



Faculté des Sciences Exactes et Naturelles de Guadeloupe
Ecole doctorale pluridisciplinaire

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

Discipline : **chimie**

Spécialité : phytochimie-chimie organique biologique

Présentée par

Josianny JOSEPH-ANGELIQUE

**CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE CHIMIQUE ET
VALORISATION BIOLOGIQUE DE**

Nectandra membranacea (Swartz) Grisebach de Guadeloupe

Soutenue le 23 juillet 2015

COMPOSITION DU JURY

Pr André PICHETTE	Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences VEGétales (LASEVE) Université du Québec à Chicoutimi	Rapporteur
Pr Laila SALMEN ESPINDOLA DARVENNE	Laboratoire de Farmacognosia Universidade de Brasília	Rapporteur
Pr Jacqueline ABAUL	Université des Antilles et de la Guyane	Examinateur
Pr Joëlle LEVALOIS GRÜTZMACHER	Université des Antilles et de la Guyane	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'Unité Mixte de Recherche de la Qualité et Valorisation des produits végétaux tropicaux (UMR QUALITROP 1270) de l'Université des Antilles et de la Guyane, Pôle Guadeloupe, sous la direction de Madame Le Professeur Joëlle LEVALLOIS-GRÜTZMACHER. Je tiens à la remercier pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre ma formation en phytochimie.

Je tiens également à remercier Madame Sylvie BERCION, directrice du laboratoire QualiTrop et Maître de conférence-HDR en Chimie, pour ses conseils, son soutien et ses encouragements.

Je remercie également mes responsables de thèse, à l'origine du projet sur lequel est basé cette thèse, Madame Lyn UDINO et Madame Muriel SYLVESTRE, Maîtres de conférences en Chimie, pour leurs efforts, leurs conseils et leur positivité, tout au long de ces années de travail.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à Madame Le Professeur Jacqueline ABAUL, Directrice de l'Ecole Doctorale et Professeur en Chimie, pour ses encouragements et sa compréhension.

Je remercie Monsieur JOVIAL, de m'avoir permis de récolter sur son terrain, l'objet de mon étude, sans lui ce travail n'aurait pas pu être réalisé.

Mes remerciements vont également aux rapporteurs les Professeurs Laila SALMEN ESPINDOLA DARVENNE et André PICHETTE qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie également les personnes dont la collaboration a été essentielle pour plusieurs aspects de ce travail :

Les Professeurs André PICHETTE et Jean LEGAULT, de l'Université du Québec à Chicoutimi et Directeurs du Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE) de m'avoir accueillie et permis de réaliser sur leur site diverses analyses et tests biologiques sur mes échantillons.

Monsieur Le Professeur, Hanszork GRÜTZMACHER m'a accueillie dans son laboratoire à l'Ecole polytechnique fédérale de Zurich, ETH. Je remercie toute son équipe pour leur convivialité et leur gentillesse. J'y ai passé de très bons moments.

Monsieur Le Professeur Etienne HIRSCH, neurobiologiste, et Directeur de recherche au CNRS (Centre national de la recherche scientifique) et à l'INSERM (Institut National de La Santé et de la Recherche Médicale) qui a réalisé les tests neuroprotecteurs pour la maladie d'Alzheimer sur mes extraits.

Je suis aussi très reconnaissante envers Monsieur Serge LAVOIE pour avoir partagé avec moi ses connaissances et pour sa disponibilité.

Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans une équipe de collègues :

Une mention particulière pour Madame Francine LAVOIE-NAGAU qui m'a énormément soutenue, conseillée, aidée dans ce travail et merci pour sa bonne humeur au quotidien. Merci beaucoup Francine!

Je remercie tous mes collègues de bureau, particulièrement Grégory LEGRAVE pour m'avoir encouragée, pour sa disponibilité et pour m'avoir supportée durant cette thèse. Corine, Laurent, Axelle, Lisa et Sabin pour tout leur soutien, leurs conseils et leur bonne humeur.

Merci à ma famille de cœur, Madame Novelta MALINUR dit Tata, Monsieur Serge Malinur, à Denise, Marie-Line, Fulbert, Stacy, Shannie, Allan et Nicolas pour leur soutien et les bons moments passés ensemble. Un merci particulier pour Jocelyn et François pour m'avoir aidée lors de mes nombreuses récoltes, et pour leurs encouragements.

Je remercie également toute l'équipe de l'UFR Sciences Exactes et Naturelles. Je tiens à remercier aussi Rod DABRIOU, Harry MEPHON pour leur soutien ainsi que Rio, Constant, Véronique, Jean-Jacques, Daniel et tout le personnel du centre hospitalier du Carbet.

Enfin mes remerciements vont aussi à Roberto, Lulu, Julien, Jean-Claude et Norbert pour m'avoir soutenue moralement, encouragée à surmonter ces épreuves difficiles. Et également au Dr Carra pour avoir contribué à la présentation de ce travail.

A toute ma famille, mes parents, Alex BENGON dit Lailai et tous mes amis Didier, Christelle, Constance et Eve, merci.



Résumé



Contribution à la connaissance chimique et à la valorisation biologique de *Nectandra membranacea* (Swartz) Grisebach

Nectandra membranacea (Lauraceae) est une plante très commune aux Petites Antilles. Aucune utilisation traditionnelle de cette plante n'est connue mais le genre *Nectandra*, qui représente le deuxième plus important de la famille des Lauraceae avec 114 espèces reconnues, présente des propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et énergétiques (Le Quesne et al 1980). *Nectandra* a également démontré une activité antitumorale (Silva-Filho, 2004). Les nombreuses propriétés du genre et le peu de connaissance chimique sur cette espèce nous ont incités à réaliser une étude phytochimique et à évaluer le potentiel biologique des différentes parties de cette plante. L'analyse des lipides a été effectuée, et les principales classes de métabolites secondaires (terpènes, flavonoïdes, alcaloïdes) ont été recherchées dans les feuilles, les écorces et les fruits de *Nectandra membranacea*. Afin de suivre les variations de la composition chimique en fonction du cycle de vie du végétal, l'étude a été réalisée sur des échantillons (feuilles, écorces et fruits), récoltés à deux stades du cycle de la plante : la germination (stade A) et la fructification (stade B). *N. membranacea*, grâce à la présence de nombreuses familles chimiques, possède des activités biologiques intéressantes. Les huiles essentielles ont montré des activités anticancéreuses, anti-inflammatoires, antioxydantes et antiherpétiques. Les extraits polyphénoliques issus des différentes parties de la plante ont montré une très grande activité antioxydante (ORAC et DPPH) et in vitro (cellules saines) ainsi que des propriétés anti-inflammatoires notables. Les extraits d'alcaloïdes totaux issus des trois parties ont été évalués pour la maladie d'Alzheimer et ont révélé de très bons effets neuroprotecteurs, plus particulièrement pour les extraits de feuilles récoltées lors de la germination. Ce travail a permis d'élargir la connaissance des huiles essentielles de l'espèce (composition pour plusieurs parties et activité biologique). Des flavonoïdes ont été identifiés, mais la plante s'est révélée particulièrement riche en alcaloïdes (une quinzaine) de type isoquinoliques et indoliques. *N. membranacea* se révèle être une plante aux nombreuses propriétés, au regard de ses activités biologiques intéressantes. Des extraits pourraient être utilisés comme principes actifs dans des médicaments mais également en industrie cosmétique.

Mots clés : *Nectandra membranacea*, Lauraceae, étude phytochimique, activité biologique, cytotoxique, anti-inflammatoire, antioxydant, antiviral.

Abstract

Contribution to chemical knowledge and biological recovery of *Nectandra membranacea* (Swartz) Grisebach

Nectandra membranacea (Lauraceae) is a very common plant in the French West Indies. No traditional use of this plant is known, but the genus *Nectandra*, which represents the second most important of Lauraceae family with 114 recognized species, has got analgesic, anti-inflammatory and energizing activities (Le Quesne et al 1980). *Nectandra* was also identified as a potential antitumor agent (Silva-Filho, 2004). Many properties of the genus, and some chemical knowledge of this species, have prompted us to perform phytochemical and biological study of different parts of the plant. Lipids and the main classes of secondary metabolites (terpenes, flavonoids, alkaloids) were investigated in leaves, bark and fruits of *Nectandra membranacea*. To determine the monitoring changes in the chemical composition, according to the life cycle of the plant, the study was carried out on samples (leaves, bark and fruits) harvested at two stages of the cycle plant : germination (stage A) and fruit stage (stage B). *N. membranacea*, thanks to the presence of many chemical families, has interesting biological activities. Essential oils have shown anticancer, anti-inflammatory, antioxidant activities. They revealed antiviral activity on the herpes virus. The polyphenolic extracts from different parts of the plant showed a high antioxidant activity (ORAC and DPPH tests) and in vitro (healthy cells) and significant anti-inflammatory properties. The total alkaloids extracted from the three parts were evaluated for Alzheimer's disease and were found to have very good protective effects, especially the leaves' extracts collected during germination. This work has expanded knowledge of the essential oil of the species (composition of several parts and biological activity). Flavonoids have been identified, but the plant was shown to be particularly rich in alkaloids (fifteen were identified) of indolic and isoquinolic type. *N. membranacea* presents many properties. In view of its interesting biological activities, it could be used for many drugs but also in cosmetic area.

Keywords: *Nectandra membranacea*, Lauraceae, phytochemical study, biological activities, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, antiviral.

Liste des figures

FIGURE 1 : CARTE DE RÉPARTITION MONDIALE DES LAURACEAE SELON HEYWOOD [HEYWOOD, 1978].....	5
FIGURE 2 : SCHÉMA D'UNE FLEUR DE LAURACEAE	6
FIGURE 3 : BOIS DE ROSE, <i>ANIBA ROSAEODORA</i>	7
FIGURE 4 : ECORCES DE CANNELIER, <i>CINNAMOMUM ZEYLANICUM</i>	7
FIGURE 5 : FRUITS DE L'AVOCATIER, <i>PERSEA AMERICANA</i>	7
FIGURE 6 : FEUILLES DE LAURIER NOBLE, <i>LAURUS NOBILIS</i>	8
FIGURE 7: STRUCTURE DE LA PERSINE (1).....	8
FIGURE 8 : CARTE DE LA RÉPARTITION DES <i>NECTANDRA</i> DANS LE MONDE :	12
FIGURE 9 : <i>NECTANDRA DOMINICANA</i> (GUADELOUPE).....	13
FIGURE 10 : FLEUR DE <i>NECTANDRA LINEATA</i>	14
FIGURE 11 : COMPOSÉS RETROUVÉS DANS L'H.E DES FRUITS DE <i>N. UMBROSA</i>	17
FIGURE 12 : SESQUITERPÈNES DE <i>NECTANDRA</i>	19
FIGURE 13 : SESQUITERPÈNES ISOLÉS DES FEUILLES DE <i>N.AMAZONUM</i>	19
FIGURE 14 : SESQUITERPÈNES ISOLÉS CHEZ <i>N. AMAZONUM</i>	19
FIGURE 15 : STRUCTURE DE QUELQUES TRIGLYCÉRIDES [FERNANDA R. ET AL. 1999]	20
FIGURE 16 : STRUCTURE DE QUELQUES STÉROLS.....	21
FIGURE 17 : PHÉNYLPROPANOÏDES CHEZ <i>N. MEGAPOTAMICA</i>	22
FIGURE 18 : PHÉNYLPROPANOÏDES DE <i>N. GLABRESCENS</i>	23
FIGURE 19 : PHÉNYLPROPANOÏDES DE <i>N. POLITA</i>	24
FIGURE 20 : A) UNITÉ C ₆ -C ₃ ; B) STRUCTURE DES LIGNANES.....	24
FIGURE 21 : STRUCTURE DE LIGNANES PRÉSENTS DANS LE GENRE <i>NECTANDRA</i>	25
FIGURE 22: STRUCTURE DE NÉOLIGNANES PRÉSENTS DANS LE GENRE <i>NECTANDRA</i>	27
FIGURE 23 : STRUCTURE DES NORLIGNANES ISOLÉS DES FEUILLES DE <i>N. LINEATA</i>	28
FIGURE 24 : STRUCTURE DE LACTONES	29
FIGURE 25 : LACTONES ISOLÉS DE <i>N. GARDNERI</i>	29
FIGURE 26 : LACTONES ISOLÉS DE <i>N. RUBRA</i>	30
FIGURE 27 : SQUELETTE DE BASE DU DIPHÉNYLE PROPANE.....	30
FIGURE 28 : STRUCTURES DES DIFFÉRENTES SOUS-CLASSES DE FLAVONOÏDES.....	31
FIGURE 29 : STRUCTURES DES CHALCONES ET AURONES	31
FIGURE 30 : ABSORPTION UV DU SQUELETTE FLAVONOÏDE	32
FIGURE 31: STRUCTURE DU FLAVONOL (3-HYDROXY-2-PHÉNYLCHROMEN-4-ONE)	33
FIGURE 32 : FLAVONOÏDES ISOLÉS DE <i>N. GARDNERI</i>	33
FIGURE 33 : ALCALOÏDES BISBENZYLISOQUINOLINES CHEZ <i>NECTANDRA</i>	36
FIGURE 34 : ALCALOÏDES ISOQUINOLINES (APORPHINES) RAPPORTÉS DANS LE GENRE <i>NECTANDRA</i>	38
FIGURE 35 : STRUCTURE DE LA (6AS)-GLAZIOVINE	38
FIGURE 36 : ALCALOÏDES TÉTRAHYDROBENZYLISOQUINOLINES DE <i>NECTANDRA SALICIFOLIA</i>	39

FIGURE 37 : STRUCTURE DU (9S)-SÉBIFÉRINE [(9S)-O-MÉTHYLFLAVINANTINE]	40
FIGURE 38 : SQUELETTE DE LA FEMME RETROUVÉ DANS UN COULOIR-CHAMBRE DE SACRIFICES HUMAINS AVEC DES GRAINES DE <i>NECTANDRA</i>	42
FIGURE 39 : TERPÈNES MAJORITAIRES CHEZ <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	45
FIGURE 40 : <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	49
FIGURE 41 : FEUILLES DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	50
FIGURE 42 : FLEURS DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	50
FIGURE 43 : FRUITS DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	51
FIGURE 44 : ECORCES DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	51
FIGURE 45 : CYCLE VÉGÉTATIF DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	52
FIGURE 46 : ECHANTILLON DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i> (HERBIER INRA)	53
FIGURE 47 : COMPOSÉS MAJEURS IDENTIFIÉS DANS LES EXTRAITS APOLAIRES DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	77
FIGURE 48 : RENDEMENT D'EXTRACTION PAR ULTRASONS DES DIFFÉRENTES PARTIES DE LA PLANTE ET DU THÉ VERT.....	78
FIGURE 49 : QUANTITÉ DE POLYPHÉNOLS TOTAUX PAR MG D'ÉQUIVALENT D'ACIDE GALLIQUE PAR G D'EXTRAIT SEC DANS LES EXTRAITS POLAIRES ET LES FEUILLES DE THÉ VERT	79
FIGURE 50 : CCM SUR GEL DE SILICE DES EXTRAITS BRUTS POLAIRES DES FEUILLES, ÉCORCES ET FRUITS DE <i>N.</i> <i>MEMBRANACEA</i>	82
FIGURE 51 : RAPPORT FRONTAL DES PRINCIPAUX SPOTS DE L'EXTRAIT BRUT POLAIRE DE FEUILLES CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE SUR GEL DE SILICE DES EXTRAITS DE FEUILLES STADE B (ACOET-HCOOH- ACOH-H ₂ O 100-11-11-27) APRÈS PULVÉRISATION AU NP/PEG	84
FIGURE 52: SPECTRE UV ET MS DES PRINCIPAUX PICS DE L'EXTRAIT DE FEUILLE À L'ACÉTONE AU STADE B	86
FIGURE 53: CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE SUR GEL DE SILICE DES EXTRAITS POLAIRES.....	88
FIGURE 54 : CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE SUR GEL DE SILICE DES EXTRAITS DE FEUILLES STADE B : FRUCTIFICATION) (ACOET-HCOOH-ACOH-H ₂ O 100-11-11-20) APRÈS PULVÉRISATION AU NP/PEG	89
FIGURE 55 : CCM BILAN DES 33 FRACTIONS OBTENUES SUITE AU PREMIER FRACTIONNEMENT SUR L'EXTRAIT AQUEUX (LA DERNIÈRE FRACTION CORRESPOND À L'EXTRAIT AQUEUX	90
FIGURE 56: FRACTIONNEMENT SUR EXTRAIT BRUT DE FEUILLES (STADE B).....	91
FIGURE 57: CCM DES FRACTIONS ISSUES DE L'EXTRAIT AQUEUX DE FEUILLES AU STADE B	91
FIGURE 58 : CHROMATOGRAMME HPLC/DAD À 360 NM DE LA FRACTION E	92
FIGURE 59 : SCHÉMA DE LA PURIFICATION DE LA FRACTION E	93
FIGURE 60 : SPECTRE UV DU COMPOSÉ E4.....	94
FIGURE 61 : SPECTRE INFRAROUGE DU COMPOSÉ E4	94
FIGURE 62: SPECTRE DE MASSE LC-UV-MS (APCI IONISATION CHIMIQUE) EN MODE POSITIF [M ⁻ H] ⁺ DU COMPOSÉ E4	95
FIGURE 63: SPECTRE RMN DU ¹³ C DU COMPOSÉ E4.....	96
FIGURE 64: SPECTRE RMN DU ¹ H DU COMPOSÉ E4.....	97
FIGURE 65: SPECTRE RMN DEPT 135 DU COMPOSÉ E4	98

FIGURE 66: SPECTRE RMN COSY DU COMPOSÉ E4	99
FIGURE 67: SPECTRE RMN 2D HSQC DU COMPOSÉ E4	100
FIGURE 68: SPECTRE RMN 2D HMBC DU COMPOSÉ E4	101
FIGURE 69: STRUCTURE DE LA QUERCÉTINE-3-O-B-L-RHAMNOSIDE	102
FIGURE 70: SPECTRE UV DU COMPOSÉ DE LA FRACTION E6	103
FIGURE 71: SPECTRE INFRA ROUGE DU COMPOSÉ E6	104
FIGURE 72 : SPECTRE DE MASSE LC-UV-MS (APCI : IONISATION CHIMIQUE) MODE POSITIF DU COMPOSÉ E6	104
FIGURE 73 : SPECTRE RMN DU ¹³ C DU COMPOSÉ E6	105
FIGURE 74 : SPECTRE RMN DU ¹ H DU COMPOSÉ E6	106
FIGURE 75 : SPECTRE RMN DU DEPT 135 DU COMPOSÉ E6	107
FIGURE 76 : SPECTRE RMN 2D COSY DU COMPOSÉ E6	108
FIGURE 77: SPECTRE RMN 2D HSQC DU COMPOSÉ E6	109
FIGURE 78: SPECTRE RMN 2D HMBC DU COMPOSÉ E6	110
FIGURE 79: STRUCTURE DU KAEMPFÉROL- 3-O-B-RHAMNOSIDE	111
FIGURE 80 : MÉTHODE D'EXTRACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX	114
FIGURE 81 : CCM DES EXTRAITS BRUTS ALCALOÏDES RÉVÉLÉE AU RÉACTIF DE DRAGENDORFF	115
FIGURE 82 : SQUELETTE DES ALCALOÏDES DE TYPE ISOQUINOLÉINE	116
FIGURE 83 : SQUELETTE DES ALCALOÏDES DE TYPE APORPHINE	116
FIGURE 84 : CHROMATOGRAMME HPLC/DAD DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES RÉCOLTÉES AU STADE A (200 NM)	117
FIGURE 85 : CHROMATOGRAMME HPLC/DAD DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES RÉCOLTÉES AU STADE B (200 NM)	118
FIGURE 86 : CHROMATOGRAMME HPLC COUPLÉE À L'UV DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES ÉCORCES RÉCOLTÉES AU STADE A (200 NM)	119
FIGURE 87 : CHROMATOGRAMME HPLC COUPLÉE À L'UV DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES ÉCORCES AU STADE B (200 NM)	120
FIGURE 88 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE D'ANALYSE GC-MS DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DE FEUILLES AU STADE A	121
FIGURE 89 : STRUCTURE DES ALCALOÏDES INDOLIQUES	122
FIGURE 90 : STRUCTURE DES ALCALOÏDES INDOLOISOQUINOLÉINES	122
FIGURE 91: PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE D'ANALYSE GC-MS DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES ÉCORCES AU STADE A	124
FIGURE 92 : PROFIL CHROMATOGRAPHIQUE D'ANALYSE GC-MS DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES ÉCORCES STADE B	125
FIGURE 93 : CCM DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES RÉVÉLÉES AU RÉACTIF DE DRAGENDORFF	128
FIGURE 94 : STRUCTURES D'ALCALOÏDES IDENTIFIÉES DANS LES FRACTIONS DES FEUILLES STADE A (FRACTION 33H)	132

FIGURE 95 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION 33C HPLC-PREPARATIVE (SHIMADZU)	132
FIGURE 96 : SPECTRE MS DU COMPOSÉ 39A	134
FIGURE 97: SPECTRE RMN DU ¹ H DE 39 A.....	135
FIGURE 98 : SPECTRE RMN DU ¹³ C DE 39A.....	135
FIGURE 99: STRUCTURE DE LA N-MÉTHYLCROTONOSINE	136
FIGURE 100: SPECTRE RMN DU ¹ H DES COMPOSÉS 39C1 EN VERT ET 39C2 EN BLEU.....	138
FIGURE 101 : SPECTRE RMN DU ¹³ C DES COMPOSÉS 39C1 EN VERT ET 39C2 EN BLEU.....	139
FIGURE 102 : SPECTRE RMN DEPT 135 DES COMPOSÉS 39C1 EN VERT ET 39C2 EN BLEU	140
FIGURE 103 : SPECTRE RMN 2D COSY DES COMPOSÉS 39C1 EN VERT ET 39C2 EN BLEU.....	141
FIGURE 104 : SPECTRE RMN 2D HSQC DES COMPOSÉS 39C1 EN VERT ET 39C2 EN BLEU	142
FIGURE 105 : SPECTRE RMN 2D HMBC DES COMPOSÉS 39C1 EN VERT ET 39C2 EN BLEU	143
FIGURE 106 : STRUCTURE DE L'ISODOMESTICINE	144
FIGURE 107 : STRUCTURE DE LA N-MÉTHYLLAUROTÉTANINE	145
FIGURE 108 : CHROMATOGRAMME HPLC/DAD (254 NM) DE LA FRACTION G	146
FIGURE 109 : SPECTRE UV D'ALCALOÏDE DE TYPE APORPHINE.....	147
FIGURE 110 : CHROMATOGRAMME GC/MS FRACTION G	147
FIGURE 111: CHROMATOGRAMME FRACTION G : ZOOM APRÈS SOUSTRACTION DU BLANC MÉTHANOL	148
FIGURE 112: CCM JA (ACOET-HCOOH-ACOH-H ₂ O: 100-11-11-20) RÉVÉLÉ AU NP/PEG.....	150
FIGURE 113 : CCM DES FRACTIONS APRÈS HPLC-PREP RÉVÉLÉES AU NP/PEG	151
FIGURE 114 : SPECTRE RMN ¹ H ET ¹³ C DE LA FRACTION JAA	151
FIGURE 115 : SPECTRE RMN ¹ H ET ¹³ C DE LA FRACTION JAB	152
FIGURE 116 : FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES.....	158
FIGURE 117 : STRUCTURE DU RADICAL DPPH'	159
FIGURE 118 : RÉDUCTION DU RADICAL DPPH'	159
FIGURE 119 : STRUCTURE DE L'AAPP	160
FIGURE 120: RÉDUCTION DE LA RÉSAZURINE EN RÉSORUFINE	161
FIGURE 121: STRUCTURE DE LA CAMPTOTHÉCINE	162
FIGURE 122 : STRUCTURE DE L'HOECHST	162
FIGURE 123 : STRUCTURE DE LA FLUOROURACILE	163
FIGURE 124 : STRUCTURE DE L'ÉTOPOSIDE	163
FIGURE 125 : STRUCTURE DE L'AMPHOTÉRICINE B	164
FIGURE 126 : STRUCTURE DU L-NAME.....	164
FIGURE 127 : STRUCTURE DE L'ACYCLOVIR.....	165
FIGURE 128 : RÉSULTATS DES INDICES ORAC SUR LES HUILES ESSENTIELLES RÉCOLTÉES AU STADE A	166
FIGURE 129 : RÉSULTATS DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DES HUILES ESSENTIELLES RÉCOLTÉES AU STADE A .	166
FIGURE 130 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES H.E PAR LE TEST DE LA RÉSAZURINE	167
FIGURE 131: EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES HE PAR LE TEST DE HOECHST.....	168

FIGURE 132 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBIOTIQUE DES HUILES ESSENTIELLES RÉCOLTÉES LORS DU STADE B, SUR LES CELLULES BACTÉRIENNES <i>E. COLI</i> (GRAM NÉGATIF) ET <i>S. AUREUS</i> (GRAM POSITIF)	169
FIGURE 133 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES (STADE A) SUR LES CELLULES BACTÉRIENNES DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	170
FIGURE 134: ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES (STADE A)	171
FIGURE 135 : TOXICITÉ DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FEUILLES (STADE A)	171
FIGURE 136: ACTIVITÉ ANTI INFLAMMATOIRE DE L'HE DES ÉCORCES A	173
FIGURE 137 : TOXICITÉ DE L'HE DES ÉCORCES A	173
FIGURE 138: ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE DE L'HE DES FRUITS.....	174
FIGURE 139 : TOXICITÉ DE L'HE DES FRUITS.....	174
FIGURE 140: EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE SUR LE VIRUS DE L'HERPES, HERPES SIMPLEX VIRUS (HSV-1) DES HUILES ESSENTIELLES (STADE A)	175
FIGURE 141 : INDICES ORAC DES EXTRAITS CYCLOHEXANE	177
FIGURE 142 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE SUR CELLULE DES EXTRAITS CYCLOHEXANE	177
FIGURE 143 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE PAR LE TEST DE LA RESAZURINE SUR LES EXTRAITS APOLAIRES (CYCLOHEXANE)	178
FIGURE 144 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES EXTRAITS CYCLOHEXANE PAR LE TEST HOECHST.....	179
FIGURE 145 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI INFLAMMATOIRE DES EXTRAITS CYCLOHEXANE À 40 µG/ML. 180	
FIGURE 146: TOXICITÉ DES EXTRAITS CYCLOHEXANE	180
FIGURE 147 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE HERPÈS HSV-1 SUR LES EXTRAITS BRUTS CYCLOHEXANE DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	181
FIGURE 148: EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE VIA LE TEST DE L'ORAC SUR LES EXTRAITS BRUTS POLAIRES DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	183
FIGURE 149 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE PAR LE TEST DPPH SUR LES EXTRAITS POLAIRES ...	184
FIGURE 150 : ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE CELLULAIRE DES EXTRAITS POLAIRES DE <i>N. MEMBRANACEA</i> ET DES FEUILLES DE THÉ VERT	185
FIGURE 151 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI INFLAMMATOIRE SUR LES EXTRAITS POLAIRES	187
FIGURE 152: EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DES EXTRAITS POLAIRES SUR L'HERPÈS HSV-1 (HERPES SIMPLEX VIRUS).	188
FIGURE 153: ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE ORAC.....	189
FIGURE 154: ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE CELLULAIRE DES FRACTIONS	190
FIGURE 155: ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE	190
FIGURE 156 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE SUR LE VIRUS DE L'HERPÈS.....	191
FIGURE 157 : (A) NEURONE NORMAL ET (B) ATTEINT DE LA MALADIE ALZHEIMER.....	193
FIGURE 158 : STRUCTURE DE LA GDNF EN 3D [KURZWEIL. WIKIMEDIA COMMONS]	194
FIGURE 159: EVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE L'EXTRAIT ALCALOÏDE DE FEUILLES (STADE A) 195	

FIGURE 160 : EVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE L'EXTRAIT ALCALOÏDE DE FEUILLES (STADE B)	196
FIGURE 161 : EVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE L'EXTRAIT ALCALOÏDES DES ÉCORCES (STADE A)	197
FIGURE 162 : EVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE L'EXTRAIT DES ÉCORCES (STADE B)	197
FIGURE 163 : EVALUATION DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE L'EXTRAIT DE FRUITS.....	198
FIGURE 164 : RÉSULTATS DES INDICES ORAC SUR L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES STADE B.....	200
FIGURE 165: RÉSULTATS DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE CELLULAIRE DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES STADE B	201
FIGURE 166 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE PAR LE TEST DE LA RÉSAZURINE DE L'EXTRAIT BRUT ALCALOÏDES DES FEUILLES.....	202
FIGURE 167 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE PAR LE TEST DE HOESCHST DE L'EXTRAIT BRUT ALCALOÏDES DES FEUILLES.....	202
FIGURE 168 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES STADE B	203
FIGURE 169 : ACTIVITÉ ANTI INFLAMMATOIRE DE L'EXTRAIT BRUT ALCALOÏDES DES FEUILLES.....	204
FIGURE 170 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIVIRALE DE L'EXTRAIT BRUT ALCALOÏDES DE FEUILLES SUR LE VIRUS DE L'HERPÈS	205
FIGURE 171 : <i>CANDIDA ALBICANS</i> SUR LAME [Y TAMBE, 2005]	225
FIGURE 172 : GROSSISSEMENT X 10 000 DE L' <i>ESCHERICHIA COLI</i> [ERIC ERBE, 2005].....	225
FIGURE 173: <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , PHOTOGRAPHIER AU MICROSCOPE [Y TAMBE, 2005].....	226
FIGURE 174: SCHÉMA DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES POLYPHÉNOLS.....	233
FIGURE 175 : CCM DES FRACTIONS DE LA COLONNE OUVERTE DE SILICE 254 NM (A), 365 NM (B), RÉACTIF DE DRAGENDROFF (C).....	238
FIGURE 176 : CHROMATOGRAMME DE LA FRACTION JA SUR HPLC/DAD	240
FIGURE 177 : CHROMATOGRAMME DE LA SÉPARATION DE LA FRACTION JA SUR HPLC PRÉPARATIVE	241
FIGURE 178 : COURBE D'ÉTALONNAGE DE L'ACIDE GALLIQUE POUR LE DOSAGE DES POLYPHÉNOLS TOTAUX	248
FIGURE 179 : COURBE DE L'ABSORBANCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN TROLOX.....	250
FIGURE 180 : COURBE D'ÉTALONNAGE DU TROLOX.....	251
FIGURE 181 : PLAQUE 96 PUIITS	254
FIGURE 182 : PLAQUE APRÈS INCUBATION ET DOSAGE COLORIMÉTRIQUE.....	255
FIGURE 183 : PLAQUE DE LYSE DES CELLULES.....	257
FIGURE 184 : FRUITS ET FEUILLES DE <i>NECTANDRA PATENS</i>	285
FIGURE 185 : FLEURS ET FRUITS DE <i>NECTANDRA CORIACEA</i>	287
FIGURE 186 : FEUILLES DE <i>NECTANDRA ANTILLANA</i>	288
FIGURE 187 : FEUILLES DE <i>NECTANDRA DOMINICANA</i> (GUADELOUPE).....	289
FIGURE 188 : CHROMATOGRAMMES DES EXTRAITS ACÉTONE, ÉTHANOL ET MÉTHANOL DE FEUILLES (STADE B) A) 280 NM ET B) 360 NM.....	293

FIGURE 189 : CHROMATOGRAMME MS DES EXTRAITS ACÉTONE, ÉTHANOL ET MÉTHANOL	DES
FEUILLES (STADE B).....	294
FIGURE 190 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS CYCLOHEXANE	295
FIGURE 191 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES EXTRAITS CYCLOHEXANE	296
FIGURE 192 : ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES EXTRAITS POLAIRE PAR TEST DE LA RESAZURINE	297
FIGURE 193 : ACTIVITÉ ANTICANCÉREUSE DES EXTRAITS POLAIRES PAR LE TEST DE HOECHST	297
FIGURE 194 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE SUR <i>E. COLI</i> ET <i>S. AUREUS</i> DES EXTRAITS POLAIRES DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	298
FIGURE 195 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS BRUTS	299
FIGURE 196 : EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE L'EXTRAIT BRUT ALCALOÏDES DE FEUILLES STADE B	300

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : TAXONOMIE DES LAURACEAE SELON CRONQUIST 1988	3
TABLEAU 2 : POSITION SYSTÉMATIQUE DES LAURACEAE SELON L'ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP APG III 2009.....	4
TABLEAU 3 : QUELQUES UTILISATIONS NON-MÉDICINALES RÉPERTORIÉES DES LAURACEAE. [JEAN BRUNETON; CHRISTIAN OUENSANGA, PALIKUR WAYASI ET AL. 1999].	9
TABLEAU 4 : QUELQUES UTILISATIONS MÉDICINALES RÉPERTORIÉES DE LAURACEAE.....	10
TABLEAU 5 : CLASSIFICATION BOTANIQUE DE <i>NECTANDRA</i> [APG III 2009].....	11
TABLEAU 6 : COMPOSÉS CHIMIQUES MAJORITAIRES DES H.E. DE <i>NECTANDRA CORIACEA</i> [JORGE A.PINO ET AL. 2005] ET <i>NECTANDRA ANGUSTIFOLIA</i> [TORRES ET AL. 2005]	16
TABLEAU 7 : COMPOSÉS CHIMIQUES MAJEURS DE L'HE DE <i>NECTANDRA SALICINA</i> [CHAVERRI ET CICCIO, 2009].	17
TABLEAU 8 : ALCALOÏDES ISOLÉS DANS LE GENRE <i>NECTANDRA</i>	40
TABLEAU 9 : UTILISATIONS TRADITIONNELLES DES EXTRAITS DE <i>NECTANDRA</i>	42
TABLEAU 10 : QUELQUES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DU GENRE <i>NECTANDRA</i>	44
TABLEAU 11 : DONNÉES GPS (GLOBAL POSITIONNING SYSTEM OU SYSTÈME DE LOCALISATION MONDIAL) DU SITE DE RÉCOLTE DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	53
TABLEAU 12 : CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	54
TABLEAU 13: RENDEMENTS DES EXTRACTIONS DES HUILES ESSENTIELLES DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	56
TABLEAU 14: DENSITÉ DES HUILES ESSENTIELLES DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	57
TABLEAU 15 : INDICE DE RÉFRACTION DES HUILES ESSENTIELLES DES FRUITS, DES ÉCORCES ET DES FEUILLES (STADE A ET B)	58
TABLEAU 16 : PROPRIÉTÉS ORGANOLEPTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES.....	58
TABLEAU 17 : COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DES FEUILLES ET DES ÉCORCES AUX DEUX STADES DE RÉCOLTE A ET B	59
TABLEAU 18 : COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FRUITS DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	62
TABLEAU 19 : COMPARAISON PRINCIPAUX COMPOSANTS DES HUILES ESSENTIELLES DE FEUILLES DE <i>N. MEMBRANACEA</i> DE GUADELOUPE ET DU COSTA RICA (PRINCIPAUX TERPÈNES)	65
TABLEAU 20 : ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DES HUILES ESSENTIELLES DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	67
TABLEAU 21 : RENDEMENT DES EXTRAITS APOLAIRES DES FEUILLES, ÉCORCES ET FRUITS POUR LES DEUX STADES DE RÉCOLTE	68
TABLEAU 22 : COMPOSITION CHIMIQUE (%) DES EXTRAITS APOLAIRES DES FEUILLES ET DES ÉCORCES DE <i>NECTANDRA MEMBRANACEA</i>	68
TABLEAU 23 : ANALYSE DE L'EXTRAIT APOLAIRE DE FEUILLES STADE A PAR GC/FID ET GC/MS	70
TABLEAU 24 : ANALYSE DE L'EXTRAIT APOLAIRE DE FEUILLES STADE B PAR GC/FID ET GC/MS	71
TABLEAU 25 : RÉSULTAT DE L'ANALYSE DE L'EXTRAIT D'ÉCORCE STADE A PAR GC/FID ET GC/MS.....	72

TABLEAU 26 : ANALYSE DE L'EXTRAIT APOLAIRE DE L'EXTRAIT D'ÉCORCE STADE B PAR GC/FID ET GC/MS.....	73
TABLEAU 27 : COMPOSITION CHIMIQUE (%) DES EXTRAITS APOLAIRES DES FRUITS DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	73
TABLEAU 28 : ANALYSE DE L'EXTRAIT APOLAIRE DES FRUITS PAR GC/FID ET GC/MS	75
TABLEAU 29 : DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DE LA QUERCÉTINE-3-O-B-L-RHAMNOSIDE.....	102
TABLEAU 30 : DÉPLACEMENT CHIMIQUE DU KAEMPFÉROL-3-O-B-RHAMNOSIDE	111
TABLEAU 31 : RENDEMENT (EN %) DES EXTRACTIONS D'ALCALOÏDES.....	114
TABLEAU 32 : COMPOSITION EN ALCALOÏDES DE L'EXTRAIT BRUT D'ALCALOÏDES DES FEUILLES	123
TABLEAU 33 : ANALYSE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE L'EXTRAIT BRUT DES ÉCORCES STADE A.....	124
TABLEAU 34 : ANALYSE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DE L'EXTRAIT BRUT DES ÉCORCES STADE B.....	126
TABLEAU 35 : STRUCTURE DES ALCALOÏDES IDENTIFIÉS PAR GC/MS DANS LES EXTRAITS BRUTS DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	127
TABLEAU 36 : RAPPORT FRONTAL DES SPOTS OBSERVÉS DANS LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES D'ÉLUTION	129
TABLEAU 37 : RASSEMBLEMENT DES FRACTIONS OBTENUES LORS DE LA SÉPARATION SUR COLONNE OUVERTE DE SILICE	129
TABLEAU 38 : COMPOSÉS IDENTIFIÉS DANS L'EXTRAIT DE FEUILLES PAR GC-MS	130
TABLEAU 39 : MASSES DES COMPOSÉS ISOLÉS À PARTIR DE 33C.....	133
TABLEAU 40 : ANALYSE GC/MS DES SOUS FRACTIONS DE 33C.....	133
TABLEAU 41 : DÉPLACEMENT CHIMIQUE DE LA N-MÉTHYLCROTONOSINE	136
TABLEAU 42 : DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS DE 39C1 (VERT): L'ISODOMESTICINE	144
TABLEAU 43 : DÉPLACEMENT CHIMIQUE DE 39C2 (BLEU) : LA N-MÉTHYLLAUROTÉTANINE	145
TABLEAU 44 : ALCALOÏDES IDENTIFIÉS PAR GC-MS DANS FRACTION G	149
TABLEAU 45 : MASSES DES FRACTIONS ISSUES DE JA PAR HPLC-PRÉPARATIVE.....	150
TABLEAU 46 : ANALYSE GC-MS DES FRACTIONS JAA À G.....	152
TABLEAU 47 : TABLEAU RÉCAPITULATIF DES ALCALOÏDES PRÉSENTS DANS LES FEUILLES DE <i>N. MEMBRANACEA</i>	155
TABLEAU 48 : ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE ET ANTI-INFLAMMATOIRE SUR E6.....	192
TABLEAU 49 : CELLULES SOUCHES (LASEVE)	226
TABLEAU 50 : MASSE DE MATIÈRES VÉGÉTALES FRAÎCHES RÉCOLTÉES	232
TABLEAU 51 : MASSE DE PRODUIT APRÈS PASSAGE AU CHARBON ACTIVÉ	235
TABLEAU 52 : ABSORBANCE DE L'ACIDE GALLIQUE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION	248
TABLEAU 53 : ESPÈCES DE <i>NECTANDRA</i> RÉPERTORIÉES (EN GRAS LES <i>NECTANDRA</i> PRÉSENTES AUX PETITES ANTILLES) [ROHWER 1958].....	282

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	xiii
TABLE DES MATIERES	xv
Abréviations.....	xxii
Lexique	xxiii
INTRODUCTION GENERALE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Les Lauraceae.....	3
1.1. Classification et position systématique.....	3
1.2. Caractères morphologiques généraux.....	4
1.3. Utilisation traditionnelle et toxicité des Lauraceae.....	6
1.3.1. Utilisations non-médicinales	6
1.3.2. Utilisations médicinales	10
2. Les <i>Nectandra</i>	11
2.1. Classification et répartition géographique des <i>Nectandra</i>	11
2.2. Caractères morphologiques.....	12
3. Composition chimique des espèces de <i>Nectandra</i>	15
3.1. Terpènes (huiles essentielles).....	15
3.1.1. Rôle physiologique et localisation	15
3.1.2. Huiles Essentielles des <i>Nectandra</i>	15
3.2. Les lipides chez les <i>Nectandra</i>	20
3.3. Les composés phénoliques simples.....	21
3.3.1. Les phénylpropanoïdes.....	22
3.3.2. Les lignanes et les néolignanes.....	24
3.3.2.1. Lignanes, néolignanes et norlignanes chez les <i>Nectandra</i>	24

3.3.3.	Les lactones.....	28
3.3.3.1.	<i>Lactones des Nectandra.....</i>	29
3.3.4.	Les flavonoïdes.....	30
3.3.4.1.	<i>Absorption des rayonnements UV.....</i>	32
3.3.4.2.	<i>Flavonoïdes chez les Nectandra.....</i>	33
3.4.	Les alcaloïdes.....	34
3.4.1.	Définition.....	34
3.4.2.	Alcaloïdes des Nectandra.....	35
3.4.2.1.	<i>Alcaloïdes bisbenzylisoquinolines.....</i>	35
3.4.2.2.	<i>Alcaloïdes aporphines.....</i>	36
3.4.2.3.	<i>Alcaloïdes proaporphines.....</i>	38
3.4.2.4.	<i>Alcaloïdes tétrahydrobenzylisoquinolines.....</i>	38
4.	Utilisations ethno-médicinales du genre <i>Nectandra</i>.....	42
5.	Activités biologiques du genre <i>Nectandra</i>.....	43
6.	Etudes antérieures sur <i>Nectandra membranacea</i>.....	45
6.1.	Composition des feuilles.....	45
6.2.	Composition des écorces.....	46
ETUDE PHYTOCHIMIQUE de <i>Nectandra membranacea</i> de Guadeloupe.....		47
7.	<i>Nectandra membranacea</i> (Swartz) Grisebach 1860.....	49
8.	Cycle végétatif de la plante.....	52
9.	Récolte et traitement du matériel végétal.....	53
10.	Criblage phytochimique.....	54
11.	Etude des molécules apolaires.....	56
11.1.	Huiles essentielles.....	56
11.1.1.	Rendement.....	56
11.1.2.	Densité.....	57
11.1.3.	Indice de réfraction.....	58

11.1.4.	Caractéristiques organoleptiques.....	58
11.2.	Composition chimique des H.E	59
11.3.	Composés apolaires non-volatils	68
11.3.1.	Composition chimique des extraits apolaires.....	68
12.	Analyse bio guidée des composés polaires.....	78
12.1.	Extraction par ultrasons	78
12.2.	Dosage des polyphénols totaux.....	79
12.3.	Analyse chromatographique (CCM, HPLC/DAD) et choix de l'extrait	81
12.4.	Fractionnement.....	87
12.5.	Extraction liquide-liquide	87
12.6.	Purification de l'extrait aqueux.....	89
12.7.	Caractérisation des molécules polaires bioactives.....	92
13.	Extraction et analyse des alcaloïdes.....	113
13.1.	Extractions des alcaloïdes totaux des feuilles, écorces et des fruits.....	113
13.1.1.	Méthode d'extraction.....	113
13.1.2.	Structure des alcaloïdes des extraits bruts	116
13.1.2.1.	Détermination des familles de molécules	116
13.1.2.2.	Identification des alcaloïdes par GC-MS	121
13.2.	Séparation sur colonne ouverte de l'extrait de feuilles.....	128
13.2.1.	Identification des alcaloïdes isolés des feuilles (UV, IR, MS, RMN).....	128
13.2.2.	Analyse de la fraction G (extrait de feuille stade B) de la partie polaire (HPLC/DAD et GC/MS)	146
13.2.3.	Analyse des fractions E et F issus de l'extrait aqueux de feuilles stade B de la partie polaire	149
13.3.	Récapitulatif des alcaloïdes identifiés et isolés des feuilles de <i>Nectandra membranacea</i>	154
14.	Activités biologiques de <i>N. membranacea</i> de Guadeloupe.....	157
14.1.	Introduction	157

14.2. Parties apolaires	165
14.2.1. Activité biologique des Huiles Essentielles	165
14.2.1.1. <i>Activité antioxydante ORAC et cellulaire</i>	165
a. <i>Activité antioxydante ORAC</i>	165
b. <i>Activité antioxydante cellulaire</i>	166
14.2.1.2. <i>Activité anticancéreuse</i>	167
a. <i>Test de la Resazurine</i>	167
b. <i>Test Hoechst</i>	168
14.2.1.3. <i>Activité antibactérienne sur S.aureus et E.coli.....</i>	169
14.2.1.4. <i>Activité antifongique sur Candida albicans.....</i>	170
14.2.1.5. <i>Activité anti-inflammatoire</i>	171
14.2.1.6. <i>Activité Antivirale contre l'Herpès HSV-1</i>	175
14.2.2. Activité biologique des extraits cyclohexane	176
14.2.2.1. <i>Activités antioxydantes chimique ORAC et sur cellules saines.....</i>	176
14.2.2.2. <i>Activité anticancéreuse.....</i>	178
a. <i>Test de la Resazurine</i>	178
b. <i>Test de Hoechst.....</i>	179
14.2.2.3. <i>Activité antibactérienne sur S.aureus et E.coli.....</i>	179
14.2.2.4. <i>Activité antifongique sur Candida albicans.....</i>	180
14.2.2.5. <i>Activité anti inflammatoire</i>	180
14.2.2.6. <i>Activité antivirale sur Herpès HSV-1</i>	181
14.3. Parties polaires	182
14.3.1. Activité Biologique des extraits bruts.....	182
14.3.1.1. <i>Activité antioxydante</i>	182
a. <i>Test ORAC</i>	182
b. <i>Test DPPH.....</i>	183
c. <i>Test Antioxydant cellulaire</i>	185

14.3.1.2. <i>Activité anticancéreuse</i>	186
b. <i>Test de la Resazurine</i>	186
c. <i>Test de Hoechst</i>	186
14.3.1.3. <i>Activité antibactérienne sur S.aureus et E.coli</i>	186
14.3.1.4. <i>Activité antifongique sur Candida albicans</i>	186
14.3.1.5. <i>Activité anti inflammatoire</i>	187
14.3.1.6. <i>Activité antivirale sur Herpès HSV-1</i>	187
14.3.2. Activité Biologique des fractions issus de Fe(B)	189
a. <i>Activité antioxydante ORAC</i>	189
b. <i>Activité antioxydante sur cellule</i>	190
c. <i>Activité anti-inflammatoire</i>	190
d. <i>Activité antivirale Herpès</i>	191
14.3.3. Composé E6 : kaempférol-3-O-rhamnoside	192
14.4. Alcaloïdes	192
14.4.1. Activité neuroprotectrice : Maladie d'Alzheimer	192
14.4.1.1. <i>Etude des extraits bruts de feuilles</i>	195
14.4.1.2. <i>Étude des extraits bruts des écorces</i>	197
14.4.1.3. <i>Étude de l'extrait brut des fruits</i>	198
14.4.2. Activité biologique de l'extrait brut de feuilles	200
14.4.2.1. <i>Activités antioxydantes chimique (ORAC) et sur cellules saines</i>	200
14.4.2.2. <i>Activité anticancéreuse : Tests Résazurine et Hoechst</i>	201
14.4.2.3. <i>Activités antibactériennes sur S. aureus et E. coli</i>	203
14.4.2.4. <i>Activité antifongique sur Candida albicans</i>	203
14.4.2.5. <i>Activité anti inflammatoire</i>	204
14.4.2.6. <i>Activité antivirale sur Herpès Simplex Virus (HSV-1)</i>	204
Récapitulatif	206
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	217

MATERIEL ET METHODES.....	220
15 . Matériel	220
15.1. Matériel végétal.....	220
15.2. Extractions.....	220
15.3. Chromatographie.....	222
15.4. Analyses physicochimiques	223
15.5. Souches bactériennes.....	224
16 . Méthodes	226
16.1. Criblage chimique	227
16.1.1. Extraction des huiles essentielles.....	232
16.1.2. Extraction des composés non-volatils	232
16.2. Méthode de séparation.....	234
16.2.1. Huiles essentielles (GC/MS, GC/FID).....	234
16.2.2. Extrait apolaire GC/MS et GC/FID.....	235
16.2.3. Polyphénols HPLC/DAD-MS	236
16.2.4. Alcaloïdes HPLC/DAD, GC/MS.....	236
16.2.5. Analyse fractions E et F (HPLC analytique).....	239
16.2.6. Analyse fraction C (HPLC/DAD).....	243
16.3. Méthodes de dosage	247
16.3.1. Dosage des polyphénols totaux.....	247
16.3.2. Dosage de l'activité antioxydante : Méthode chimique	249
16.3.2.1. Test du DPPH (2,2-diphényl 1-pyrcilhydrazyl).....	249
16.3.2.1. Test de l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	252
16.4. Méthode d'évaluation des activités biologiques	252
16.4.1. Test anti-oxydant cellulaire	252
16.4.2. Activité anticancéreuse	253
16.4.3. Activité antibactérienne	253

16.4.4. Activité antifongique	254
16.4.5. Activité anti-inflammatoire	254
16.4.6. Activité antivirale sur Herpès HSV-1 (Herpes simplex virus)	256
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	258
ANNEXES	277
ANNEXE 1 : Problématique de la différenciation <i>Nectandra</i> et <i>Ocotea</i>	278
ANNEXE 2 : Espèces du genre <i>Nectandra</i>	282
ANNEXE 3 : Description botanique des <i>Nectandra</i> des Petites Antilles Françaises (Fournet 1978 et Rohwer 1993)	284
ANNEXE 4 : Prospection sur le terrain	291
ANNEXE 5 : Chromatogramme UV et MS des extraits polaires de feuilles stade B	293
ANNEXE 6 : Activité antifongique sur <i>Candida albicans</i> des extraits cyclohexane de <i>N. membranacea</i>	295
ANNEXE 7 : Activité antibactérienne sur <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> des extraits cyclohexane de <i>N. membranacea</i>	296
ANNEXE 8 : Activité anticancéreuse des extraits bruts polaires de <i>N. membranacea</i> ..	297
ANNEXE 9 : Activité antibactérienne sur <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i> des extraits bruts polaires de <i>N. membranacea</i>	298
ANNEXE 10 : Activité antifongique sur <i>Candida albicans</i> des extraits bruts polaires de <i>N. membranacea</i>	299
ANNEXE 11 : Activité antibactérienne sur <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> des extraits alcaloïdes de <i>N. membranacea</i>	300

Abréviations

[α]_D: pouvoir rotatoire
 δ : déplacement chimique
1,2,3...: désignation des composés
AcOEt: acétate d'éthyle
APCI: ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical ionization, MS)
CO: colonne ouverte
CCM: chromatographie sur couche mince
d: Doublet (RMN)
dd: doublet de doublet
s : singulet
Da: Dalton (unité de masse moléculaire)
DAD-UV: Détecteur ultraviolet à barrettes de diodes (Diode Array Detector)
DEPT: Séquence Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert
DMSO: diméthylsulfoxyde
DPPH: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
EI: ionisation par impact électronique (Electron Impact ionization)
ESI: Ionisation par électrospray (ElectroSpray Ionization, MS)
EtOH: éthanol
GC: chromatographie en phase gazeuse
HE : huile essentielle
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC: chromatographie liquide à haute performance
HPLC/UV: chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie ultraviolet
HPLC/UV/MS: chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie ultraviolette et à la spectroscopie de masse
HSQC: Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC₅₀: Concentration inhibitrice de 50%
J: constante de couplage
m : multiplet
m/z: masse/charge électrique
MeOH: méthanol
MeCN: acétonitrile
MS: spectroscopie de masse
PAF: facteur d'agrégation plaquettaire
R_f: rapport frontal
Rha: rhamnose
RMN: résonance magnétique nucléaire
Tr: temps de rétention
uma: unité de masse atomique
UV: ultraviolet

Lexique

Acuminé : terminé en pointe

Alternes : se dit des feuilles disposées à des hauteurs différentes sur la tige

Alzheimer : la maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative à prédominance corticale qui touche en premier lieu les fonctions cognitives et se répercute sur le comportement et l'adaptation sociale des patients.

Analgésique : substance qui supprime la douleur

Anesthésique : se dit d'un procédé utilisé pour produire la perte de la sensibilité à la douleur (analgésie)

Amémorrhée : absence de règles (menstruations)

Angiosperme : végétal phanérogame dont les organes reproducteurs sont condensés en une fleur et dont les graines fécondées sont enfermées dans un fruit (plante à fleurs).

Anesthésique : substance qui provoque une anesthésie

Antalgique : qui calme la douleur

Anthère : partie de l'étamine qui contient les grains de pollen

Antibactérien : se dit d'une substance active contre les bactéries

Antidiarrhéique : se dit d'une substance utilisée contre la diarrhée

Antifongique : se dit d'une substance qui agit contre les mycoses

Anti infectieux : se dit d'une substance, médicament propre à combattre l'infection

Anti-inflammatoire : se dit d'une substance, médicament, propre à combattre l'inflammation

Antileishmanien : se dit d'une substance, médicament, qui lutte contre leishmaniose, maladie chronique à manifestation cutanée et ou viscérale

Anti malaria : se dit d'une substance utilisée pour lutter contre la malaria, infection parasitaire

Antimicrobien : se dit d'une substance qui combat les microbes, les bactéries

Antipaludisme = malaria : se dit d'une substance utilisée pour lutter contre les maladies parasitaires potentiellement mortelles transmises par les moustiques

Antispasmodique : empêche les contractions musculaires involontaires

Antiplasmodiale : substance capable d'inhiber la croissance

Antiprolifératif : produit qui empêche la prolifération (accroissement) d'un phénomène

Antipyrétique : se dit d'une substance qui diminue la fièvre

Antioxydant : se dit d'un agent qui ralentit la dégradation des aliments et de certains matériaux ou composés organiques due aux effets de l'oxydation

Antiseptique : se dit d'un agent, d'un médicament utilisé pour la destruction des micro-organismes pathogènes capables de provoquer des infections)

Anti tumorale : substance qui lutte contre les tumeurs

Antiviral, e : se dit d'une substance active contre les virus

Apex : extrémité terminale

Aphte : ulcération superficielle mais douloureuse de la muqueuse buccale ou génitale

Apicale : situé au sommet d'un organe animal ou végétal, c'est-à-dire à l'extrémité opposée au point d'insertion ou base.

Apicule : pointe abrupte, courte, aiguë, non effilée, à l'extrémité d'un limbe ou au sommet d'un fruit

Arbuste : végétal ligneux à tige non ramifiée dès la base, qui s'élève à une faible hauteur

Arthrite : maladie rhumatismale inflammatoire des articulations

Aromatisation : action d'aromatiser, de parfumer avec une substance aromatique

Asthénie : affaiblissement général de l'organisme

Bactéricide : se dit d'un produit qui tue les bactéries (antibiotique)

Baie : fruit charnu à graines ou à pépins, sans noyau

Broncho-pulmonaire : relatif aux bronches et aux poumons

Bourgeon : organe situé à l'extrémité des rameaux ou à l'aisselle des feuilles

Calice : ensemble des sépales d'une fleur

Cancérigène : qui peut provoquer ou favoriser l'apparition d'un cancer

Cardio-vasculaire : qui concerne le cœur et les vaisseaux

Carminatif : évacue les gaz intestinaux

Carpelle : pièce florale portant les ovules et formant, seule ou soudée à d'autres, le pistil des fleurs

Charnu : qui a des tissus épais, juteux, fermes mais tendres; caractérise les organes des plantes grasses

Chemotype : définit, au sein espèce, des populations juxtaposées chez lesquelles la teneur en certaines substances chimiques peut fluctuer plus ou moins d'une population à l'autre, sous la dépendance de facteurs génétiques, mais sans que cette variation soit corrélée à un caractère morphologique

Chimiotype : synonyme de chemotype

Cires : substances hydrofuges formant des cristaux à la surface des épidermes; elles contribuent à former la cuticule

Classification APG : classification scientifique des angiospermes la plus récente établie selon les travaux de l'Angiosperms Phylogeny Group

Climat : ensemble des éléments et phénomènes météorologiques qui caractérisent l'état moyen de l'atmosphère en un point précis.

Cône: 1. inflorescence unisexuée de certaines Gymnospermes, constituée d'un ensemble d'écaillés fertiles et/ ou stériles, mâmes ou femelles, disposées en hélice sur axe

2. Fructification d'un conifère, formée d'un axe portant des écaillés imbriquées sur lesquelles sont attachés les ovules

Colite : inflammation du côlon (partie de l'intestin comprise entre l'intestin grêle et le rectum)

Colique : violente douleur abdominale

Coriace : feuille à cuticule épaisse, ferme et résistante mais relativement souple, qui a la consistance du cuir

Cotylédon : première feuille présente dans l'embryon de la graine ; elle est souvent remplie de substances de réserve pour le développement de la plantule donc impropre au rôle des vraies feuilles. Le cotylédon assure la nutrition de l'embryon avant et au début de la germination et n'évolue pas en feuille chlorophyllienne ordinaire. On reconnaît deux grands groupes parmi les Angiospermes.

Les dicotylédons qui possèdent un embryon à 2 cotylédons (la plupart des végétaux cultivés et arbres)

Les monocotylédons dont l'embryon n'a qu'un seul cotylédon (graminées, iris, palmier)

Cultivar : toute variété végétale résultant d'une sélection, d'une mutation ou d'une hybridation et cultivée pour ses qualités agronomiques.

Cytotoxique : se dit d'une substance ou d'une cellule spécialisée capable de détruire les cellules d'un organisme

Décoction : liquide obtenu par l'action prolongée de l'eau bouillante sur une plante aromatique

Dépuratif : favorise l'élimination des toxines et déchets organiques

Démence : déclin général et irréversible des facultés mentales lié à une altération des cellules cérébrales.

Diabétique : relatif au diabète (trouble du métabolisme des glucides dû à une insuffisance de l'action de l'insuline pancréatique et caractérisé par une hyperglycémie et parfois par la présence de sucre dans les urines)

Diurétique : se dit d'une substance qui augmente la sécrétion urinaire et qui peut éventuellement être utilisée contre l'hypertension artérielle ou contre les œdèmes et l'insuffisance cardiaque

Drupe : fruit charnu, à noyau, tel que la cerise

Dysenterie : maladie infectieuse bactérienne ou parasitaire provoquant une colique avec des selles glaireuses et sanguinolentes

Dyspepsie : désigne une digestion difficile

Ecorce : partie externe protectrice de la tige des branches, du tronc, des racines des végétaux ; ce tissu de revêtement comprend le cambium libéro-ligneux et le phloème secondaire le plus jeune d'une part, et le rhytidome (écorce externe) d'autre part

Emménagogue : qui favorise ou provoque la menstruation

Endémique : qualifie une espèce ou un ensemble d'espèces, originaires d'un milieu particulier et qui ne se trouve nulle part ailleurs ; à la suite de mutations naturelles, ces espèces, indigènes à l'origine, sont devenues des espèces nouvelles, unique au monde

Entière : se dit d'une feuille à bord lisse, sans encoches ni appendices, dont le limbe est d'une seule pièce

Espèce : unité de classification à l'intérieur d'un genre, typifiée par un spécimen et que l'on distingue d'après des critères de ressemblance entre les individus

Etamine : organe mâle des plantes à fleurs, formé d'une partie mince, le filet et d'une partie renflée, l'anthère, qui renferme le pollen

Exalbuminée : qui n'a plus d'albumen (tissu de réserves de la graine)

Expectorant : favorise l'expulsion de substances provenant des voies respiratoires

Famille : groupe végétal regroupant les plantes de genres différents mais qui ont un ou des caractères botaniques communs ou assez proches ; le nom d'une famille dérive de celui du genre qui lui sert de type, et se termine en -aceae (-acées en français)

Fébrifuge : diminue la fièvre

Feuille : organe aérien d'une plante porté par la tige, accompagné d'un bourgeon axillaire situé à sa base, du côté orienté vers le haut de l'axe

Flavonoïde : groupe de pigments végétaux réunissant les flavones (jaunes) que l'on trouve notamment dans les écorces des agrumes et les anthocyanes (rouges, bleues, violettes) très présentes dans les fleurs

Fleur : chez les Angiospermes, élément de la plante constitué par les organes reproducteurs; la formation de la fleur, résultant du remaniement des méristèmes inflorescentiels en méristèmes floraux, réuni en un ensemble unique quatre types de pièces florales, insérées sur le réceptacle : les sépales, les pétales, les étamines et les carpelles

Floraison : saison où a lieu l'épanouissement des fleurs

Fossiles : se dit d'un reste ou d'une empreinte de plante ou d'animal ayant vécu avant l'époque historique, qui ont été conservés dans des dépôts sédimentaires

Fructification : ensemble des phénomènes physiologiques ayant le fruit pour siège, depuis la fécondation de l'ovule jusqu'à la maturité

Fruit : structure particulière aux Angiospermes qui se développe à partir d'un organe arrivé à maturité et résultant strictement de la fécondation des parties femelles d'une fleur ; dans le même temps où l'ovule, doublement fécondé, se différencie en graine, le gynécée subit une suite de transformations qui le transforment en fruit

Gastrique : relatif à l'estomac

Gastro-intestinal : qui concerne l'estomac et l'intestin

Genre : groupe homogène de niveau supérieur à celui de l'espèce, défini par le type d'une espèce qu'il contient ; un genre regroupe en général plusieurs espèces qui ont en commun des caractères botaniques très proches et qui appartiennent obligatoirement à la même famille. Les

espèces d'un même genre ont des affinités génétiques suffisantes pour que l'hybridation soit souvent possible

Germination : phénomène par lequel l'activité métabolique de la plantule augmente, sous l'action de l'eau et de la chaleur, permettant sa croissance, sa sortie de la graine, son implantation dans le sol et la mise en place de sa vie autonome.

Glabre : se dit d'un organe dépourvu de poils

Graine : produit de la maturation d'un ovule fécondé chez les plantes à fleurs; la graine contient un embryon et les réserves nutritives qui alimentent la plantule au début de sa croissance. Entourée de téguments protecteurs, elle peut être définie comme une forme de résistance efficace du végétal lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables.

Gynécée : organe femelle de la fleur placé en position centrale se composant d'un ou de plusieurs carpelles libres ou soudées.

Hépatique : relatif au foie

Hypertension : augmentation anormale de la pression à l'intérieur d'un vaisseau ou d'une cavité

Inférovarie : se dit d'un ovaire situé au-dessous du plan d'insertion des autres pièces florales

Inflorescence : mode de groupement des fleurs sur une plante ; ensemble de ces fleurs

Insecticide : se dit d'un produit utilisé pour détruire les insectes nuisibles

Intoxication : ensemble des troubles dus à l'introduction d'une substance toxique dans l'organisme

Lacéré : qualifie l'organe d'un végétal qui est profondément découpé irrégulièrement en lobes, eux-mêmes irrégulièrement incisés

Latex : sécrétion liquide d'aspect souvent laiteux, coloré ou incolore, de composition diverse, formée dans les laticifères, émise chez certaines plantes suite à des lésions

Laticifère : canaux unicellulaires ou pluricellulaires, ramifiés, formés de cellules sécrétrices interconnectées qui contiennent un latex blanchâtre

Lancéolé : en forme de fer de lancette ou de fer de lance étroit : plus ou moins large à la base et pointue au sommet

Laxatif : purgatif

Limbe : partie élargie plus ou moins mince d'un organe

Lobe : division d'un organe comprise entre deux parties creuses plus ou moins profondes qui les séparent

Maturation : phénomène progressif aboutissant à la maturité

Maturité : état de ce qui est mûr

Métabolite : élément produit par la transformation d'un composé organique à l'intérieur de la cellule. Il est dégradé ou en cours de dégradation. On attribue aussi le terme «métabolite» à un produit simple qui participe à la nutrition. Il est qualifié de secondaire lorsqu'il ne s'agit pas d'un nutriment essentiel.

Microsomes : fragments de membranes du réticulum endoplasmique

Mitochondrie : organite cytoplasmique de la cellule, limité par une double membrane, qui synthétise l'adénosine triphosphate ATP, source universelle d'énergie pour les êtres vivants

Morphologique: étude de la forme et de la structure externe des êtres vivants

Nervure : lignes visibles sur le limbe foliaire, formées de structures contenant les faisceaux

Ovaire : partie renflée et creuse du pistil qui contient les ovules et forme le fruit après la fécondation.

Papille : petite saillie, charnue et plus ou moins digitée, que l'on observe sur la peau, les muqueuses.

Parasite : se dit d'une plante qui vit fixée sur une autre, et y puise les substances qui lui sont nécessaires

Pétale : pièce généralement colorée, parfois parfumée, dont l'ensemble constitue la corolle de la fleur.

Pétiole : désigne la pièce foliaire, reliant le limbe à la tige.

Phanérogame : plante vasculaire se reproduisant par des organes bien visibles, regroupés en cônes ou en fleurs.

Phagocytaire (stimulant) : relatif à la phagocytose

Phagocytose : processus par lequel certaines cellules englobent des particules ou d'autres cellules par leurs pseudopodes (expansion cytoplasmique de la cellule), les absorbent puis les digèrent

Phénologie : étude de la chronologie de certains phénomènes biologiques (floraison, feuillaison..) en fonction des facteurs du climat

Pistil : ensemble des pièces femelles d'une fleur, résultant de la soudure de plusieurs carpelles et comprenant l'ovaire, le style et le stigmate

Pore : trou minuscule par lequel s'effectue un échange.

Purgatif : stimule les évacuations intestinales

Réceptacle : chez les Angiospermes, zone sommitale fortement développée du pédoncule de la fleur résultant de la transformation du méristème floral, sur laquelle les pièces florales ou l'ensemble des fleurs élémentaires

Rétrovirus : virus à ARN (acide ribonucléique) dont la famille comprend notamment le VIH (Virus de l'Immuno déficience Humaine), qui provoque le sida

Rhumatisme : affection douloureuse touchant les articulations

Sédatif : calme la douleur

Sépale : chacune des pièces du calice d'une fleur

Spasme : contraction pathologique des muscles lisses des viscères

Stigmate : partie supérieure du pistil, qui reçoit le pollen

Stipule : chacun des appendices germinés portés par la base de la feuille au niveau de son insertion sur la tige.

Stomachique : qui facilite la digestion gastrique

Style : partie du pistil en forme de colonne, surmontant l'ovaire et portant les stigmates à son sommet

Sympathomimétique (adrénergique) : qui agit grâce à l'adrénaline, substance jouant un rôle d'hormone et de neurotransmetteur.

Systématique : méthode de classification biologique des êtres vivants, étude de la définition, des interrelations génétiques, de l'évolution et de la classification des êtres vivants

Tanin : substance naturelle ; composé phénolique astringent assez répandu dans les plantes

Teinture : liquide contenant une matière colorante en dissolution, dont on imprègne les tissus ou les cheveux

Tépale : pièce du périanthe des monocotylédons

Tonique : qui a du tonus ; énergétique

Toxicité : caractère de ce qui est toxique

Trypanocide : se dit d'un médicament actif contre les trypanosomes (parasites)

Toxique : se dit d'une substance nocive pour les organismes vivants

Tumeur : prolifération anormale, non inflammatoire, de cellules groupées ou disséminées plus ou moins différenciées et autonomes

Unicarpellé : gynécée constitué d'un seul carpelle

Uniovulé : se dit d'un carpelle à un seul ovule

Urinaire : relatif à l'urine, liquide filtré par les reins et collecté dans la vessie avant son évacuation

Vaccine : maladie infectieuse des vaches et des chevaux, transmissible à l'homme, due à un virus de la famille des poxvirus (famille de virus à A.D.N)

Vacuole : cavité du cytoplasme des cellules renfermant diverses substances en solution dans l'eau

Variole : maladie infectieuse très contagieuse, due à un virus et caractérisée par une éruption de tâches rouges devenant des vésicules, puis des pustules

Vasculaire : qualifie un organe qui possède des vaisseaux conducteurs de la sève

Vérole : syphilis, maladie infectieuse due au tréponème pâle sexuellement transmissible.

Verticilles : ensemble des feuilles, de fleurs, de pièces florales partant toutes d'un même niveau de l'axe qui les porte

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes possèdent des propriétés biologiques très variées, qui trouvent leur application dans divers domaines comme la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture. Elles représentent une grande source de composés actifs pour la recherche de nouveaux intrants naturels, pour leurs propriétés phytothérapeutiques (activités antioxydante, anti inflammatoire ou anti-microbienne) que l'on retrouve chez de nombreux métabolites secondaires tels les composés phénoliques, les terpènes ou les alcaloïdes.

La médecine traditionnelle à base de plantes, est depuis longtemps utilisée. Il est souvent difficile de définir les molécules responsables de certains effets pharmacologiques mais de nombreuses études ont montré que des composés comme, les terpènes, les stéroïdes, les composés phénoliques et les alcaloïdes peuvent avoir des activités biologiques extrêmement intéressantes.

La Guadeloupe, île des Petites Antilles et Département français d'Outre Mer, est située dans la mer des Caraïbes. Elle se compose de deux terres distinctes la Basse-Terre, montagneuse et recouverte d'une forêt tropicale très dense, et la Grande Terre, plaine calcaire bordée d'une mangrove.

Grâce à son climat tropical tempéré, elle est dotée d'une biodiversité très riche de nombreuses espèces endémiques (environ 10%) dont beaucoup plantes sont utilisées comme aliments et médicaments. Récemment, 47 nouvelles plantes des régions d'outre mer ont été inscrites dans la Pharmacopée française (15 en Guadeloupe, 16 en Martinique et 16 à l'île de la Réunion), montrant ainsi la grande richesse en matières premières pharmaceutiques de ces espèces [Société Française d'Ethnopharmacologie. Ethnopharmacologia 50].

Ce résultat a été obtenu grâce au travail de réseaux de chercheurs, qui regroupent les savoirs des scientifiques de la région Caraïbe, notamment des botanistes, chimistes, agronomes, pharmaciens spécialistes en pharmacognosie et en phytothérapie. Cette pluridisciplinarité scientifique a permis d'identifier, répertorier, analyser et enfin valoriser ces plantes pour traiter des maladies tropicales sur lesquelles la médecine allopathique s'avère insuffisante.

Dans ce cadre, l'étude d'une Lauraceae poussant de façon spontanée en Guadeloupe nous a semblé intéressante. Le choix du genre *Nectandra* a été motivé par sa faible utilisation locale

contrairement aux autres zones du globe et par l'expertise du laboratoire pour la famille des Lauraceae.

Après une étude bibliographique sur la famille, le genre, l'espèce, nous présentons l'étude phytochimique bioguidée réalisée sur les feuilles, les écorces et les fruits du végétal. Afin de déterminer l'évolution de la composition chimique de la plante en fonction de son cycle de vie, l'étude a été menée à deux stades du cycle de la plante : la germination (stade A) et la fructification (stade B). Les résultats des travaux d'isolation et d'identification seront présentés lors de l'étude phytochimique de *Nectandra membranacea*.

En raison des axes de recherche du laboratoire Qualitrop, l'activité antioxydante des extraits de *Nectandra membranacea* a été particulièrement étudiée (huiles essentielles, les lipides, les flavonoïdes et les alcaloïdes). Néanmoins, d'autres activités biologiques ont été évaluées afin de déterminer de façon plus étendue le potentiel de cette espèce (activités anticancéreuse, antifongique, antibactérienne, antivirale sur le virus de l'herpès HSV-1, anti inflammatoire et contre la maladie d'Alzheimer). En fonction des résultats obtenus nous envisagerons les perspectives de valorisation de ce végétal.

Ce travail est donc réparti en deux grandes parties, l'une initié par une recherche bibliographique sur la famille du genre de la partie sélectionnée. Puis, nous développons la composition chimique des substances actives du genre : huiles essentielles, lipides, composés phénoliques et alcaloïdes. Dans la deuxième partie, nous présentons l'étude phytochimique de la plante étudiée : *Nectandra membranacea*, les activités biologiques dans la plante. Enfin, pour finir nous discuterons des résultats obtenus.

La partie protocole est subdivisée en deux parties. La première présente les matériels, elle suivie des méthodes qui décrit les techniques de criblage biologique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les Lauraceae

1.1. Classification et position systématique

Le terme « Lauraceae » est dérivé du latin *laurus*, laurier auquel se rajoute le suffixe –aceae qui signifie « appartenance à ». Les premiers fossiles de Lauraceae datent du début du Crétacé. Il est possible que l'origine ancienne de cet ordre soit la raison de sa grande diversité.

Selon les classifications botaniques pré-moléculaires, les Lauraceae sont des dicotylédones appartenant à l'ordre des **Laurales** (Tableau 1) qui comprend aussi les *Amborellaceae*, *Monimiaceae*, *Trimeniaceae*, *Gomortegaceae*, *Calycanthaceae*, *Idiospermaceae* et *Hernandiaceae* selon Cronquist [Cronquist 1988].

Tableau 1 : Taxonomie des Lauraceae selon Cronquist 1988

Classification Classique de Cronquist 1988	
Règne	Plantae
Sous-Règne	Tracheobionta (plante vasculaire)
Embranchement	Spermatophytes (plantes à graines)
Sous-Embranchement	Angiospermes (plantes à fleurs)
Classe	Magnoliopsida (dicotylédones)
Sous-Classe	Magnoliidae
Ordre	Laurales
Famille	Lauraceae

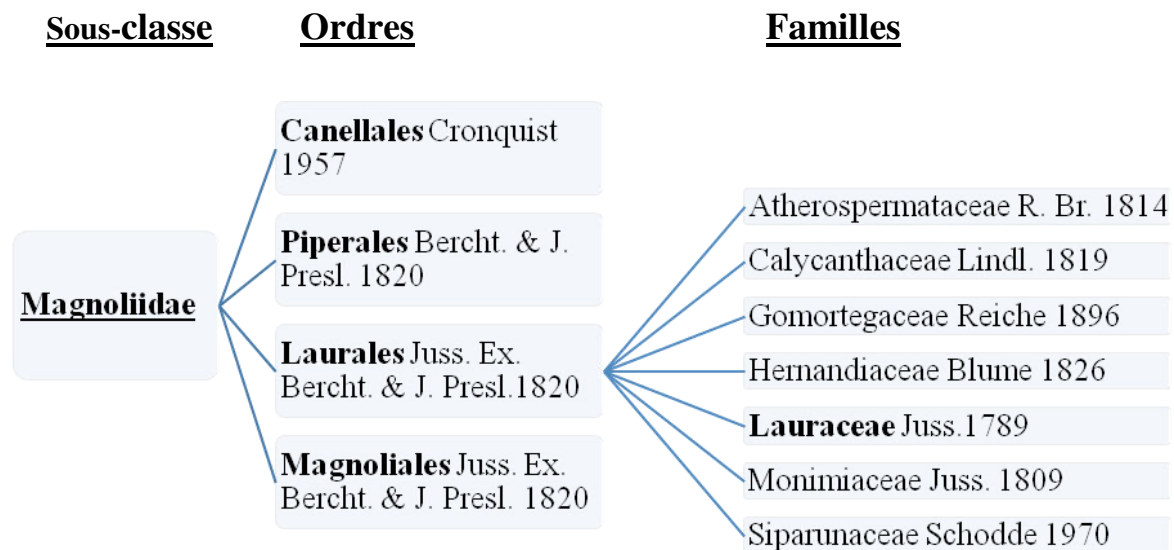
La classification de Cronquist, basée essentiellement sur des critères morphologiques et anatomiques fut longtemps la plus utilisée. Cependant, des études modernes sur la biologie moléculaire mettent actuellement en exergue les liens évolutifs entre les plantes. C'est la systématique « cladistique » ou « phylogénétique » basée sur des séquences de gènes, c'est-à-

dire, sur le comptage de séquence d'acide nucléique. Plus les séquences sont voisines plus les plantes sont proches phylogénétiquement.

Ces nouveaux travaux ont bouleversé les classifications usuelles et ont donné naissance en 1998 à une nouvelle classification ordinale des plantes à fleurs : Angiosperm Phylogeny Group (APG I). Cette classification APG, est la classification scientifique des angiospermes la plus récente établie. Elle a été révisée en 2003 [APG II, 2003] puis en 2009 [APG III, 2009].

Cette classification compte 14 ordres et un petit nombre de familles. En ce qui concerne les Lauraceae, leur appartenance à l'ordre des Laurales est confirmée.

Tableau 2 : Position systématique des Lauraceae selon l'Angiosperm Phylogeny Group APG III 2009



1.2. Caractères morphologiques généraux

La famille des Lauraceae regroupe plus de 2000 espèces réparties en 53 genres déclinés ci-dessous, dont les principaux sont le genre *Ocotea* (324 espèces) et le genre *Nectandra* (114 espèces). Les différents genres qui constituent la famille des Lauraceae sont :

Actinodaphne, Adenodaphne, Aiouea, Alseodaphne, Anaueria, Aniba, Apollonias, Aspidostemon, Beilschmiedia, Brassiodendron, Caryodaphnopsis, Chlorocardium, Cinnadenia, Cinnamomum, Clinostemon, Cryptocarya, Dehaasia, Dicypellium, Dodecadenia, Endiandra, Endlicheria, Eusideroxylon, Gamanthera, Hexapora, Hypodaphnis, Iteadaphne, Kubitzkia, Laurus, Licaria, Lindera, Litsea, Mezilaurus, Nectandra, Neocinnamomum, Neolitsea,

Nothaphoebe, Ocotea, Paraia, Persea, Phoebe, Phyllostemonodaphne, Pleurothyrium, Potameia, Potoxylon, Povedadaphne, Ravensara, Rhodostemonodaphne, Sassafras, Syndiclis, Triadodaphne, Umbellularia, Urbanodendron, Williamodendron.

Les membres de cette famille sont des arbres ou arbustes présents dans les zones tropicales et tempérées de la planète. Ils sont absents dans les régions aux climats les plus froids (Nord de l'Amérique du nord, Europe, Nord de l'Asie,), comme le montre la figure ci-dessous.

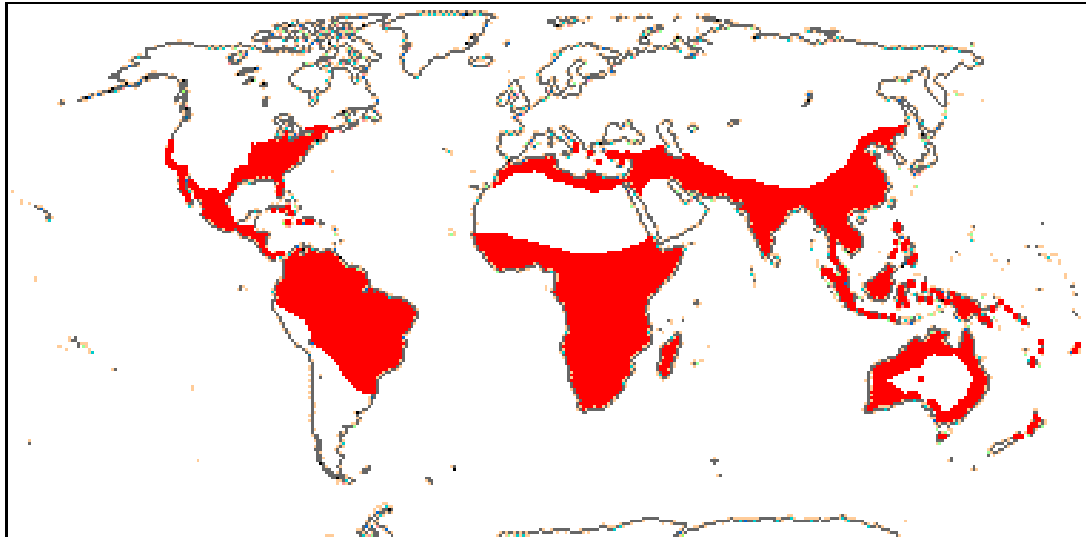


Figure 1 : Carte de répartition mondiale des Lauraceae selon Heywood [Heywood, 1978]

Les principaux caractères morphologiques des Lauraceae sont les suivants :

- **Feuille :**
 - Entière et coriace
 - dépourvue de stipule
- **Fleur :**
 - Jaune ou verte
 - Petite et groupée en inflorescences
 - Réceptacle en forme de coupe
 - sur son bord, un ou deux verticilles de deux ou trois sépales, ainsi que plusieurs verticilles de deux ou trois étamines
 - les anthères s'ouvrent par deux (Lauroïdées) ou quatre (Perséoïdées) pores munis chacun d'un volet
 - le gynécée est invariablement réduit à un pistil unicarpellé et uniovulé, posé sur le fond de l'urne ou de la coupe réceptaculaire.

- **Fruit :**

- baie ou drupe
- Graine exalbuminée
- Entièrement verticillé
- Tendance à l'infériorité : calice placé au-dessous de l'ovaire.

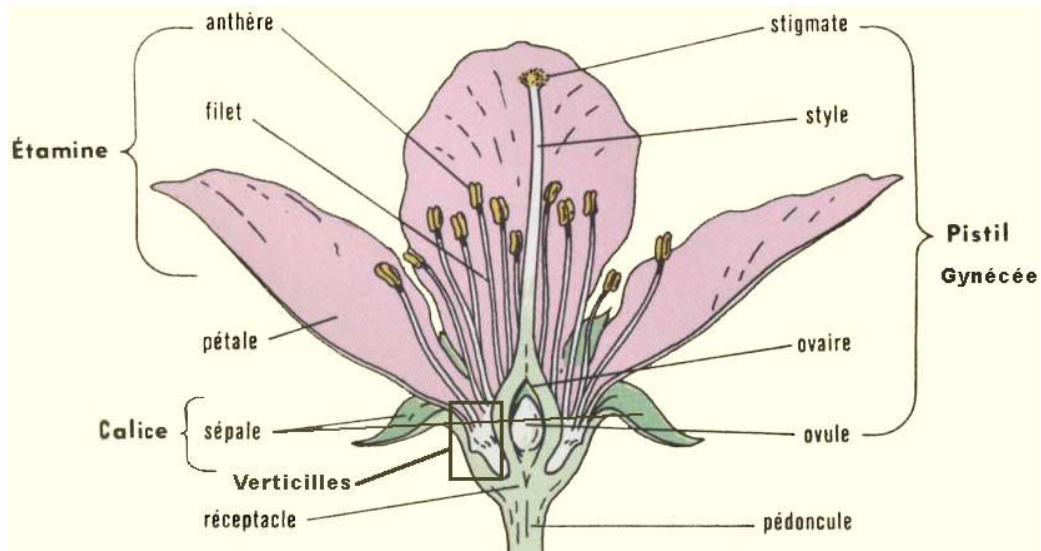


Figure 2 : Schéma d'une fleur de Lauraceae

S'il est assez facile de reconnaître une Lauraceae, en revanche, les critères séparant les genres sont très subtils (distinction entre *Ocotea* et *Nectandra* Annexe 1). Souvent basés sur des particularités des étamines.

1.3. Utilisation traditionnelle et toxicité des Lauraceae

1.3.1. Utilisations non-médicinales

Il existe trois principales utilisations économiques de cette famille de plante :

- Parfumerie : de nombreuses Lauraceae présentent une haute teneur en huiles essentielles et sont des sources de parfums.
 - L'huile essentielle de rose est extraite d'*Aniba rosaeodora*, bois très parfumé originaire d'Amazonie et de Guyane.



Figure 3 : Bois de rose, *Aniba rosaeodora*

- L'huile essentielle de cannelle extraite par hydrodistillation fournit des parfums épicés. Elle est aussi utilisée comme modificateur dans les parfums orientaux. Elle est fabriquée avec l'écorce de *Cinnamomum zeylanicum*, arbre originaire du Sri Lanka.



Figure 4 : Ecorces de cannellier, *Cinnamomum zeylanicum*

- Alimentaire : de manière générale, les fruits des Lauraceae sont riches en corps gras.
 - L'un des plus célèbres est l'avocat, *Persea americana*. C'est un arbre originaire du Mexique, diversifié en de très nombreux cultivars.



Figure 5 : Fruits de l'avocatier, *Persea americana*

- Les Lauraceae sont également utilisées comme épices et condiments : la cannelle, par exemple, est l'une des épices les plus connues au monde. Les feuilles de laurier noble, *Laurus nobilis*, originaire d'Asie Mineure constitue une épice connue.



