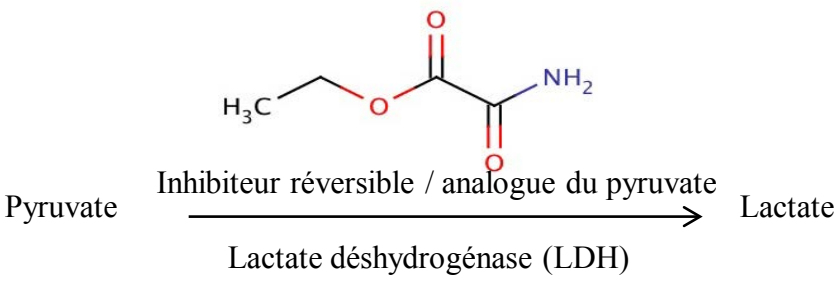
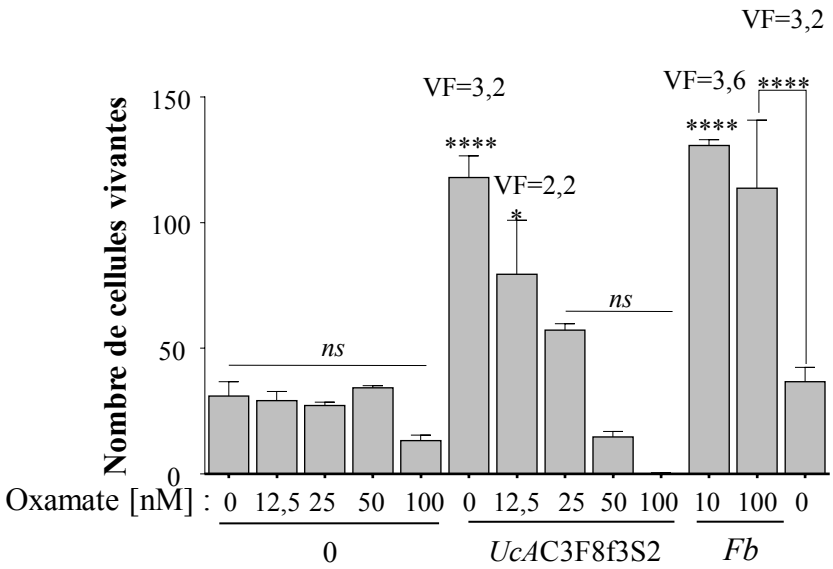


Figure 104: La signalisation RdCVF. RdCVF, rod-derived cone viability factor; BSG1 basigin 1; GLUT1, transporter du glucose 1; HEX, hexokinase, GPI; glucose phosphate isomérase; PFK, phosphofructokinase; ALDO, aldolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogenase; TPI, triose phosphate isomerése; PGK phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglycerate mutase; ENO, énolase; PKM; pyruvate kinase; LACT, lactate déshydrogenase; MCT1, Transporter du lactate 1; MPC, Transporteur mitochondrial du pyruvate; TXNR, thirédoxine réductase; TXN, thiorédoxine; *Glc*, glucose; *G6P*, glucose-6-phosphate; *NADPH*, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; *DHAP*, dihydroxyacetone phosphate; *PYR*, pyruvatye; *LACT*, lactate; 6PD, 6-phosphogluconate dehydrogense *PPP*, voie des pentoses phosphates; *OXPHOS*, Phosphorylation oxydative; *ROS*, Espèces réactives de l'oxygène; Ox, Oxydé; red, réduit.

a.



b.



c.

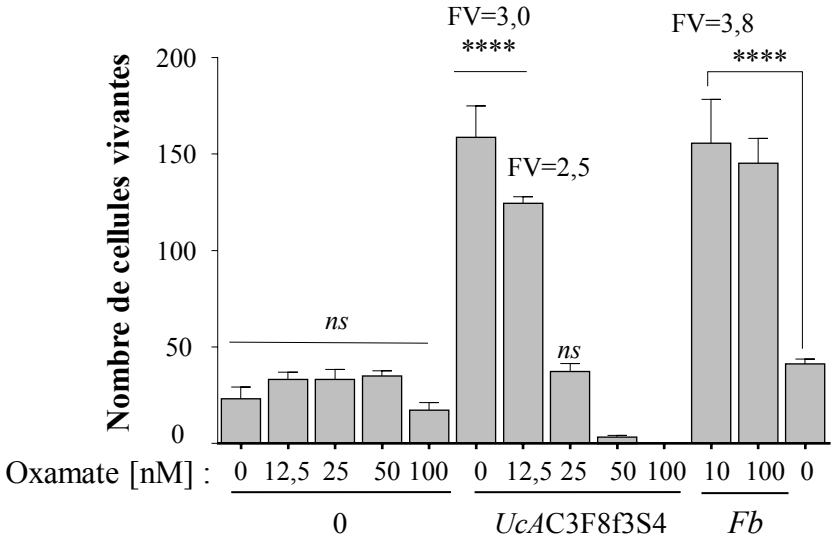


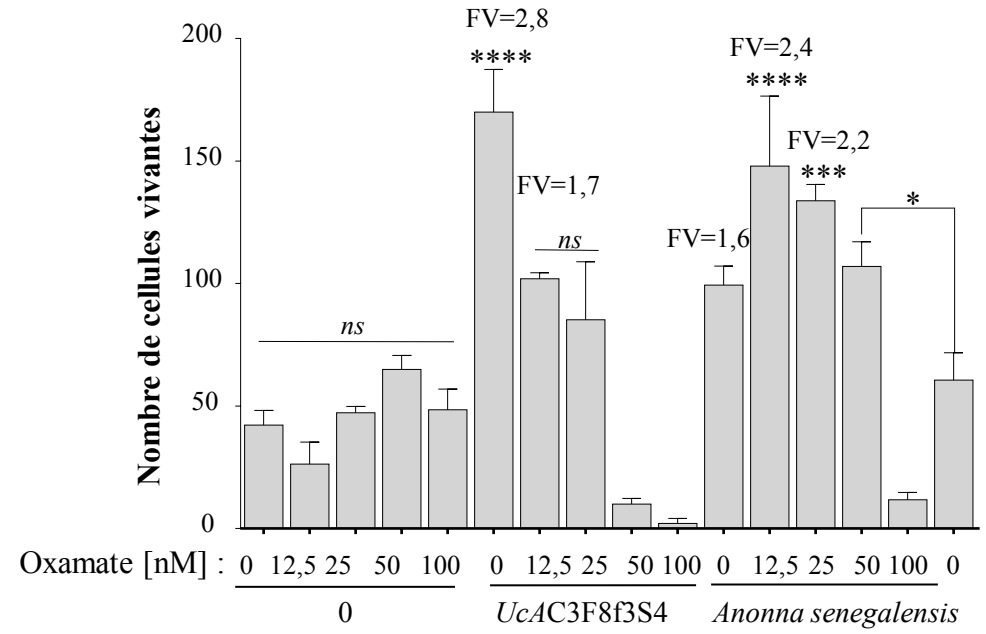
Figure 105: Inhibition de l'activité trophique d'*Uvaria chamae* par l'oxamate de sodium. a. Mécanisme d'inhibition de la lactate déshydrogénase par l'analogue structural du pyruvate, l'oxamate. **b.** Inhibition de l'activité trophique de la fraction *UcA*C3F8f3S2 à 100 ng/ml par l'oxamate sur des cultures enrichies et en cônes ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. **c.** Inhibition de l'activité trophique de la fraction *UcA*C3F8f3S4 à 1 µg/ml par l'oxamate sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2.

*UcAC*3F8f3S2 est réduite en présence de 12,5 nM d'oxamate et abolie à 25 nM (Fig. 105b). On observera que l'oxamate n'a aucun effet toxique sur les cellules entre 12,5 et 50 nM comme il est possible de le voir pour les cultures incubées sans fraction de métabolites secondaires (0). L'activité trophique de la fraction *UcAC*3F8f3S4 est aussi inhibée de manière dose dépendante par l'oxamate (Fig. 105c). Ceci renforce l'hypothèse que les molécules actives présentes dans les fractions S2 et S4 sont apparentées (**Fig. 90a**).

Cet essai nous a conduit à nous poser la question de l'implication générale de la glycolyse aérobie dans la survie des cônes. Nous avons observé que l'oxamate est toxique à la dose de 100 nM, mais pas aux concentrations moins élevées testées. Ceci indique que seul l'effet trophique est affecté entre 12,5 et 50 nM. Nous avons donc testé deux autres plantes sélectionnées par le criblage, l'annonacée *Annona senegalensis* (**Fig. 67**) et la rutacée *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Table 4). Lors de ce second essai, l'inhibition par l'oxamate des effets trophiques de la fraction *UcAC*3F8f3S4 a pu être reproduit ; même si nos conditions diffèrent légèrement car la fraction a été testée à 100 ng/ml et pas à 1 µg/ml comme précédemment (**Fig. 106a**). Pour ce qui est d'*Annona senegalensis,* le facteur de viabilité est réduit progressivement lorsque que la concentration en oxamate augmente. Lors de l'essai impliquant *Zanthoxylum zanthoxyloides*, l'inhibition de l'effet trophique de la fraction *UcAC*3F8f3S4 est observée à 50 nM d'oxamate (**Fig. 106b**). À cette concentration, et même à 100 nM, l'oxamate ne réduit pas le facteur de viabilité, ce qui indique que l'activité des métabolites secondaires contenus dans la plante *Zanthoxylum zanthoxyloides* ne requiert pas la lactate déshydrogénase. Ceci suggère que les molécules actives contenues dans l'annonacée sont apparentées aux molécules contenues dans les feuilles d'*Uvaria chamae* et que *Zanthoxylum zanthoxyloides* agit sur les cônes par un mécanisme indépendant d'*Uvaria chamae* et de RdCVF.

La glycolyse aérobie implique que les carbones du glucose ne soient pas oxydés en $C0_2$ par la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie mais qu'ils entrent dans la composition de macromolécules utilisées comme biomasse, et plus précisément dans les lipides nécessaires au renouvellement des segments externes des cônes. Récemment, les transporteurs mitochondriaux du pyruvate (MPC) ont été identifiés (Bricker et al., 2012; Herzig et al., 2012). Ces protéines de la membrane interne de la mitochondrie sont essentielles au transport du pyruvate issues de la glycolyse vers la matrice mitochondriale où il est oxydé décarboxylé en acétyl-coA qui est oxydé par le cycle de Krebs pour former du CO_2 et un gradient de proton qui est ensuite utilisé par la chaîne respiratoire pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (Stryer et al., 2003). L'acide 2-cyano-3-(1-phényl-1H-indol-3-yl)-2-propénoïque (UK5099) est un inhibiteur des transporteurs mitochondriaux du pyruvate (Du et al., 2013). À 10 nM UK5099 inhibe la consommation d'oxygène alimentée par le pyruvate mais pas celle alimentée par le glutamate ou le succinate. Nous avons donc testé l'effet de l'inhibition du transport du pyruvate vers la mitochondrie (**Fig. 107a**). Pour réaliser ce test, nous avons utilisé la fraction *Uc*SUCF1 issue du « scale up ». Des cultures enrichies en cônes ensemencées à 2 x 10^5 cellules/cm^2 ont été mises en présence de la fraction *Uc*SUCF1 à 10 µg/ml et avec des concentrations croissantes d'UK5099. Le transport du pyruvate dans la matrice mitochondriale n'est pas essentiel à l'effet trophique de RdCVF, pas plus qu'à celui des métabolites contenus dans les feuilles d'*Uvaria chamae* (Fig. 107b). Même à la concentration de 50 nM, soit cinq fois la concentration reportée pour être active, UK5099 ne

a.



b.

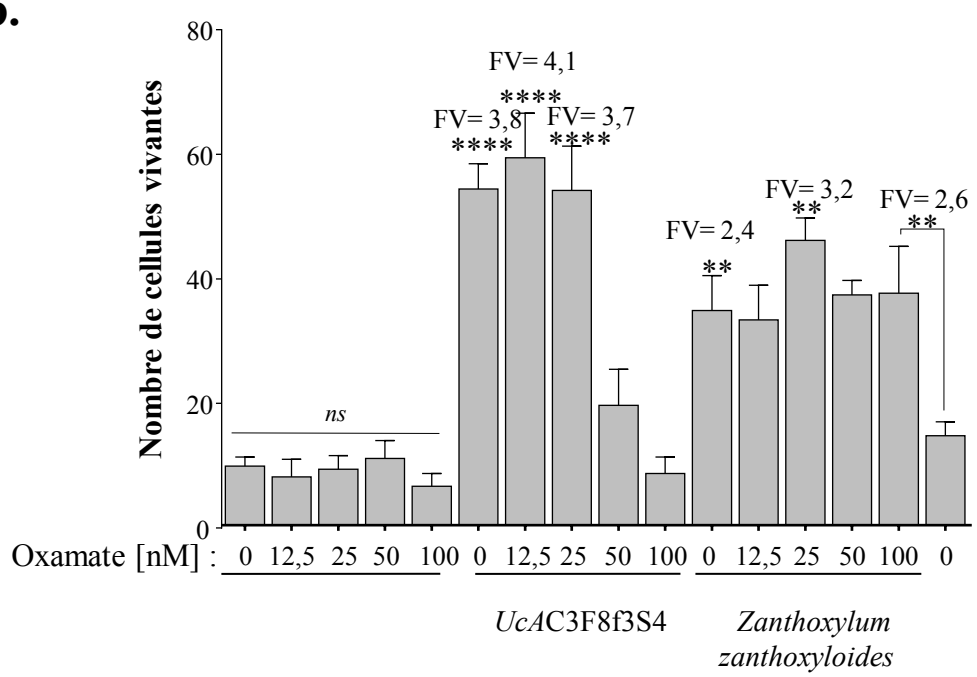
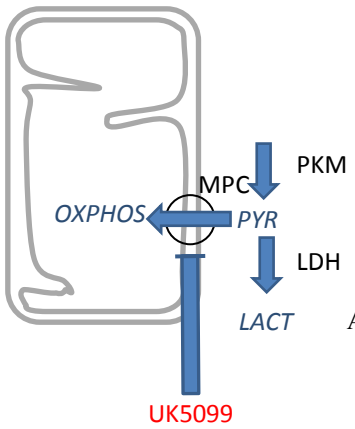
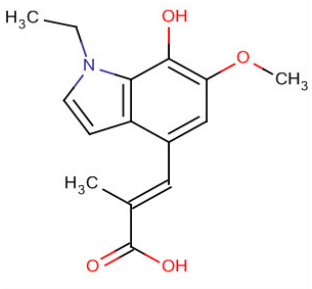


Figure 106: Effet de l'oxamate sur l'activité trophique d'*Annona senegalensis et de Zanthoxylum zanthoxyloides.* **a.** Inhibition de l'activité trophique de l'extrait d'annonacée *Annona senegalensis* (plante 5 du HCS) à 10 µg/ml par l'oxamate**. b.** Inhibition de l'activité trophique de l'extrait de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (plante 8 du HCS) à 10 µg/ml par l'oxamate. *UcA*C3F8f3S4 (100 ng/ml).

a.





Acide2-Cyano-3-(1-phényl-1H-indol-3-yl)-2-propénoïque (UK5099)

b.

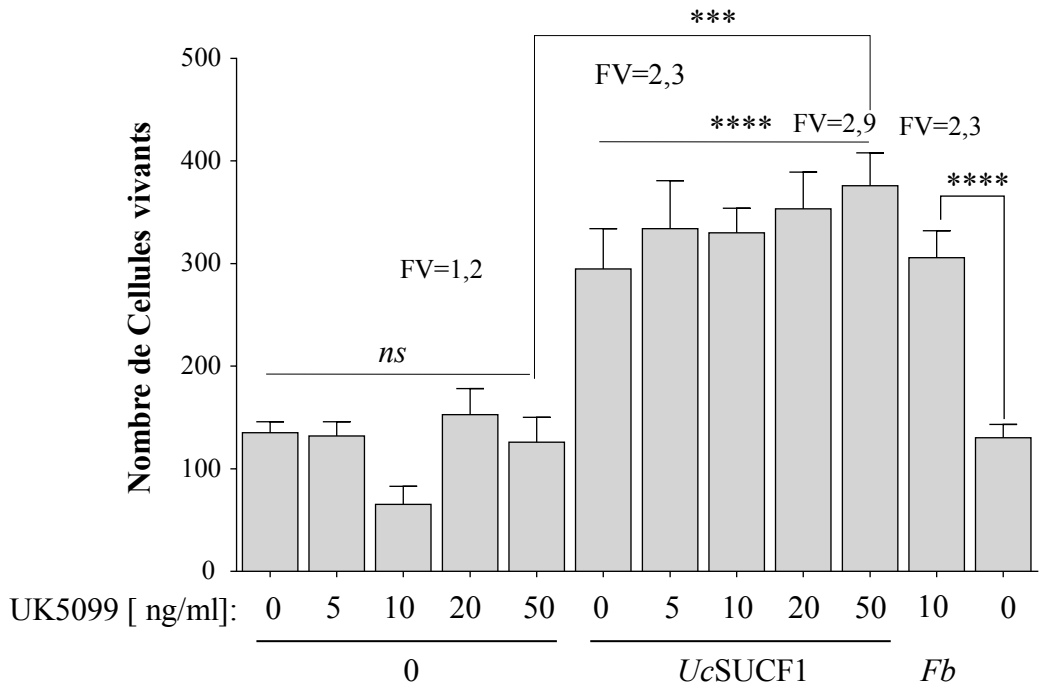


Figure 107: Action de l'inhibiteur du transporteur mitochondriale du pyruvate (UK5099) sur l'activité trophique d'*Uc*SUCF1. **a.** Mécanisme d'action de l'acide 2-cyano-3-(1-phényl-1H-indol-3-yl)-2-propénoïque (UK5099) sur le transport du pyruvate. **b.** Effet de l'inhibition du transport mitochondrial sur l'effet trophique de la fraction *Uc*SUCF1 à 10 µg/ml sur des cultures enrichies et en cônes ensemencées à 2 x 10^5cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum* a 10 µg/ml. FV, facteur de viabilité.

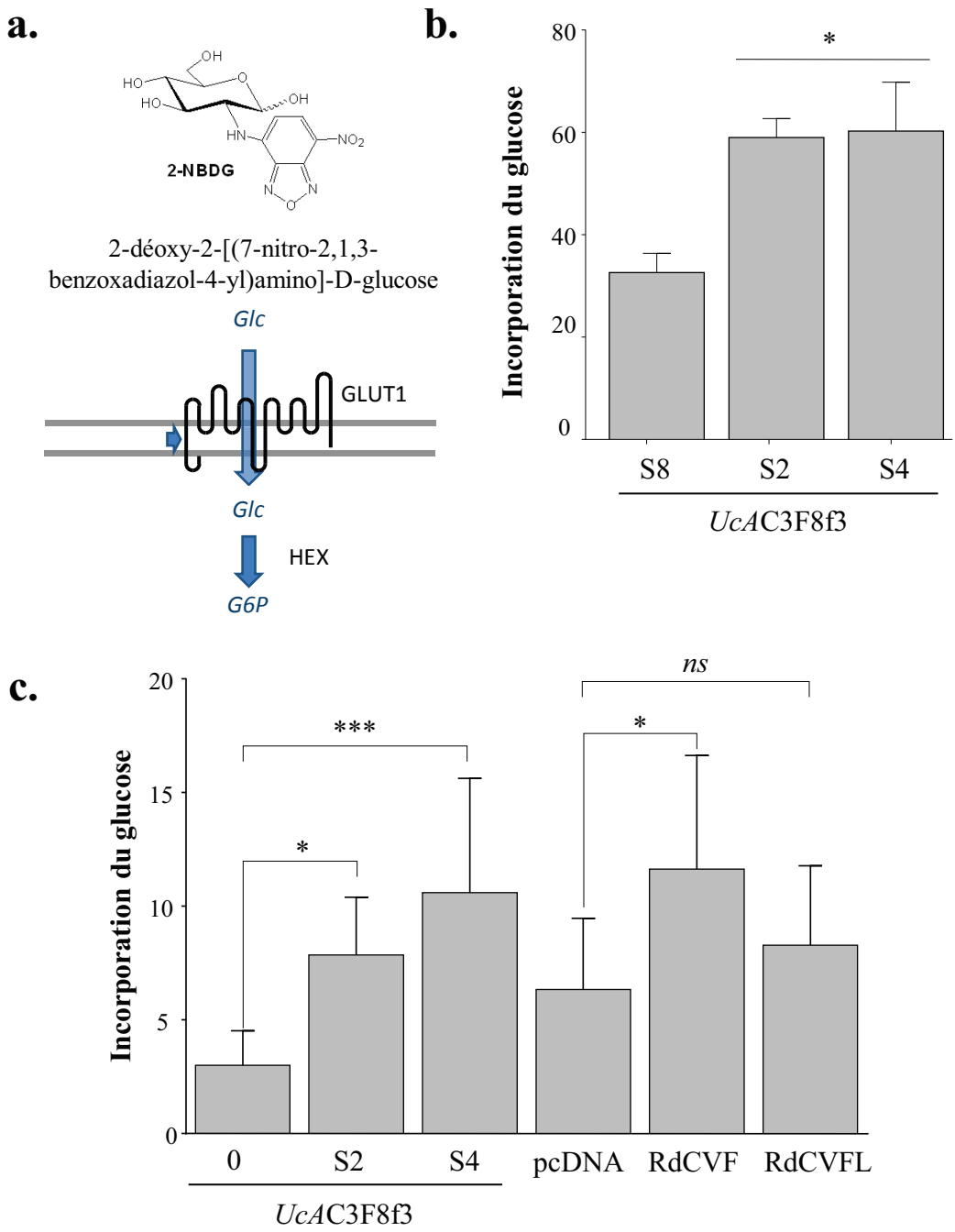


Figure 108: Induction de l'incorporation du glucose par la fraction *UcA*C3F8f3S2 et S4. a. la mécanisme d'incorporation du glucose et la sonde utilisée. **b.** Stimulation de l'incorporation du glucose par les fractions *UcA*C3F8f3S2 (500 ng/ml), S4 (100 ng/ml), mais pas *UcA*C3F8f3S8 (500 ng/ml) **c.** Stimulation de l'incorporation du glucose par les fractions *UcA*C3F8f3S2 (500 ng/ml), S4 (100 ng/ml) et RdCVF. **c.** Stimulation de l'incorporation du glucose par les fractions *UcA*C3F8f3S2 et S4. pcDNA, RdCVF et RdCVFL correspondent à des milieu conditionnés de cellules COS-1 transfectées avec les plasmides pcDNA3 (vecteur vide), pRdCVF (facteur trophique) et pRdCVFL (thiorédoxine).

réduit pas l'activité trophique *Uc*SUCF1, il semble même que celle-ci soit potentialisée. Ce résultat est parfaitement compatible avec ceux obtenus pour l'oxamate et confirme l'implication de la glycolyse aérobie dans le mécanisme d'action trophique d'*Uvaria chamae*.

Ces résultats nous ont amené à nous poser la question de l'implication du transport du glucose. Pour tester l'incorporation du glucose dans les cellules enrichies en cônes, nous avons utilisé un analogue non métabolisable du glucose le 2-déoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG). Celui-ci est fluorescent et permet de mesurer la quantité relative d'incorporation du glucose (**Fig. 108a**). Lors des essais, les cultures enrichies en cônes ont été incubées pendant quatre jours avec les fractions d'*Uvaria chamae*, ensuite le milieu contenant du glucose été éliminé et remplacé par un milieu contenant la sonde 2-NBDG mais pas de glucose (M&M, chapitre 13). Dans un premier essai, nous avons pu montrer que les fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 entraînaient une plus grande incorporation de glucose dans la cellule que la fraction inactive *UcAC*3F8f3S8 (**Fig. 108b**). Lors d'un second essai, l'activité de ces fractions sur l'incorporation du glucose a été comparée à RdCVF. *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 entraînent une plus grande incorporation de glucose dans la cellule comparativement au contrôle négatif (**Fig. 108c**). Dans cet essai, le facteur trophique RdCVF est actif alors que la thiorédoxine RdCVFL ne l'est pas.

Nous avons ensuite testé la possibilité que l'augmentation du transport du glucose par les métabolites secondaires d'*Uvaria chamae* impliquait le récepteur de RdCVF, BSG1 (**Fig. 104**). Pour ceci, nous avons mesuré l'activité d'inhibition d'une forme soluble de BSG1, exBSG1. Cette construction correspond à la partie extracellulaire du récepteur mais ne comprend pas le domaine transmembranaire (Fig. 109a). Lorsque celle-ci est ajoutée en présence de RdCVF, elle s'y lie et inhibe par compétition la signalisation trophique. Deux essais ont été réalisés indépendamment. Lors du premier essai, la fraction inactive *Uc*C3F81f3S1 a été comparée aux fractions actives *Uc*C3F81f3S2 et *Uc*C3F81f3S4. Une réduction du facteur de viabilité de 4,5 à 2,6 a été constatée pour des concentrations croissantes d'exBSG1 avec la fraction S2 (**Fig. 109b**). Pour la fraction S4, la réduction de FV est de 6,6 à 5,1. Dans aucun des cas, l'effet trophique n'a pu être annulé comme nous l'avons par ailleurs observé pour RdCVF. Lors du deuxième essai, les mêmes fractions actives ont été comparées à la fraction inactive *Uc*C3F81f3S8. Ces derniers résultats ne semblent pas conforter un rôle de BSG1 dans la signalisation d'*Uvaria chamae*. En effet, les facteurs de viabilité à la plus haute concentration d'exBSG1 pour les fractions S2 et S4 ne montrent pas de réduction significative (**Fig. 109c**). Cette expérience un peu compliquée peut aussi expliquer la variabilité des résultats. Nous procéderons donc par une autre approche consistant à réduire l'expression endogène de BSG1 par ARN interférence.

Les propriétés partiellement hydrophobes des fractions actives d'*Uvaria chamae*, ainsi que la masse réduite des métabolites secondaires comparativement aux macromolécules telles que les protéines, nous ont amené à explorer la possibilité que la cible des molécules actives étaient une protéine intracellulaire. Cette cible serait théoriquement impliquée dans la glycolyse aérobie, à une étape limitante du flux métabolique. La phosphofructokinase (PFK) est l'enzyme allostérique qui régule la glycolyse (Stryer et al., 2003) (**Fig. 104**). La rétine de la souris se différencie après la naissance. Les précurseurs des cellules rétiniennes cessent de se diviser et se différencient en cellules gliales et en différents type de neurones (**Fig. 38**).

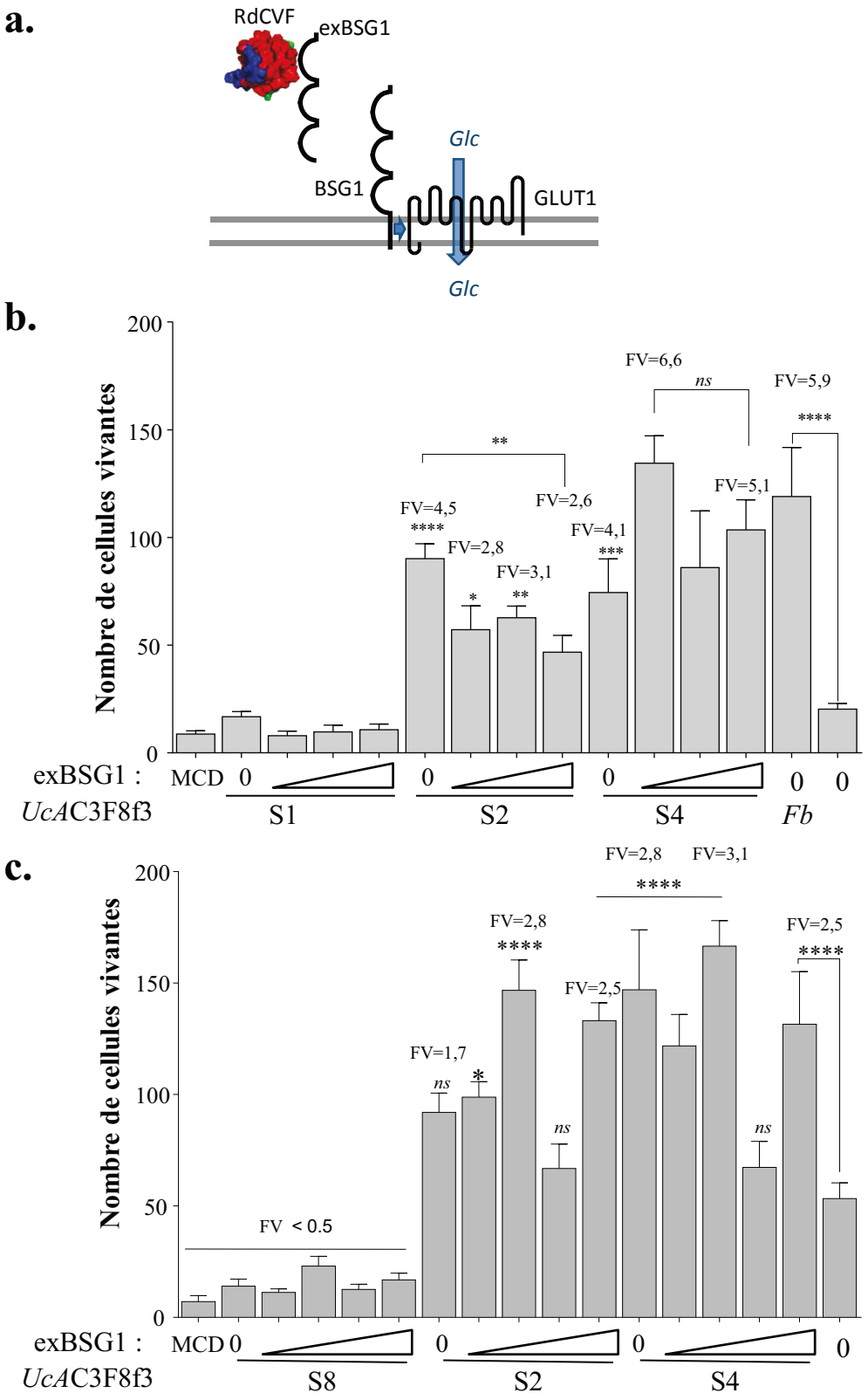


Figure 109: Test de l'implication de BSG1 dans l'effet trophique des fractions d'*Uvaria chamae*. **a.** Mécanisme de compétition par la protéine exBSG1. **b.** Effet sur l'activité trophique des fractions *Uc*C3F81f3S1 et S2 (500 ng/ml) et S4 (100 ng/ml) en présence de quantité croissante de exBSG1. **c.** Effet sur l'activité trophique des fractions *Uc*C3F81f3S8 et S2 (500 ng/ml) et S4 (100 ng/ml) en présence de quantité croissante de exBSG1. Cultures à 1 x 10^5 cellules /cm^2.