Figure 6 : Feuilles de Laurier noble, *Laurus nobilis*

- Bois de construction : les écorces dures de plusieurs espèces telles que *Nectandra membranacea*, *Nectandra coriacea* mais aussi *Ocotea*, *Beilschmiedia* et *Cryptocarya* sont sources de bois (planches, poutres pour la construction) pour le bâtiment à travers le monde.

Toxicité

Les Lauraceae ne sont généralement pas des plantes toxiques (voie alimentaire, inhalation, contact etc...). Cependant, le caractère cancérigène des allyl propényl-benzènes, qui composent majoritairement l'huile essentielle de *Sassafras* (*S. albidum*), a été mis en évidence chez le rongeur. Il peut également y avoir des risques liés à une application de l'huile essentielle de cannelle et des problèmes cutanés pour certains travailleurs de l'industrie du bois. Dans la littérature, on souligne la toxicité des feuilles, des écorces de l'avocatier concernant les animaux [Jean Bruneton, 1999]. En effet, les feuilles de l'avocatier contiennent de la persine **1**, dérivé d'acide gras toxique qui peut causer la mort [Appleman, O. 1944 ; Fuller T.C. 1986].

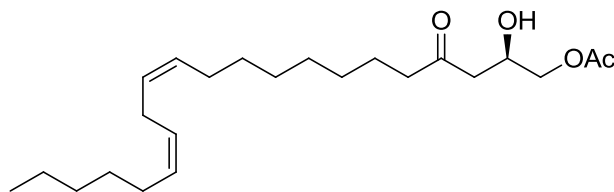


Figure 7: Structure de la persine (1)

Le tableau ci-dessous présente les multiples usages traditionnels non-médicinaux de quelques Lauraceae.

Tableau 3 : Quelques utilisations non-médicinales répertoriées des Lauraceae. [Jean Bruneton; Christian Ouensanga, Palikur Wayasi et *al.* 1999].

Plante	Organes	Utilisations	Origine
<i>Persea americana</i>	Fruits	Alimentation huile : produits cosmétiques, élimine les pellicules...	Amérique
	Bois	Bois de construction	
	Feuilles, Bourgeons et Boutons de fleurs	Bains aromatiques	
<i>Cinnamomum verum</i>	Écorces séchées	Teinture de cannelle, épices	Inde
	Huiles Essentielles	Parfumerie, aromatique	
<i>Cinnamomum camphora</i>	Bois	Parfumerie, épices	Extrême Orient
<i>Ocotea odorifera</i>	Bois	Huile de sassafras, mobilier, bâtiment	Brésil
<i>Aniba rosaeodora</i>	Bois, feuilles	Huile essentielle	Brésil Guyane
	Racines	Parfumerie, savonnerie	
	Bois	Bois d'œuvre, meuble, construction, bateaux, canoës, placards, outils agricoles...	
<i>Chlorocardium rodie</i>	Bois	Bois d'œuvre : navire, embarcadères, poteaux d'habitations	Brésil
<i>Licaria canella</i>	Ecorces	Épice, décoction: aphrodisiaque	Guyane
<i>Ocotea cymbarum</i>	Tronc	Fabrication huile de <i>sassafras</i> de Santa Catarina	Brésil
<i>Mezilaurus itauba</i>	Bois	Bois d'œuvre : construction d'extérieur, coffres, meubles, placage de décoration	Brésil
	Fruits	Cosmétique	

1.3.2. Utilisations médicinales

La famille des Lauraceae présente aussi de nombreuses propriétés médicinales. Quelques unes sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Quelques utilisations médicinales répertoriées de Lauraceae.

[Jean Bruneton 1999, Weniger 1996]

Plante	Organe	Utilisations	Origine
<i>Cinnamomum verum</i>	Ecorces	Antibactérienne à large spectre et à action puissante, antifongiques, antifermentaires, aphrodisiaques, antiparasitaires, antivirales, antiseptiques, emménagogues, hyperémiantes (provoque afflux sanguin)	Océan Indien
	Huiles Essentielles	Infections urinaires, antivirales, bactéricides	
<i>Cinnamomum aromaticum</i>	Ecorces	Vertus stomachiques (digestion facilitée), anti-douleurs (abdominales)	Chine
<i>Sassafras albidum</i>	Ecorces	Huiles essentielles	USA
	Racines	Carminatifs, diurétiques, antiseptiques, rhumatismes, éruptions cutanées	
<i>Persea americana</i>	Bourgeons des branches	Soulagement de la vérole	Amérique centrale
	Fruits	Arrêt de la dysenterie, recommandée pour les diabétiques	
	Feuilles	Traitements hypertensions, affections gastro-intestinales, troubles hépatiques, états grippaux, antidiarrhéiques, anti-inflammatoires	
	Huile et pulpe	Stimulants phagocytaires	
	Fruits	Annémorhées	
<i>Aniba rosaeodora</i>	Bois	Anti-infectieuses, infections ORL, (oto-rhino-laryngologie) broncho-pulmonaires	Amérique du Sud
<i>Laurus nobilis</i>	Feuilles	Infections respiratoires, gripes, aphtes, colites, arthrites, spasmes	Europe
<i>Ravensara aromatica</i>	Feuilles	Actives sur virus, rétrovirus, état grippaux, facilite le sommeil	Océan Indien
<i>Cassytha filiformis</i>	Plante	Décoction : affections dermatologiques, rougeurs, plaies, troubles circulatoires dus à la ménopause, contre hypertensions, rhumatismes, coliques	Europe

2. Les *Nectandra*

Nectandra est le deuxième genre le plus important des Lauraceae après *Ocotea*. (Tableau récapitulatif des espèces Annexe 2).

2.1. Classification et répartition géographique des *Nectandra*

La classification botanique des *Nectandra* est présentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Classification botanique de *Nectandra* [APG III 2009]

Classification botanique du genre	
Embranchement	Spermatophytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Magnolidae
Ordre	Laurales
Famille	Lauraceae
Genre	<i>Nectandra</i>

Nectandra est restreint aux régions tropicales et subtropicales de l'Amérique, la plupart des espèces étant localisées entre les tropiques du Cancer et du Capricorne. Les espèces de ce genre se retrouvent dans la plupart des habitats qui permettent la croissance des arbres à feuilles persistantes, comme les forêts tropicales humides et inondées. Dans les sols de glaise riches ou pauvres en nutriments, ainsi que dans les sables blancs d'Amazonie on retrouve en particulier des bois à feuilles caduques [Rohwer, 1958].

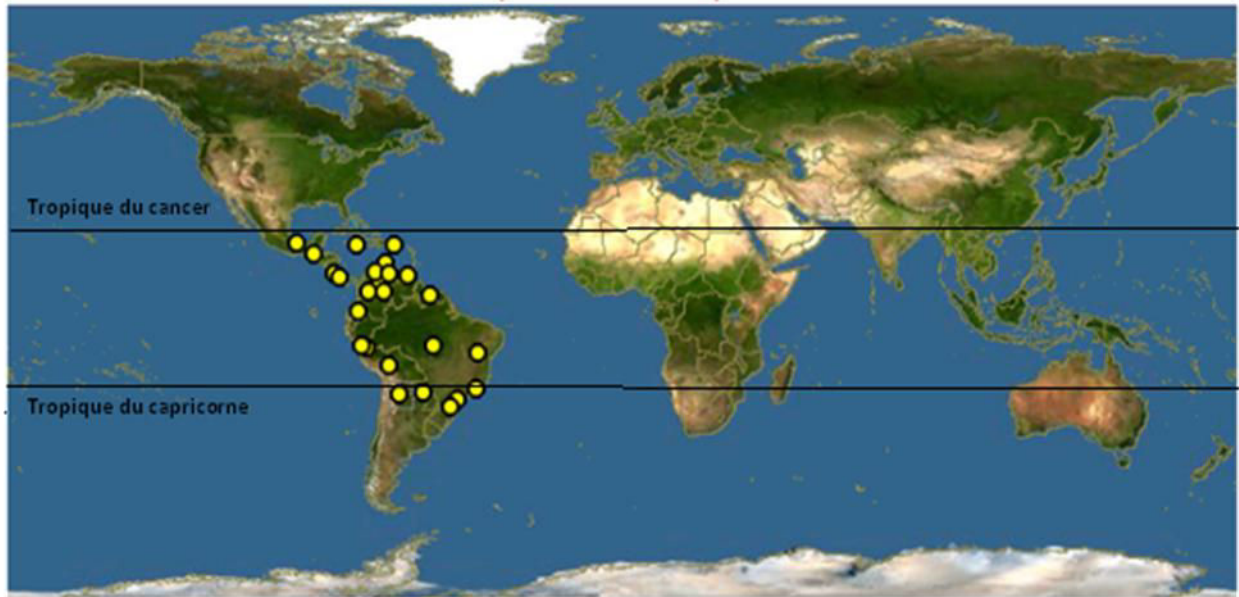


Figure 8 : Carte de la répartition des *Nectandra* dans le monde :
International Biogeography Society 2013

2.2. Caractères morphologiques

Les espèces du genre *Nectandra* sont habituellement des arbres, mais beaucoup d'entre elles peuvent aussi se développer comme des arbustes. On retrouve parfois dans les habitats secs ou dans les hautes altitudes, des formes naines, qui lors de la floraison atteignent seulement un mètre de hauteur. Les arbres les plus grands atteignent quarante mètres de haut. Mais on retrouve plus couramment des arbres d'environ huit mètres.

La plupart des espèces ont une écorce grise relativement lisse, souvent avec de grandes lenticelles. Sur les grands troncs, l'écorce devient souvent squameuse (en forme d'écailles). Les jeunes brindilles sont souvent plus ou moins angulaires, tandis que les feuilles restent entières et pétiolées (voir figure 9 : *N. dominicana*) [Rohwer, 1958].

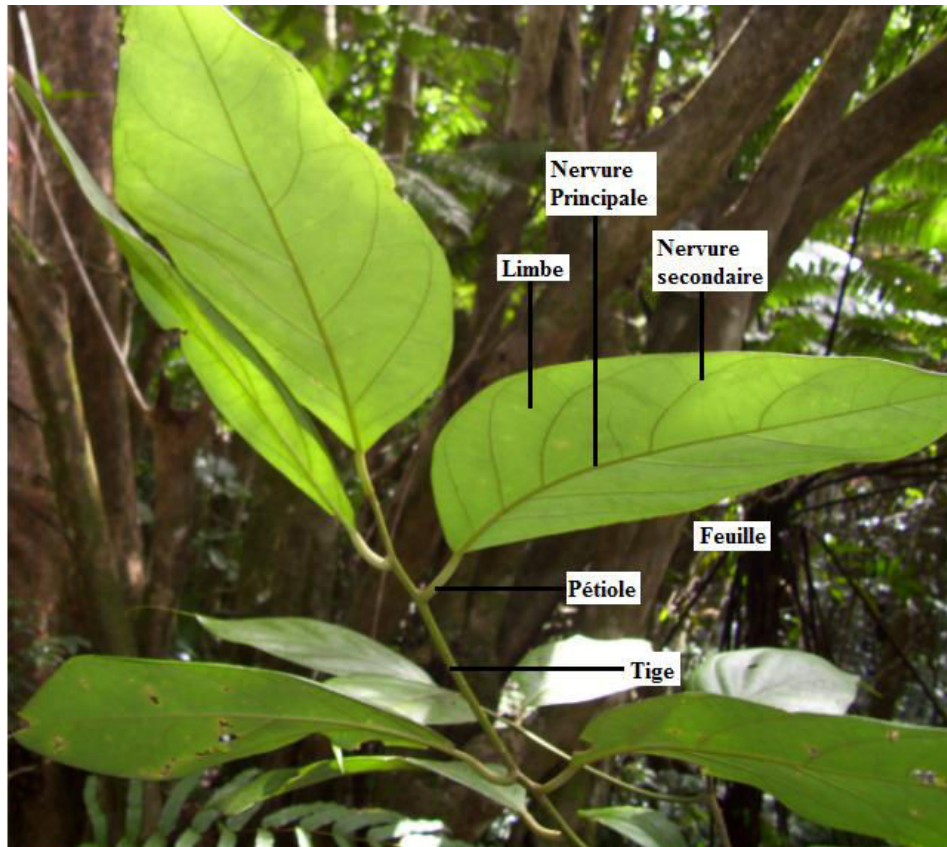


Figure 9 : *Nectandra dominicana* (Guadeloupe)

Trace des Etangs Basse-Terre
Josianny JOSEPH-ANGELIQUE

DESCRIPTION SELON ROHWER [Rohwer 1958]

- **Feuilles**
 - Entières
 - Alternées
 - Glabres
- **Inflorescences**
 - Rarement en forme de grappes
 - se développent de la base vers le haut
- **Fleurs**
 - Bisexuelles
 - Actinomorphes (symétrie radiale)
 - 3 à 17 mm de diamètre
 - Six tépales égaux
 - Papillosoes (petite excroissance charnue) à l'intérieur de la surface, en général blanches, parfois jaunâtres ou grisâtres, rarement roses
 - 9 étamines, attachées par la base sans pédoncule ou avec des filaments apicales habituellement papilleuses (parsemées de papilles)
 - Sacs de pollen par anthères, arrangés plus ou moins en un arc horizontal, parfois par paire, l'une au-dessus de l'autre.
 - 3 staminodes, alternés à l'intérieur d'étamines, toujours distincts
- **Fruit**
 - Baie ensemencée ou drupe, habituellement noire, brunâtre pourpre à la maturité, entourée en général d'un réceptacle rouge.



Figure 10 : Fleur de *Nectandra lineata*
Smithsonian Tropical Research Institute 2003-2006

3. Composition chimique des espèces de *Nectandra*

Quatre grandes familles de molécules ont été mises en évidence dans le genre *Nectandra* :

- les terpènes (dont les huiles essentielles)
- les lipides
- les composés phénoliques : phénols, lignanes, flavonoïdes, tanins
- les alcaloïdes.

Après une présentation générale de chacune de ces familles, nous présenterons les métabolites retrouvés dans le genre.

3.1. Terpènes (huiles essentielles)

3.1.1. Rôle physiologique et localisation

Beaucoup de plantes produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans le processus de la vie de la plante est inconnu [Rai, 2003]. Certains effets apparents ont été décrits dont celui de la protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides, bactéricides et contre les herbivores par le goût ainsi que les effets défavorables sur le système nerveux [Porter, 2001]. La plante utilise aussi les huiles essentielles pour repousser les prédateurs ou attirer les insectes afin de favoriser la pollinisation. L'essence est aussi considérée comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques [Belaïche, 1979].

3.1.2. Huiles Essentielles des *Nectandra*

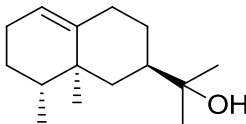
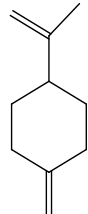
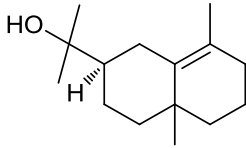
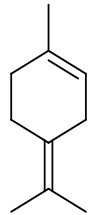
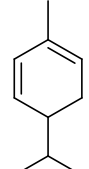
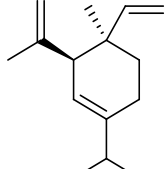
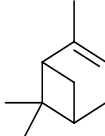
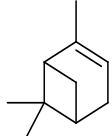
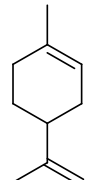
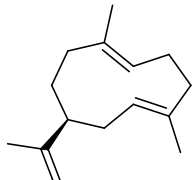
Avec les espèces qui produisent des fleurs (*N. coriacea*, *N. cissiflora*, *N. reticulata*) et celles qui fournissent un bois odorant (*Nectandra dominicana*, de nom local « bois doux muscade »), le genre *Nectandra* semble riche en huiles essentielles. Les huiles essentielles se retrouvent au niveau de toutes les parties de la plante : feuilles, écorces, fruits. Elles se composent principalement de mono et de sesquiterpènes ainsi que de leurs dérivés oxygénés.

Dans la littérature très peu de travaux ont été réalisés sur les huiles essentielles des *Nectandra*.

Morais et son équipe, indiquent que l' α - et le β -phellandrène (72,8 %) sont les composés majoritaires de l'huile essentielle de *N. rigida* (Kunth) Nees [Morais et al. 1972].

A titre d'exemple, le tableau suivant présente les principaux constituants des huiles essentielles de deux *Nectandra* : *N. coriacea* [Jorge A.Pino et al. 2005] et *N. angustifolia* [Torres et al. 2005].

Tableau 6 : Composés chimiques majoritaires des H.E. de *Nectandra coriacea* [Jorge A.Pino et al. 2005] et *Nectandra angustifolia* [Torres et al. 2005]

Composition chimique des feuilles de <i>N. coriacea</i>	%	Formules	Composition chimique des feuilles de <i>N. angustifolia</i>	%	Formules
1 Valérianol	16,7		2 p-menta-1(7)8-diène	25,2	
3 γ -eudesmol	12,3		4 α -terpinolène	20,9	
5 α -phellandrène	7,2		6 δ -élémente	6,8	
7 α -pinène	6,4		α -pinène	10	
8 limonène	4,3		9 germacrène D	5,2	

L'huile essentielle de l'espèce *N. angustifolia* Nees présentée ci-dessus est de couleur jaune citron. Elle est très riche en hydrocarbures monoterpéniques (72%), avec notamment le p-menta-1(7)-8-diène **2** (25,2%) et l' α -terpinolène **4** (20,9%) qui lui confèrent une densité faible [TORRES et al. 2005].

Les composés sesquiterpéniques représentent moins de 20% et les composés oxygénés sont faiblement représentés, ce qui fait de cette huile essentielle une essence très volatile.

En 1999, Valley et Scora, identifient dans l'huile essentielle des fruits de *N. umbrosa* (Kunth) Mez., deux sesquiterpènes oxygénés et un non oxygéné majeur représentant à eux trois 54% des composés : le cadinol **10**, le germacrène B **11** et le spatuléol **12** [Valley et Scora, 1999].

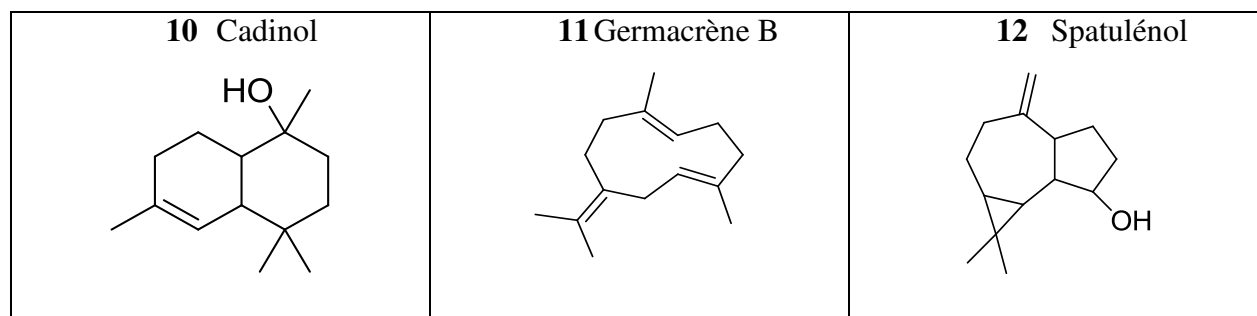
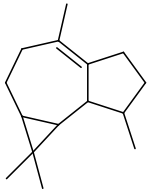
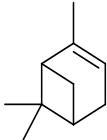
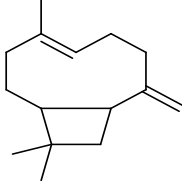
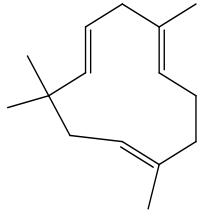
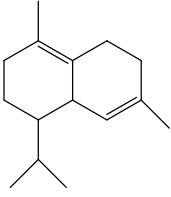
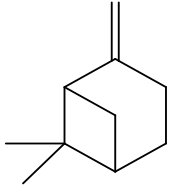
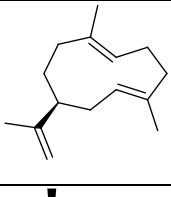
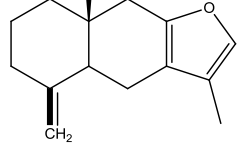
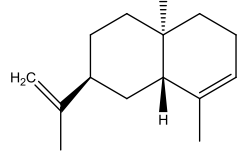


Figure 11 : Composés retrouvés dans l'H.E des fruits de *N. umbrosa*

Les volatils de *N. salicina* ont également été étudiés. Les composés chimiques majeurs des huiles essentielles des feuilles et des branches sont présentés dans le tableau suivant [Chaverri et Ciccio, 2009].

Tableau 7 : Composés chimiques majeurs de l'HE de *Nectandra salicina* [Chaverri et Ciccio, 2009].

Composés	Feuilles (%)	Branches (%)	Formules
13 Viridiflorène	10,1	7,9	
7 α -pinène	9,4		
14 β -caryophyllène	7,2		

15 α -humulène	7,0		
16 δ -cadinène	6,1		
17 β -pinène	6,0		
9 Germacrène D	5,8	10,7	
18 Attractylone	14,6	21,1	
19 7-épi- α -sélinène		5,0	
TOTAL	66,2%	44,7%	

Il y a 37 composés majeurs dans l'huile essentielle des feuilles soit 66,2% sur un total de 92,6%. Dans l'essence des écorces, 42 composés majoritaires, soit 44,7%, ont été identifiés sur un total de 86,2%. Des sesquiterpènes sont aussi retrouvés dans le genre *Nectandra*, le plus fréquent est l'acide costique **20** isolé des écorces de *Nectandra membranacea* [Xiujun Wu et al. 2006], *N. grandiflora* [Moreno and al.1993] et *N. cissiflora* [Feranda R. et al. 2010]. L'acide 3-isocostique **21** a aussi été isolé de *N. cissiflora* et de *N. membranacea*.

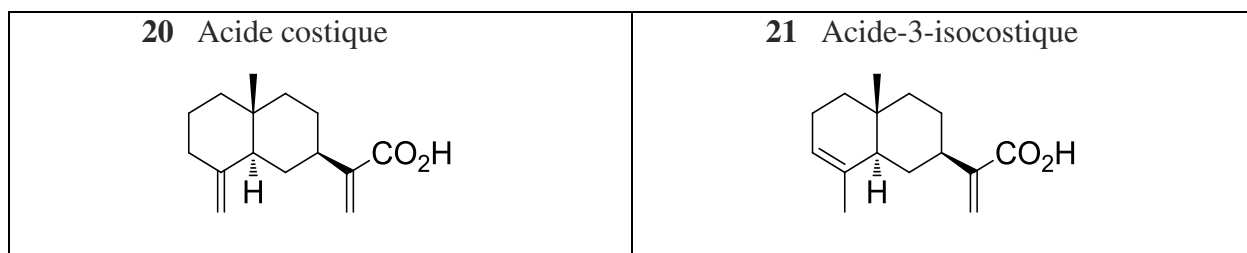


Figure 12 : Sesquiterpènes de *Nectandra*

Deux nouveaux sesquiterpènes de type cadinane ont été isolés des feuilles de *N. amazonum*, rel-(4S, 6)-cadinane-1(10), 7(11)-diène **22** et rel-(1R, 4S, 6S, 10S)-cadin-7(11)-en-10-ol **23** [Cuca Luis E. 2013].

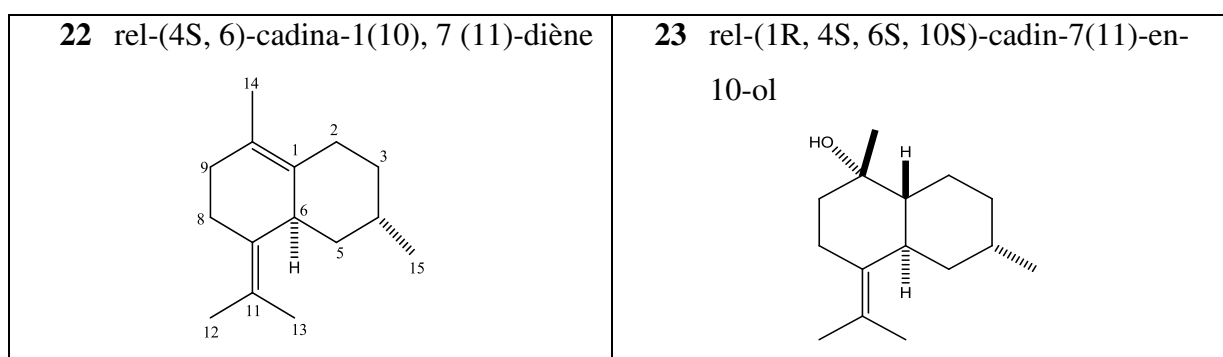


Figure 13 : Sesquiterpènes isolés des feuilles de *N. amazonum*

D'autres sesquiterpènes du même type sont aussi identifiés tels que le δ -cadinène **16**, l' α -cadinène **24**, le torrèyol **25** et l' α -cadinol **26** [Cuca Luis E, 2013].

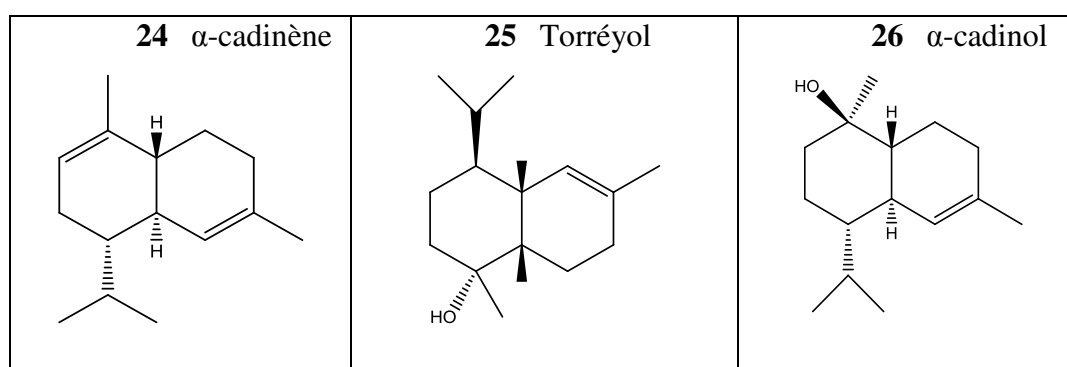


Figure 14 : Sesquiterpènes isolés chez *N. amazonum*

Tous ces résultats récents montrent un intérêt pour le genre *Nectandra* en matière de terpénoïdes.

3.2. Les lipides chez les *Nectandra*

Les lipides sont des corps gras c'est-à-dire des molécules hydrophobes ou amphipathiques (une partie hydrophobe et une partie hydrophile). Ils sont solubles dans les solvants organiques non polaires et se classent en deux grandes catégories :

- les lipides à base d'acide gras qui comprennent : les acides gras, les lipides simples et les lipides complexes
- et les lipides à base d'isoprène : terpénoïdes, caroténoïdes, quinone à chaîne isoprénique, stéroïdes et tocophérols.

Chez les *Nectandra*, quelques triglycérides ont été isolés comme les triglycérides de l'acide oléique **27**, de l'acide palmitique **28**, et de l'acide linoléique **29** dans les feuilles de *Nectandra gardneri* [Fernanda R. et al., 1999].

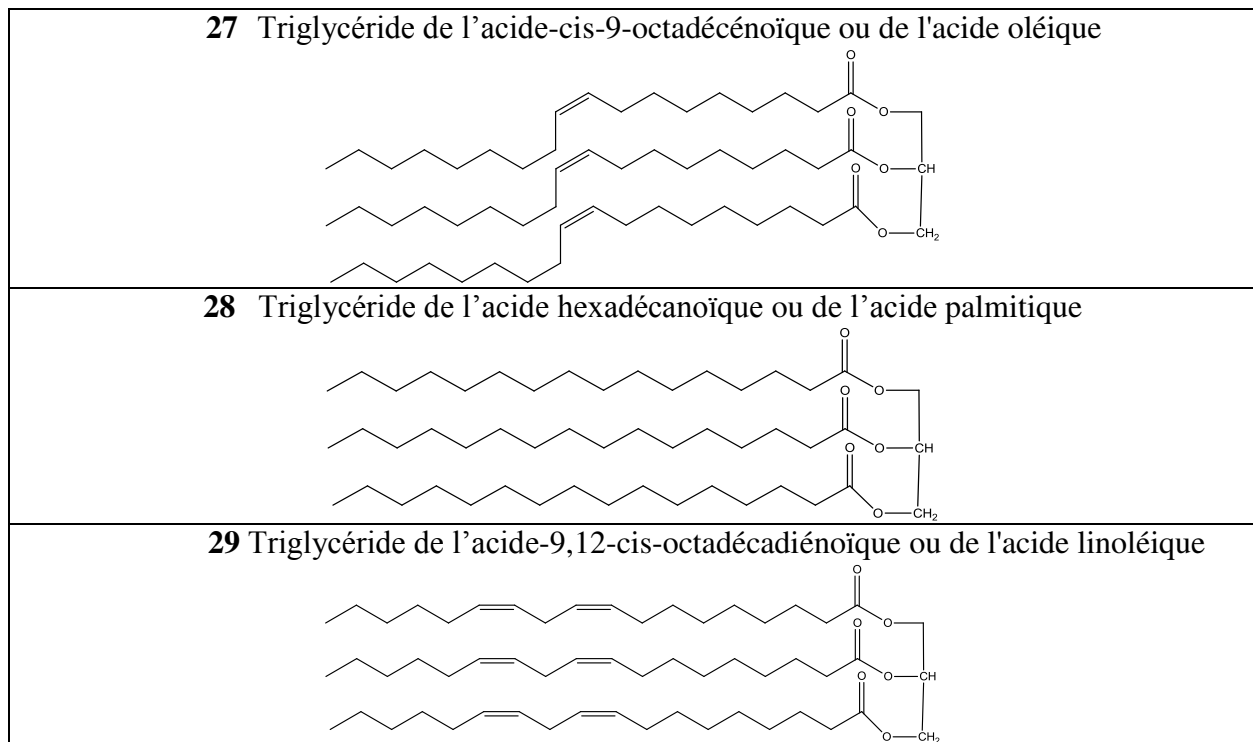


Figure 15 : Structure de quelques triglycérides [Fernanda R. et al. 1999]

Les phytostérols sont aussi présents dans le genre *Nectandra*. Ce sont des stérols présents naturellement dans les plantes, qui possèdent des propriétés antioxydantes et anti-polymériques [Smadi, 2007].

On peut citer le stigmastérol **30** et le β -sitostérol **31** isolés des calices des fruits et des feuilles de *N. amazonum* [Ahmad et al., 1992. β -sitostérol a aussi été isolé à partir du bois de *N. polita* [Margoth Suarez et al., 1983] et des fruits de *N. glabrescens* [José M. Barbosa-Filho et al.1991]. Ces deux stérols sont décrits comme hypocholestérolémiant [José M. Barbosa-Filho et al.1991].

Plusieurs travaux de recherche indiquent que le stigmastérol et β -sitostérol peuvent être utiles dans la prévention de certains cancers : ovaires, prostate, sein et colon [Klippel KF, et al. 1997 ; Carbin BE et al. 1990 ; Wilt TJ et al. 1999 ; Awad AB and al. 2000 ; Awad AB et al. 1996 ; Awad AB, et al. 1998]. La société Upjohn utilise le stigmastérol comme matériau brut pour la synthèse de la cortisone. [Hogg, John A. 1992 ; Soy Infocenter 2009].

Une étude menée par l'organisme scientifique European Food Safety Authority [Efsa, 2012] a évalué les dangers de l'utilisation des végétaux riches en stigmastérol dans les additifs alimentaires et les sources de nutriments ajoutés aux aliments. Cette étude a conclu que ce stérol peut être utilisé sans danger comme stabilisateur dans les cocktails alcoolisés.

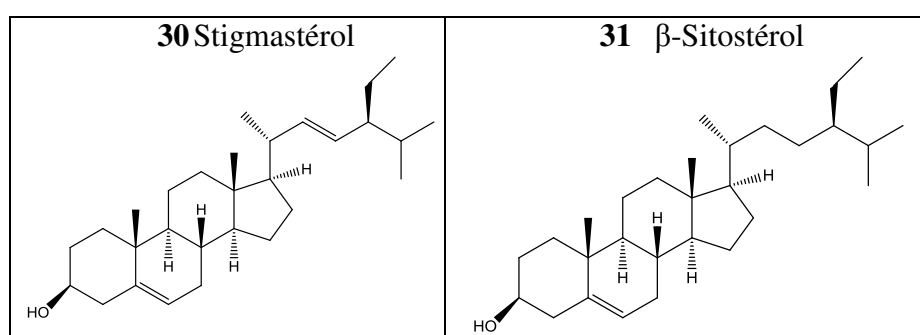


Figure 16 : Structure de quelques stérols

3.3. Les composés phénoliques simples

Les composés phénoliques naturels constituent un ensemble de molécules très répandues dans le règne végétal. Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes et ont un effet bénéfique pour la santé. Ces composés ne sont pas synthétisés en priorité par la plante.

Les composés phénoliques font actuellement l'objet d'une littérature abondante compte-tenu de leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires ou anti-viraux [Chung et al., 1998], croissance

cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation [Nitsch et *al.*, 1961 ; Alibert et *al.*, 1977].

Ils sont également utilisés comme additif dans l'industrie agroalimentaire [Reynaud C. et *al.* 2013].

Les polyphénols présentent une grande diversité avec plus de 8000 composés phénoliques dont 5000 appartenant à la sous-classe des flavonoïdes [Bravo, 1998]. On distingue trois grands groupes : composés phénoliques simples, les flavonoïdes, et les tanins.

3.3.1. Les phénylpropanoïdes

Aucune étude n'a rapporté la présence de ces composés chez *Nectandra membranacea*. Par contre, des phénylpropanoïdes ont été isolés dans plusieurs autres espèces de *Nectandra*.

A partir de l'écorce du tronc de *N. megapotamica*, quatre phénylpropanoïdes ont été isolés et identifiés : élémicine **32**, isoélémicine **33**, (±) érythro-1-(3,4,5-triméthoxyphényl)-1,2-propanediol **34**, et le (±) thréo-1-(3,4,5-triméthoxyphényl)-1,2-propanediol **35** [Fernanda R. Garcez et *al.*, 2009].

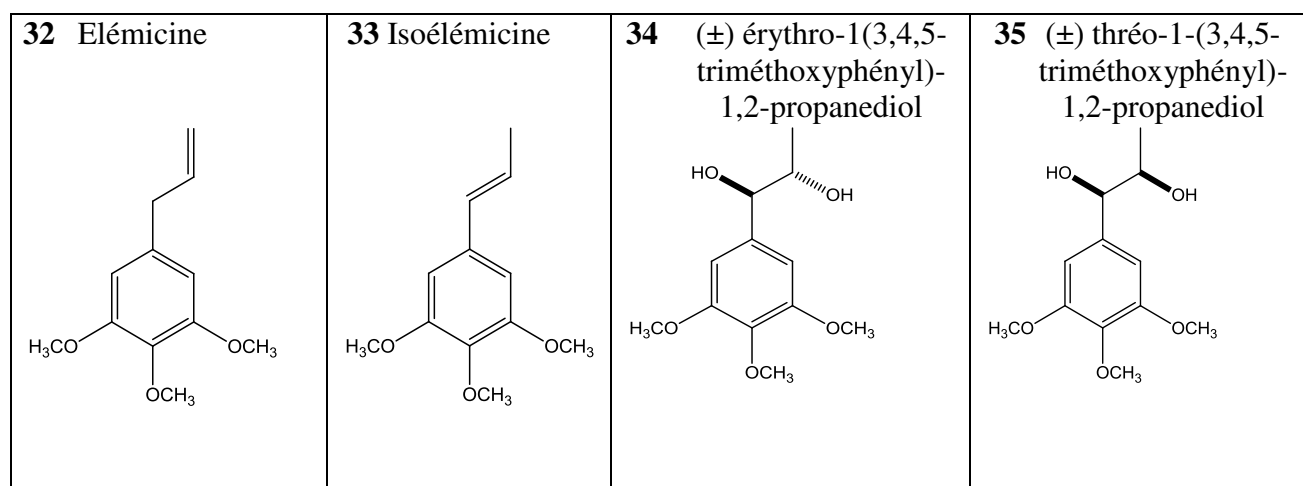
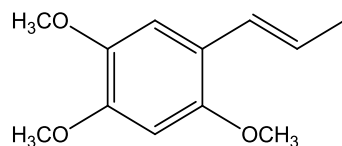


Figure 17 : Phénylpropanoïdes chez *N. megapotamica*

Un phénylpropanène très actif a été isolé des écorces de cette même *Nectandra* : il s'agit de l' α -asarone **36**, composé hépatotoxique et cancérigène [Lopez et *al.*, 1993].



36 α -aarone

D'autres phénylpropanoïdes ont été isolés comme le safrol **37**, l'isosafrol **38**, l'eugénol **39**, l'isoeugenol **40**, dans les fruits de *N. glabrescens* [José M., Barbosa-Filho et al., 1989].

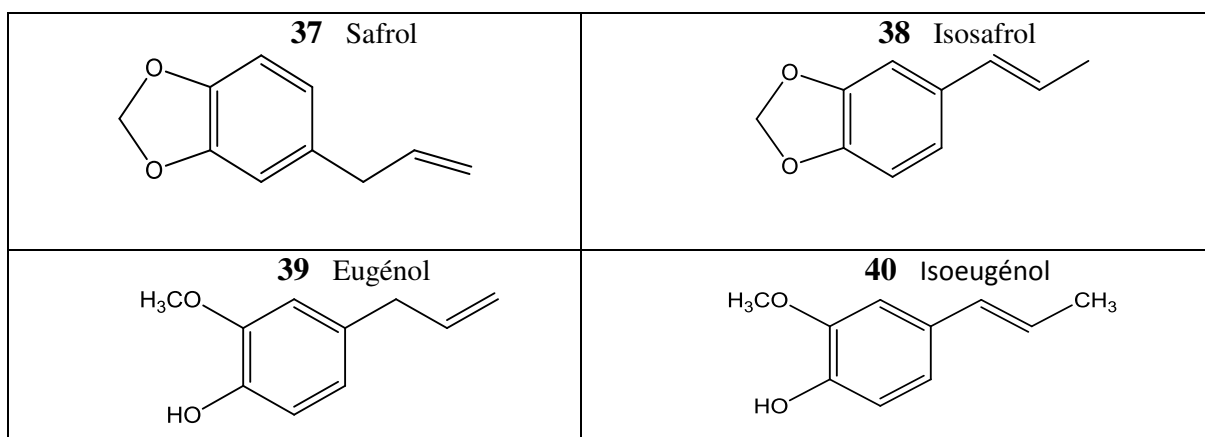
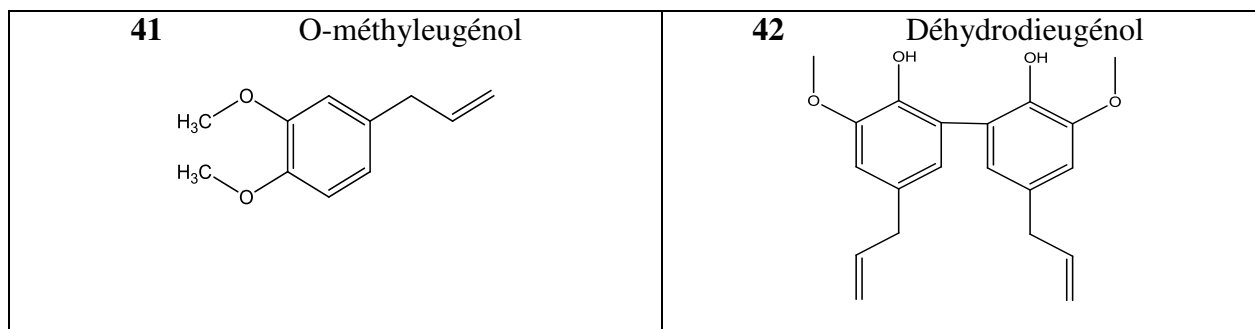


Figure 18 : Phénylpropanoïdes de *N. glabrescens*

L'étude du tronc de *N. polita* a permis d'établir la présence d'eugénol, du O-méthyleugénol **41**, du déhydrodieugénol **42**, du O-méthyldehydrodieugenol **43** et du di-O-méthyldehydrodieugenol **44** [Margoth Suarez et al., 1983]. Les structures sont présentées à la figure 19.



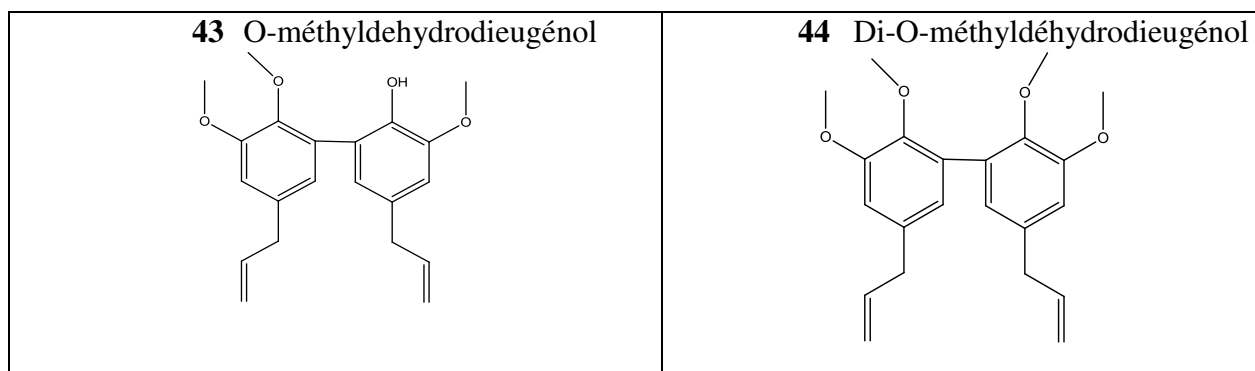


Figure 19 : Phénylpropanoïdes de *N. polita*

3.3.2. Les lignanes et les néolignanes

Les lignanes sont des dimères de phénylpropanoïdes (2 unités C₆-C₃) dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones β-β' (liaison 8-8').

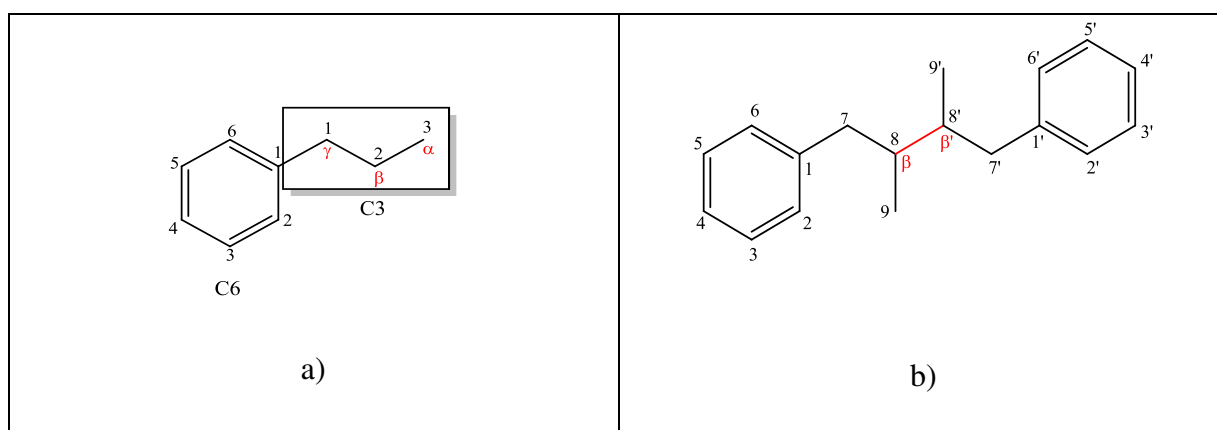
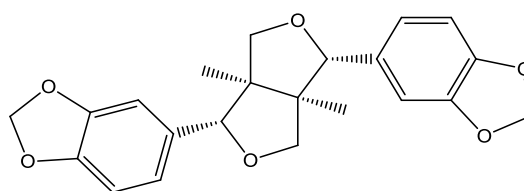


Figure 20 : a) unité C₆-C₃ ; b) Structure des lignanes

3.3.2.1. Lignanes, néolignanes et norlignanes chez les *Nectandra*

Les Lauraceae et le genre *Nectandra* sont riches en lignanes. La sésamine **45** (lignane que l'on retrouve dans les graines de sésame) a été isolé et identifié à partir des calices des fruits de *N. amazonum* [Mario G. José M. Barbosa-Filho 1989] et des écorces du tronc de *N. turbacensis* [De Carvalho, 1989]. De même, chez *N. megapotamica* ont été identifiés la galgavine **46**, la machiline G **47**, les nectandrines A **48** et B **49**, la veraguensine **50**, l'aristolignine **51**, la calopiptine **52** et la ganschisandrine **53** [Asai M. Lee J.W et al., 2012].



45 Sésamine

- 46** Galgravine: R= R₁= R₃= OCH₃; R₂= H
47 Machiline G : R= R₁= OCH₂; R₃=OCH₃; R₂= H
48 Nectandrine A : R₁= OH; R=R₃=OCH₃; R₂= H
49 Nectandrine B : R= OCH₃ ; R₁=R₃=OH; R₂= H
50 Veraguensine: R= R₁=R₃= OCH₃, =OH; R₂= H.
51 Aristolignine : R= R₃= OCH₃, R₁=OH; R₂= H
52 Calopiptine : R= R₁= OCH₂O; R₂=H; R₃= OCH₃
53 Ganschisandrine: R= R₁= R₃= OCH₃; R₂= H

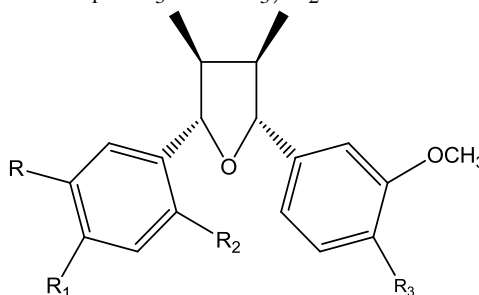


Figure 21 : Structure de lignanes présents dans le genre *Nectandra*

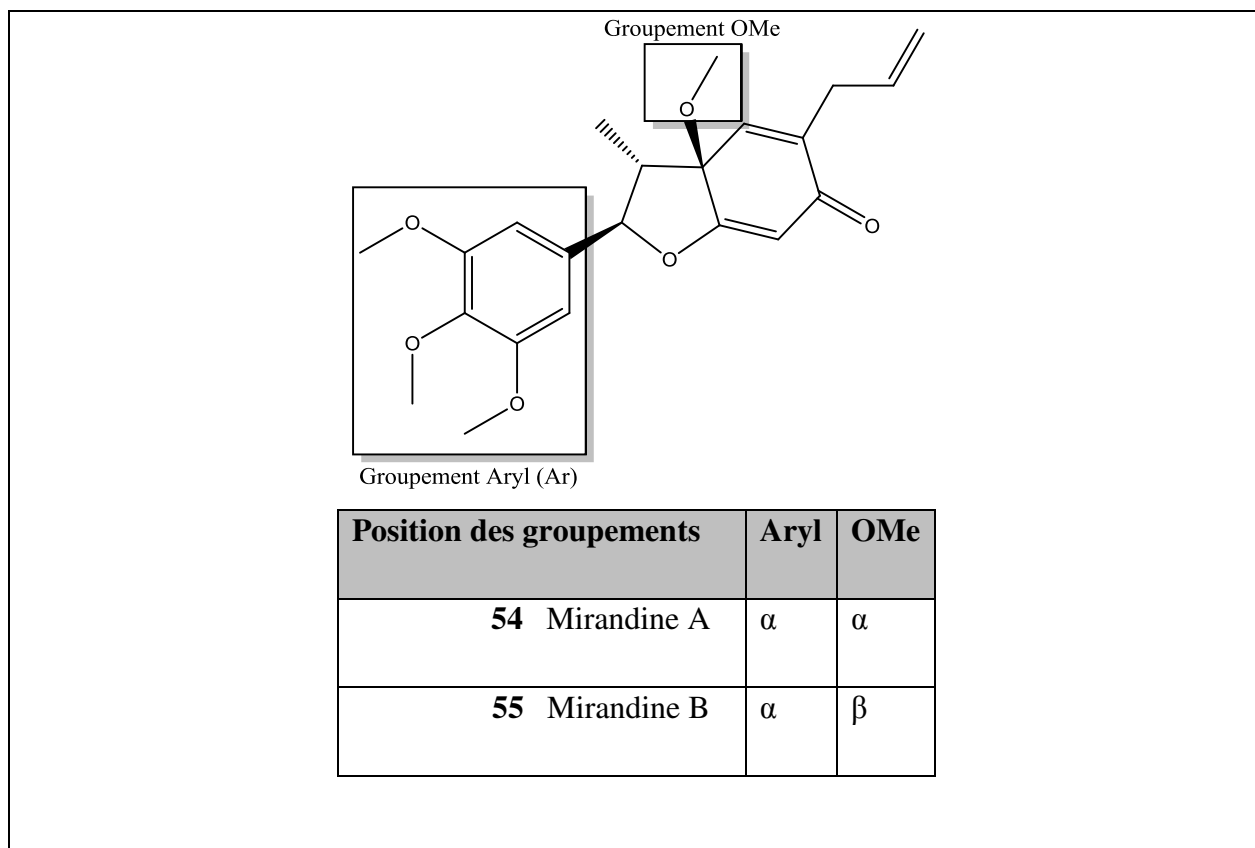
Les lignanes possèdent de nombreuses activités biologiques intéressantes. Ce sont des molécules ayant des propriétés antitumorales [Giorgi-Renault 2005], insecticides [Saguez J. et al.2013].

Ainsi les travaux d'Asai et de son équipe, ont montré que la galgravine et la veraguensine isolées de *N. megapotamica* offraient de nouvelles possibilités pour le traitement des maladies des os comme l'ostéoporose. [Asai M. Lee JW. et al., 2012].

La machiline G, identifiée des feuilles de *N. megapotamica*, présente une activité trypanocide élevée avec un IC₅₀ de 2,2 µM et lyse à 94 % des parasites à 32 µM. Les autres lignanes isolés de cette espèce présentent une activité trypanocide moyenne : la galgravine, la nectandrine B, la calopiptine, la veraguensine, l'aristolignine et la ganschisandrine tandis que la nectandrine A est inactive.

Les néolignanes sont également très répandus chez les Lauraceae. Les plus fréquemment rencontrés sont :

- les mirandines A **54** et B **55**, (2S, 3S, 3aS) et (2S, 3S, 3aR)-5-allyl-3a-méthoxy-2-(3',4',5'-triméthoxyphényl)-3-méthyl-2,3,3a,6-tétrahydro-6-oxobenzofurane isolées du tronc de *Nectandra miranda* [Cacilda J. Aiba et al., 1977].
- Les nectamazines A **56**, B **57** et C **58**, la licarine A **59**, l'acuminatine **60**, la denudatine B **61**, le lilifol B **62**, le macrophylline B **63**, le denudanolide D **64**, et la kadsurenine C **65** isolés des feuilles de *N. amazonum*.
- Des néolignanes de type dihydrobenzofurane ont été retrouvés dans les fruits de *N. glabrescens* [Barbosa-Filho et al. 1989].



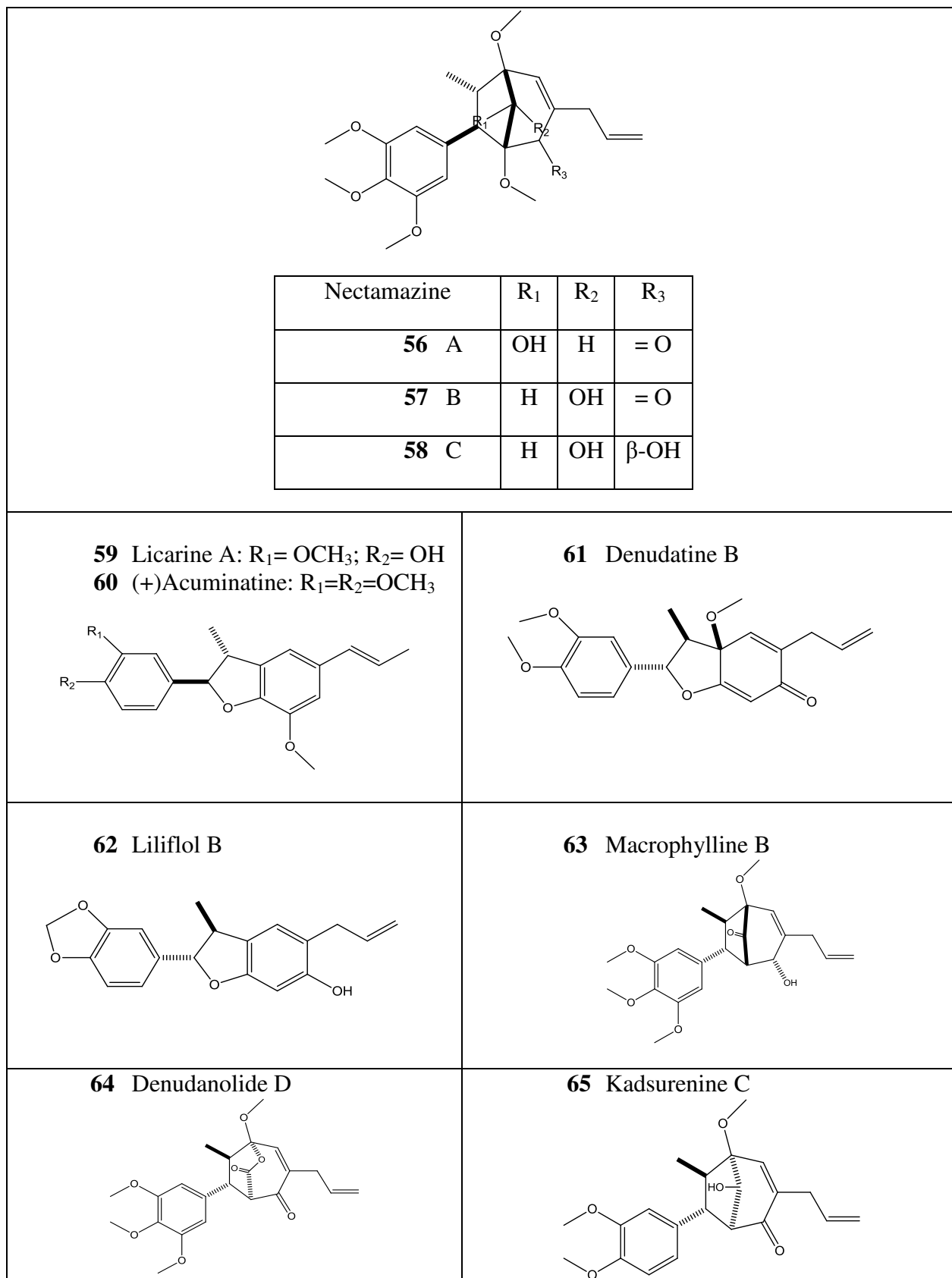
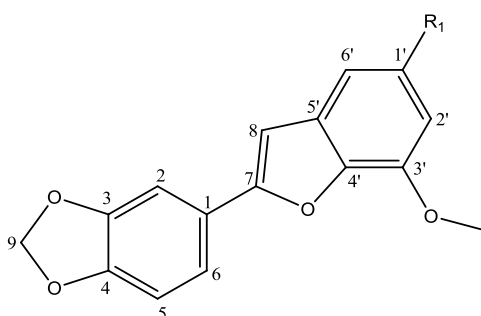


Figure 22: Structure de néolignanes présents dans le genre *Nectandra*

L'extrait des feuilles de *N. lineata* s'est révélé très actif ($IC_{50} = 5\mu\text{g/mL}$) sur *Trypanosoma cruzi*, parasite provoquant des trypanosomiasis chez l'Homme et les animaux en Amérique du Sud. Ce parasite est transmis par des fèces de réduves (punaises).

Le fractionnement a été réalisé et deux norlignanes ont été isolés, le 3-méthoxy-3,4-méthylènedioxy-4',7-époxy-9-nor-8,5'-néolignane-9'-acétoxy **66**, et le 3'-méthoxy-3,4-méthylènedioxy-4'-7-époxy-9-nor-8,5'-néolignane-7,8'-diène **67**. Le premier norlignane a montré une activité beaucoup moins élevée contre le parasite ($IC_{50} = 40,86\ \mu\text{g/mL}$) que le second ($IC_{50} = 18,6\ \mu\text{g/mL}$) [Lilia Cherigo, 2005].



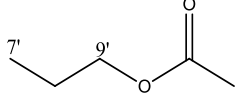
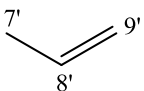
3'-méthoxy-3,4-méthylènedioxy-4',7-époxy-9'-acétoxy-9-nor-8,5'-néolignan-	$R_1 =$  66
3'-méthoxy-3,4-méthylènedioxy-4'-7-époxy-9-nor-8,5'-néolignan-7,8'-diène	$R_1 =$  67

Figure 23 : Structure des norlignanes isolés des feuilles de *N. lineata*

3.3.3. Les lactones

Les lactones sont des composés cycliques formés par estérification intramoléculaire d'un acide hydroxylé conduisant à un ester cyclique, avec élimination d'eau. Les lactones sesquiterpéniques appartiennent à la classe des terpènes et sont formés de trois unités isopréniques.

Selon la taille du cycle, on trouve des β - **68**, γ - **69** ou δ -lactones **70**.

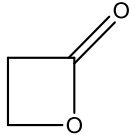
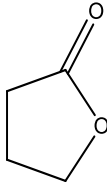
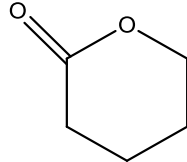
68 β -lactone hétérocycle à 4 chaînons	69 γ -butyrolactone hétérocycle à 5 chaînons	70 δ -valérolactone hétérocycle à 6 chaînons
		

Figure 24 : Structure de lactones

Les cycles à 5 atomes de carbones ou 6 chaînons en comptant l'oxygène sont les plus stables. Ce sont les γ -lactones qui sont le plus couramment rencontrées parmi les lactones à petit cycle. Les lactones de faible masse moléculaire sont des liquides d'odeur agréable. Les lactones à grand cycle possèdent des propriétés odorantes particulières, odeur de musc très pénétrante (cycles de 14 à 18 chaînons) et sont toutes très stables [Surdin Dina, 2013]. De nombreux produits naturels contiennent un cycle lactonique qui joue un rôle très important dans leurs propriétés physiologiques (insecticides [Surdin Dina, 2013], potentiels thérapeutiques et anticancéreux avec l'isolancifolide **104** [Choi JJ, 2012]).

3.3.3.1. Lactones des *Nectandra*

Parmi les lactones les plus fréquentes rencontrées dans le genre *Nectandra*, on peut citer

- L'isolancifolide **71**, la fraxidine **72**, la fraxidine-8-O- β -D-glucopyranoside **73** et la scopolétine **74** isolés de *Nectandra gardneri* [Fernanda R. Garcez et al., 1999].

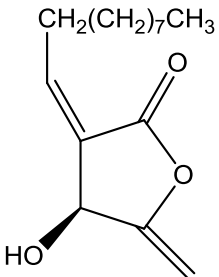
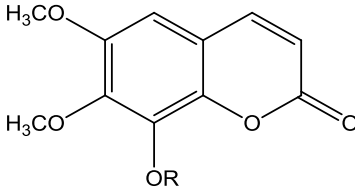
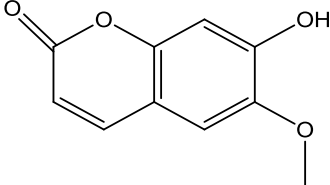
<p data-bbox="336 1473 576 1503">71 Isolancifolide</p> 	<p data-bbox="655 1473 943 1503">72 R= H : Fraxidine</p> <p data-bbox="655 1509 895 1615">73 R= β-D-Glc : Fraxidine 8-O-β-d- glucopyranoside</p> 	<p data-bbox="1193 1473 1406 1503">74 Scopolétine</p> 
---	---	--

Figure 25 : Lactones isolés de *N. gardneri*

- La rubrenolide **75**, rubrynolide **76**, dihydrorubrenolide **77** présents de *N. rubra* [Franca N.C.; O. R. Gottlieb et al. 1972].

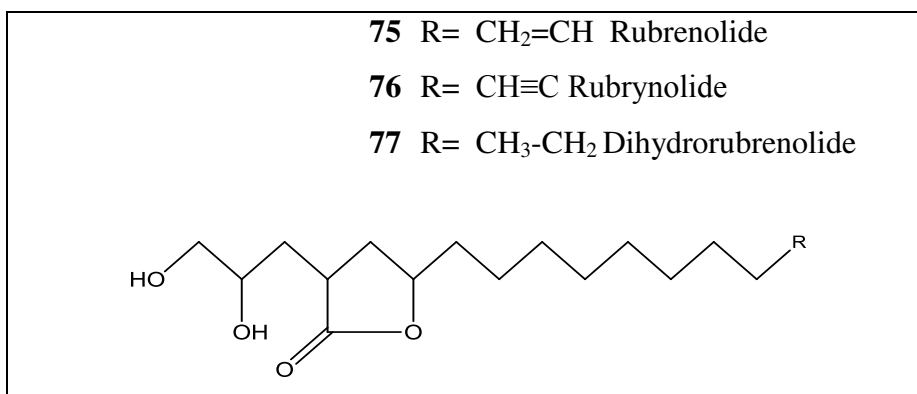


Figure 26 : Lactones isolés de *N. rubra*

3.3.4. Les flavonoïdes

Généralités

Les flavonoïdes sont largement distribués dans différentes parties des végétaux comme les feuilles, les graines, les écorces et les fleurs des végétaux [Medic-Saric et al., 2003], et même dans différents produits dérivés tels que les boissons: vins, cidre, bière, thé, cacao etc...

Cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales, comme la germination, le degré de maturité, la variété, le traitement, le stockage [Lugasi et al., 2003]. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV [Hadi, 2004].

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont le squelette de base à quinze atomes de carbones est constitué de deux unités aromatiques, cycles notés (A et B), reliés par une chaîne en C₃ (cycle C) correspondant à un diphenyle propane figure 27.

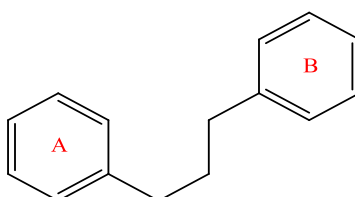


Figure 27 : Squelette de base du diphenyle propane

Parmi les flavonoïdes, on distingue huit sous-classes présentées en figure 28 et 29 en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C: flavones **78**, flavanones **79**, flavonols **80**, dihydroflavonols **81**, flavanols **82** et anthocyanes **83**, chalcones **84** et auronnes **85** [Medic-Saric et *al.*, 2004].

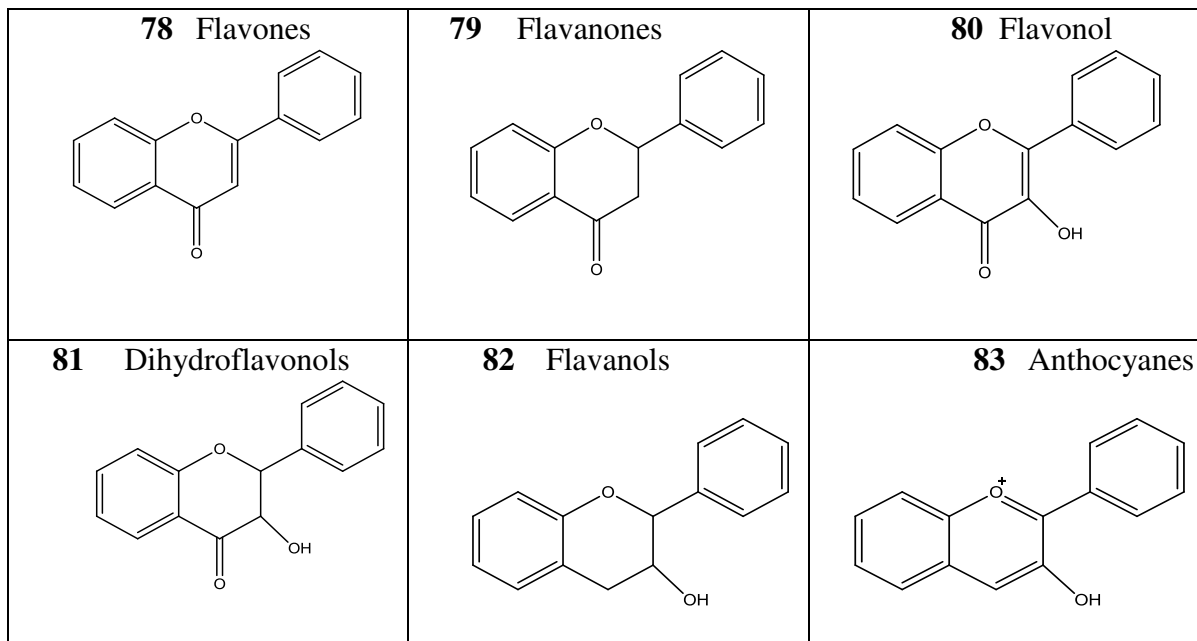


Figure 28 : Structures des différentes sous-classes de flavonoïdes

Le cycle C peut s'ouvrir donnant naissance aux chalcones **84** puis se recycliser en un hétérocycle à 5 chaînons caractéristiques des auronnes **85**.

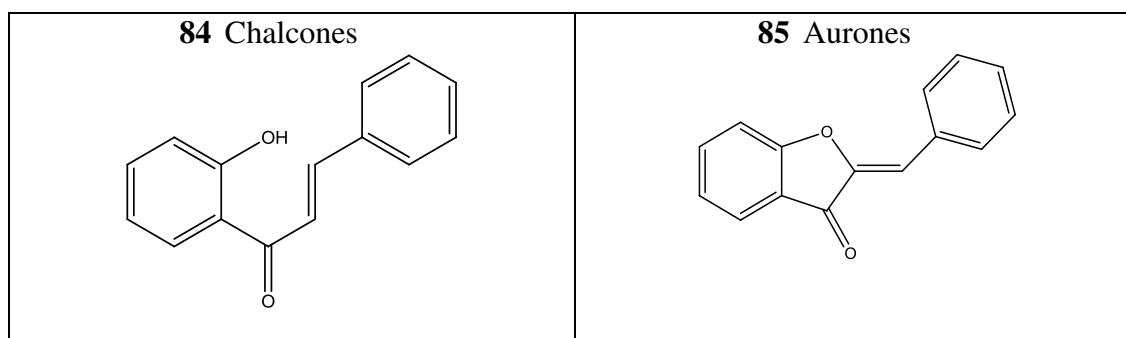
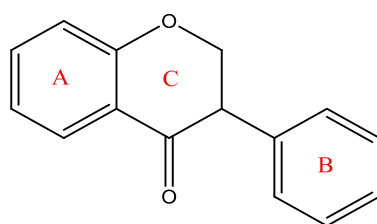


Figure 29 : Structures des chalcones et auronnes

Le déplacement du point d'attache du noyau B du C-2 vers le C-3 du cycle C conduit des flavonoïdes aux iso flavonoïdes **86**. La plupart des flavonoïdes des aliments sont des 3-O-glycosides et des polymères. On en retrouve aussi sous forme aglycone [Medic-Saric et *al.* 2003]. Les propriétés générales des flavonoïdes en font des éléments essentiels à l'alimentation

de l'homme. La prise journalière moyenne des flavonoïdes par l'Homme varie de 25 mg/jour à 1g /jour [Wang et Mazza, 2002].



86 Isoflavones

3.3.4.1. Absorption des rayonnements UV

L'action des flavonoïdes dans les plantes résulte en partie de leur effet filtre et de leur forte absorption dans le domaine UV. Les spectres UV des flavonoïdes exhibent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm. La bande I (300-395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle (noyau B) du flavonoïde et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle comme l'indique le schéma suivant :

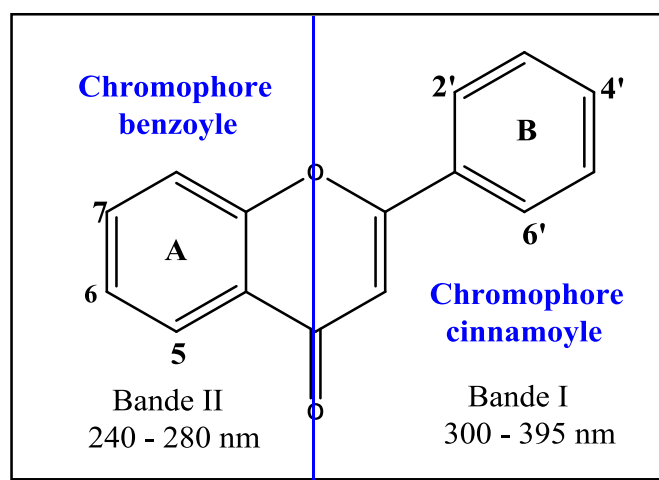


Figure 30 : Absorption UV du squelette flavonoïde

Plusieurs facteurs peuvent affecter les spectres d'absorption et le coefficient d'extinction des flavonoïdes. L'augmentation du nombre d'hydroxyles sur la partie aglycone provoque un effet bathochrome des bandes d'absorption vers de plus grandes valeurs.

En absence d'hydroxyle en position 3 (cas des flavones), la longueur d'onde de la bande I est la plus courte de 20 à 30 nm. La méthylation comme la glycosylation, en particulier sur les

hydroxyles en position 3, 5, 7, 4', provoquent un effet hypsochrome vers les longueurs d'onde plus courtes. Toutefois, la nature du sucre n'a généralement pas d'effet. Pour l'acylation, peu de données existent sur l'effet de cette réaction sur les propriétés spectrales des flavonoïdes. Cette propriété d'absorption dans le domaine de l'UV avec deux bandes caractéristiques pourra être exploitée pour la détection de ce type de composés.

3.3.4.2. Flavonoïdes chez les *Nectandra*

Les flavonoïdes rencontrés sont essentiellement des flavonols (figure 31).

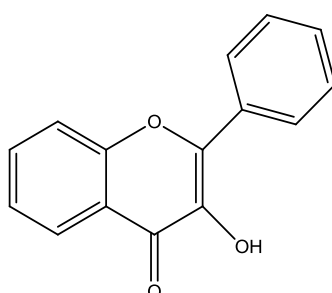


Figure 31: Structure du Flavonol (3-hydroxy-2-phénylchromen-4-one)

Le kaempférol 3-O- α -L-rhamnopyranoside **87**, la quercitrine **88**, quercétine **89**, ont été isolés des feuilles de *N. gardneri* [Fernanda R. Garcez et al. 1999].

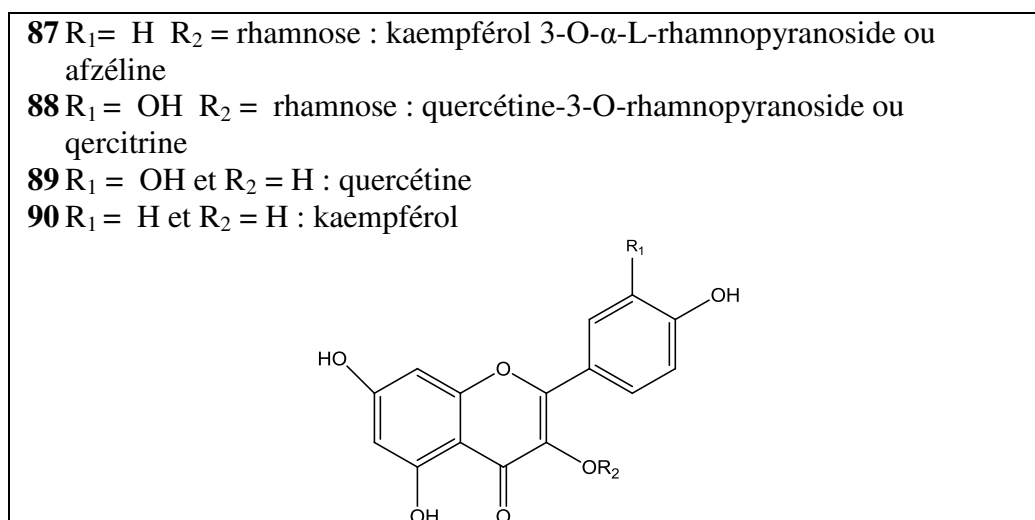
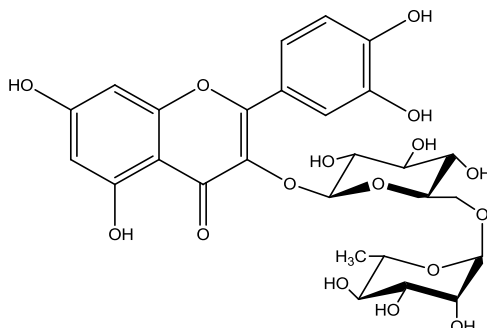


Figure 32 : Flavonoïdes isolés de *N. gardneri*

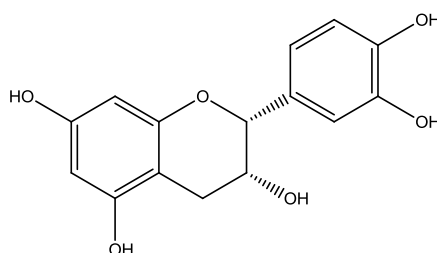
Le kaempférol et la quercétine ont été également caractérisés à partir des fruits de *N. glabrescens* [José M. Barbosa-Filho et al. 1989].

L'afzéline et la quercitrine isolées des feuilles de *N. grandiflora* [Alan B. Ribeiro et *al.*, 2005] montrent une activité antiradicalaire envers le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de 16 et 73% à 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. La référence utilisée, la rutine **91**, antioxydant commercial est à 81% inhibitrice du DPPH pour une concentration de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.



91 Rutine

Pour finir, la (-) épicatechine **92** a été isolée des écorces du tronc de *N. cissiflora* [Fernanda R. Garcez et *al.*, 2010] et de *N. megapotamica* [Fernanda R. Garcez, 2009].



92 (-) épicatechine

3.4. Les alcaloïdes

3.4.1. Définition

Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées, de nature basique, présentant généralement de puissants effets physiologiques. Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. La médecine moderne les emploie souvent à l'état pur [Bruneton Jean, 2009].

Les alcaloïdes se rencontrent surtout chez les Angiospermes mais de façon irrégulière. En règle générale, tous les alcaloïdes d'une même plante ont une origine biosynthétique commune,

même si leurs structures peuvent paraître assez différentes. Pour une plante donnée la teneur en alcaloïdes peut être inégale et certaines parties peuvent en être totalement dépourvues.

Ils s'accumulent surtout dans les vacuoles au niveau cellulaire, mais leur répartition dans la plante se fait différemment suivant les espèces. Les alcaloïdes se rencontrent surtout au niveau des épidermes du pourtour des cordons vasculaires, des laticifères et, de façon générale, dans tous les tissus en voie de croissance (jeunes racines, jeunes feuilles).

Les propriétés toxiques ou médicamenteuses des alcaloïdes confèrent à ce groupe de métabolites secondaires un intérêt particulier. Au niveau du système nerveux central, ils agissent comme dépresseurs telles la morphine, la scopolamine, ou encore comme stimulants (caféine, strychnine). Au niveau du système nerveux autonome, ce sont des sympathomimétiques, (éphédrine). Certains jouent le rôle d'anesthésiques locaux comme la cocaïne ou d'antipaludiques (la quinine) [Bruneton, 2009].

3.4.2. Alcaloïdes des *Nectandra*

Les alcaloïdes sont très présents dans le genre *Nectandra*. Plusieurs types de structures sont retrouvés.

3.4.2.1. Alcaloïdes bisbenzylisoquinolines

Les bisbenzylisoquinolines sont l'un des deux plus grands groupes d'alcaloïdes isoquinoléines (avec les aporphinoïdes). En 1991, un total de 393 composés de cette classe a été décrit [Schiff Jr, 1991]. Le nombre de composés décrits a récemment augmenté de façon très significative. Les structures de base sont formées par condensation de deux unités benzylisoquinolines, de telle sorte que trois classes de dimères soient formées : biscoclaurine, coclaurine - réticuline et bisréticuline. Des réactions d'oxydations phénoliques conduisant à diverses combinaisons de ponts éther diarylique et des liens carbonés-carbonés entre les monomères ainsi que l'hydroxylation ou méthylation des composés conduisent à l'existence de nombreux sous-groupes.

Nous retrouvons chez les *Nectandra* deux types de structures : ocotine **93**, rodiasine **94** et sépérine **95** chez *N. rodiaei*. [Bick et al. 1978] et la costarine **96** chez *N. salicifolia* [Böhlke et al., 1996].

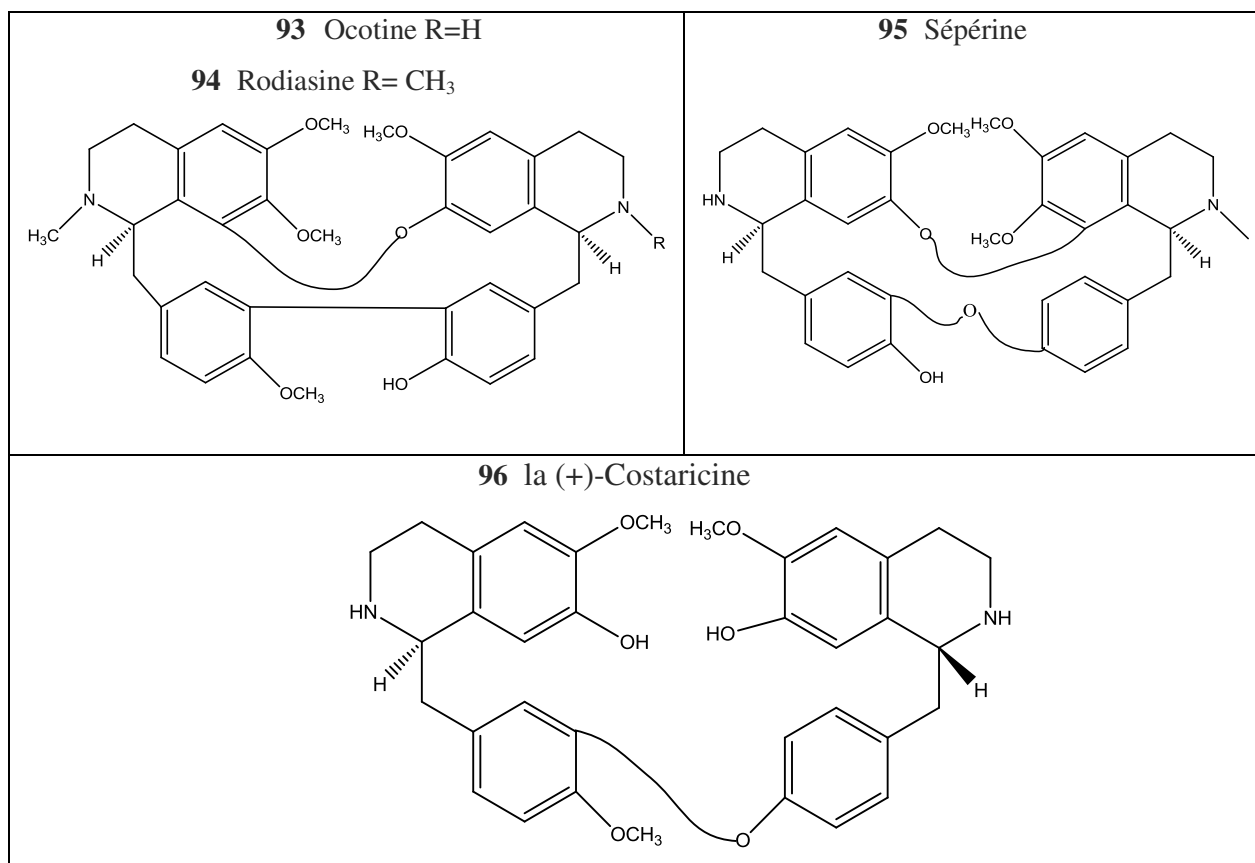
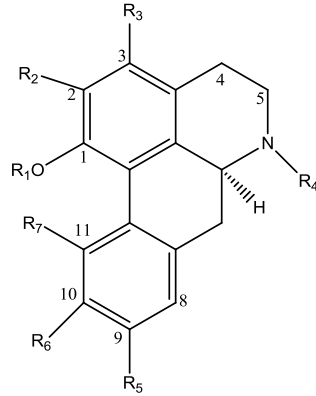


Figure 33 : Alcaloïdes bisbenzylisoquinolines chez *Nectandra*

3.4.2.2. Alcaloïdes aporphines

Les alcaloïdes aporphines constituent l'une des deux plus grandes classes d'alcaloïdes isoquinoléines, avec les bisbenzylisoquinolines [Schiff et *al.*, 1991]. La biosynthèse de ces composés est réalisée à partir de benzylisoquinolines et de proaporphines comme ceux isolés à partir de *N. salicifolia*, *N. grandiflora* (boldine, isoboldine...). Dans les aporphines, un groupe méthyl est habituellement rattaché à un atome d'azote, qui est tertiaire [Shamma, 1972]. (Boldine, isoboldine, N-méthyllaurotétanine).

Les aporphines avec un second azote sont appelés noraporphines. Les positions 1 et 2 ont toujours des substituants oxygénés qui peuvent être des groupements hydroxyles, méthoxyles ou des dioxyméthylènes (exemples : isocorydine, boldine, laurotétanine retrouvés dans de plusieurs espèces de *Nectandra*). D'autres positions peuvent être substituées par des groupements oxygénés C-9, C-10 (laurelliptine, bodine, norisocorydine, ...) et C-11 (isocorydine, norisocorydine identifiés chez *N. salicifolia* [Böhkle et al. 1996]) moins souvent en C-3 (norpurpuréine isolé de *N. salicifolia* [Böhkle et al. 1996], 3-méthoxy-nordomesticine, 1,2,3- triméthoxy-9, 10- méthylènedioxy-aporphine isolé de *N. sinuata* [Castro et *al.*, 1991]) et C-8. Les alcaloïdes aporphines sont les plus représentés chez les *Nectandra*.



Alcaloïdes isolés de <i>Nectandra</i>		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
97	Laurelliptine	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	H
98	Boldine	CH ₃	OH	H	CH ₃	OH	OCH ₃	H
99	Isoboldine	OH	CH ₃	H	CH ₃	OH	OCH ₃	H
100	Laurolitsine	OCH ₃	OH	H	H	OH	OCH ₃	H
101	N-méthyllaurotétanine	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	OH	OCH ₃	H
102	Laurotétanine	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H
103	Isocorydine	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	H	OCH ₃	OH
104	Norisocorydine	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OH
105	Norpurpureine	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H
106	Norlirioferine	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	H	H
107	Nordomesticine	H	CH ₃	H	H	-CH ₂ -		H
108	3-méthoxy- nordomesticine	H	CH ₃	OCH ₃	H			H
109	1,2,3-triméthoxy-9,10-méthylènedioxy-aporphine	CH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃			H
110	Ocoteine	-CH ₂ -		OCH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H

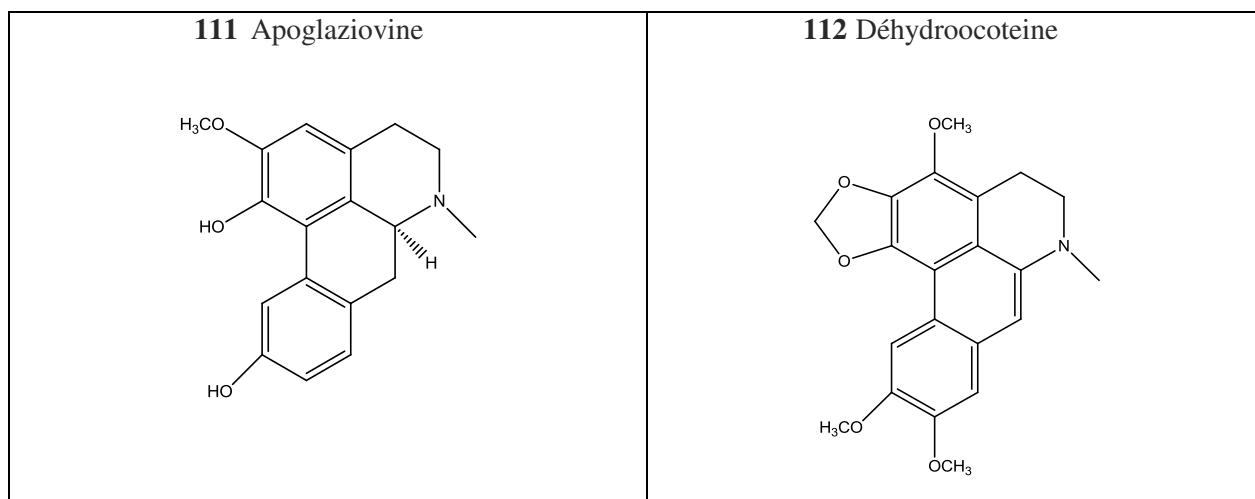


Figure 34 : Alcaloïdes isoquinolines (aporphines) rapportés dans le genre *Nectandra*

3.4.2.3. Alcaloïdes proaporphines

Ils sont formés par oxydation phénolique d'alcaloïdes. Beaucoup de ces structures possèdent un système cyclohexadiènone (cycle D), [Mothes et *al.*, 1985]. Dans d'autres structures le système diénone est partiel ou complètement réduit [Cordelle et *al.*, 1981]. Les proaporphines peuvent être soit de stéréochimie R ou S en C-6. Cette stéréochimie peut créer une asymétrie dans la molécule, de tel sorte que les deux côtés de l'anneau ne soient pas équivalents comme le montre la structure de la glaziovine isolée de *N. membranacea* [Hasbu et *al.*, 1991] et de *N. salicifolia* [Castro et *al.*, 1989 ; Böhlke et *al.*, 1996].

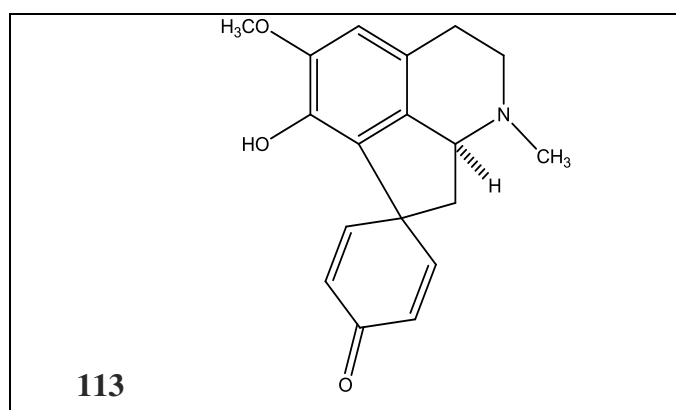


Figure 35 : Structure de la (6aS)-Glaziovine

3.4.2.4. Alcaloïdes tétrahydrobenzylisoquinolines

Trois des quatre sous-groupes des tétrahydrobenzylisoquinolines sont représentés dans *N. salicifolia* [Böhlke et *al.*, 1996] : le type coclaurine avec trois substituants en C-6, C-7 et C-12 (coclaurine et N-méthylcoclaurine); type réticuline avec quatre substituants oxygénés en C-6,

C-7, C-11 et C-12 (réticuline) et le type juziphine, avec trois substituants oxygénés en C-7, C-8 et C-12 (juziphine et nor-juziphine).

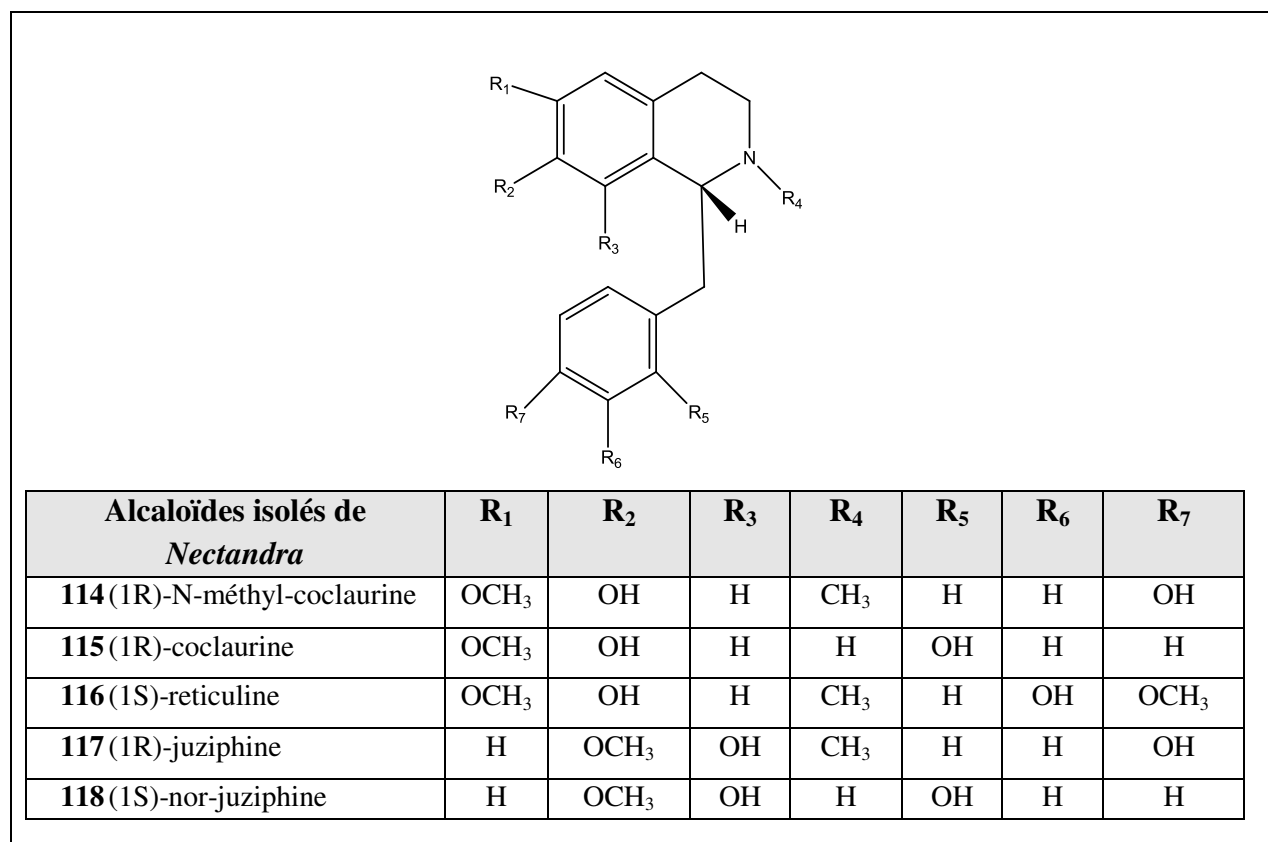


Figure 36 : Alcaloïdes tétrahydrobenzylisoquinolines de *Nectandra salicifolia*

3.4.2.5. Alcaloïdes morphinandiènonnes

Les morphinandiènonnes, pharmacologiquement actives, sont des intermédiaires importants de la biosynthèse des alcaloïdes morphinanes (exemple : l'opium, alcaloïdes de *Papaver somniferum* [Blasko et Cordell, 1988]. Elles ont des propriétés particulières qui font d'eux une classe distincte de composés. Elles possèdent généralement un groupe méthoxyle et une cétone sur le cycle C, avec ce dernier en C-7. Elles sont issues de sources naturelles et sont de stéréochimie R ou S en C-9 [Guinaudeau et Bruneton 1993]. Comme exemple, nous pouvons citer la (9S) sébiférine [(9S-O-méthylflavinantinel] isolée de *N. salicifolia* [Böhlke et al, 1996].

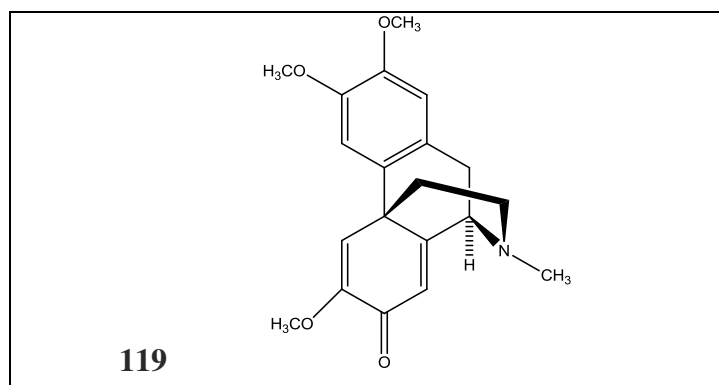


Figure 37 : Structure du (9S)-sébiférine [(9S)-O-méthylflavinantine]

Le tableau ci-après précise l'origine des alcaloïdes isolés du genre *Nectandra*.

Tableau 8 : Alcaloïdes isolés dans le genre *Nectandra*

Composés	Espèces	Parties	Références
Alcaloïdes Bisbenzylisoquinolines			
Ocotine 93	<i>N. rodioei</i> Hook.	Pas indiquée	Bick and Sinchai (1978)
Rodiasine 94	<i>N. rodioei</i> Hook.	Ecorces	Grundon and McGarvey (1966)
(+)-sépérine 95	<i>N. rodioei</i> Hook.	Ecorces	Grundon and McGarvey (1966)
(+) costaricine 96	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces Tronc/racines	Böhlke et al. 1996
Alcaloïdes Proaporphines			
Glaziovine 113	<i>N. membranacea</i> Griesb.	Ecorces	Hasbu et al. 1991
	<i>N. salicifolia</i>	Feuilles	Castro et al. 1989
		Racines	Böhlke et al. 1996
Alcaloïdes Aporphines			
Apoglaziovine 111	<i>N. membranacea</i>	Feuilles	Castro et al. 1989
Boldine 98	<i>N. grandiflora</i>	Écorces, tronc	Moreno et al. 1993
(+) boldine	<i>N. ramonensis</i> Standl.	Écorces	Lopez et al. 1995
	<i>N. salicifolia</i>	Écorces Tronc/racines/ Feuilles	Böhlke et al. 1996
Isoboldine 99	<i>N. grandiflora</i> Nees et Mart.	Ecorces tronc	Moreno et al. 1993
	<i>N. membranacea</i>	Ecorces	Hasbun et al. 1991
		Feuilles	Castro et al. 1989
		Bois	Hasbun et al. 1991
(+) isoboldine	<i>N. pichurim</i> (H.B.K)Mez	Feuilles/tiges Ecorces	Ferrari et al. 1971
	<i>N. salicifolia</i>	Tronc/racines	Böhlke et al. 1971

Composés	Espèces	Parties	Références
(+)-laurelliptine 97	<i>N. rigida</i> Nees	Feuilles/tiges	LeQuesne et al. 1980
		Ecorces/tiges	LeQuesne et al. 1980
Laurotétanine 102	<i>N. grandiflora</i>	Ecorces tronc	Moreno et al. 1993
	<i>N. saligna</i> Nees & Mart.	Non précisé	Bick et Sinchai 1978
	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces Tronc/racines	Böhlke et al. 1996
N-méthyllaurotétanine 101	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces Tronc/racines	Böhlke et al. 1996
Norlirioféline 106	<i>N. sinuata</i> Mez	Ecorces	Castro et al. 1991
Nordomesticine 107	<i>N. sinuata</i>	Ecorces	Castro et al. 1991
3-méthoxynordomesticine 108	<i>N. sinuata</i>	Ecorces	Castro et al. 1991
1,2,3-triméthoxy-9,10 méthylène dioxydihydroaporphine 109	<i>N. sinuata</i>	Ecorces	Castro et al. 1991
(+) -ocotéine 110	<i>N. saligna</i>	Écorces	Baralle et al. 1972
		Non précisé	Bick et Sinchai 1978
Déhydroocotéine 112	<i>N. saligna</i>	Non précisé	Bick et Sinchai 1978
(+) -laurolitsine 100	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces tronc/racines	Böhlke et al. 1996
(+) -isocorydine 103	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces, Tronc Racines	Böhlke et al. 1996
(+) -norisocorydine 104			
(+) -norpurpuréine 105			
Alcaloïdes Tétrahydrobenzylisoquinolines			
(1R) N-méthylcoclaurine 114	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces, tronc Feuilles	Böhlke et al. 1996
(1R)-coclaurine 115	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces tronc Ecorces	Böhlke et al. 1996
(+) -réticuline 116	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces Tronc/feuilles	Böhlke et al. 1996
(1S)-juziphine 117 (1S)-Norjuziphine 118	<i>N. salicifolia</i>	Racines	Böhlke et al. 1996
Alcaloïdes Morphinandienones			
(9S)-sebiferine[(9S)-O-méthylflavinantine] 119	<i>N. salicifolia</i>	Ecorces Tronc/racines /feuilles	Böhlke et al. 1996

Nectandra apparaît bien comme un genre riche en alcaloïdes de structures variées.

4. Utilisations ethno-médicinales du genre *Nectandra*

Les informations sur les utilisations médicales de *Nectandra* sont rares. Néanmoins, au VIII^{ème} siècle, au Pérou (Huaca Bandera), sur un site archéologique (culture Moche, 100 à 800 av. JC-), des graines de *Nectandra* ont été retrouvées dans les céramiques, déposées avec des coquillages aux côtés d'une femme dont la tête portait des ornements de cuivre. Ces graines, pour leurs propriétés psychoactives, étaient souvent utilisées lors des cérémonies rituelles.



Figure 38 : Squelette de la femme retrouvé dans un couloir-chambre de sacrifices humains avec des graines de *Nectandra* dans les céramiques (Musée National Archéologique de Bruning).

La littérature décrivant la médecine indigène du centre et du nord de l'Amérique du Sud contient des références attestant de l'utilisation de diverses espèces végétales du genre *Nectandra*. Quelques utilisations traditionnelles sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Utilisations traditionnelles des extraits de *Nectandra*

Plantes	Préparations	Utilisations traditionnelles	Pays	Références
<i>N. acutifolia</i> (Ruiz et Pav.)Mez	Décoction : feuilles, écorces	Stimulant particulièrement fort pour hommes âgés (pour fatigue excessive et sommolence)	Tribu Kubeo (Amazonie Colombienne)	Schultes 1993

Plantes	Préparations	Utilisations traditionnelles	Pays	Références
<i>N. coriacea</i> (Sw.) Griseb	Décoction, feuilles	Voie orale : traitement indigestion	Zone de Thomonde Plateau Central Haïti	Weniger et al. 1986
<i>N. cymbarum</i> Mees	Racine, sève	Voie orale comme emménagogue, diurétique, anti plasmatique	Amérique du Sud, Brésil, Vénézuéla	Dragendorff 1898
	Racine : infusion	Voie orale, boisson désaltérante	Brésil, vénézuéla	Dragendorff 1898
	Non précisé	Voie orale : diurétique, emménagogue, tonic	Guyane Française	Heckel 1897
<i>N. globosa</i> (Aubl.) Mez	Infusion écorces	Voie orale : fébrifuge	Indiens Tikuna (Loretoyacu Rio région Amazonienne Colombie)	Schultes et Raffauf 1994
<i>N. mollis</i> Nees	Extrait feuilles Infusion	Voie orale : emménagogue, diurétique	Brésil	Dragendorff 1898
<i>N. sanguinea</i> Roland ex Rott.	Infusion feuilles	Voie orale : maux d'estomac	Oaxaca, Puebla, Veracruz, Mexico	Zamora-Martinez et al. 1992

Les utilisations traditionnelles des *Nectandra* sont nombreuses et diverses. Les principales étant les activités : diurétique, stimulante et émménagogue. Ces différentes propriétés pourraient donc être présentes dans l'espèce que nous étudions.

5. Activités biologiques du genre *Nectandra*

Le genre *Nectandra* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. Grâce aux propriétés de leurs métabolites secondaires, les espèces du genre sont utilisées dans la thérapie des infections des systèmes génito-urinaire, et broncho-pulmonaire mais également dans le traitement de toutes les crampes menstruelles et de l'accouchement. On observe aussi des effets antiprolifératifs comme l'activité anti-tumorale, et

des effets antimicrobiens, telle l'activité antibactérienne. Ces activités sont souvent expliquées par la présence d'alcaloïdes aporphines dont ces plantes sont des sources abondantes [Morton, J.F. 1981 ; Duke J.A. 1994; Guinaudeau, H. Leboeuf 1979, 1983, 1988, 1994]. Cette plante fait l'objet d'un nombre réduit de publications relativement récentes. Des extraits de feuilles testés sur des rats ont montré des modifications fonctionnelles de la thyroïde, du cœur, du rein, et du muscle [Moreno, 2007]. En effet, ces extraits contiendraient des métabolites capables d'influencer l'action d'un biocomplexe radioactif, utilisé pour évaluer les fonctions de certains organes, en ralentissant son effet. Cette étude invite donc à une grande prudence au niveau des patients utilisant cette plante. D'autre part, dans une étude, la toxicité d'un extrait de *N. membranacea* a été évaluée lors de test in vitro et n'a montré aucun potentiel génotoxique [A.Arnobio, 2011].

Le tableau 10 présente l'ensemble des activités biologiques relevées au cours de cette étude.

Tableau 10 : Quelques activités biologiques du genre *Nectandra*

Nom de l'espèce	Activités	Organes	Références
<i>N. espèce non spécifiée</i>	Antioxydante	Feuilles	Mihelic, 1958
<i>N. amazonum</i>	Inhibitrice de phosphoglycéride PAF*	Feuilles	Koltei et al. 1991
<i>N. coto</i>	Cytotoxique	Ecorces	May et Willuhn 1978
	Antivirale (virus de la Vaccine)	Ecorces	May et Willuhn 1978
<i>N. cymbarum</i>	Antifongique		Maruzzella et al. 1960
<i>N. falcifolia</i>	Anti-inflammatoire	Feuilles	Olivera de Melo Julianana et al. 2006
<i>N. glabosa</i>	stimule le système réticulo-endothélial (souris)	Ecorces et feuilles	DiCarlo et al. 1964
<i>N. grandiflora</i>	Anti-tumorale	Ecorces de tronc	Morena P.R.H. et al. 1993
	Antioxydante	Feuilles	Ribeiro Alan B. et al. 2005
<i>N. megapotamica</i>	Analgésique	Ecorces	Cristina de Novales Adriana et al. 1998
	Trypanocidale	Feuilles	Ademar A. da Silva Filho et al. 2004
	Anti-inflammatoire, analgésique	Feuilles	Ademar A. da Silva Filho et al. 2004
	Antileishmaniale, Antimalaria	Ecorces	Ademar A. da Silva Filho et al. 2008
	Antifongique	Ecorces de tronc	Fernanda R. Garcez et al. 2009
<i>N. membranacea</i>	Cytotoxique et antimicrobienne	Ecorces	Xiujun Wu et al. 2006
<i>N. pichurim</i>	Problèmes de coliques, problèmes gastriques	Feuilles, fruits	Marques 2001
<i>N. rectinerva</i>	Antifongique	Cœur du bois	Waterman 1946

Nom de l'espèce	Activités	Organes	Références
<i>N. rigida</i>	Cytotoxique	Feuilles et tiges	Le Quesne Philip W. et <i>al.</i> 1980
<i>N. rodiaei</i>	Antipyrétique et tonique	Ecorces	Marques 2001
<i>N. salicifolia</i>	Antiplasmodiale	Ecorces de tronc, racines	Mark Böhlke et <i>al.</i> 1996
	Anti-inflammatoire		Melo et <i>al.</i> 2006
	Détentes musculaires		Slish et <i>al.</i> 1999
	Antimalaria		Böhlke et <i>al.</i> 1993

*PAF (platelet-activating factor): Phosphoglycérides, lipides responsables de l'hypersensibilité et l'inflammation

6. Etudes antérieures sur *Nectandra membranacea*

Ci-dessous sont présentés les travaux phytochimiques en lien avec les activités biologiques réalisés sur cette espèce.

6.1. Composition des feuilles

L'huile essentielle des feuilles de *N. membranacea* du Costa Rica a été obtenue par hydrodistillation et a montré une grande richesse en hydrocarbures terpéniques.

En effet, 48 composés ont été identifiés, par GC-MS. Les composés les plus abondants sont des monoterpènes (35,9 % dont 1,6 % d'oxygénés) et sesquiterpènes (57,9 % et dont 4,3% oxygénés). Les composés majeurs sont : α -pinène (22,4%), δ -cadinène (14,1%), β -pinène (12,6%), α -copaène (12,5%), germacrène D (6,9%), α -humulène (5,6%) et β -caryophyllène (5,5%). L'huile essentielle et les composants majeurs n'ont montré aucune activité cytotoxique ou anti-microbienne appréciables [Xiujun Wu, 2006].

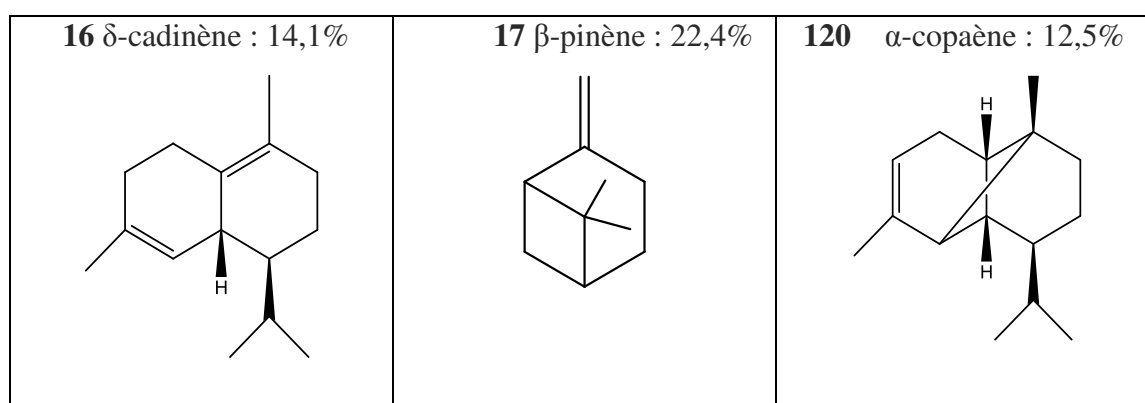
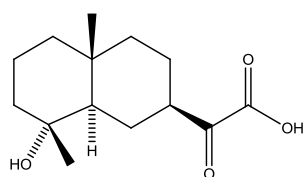


Figure 39 : Terpènes majoritaires chez *Nectandra membranacea*

Au cours d'une étude antérieure, trois alcaloïdes de type proaporphine et aporphine ont été isolés et identifiés des feuilles de *N. membranacea* de Costa Rica : apoglaziovine, isoboldine et glaziovine [O.Castro, 1989].

6.2. Composition des écorces

L'étude des écorces a révélé la présence de trois sesquiterpènes : l'acide ilicique **121**, l'acide costique **20** et l'acide 3-isocostique **21** [Xiujun Wu et al. 2006]. L'acide ilicique a montré une faible cytotoxicité sur les lignées de cellules tumorales KB (carcinome oral humain), SK-MEL (mélanome malin humain) et A549 (carcinome pulmonaire humain) pour une concentration de 20 µg/mL mais aucunes de ces activités n'ont été rapportée pour les deux autres composés [Zheng QX, 2003]. Les auteurs ont également étudié l'activité cytotoxique sur des cellules tumorales humaines du foie (Hep G2) et du sein (MDA-MB-231) ainsi que l'activité antimicrobienne contre les bactéries *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*. L'acide ilicique a montré une activité antibactérienne notable sur la bactérie *Staphylococcus aureus* (MIC = 7,8 µg/mL) et faible sur la bactérie *Bacillus cereus* (MIC = 15,6 µg/mL). Il n'a montré aucune activité cytotoxique sur le MDA-MB-231 (seulement 18% d'inhibition) et Hep G2 (0% d'inhibition) à 100 µg/mL. L'acide ilicique est aussi inactif contre la levure *Candida albicans*. Les faibles rendements obtenus dans le cadre de cette étude pour l'acide costique et l'acide 3-isocostique n'ont pas permis l'examen de leurs activités biologiques.



121 Acide ilicique

ETUDE PHYTOCHIMIQUE de *Nectandra membranacea* de Guadeloupe

Introduction

Aux petites Antilles, cinq espèces de *Nectandra* sont répertoriées outre *N. membranacea* : *N. patens*, *N. coriacea*, *N. krugii*, *N. antillana* et *N. dominicana*, présentées ci-dessous (Description botanique Annexe 3).



N. patens (Swartz) Grisebach 1860
Natural Resources Conservation Service
United States Department of Agriculture



N. coriacea (Swartz) Grisebach 1860
Cybertruffle.org



N. dominicana (Meisn. Mez) 1889
Josianny JOSEPH-ANGELIQUE
Trace des Etangs Basse-Terre



N. antillana (Ruiz et Pavon) Rohwer,
Meissner 1864
St ann's-Bay Bamboo/Green Park Jamaica
Albert Perdeck



N. krugii Mez,
 Jahrb. Königl. Bot. Gart. 1889

Après plusieurs prospections sur le terrain (Annexe 4), il s'est avéré que parmi les espèces de *Nectandra* présentes en Guadeloupe, peu d'entre elles ont été localisées telles que *N. patens* et *N. antillana*. *N. krugii*, endémique de la Guadeloupe, *N. coriacea* et *N. dominicana* étaient encore de petits arbustes, avec peu de matière végétale à exploiter. Deux spécimens matures de *N. membranacea* ont été localisés à Petit Bourg. Compte tenu de l'abondance de matériel végétatif. Cette espèce a donc été choisie pour l'étude qui consiste donc à contribuer à la connaissance chimique de *N. membranacea* de Guadeloupe et d'évaluer le potentiel biologique de ce végétal notamment l'activité antioxydante afin de pouvoir valoriser la plante.

Afin d'étudier l'effet de la fructification sur la composition chimique de la plante, les procédures seront effectuées à deux stades de maturations. Pour y arriver, il faudra :

- Extraire, isoler et identifier les différentes familles chimiques présentes dans les feuilles, les écorces et les fruits.
- Evaluer le potentiel biologique des différents extraits de cette plante.

7. *Nectandra membranacea* (Swartz) Grisebach 1860

N. membranacea est localisée en Guadeloupe principalement dans les régions suivantes : Pointe noire, Ravine chaude, Sainte-Marie et connue sous les noms vernaculaires de « bois négresse, bois violon, laurier bois et laurier bois doux » ou en créole « Lowyé Sann, Fey gwan Lowyé ». Présente aussi en Martinique (Prêcheur, Rivière Pilote et aux environs de Fort-de-France), *N. membranacea* est appelée « Laurier gland ».



Figure 40 : *Nectandra membranacea*
Petit Bourg, Guadeloupe Josianny Joseph-Angélique

C'est un arbre persistant, haut de 12 à 22 m, à l'écorce grise clair, avec des rameaux naissants pubescents. Aux Petites Antilles, les périodes de floraison sont de juin à octobre et la fructification, de février à mai.

- **Feuilles**

Les feuilles sont lancéolées à elliptiques, longues de 10 à 20 cm et larges de 2 à 8 cm, avec les bases aigües à cunéiformes. Elles ont un apex longuement acuminé, avec un pétiole glabrescent long de 5 à 15 cm.



Figure 41 : Feuilles de *Nectandra membranacea*
Petit Bourg, Guadeloupe Josianny Joseph-Angélique

- **Fleurs**

Les fleurs sont unisexuées, de couleur blanche à jaunâtre avec un diamètre de 4 à 5 mm. Elles sont groupées en panicules axillaires.



Figure 42 : Fleurs de *Nectandra membranacea*
Blumenau-SC

- **Fruits**

Leurs drupes sont globuleuses et vertes avec un diamètre de 10 à 13 mm.



Figure 43 : Fruits de *Nectandra membranacea*

Petit Bourg, Guadeloupe Josianny Joseph-Angélique

- **Ecorces**

L'écorce de l'arbre est grise clair, avec des rameaux naissants pubescents.



Figure 44 : Ecorces de *Nectandra membranacea*

Petit Bourg, Guadeloupe Josianny Joseph-Angélique

8. Cycle végétatif de la plante

Sachant que les états physiologiques d'une plante influencent sa composition chimique, les différents stades du cycle de floraison de *N. membranacea* ont été repérés dans le but de faire le lien avec sa composition chimique.

Une observation hebdomadaire d'un spécimen situé à Petit-Bourg sur un an a permis de déterminer le cycle de floraison (Figure 45).

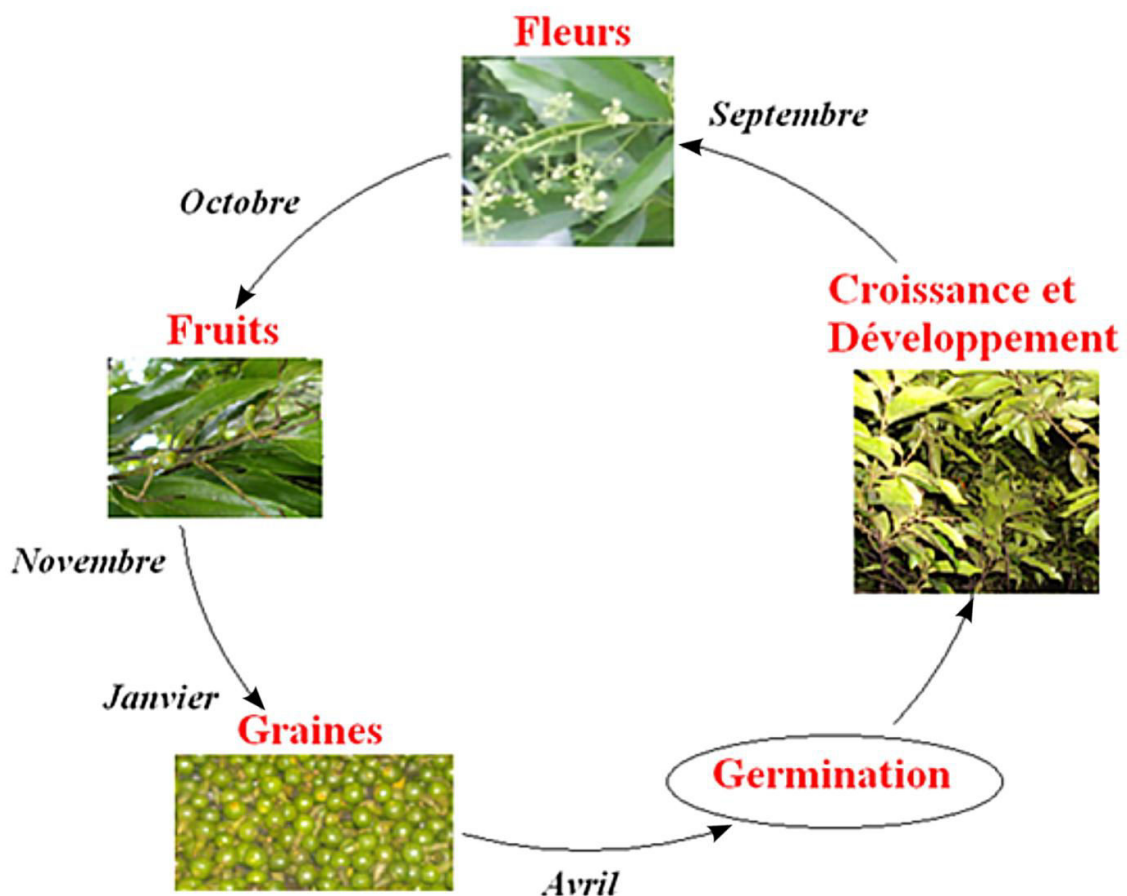


Figure 45 : Cycle végétatif de *N. membranacea*

Les deux stades choisis pour l'étude de la composition chimique de la plante sont :

- Stade A correspondant à la germination (avant fructification en juin)
- Stade B correspondant à la fructification (à la maturité des fruits en janvier).

9. Récolte et traitement du matériel végétal

Nectandra membranacea a été récoltée à deux périodes : hors fructification (stade A) au mois de juin et en fructification au mois de janvier (stade B) au domaine Duquerry, à Petit Bourg en Guadeloupe. Trois échantillons ont été déposés à l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) à Petit Bourg. Les numéros d'herbier sont les suivants : GUAD00530- GUAD 14211 et GUAD14212.



Figure 46 : Echantillon de *Nectandra membranacea* (Herbier INRA)

Les caractéristiques du site de récolte sont présentées au Tableau 11.

Tableau 11 : Données GPS (Global Positioning System ou système de localisation mondial) du site de récolte de *N. membranacea*

Région	Latitude	Longitude	Climat
Duquerry Petit-Bourg	16°11'26,18"Nord	61°35'26,62"Ouest	pluvieux, sol humide

Pour l'extraction des huiles essentielles, le matériel végétal est fraîchement récolté (feuilles, écorces et fruits) et traité immédiatement ou mis au congélateur (- 4°C) pour réaliser ultérieurement les hydrodistillations. Pour les extraits, les feuilles et écorces sont coupées puis mises à sécher à l'étuve à 40°C séparément tandis que les fruits sont conservés sans aucune forme de prétraitement. Chacune de ces parties aériennes du végétal est ensuite broyée séparément afin d'obtenir une poudre fine, conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité. Le taux d'humidité a été calculé il se situe entre 12 et 15%.

10. Criblage phytochimique

Afin d'établir une cartographie des familles chimiques présentes dans l'espèce, un criblage phytochimique a été effectué pour la première fois sur *N. membranacea*, principalement pour mettre en évidence la présence éventuelle de polyphénols et les alcaloïdes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Criblage phytochimique de *Nectandra membranacea*

Famille de molécules	Feuilles ^A	Feuilles ^B	Ecorces ^A	Ecorces ^B	Fruits
Coumarines	-	-	-	-	-
Terpènes et stérols	+++	+++	+++	+++	-
Saponosides	+ : 0,8 cm	+ : 1cm	++ : 2 cm	+++ : 7,5 cm	++ : 2 cm
Antraquinones libres	++	+++	+	+++	-
Hétérosides anthraquinoniques	+++	+++	+++	+++	+++
Tanins	+++	+++	+++	+++	+
Phénols	+++	+++	++	+++	-
Quinones	+++	+++	++	+++	-
Flavonoïdes	+++	+++	+++	+++	+ chalcone/ Isoflavones
Flavanes	+++	+++	+++	+++	++

Anthocyanes	++	++	+++	+++	+
Proanthocyanidols	+++	+++	+++	+++	+++
Alcaloïdes	+++	+++	+++	+++	+++

L'importance du précipité permet une appréciation de la teneur de la plante en métabolites :

- (+/-) ou (+) : turbidité très faible observable sur fond noir : présence très faible ou traces,
- (++) : turbidité net flocculant au bout de quelques minutes : présence notable
- (+++): précipité net immédiat et abondant : présence très importante.

Ce criblage phytochimique a permis de mettre en évidence que :

- les feuilles, les écorces et les fruits sont riches en composés polyphénoliques (tanins, flavonoïdes, flavanes) et en alcaloïdes pour les deux stades de récoltes. On observe également la présence d'hétérosides anthraquinoniques, de proanthocyanidols et d'alcaloïdes dans les feuilles, les écorces et les fruits. La présence de ce type de composés n'est pas surprenante car ils sont fréquemment décrits chez les espèces de ce genre.
- en concentrations, plus ou moins variables selon l'organe testé, les différentes parties semblent contenir des anthraquinones libres, des phénols, des quinones (sauf pour les fruits) et des anthocyanes.
- Les saponosides sont en quantité très importante dans les écorces du stade A, plus de 7 fois plus importante que dans les autres organes de la plante étudiée.
- On note l'absence ou la très faible présence de terpènes, stérols, anthraquinones libres, phénols et de quinones dans les extraits de fruits testés.
- A priori, la plante ne contient pas de coumarines. Les résultats sont en accord avec l'étude bibliographique du genre *Nectandra* réalisée dans la partie B.

Ces tests préliminaires laissent supposer une grande richesse en métabolites secondaires chez *Nectandra membranacea*.

11. Etude des molécules apolaires

Les composés apolaires de *Nectandra membranacea* sont extraits à partir de la matière végétale fraîche (huile essentielle) et sèche (extraction au cyclohexane par ultrason).

11.1. Huiles essentielles

Le genre *Nectandra* étant généralement très riche en huiles essentielles. L'extraction des volatiles des différentes parties récoltées de *Nectandra membranacea* a été réalisée par hydrodistillation. Les différentes caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles obtenues ont été déterminées et sont présentées ci-dessous.

11.1.1. Rendement

Les huiles essentielles ont été extraites à partir des feuilles, écorces et fruits frais. Les résultats obtenus sont comparés à ceux de la littérature lorsqu'ils existent. Le rendement est calculé de la façon suivante :

$$rdt = \frac{\text{(masse huile essentielle obtenue en g)}}{\text{masse matériel végétal}} \times 100$$

Les résultats obtenus sont comparés à ceux de la littérature.

Tableau 13: Rendements des extractions des huiles essentielles de *N. membranacea*.

Huiles Essentielles	Fruits	Ecorces		Feuilles		Feuilles Costa Rica [Xiujun Zu et al. 2006]
		A	B	A	B	
Stade						
Rdt (%)	0,20	0,03	0,02	0,13	0,16	0,04

L'étude du tableau ci-dessus permet de conclure que les fruits de la plante sont plus riches en huiles essentielles que les autres organes étudiés (feuilles, écorces) avec un rendement d'environ 0,20%.

Pour les feuilles, le rendement est très supérieur quel que soit le stade (4 à 8 fois) à celui des écorces. Le rendement pour les feuilles stade B est légèrement supérieur à celui obtenu pour les feuilles stade A. Concernant les écorces, c'est l'inverse.

Les feuilles, quel que soit le stade, sont toujours plus riches en huiles essentielles que les écorces (Rendement stade A x 4 et rendement stade B x 7).

Dans la bibliographie, Xiujun Wu et *al.* 2006, ont réalisé l'huile essentielle des feuilles de *N. membranacea* de Monteverde (Costa Rica) et ont obtenu un rendement de 0,03 % par hydrodistillation en utilisant un appareillage Likens-Nickerson (49,6 g de feuilles fraîches coupées, pendant 4 heures produisant 18,4 mg d'huile essentielle).

Ce rendement est 4 fois moins important que celui obtenu pour les spécimens de Guadeloupe. Ce premier résultat confirme que la région d'origine influence beaucoup la production d'huiles essentielles d'une plante aromatique. Ces variations peuvent également être attribuées à la période de cueillette de la matière végétale, à la fraîcheur du matériel, au niveau de précipitation, au temps et au mode d'extraction.

11.1.2. Densité

Les mesures de densité ont été effectuées à 20°C pour les différentes parties étudiées et sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 14: Densité des huiles essentielles de *N. membranacea*

Partie de la plante	Densité à 20°C
Feuilles stade A et B	0,90
Fruits	0,95
Ecorces Stade A et B	n.d

n.d. non déterminé (quantité d'huile essentielle insuffisante pour l'analyse)

L'huile essentielle des fruits est légèrement plus dense que celle des feuilles.

11.1.3. Indice de réfraction

Les indices de réfraction des huiles essentielles sont assez proches pour les feuilles et les fruits soient 1,49. Néanmoins, le stade A présente un indice moins élevé. Dans le cas des écorces, l'indice de réfraction est le plus bas avec 1,4507.

Tableau 15 : Indice de réfraction des huiles essentielles des fruits, des écorces et des feuilles (stade A et B)

Stade	Fruits	Feuilles		Ecorces	
		A	B	A	B
Indice de réfraction 20°C	1,4985	1,4984	1,4990	1,4507	n.d

n.d. non déterminé (quantité d'huile essentielle insuffisante pour l'analyse)

11.1.4. Caractéristiques organoleptiques

A l'issue de l'hydrodistillation, les huiles essentielles obtenues sont de couleur jaune verdâtre avec une odeur boisée prononcée. Les paramètres organoleptiques des huiles essentielles sont répertoriés dans le tableau ci-après.

Tableau 16 : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles

Caractéristiques	Stade A			Stade B	
	Feuilles	Ecorces	Feuilles	Ecorces	Fruits
Aspect	Liquide, fluide limpide	Liquide, fluide	Liquide, plus ou moins fluide	Liquide un peu visqueux	Liquide, fluide
Couleur	Jaune verdâtre	Jaune verdâtre pâle	Jaune verdâtre foncée	Jaune verdâtre très pâle	Jaune clair
Odeur	Boisée, âcre, piquante	Boisée	Fruitée, âcre, douce boisée,	Forte, fruitée, boisée	Fruitée, sucrée, boisée

Les huiles essentielles sont limpides, fluides et de couleur jaune. Les senteurs sont fonction du stade de récolte : odeur plus boisée pour le stade A et plus fruitée pour le stade B. Cela correspond bien aux deux saisons de récolte.

11.2. Composition chimique des H.E

Le tableau 17 présente la composition chimique des huiles essentielles de *N. membranacea*.

Tableau 17 : Composition chimique des huiles essentielles des feuilles et des écorces aux deux stades de récolte A et B

N°	Composés	RI DB- 5 ^a	RI Spwa ^b	Feuilles ^A		Feuilles ^B		Ecorces ^A		Ecorces ^B	
				Tr (min)	%	Tr (min)	%	Tr (min)	%	Tr (min)	%
1	α -pinène	939	1017	12,31	3,14	12,29	2,39				
2	camphène	953	1062	13,10	0,09	13,08	0,07				
3	β -pinène	976	1103	14,78	1,97	14,76	1,44				
4	myrcène	992	1166	15,92	0,20	15,90	0,18				
5	α -phellandrène	1000	1162	16,58	0,09	16,56	0,09				
6	δ -3-carène	1008	1146	16,96	0,16	16,94	0,14				
7	p-cymène	1025	1275	17,88	0,04	17,85	0,05				
8	limonène	1031	1192	18,17	0,20	18,15	0,16				
9	β -phellandrène	1031	1198	18,17		18,15					
10	1,8-cinéole	1033	1198	18,25	0,10	18,24	0,10				
11	trans- β -ocimène	1057	1258	19,65	0,06	19,62	0,06				
12	γ -terpinène	1066	1238			20,19	0,02				
13	terpinolène	1097	1285	22,18	0,93	22,15	0,90				
14	linalol	1111	1551			23,05	0,02				
15	Cis-para-menth-2-èn-1-ol	1128	1553	24,25	0	24,25	0,11				
16	4,8 diméthyl-1,3,7-nonatriène	1128	1317	24,28	0,11	24,28					
17	terpin-1-èn-4-ol	1177	1595	28,11	0,04	28,07	0,03				
18	α -terpinéol	1188	1699	29,05	0,14	29,00	0,14				
19	α -cubébène	1353	1452	39,53	0,08	39,51	0,10	39,54	1,09	39,51	1,95
20	Piperiténone oxide	1365	1951							40,32	0,22
21	α -ylangène	1365	1469	40,35	0,09			40,36	0,16		
22	α -copaène	1375	1485	41,11	0,16	41,09	0,18	41,11	0,64	41,08	0,91
23	β -élémane, isomère	1383	1572	41,74	0,94	41,72	0,91	41,73	0,05	41,70	0,09
24	β -élémane	1390	1581	42,22	31,25	42,21	30,31	42,19	2,38	42,17	4,43
25	β -caryophyllène	1414	1581	43,71	4,44	43,69	5,30	43,70	0,92	43,67	1,13
26	β -copaène	1425	1577	44,33	0,15			44,33	0,10	44,29	0,18
27	Tr- α -bergamotène	1436	1581			44,87	0,55			44,85	0,22
28	2,5-diméthoxy-para-cymène	1436	2212	44,89	0,57	44,30	0,10	44,89	0,11		
29	Cis-cadina-(6)4-diène	1452	1626							45,72	1,45
30	α -humulène	1452	1653	45,75	0,88	45,73	0,91	45,75	1,21		
31	cis muurolo-3,5-diène	1452	1649	45,75				45,60	0,15		
32	Alloaromadendrène	1459	1625	46,19	1,98	46,16	1,82				
33	9-épi- β -caryophyllène	1459	1577	46,19				46,19	0,77	46,15	1,35
34	Trans- β farnésène	1461	1662			46,27	0,26				
35	4,5-di-épi-aristolochène	1467		46,59	0,19			46,74	0,09	46,70	0,13
36	Trans-cadina-1(6)4-diène	1475	1625					47,05	0,59		
37	β -chamigrène	1477	1663	47,16	3,02	47,14	3,93	47,16	0,47	47,13	1,12
38	γ -muuroloène	1477	1675	47,16		47,51	0,26	47,16	0,25	47,13	0,16
39	α -amorphène	1481	1699							47,41	0,11

N°	Composés	RI DB- 5 ^a	RI Spwa ^b	Feuilles ^A		Feuilles ^B		Ecorces ^A		Ecorces ^B	
				Tr (min)	%	Tr (min)	%	Tr (min)	%	Tr (min)	%
40	germacrène D	1481	1697	47,43	0,40	47,40	0,37	47,43	0,10		
41	β-sélinène	1486	1705	47,71	9,00	47,69	10,97	47,71	3,90	47,69	5,49
42	Tr-muuro-la-4-(14)-5-diène	1493						48,03	0,33		
43	Cis-β-guaiène	1493	1651					48,03		48,00	0,19
44	δ-sélinène	1493	1663	48,11	0,65	48,08	0,69			48,00	0,47
45	α-sélinène	1496	1711	48,27	8,16	48,25	9,74	48,26	3,23	48,24	4,14
46	épizonarène	1501	1705					48,52	0,12	48,48	0,13
47	α-muuro-lène	1503	1715					48,68	0,37	48,63	0,51
48	germacrène A	1506	1746	48,84	12,33	48,82	10,82			48,78	0,10
49	Trans-β-guaiène	1506	1759					48,82	0,14		
50	δ-amorphène	1510	1718							49,00	0,30
51	cubébol	1510	1718					49,05	0,30		
52	β-bisabolène	1513	1713	49,26	0,18	49,23	0,22				
53	7-épi-α-sélinène	1517	1722	49,53	0,42	49,50	0,42	49,49	0,46	49,38	0,53
54	γ-cadinène	1517	1746	49,53				49,49		49,38	
55	Tr-calaménène	1525	1815					49,92	0,87	49,88	2,25
56	δ-cadinène	1525	1746	50,01	0,31	49,98	0,35	50,02	3,11	49,99	3,27
57	Tr-cadina-1,4-diène	1534	1766					50,47	0,43	50,42	0,21
58	sélina-3,7-diène	1541	1763							50,85	0,16
59	α-calacorène	1542	1901					51,00	0,28	50,95	0,48
60	élémol	1549	2075	51,45	0,24	51,4	0,16			51,28	0,25
61	germacrène B	1554	1803	51,75	0,08	51,72	0,08			51,42	1,33
62	tr-nérolidol	1565	2044	52,43	0,19	52,39	0,17			52,34	0,62
63	oxyde de caryophyllène	1576	1959	53,16	0,55	53,13	0,34	53,17	0,48	53,13	1,11
64	globulol	1577	2070							53,13	0,17
65	guaiol	1592	2082	54,17	0,27	54,13	0,24	54,18	1,20	54,14	1,71
66	cubénol	1600	2040					54,67	1,10		
67	10-épi-γ-eudesmol	1605	2125					54,93	0,58	54,88	0,69
68	1-épi-cubénol	1623	2048					55,80	2,45	55,78	3,60
69	τ-eudesmol	1627						55,97	0,72		
70	τ-cadinol	1638	2144	56,57	0,20	56,52	0,18	56,58	1,61	56,54	0,34
71	τ-muuro-lol	1639	2177							56,54	0,98
72	α-muuro-lol	1642	2174	56,80	0,28	56,76	0,21	56,90		56,86	1,43
73	cubénol	1644	2080					56,81	0,69	54,63	0,93
74	pogostol	1649	2235	57,15	6,46	57,11	6,51			57,12	3,18
75	β-eudesmol	1646	2202					56,90	1,51	56,86	1,72
76	α-cadinol	1652	2212	57,30	0,66	57,26	0,55	57,14	3,41	57,12	3,43
77	α-eudesmol	1654	2202					57,32	0,41		
78	α-sélin-11-èn-4-α-ol	1660		57,69	0,45			57,70	0,99	57,65	0,85
79	14-hydroxy-β-caryophyllène	1663		57,85	0,38	57,81	0,26				
80	14-hydroxy-9-épi-E-caryophyllène	1669	2290	58,17	0,94	58,12	0,62	57,92	0,39	57,88	0,45
81	γ-costol	1745	2504					62,11	0,93	62,07	1,09
82	β-costol	1761	2580					63,01	3,54	62,97	3,94
83	α-costol	1767	2576					63,35	1,93	63,30	1,82
TOTAL IDENTIFIE					93,17		93,43		44,56		61,32

A récolte au stade de germination de la plante

B récolte au stade de fructification de la plante

Composés majoritaires

NB : Lorsqu'il y a une seule valeur pour deux molécules, il s'agit de la somme des pourcentages de ces deux molécules.

50 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des feuilles au stade A, ce qui représente un niveau d'identification de plus de 95% des composés détectés. Elle est caractérisée principalement par des sesquiterpènes (72,2%) et des sesquiterpènes oxygénés (12,2%). Les monoterpènes représentent 7% des volatils et les monoterpènes oxygénés 1,4%. Le composé principal est le β -élémane avec une concentration de 31,3%. D'autres composés majoritaires sont présents germacrène A (12,3%), β -sélinène (9,0%), α -sélinène (8,2%), pogostol (6,5%), β -caryophyllène (4,4%), α -pinène (3,1%) and β -chamigrène (2,6%).

Dans l'huile essentielle des feuilles au stade B, 51 composés ont été identifiés, ce qui représente un niveau d'identification de plus 93% des composés détectés. Cette essence est dominée par des sesquiterpènes hydrocarbonés avec 78,2%, sesquiterpènes oxygénés (9,4%), monoterpènes hydrocarbonés (5,5%). Les monoterpènes oxygénés sont présents à l'état de traces (0,5%). β -élémane est aussi le composé majeur avec 30,3% suivi du germacrène A (10,9%), α -sélinène (9,7%), β -sélinène (9,6%), pogostol (6,5%), β -caryophyllène (5,3%) et du α -pinène (2,4%).

44 composés ont été identifiés dans l'huile essentielle des écorces au stade A, ce qui représente un niveau d'identification de 43% de composés détectés. Cette huile est composée de 22,2 % de sesquiterpènes oxygénés et non-oxygénés avec une absence de monoterpènes. Néanmoins, on note la présence de 0,1% de monoterpènes oxygénés. Au stade B, 48 composés ont été identifiés soit un niveau d'identification de 61,3%. Comme au stade précédent, il n'y a pas de monoterpènes mais 0,2% de monoterpènes oxygénés ont été identifiés. Par contre, la présence des sesquiterpènes est plus importante 33% de non-oxygénés et oxygénés 28%.

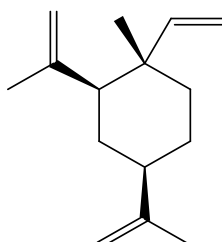
Les composés majoritaires retrouvés dans les huiles essentielles sont les mêmes aux deux stades de récoltes pour les écorces et les feuilles. Le composé majoritaire des huiles essentielles de feuilles est le β -élémane **122** avec une proportion de plus de 30 %. Quelque soit le stade de récolte, on trouve également de façon abondante le germacrène A (>10%), le β -sélinène (10%), l' α -sélinène (>8%) et le pogostol (>6%).

Les différences se situent au niveau des composés minoritaires notamment les composés 15, 16, 21, 27, 28, 34, 35, 38, 63, 78 et 80 dont les proportions varient notablement d'un stade à l'autre. La composition des huiles essentielles des écorces est très différente de celle des feuilles. En effet, on y note l'absence de nombreux monoterpènes.

Pour ces huiles essentielles, aucun composé n'est prépondérant, mais plusieurs peuvent être remarqués à des pourcentages avoisinant les 3% : Il s'agit du β -sélinène, de l' α -sélinène, δ -

cadinène, le guaiol, l' α -costol et l' α -cadinol. En revanche le pogostol est absent de l'huile essentielle au stade A.

Dans les écorces, la quantité de β -élémane chute considérablement par rapport à la teneur des feuilles (30 à 40%). Le taux de β -élémane est deux fois plus important en période de fructification de l'arbre avec 4,43% contre 2,38 % hors fructification.



122 β -élémane

Les huiles essentielles de *Nectandra membranacea* de Guadeloupe sont donc très riches en sesquiterpènes. Le composé majoritaire, β -élémane est présent dans toutes les parties de la plante dans des proportions variables.

Le tableau ci-après présente la composition de l'huile essentielle des fruits de *N. membranacea*.

Tableau 18 : Composition chimique de l'huile essentielle des fruits de *N. membranacea*

Fruits					
N°	Composés	RI DB-5 ^a	RI Spwa ^b	Tr (min)	%
1	α -pinène	939	1019	12, 28	0.59
2	camphène	953	1064	13, 07	0.15
3	β -pinène	976	1106	14, 75	0.08
4	Myrcène	992	1168	15,88	1,31
5	α -phéllandrène	1000	1164	16,55	0,15
6	δ -3-carène	1008	1148	16,92	0,44
7	α -terpinène	1016	1177	17,35	0,16
8	p-cymène	1025	1275	17,84	0,11
9	limonène	1031	1194	18,14	0,64
10	β -phéllandrène	1031	1200	18,14	
11	1,8-cinéole	1033	1200	18,22	0,18
12	cis- β -ocimène	1045	1242	18,95	0,19
13	trans- β -ocimène	1057	1260	19,61	1,50
14	γ -terpinène	1066	1248	20,17	0,10
15	terpinolène	1097	1287	22,14	2,11
16	linalool	1111	1559	23,04	0,18

Fruits					
N°	Composés	RI DB-5 ^a	RI Spwa ^b	Tr (min)	%
17	fenchol	1121		23,73	0,11
18	2-méthyl-6-méthylène-1,7-octadièn-3-one	1128		24,24	0,12
19	bornéol	1167	1699	27,23	0,08
20	terpin-1-en-4-ol	1177	1598	28,05	0,10
21	α -terpinéol	1188	1699	28,99	0,33
22	δ -élémente	1342	1469	38,75	10,44
23	α -copaène	1375	1485	41,07	0,36
24	β -élémente, isomère.	1383	1572	41,69	0,13
25	β -élémente	1389	1581	42,14	4,20
26	β -caryophyllène	1414	1581	43,69	0,91
27	β -copaène	1421	1565	44,04	0,20
28	tr- α bergamotène	1436	1581	44,85	0,10
29	6,9-guaiadiène	1443	1595	45,20	0,41
30	tr-muuro-la-3,5-diène	1450	1612	45,60	0,48
31	α -humulène	1452	1656	45,72	0,73
32	cis-cadina-1(6),4-diène	1452	1626	45,72	
33	trans-9-épi-caryophyllène	1459		46,14	0,34
34	4,5-diepi-aristolochène	1469		46,69	0,23
35	β -chamigrène/séline-4,7-diène	1477	1665	47,13	6,16
36	γ -muurolène	1477	1679	47,13	
37	α -amorphène	1481	1699	47,41	0,87
38	β -sélinène	1486	1705	47,66	7,56
39	β -sélinène, isomère	1489	1705	47,80	0,57
40	cis- β -guaiène	1492	1649	47,96	0,41
41	δ -sélinène	1493	1684	48,06	2,05
42	α -sélinène	1496	1711	48,23	8,45
43	épizonarene	1502	1705	48,53	0,50
44	α -muurolène	1503	1717	48,63	0,99
45	germacrène A	1506	1759	48,78	1,09
46	δ -amorphène	1510	1718	49,01	0,65
47	γ -cadinène	1516	1749	49,36	0,84
48	7-épi- α -sélinène	1518	1735	49,48	0,32
49	α -alaskène	1522	1749	49,75	1,06
50	δ -cadinène	1526	1749	49,97	2,82
51	tr-cadina-1,4-diène	1533	1779	50,42	0,41
52	zonarène	1538	1749	50,72	0,42
53	séline-3,7-diène	1541	1763	50,88	0,34
54	α -calacorène	1541	1904	50,88	
55	élémol	1549	2077	51,39	0,37
56	germacrène B	1554	1817	51,71	0,12
57	caryophyllène alcool	1565	2050	52,38	0,52
58	caryophyllène oxide	1575	1953	53,02	0,13
59	globulol	1578	2063	53,21	0,49
60	guaiol	1594	2084	54,23	0,57

Fruits					
N°	Composés	RI DB-5 ^a	RI Spwa ^b	Tr (min)	%
61	10-épi- γ -eudesmol	1604	2127	54,87	2,82
62	1,10-doépi-cubéno	1609	2036	55,07	1,27
63	1-épi-cubéno	1619		55,58	1,04
64	τ -eudesmol	1623	2158	55,78	3,06
65	muuro	1623	2247	55,78	
66	τ -cadinol	1637	2162	56,44	2,86
67	τ -muuro	1637	2177	56,44	
68	α -muuro	1645	2188	56,83	2,68
69	β -eudesmol	1645	2211	56,83	
70	Pogostol	1650	2237	57,09	8,69
71	α -cadinol	1650	2219	57,09	
72	α -eudesmol	1650	2204	57,09	
73	α -séli	1660		57,65	0,39
74	tr-calamè	1663		57,84	0,01
75	14-hydroxy-9-epi-E-caryophyllène	1669		58,11	0,76
76	γ -costol	1744	2515	62,06	0,45
77	β -costol	1760	2592	62,94	0,76
78	α -costol	1766	2588	63,27	0,84
TOTAL IDENTIFIE					90,50

A récolte au stade de germination de la plante

B récolte au stade de fructification de la plante

Composés majoritaires

L'huile essentielle des fruits comprend 78 composés identifiés soit 90,5% de l'extrait. On trouve 81,8% de sesquiterpènes, incluant 27,8% sesquiterpènes oxygénés. Le composé majoritaire est le δ -élémente, représentant 10,4% de l'essence, uniquement présent dans cette partie de la plante.

Les autres composés caractéristiques présents dans l'huile essentielle sont α -séliène (8,5%), β -séliène (7,6%), β -chamigrène/séli

Le β -élémente n'est représenté qu'à 4,20% comme dans les écorces. Par contre son isomère le δ -élémente est présent. Ce composé est d'ailleurs identifié uniquement dans les huiles essentielles des fruits.

A titre de comparaison, nous présentons dans le tableau ci-après, les principaux composés des huiles essentielles de *N. membranacea* de Guadeloupe et du Costa Rica.

Tableau 19 : Comparaison principaux composants des huiles essentielles de feuilles de *N. membranacea* de Guadeloupe et du Costa Rica (principaux terpènes)

Espèces		<i>N. membranacea</i> Guadeloupe		<i>N. membranacea</i> Costa Rica
Parties de la plante		Feuilles		Feuilles
Stade de récolte		A	B	
MONOTERPENES	α -pinène	3,14	2,39	22,40
	β -pinène	1,97	1,44	12,60
	myrcène	0,20	0,18	Traces
	δ -3-carène	0,16	0,14	1
	α -terpinéol	0,14	0,14	Traces
	1,8-cinéole	0,10	0,10	1,90
	limonène et β phellandrène	0,20	0,16	Traces
	terpinolène	0,86	0,79	-
SESQUITERPENES	β -élémente	31,25	30,31	0,60
	germacrène A	12,33	10,82	Traces
	α -sélénène	8,16	9,74	-
	β -sélénène	9,00	9,61	-
	β -caryophyllène	4,44	5,30	5,50
	pogostol	6,46	6,51	-
	β -chamigrène	2,63	3,93	-
	α -copaène	0,16	0,18	12,5
	α -humulène	0,66	0,91	5,60
	germacrène D	0,40	0,37	6,90
	δ -cadinène	0,31	0,35	14,1
	bicyclogermacrène	-	-	4,80
	alloaromadendrène	1,98	1,82	2,20
	α -cadinol	0,66	0,55	0,70

A récolte au stade de germination de la plante

B récolte au stade de fructification de la plante



Composés majoritaires dans *N. membranacea* de Guadeloupe



Composés majoritaires dans *N. membranacea* de Costa Rica

Contrairement à l'huile essentielle des feuilles de Guadeloupe riche en β -élémente et en germacrène A, celle du Costa Rica est riche en monoterpènes dont α -pinène (22,4%) et β pinène (12,60%). Ils sont les plus représentés et constituent la grande part (35 %) de l'huile essentielle de Costa Rica alors qu'ils sont en faibles proportions (4 à 5 %) dans les huiles essentielles des feuilles de *N. membranacea* de Guadeloupe. Concernant les sesquiterpènes l' α -

copaène (12,5%) et le δ -cadinène (14,1%) sont très présents dans H.E des feuilles de Costa Rica, alors qu'ils sont minoritaires dans l'espèce de Guadeloupe.

Ainsi donc, l'huile essentielle de *N. membranacea* de Guadeloupe est très riche en sesquiterpènes qui représentent aussi les composés majoritaires de l'essence. A l'inverse, ces derniers sont faiblement représentés ou absents de l'essence du Costa Rica, riche en monoterpènes.

La composition chimique est donc différente de *N. membranacea* de Costa Rica.

Dans les huiles essentielles de Guadeloupe, β -élémane, α -sélinène et β -sélinène sont majoritaires et présents dans tous les extraits.

Le chémotype ou race chimique de chaque huile essentielle est :

- Chémotype : β -élémane (30-31,3%) / germacrène A (10,8-12,3%) / β -sélinène (9,0-9,6%) pour l'huile essentielles de *N. membranacea* de Guadeloupe.
- Chémotype : α -pinène (22,4%) / δ -cadinène (14,1%) / β -pinène (12,6%) pour l'huile essentielle de *N. membranacea* de Costa Rica.

D'autre part, on observe des différences dans la composition chimique de l'essence de Guadeloupe pour les écorces, les feuilles et les fruits. La présence et la concentration de certains constituants chimiques fluctuent selon la maturation de la plante [Chu et kemper, 2001].

Ces résultats démontrent que, pour une même espèce botanique, la composition chimique de l'huile essentielle n'est pas immuable. Les huiles essentielles sont élaborées par les plantes aromatiques au sein des cellules sécrétrices. Cette variabilité peut être influencée par la composition du sol et la position géographique [Inouye et Abe, 2003].

Les différences observées ici restent tout de même très importantes. Afin d'envisager une valorisation de ces huiles essentielles, une étude bibliographique des activités biologiques de leurs principaux constituants a été effectuée. Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 20 : Activités biologiques des principaux constituants des huiles essentielles de *Nectandra membranacea*

Composés	Activités biologiques connues	Réf.
122 β -élémane	Anticancéreux (gastrique). Efficace contre traitement de la leucémie, tumeur cérébrale, cancer du sein, du poumon et cancer du foie	Liu Jing, 2011 Zhou H. et al. 2003 Zou L. et al. 2001 Yuan J. et al. 1999 Qian J. et al. 1999 Zheng S. et al. 1997 Qingdi Q. et al. 2009
6 δ -élémane	Induction de l'apoptose sur cellules HeLa (lignée cellulaire utilisée en biologie cellulaire et recherche médicale)	Wang XS et al. 2006
7 α -pinène	Antibactérien, anti-inflammatoire, antiviral, expectorant, sédative, herbicide, insectifuge, aromatisant	Duke, 1998
14 β -caryophyllène	Anti-inflammatoire, antibiotique, antioxydant, analgésique	Legault J et Pichette A. 2007
123 Pogostol	Activité antibactérienne	Xian Yang, 2013
15 α -humulène	Activité cytotoxique, anti-inflammatoire	Adil el Hadri et al. 2010

Les activités biologiques répertoriées des composés majoritaires des huiles essentielles de *N. membranacea* laissent envisager de très bonnes propriétés pour ces essences, du fait notamment des possibles effets de synergie. On peut envisager des utilisations médicinales ou cosmétiques d'autant que la source des feuilles ne condamne pas le végétal.

L'étude des huiles essentielles des feuilles et des fruits de *Nectandra membranacea* font l'objet d'un article qui sera publié bientôt. Par contre, pour les huiles essentielles des écorces, une analyse plus approfondie sera réalisée.

11.3. Composés apolaires non-volatils

L'extraction des composés apolaires sur la matière végétale (feuilles et écorces aux deux stades, fruits) sèche et broyée est réalisée par ultrasons avec du cyclohexane (moins toxique que l'hexane). Les rendements obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 21 : Rendement des extraits apolaires des feuilles, écorces et fruits pour les deux stades de récolte

Partie de la plante	Feuilles		Ecorces		Fruits
Stade de récolte	A	B	A	B	
Rendement %	2,1	1,2	2,0	1,9	30,1

Le rendement le plus important en composés apolaires est, de façon prévisible, obtenu pour les fruits (30,07%). Pour les feuilles et les écorces, les rendements sont faibles avec des valeurs allant de 1,20 à 2,03%. Il n'y a pas de différences notables entre les deux stades de récolte pour les écorces. Néanmoins, pour les feuilles, on peut noter que le stade B (1,20%) présente un rendement pratiquement deux fois plus faible qu'au stade A (2,03%).

11.3.1. Composition chimique des extraits apolaires

Les extraits apolaires sont des solides, vert-brun foncé, parfois visqueux et épais (extrait de fruit). Pour cette raison l'indice de réfraction n'a pas pu être mesuré. Environ 30% du pourcentage relatif des extraits ont pu être identifiés. Nous présentons ci-après, leur composition chimique déterminée par GC/MS. Le reste des extraits correspond en majorité à des phtalates.

Tableau 22 : Composition chimique (%) des extraits apolaires des feuilles et des écorces de *Nectandra membranacea*

Famille chimique	N°	Composé	RI DB-5	RI Spaw	% Feuille A	% Feuille B	% Ecorce A	% Ecorce B
Sesquiterpènes	1	α - cubébène	1366	1450				0,29
	2	α -ylangène	1373	1462				0,15
	3	α -copaène	1377	1470	traces	0,12	traces	0,11
	4	β -cubébène	1389					0,16
	5	β -élémane	1390	1570	2,92	2,70	1,85	0,24
	6	β -ylangène	1416	1559				
	7	β -caryophyllène	1414	1564	0,72	1,12	0,85	

Famille chimique	N°	Composé	RI DB-5	RI Spaw	% Feuille ^A	% Feuille ^B	% Ecorce ^A	% Ecorce ^B
	8	Trans- α -bergamotène	1438			0,18	0,16	
	9	Aromadendr-9-ène	1459					0,12
	10	Alloaromadendrène	1459	1602	0,62	0,77	0,86	
	11	9-épi-B-caryophyllène	1459					
	12	4,5-di-épi-aristolochène	1472			0,24	0,23	
	13	Sélina-4,11-diène	1477	1646	1,49	1,92	2,08	0,33
	14	γ -muurolène	1477	1665				
	15	β -sélinène	1489	1681	5,6	7,59	7,81	0,76
	16	Valencène	1491			0,56	0,56	
	17	α -sélinène	1498	1689	4,32	6,85	7,20	0,51
	18	7-épi- α -selinène	1520		traces	0,29	0,30	
	19	Cadalène	1681					0,24
	Terpènes et sesqui. oxygénés	20	Oxyde de caryophyllène	1576	1929	0,66	0,74	0,80
21		Epoxyde d'humulène II	1602		traces		0,39	Traces
22		1-épi-cubénol						0,17
23		α -muurolol						0,13
24		β + α eudesmol	1648					0,27
25		Sélin-11-ène-4- α -ol	1649		0,90	1,63	1,68	0,32
26		14-hydroxy-9-épi- β -caryophyllène	1672		0,39	0,84	0,63	
27		β -costol	1763					0,51
28		Acide Isocostique	1782					1,51
29		Acide β -costique	1796					10,52
30	Phytol	2117		0,21				
Acides gras	31	Acide tétradécanoïque (acide myristique)	1734					0,13
	32	Acide Hexadécanoïque (acide palmitique)	1932		0,30	0,74	0,74	Traces
	33	Acide Linoléique	2097	2480	traces	0,36	0,32	0,32
	34	Acide oléique	2104		0,30	0,57	0,63	0,29
	35	Acide octadécanoïque (acide stéarique)	2117	2413		0,19	traces	
Alcanes	36	Nonacosane	2894	2903	1,99	1,62	1,51	0,10
	37	Untriacontane	3137		1,11	0,30	0,50	0,28
Toco Pherol	38	Vitamine E isomère	3137					1,06
	39	Vitamine E	3166	4010	4,50	2,72		
Stérol	40	β -sitostérol	3398		0,81	0,47	0,47	0,37
TOTAL IDENTIFIE					26,84	32,52	30,63	18,08

A récolte au stade de germination de la plante

B récolte au stade de fructification de la plante

Composés majoritaires

Analyse de la composition chimique des Feuilles

- **Stade A**

Dans les extraits de feuilles, 19 composés ont été identifiés qui correspondent à 26,8% de l'extrait. 11 composés n'ont pu être identifiés (soient 8,6 %) et les 64,5% restant correspondent à des phtalates. Différentes familles de molécules sont retrouvées : sesquiterpènes (15,7%), terpènes oxygénés (2,2%), acides gras (0,6%), alcanes (\approx 3,1%), tocophérols (\approx 5,0%) et stérols (0,8%).

Les sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés identifiés sont les mêmes que ceux identifiés dans l'huile essentielle des feuilles (stade A), dont les majoritaires sont le β -élémane (2,9%), les β et α -sélinènes (respectivement 5,6 et 4,3%), le mélange sélina-4,11-diène / γ -muurolène (1,5%) et le sélin-11-èn-4- α -ol (0,9%).

Les lipidiques déterminés sont divers mais en très faibles proportions pour certains, moins de 1% pour les acides gras : acide palmitique (0,3%) et acide oléique (0,3 %) pour les plus importants. On retrouve aussi des traces d'acide linoléique. Un seul stérol a été retrouvé, le β -sitostérol (0,8%). La vitamine E (4,5%), très connue pour ses propriétés antioxydantes, et son précurseur le phytol (0,2%) sont présents dans l'extrait apolaire des feuilles (stade A).

Tableau 23 : Analyse de l'extrait apolaire de feuilles stade A par GC/FID et GC/MS

	26,8 % Identifiés (19 composés)
<u>Extrait</u>	8,6 % Inconnus (11 composés). Les m/z inconnus des bases de données utilisées
<u>Feuille stade A</u>	3,7 % Phtalates(récupérées lors des étapes d'extraction)
	7,5% Impuretés (récupérées lors des étapes de broyage et d'extraction)

- **Stade B**

Au stade de fructification, les composés majoritaires sont les mêmes que précédemment avec des proportions différentes, parfois plus élevées.

Nous retrouvons donc dans cet extrait 23 composés identifiés (32,5%) avec : 22,3% de sesquiterpènes, 3,2 % de sesquiterpènes oxygénés, 1,9 % d'acide gras, 2,7 % de tocophérols, 0,5 % stérol et 1,9% d'alcanes.

Les composés majoritaires sont les β et α -sélinène (respectivement 7,6 et 6,9 %), le β -élémane (2,7 %), la vitamine E (2,7 %) deux fois moins importante que dans le stade A, le mélange sélina-4,11-diène / γ -muuroène (1,9%) et le sélin-11-èn-4- α -ol (1,6%). Les acides gras sont peu nombreux et en faible proportion. Nous retrouvons l'acide palmitique (0,7%), l'acide linoléique (0,4 %), l'acide oléique (0,6 %) et l'acide stéarique (0,2%). Le stérol identifié est le β -sitostérol (0,5%). 11 composés n'ont cependant pas pu être identifiés dans l'extrait (8,2%).

Tableau 24 : Analyse de l'extrait apolaire de feuilles stade B par GC/FID et GC/MS

32,3 % Identifiés (23 composés)	
<u>Extrait</u>	6,6 % Inconnus (12 composés). Les m/z inconnus des bases de données utilisées
<u>Feuille stade B</u>	2,5 % Phtalates
	18,6 % Impuretés (récupérées lors des étapes de broyage et d'extraction)

Récapitulatif

Les compositions qualitatives des extraits apolaires de feuilles sont comparables au stade de germination ou de fructification. Les proportions ne sont pas identiques. Certains composés sont présents dans les mêmes proportions alors que pour d'autres les quantités sont différentes. On peut citer la vitamine E, en proportion plus élevée au stade A (x 1,65), ou encore au stade B, en plus grande quantité on retrouve, l' α -sélinène (x 1,58) et le β -sélinène (x 1,35).

On note néanmoins, quelques composés supplémentaires lors de la fructification, le trans- α -bergamotène (0,2%); le 4,5-di-épi-aristolochène (0,24 %); le valencène (0,6%), le 7-épi- α -sélinène (0,3 %) et l'acide stéarique (0,2 %).

Analyse de la composition chimique des écorces

- **Stade A**

21 composés sont identifiés correspondant à 30,63% de l'extrait. Ce stade A est constitué de sesquiterpènes (21,9%), de sesquiterpènes oxygénés (3,50%), d'acide gras (1,7 %), d'alcanes (2,0 %), de tocophérol (1,1 %) et stérol (0,5%).

Les composants majoritaires sont les suivants : les α et β -sélinène (7,2 et 7,8% respectivement), le sélina-4,11-diène (2,1 %), β -élémane (1,85%), le sélin-11-èn-4- α -ol (1,7%), le nonacosane (1,5%) et un isomère de la vitamine E (1,1%). Les acides gras retrouvés sont les acides palmitique (0,7 %), linoléique (0,3%), oléique (0,6%) et des traces d'acide stéarique. Le β -sitostérol (0,5%) est aussi détecté. 8 composés n'ont pu être identifiés ce qui correspondent à 7,52% de l'extrait.

Tableau 25 : Résultat de l'analyse de l'extrait d'écorce stade A par GC/FID et GC/MS

30,6% Identifiés (21 composés)	
<u>Extrait</u>	7,5% Inconnus (8 composés). Les m/z inconnus des bases de données utilisées
<u>Écorce stade A</u>	9,2 % Phtalates (récupérées lors des étapes d'extraction)
	7,8% Impuretés (récupérées lors des étapes de broyage et d'extraction)

- **Stade B**

Dans cet extrait 27 composés sont identifiés représentant 18,1% du total. Parmi ces composés, des sesquiterpènes (2,9 %), des terpènes oxygénés (13,6 %), des acides gras (0,7%), des alcanes (0,4 %), un tocophérol, un isomère de la vitamine E (0,1%) et un stérol (0,4%) sont retrouvés.

Le composé majoritaire est l'acide β -costique avec 10,5%. On note également la présence de l'acide isocostique 1,5% et du β -costol 0,5 %.

Les composés retrouvés précédemment sont les mêmes dans l'extrait récolté lors de la germination mais en très faible proportion (<1%). On retrouve l' α -sélinène (0,5 %) et le β -sélinène (0,8 %), le mélange sélina-4,11-diène / le γ -muurolène (0,3%), le β -élémane (0,24%), le sélin-11-èn-4- α -ol (0,3%), le nonacosane (0,10%) et un isomère de la vitamine E (0,28%). Les acides gras retrouvés sont les acides linoléique (0,3%), oléique (0,3%), myristique (0,13%), des traces d'acides stéarique et palmitique. On note la présence du β -sitostérol (0,37%). Huit composés restent non identifiés dans l'extrait (14,1%).

Tableau 26 : Analyse de l'extrait apolaire de l'extrait d'écorce stade B par GC/FID et GC/MS

18,1 % Identifiés (27 composés)	
Extrait	14,1% Inconnus (8 composés). Les m/z inconnus des bases de données utilisées;
Écorce stade B	5,9 % Phtalates (récupérées lors des étapes d'extraction)
	18,6 % Impuretés (récupérées lors des étapes de broyage et d'extraction)

En résumé

Les mêmes composés sont retrouvés dans les feuilles et les écorces. Par contre, leurs proportions sont plus faibles au stade B. Néanmoins, la quantité de sesquiterpènes, de terpènes oxygénés et d'acide gras est plus importante.

A la germination, les α et β -sélinène ainsi que le β -élémane pour les feuilles sont représentés respectivement à 7,2%, 7,8% et 1,9% tandis que pour le stade B, ces proportions sont nettement plus faibles, respectivement 0,51%, 0,767% et 0,2 % soit environ plus de 10 fois inférieures à celles du stade A. La vitamine E est retrouvée en quantité deux fois plus importante au stade A.

Pour les écorces, le composé le plus abondant lors de la fructification est l'acide β -costique (10,5 %), absent lors de la germination. La vitamine E est en très faible quantité au stade B (0,1%). D'autres composés apparaissent comme l'acide isocostique (1,5 %), le β -cubébène (0,2 %), le β -ylangène (0,2 %), le cadalène (0,2%), les β et α -eudesmol (0,3%) le β -costol (0,5%), le tétradécanoate de méthyle (0,1%); le α -muurolol (0,1%) et le 1-épi-cubénol (0,2%).

Composition chimique de l'extrait apolaire de fruit :

C'est l'extrait apolaire le plus abondant sa composition est ici présentée :

Tableau 27 : Composition chimique (%) des extraits apolaires des fruits de *N. membranacea*

Famille chimique	N°	Composé	RI DB-5	RI Spaw	Fruit
Sesquiterpènes	1	δ élémène	1344	1457	0,61
	2	α -cubébène	1366	1450	0,07
	3	α - ylangène	1373	1462	0,15
	4	α -copaène	1377	1470	0,45
	5	β -élémane	1390	1570	1,53
	6	β -ylangène	1416	1559	0,31
	7	β -caryophyllène	1414	1564	
	8	β -copaène	1428		0,42

Famille chimique	N°	Composé	RI DB-5	RI Spaw	Fruit	
	9	Guaia-6,9-diène	1444	1578	0,18	
	10	Sélina-4(15)6-diène	1462		0,42	
	11	Sélina-4(15)7diène	1462		0,22	
	12	4,5-di-épi-aristolochène	1472		0,14	
	13	Sélina-4,11-diène	1477	1646	3,66	
	14	γ -muurolène	1477	1665		
	15	α -amorphène	1484		0,43	
	16	β -sélinène	1489	1681	5,08	
	17	Bicyclosesquiphellandrène			0,52	
	18	α -sélinène	1498	1689	3,81	
	19	α -muurolène	1505		0,45	
	20	7-épi- α -sélinène	1520		0,13	
	21	δ -cadinène	1528	1725	0,34	
	22	γ -cadinène			0,14	
	23	α -cadinène	1540	1794	0,23	
	24	α -calacorène	1540	1725		
	25	Cadalène	1681		0,34	
	Sesquiterpènes oxygénés	26	Oxyde de caryophyllène	1576	1929	
		27	Guaia-6,10(14)-dién-4- β -ol	1627	2224	4,76
		28	τ -cadinol	1640	2141	0,43
		29	β + α eudesmol	1648		0,39
		30	Sélin-11-én-4 α -ol	1649		1,81
	Acide Gras	31	Acide dodécanoïque	1580	2481	9,06
		32	Dodécanoate de métyle	1533		3,55
		33	Acide tridécanoïque	1633	1916	0,25
34		Acide hexadécanoïque	1932		0,56	
35		Acide linoléique	2097	2480	0,61	
36		Acide oléique	2104		0,94	
37		Acide stéarique	2136	2410	0,14	
Alcanes	38	Nonacosane	2894	2903	0,12	
TOTAL IDENTIFIE			42,25			

A récolte au stade de germination de la plante

B récolte au stade de fructification de la plante

Composés majoritaires

Avec 38 composés identifiés soit 42,2 %, l'extrait de fruit est constitué de 19,6% de sesquiterpènes, 15,1% d'acide gras, 7,4% de sesquiterpènes oxygénés et 0,1 % d'alcanes.

Les composés majoritaires sont l'acide dodécanoïque ou acide laurique (9,1 %), le β -sélinène (5,1 %), le guaia-6,10 (14)-dièn-4- β -ol (4,8 %), l' α -sélinène (3,81%), le sélina-4,11-diène et le γ -muurolène (3,7%), le dodécanoate de méthyle (3,55%), le sélina-11-èn-4 α -ol (1,8%) et le β -élémente (1,5%).

Les acides gras suivants sont également retrouvés : les acides tridécanoïque (0,3%), hexadécanoïque ou acide palmitique (0,6%), linoléique (0,6%), oléique (0,9%) et stéarique (0,1%).

Tableau 28 : Analyse de l'extrait apolaire des fruits par GC/FID et GC/MS

42,3% Identifiés (38 composés)	
<u>Extrait</u>	1,3 % Inconnus (8 composés). Les m/z inconnus des bases de données utilisées
<u>Fruit</u>	2,6% Phtalates (récupérées lors des étapes d'extraction)
	1,5% Impuretés (récupérées lors des étapes de broyage et d'extraction)

L'ensemble des extraits apolaires est majoritairement constitué de sesquiterpènes, qui ont aussi été retrouvés aussi dans les huiles essentielles : le β -élémente, les α et β -sélinène pour les plus importants. La teneur en acide gras est faible, les principaux identifiés sont les acides palmitique, linoléique, et oléique que l'on retrouve également dans les feuilles de *N. gardneri* [Fernanda R. et al., 1999]. D'autres acides gras sont présents mais uniquement lors de la fructification et dans des parties spécifiques de la plante : l'acide stéarique, dans les feuilles, l'acide myristique dans les écorces et l'acide laurique dans les fruits uniquement.

Le seul stérol trouvé est le β -sitostérol présent dans les feuilles et les écorces, mais non détecté dans les fruits de *N. membranacea*. Ce composé est néanmoins retrouvé dans les fruits d'autres espèces de *Nectandra* comme *N. glabrescens* [José M. Barbosa-Filho et al., 1991] et de *N. amazonum* [Ahmad et al.; 1992].

La plupart des composés majoritaires se retrouve dans toutes les parties de la plante, soient les feuilles, les écorces et les fruits mais dans des proportions différentes. Lors de la fructification, d'autres composés apparaissent dans les écorces et les fruits, l'acide β -costique 10,5 % et l'acide dodécanoïque (acide laurique) 9,06 % respectivement. L'acide β -costique a déjà été isolé des

écorces de *N. membranacea* du Costa Rica [Xiujun et al., 2006] ainsi que chez *N. grandiflora* [Moreno et al., 1993], et *N. cissiflora* [Fernanda et al., 2010]. Un dérivé de l'acide isocostique, l'acide 3-isocostique a aussi été identifié chez *N. cissiflora* et *N. membranacea* (Costa Rica) [Fernanda et al., 2010, Xiujun et al., 2006].

Les résultats obtenus par l'extraction apolaire sur les feuilles, les fruits et les écorces de *Nectandra membranacea* seront publiés.

Le tableau ci-dessous rassemble les structures des composés majoritaires issus des extraits apolaires de *N. membranacea*.


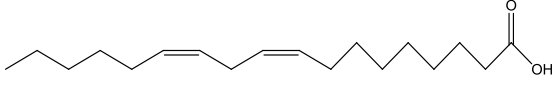
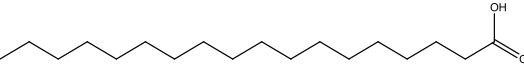
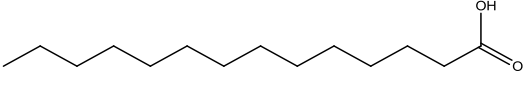
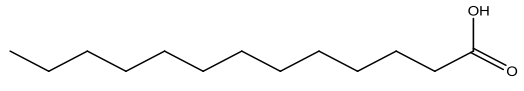
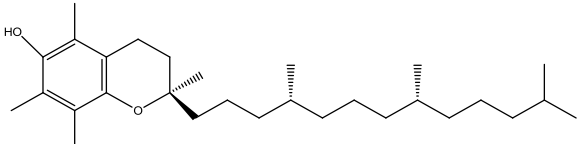
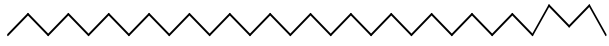
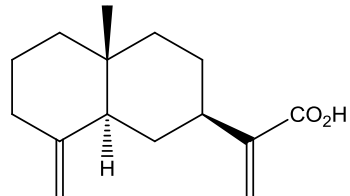
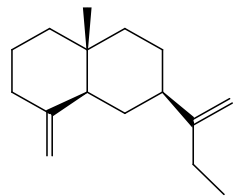
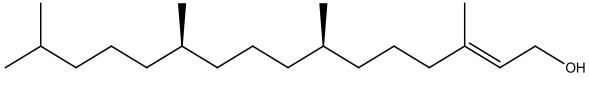
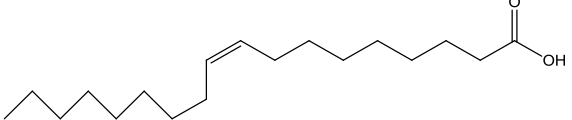
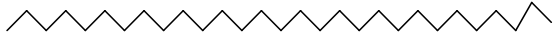
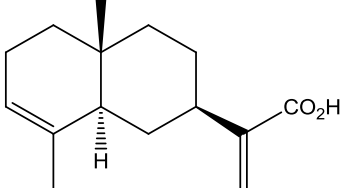
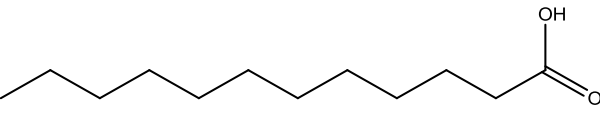
<p>28 Acide palmitique</p> 	<p>29 Acide linoléique</p> 
<p>124 Acide stéarique</p> 	<p>125 Acide myristique</p> 
<p>126 Acide tridécanoïque</p> 	<p>127 Vitamine E</p> 
<p>128 Untriacontane</p> 	<p>20 Acide costique</p> 
<p>129 B-costol</p> 	<p>130 Phytol</p> 
<p>27 Acide oléique</p> 	<p>131 Nonacosane</p> 
<p>21 Acide isocostique</p> 	<p>132 Acide laurique</p> 

Figure 47 : Composés majeurs identifiés dans les extraits apolaires de *N. membranacea*

Le chapitre suivant présente les résultats des analyses des extraits polaires réalisés sur les différentes parties de la plante. La sélection des extraits s'est effectuée de façon bio guidée.