Les segments externes des photorécepteurs, d'abord inexistants s'allongent progressivement entre 10 et 22 jours (LaVail, 1973). Comme les opsines sont les constituants protéiques majeurs des segments externes, l'expression des ARN messagers des opsines est un bon indicateur de l'état de différenciation des photorécepteurs. Ainsi, l'expression du messager de la rhodopsine (*Rho*) atteint son maximal d'expression à 20 jours chez la souris normale (wt, **Fig. 54**). Nous avons donc examiné le transcriptome de la souris au cours de la différenciation cellulaire entre 5 à 21 jours et recherché les messagers codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse aérobie. Ainsi l'expression du messager de l'hexokinase 2 (*Hk2*), qui est spécifique de l'effet Warburg ou glycolyse aérobie augmente entre 9 et 21 jours (Wolf et al., 2011) (**Fig. 110a**). L'expression de *Glut1* n'est pas substantiellement modifiée durant cette période. Par contre l'expression du messager du transporteur du lactate *Slc16a1* et celui de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 (*Pfkfb2*) précèdent celle de l'hexokinase avec un saut d'expression entre 9 et 11 jours, comme si le métabolisme particulier des photorécepteurs se mettait en place à ce stade de la différenciation de la rétine. Il y a quatre gènes codant pour une 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) chez les vertébrés, mais seul *Pfkfb2* présente ce profil d'expression particulier et suggestif. Les PFKFB sont responsables de la synthèse du fructose 2,6-bisphosphate (F26BP), l'activateur allostérique de la phosfructokinase (PFK), l'enzyme de régulation de la glycolyse (Rider et al., 2004) (**Fig. 110b**). Les PFKFB sont bifonctionnelles comprenant une activité fructose-2,6-bisphosphatase qui réduit la concentration de F26BP. Ainsi, un métabolite secondaire capable d'augmenter l'activité 6-phosphofructo-2-kinase ou de diminuer l'activité 2,6-bisphosphatase de PFKFB2 devrait provoquer une augmentation de la concentration intracellulaire de F26BP, l'activité de la phosfructokinase (PFK) et donc la glycolyse. La phosphorylation de PFKF2 aux résidus S466 et S483 entraîne l'activation constitutive de l'activité 6-phosphofructo-2-kinase et conjointement avec HK2, la synthèse des lipides (Moon et al., 2011). Comme les transporteurs du glucose tel que GLUT1 sont facilitants, c'est à dire qu'ils transportent le glucose selon son gradient de concentration, l'accélération de la glycolyse doit réduire la concentration de glucose intracellulaire et accélérer ainsi son transport du milieu extracellulaire vers le cytoplasme (Carruthers et al., 2009). Ceci s'accorderait donc avec les résultats de l'incorporation du glucose (**Fig. 108**). Étrangement, PFKFB2 est connue comme la forme cardiaque des PFKFB et n'a pas jusqu'à maintenant été reportée comme exprimée dans la rétine (Heine-Suner et al., 1998). Nous avons examiné l'expression tissulaire de son messager *in silico* grâce aux données disponibles dans notre base de connaissances (KBaSS, 2014). Parmi les 37 tissus examinés, l'expression dans la rétine est prépondérante et dépasse largement celle enregistrée pour le cœur (**Fig. 110c**). Nous avons donc examiné l'expression de PFKFB2 dans la rétine d'une souris adulte par « western blotting ». Comme les données *in silico* le laissaient entendre, PFKFB2 est exprimée à un niveau beaucoup plus élevé que le cœur et le cerveau (**Fig. 111a**). Afin de préciser le site d'expression dans la rétine nous avons examiné en triplicat l'expression de PFKFB2 dans la rétine de souris normales (wt) et de souris présentant une dégénérescence séquentielle des bâtonnets puis des cônes liée à la mutation du gènes *Pde6b*, la souris *rd1*. La perte d'expression du messager de la rhodopsine, spécifique des bâtonnets à 21 jours, signe la mort des bâtonnets à cet âge (**Fig. 54a**). Pourtant, à cet âge, l'expression de PFKFB2 n'est pas significativement différente entre la rétine wt et *rd1* (**Fig. 111b**). Par contre l'expression de PFKFB2 est réduite à 35 jours dans la rétine de la souris *rd1* (**Fig. 111c**). Puisque la perte des cônes suit directement celle des bâtonnets après

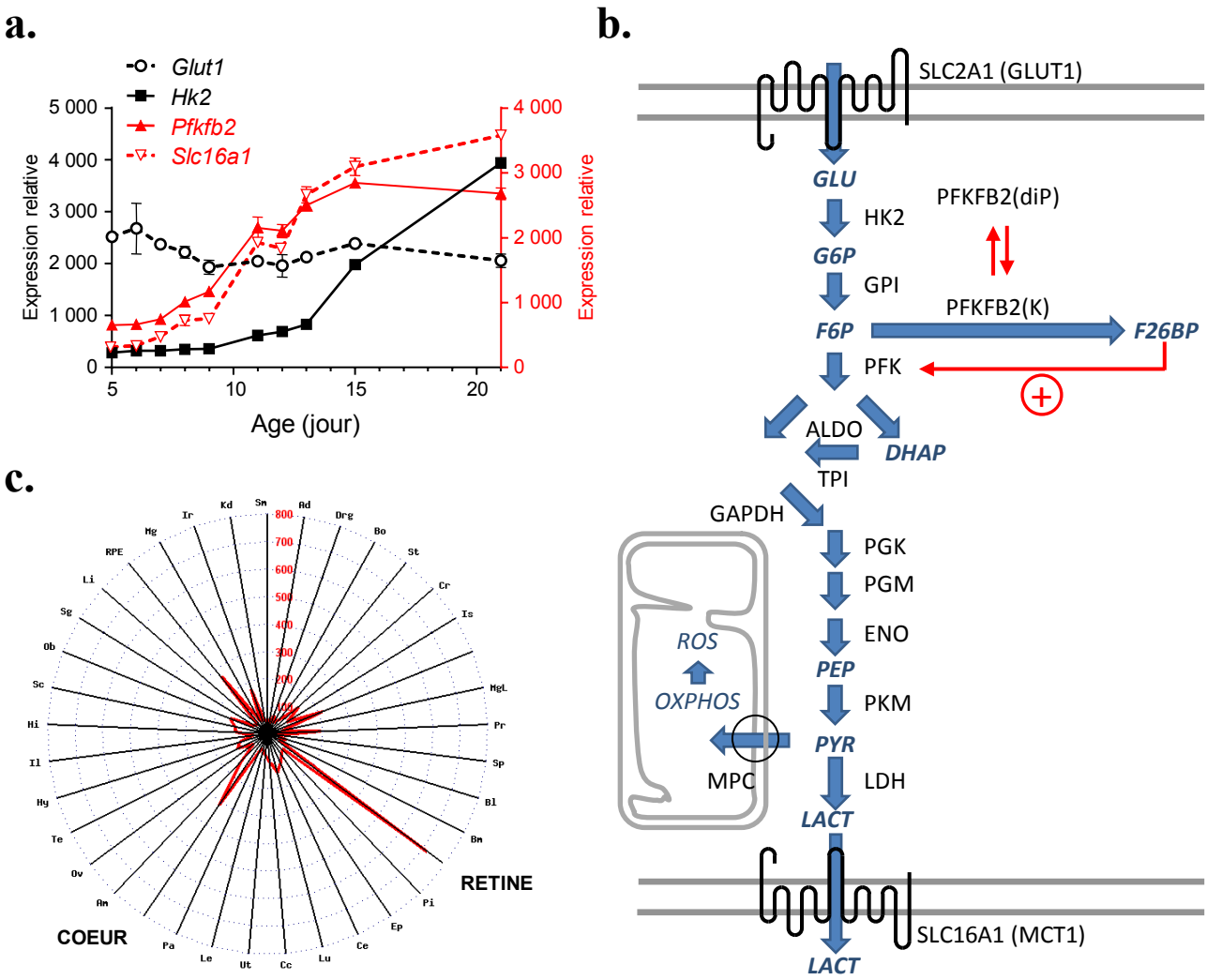
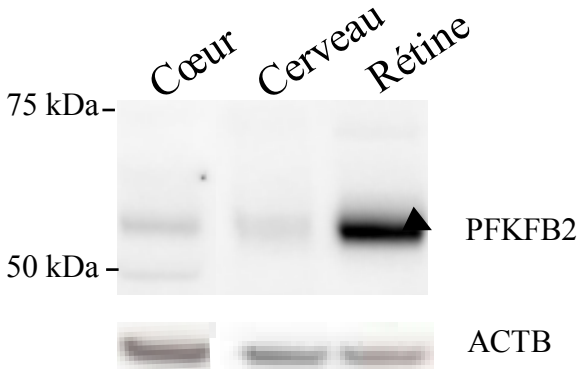
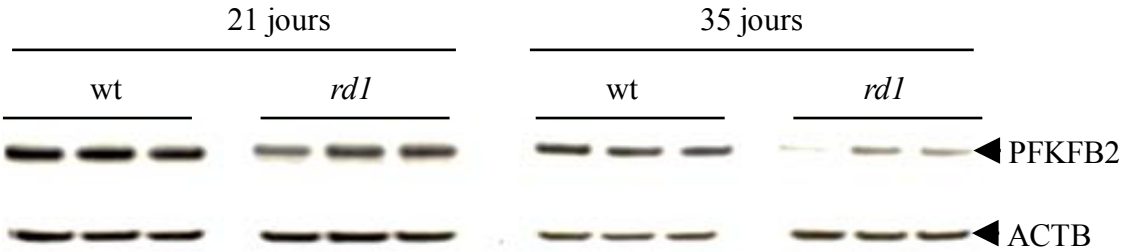


Figure 110: La glycolyse aérobie lors de la différentiation des photorécepteurs chez la souris. **a.** Expression des messagers de *Glut1*, *Hk2*, *Slc16a1* et *Pfkfb2* durant la différentiation de la rétine chez la souris **b.** Le rôle de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 (PFKFB2) dans la glycolyse **c.** Expression tissulaire de *Pfkfb2* chez la souris. L'expression est donnée sous forme d'un radar.

a.



b.



c.

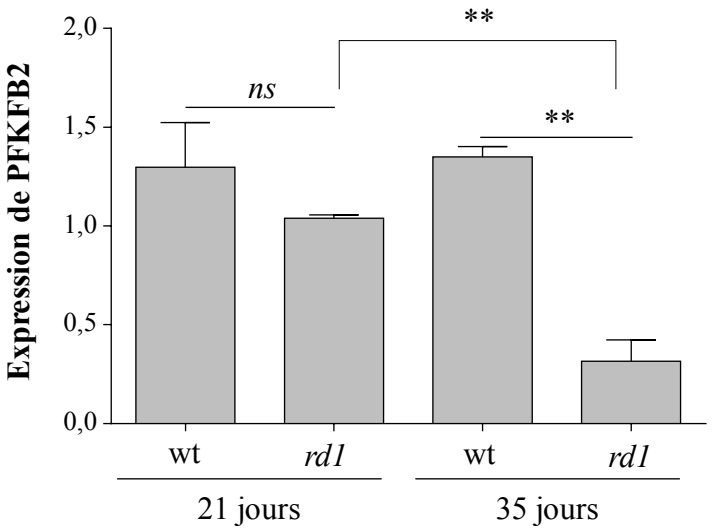


Figure 111: Expression de PFKFB2 dans des rétine de souris wt et *rd1*. a. Analyse par immunoempreinte de l'expression de PFKFB2 dans le cœur, le cerveau de la rétine d'une souris normale âgée de 35 jours. **b.** Analyse par immunoempreinte de l'expression de PFKFB2 aux jours de la maturation de la rétine chez la souris normale wt (C57BL/6@J) et *rd1* (C3H/HE@N) pour n=3. **c.** Quantification selon de rapport PFKFB2/ACTB. ACTB, actine cytoplasmique. Analyse t-test. Valeur de p = 0,001.

la perte d'expression de RDCVF, ce profil temporel d'expression est compatible avec une expression préférentielle de PFKFB2 par les cônes. Nous rechercherons donc l'effet de l'inhibition de l'expression de PFKFB2 dans les cultures enrichies en cônes par ARN interférence sur l'effet trophique des métabolites secondaires contenus dans les feuilles d'*Uvaria chamae*.

III.7 CARACTERISATION DU METABOLITE ACTIF SUR LA SURVIE

Le *Fructus barbarum* est utilisé en médecine traditionnelle pour son action bénéfique sur la vision. Des analyses HPLC-MS, GC-MS couplées à des études de résonnance magnétique nucléaire sur des extraits aqueux de baies de *Fructus barbarum* ont mis en évidence des glycoprotéines dénommées les LBP (liposaccharide binding protein). Ces carbohydrates sont liés par des liaisons o-glycosidiques aux résidus thréonine et sérine des protéines, leur conférant ainsi une grande diversité chimique et un hauts poids moléculaire. Dans un modèle de maladies de Parkinson, Alzheimer (AD), Huntington, les LBP diminuent les induits de glutamate et causent également la diminution de la phosphorylation de TAU, préservant la survie neuronale. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré les effets protecteurs des LBP sur la survie des cellules ganglionnaires rétiniennes (t M yang). La cible et le mécanisme d'action des LBP ne sont pas connus mais, de par leur grande diversité chimique, les LBP semblent être capables de toucher plusieurs cibles impliquées dans des pathologies multifactorielles comme les dégénérescences rétiniennes. Nous avons prouvé l'effet protecteur sur la survie des cônes du *Fructus barbarum,* ce qui a renforcé son utilisation dans nos essais comme témoin positif.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons émis l'hypothèse que la molécule active d'*Uvaria chamae* sur la survie des cônes pourrait appartenir à la famille des arabinogalactoprotéines (AGP), connues pour posséder de hauts poids moléculaires. Ces protéines sont, pour la plupart, complexées à des fonctions oses comme le sont les LBP et exercent une multitude de rôles dans le développement et la croissance des végétaux.

III.7.1 SEPARATION PAR TAILLE DES FRACTIONS ACTIVES D'*UVARIA CHAMAE*

Afin de valider ou réfuter cette hypothèse nous permettant de déterminer la nature des métabolites actifs sur la survie des photorécepteurs à cônes, des expériences d'ultrafiltration furent réalisées avec des filtres présentant une limite d'exclusion de 3kDa, sur les fractions UcAC3F8f3S2 et UcAC3F8f3S4 en parallèle de celle issue du « scale up » *Uc*SUCF1 (**Fig. 113a**). Cette opération a conduit aux filtrats et rétentats de chacune d'entre elles. Les filtrats sont caractérisés par une couleur blanche à transparente, les rétentats sont quant à eux caractérisés par une coloration jaune pour la *UcAC*3F8f3S2 et *Uc*SUCf1, et odorante et de coloration verte pour la fraction trophique *UcAC*3F8f3S4. L'effet de ces fractions sur les cultures de cônes ensemencées à 1 x 10^5cellules/cm^2 a permis de mettre en évidence que le métabolite actif sur la survie se retrouve uniquement dans le rétentat, toutes fractions confondues. La fraction *Uc*SUCF1 testée à 100 ng/ml induit un FV de 2,5, cette activité est retrouvée dans le rétentat et absent du filtrat. Cette observation a été également constatée pour la fraction *UcAC*3F8f3S4 dont le FV du filtrat est inférieur à 2 dans le filtrat et de 3,2 pour le rétentat. Par comparaison, le FV de la fraction totale (dépôt) est de 2,1, dénotant un enrichissement en faveur du rétentat (**Fig. 113b**). Ces résultats semblent indiquer que

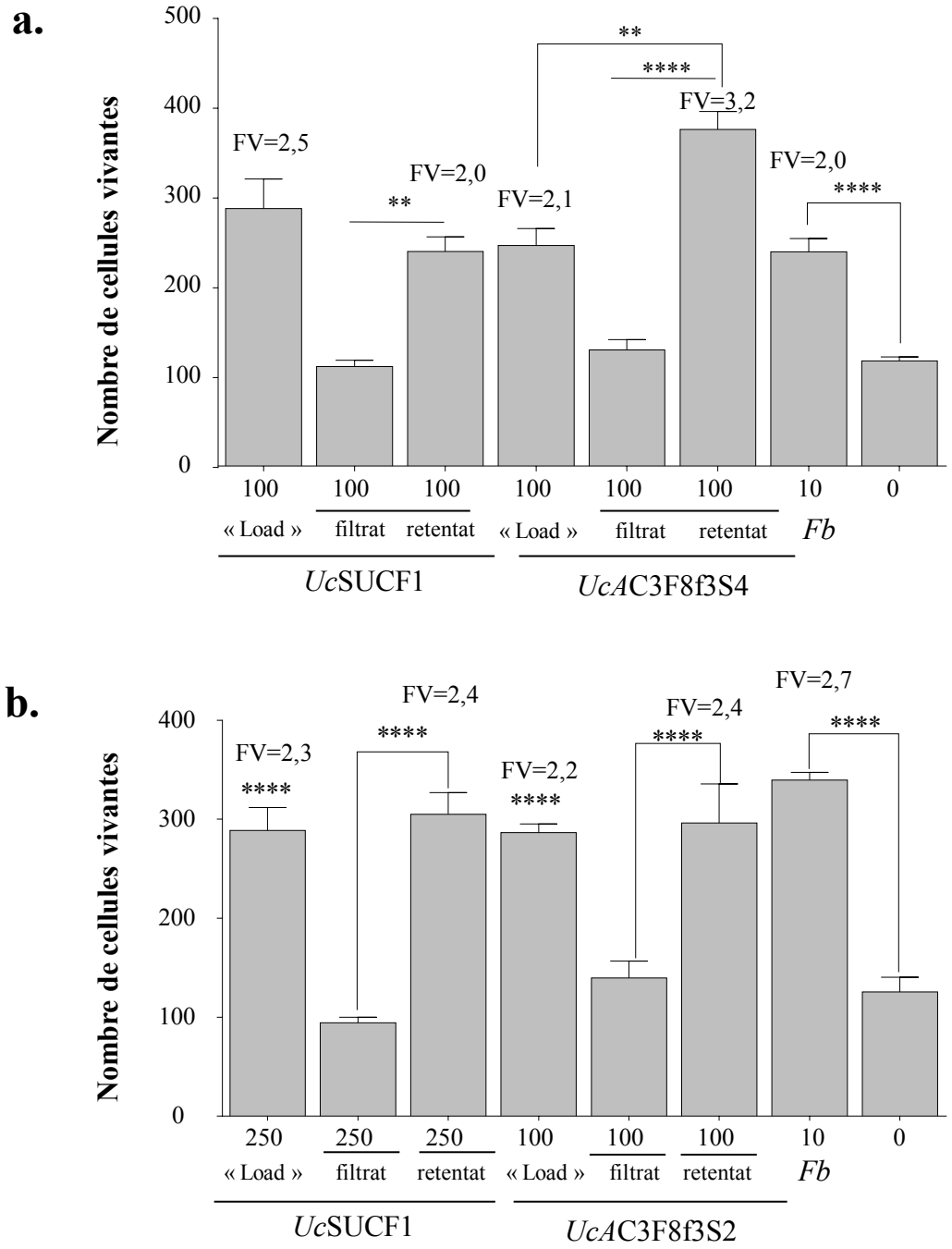


Figure 112 : Ultrafiltration des fractions du « scale up » *Uc*SUCF1 est des fractions *UcA*C3F8f3S2 et *UcA*C3F8f3S4 sur filtre de 3 kDa. **a.** *Uc*SUCF1 et *UcA*C3F8f3S4 ont été testés à 100 et 250 ng/ml sur des cultures de cônes enrichies a 1 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, Extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. Statistique ANOVA Analyse statistique option multiples comparaisons test de Dunnett. (****), valeur de $p < 0,0001$.

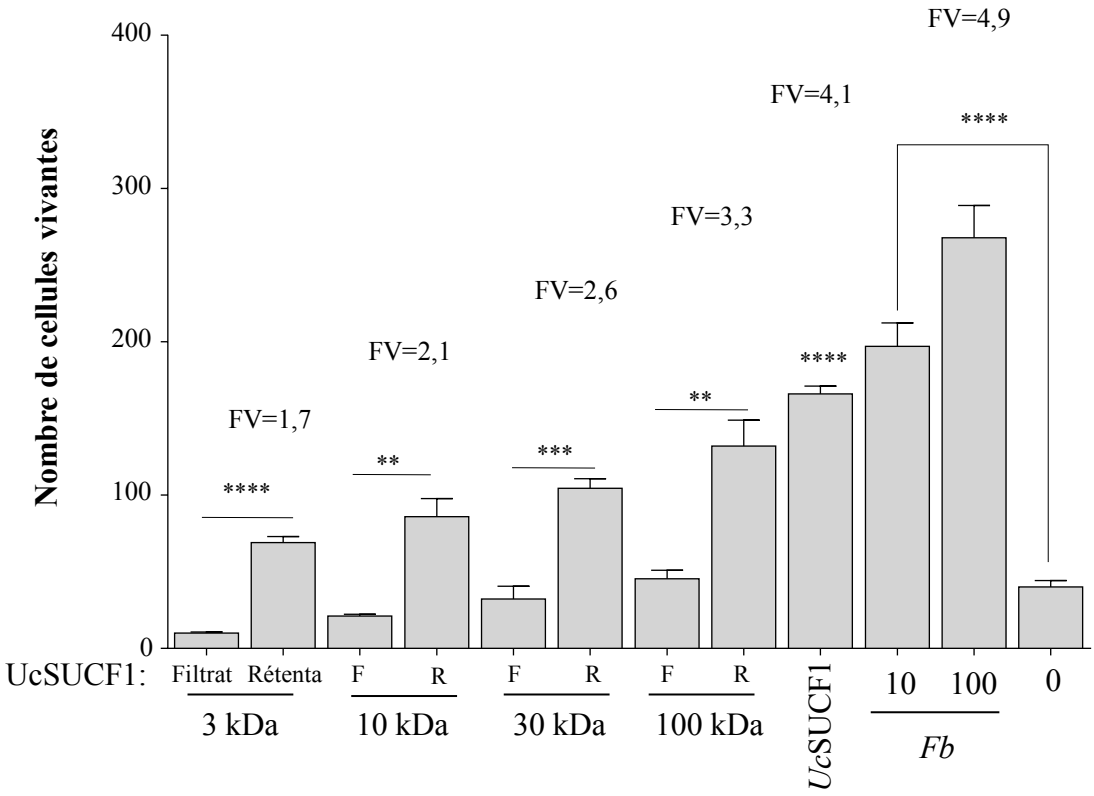


Figure 113: Ultrafiltration d'*Uc*SUCF1 avec des filtre d'exclusion de taille de 3, 10, 30, 100 kDa. a. Le filtrat (F) et le rétentat (R) d'*Uc*SUCF1 on été testés à 10 µg/ml sur des cultures de cônes ensemencées à 1 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. Statistique t-test et ANOVA test de Dunnett de comparaisons multiples au contrôle négatif . Valeur de $p < 0,0001$

l'exclusion sur filtre de 3 kDa a scindé dans ces fractions les molécules possiblement toxiques et neutres au niveau du filtrat et les métabolites protecteurs enrichis dans le rétentat. De façon comparable, la fraction *UcAC*3F8f3S2 présente à sa dose optimale le même comportement, avec un FV de 2,4 pour le rétentat, ce qui exprime un net enrichissement en métabolites trophiques comparé au filtrat, qui présente une légère toxicité en comparaison au contrôle négatif (**Fig. 113b**).

Afin de resserrer l'étau, nous avons utilisé une série de filtres avec des limites d'exclusions de 3,10, 30, 100 kDa sur la fraction « scale up » *Uc*SUCF1 (**Fig. 114a**). Les facteurs de viabilité des rétentats sont significativement supérieurs aux filtrats pour l'ensemble des filtres utilisés. Il semble que l'utilisation de diamètres de pores croissants soit en corrélation avec l'augmentation du facteur de viabilité qui est de 3,3 pour 100 kDa et de 2,7 pour un filtre de 10 kDa. L'incapacité de retrouver pour *Uc*SUCF1 un FV aux alentours de 4,1 s'explique par la difficulté de solubiliser le rétentat durant la reprise d'*Uc*SuCF1, concentré en métabolites, ainsi que par les pertes non spécifiques attribuées à l'utilisation du filtre. La transposition de ce procédé en « scale up » a nécessité l'utilisation d'un mode de séparation équivalent. Une centrifugation de plus de 50 000 g a été appliquée à *Uc*SUCF1. Le culot et le surnageant résultants furent testés en parallèle dans une gamme de concentrations de 1, 10, 100 µg/ml sur des cultures à 2 x 10^5 cellules/cm^2. Les résultats semblent en accord avec l'expérience d'ultrafiltration, l'ensemble des métabolites avec activité trophique sont dans le culot, alors que le surnageant en est appauvri. De plus un effet dose réponse est constaté avec un FV de 2,3 pour une concentration de 100 µg/ml (**Fig. 114a**). La comparaison entre la fraction *Uc*SUCF1 et son culot tend à indiquer un enrichissement des molécules protectrices dans le culot ainsi qu'un appauvrissement des molécules toxiques, suggérant que la centrifugation a séparé les molécules protectrices des molécules toxiques, ces dernières se retrouvant majoritairement dans le filtrat.

L'ensemble de ces résultats peut s'interpréter de deux façons : 1) les métabolites actifs se caractérisent par un haut poids moléculaire 2) Les molécules actives se trouve encastrée dans un complexe la maintenant dans les fractions culot et rétentat. Les analyses de masses conduites sur la fraction *UcAC*3F8 montrent des métabolites se situant dans une fourchette de masses allant de 254 à 1284 Da, ce qui semble soutenir l'hypothèse d'un complexe, ou agrégat, de métabolites encastrant les molécules actives sur la survie des cônes.

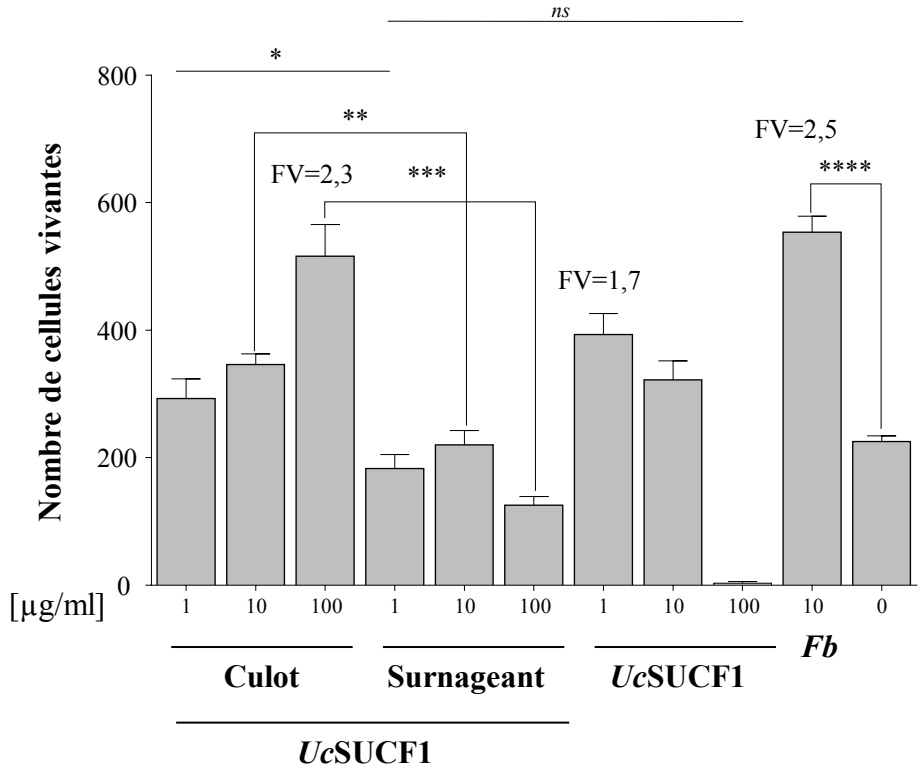


Figure 114: Ultracentrifugation de la fraction *Uc*SUCF1. La fraction *Uc*SUCF1 est centrifugée a 50 000 g durant 6 h. A l'issue du fractionnement *Uc*SUCF1 Culot et *Uc*SUCF1 Surnageant ont été testées en parallèle à leur contrôle *Uc*SUCF1 non centrifugé à 1, 10, 100 µg/ml sur des cultures enrichies en cônes à 2 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. Statistique ANOVA test de Dunnett test avec comparaisons multiples au contrôle négatif. Valeur de p <0,0001

III.7.2 EFFET DE LA DÉGLYCOSYLATION

Ces données obtenues par ultrafiltration ou centrifugation n'ont toutefois pas validé ou réfuté l'hypothèse des arabinogalactoproteines (AGP). Nous avons donc effectué une déglycosylation des fractions actives *UcAC*3F8f3S4 et de la fraction *Uc*SUCF1 par l'intermédiaire de différentes enzymes de clivages (**Fig. 115a**). La déglycosylation a été validée sur gel de Coomassie et par coloration argentique par l'intermédiaire de la déglycosylation d'un contrôle interne, la glycoprotéine fétuine **(Fig. 115b)**. Les activités des fractions glycosylées et non glycosylées d'*UcAC*3F8f3S4 et *Uc*SUCF1 ne montrent pas de différence significative, les FV sont similaires pour les deux formes à la même concentration **(Fig. 115c)**. Un effet dose dépendant est constaté pour *UcAC*3F8f3S4 avec un facteur de viabilité de 2,6 pour 50 ng/ml et de 3,8 pour 100 ng/ml. De ces résultats nous pouvons déduire que l'activité protectrice ne serait probablement pas imputée à un métabolite de la famille des AGP, des glycoprotéines ou à des sucres conjugués.

Ces procédés de separation par taille et par propriétes chimiques ont orienté l'étape de purification mise en place dans le « Scale up » en montrant le potentiel d'utilisation du caractère insoluble de la fraction *Uc*SUCF1In (**Fig. 100**).