12. Analyse bio guidée des composés polaires

L'extraction par ultrason a été préférée au soxhlet et à la macération pour sa simplicité de mise en œuvre et sa faible consommation en solvant. Le choix des extraits polaires à analyser en priorité a été orienté par les tests d'activités biologiques notamment par l'évaluation de l'activité antioxydante.

12.1. Extraction par ultrasons

Les rendements d'extraction calculés sont représentés sur la figure ci-dessous :

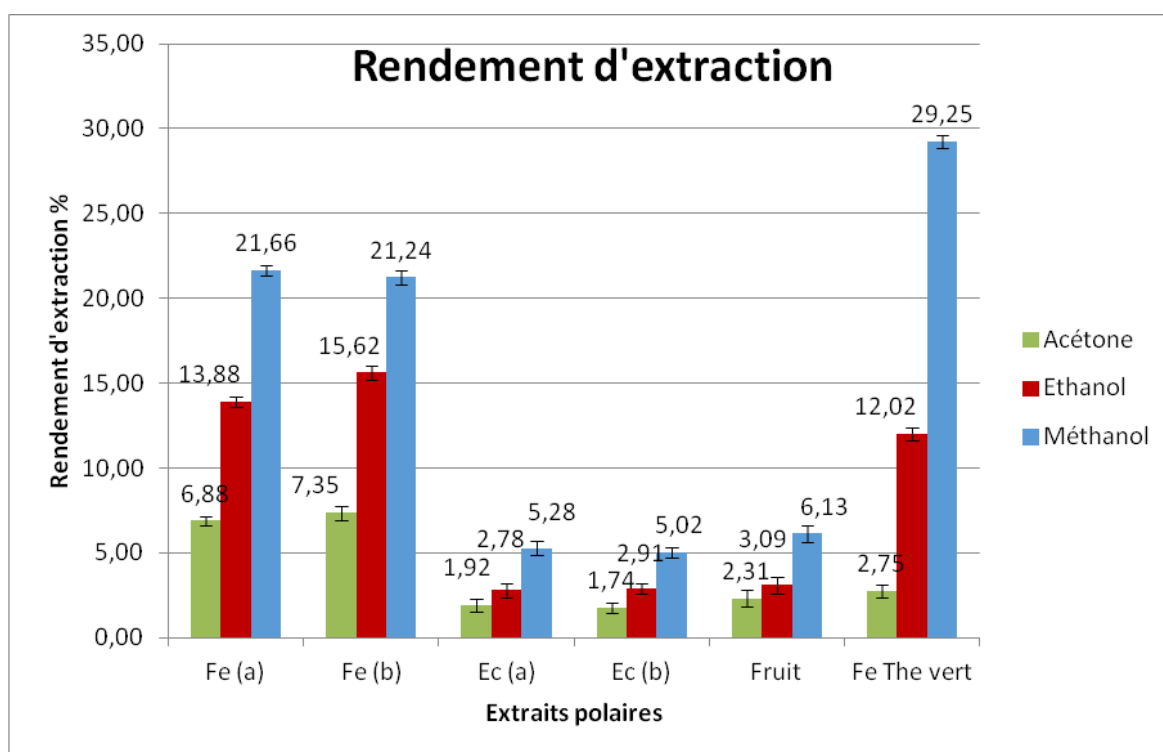


Figure 48 : Rendement d'extraction par ultrasons des différentes parties de la plante et du thé vert

Il ressort à l'observation des rendements d'extraction de la figure 48, que pour les solvants polaires, le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction soit une moyenne d'environ 22% pour les feuilles, de 5% pour les écorces, et de 6% pour les fruits.

Avec l'éthanol, les rendements sont un peu moins élevés, on obtient une moyenne de 15,75% pour les feuilles, 2,84% pour les écorces et de 3,09% pour les fruits. L'acétone est le solvant pour lequel les rendements sont les plus faibles, les valeurs variant entre 1,74 et 7,35%.

Les rendements d'extraction varient en fonction des parties de la plante (écart entre les feuilles et les écorces de 16,3% avec le méthanol, 11,91% avec l'éthanol et 3,88% avec l'acétone). En ce qui concerne les deux stades de récolte, on observe des écarts variant de 11 % à 17,4 %.

12.2. Dosage des polyphénols totaux

La méthode de Folin Ciocalteu a été utilisée pour quantifier les polyphénols des extraits de *N. membranacea*. L'ensemble des composés phénoliques est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration bleue produite possède une absorption maximum aux environs de 750 nm qui est proportionnelle au taux de composés phénoliques.

Les figures suivantes montrent la quantité de polyphénols totaux contenus dans les différents extraits de *N. membranacea* ainsi que dans les feuilles de thé vert.

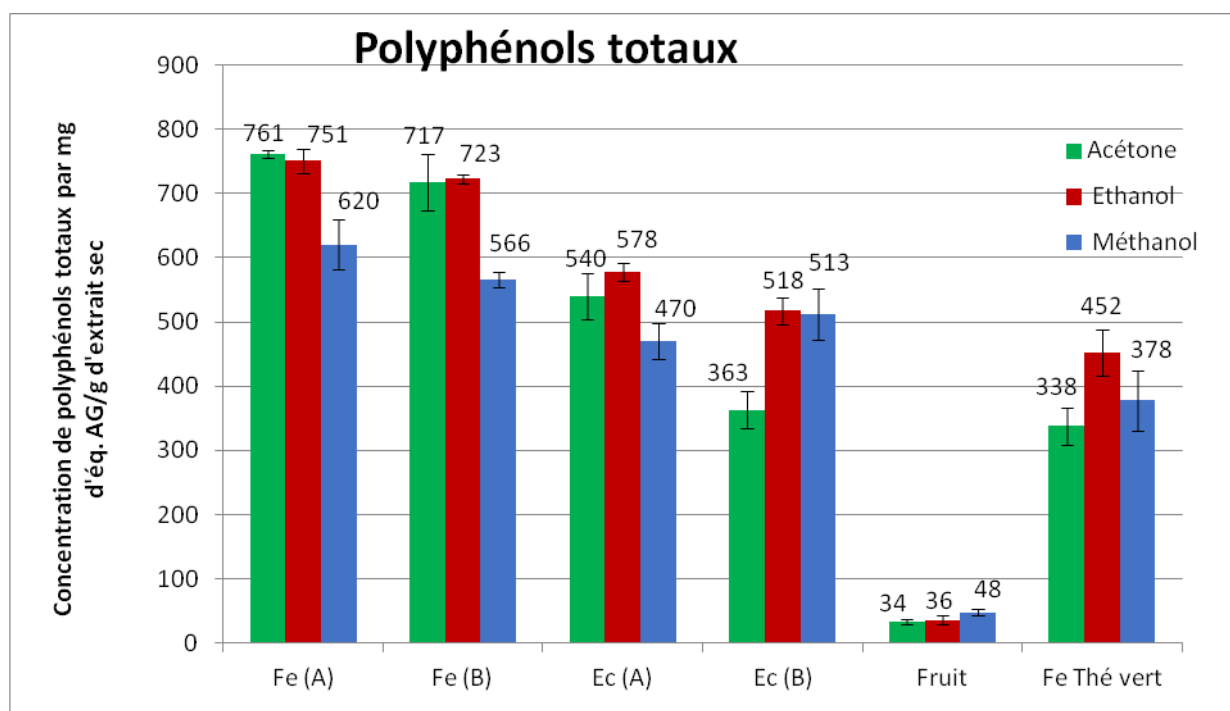


Figure 49 : Quantité de polyphénols totaux par mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec dans les extraits polaires et les feuilles de thé vert

La quantité totale de polyphénols totaux est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique (EAG) par g d'extrait sec (figure 49). Les valeurs sont comprises entre 33,8 et 761,13 mg EAG/g d'extrait sec.

Les feuilles présentent environ entre 620 à 760 mg d'équivalent d'acide gallique/g d'extrait sec de la plante et les écorces 470 à 580 mg/g. Les fruits contiennent très peu de composés phénoliques avec entre 36 et 48 mg d'équivalent d'acide gallique/g d'extrait sec.

Les quantités de polyphénols totaux les plus élevés de 717 à 761 mg EAG/g d'extrait sec sont trouvées respectivement dans les extraits acétone et éthanol des feuilles récoltées lors des stades A et B. Les résultats montrent clairement que les extraits acétone et éthanol donnent de meilleures extractions de polyphénols totaux pour les feuilles. Pour les écorces, il semblerait que ce soit l'éthanol (577,57 et 517,57 mg EAG/g stade A et B). Les fruits quant à eux, ont des résultats inférieurs à 50 mg EAG/g. Ce résultat est en accord avec la bibliographie, car les fruits des *Nectandra* sont riches en sesquiterpènes et lignanes. (*N. glabrescens* [Ahmad et al. 1992], *N. amazonum* [José M. Barbosa-Filho et al. 1991]).

Dans les extraits de thé vert testés, les valeurs sont comprises entre 337,80 et 452,02 mg EAG/g soit deux fois moins importante que la quantité présente dans les extraits de feuilles de *N. membranacea*. Les feuilles de *Nectandra* sont donc plus riches en polyphénols totaux que les feuilles de thé vert utilisée comme témoin.

Le méthanol présente un meilleur rendement d'extraction mais la quantité de polyphénols totaux extraite est moyenne si l'on compare aux deux autres solvants (éthanol et acétone). Le méthanol n'est donc pas un solvant spécifique à l'extraction des polyphénols, il extrait aussi d'autres molécules polaires.

Cette étude montre que la variation de la teneur en polyphénols totaux n'est pas dépendante de la saison de récolte mais de la partie de la plante. Les variations sont hautement significatives notamment pour les feuilles qui donnent les teneurs les plus élevées (690 mg EAG/g d'extrait sec en moyenne). Cette teneur est supérieure à celle enregistrée pour les écorces (497 mg EAG/g d'extrait sec en moyenne) et environ 17 fois supérieure à celle des fruits.

12.3. Analyse chromatographique (CCM, HPLC/DAD) et choix de l'extrait

L'analyse chromatographique des extraits a été réalisée par chromatographie sur couche mince sous UV à 254 nm et 365 nm, après pulvérisation à l'acide sulfurique 10% dans méthanol, et à 365 nm après pulvérisation du réactif NP/PEG.

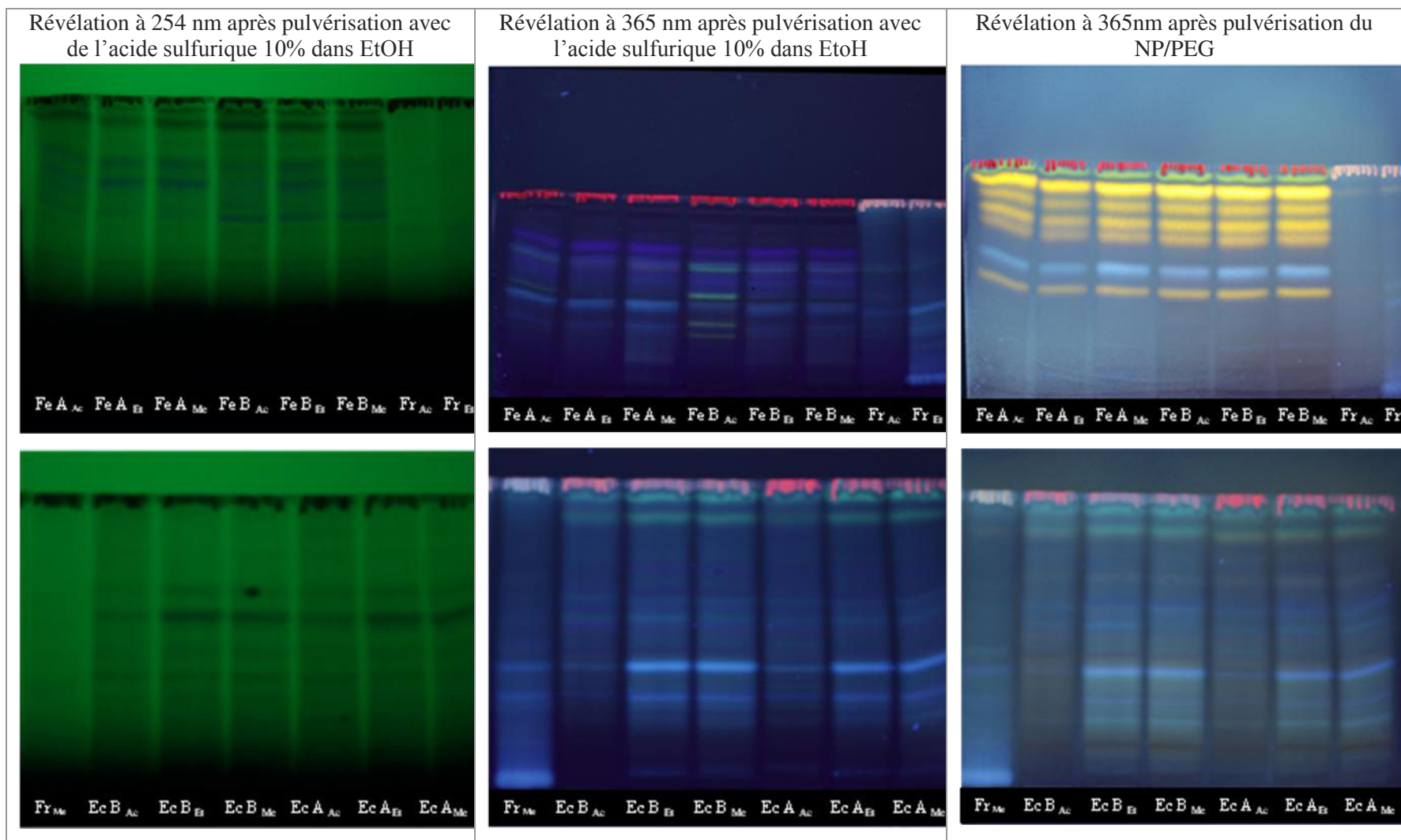


Figure 50 : CCM sur gel de silice des extraits bruts polaires des feuilles, écorces et fruits de *N. membranacea* (AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O) / 100-11-11-20)

Pour chaque partie de la plante deux types de profils chromatographiques distincts sont observés : le profil 1 pour les feuilles et le second profil concernant les écorces. Pour le profil des fruits, très peu de composés polaires sont visibles (traces).

Les différents tests ont montré le fort potentiel antioxydant des extraits de feuilles principalement au stade B de récolte (§14.3.2.1.). Ces extraits présentent également bonne activité anti inflammatoire (§14.3.2.5.)

Au regard des résultats des activités biologiques (§14.3.2.) et des analyses chromatographiques, l'étude poussée de l'extrait de feuilles au stade de fructification (stade B) a été effectuée.

ANALYSE PAR CCM DES EXTRAITS DE FEUILLES STADE B

La chromatographie sur couche mince montre la présence de huit taches majoritaires. La tache rouge correspond aux chlorophylles. Ces huit taches sont dans la même zone chromatographique dans les trois extraits de feuilles (acétone, éthanol et méthanol).

Le révélateur au NP/PEG permet de déterminer les principales familles de molécules présentes dans les extraits de feuilles stade B. Les flavonoïdes sont colorés en vert, les flavonoïdes glycosylés en jaune et les acides phénoliques en bleu. Les spots jaunes qui correspondent aux flavonoïdes sont les plus intenses et les plus nombreux, ils seraient à priori les composés majoritaires dans l'extrait.

Cette analyse qualitative est une première approche de la composition en polyphénols de cet extrait.

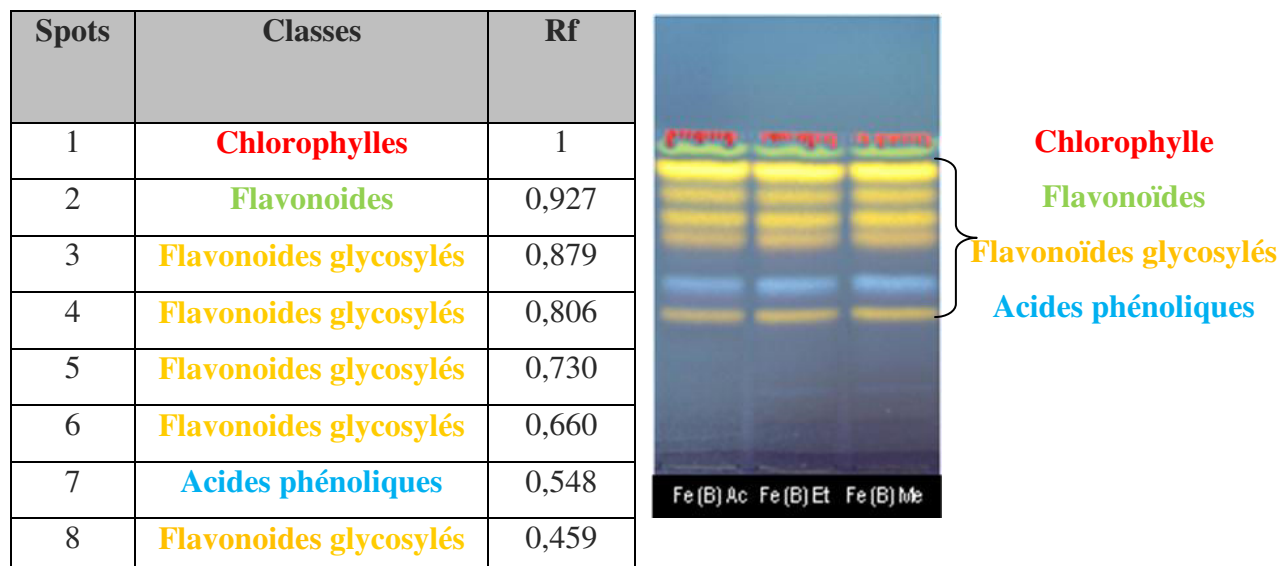
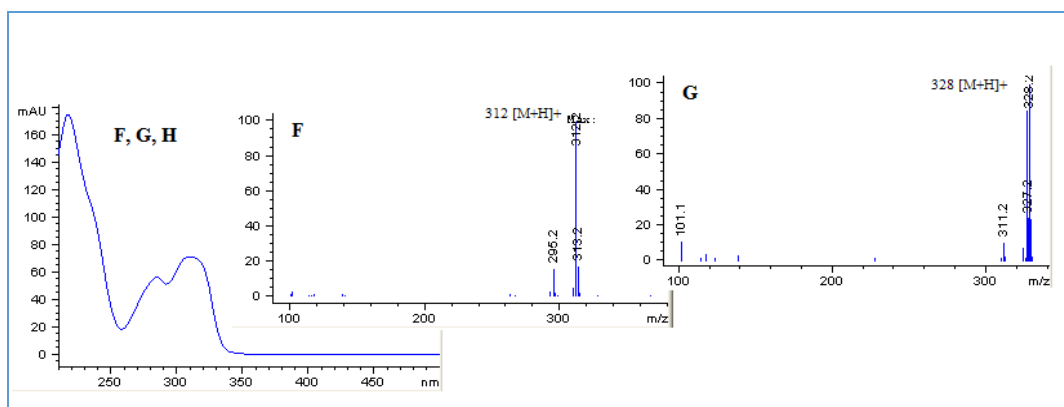
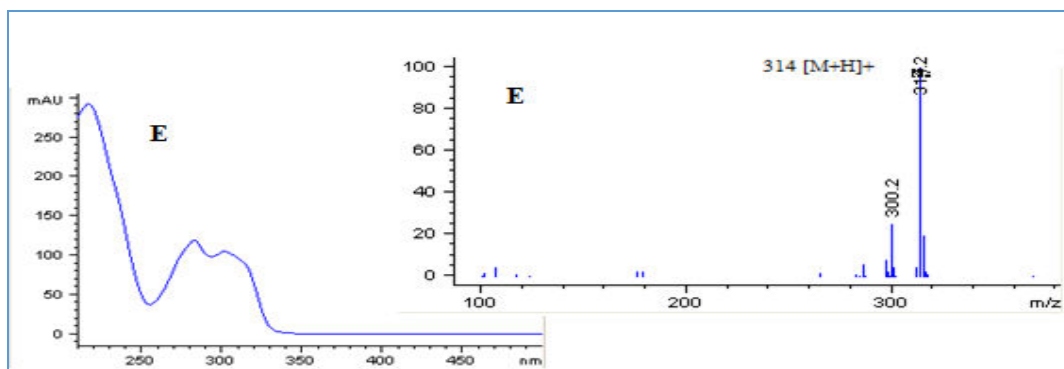
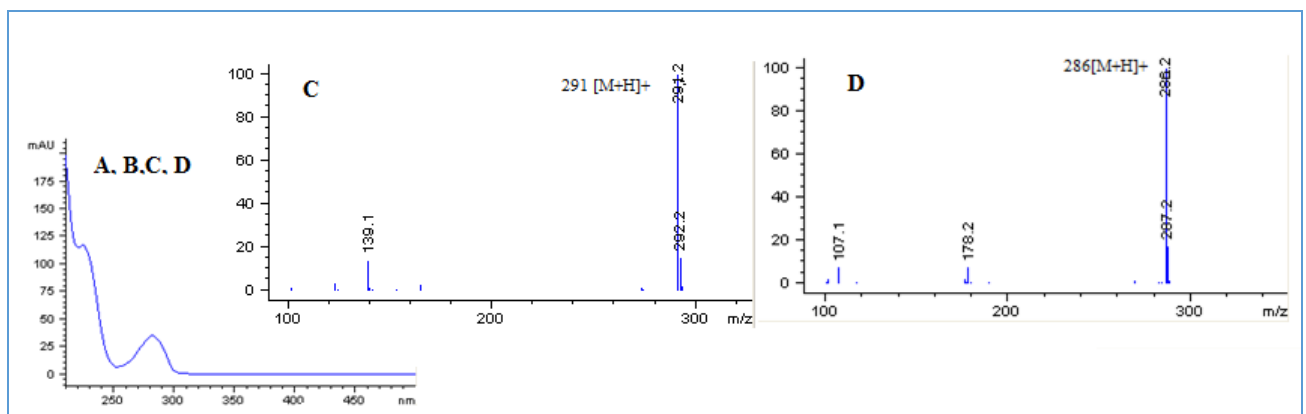
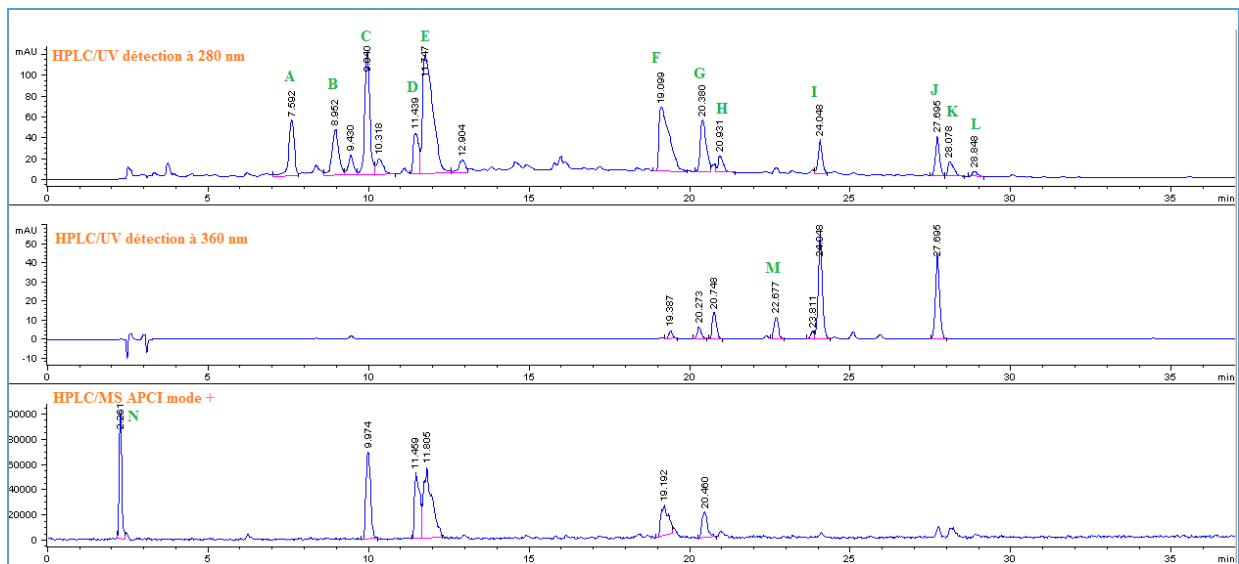


Figure 51 : Rapport Frontal des principaux spots de l'extrait brut polaire de feuilles Chromatographie sur couche mince sur gel de silice des extraits de feuilles stade B (AcOEt-HCOOH- AcOH-H₂O 100-11-11-27) après pulvérisation au NP/PEG

ANALYSE PAR HPLC/UV/MS DE L'EXTRAIT DE FEUILLES STADE B

Les extraits sont analysés par chromatographie liquide à 280 et 360 nm couplée à une analyse par spectrométrie de masse (mode positif). Les chromatogrammes obtenus sont identiques (Annexe 5) pour tous les extraits de feuilles au stade B. Ces extraits sont donc rassemblés afin d'avoir suffisamment de masse pour le fractionnement.

L'analyse chromatographique de l'extrait est présentée ci-dessous.



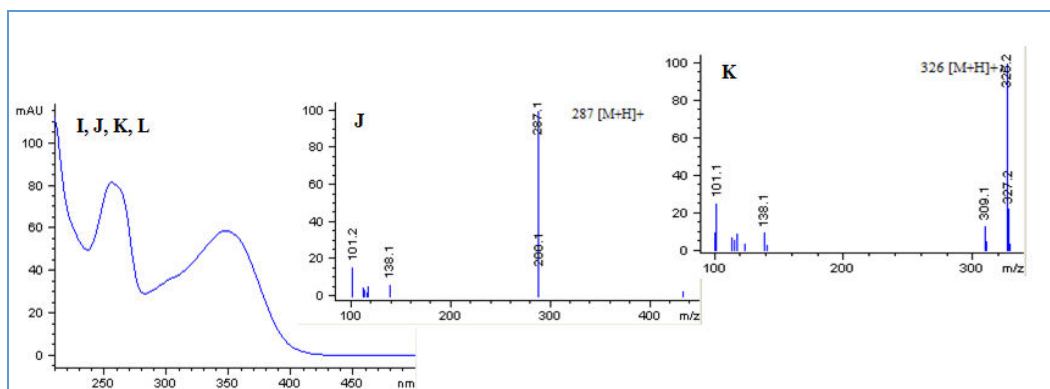


Figure 52: Spectre UV et MS des principaux pics de l'extrait de feuille à l'acétone au stade B

Les analyses LC/DAD/UV et LC/UV/APCI-MS en mode positif ont montré une diversité dans les classes de composés que l'on trouve dans les extraits de feuilles de *N. membranacea*. Ainsi les profils des spectres UV appartenant aux composés **A-D** montrent un maximum d'absorption à 280 nm et un épaulement vers 224 nm. Ils peuvent donc appartenir à la même classe de composés.

Le spectre MS du composé **C** présente un pic moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 291 qui pourrait correspondre à l'épicatéchine (m/z 290) déjà identifiée chez *N. megapotamica* [Fernanda R. Garcez, 2009].

I, J, K, L ont des spectres UV avec des maxima d'absorption de 256 et 348 nm qui correspondraient à des composés de type flavonoïdes. Le composé **J** présente un pic moléculaire $[M+H]^+$ à 287. Ce composé pourrait être le kaempférol (m/z 286) isolé de *N. glabrescens* [José M. Barbosa-Filho et al. 1989].

Le composé **E** montre un profil de spectre UV avec des maxima d'absorption à 216, 282 et 302 nm, caractéristiques des alcaloïdes aporphines.

Les composés **F, G, et H** montrent à priori le même profil de spectre UV que précédemment avec des maxima 216, 284 et 310 nm. Le spectre de masse du composé **G** a un pic moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 328 qui pourrait correspondre à l'isoboldine (m/z 327) déjà isolée chez *N. membranacea* et *N. grandiflora* [Moreno et al. 1993; Hasbun et al. 1991]

12.4. Fractionnement

Plusieurs procédés de purification ont été employés. Il s'agit essentiellement des techniques chromatographiques qui seront détaillées dans la partie « Matériels et méthodes » (colonne ouverte, colonne haute pression, etc..). Les fractions présentant des profils identiques en CCM sont réunies et sont ensuite testées pour un criblage biologique. Les fractions qui se révèlent les plus actives au niveau de l'activité antioxydante sont ensuite purifiées.

L'extrait brut de feuilles stade B, est repris dans du méthanol puis concentré sous pression réduite.

12.5. Extraction liquide-liquide

Une extraction liquide-liquide successive est réalisée sur les extraits de feuilles stade B (Fe_{total} (B, soit 40 mg dans 500 mL d'eau), à l'aide des solvants suivants : dichlorométhane (CH_2Cl_2), acétate d'éthyle (AcOEt), méthanol (MEOH) et eau.

L'activité antioxydante a été évaluée par le test ORAC et le test sur cellule. Les résultats au test ORAC ont montré que les extraits issus de l'extraction liquide-liquide sont très antioxydants avec des valeurs inférieures à 12,5 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ au test de l'ORAC (Figure 155) et inférieurs à $IC_{50} = 3,6 \mu\text{g / mL}$ sur cellule. Le meilleur résultat pour ce test est obtenu avec l'extrait aqueux $IC_{50} = 1,5 \mu\text{g / mL}$ (Figure 156).

L'activité anti-inflammatoire est aussi testée et a montré que l'extrait dichlorométhane est plus actif que les autres extraits testés avec un pourcentage d'inhibition du monoxyde d'azote de 71,3% (Figure 157).

Les extraits aqueux et méthanol montrent une activité antivirale de 100 % de protection sur le virus de l'herpès ainsi qu'un effet désactivant (100%).

Sachant que nous nous intéressons à l'activité antioxydante en vue d'isoler des composés pharmaceutiques, l'extrait aqueux, qui présente une bonne activité antioxydante ORAC (9,6 $\mu\text{mol Trolox/mg}$) et la plus intéressante sur cellule ($IC_{50} = 1,5 \mu\text{g / mL}$), a été sélectionné pour la suite de l'étude.

Un fractionnement sur colonne Diaion est réalisé à partir de l'extrait aqueux. Les fractions obtenues de A à G, sont aussi testées pour les activités antioxydantes, anti inflammatoire et antivirale. Les résultats de tous ces tests sont présentés ci-dessous.

Les fractions C, E, F et G donnent de très bonnes activités antioxydantes. La meilleure activité est obtenue pour la fraction G. Elle est comparable à celle de la quercétine ($22,92 \pm 1,39 \mu\text{g Trolox/mL}$). L'activité anti inflammatoire se situe au niveau des fractions E, F, G, avec une meilleure activité sur la fraction G (98% inhibition). L'activité antivirale n'a pas pu être testée sur cette fraction à cause du manque de matière. Néanmoins, on peut noter que la fraction B montre une excellente activité antivirale : 100% de protection dans la cellule, effet désactivant de 100% sur le virus et empêche à 100% la réplication de celui-ci.

Les CCM des 4 extraits obtenus sont ici présentées :

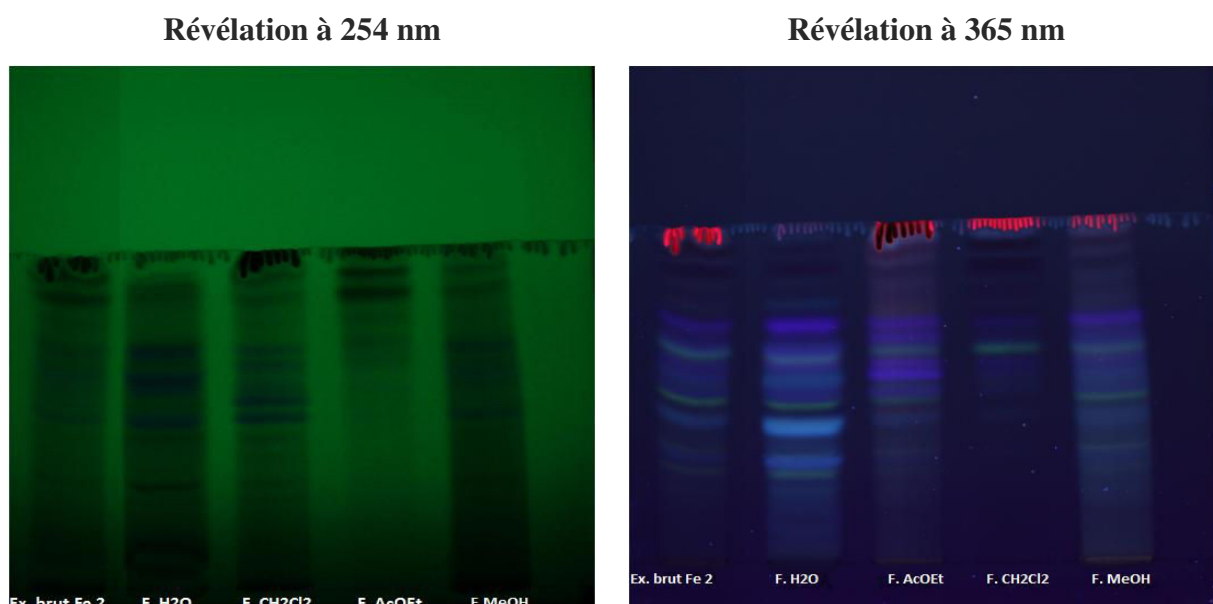


Figure 53: Chromatographie sur couche mince sur gel de silice des extraits polaires (AcOEt-HCOOH-AcOH- H₂O (100-11-11-20))

Les plaques sont ensuite pulvérisées au NP/PEG, révélateur des polyphénols.

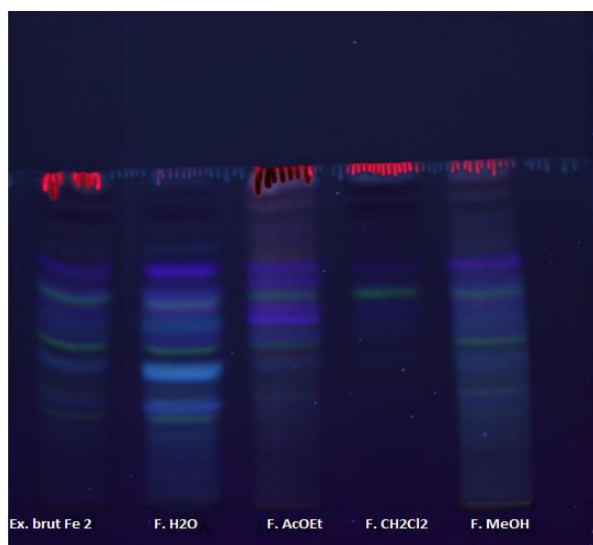


Figure 54 : Chromatographie sur couche mince sur gel de silice des extraits de feuilles stade B : fructification) (AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O 100-11-11-20) après pulvérisation au NP/PEG

Les mêmes composés sont retrouvés dans tous les extraits à des intensités variables. Cependant, seule la fraction aqueuse ne présente plus de chlorophylle (rouge).

L'activité biologique des fractions est évaluée avec des tests d'activités antioxydant (ORAC et cellulaire), anti-inflammatoire et antiviral contre l'herpès HSV-1. Les résultats sont présentés au chapitre 14.3.2.

Parmi les extraits issus de l'extraction liquide liquide, les extraits aqueux et acétate d'éthyle montrent des activités antioxydantes très intéressantes (§.14.3.2) aussi bien sur ORAC que sur cellule. L'extrait aqueux a été retenu pour le reste de l'étude car il est supposé moins toxique, et obtenu en quantité plus importante.

12.6. Purification de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux est concentré puis fractionné grossièrement par chromatographie sur colonne ouverte de Diaion HP-20, éluée successivement avec l'eau distillée puis un gradient de MeOH 30 %, 50%, 80% et 100%. La colonne est ensuite lavée avec l'acétate d'éthyle suivi du

méthanol et de l'eau. 33 fractions sont obtenues, puis regroupées en fonction de la CCM suivante :

Révélation à 365 nm après pulvérisation au NP/PEG des fractions 1 à 33

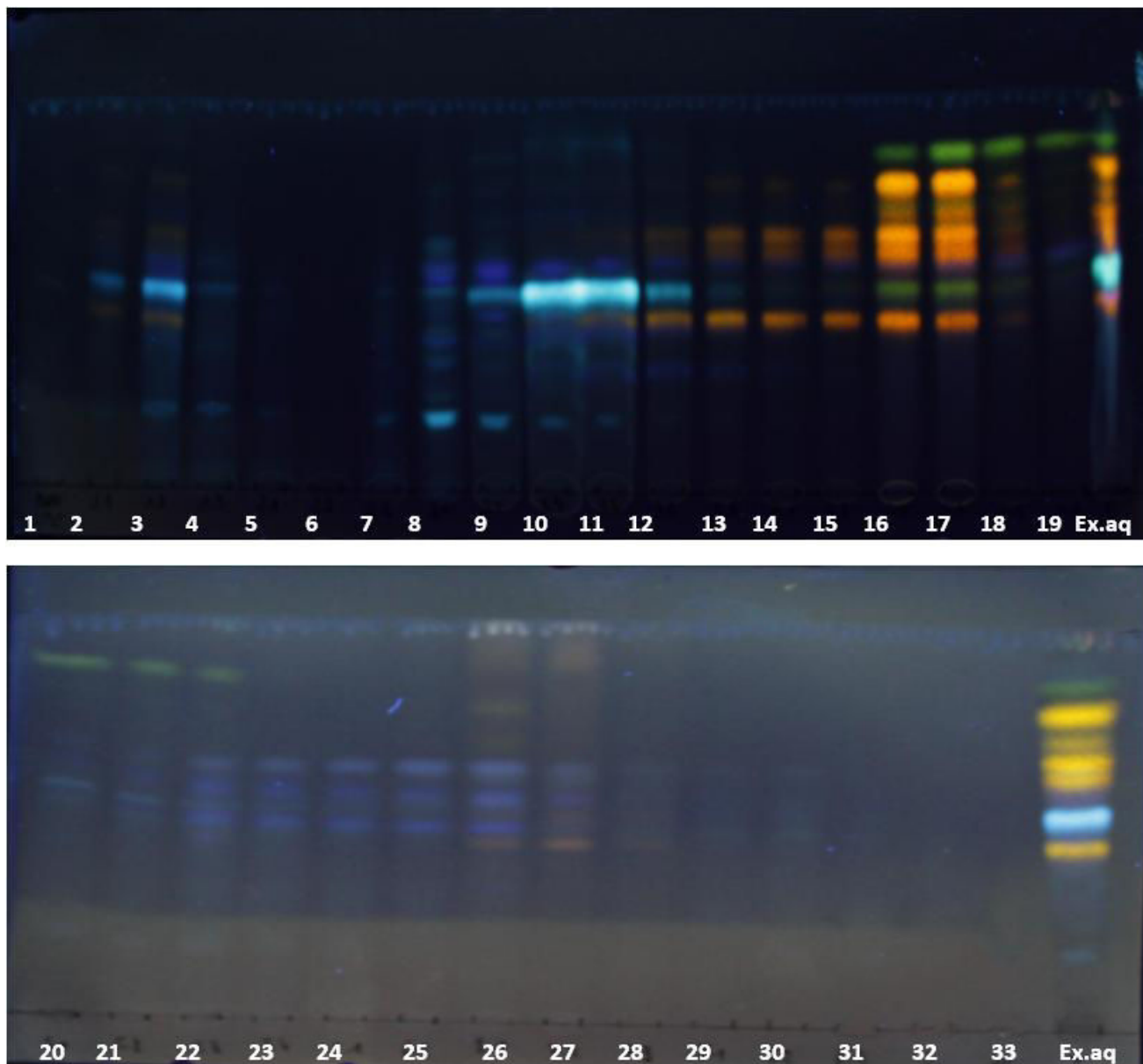


Figure 55 : CCM bilan des 33 fractions obtenues suite au premier fractionnement sur l'extrait aqueux (la dernière fraction correspond à l'extrait aqueux (AcOEt-HCOOH-AcOH- H₂O / 100-11-11-20)

Les fractions éluées possédant les mêmes spots sur CCM sont rassemblées. 7 fractions sont obtenues de A à G.

L'ensemble de la procédure est exposé dans l'organigramme suivant :

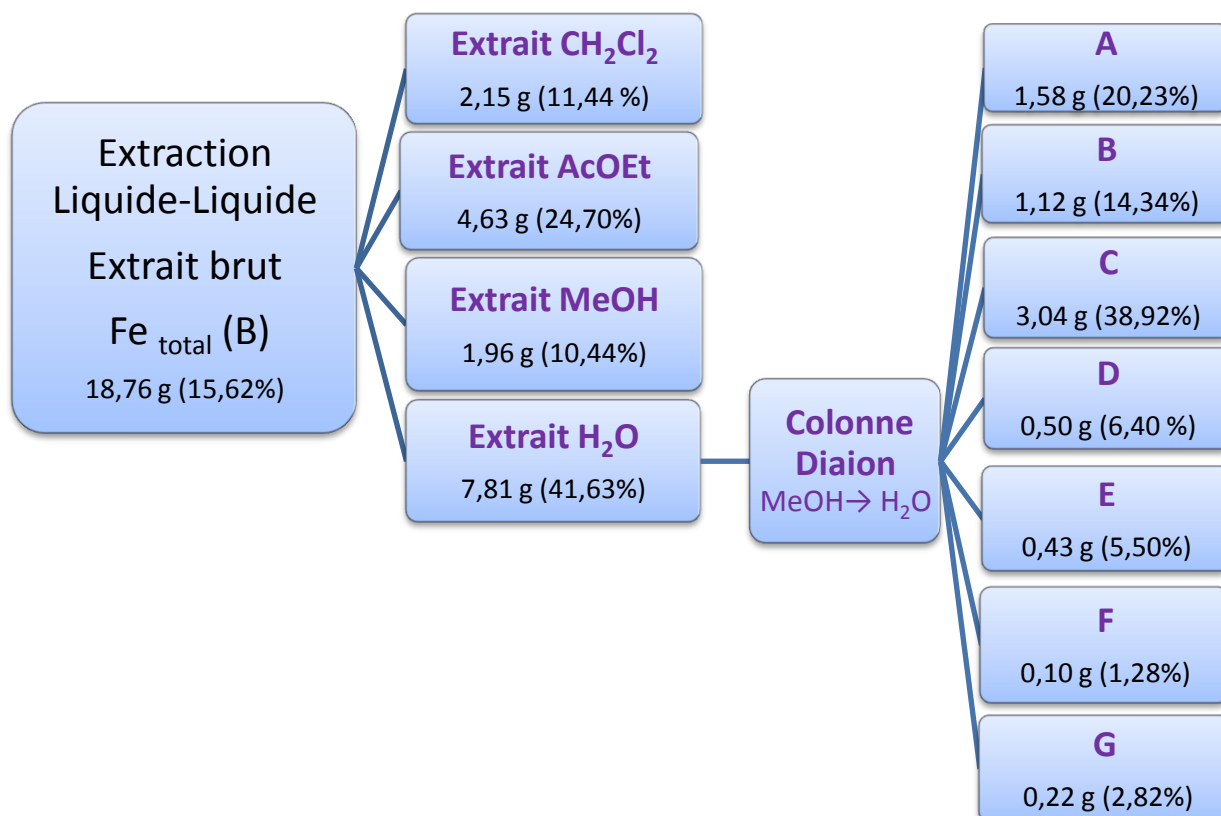


Figure 56: Fractionnement sur extrait brut de feuilles (stade B)



Figure 57: CCM des fractions issues de l'extrait aqueux de feuilles au stade B

Les différentes fractions recueillies de A à G sont analysées par CCM et montrent un nombre élevé de spots. Les fractions sont rassemblées par famille de molécules. Les fractions de A à C révèlent des spots bleus qui correspondraient aux acides phénoliques. Pour les fractions de D à

F, les spots sont majoritairement jaunes, ce qui pourrait correspondre à des flavonoïdes glycosides. Quelques spots verts laisseraient supposer la présence de flavonols ou flavonones. Et pour finir, la fraction G, constituée de spots violets et bleus en majorité qui pourraient être des alcaloïdes et des acides phénoliques. Des traces des spots jaunes sont également retrouvées.

La fraction B a montré une forte activité antivirale sur tous les types de tests (protection contre virus, réplication et inhibition §.14.3.3.). Le choix des fractions à travailler s'est porté sur celles qui présentaient la meilleure activité antioxydante, soit les fractions G, E et C. La fraction F présente le même profil CCM que la E. Ces deux fractions n'ont pas été rassemblées. L'étude est poursuivie sur la fraction E, la fraction F étant stockée. Les études préliminaires sur la fraction G ont révélé une présence majoritaire d'alcaloïdes.

12.7. Caractérisation des molécules polaires bioactives

A partir de la fraction E, une séparation sur HPLC analytique et préparative a été effectuée. L'élution s'est faite par un gradient composé d'eau et d'acétonitrile.

Le profil chromatographique obtenu par HPLC analytique, a permis de mettre en évidence six groupes de molécules. L'HPLC préparative avait pour but de les séparer suivant le regroupement présenté sur le chromatogramme figure 58 en 6 fractions notées F1 à F6.

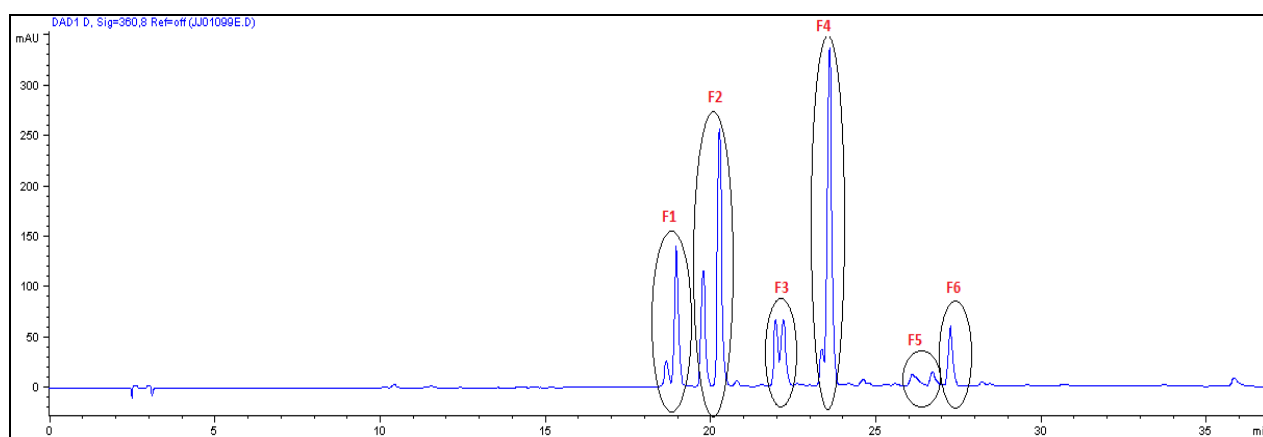


Figure 58 : Chromatogramme HPLC/DAD à 360 nm de la fraction E

L'organigramme ci-après présente les masses obtenues par la séparation par HPLC préparative de la fraction E. 140 mg sont analysés afin de ne pas saturer la colonne utilisée.

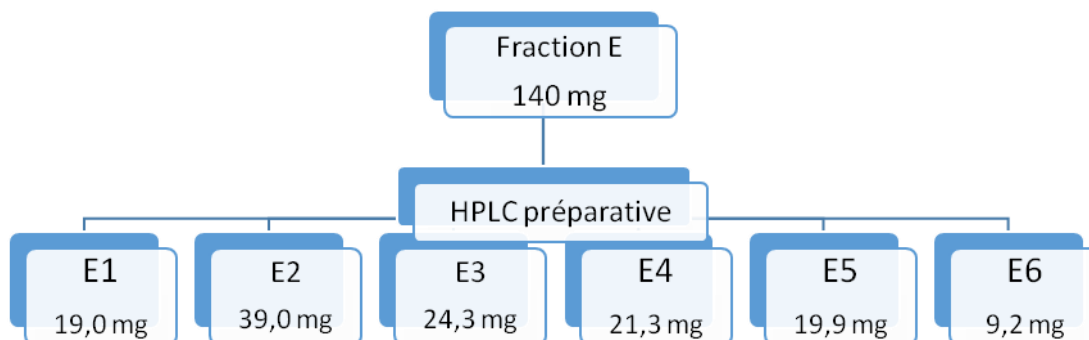


Figure 59 : Schéma de la purification de la fraction E

Les six fractions ont été analysées par HPLC analytique. Les fractions E4 et E6 sont des produits purs. La détermination de leur structure est exposée ci-après.

La sous-fraction E4 a été identifiée par HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes et à un spectromètre de masse. L'identification a été confirmée par analyse RMN ^1D et ^2D (^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC, HMBC).

Ce composé se présente sous forme de cristaux jaunes. Il réagit au réactif NP/PEG avec une fluorescence jaune sous UV 365 nm laissant envisager une structure de type flavonols ou flavone glycosylé [H. Wagner; S.Bladt 1996].

Son spectre UV ci-dessous montre deux maxima d'absorption à 256 nm et 348 nm correspondant aux absorptions des deux cycles A et B de composés de type flavonoïdes [Mabry *et al.* 1970].

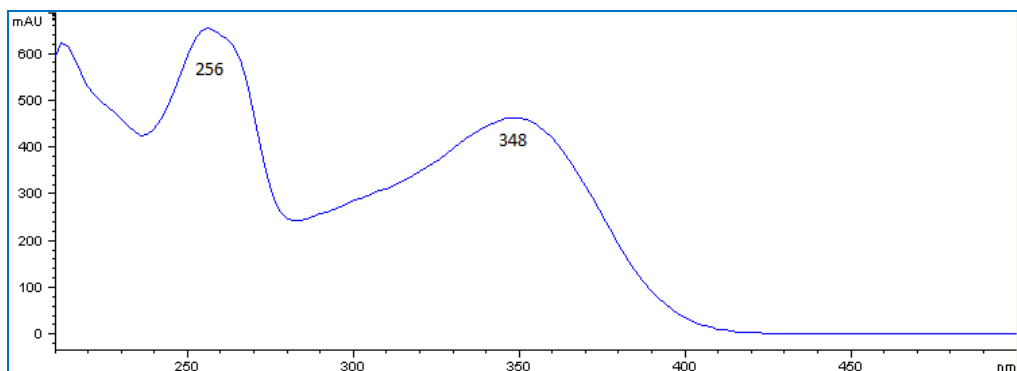


Figure 60 : Spectre UV du composé E4

Le spectre infra rouge indique la présence de groupements : hydroxyle ($3362,3\text{ cm}^{-1}$ et $1257,8\text{ cm}^{-1}$), C=C aromatique ($1606,4\text{ cm}^{-1}$ et $1457,6\text{ cm}^{-1}$), cétone conjuguée ($1653,2\text{ cm}^{-1}$). Il montre également la présence de bandes d'absorption des liaisons C-H aromatiques ($2928,6\text{ cm}^{-1}$ et $811,38\text{ cm}^{-1}$), de C-H aliphatiques (2850 cm^{-1}) et deux bandes d'absorption qui correspondent à une fonction éther ($1172,8\text{ cm}^{-1}$ et $1036,7\text{ cm}^{-1}$).

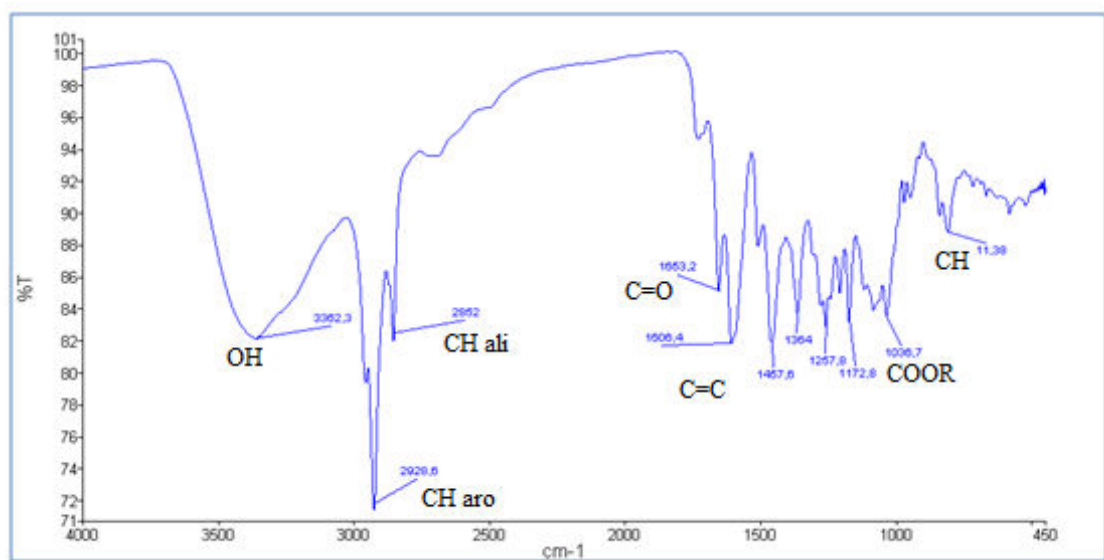


Figure 61 : Spectre Infrarouge du composé E4

Le spectre de masse réalisé en ESI en mode positif, présente un ion moléculaire à m/z 449 $[M-H]^+$ suggérant une masse atomique de 448 uma.

Le pic de moléculaire m/z est observé à 449 $[M-H]^+$. Le fragment observé à m/z 303 (100) $[M-H-146]^+$ correspond à la perte d'un rhamnose (perte de 146 u) et un ion fragment à m/z 304 (22) correspondant à $[M-H-146-H]^+$. D'autres ions de moindre abondance sont également présents à m/z 211 (68).

Ces résultats combinés à ceux de l'IR et de l'UV orientent vers la structure de la quercétine.

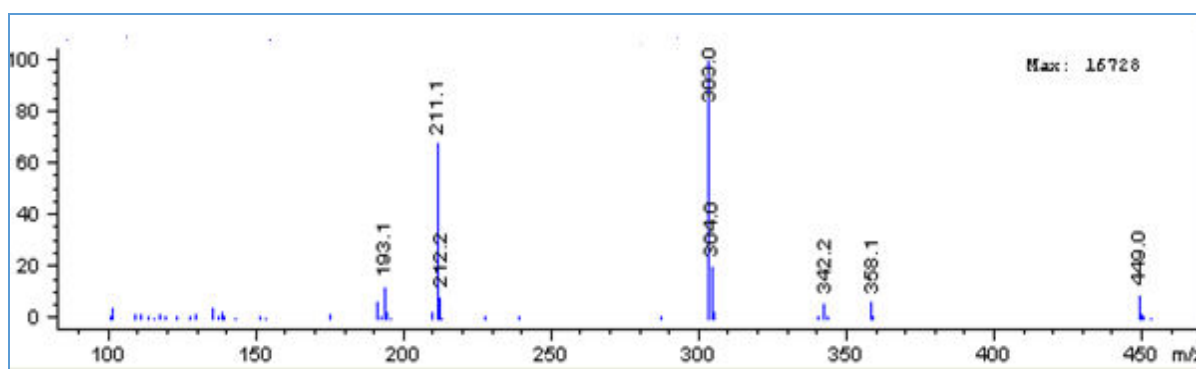


Figure 62: Spectre de masse LC-UV-MS (APCI Ionisation chimique) en mode positif $[M-H]^+$ du composé E4

Afin de préciser la structure du composé E4, nous avons procédé à différentes analyses RMN du proton 1H et du carbone ^{13}C . Les données recueillies sur le spectre ^{13}C comparés à ceux de la littérature, « Carbon-13 NMR of flavonoids. » [Agrawal P. K. 1989] ont permis de supposer que ce composé pourrait être la quercétine-3-O-rhamnoside.

Le pouvoir rotatoire a été mesuré il s'agit d'un composé lévogyre (L) dans notre cas, la quercétine-3-O-L-rhamnoside.

Les différents spectres RMN réalisés qui nous ont confirmé cette structure sont présentés à la suite.

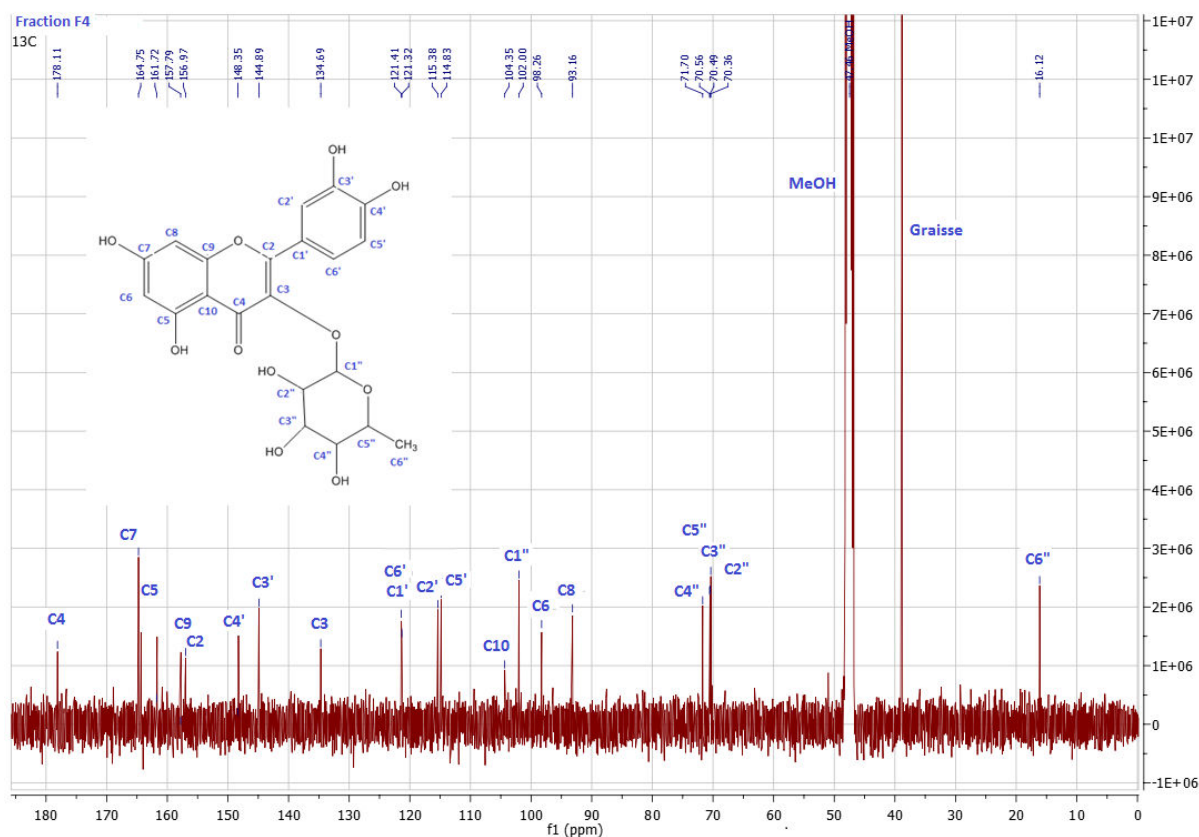


Figure 63: Spectre RMN du ^{13}C du composé E4

Le spectre RMN du ^{13}C indique la présence de 21 atomes de carbone. Les signaux caractéristiques du rhamnose se retrouvent dans la zone $\delta=70\text{-}72$ ppm (C-2'' ; C-3'' ; C-4'' et C-5''). Le groupement méthyle rattaché au rhamnose se situe sur le carbone C-6'' à δ 16,12 ppm. La position C-3 ($\delta = 134,69$ ppm) et le déblindage des carbones C-2 ($\delta = 156,97$ ppm) C-4 ($\delta = 178,11$ ppm) et C-5 ($\delta = 161,72$ ppm) comparativement avec l'aglycone suggère que la position d'attache du rhamnose avec l'aglycone se situe sur le carbone C-3. Ces données confirment bien ceux de la littérature [Agrawal P. K. 1989].

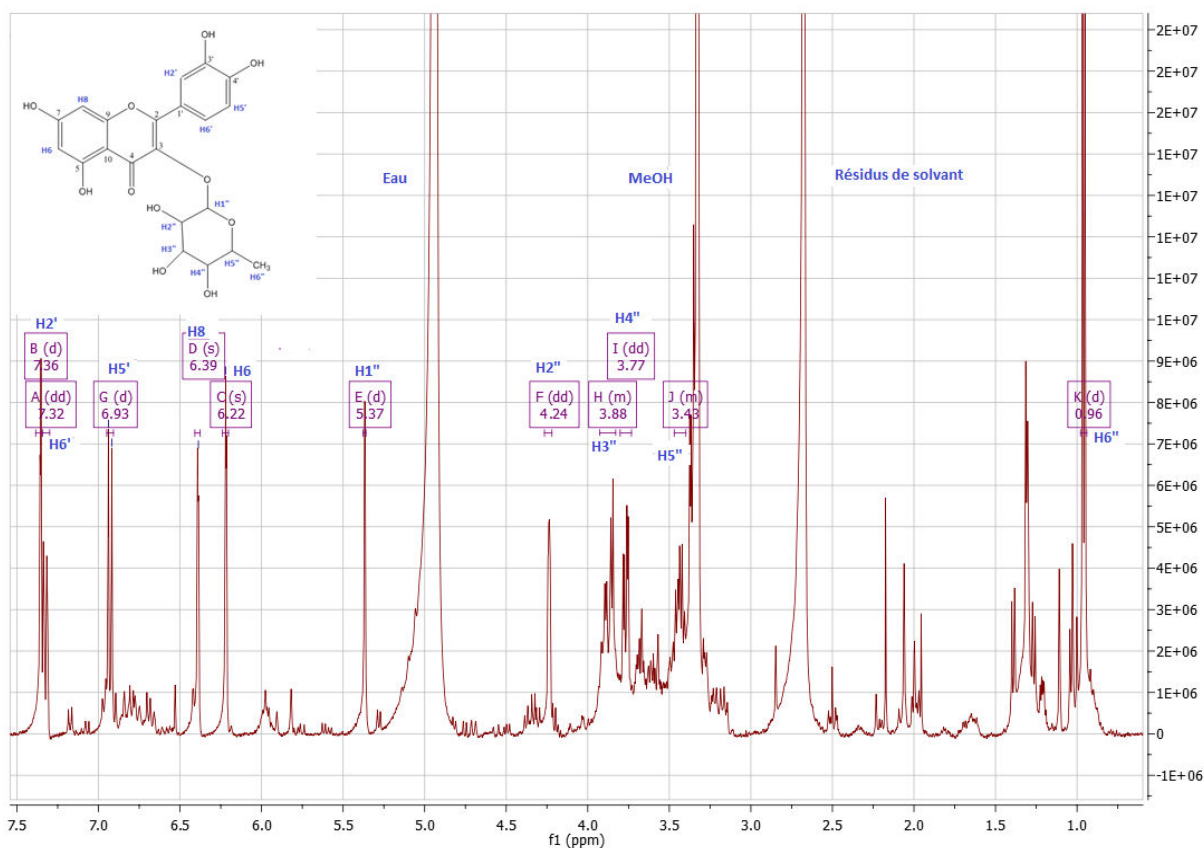


Figure 64: Spectre RMN du ¹H du composé E4

Le spectre RMN ¹H présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques. Les protons à $\delta = 6,22$ ppm (1H, s, H-6) et $\delta = 6,39$ ppm (1H, s, H-8) couplent en système AB caractéristiques du cycle A des flavonoïdes. Dans le cycle B, le doublet à $\delta = 7,36$ ppm et $\delta = 7,32$ ppm correspondant aux protons équivalents H-2' (1H ; J = 1,9 Hz) et H-6' (1H ; J = 2 Hz ; 8,3 Hz). Le proton H-6' est couplé avec le proton H-5' (1H ; $\delta = 6,93$ ppm ; J = 8,3 Hz). Le spectre RMN ¹H montre un singulet large correspondant au proton anomérique à $\delta = 5,37$ ppm. La faible constante de couplage du proton anomérique J = 1,2 Hz indique la configuration β du sucre. Le doublet à $\delta = 0,96$ ppm (1H ; d ; J = 6,1 Hz) caractérise le groupement méthyle du rhamnose.

D'autres analyses RMN complémentaires sont réalisées afin de confirmer cette hypothèse : DEPT 135 et RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC).

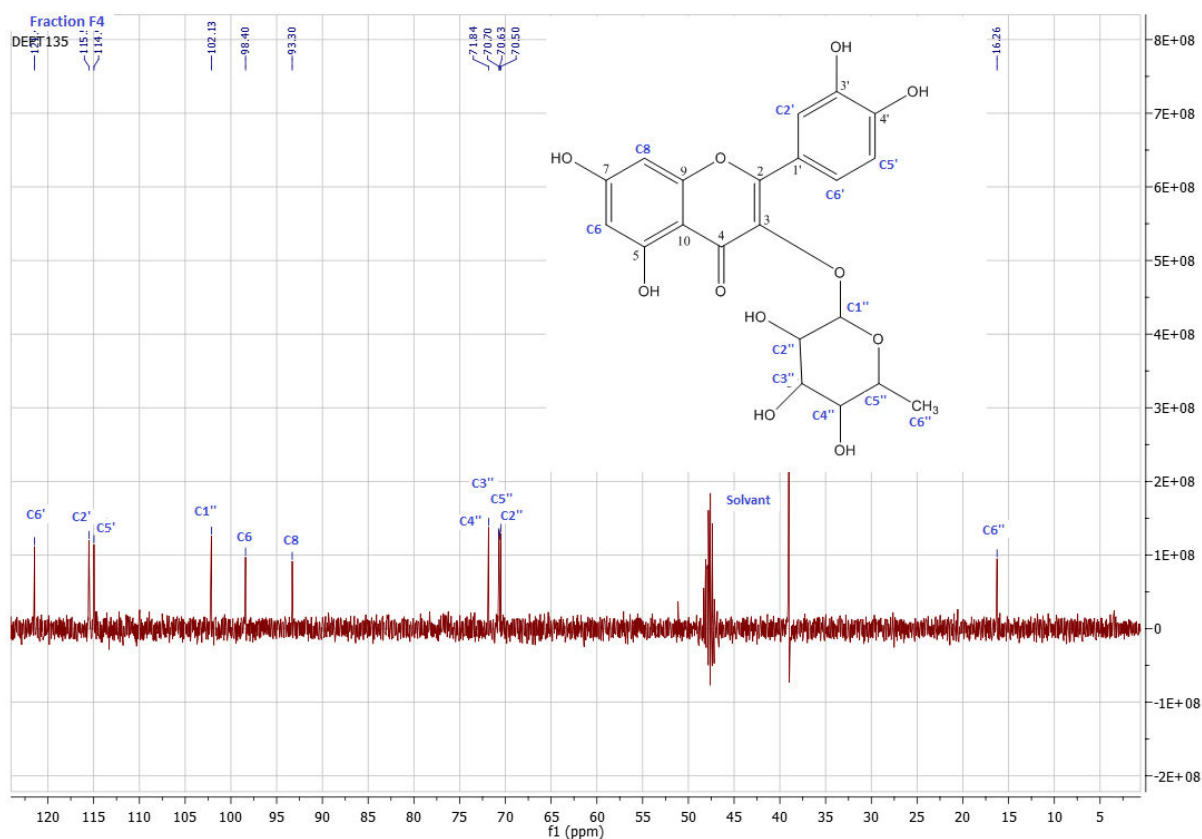


Figure 65: Spectre RMN DEPT 135 du composé E4

Le DEPT 135 permet de distinguer tous les groupements CH et CH₃ (vers le haut) et les CH₂ (à l'opposé). Les carbones quaternaires n'apparaissent pas. La présence en tout d'un groupement CH₃ (carbone primaire à 16 ppm) et 10 groupements CH (carbones tertiaires de 70 à 121,45 ppm) sont visibles sur le spectre.

En comparaison avec la littérature, les 10 groupements CH correspondent :

- sur le flavonoïde : sur le cycle A, aux carbones C-6 à $\delta = 98,40$ ppm et C-8 à $\delta = 93,30$ ppm. Sur le cycle B aux trois carbones tertiaires C-2' à $\delta = 115,51$ ppm ; C-5' à 114,96 ppm et C-6' à 121,45 ppm.

- sur le sucre : le carbone anomérique est nettement visible à $\delta = 102,13$ ppm (C-1''). Les 4 autres carbones du sucre sont C-2'' à $\delta = 70,50$ ppm, C-3'' à $\delta = 70,70$ ppm, C-4'' à $\delta = 71,84$ ppm et C-5'' à 70,63 ppm.

Le groupement méthyle rattaché au rhamnose se situe sur le C-5'' à $\delta = 70,63$ ppm. Son carbone C6 résonne à 16,26 ppm.

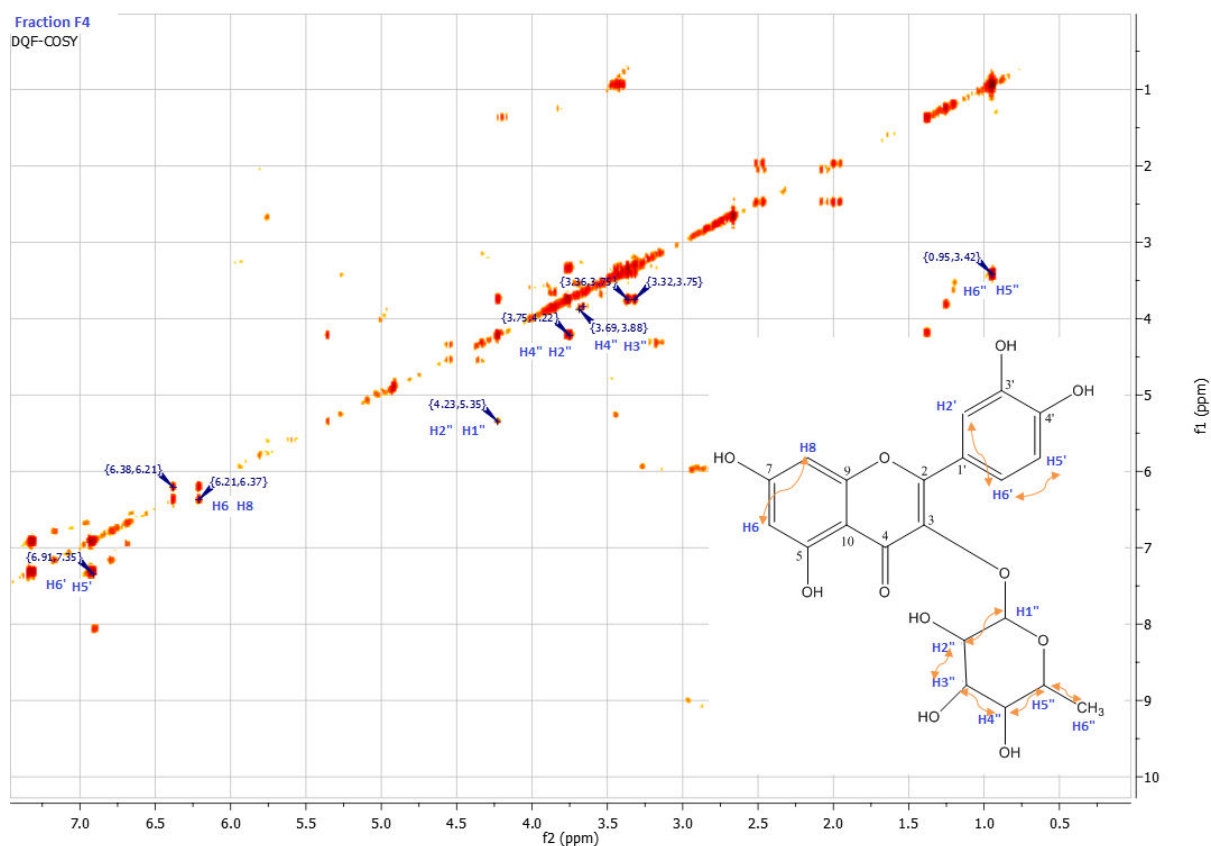


Figure 66: Spectre RMN COSY du composé E4

Parmi ces procédés, la COSY H-H permet de mettre en évidence les couplages 2J et 3J et de les distinguer d'après l'orientation des taches de corrélation vis-à-vis de la diagonale.

Ainsi, le spectre nous montre les corrélations entre les hydrogènes H-6 et H-8 ; H-2' et H-6' ; H-5' et H-6'. Tous les protons du cycle rhamnose sont corrélés H-1'' et H-2'' ; H-2'' et H-3'' ; H-3'' et H-4'' ; H-4'' et H-5'' ; H-5'' et les 3 H6''.

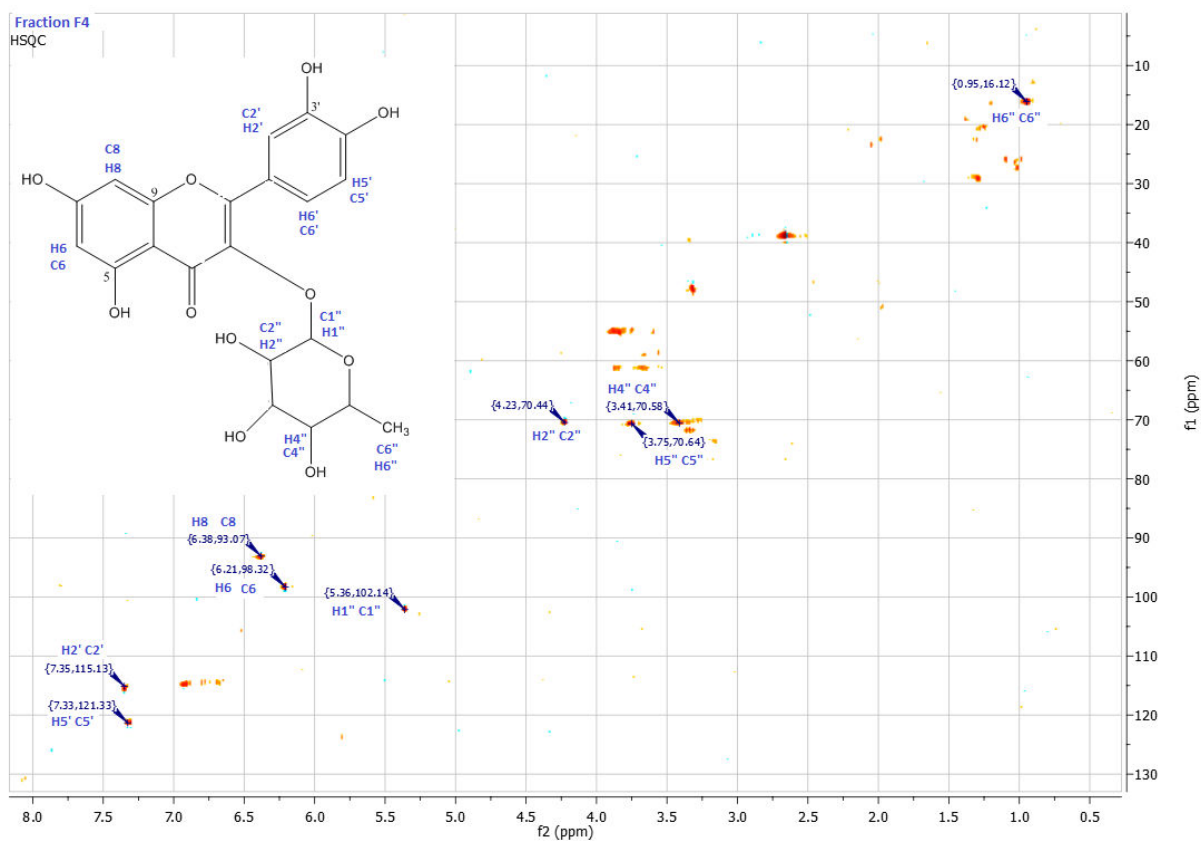


Figure 67: Spectre RMN 2D HSQC du composé E4

L'expérience HSQC permet de mettre en évidence le couplage 1J . Des corrélations du proton H-6 et du carbone C-6; du proton H-8 et du carbone C-8 sont observées. Les corrélations les plus visibles sont celles des protons H-2'; H5'; H-1'' ; H-2'' ; H-4'' ; H5'' avec leur carbones respectifs C-2'; C-5'; C-1'' ; C-2'' ; C-4'' et C-5'' ainsi que H-6'' avec le carbone C-6''.

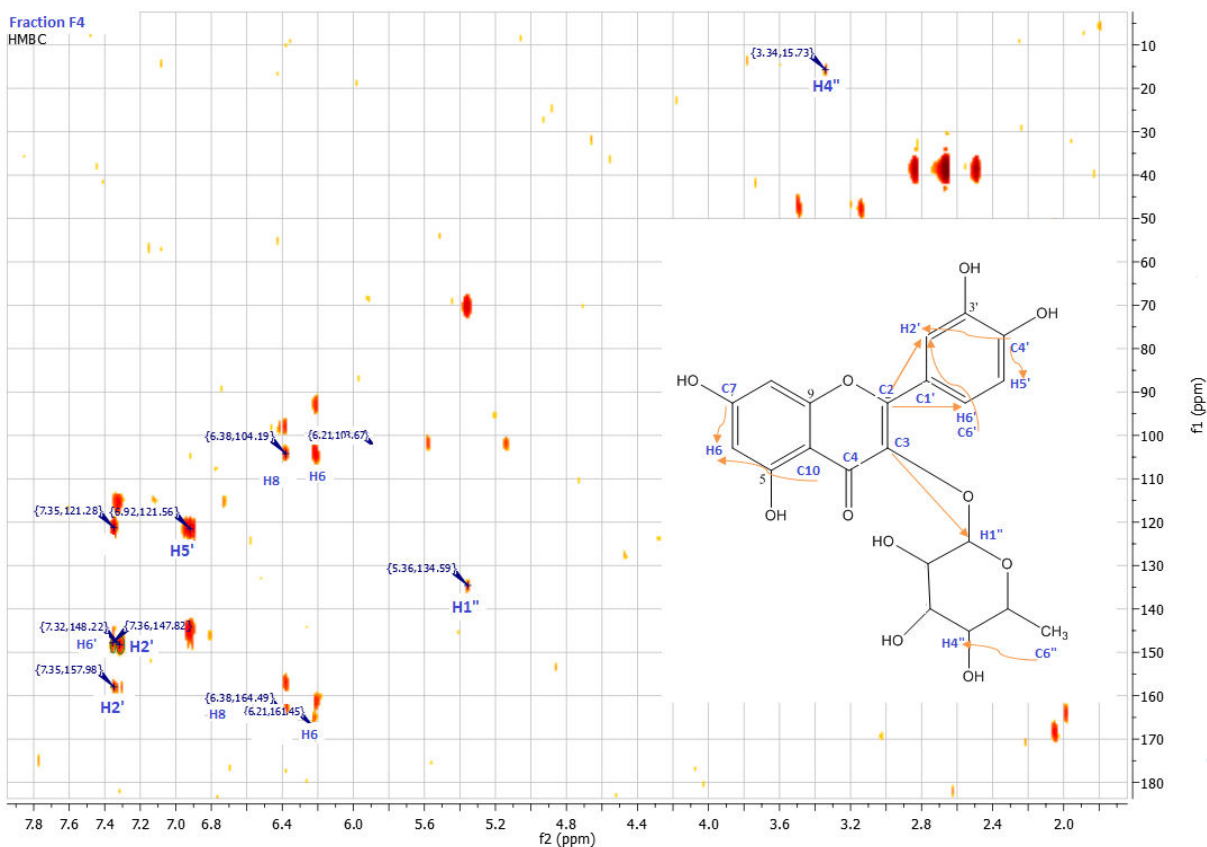
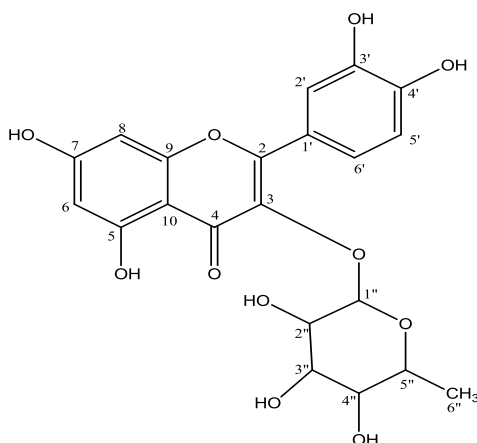


Figure 68: Spectre RMN 2D HMBC du composé E4

La technique HMBC met en évidence les couplages hétéronucléaires 2J et 3J . Le spectre montre ici une corrélation entre les protons H-2' à $\delta = 7,36$ ppm et H-6' à $\delta = 7,32$ ppm et le carbone C-2 D'autres corrélations sont observées entre le proton H-1'' à $\delta = 5,37$ ppm et le carbone C-3; entre le proton H-6 à $\delta = 6,39$ ppm et les carbones C-5 et C-7 et C-10 ; entre le proton H-5' à $\delta = 6,93$ ppm et le carbone C-1' ; entre les protons H-2' et H-5' et le carbone C-4'; entre les protons H-2' et le carbone C-6'; entre le proton H-4'' et le carbone C-6''.

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison des données trouvées dans la littérature [*N. grandiflora*. Ribeiro, 2005] ont permis de déterminer la structure du composé F4 comme étant la quercétine- 3-O- β -rhamnoside. C'est la première fois que ce composé est décrit dans *N. membranacea*.



89

Figure 69: Structure de la quercétine-3-O-β-L-rhamnoside

Les données RMN comparées à la littérature sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 29 : Déplacements chimiques de la quercétine-3-O-β-L-rhamnoside

Position	δc (ppm)(mult)	δH (ppm) J(Hz)	COSY	HMBC	Réf Ribeiro
2	156,97 (s)			H2'/H6'	156,0
3	134,69 (s)			H1''	133,5
4	178,11 (s)				177,0
5	161,72 (s)				162,0
6	98,26 (d)	6,22 <i>s</i>	H8		100,0
7	164,75 (s)			H6	162,0
8	93,16 (d)	6,39 <i>s</i>	H6		94,1
9	157,79 (s)				157,0
10	104,35 (s)			H6	101,0
1'	121,4 (s)			H5'	120,0
2'	115,38 (d)	7,36 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,9Hz)			115,0
3'	144,89 (s)				149,5
4'	148,35 (s)			H2'/H5'	145,5
5'	114,83 (d)	6,93 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 8,3Hz)	H6'		115,4
6'	121,32 (d)	7,32(<i>dd</i> ; <i>J</i> = 2Hz ; 8,3Hz)	H2'/H5'	H2'	120,8
Rhamnose 1''	102 (d)	5,37 (<i>d</i> ; <i>J</i> = 1,2Hz)	H2''		101,8
2''	70,36 (d)	4,2 (<i>dd</i> ; <i>J</i> = 3,1Hz ;	H1''/H3'		70,1

Position	δ_c (ppm)(mult)	δH (ppm) J(Hz)	COSY	HMBC	Réf Ribeiro
		1,5(Hz)	,		
3''	70,56 (d)	3,8 (m)	H2''/H4'		70,3
4''	71,70 (d)	3,43	H3''/H5'		71,3
5''	70,49 (d)	3,77	H4''/H6'		70,5
6''	16,12 (q)	0,96 (d, J = 6,1Hz)	H5''	H4''	17,5

Le composé majoritaire présent dans la fraction E6 a été identifié dans les mêmes conditions que précédemment.