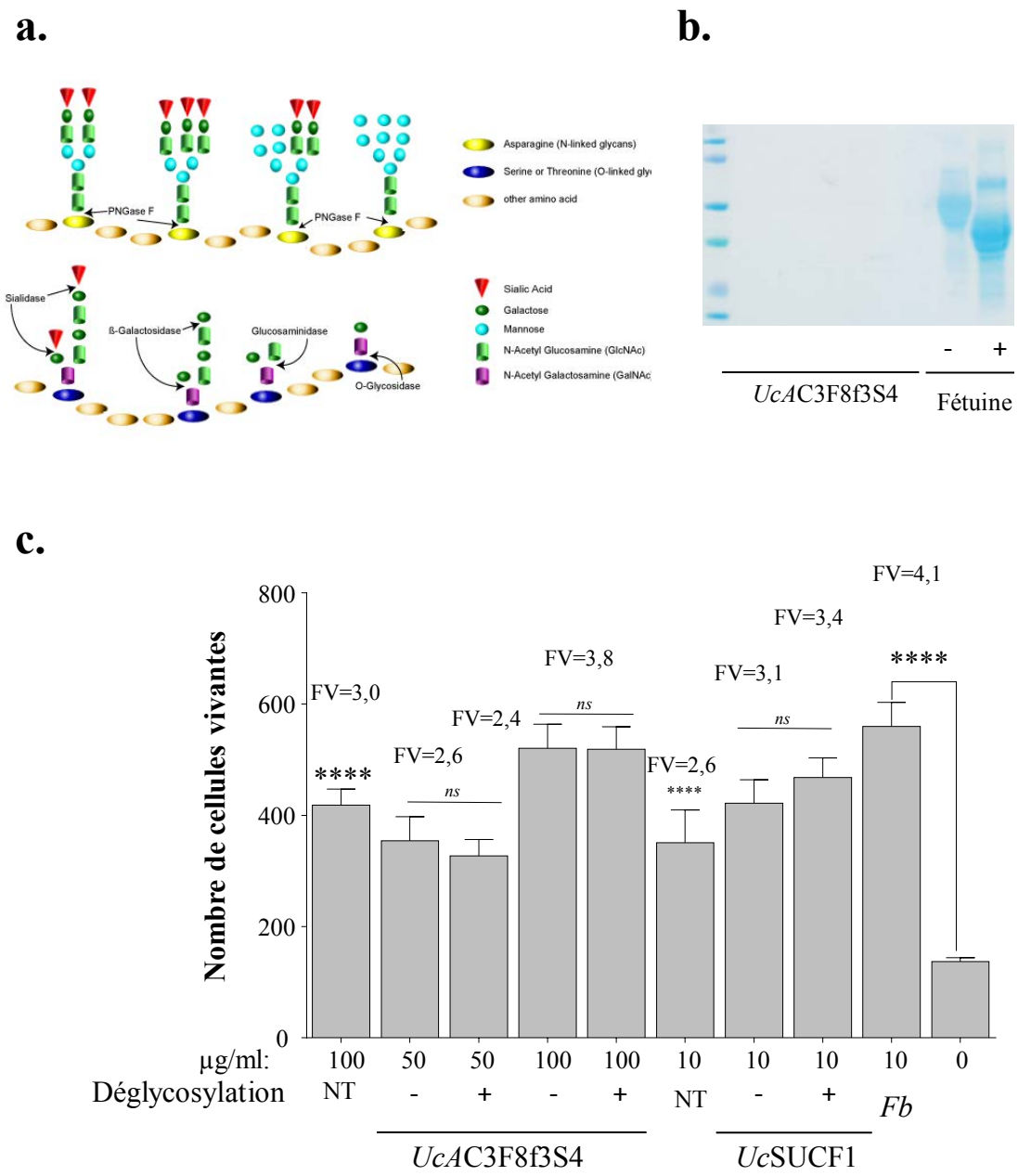


Figure 115: Effet de la déglycosylation des fractions *Uc*MCPC3F8f3S4 et *Uc*SUCF1 sur la survie des cônes. a. Schéma des sites de clivages de la réaction de déglycosylation (QAbio). **b.** Visualisation et validation de la déglycosylation de la glycoprotéine témoin fétuine sur gel coloré au bleu de coomsassie. **c.** Fraction *UcA*C3F8f3S4 non traitée (NT) et la fraction active du « scale up » *Uc*SUCF1 (NT) ont été déglycosylées (+) ou non (-) et testées à leur concentration optimale sur des cultures enrichies en cônes et ensemencées a 2 x 10^5 cellules/cm^2. *Fb*, extrait acétate d'éthyle de *Fructus barbarum*. FV, facteur de viabilité. Statistique ANOVA test Dunnett avec comparaisons multiples au contrôle négatif? Valeur de p <0,0001

IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

IV DISCUSSION ET PERSPECTIVES

IV.1 OÙ EN SOMMES-NOUS ?

Au stade actuel, nous avons produit par « scale up » 33,3 gr d'une fraction *Uc*SUCF1InR4D7 avec une activité trophique sensiblement équivalente à la fraction *UcAC*3F8f3 (**Table 10**). Ainsi la fraction *Uc*SUCF1InR4D7 présente un facteur de viabilité de 3,9 à 100 ng/ml (**Fig. 102a**) et la fraction *UcAC*3F8f3 un facteur de viabilité de 4,5 à 100 ng/ml (**Fig. 86b**). L'analyse du profil chromatographique de ces deux fractions nous indique que la fraction *Uc*SUCF1InR4D7 du « scale up » est sans doute moins hétérogène que la fraction *UcAC*3F8f3 (**Fig. 103**). Les 33,3 gr produits sont inférieurs aux 75 gr prédits par notre simulation (**Table 9**). Néanmoins, ceci ne représente pas réellement un handicap car la production des équivalents des fractions actives *UcAC*3F8f3S2A2-A3 et *UcAC*3F8S4B4 devrait maintenant pouvoir être optimisée. Ces deux fractions contiendraient un alcaloïde actif et un dérivé actif de cet alcaloïde (**Fig. 84** et **90a**) présentant une activité trophique à 0,188 nM, similaire à celle du facteur trophique RdCVF. Cette activité spécifique très élevée est parfaitement compatible avec le fait que les métabolites secondaires actifs contenus dans les feuilles d'*Uvaria Chamae* agissent sur la glycolyse aérobie comme RdCVF. Ainsi, les effets protecteurs des fractions *UcAC*3F8f3S2 et *UcAC*3F8f3S4 sont bloqués par l'oxamate, un inhibiteur de la lactate déshydrogénase (**Fig. 105**). De même, et comme pour RdCVF, le transfert du pyruvate dans la matrice mitochondriale n'est pas nécessaire à l'activité trophique de la fraction *Uc*SUCF1 issue du « scale up » comme le montre l'absence d'effet de l'inhibiteur du transporteur mitochondrial du pyruvate UK5099 (**Fig. 107**). Ces deux molécules seront très utiles pour faire le tri parmi les fractions actives lors de la présence d'ambiguïté dans les résultats (voir par exemple **Fig. 92b**).

Nous n'avons avons pas trouvé d'exemple dans la littérature de facteur trophique ou bien de métabolite secondaire issus de végétaux qui agissent en stimulant la glycolyse aérobie. Pourtant, le Pr Otto Warburg avait lui-même relevé que la rétine faisait exception à la restriction de l'effet Warburg aux seules cellules tumorales (Warburg and Dickens, 1931). L'explication la plus souvent avancée pour expliquer que les cellules cancéreuses fonctionnent selon un mode énergétique qui évite la phosphorylation oxydative de la mitochondrie, au détriment de la capacité à former des molécules d'ATP, est que ces cellules se multiplient rapidement et leur demande repose beaucoup plus sur l'utilisation du carbone provenant du glucose pour fabriquer les macromolécules que d'ATP qui est utilisé comme réserve énergétique pour les nombreuses activités enzymatiques de la cellule (Vander Heiden et al., 2009). L'explication de l'existence dans des conditions physiologiques de ce métabolisme particulier du glucose, la source énergétique principale des neurones, est très probablement liée au taux extrêmement élevé de renouvellement des segments externes des photorécepteurs durant toute la vie (Casson et al., 2012). Il est important de remarquer ici que la membrane des segments photorécepteurs à cônes est en prolongement de celui de la membrane du cône, ce qui n'est pas le cas pour les bâtonnets du fait de la présence de disques fermés (Young, 1969) (**Fig. 116a**). À cause de ces disques, les lipides doivent être transportés par des vésicules dans les bâtonnets (Chuang *et al.*, 2007) (**Fig. 116b**). Un défaut dans le mécanisme de fusion de ces vésicules conduit à la mort des bâtonnets (Nishiwaki *et al.*, 2013). Les cultures enrichies en cônes préparées à partir de rétines d'embryons de poulet

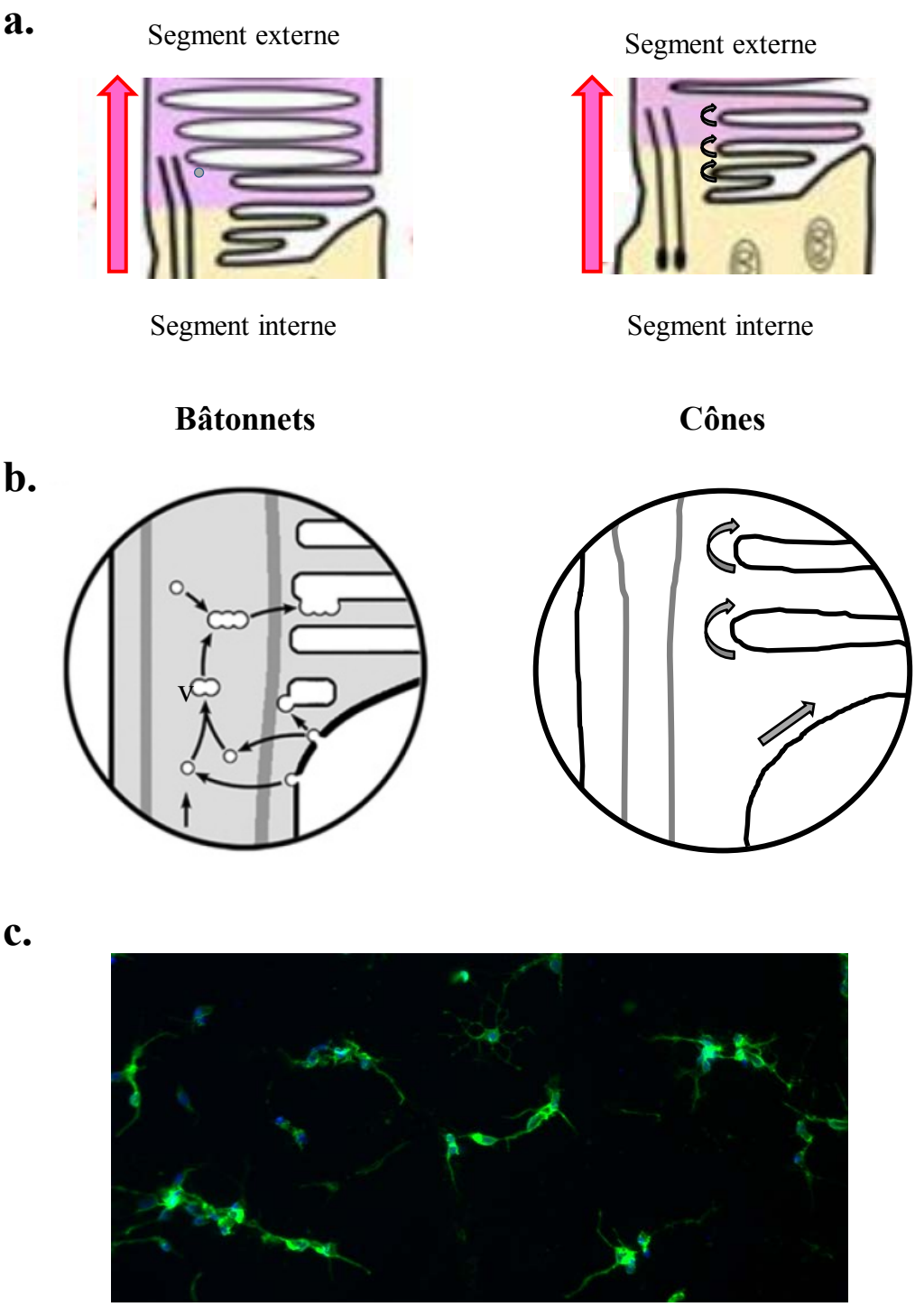


Figure 116: Différence des mécanisme de renouvellement des segments externes des bâtonnets et les cônes. a. Le transport des lipides du segment interne où ils sont synthétisés vers le segment externe. Noter l'absence de continuité de la membrane pour les bâtonnets. **b.** Détails illustrant le mécanisme de transport qui ne fait intervenir des vésicules (V) que pour les bâtonnets. Adapté de Chuang et coll., *Cell* 13, 535 (2007). **c.** Analyse immunocytochimique des cultures enrichies en cônes avec un anticorps dirigé contre l'opsine des cônes rouges (CERN 906).

constituent un modèle approprié d'étude de la survie des cônes à plusieurs égards. Ces cultures primaires de neurones sont constituées d'approximativement de ~80% de cônes, et ceux-ci s'allongent et se raccourcissent en fonction de la lumière et du rythme circadien. Ce sont ces prolongements que nous avons observés dans les cultures en présence des fractions actives des feuilles d'*Uvaria chamae* (**Fig. 87**, **94**, **96** et **97**). Cette morphologie caractéristique des cônes matures est très probablement liée à l'extension de la membrane plasmique des cellules à cônes, extensions qui ne sont pas sans rappeler l'ébauche de segment externe observée dans nos cultures provenant d'embryons de poulet. D'ailleurs lorsque ces cultures sont analysées par immunocytochimie, à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'opsine rouge des cônes de poulet (CERN 906, Paul Layer, université de Darmstadt), l'immunoréactivité membranaire se localise au niveau du corps cellulaire et dans ces prolongements, ou neurites (**Fig. 116c**). Ceci laisse à penser que les métabolites actifs d'*Uvaria chamae* induisent la survie des cônes en stimulant la glycolyse aérobie, peut être via PFKFB2, ce qui augmenterait la synthèse lipidique et ainsi la formation de pseudo segments externes. L'absence de ces dernières structures, comme nous avons pu le constater pour les cellules vivantes dans les essais réalisés avec des fractions inactives pourrait prédir leur mort prochaine, suite peut-être au déficit de production d'un lipide (**Fig. 87b** et **94b**).

Il est théoriquement possible que nous aurions pu identifier et caractériser un métabolite secondaire doté d'un pouvoir protecteur sur les cônes en nous concentrant sur l'extrait de *Ruta montana* (**Fig. 53** et **54**). Cependant, pour des raisons de propriète intelectuelle nous n'avons pas pu utiliser cette plante. Ce constat nous a conduits à identifier une nouvelle source par la methode criblage haut contenu. Nous avons ainsi pu expérimenter les différences entre le criblage d'une banque d'expression et une extraithèque de plantes. Cette dernière est constituée d'un mélange de molécules protectrices et de molécules cytotoxiques (**Fig. 65 et 66**). Ces molécules cytotoxiques interfèrent avec le processus de purification. Ainsi la fraction active *Uc*SUCF1InR4D7 est toxique à 100 µg/ml (**Fig. 102b**). Notre idée à l'origine était de cribler des plantes utilisées comme remède traditionnel pour traiter les affections oculaires, comme pour *Ruta graveolens* et *Fructus barbarum*. Ceci n'a pas été possible si tant est que cela ait été réalisable. En effet, les médecines traditionnelles ne sont pas prescrites par des ophtalmologistes et chaque plante est en fait utilisée pour de nombreuses applications. Ainsi 39% des plantes sont associées à plus de 10 termes médicaux, et, parmi les 39% des plantes n'étant associées qu'à un seul terme, aucune ne concerne les affections oculaires **(Fig. 117)**. Les 9 plantes annotées « ophthalmia » de la collection sont toutes retrouvées dans le groupe des 10 termes ou plus. Cela est peut-être lié au statut social des aveugles dans les sociétés primitives. Il faudrait très certainement travailler étroitement avec des ethnologues pour être en mesure de constituer une collection ethnopharmacologique de plantes utilisables en ophtalmologie. Rappelons que le Centre National Ophtalmologique des Quinze-Vingts, le premier hôpital ophtalmologique dans le monde, a été fondé par saint Louis vers 1260. Le nom de Quinze-Vingts correspond aux 300 lits de l'hôpital qui été étaient répartis en 15 rangées de 20 lits. D'abord fondé pour recueillir les soldats blessés au retour de la septième croisade, l'hôpital a ensuite été ouvert aux aveugles de Paris qui étaient en détresse. De part leur disponibilité, les plantes ont été largement utilisées en médecine traditionnelle pour de très nombreuses maladies. De même, de nos jours l'industrie pharmaceutique exploite encore les nombreuses propriétés médicinales des plantes, et cherche toujours à identifier de nouvelles plantes ou de nouveaux principes actifs.

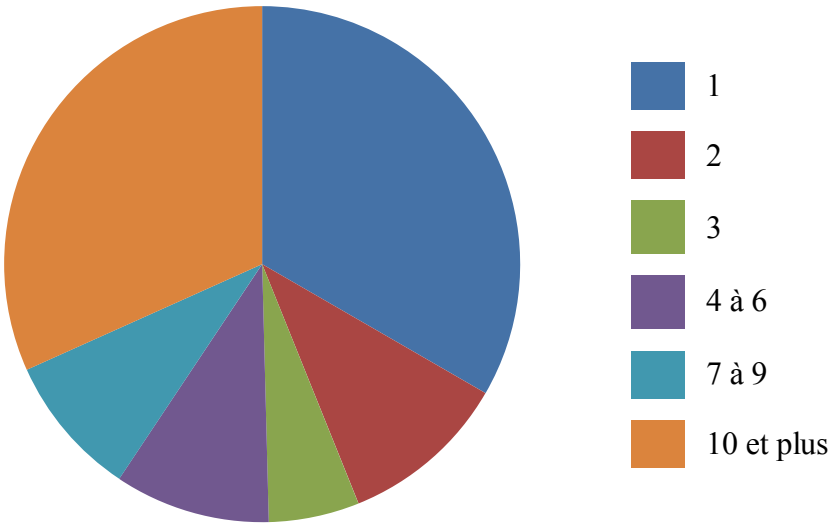


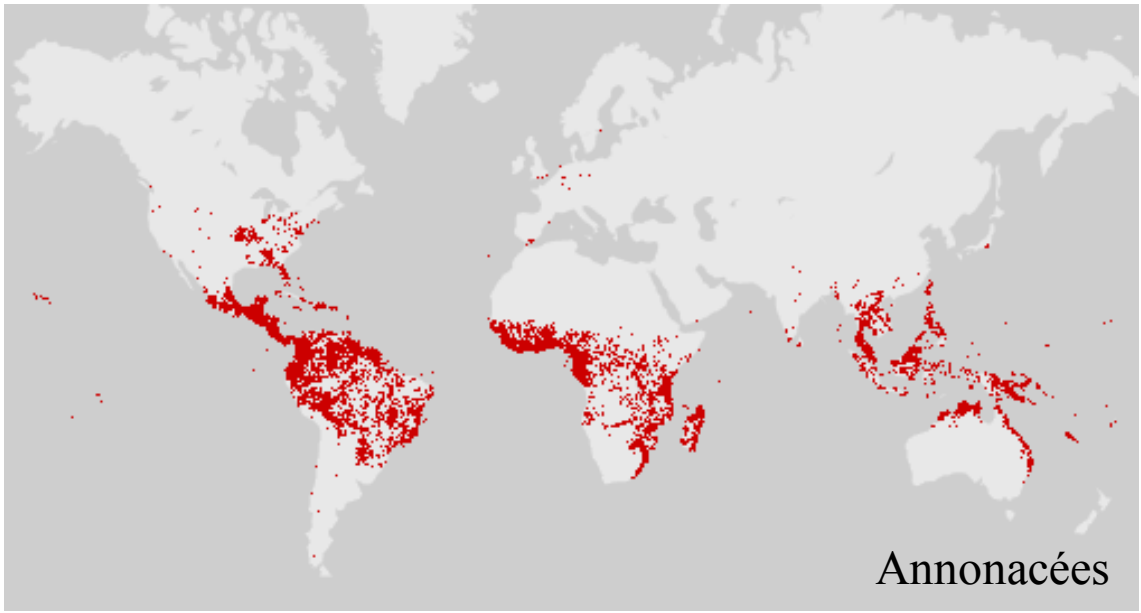
Figure 117: Nombre de termes médicaux associés aux plantes de l'extraithèque criblée. D'après la base de données par le Docteur Duke (Duke, 2014; Royal_botanic_gardens, 2014).

Le fait que la molécule active ne soit pas encore isolée et caractérisée est en relation avec sa concentration, sans doute faible, dans les feuilles d'*Uvaria chamae* ce qui nous a conduit à procéder à un « scale up » avec 100 kg de feuilles. Cette quantité de matériel biologique n'est pas sans rappeler, toute proportion gardée, la purification de la brassinolide à partir de 200 kg d'un extrait de pollen de colza (*Brassica napus*) guidée par la capacité des fractions de l'extrait à favoriser l'élongation cellulaire (Grove et al., 1979). La brassinolide active un récepteur exprimé à la surface des cellules végétales. Il s'agit sans doute d'une indication forte du potentiel thérapeutique des métabolites actifs d'*Uvaria chamae* pour traiter les dégénérescences rétiniennes héréditaires, dont la rétinopathie pigmentaire. Il est très peu probable que cette molécule s'ajoute à la longue liste des antioxydants utilisés contre le vieillissement car son action semble différente.

IV.2 OÙ ALLONS-NOUS ?

Après isolement et caractérisation, les métabolites secondaires des feuilles d'*Uvaria Chamae* pourraient être administrés aux patients atteints de rétinopathie pigmentaire pour prévenir la perte des cônes et donc de la vision centrale (Leveillard, 2014). La structure de ces molécules pourrait être utilisée pour en réaliser la synthèse de novo, mais l'exemple du taxol nous conduit à rester prudent sur cette dernière perspective (Mangatal et al., 1989). L'autre option, plus réaliste à ce stade du projet serait d'administer la molécule active sous forme d'un phytomédicament lors d'essais précliniques et dans la première phase d'un éventuel essai clinique et d'en obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) (Choi et al., 2013). Le fait qu'*Uvaria chamae* n'est pas indiquée de manière explicite pour le traitement des affections oculaires au Burkina Faso ou ailleurs, nous porte à penser que nous ne pouvons être accusés de biopiraterie. Elle est associée à vingt termes dans la base du Dr. Duke, dont dysenterie, fièvre jaune, jaunisse, ophtalmie, purgatif,… (**Table 3**). En effet, notre approche de criblage d'une extraithèque de plantes médicinales se départit de l'acte caractérisé de biopiraterie (Vermaak et al., 2011). *Hoodia gordonii* est une plante succulente typique du désert de Namibie, utilisée traditionnellement par les Khoi-Sans comme coupe-faim. Cette plante est convoitée par certains laboratoires pharmaceutiques, qui aimeraient breveter son utilisation dans les régimes amaigrissants. Pour ce faire, notre fournisseur au Burkina Faso a été averti qu'une demande importante de feuilles d'*Uvaria chamae* pourrait lui être adressée pour la prochaine collecte, en Juin 2015. Nous pouvons bien entendu, et dès maintenant, tenter d'acclimater la plante en France, où elle n'existe pas à notre connaissance. En effet *Uvaria chamae* appartient aux annonacées, une famille ne regroupant que des espèces tropicales (**Fig. 118a**). Elle appartient à l'ordre des magnoliales dont l'aire de répartition inclus l'Europe (**Fig. 118b**). Il est intéressant de remarquer qu'*Uvaria chamae* et la famille des annonacées sont des plantes très archaïques (Leboeuf et al., 1982). Trois espèces d'annonacées ont été identifiées par criblage haut contenu : *Uvaria chamae*, *Annona senegalensis* et *Xylopia vielana* (**Table 4** et **Fig. 65**). L'effet trophique d'*Uvaria chamae* et d'*Annona senegalensis* requiert l'activité de la lactate déshydrogénase, et passe donc par la stimulation de la glycolyse aérobie (**Fig. 106a**). Il est semble-t-il légitime de s'interroger sur l'existence d'un métabolite secondaire avec une activité trophique sur les cônes qui soit présent dans l'ensemble des espèces de magnoliales. L'arbre phylogénétique se découpe en 6 branches (**Fig. 119a**) qui inclut une famille largement distribuée en France, celle des magnoliacées dont le magnolia (**Fig. 119b)**. Nous testerons donc des extrais de magnolia, qui

a.



b.

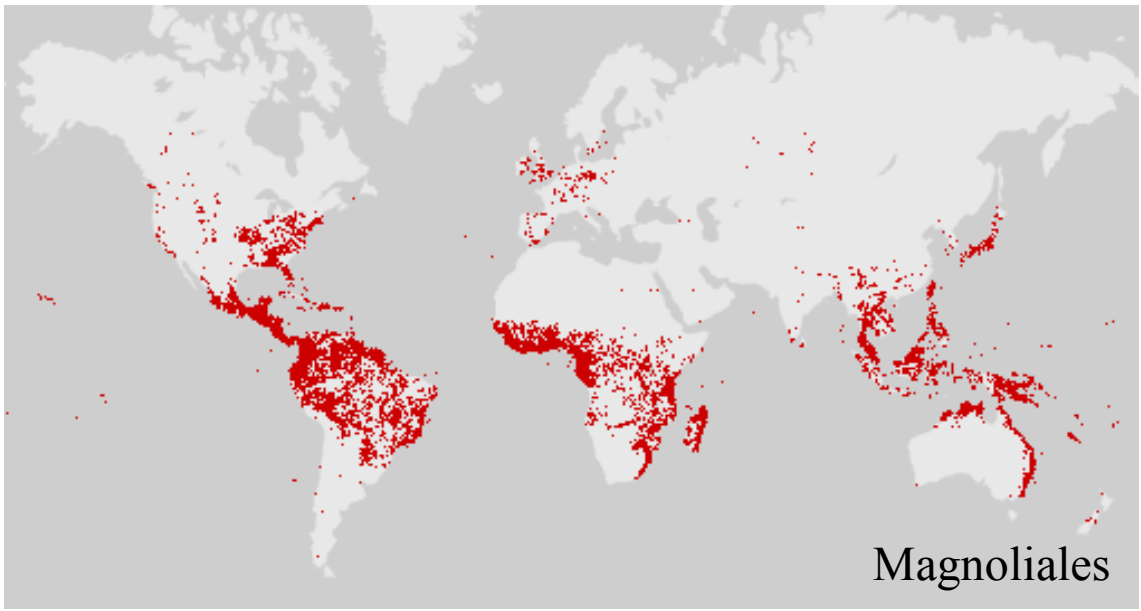
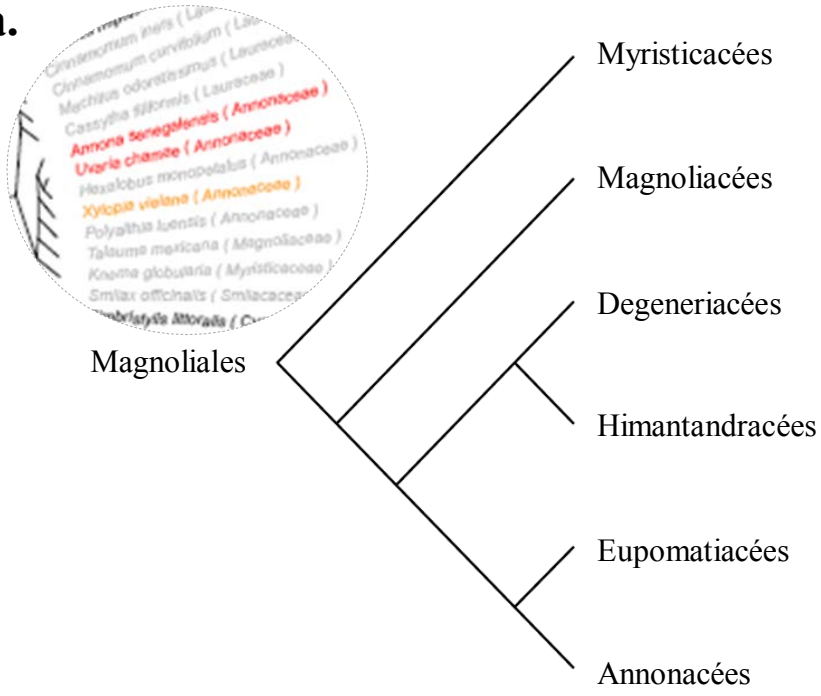


Figure 118: Répartition géographique des plantes apparentées à *Uvaria chamae*. **a.** La famille des annonacées**.** **b.** Le genre des magnoliales**.**

a.



b.



Figure 119: Les magnoliacées comme source potentiel de métabolites secondaires trophiques pour les études précliniques. a. Arbre généalogique des magnoliales. Détail de la figure 67. **b.** Répartition des magnoliacées en France (en jaune)**.**

possède aussi des caractères primitifs, pour chercher une source plus abondante et aisément accessible de métabolites secondaires protégeant les cônes.

Ces métabolites secondaires seraient administrés à des patients souffrant de rétinopathie pigmentaire, et pour lesquels le gène causal et la mutation précédemment ont été caractérisés. Des patients avec une mutation dominante dans le gène de la rhodopsine, exprimé sélectivement par les bâtonnets, ont déjà été recrutés pour les essais impliquant RdCVF au centre d'investigation clinique des Quinze-Vingts (Audo et al., 2010). Le mécanisme d'action proposé ici des métabolites secondaires contenus dans les feuilles d'*Uvaria chamae* impliquant une augmentation de la concentration de F26BP, le régulateur allostérique de la glycolyse, via PFKFB2, suggère qu'ils pourraient agir en synergie avec RdCVF. La stimulation du transporteur du glucose GLUT1 augmente la concentration de glucose dans la cellule et la stimulation de la glycolyse accélère de manière indépendante et donc cumulative la production de précurseurs des lipides pour renouveler les segments externe des cônes. Ce renouvellement suit leur phagocytose (raccourcissement) par l'épithélium pigmentaire rétinien aux premières heures du jour (Boudard et al., 2011). L'expression du messager de RdCVF cycle selon le rythme nycthéméral avec une expression minimale la nuit et progressant durant la journée en parallèle à l'allongement des segments externes des photorécepteurs (Elachouri *et coll.*, manuscrit en préparation). La délivrance de RdCVF par thérapie génique ne reproduira pas ce cycle parce qu'il sera introduit dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dans un vecteur VAA avec un promoteur ubiquitaire. Il serait ainsi concevable de stimuler la glycolyse aérobie à un niveau supérieur à celui dû au seul vecteur RdCVF en administrant le matin, avant même d'ouvrir les yeux ou bien de s'exposer à la lumière les métabolites actifs d'*Uvaria chamae* en vue de stimuler au maximum le renouvellement des segments externe des cônes qui sont si importants pour la vision centrale.

V

BIBLIOGRAPHIE

V BIBLIOGRAPHIE

Acland, G.M., Aguirre, G.D., Bennett, J., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Bennicelli, J., Dejneka, N.S., Pearce-Kelling, S.E., Maguire, A.M., Palczewski, K., *et al.* (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. Mol Ther *12*, 1072-1082.

Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., *et al.* (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nature genetics *28*, 92-95.

Adler, R., and Hatlee, M. (1989). Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. Science *243*, 391-393.

Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. Lancet Oncol *3*, 364-373.

Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., and Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale.

Allorge-Boiteau, L., and Ikor, O. (2003). La fabuleuse odyssée des plantes les botanistes voyageurs, les Jardins des plantes, les herbiers avec Olivier Ikor (Paris: J.-C. Lattès).

Allwood, J.W., and Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. Phytochemical analysis : PCA *21*, 33-47.

Amagase, H., and Nance, D.M. (2011). Lycium barbarum increases caloric expenditure and decreases waist circumference in healthy overweight men and women: pilot study. Journal of the American College of Nutrition *30*, 304-309.

Anati, E., and Nicolas, J. (2003). Aux origines de l'art trad. de l'italien par Jérôme Nicolas préf. de Yves Coppens (Paris: le Grand livre du mois).

Aniszewski, T. (2007). Alkaloids - secrets of life : alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role (Amsterdam ; Oxford: Elsevier).

Ashtari, M., Cyckowski, L.L., Monroe, J.F., Marshall, K.A., Chung, D.C., Auricchio, A., Simonelli, F., Leroy, B.P., Maguire, A.M., Shindler, K.S., *et al.* (2011). The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. The Journal of clinical investigation *121*, 2160-2168.

Audo, I., Manes, G., Mohand-Said, S., Friedrich, A., Lancelot, M.E., Antonio, A., Moskova-Doumanova, V., Poch, O., Zanlonghi, X., Hamel, C.P., *et al.* (2010). Spectrum of rhodopsin mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients. Investigative ophthalmology & visual science *51*, 3687-3700.

Baehr, W., Wu, S.M., Bird, A.C., and Palczewski, K. (2003). The retinoid cycle and retina disease. Vision research *43*, 2957-2958.

Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., *et al.* (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. The New England journal of medicine *358*, 2231-2239.

Ban, Y., and Rizzolo, L.J. (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. Brain research *121*, 89-95.

Barbehenn, R., Dukatz, C., Holt, C., Reese, A., Martiskainen, O., Salminen, J.P., Yip, L., Tran, L., and Constabel, C.P. (2010). Feeding on poplar leaves by caterpillars potentiates foliar peroxidase action in their guts and increases plant resistance. Oecologia *164*, 993-1004.

Barton, N.H. (2007). Evolution (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Berner, R.A. (1999). Atmospheric oxygen over Phanerozoic time. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 10955-10957.

Birch, D.G., Weleber, R.G., Duncan, J.L., Jaffe, G.J., and Tao, W. (2013). Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. American journal of ophthalmology *156*, 283-292 e281.

Bird, D.A., Franceschi, V.R., and Facchini, P.J. (2003). A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. The Plant cell *15*, 2626-2635.

Blanks, J.C., and Johnson, L.V. (1983). Selective lectin binding of the developing mouse retina. The Journal of comparative neurology *221*, 31-41.

Bohlmann, J., and Keeling, C.I. (2008). Terpenoid biomaterials. Plant J *54*, 656-669.

Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 4126-4133.

Boudard, D.L., Acar, N., Bretillon, L., and Hicks, D. (2011). Retinas of the diurnal rodent Arvicanthis ansorgei are highly resistant to experimentally induced stress and degeneration. Investigative ophthalmology & visual science *52*, 8686-8700.

Bowes, C., Danciger, M., Kozak, C.A., and Farber, D.B. (1989). Isolation of a candidate cDNA for the gene causing retinal degeneration in the rd mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *86*, 9722-9726.

Boycott, B.B., and Wassle, H. (1991). Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. The European journal of neuroscience *3*, 1069-1088.

Brace, C.L. (1974). Ethnology of Nott,Jc. B New York Acad Med *50*, 509-528.

Bricker, D.K., Taylor, E.B., Schell, J.C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y.C., Cox, J.E., Cardon, C.M., Van Vranken, J.G., Dephoure, N., *et al.* (2012). A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans. Science *337*, 96-100.

Brown, P.K., and Wald, G. (1963). Visual Pigments in Human and Monkey Retinas. Nature *200*, 37-43.

Capasso, L. (1998). 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. Lancet *352*, 1864.

Carruthers, A., DeZutter, J., Ganguly, A., and Devaskar, S.U. (2009). Will the original glucose transporter isoform please stand up! American journal of physiology Endocrinology and metabolism *297*, E836-848.

CAS http://www.cas.org/.

Casson, R.J., Chidlow, G., Han, G., and Wood, J.P. (2012). An explanation for the Warburg effect in the adult mammalian retina. Clinical & experimental ophthalmology.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L.*, et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science *288*, 669-672.

Cayouette, M., and Gravel, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. Human gene therapy *8*, 423-430.

Chae, L., Kim, T., Nilo-Poyanco, R., and Rhee, S.Y. (2014). Genomic signatures of specialized metabolism in plants. Science *344*, 510-513.

Chalmel, F., Leveillard, T., Jaillard, C., Lardenois, A., Berdugo, N., Morel, E., Koehl, P., Lambrou, G., Holmgren, A., Sahel, J.A.*, et al.* (2007). Rod-derived Cone Viability Factor-2 is a novel bifunctional-thioredoxin-like protein with therapeutic potential. BMC molecular biology *8*, 74.

Chan, H.C., Chang, R.C., Koon-Ching Ip, A., Chiu, K., Yuen, W.H., Zee, S.Y., and So, K.F. (2007). Neuroprotective effects of Lycium barbarum Lynn on protecting retinal ganglion cells in an ocular hypertension model of glaucoma. Experimental neurology *203*, 269-273.

Chang, G.Q., Hao, Y., and Wong, F. (1993). Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. Neuron *11*, 595-605.

Choi, J., Kim, T.H., Choi, T.Y., and Lee, M.S. (2013). Ginseng for health care: a systematic review of randomized controlled trials in Korean literature. PloS one *8*, e59978.

Chuang, J.Z., Zhao, Y., and Sung, C.H. (2007). SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods. Cell *130*, 535-547.

Churcher, T.S., Cohen, J.M., Novotny, J., Ntshalintshali, N., Kunene, S., and Cauchemez, S. (2014). Public health. Measuring the path toward malaria elimination. Science *344*, 1230-1232.

Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M.*, et al.* (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 15112-15117.

Clerin, E., Wicker, N., Mohand-Said, S., Poch, O., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2011). e-conome: an automated tissue counting platform of cone photoreceptors for rodent models of retinitis pigmentosa. BMC ophthalmology *11*, 38.

Clottes, J., and Lewis-Williams, D. (2007). Les chamanes de la Préhistoire transe et magie dans les grottes ornées suivi de Après "Les chamanes", polémiques et réponses (Paris: Seuil).

Colella, P., and Auricchio, A. (2012). Gene therapy of inherited retinopathies: a long and successful road from viral vectors to patients. Human gene therapy *23*, 796-807.

Cone, K.C., Burr, F.A., and Burr, B. (1986). Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus C1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *83*, 9631-9635.

Coronado, L.M., Nadovich, C.T., and Spadafora, C. (2014). Malarial hemozoin: From target to tool. Biochimica et biophysica acta *1840*, 2032-2041.

Courdavault, V., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., St-Pierre, B., and Burlat, V. (2014). A look inside an alkaloid multisite plant: the Catharanthus logistics. Current opinion in plant biology *19C*, 43-50.

Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2013a). Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochimica et biophysica acta *1830*, 3670-3695.

Cragg, G.M., and Newman, D.J. (2013b). Natural products: A continuing source of novel drug leads. Bba-Gen Subjects *1830*, 3670-3695.

Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.L., Kinzel, B., Clerin, E., Petrosian, A., Picaud, S., Poch, O.*, et al.* (2010). The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. Cell death and differentiation *17*, 1199-1210.

Cruickshank, I.A., and Perrin, D.R. (1960). Isolation of a phytoalexin from Pisum sativum L. Nature *187*, 799-800.

Cutts, J.H., Beer, C.T., and Noble, R.L. (1960). Biological properties of Vincaleukoblastine, an alkaloid in Vinca rosea Linn, with reference to its antitumor action. Cancer research *20*, 1023-1031.

Daniele, L.L., Sauer, B., Gallagher, S.M., Pugh, E.N., Jr., and Philp, N.J. (2008). Altered visual function in monocarboxylate transporter 3 (Slc16a8) knockout mice. American journal of physiology Cell physiology *295*, C451-457.

Daviere, J.M., and Achard, P. (2013). Gibberellin signaling in plants. Development *140*, 1147-1151.

Dolan, L. (2009). Body building on land: morphological evolution of land plants. Curr Opin Plant Biol *12*, 4-8.

Dorrington, G.E. (2012). On flying insect size and Phanerozoic atmospheric oxygen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, E3393; author reply E3394.

Dryja, T.P., McGee, T.L., Reichel, E., Hahn, L.B., Cowley, G.S., Yandell, D.W., Sandberg, M.A., and Berson, E.L. (1990). A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. Nature *343*, 364-366.

Du, J., Cleghorn, W.M., Contreras, L., Lindsay, K., Rountree, A.M., Chertov, A.O., Turner, S.J., Sahaboglu, A., Linton, J., Sadilek, M., *et al.* (2013). Inhibition of mitochondrial pyruvate transport by zaprinast causes massive accumulation of aspartate at the expense of glutamate in the retina. The Journal of biological chemistry *288*, 36129-36140.

Dudareva, N., Martin, D., Kish, C.M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Faldt, J., Miller, B., and Bohlmann, J. (2003). (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. The Plant cell *15*, 1227-1241.

Duke, D. (2014). http://www.ars-grin.gov/duke/.

Eagle, H. (1955). Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc Soc Exp Biol Med *89*, 362-364.

Engel, M.S., and Grimaldi, D.A. (2004). New light shed on the oldest insect. Nature *427*, 627-630.

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S., Emiliani, J., Pourcel, L., Feller, A., Morohashi, K., Casati, P., and Grotewold, E. (2010). Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. The Plant journal : for cell and molecular biology *62*, 77-91.

Fintz, A.C., Audo, I., Hicks, D., Mohand-Said, S., Leveillard, T., and Sahel, J. (2003). Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. Investigative ophthalmology & visual science *44*, 818-825.

Fraenkel, G.S. (1959). The raison d'etre of secondary plant substances; these odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. Science *129*, 1466-1470.

Frasson, M., Picaud, S., Leveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., Hicks, D., and Sabel, J. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. Investigative ophthalmology & visual science *40*, 2724-2734.

Fridlich, R., Delalande, F., Jaillard, C., Lu, J., Poidevin, L., Cronin, T., Perrocheau, L., Millet-Puel, G., Niepon, M.L., Poch, O., *et al.* (2009). The thioredoxin-like protein rod-derived cone viability factor (RdCVFL) interacts with TAU and inhibits its phosphorylation in the retina. Molecular & cellular proteomics : MCP *8*, 1206-1218.

Friedrichsen, D.M., Joazeiro, C.A., Li, J., Hunter, T., and Chory, J. (2000). Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucine-rich repeat receptor serine/threonine kinase. Plant physiology *123*, 1247-1256.

Galis, I., Onkokesung, N., and Baldwin, I.T. (2010). New insights into mechanisms regulating differential accumulation of phenylpropanoid-polyamine conjugates (PPCs) in herbivore-attacked Nicotiana attenuata plants. Plant Signal Behav *5*.

Gensel, P.G., and Edwards, D. (2001). Plants invade the land : evolutionary and environmental perspectives (New York ; Chichester: Columbia University Press).

Gerkema, M.P., Davies, W.I., Foster, R.G., Menaker, M., and Hut, R.A. (2013). The nocturnal bottleneck and the evolution of activity patterns in mammals. Proceedings Biological sciences / The Royal Society *280*, 20130508.

Gibberellins (WEB-page). http://www.plant-hormones.info/gibberellins.htm.

Gilbert, S.G. (2004). A small dose of toxicology : the health effects of common chemicals (Boca Raton: CRC Press).

Girard, P.R. (2013). Ces esclaves qui ont vaincu Napoléon Toussaint Louverture et la guerre d'Indépendance haïtienne, 1801-1804 (Bécherel: les Perséides éd.).

Glinwood, R., Ninkovic, V., and Pettersson, J. (2011). Chemical interaction between undamaged plants--effects on herbivores and natural enemies. Phytochemistry *72*, 1683-1689.

Gottlieb, O.R. (1982). Micromolecular evolution, systemics and ecology an essay into a novel botanic discipline (Berlin New York: Springer).

Graham, I.A., Besser, K., Blumer, S., Branigan, C.A., Czechowski, T., Elias, L., Guterman, I., Harvey, D., Isaac, P.G., Khan, A.M., *et al.* (2010). The genetic map of Artemisia annua L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. Science *327*, 328-331.

Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., and Cook, J.C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from Brassica napus pollen. Nature *281*, 216-217.

Gu, S.M., Thompson, D.A., Srikumari, C.R., Lorenz, B., Finckh, U., Nicoletti, A., Murthy, K.R., Rathmann, M., Kumaramanickavel, G., Denton, M.J., *et al.* (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. Nature genetics *17*, 194-197.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of medicine *27*, 1-93.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science *302*, 415-419.

Hamburger, V., and Hamilton, H. (1951). Series of embryonic chicken growth. J Morphol.

Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Dollfus, H., Dufier, J.L., Feingold, J., Munnich, A., Bhattacharya, S., Kaplan, J., Sahel, J.A., *et al.* (2006). Disease-associated variants of the rod-derived cone viability factor (RdCVF) in Leber congenital amaurosis. Rod-derived cone viability variants in LCA. Advances in experimental medicine and biology *572*, 9-14.

Harborne, J.B. (1993). Introduction to ecological biochemistry, 4th ed. edn (London: Academic Press).

Harborne, J.B., and Baxter, H. (1999). The handbook of the natural flavonoids (Chichester ; New York: Wiley).

Harborne, J.B., and Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry *55*, 481-504.

Hardy, K., Buckley, S., Collins, M.J., Estalrrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., Garcia-Tabernero, A., Garcia-Vargas, S., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., *et al.* (2012). Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. Die Naturwissenschaften *99*, 617-626.

Hartmann, T. (2008). The lost origin of chemical ecology in the late 19th century. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 4541-4546.

Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, T., Bernays, E.A., and Singer, M.S. (2005). Acquisition, transformation and maintenance of plant pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid Grammia geneura. Insect biochemistry and molecular biology *35*, 1083-1099.

Heine-Suner, D., Diaz-Guillen, M.A., Lange, A.J., and Rodriguez de Cordoba, S. (1998). Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2). European journal of biochemistry / FEBS *254*, 103-110.

Henry, A.G., Brooks, A.S., and Piperno, D.R. (2011). Microfossils in calculus demonstrate consumption of plants and cooked foods in Neanderthal diets (Shanidar III, Iraq; Spy I and II, Belgium). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 486-491.

Hervas, G., Perez, V., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R., Almar, M.M., and Frutos, P. (2003). Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. Journal of comparative pathology *129*, 44-54.

Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J.L., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R., and Martinou, J.C. (2012). Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. Science *337*, 93-96.

Hewitt, A.T., Lindsey, J.D., Carbott, D., and Adler, R. (1990). Photoreceptor survival-promoting activity in interphotoreceptor matrix preparations: characterization and partial purification. Experimental eye research *50*, 79-88.

Hobhouse, H., and Barbe-Girault, P. (2012). Les graines du changement six plantes qui ont transformé l'humanité traduit de l'anglais par Patricia Barbe-Girault (Orléans: Regain de lecture).

Holland, H.D. (2006). The oxygenation of the atmosphere and oceans. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences *361*, 903-915.

Holton, R. (1991). Method for preparation of taxol using an oxazinone. US Patent 5,015,744.

Hosoya, K., Tomi, M., and Tachikawa, M. (2011). Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. Expert opinion on drug delivery *8*, 1571-1587.

Houël, E. (2011). Etude de substances bioactives issues de la flore amazonienne Thèse de l'Université des Antilles et de la Guynane.

Huffman, M.A. (2003). Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. The Proceedings of the Nutrition Society *62*, 371-381.

Humayun, M.S., Dorn, J.D., Ahuja, A.K., Caspi, A., Filley, E., Dagnelie, G., Salzmann, J., Santos, A., Duncan, J., daCruz, L.*, et al.* (2009). Preliminary 6 month results from the Argus II epiretinal prosthesis feasibility study. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc *2009*, 4566-4568.

Hussain, S., Schonbichler, S.A., Guzel, Y., Sonderegger, H., Abel, G., Rainer, M., Huck, C.W., and Bonn, G.K. (2013). Solid-phase extraction of galloyl- and caffeoylquinic acids from natural sources (Galphimia glauca and Arnicae flos) using pure zirconium silicate and bismuth citrate powders as sorbents inside micro spin columns. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis *84*, 148-158.

Jaillard, C., Mouret, A., Niepon, M.L., Clerin, E., Yang, Y., Lee-Rivera, I., Ait-Ali, N., Millet-Puel, G., Cronin, T., Sedmak, T.*, et al.* (2012). Nxnl2 splicing results in dual functions in neuronal cell survival and maintenance of cell integrity. Human molecular genetics *21*, 2298-2311.

Johnson, I.S., Wright, H.F., Svoboda, G.H., and Vlantis, J. (1960). Antitumor principles derived from Vinca rosea Linn. I. Vincaleukoblastine and leurosine. Cancer research *20*, 1016-1022.

Joshi-Saha, A., Valon, C., and Leung, J. (2011). A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. Science signaling *4*, re4.

Kajiwara, K., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1994). Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. Science (New York, NY *264*, 1604-1608.

KBaSS (2014). http://kbass.institut-vision.org/KBaSS/.

Kenrick, P., Wellman, C.H., Schneider, H., and Edgecombe, G.D. (2012). A timeline for terrestrialization: consequences for the carbon cycle in the Palaeozoic. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences *367*, 519-536.

Khachik, F., Bernstein, P.S., and Garland, D.L. (1997). Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. Investigative ophthalmology & visual science *38*, 1802-1811.

Kliebenstein, D.J. (2012). Plant defense compounds: systems approaches to metabolic analysis. Annual review of phytopathology *50*, 155-173.

Koehn, F.E., and Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. Nature reviews Drug discovery *4*, 206-220.

Kolb, H., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1992). Neurons of the human retina: a Golgi study. The Journal of comparative neurology *318*, 147-187.

Konno, K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. Phytochemistry *72*, 1510-1530.

Kyselova, Z. (2011). Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. Interdisciplinary toxicology *4*, 173-183.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W.*, et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature *409*, 860-921.

LaVail, M.M. (1973). Kinetics of rod outer segment renewal in the developing mouse retina. The Journal of cell biology *58*, 650-661.

Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Pereon, Y., Cherel, Y.*, et al.* (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. Gene therapy *14*, 292-303.

Leboeuf, M., Cave, A., Bhaumik, P.K., Mukherjee, B., and Mukherjee, R. (1982). The Phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry *21*, 2783-2813.

Lee-Rivera, I., Elachouri, G., Berdugo, N., Clerin, E., Camara, H., Raffelsberger, W., Wan, J., Ait-Ali, N., Desrosiers, M., Niepon, M.L.*, et al.* (in revision). Susceptibility to photo-oxidative damage of mice lacking the Rod derived Cone Viability Factor gene Nxnl1.

Leiter, J., Bourke, A.R., Fitzgerald, D.B., Macdonald, M.M., Schepartz, S.A., and Wodinsky, I. (1962). Screening data from the Cancer Chemotherapy National Service Center screening laboratories. XI. Cancer research *22*, 919-1020.

Leroi-Gourhan, A. (1975). The Flowers Found with Shanidar IV, a Neanderthal Burial in Iraq. Science *190*.

Leveillard, T. (2014). Spare the rod, spoil the degeneration. Journal of pediatric ophthalmology and strabismus *51*, 74.

Leveillard, T., Andera, L., Bissonnette, N., Schaeffer, L., Bracco, L., Egly, J.M., and Wasylyk, B. (1996). Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumour-associated mutations. The EMBO journal *15*, 1615-1624.

Leveillard, T., Fridlich, R., Clerin, E., Ait-Ali, N., Millet-Puel, G., Jaillard, C., Yang, Y., Zack, D., van-Dorsselaer, A., and Sahel, J.A. (2014). Therapeutic strategy for handling inherited retinal degenerations in a gene-independent manner using rod-derived cone viability factors. Comptes rendus biologies *337*, 207-213.

Leveillard, T., Mohand-Said, S., Fintz, A.C., Lambrou, G., and Sahel, J.A. (2004a). The search for rod-dependent cone viability factors, secreted factors promoting cone viability. Novartis Foundation symposium *255*, 117-127; discussion 127-130, 177-118.

Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A.C., Clerin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F.*, et al.* (2004b). Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. Nature genetics *36*, 755-759.

Leveillard, T., Mohand-Said, S., and Sahel, J.A. (2007). [Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors]. Medecine sciences : M/S *23*, 240-242.

Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2010). Rod-derived cone viability factor for treating blinding diseases: from clinic to redox signaling. Science translational medicine *2*, 26ps16.

Lietava, J. (1992). Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV? Journal of ethnopharmacology *35*, 263-266.

Lisch, D. (2013). How important are transposons for plant evolution? Nature reviews Genetics *14*, 49-61.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry *193*, 265-275.

MacLaren, R.E., Pearson, R.A., MacNeil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. Nature *444*, 203-207.

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M.*, et al.* (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. The New England journal of medicine *358*, 2240-2248.

Mandal, S.M., Chakraborty, D., and Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Plant signaling & behavior *5*, 359-368.

Mangatal, L., Adeline, M.T., Guenard, D., Guerittevoegelein, F., and Potier, P. (1989). Application of the Vicinal Oxyamination Reaction with Asymmetric Induction to the Hemisynthesis of Taxol and Analogs. Tetrahedron *45*, 4177-4190.

Mariani, A.P. (1984). Bipolar cells in monkey retina selective for the cones likely to be blue-sensitive. Nature *308*, 184-186.

Marston, A. (2007). Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. Phytochemistry *68*, 2786-2798.

Martens, S., Preuss, A., and Matern, U. (2010). Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis thaliana L. Phytochemistry *71*, 1040-1049.

McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *36*, 344-355.

McDonald institute for archaeological research (1991). Cambridge archaeological journal (Cambridge: Cambridge university press).

McFadden, G.I. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. Current opinion in plant biology *2*, 513-519.

McLaughlin, M.E., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. Nature genetics *4*, 130-134.

McWilliam, P., Farrar, G.J., Kenna, P., Bradley, D.G., Humphries, M.M., Sharp, E.M., McConnell, D.J., Lawler, M., Sheils, D., Ryan, C.*, et al.* (1989). Autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): localization of an ADRP gene to the long arm of chromosome 3. Genomics *5*, 619-622.

Millet-Puel, G. (2011). Identification et analyse d'un facteur de survie des photorécepteurs à cônes de l'épithélium piggmenté rétinien. Mémoire EPHE

Mishra, B.B., and Tiwari, V.K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. European journal of medicinal chemistry *46*, 4769-4807.

Mithofer, A., and Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. Annual review of plant biology *63*, 431-450.

Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A.C., Leveillard, T., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (1998). Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 8357-8362.

Moon, J.S., Jin, W.J., Kwak, J.H., Kim, H.J., Yun, M.J., Kim, J.W., Park, S.W., and Kim, K.S. (2011). Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells. The Biochemical journal *433*, 225-233.

Moutsatsou, P. (2007). The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. Hormones (Athens) *6*, 173-193.

Muller, C.H., Muller, W.H., and Haines, B.L. (1964). Volatile Growth Inhibitors Produced by Aromatic Shrubs. Science *143*, 471-473.

Myburg, A.A., Grattapaglia, D., Tuskan, G.A., Hellsten, U., Hayes, R.D., Grimwood, J., Jenkins, J., Lindquist, E., Tice, H., Bauer, D., *et al.* (2014). The genome of Eucalyptus grandis. Nature.

Nam, K.H., and Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. Cell *110*, 203-212.

Nandrot, E., Dufour, E.M., Provost, A.C., Pequignot, M.O., Bonnel, S., Gogat, K., Marchant, D., Rouillac, C., Sepulchre de Conde, B., Bihoreau, M.T., *et al.* (2000). Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. Neurobiology of disease *7*, 586-599.

Newman, R.D. (2012). World Malaria Report 2011.

Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. (2013). The BH3-only SNARE BNip1 mediates photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects. Developmental cell *25*, 374-387.

Noguchi, T., Fujioka, S., Choe, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., Yuan, H., Feldmann, K.A., and Tax, F.E. (1999). Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of Arabidopsis accumulate brassinosteroids. Plant physiology *121*, 743-752.

Ochrietor, J.D., Moroz, T.P., Clamp, M.F., Timmers, A.M., Muramatsu, T., and Linser, P.J. (2002). Inactivation of the Basigin gene impairs normal retinal development and maturation. Vision research *42*, 447-453.

Ochrietor, J.D., Moroz, T.P., van Ekeris, L., Clamp, M.F., Jefferson, S.C., deCarvalho, A.C., Fadool, J.M., Wistow, G., Muramatsu, T., and Linser, P.J. (2003). Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily. Investigative ophthalmology & visual science *44*, 4086-4096.

Oyama, V.I., and Eagle, H. (1956). Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (folin-ciocalteau). Proc Soc Exp Biol Med *91*, 305-307.

Papermaster, D.S., Schneider, B.G., and Besharse, J.C. (1985). Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. Ultrastructural immunocytochemical and autoradiographic evidence in Xenopus retinas. Investigative ophthalmology & visual science *26*, 1386-1404.

Paré, A., and Delacomptée, J.-M. (2011). Discours de la momie et de la licorne préface de Jean-Michel Delacomptée ([Paris]: Gallimard).

Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., and Saedler, H. (1987). The regulatory c1 locus of Zea mays encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. The EMBO journal *6*, 3553-3558.

Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P., and Harberd, N.P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. Genes & development *11*, 3194-3205.

Petersen, F., and Amstutz, R. (2008). Natural Compounds as Drugs Volume I (Basel: Birkh©Þuser Verlag AG).

Philipov, S., Ivanovska, N., Istatkova, R., Velikova, M., and Tuleva, P. (2000). Phytochemical study and cytotoxic activity of alkaloids from Uvaria chamae P. Beauv. Die Pharmazie *55*, 688-689.

Pichersky, E., and Lewinsohn, E. (2011). Convergent evolution in plant specialized metabolism. Annual review of plant biology *62*, 549-566.

Poder, R., and Peintner, U. (1999). Laxatives and the Ice Man. Lancet *353*, 926.

Pollio, A., De Natale, A., Appetiti, E., Aliotta, G., and Touwaide, A. (2008). Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: Ruta spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. Journal of ethnopharmacology *116*, 469-482.

Potier, P., Chast, F., and Guérin, C. (2001). Le magasin du bon Dieu les extraordinaires richesses thérapeutiques des plantes et des animaux (Paris: J. C. Lattès).

Punzo, C., Kornacker, K., and Cepko, C.L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. Nature neuroscience *12*, 44-52.

Rao, M.V., Paliyath, G., and Ormrod, D.P. (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of Arabidopsis thaliana. Plant physiology *110*, 125-136.

Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N*., et al.* (2002). Plants and human health in the twenty-first century. Trends in biotechnology *20*, 522-531.

Reichman, S., Terray, A., Slembrouck, A., Nanteau, C., Orieux, G., Habeler, W., Nandrot, E.F., Sahel, J.A., Monville, C., and Goureau, O. (2014). From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 8518-8523.

Reigosa Roger, M.J.n., Pedrol, N., and González, L.s. (2006). Allelopathy : a physiological process with ecological implications (Dordrecht, Netherlands: Springer).

Ren, D., Liu, Y., Yang, K.Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S. (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 5638-5643.

RetNet https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm.

Reynolds, T. (2005). Hemlock alkaloids from Socrates to poison aloes. Phytochemistry *66*, 1399-1406.

Rider, M.H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P.A., Rousseau, G.G., and Hue, L. (2004). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. The Biochemical journal *381*, 561-579.

Ritter, H., and Schulz, G.E. (2004). Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. The Plant cell *16*, 3426-3436.

Rivier, L., and Bruhn, J.G. (1979). Editorial. Journal of ethnopharmacology *1*, 1.

Riviere, C., Pawlus, A.D., and Merillon, J.M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. Natural product reports *29*, 1317-1333.

Rollo, F., Ubaldi, M., Ermini, L., and Marota, I. (2002). Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 12594-12599.

Rosenfeld, P.J., Cowley, G.S., McGee, T.L., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1992). A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. Nature genetics *1*, 209-213.

Royal_botanic_gardens (2014). http://www.kew.org/.

Samanani, N., Park, S.U., and Facchini, P.J. (2005). Cell type-specific localization of transcripts encoding nine consecutive enzymes involved in protoberberine alkaloid biosynthesis. The Plant cell *17*, 915-926.

Sams-Dodd, F. (2006). Strategies to optimize the validity of disease models in the drug discovery process. Drug discovery today *11*, 355-363.

Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K.M., and Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. Afr J Tradit Complement Altern Med *8*, 1-10.

Schiff, P.B., Fant, J., and Horwitz, S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature *277*, 665-667.

Serazetdinova, L., Oldach, K.H., and Lorz, H. (2005). Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. Journal of plant physiology *162*, 985-1002.

Shanle, E.K., and Xu, W. (2011). Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. Chem Res Toxicol *24*, 6-19.

Shannon, M., Hamilton, A.T., Gordon, L., Branscomb, E., and Stubbs, L. (2003). Differential expansion of zinc-finger transcription factor loci in homologous human and mouse gene clusters. Genome research *13*, 1097-1110.

Shin, H., Lee, H., Woo, K.S., Noh, E.W., Koo, Y.B., and Lee, K.J. (2009). Identification of genes upregulated by pinewood nematode inoculation in Japanese red pine. Tree physiology *29*, 411-421.

Sieving, P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J., Fullmer, K.R., and Bush, R.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase

I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 3896-3901.

Staley, M. (2002). Darwinian selection leads to Gaia. Journal of theoretical biology *218*, 35-46.

Stenkamp, D.L., and Adler, R. (1993). Photoreceptor differentiation of isolated retinal precursor cells includes the capacity for photomechanical responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 1982-1986.

Stenkamp, D.L., Iuvone, P.M., and Adler, R. (1994). Photomechanical movements of cultured embryonic photoreceptors: regulation by exogenous neuromodulators and by a regulable source of endogenous dopamine. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *14*, 3083-3096.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. Physiological reviews *85*, 845-881.

Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Weinman, S. (2003). Biochimie trad. de l'américain, [5e éd.] par Serge Weinman, 5e éd. edn (Paris: Flammarion médecine-sciences).

Sugasawa, K., Deguchi, J., Okami, T., Yamamoto, A., Omori, K., Uyama, M., and Tashiro, Y. (1994). Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells. Cell structure and function *19*, 21-28.

Swain, P.K., Chen, S., Wang, Q.L., Affatigato, L.M., Coats, C.L., Brady, K.D., Fishman, G.A., Jacobson, S.G., Swaroop, A., Stone, E.*, et al.* (1997). Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. Neuron *19*, 1329-1336.

Taylor, S.M., Cerami, C., and Fairhurst, R.M. (2013). Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of Plasmodium falciparum malaria pathogenesis. PLoS pathogens *9*, e1003327.

Terry, I., Walter, G.H., Moore, C., Roemer, R., and Hull, C. (2007). Odor-mediated push-pull pollination in cycads. Science *318*, 70.

Thuau, U.J. (1921). Evoluation of the diverse methods of tanning. In Le cuir, édition technique (Paris), pp. 105.

Touati, D., Atta ur, R., and Ulubelen, A. (2000). Alkaloids from Ruta montana. Phytochemistry *53*, 277-279.

Touwaide, A., and Appetiti, E. (2013). Knowledge of Eastern materia medica (Indian and Chinese) in pre-modern Mediterranean medical traditions: a study in comparative historical ethnopharmacology. Journal of ethnopharmacology *148*, 361-378.

Trojan, P., Krauss, N., Choe, H.W., Giessl, A., Pulvermuller, A., and Wolfrum, U. (2008). Centrins in retinal photoreceptor cells: regulators in the connecting cilium. Progress in retinal and eye research *27*, 237-259.

Tunon, H., and Svanberg, I. (1999). Laxatives and the Ice Man. Lancet *353*, 925-926.

Turlings, T.C., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Rose, U.S., Lewis, W.J., and Tumlinson, J.H. (1995). How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 4169-4174.

Turlings, T.C., Tumlinson, J.H., and Lewis, W.J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. Science *250*, 1251-1253.

Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I.*, et al.* (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. Nature *437*, 693-698.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science *324*, 1029-1033.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A.*, et al.* (2001). The sequence of the human genome. Science *291*, 1304-1351.

Vermaak, I., Hamman, J.H., and Viljoen, A.M. (2011). Hoodia gordonii: an up-to-date review of a commercially important anti-obesity plant. Planta medica *77*, 1149-1160.

Vithana, E.N., Abu-Safieh, L., Allen, M.J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Maghtheh, M., Ebenezer, N.D., Willis, C., Moore, A.T.*, et al.* (2001). A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). Molecular cell *8*, 375-381.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., and McPhail, A.T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia. Journal of the American Chemical Society *93*, 2325-2327.

Warburg, O.H., and Dickens, F. (1931). The Metabolism of tumours: investigations from the Kaiser Wilhelm Institute for biology, Berlin-Dahlem. Richard R Smith.