Ce composé se présente sous forme de cristaux jaunes et réagit au réactif NP/PEG avec une fluorescence jaune sous UV 365 nm laissant envisager une structure de type flavonol ou flavonone glycosilé. Le spectre UV montre deux maxima d'absorption à 264 nm et 344 nm correspondant comme précédemment aux absorptions des deux cycles A et B de composés de type flavonoïdes [Mabry et al. 1970].

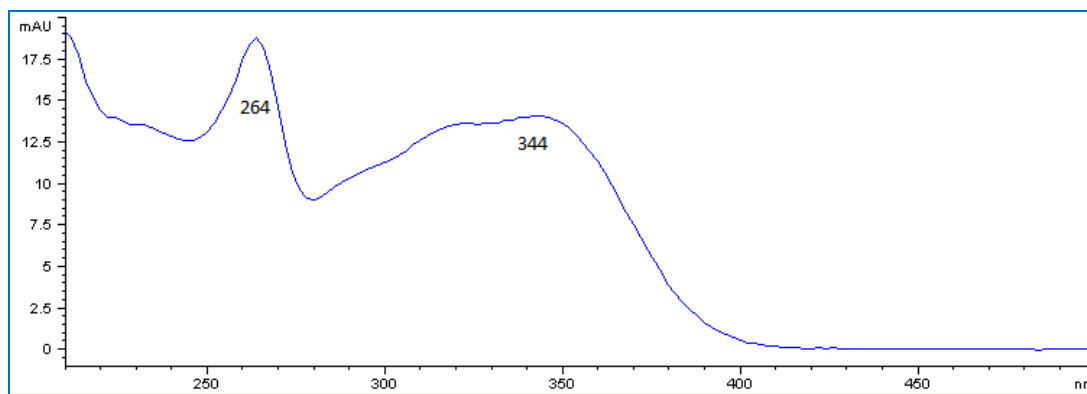


Figure 70: Spectre UV du composé de la fraction E6

Le spectre infra rouge indique la présence de groupements : hydroxyle (3404 cm^{-1}), carbonyle conjugué ($1653,2\text{ cm}^{-1}$) et C=C aromatiques ($1593,7\text{ cm}^{-1}$) et ($1457,6\text{ cm}^{-1}$) et montre également la présence de bandes d'absorption des liaisons C-H aromatiques ($2924,4\text{ cm}^{-1}$) et une bande caractéristique d'un éther (1028 cm^{-1}).

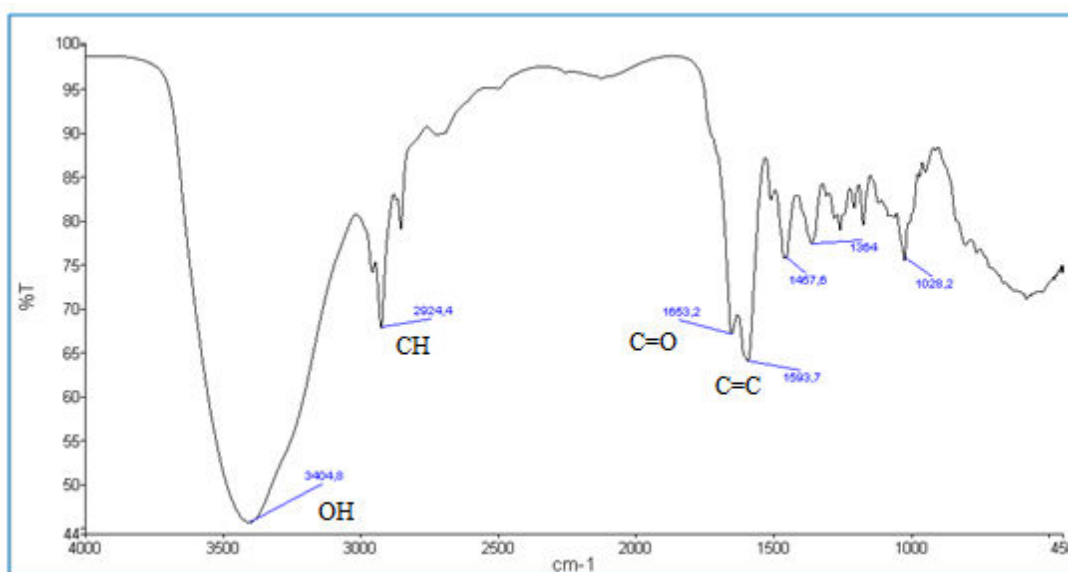


Figure 71: Spectre Infra rouge du composé E6

Le spectre de masse réalisé en ESI (mode positif) donne un ion moléculaire à m/z 433 $[M-H]^+$ suggérant une masse atomique de 432 uma. Soit un atome d'oxygène de moins que la structure précédente. Les ions fragments majoritaires sont les suivants : m/z 326 (100) $[M-H-107]^+$, un autre ion fragment à 327 (20) qui correspond à $[M-H-107-H]^+$. L'ion fragment à m/z 287 (69) $[M-H-146]^+$ correspond comme précédemment à la perte d'un rhamnose (-146 u).

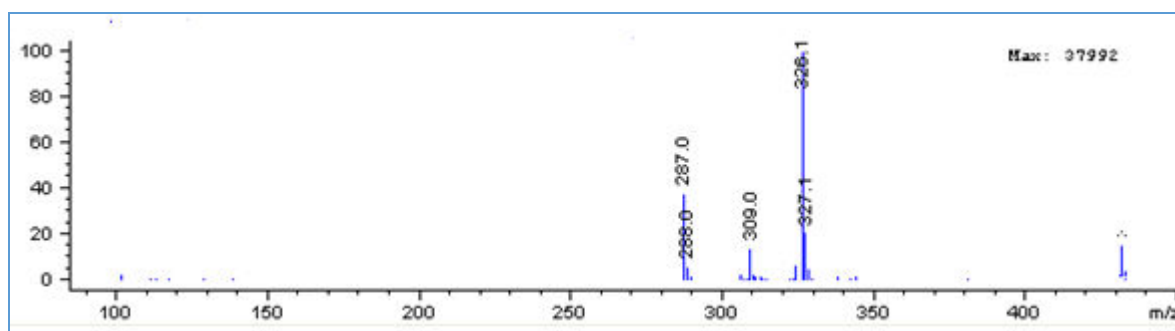


Figure 72 : Spectre de masse LC-UV-MS (APCI : Ionisation Chimique) mode positif du composé E6

Comme précédemment, l'analyse RMN du ^{13}C est réalisée et les données ont été comparées à la littérature [Agrawal P. K. 1989] orientant l'identification vers le kaempférol-3-O- rhamnoside. Par contre, la mesure du pouvoir rotatoire n'a pas pu être mesuré à cause de la masse insuffisante de produit.

L'analyse du spectre ^{13}C est réalisée ci-dessous.

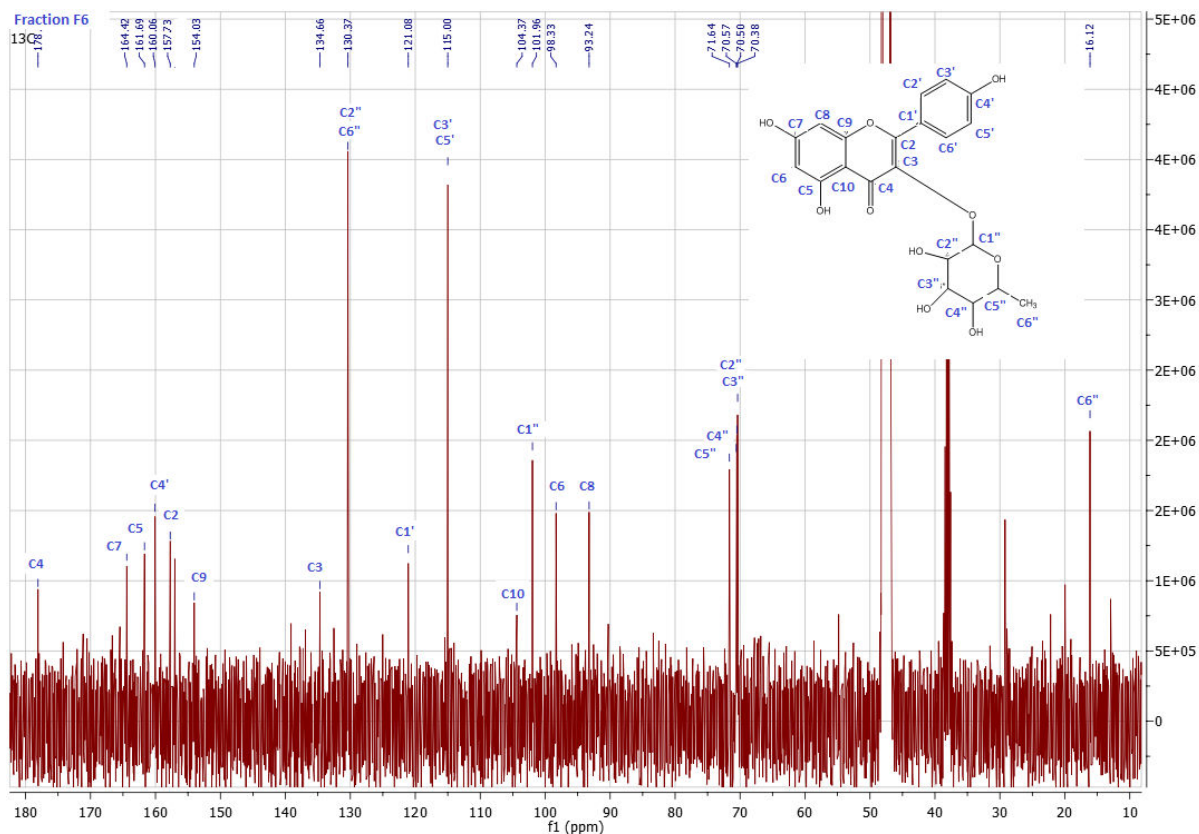


Figure 73 : Spectre RMN du ^{13}C du composé E6

Le spectre RMN du ^{13}C montre la présence de 21 atomes de carbones. Le carbone du méthyle C-6'', rattaché au sucre résonne à $\delta = 16,12$ ppm. Les déplacements chimiques des autres carbones du sucre sont situés dans la zone $\delta = 70$ à 72 ppm constitué des carbones C-2''; C-3''; C-4'' et C-5''. Comme pour le composé précédant, la position de C-3 à $\delta=134,66$ ppm et le déblindage des carbones C-2 ($\delta=157,73$ ppm) ; C-4 ($\delta = 178,08$ ppm) et C-5 ($\delta = 161,69$ ppm) indique que la position d'attache du rhamnose avec l'aglycone se situe sur le carbone C-3.

Les déplacements chimiques correspondent à ceux de la littérature [Agrawal P. K. 1989] pour la structure supposée.

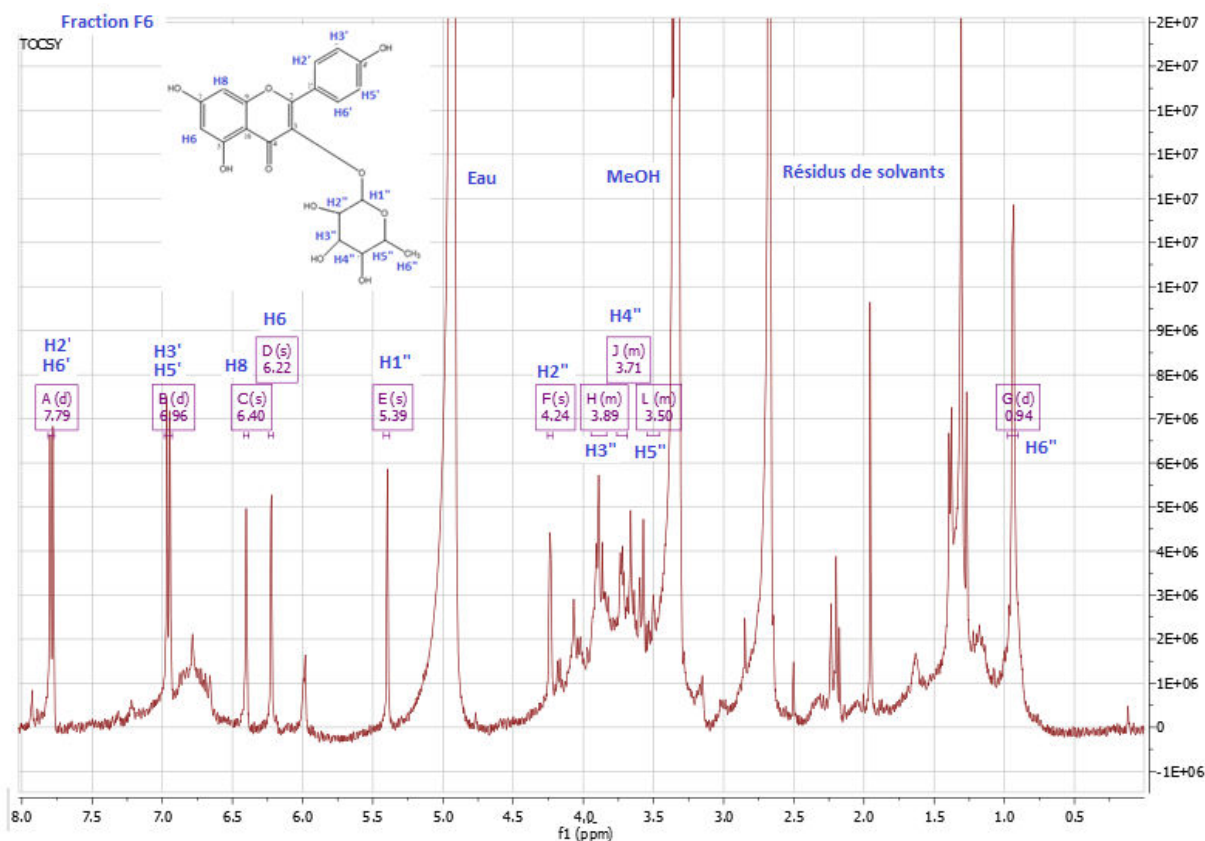


Figure 74 : Spectre RMN du ¹H du composé E6

Le spectre du proton est comparable au précédent mais la structure semble plus symétrique au niveau des protons aromatiques du noyau B. Les protons équivalents H-2' et H-6' ppm résonnent ensemble à $\delta = 7,79$ ppm. Ils sont couplés aux protons équivalents H-3' et H-5' à $\delta = 6,96$ ppm ($J = 8,6$ Hz).

Les protons aromatiques à $\delta=6,22$ ppm (1H, *s*, H-6) et à $\delta = 6,40$ ppm (1H, *s*, H-8) couplent en système AB caractéristiques des flavonoïdes.

Le proton anomérique est représenté par un singulet à $\delta = 5,39$ ppm. Le doublet caractéristique du groupement méthyle du sucre est à $\delta = 0,94$ ppm. Les signaux compris entre $\delta = 3,50$ et $4,24$ ppm correspondent aux protons du sucre, caractéristiques du rhamnane.

D'autres analyses RMN sont réalisées afin de confirmer les résultats : DEPT 135, COSY, HSQC et HMBC. Les résultats sont présentés ci-dessous.

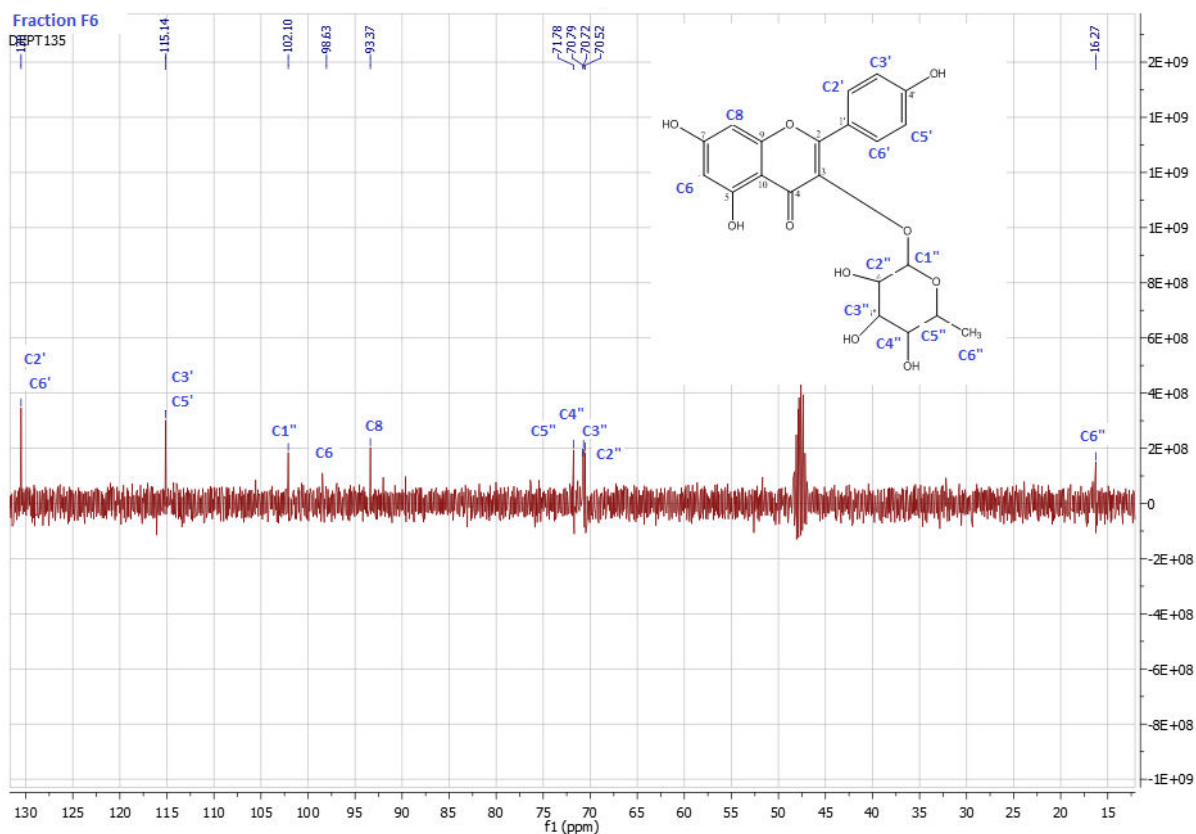


Figure 75 : Spectre RMN du DEPT 135 du composé E6

Le DEPT 135 indique que le composé comprend 10 groupements CH et 1 groupement CH₃ à $\delta = 16, 27$ ppm. Les carbones C-6 à $\delta = 98,33$ ppm et C-8 à $\delta = 93,24$ ppm sont situés sur le cycle A du flavonoïde et les carbones C-2' ($\delta = 130,37$ ppm); C-5' ($\delta = 115, 00$ ppm) et C-6' ($\delta = 130,37$ ppm) sur le cycle B. Les CH caractéristiques du sucre, rhamnose, sont C-2'' ($\delta = 70,37$ ppm); C-3'' ($\delta = 70,50$ ppm); C-4'' ($\delta = 70,57$ ppm) et C-5'' ($\delta = 71,64$ ppm).

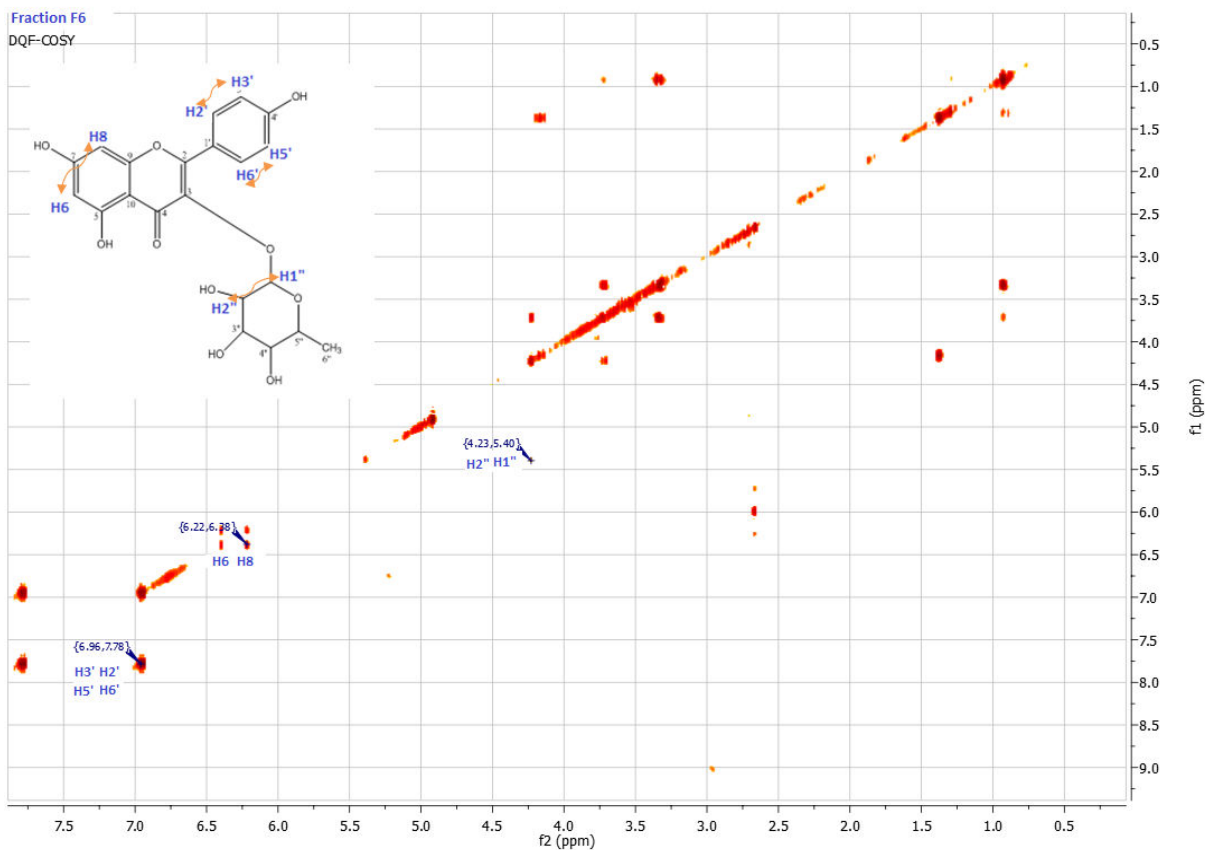


Figure 76 : Spectre RMN 2D COSY du composé E6

Le spectre COSY montre les corrélations entre les protons H-6 et H-8; H-2' et H-3'; H-5' et H-6' et H1'' et H-2'' compatibles avec la structure proposée.

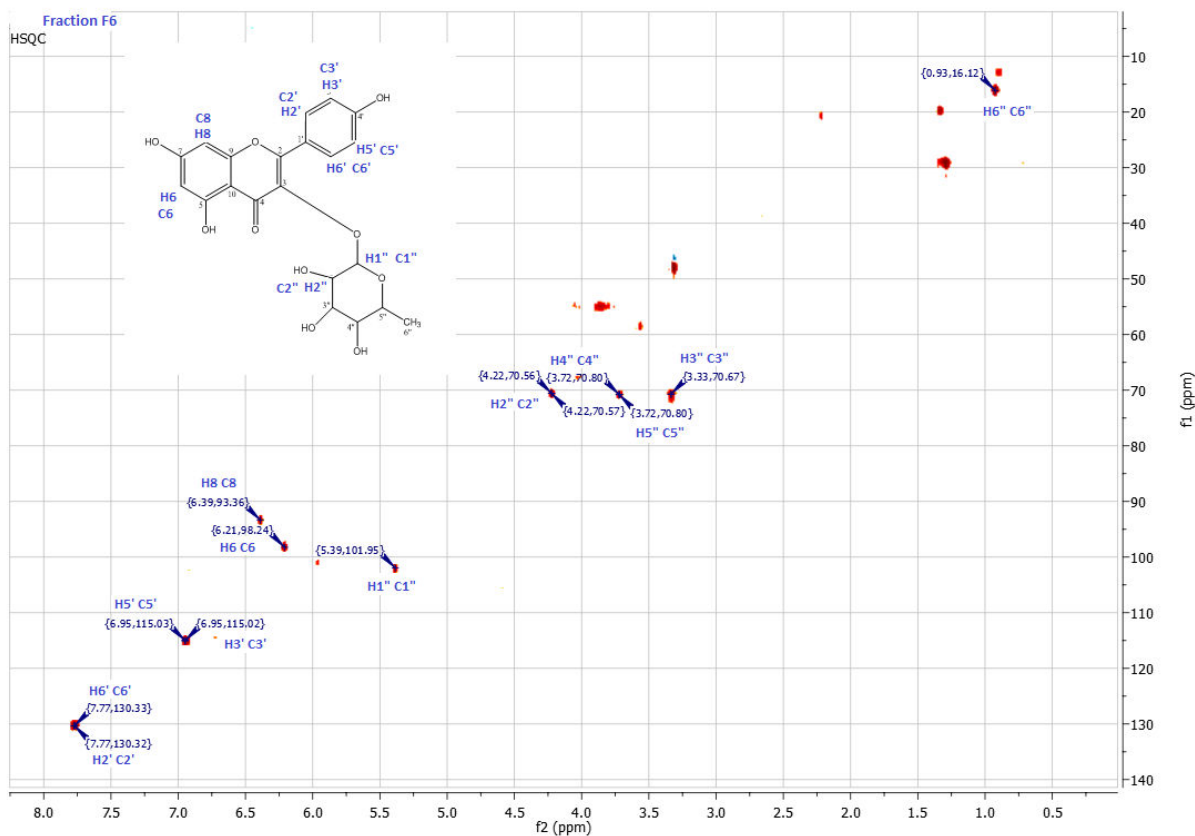


figure 77: Spectre RMN 2D HSQC du composé E6

Le spectre HSQC permet de distinguer les corrélations des carbones avec leurs protons proches (couplage 1J), ainsi donc C-6''; C-3''; C-5''; C-4'', C-2''; C-1''; C-2'; C-3'; C-5'; C-6'; C-6; C-8 sont couplés à 1J respectivement avec les protons H-6''; H-3''; H-5''; H-4''; H-2'' H-1''; H-2', H-3'; H-5'; H-6'; H-6; H-8.

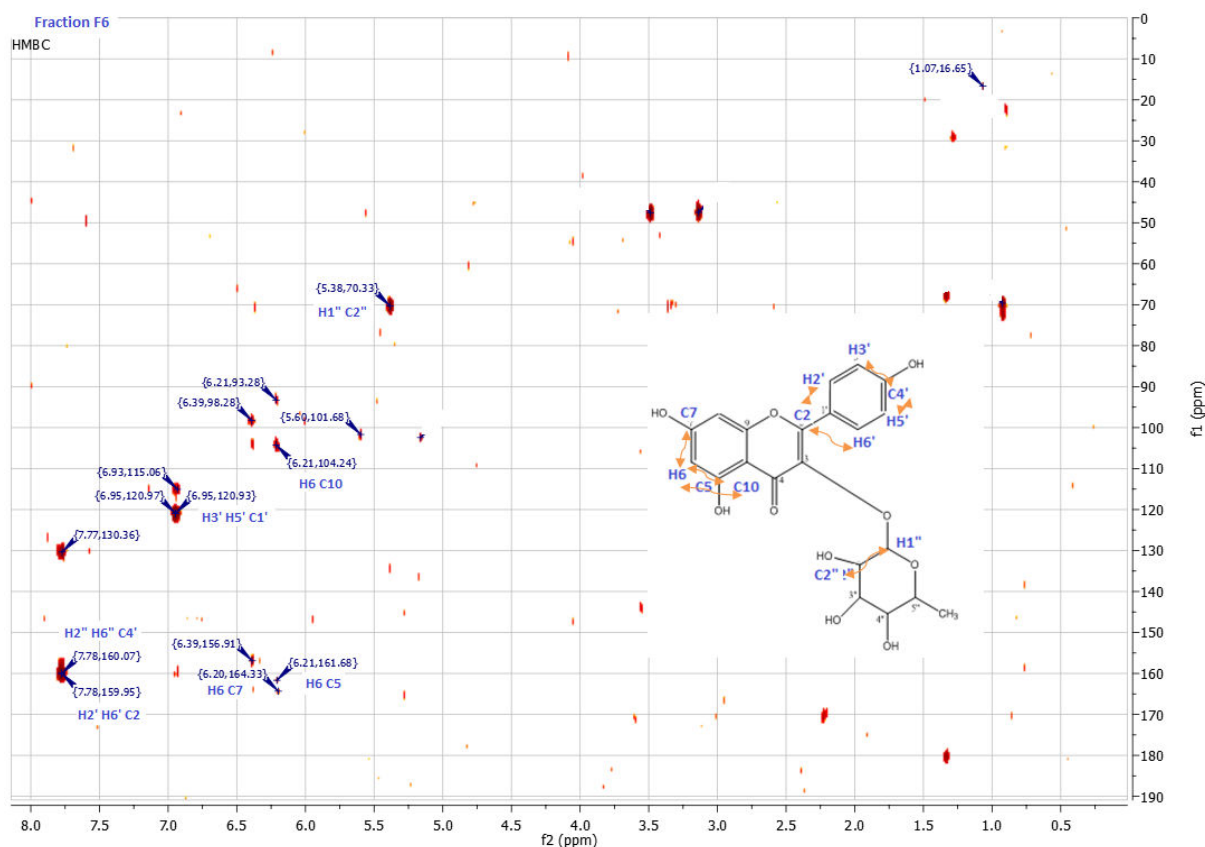
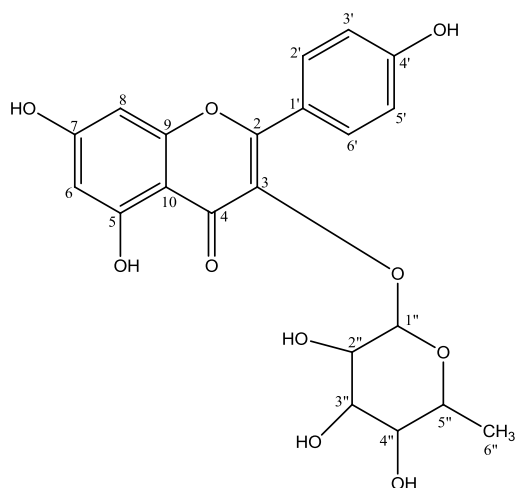


Figure 78: Spectre RMN 2D HMBC du composé E6

Le spectre HMBC montre les corrélations entre les protons H-6 à $\delta = 6,22$ ppm et les carbones C -5 à $\delta = 161,69$ ppm et C-7 à $\delta = 164,42$ ppm (couplage 2J) et avec le carbone C-10 à $\delta = 104,37$ ppm (couplage 3J). D'autres corrélations sont visibles notamment celles des protons H-2' et H-6' avec les carbones C-2 ($\delta = 157,73$ ppm) et C4' ($\delta = 160,06$ ppm) avec un couplage 3J . Un couplage 2J relie les protons H-3' et H-5' avec le carbone C-4'. Le proton anomérique H1'' à $\delta = 5,39$ ppm est corrélé avec le C-3 à $\delta = 134$ ppm.

Comme précédemment, l'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison des données trouvées dans la littérature [*N. grandiflora*. Ribeiro, 2005] a permis de déterminer la structure du composé F4 comme étant le kaempférol- 3-O- β -rhamnoside. Ce composé est décrit pour la première fois dans *N. membranacea*.



133

Figure 79: Structure du kaempférol- 3-O-β-rhamnoside

Les données RMN comparées à la littérature sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 30 : Déplacement chimique du kaempférol-3-O-β-rhamnoside

Position	δc (ppm)	δH (ppm) J(Hz)	COSY	HMBC	Réf. Ribeiro
2	157,73 <i>s</i>			H2'/H6'	155,50
3	134,66 <i>s</i>			H1''	134,0
4	178,08 <i>s</i>				176,0
5	161,69 <i>s</i>			H6	162,0
6	98,33 <i>d</i>	6,22 <i>s</i> ; 1H	H8		100,6
7	164,42 <i>s</i>			H6	162,0
8	93,24 <i>d</i>	6,40 <i>s</i> ; 1H	H6		95,0
9	154,03 <i>s</i>				157,1
10	104,37 <i>s</i>			H6	101,0
1'	121,08 <i>s</i>			H3'/H5'	120,0
2'	130,37 <i>d</i>	7,79 <i>d</i> (8,5 Hz ; 1H)	H3'		130,2
3'	115,00 <i>d</i>	6,95 <i>d</i> (8,6 Hz ; 1H)	H2'		115,4
4'	160,06 <i>s</i>			H2'/H6'	160,2
5'	115,00 <i>d</i>	6,95 <i>d</i> (8,6 Hz ; 1H)	H6'		115,4
6'	130,37 <i>d</i>	7,79 <i>d</i> (8,5 Hz ; 1H)	H5'		130,2
Rhamnose 1''	101,96 <i>d</i>	5,39 <i>d</i> (1H)	H2''		101,6
2''	70,38 <i>d</i>	4,24 <i>s</i> (1H)	H1''		70,1
3''	70,50 <i>d</i>	3,89 <i>m</i>			70,3
4''	70,57 <i>d</i>	3,71 <i>m</i>			70,4
5''	71,64 <i>d</i>	3,50 <i>m</i>			71,2
6''	16,12 <i>q</i>	0,94 <i>d</i> (5 Hz)			17,5

Ces deux composés ont été précédemment isolés dans les feuilles de *Nectandra gardneri* [Fernanda R. Garcez et al. 1999] et *Nectandra grandiflora* [Alan B. Ribeiro et al. 2005].

La présence des composés de type flavonoïdes E4 et E6 dans les feuilles des végétaux est vraisemblablement liée à la protection contre les processus oxydatifs. Les feuilles sont le site principal pour les réactions photosynthétiques en raison de leur forte teneur en chlorophylle. Elles sont continuellement exposées à la lumière UV/Visible nécessaire à la photosynthèse, mais également responsables de la génération des espèces radicalaires qui pourraient endommager les structures sous-cellulaires sans système de protection.

Outre, dans les feuilles de *N. gardneri* [Fernanda R. Garcez et al. 1999], les deux composés quercétine-3-O-rhamnoside et kaempférol-3-O rhamnoside ont également été identifiés dans les feuilles d'une autre espèce : *N. grandiflora* [Ribeiro 2005]. L'activité antioxydante y a été observée sur CCM par le test du blanchiment du β -carotène. Les deux composés ont été révélés avec une solution de β -carotène, en donnant des spots jaunes qui indiquent la présence de substance antioxydante.

Afin d'évaluer cette activité, le test de DPPH a été réalisé et a révélé que la quercétine-3-O- β -rhamnoside a une activité antioxydante plus élevée que le kaempférol-3-O- β -rhamnoside. Cette différence semble due à l'hydroxyle supplémentaire sur le cycle B du flavonoïde. La position d'un ortho-dihydroxy du groupe catéchol lui confère une grande stabilité pour le radical flavonoïde groupement, responsable de la forte capacité de piégeage des radicaux libres.

Les valeurs obtenues ne sont pas mentionnées dans la publication néanmoins pour une concentration de 80 μ M, le kaempférol-3-O-rhamnoside réduit le DPPH de moins de 20% tandis que pour la quercétine-3-O-rhamnoside, on observe une réduction de près de 80% du radical DPPH.

Dans notre cas, l'activité antioxydante et anti inflammatoire (faible) ont été évaluées sur le composé E6, le kaempférol-3-O-rhamnoside. Par contre, ces activités n'ont pas pu être testées pour le composé E4, la quercétine-3-O-rhamnoside, car la masse disponible était insuffisante. Mais, d'après la littérature ce composé a une activité antioxydante supérieure à celle du kaempférol-3-O- β -rhamnoside [Alan B. Ribeiro et al. 2005].

Cette évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par deux méthodes. La méthode chimique avec le test de l'ORAC et la méthode in vivo sur des cellules humaines saines. Au test de l'ORAC, le kaempférol-3-O-rhamnoside présente une très bonne activité avec une IC₅₀ de 13,40 µmol Trolox /mg (quercétine IC₅₀: 20,82 µmol Trolox/mg). Sur cellule, l'activité antioxydante a montré une IC₅₀ relativement bonne de 4,1µg/mL (quercétine : 0,087 µg/mL).

L'extraction des composés polaires sur *Nectandra membranacea* a permis d'isoler et d'identifier des polyphénols. Nous avons aussi pu réalisé un criblage biologique. Ces premiers résultats feront l'objet d'un écrit.

Après cette étude des polyphénols majoritaires de la plante, nous nous intéressons maintenant aux alcaloïdes présents.

13. Extraction et analyse des alcaloïdes

Les *Nectandra* étant réputées pour leur richesse en alcaloïdes, une extraction spécifique de ce type de molécules a été menée sur les différentes parties de *Nectandra membranacea*.

13.1. Extractions des alcaloïdes totaux des feuilles, écorces et des fruits

13.1.1. Méthode d'extraction

Les alcaloïdes totaux sont extraits à partir de la méthode suivante, adaptée au laboratoire.

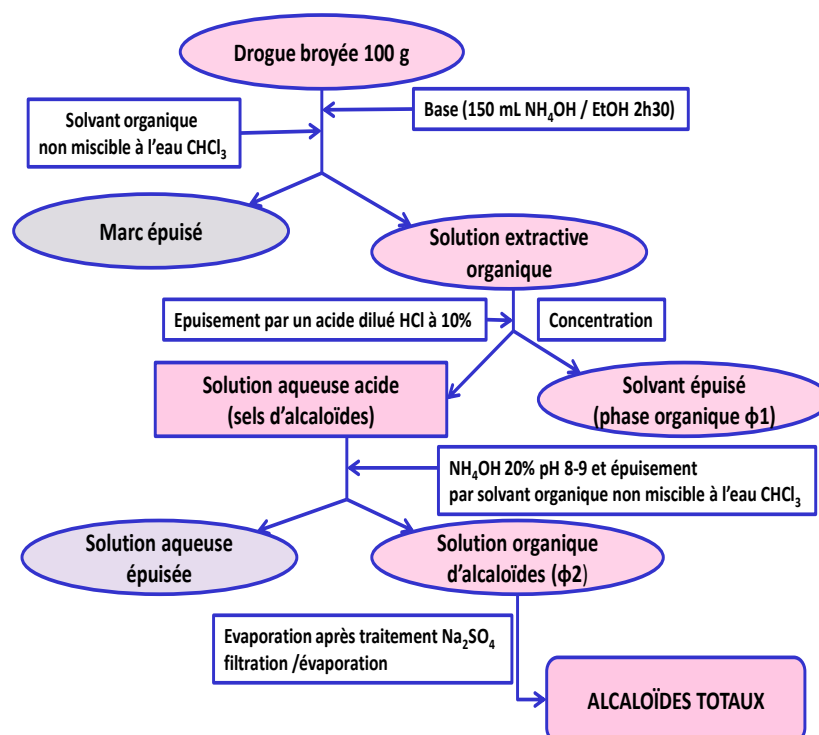


Figure 80 : Méthode d'extraction des alcaloïdes totaux

L'extraction a été menée sur 100 g de matière végétale : feuilles et écorces pour les deux stades de croissance ainsi que pour les fruits. Le tableau récapitule les masses et les rendements obtenus en alcaloïdes totaux.

Tableau 31 : Rendement (en %) des extractions d'alcaloïdes

Partie étudiée	Feuilles ^A	Feuilles ^B	Ecorces ^A	Ecorces ^B	Fruits
Φ1	0,3	0,5	1,1	0,2	1,4
Φ2	1,3	1,1	1,3	0,1	0,4

Les deux phases organiques ϕ_1 et ϕ_2 sont analysées en CCM afin de confirmer à l'aide du réactif de Dragendorff, la présence des alcaloïdes. De nombreux spots sont colorés en orange.

Les $\phi 2$, positives au test (écorces et feuilles), seront soumises à des séparations chromatographiques.

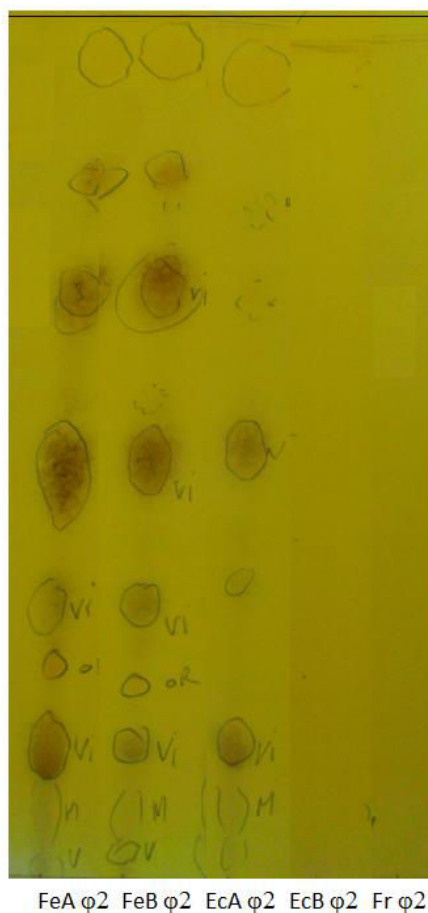


Figure 81 : CCM des extraits bruts alcaloïdes révélée au réactif de Dragendorff

Système : Hexane/ CHCl_3 /MeOH/ NH_4OH : 45/45/10/1

Les feuilles révèlent une forte teneur en alcaloïdes avec des rendements en alcaloïdes totaux de 1 et 1,3% pour les deux stades. Concernant les écorces, les résultats sont très différents pour les deux stades. Le stade A est comparable aux feuilles alors que pour le stade B, le rendement est dix fois moindre. La teneur en alcaloïdes des écorces varie en fonction du stade de récolte. Les fruits quant à eux sont pauvres en alcaloïdes ($\rho = 0,1389\%$).

13.1.2. Structure des alcaloïdes des extraits bruts

13.1.2.1. Détermination des familles de molécules

Les profils chromatographiques (HPLC/DAD) des extraits bruts d'alcaloïdes ainsi que les spectres UV des composés majoritaires sont ici présentés. Ils présentent des maxima d'absorption nous orientant en référence à la littérature vers des structures de type aporphine et isoquinoléine.

Selon Guinaudeau et Bruneton, les spectres UV des isoquinoléines identifiés montrent des bandes d'absorptions UV similaires. Chaque spectre est caractérisé par un maximum entre 206 et 201 nm, un maximum entre 225 et 235 et un autre entre 279 et 283 nm.

Type isoquinoléine

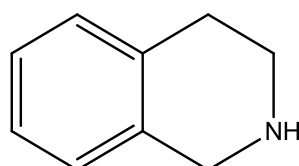


Figure 82 : Squelette des alcaloïdes de type isoquinoléine

Les spectres UV alcaloïdes de type aporphines présentent un maximum entre 265 et 290 nm et un autre vers 300nm. [Guinaudeau, H.and Bruneton 1993].

Type aporphine

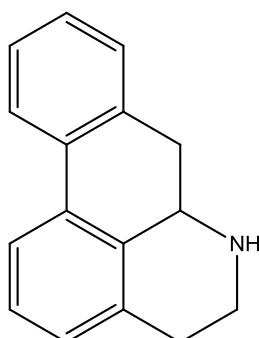


Figure 83 : Squelette des alcaloïdes de type aporphine

Les chromatogrammes des extraits bruts de feuilles aux deux stades sont ici présentés avec les spectres UV des pics majoritaires.

Extrait brut des feuilles Stade A

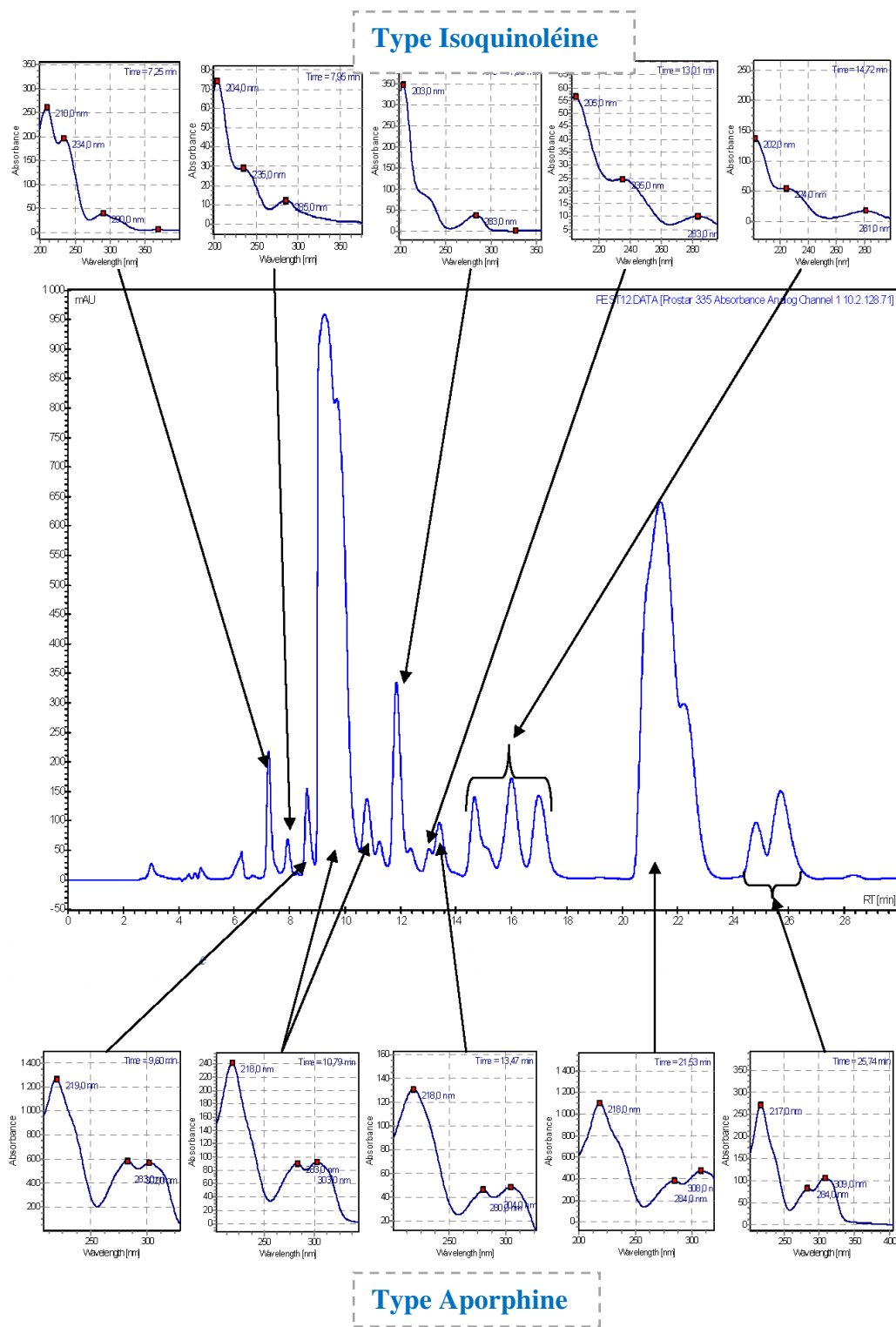
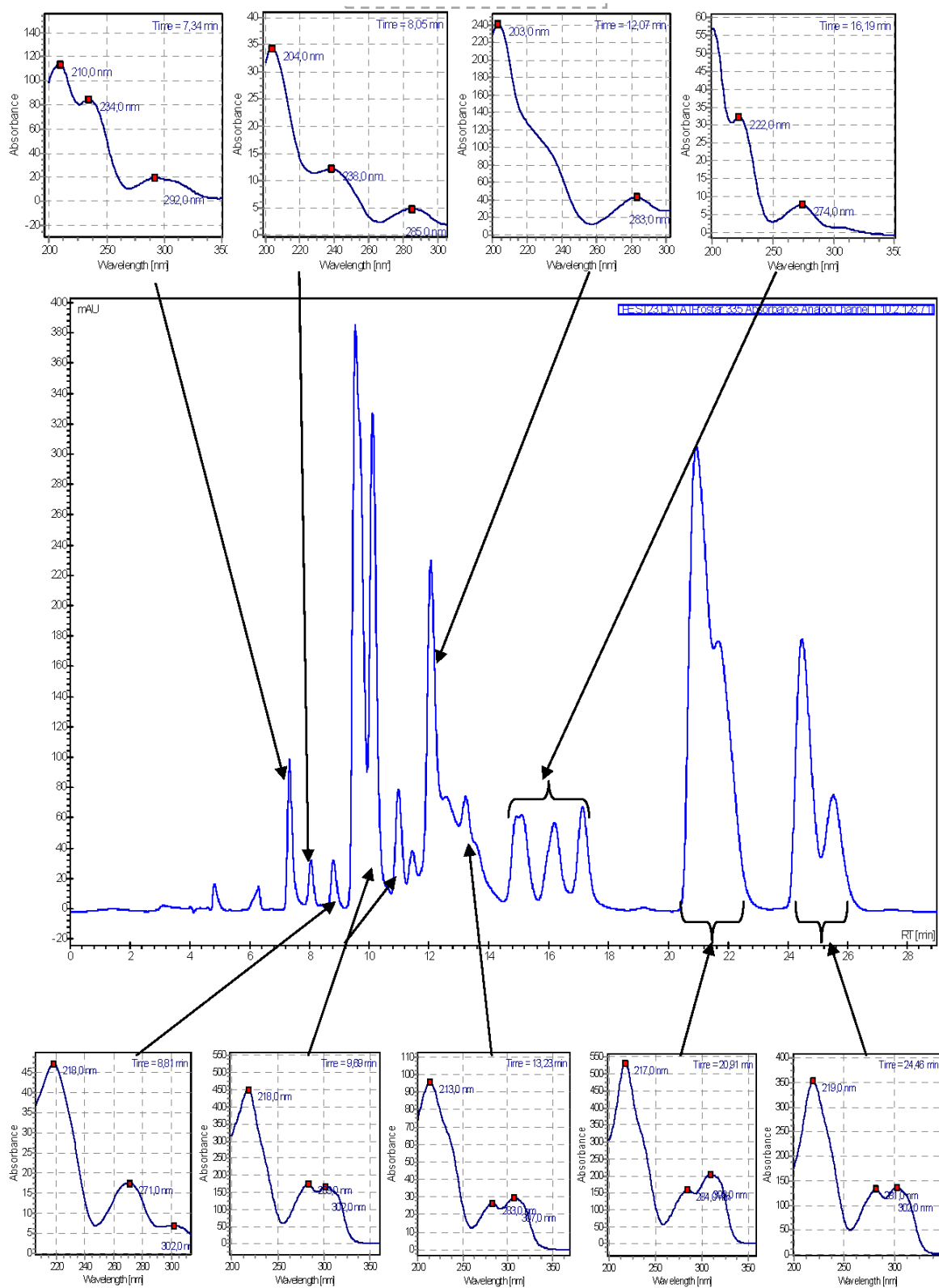


Figure 84 : Chromatogramme HPLC/DAD de l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles récoltées au stade A (200 nm)

Extrait brut des feuilles Stade B

Type Isoquinoléine



Type Aporphine

Figure 85 : Chromatogramme HPLC/DAD de l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles récoltées au stade B (200 nm)

Les extraits de feuilles présentent des profils chromatographiques très semblables. De plus, les spectres UV des différents composés correspondent. Le stade de récolte n'a donc a priori pas d'incidence sur la composition en alcaloïdes au niveau des feuilles.

De même les chromatogrammes des extraits alcaloïdes des écorces et les spectres UV des pics majoritaires sont présentés ci-dessous.

Extrait brut des écorces Stade A

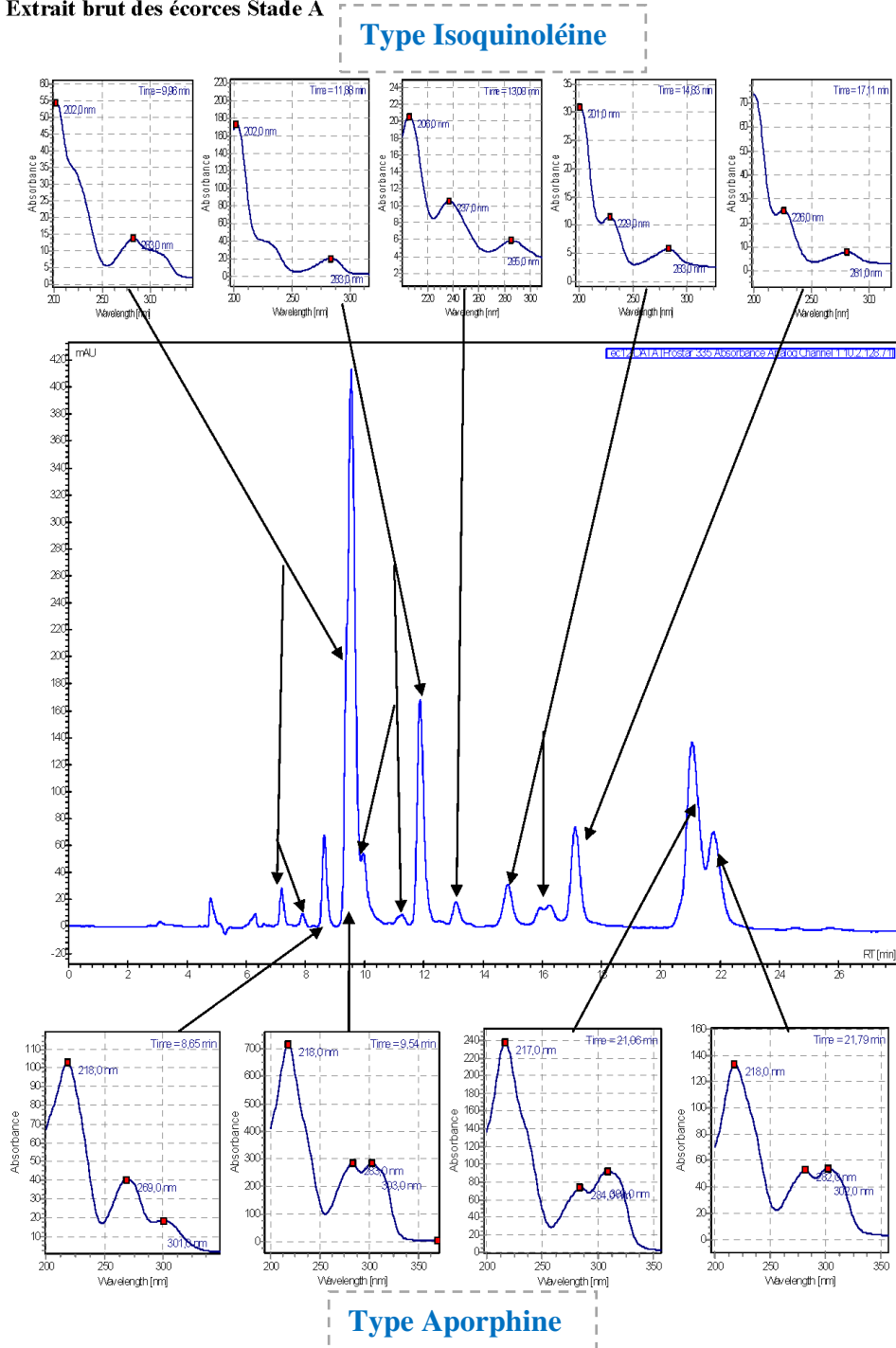


Figure 86 : Chromatogramme HPLC couplée à l'UV de l'extrait brut d'alcaloïdes des écorces récoltées au stade A (200 nm)

Extrait brut des écorces Stade B

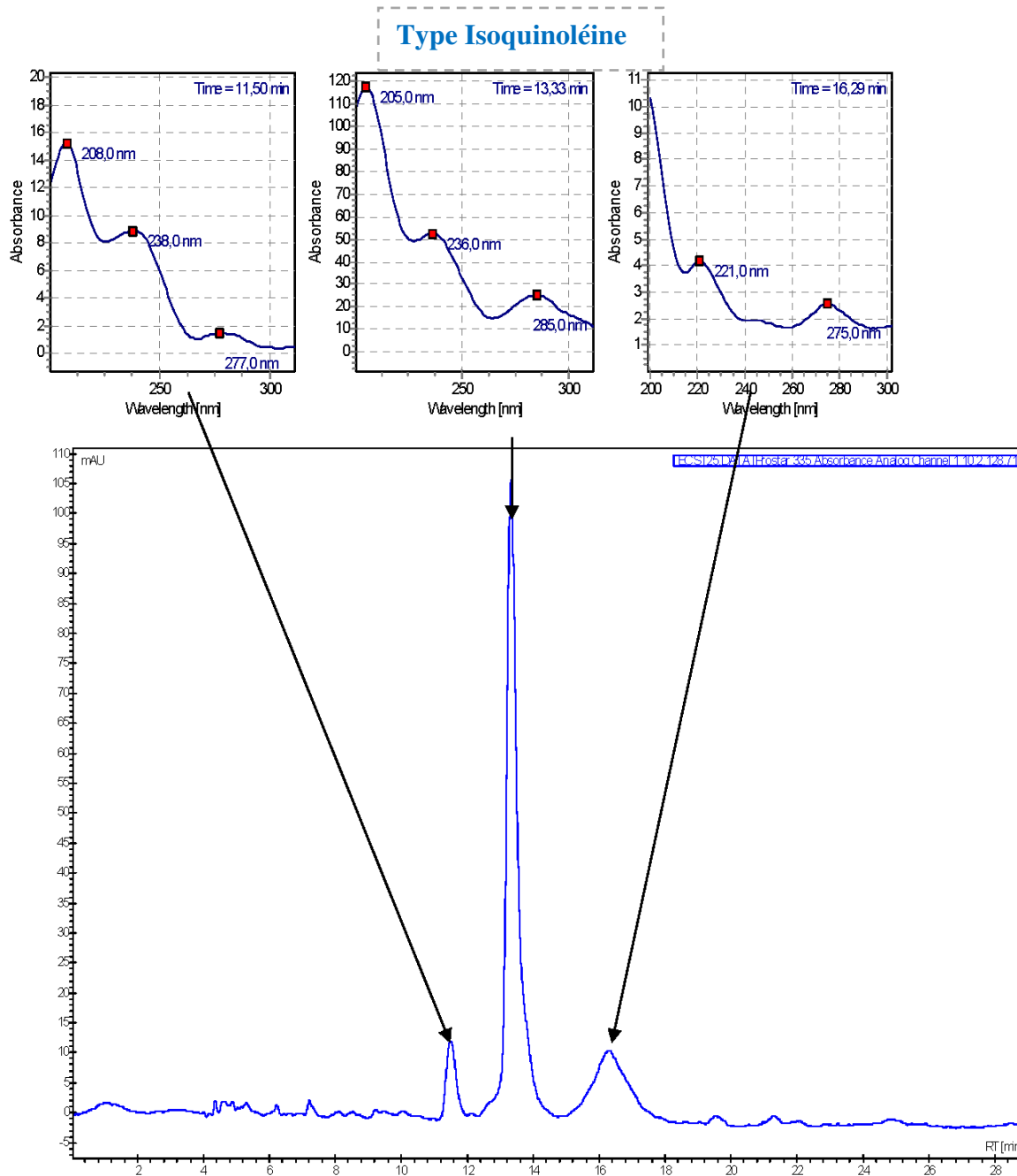


Figure 87 : Chromatogramme HPLC couplée à l'UV de l'extrait brut d'alcaloïdes des écorces au stade B (200 nm)

Comme prévu par la CCM réalisée précédemment, peu de pics chromatographiques sont observés pour les écorces stade B. Dans cet extrait, les alcaloïdes majoritaires ont tous la structure isoquinoléine, qui laisse supposer des alcaloïdes du même type que ceux contenus dans les feuilles : isoquinoléine et aporphine.

Le chromatogramme de l'extrait brut des fruits ne contient pas d'alcaloïdes comme le prévoyait la CCM.

12.1.2.2. Identification des alcaloïdes par GC-MS

Les 4 extraits bruts d'alcaloïdes totaux obtenus ($\varphi 2$) ont été analysés par GC-MS. Les pics non identifiés correspondent à des structures qui ne sont pas répertoriées dans la banque de spectres. Il serait intéressant de poursuivre les séparations afin de les isoler et d'obtenir leur structure complète. Les chromatogrammes correspondant sont présentés ci-dessous :

Extrait brut alcaloïdes totaux des feuilles

La figure 88 montre le profil chromatographique de l'extrait brut alcaloïdes des feuilles stade A obtenu par GC couplée à la MS.

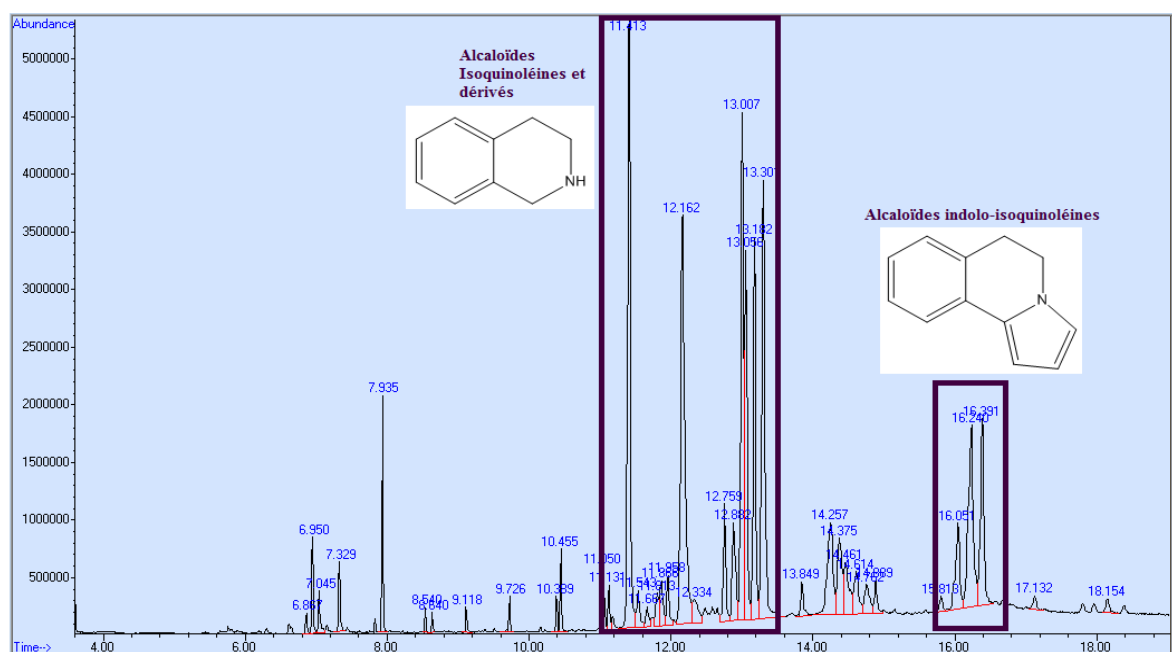


Figure 88 : Profil chromatographique d'analyse GC-MS de l'extrait brut d'alcaloïdes de feuilles au Stade A

L'extrait de feuilles stade B présentant le même profil et les mêmes constituants majoritaires n'a pas été présenté. Les deux périodes de récolte n'ont apparemment aucune incidence sur la nature des alcaloïdes des feuilles de *Nectandra membranacea*.

Quatre types de structures sont retrouvés dans les extraits bruts alcaloïdiques de *Nectandra membranacea*. Les structures aporphines et isoquinoléïnes déjà reconnues, en HPLC/DAD sont accompagnés de molécules de type :

- indoliques
- et indolo-isoquinoléïnes

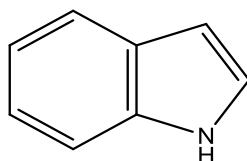


Figure 89 : Structure des alcaloïdes indoliques

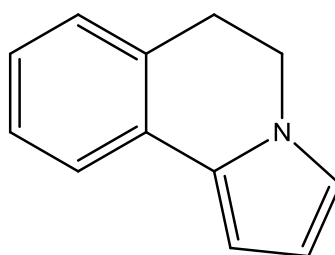


Figure 90 : Structure des alcaloïdes indoloisoquinoléïnes

Onze alcaloïdes majoritaires ont été identifiés par GC/MS par comparaison de leur spectre de masse avec ceux de la banque de spectre et sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 32 : Composition en alcaloïdes de l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles

Ref.	RT (min)	Nom du composé	% AT
Alcaloïdes isoquinoléines et ses dérivés			
116	11,413	Réticuline	14,36
134	12,162	1,1-diméthyl -1,2,3,4-tétrahydro-6,7-isoquinolinediol	15,77
138	12,334	Bulbocapnine	1,72
136	12,882	Nanténine	3,61
101	13,007	N-méthyllaurotétanine	11,41
137	13,056	Actinodaphnine	8,86
139	13,182	Domesticine	8,27
98	13,301	Boldine	13,26
Alcaloïdes indolo-isoquinoléines			
141	16,051	11,12-dihydro-2, 3, 8,9-tétraméthoxy-1H-indolo [2, 1, α] isoquinoline	4,76
135	16,240	6,9, 10-triméthoxy-12H-benz[6,7]oxeprino-2,3,4-isoquinoline	9,92
140	16,391	N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4'méthoxyphényl)-1H-indole	8,00
TOTAL			99,94

AT : Alcaloïdes totaux

Le profil chromatographique obtenu lors des analyses qualitatives et quantitatives GC-MS de l'extrait d'alcaloïdes des écorces récoltées lors du stade A, est représenté dans la figure suivante.

Extrait brut alcaloïde totaux des écorces au stade A

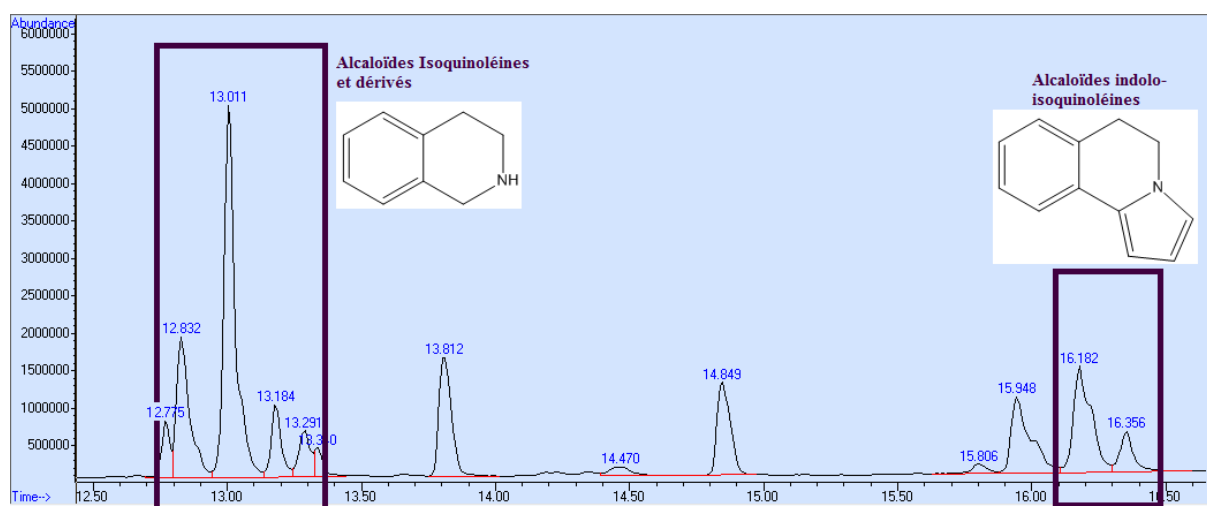
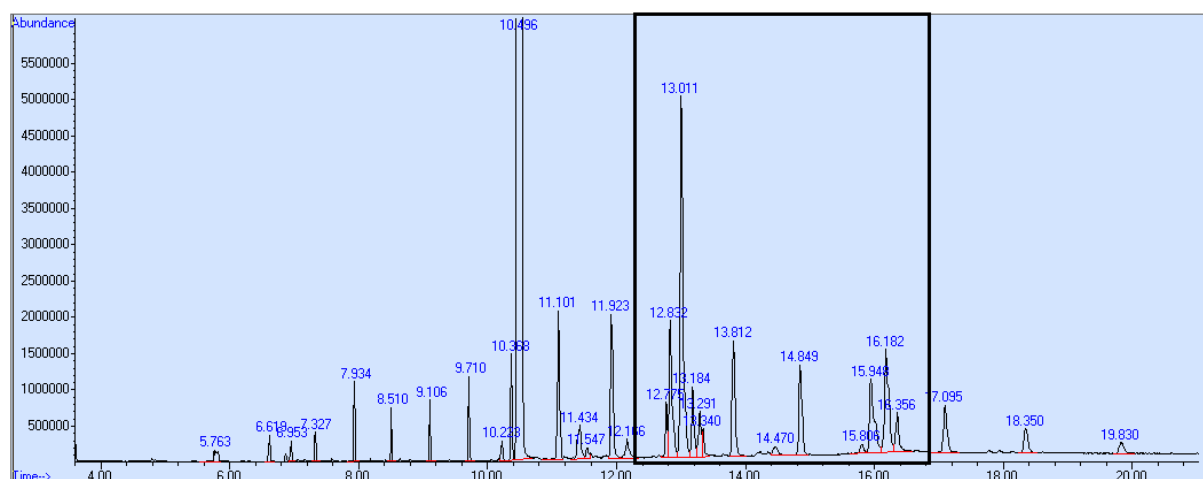


Figure 91: Profil chromatographique d'analyse GC-MS de l'extrait brut d'alcaloïdes des écorces au stade A

Le tableau ci-dessous présente les alcaloïdes identifiés avec la méthode précédente dans cet extrait.

Tableau 33 : Analyse quantitative et qualitative de l'extrait brut des écorces stade A

Réf	RT (min)	Nom du composé	% AT
Alcaloïdes isoquinoléines et dérivés			
139	12,76	Domesticine	6,07
101	13,011	N-méthyllaurotétanine	53,27
98	13,291	Boldine	6,72
Alcaloïdes indolo-isoquinoléines			
141	16,182	11,12-dihydro-2, 3, 8,9-tétraméthoxy -1H-indolo [2, 1, α] isoquinoline	25,13
140	16,356	N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4'méthoxyphényl)-1H-indole	8,78
TOTAL			99,97

Nous retrouvons quelques alcaloïdes, à l'état de traces. Néanmoins le composé majoritaire identifié est la N-méthyllaurotétanine (53,27%). Les structures présentes dans l'extrait brut des feuilles sont retrouvées ici en moindres quantités. Elles sont de type aporphines : (domesticine 6,07%, boldine 6,72%), indolo-isoquinoléine (11,12-dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-1H-indolo-[2,1,α]isoquinoline, 25,13%) et indolique (N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4'-méthoxyphényl)-1H-indole, 8,78%).

Extrait brut alcaloïdes des écorces stade B

Le chromatogramme suivant présente l'analyse GC/MS de l'extrait brut des écorces au stade B :

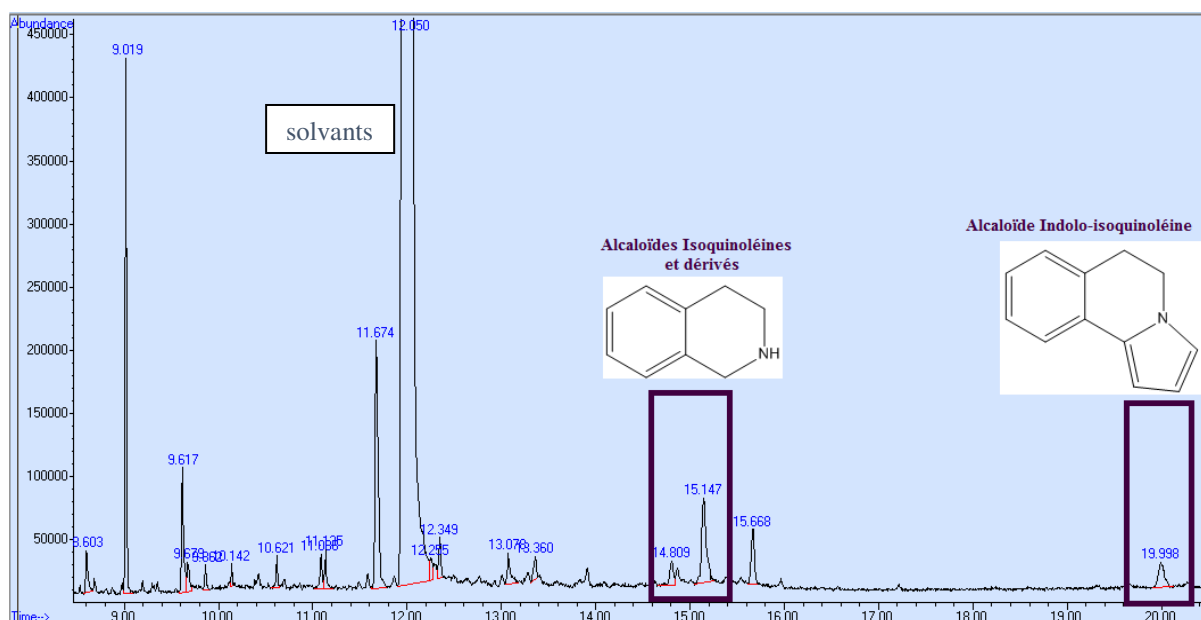


Figure 92 : Profil chromatographique d'analyse GC-MS de l'extrait brut d'alcaloïdes des écorces stade B

Deux types d'alcaloïdes ont été identifiés dans l'extrait brut des écorces stade B. Il s'agit de structures isoquinoléines et indolo-isoquinoléines présentées dans le tableau ci-après :

Tableau 34 : Analyse quantitative et qualitative de l'extrait brut des écorces stade B

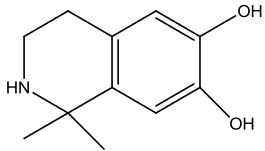
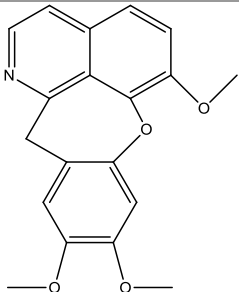
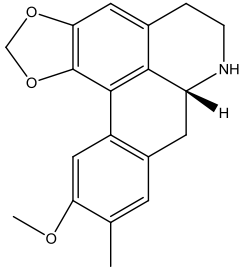
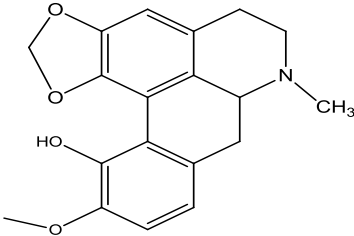
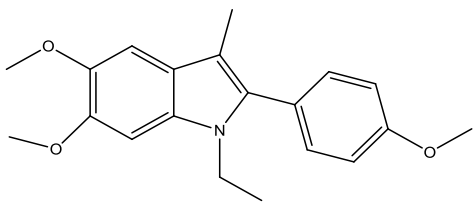
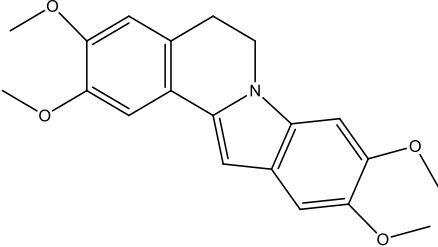
Réf	RT (min)	Nom du composé	% AT
		Alcaloïdes isoquinoléines et ses dérivés	
139	14,808	Domesticine	14,53
101	15,145	N-methylaurotétanine	61,27
		Alcaloïde indolo-isoquinoléine	
141	19,996	11,12-dihydro-2, 3, 8,9-tétraméthoxy-1H-indolo [2, 1, α] isoquinoline	24,19
TOTAL			99,99

Les alcaloïdes sont présents dans les autres extraits bruts, feuilles et écorces. Toutes ces structures sont identifiées pour la première fois dans *N. membranacea*. Ces résultats feront l'objet d'une publication.

Familles de molécules	Feuilles stade A et B	Feuilles et Ecorces stade A et B
Isoquinoléiques	<ul style="list-style-type: none"> • 1,1-diméthyl-1, 2, 3,4-tétrahydro- -6,7-isoquinolinediol • 6,9,10-triméthoxy-12H-benz[6,7]oxeprino (2, 3,4 isoquinoline 	
Aporphines		<ul style="list-style-type: none"> • N-méthyllaurotétanine • Boldine
Tétrahydrobenzyl isoquinoléiques	<ul style="list-style-type: none"> • Réticuline 	
Bisbenzylisoquinolines	<ul style="list-style-type: none"> • Nanténine • Actinodaphnine • Bulbocapnine 	<ul style="list-style-type: none"> • Domesticine
Indoliques		<ul style="list-style-type: none"> • N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl- 2-(4' méthoxyphényl)-1H-indole <p>stade A seulement pour les écorces</p>
Indolo isoquinoléiques		<ul style="list-style-type: none"> • 11,12-dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-1H-indolo[2,1,α]isoquinoline

Un récapitulatif des différentes structures d'alcoïdes identifiés par GC-MS est présenté dans le tableau 35.

Tableau 35 : Structure des alcoïdes identifiés par GC/MS dans les extraits bruts de *N. membranacea*

Structure des alcoïdes de <i>N. membranacea</i>	
	
<p>134 1,1-diméthyl-1,2,3,4-tétrahydro-6,7-isoquinolinediol</p>	<p>135 6,9,10-triméthoxy-12H-benz[6,7]oxeprino(2,3,4)isoquinoline</p>
	
<p>137 Actinodaphnine</p>	<p>138 Bulbocapnine</p>
	
<p>140 N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4' méthoxyphényl)-1H-indole</p>	<p>141 11,12-dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-1H- indolo [2,1,α] isoquinoline</p>

13.2. Séparation sur colonne ouverte de l'extrait de feuilles

Pour les deux stades de récolte, les extraits d'alcaloïdes totaux de feuilles présentent des profils chromatographiques (HPLC et GC) comparables. Leurs rendements sont proches, ils sont tous deux disponibles en quantité suffisante pour un fractionnement sur colonne ouverte. L'extrait d'alcaloïdes totaux de feuilles au stade A a été choisi afin d'isoler ces alcaloïdes.

13.2.1. Identification des alcaloïdes isolés des feuilles (UV, IR, MS, RMN)

La séparation a été réalisée sur colonne de silice. Tout d'abord, nous avons déterminé le système d'élution par chromatographie sur couche mince. La CCM est réalisée dans différents systèmes de solvant. Après vaporisation au réactif de Dragendorff, spécifique aux alcaloïdes les tâches qui leur correspondent prennent une couleur orangée.

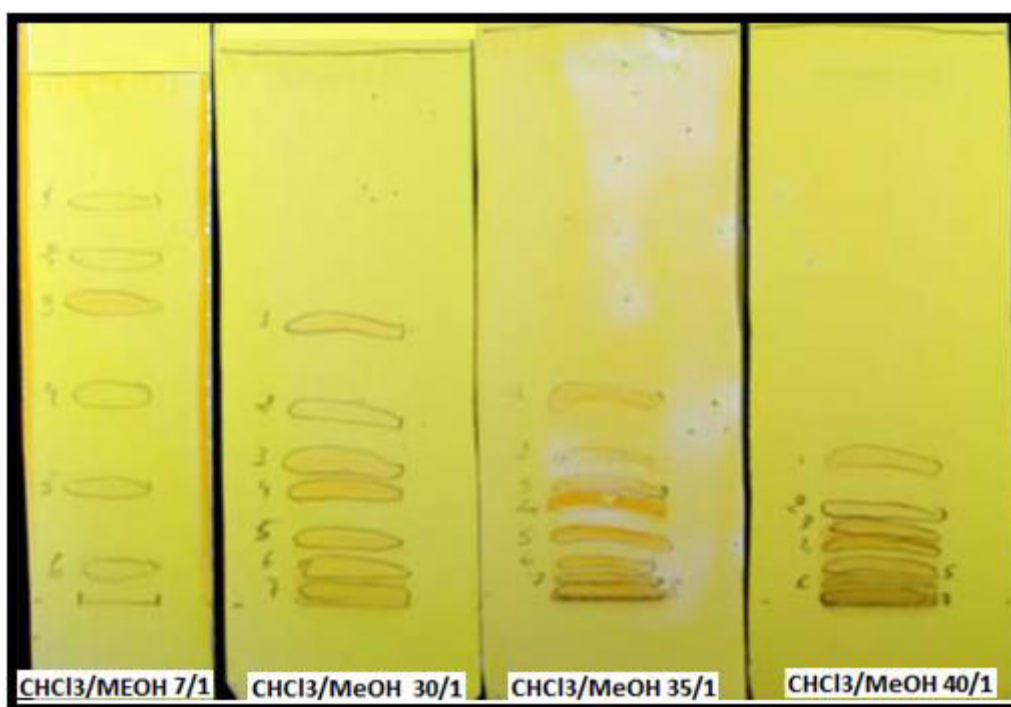


Figure 93 : CCM de l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles révélées au réactif de Dragendorff

Le rapport frontal des spots observés est calculé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 36 : Rapport Frontal des spots observés dans les différents systèmes d'éluion

Condition	Indices	R _f	ΔR _f	Condition	Indices	R _f	ΔR _f
CHCl ₃ /MeOH 7:1	1	0,78	0,11	CHCl ₃ /MeOH 35:1	1	0,28	0,10
	2	0,67	0,07		2	0,18	0,03
	3	0,60	0,18		3	0,15	0,03
	4	0,42	0,18		4	0,13	0,05
	5	0,24	0,15		5	0,08	0,03
	6	0,08			6	0,05	0,03
CHCl ₃ /MeOH 30:1	1	0,62	0,20	CHCl ₃ /MeOH 40:1	1	0,39	0,14
	2	0,42	0,08		2	0,25	0,04
	3	0,34	0,08		3	0,21	0,01
	4	0,26	0,11		4	0,20	0,07
	5	0,15	0,05		5	0,13	0,05
	6	0,11	0,05		6	0,08	0,03
	7	0,06			7	0,05	0,03
					8	0,03	

Les conditions optimales pour réaliser la séparation sur colonne semblent correspondre au système d'éluion CHCl₃/MeOH 35 :1 ($0,1 < R_f < 0,35$ et $\Delta R_f \leq 0,15$). Pour les composés les moins polaires, les conditions idéales sont celles du système CHCl₃/MeOH 40:1. L'éluion commencera par ce système. (CCM des fractions de la colonne de silice voir Matériels et Méthodes).

Les masses obtenues sont répertoriées dans le tableau suivant.

Tableau 37 : Rassemblement des fractions obtenues lors de la séparation sur colonne ouverte de silice

N° tubes	Fractions	Masse (mg)	Commentaire
1-39	33A	9,8	Mélange
40-63	33B	52,6	Mélange
64-100	33C	154,2	Produit A
101-123	33D	44,6	Mélange

N° tubes	Fractions	Masse (mg)	Commentaire
124-156	33 ^E	60,5	Produit B
157-179	33F	31,6	Mélange
180-190	33G	12,4	Produit C
191-fin	33H	1019,4	Mélange

Les fractions ont été analysées par GC/MS. Le tableau ci-dessous présente les différentes structures identifiées via les bases de données du GC/MS (Wiley ; NIST08 ; HPCH).

Tableau 38 : Composés identifiés dans l'extrait de feuilles par GC-MS

Fractions	Noms et Proportions	Numéros
33 A	Impuretés	
33 B	<ul style="list-style-type: none"> Nanténine 20,89% Domesticine 7,07% 	136 139
33C	<ul style="list-style-type: none"> N-méthylaurotétanine 49,76% 11,12-dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-1H-indolo [2,1,α]isoquinoline 19,32 % Nanténine 30,90% 	101 141 136
33D	<ul style="list-style-type: none"> Nanténine 4,24 % N-méthylaurotétanine 41,22% Domesticine 20,43 % 6,9,10-triméthoxy-12H-benz[6,7]oxeprino (2,3,4) isoquinoline 11,74 % 	136 101 139 135
33 E	<ul style="list-style-type: none"> Nanténine 7,20% Domesticine 41,46 % Boldine 16,71% 6,9,10-triméthoxy-12H-benz[6,7]oxeprino (2,3,4) isoquinoline 14,815 % N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthoxy-3-méthyl-2-4'méthoxyphényl-1H-indole 3,59% 	136 139 98 135 140

Fractions	Noms et Proportions	Numéros
33 F	• Domesticine 21,92%	139
	• Boldine 5,86%	98
	• Nanténine 2,86 %	136
	• Isoboldine 26,28%	99
	• 6,9,10-triméthoxy-12H-benz(6,7)oxeprino (2,3,4) isoquinoline	135
	• N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthoxy-3-méthyl-2-4' methoxyphenyl-1H-indole 7,37%	140
33 G	• Boldine 13,874%	98
	• 1-[(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthyl]-6-méthoxyisoquinolin-7-ol ou (1, 2, 3,4 detétrahydro-norrecticuline), 2,79%	134
	• Domesticine 3,35%	139
33 H	• (+)-réticuline 12,45%	116
	• Salsoline 20,97%	143
	• 1-[(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthyl]-6-méthoxyisoquinolin-7-ol 36%	142
	• Boldine 14,36%	
	• N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthoxy-3-méthyl-2-4' méthoxyphenyl-1H indole 5,28%	98 140

Les composés identifiés dans l'extrait brut (GC-MS) sont évidemment retrouvés. Cependant le fractionnement a permis d'identifier deux structures supplémentaires.

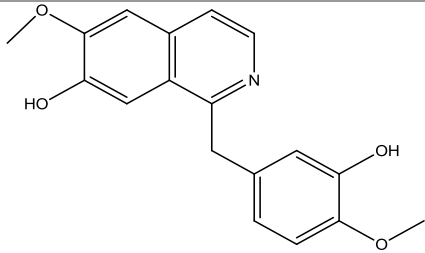
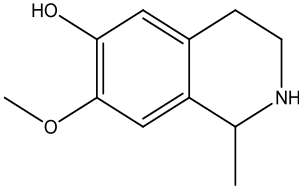
Nom du composé	
Alcaloïdes isoquinoléines et ses dérivés	
	
142	143
1-[(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)méthyl]-6-méthoxyisoquinolin-7-ol (Tétrahydrobenzylisoquinoléine)	Salsoline (Isoquinoléine)

Figure 94 : Structures d'alcaloïdes identifiées dans les fractions des feuilles stade A (fraction 33H)

Certaines fractions sont soumises à des purifications afin d'en isoler les composés et de les confirmer grâce à la RMN.

Etude de la fraction 33C issue de l'extrait de feuilles

Identification des constituants présents dans la fraction 33C

La fraction 33C est la plus abondante (11% ; 154,2 mg). Son chromatogramme est reporté ci-dessous. Les composés ont été séparés par HPLC préparative : 3 fractions sont récupérées : 39A, 39B et 39C.

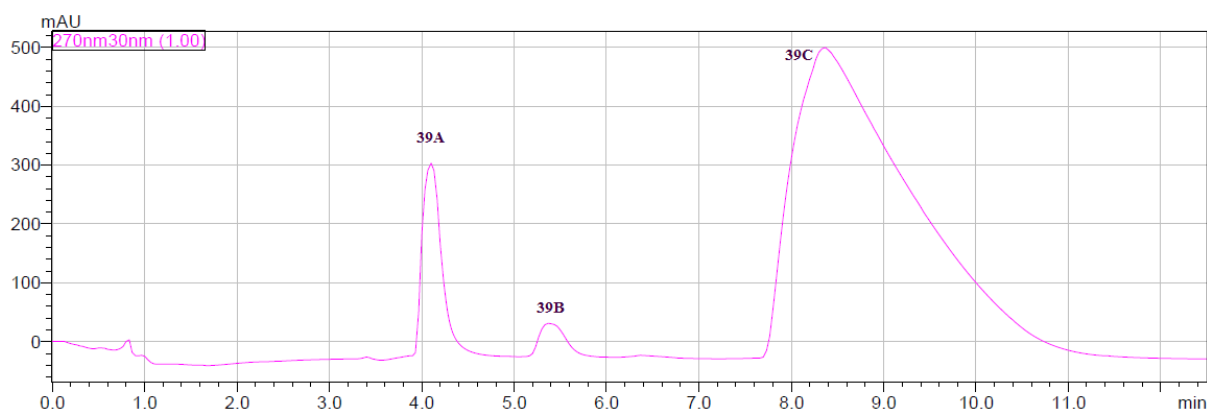


Figure 95 : Chromatogramme de la fraction 33C HPLC-préparative (SHIMADZU)

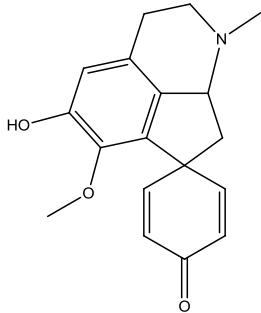
Le rendement de l'ensemble des fractions est de 23%. Le détail des masses obtenues est le suivant :

Tableau 39 : Masses des composés isolés à partir de 33C

Fractions	Masses (mg)
39A	2,7
39B	4,4
39C	29,7

Les composés 39A, 39B et 39C ont été analysés par GC/MS. Les données obtenues sont comparées à celles de la banque de spectre.

Tableau 40 : Analyse GC/MS des sous fractions de 33C

Fractions	Noms et Formules	Structures
39 A	<ul style="list-style-type: none"> • N-méthylcrotonosine 100% 	 <p>144</p>
39 B	<ul style="list-style-type: none"> • Domesticine 10,116% • N-méthyllaurotétanine 19,543% 	<p>139</p> <p>101</p>
39 C	<ul style="list-style-type: none"> • N-méthyllaurotétanine 47,368% • Domesticine 11,436% • 11,12-dihydro-2,3,8,9-tetraméthoxy-1H-indolo[2,1,α]isoquinoline 9,487% 	<p>139</p> <p>141</p>

L'analyse a permis de déterminer que la fraction 39A est pure et que les autres fractions 39B et 39C sont des mélanges d'alcaloïdes.

Afin de confirmer les possibilités de structures ci-dessous, l'étude des 3 sous-fractions, 39A, 39B et 39C est réalisée. Les données recueillies sont présentés ci-dessous :

Détermination structurales du composé 39 A

Le spectre de masse de 39A a été extrait et est représenté ci-dessous :

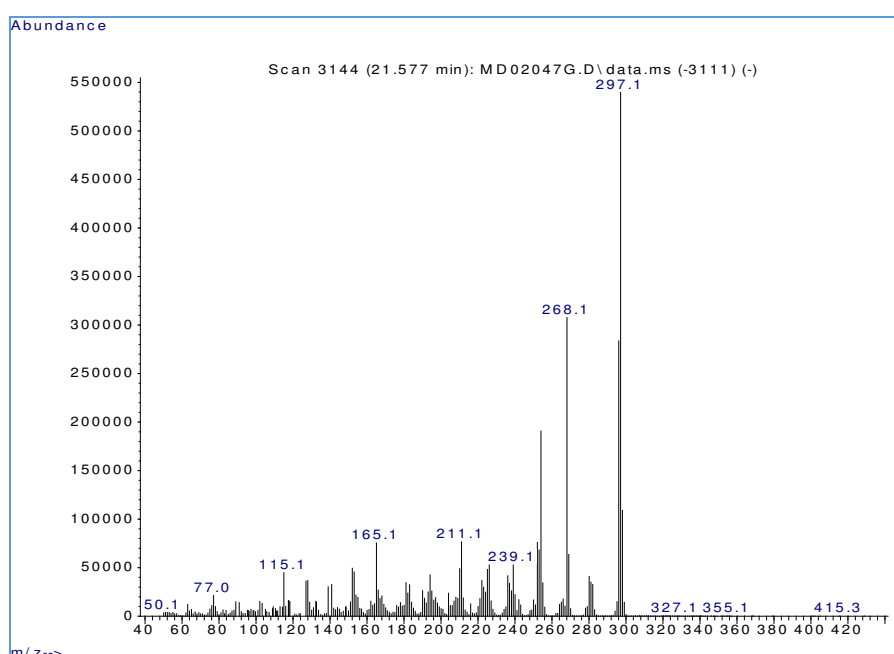


Figure 96 : Spectre MS du composé 39A

Le spectre de masse obtenu correspond aux données bibliographiques de la N-méthylcrotonosine [Hemingway 1991]. Les pics de masses correspondent aux fragments suivants: 297 [M^+] : $C_{18}H_{19}O_3N_1$. ; 268 [M-29] perte de (OMe).

Afin de confirmer cette structure, des analyses en RMN 1H et ^{13}C ont été menées. Les données spectroscopiques obtenues ont été également comparées à celles de la littérature. [Hemingway 1991].

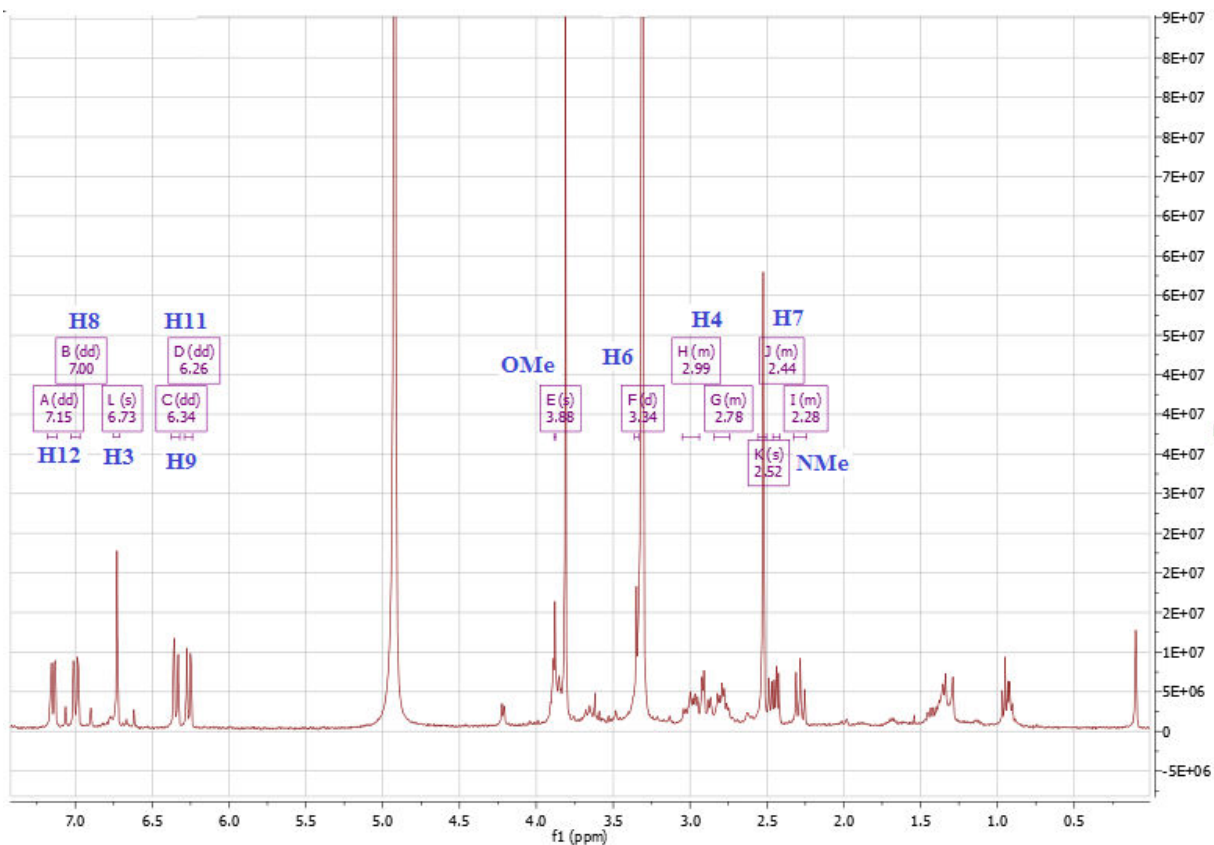


Figure 97: Spectre RMN du ^1H de 39 A

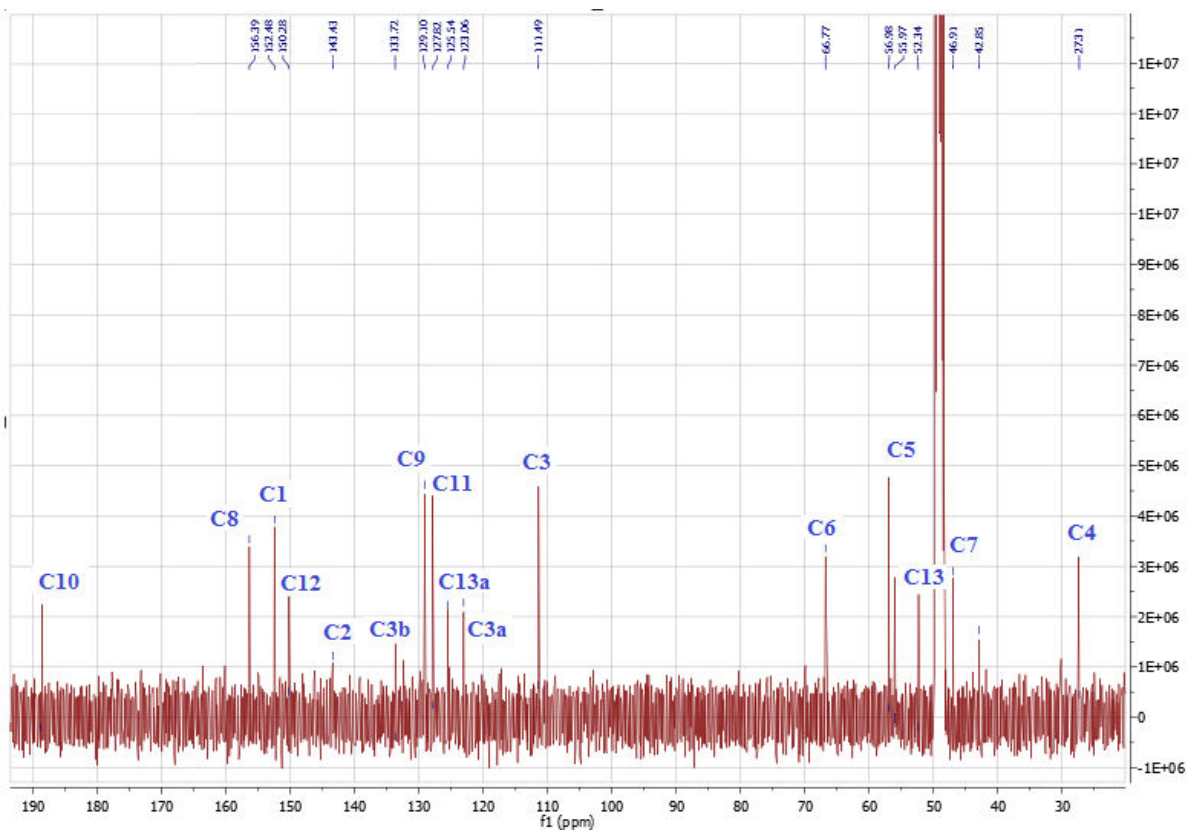
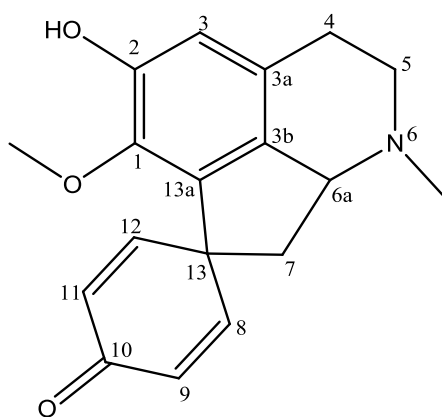


Figure 98 : Spectre RMN du ^{13}C de 39A



144

Figure 99: Structure de la N-méthylcrotonosine

Tableau 41 : Déplacement chimique de la N-méthylcrotonosine

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) J(Hz)	Hemingway 2011	Diff
1	152,48		147,26	-5,22
2a	143,43		144,27	0,84
3	111,41	6,73 <i>s</i>	109,74	-1,67
3a	123,06		122,97	-0,09
3b	133,72		134,36	0,64
4	27,31	2,99 - 2,78 <i>m</i>	27,19	-0,12
5	55,97		55,06	-0,97
6	66,77		65,78	-0,99
7	46,91	2,44 - 2,28 <i>m</i>	47,13	0,22
8	156,39	7,00 <i>dd</i> ($J = 9,9$; 2,8Hz)	153,23	-3,16
9	129,09	6,34 <i>dd</i> ($J = 9,9$; 1,8Hz)	128,77	-0,32
10	188,93		186,26	-2,67
11	127,82	6,26 <i>dd</i> ($J = 9,9$; 1,8Hz)	127,62	-0,2
12	150,28	7,15 <i>dd</i> ($J = 9,9$; 2,8Hz)	149,54	-0,74
13	52,34		50,77	-1,57
13a	125,54		123,94	-1,6
NMe	42,85	2,52 <i>s</i>	43,50	0,65
OMe	56,98	3,88 <i>s</i>	56,55	-0,43

Comme le montre le tableau comparatif ci-dessus, le composé 39A est effectivement la N-méthylcrotonosine, (2',3',8',8'a-tétrahydro-5'hydroxy-6'-méthoxy-1'méthyl)[2,5-cyclohexadiene-1,7'-1'H-cyclopent[i] isoquinolin]-4-one, un alcaloïde de type proaporphine comportant une cétone conjuguée. C'est la première fois qu'elle est identifiée de *N. membranacea* et du genre *Nectandra*.

Les fractions 39B et 39C présentent à priori d'après la GC-MS, les mêmes composés majoritaires : méthyllaurotétanine et domesticine. La confirmation par analyse RMN est réalisée sur la fraction 39C qui contient plus de produit. Les résultats sont donnés ci-dessous.

Étude de la sous-fraction 39C issue de la fraction 33C

Détermination structurale des composés de la sous-fraction 39 C

La fraction 39C est composée d'un mélange de deux composés majoritaires, nommés 39C1 et 39C2. Ces composés pourraient correspondre à la méthyllaurotétanine et à la domesticine d'après les résultats obtenus en GC-MS, la méthyllaurotétanine étant en plus grande proportions (47 %) dans la fraction que la domesticine (11%).

Ces conclusions seront confirmées ou contredites par l'analyse des spectres RMN 1D et 2D.

L'analyse RMN du proton a été réalisée en premier, des pics de protons plus intenses que d'autres sont observés. Ceci appui l'hypothèse qu'un des composés est en plus grande quantité dans la fraction.

Grâce à la bibliographie les données RMN des deux composés supposés ont pu être comparées à celles des spectres obtenues. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Tout d'abord, les pics de protons ont été attribués à chaque composé. Afin de les différencier sur les spectres RMN, deux couleurs sont utilisées: le vert qui correspond aux pics du composé 39C1 et le bleu pour le 39C2.

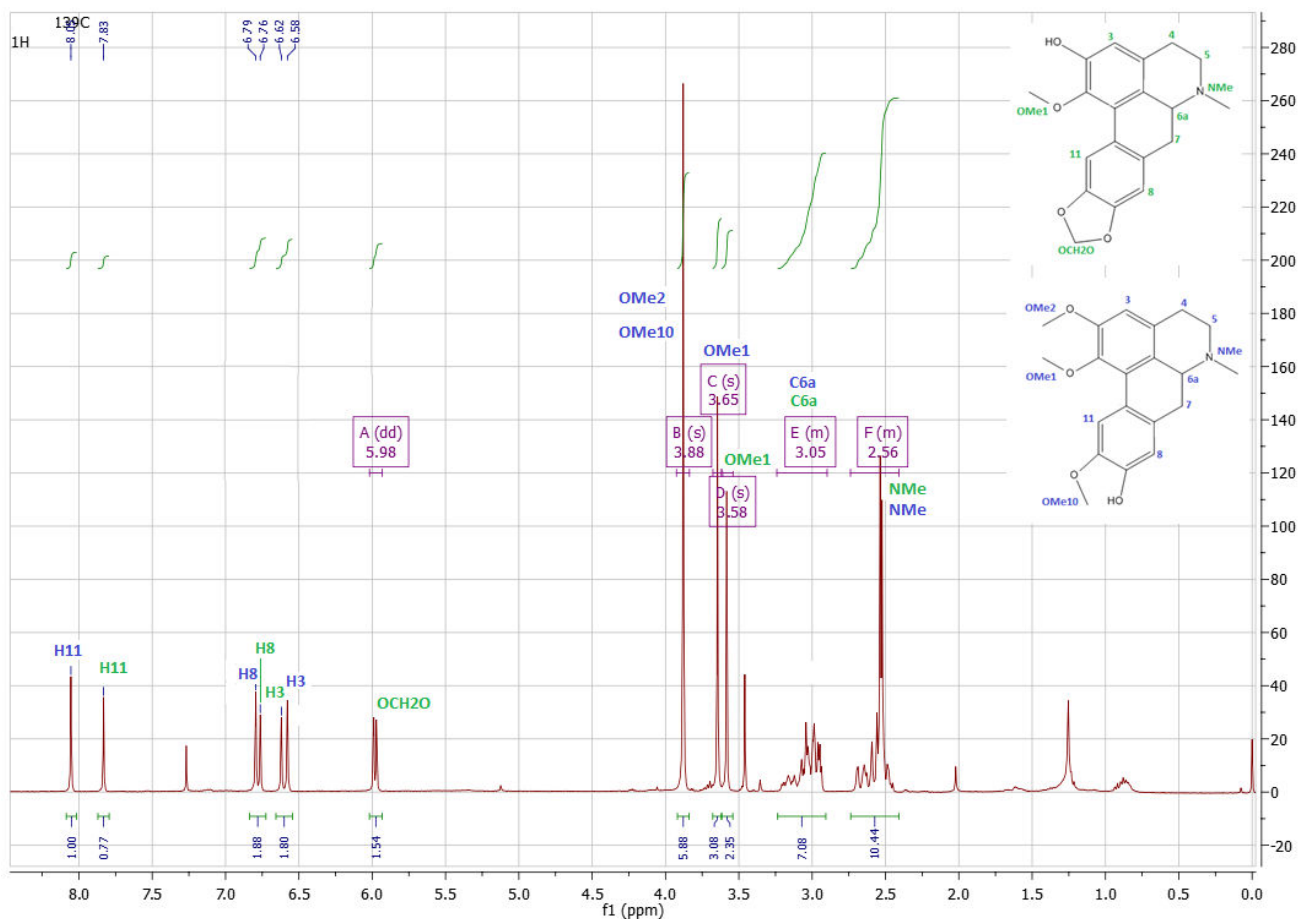


Figure 100: Spectre RMN du ¹H des composés 39C1 en vert et 39C2 en bleu

Le spectre RMN du proton révèle la présence de protons aromatiques H-11 ($\delta = 8, 09$ ppm et $7,83$ ppm), H-8 ($\delta = 6,79$ ppm et $\delta = 6,76$ ppm) et H-3 ($\delta = 6,62$ ppm et $6,58$ ppm). Les protons du groupement éther OCH₂O sont caractérisés par le doublet à $\delta = 5,98$ ppm. Les pics $\delta = 3,88$; $3,65$ et $3,58$ ppm correspondent aux protons des groupements méthoxylés.

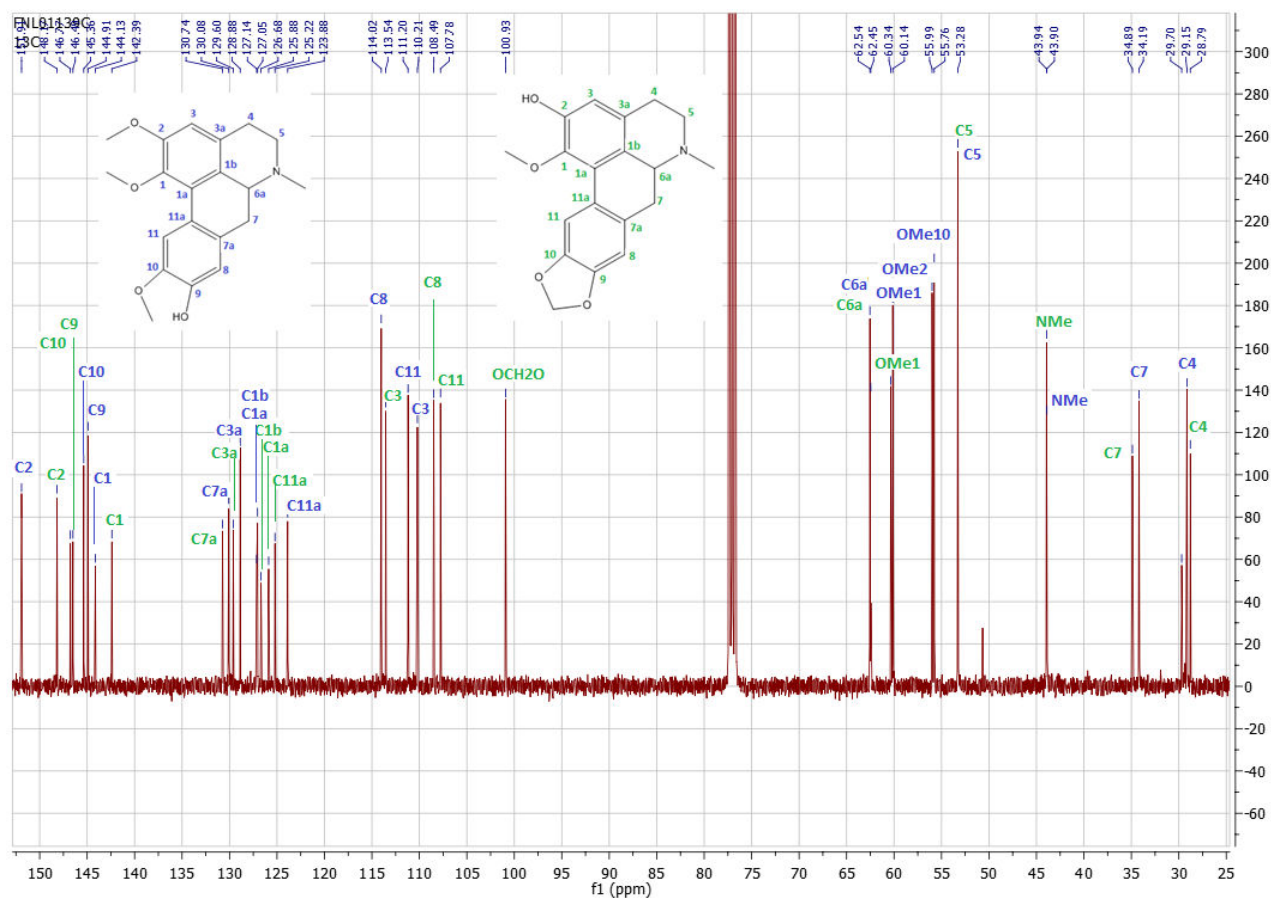


Figure 101 : Spectre RMN du ^{13}C des composés 39C1 en vert et 39C2 en bleu

Comme précédemment, l'attribution des carbones correspondant au composé 39C1 est en vert et pour le composé 39C2 en bleu. Le spectre RMN du ^{13}C montre la présence de 36 atomes de carbones en tout pour les deux composés soit 17 atomes de carbone pour le composé 39C1 et 19 atomes pour 39C2. Les pics correspondant aux groupements méthyls azoté sont situés à 43,94 et 43,90 ppm.

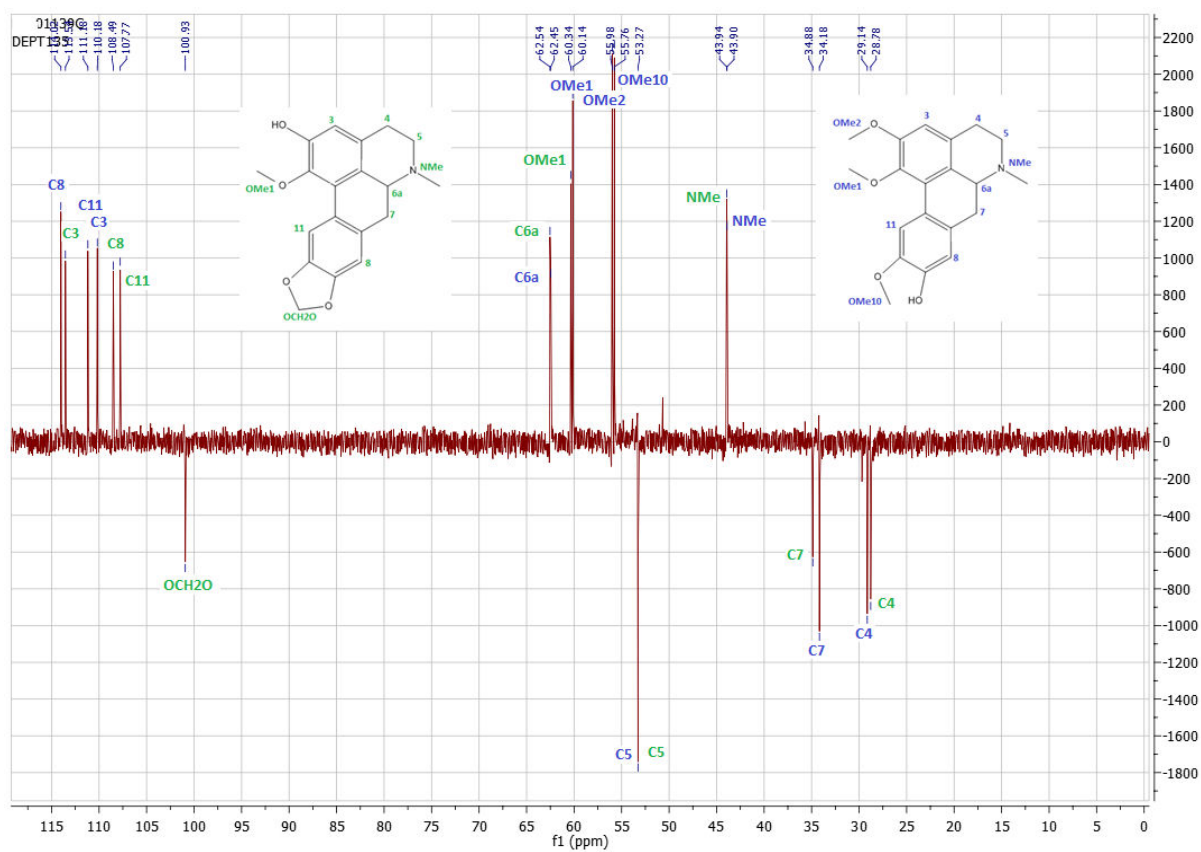


Figure 102 : Spectre RMN DEPT 135 des composés 39C1 en vert et 39C2 en bleu

Le DEPT 135 indique qu'il y a 12 groupements CH et 7 groupements CH₂. Les groupements NMe sont identifiés à δ 43,94 et 43,90 ppm.

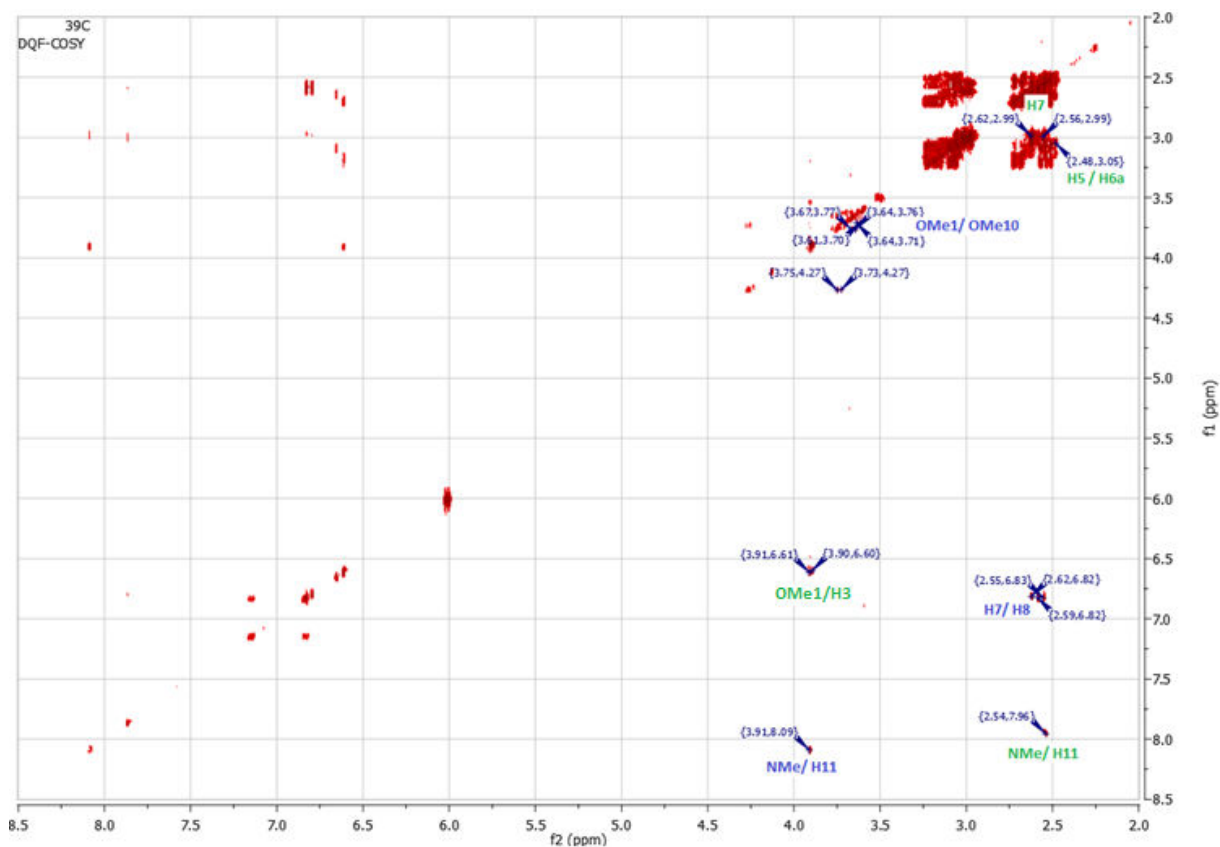


Figure 103 : Spectre RMN 2D COSY des composés 39C1 en vert et 39C2 en bleu

Grace au spectre RMN 2D COSY, certaines corrélations ont pu être notamment établies entre les protons H-5 et H-6a; les protons H-7 du CH₂; et les protons H-7 et H-8. D'autres corrélations sont à noter : les protons des groupements méthylés OMe1 et OMe10; OMe2 et H-3 ainsi que les groupements azoté méthylés des deux composés 39C1 et 39C2.

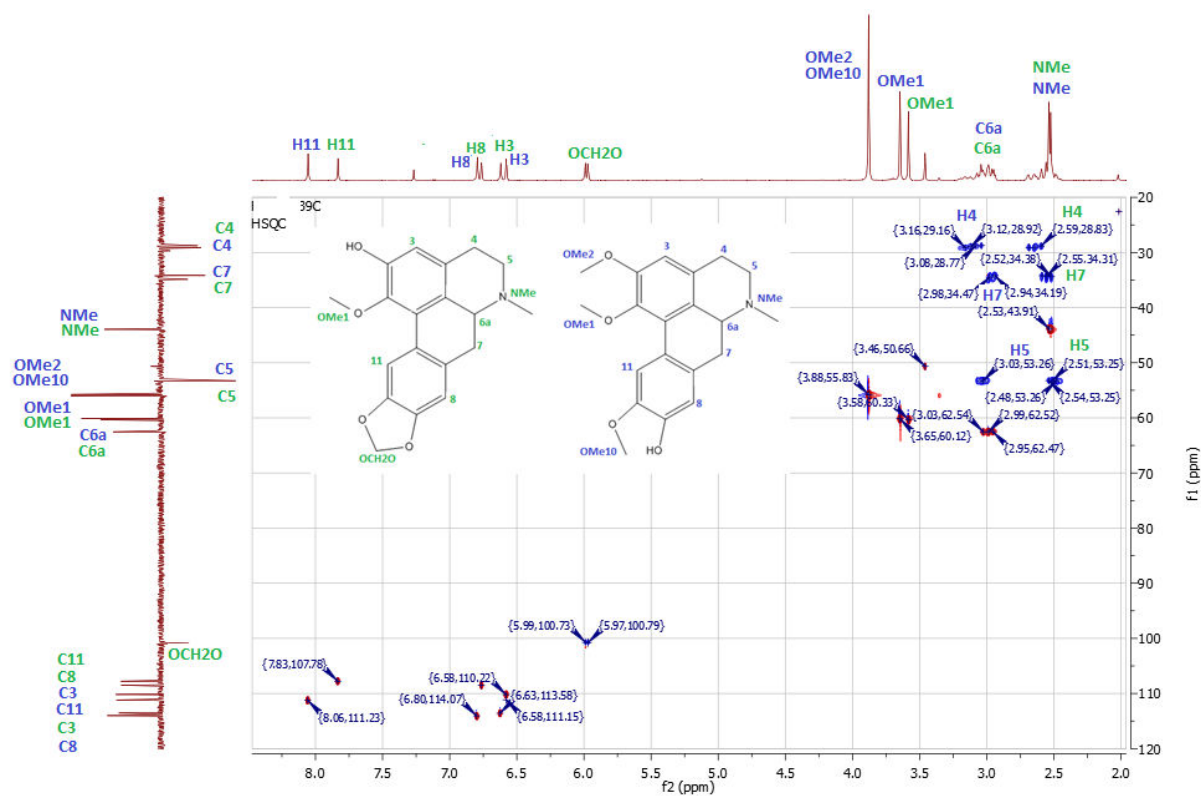


Figure 104 : Spectre RMN 2D HSQC des composés 39C1 en vert et 39C2 en bleu

Le spectre HSQC nous permet de voir les corrélations des carbones avec leurs protons proches. Ainsi donc les corrélations des carbones ont pu être déterminées C4, C5 et C7 avec leurs protons respectifs H-4, H-5 et H-7.

Ce spectre a permis de distinguer avec précision les corrélations des carbones avec leurs protons des deux composés permettant ainsi d'évoluer vers une identification sûre.

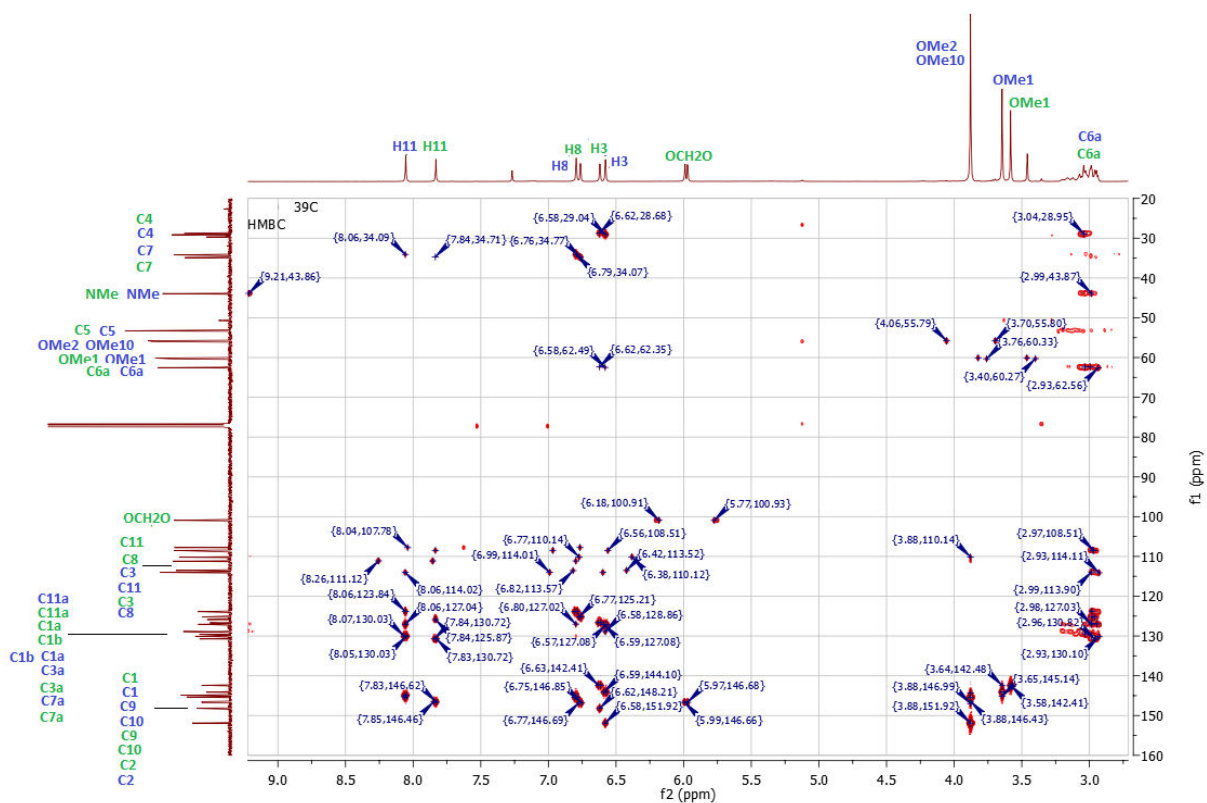
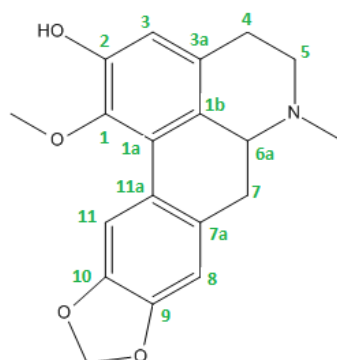


Figure 105 : Spectre RMN 2D HMBC des composés 39C1 en vert et 39C2 en bleu

Ce spectre HMBC a permis de déterminer les corrélations des carbones des composés 39C1 et 39C2 avec leurs protons respectifs. Les différentes corrélations des deux composés sont visibles sur la figure ci-dessus.

L'ensemble des données spectrales a permis de déterminer la structure des deux composés. Il s'agirait ici pour le composé 39C1 (vert) de l'isodomeesticine et pour le composé 39C2 (bleu), la N-méthyllaurotétanine.

Les données RMN du composé 39C1 (vert) sont regroupées dans les tableaux ci-dessous :



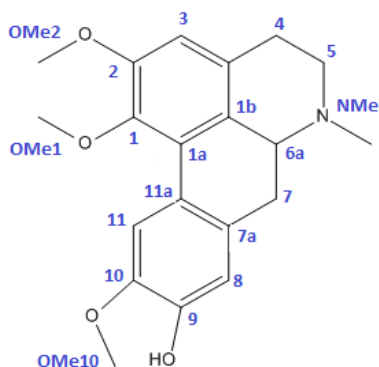
145

Figure 106 : Structure de l'isodomecicine

Tableau 42 : Déplacements chimiques des protons de 39C1 (vert): l'isodomecicine

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) J (Hz)	COSY	HMBC	Garcez 2011	Diff
1	149,39				144,7	2,31
1a	125,88				127,8	1,92
1b	126,68				126,7	0,02
2	148,17				150,7	2,53
3	113,54	6,62 <i>s</i>		H4	115,5	1,96
3a	129,60				130,0	0,40
4	28,79	3,09 - 2,62		H5/H3	29,3	0,51
5	53,28	3,03 - 2,49	H6a	H4	54,3	1,02
6	N					
6a	62,54	3,05 <i>m</i>	H5		63,9	1,36
7	34,89	2,97 - 2,56	H8	H8	35,6	0,71
7a	130,74				131,6	0,86
8	108,49	6,76 <i>s</i>	H7	H7	109,3	0,81
9	146,49				148,0	1,51
10	146,77				148,2	1,43
11	107,78	7,83 <i>s</i>			109,1	1,32
11a	125,22				126,7	1,49
NMe	43,94	2,54	H11	H6a	43,9	-0,04
OCH₂O	100,93	5,99 – 5,97 <i>d J</i> =1,3 Hz			102,3	1,3737
OMe₁	60,34	3,58 <i>s</i>			61,2	0,86

Les données RMN du composé 39C2 (bleu) sont regroupées dans le tableau ci-dessous :



101

Figure 107 : Structure de la N-méthyllaurotétanine

Tableau 43 : Déplacement chimique de 39C2 (bleu) : la N-méthyllaurotétanine

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) J(Hz)	COSY	HMBC
1	144,13			
1a	127,05			
1b	127,14			
2	151,91			
3	110,21	6,58 s		H4
3a	128,88			
4	29,15	3,17 – 2,67		H5/H3
5	53,28	3,03 – 2,49	H6a	H4
6	N			
6a	62,45	3,00 m	H5	
7	34,19	2,96 – 2,56	H8	H8
7a	130,08			
8	114,02	6,79 s	H7	H7
9	144,91			
10	145,36			
11	111,20	8,09 s		
11a	123,88			
NMe	43,90	2,52	H11	H6a
OMe₁	60,14	3,65 s		
OMe₁₀	55,76	3,88 s		
OMe₂	3,88 s			

Ainsi donc l'analyse de la fraction 33C a permis de confirmer la présence de la N-méthyllaurotétanine déjà identifiée par GC-MS.

D'après l'analyse RMN, l'isodomecicine et la N-méthylcrotosine pourraient correspondre à la nanténine et au 11,12 dihydro-2, 3, 8,9-tetraméthoxy-1H-indolo [2, 1, α] isoquinoline, identifié en GC-MS.

13.2.2. Analyse de la fraction G (extrait de feuille stade B) de la partie polaire (HPLC/DAD et GC/MS)

L'analyse HPLC de la fraction G (issue de l'extrait aqueux de feuilles stade B §.12.6) a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le profil des pics obtenus est dédoublé. Les spectres UV des différents pics majoritaires montrent trois maxima 220 nm, 280 nm, 302 nm qui sont caractéristiques des alcaloïdes de type aporphine.

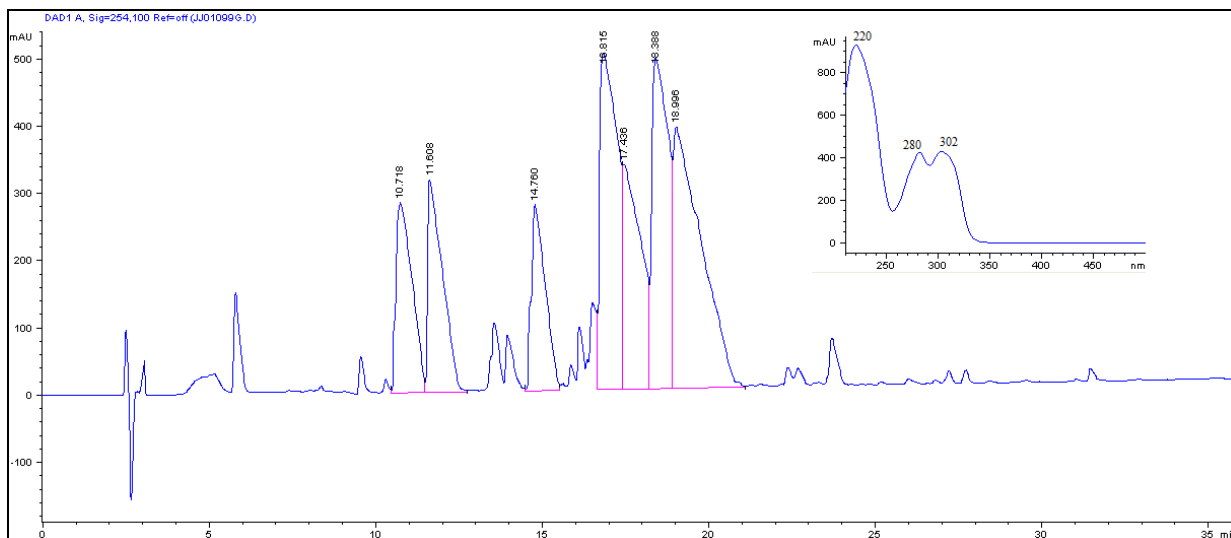


Figure 108 : Chromatogramme HPLC/DAD (254 nm) de la Fraction G

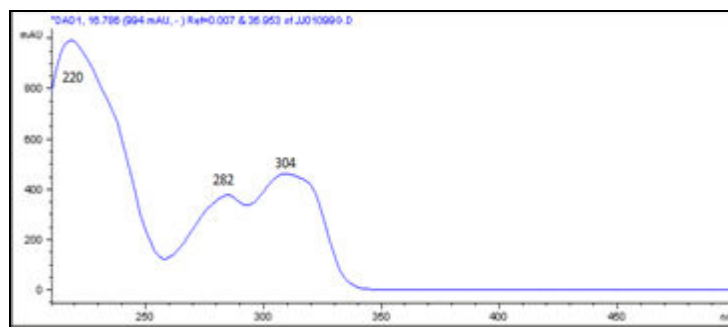


Figure 109 : Spectre UV d'alcaloïde de type aporphine

L'analyse en GC/MS de cette fraction dans du méthanol (10 mg/mL) donne le chromatogramme suivant :

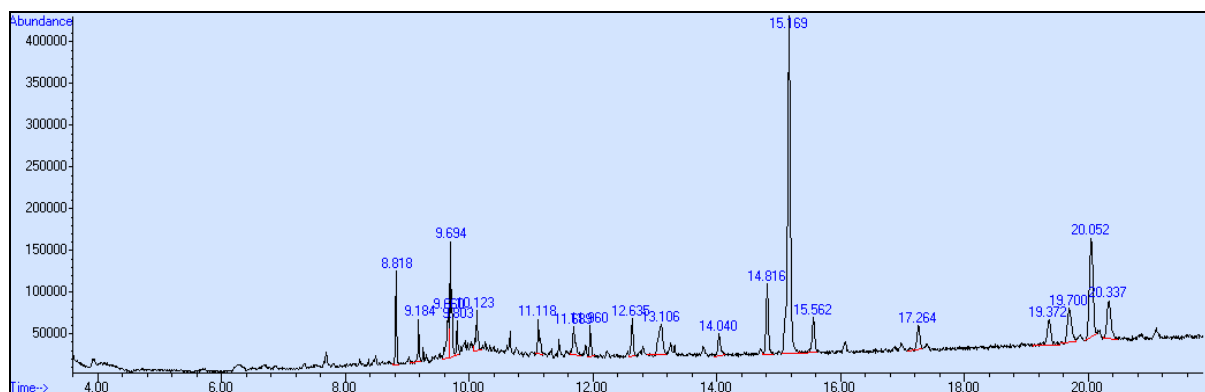


Figure 110 : Chromatogramme GC/MS Fraction G

Après soustraction du blanc (méthanol), le chromatogramme Figure 110 est obtenu où l'on distingue parfaitement deux groupements de molécules :

- groupe 1 : entre 14,50 et 16 min
- groupe 2 : entre 19 et 20,50 min

Ce profil laisserait à supposer dans cette fraction G la présence de deux groupes d'alcaloïdes.

Par comparaison avec les bases de données (Base de données : Wiley6n3, HPCH2205.L, NIST08.L) sept structures ont été identifiées. Elles sont présentées sur le chromatogramme suivant :

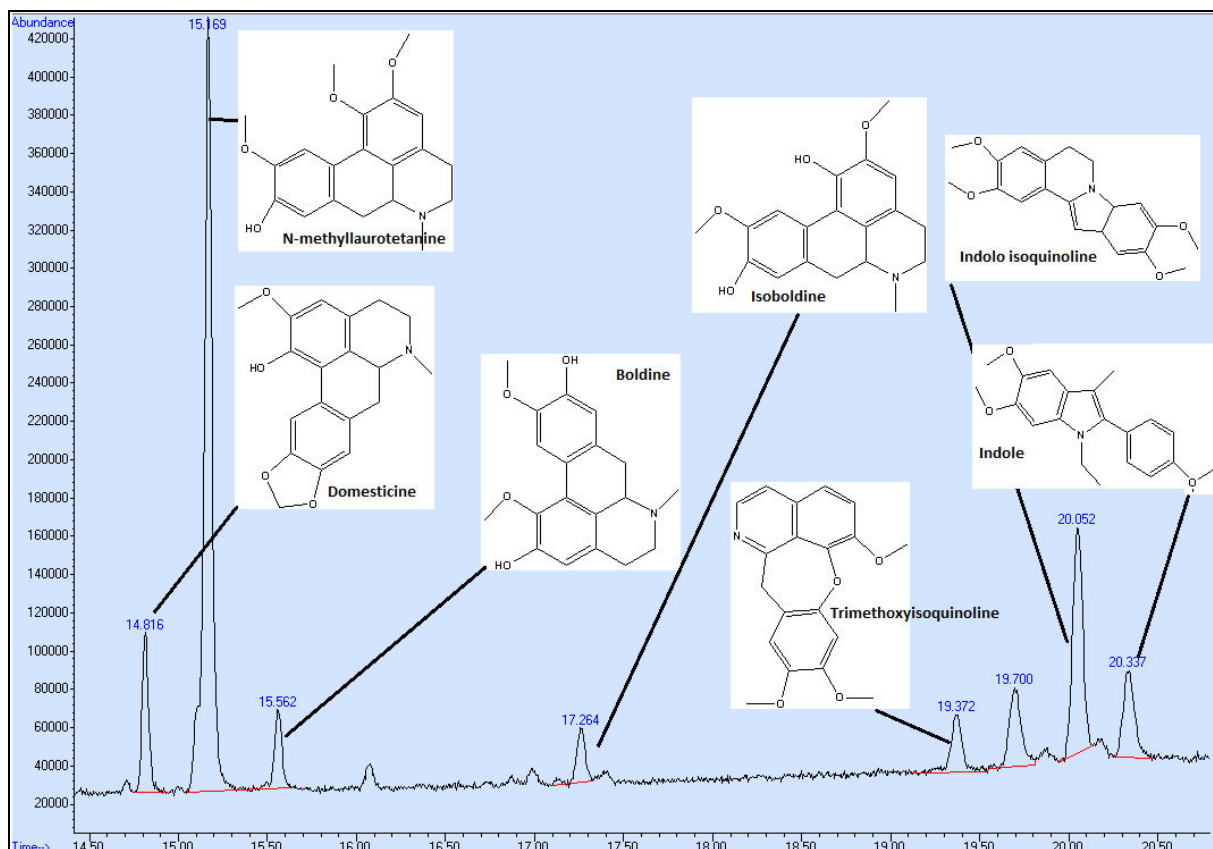


Figure 111: Chromatogramme Fraction G : zoom après soustraction du blanc méthanol

Les deux classes principales d'alcaloïdes précédemment identifiées sont retrouvées :

- Dérivés indoliques : N-éthyl, 5,6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4'-méthoxyphényl)-1H-indole et indolo-quinoléine avec le 11, 12-dihydro 2,3,8,9-tétraméthoxy-1H-indolo[2,1,α]isoquinoline.
- Dérivés isoquinoléines : 6,9,10-triméthoxy-12H[1]-benzoxeprino [2, 3,4] isoquinoline, nous retrouvons aussi les dérivés aporphines : domesticine, N-méthyllaurotétanine, boldine et isoboldine.

L'isoboldine est un composé très connu dans le genre *Nectandra*. Il est retrouvé dans les feuilles de *N. membranacea* de Costa Rica [Castro et al., 1989], dans les feuilles et les tiges chez *N. pichurim* [Ferrari et al., 1971], ainsi que dans les écorces du tronc de *N. salicifolia* [Böhlke et al., 1971] et de *N. grandiflora* [Moreno et al., 1993]. Les autres alcaloïdes aporphines sont également retrouvés dans le genre *Nectandra* (§.3.4.2).

Le tableau ci-dessous regroupe les alcaloïdes présents dans la fraction G, la proportion de chaque composé est donnée :

Tableau 44 : Alcaloïdes identifiés par GC-MS dans fraction G

RT (min)	Nom et Formule brute	% AT
14,816	Domesticine	8,48
15,169	N-méthyllaurotétanine	49,66
15,562	Boldine	4,86
17,264	Isoboldine	3,65
19,372	6,9,10-triméthoxy-12H[1]benzoxeprino[2,3,4]isoquinoline	4,70
20,050	11, 12-dihydro 2,3,8,9-tétraméthoxy -1H-indolo[2,1, α]isoquinoline	20,03
20,337	N-éthyl,5-6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4'méthoxyphenyl)-1H indole	8,60

Le composé majoritaire est la N-méthyllaurotétanine qui correspond à 31,208% de la fraction G, suivi du (1H) indolo-isoquinoléine avec 11,243 %. D'autres structures déjà identifiées précédemment sont rencontrés: une indolique (indolo-isoquinoline 4,95%), isoquinoline (triméthoxy isoquinoline 3,33 %) et des aporphines (domesticine 5,31%, boldine 3,11% et isoboldine 2,42%).

Toutes ces structures sont identifiées pour la première fois dans *Nectandra*.

13.2.3. Analyse des fractions E et F issus de l'extrait aqueux de feuilles stade B de la partie polaire

Les deux fractions E et F obtenues lors de la séparation sur colonne diaion de l'extrait aqueux de feuilles stade B, ont sensiblement la même composition (CCM 12.6. figure 57). Ces deux fractions sont combinées pour la suite de l'étude car elles ont de faibles masses. Ce nouvel extrait est nommé JA.

La CCM est réalisée après révélation au NP/PEG nous obtenons la plaque suivante :

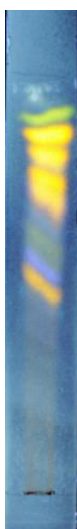


Figure 112: CCM JA (AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O: 100-11-11-20) révélé au NP/PEG

La fraction JA est analysée par HPLC/DAD puis séparée sur HPLC-prep (Matériel et Méthodes § 16.2.5.figures 178 et 179).

Sept fractions ont été récupérées.

Tableau 45 : Masses des fractions issues de JA par HPLC-préparative

Fractions	Masses (mg)
JAA	3,7
JAB	10,3
JAC	3,3
JAD	9,4
JAЕ	5,0
JAF	4,2
JAG	48,7
Bilan massique	84,6

Les CCM sont réalisées puis révélés au NP/PEG

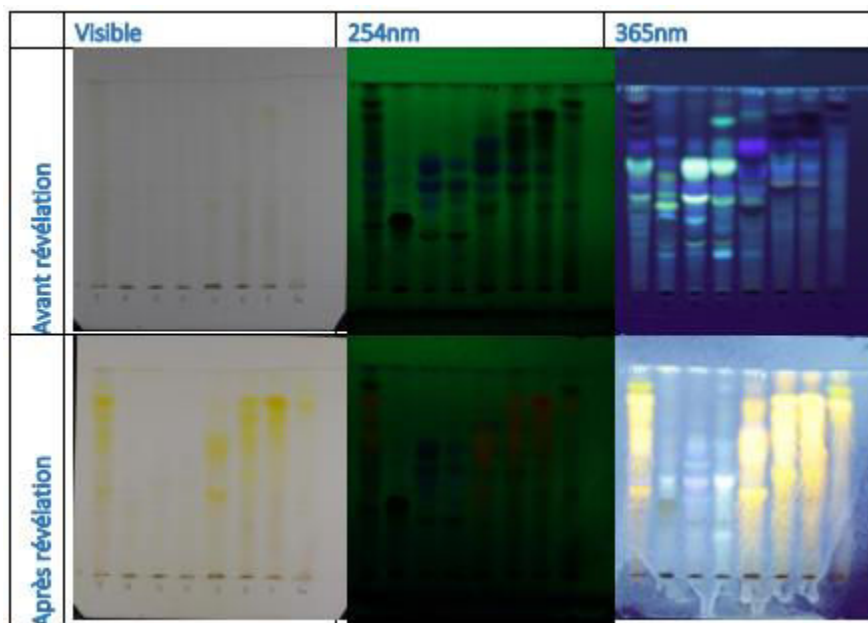


Figure 113 : CCM des fractions après HPLC-prep révélées au NP/PEG

L'analyse RMN ^1H et ^{13}C des fractions JAA et JAB a été réalisée.

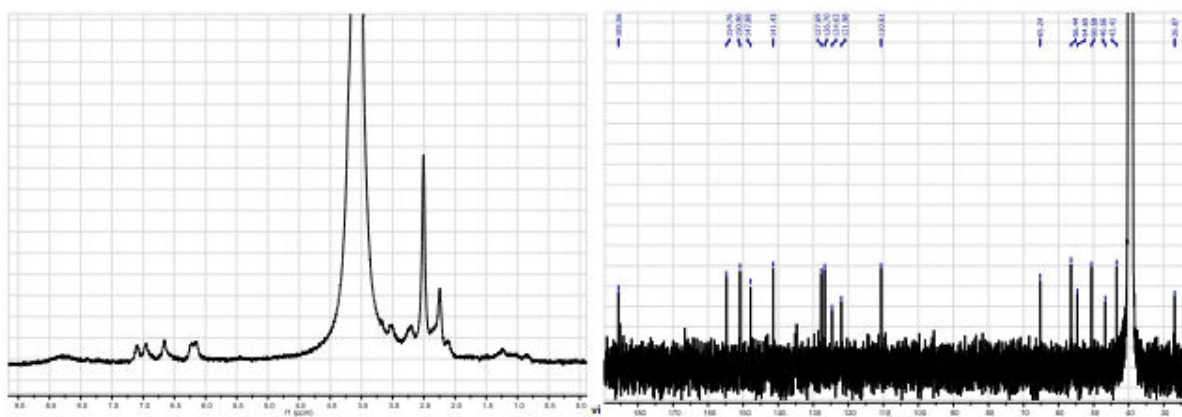


Figure 114 : Spectre RMN ^1H et ^{13}C de la fraction JAA

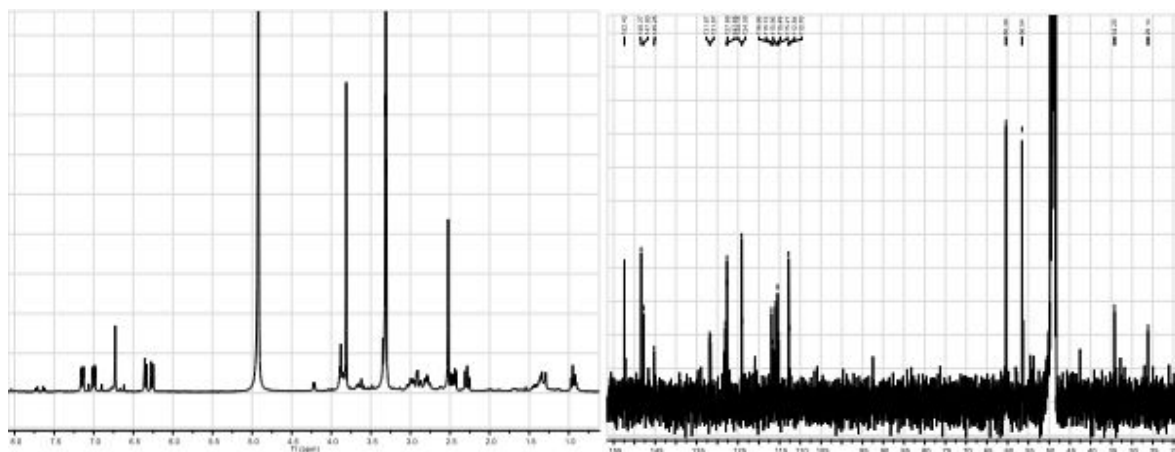


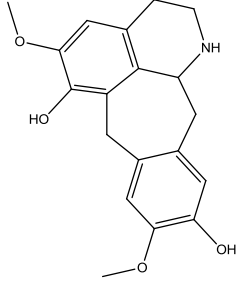
Figure 115 : Spectre RMN ^1H et ^{13}C de la fraction JAB

Les spectres RMN des fractions ci-dessous semblent montrer qu'il s'agirait d'alcaloïdes On retrouve des groupements azotés sur les RMN ^1H : $\sim 2,5$ ppm et ^{13}C : ~ 40 ppm.

Toutes les fractions sont donc analysées en GC-MS.

Tableau 46 : Analyse GC-MS des fractions JAA à G

Fractions	Composés identifiés par GC-MS
JAA	Méthylcrotonosine (144)
JAB	Boldine (98) Norboldine
JAC	Isoboldine (99)

JAD	<p>1-[(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthyl]-6-méthoxyisoquinolin-7-ol (142)</p> <p>N-méthyllaurotétanine (101)</p> <p>4,5,6,6a-tétrahydro-1,9-dihydroxy-2,10-diméthoxy- benzocycloheptano [2,3,4,i,j]isoquinoline</p>  <p>146</p>
JAE	<p>Isoboldine (99)</p> <p>N-méthyllaurotétanine (101)</p>
JAF	
JAG	

La fraction JA contient des alcaloïdes, comme le confirme les fractions étudiées, bien que cet extrait a été traité pour être enrichi en composés polyphénoliques.

Les types alcaloïdes retrouvés dans cet extrait sont conformes à ceux identifiés et isolés des extraits alcaloïdes de feuilles. *Nectandra membranacea* est donc une plante très riche en alcaloïdes. Les fractions JAF et JAG n'ont pas pu être analysées par cette technique. Il en est de même pour la fraction, issue de l'extrait aqueux, même méthylée.

13.3. Récapitulatif des alcaloïdes identifiés et isolés des feuilles de *Nectandra membranacea*

Les alcaloïdes présents dans les feuilles de *Nectandra membranacea* ont été soit identifiés par GC/MS soit isolés via un fractionnement sur colonne de silice. Le tableau ci-dessous est un récapitulatif des résultats obtenus ainsi que des activités biologiques connues de certains composés.

Tableau 47 : Tableau récapitulatif des alcaloïdes présents dans les feuilles de *N. membranacea*

Noms	GC-MS	Isolé	Propriétés biologiques connues	Réf.
N-méthyllaurotétanine	+	+		
Isodomesticine		+		
Domesticine	+		Antagoniste des récepteurs alpha-1D-adrénergiques (inhibe la phényléphrine contraction induite dans aorte thoracique des rats)	Indra, B. 2002
N-méthylcrotonosine	+	+	Aucune donnée	
Réticuline	+		Aucune donnée	
Nanténine	+		Aucune donnée	
Boldine	+		Cholérétique, hépatoprotecteur, anti-inflammatoire (contre action peroxydante radicaux libres), protège des dommages oxydatifs mitochondriaux dans le diabète, antiplasmodique, effet relaxant sur la musculature lisse par mécanisme anticholinergique, Antioxydant	Fernandez <i>et al.</i> 2009 Backhouse <i>et al.</i> 1994 Jang YY <i>et al.</i> 2000 O'Brien <i>et al.</i> 2006 Jiménez L. <i>et al.</i> 2000 Speisky H., <i>et al.</i> 1991
Bulbocapnine	+		Inhibiteur de l'acétylcholinestérase, inhibiteur de la biosynthèse de la dopamine par intermédiaire d'une enzyme, la tyrosine hydroxylase	Adsersen A. <i>et al.</i> 2007 Zhang, YH <i>et al.</i> 1997

Noms	GC-MS	Isolé	Propriétés biologiques connues	Réf.
			Utilisé dans le traitement des tremblements musculaires et vestibulaires du nystagmus	Shin JS et <i>al.</i> 1998 Dictionnaire Médical Dorlands à Merck
Actinodaphnine	+		Cytotoxicité dans certains cancers	Hsieh TJ et <i>al.</i> 2006
Salsoline	+		Active métabolite de la dopamine, Inhibiteur de la cholinestérase	Sällström Baum S. 1999
1-[(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthyl]-6-méthoxyisoquinolin-7-ol	+		Aucune donnée	
11,12dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-1H-indolo[2,1]isoquinoline	+		Aucune donnée	
6,9,10-triméthoxy-12H-benz [6,7]oxeprino(2,3,4) isoquinoline	+		Aucune donnée	
N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl-2,4'-méthoxyphényl-1H- indole	+		Aucune donnée	
1,2,3,4-tétrahydro-1,1-diméthyl-6,7-isoquinolinediol	+		Aucune donnée	

14. Activités biologiques de *N. membranacea* de Guadeloupe

14.1. Introduction

Afin d'envisager la valorisation de *Nectandra membranacea*, il était nécessaire de procéder à une évaluation précise des activités biologiques que laissait entrevoir la composition chimique des différents organes de la plante.

Un criblage biologique a été réalisé sur les extraits apolaires et polaires pour orienter les fractionnements prioritaires (bioguidage). Les activités biologiques de certaines fractions purifiées ont également été évaluées.

Dans le but de se placer dans l'axe de recherche du laboratoire, dans un premier temps, l'activité antioxydante a été testée autant du point de vue chimique (ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity et DPPH : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl) que biologique sur cellules saines. Puis, dans un deuxième temps, d'autres activités biologiques ont été évalués.

L'organisme produit naturellement des radicaux libres qui sont des substances oxydantes. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $\cdot OH$, permettent la production d'énergie. Ils sont donc indispensables au bon fonctionnement du corps humain. Leur production peut cependant être accrue par de nombreux facteurs présentés sur la figure 116.

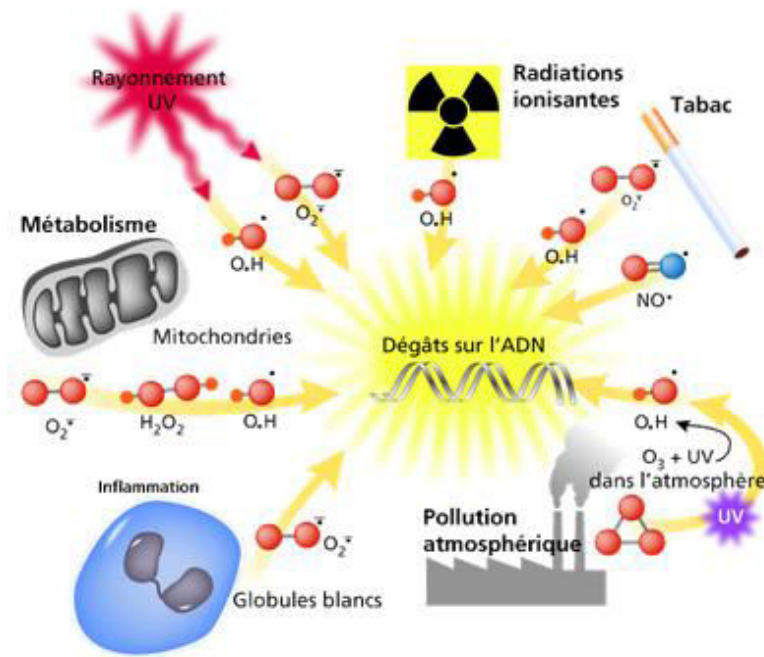


Figure 116 : Facteurs influençant la production de radicaux libres

Cet excès de production de radicaux libres se traduit dans les cas les plus bénins par un vieillissement de la peau, des tâches de vieillesse, rougeurs. Il peut provoquer à long terme une dégradation des cellules de l'organisme et des protéines, l'altération de l'ADN, le vieillissement cellulaire qui est à la base de certains cancers et de la maladie d'Alzheimer.

Les antioxydants, synthétisés par la peau et ceux qu'apporte l'alimentation (vitamine C, E, caroténoïdes...) permettent de lutter contre l'excès de ces radicaux libres. Le caractère antioxydant des aliments est généralement dû à leur forte teneur en composés phénoliques.

Il existe plusieurs méthodes pour estimer l'activité antioxydante. Afin d'évaluer celle des différentes parties de la plante étudiée, nous avons utilisé trois approches: deux méthodes chimiques et une méthode biologique.

- Méthodes chimiques :
- la méthode DPPH permet d'évaluer l'activité antioxydante d'un composé pur ou d'un extrait par la mesure de son pouvoir de piégeage du radical DPPH[•] (2,2-diphényl 1-1-1-1-tétrahydro-5,5-dihydro-2-pyridyl).

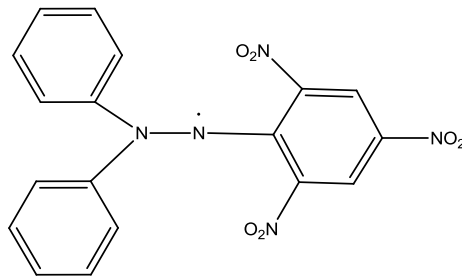


Figure 117 : Structure du radical DPPH'

Le pouvoir antioxydant des extraits étudiés est estimé par comparaison avec ceux du dihydrate de quercétine et du thé vert. Le DPPH' absorbe à 515 nm. Sous l'action d'un antioxydant AOH qui le réduit en DPPH, son absorbance diminue jusqu'à atteindre un plateau, la cinétique variant selon l'antioxydant utilisé :

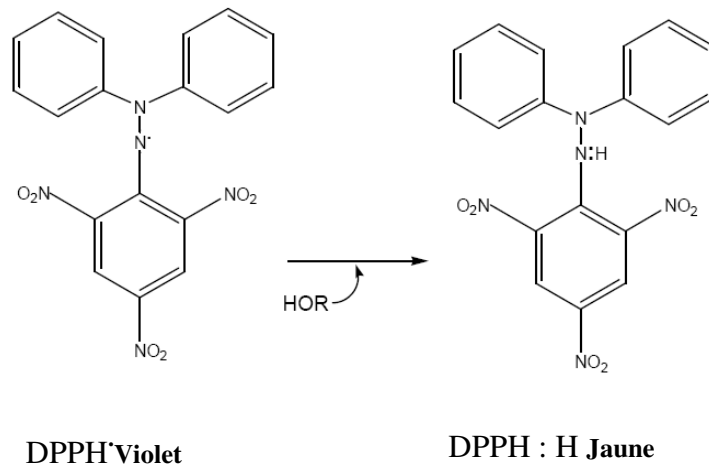
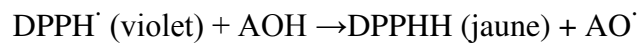


Figure 118 : Réduction du radical DPPH'

Par conséquent, la réduction de la vitesse d'une réaction chimique lors de l'addition du DPPH' est utilisée comme un indicateur de la nature radicalaire de cette réaction. Le suivi de l'absorbance du mélange en fonction du temps permet de déterminer le pourcentage de DPPH' résiduel à l'équilibre. Cette opération est répétée pour différentes concentrations d'antioxydant et les résultats obtenus sont reportés sur un graphique représentant le pourcentage de DPPH' restant à l'équilibre en fonction de la concentration en antioxydant [AOH].

L'équation de la courbe effet-dose ainsi obtenue permet de calculer l'IC₅₀, correspondant à la concentration en AOH nécessaire pour réduire de moitié la quantité de DPPH[•] initialement présente dans le milieu. L'inverse de l'IC₅₀ donne l'activité anti radicalaire (AA). Plus la valeur de l'AA est élevée, plus l'antioxydant est efficace.

- la méthode d'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mesure la capacité d'absorbance du radical de l'oxygène.

Le test ORAC est simple et largement utilisé pour évaluer le potentiel antioxydant. Comme le test DPPH, c'est un test chimique. Il est spécifique pour détecter les antioxydants capables d'éliminer les radicaux peroxydes.

Il a été réalisé selon la procédure de Ou et *al.* (2001) en appliquant quelques modifications. Les produits à tester sont préparés selon un gradient de 16 concentrations et ajoutés dans des microplaques noires à 384 puits. Parallèlement, un gradient de concentrations de Trolox est ajouté comme contrôle. Chaque puit reçoit une concentration fixe de fluoresceine ainsi qu'une dose fixe de AAPH [2,2'-Azobis (2-méthylpropionamidine) dihydrochloride].

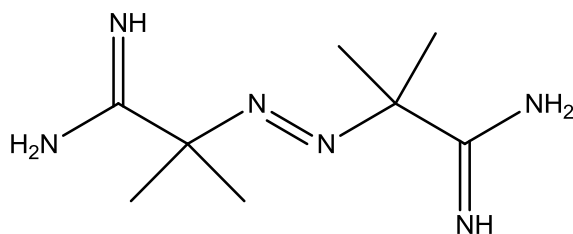


Figure 119 : Structure de l'AAPH

- Méthode sur cellule saine

Le test antioxydant sur cellules ne permet pas de discriminer les différents modes d'action des composés testés, mais il est sensible à une plus large gamme d'antioxydant comme les chélateurs de fer, indétectables par le test ORAC.

Ce test permet la détection de potentiel pro-oxydant qui n'est pas non plus détectable par les tests chimiques. Des fibroblastes cutanés sains WS-1 sont utilisés par défaut pour le test de potentiel antioxydant cellulaire.

D'autres activités permettant une valorisation directe ont également été évaluées :

- l'activité anticancéreuse par les tests Resazurine et Hoechst

Le test anticancéreux mesure la cytotoxicité des échantillons testés sur une variété de lignées cellulaires cancéreuses. L'expérimentation se déroule en deux étapes. D'abord, les cellules sont exposées aux échantillons puis leur activité métabolique est mesurée par le test de la réduction de la résazurine. La résazurine (7-hydroxy-3H-phenaxarin-3-one 10-oxide) est une molécule bleue non fluorescente qui peut être réduite par l'activité métabolique (mitochondriale ou bactérienne) pour être transformée en résorufine rose fluorescente.

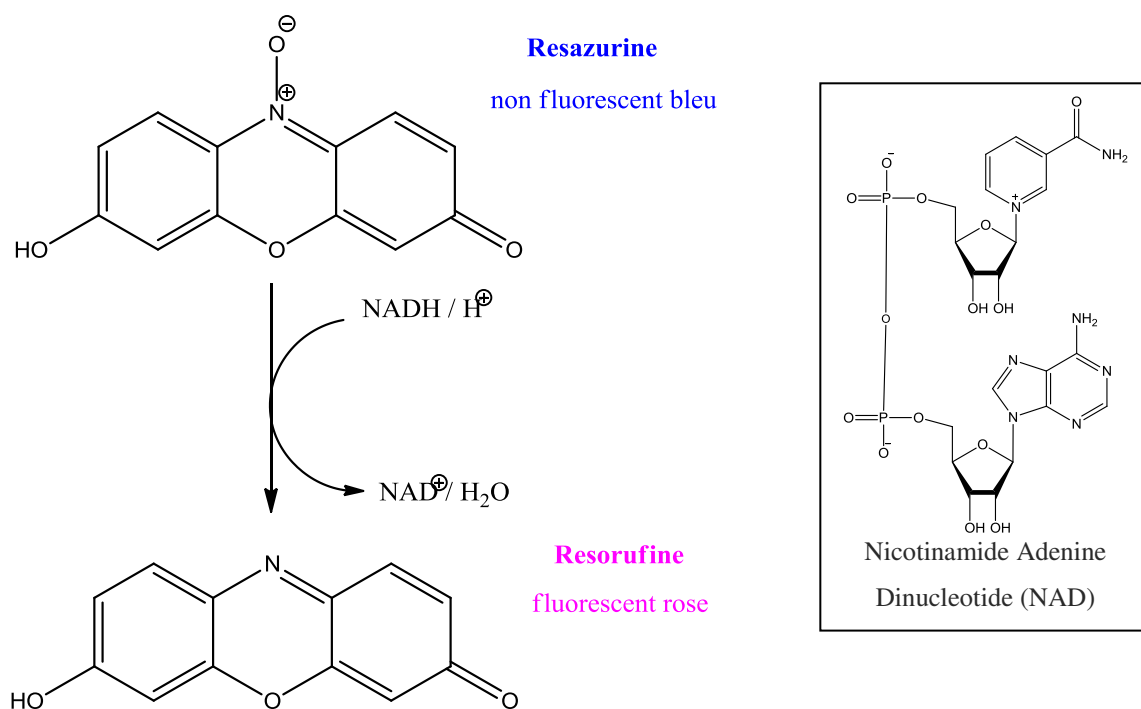


Figure 120: Réduction de la Résazurine en Résorufine

Une mesure de l'activité métabolite à la résazurine est effectuée lors de chaque test de potentiel anticancéreux (cytotoxicité) ainsi que lors des tests de potentiel anti-inflammatoire sur les macrophages de souris. La camptothécine, molécule anticancéreuse est utilisée comme référence.

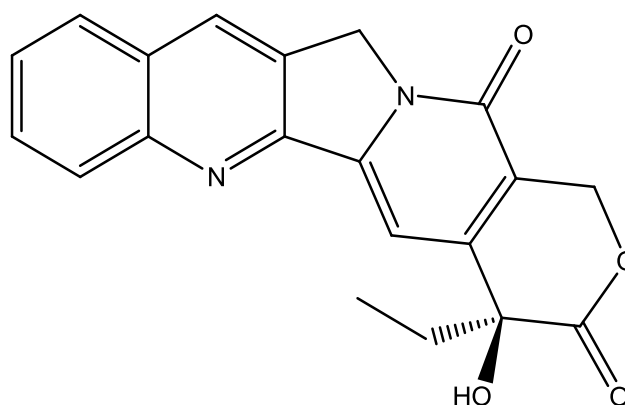


Figure 121: Structure de la camptothécine

Ensuite, les surnageants sont retirés des plaques pour réaliser un dosage d'ADN par le Hoechst (2'-(4-hydroxyphényl)-5-(4-méthyl-1-pipérazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate bisbenzimidide)) sur les tapis cellulaires toujours présents au fond des puits et préalablement lysés. Hoechst est une molécule qui devient fluorescente lorsqu'elle se lie à l'ADN. Une quantification d'ADN est effectuée systématiquement après le test d'activité métabolique à la résazurine lors des tests de potentiel anticancéreux (cytotoxique). Il est possible d'effectuer un dosage d'ADN à la fin d'autres tests, comme le test de potentiel antioxydant cellulaire.

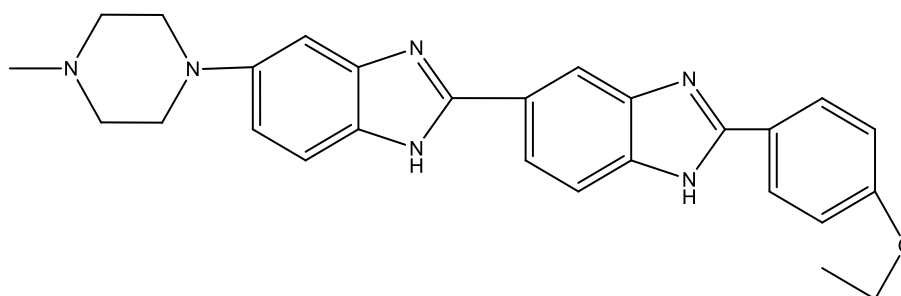


Figure 122 : Structure de l'Hoechst

Ces deux étapes, fondées sur deux méthodes différentes, réduisent ensemble les possibilités de faux positifs et de faux négatifs renseignant ainsi sur deux aspects attendus d'un anticancéreux.

Les cellules cibles sont les cellules anticancéreuses. Les extraits testés doivent avoir une toxicité minimale sur les cellules saines.

Leur sélectivité est donc évaluée en mesurant parallèlement la toxicité des échantillons sur une ou plusieurs lignées cellulaires non cancéreuses. De plus, chaque test est contrôlé en comparant l'activité de l'échantillon à des anticancéreux connus, comme le fluorouracile et l'étoposide.

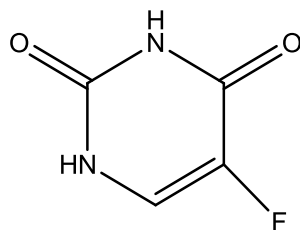


Figure 123 : Structure de la fluorouracile

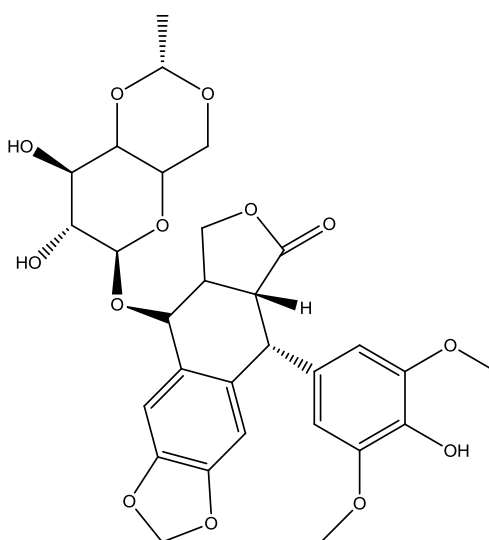


Figure 124 : Structure de l'étoposide

Les cellules testés sont:

- A-549 (CRL-185) : carcinome pulmonaire humain
- DLD-1 (CCL-221) : adénocarcinome colorectal humain
- WS-1 (CRL-1502) : fibroblaste cutanée humain

- **Activité antibactérienne**

Le test antibactérien consiste à cultiver deux bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) avec les échantillons et de la résazurine, puis à mesurer la fluorescence développée dans le temps. Ainsi, on quantifie leur croissance et détermine une concentration minimale inhibitrice

- Activité antivirale

Ce test sert à incuber les virus dans différentes conditions avec les échantillons à tester. Après 72 heures d'incubation, l'activité antivirale est évaluée par comptage des plages de lyse après coloration au cristal violet. Chaque activité antivirale est comparée à un antiviral connu et utilisée en clinique, l'acyclovir, (2-amino-9-(2hydroxyéthoxy) méthyl-1H-purin-6(9H)one) de la famille des purines et analogue de la guanine (2-amino-1H-purin-6(9H)one).