Wasilewska, A., Vlad, F., Sirichandra, C., Redko, Y., Jammes, F., Valon, C., Frei dit Frey, N., and Leung, J. (2008). An update on abscisic acid signaling in plants and more. Molecular plant *1*, 198-217.

Waters, E.R. (2003). Molecular adaptation and the origin of land plants. Molecular phylogenetics and evolution *29*, 456-463.

Webvision http://webvision.med.utah.edu/

Weng, J.K., and Chapple, C. (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. The New phytologist *187*, 273-285.

Wolf, A., Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., and Guha, A. (2011). Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor

growth in human glioblastoma multiforme. The Journal of experimental medicine *208*, 313-326.

Wu, J., and Baldwin, I.T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. Annual review of genetics *44*, 1-24.

Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Akiana, J., Anderson, T.J., Aubouy, A., Balloux, F., Besnard, P., Bogreau, H.*, et al.* (2012). Multiple independent introductions of Plasmodium falciparum in South America. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 511-516.

Young, R.W. (1969). A difference between rods and cones in the renewal of outer segment protein. Investigative ophthalmology *8*, 222-231.

Zeng, S., Wu, M., Zou, C., Liu, X., Shen, X., Hayward, A., Liu, C., and Wang, Y. (2014). Comparative analysis of anthocyanin biosynthesis during fruit development in two Lycium species. Physiologia plantarum *150*, 505-516.

Ziegler, J., and Facchini, P.J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. Annual review of plant biology *59*, 735-769.

Zulak, K.G., and Bohlmann, J. (2010). Terpenoid biosynthesis and specialized vascular cells of conifer defense. Journal of integrative plant biology *52*, 86-97.

TABLE SUPPLÉMENTAIRE 1

DONNÉES ETHNOPHARMACOLOGIQUES

DES 202 PLANTES

Famille	Espèce	Usage traditionnel (GreenPharma)	Compléments d'information (GreenPharma)	Royal Botanic Gardens database	Duke database	Citations (Pubmed)
ACANTHACEAE	*Justicia spicigera* **(l)**					J Ethnopharmacol 2013;148(1):337-40 J Ethnopharmacol 2013;145(2):476-89 J Ethnopharmacol 2012;143(2):455-62 J Ethnopharmacol 2012;141(3):888-94 Nat Prod Commun 2011;6(12):1925-8 Proc. West. Pharmacol. Soc. 2009;52:78-82 Phytomedicine 2004;11(5):446-51 Proc. West. Pharmacol. Soc. 2001;44:151-2 Phytother Res 2001;15(8):691-7 Rev. Invest. Clin. 2000 Nov-Dec;52(6):645-53 Rev. Invest. Clin. 1994 Sep-Oct;46(5):343-7
	Lepidagathis anobrya **(w)**					Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(4):420-4
ANACARDIACEAE	*Amphipterygium adstringens* **(b)**			Phytother. Res. 1998 12. 01-4.	Astringent, Cancer, Esophagus, Gum, Malaria, Sore, Stomach, Tumor, Typhoid, Typhus, Wound	Toxicol. Lett. 2014; Arch. Med. Res. 2013;44(7):488-94 J Ethnopharmacol 2012;141(3):860-5 J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011;339(2):403-11 Nat. Prod. Res. 2011;25(13):1282-7 J Med Food 2011;14(10):1280-3 J Ethnopharmacol 2011;134(1):67-73 J Ethnopharmacol 2007;114(1):72-7 Mutat. Res. 2006;609(1):43-6 Proc. West. Pharmacol. Soc. 2005;48:70-2 J. Pharm. Pharmacol. 2005;57(12):1629-36 J. Pharm. Pharmacol. 2005;57(9):1087-91 Phytomedicine 2004;11(5):436-45 Planta Med. 2003;69(10):905-9 J Pharm Sci 1962;51:786-90
	Buchanania reticulata **(l)**					
	Lannea microcarpa **(b)**			Trop. Sci. 1998 38. 20-24.		Molecules 2014;19(2):2684-93 Environ Sci Pollut Res Int 2013;20(9):6601-10 Tanzan J Health Res 2009;11(4):226-34 Pak. J. Biol. Sci. 2009;12(14):1004-11 Molecules 2008;13(3):581-94 J. Pharm. Pharmacol. 2006;58(7):981-8
	Lannea velutina **(l)**	food	Organ: fruit			J Ethnopharmacol 2006;104(1-2):132-7 Phytother Res 2001;15(5):401-6
	Melanorrhoea laccifera **(l)**					Anal. Chim. Acta 2012;710:9-16 Anal Bioanal Chem 2009;395(7):2167-74 Talanta 2006;70(2):370-6 Talanta 2007;71(4):1536-40 Rev. Palaeobot. Palynol. 2001;113(4):261-272
	Ozoroa pulcherrima **(l)**					Nat Prod Commun 2011;6(8):1133-4 J Asian Nat Prod Res 2011;13(1):84-7

	Rhus javanica **(l)**			Pharm. J. 1924		Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:549207 J. Insect Sci. 2012;12:10 Nat. Prod. Res. 2010;24(17):1643-7 Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008;72(10):2782-4 J Asian Nat Prod Res 2008 Jul-Aug;10(7-8):693-7 Ann. Bot. 2008;101(9):1391-400 Fitoterapia 2008;79(1):32-6 J. Agric. Food Chem. 2007;55(16):6460-5 Chem. Pharm. Bull. 2007;55(5):804-7 J. Toxicol. Environ. Health Part A 2007;70(5):393-407 Int. Immunopharmacol. 2005;5(13-14):1820-9 Fitoterapia 2004;75(1):39-44 Z. Naturforsch., C, J. Biosci. 2003 Sep-Oct;58(9-10):719-25 Chem. Pharm. Bull. 2001;49(8):1024-6 Heredity (Edinb) 2000;84 (Pt 2):178-85 Phytochemistry 2000;53(3):357-63 J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999;289(1):72-8 Antiviral Res. 1998;39(1):25-33 Nippon Rinsho 1998;56(1):156-60 Antiviral Res. 1996;32(2):63-70
	Sclerocarya birrea **(b)**	food hypertension diabete	Organ: fruit Administration mode: oral Organ: bark Administration mode: oral Traditional medecines: Mossi medicine, Bobo medicine, Jula Organ: leaf Administration mode: oral Traditional medecines: Mossi medicine	Forests Trees Livelihoods 2003 13. (3): 217-232. Pl. Med. 1992 58. 174-175. Phytother. Res. 1991 5. 276-278. S. Afr. J. Bot. 1988 54. 383-385. Bot. J. Linn. Soc. 1988 98. 153-158.	Dysentery Eruption Intoxicant Skin	J Ethnopharmacol 2014;154(1):170-5 J Ethnopharmacol 2014;153(1):61-84 Nat Prod Commun 2013;8(9):1279-84 ScientificWorldJournal 2013;2013:601435 J Ethnopharmacol 2013;149(3):656-67 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9:34 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9:27 ScientificWorldJournal 2013;2013:956206 Springerplus 2013;2(1):88 J. Sci. Food Agric. 2013; J Ethnopharmacol 2012;144(1):118-27 J Ethnopharmacol 2012;143(1):377-82 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:834156 Cardiovasc J Afr 2012;23(1):12- Nat Prod Commun 2011;6(11):1585-8 Parasitol. Res. 2012;110(6):2351-62 Pharm Biol 2012;50(2):254-63 Int J Mol Sci 2011;12(9):5652 Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(2):99-105 J Ethnopharmacol 2011;137(3):1516-20
	Semecarpus cochinchinensis **(ap)**					
	Spondias pinnata **(l)**			Indian Forester 1990 116. 455-458.	Cough,Dysmenorrhea,Gonorrhea, Herpes, Scurf, Sore,Ache(Ear), Anemia,Antidote,Asthma, Astringent, Bilious, Cholera, Demulcent, Diarrhea, Dysentery, Dyspepsia,Evil eye,Gonorrhea, Metroxenia, Nausea,Night-fever, **Ophthalmia**,Rheumatism, Rinderpest, Tuberculosis	Cytotechnology 2014;66(2):209-18 Food Chem 2013;140(3):507-12 Ann Hepatol 2013 Jan-Feb;12(1):123-9 Int J Food Sci Nutr 2010;61(4):425-32 Zhong Yao Cai 2009;32(1):39-41 BMC Complement Altern Med 2008;8:63 Anc Sci Life 1997;17(1):28-31 Planta Med. 1976;29(2):190-2

ANNONACEAE	*Annona senegalensis* **(l)**			Pl. Med. 1986 202-204.	Medicine	J Complement Integr Med 2014;11(2):93-7 Rev Bras Parasitol Vet 2013 Jan-Mar;22(1):119-23 J Ethnopharmacol 2013;150(3):1145-53 Pharmacol. Biochem. Behav. 2013;109:38-43 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:831327 Korean J Hematol 2012;47(1):67-73 Asian Pac J Trop Med 2012;5(4):277-82 Pharm Biol 2011;49(12):1286-97 Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(2):99-105 Pharmacognosy Res 2010;2(4):211-4 Therapie 2011 Jan-Feb;66(1):73-80 J. Helminthol. 2011;85(3):304-12 Pharm Biol 2010;48(12):1361-70 Dakar Med 2008;53(1):61-7 Pak. J. Biol. Sci. 2008;11(5):719-25 J Ethnopharmacol 2008;119(3):473-7 J Ethnopharmacol 2008;116(1):125-30 J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 J Ethnopharmacol 2007;113(3):427-32 J Ethnopharmacol 2007;112(1):85-9
	Hexalobus monopetalus **(l)**			Pl. Med. 1988 54. 177.	Diarrhea Expectorant	Nat Prod Bioprospect 2014;4:101-105 Planta Med. 1988;54(2):177
	Polyalthia luensis **(l)**					J. Biosci. Bioeng. 2014; Molecules 2014;19(2):2049-60 Nat. Prod. Res. 2014;28(8):555-62 PhytoKeys 2013; Nat Prod Commun 2013;8(10):1427-9 Am. J. Trop. Med. Hyg. 2014;90(2):247-55 J Oleo Sci 2013;62(10):843-8 Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013;97(20):9121-31 Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:925380 Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013;14(4):2637-41 Indian J. Biochem. Biophys. 2013;50(2):120-5 Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(8):589-96 Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(5):368-74 Nat Prod Commun 2013;8(2):239-42 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:561284 Pharm Biol 2012;50(11):1408-15 J Ethnopharmacol 2012;142(2):422-31 Indian J Pharmacol 2012;44(2):277-8 Pak J Pharm Sci 2012;25(2):353-6 Neurosci. Lett. 2012;513(2):229-32
	Uvaria chamae **(l)**			Int. J. Pharmacog. 1996 34. 34-40. Pl. Med. 1989 55. 312-313.	Astringent,Catarrh, Counterirritant,Dysentery,Fever, Fontanelleles, Hematemesis, Hematoptysis, Hematuria, Inflammation, Jaundice, **Ophthalmia,** Parturition, Piles, Purgative, Sore, Styptic, Swelling,Wound,Yellow Fever	Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:751291 Afr J Tradit Complement Altern Med 2013;10(6):469-76 Afr J Med Med Sci 2012;41 Suppl:99-103 Org. Lett. 2011;13(3):514-7 Ann Trop Med Parasitol 2006;100(7):585-90 Planta Med. 2006;72(10):938-40 Dakar Med 2003;48(2):112-6 J. Nat. Prod. 2004;67(6):1041-3 Nat Prod Lett 2002;16(5):315-21

						J Ethnopharmacol 2001;76(1):99-103 Pharmazie 2000;55(9):688-9 Planta Med. 1989;55(3):312-3 IARC Sci. Publ. 1984; Cancer Lett. 1979;8(1):87-92 Lloydia 1978 Mar-Apr;41(2):156-60 J. Org. Chem. 1977;42(8):1295-1302 J. Org. Chem. 1976;41(7):1297-8
	Xylopia vielana **(t)**					Phytochemistry 2003;64(4):811-6 Phytochemistry 2001;56(4):335-40
APOCYNACEAE	*Landolphia heudelotii* **(l)**			J. Essent. Oil Res. 1996 8. 299-301.		
	Leptadenia hastata **(l)**			Pl. Med. 1997 63. 486. J. Agric. Trad. Bot. Appl. [JATBA] 1995 37. 37-50.		Pak. J. Biol. Sci. 2013;16(4):190-4 Planta Med. 1997;63(5):486 Afr J Tradit Complement Altern Med 2007;4(4):469-75 Dakar Med 2003;48(3):222-5 Phytother Res 2001;15(2):131-4 Plant Foods Hum Nutr 1998;53(1):57-69 Plant Foods Hum Nutr 1998;52(1):17-30 J. Nat. Prod. 1996;59(6):555-64 J. Nat. Prod. 1995;58(5):672-9
	Strophanthus sarmentosus **(l)**			Pl. Med. 1963 11. 293-302. Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop. 1952 32. 2-14. Rev. Int. Bot. Appl. Agric. Trop. 1949 29. 605-607.	Poison (Arrow)	Br Homeopath J 1952;42(1):13-5 Pharm Acta Helv 1953;28(10):289-307 Manuf Chem Aerosol News 1956;27:51-5 Br Homeopath J 1952;42(1):4-12 J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc 1950;39(11):615-20
ARALIACEAE	*Cussonia barteri* **(l)**			Pl. Med. 1986 80-83.		Planta Med. 1998;64(5):479-81 Afr J Tradit Complement Altern Med 2007;4(4):495-500 Planta Med. 2001;67(8):732-6 Phytother Res 2001;15(5):401-6 Planta Med. 1986;
ASCLEPIADACEA	*Calotropis procera* **(ft)**	skin infections bronchitis	Organ: fruit	Arab Gulf J. Sci. Res. 2000 18. (3): 157-164. Fitoterapia 2000 71. 77-79. Hamdard Med. 1999 42. 96-101. J. Ethnopharmacol. 1999 68. 261-266. J. Ethnopharmacol. 1999 68. 83-95. Arab Gulf J. Sci. Res. 1998 16. (1): 129-144. Phytother. Res. 1997 11. 163-165. Fitoterapia 1997 68. 371-373. Phytother. Res. 1997 11. 166-167. Fitoterapia 1996 67. 275-277. J. Ethnopharmacol. 1994 44. 123-125. Fitoterapia 1992 63. 507-514. Geobios 1992 19. 135-137.	Ache (Head), Ache (Tooth), Asthma, Chancre, Cold, Cough, Deodorant, Depilatory, Diaphoretic, Dyspepsia, Elephantiasis, Epilepsy, Expectorant, Fatality, Fumitory, Hemiplegia, Homicide, Infanticide, Intoxicant, Labor, Leprosy, Malaria, Medicine, Odontectomy, Parturition, Poison Poison (Arrow), Purgative, Rheumatism, Smallpox, Sore, Splenitis, Splinter, Sting, Sudorific, Suicide, Throat	Sci Rep 2014;4:4748 Nat. Prod. Res. 2014; Nat. Prod. Res. 2014; Chembiochem 2014;15(6):872-8 Parasitol. Res. 2014;113(5):1919-26 Phytopathology 2014; C. R. Biol. 2014;337(2):86-94 PLoS ONE 2014;9(2):e87895 J Ethnopharmacol 2014;152(2):349-57 Environ. Toxicol. 2014; J Ethnopharmacol 2014;152(1):207-16 ScientificWorldJournal 2013;2013:615454 ISRN Pharmacol 2013;2013:691372 Afr J Tradit Complement Altern Med 2013;10(3):574-9 An. Acad. Bras. Cienc. 2013;85(3):1025-34

				J. Ethnopharmacol. 1991 31. 319-324. Fitoterapia 1990 61. 89. Trop. Sci. 1990 30. 321-323. Phytochemistry 1989 28. 2859-2861. J. Nat. Prod. 1988 51. 925-928. J. Ethnopharmacol. 1988 22. 211-221. Phytochemistry 1982 21. 2343-48. Phytochemistry 1982 21. 2343-48. Ann. Arid Zone 1981 20. 259-264. Econ. Bot. 1981 35. 467-472. J. Agric. Trop. Bot. Appl. [JATBA] 1968 15. 543-545. Pharm. J. 1913		Pharm Biol 2014;52(2):144-50 J Ethnopharmacol 2013;150(1):32-50 Zhong Yao Cai 2013;36(3):404-7 Pharmacol Rep 2013;65(3):761-7 J Complement Integr Med 2013;10
ASTERACEAE	*Brickellia grandiflora* **(l)**					
	Eupatorium odoratum **(l)**			Bee World 1997 78. (4): 175-178. J. Altern. Complem. Med 1996 2. 335-343. Pl. Med. 1993 59. 184-185. Indian Forester 1991 117. 659-660. Pl. Med. 1981 42. 403-405. Indian Forester 1959 85. 728-730. Indian Forester 1949 75. 351-3.	Amenorrhea,Amygdalitis, Apertif, Bite (Leech), Cataplasm, Catarrh, Cold, Cough, Decongestant, Diabetes, Diarrhea, Emmenagogue, Fever, Flu, Gargle, Hemostat, Hoarseness, Inflammation, Laryngitis, Lash, Leptospirosis, Pertussis, Rheumatism, Vermifuge	Nat Prod Commun 2013;8(12):1711-2 J. Nat. Prod. 2014;77(3):503-8 Oecologia 2014;174(4):1205-14 PLoS ONE 2013;8(10):e78651 PLoS ONE 2013;8(10):e76995 J Ethnopharmacol 2013;150(2):614-8 ISRN Dermatol 2013;2013:168269 PLoS ONE 2013;8(8):e71767 PLoS ONE 2013;8(8):e68274 J Ethnopharmacol 2013;149(1):344-51 Chem. Biodivers. 2013;10(4):621-7 J Ethnopharmacol 2013;147(2):434-41 New Phytol. 2013;197(3):979-88 J. Nat. Prod. 2012;75(12):2076-81 J Ethnopharmacol 2013;145(1):363-72 J. Sci. Food Agric. 2013;93(6):1338-48 J. Insect Sci. 2012;12:24 Phytother Res 2013;27(6):835-40 Pharm Biol 2012;50(9):1073-7 ScientificWorldJournal 2012;2012:439479
	Mikania guaco **(t)**			Biochem. Syst. Ecol. 1999 27. 99- 102. J. Spices Med. Pl. 1998 6. 29-36. Phytochem. Anal. 1997 8. 74-77.		Anal. Chim. Acta 2014;821:89 An. Acad. Bras. Cienc. 2014;86(1):407-18 Fitoterapia 2014;94:155-63 Acta Cir Bras 2014;29(1):30-7 PLoS ONE 2013;8(12):e84657 PLoS ONE 2013;8(10):e75555 PLoS ONE 2013;8(10):e76725 Oecologia 2014;174(1):195-203 Molecules 2013;18(7):7865-72 PLoS ONE 2013;8(6):e66289 An. Acad. Bras. Cienc. 2013 Apr-Jun;85(2):473-85 J. Agric. Food Chem. 2013;61(30):7309-14 PLoS ONE 2013;8(5):e62608 Food Sci Technol Int 2013;19(6):485-92 ISRN Toxicol 2013;2013:521432 Phytomedicine 2013;20(10):883-9

						Chem. Biodivers. 2013;10(2):288-95 Cytotechnology 2014;66(1):107-17 Genet. Mol. Res. 2012;11(4):4383-401 J. Insect Sci. 2012;12:58
	Tagetes erecta **(fl)**			Phytother. Res. 1996 10. S186-S188. Fitoterapia 1993 64. 35-41. Fitoterapia 1983 54. 09-12.	Amenorrhea, Anodyne, Bactericide, Boil, Bronchitis, Cachexia, Carbuncle, Carminative, Cold, Colic, Conjunctivitis, Cough, Depurative, Diaphoretic, Diuretic, Dropsy, Dysmenorrhea, Dyspepsia, Edema, Emmenagogue, **Eye**, Fever, Laxative, Liver, Malaria, Mastitis, Medicine, Muscle, Nematicide, Parotitis, Pertussis Piles, Renitis, Respiratory, Rheumatism, Sore, Stimulant, Stomach, Tumor, Vermifuge, Vulnerary, Wart	J Environ Biol 2014;35(2):439-43 Environ Technol 2013 Nov-Dec;34(21-24):3059-67 J Food Sci Technol 2013;50(1):122-8 Exp Ther Med 2014;7(1):246-250 Pak J Pharm Sci 2013;26(6):1071-6 J. Food Sci. 2013;78(10):T1636-42 Indian J Pharmacol 2013 Jul-Aug;45(4):386-90 Chemosphere 2013;93(10):2284-8 J Ethnopharmacol 2013;146(2):581-93 Toxicol Ind Health 2012; Nat Prod Commun 2012;7(9):1225-6 Pharm Biol 2012;50(8):1013-8 Plant Physiol. Biochem. 2012;58:6-15 J Ethnopharmacol 2012;143(1):292-8 J Environ Sci Eng 2012;54(3):432-5 ScientificWorldJournal 2012;2012:796472 Environ Sci Pollut Res Int 2013;20(2):1161-72 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2012;37(3):315-8 Fitoterapia 2012;83(3):481-9 Indian J. Med. Res. 2011;134:375-83
	Tithonia diversifolia **(ap)**			Pl. Med. 1998 64. 588-593. Phytother. Res. 1993 7. 305-309.	Bruise, Wound	Molecules 2014;19(5):6070-9 Trop Anim Health Prod 2014; J Parasitol Res 2014;2014:434506 IMA Fungus 2013;4(2):201-4 Nutr Res Pract 2013;7(6):510-8 Pak. J. Biol. Sci. 2013;16(4):175-9 J Ethnopharmacol 2013;147(2):389-94 Rev. Biol. Trop. 2012;60(4):1535-42 Fitoterapia 2012;83(8):1590-7 J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2012;39(11):1719-24 Bull Environ Contam Toxicol 2012;89(2):328-33 J Nat Med 2013;67(1):98-106 Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012;22(8):2954-8 Chem. Biodivers. 2012;9(2):210-35 Trop Anim Health Prod 2012;44(5):1097-104 Ecol Appl 2011;21(3):695-703 J Ethnopharmacol 2011;137(1):154-66 J Ethnopharmacol 2011;136(2):355-62 J. Agric. Food Chem. 2011;59(6):2347-55 Molecules 2011;16(1):665-74
BERBERIDACEAE	*Mahonia nepalensis* **(l)**				Diuretic, Dysentery	
BIGNONIACEAE	*Markhamia stipulata* **(l)**					Phytochemistry 2002;59(5):557-63
	Stereospermum			Pl. Med. 1986 342.	Diarrhea, Dysentery,	Osong Public Health Res Perspect 2013;4(6):347-57

	kunthianum(b)			Pl. Med. 1985 464.	Witchcraft	Afr J Tradit Complement Altern Med 2013;10(4):47-51 Nat. Prod. Res. 2011;25(19):1777-88 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(5 Suppl):90-6 Indian J Pharm Sci 2009;71(1):106-10 Acta Pol Pharm 2009 Jan-Feb;66(1):83-8 Afr J Tradit Complement Altern Med 2009;6(4):544-8 J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2006;100(4-5):202-8 Phytochemistry 2002;60(1):39-44 Planta Med. 1986; Planta Med. 1985;51(5):464
BIXACEAE	*Cochlospermum planchonii* **(r)**			Essent. Oil Res. 2001 13. 65-67. Pl. Med. 1999 65. 378-381. J. Ethnopharmacol. 1995 48. 89-97.	Emmenagogue	Afr J Tradit Complement Altern Med 2013;10(5):394-400 Parasit Vectors 2013;6:337 J Vector Borne Dis 2013 Apr-Jun;50(2):103-10 J Ethnopharmacol 2012;140(2):255-60 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):22-6 Planta Med. 2011;77(6):662-71 Pak. J. Biol. Sci. 2007;10(22):4177-9 Phytother Res 2008;22(4):550-1 J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 Trends Parasitol. 2005;21(10):462-8 J Ethnopharmacol 2003;89(1):111-4 J Ethnopharmacol 2003;87(2-3):221-5 Planta Med. 1999;65(4):378-81 J Ethnopharmacol 1995;48(2):89-97
BOMBACACEAE	*Bombax costatum* **(l)**					J. Agric. Food Chem. 2005;53(6):2316-21
BORAGINACEAE	*Cordia boissieri* **(ft)**				Anodyne, Bronchitis, Catarrh, Cold, Cough, Intoxicant, Pectoral, Pneumonia, Rheumatism, Tuberculosis	Evid Based Complement Alternat Med 2011;2011:536139 J Ethnopharmacol 2007;109(3):435-41 Small Rumin. Res. 2001;39(2):153-159
	Cordia myxa **(l)**			Pl. Med. 1992 58. 643. Phytother. Res. 1989 3. 126-131. Pl. Med. 1967 15. 240-244.	Chest, Cough, Demulcent, Tumor (Abdomen), Urogenital	Pak. J. Biol. Sci. 2013;16(24):2066-9 Int. J. Biol. Macromol. 2014;65:215-21 Biotech Histochem 2014;89(4):256-8 Jundishapur J Nat Pharm Prod 2012;7(4):129-33 Z. Naturforsch., C, J. Biosci. 2012 May-Jun;67(5-6):297-307 J Zhejiang Univ Sci B 2010;11(7):506-11 Int J Food Sci Nutr 2009;60 Suppl 4:155-62 Nutrition 2001;17(5):391-6 Farmaco 1995;50(4):245-56 Zentralbl Bakteriol Naturwiss 1980;135(4):296-301 Planta Med. 1967;15(3):240-4
BUDDLEJACEAE	*Buddleja asiatica* **(l)**			Indian Forester 1989 115. 120-121.	Piscicide, Abortifacient, Dermatosis, Abortifacient, Dermatosis, Inflammation, Intoxicant, Malaria, Poison Skin, Tumor	Plant Biol (Stuttg) 2014; J Asian Nat Prod Res 2013;15(6):631-7 J Ethnobiol Ethnomed 2011;7:31 Z. Naturforsch., C, J. Biosci. 2009 Jan-Feb;64(1-2):11-9 Z. Naturforsch., C, J. Biosci. 2008 Jul-Aug;63(7-8):483-91 Fitoterapia 2005;76(6):588-9 J. Nat. Prod. 1999;62(9):1241-5
BURSERACEAE	*Boswellia dalzielii* **(b)**	gastrointestinal disorders perfume	Organ: leaf Administration mode: oral			Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(7):449-55 J Ethnopharmacol 2010;130(1):143-50 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1989;42(2):195-202

			Traditional medecines: Mossi medicine Organ: gum Traditional medecines: Mossi medicine			J Chromatogr A 2012;1256:177-90 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1989;42(2):189-92
	Commiphora africana **(b)**				Cancer Medicine	Fitoterapia 2008;79(3):223-5 J. Environ. Manage. 2007;85(2):443-52 J. Nat. Prod. 2005;68(1):115-7
CAESALPINIACEAE	*Berlinia grandiflora* **(b)**					Med. Vet. Entomol. 2005;19(4):372-8
	Burkea africana **(b)**					BMC Complement Altern Med 2013;13(1):116 Phytother Res 2002;16(2):148-53
	Detarium microcarpum **(r)**			Pl. Foods Human Nutrition 1995 48. 55-63. Fitoterapia 1991 62. 455.		J. Hazard. Mater. 2012;243:59-66 Molecules 2008;13(3):581-94 J. Nat. Prod. 2006;69(5):768-73 Plant Foods Hum Nutr 2004;59(4):137-41 Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 2004;69(2):161-4 Carbohydr. Res. 2002;337(18):1663-6 Plant Foods Hum Nutr 2001;56(4):297-302 Plant Foods Hum Nutr 1999;54(2):173-82 Boll Chim Farm 1999;138(4):165-8 Plant Foods Hum Nutr 1997;50(1):27-36 Plant Foods Hum Nutr 1995;48(1):55-63 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1989;42(2):195-202 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1989;42(2):189-92
	Isoberlinia doka **(b)**					J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53
	Piliostigma reticulatum **(l)**	malaria food	Organ: leaf Administration mode: oral Traditional medecines: Mossi medicine Organ: leaf Administration mode: oral		Ache (Tooth), Soap	Afr J Tradit Complement Altern Med 2012;9(2):242-9 Epilepsy Behav 2009;14(3):454-8 Phytochemistry 2008;69(11):2245-50 Br. J. Nutr. 1995;73(6):897-913 J Diarrhoeal Dis Res 1995;13(2):127-9
	Swartzia madagascariensis **(l)**			J. Ethnopharmacol. 1986 15. 211-213.	Wart	J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 Bioresour. Technol. 2008;99(6):2037-45 Toxicon 2004;44(4):417-30 Am. J. Bot. 2003;90(9):1271-92 East Afr Med J 1991;68(10):827-30 Acta Trop. 1986;43(1):69-83 J Ethnopharmacol 1986;15(2):211-3 Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1986;80(3):460-1 C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat. 1967;264(2):401 Sven Farm Tidskr 1958;62(26):541-53 Pharm Weekbl 1958;93(1):5-7
CAPPARACEAE	*Cadaba farinosa*			Phytochemistry 1985 24. 2709-2711.	Anodyne, Cold(Head), Dentifrice	Ecol Evol 2013;3(11):3672-82

	(s)			Fitoterapia 1984 55. 117-118.	Deobstruent, Evil eye, Gonorrhea Sore, Uteritis, Vermifuge	Int J Food Sci Nutr 2002;53(2):109-15 Plant Foods Hum Nutr 2002;57(1):73-81
	Capparis corymbosa **(r)**				Fatality, Poison, Witchcraft	
	Capparis micrantha **(l)**				Cough, Uterotonic	
	*Capparis pyrifolia***(l)**				Ache (Stomach), Bilious, Vertigo	
	Cleome viscosa **(l)**			Econ. Bot. 2000 54. 150-154. Phytother. Res. 1991 5. 82-84. Phytochemistry 1980 19. 2510-2511. Phytochemistry 1979 18. 2057-2058. J. Agric. Trop. Bot. Appl. [JATBA] 1971 18. 566-570.	**Ophthalmia**, Rheumatism Synergist (Narcotic), Ache (Head), Apertif, Collyrium Ear, Stimulant, Wound	Biomed Res Int 2014;2014:680879 J Environ Biol 2014;35(2):327-32 Eur Rev Med Pharmacol Sci 2013;17(9):1273-7 J. Basic Microbiol. 2013; Pharm Biol 2013;51(5):595-600 Nat Prod Commun 2012;7(10):1363-4 Indian J. Exp. Biol. 2012;50(7):502-10 Org Med Chem Lett 2012;2(1):19 Indian J Pharm Sci 2011;73(1):98-100 Indian J Pharm Sci 2010;72(6):759-65 Chem Biol Drug Des 2011;78(4):567-79 J. Biosci. 2011;36(1):27-35 Pharm Biol 2010;48(1):105-12 Pak. J. Biol. Sci. 2009;12(19):1320-4 Indian J Pharmacol 2009;41(1):36-40 Biomed. Chromatogr. 2010;24(9):1000-5 Nat. Prod. Res. 2009;23(14):1289-97 Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 2008;73(4):871-4 Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 2008;73(3):611-9 Inflammopharmacology 2008;16(6):272-7
CAPPARIDACEAE	*Crateva religiosa* **(b)** *Crateva religiosa* **(b)**				Earache,Constipation,Ache(Ear), Alopecia, Apertif, Constipation Digestion, Epididymitis, Fishbait, Hydrocoele, Inflammation, Laxative, Purgative, Tumor (Abdomen)	Acta Pol Pharm 2008 Mar-Apr;65(2):245-7 Phytother Res 2006;20(4):279-87 Phytomedicine 2003;10(4):325-33
CAPRIFOLIACEAE	*Sambucus hookeri* **(ap)**					
CELASTRACEAE	*Maytenus senegalensis* **(l)**			J. Ethnopharmacol. 1999 64. 227-233. Phytochemistry 1999 50. 689-694. Pl. Med. 1981 43. 89-91. Lloydia 1971 34. 79-87.	Ache (Leg), Aphrodisiac, Blennorrhagia, Boil, Cancer, Cicatrizant, Colic, Diarrhea, Diuretic, Dysentery, Edema, Enema, Enteritis, Gastritis, Gonorrhea, Laxative, Mouthwash, ,Sore, Stomatitis, Syncope, Tonic, Tumor, Vermifuge, Wound	BMC Complement Altern Med 2013;13(1):100 BMC Res Notes 2012;5:546 Anal. Chim. Acta 2012;730:42-8 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(5 Suppl):90-6 J Nat Sci Biol Med 2011;2(1):59-65 Tanzan J Health Res 2009;11(4):226-34 Hum Exp Toxicol 2011;30(7):693-700 J Ethnopharmacol 2008;116(1):43-8 Phytother Res 2007;21(4):337-43 J Ethnopharmacol 2007;111(1):190-5 Phytomedicine 2007;14(2-3):109-14 J Ethnopharmacol 2005;97(2):319-25 J Ethnopharmacol 2003;87(1):35-41

						J Ethnopharmacol 1999;64(3):227-33 Phytother Res 1999;13(1):31-6 Acta Trop. 1994;56(1):65-77 J Pharm Sci 1971;60(7):1085-7 Lloydia 1971;34(1):79-87
CHENOPODIACEAE	*Chenopodium ambrosoides* **(w)**				Vermifuge, Ankylostomiasis, Ache (Stomach), Amebiasis, Amenorrhea, Analgesic, Anemia, Anodyne, Anthelminthic, Antiseptic, Arthritis, Ascaricide,, Asthma, Bite (Bug), Carminative, Colic, Conjunctivitis, Diaphoretic, Diuretic, Dysentery Dysmenorrhea, Dyspnea, Emmenagogue, ,Fatigue, Fear, Fungicide, Hookworms, Lactogogu, Medicine, Narcotic, Nerves, Nervine, Palpitation, Parasiticide, Poison, Puerperium, Rheumatism, Roundworms, Sore Stimulant, Stomach, Stomachic, Tea, Tonic, Tumor, Vermifuge	Molecules 2013;18(2):1638-52 Arch. Environ. Contam. Toxicol. 2013;64(2):219-27 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:846583 J Med Food 2011;14(10):1280-3 J Ethnopharmacol 2010;128(1):49-51 Rev Gastroenterol Peru 1994 Jan-Apr;14(1):27-31 Soc Sci Med 1993;37(4):531-9 Oncology 1992;49(3):253-5
CHRYSOBALANACEAE	*Parinari annamensis* ***(l)***					
	Parinari curatellifolia **(b)**					J Ethnopharmacol 2014; Asian Pac J Trop Med 2011;4(10):808-13 Trop Biomed 2010;27(3):595-610 J Ethnopharmacol 2008;119(3):473-7 J. Agric. Food Chem. 2004;52(8):2322-5 Phytother Res 2003;17(2):123-8 J. Biol. Chem. 2001;276(51):48231-6 Chem. Biol. Interact. 1996;99(1-3):193-204
CLUSIACEAE	*Calophyllum calaba* **(ap)**			Phytochemistry 1984 23. 323-328	Astringent, Cicatrizant, Digestive, Flu, Hernia, Leucorrhea, Pectoral, Skin, Sore, Tonic, Vulnerary	Phytochemistry 2005;66(15):1825-31
	Garcinia benthami **(l)**					Phytochemistry 2011;72(2-3):290-5 Nat. Prod. Res. 2006;20(12):1059-62
	Garcinia gaudichaudii **(l)**				Wound	Planta Med. 2002;68(3):198-203 Org. Lett. 2000;2(24):3945-8
	Pentadesma butyraceae **(l)**				Soap	PLoS ONE 2013;8(2):e55880 Mol Ecol Resour 2013;13(1):158-9 Planta Med. 2011;77(4):377-9 Nat Prod Commun 2010;5(7):1055-60 J. Nat. Prod. 2009;72(5):954-7

COMBRETACEAE	*Anogeissus leiocarpus* **(l)**				Chewstick	Anal. Chem. 2014;86(6):2955-62 Indian J Pharmacol 2013 Jul-Aug;45(4):381-5 J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2013;937:7-12 J. Helminthol. 2013; Parasitol. Res. 2013;112(7):2681-8 Phytochem Anal 2013 Jul-Aug;24(4):367-73 Vet. Parasitol. 2012;190(1-2):136-42 Parasitol. Res. 2012;111(2):827-34 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(2):134-9 Afr J Tradit Complement Altern Med 2013;10(2):173-9 Parasitol. Res. 2012;110(1):219-26 J. Helminthol. 2011;85(3):304-12 Pharm Dev Technol 2011;16(2):170-8 J Ethnopharmacol 2010;127(3):755-9 Parasitol. Res. 2010;106(2):335-40 Parasitol. Res. 2009;105(5):1339-43 Parasitol. Res. 2008;103(6):1333-8 Tanzan J Health Res 2008;10(1):34-8 Parasitol. Res. 2008;102(6):1119-27 Parasitol. Res. 2008;102(4):697-703
	Combretum glutinosum **(l)**				Wound	J Ethnobiol Ethnomed 2013;9(1):67 Ann Pharm Fr 1980;38(6):529-36
	Guiera senegalensis ***(l)***			J. Ethnopharmacol. 2000 69. 253-257. Phytochem. Anal. 2000 11. 62-56. Phytother. Res. 1998 12. 159-162. Phytother. Res. 1998 12. 132-134. Phytomedicine 1997 3. 339-348. Fitoterapia 1995 66. 86-87.	Tumor	Parasit Vectors 2014;7:185 Vet. Parasitol. 2014;199(3-4):201-5 Asian Pac J Trop Med 2013;6(10):771-5 Cell Div 2012;7(1):16 Antimicrob. Agents Chemother. 2012;56(8):4207-13 Microsc. Microanal. 2008;14(5):398-404 J Ethnopharmacol 2008;119(2):225-31 Dakar Med 2007;52(2):130-4 J Ethnopharmacol 2006;106(2):173-8 Avian Pathol. 2005;34(2):127-32 Onderstepoort J. Vet. Res. 2005;72(2):111-8 J Ethnopharmacol 2005;97(3):549-54 J Ethnopharmacol 2005;96(1-2):249-53 Dakar Med 2000;45(1):89-94 J. Nat. Prod. 2003;66(3):447-9 Phytother Res 2002;16(7):646-9 Parasitol. Res. 2002;88(2):165-71 Phytomedicine 2001;8(5):356-61 J. Environ. Manage. 2001;62(4):343-56 J Ethnopharmacol 2000;69(3):253-7
	Pteleopsis suberosa **(b)**	haemorrhoids cough; respiratory disorders	Organ: bark Ad. mode: wash Traditional medecines: Bobo medicine, Mossi medicine Organ: ND organ	Acta Bot. Gallica 1998 145. 233-238. J. Ethnopharmacol. 1998 59. 167-172. J. Ethnopharmacol. 1995 47. 55-58.		J Ethnopharmacol 2008;115(2):271-5 Phytochemistry 2006;67(24):2623-9 J Ethnopharmacol 2014;151(3):1100-8 J Ethnopharmacol 2012;140(2):368-78 Planta Med. 2008;74(4):401-6 Planta Med. 2006;72(7):604-10 J. Pharm. Pharmacol. 1999;51(11):1299-303 J Ethnopharmacol 1999;66(3):335-8

						J Ethnopharmacol 1998;59(3):167-72 J Ethnopharmacol 1995;47(1):55-8
	Terminalia laxiflora **(b)**	jaundice	Organ: bark Administration mode: oral			Parasitol. Res. 2012;110(2):521-6
CONNARACEAE	*Connarus cochinchinensis* **(l)**					
CONVOLVULACEAE	*Ipomoea stans(r)*				Bilious, Epilepsy, Hysteria, Inflammation, Kidney, Purgative	J Ethnopharmacol 2007;112(2):243-7 J. Nat. Prod. 2006;69(10):1460-6 J. Nat. Prod. 2004;67(9):1552-6 Phytomedicine 1996;3(1):41-4 J. Nat. Prod. 1995;58(11):1730-4 J Ethnopharmacol 1995;46(1):63-9 Salud Publica Mex 1985 Nov-Dec;27(6):485-91
CYPERACEAE	*Fimbristylis littoralis* **(w)**					
DILLENIACEAE	*Dillenia scabrella* **(l)**				Sore	
DIPTEROCARPACEA	*Monotes kerstingii* **(l)**					
	Shorea guiso **(l)**					
	Vatica odorata **(l)**					
EBENACEAE	*Diospyros malabarica* **(ap)**					Indian J. Exp. Biol. 2006;44(1):39-44
	Diospyros mespiliformis **(l)**					J Ethnopharmacol 2014;153(1):268-73 Springerplus 2014;3:74 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9:34 J Ethnopharmacol 2013;148(1):45-55 Molecules 2008;13(3):581-94 Plant Foods Hum Nutr 2005;60(4):187-93 J Zhejiang Univ Sci B 2006;7(1):56-63 Phytother Res 2003;17(3):282-4 J Ethnopharmacol 2002;83(1-2):139-43 J Ethnopharmacol 2002;82(2-3):191-5 Plant Foods Hum Nutr 1997;50(2):151-62 Afr J Med Med Sci 1996;25(3):221-4
ERYTHROXYLACEAE	*Erythroxylon cambodianum* **(l)**					Chem. Pharm. Bull. 2005;53(5):579-81
EUPHORBIACEAE	*Antidesma*				Collyrium	

	venosum **(l)**					
	Aporusa microstachya **(l)**					
	Aporusa tetrapleura **(l)**					
	Bridelia ferruginea **(l)**	haemorrhoids	Organ: bark Administration mode: oral Traditional medecines: Bobo medicine, Mossi medicine	Fitoterapia 2001 72. (3): 230-235. Fitoterapia 2000 71. 75-76. J. Ethnopharmacol. 2000 71. 153-160. Pl. Med. 1999 65. 213-217. Phytother. Res. 1996 10. 418-420. J. Ethnopharmacol. 1994 43. 185-190. Phytother. Res. 1994 8. 38-41. Phytother. Res. 1990 4. 189-194. Fitoterapia 1989 60. 359-362.	Ache (Head), Anodyne, Antidote (Arrow poison), Bladder, Diabetes, Diarrhea, Diuretic Dysenteryj, Edema, Eruption, Fever, Gonorrhea, Intestine, Laxative, Mouthwash, Preventitive (Syphilis), Rheumatism, Skin, Stiffness, Thrush	J Ethnopharmacol 2014;153(3):896-9 J Toxicol 2013;2013:272097 J Diet Suppl 2013;10(3):210-28 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:546873 Food Chem. Toxicol. 2013;52:176-9 Pharmacognosy Res 2012;4(2):116-22 Pharm Biol 2012;50(2):188-94 Pharm Biol 2011;49(12):1286-97 J Ethnopharmacol 2011;137(1):50-6 J Complement Integr Med 2011;8 J Ethnopharmacol 2011;133(1):116-9 Pharmazie 2008;63(2):164-8 J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 Planta Med. 1999;65(3):213-7 Phytomedicine 2007;14(2-3):192-5 J Ethnopharmacol 2003;88(2-3):221-4 Fitoterapia 2002;73(4):343-5 Fitoterapia 2000;71(1):75-6 J. Pharm. Pharmacol. 2001;53(5):757-61 Fitoterapia 2001;72(3):230-5
	Bridelia ferruginea **(l)**					
	*Euphorbia hirta***(w)**	dysentery	Organ: all Administration mode: oral Traditional medecines: Bobo medicine, Mossi medicine	J. Ethnopharmacol. 1999 65. 63-69. Phytother. Res. 1997 11. 401-402. Phytother. Res. 1996 10. 670-676. J. Ethnopharmacol. 1995 49. 115-118. J. Ethnopharmacol. 1991 34. 235-246. Pl. Med. 1991 57. 225-231. J. Ethnopharmacol. 1990 29. 189-198.	Bruise, Catarrh, Conjunctivitis, Cornea, Dermatosis, Ringworm, Sore, Ache (Head), Ache (Stomach), Alexiteric, Anodyne, Asthma, Athlete's-Foot, Breast, Bronchitis, Carminative, Colic, Cough, Cyanogenetic, Depurative, Diuretic, Dysentery, Enteritis, Eruption, Excrescence, **Eyelid**, Fever Flu, Fracture(Veterinary),; Fungus, Gargle, Gonorrhea, Heart, Hypertension, Itch, Lactagogue, Lactogogue, Measles, ,Nausea, **Ophthalmia**, Oxyuris, Poison, Post-Natal, Poultice, Purgative, Skin, Sore, Splinter, Tumor, Urogenital, Vermifuge, Vesicant, Wart Wound	J Enzyme Inhib Med Chem 2014; J Ethnopharmacol 2013; J Ethnopharmacol 2013;150(3):989-1006 J Ethnopharmacol 2014;152(1):207-16 Immunol. Invest. 2014;43(3):197-211 Biomed Res Int 2013;2013:182064 J Ethnopharmacol 2014;151(2):1005-18 Chin J Nat Med 2013;11(5):528-33 BMC Complement Altern Med 2013;13:346 Exp Ther Med 2013;6(5):1247-1250 Int J Appl Basic Med Res 2013;3(2):111-6 Asian Pac J Trop Biomed 2013;3(9):692-6 Colloids Surf B Biointerfaces 2013;108:60-5 BMC Complement Altern Med 2013;13:66 CNS Drugs 2013;27(3):207-19 Asian Pac J Trop Med 2013;6(2):102-9 Pharm Biol 2013;51(4):411-7 Chin J Nat Med 2012;10(1):40-2 Inflammopharmacology 2013;21(5):365-75 Parasitol. Res. 2013;112(2):679-92
	Mallotus philippinensis			Hamdard Med. 1995 38. 62-71.	Enuresis, Piscicide, Aphrodisiac, Bactericide, Cold, Laxative,	Phytomedicine 2014;21(3):247-53 Cancer Lett. 2014;343(2):179-89

	(l)				Litholytic, Taenifuge, Vermifuge	Nat. Prod. Res. 2014;28(4):245-50 J Environ Biol 2013;34(1):87-92 Asian Pac J Trop Med 2013;6(8):595-601 Phytomedicine 2013;20(10):853-60 Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011;21(16):4928-31 Chem Biol Drug Des 2011;77(6):460-70 J Ethnopharmacol 2010;131(2):502-4 Nat Prod Commun 2010;5(2):211-7 J. Biomed. Biotechnol. 2009;2009:742936 J Environ Biol 2009;30(2):295-8 Biol Proced Online 2009;11:227-40 Biol. Pharm. Bull. 2009;32(4):631-6 J Ethnopharmacol 2008;119(1):185-90 J Ethnopharmacol 2008;118(2):213-9 J Ethnopharmacol 2006;108(1):152-4 J Ethnopharmacol 2006;107(2):182-8 Life Sci. 2005;77(6):707-19 Reprod. Toxicol. 2005 May-Jun;20(1):149-56
	Sapium discolor **(l)**					J. Plant Res. 2013;126(1):95-103 Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 2007;18(10):2160-6
	Securinega virosa **(l)**				Analgesic, Antiseptic, Aphrodisiac, Chest, Cicatrizant, Diarrhea, Dyspepsia, Fever, Gum, Larvicide, Pneumonia, Purgative, Sedative, ,Venereal, Wound	Metab Brain Dis 2014;29(1):161-5 J Parasit Dis 2013;37(1):125-30 J. Nat. Prod. 2014;77(1):22-8 Micron 2013;50:62-7 Org. Lett. 2013;15(1):120-3 Org. Lett. 2012;14(12):3096-9 J Ethnopharmacol 2012;141(1):128-33 Org. Lett. 2011;13(15):3888-91 Nat Prod Commun 2009;4(12):1645-50 Afr J Tradit Complement Altern Med 2008;5(2):147-53 J Ethnopharmacol 2008;116(1):74-83 J Ethnopharmacol 2007;112(3):545-51 Mali Med 2007;22(4):1-8 Org. Lett. 2006;8(11):2285-8 Phytother Res 2006;20(1):41-5 Pharmazie 2004;59(6):492-4 Phytother Res 2003;17(2):123-8 Planta Med. 2002;68(4):372-4 Pharm Biol 2000;38(3):214-21 Trop. Med. Int. Health 1996;1(6):765-71
	Uapaca togoensis **(l)**					Parasitol. Res. 2010;107(3):643-50 Afr J Tradit Complement Altern Med 2006;4(1):17-22 J Ethnopharmacol 2004;93(1):43-9
FABACEAE	*Acacia macrostachya* **(b)**					Nat. Prod. Res. 2012;26(6):575-9 Malar. J. 2010;9:262
	Albizia chinensis **(l)**				Piscicide	J Ethnopharmacol 2012;142(2):422-31 Nat Prod Commun 2011;6(11):1617-20 Colloids Surf B Biointerfaces 2011;82(1):224-32 Carbohydr. Res. 2010;345(13):1877-81 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2009;34(16):2063-6

						J. Nat. Prod. 2009;72(4):632-9
	Alysicarpus rugosus **(l)**					Indian J. Exp. Biol. 2005;43(10):916-20
	Archidendron turgidum **(l)**					
	Bauhinia rufescens **(l)**	malaria	Organ: leaf Ad. mode: oral Trad: Mossi		**Eye**, Fever, Medicine	Nat Prod Commun 2013;8(10):1435-7 Nat. Prod. Res. 2012;26(11):1069-74
	Cajanus kerstingii **(l)**					
	Cassia sieberiana **(r)**					BMC Complement Altern Med 2012;12:247 BMC Complement Altern Med 2012;12:65 J Ethnopharmacol 2012;141(1):48-56 J. Vector Ecol. 2010;35(2):267-76 J. Nat. Prod. 2011;74(3):455-9 J Ethnopharmacol 2010;127(3):755-9 Phytother Res 2008;22(8):1013-6 Dakar Med 2005;50(3):132-5 Int. J. Oncol. 1996;9(4):801-9 Planta Med. 1968;16(2):184-90 Ann Pharm Fr 1967;25(5):343-6
	Entada africana **(r)**	malaria pain cold; cough	Organ: root Administration mode: oral Traditional medecines: Mossi medicine Organ: bark Organ: bark Administration mode: oral Traditional medecines: Mossi medicine, Bobo medicine			J Ethnopharmacol 2002;82(2-3):155-8 J Basic Clin Physiol Pharmacol 2014;25(2):217-23 BMC Complement Altern Med 2013;13:254 J Ethnopharmacol 2013;149(1):162-8 Asian Pac J Trop Med 2011;4(10):808-13 J Ethnopharmacol 2011;137(1):553-61 J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 J Ethnopharmacol 2007;110(1):99-104 J. Nat. Prod. 2006;69(9):1323-9 J Ethnopharmacol 2006;107(2):189-98 Farmaco 2001 May-Jul;56(5-7):361-3 J Ethnopharmacol 2001;74(2):159-71 J. Pharm. Pharmacol. 1999;51(11):1299-303 Mycoses 1996 Jan-Feb;39(1-2):67-70 J Diarrhoeal Dis Res 1995;13(2):127-9

	Erythrina variegata **(b)**			Fitoterapia 1993 64. 15-17. Fitoterapia 1993 64. 88. Pl. Med. 1988 54. 526-528. Lloydia 1978 41. 342-347.	Abscess Ache(Tooth) Asthma Bite (Snake), Cancer, Cough, Dysentery, Lactagogue, Ache (Ear), Ache (Stomach), Ache (Tooth), Anodyne, ,Asthma, Astringent, Bilious, Bite (Snake), Bubo, Cancer, Cold, Convulsion, Cough, Depressant, Diuretic, Emmenagogue, **Eye**, Female, Fever, Hematemesis, , Lactogogue, Laxative, Medicine, Menorrhagia, **Ophthalmia**, Paralysis, Pimple, Poison, Sore Venereal, Vermifuge	Phytomedicine 2013;20(10):918-22 ScientificWorldJournal 2012;2012:796472 Nat Prod Commun 2012;7(2):171-2 Trop Anim Health Prod 2012;44(7):1659-65 J Pharmacol Pharmacother 2011;2(4):285-7 Asian Pac. J. Cancer Prev. 2011;12(5):1219-23 Chem. Biodivers. 2011;8(3):476-82 Pharm Biol 2011;49(6):577-82 Nat Prod Commun 2010;5(11):1781-4 J Pharm Bioallied Sci 2010;2(4):350-5 Pharmacogn Rev 2010;4(8):147-52 Br. J. Nutr. 2010;104(7):965-71 Yao Xue Xue Bao 2009;44(12):1359-63 Arch. Pharm. Res. 2008;31(12):1534-9 Microbiology (Reading, Engl.) 2008;154(Pt 6):1825-36 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2007;32(7):627-30 J Enzyme Inhib Med Chem 2007;22(1):115-20 Chem. Biodivers. 2004;1(7):1101-8 J Ethnopharmacol 2007;109(1):165-9 Chem. Pharm. Bull. 2006;54(4):570-3
	Eysenhardtia adenostylis **(t)**				Kidney	Colloids Surf B Biointerfaces 2014;116:183-92 Nat Prod Commun 2013;8(2):177-80 J Ethnopharmacol 2012;141(3):860-5 Br. J. Biomed. Sci. 2009;66(2):102-3 Org. Lett. 2009;11(14):3020-3 J Sep Sci 2008;31(4):741-5 Phytochemistry 2008;69(2):451-6 Biol. Pharm. Bull. 2007;30(8):1503-10 J. Nat. Prod. 2006;69(12):1687-91 Am. J. Bot. 2004;91(8):1219-30 Phytochemistry 1999;52(8):1469-71 J. Nat. Prod. 1998;61(6):767-70
	Indigofera macrocalyx **(l)**					Pak. J. Biol. Sci. 2008;11(11):1429-35
	Lonchocarpus cyanescens **(l)**				Cataract, Leprosy, Puerperium, Skin, Sore, Stomachic, Yaws	J Basic Clin Physiol Pharmacol 2014;25(2):235-40 Microsc. Microanal. 2012;18(4):840-3 Nat. Prod. Res. 2012;26(20):1954-6 J Nat Med 2012;66(1):127-32 Plant Foods Hum Nutr 1991;41(3):233-9 J Pharm Sci 1982;71(12):1412-3 J Ethnopharmacol 1982;6(3):263-74
	Milletia diptera **(ap)**					Pest Manag. Sci. 2003;59(10):1159-61
	Pericopsis laxiflora **(l)**					Parasitol. Res. 2012;110(2):521-6
	Prosopis africana **(b)**	pain cicatrizant	Organ: bark Organ: bark Administration mode: local	Taub Trop. Sci. 1996 36. 206-210.	Aphrodisiac Sterility	Pharmacognosy Res 2012;4(2):116-22 Pharm Dev Technol 2011;16(2):170-8 J. Genet. 2011;90(2):251-64 Indian J Pharm Sci 2010;72(3):334-9

			application Traditional medecines: Bobo medicine, Mossi medicine			J Ethnopharmacol 2010;131(3):585-91 Pharm Biol 2010;48(3):296-9 J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008;35(9):947-52 Int. J. Food Microbiol. 2007;113(2):208-18 Acta Pharm 2003;53(1):49-56 J Ethnopharmacol 2002;82(2-3):155-8 J Ethnopharmacol 2002;79(2):279-82 Boll Chim Farm 2001 Jan-Feb;140(1):40-5 Boll Chim Farm 2000 Jul-Aug;139(4):173-6 Chem. Pharm. Bull. 2000;48(5):734-7 Int. J. Food Microbiol. 1999;51(2-3):183-6 Plant Foods Hum Nutr 1998;52(4):325-8 J. Nutr. 1998;128(11):2014-22 Am. J. Bot. 1997;84(3):285 Plant Foods Hum Nutr 1992;42(4):297-304 Ann Pharm Fr 1968;26(12):787-96
	Pterocarpus santalinoides **(l)**					J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2012;96(2):250-9 Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(8):1201-4 Tanzan J Health Res 2009;11(4):250-2 Med. Vet. Entomol. 2005;19(4):372-8 J Ethnopharmacol 2000;73(1-2):145-51
	Sindora siamensis **(l)**				Parturition	
	Tephrosia mossiensis **(l)**					Toxicol Int 2014;21(1):78-83 Indian J Pharmacol 2014 Mar-Apr;46(2):197-200 Eur J Pain 2014; PLoS ONE 2014;9(3):e92072 PLoS ONE 2014;9(3):e90806 Chin J Nat Med 2014;12(1):1-7 Sci Pharm 2013;81(4):1071-87 Molecules 2014;19(2):1432-58 Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2014;121:164-72 Appl. Biochem. Biotechnol. 2013;171(8):2105-20 Pharm Biol 2013;51(10):1262-71 J. Basic Microbiol. 2013; Acta Pol Pharm 2013 Mar-Apr;70(2):345-7 Acta Pol Pharm 2013 Mar-Apr;70(2):261-9 Res. Vet. Sci. 2013;95(1):200-3 J Ethnopharmacol 2013;145(2):547-53 J Environ Biol 2012;33(3):617-21 J. Agric. Food Chem. 2012;60(40):10055-63 Vet. Parasitol. 2012;190(1-2):204-9 J. Pharm. Pharmacol. 2012;64(8):1195-205
	Xeroderris stuhlmannii **(l)**					Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):45-60 J Ethnopharmacol 2005;99(2):273-9
	Zornia glochidiata **(l)**					Syst. Appl. Microbiol. 2009;32(6):387-99
FLACOURTIACEA	*Flacourtia flavescens* **(l)**					Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):66-8 Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(7):449-55

GESNERIACEAE	*Kohleria deppeana* **(l)**				Cancer (Breast), Diarrhea, Douche, Gastritis, Internulcer, Leucorrhea, Sore	
GUTTIFERAE	*Psorospermum febrifugum* **(l)**	skin disorders	Organ: leaf Administration mode: wash Traditional medecines: Bobo medicine	Phytochemistry 1989 28. 2483-2487. Phytochemistry 1988 27. 2795-2800. Pl. Med. 1986 207-210. Phytochemistry 1985 24. 827-830.	Fever Leprosy	PLoS ONE 2013;8(2):e55880 J Ethnopharmacol 2010;130(1):43-53 Chem. Pharm. Bull. 2009;57(10):1113-8 Pak. J. Biol. Sci. 2008;11(5):719-25 Afr J Tradit Complement Altern Med 2007;4(4):510-23 Cancer Res. 1994;54(12):3191-5 J. Nat. Prod. 1990 Jan-Feb;53(1):23-41 J. Chromatogr. 1988;450(1):3-11 J. Nat. Prod. 1987 Mar-Apr;50(2):141-5 Planta Med. 1986; J. Nat. Prod. 1986 May-Jun;49(3):412-23 Experientia 1981;37(11):1138-9 J. Nat. Prod. 1980 Mar-Apr;43(2):296-301
HIPPOCRATEACEAE	*Hippocratea excelsa* **(r)**			Econ. Bot. 2003 57. (1): 54-64. J. Ethnopharmacol. 1995 47. 85-90. Pl. Med. 1991 57. 194-195. J. Nat. Prod. 1990 53. 1212-1219. Econ. Bot. 1989 43. 508-509.		Phytochemistry 2008;69(4):1057-64 J. Nat. Prod. 2007;70(5):863-5 J Ethnopharmacol 2007;110(2):334-42 J Ethnopharmacol 2006;103(1):66-70 J Ethnopharmacol 2005;100(1-2):153-7 Phytochemistry 2002;59(7):767-77 J Ethnopharmacol 2002;79(3):383-8 J Ethnopharmacol 1995;47(2):85-90 Planta Med. 1991;57(2):194-5 J. Nat. Prod. 1990 Sep-Oct;53(5):1212-9
HYMENOCARDIACEAE	*Hymenocardia acida* **(l)**			Int. J. Pharmacog. 1997 35. 354-357. Phytother. Res. 1988 2. 42-45.	Antiseptic	Phytochemistry 2014;98:216-22 J Ethnopharmacol 2013;146(2):623-31 J Diet Suppl 2011;8(1):1-11 Afr J Tradit Complement Altern Med 2012;9(2):204-9 Pak. J. Biol. Sci. 2010;13(10):480-8 Nat. Prod. Res. 2009;23(2):168-77 J Ethnopharmacol 2007;113(3):427-32 Pak. J. Biol. Sci. 2007;10(5):788-91 Phytomedicine 2007;14(2-3):192-5 J Ethnopharmacol 2004;91(1):37-42 J Ethnopharmacol 2003;87(2-3):221-5 Bull Soc Chim Fr 1968;7:2979-84
HYPERICACEAE	*Cratoxylon formosum* **(l)**					Chin Med 2014;9(1):12 Fitoterapia 2014;94:114-9 Arch. Pharm. Res. 2014; BMC Complement Altern Med 2012;12:246 Cancer Res. 2013;73(1):307-18 Talanta 2012;93:371-82 Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online 2011;67(Pt 8):o1916-7 Chem. Pharm. Bull. 2011;59(2):231-4 J Med Food 2010;13(5):1097-103 J. Nat. Prod. 2010;73(7):1283-7 Chem. Pharm. Bull. 2010;58(3):386-9 Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online 2010;66(Pt 8):o2066-7 Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online 2010;66(Pt 4):o817-8 Biol. Pharm. Bull. 2007;30(4):661-6