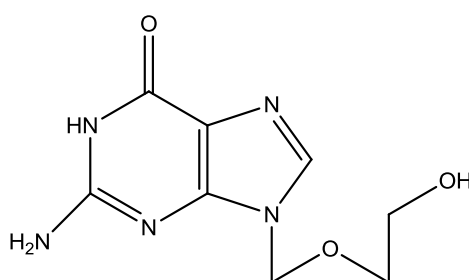


Figure 127 : Structure de l'acyclovir

Les alcaloïdes sont réputés pour leur activité au niveau du système nerveux. Les cinq extraits d'alcaloïdes sont ainsi soumis à un test d'activité neuroprotectrice relatif à la maladie d'Alzheimer.

14.2. Parties apolaires

14.2.1. Activité biologique des Huiles Essentielles

14.2.1.1. Activité antioxydante ORAC et cellulaire

a. Activité antioxydante ORAC

Le test ORAC permet d'évaluer la capacité antioxydante des différents extraits. Afin de mieux comprendre les résultats, une valeur de 1 μ M trolox/mg signifie que 1 μ M de trolox est nécessaire pour produire la même activité antioxydante que 1mg d'extrait. Les résultats obtenus sont présentés, en abscisse, en μ mol Trolox/mg et en ordonnée, les différents échantillons testés. La figure 128 présente les données pour le stade A.

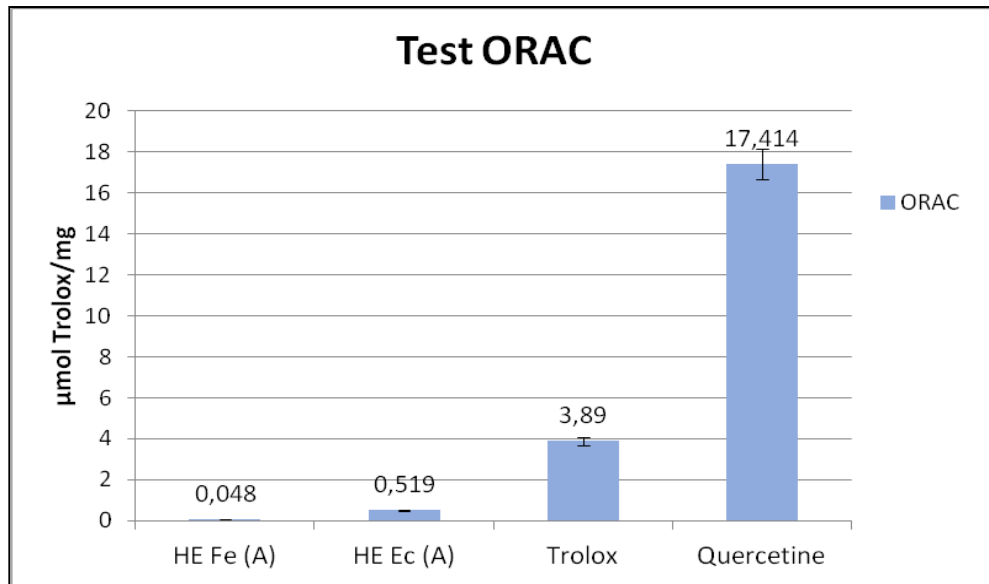


Figure 128 : Résultats des indices ORAC sur les huiles essentielles récoltées au stade A

Les huiles essentielles testées, (feuilles et écorces stade A) montrent une activité antioxydante très faible, les valeurs obtenues sont inférieures à 0,519 µmol Trolox/mg.

b. Activité antioxydante cellulaire

Le graphe ci-dessous présente l'activité antioxydante des extraits testée sur cellules saines humaines.

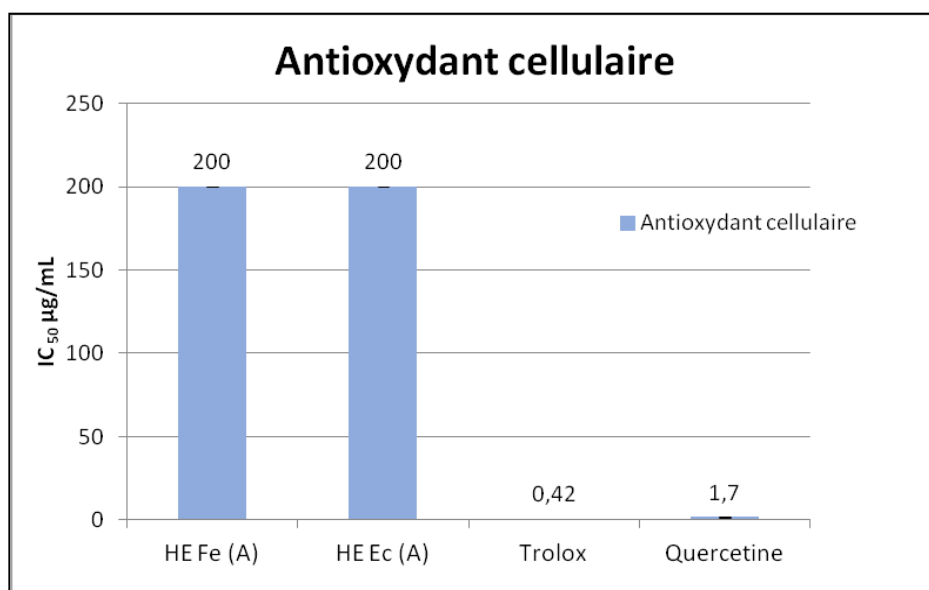


Figure 129 : Résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles récoltées au stade A

Les tests sur cellules ont été réalisés avec ces mêmes huiles essentielles afin d'évaluer l'activité antioxydante dans le contexte cellulaire. Les résultats regroupés dans la figure ci-dessus indiquent qu'aucune des huiles essentielles ne présentent pas d'activité antioxydante au niveau cellulaire.

14.2.1.2. Activité anticancéreuse

a. Test de la Resazurine

L'activité anticancéreuse des huiles essentielles des différents organes de *N. membranacea* aux deux stades a été évaluée, grâce au test de la Résazurine, sur les cellules cancéreuses du poumon A-549, du colon DLD-1 et sur les cellules saines WS-1. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-après, en abscisse l'IC₅₀ (concentration nécessaire pour inhiber 50% d'une fonction biologique ou biochimique) et en ordonnée, les échantillons testés.

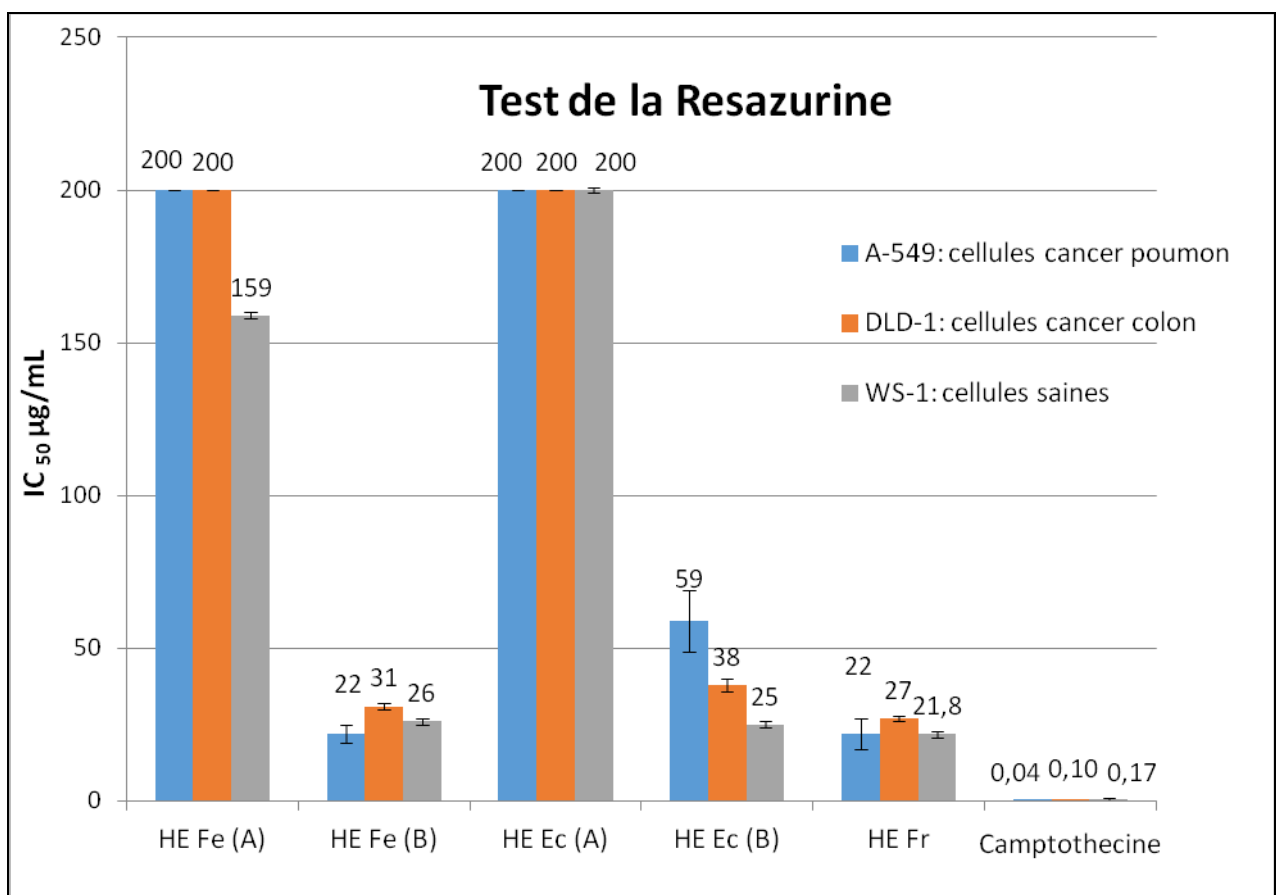


Figure 130 : Evaluation de l'activité anticancéreuse des H.E par le test de la Résazurine

Plus l'IC₅₀ est élevée moins l'activité anticancéreuse est importante. Nous constatons d'emblée une grande différence entre les deux stades de récoltes. En effet, aucune des huiles essentielles correspondant au stade de germination (stade A) ne présente d'activité cytotoxique. En revanche, les huiles essentielles récoltées lors de la fructification (feuilles, écorces et fruits au stade B) montrent une activité cytotoxique avec des IC₅₀ souvent inférieures à 31µg/ml. Ces valeurs restent tout de même supérieures à celles de la référence.

Cependant, les huiles essentielles des feuillesa stade B et des fruits sont aussi nuisibles sur les cellules saines que sur les cellules cancéreuses. Les huiles essentielles des écorces (stade B) montrent quant à elles, une activité cytotoxique supérieure sur cellules saines.

b. Test Hoechst

L'activité anticancéreuse sur les mêmes cellules souches a également été déterminée par le test de Hoechst. Les résultats sont rassemblés dans le graphique de la figure 129 ci-dessous. en abscisse l' IC₅₀ (concentration nécessaire pour inhiber 50% d' une fonction biologique ou biochimique) et en ordonnée les échantillons testés.

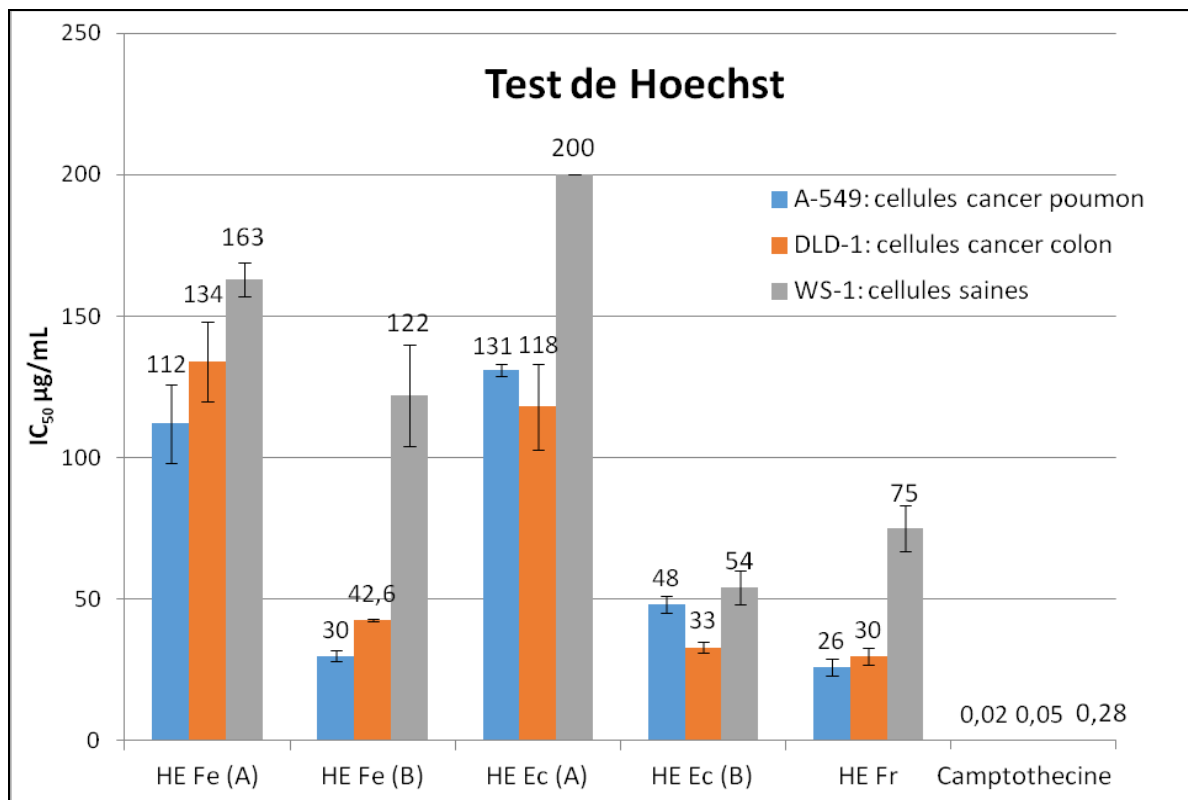


Figure 131: Evaluation de l'activité anticancéreuse des HE par le test de Hoechst

Comme précédemment, les huiles essentielles récoltées lors de la germination ne présentent pas d'activité cytotoxique sur les cellules testées. Les huiles essentielles obtenues lors de la fructification montrent une activité cytotoxique plus importante avec des IC_{50} inférieures à 50 $\mu\text{g/mL}$. Ces valeurs semblent moins intéressantes que celles obtenues pas le test de la résazurine. Cependant, on observe avec le test de Hoechst une toxicité moindre sur les cellules saines. Par exemple, les huiles essentielles des feuilles au stade B sont très cytotoxiques sur le carcinome du poumon $IC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$ alors qu'elles restent plus sélectives vis-à-vis des cellules saines $IC_{50} = 122 \mu\text{g/mL}$.

La comparaison des compositions chimiques des H.E aux deux stades ne permet pas à priori de justifier des différences d'activités. Les composés majoritaires sont présents dans les 2 stades à des pourcentages similaires. Si certains minoritaires sont plus présents à un stade qu'à un autre (β -élémane: HE Ec stade A 2,38 %; HE Ec 4,43 %). Cette observation ne s'étend pas à tous les organes. Ces différences pourraient s'interpréter par des effets de synergie complexes ou encore par la matrice hydrophobe.

14.2.1.3. Activité antibactérienne sur *S.aureus* et *E.coli*

La figure ci-dessous présente les résultats du test antibactérien des huiles essentielles de feuilles et des écorces lors de la germination.

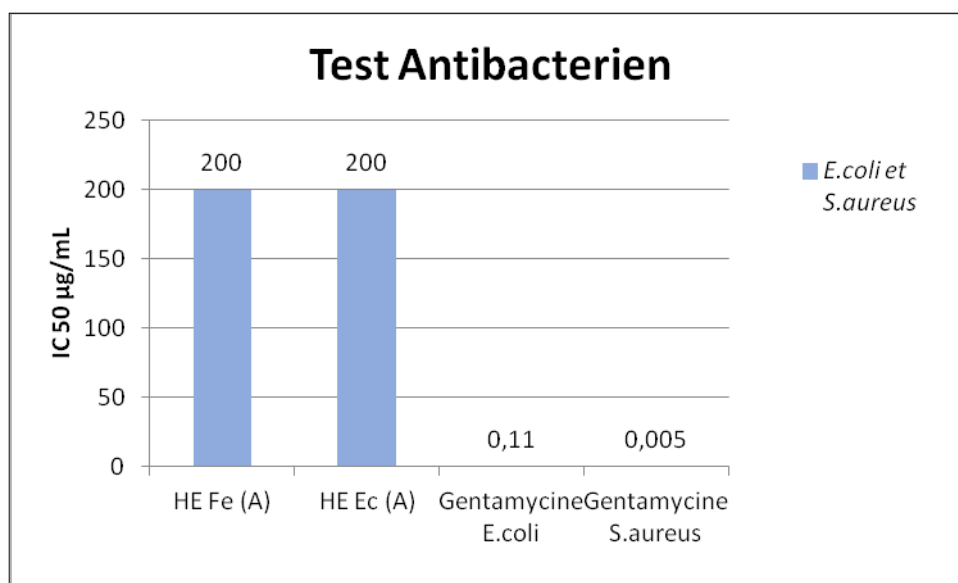


Figure 132 : Evaluation de l'activité antibiotique des huiles essentielles récoltées lors du stade B, sur les cellules bactériennes *E.coli* (gram négatif) et *S.aureus* (gram positif)

Les huiles essentielles n'ont montré aucune activité antibactérienne contre les deux types de bactéries *S. aureus* et *E. coli*. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont toutes supérieures à 200 µg/mL.

14.2.1.4. Activité antifongique sur *Candida albicans*

Le graphique ci-dessous montre les résultats de l'activité antifongique sur l'huile essentielle des feuilles et des écorces lors de la germination.

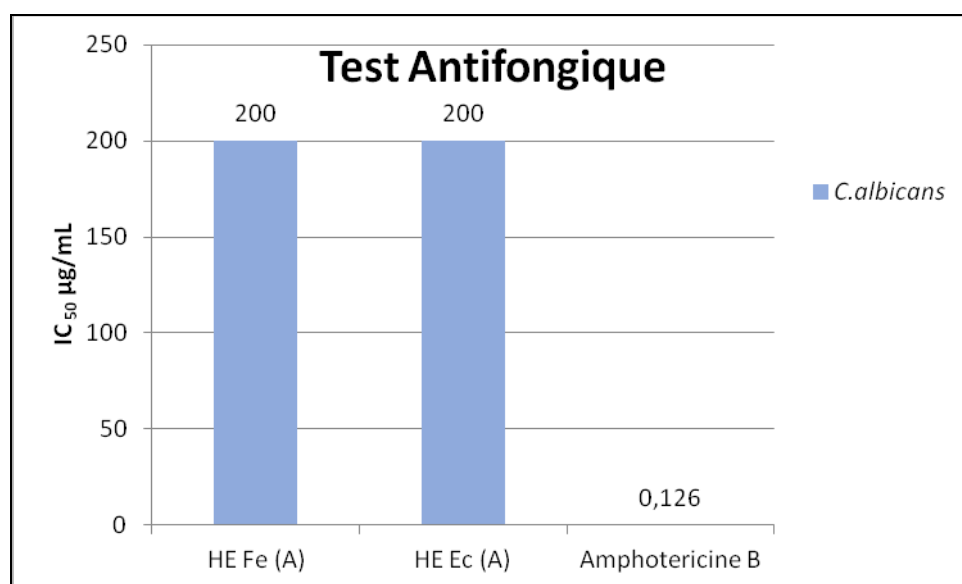


Figure 133 : Evaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles (stade A) sur les cellules bactériennes de *Candida albicans*

Les huiles essentielles testées, feuilles et écorces récoltés lors de la germination de *N. membranacea* ne sont pas actives contre la prolifération de *Candida albicans*. En effet, la valeur d'IC₅₀ est supérieure à 200µg/mL.

14.2.1.5. Activité anti-inflammatoire

Les espèces du genre *Nectandra* sont généralement connues pour contenir des composés actifs contre l'inflammation [Lopez, et al. 1995]. Le potentiel anti-inflammatoire des huiles essentielles de *N. membranacea* a donc également été évalué. Les données obtenues pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire sont présentées sous forme de diagramme dont l'abscisse est en pourcentage d'inhibition de monoxyde de carbone et en ordonnée la concentration des échantillons en $\mu\text{g/mL}$. Un deuxième diagramme montre la toxicité des échantillons sur des cellules saines. En abscisse, le pourcentage de survie cellulaire et en ordonnée le logarithme (\log) de la concentration.

Les résultats des huiles essentielles des feuilles (stade A) sont les suivants :

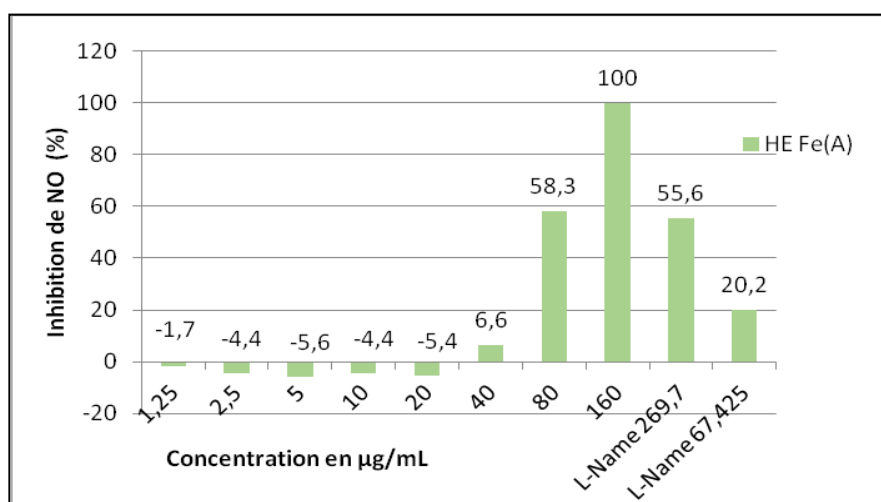


Figure 134: Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle des feuilles (stade A)

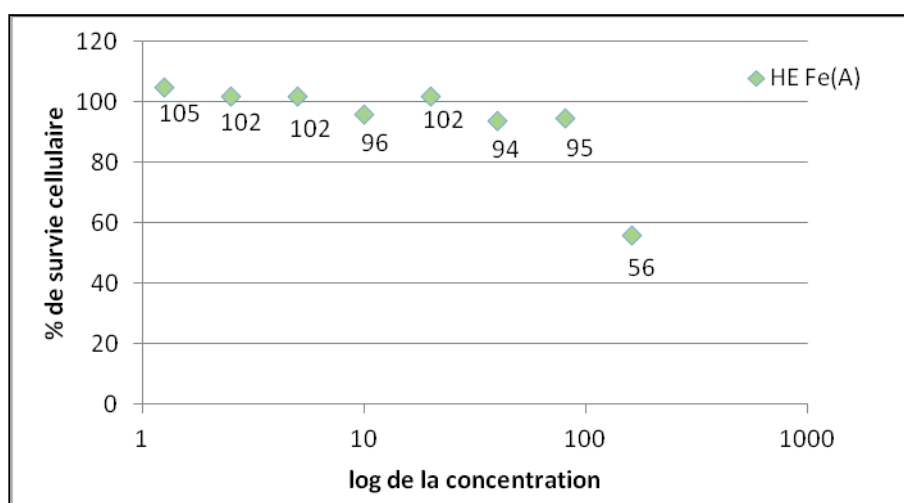


Figure 135 : Toxicité de l'huile essentielle des feuilles (stade A)

La figure 134, montre que l'huile essentielle des feuilles (stade A), a une activité anti-inflammatoire marquée à partir de 80 $\mu\text{g/mL}$ (58,3% inhibition de NO). Cette activité est comparable à celle du standard L-Name à la concentration de 269,7 $\mu\text{g/mL}$ (55,6% inhibition de NO). Notre extrait se montre plus actif que le standard. La plus forte activité est observée à 160 $\mu\text{g/mL}$, concentration à laquelle l'inhibition est de 100% de la production de NO. Cependant, cette valeur est à corrélérer à la toxicité observée avec le test de la résazurine (figure 130). En effet, le taux de survie mesuré à cette concentration n'est que de 56%.

Les figures 136 et 137 présentent les résultats concernant les huiles essentielles des feuilles (stade B).

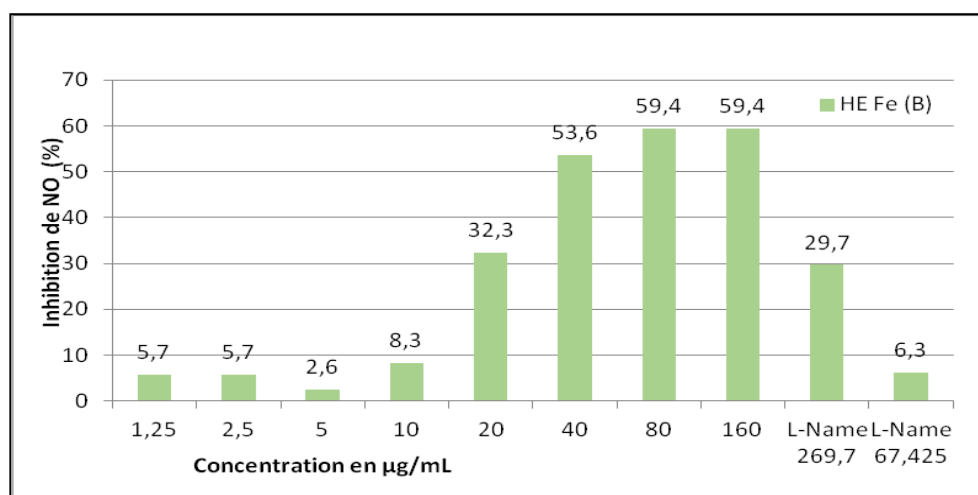


Figure 136: Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle des feuilles (stade B)

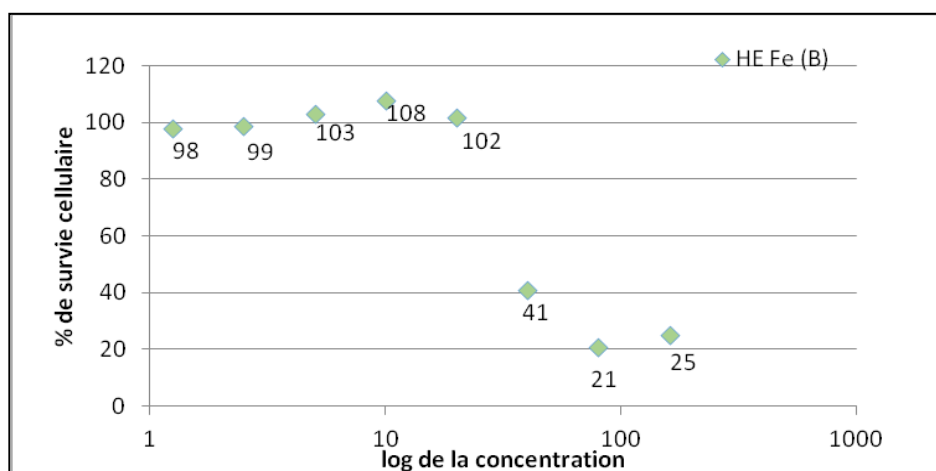


Figure 137 : Toxicité de l'HE des feuilles stade B

Les huiles essentielles des feuilles (stade B) montre de fortes activités anti-inflammatoires moyennes pour les concentrations allant de 40 à 160 µg/ mL. Cependant ces concentrations présentent une toxicité sur les cellules. Le résultat le plus intéressant correspond donc à la concentration de 20 µg/mL avec une activité de 32% comparable à celle du L-name (29%) et une absence de toxicité.

Ci-après sont présentés les résultats relatifs aux huiles essentielles des écorces (stade A).

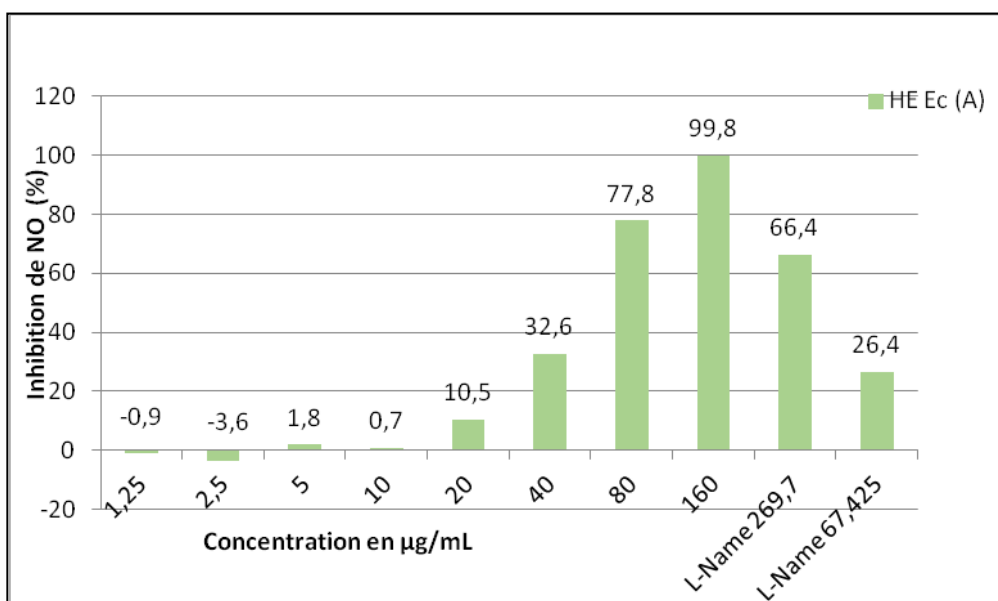


Figure 136: Activité anti inflammatoire de l'HE des écorces A

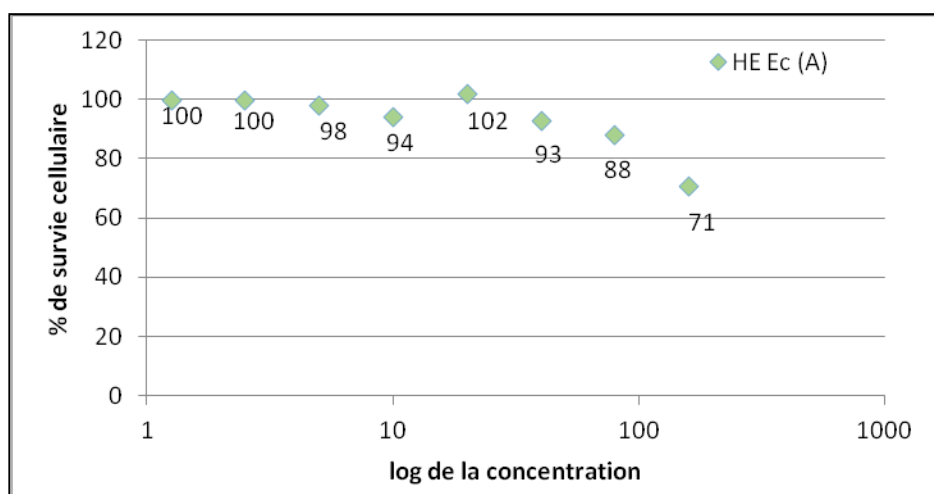


Figure 137 : Toxicité de l'HE des écorces A

Selon la figure 138, l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles des écorces est modérée à partir de la concentration de 40 µg/mL avec un taux d'inhibition de 32,6%. A la concentration de 80 µg/mL, l'activité est plus que doublée (77,8%). Ce résultat est associé à une toxicité relativement faible pour cette concentration, avec un pourcentage de survie cellulaire de 88%.

A 160 µg/mL, la production de NO est pratiquement inhibée (99,8%), cependant la toxicité associée à cette concentration est légèrement plus importante (71%).

La figure 140 présente les résultats obtenus pour les huiles essentielles des fruits.

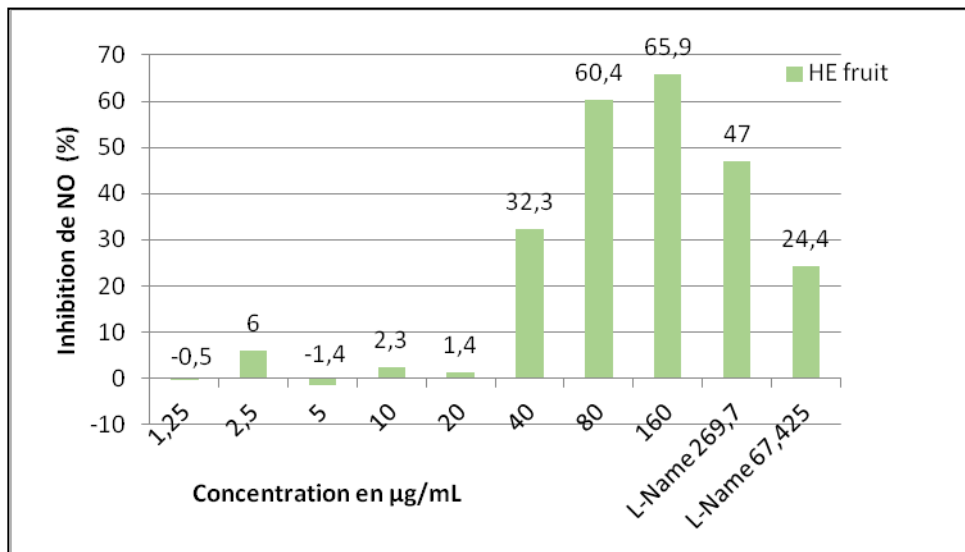


Figure 138: Activité anti-inflammatoire de l'HE des fruits

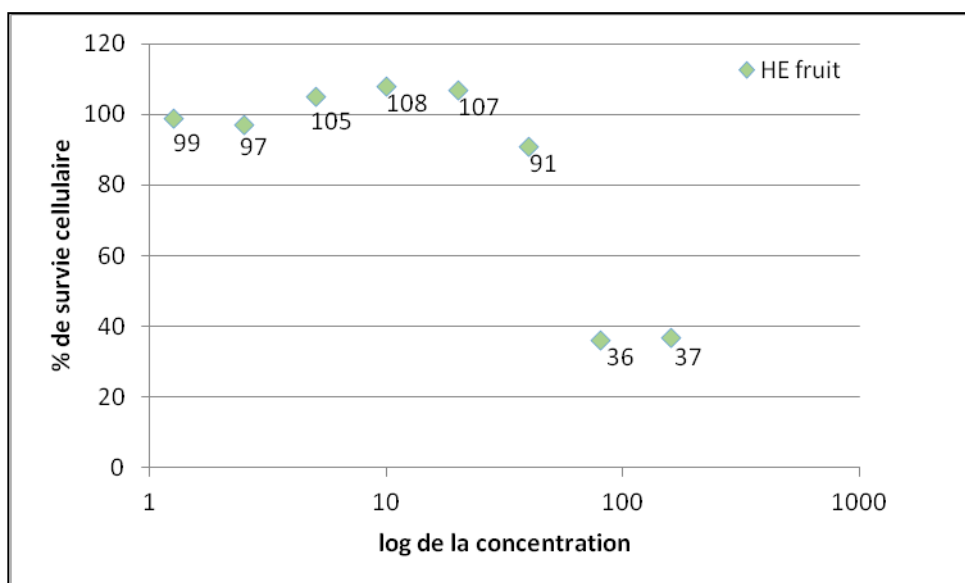


Figure 139 : Toxicité de l'HE des fruits

L'huile essentielle des fruits montre une activité anti-inflammatoire intéressante (32%) pour une concentration de 40 µg/mL. Ce résultat est légèrement inférieur à celui L-name (47%). Aux concentrations plus élevées de 80 et 160 µg/mL, on observe un pourcentage d'inhibition de 60 et 65% tempéré par une toxicité marquée (36 % de survie cellulaire).

14.2.1.6. Activité Antivirale contre l'Herpès HSV-1

HSV-1 est responsable de 95 % des herpès oro-faciaux, ainsi que bon nombre d'herpès neuro-méningés et ophtalmiques. Selon les études, il est aussi responsable de 20 à 40 % des herpès génitaux par contamination oro-génitale. La figure présente les résultats du test antiviral de l'herpès sur les huiles essentielles des feuilles et des écorces lors de la germination. En abscisse le pourcentage de protection contre les plage de lyse.

Les valeurs négatives signifient qu'il n'y a plus de virus dans ces conditions que le contrôle virus lui-même.

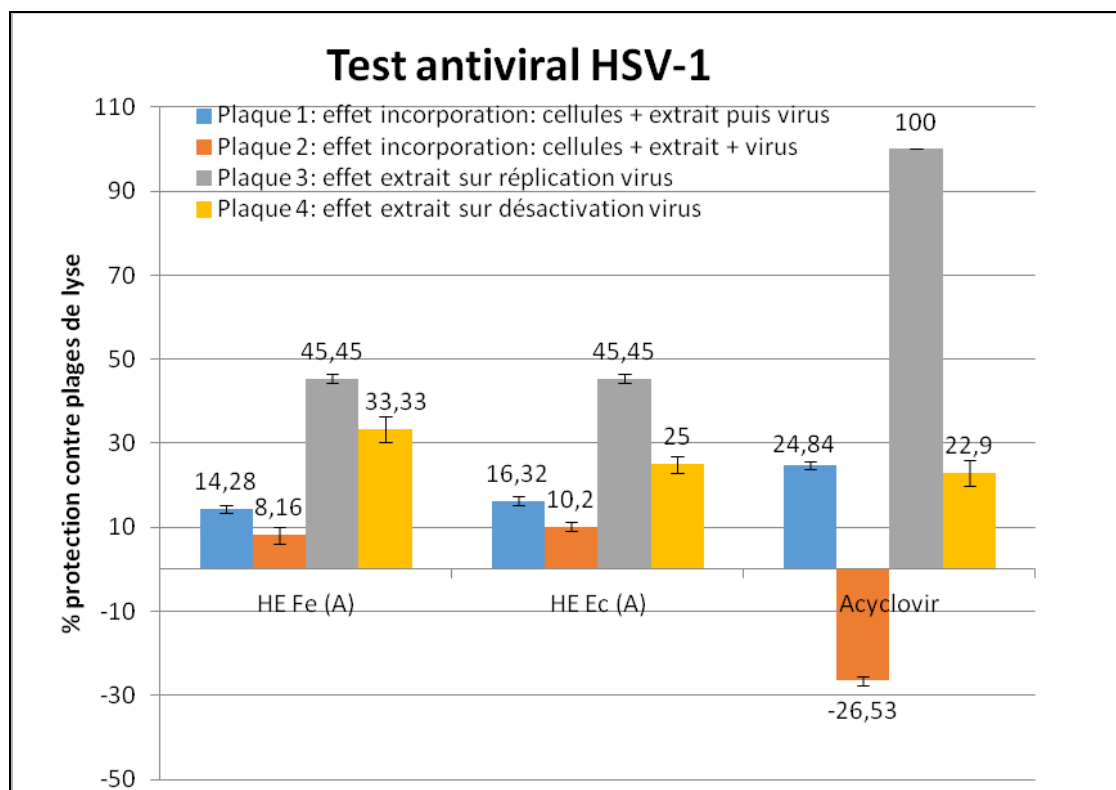


Figure 140: Evaluation de l'activité antivirale sur le virus de l'Herpes, Herpes Simplex Virus (HSV-1) des huiles essentielles (stade A)

Le pourcentage de protection des cellules contre la prolifération du virus de l'herpès de l'huile essentielle des feuilles est très moyen (14,28% plaque 1 et 8,16% plaque 2) ainsi que pour l'huile essentielle des écorces (16,32 % plaque 1 et 10,20% plaque 2).

L'effet des huiles essentielles sur la réplication du virus est plus marqué avec 45,45% (plaque 3) de protection sur les cellules pour les deux huiles essentielles.

L'huile essentielle des feuilles (stade A) montre une activité antivirale directe sur le virus de l'herpès (33,3%), cette activité est plus importante que celle de l'acyclovir (22,9 %). L'huile essentielle des écorces révèle également une activité intéressante (25%).

Nous pouvons utiliser le résultat du test acyclovir puisqu'il a bien fonctionné en plaque 3.

Les huiles essentielles de *N. membranacea* se présentent donc comme une alternative possible aux traitements chimiques contre le virus de l'herpès.

14.2.2. Activité biologique des extraits cyclohexane

Les activités biologiques des extraits cyclohexane ont été évaluées et sont présentées ci-dessous.

14.2.2.1. Activités antioxydantes chimique ORAC et sur cellules saines

Les figures ci-dessous présentent les résultats aux tests antioxydant ORAC et sur cellules :

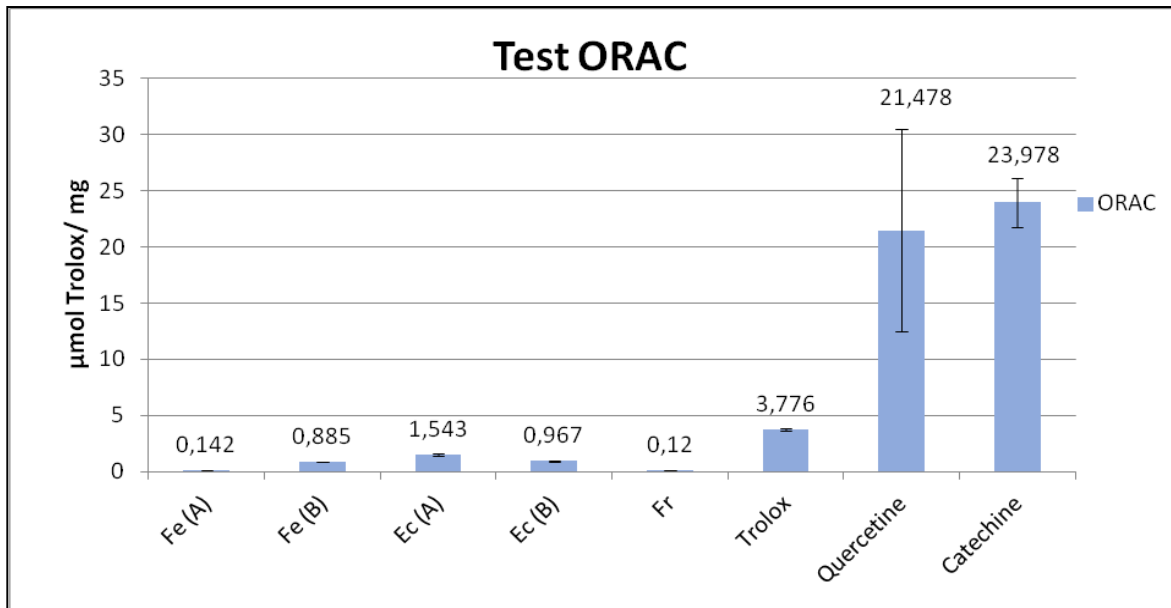


Figure 141 : Indices ORAC des extraits cyclohexane

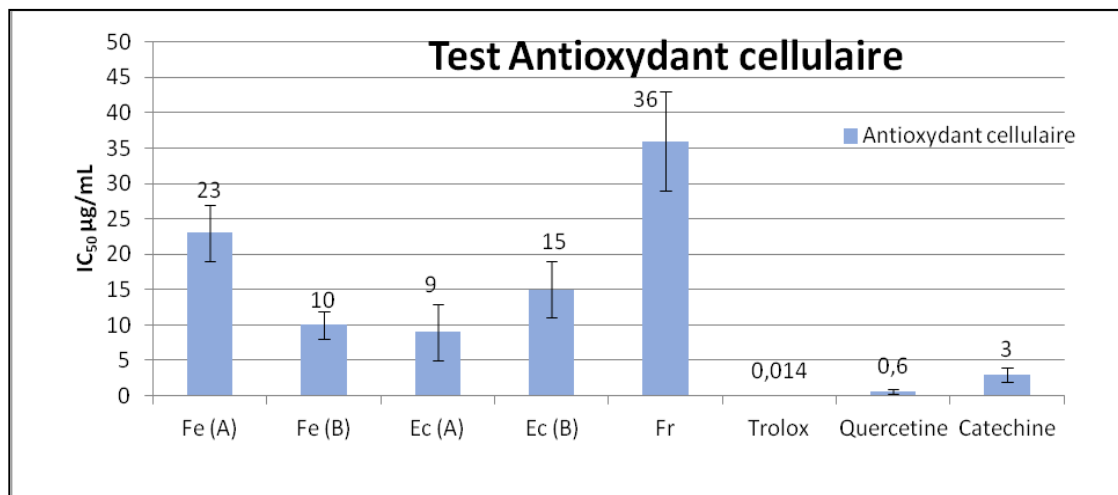


Figure 142 : Evaluation de l'activité antioxydante sur cellule des extraits cyclohexane

Les extraits au cyclohexane s'avèrent très inactifs au test ORAC, avec des valeurs inférieures à 1,6 µmol Trolox/mg. Les résultats sur cellules indiquent une activité faible avec des IC₅₀ supérieures à 9 µg/mL.

14.2.2.2. Activité anticancéreuse

a. Test de la Resazurine

Le graphe ci-dessous présente les résultats des extraits apolaires au test de la résazurine :

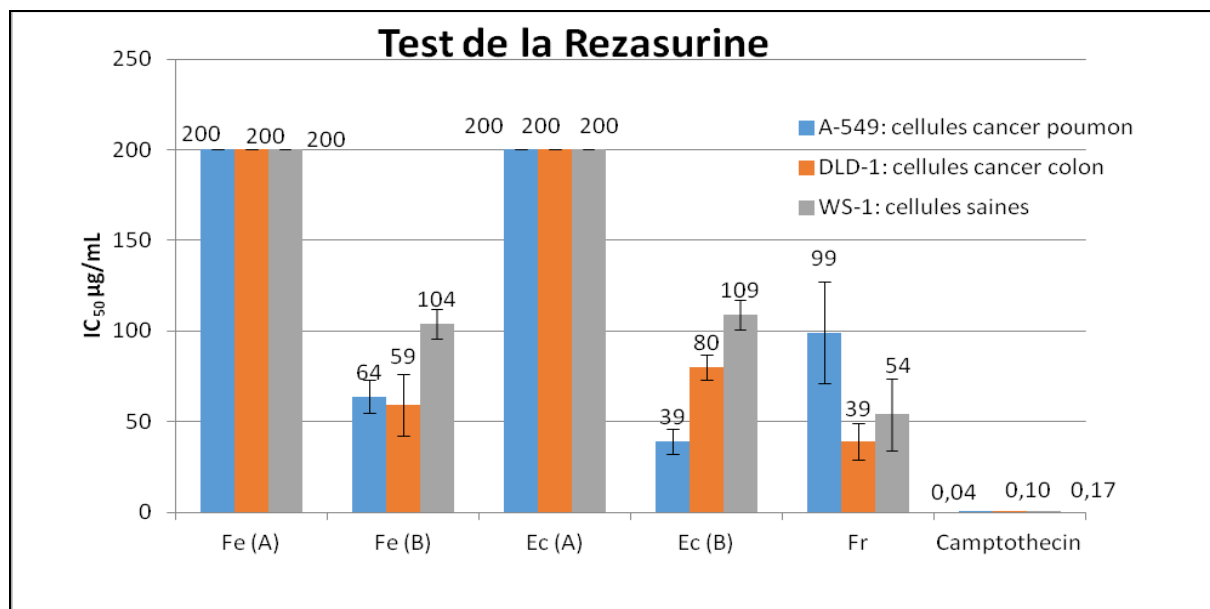


Figure 143 : Evaluation de l'activité anticancéreuse par le test de la Resazurine sur les extraits apolaires (cyclohexane)

Comme pour les huiles essentielles les extraits apolaires au stade A ne présentent pas d'activité cytotoxique. L'extrait de fruit montre lui, une activité cytotoxique plus importante sur les cellules saines que sur les cellules cancéreuses du poumon. Son activité sur les cellules cancéreuses du colon reste tout de même intéressante. Les extraits de feuilles et d'écorces récoltés lors de la fructification montrent une toxicité sélective sur les cellules cancéreuses. L'extrait d'écorces se montre quant à lui beaucoup plus actif sur les cellules cancéreuses du poumon.

b. Test de Hoechst

Les résultats au test de Hoechst des extraits apolaires sont présentés sur la figure 146.

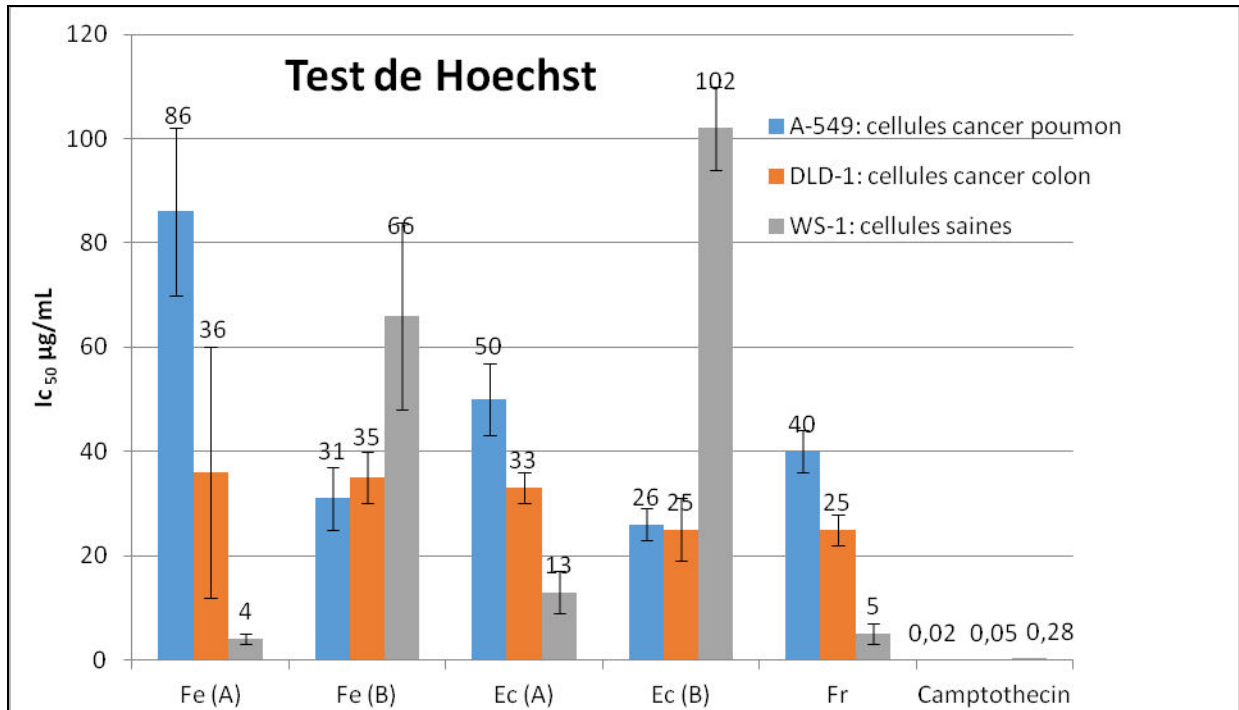


Figure 144 : Evaluation de l'activité anticancéreuse des extraits cyclohexane par le test Hoechst

Selon le test de Hoechst, tous les extraits cyclohexane présentent une cytotoxicité. Contrairement au test de la rézasurine, les extraits correspondant au stade A sont cytotoxiques notamment sur cellules saines. C'est également le cas des extraits de fruits. Les extraits récoltés au stade B sont plus sélectifs sur les cellules cancéreuses que sur les cellules saines. Ceux des écorces se montrent les plus intéressants avec une IC_{50} de 25 $\mu\text{g/mL}$ pour une innocuité sur cellules saines.

14.2.2.3. Activité antibactérienne sur *S.aureus* et *E.coli*

Les extraits apolaires n'ont aucune activité antibactérienne sur les bactéries *E. coli* et *S. aureus* ($IC_{50} > 200\mu\text{g/mL}$).

14.2.2.4. Activité antifongique sur *Candida albicans*

Aucun des extraits ne présentent d'activité antifongique (valeurs $> 200\mu\text{g/mL}$).

14.2.2.5. Activité anti inflammatoire

Le graphe ci-dessous présente les résultats de l'activité anti inflammatoire des extraits cyclohexane testés à $40\mu\text{g/mL}$.

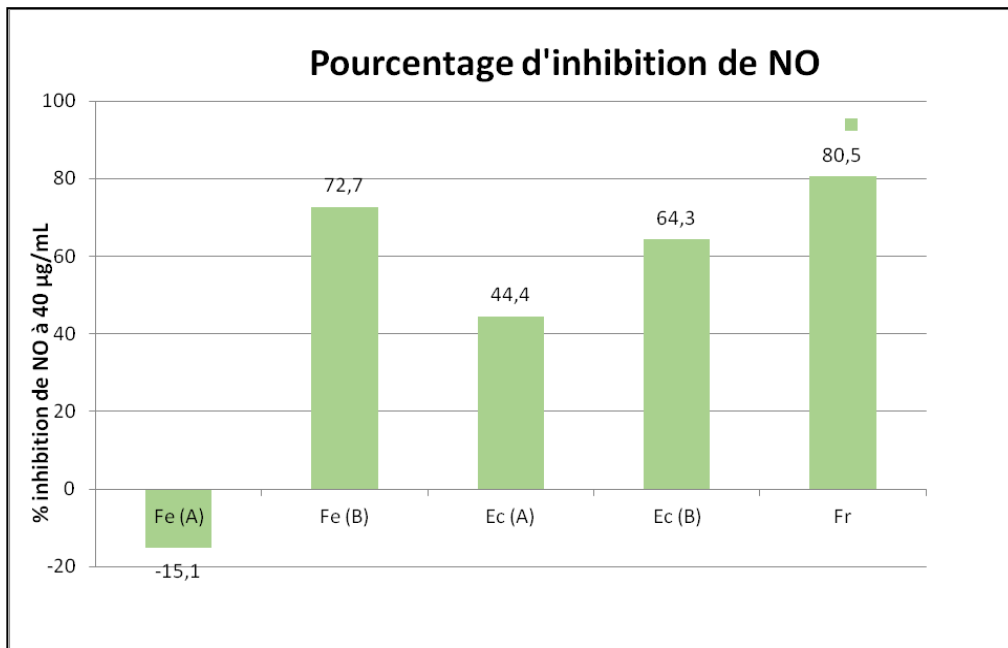


Figure 145 : Evaluation de l'activité anti inflammatoire des extraits cyclohexane à $40\mu\text{g/mL}$.

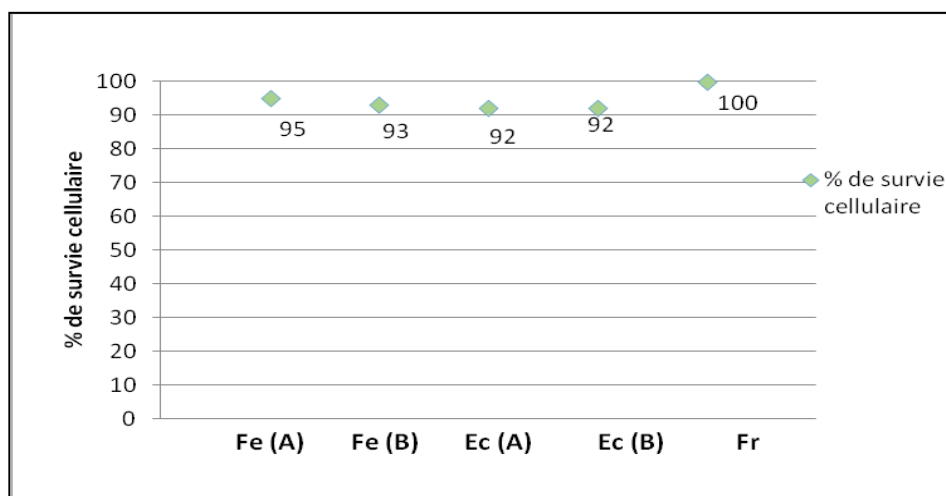


Figure 146: Toxicité des extraits cyclohexane

A la concentration de 40 µg/mL, l'extrait le plus actif est celui des fruits avec 80,5% d'inhibition de NO.

Au niveau des deux stades de récolte, les extraits d'écorces sont tous deux actifs (44 et 64%) alors que pour les feuilles, l'extrait au stade A n'est pas actif, tandis que celui au stade B révèle une toxicité de 72,7%.

14.2.2.6. Activité antivirale sur Herpès HSV-1

Les résultats du test d'activité antivirale contre l'Herpès HSV-1 des extraits cyclohexane sont présentés dans l'histogramme suivant :

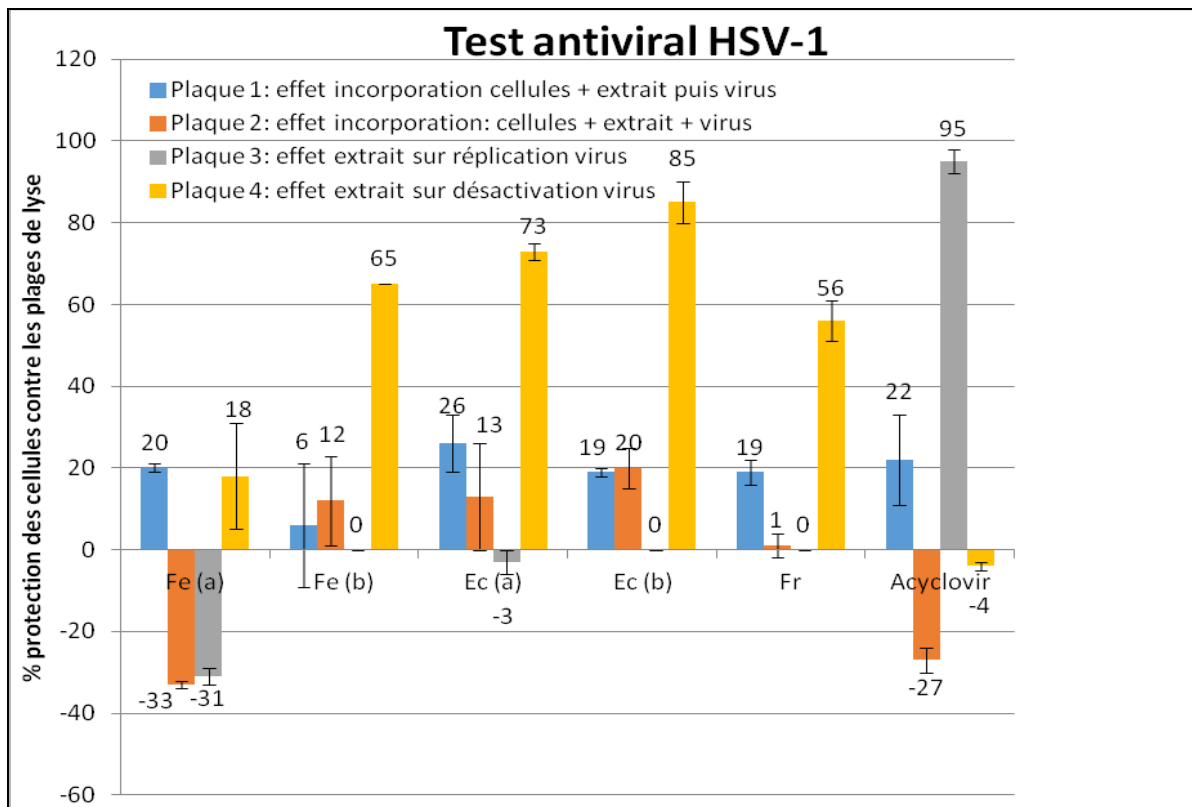


Figure 147 : Evaluation de l'activité antivirale Herpès HSV-1 sur les extraits bruts cyclohexane de *N. membranacea*

La figure ci-dessus montre que dans les résultats obtenus au test antiviral pour les différents extraits sont très variables.

Les pourcentages de protection des cellules contre la prolifération du virus (plaque 1 et 2) présentent des valeurs, inférieures à 26 % sur l'ensemble des extraits. Des résultats nettement plus importants sont obtenus concernant l'effet des extraits directement sur le virus. Plus particulièrement, les extraits d'écorces au stade B donnent la meilleure activité (85%). Les écorces au stade A montrent aussi de bon résultat (73%). En ce qui concerne les autres extraits, seuls ceux des feuilles au stade B (65%) et de fruits (56%) montrent une activité notable. Les échantillons n'ont aucun effet sur la réplication du virus (plaque 3).

Dans l'ensemble, les écorces montrent une activité antivirale directe de même que les feuilles du stade B.

14.3. Parties polaires

Ce chapitre présente les résultats concernant les activités biologiques précitées des extraits acétone, éthanol et méthanol des différents organes de *Nectandra membranacea* aux deux stades de récolte.

14.3.1. Activité Biologique des extraits bruts

14.3.1.1. Activité antioxydante

a. Test ORAC

La figure suivante présente les résultats au test de l'ORAC des échantillons testés. Les contrôles utilisés sont la quercétine et la catéchine. La référence est le trolox.

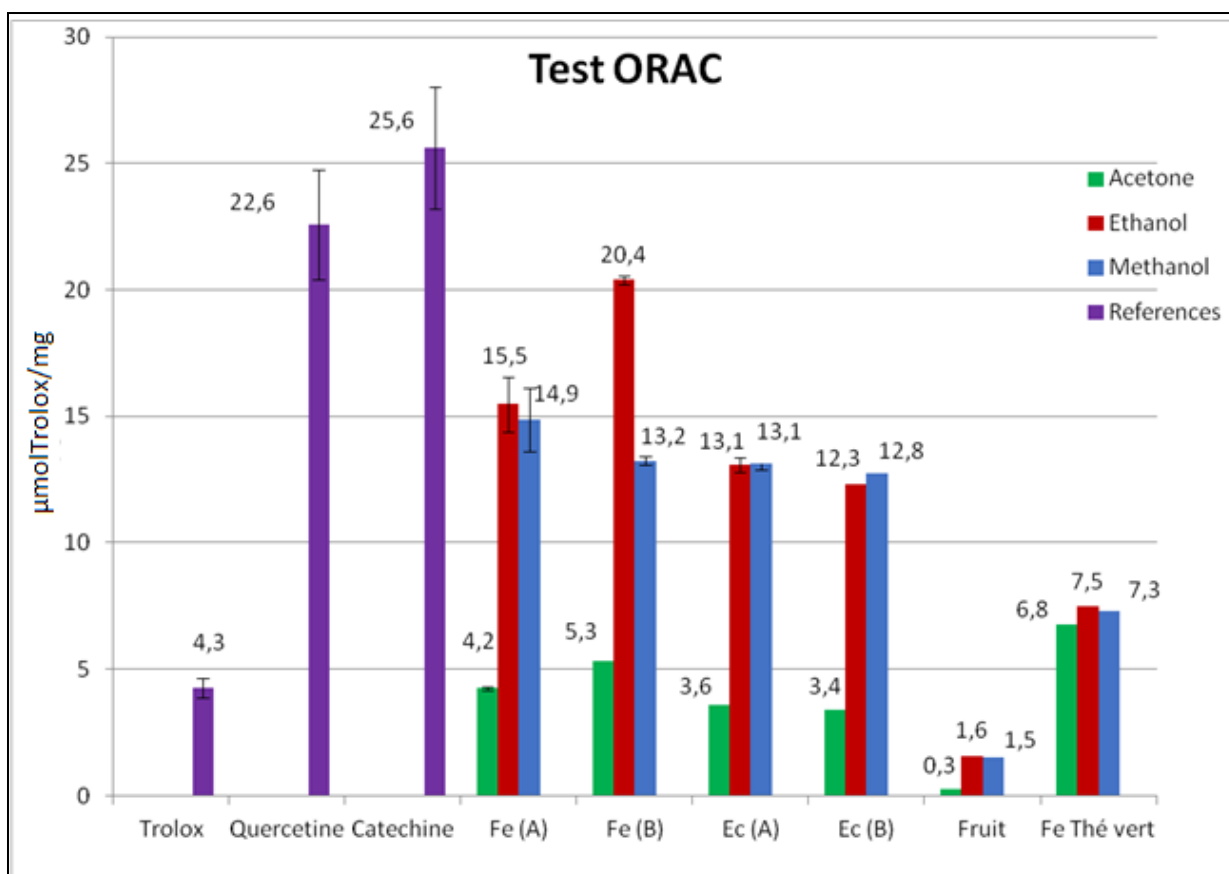


Figure 148: Evaluation de l'activité antioxydante via le test de l'ORAC sur les extraits bruts polaires de *N.membranacea*

Globalement, les extraits de fruits ne présentent pas d'activité antioxydante avec ce test. Les résultats obtenus montrent que les extraits éthanoliques et méthanoliques de feuilles et d'écorces présentent une forte activité anti oxydante, contrairement aux extraits acétone dont l'activité est moins intéressante quoique comparable à celle du trolox. Pour l'ensemble des extraits éthanol et méthanol, l'activité est meilleure que celle du thé vert.

L'activité est très élevée dans l'extrait éthanolique de feuilles récoltées lors de la fructification. Elle est comparable à celle de la quercétine.

b. Test DPPH

L'évaluation de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH mesurée sur les extraits bruts polaires de feuilles et d'écorces de *N. membranacea* est présentée dans la figure ci-dessous. Des extraits de feuilles de thé vert (Chine), le trolox et la quercétine déshydratée sont utilisés

comme références. Les résultats concernant les extraits de fruits, pas significatifs, n'ont pas été reportés.

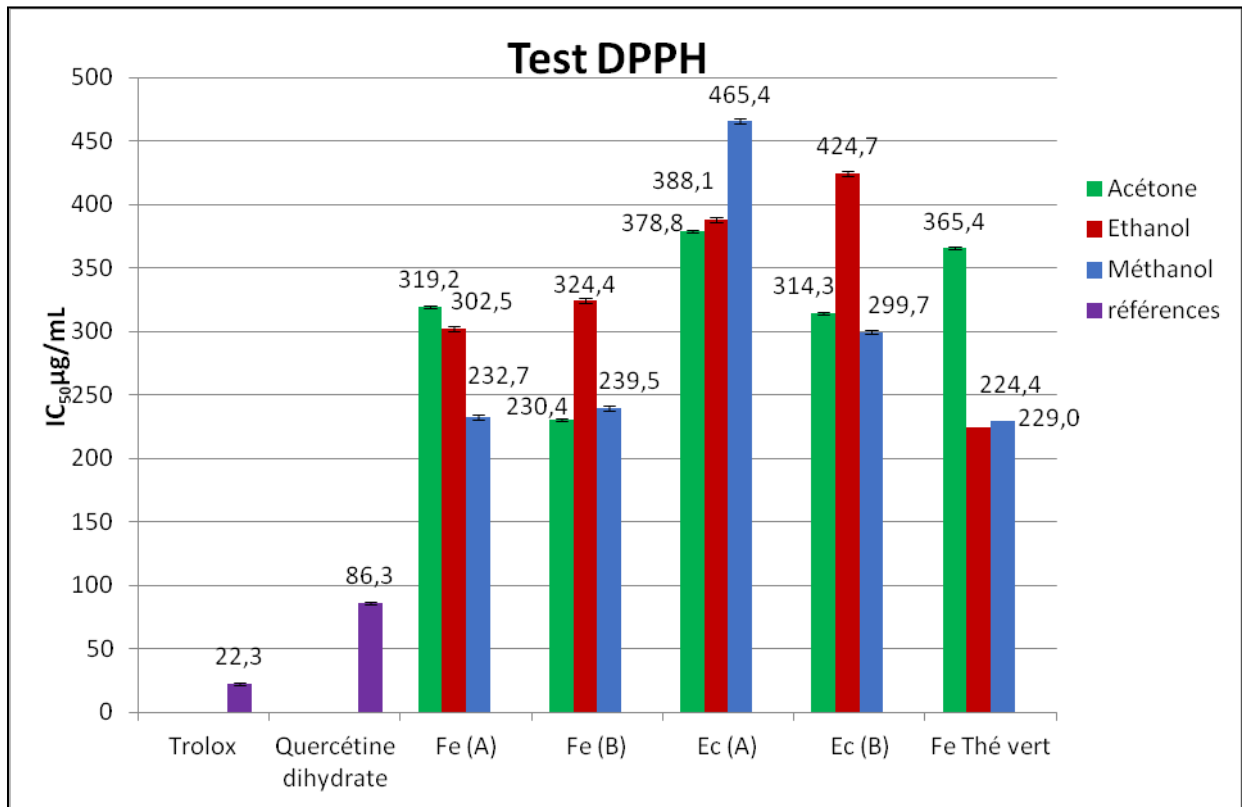


Figure 149 : Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH sur les extraits polaires

Les extraits polaires des feuilles ont une activité antioxydante légèrement supérieure à celle des écorces. Il est à noter que, pour tous les extraits, cette activité antioxydante reste comparable à celle des extraits de thé vert. Les meilleurs résultats étant observés pour l'extrait méthanol de feuilles (A) et l'extrait acétone des feuilles (B). Au niveau des deux stades de récolte, il n'y a pas de différence notable, la même tendance est observée.

c. Test Antioxydant cellulaire

Les résultats de ce test biologique sont représentés sur la figure ci-dessous :

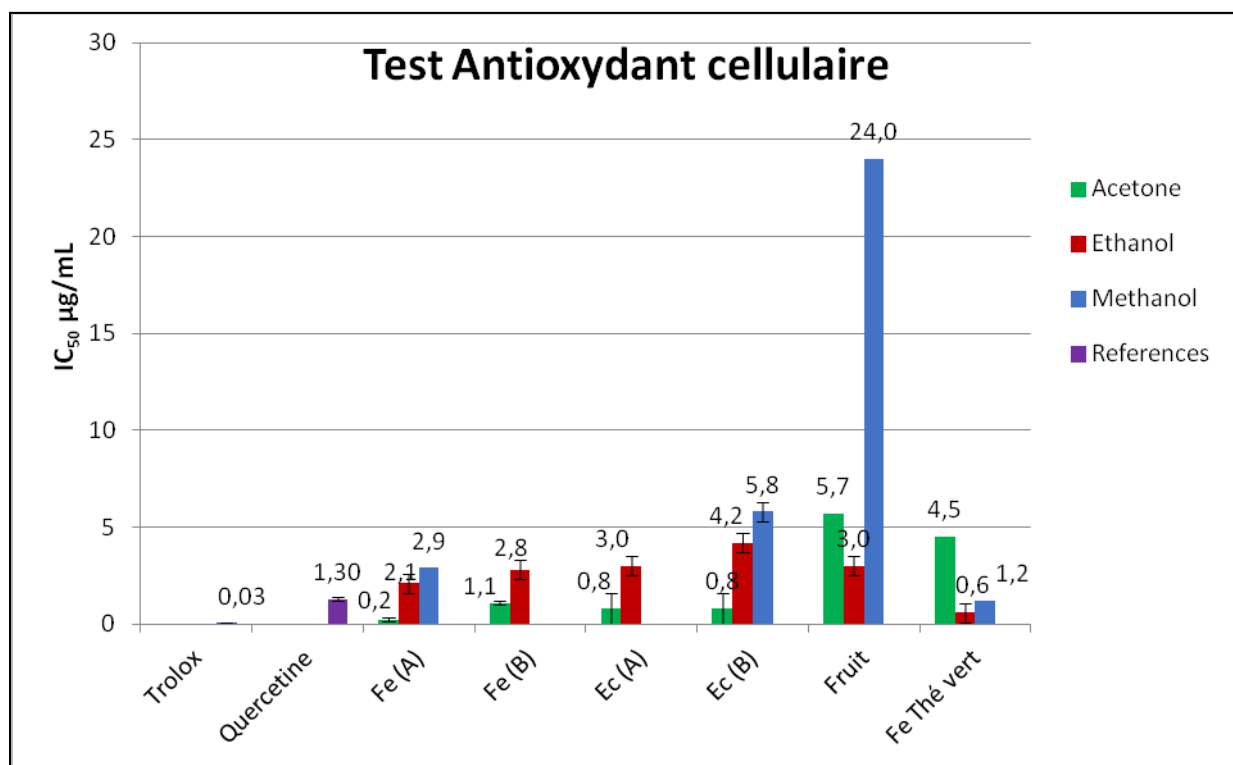


Figure 150 : Activité antioxydante cellulaire des extraits polaires de *N. membranacea* et des feuilles de thé vert

Excepté l'extrait méthanolique des fruits, tous les extraits montrent une activité antioxydante cellulaire intéressante.

Les extraits acétone montrent la meilleure activité antioxydante sur cellule ($IC_{50} < 1,2 \mu\text{g/mL}$). Pour les feuilles et les écorces, l'activité est comparable à celle de la quercétine ($IC_{50} = 1,3 \mu\text{g/mL}$). Parmi les autres extraits testés, les extraits de feuilles (A) et (B) méthanolique et éthanolique ont une très bonne activité antioxydante cellulaire avec une IC_{50} inférieure à $2,9 \mu\text{g/mL}$. Les résultats obtenus pour l'extrait éthanol de thé vert pour ce test, montrent une excellente activité antioxydante de $0,60 \mu\text{g/mL}$.

Concernant les extraits méthanol de feuilles (stade B) et d'écorces (stade A), les faibles quantités n'ont pas permis de réaliser ce test.

Les résultats ORAC et cellulaire nous permettent de conclure que l'extrait de feuille stade B éthanolique est le plus actif au niveau de l'activité antioxydante.

14.3.1.2. Activité anticancéreuse

b. Test de la Resazurine

Les résultats montrent qu'aucun extrait ne présente d'activité anticancéreuse sur les cellules testées (IC_{50} supérieure à 183 $\mu\text{g/mL}$).

c. Test de Hoechst

Les résultats sont très variables pour ce test avec une IC_{50} comprise entre 97 et 200 $\mu\text{g/mL}$ pour les cellules A-549 (cellules du cancer du poumon) et entre 60 et 181 $\mu\text{g/mL}$ pour les cellules DLD-1 (cellule du cancer du colon). Seuls les extraits acétone présentent une faible activité sur les cellules DLD-1 (entre 61 et 115 $\mu\text{g/mL}$).

14.3.1.3. Activité antibactérienne sur *S.aureus* et *E.coli*

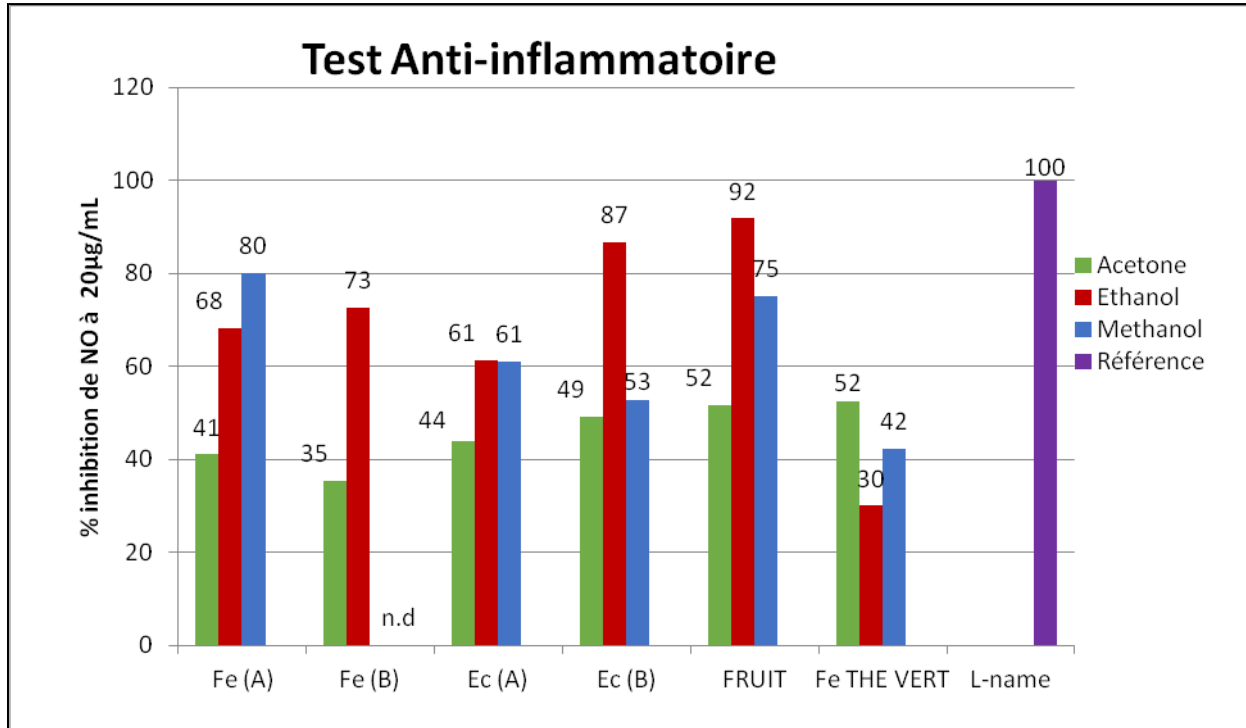
Les extraits ne présentent aucune activité antibactérienne contre les bactéries testées. Seuls les extraits acétone présentent une toxicité sur ces deux souches de bactéries. La plus active est l'extrait acétone de feuilles récolté lors de la fructification et qui présente une activité intéressante d'environ 23 $\mu\text{g/mL}$ sur la bactérie *S. aureus*. Concernant le thé vert, aucune activité n'est constatée.

14.3.1.4. Activité antifongique sur *Candida albicans*

Aucun extrait ne montre d'activité antifongique sur la bactérie testée. Seul l'extrait acétone de thé vert montre une faible activité de 85 $\mu\text{g/mL}$.

14.3.1.5. Activité anti inflammatoire

Les résultats des activités anti inflammatoires réalisées sur les différentes parties de la plante sont exposés ci-dessous.



L'extrait méthanol stade B n'a pas pu être testé par manque de masse.

Figure 151 : Evaluation de l'activité anti inflammatoire sur les extraits polaires

Dans l'ensemble, l'éthanol montre de meilleurs résultats pour l'évaluation de l'activité anti inflammatoire particulièrement pour les extraits qui correspondent à la fructification avec une moyenne d'environ 83,73%. Les extraits, au stade A, présentent des résultats 1,2 fois inférieurs (avec une moyenne de 64,8%). Parmi les extraits testés, les fruits ont le meilleur pouvoir anti inflammatoire 91,8%.

14.3.1.6. Activité antivirale sur Herpès HSV-1

Les résultats de l'activité antivirale de l'Herpès sont répertoriés sur le diagramme suivant :

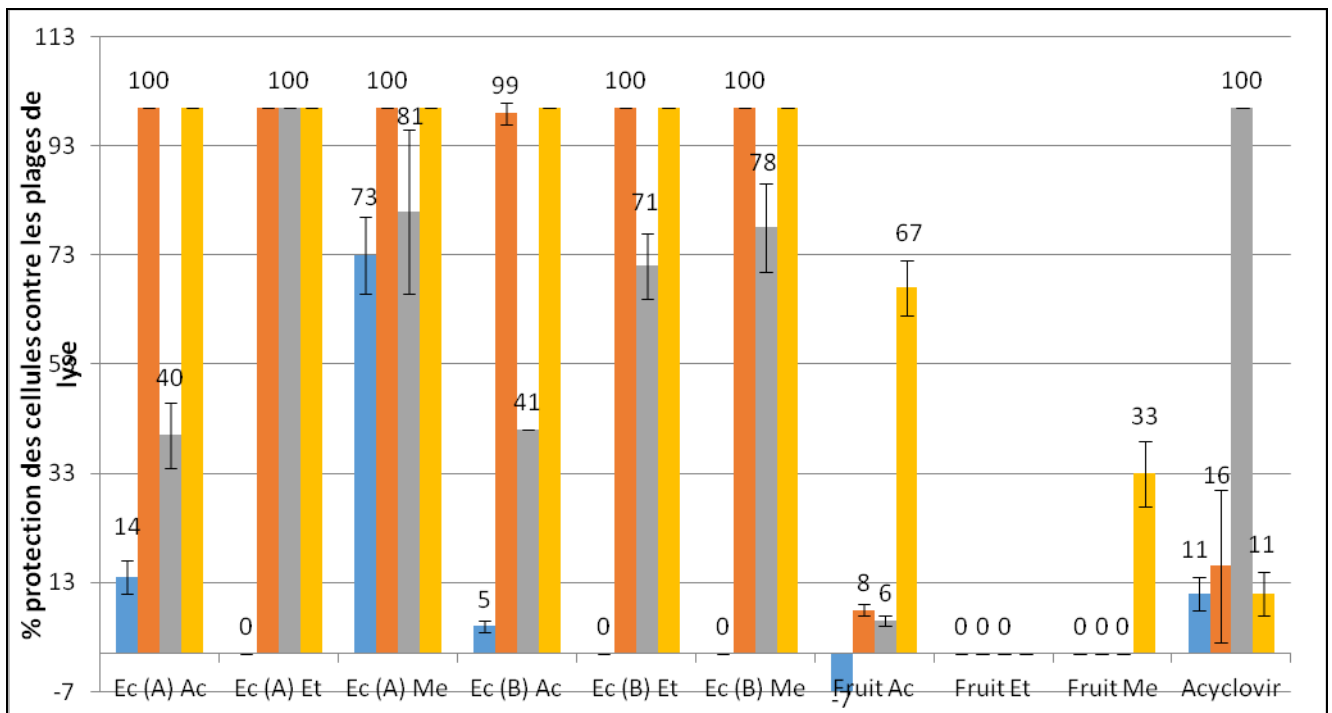
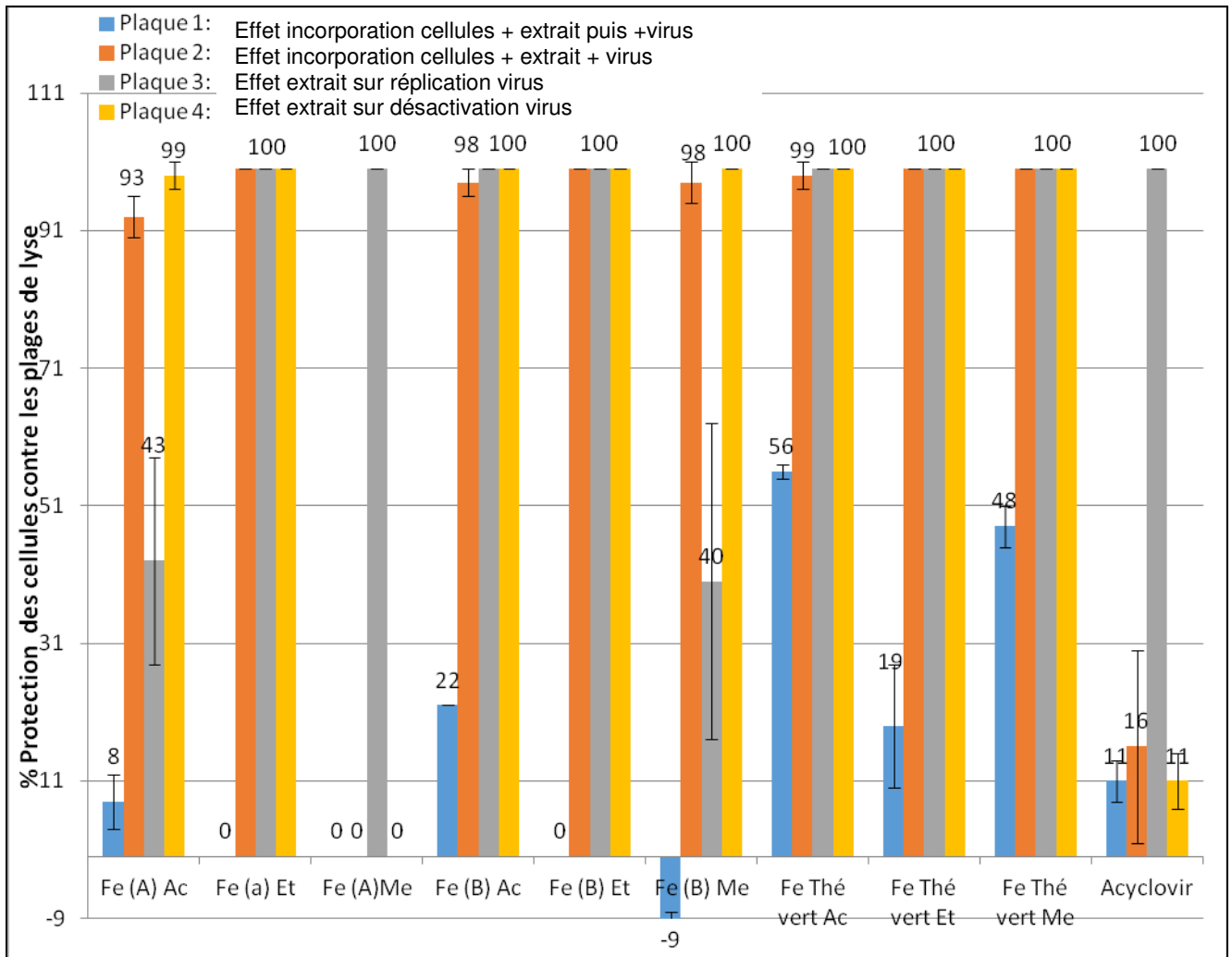


Figure 152: Evaluation de l'activité antivirale des extraits polaires sur l'herpès HSV-1 (Herpes Simplex Virus).