						Asia Pac J Clin Nutr 2007;16 Suppl 1:37-42 Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 2006;37(6):1156-9 J. Agric. Food Chem. 2006;54(7):2719-25 Community Dent Oral Epidemiol 2006;34(2):81-6 Phytochemistry 2006;67(7):723-7
ICACINACEAE	*Gonocaryum lobbianum* (l)					J. Plant Res. 2012;125(3):361-9
KRAMERIACEAE	*Krameria secundifolia* **(s)**					
LAMIACEAE	*Hyptis suaveolens* **(l)**			J. Econ. Taxon. Bot. 1999 23. 719-722 J. Essent. Oil Res. 1997 9. 683-687. J. Essent. Oil Res. 1996 8. 315- 318. Fitoterapia 1993 64. 03-6. Fitoterapia 1992 63. 462-465. Phytochemistry 1990 29. 1326-1329. Phytochemistry 1984 23. 337-338. J. Nat. Prod. 1984 47. 377-378. J. Nat. Prod. 1981 44. 735-738.	Catarrh, Dermatosis, Lactagogue Stimulant, Sudorific, Ache (Head), Ache (Stomach), Analgesic, Antispasmodic, Antisuperofic, Apertif, Bechic, Bilious, Cancer,, Carminative, Catarrh, Cold Colic, Constipation, Depurative, Dyspepsia, Epistaxis, Expectorant, Fever, Flu, Gall, Intestine, Lactogogue, Liver, Malaria, Menorrhagia, Nausea, Pacifier, Palsy, Poison (Veterinary), Refrigerant, Repellant (Insect), Rheumatism, Spasm, Stimulant, Stomachic, Sudorific, Tea, Tumor, Uteritis, Yellow Fever	Cell. Mol. Neurobiol. 2014;34(3):323-31 J Ethnopharmacol 2013;150(3):982-8 Pak. J. Biol. Sci. 2013;16(4):175-9 Chem. Biodivers. 2013;10(8):1494-500 Pharmacognosy Res 2013;5(2):93-102 Pharm Biol 2013;51(9):1125-30 Nat. Prod. Res. 2013;27(22):2091-9 J. Med. Entomol. 2012;49(6):1398-404 Asian Pac J Trop Med 2012;5(11):868-74 Molecules 2012;17(8):8917-27 J Ethnopharmacol 2012;143(1):377-82 J. Am. Mosq. Control Assoc. 2012;28(1):15-9 Nat Prod Commun 2011;6(11):1775-96 Parasitol. Res. 2012;110(5):2013-21 Parasitol. Res. 2012;110(6):2105-15 J. Food Sci. 2012;77(1):C15-9 Asian Pac J Trop Med 2011;4(9):689-93 J. Insect Sci. 2011;11:33 Rev. Biol. Trop. 2010;58(4):1549-60 J Environ Biol 2010;31(3):379-86
LAURACEAE	*Cassytha filiformis* **(w)**	tonic	Organ: all Administration mode: inhalation Traditional medecines: Dioula medicine	Fitoterapia 1987 58. 291-294.	Enterosis, Vermifuge, Anasarca, Bilious, Cold, Collyrium, Dropsy, Dysentery, Hair-Oil, Insecticide, Poison, Sclerosis, Skin, Sore, Urethritis	Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:751291 J. Nat. Prod. 2008;71(2):289-91 J Med Toxicol 2007;3(4):146-51 Planta Med. 2004;70(8):764-70 Planta Med. 2004;70(5):407-13 Planta Med. 2002;68(11):1042-4 J. Nat. Prod. 1998;61(7):863-6 Jpn. J. Pharmacol. 1997;73(3):207-14 Yakugaku Zasshi 1965;85(9):827-31
	Cinnamomum curvifolium **(l)**					
	Cinnamomum iners **(l)**				Antidote (Antiaris), Fever, Parturition, Rheumatism, Ache (Head), Carminative, Deobstruent Diaphoretic, Diuretic, Fever, Lactogogue, Post-Natal, Stimulant	J Ethnopharmacol 2014;153(3):587-95 Nat. Prod. Res. 2013;27(10):888-95 Nat. Prod. Res. 2012;26(22):2155-8 Molecules 2011;16(4):3037-47 Molecules 2007;12(4):868-77
	*Machilus odoratissimus***(l)**					

LECYTHIDACEAE	*Careya arborea* **(l)**				Emollient, Anus, Bite (Snake), Cold, Cough, Demulcent, Digestive, Emollient, Eruption, Fever, Fistula, Leech-Repellant, Piscicide, Poison, Prolapse, Pruritis, Smallpox, Sore	Pharm Biol 2014; J Environ Biol 2013;34(1):87-92 Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(5):404-8 J Nat Med 2008;62(3):336-9 J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2007;53(3):267-76 Phytother Res 2007;21(5):492-5 J. Pharmacol. Sci. 2007;103(1):12-23 Phytochemistry 2006;67(2):183-90 Fitoterapia 2003;74(1-2):116-8 Pharmazie 2002;57(10):698-701 Bull Calcutta Sch Trop Med 1967;15(1):8-9 Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges 1957;290/62(11):578-9
LOGANIACEAE	*Anthocleista djalonensis* **(b)**					Asian Pac J Trop Biomed 2012;2(6):461-4 Nat Prod Commun 2013;8(2):243-8 J Ethnopharmacol 2013;146(3):811-4 Pharmacognosy Res 2012;4(2):92-103 Can. J. Physiol. Pharmacol. 2010;88(9):880-7 Indian J Pharmacol 2009;41(6):258-61 J Ethnobiol Ethnomed 2005;1:7 J Ethnopharmacol 2006;104(1-2):164-7 J Ethnopharmacol 2004;92(1):135-44
	Strychnos spinosa **(b)**	gynaecological disorders	Organ: bark Administration mode: oral Traditional medecines: Mossi medicine	Phytochemistry 1985 24. 771-772. Phytochemistry 1981 20. 2585-2586.	Poison	Trop Anim Health Prod 2013;45(6):1341-7 J Ethnopharmacol 2010;127(3):755-9 J Ethnopharmacol 2009;122(3):439-44 J. Nat. Prod. 2007;70(8):1360-3 Planta Med. 2006;72(5):480-2 J. Nat. Prod. 2005;68(9):1434-6 J Ethnopharmacol 2005;99(2):273-9 J Ethnopharmacol 2004;91(1):37-42 J. Agric. Food Chem. 2003;51(21):6256-60 Tree Physiol. 2001;21(2-3):117-28 Int J Food Sci Nutr 2000;51(2):91-107 Planta Med. 1984;50(5):446-7
LORANTHACEAE	*Tapinanthus dodoneifolius* **(l)**					Neurol Res Int 2014;2014:974308 Bioorg. Med. Chem. 2013;21(13):3790-4 Int. J. Mol. Med. 2011;28(2):261-70 J Ethnopharmacol 2011;133(2):345-52 J. Nat. Prod. 2007;70(12):2006-9 Cardiovasc J S Afr 2007 Jan-Feb;18(1):9-15 J Ethnopharmacol 2002;83(3):235-40
MALVACEAE	*Hibiscus mesnyi* **(l)**					
	Malva rotundifolia **(w)**				Abscess, Bladder, Bronchitis, Cough, Demulcent, Emmenagogue, Emollient, Glycosuria, Lubricative, **Ophthalmia**, Piles, Sore (Throat), Stomach, Tumor	Am. J. Bot. 2002;89(8):1285-8 J Am Osteopath Assoc 1969;68(10):1029-35 J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc 1949;38(8):470-3
	Urena lobata **(l)**			Tropenpflanzer 1930 296-299	Abdomen, Anodyne, Diarrhea, Dysentery, Fever, Gonorrhea, Hematochezia, Hemostat,	PLoS ONE 2014;9(3):e90305 Asian Pac J Trop Med 2012;5(8):616-22 J Ethnopharmacol 2012;141(1):331-7

					Wound, Yaws, Ache (Head), Ache (Stomach), Aftosa, Alexiteric, Aphthaee, Bladder, Blennorrhagia, Boil, Bronchitis, Burn, Calculus, Cataplasm, Colic, Cough, Depurative, Diarrhea, Diuretic, Dysentery, Emmena-gogue, Emollient, Eruption, Erysipelas, Expectorant, Fever, Filariasis, Flatulence, Flu, Gastritis, Gingivitis, Hangover, Hepatitis, Inflammation, Intestine, Lumbago, Lung, Nephritis, Pleurisy, Pneumonia, Refrigerant, Scald, Sore, Stomach, Swelling, Urogenital	J Asian Nat Prod Res 2011;13(10):907-14 J Asian Nat Prod Res 2010;12(11):962-7 Fitoterapia 2006;77(4):296-9 Anc Sci Life 2006;25(3-4):10-5 Fitoterapia 2001;72(8):927-9 Plant Physiol. 1969;44(12):1749-51
	Wissadula amplissima **(w)**					Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(2):185-95 Virus Res. 2010;150(1-2):148-52 Arch. Virol. 2009;154(11):1859-60 Virus Genes 2009;39(3):387-95
MELASTOMATACEAE	*Dissotis eliotii* (l)					Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(4):387-90 BMC Complement Altern Med 2010;10:71 Tanzan J Health Res 2009;11(1):23-8 Pak J Pharm Sci 2006;19(1):44-8 J Ethnopharmacol 1997;56(2):133-7
	Memecylon edule **(l)**				Astringent	Asian Pac J Trop Med 2013;6(5):337-45 Biomaterials 2013;34(3):724-34 Int J Nanomedicine 2011;6:1265-78 J Ethnopharmacol 2009;121(2):278-81
MELIACEAE	*Khaya senegalensis* **(b)**			Pl. Med. 1999 65. 209-212. Phytother. Res. 1992 6. 282-284. Fitoterapia 1983 54. 141-143. Fitoterapia 1983 54. 141-143. Indian Forester 1960 86. 395-399.	Repellant(Insect)	J Ethnobiol Ethnomed 2014;10(1):42 J Ethnopharmacol 2014; Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:751291 J Ethnopharmacol 2014;151(3):1100-8 J Toxicol 2013;2013:803835 Afr J Tradit Complement Altern Med 2013;10(6):469-76 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9(1):67 J Asian Nat Prod Res 2013;15(6):638-43 Pharm Biol 2013;51(7):906-13 BMC Complement Altern Med 2013;13:51 J. Nat. Prod. 2013;76(3):327-33 Chem Asian J 2012;7(9):2024-7 Pharmacognosy Res 2012;4(2):92-103 Parasitol. Res. 2012;111(2):827-34 J Ethnopharmacol 2012;140(2):368-78 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):45-60 Pharm Biol 2011;49(12):1286-97 Mol Ecol Resour 2012;12(2):344-53 Ecol Appl 2011;21(5):1604-16 Am. J. Bot. 2011;98(8):e207-9
	Pseudocedrela kotschyi	toothache	Organ: branch Administration	Discovery Innov. 2001 13. (3-4): 132-135.	Rheumatism	Phytother Res 2008;22(8):1013-6 BMC Complement Altern Med 2013;13:51

	(b)		mode: local application Traditional medecines: Mossi medicine, Bobo medicine			Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):45-60 Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2009;103(7):698-702 Bioresour. Technol. 2008;99(6):2037-45 J. Nat. Prod. 2007;70(1):9-13 J Ethnopharmacol 2007;110(1):99-104 Phytochemistry 1990;29(4):1193-5 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1989;42(2):195-202 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1989;42(2):189-92
	Trichilia emetica ***(l)***			J. Nat. Prod. 1998 61. 179-184. FRIM Newsl. 1997 80. (2): 4. Int. Tree Crops J. 1988 5. 163-177.	Emetic, Poison, Soap	Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:867075 Phytochemistry 2013;96:437-42 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9(1):67 Pharmacognosy Res 2012;4(2):92-103 Phytochemistry 2012;75:78-89 Pharm Biol 2012;50(4):481-9 Cryo Letters 2011 Mar-Apr;32(2):166-74 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(5 Suppl):90-6 J Ethnopharmacol 2010;131(3):585-91 Cryo Letters 2009 Jul-Aug;30(4):280-90 Mycoses 2010;53(4):305-10 Int. J. Biol. Macromol. 2009;44(3):236-9 Nat. Prod. Res. 2007;21(1):13-7 J Ethnopharmacol 2007;110(3):451-7 J Ethnopharmacol 2006;105(3):368-73 J Ethnobiol Ethnomed 2005;1:7 J Ethnopharmacol 2005;96(1-2):227-32 Am. J. Bot. 2004;91(6):863-70 J Ethnopharmacol 2004;91(1):37-42 J Ethnopharmacol 2004;90(2-3):221-7
MORACEAE	*Ficus glumosa* **(l)**					Niger J Physiol Sci 2013;28(1):99-104 Anim Cogn 2010;13(1):145-55
MYRISTICACEAE	*Knema globularia* **(l)**					
MYRTACEAE	*Syzygium guineense* **(l)**				Edema	J. Sci. Food Agric. 2013; J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 2014;98(3):417-23 Mycologia 2013 Mar-Apr;105(2):297-311 Pharm Biol 2012;50(7):857-65 J. Agric. Food Chem. 2011;59(14):7688-99 Mycologia 2011 May-Jun;103(3):554-69 Phytother Res 2010;24(10):1457-62 J Diet Suppl 2010;7(1):21-30 Am. J. Primatol. 2009;71(11):901-11 J Ethnopharmacol 2008;120(3):413-8 Pak. J. Biol. Sci. 2008;11(5):719-25 Med. Vet. Entomol. 2005;19(4):372-8 J Ethnopharmacol 2005;101(1-3):283-6 Afr J Health Sci 1997 Jan-Mar;4(1):43-5 Ann Pharm Fr 1996;54(6):276-9
NAUCLEACEAE	*Mitragyna inermis* **(b)**			Phytother. Res. 2000 14. 608-611. J. Ethnopharmacol. 1996 54. 59-62.	Venereal	Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(3):149-69 J Sep Sci 2010;33(12):1863-9 Phytother Res 2008;22(8):1013-6 Afr J Tradit Complement Altern Med 2008;5(4):387-90

						J Ethnopharmacol 2006;106(2):173-8 Med. Vet. Entomol. 2005;19(4):372-8 J Ethnopharmacol 2006;103(3):319-26 Phytochem Anal 2005 Jan-Feb;16(1):30-3 Fitoterapia 2004;75(5):447-50 J Ethnopharmacol 2004;93(2-3):345-50 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2002;27(4):274-7 Phytochemistry 2002;61(4):379-82 Parasitol. Res. 2002;88(2):165-71 Food Chem. Toxicol. 2001;39(3):287-91 Phytother Res 2000;14(8):608-11 J Ethnopharmacol 2000;73(1-2):145-51 Phytother Res 2000;14(1):45-7 J Ethnopharmacol 1996;54(1):59-62 J. Pharm. Pharmacol. 1971;23(7):559-60 J. Pharm. Pharmacol. 1969;21:Suppl:113S+
	Nauclea latifolia **(r)**			Fitoterapia 2001 72. 12-21. Phytother. Res. 2000 14. 608-611. Fitoterapia 1998 69. 141-146. Fitoterapia 1996 67. 220-222. J. Herbs Spices Med. Pl. 1995 3. 23-35. J. Ethnopharmacol. 1991 35. 91-96. Pl. Med. 1979 35. 242-246.	Ache (Tooth), Anodyne,, Chewstick, Colic, Debility, Diarrhea Dysentery, Dyspepsia, Emetic,Emmenagogue, Enteritis, Female, Fever, Gastritis, Gonorrhea, Leprosy, Malaria, Measles, Orchitis, Piles, Stomachic, Tonic	Pak. J. Biol. Sci. 2013;16(23):1811-4 J Ethnopharmacol 2014;151(1):445-51 J Ethnopharmacol 2013;150(3):1145-53 BMC Complement Altern Med 2013;13:266 BMC Complement Altern Med 2013;13:77 Chem. Biodivers. 2013;10(3):401-10 CNS Drugs 2013;27(3):207-19 J Ethnopharmacol 2012;144(3):618-26 J Complement Integr Med 2012;9:Article 16 J Ethnopharmacol 2012;142(1):265-73 Acta Pharm Hung 2011;81(4):139-49 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2011;36(18):2511-4 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):45-60 J Ethnopharmacol 2011;138(3):756-61 Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(3):149-69 J Ethnopharmacol 2011;137(1):176-83 Methods Find Exp Clin Pharmacol 2010;32(8):551-5 Pharm Biol 2011;49(1):15-25 Nat Prod Commun 2009;4(9):1185-8 J Ethnopharmacol 2010;127(1):85-90
	Nauclea officinalis **(l)**			Pl. Med. 1984 50. 459-461.		Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2013;38(22):3898-901 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2013;38(9):1306-9 Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi 2013;29(3):223-4, 231 Yao Xue Xue Bao 2013;48(2):276-80 Planta Med. 2013;79(9):782-7 J Complement Integr Med 2013;10 Int. J. Biol. Macromol. 2013;58:7-12 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2012;37(22):3446-50 Zhong Yao Cai 2012;35(8):1259-62 Food Chem. Toxicol. 2013;53:263-71 Zhong Yao Cai 2012;35(7):1049-53 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2012;37(11):1682-5 J Nat Med 2013;67(2):399-403 Yao Xue Xue Bao 2012;47(4):535-40 J Ethnopharmacol 2012;142(3):762-8

						Molecules 2012;17(4):4028-36 J Asian Nat Prod Res 2012;14(2):97-104 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2011;36(17):2325-8 Nat. Prod. Res. 2012;26(18):1750-4 Chem. Biol. Interact. 2011;194(2-3):97-105
NYCTAGINACEAE	*Boerhavia repens* **(l)**					Nat Prod Commun 2011;6(11):1651-2
OCHNACEAE	*Lophira lanceolata* **(l)**			J. Nat. Prod. 1994 57. 971-974. Phytochemistry 1989 28. 1557-1559.		Rev Bras Parasitol Vet 2013 Jan-Mar;22(1):119-23 Ann Trop Med Parasitol 2006;100(3):237-43 Bioresour. Technol. 2003;86(2):203-5 J. Nat. Prod. 1998;61(6):801-3 Plant Foods Hum Nutr 1993;43(3):251-8 Planta Med. 1967;15(4):361-5
OLACACEAE	*Ximenia americana* **(l)**			Fitoterapia 1994 65. 59-61. Fitoterapia 1994 65. 185.	Colic, Ache (Head), Ache (Tooth), Astringent, Bactericide, Cathartic, Cold, Cough,, Cyanogenetic, Dentifuge, Diarrhea, Dropsy, Fever, Gastritis, Hair-Oil, Intoxicant, Jaundice, Laxative, Liqueur, Nausea, **Ophthalmia**, Poison, Purgative, Pyorrhea, Repellant (Insect), Rheumatism, Ringworm, Trypanosomiasis, Venereal, Vermifuge	Biotechnol. Adv. 2014; J Parasitol Res 2014;2014:904318 J Ethnopharmacol 2014;153(1):61-84 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9(1):67 J. Biol. Chem. 2012;287(43):35873-86 J Ethnopharmacol 2012;139(3):858-62 Protein Expr. Purif. 2012;82(1):97-105 J Ethnopharmacol 2011;135(2):501-9 J Ethnopharmacol 2009;123(3):369-77 C. R. Biol. 2009;332(4):371-7 J Ethnobiol Ethnomed 2008;4:26 Molecules 2008;13(3):581-94 J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 FASEB J. 2006;20(8):1194-6 Toxicol. Appl. Pharmacol. 2006;211(3):177-87 Oecologia 2005;144(3):337-52 J Ethnopharmacol 2004;93(1):43-9 Bioresour. Technol. 2003;86(2):203-5 Fitoterapia 2003;74(1-2):122-6 Bioresour. Technol. 2002;82(3):303-4
ONAGRACEAE	*Ludwigia octovalvis* **(l)**					Age (Dordr) 2014;36(2):689-703 Bull Environ Contam Toxicol 2013;90(6):714-9 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:701261 J Ethnopharmacol 2012;142(3):663-8 Food Chem. Toxicol. 2010;48(2):716-21 J Asian Nat Prod Res 2007 Jan-Feb;9(1):67-72 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2005;30(24):1923-6 J. Nat. Prod. 2004;67(1):91-3 J. Environ. Qual. 2002 Mar-Apr;31(2):690-6 Phytomedicine 1996;3(3):263-9 J Ethnopharmacol 1989;27(3):285-95 J Ethnopharmacol 1987 Jan-Feb;19(1):103-10 Planta 1976;128(3):195-9

OXALIDACEAE	*Biophytum petersianu* **(l)**				Infertility	Carbohydr Polym 2014;101:457-63 Scand. J. Immunol. 2013;77(5):372-88 Phytochemistry 2011;72(17):2139-47 J. Sci. Food Agric. 2010;90(3):456-61 Glycobiology 2008;18(12):1074-84 J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2006;100(4-5):202-8 Biomacromolecules 2006;7(1):48-53
PAPILIONACEAE	*Moghania faginea* **(l)**					Planta Med. 1990;56(4):410-2
PEDALIACEAE	*Ceratotheca sesamoides* **(l)**				Soap	Ecol Food Nutr 2012;51(1):22-39 Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(2):99-105 J Ethnopharmacol 2008;116(1):43-8
POACEAE	*Acroceras zizanoides* **(w)**					Braz. J. Microbiol. 2012;43(4):1347-54 J Environ Biol 2013;34(1):17-22 Chem Biol Drug Des 2013;82(5):587-94 Med. Vet. Entomol. 2011;25(3):302-10 Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008;71(3):671-6 Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008;69(2):306-11 Chemosphere 2005;61(10):1451-7
	Andropogon pseudapricus **(l)**					Trop Anim Health Prod 2014;46(5):733-7 Oecologia 2014;175(1):293-303 J Vis Exp 2014; J Ethnopharmacol 2014;152(1):78-90 Mol. Ecol. 2014;23(6):1571-83 Chemosphere 2013;93(11):2894-900 Am. J. Bot. 2013;100(10):1957-68 Neotrop. Entomol. 2013;42(3):240-5 Can. J. Microbiol. 2013;59(7):494-502 PLoS ONE 2013;8(5):e59144 Ecology 2013;94(1):62-71 Int J Phytoremediation 2013;15(1):5-23 Mol. Ecol. 2013;22(9):2573-87 New Phytol. 2013;198(1):203-13 J. Chem. Ecol. 2013;39(2):312-22 Oecologia 2013;172(4):933-6 FEMS Microbiol. Ecol. 2013;83(3):596-606 J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2012;47(14):2219-29 Oecologia 2013;171(2):571-81 J. Dairy Sci. 2012;95(10):6057-71
	Aristida kerstingii **(l)**					
	Brachiaria xantholeuca **(w)**				Lactogogue	J. Med. Entomol. 2006;43(5):789-94
	Digitaria horizontalis **(l)**				Antifertility	Mol. Plant Pathol. 2005;6(6):605-13

	Hackelochloa granularis **(l)**					J. Food Sci. 2014;79(2):C155-62 Tsitol. Genet. 2013 Mar-Apr;47(2):40-55 J. Comp. Neurol. 2013;521(4):949-75 Zookeys 2012; J. Morphol. 2012;273(1):40-8 J. Morphol. 2011;272(4):419-41 J Biophotonics 2009;2(5):288-91 Sci. Total Environ. 2009;407(6):1892-900 Mutat. Res. 2009;673(1):67-73 Dose Response 2008;6(4):383-96 J. Comp. Neurol. 2009;512(5):628-50 J. Comp. Neurol. 2008;509(1):1-22 Environ. Mol. Mutagen. 2008;49(5):351-9 Folia Histochem. Cytobiol. 2008;46(1):5-9 Brain Res. Bull. 2008;75(1):94-100 Dev. Biol. 2008;313(1):167-80 Anat Histol Embryol 2008;37(3):161-5 Chem. Biol. Interact. 2007;168(2):106-16 Folia Parasitol. 2007;54(1):1-12 J. Comp. Neurol. 2007;502(5):714-35
	Leersia hexandra **(w)**				Cyanogenetic	Environ Technol 2014 Jan-Feb;35(1-4):187-94 C. R. Biol. 2013;336(7):354-63 Braz J Biol 2012;72(3):519-31 Int J Phytoremediation 2012;14(10):966-77 ScientificWorldJournal 2012;2012:586831 Genet. Mol. Res. 2012;11(1):30-41 J. Hazard. Mater. 2011;188(1-3):85-91 J. Hazard. Mater. 2010;182(1-3):598-602 J Colloid Interface Sci 2009;333(1):71-7 Bull Environ Contam Toxicol 2009;82(3):358-62 Chemosphere 2007;67(6):1138-43 Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 2006;37(2):279-82 Genetics 2005;170(2):613-30 Environ. Pollut. 2004;132(1):29-40 Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 1994;25(4):760-5 Biochem. Genet. 1991;29(3-4):115-23
	Panicum laetum **(l)**					
	Paspalum scrobiculatum **(w)**			Econ. Bot. 1983 37. 159-163. J. Agric. Trop. Bot. Appl. [JATBA] 1959 6. 680-684.	Alterative, Antidote (Scorpion), Carbuncle, Diabetes, Intoxication, Narcotic, **Ophthalmia**, Parturition, Poison, Sore	J Ethnopharmacol 2010;127(2):325-8 Indian J. Exp. Biol. 2005;43(3):254-8 J Ethnopharmacol 2003;87(2-3):211-4 J. Nutr. Biochem. 2002;13(9):517 Plant Foods Hum Nutr 1997;50(4):359-73 Plant Cell Rep. 1991;10(6-7):362-5 Plant Foods Hum Nutr 1989;39(4):349-57 Plant Foods Hum Nutr 1989;39(2):201-8 Plant Cell Rep. 1989;8(5):296-9 Mycopathologia 1985;89(3):177-80 Can. J. Microbiol. 1984;30(2):247-50 Acta Microbiol Acad Sci Hung 1975;22(3):253-62 Indian J Med Sci 1971;25(6):389-91

	Paspalum scrobiculatum **(w)**					Indian J. Physiol. Pharmacol. 1969;13(3):185-8 Indian Vet. J. 1967;44(9):786-93 Psychopharmacologia 1964;5:228-33 Br J Pharmacol Chemother 1962;18:7-18 Psychopharmacologia 1961;2:295-6 Nature 1959;183(4677):1735-6
	Schoenfeldia gracilis **(l)**					Aquat. Toxicol. 2014;154C:114-120 Int J Surg Case Rep 2014;5(7):403-407 Zootaxa 2014;3770:1-136 Zootaxa 2014;3802(4):477-514 Zootaxa 2014;3765(6):541-56 Zootaxa 2014;3765(2):134-42 Zootaxa 2014;3797(1):169-93 Zootaxa 2014;3797(1):78-102 Zootaxa 2014;3797(1):39-64 Zootaxa 2014;3761:1-156 Zootaxa 2014;3793(1):1-59 Zootaxa 2014;3789(1):1-72 Zootaxa 2014;3754(4):473-82 Zootaxa 2014;3753(5):440-52 Plast. Reconstr. Surg. 2014;133(6):842e-51e Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014; Aquat. Toxicol. 2014;154C:58-70 Mitochondrial DNA 2014; Cir Esp 2014;92S1:48-57 Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 2014;
	Setaria pallidifusca **(l)**					Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 2014; J. Exp. Bot. 2014; Gene 2014; Arch. Virol. 2014; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014;111(17):6178-83 Pest Manag. Sci. 2014; PLoS ONE 2014;9(4):e95109 Acta Trop. 2014;136:1-9 Plant Physiol. 2014;165(1):62-75 Am. J. Bot. 2014;101(3):539-57 Exp. Parasitol. 2014;141:12-20 Commun Integr Biol 2013;6(6):e27496 Wien. Klin. Wochenschr. 2014;126(Supplement 1):37-41 PLoS ONE 2014;9(2):e85050 PLoS ONE 2014;9(1):e87713 J Drug Target 2014;22(5):395-407 BMC Genomics 2014;15:78 PLoS ONE 2014;9(1):e86852 Asian Pac J Trop Med 2014;7(2):85-92 Biofizika 2013 Jul-Aug;58(4):697-703

POLYGALACEAE	*Securidaca longepedunculata* **(r)**			J. Ethnopharmacol. 1999 65. 157-164. Pharm. Biol. 1999 37. 134-137.	Poison	J. Nat. Prod. 2014; J Parasitol Res 2014;2014:434506 Parasit Vectors 2013;6:337 Rev Bras Parasitol Vet 2013 Jan-Mar;22(1):119-23 Bioorg. Med. Chem. 2013;21(24):7663-8 Asian Pac J Trop Med 2013;6(11):841-6 CNS Drugs 2013;27(3):207-19 Phytother Res 2012;26(12):1920-6 Pharm Biol 2011;49(12):1286-97 J Ethnopharmacol 2011;137(1):114-20 C. R. Biol. 2010;333(9):663-9 J Ethnopharmacol 2010;130(1):151-7 J Ethnopharmacol 2010;130(2):191-5 J Med Food 2010;13(2):444-51 Hum Exp Toxicol 2010;29(8):679-88 Phytother Res 2010;24(6):945-7 Phytochemistry 2010;71(1):90-4 J. Agric. Food Chem. 2009;57(19):8860-7 Hum Exp Toxicol 2008;27(11):859-66 J Ethnopharmacol 2008;119(2):225-31
RHAMNACEAE	*Ziziphus mauritiana* **(b)**			J. Agric. Sci. 1995 65. 363-367. J. Agric. Sci. 1989 59. 269-270. Ann. Arid Zone 1989 28. 123-132. Ann. Arid Zone 1989 28. 133-135. Ann. Arid Zone 1987 26. 119-123. Ann. Arid Zone 1986 25. 294-299. Ann. Arid Zone 1986 25. 214-221. Ann. Arid Zone 1985 24. 175-177.	Anodyne, Antidote, Blennorrhagia, Chest, Contraceptive, Cough, Diaphoretic, Diarrhea, Dysentery, Expectorant, Flu, Gingivitis Gonorrhea, Nausea, Pregnancy Refrigerant, Rheumatism Sedative, Soporific, Sweetener, Tonic, Typhoid, Wound	J Food Sci Technol 2014;51(2):329-34 Physiol Mol Biol Plants 2013;19(4):537-45 Food Chem 2014;150:448-56 Int. J. Food Microbiol. 2013;166(3):426-32 Nat. Prod. Res. 2013;27(22):2154-6 Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:835854 J Chromatogr A 2013;1301:147-55 J Ethnopharmacol 2013;148(2):528-36 J. Sci. Food Agric. 2013; Zhong Yao Cai 2012;35(11):1758-62 Food Chem 2013;139(1-4):496-502 Food Chem 2013;138(1):168-72 J. Sci. Food Agric. 2013;93(8):1940-4 Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012;22(20):6377-80 Am. J. Bot. 2012;99(5):e199-202 Phytochemistry 2011; Int J Food Sci Nutr 2011;62(3):276-9 Evid Based Complement Alternat Med 2011;2011 Pharm Biol 2010;48(6):604-10 Sex. Plant Reprod. 2009;22(2):73-85
RHIZOPHORACEAE	*Carallia brachiata* **(l)**				Sapraemia, Itch, Sapraemia, Skin Sore, Stomatitis, Tea, Throat	Indian J Pharm Sci 2009;71(5):576-8 Phytother Res 2006;20(6):458-61 Fitoterapia 2004;75(7-8):785-8
ROSACEAE	*Maranthes polyandra* **(l)**					
RUBIACEAE	*Canthium dicoccum* **(l)**				Diarrhea	Fitoterapia 2001;72(3):201-5
	Canthium multiflorum	fever	Organ: leaf Administration			Fitoterapia 2013;91:199-204 Pak. J. Biol. Sci. 2009;12(12):919-23

	(l)		mode: oral Traditional medecines: Bobo medicine			Nat. Prod. Res. 2009;23(12):1108-11 Planta Med. 2008;74(5):560-2
	Coutarea latiflora **(b)**			Pl. Med. 1990 56. 63-65. J. Nat. Prod. 1984 47. 172-174.	Bilious, Malaria, Pimple	J Med Food 2009;12(6):1398-402 Am. J. Med. 2003;115(8):677 Planta Med. 1990;56(1):63-5 Ann Pharm Fr 1960;18:205-19 Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges 1955;288(11-12):595-608 Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges 1955;288(11-12):535-44
	Crossopteryx febrifuga **(l)**			Phytochemistry 1990 29. 2629-2635.	Enema, Tonic	J Ethnopharmacol 2013;150(3):1145-53 Pak. J. Biol. Sci. 2011;14(3):149-69 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(3):300-6 Int. J. Biol. Macromol. 2009;44(3):236-9 J Ethnopharmacol 2007;114(1):44-53 J Ethnopharmacol 2006;104(1-2):132-7 J Ethnopharmacol 2004;93(2-3):167-71 Tree Physiol. 2004;24(2):205-16 J Ethnopharmacol 2003;86(2-3):143-7 Phytomedicine 2000;7(1):31-8 J. Pharm. Pharmacol. 1999;51(11):1299-303 Planta Med. 1988;54(3):266-7
	Feretia apodenthera **(b)**			Pl. Med. 1979 37. 316-324.		J. Nat. Prod. 2013;76(1):29-35 Phytother Res 2002;16(7):646-9 Parasitol. Res. 2002;88(2):165-71 Rev. Palaeobot. Palynol. 2000;108(3-4):151-174 Ann Pharm Fr 1981;39(2):111-7
	Gardenia sokotensis **(l)**					J Ethnopharmacol 2013;148(3):763-9 J Ethnopharmacol 2010;130(1):143-50
	Haldina cordifolia **(l)**				Antiseptic, Astringent, Bilious Blindness (Veterinary), Carbuncle, Cholera, Colic, Diarrhea, Dysentery, Fever, Insecticide, Night-Blindness, Rinderpest	Syst. Biol. 2004;53(2):177-92
	Macrosphyra longistyla **(l)**					Chem. Biodivers. 2011;8(3):494-502
	Randia dasycarpa **(l)**					
	Wendlandia glabrata **(l)**					
RUTACEAE	*Casimiroa edulis* **(l)**			J. Ethnopharmacol. 1999 68. 275-282. J. Ethnopharmacol. 1995 47. 01-8. Pl. Med. 1991 57. 217-220. Bol. Soc. Bot. Mex. 1991 51. 53-65. J. Nat. Prod. 1985 48. 146.	Analgesic, Cancer, Convulsion, Diarrhea, Fever, Hypnotic,, Nervine, Poison, Rheumatism, Sedative, Soporific, Sore, Suppurative, Ulcer, Vermifuge, Vulnerary	Phytomedicine 2014;21(5):586-94 CNS Drugs 2013;27(3):207-19 Phytother Res 2012;26(3):452-7 J. Econ. Entomol. 2011;104(4):1204-11 J Ethnopharmacol 2011;137(1):934-6 Nat. Prod. Res. 2011;25(11):1067-73 J Ethnopharmacol 2011;134(3):637-43

						Nat Prod Commun 2009;4(3):425-6 J. Med. Chem. 2009;52(7):1873-84 Anticancer Res. 2008 Nov-Dec;28(6A):3705-9 Pak J Pharm Sci 2008;21(1):1-6 Nutr Cancer 2007;57(1):28-37 J. Med. Chem. 2007;50(2):350-5 J. Econ. Entomol. 2006;99(6):1994-2001 J Ethnopharmacol 2005;97(2):191-7 J Ethnopharmacol 2004;95(2-3):163-7 J Ethnopharmacol 2004;93(1):93-8 Anticancer Res. 2001 May-Jun;21(3B):1763-70 J Ethnopharmacol 1999;68(1-3):275-82 J Ethnopharmacol 1999;64(1):35-44
	Evodia lepta **(l)**				Alexiteric, Anodyne, Arthritis, Chickenpox, Emmenagogue, Febrifuge, Fever, Flu, Hepatitis, Itch, Meningitis, Piles, Rheumatism, Sore (Throat), Tonic, Trauma	Fitoterapia 2014;92:270-3 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2013;38(8):1193-7 J Ethnopharmacol 2013;148(3):999-1007 Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 2005;16(9):1786-90 Yao Xue Xue Bao 1997;32(9):682-4 J Asian Nat Prod Res 1999;1(4):337-41 J. Nat. Prod. 1998;61(3):390-1
	Ruta graveolens **(l-r)**			Pl.. J. Exp. Pl. Biol. 2001 161. (1): 189-199. Canad. J. Bot. 2000 78. (10): 1326-1335. Phytother. Res. 1997 11. 203-206. Herba Pol. 1997 43. 12-18. Herba Pol. 1997 43. 334-336. Delpinoa 1995 37-38. 63-72. Fitoterapia 1994 65. 301-303. J. Ethnopharmacol. 1991 34. 49-59. Pl. Med. 1991 57. 59-61. Pl. Med. 1991 57. 82-83. Pl. Med. 1989 55. 176-178. Fitoterapia 1988 59. 83-88. Pl. Med. 1985 517-519. Pl. Med. 1984 50. 508-512. Fitoterapia 1984 55. 67-71. Fitoterapia 1981 52. 93-95. Pl. Med. 1979 36. 255-6. Pl. Med. 1975 27. 264-271.	Acaricide, Anaphrodisiac, Convulsion, Cough, Earache Fever, Hysteria, Itch, Abortifacient, Ache(Ear), Ache (Head), Ache (Tooth), Amenorrhea, Anaphrodisiac, Antidote, Antifertility, Apertif, Arthritis, Bactericide, Bite (Bug), Bite (Snake), Cancer, Carminative, Cold, Colic, Convulsion, Detersive, Digestive Diuretic, Dyspepsia, Emmenagogue, Epilepsy, Excrescence, Fertility, Fever, Hematuria, Hemostat, Hysteria, Insecticide, Malaria, Medicine, Narcotic, Nervine, Neuralgia, Poison, Poultice, Puerperium, Resolvent, Revulsive, Rheumatism, Sedative, Spasm, Spermicide, Spice, Stimulant, Uterotonic, Vermifuge, Whitlow	Orphanet J Rare Dis 2014;9(1):72 Sci. Int Aquat. Toxicol. 2014;154C:97-106 Int. J. Food Microbiol. 2014;182-183:9-17 J. Appl. Microbiol. 2014; J. Med. Entomol. 2013;50(6):1267-74 Clin. Rheumatol. 2014; Nat Commun 2014;5:3939 Leuk. Res. 2014; Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 2014;89(4):042308 Clin. Rheumatol. 2014; Soft Matter 2014; Acta Trop. 2014;136:129-36 Prev. Vet. Med. 2014; Curr. Microbiol. 2014; Pol. Merkur. Lekarski 2014;36(213):155-9 Persoonia 2013;31:188-296 Glob Adv Health Med 2014;3(1):36-53 Int. J. Cardiol. 2014;174(1):193-4 Vet. Microbiol. 2014;171(1-2):189-97 Acta Trop. 2014;136:14-8
	Talauma mexicana **(l)**				Astringent, Atheromasia, Epilepsy, Fever, Gout, Heart, Malaria, Paralysis, Spasm, Sterility, Tonic	Asian Pac J Trop Med 2014;7(3):179-83 Nat Prod Commun 2013;8(1):135-8 Pharm Biol 2010;48(7):732-9 Gac Med Mex 2000 Sep-Oct;136(5):511-8

	Zanthoxylum zanthoxyloides **(r)**			J. Herbs Spices Med. Pl. 1998 6. 19-27. Pl. Med. 1982 44. 54-56. Pl. Med. 1982 44. 54-56.		Evid Based Complement Alternat Med 2014;2014:751291 J Ethnopharmacol 2014;151(3):1100-8 Chem Cent J 2013;7:125 Nat. Prod. Res. 2013;27(21):1994-8 J Ethnopharmacol 2013;148(1):74-80 Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):15-21 Parasitol. Res. 2012;110(4):1427-33 Vet. Parasitol. 2011;180(3-4):292-7 Parasitol. Res. 2010;106(2):335-40 Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2009;103(7):698-702 Phytomedicine 2009;16(2-3):125-9 J Ethnopharmacol 2007;110(1):99-104 Planta Med. 2006;72(8):746-50 Planta Med. 2005;71(6):489-94 J. Helminthol. 2005;79(1):29-33 Res. Vet. Sci. 2005;78(2):155-60 Phytochemistry 2004;65(8):1145-51 Afr Health Sci 2003;3(3):124-6 Planta Med. 2003;69(4):316-20 J Pharm Biomed Anal 1985;3(5):447-51
SAPINDACEAE	*Allophylus africanus* **(l)**				Ache (Head), Rheumatism	Chin J Nat Med 2013;11(4):371-6
	Dimocarpus longan **(l)**				Antidote, Cancer (Uterus), Intellect, Perspiration, Spleen, Vermifuge	Biol. Pharm. Bull. 2014;37(6):954-60 Int. J. Biol. Macromol. 2014;67:323-9 Int J Mol Sci 2014;15(3):5140-62 Genet. Mol. Res. 2014;13(1):1447-55 Mol. Biol. Rep. 2014; Int J Food Sci Nutr 2014; Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 2013;24(8):2235-40 Food Sci Technol Int 2013; Springerplus 2013;2:501 BMC Genomics 2013;14:561 Plant Physiol. Biochem. 2013;71:184-90 Gene 2013;529(1):37-44 PLoS ONE 2013;8(4):e60337 Food Chem 2013;139(1-4):938-43 Plant Physiol. Biochem. 2013;66:20-5 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:709483 J. Agric. Food Chem. 2012;60(36):9188-94 Molecules 2012;17(8):9421-5 Phytochemistry 2012;77:226-37 Fitoterapia 2012;83(3):545-53
	Paullinia pinnata **(l)**				Abdomen, Abscess, Ache (Stomach), Ache (Tooth), Amaurosis, Anodyne, Antiabortifacient, Arrow, Asthenia, Bite (Snake), Bruise, Chest, Chewstick, Cicatrizant, Colic, Collyrium, Cough, Dentifrice, Dysentery, Dysmenorrhea, Emetic, Enteritis,	Phytochemistry 2014; Phytother Res 2014; Lipids 2014;49(4):335-45 Einstein (Sao Paulo) 2013;11(4):435-8 Rev. Biol. Trop. 2013;61 Suppl 1:121-30 Food Chem 2014;152:612-8 J Diet Suppl 2013;10(4):325-34 Nutrients 2013;5(9):3589-604 J Ethnopharmacol 2013;150(1):14-31

					Fever, Fracture, Gastritis,,, Gonorrhea, Hemostat, Hepatitis, Homicide, Jaundice, Leprosy Liver, Lumbago, Lung, Medicine, Mental, Narcotic, **Ophthalmia** Piscicide, Poison, Poison (Arrow) Preventitive (Miscarriage), Rheumatism, Rickets, Sore, Sterility, Sterility (Female), Urogenital, Vesicant, Wound, Yellow Fever	Afr J Med Med Sci 2013;42(1):81-90 J Ethnopharmacol 2013;149(2):583-9 J Negat Results Biomed 2013;12:9 Nat. Prod. Res. 2013;27(22):2084-90 Nutr Res Rev 2013;26(1):49-70 Food Chem 2012;134(4):1804-12 Toxicol In Vitro 2013;27(4):1220-5 Lipids Health Dis 2013;12:12 Pediatr Rev 2013;34(2):55-62 Evid Based Complement Alternat Med 2012;2012:428560 PLoS ONE 2012;7(12):e52340
SAPOTACEAE	*Donella lanceolata* **(l)**					
	Malacantha alnifolia **(l)**					J Med Food 2014;17(3):384-92 Bioinformation 2013;9(19):978-82 Molecules 2013;18(10):12571-86 Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:614501 J Anim Ecol 2014;83(1):223-33 Parasitol. Res. 2013;112(3):1205-19 Molecules 2012;17(8):8968-81 J Ethnopharmacol 2012;143(2):481-7 J. Agric. Food Chem. 2012;60(4):1020-7 Parasitol. Res. 2012;110(6):2263-70 Parasitol. Res. 2012;110(2):571-81 J. Agric. Food Chem. 2009;57(12):5401-6 J Microw Power Electromagn Energy 2008;42(4):4-12 Madag Conserv Dev 2009;4(2):128-131 Molecules 2008;13(11):2823-36 J. Agric. Food Chem. 2008;56(21):9933-40 J. Agric. Food Chem. 2008;56(3):627-9 J. Agric. Food Chem. 2008;56(3):654-60 Can. J. Physiol. Pharmacol. 2007;85(11):1139-52 J. Agric. Food Chem. 2007;55(25):10414-24
	Manilkara multinervis **(b)**					
	Pachystela pobeguiniana **(l)**					
	Vittelaria paradoxa **(l)**			Bangor: School of Agricultural and Forest Sciences, University of Wales 1996		
SELAGINELLACEAE	*Selaginella lepidophylla* **(ap)**				Bilious, Calculus, Cystitis, Diuretic, Dyspepsia, Kidney, Liver	Plant Physiol. Biochem. 2014;80C:285-290 J AOAC Int 2013 Jul-Aug;96(4):712-6 Am. J. Bot. 2013;100(8):1672-82 Urolithiasis 2013;41(3):205-15 Mol Plant 2013;6(2):369-85 Plant J. 2012; J Med Food 2011;14(10):1280-3 J Med Food 2009;12(6):1398-402

						J. Agric. Food Chem. 2008;56(16):6994-7000 Ann. Bot. 2007;99(6):75-93 Ann. Bot. 2007;99(1):75-93 Biochimie 2006;88(10):1505-10 Integr. Comp. Biol. 2005;45(5):751-8 Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004;313(2):314-9 Biochem. J. 2002;366(Pt 1):63-71 Plant Physiol. 1999;119(4):1473-82 Plant Physiol. 1986;82(1):61-4 J. Ultrastruct. Res. 1982;78(3):269-82 Plant Physiol. 1982;69(1):135-8 Plant Physiol. 1981;68(6):1222-5
SIMAROUBACEAE	*Brucea javanica* *(ft)*			Pl. Med. 1991 57. 62-64. Pl. Med. 1990 56. 649. Phytochemistry 1990 29. 2720-2722. Pl. Med. 1990 56. 632. Phytochemistry 1990 29. 141-143. J. Nat. Prod. 1987 50. 41-48. Pl. Med. 1986 108-111. J. Nat. Prod. 1984 47. 550-551. Pl. Med. 1981 41. 209-220.	Anodyne, Bite(Centipede), Boil, Colic, Cough, Diarrhea, Dysentery, Fever, Labor, Mange, Rheumatism, Ringworm, Scurf, Splenomegaly, Amebiasis, Anticoagulant, Cancer (Esophagus), Cathartic, Cholagogueue, Condyloma, Corn Diarrhea, Dysentery, Emetic, Insecticide, Malaria, Nematicide, Piles, Poison, Pulicide Sore, Tumor (Lung), Vermifuge, Wart, Wen	ScientificWorldJournal 2014;2014:786130 Eur. J. Pharmacol. 2014;728:141-50 Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2013;33(11):1545-51 Sci Rep 2014;4:3719 BMC Complement Altern Med 2013;13:342 Int J Nanomedicine 2013;8:4045-52 Phytother Res 2013; Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013;14(8):4791-4 Anticancer Agents Med Chem 2014;14(3):440-58 Arch. Oral Biol. 2013;58(10):1335-42 Nat. Prod. Res. 2013;27(21):2016-21 Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:397268 Asian Pac. J. Cancer Prev. 2013;14(3):2009-12 Arch. Pharm. Res. 2013;36(8):993-1003 Lett. Appl. Microbiol. 2013;57(2):129-36 J Evid Based Med 2012;5(4):216-25 J Ethnopharmacol 2013;147(2):442-6 Drug Dev Ind Pharm 2014;40(2):266-77 Int J Nanomedicine 2013;8:85-92 Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2012;37(13):2022-9
	Castela tortuosa **(t)**				Amebiasis, Diarrhea, Dysentery, Fever, Stomachic	Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008;1149:158-60
	Quassia amara **(s)**			J. Ethnopharmacol. 1999 67. 321-325. Int. J. Pharmacog. 1996 34. 349-354. Ceiba 1995 36. (1): 140. Pl. Med. 1995 61. 180-182. Pl. Med. 1993 59. 259-262. Pl. Med. 1990 56. 216-217. Pl. Med. 1987 53. 289-290.	Astringent, Bite(Snake), Cancer, Carcinoma, Diarrhea, Digestive, Diuretic, Dysentery, Dyspepsia, Fever, Hyperglycemia, Insecticide, Laxative, Liver, Malaria, Medicine, Stimulant, Stomachic, Tonic, Vermicide, Vermifuge	J Ethnopharmacol 2013;148(3):895-900 Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:687197 J Drugs Dermatol 2013;12(3):312-5 ISRN Dermatol 2012;2012:460467 J Ethnopharmacol 2012;141(1):301-8 Exp. Parasitol. 2012;130(4):341-7 Afr J Tradit Complement Altern Med 2012;9(1):112-9 Chin J Integr Med 2011;17(12):933-6 Rev. Biol. Trop. 2011;59(1):487-99 Phytother Res 2011;25(12):1806-12 J Clin Pharmacol 2012;52(1):84-8 J Ethnopharmacol 2011;134(3):904-10 Exp. Cell Res. 2011;317(1):82-93 J. Nat. Prod. 2010;73(9):1553-8 Curr Drug Saf 2010;5(4):333-41 J. Agric. Food Chem. 2010;58(5):2807-11 Niger J Physiol Sci 2010;25(2):103-6 Niger J Physiol Sci 2010;25(2):95-102

						Exp. Parasitol. 2010;124(4):421-7 Mol. Cell. Biochem. 2010;336(1-2):127-35
	Quassia undulata **(l)**			J. Ethnopharmacol. 1999 67. 321-325.	Colic	Afr J Med Med Sci 2003;32(4):353-6 J Ethnopharmacol 1999;67(3):321-5
SMILACACEAE	*Smilax officinalis* **(r)**				Tumor	J Cosmet Sci 2013 Mar-Apr;64(2):145-58 Bioresour. Technol. 2010;101(12):4676-89 J Ethnopharmacol 2006;106(3):333-43 Vaccine 1997;15(9):1024-9 Phytochemistry 1996;43(2):465-9
SOLANACEAE	*Lycium barbarum(ft)*			Bot. Bull. Acad. Sin. (Taipei) 2000 41. (1): 11-14.	Ache(Back),Aphrodisiac, Debility, Diuretic, Fever, Hyperglycemia, Impotency, Laxative, Poison, Spasm, Vertigo	Int. J. Biol. Macromol. 2014;69C:73-78 J. Sci. Food Agric. 2014; PLoS ONE 2014;9(5):e97039 J. Agric. Food Chem. 2014; Food Chem 2014;159:137-42 J Ethnopharmacol 2014;154(1):249-58 Biotechnol. Appl. Biochem. 2014; Mol. Biol. Rep. 2014; Physiol Plant 2014;150(4):505-16 Food Funct 2014;5(5):1038-49 PLoS ONE 2014;9(3):e90780 Food Funct 2014;5(4):811-20 Mol Med Rep 2014;9(4):1237-41 J Ethnopharmacol 2014;153(1):151-9 Int. J. Biol. Macromol. 2014;65:441-5 Carbohydr Polym 2014;103:148-53 PLoS ONE 2014;9(2):e88076 Int. Immunopharmacol. 2014;19(1):132-41 Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:690808 Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 2013;33(10):1404-7
SONNERATIACEAE	*Duabanga sonneratioides* **(l)**					Phytochemistry 2012;76:78-82 Nat. Prod. Res. 2011;25(19):1857-64 J. Microbiol. Methods 2011;84(2):161-6 Am. J. Chin. Med. 2010;38(2):387-99 Am. J. Bot. 2004;91(7):1126-39
STERCULIACEAE	*Cola laurifolia* **(l)**					Med. Vet. Entomol. 2005;19(4):372-8
	Guazuma ulmifolia **(ft)**			Commonw. Forest. Rev. 1988 67. 187-190. Commonw. Forest. Rev. 1987 66. 317-324.	Antidote (Comocladia), Asthma, Astringent, Bronchitis, Chest, Depurative, Diaphoretic, Diarrhea, Dysentery, Elephantiasis, Emollient, Fertility (Veterinary), Fever, Hair, Kidney, Leprosy, Liver, Lung, Malaria, Medicine, Obesity, Pectoral, Refrigerant, Scurf, Skin, Stomach Stomachic, Styptic, Sudorific, Syphilis	Braz. J. Microbiol. 2012;43(4):1302-8 Rev. Biol. Trop. 2012;60(4):1613-9 Phytochemistry 2013;86:64-71 Plant Biol (Stuttg) 2013;15(1):152-7 Nat Prod Commun 2011;6(12):1925-8 Int J Anal Chem 2012;2012:508945 An. Acad. Bras. Cienc. 2011;83(2):695-703 Fungal Biol 2010 May-Jun;114(5-6):438-45 Indian J Pharm Sci 2009;71(4):406-12 Braz J Biol 2010;70(1):75-83 Braz J Biol 2008;68(4):781-93 J Ethnopharmacol 2008;118(2):252-6 J Ethnopharmacol 2008;117(1):58-68 J Ethnopharmacol 2007;114(2):153-60 Mol. Phylogenet. Evol. 2007;44(3):1141-54 Microbiology (Reading, Engl.) 2007;153(Pt 8):2613-20

						Anal. Chim. Acta 2007;587(1):132-6 Rev. Biol. Trop. 2005 Sep-Dec;53(3-4):387-414 Rev. Biol. Trop. 2005 Mar-Jun;53(1-2):29-48 Biol. Pharm. Bull. 2006;29(6):1092-5
	Helicteres hirsuta **(l)**					Phytother Res 2006;20(1):62-5
	Sterculia setigera **(b)**					Pak. J. Biol. Sci. 2008;11(1):139-41 Bioresour. Technol. 2003;86(2):203-5 J Ethnopharmacol 2002;79(2):279-82 Nature 1949;163(4135):177
	Waltheria indica **(w)**			Fitoterapia 1990 61. 371.	Abortifacient, Collyrium, Cough, Dentifrice, Diarrhea, Emollient, Enterorrhagia, Eruption, **Eye**, Fever, Giddiness, Hemoptysis Preventitive (Fever), Purgative, Skin, Soap, Sore, Sterility, Sudorific, Syphilis, Vertigo, Wound	Fundam Clin Pharmacol 2014;28(3):323-30 J Ethnopharmacol 2013;148(1):14-26 J Ethnopharmacol 2010;130(1):143-50 Neotrop. Entomol. 2006 Jul-Aug;35(4):435-9 Afr J Tradit Complement Altern Med 2006;4(1):17-22 Biol. Pharm. Bull. 2005;28(5):912-5
THEACEAE	*Eurya turfosa* **(l)**					Plant Biol (Stuttg) 2014; Phytother Res 2013; Evid Based Complement Alternat Med 2013;2013:131306 J. Nat. Prod. 2013;76(4):580-7 Fungal Biol 2013;117(3):191-201 Pharm Biol 2011;49(10):1046-51 Molecules 2010;15(12):8602-17 J Appl Toxicol 2010;30(7):666-73 J Asian Nat Prod Res 2009;11(9):817-23 Phytother Res 2010;24(6):840-5 Plant Physiol. Biochem. 2010;48(1):70-2 Mycobiology 2009;37(2):152-4 Environ. Entomol. 2008;37(5):1231-40 J. Pharm. Pharmacol. 2008;60(7):917-24 Environ. Entomol. 2007;36(6):1504-11 Tree Physiol. 2006;26(8):1025-33 Ying Yong Sheng Tai Xue Bao 2005;16(11):2019-24 Arch. Pharm. Res. 2005;28(11):1244-50 Am. J. Bot. 2005;92(12):2003-9 Arch. Pharm. Res. 2005;28(9):1047-52
TILIACEAE	*Grewia mollis* **(l)**				Fever, Laxative, Parturition, Wound	J Med Food 2012;15(1):83-8
	Triumfetta pentandra **(l)**					Acta. Biol. Hung. 1988;39(1):87-98
ULMACEAE	*Celtis integrifolia* **(l)**					Pak J Pharm Sci 2013;26(6):1151-6 Pak J Pharm Sci 2012;25(3):629-32 Indian J. Biochem. Biophys. 2010;47(1):53-5 Appl. Biochem. Biotechnol. 2010;160(6):1752-9
VERBENACEAE	*Lippia chevalieri* **(l)**			Phytochem. Anal. 2003 62. (2): 209-212.		J Ethnobiol Ethnomed 2013;9(1):67 Phytochemistry 2003;62(2):209-12
	Vitex glabrata ***(b)***			J. Nat. Prod. 1986 49. 365-366.	Astringent	Nat Prod Commun 2013;8(1):125-8 Pak J Pharm Sci 2012;25(1):131-4

						Nat. Prod. Res. 2012;26(12):1135-40 J. Nat. Prod. 2009;72(11):1954-9 Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2007;23(6):1033-6 J Ethnopharmacol 2005;101(1-3):84-9
VITACEAE	*Cissus quadrangularis* **(l)**			India Ethnobotany 1991 3. 21-25. Phytochemistry 1990 29. 336-337.	Alterative, Dyspepsia Woi, Poison (Arrow), Saddle-Sore (Veterinary), Sore (Veterinary) Stomachic	J Ayurveda Integr Med 2014;5(1):25-32 J Basic Clin Physiol Pharmacol 2014; Adv Pharmacol Sci 2014;2014:483051 Pestic Biochem Physiol 2014;109:18-33 Nanomedicine (Lond) 2014; Natl J Maxillofac Surg 2013;4(1):52-6 Phys Sportsmed 2013;41(3):29-35 Proc Inst Mech Eng H 2013;227(8):859-65 Ayu 2012;33(2):317-8 Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2013;106:190-6 J Ethnobiol Ethnomed 2013;9:8 Indian J Pharm Sci 2012;74(2):183-7 Food Funct 2013;4(2):338-46 Trop Anim Health Prod 2013;45(2):525-32 Ayu 2012;33(1):110-3 Phytother Res 2013;27(8):1107-14 J Ethnopharmacol 2012;143(2):664-72 J Osteoporos 2012;2012:101206 Exp. Parasitol. 2012;132(2):156-65 Indian J Pharmacol 2012;44(3):345-50
XANTHOPHYLLACEAE	*Xanthophyllum annamense* **(l)**					
ZYGOPHYLLACEAE	*Balanites aegyptiaca* **(b)**			Ethnopharmacologia 2003 30. 30-37. J. Ethnopharmacol. 2000 71. 247-252. Hamdard Med. 2000 43. 24-29. Phytother. Res. 1999 13. 439-441. Journal of Food Composition and Analysis 1998 11. 221-230. Commonw. Forest. Rev. 1992 71. 52-56. Vet. Hum. Toxicol. 1992 34. 224-226. School of Agricultural and Forest Sciences, University of Wales, bangor, 1991 Bangor: School of Agricultural and Forest Sciences, University of Wales, 1991 Hamdard Med. 1991 34. 53-56. Pl. Med. 1981 43. 92-93. Econ. Bot. 1972 26. 169-173. Pl. Med. 1971 20. 124-130. Pl. Med. 1971 20. 193-198. Oleagineux 1965 20. 603-608. J. Agric. Trop. Bot. Appl. [JATBA] 1955 2. 40-49. Bull. Imp. Inst. 1908 6. 364-366.	Abortifacient,Antidote (Arrow poison), Aperient, Circumcision, Cold, Fever, Fumigant, Herpes zoster, Liver, Malaria, Malignancy, Piscicide, Purgative, Sleeping sickness, Soap, Sweetener, Syphilis, Unguent, Vermifuge, Wound	Asian Pac J Trop Biomed 2013;3(8):657-62; discussion 661 J. Sci. Food Agric. 2013; Chem. Phys. Lipids 2013 May-Jun;170-171:1-7 Pharm Biol 2012;50(10):1326-9 Pharmacogn Rev 2011;5(9):55-62 Asian Pac J Trop Med 2011;4(10):808-13 Vet. Parasitol. 2012;183(3-4):386-92 J Parasitol Res 2011;2011:368692 Int. J. Biol. Macromol. 2011;49(3):397-401 Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 2011;10:21 J Ethnopharmacol 2011;135(3):725-9 J. Vector Ecol. 2011;36 Suppl 1:S23-31 Nat. Prod. Res. 2011;25(2):93-9 Pak. J. Biol. Sci. 2010;13(8):362-8 Parasitol. Res. 2010;107(1):17-25 J. Hazard. Mater. 2010;178(1-3):725-8 Pak. J. Biol. Sci. 2009;12(14):1004-11 J Ethnopharmacol 2010;127(2):495-501 Bioresour. Technol. 2009;100(3):1221-6 J Ethnopharmacol 2008;119(1):58-66

Table supplémentaire 1: Données ethnopharmacologiques et bibliographiques de l'ensemble des 202 plantes utilisées lors du criblage à haut contenu. ap, gomme; b, partie aérienne; bch, branche; fl, fleur; ft, fruit; g, non déterminé; l, feuille; r, racine; s, tige; t, tronc ; w, écorce. Les espèces sélectionnées par le criblage et les deux espèces de la preuve de principe sont surlignées en gris foncé. Les termes « ophthamia » et « eye » sont indiqués en rouge

Abstract

More than 57 genes are responsible for retinitis pigmentosa (RP), the most common inherited retinal degeneration, are selectively expressed by rods. In most mammals, including humans, rods represent 95% of photoreceptors whereas the remaining 5% are cones. Rods have a minor role in vision which depends mainly on cone photoreceptors. It is unknown why cones degenerate after rods in a second step in this incurable blinding disease.

The gene *NXNL1* encodes for a cone survival factor, RdCVF and also by alternative splicing, for a thioredoxin protein, RdCVFL. Those proteins are selectively expressed by photoreceptors. RdCVF is secreted by rods and protects the cones and their function by activating a receptor on their surface.

A mutation causing a rod death in RP results in a significant reduction in retinal concentration of RdCVF. Consequently, cones are no longer protected and therefore degenerate. Administration of RdCVF could invert cone degeneration by maintaining central vision in patients suffering of RP, regardless of a causative gene.

RdCVF was identified by the technology of high content screening on primary chicken cone cultures. In order to identify secondary metabolites having the ability to promote cone survival, we test on the same system a collection of plants extracts used in traditional medicine. Our findings would serve to develop a second generation of therapeutic agents for the treatment of RP.

The screening of 800 extracts has led us to identify 30 plants having a possible protective activity on cones. We focused on secondary metabolites extracted from *Uvaria chamae* leaves, belonging to the Annonaceae family and demonstrated its strong promoting activity on cone survival. The bioguided fractionation of 5 kg of leaves extracted from *Uvaria chamae* allowed, after six purification steps including four reverse phase chromatography rounds (RP-HPLC), the production of 140 micrograms. This fraction was shown to possess a high specific activity. Since the material amount is not sufficient to characterize actives molecules, we repeated the same purification process starting from 100 kg of *Uvaria chamae* leaves that were harvested specifically for this project during the rainy season in Burkina Faso.

The second fractionation was carried out by a quasi-industrial scale, given a proper amount of material that enabled us to study the activity on cone survival. After four successful consecutive purification steps, we are able to purify and to characterize the active molecules which will be then validated in a mouse model of RP before initiating preclinical studies.

Using the most active fractions, we have shown that the *Uvaria chamae* extract induced cone survival by stimulating aerobic glycolysis, also known as the Warburg effect. This has also been validated for the second species of the same family *Annona senegalensis*, issued from the screening.
This effect does not depend on the RdCVF surface receptor that activates the Warburg effect by stimulation of glucose uptake through one of its transporters, GLUT1.
These molecules are not agonists of RdCVF and do not interact with the same receptor of RdCVF. It seems that the glucose uptake and the Warburg effect, stimulated by the *Uvaria chamae* molecules, depend on an intracellular target.
Using transcriptomic data, we were able to highlight specific expression by photoreceptors of an enzyme belonging to the family of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2, PFKFB2, which produces an allosteric glycolysis activator. RNA interference studies will enable to validate this target and to identify common points between the trophic factor RdCVF and the secondary metabolite extracts from *Uvaria chamae* leaves.

Key words: *Uvaria chamae*, retinitis pigmentosa (RP), RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor), high content screening, Traditional medicine, bioguided fractionation, Annonaceae, primary chicken cone cultures, Warburg effect, cell survival, quasi-industrial scale, RP-HPLC.