Les extraits éthanolique donnent d'excellentes réponses aux différents tests effectués sur plaque avec 100% de protection contre le virus de l'herpès HSV-1 (plaque 2) ainsi que sur la réplication du virus (plaque 3) mais aussi un effet désactivant directement sur le virus. Ces résultats sont comparables aux feuilles de thé vert qui montrent aussi de très bons résultats à tous les tests.

14.3.2. Activité Biologique des fractions issus de Fe(B)

La période de fructification s'est révélée avoir la meilleure réponse pour l'ensemble des activités testées surtout dans les feuilles. Les extraits sont très actifs pour les trois tests suivants : antioxydant, anti inflammatoire et antiviral. Les différents extraits de feuilles stade B sont regroupés Fe_{total} (B) afin d'avoir plus de masse pour procéder au fractionnement.

Les fractions de A à G obtenues après l'extraction liquide-liquide sont aussi testées pour les activités antioxydantes, anti inflammatoire et antivirale. Les résultats de tous ces tests sont présentés ci-dessous.

a. Activité antioxydante ORAC

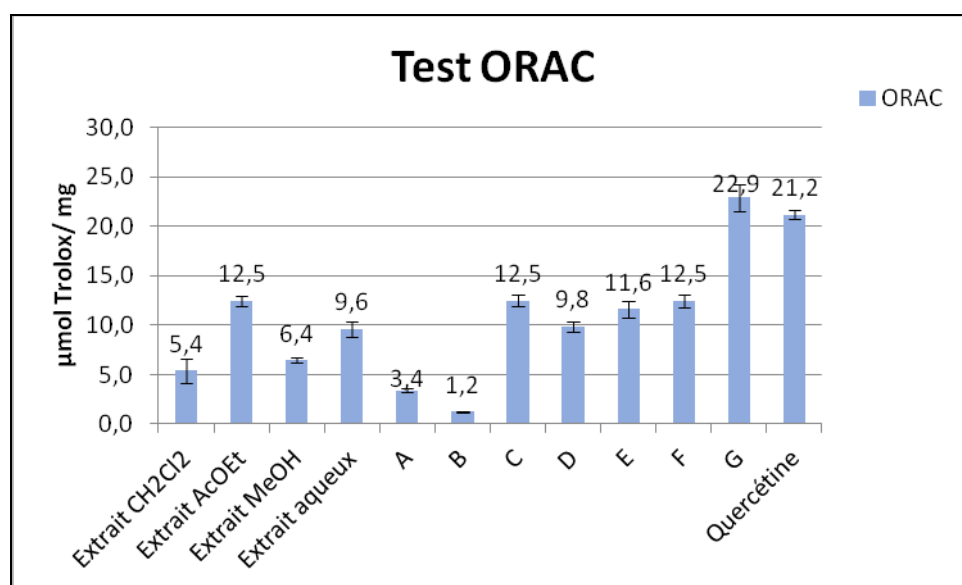


Figure 153: Activité antioxydante ORAC

b. Activité antioxydante sur cellule

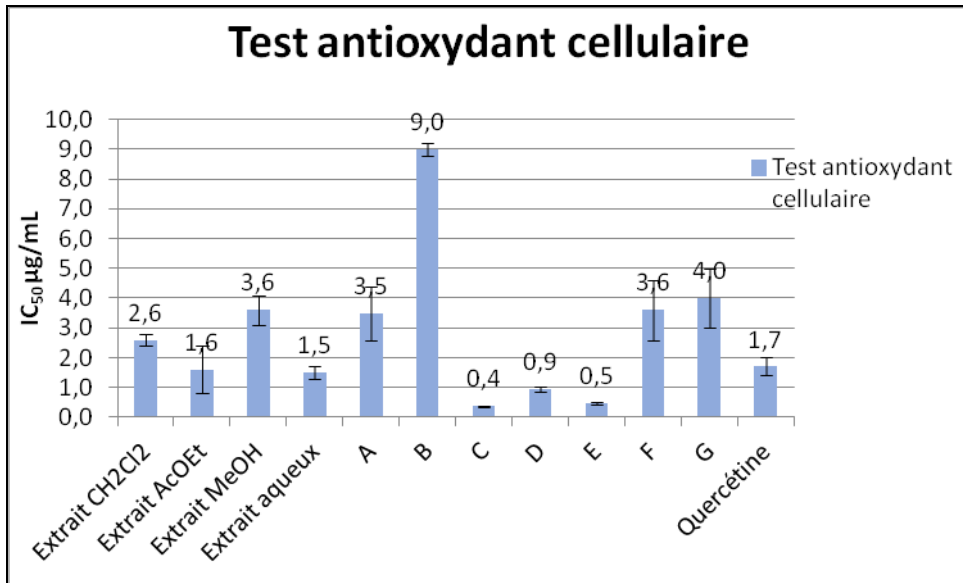


Figure 154: Activité antioxydante cellulaire des fractions

c. Activité anti-inflammatoire

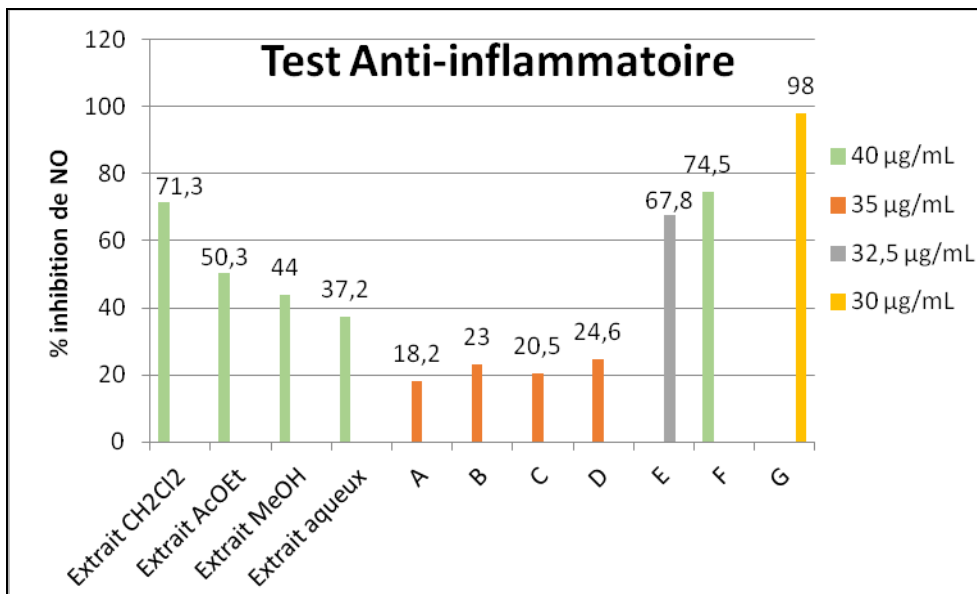


Figure 155: Activité anti-inflammatoire

d. Activité antivirale Herpès

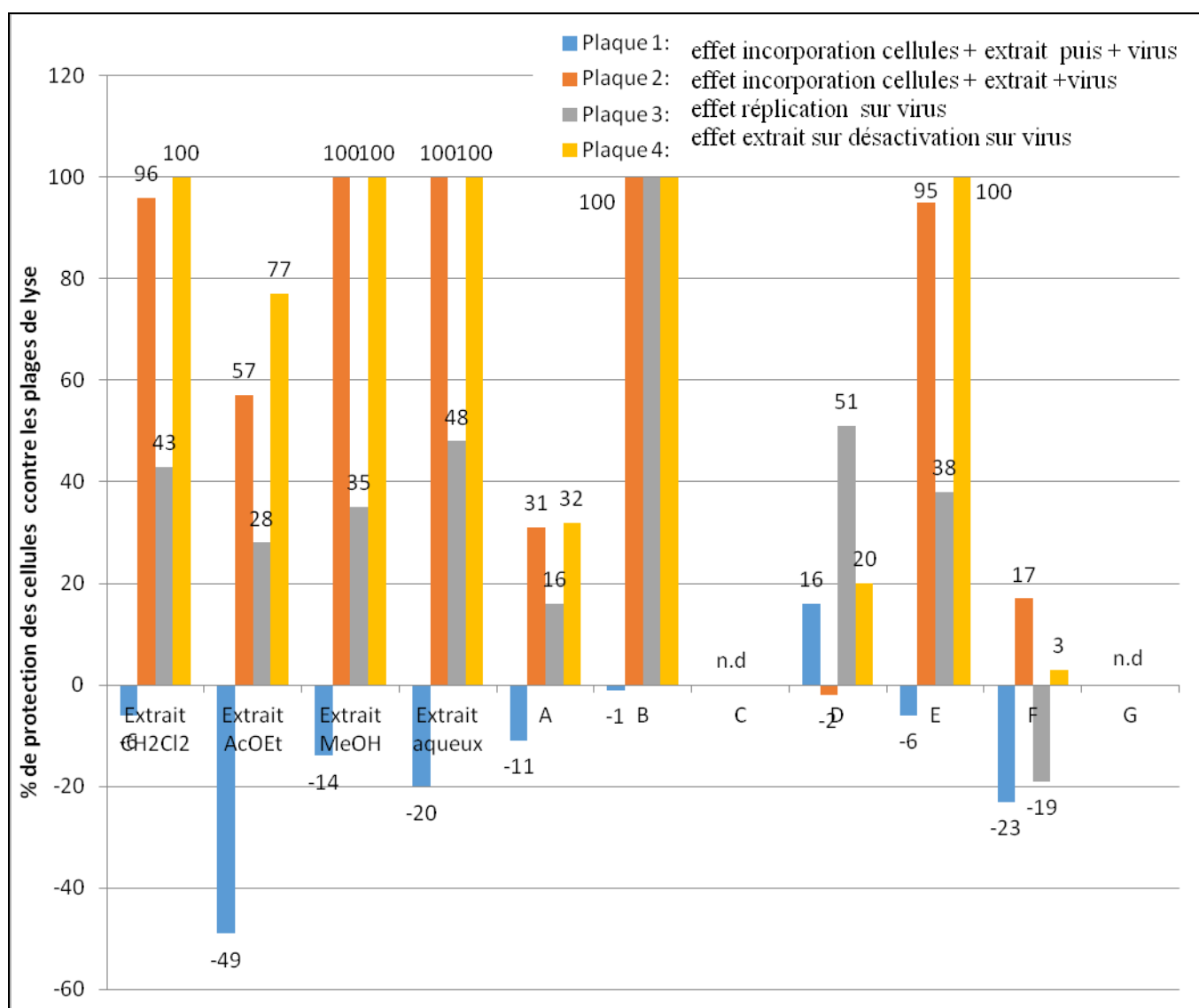


Figure 156 : Evaluation de l'activité antivirale sur le virus de l'herpès

Les fractions C, E, F et G donnent de très bonnes activités antioxydantes. La meilleure activité est obtenue pour la fraction G. Elle est comparable à celle de la quercétine ($22,92 \pm 1,39 \mu\text{g Trolox/mL}$). L'activité anti inflammatoire se situe au niveau des fractions E, F, G, avec une meilleure activité sur la fraction G (98% inhibition). L'activité antivirale n'a pas pu être testée sur cette fraction à cause du manque de matière. Néanmoins, on peut noter que la fraction B montre une excellente activité antivirale : 100% de protection dans la cellule, effet désactivant de 100% sur le virus et empêche à 100% la répllication de celui-ci.

14.3.3. Composé E6 : kaempférol-3-O-rhamnoside

L'activité antioxydante et anti-inflammatoire a été testée sur le composé E6 qui correspond au kaempférol-3-O-rhamnoside. Les résultats sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 48 : Activité antioxydante et anti-inflammatoire sur E6

Composé	Activité antioxydant		Anti inflammatoire
	ORAC $\mu\text{mol Trolox/mg}$	Cellulaire WS-1 $\text{IC}_{50} \mu\text{g/mL}$	Inhibition de NO en % pour 40 $\mu\text{g/mL}$
E6	13,40 \pm 0,65	4,10 \pm 0,60	5,1
Quercétine	21,35 \pm 1,01	2,10 \pm 0,20	
Trolox	3,67 \pm 0,05	0,08 \pm 0,01	

Aux tests antioxydants ORAC et cellulaire, le kaempférol-3-O-rhamnoside a montré de très bons résultats (ORAC : $\text{IC}_{50} = 13,40 \mu\text{mol trolox /mg}$ et cellulaire : $\text{IC}_{50} = 4,10 \mu\text{g/mL}$). Par contre, il possède une très faible réponse au test anti-inflammatoire.

14.4. Alcaloïdes

L'activité des extraits bruts des feuilles (A et B), des écorces (A et B) et des fruits a été évaluée sur les facteurs de la maladie d'Alzheimer. D'autres tests biologiques ont été réalisés sur l'extrait des feuilles (anticancéreux, antioxydant, antifongique, antibactérien, antiviral et anti inflammatoire). Les résultats sont présentés ci-après.

14.4.1. Activité neuroprotectrice : Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie dégénérative qui engendre un déclin progressif des facultés cognitives et de la mémoire. Une destruction des cellules nerveuses se produit dans les régions du cerveau liées à la mémoire et au langage de façon progressive. C'est une forme de démence la plus fréquente chez les personnes âgées (65 % des cas de démence). Elle se distingue des autres démences par le fait qu'elle évolue graduellement et touche surtout la mémoire à court terme.

Les symptômes apparaissent généralement après 65 ans et augmentent fortement avec l'âge. Ils se manifestent de la façon suivante : difficulté à mémoriser les événements, à reconnaître les objets et les visages, à se rappeler la signification des mots et à exercer son jugement.

Quelques explications sur la source de la maladie.

Dans la Maladie d'Alzheimer, l'APP (précurseur de la protéine Amyloïde, qui maintient la structure du neurone, aide à sa croissance et à la formation des synapses et la transmission) est transformée, ce qui conduit à la libération des β -amyloïdes autour du neurone, substance caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

Le cerveau ne pouvant pas éliminer cette substance, elle s'empile autour des neurones et crée des plaques séniles qui sécrètent des substances (β -amyloïdes) qui sont neurotoxiques et agressent le neurone. Celui-ci, se sentant attaqué, lance le mécanisme d'apoptose.

Le neurone fonctionne moins bien et crée des produits toxiques qui le détruisent (mort neuronale, destruction des liens, des synapses) c'est la dégénérescence neurofibrillaires (anomalie de la protéine Tau). Cette destruction neuronale précède les troubles de mémoire. L'intervalle entre le début des mécanismes d'apoptose neuronale et les premiers signes de la maladie serait de plusieurs années.

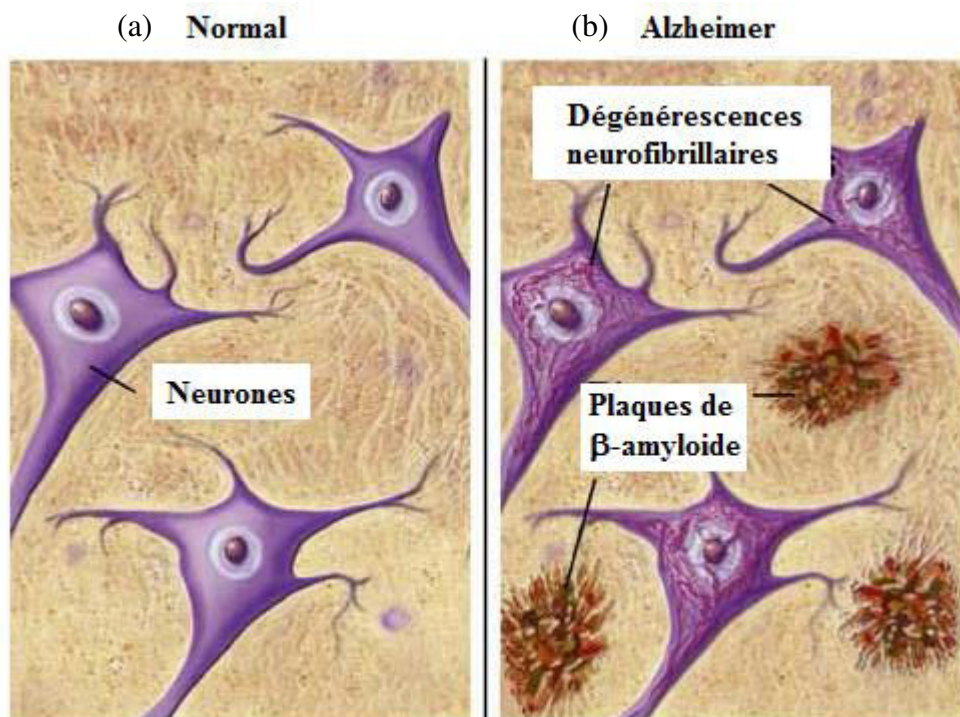


Figure 157 : (a) Neurone normal et (b) atteint de la maladie Alzheimer

[Alzheimer's Disease Research]

Plus les neurones sont détruits, plus le réseau cellulaire est perturbé. Les cellules concernent différents systèmes de cellules nerveuses, mais avant tout les neurones appelés cholinergiques, qui sont spécialisés dans la mémoire. Il en résulte un manque de messagers entre les cellules en particulier au niveau du neurotransmetteur acétylcholine. Le neurone ne peut plus transmettre le bon message ce qui explique que les premiers symptômes de cette maladie sont des troubles de la mémoire.

Afin de stopper la mort cellulaire des neurones, les chercheurs de l'unité INSERM de Marseille-Luminy, ont démontré que le facteur de croissance, GDNF, facteur neurotrophe dérivé de la glie, (Glial cell line-derived neurotrophic factor), est actuellement le meilleur agent connu pour favoriser la survie de nombreux types de neurones, motoneurones, cellules dopaminergiques [Airaksinen M. 2002)]. En effet, il est en mesure d'empêcher l'apoptose des neurones grâce à ses effets régénérateurs et réparateurs remarquables.

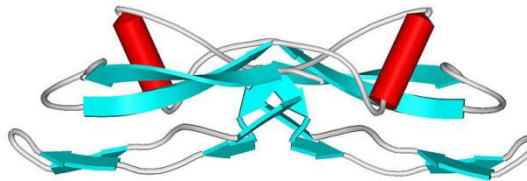


Figure 158 : Structure de la GDNF en 3D [Kurzweil. Wikimedia commons]

Les extraits bruts d'alcaloïdes (feuilles, écorces et fruits aux deux stades de récoltes) de *Nectandra membranacea* ont été testés à différentes concentrations (0,01-0,1-1 et 10 $\mu\text{g/mL}$) et comparé au GDNF, utilisé comme référence. Ce test biologique a pour but de mesurer l'effet neuroprotecteur des différents échantillons. Le diagramme réalisé présente en abscisse la concentration en neurones TH+ (Tyrosine Hydroxylase positive) et en ordonnée la concentration des échantillons.

Ces analyses ont été réalisées à l'Université Pierre et Marie Curie. Les résultats sont présentés ci-après.

14.4.1.1. Etude des extraits bruts de feuilles

La figure suivante présente les résultats obtenus sur l'extrait de feuilles au stade A.

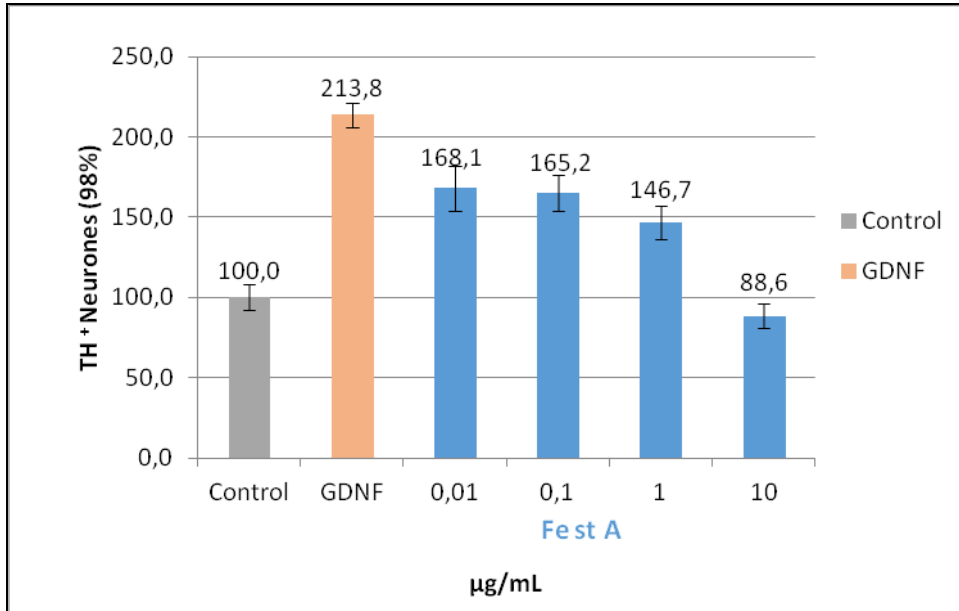


Figure 159: Evaluation de l'effet neuroprotecteur de l'extrait alcaloïde de feuilles (stade A)

L'extrait de feuilles, récolté lors du stade A, a montré un très bon effet protecteur. Comparé à la référence, on note un écart inférieur de 20% pour les concentrations de 0,01 et 0,1 µg/mL. Pour de plus fortes concentrations, l'effet diminue (environ 30% d'écart à 1 µg/mL et 58% à 10 µg/mL).

Les résultats de l'extrait de feuilles au stade B, sont présentés sur la figure suivante :

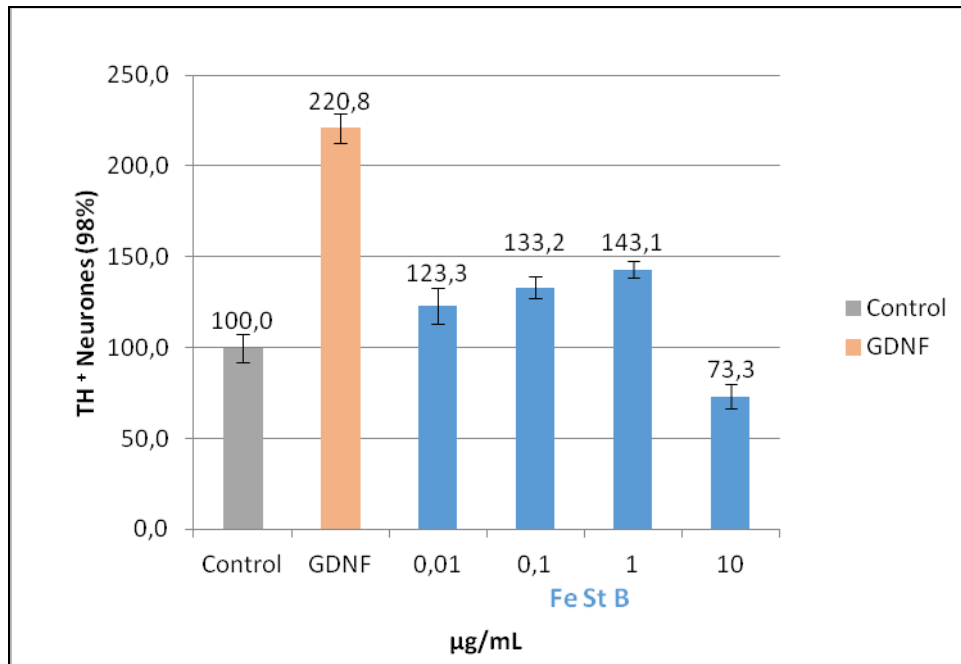


Figure 160 : Evaluation de l'effet neuroprotecteur de l'extrait alcaloïde de feuilles (stade B)

L'extrait de feuilles récolté lors de la fructification, montre un effet protecteur, moins important que précédemment mais néanmoins intéressant. Le meilleur résultat est obtenu pour une concentration de 1 µg/mL (écart d'inférieur 35% comparé au GDNF).

Les extraits de feuilles montrent un très bon effet neuroprotecteur. Bien que les compositions chimiques semblent similaires des différences notables sont observées au niveau des deux stades de récoltes. A la germination, les extraits testés sont plus actifs que ceux du stade « fructification ». Comparé à la référence, l'écart des moyennes pour les concentrations allant de 0,01 à 1 µg/mL est de 25 % pour l'extrait de feuilles au stade A, germination, et de 39% pour la fructification.

14.4.1.2. Étude des extraits bruts des écorces

Les résultats des extraits d'écorces stade A au test de la Maladie d'Alzheimer sont donnés sur la figure suivante :

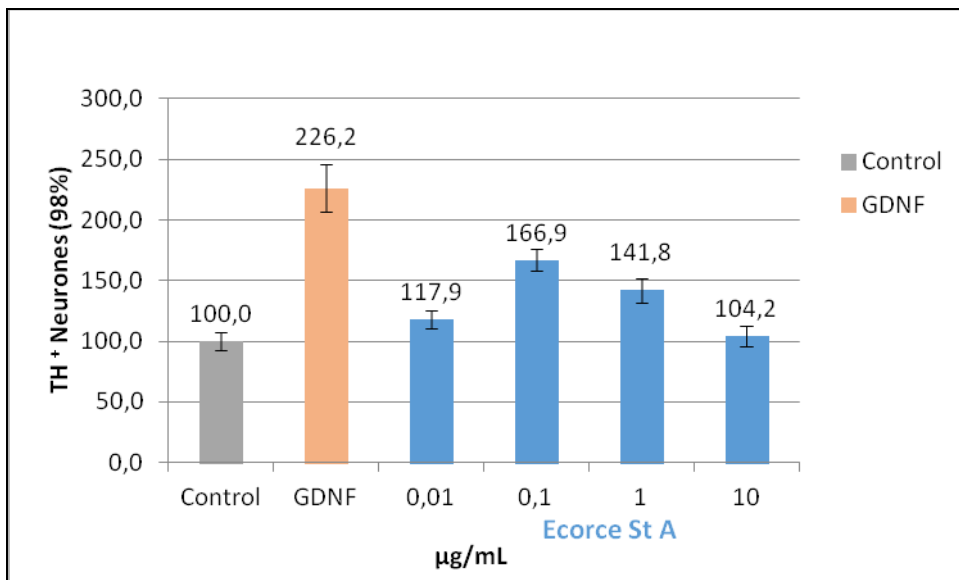


Figure 161 : Evaluation de l'effet neuroprotecteur de l'extrait alcaloïdes des écorces (stade A)

A la germination, les extraits d'écorces, donnent un meilleur effet protecteur pour une concentration de 0,1 µg/mL (écart inférieur de 26% comparé à GDNF). L'effet protecteur moyen pour l'ensemble des concentrations est de 132,69% (soit un écart de 41%).

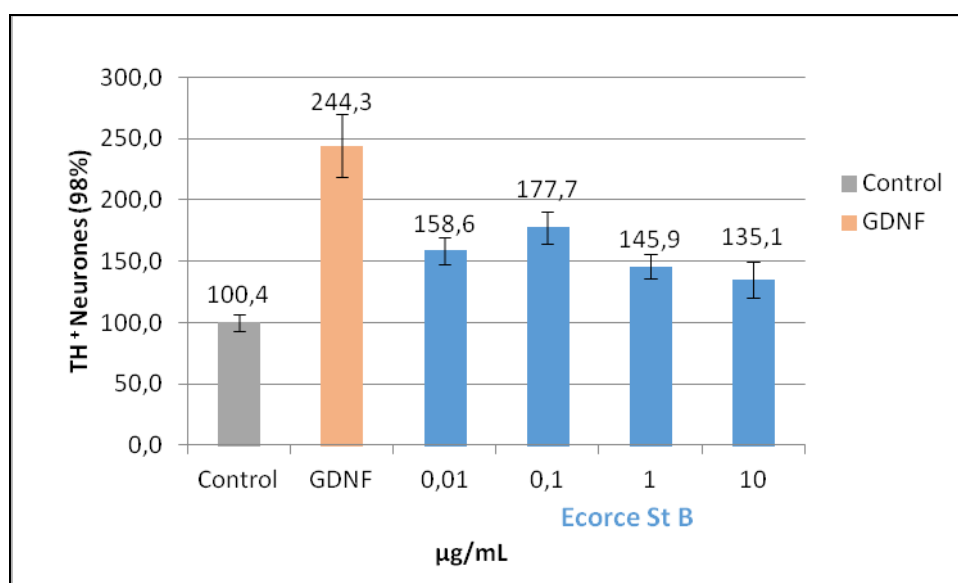


Figure 162 : Evaluation de l'effet neuroprotecteur de l'extrait des écorces (stade B)

L'extrait d'écorces récolté lors du stade B, donne un meilleur effet protecteur pour une concentration de 0,1µg/mL, avec une valeur de 177,73 (écart inférieur de 27%). La moyenne de l'ensemble des concentrations testées, est 154,35 (écart de 37% comparé à la référence).

Les extraits d'écorces n'ont pas montré de différences significatives au niveau des deux stades de récoltes. Tous les deux ont montré un plus fort effet protecteur à 0,1µg/mL. L'écart par rapport à la référence est quasi le même pour les deux stades de récolte (stade A : 166,92 écart de 26% et stade B : écart inférieur de 27%). Il en va de même que pour l'écart moyen des concentrations testées (stade A : 41% et stade B: 37%).

14.4.1.3. Étude de l'extrait brut des fruits

Le diagramme ci-dessous présente les résultats du test sur les extraits bruts des fruits :

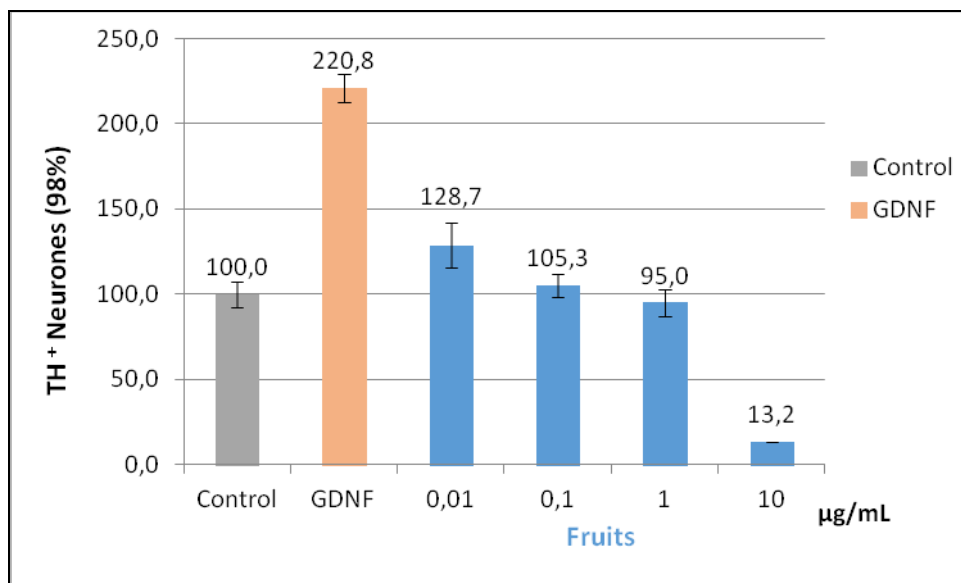


Figure 163 : Evaluation de l'effet neuroprotecteur de l'extrait de fruits

L'évaluation de l'extrait de fruits montre un effet protecteur plus important pour 0,01µg/mL (écart inférieur d'environ 42% par rapport à la référence). La moyenne des concentrations allant de 0,01 à 1 µg/mL est de 109,83 (soit un écart de 50% comparé à GDNF).

Les différents extraits bruts alcaloïdes de *Nectandra membranacea*, ont révélé un effet protecteur non négligeable comparé à la référence, le GDNF. Des différences sont observées en fonction de la partie de la plante et de son stade de récolte.

Les extraits de feuilles présentent les meilleurs résultats plus particulièrement l'extrait de feuilles récolté lors de la germination. En effet, ce dernier montre à la concentration la plus faible testée 0,01µg/mL, le plus fort effet protecteur, proche de la référence (écart de 20% soit environ 1,27 fois inférieur au GDNF).

Afin de classer les extraits par ordre croissant de l'effet protecteur, les écarts par rapport à la référence ont été calculés pour une concentration de 0,1µg/mL. Ceci a permis de déterminer que Feuille st A (22 %) < Écorce st A (26%) < Écorce st B (27%) < Feuille st B (39%) < fruit (52%).

Les meilleurs résultats sont ainsi obtenus pour les extraits récoltés au stade A, (germination), feuilles et écorces. Néanmoins, il n'y pas de différence significative pour les écorces au niveau des deux stades de récoltes, l'écart par rapport à la référence étant le même. Le contraste est bien marqué pour les feuilles, stade A (22% d'écart) et stade B (39%). Quant à l'extrait de fruits, c'est le moins actif avec un écart de 52% par rapport au GDNF.

Les résultats obtenus pour les extraits sont en corrélation avec les composés identifiés. En effet, les structures indoles, isoquinolines présentent une inhibition de l'acétylcholinérase, enzyme de la maladie d'Alzheimer. [Mukherjee PK., 2007].

L'extrait des feuilles qui présentent le plus de composés alcaloïdes montre en effet, les meilleurs résultats à ce test. Cet extrait a donc été choisi afin d'identifier les molécules responsables de ce pouvoir protecteur. Des analyses complémentaires sont en cours sur les échantillons correspondant à un fractionnement de l'extrait brut d'alcaloïdes totaux des feuilles stade A.

14.4.2. Activité biologique de l'extrait brut de feuilles

L'évaluation biologique de l'extrait brut alcaloïde des feuilles a été réalisée. Il en ressort des activités très intéressantes présentées ci-dessous.

14.4.2.1. Activités antioxydantes chimique (ORAC) et sur cellules saines

Les figures 166 et 167 montrent les résultats aux tests antioxydants: ORAC et cellulaire.

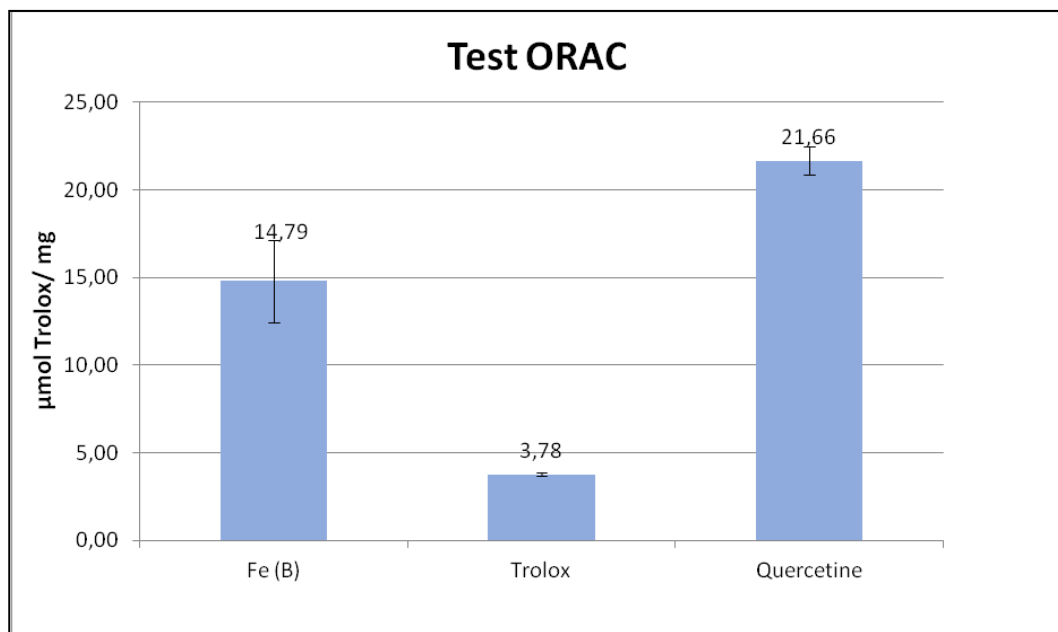


Figure 164 : Résultats des indices ORAC sur l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles stade B

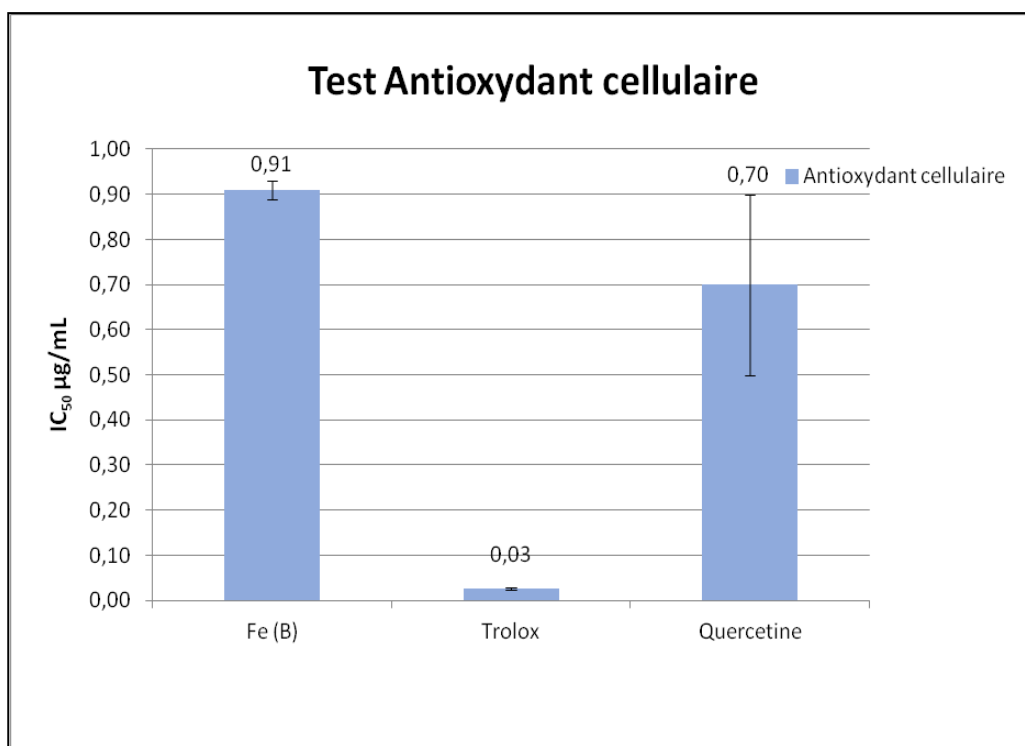


Figure 165: Résultats de l'activité antioxydante cellulaire de l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles stade B

L'extrait s'est révélé très actif au test ORAC, $IC_{50} = 14,79 \mu\text{mol Trolox/mg}$. Sur cellule, l'extrait montre de très bons résultats avec une IC_{50} comparable à celle la quercétine ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$).

14.4.2.2. Activité anticancéreuse : Tests Résazurine et Hoechst

Ci-dessous les résultats des tests anticancéreux, Résazurine et Hoechst sur les cellules carcinome du poumon A-549, du colon DLD-1 et sur les cellules saines WS-1.

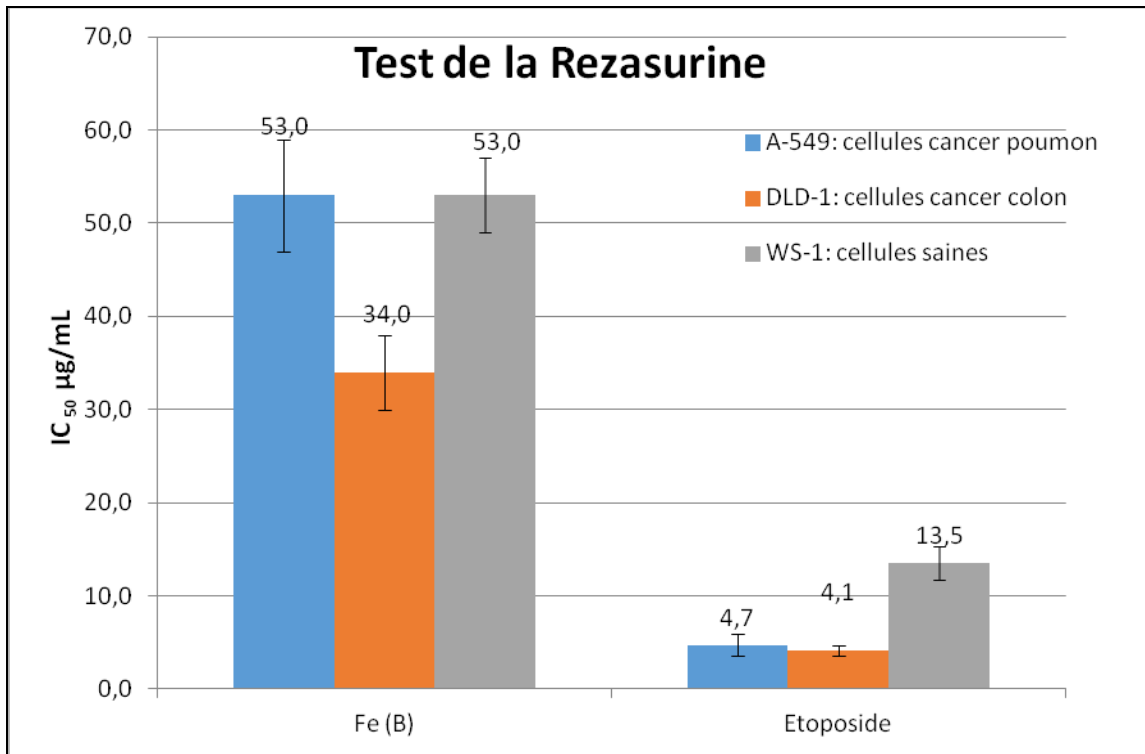


Figure 166 : Evaluation de l'activité anticancéreuse par le test de la Résaurine de l'extrait brut alcaloïdes des feuilles

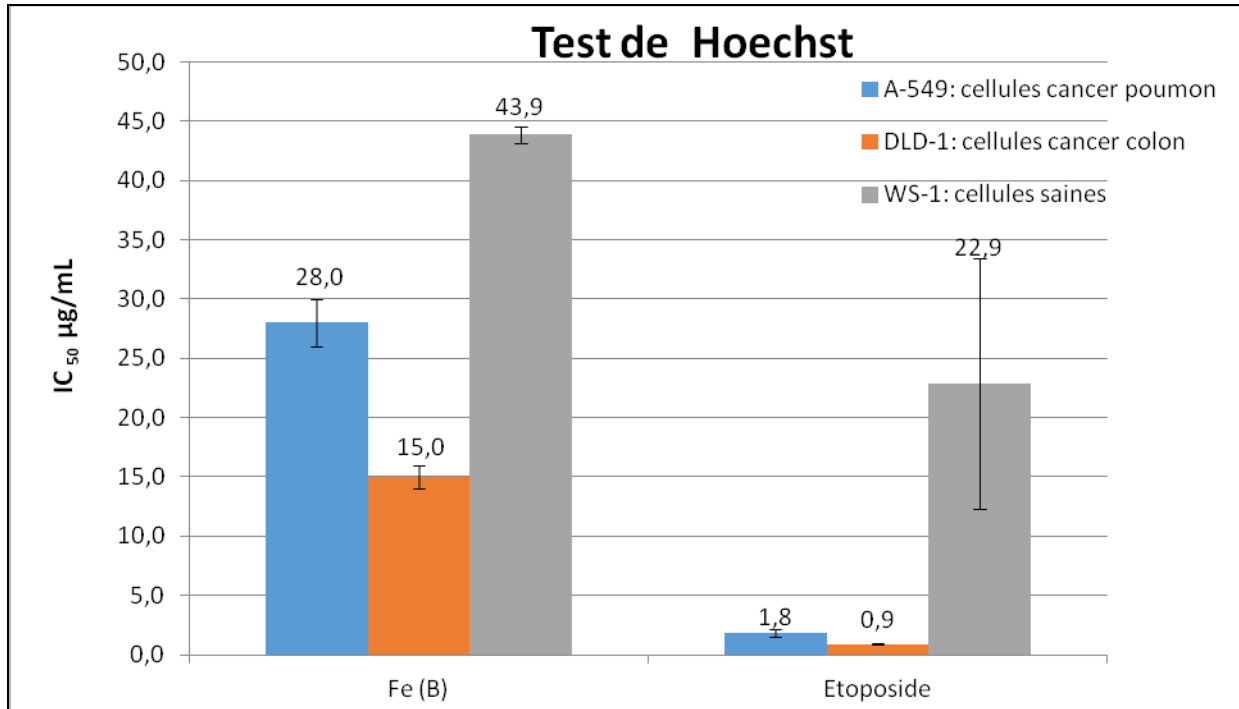


Figure 167 : Evaluation de l'activité anticancéreuse par le test de Hoeschst de l'extrait brut alcaloïdes des feuilles

Les tests anticancéreux, Résazurine et Hoechst, montrent que l'extrait est moyennement actif sur les deux lignées cancéreuses : poumon (A-549), et côlon (DLD-1). Il est néanmoins plus actif sur les cellules du cancer du poumon. Cependant, l'extrait se révèle également toxique sur les cellules saines.

14.4.2.3. Activités antibactériennes sur *S. aureus* et *E. coli*

L'extrait brut alcaloïdes des feuilles n'a montré aucune activité antibactérienne contre les deux types de bactéries *S. aureus* et *E. coli*. Les valeurs d'IC₅₀ obtenues sont toutes supérieures à 200 µg/mL (Annexe 12).

14.4.2.4. Activité antifongique sur *Candida albicans*

La figure ci-dessous présente les résultats de l'activité antifongique sur la levure *Candida albicans* :

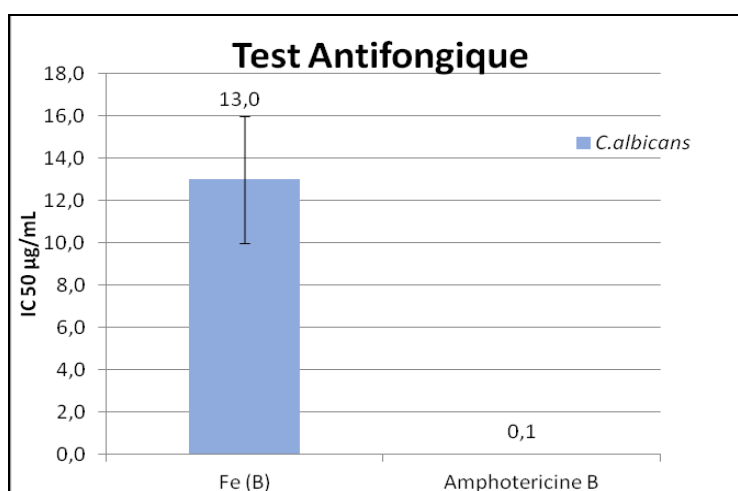


Figure 168 : Evaluation de l'activité antifongique de l'extrait brut d'alcaloïdes des feuilles stade B

L'extrait alcaloïde des feuilles possède une excellente activité antifongique sur la bactérie *C. albicans* avec une IC₅₀ de 13 µg/mL.

14.4.2.5. Activité anti inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits de feuilles sont présenté dans la figure 171.

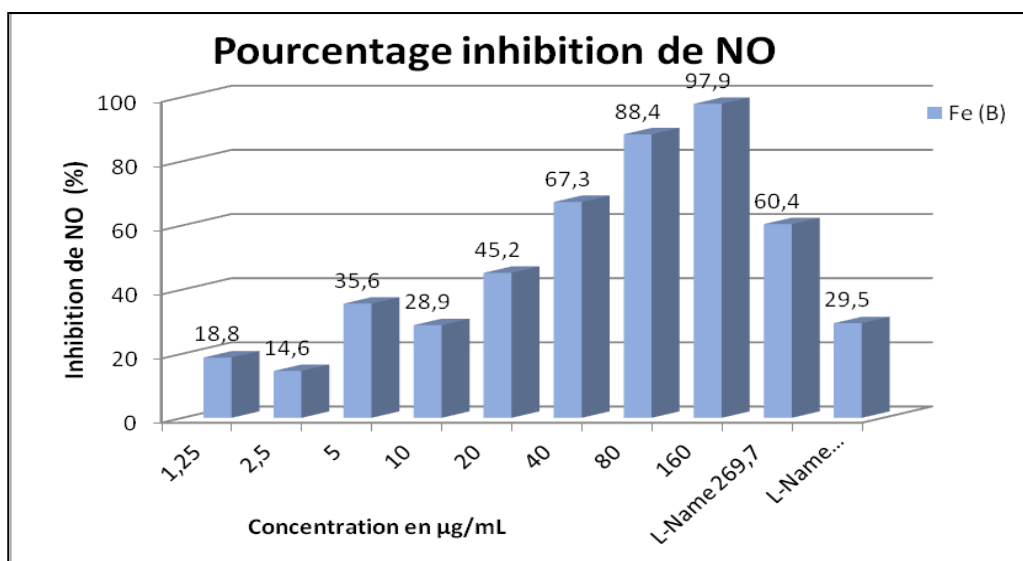


Figure 169 : Activité anti inflammatoire de l'extrait brut alcaloïdes des feuilles

L'extrait montre une activité anti inflammatoire nettement supérieure à celle de la L-Name. Pour une concentration de 40 µg/mL, l'extrait donne un pourcentage d'inhibition de 67,3 % alors que pour le témoin utilisé il faudrait une concentration environ 7 fois plus élevée (269,7 µg/mL) pour arriver à seulement 60,4% inhibition du monoxyde d'azote. On observe de très bons résultats pour les concentrations les plus élevées de l'extrait (à 80µg/ml = 88,4% et 160µg/ml= 97,9%). De plus, aucune toxicité cellulaire n'a été révélée.

14.4.2.6. Activité antivirale sur Herpès Simplex Virus (HSV-1)

Les résultats de l'activité antivirale sur l'herpès sont présentés sur la figure suivante :

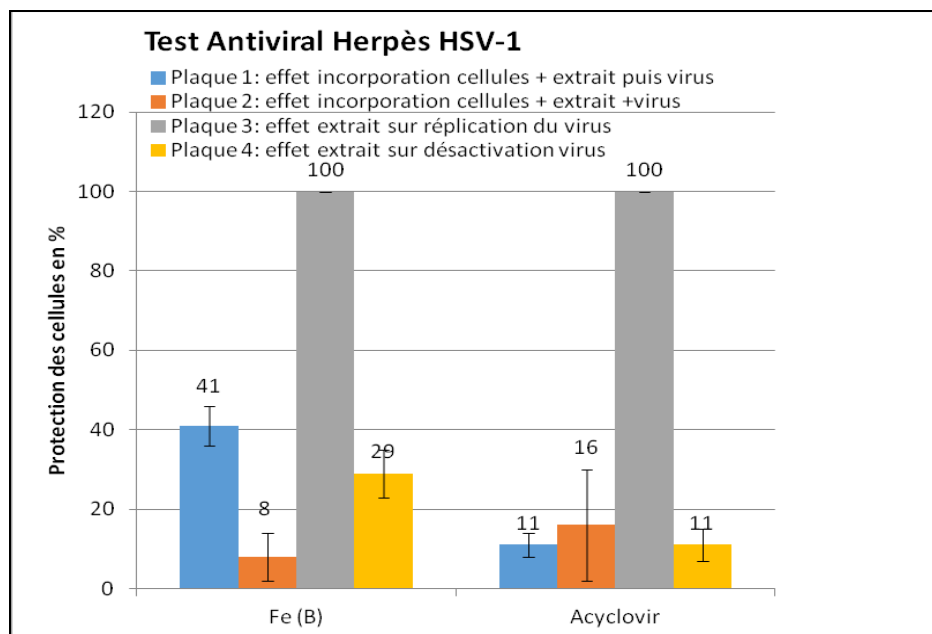


Figure 170 : Evaluation de l'activité antivirale de l'extrait brut alcaloïdes de feuilles sur le virus de l'Herpès

Au test antiviral sur le virus de l'Herpès, nous constatons que l'extrait testé présente les mêmes caractéristiques que l'acyclovir (agent antiviral de référence). Très actif au niveau de la réplication du virus avec un pourcentage maximal de 100 % de protection (plaque 3), il présente une activité très moyenne inférieure à 45% en ce qui concerne la protection de la cellule infectée par le virus (plaque 1 et 2) et un niveau de protection très faible (inférieur à 20%) lorsque le test est réalisé directement sur le virus.

Même s'il ne présente aucune activité antibactérienne vis-vis de *S. aureus* et *E. coli*, l'extrait brut alcaloïdes de feuilles montre une très grande variété d'activités biologiques :

- activité anticancéreuse moyenne sur les cellules du cancer du poumon et plus particulièrement les cellules du côlon, mais toxique sur les cellules saines,
- activité antioxydante très forte au test chimique (ORAC) et biologique (cellules saines),
- activité antifongique très élevé sur la bactérie *C. albicans*,
- activité antivirale maximale (100%) sur la réplication du virus de l'herpès,
- activité anti inflammatoire très importante et aucune toxicité sur cellules saines.

Tous ces résultats sont donc une source de valorisation importante de ce végétal d'autant que les extraits proviennent de la partie aérienne et que leur exploitation ne mettra pas l'espèce en péril. Les nombreuses données obtenues feront l'objet d'une publication.

Récapitulatif

Les résultats des tests biologiques réalisés sur l'ensemble des échantillons présentés dans les paragraphes précédents sont regroupés dans le tableau ci-dessous. L'appréciation des activités a été faite sur la base des références utilisées pour chaque test.

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
	A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire	<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Herpès HSV-1		Maladie Alzheimer
Huiles Essentielles												
Fe A	-	-	+	-	n.d	-	-	-	-	++	++	n.d
Fe B	+++	+++	+++	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	++	n.d
Ec A	-	-	-	-	n.d	-	-	-	-	++	++	n.d
Ec B	++	++	+++	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Fr	+++	+++	+++	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	++	n.d

- : Aucune activité ; + : Activité faible ; ++ : Activité moyenne; +++ : Activité forte ;

n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon; DLD-1 : cellules cancer côlon; WS-1 : cellules saines

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
	A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire		<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>			
										Herpès HSV-1		Maladie Alzheimer
Extraits cyclohexane												
Fe A	-	-	-	-		+	-	-	-	+	-	n.d
Fe B	+	+	+	-		+	-	-	-	+	+++	n.d
Ec A	-	-	-	-		+	--	-	-	+	++	n.d
Ec B	+	+	+	-		+	-	-	-	++	++	n.d
Fr	+	+	+	-		+	-	-		+	+++	n.d

- : Aucune activité ; + : Activité faible ; ++ : Activité moyenne ; +++ : Activité forte ;

n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon; DLD-1 : cellules cancer côlon; WS-1 : cellules saines

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
	A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire		<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>			
										Herpès HSV-1		Maladie Alzheimer
Extraits polaires												
Fe A												
Acétone	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d
Éthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d
Méthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+	+++	n.d
Fe B												
Acétone	-	-	-	+++	++	+++	-	-	+++	+++	++	n.d
Éthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+++	+++	n.d
Méthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	++	n.d	n.d

- : Aucune activité ; + : Activité faible; ++ : Activité moyenne ; +++ : Activité forte ;

n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon; DLD-1 : cellules cancer côlon; WS-1 : cellules saines

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
	A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire		<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>			
										Herpès HSV-1		Maladie Alzheimer
Extraits polaires												
Ec A												
Acétone	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	++	++	n.d
Éthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d
Méthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d
Ec B												
Acétone	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	++	++	n.d
Éthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+++	+++	n.d
Méthanol	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d

- : Aucune activité; + : Activité faible; ++ : Activité moyenne; +++ : Activité forte ;

n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon; DLD-1 : cellules cancer côlon; WS-1 : cellules saines

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
	A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire		<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>			
										Herpès HSV-1		Maladie Alzheimer
Extraits polaires												
Fr												
Acétone	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+	++	n.d
Éthanol	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	-	+++	n.d
Méthanol	-	-	-	+++	++	++	-	-	-	-	+++	n.d
Thé vert												
Acétone	-	-	-	+++	++	+++	+	-	-	+++	++	n.d
Éthanol	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d
Méthanol	-	-	-	+++	++	+++	-	-	-	+++	++	n.d

- : Aucune activité ; + : Activité faible ; ++ : Activité moyenne ; +++ : Activité forte ;

n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon ; DLD-1 : cellules cancer côlon; WS-1 : cellules saines

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
	A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire	<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Herpès HSV-1		Maladie Alzheimer
Extraction liquide liquide extrait Fe B												
CH₂Cl₂	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+++	++	n.d
AcOEt	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	++	+	n.d
MeOH	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	++	++	n.d
H₂O	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	++	++	n.d
Fractionnement extrait aqueux Fe B												
A	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+	+	n.d
B	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+	+++	n.d
C	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+	n.d	n.d
D	n.d	n.d	n.d	++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+	+	n.d
E	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	++	++	n.d
F	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+++	-	n.d
G	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	n.d

- : Aucune activité ; + : Activité faible ; ++ : Activité moyenne ; +++ : Activité forte ;
n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon; DLD-1 : cellules cancer côlon; WS-1 : cellules saines

Activités testées	Anticancéreux : Résazurine			Antioxydant			Antifongique	Antibactérien		Antivirale	Anti-inflammatoire	Activité neuroprotectrice
		A-549 CCL-185	DLD-1 CCL-221	WS-1 CRL-1502	ORAC	DPPH	Cellulaire	<i>Candida albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Herpès HSV-1	
Fractionnement de E issu de l'extrait de Fe B (keampférol-3-O-rhamnoside)												
E6	n.d	n.d	n.d	+++	n.d	+++	n.d	n.d	n.d	+	n.d	n.d
Alcaloïdes												
Fe A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	+++
Fe B	++	+++	++	+++	n.d	+++	+++	-	-	++	+++	+++
Ec A	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	+++
Ec B	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	+++
Fr	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	+++

- : Aucune activité ; + : Activité faible ; ++ : Activité moyenne ; +++ : Activité forte ;

n.d : activité non déterminée

A-549 : cellules cancer poumon ; DLD-1 : cellules cancer côlon ; WS-1 : cellules saines

Les huiles essentielles des feuilles, des écorces et des fruits récoltés lors de la fructification (stade B) agissent principalement contre les cancers du poumon et du côlon. Cette activité anticancéreuse est certainement due au trans- α -bergamothène, composé commun aux trois essences. Mais aussi à la présence du β -élémane (**112**), composant actif utilisé en Chine pour traiter certains cancers (leucémie, tumeur cérébrale cancer du sein, cancer du foie et cancer du poumon) [Liu Jing, 2011; Zhou H. *et al.* 2003; Zou L. *et al.* 2001 Yuan J. *et al.* 1999; Qian J. *et al.* 1999 Zheng S. *et al.* 1997; Qingdi Q. *et al.* 2009]. Ces huiles essentielles montrent une légère toxicité sur les cellules saines. Celle-ci peut s'expliquer en partie par la présence de l' α -humulène (**15**) dont la cytotoxicité a déjà été démontrée [Adil el Hadri *et al.* 2010]. Une étude d'Arnobio *et al.* a cependant montré qu'un extrait de *N.membranacea* n'est pas capable de causer des dommages aux lymphocytes humains [Arnobio A. *et al.* 2011]. Les huiles essentielles présentent également une activité anti-inflammatoire moyenne. Les composés *a priori* responsables de cette activité sont principalement l' α -humulène [Adil el Hadri *et al.* 2010], le β -caryophyllène [Legault J et Pichette A. 2007] et l' α -pinène [Duke, 1998]. Les huiles essentielles des feuilles et des écorces au stade A ont une activité antivirale sur le virus de l'herpès (les autres échantillons n'ayant pas pu être testés). Néanmoins, aucune activité antioxydante forte n'ont été révélés au test de l'ORAC (sur les H.E Feuilles et écorces stade A).

Comme les H.E., les extraits apolaires (cyclohexane) ne montrent pas d'activité antioxydante au test de l'ORAC et sur cellule. L'activité anti-inflammatoire est moyenne. et l'activité antivirale sur l'herpès est faible.

Les extraits polaires sont riches en polyphénols totaux particulièrement les feuilles. Ils sont de forts antioxydants. (Tests DPPH, ORAC et cellulaire). Cette activité est due à la présence de polyphénols dans la plante, en particulier de flavonoïdes, dont les deux glycosylés isolés et identifiés (kaempférol-3-O-rhamnoside (**133**) et quercétine-3-O-rhamnoside (**89**)). L'activité antioxydante du β -caryophyllène (**14**), a déjà été démontrée [Legault J. et Pichette A. 2007]. Le kaempférol-3-rhamnoside a été ici évalué et s'est révélé être un antioxydant fort avec une activité anti-inflammatoire plus ou moins forte ainsi qu'une faible activité antivirale sur l'herpès. Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres grâce à leur propriété de donateurs d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupements phénoliques [Sandhar *et al.* 2011]. La capacité des flavonoïdes à donner des hydrogènes augmente avec l'augmentation de l'hydroxylation de leurs cycles phénoliques.

Ainsi, pour le kaempférol, la quercétine et la myricétine, l'activité antioxydante est croissante en fonction des groupements –OH de la molécule. Les extraits polaires présentent également une très forte activité antivirale sur le virus de l'herpès, agissant sur la protection, l'absorption, la réplication et la désactivation du virus. L'activité anti-inflammatoire est notable. Et pour finir, seul l'extrait acétone de feuilles stade B, révèle une forte activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus*.

Les extraits alcaloïdes révèlent une activité neuroprotectrice. L'étude mérite d'être poussée pour une éventuelle utilisation dans un traitement de la maladie d'Alzheimer. L'extrait testé (Fe B) présente également une activité anticancéreuse sur les cancers du poumon, et du côlon avec une toxicité moyenne sur cellules saines. Cet extrait est un très bon antioxydant (ORAC et cellulaire) et un très fort agent antifongique sur *Candida albicans*. On observe également un pouvoir anti-inflammatoire intéressant et une activité antivirale (Herpès) moyenne. Toutes ces propriétés sont à priori principalement dues à la boldine (**98**) [Fernandez *et al.* 2009, Backhouse *et al.* 1994, Jang YY *et al.* 2000, O'Brien *et al.* 2006, Jiménez L. *et al.* 2000, Speisky H., *et al.* 1991], mais également à l'actinodaphnine (**137**) [Hsieh TJ *et al.* 2006].

En synthèse, *Nectandra membranacea* est une plante qui présente de nombreuses activités biologiques :

- Activité antioxydante très importante quelle que soit la partie de la plante et l'étude réalisée (huiles essentielles, polyphénols, et d'alcaloïdes).
- Activité antivirale principalement des extraits polaires de feuilles et des écorces sur le virus de l'herpès.
- Activité anti-inflammatoire, moyenne dans les huiles essentielles, meilleure dans les extraits polaires.
- Activité neuroprotectrice contre la maladie d'Alzheimer, des extraits alcaloïdes des feuilles, écorces et fruits.
- Activité anticancéreuse des huiles essentielles et de l'extrait alcaloïdes de feuilles sur le cancer du poumon et du côlon mais cytotoxiques aussi sur les cellules saines.
- Activité antibactérienne

L'activité bactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, les flavonoïdes, et les alcaloïdes pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquence des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort [Rhayour, 2002].

La variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre de leur contenu en composés polyphénoliques. Selon Chabot et *al.* 1992, l'activité microbienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyles OH sur leur cycle B sont plus actifs vis-à-vis des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle. D'après Mori et *al.* 1987,

les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués en 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

D'autres travaux [Sarker et *al.* 2005] montrent que l'effet d'un extrait est probablement dû à la synergie entre le nombre de composés, lorsqu'ils sont séparés, ils deviennent inactifs individuellement.

Il faut également se rappeler que l'activité des principes actifs serait aussi liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante [Moussaid et *al.* 2012].

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux de recherche ont apporté une forte contribution à l'étude phytochimique et à la connaissance du potentiel biologique de l'espèce *Nectandra membranacea* de Guadeloupe.

L'un des objectifs de la présente étude était la recherche de nouveaux composés naturels, d'intérêt. Les extraits provenant de différentes parties de *Nectandra membranacea* (feuilles, écorces et fruits) récoltées lors de la germination (stade A) et de la fructification (stade B), ont été évalués à l'aide de méthodes de criblages chimique et biologique qui ont permis de mettre en évidence les plus intéressants au niveau de l'activité biologique.

Différentes familles de composés ont été extraites à partir du matériel végétal (terpènes, corps gras, polyphénols et alcaloïdes). Les huiles essentielles, se sont révélées riches en composés sesquiterpéniques et plus particulièrement en β -élémane dans toutes les parties de la plante. La composition chimique des huiles essentielles des feuilles est néanmoins très différente de celle des écorces. Plusieurs activités biologiques des huiles essentielles ont été mises en évidence pour les différentes parties de la plante (anticancéreuse, antioxydante, anti-inflammatoire, antivirale).

L'analyse des composés apolaires a montré une très faible présence d'acides gras libres dans les différentes parties étudiées, souvent moins de 2% dans les extraits hexane. Les acides myristique, palmitique, linoléique, oléique, et stéarique ont été identifiés. A ce niveau, il n'existe pas de différences notables entre les compositions des parties aux deux stades de récolte. Des traces des sesquiterpènes identifiés dans les huiles essentielles sont également retrouvées dans la partie lipidique. Les principales activités biologiques mises en évidence dans notre étude au niveau de ces extraits, sont les activités anti-oxydante et anti-inflammatoire, plus particulièrement dans les feuilles (stade B) et les fruits.

L'extraction des composés polaires réalisée à l'aide de trois solvants (éthanol, méthanol et acétone) suivie d'un dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu, a montré une grande richesse en polyphénols des différentes parties de la plante, plus particulièrement au niveau des feuilles dont la teneur des extraits s'est révélée deux fois plus importante que celle des feuilles de thé vert. Nous avons pu logiquement mettre en évidence

une activité antioxydante très marquée, certains extraits étant comparables à la quercétine ou au trolox. Les écorces ont montré une activité antivirale particulièrement importante contre l'herpès, celle des feuilles bien que moindre, reste notable. Les fruits se sont révélés anti-inflammatoires.

Sur la base des résultats obtenus lors du criblage biologique, les feuilles récoltées au stade B ayant montré un fort pouvoir antioxydant et anti-inflammatoire, cet extrait a été sélectionné pour une investigation phytochimique approfondie.

Une chromatographie liquide a permis d'isoler sept fractions notées de A à G. Le suivi de l'activité antioxydante a montré que cette dernière est forte pour toutes les fractions. Les fractions E, F, G ont également révélé une activité anti-inflammatoire.

Deux flavonoïdes glycosylés de la fraction E, isolés pour la première fois dans l'espèce, ont été identifiés. Ils ont montré une activité antioxydante. Il s'agit de la quercétine-3-O-rhamnoside et du kaempférol-3-O-rhamnoside.

Une analyse GC-MS a permis de mettre en évidence dans cet extrait enrichi en polyphénols la présence de onze alcaloïdes identifiés par comparaison de leur spectre de masse avec des standards. Il s'agit de la boldine, la réticuline, la N-méthyllaurotétanine (présente aussi dans l'extrait d'écorces stade B), la domesticine, la N-éthyl-5,6-diméthoxy-3-méthyl-2-(4'-méthoxyphényl)-1H-indole, la 11,12-dihydro-2,3,8,9-tétraméthoxy-1H-indolo-[2,1,α]isoquinoline, la 6,9,10-triméthoxy 12 H-benz [6,7] oxepino-2,3,4-isoquinoline, la nanténine, l'actinodaphnine, la bulbocapnine et la 1,2,3,4-dététrahydronorreticuline (ou 1,1-diméthyl-1,2,3,4-tétrahydro-6,7-isoquinolinediol). Les sept derniers composés sont pour la première fois identifiées dans le genre *Nectandra*.

Une extraction spécifique des alcaloïdes à partir des différentes parties de la plante a permis de mettre en évidence cinq alcaloïdes supplémentaires dans les feuilles, soit un total de seize dans les écorces et les feuilles. L'extrait de fruits ne contient pas d'alcaloïdes. Les molécules extraites uniquement des feuilles sont l'isoboldine et pour la première fois dans le genre, la salsoline, isodomesticine, le 1-[(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthyl]-6-méthoxyisoquinolin-7-ol et la N-méthylcrotonosine.

Deux autres alcaloïdes sont identifiés par GC/MS, pour la première fois chez *Nectandra*, dans un extrait enrichi en polyphénols, il s'agit du norboldine et du 4,5,6,6a-tétrahydro-1,9-dihydroxy-2,10-diméthoxy-benzocycloheptano[2,3,4,i,j] isoquinoline.

Si les 18 alcaloïdes ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse, trois composés isolés des feuilles ont été analysés par méthodes spectroscopiques combinées. Il s'agit de la N-méthylcrotonosine, de l'isoboldine, et de la N-méthyllaurotétanine. Identifiés aussi pour la première fois dans le genre.

Parmi ces 18 structures, on distingue 9 de type aporphines, 1 proaporphine, 6 isoquinoléines et 2 indolo-isoquinoléines. 13 d'entre elles sont identifiées pour la première fois chez *Nectandra*.

Les extraits alcaloïdes ont montré un effet neuroprotecteur pour la maladie d'Alzheimer, qui reste modéré comparé au facteur de croissance GDN, la référence utilisée pour ce test. Les résultats obtenus nous ont cependant amenés à faire un fractionnement dans le but d'augmenter le pouvoir neuroprotecteur et d'identifier la molécule chimique qui pourrait être neuroprotectrice.

Nectandra membranacea s'est révélée être une espèce plus riche en alcaloïdes qu'en polyphénols. Des huiles essentielles et des lipides ont également été extraits de la plante et analysés. Les différentes activités biologiques testées ont donné des résultats très intéressants qui pourront être valorisés dans les milieux pharmaceutiques et cosmétiques.

Les premières applications pharmaceutiques et cosmétiques qui pourraient être envisagées concernent le virus de l'herpès. Le domaine neuroprotecteur contre la maladie d'Alzheimer mérite d'être approfondi. Nos extraits ouvrent une nouvelle voie d'exploitation notamment concernant l'identification des molécules neuroprotectrices.

MATERIEL ET METHODES

15. Matériel

15.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles, écorces, fruits, récoltés lors de deux périodes du cycle de floraison de la plante :

- la germination qui correspond au stade A
- la fructification, le stade B.

Le matériel végétal est récolté à Duquerry, à Petit-Bourg (Guadeloupe). Un spécimen est déposé à l'herbier de l'Institut National de Recherche Agroalimentaire (INRA, Petit-Bourg).

15.2. Extractions

L'ensemble des méthodes chromatographiques utilisées est présenté ci-dessous.

La **chromatographie sur couche mince** (CCM) est utilisée pour le suivi et le contrôle des purifications des produits analysés. Les plaques utilisées pour la réalisation des CCM ont un support en verre ou en aluminium, (SiliaPlate Silicycle Ultrapure Silica Gels), recouverte de gel de silice 60 F254, 250 μm (20 X 20 cm). Les échantillons sont préparés à la concentration de 10mg/mL. 40 μL de chaque échantillon est déposé.

Les CCM préparatives sont en verre et recouvertes de gel de silice PLC Silica Gel 60 F-254 (20 X 20 cm) et d'épaisseur 1mm (Merck KGaA). Différents systèmes d'élution sont utilisés pour les différentes classes de composés étudiés :

- AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100-11-11-20) et (100-11-11-27)

- CHCl₃-MeOH (5-1) et (26-14)

La vaporisation des réactifs chimiques sur les CCM permettent de compléter les observations visuelle sous lampe UV à 254 nm et 365 nm. Le réactif utilisé permet de mettre en évidence des constituants ou classe de constituants présents dans un extrait.

Les révélateurs de molécules utilisés dans ce travail sont :

- le réactif de Dragendorff pour les alcaloïdes qui apparaissent sous forme de taches oranges.
- l'acide sulfurique 20% dans méthanol, pour tous les composés phénoliques et autres composés : plusieurs colorations sont visibles en fonction du type de composés.
- Le réactif Neu ou NP/PEG utilisé pour révéler les flavonoïdes. Pour la préparation, il faut une solution d'acide amino-2-éthylidiphénylborique (1g dans 100 ml de méthanol) et une solution de PEG (5g dans 100 ml d'éthanol). La solution d'acide est pulvérisée puis la solution de PEG. La plaque est ensuite chauffée à 110°C pendant 2 minutes environ. On observe à la lampe UV 365 nm, les flavonoïdes qui apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.

Après révélation, les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur du rapport frontal (Rf) qui peut être comparée à celle de la littérature ou à celles des étalons.

Cette valeur correspond à $R_f = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}}$

Deux types de chromatographies sur colonne ouverte sont utilisés : sur gel de silice et sur Diaion HP 20 : chromatographie d'adsorption.

La **chromatographie sur colonne ouverte**, de diamètre choisi selon la masse du produit à purifier est remplies de gel de silice, silicycle ultra pure Silica Gels SiliaFlash® G60 référence de granulométrie comprise entre 60 et 200 µm. Pour une bonne séparation, 50 fois le poids de silice par rapport au poids de l'échantillon à étudier est utilisé. Le mélange à purifier est déposé sur la silice et élué avec un gradient de solvants de polarité croissante déterminée préalablement sur plaque CCM.

La **chromatographie d'adsorption** permet un débit d'élution rapide. C'est une résine de type acrylique basé sur une matrice polymère de type gel constitué de styrène-divinylbenzène (Diaion HP-20). Utilisée pour les composés hydrophobes tels que les antibiotiques, les biomolécules. Il dispose d'une fonctionnalité d'amine tertiaire à haute efficacité de régénération. La matrice polymère acrylique assure une bonne stabilité chimique et une bonne résistance. La taille des particules est de 250-850 μ m, la taille des pores est d'environ 1,30 volume poreux mL par gramme dont l'aire de la surface est de 500m²/g et la densité de 1,01 g/mL à 25°C.

15.3. Chromatographie

D'autres techniques de chromatographie sont utilisées pour la séparation des composés.

La **chromatographie liquide haute pression performance couplée à la détection UV-visible à barrettes diode** (HPLC/DAD/UV). Les diverses fractions obtenues à partir de l'extrait végétal sont ainsi analysées. Ces analyses sont réalisées sur un système VARIAN PROSTAR model 335, composé d'un dégazeur (degassit Metachem DC 24V, 1A), de pompes quaternaires (Quat Pump model 335), d'un passeur d'échantillons (Autosampler Model 410 Varian Prostar) et d'un détecteur à barrettes diodes (DAD).

La **chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse UPLC-MS** (Modèle 1100 series Agilent). Cette technique permet d'analyser la composition de mélange complexe et est muni d'un dégazeur à membrane, d'une pompe quaternaire 5ml/min et d'un injecteur automatique. Il comprend aussi un détecteur UV-DAD. Le MS est de la marque Agilent 1100 Serie LC/MSD avec source APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique).

La **chromatographie liquide à haute performance préparatif** (HPLC-PREP) permet d'isoler les composants d'un mélange simple. Les analyses sont réalisées sur une HPLC modèle 1100 séries Agilent avec le logiciel Purify software pour la préparative, comprenant deux pompes hautes puissances 100 ml/min, un injecteur automatique, un détecteur UV et un collecteur de fractions.

La **chromatographie gazeuse à spectrométrie de masse GC-MS** utilisée est de la marque Agilent Technology 7890A avec un système à injecteur automatique. Le MS de marque 5975C inert XLEI/CI MSD Triple-Axis Detector avec double source EI (ionisation électronique) et CI (ionisation chimique).

Les solvants utilisés sont des solvants commerciaux de qualité technique pour les analyses : cyclohexane, méthanol, éthanol, chloroforme, acide formique. Pour l'HPLC, les solvants sont de grade HPLC : méthanol et acétonitrile. Nous avons également utilisé de l'eau milliQ.

15.4. Analyses physicochimiques

Les **lampes UV** de marque BIOBLOCK Scientific aux longueurs d'ondes suivantes $\lambda = 254$ et 365 nm (220 V, 50 Hz) sont utilisées pour révéler les plaques CCM.

Les échantillons sont dissous dans le méthanol et mesurés à partir d'un **spectromètre Ultra-Visible**, VARIAN Cary 50 BIO pour l'activité antiradicalaire et pour l'étude du dosage de polyphénols totaux.

La **spectrométrie infra-rouge (IR)** a été utilisée pour réaliser les spectres IR des composés. L'appareillage est de marque PerkinElmer, Spectrum 65, FT-IR spectrometer. Les analyses sont effectuées sur une pastille de NaCl. Le solide est dilué dans de l'acétone et déposé sur la pastille de NaCl à l'aide d'une pipette pasteur puis séché. Le spectre est enregistré entre 450 et 4000 cm^{-1} .

La **spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)** est la méthode utilisée pour l'identification des composés naturels isolés. Les solvants deutérés utilisés pour les mesures RMN sont CDCl_3 , DMSO- d_6 , Acétone- d_6 , méthanol.

Le DEPT 135 est une technique qui permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. Elle met en évidence les carbones primaires CH_3 , secondaires CH_2 et tertiaires CH .

Des mesures bidimensionnelles sont effectuées COSY, HSQC et HMBC. Les séquences multi-implusionnelles (Sadler et *al.*1988) aboutissent à l'obtention de figures de corrélation qui favorisent l'interprétation sans équivoque des spectres monodimensionnels et qui permettent

l'établissement de la séquence de la chaîne osidique et de la position des liaisons hétérosidiques.

Parmi ces procédés, la **COSY** ^1H - ^1H (Corelation Spectroscopy) qui permet de mettre en évidence les couplages 2J et 3J et de les distinguer d'après l'orientation des taches de corrélation vis-à-vis de la diagonale (Siddiqui et *al.* 1992) a été utilisée.

L'expérience **HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence) permet de mettre en évidence le couplage $^1J_{(\text{H-C})}$ entre les carbones et les protons auxquels ils sont liés (Muller et *al.* 1979). Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

L'expérience **HMBC** (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity) met en évidence les couplages longues distances hétéronucléaires $^2J_{(\text{H-C})}$ et $^3J_{(\text{H-C})}$ et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons (Bax et *al.* 1986)

Les mesures RMN ont été effectuées sur spectromètre Modèle Avance 400 MHz Bruker, dont le champ magnétique est de 9,4 T résonance du proton à 400 MHz. Sonde QNP sensible à quatre noyaux ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . Piloté par le logiciel « Team Viewer 8 (Xwin-NMR version) »

Le **bain à ultrasons** de marque VWR Ultrasonic Cleaner est utilisé pour les extractions sur les matières végétales étudiées.

Une **étuve** MEMMERT Type VL 50 (220V, 50/60 HZ, 2800 W), est utilisée pour sécher le matériel végétal.

Le **Lyophilisateur** utilisé est un modèle FreeZone (Labconco) qui permet de lyophiliser plusieurs échantillons à la fois.

15.5. Souches bactériennes

Le suivi-bio guidé, qui s'inscrit dans la démarche adoptée, a été fait grâce aux différents tests biologiques suivants :

Candida albicans est une levure faisant partie de la flore commensale gastro-intestinale, buccale et vaginale de l'être humain. Ce champignon microscopique peut cependant devenir pathogène chez les personnes dont les mécanismes de défense sont déficients, comme par exemple chez les patients du SIDA. Les résistances du microorganisme à l'arsenal thérapeutique existant étant de plus en plus nombreuses, il est nécessaire d'identifier de nouveaux composés toxiques pour cette levure.

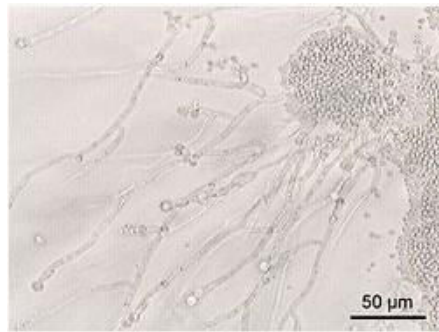


Figure 171 : *Candida albicans* sur lame [Y Tambe, 2005]

Escherichia coli, notée *E. coli*, appelé colibacille est une bactérie intestinale des mammifères très commune chez l'être humain. Elle compose 80 % de notre flore intestinale. Certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites ou Sepsis.



Figure 172 : Grossissement x 10 000 de l'*Escherichia coli* [Eric Erbe, 2005]

Staphylococcus aureus (SARM) est caractérisé par sa résistance à un antibiotique, la méticilline. Responsable des intoxications alimentaires, d'infections localisées et dans certains

cas extrêmes, des septicémies physiques (greffes, prothèses cardiaques), le *S. aureus* se présente comme une coque en amas (grappes de raisin).

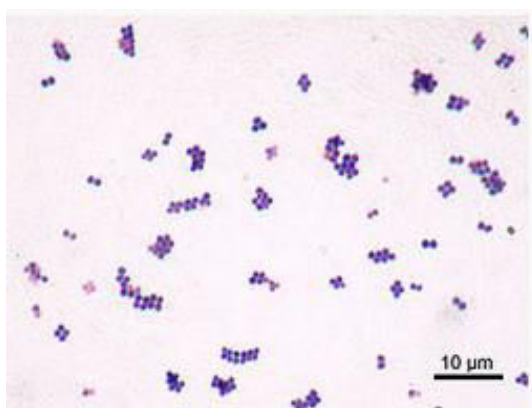


Figure 173: *Staphylococcus aureus*, Photographier au microscope [Y Tambe, 2005]

Le Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales de Chicoutimi (LASEVE) dispose de nombreuses souches cellulaires. Le tableau suivant présente les différentes cellules utilisées pour les tests biologiques réalisés sur nos échantillons.

Tableau 49 : Cellules souches (LASEVE)

Cellules	Sources	Organisme	Commentaires
A-549	CCL-185	Homo sapiens, Humain	Carcinome pulmonaire
DLD-1	CCL-221	Humain	Adénocarcinome colorectal
WS-1	CRL-1502	Humain	Fibroblaste cutané
RAW 264.7	TIB-71	Souris	Macrophages

16. Méthodes

Une première approche a été utilisée pour déterminer de façon qualitative les principales familles de produits naturels contenus dans le matériel végétal récolté. La détection de ces familles chimiques de substances naturelles constitue le criblage phytochimique. Puis, des tests biologiques sont réalisés sur les extraits bruts obtenus. L'isolement des principes actifs s'est fait ensuite par fractionnement bioguidé. Ces principes actifs font partis de groupes chimiques très

divers : alcaloïdes, flavonoïdes, composés phénoliques ou mélanges complexes : huiles essentielles, acide gras.

16.1. Criblage chimique

Il s'agit de déterminer les groupes chimiques présents dans chacune des parties de la plante récoltée. Cette étude se base sur la formation de complexes insolubles (réaction de précipitation) ainsi que sur la formation de complexes colorés (réaction de coloration).

Protocole Alcaloïdes

Quatre tests fondés sur la capacité des alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds ont été effectués dans différents milieux acides et basiques.

Milieu acide (non spécifique aux alcaloïdes) test 1

1 g de poudre végétale est mis à macérer avec 10 ml d'acide chlorhydrique pendant quelques minutes dans un tube à essai. Après filtration, 1 ml de filtrat est prélevé dans des tubes à hémolyse afin de réaliser les tests de Dragendorff et de Valser-Mayer fournis a respectivement une coloration orangée à rouge et un blanc jaunâtre pour chaque test, on ajoute 5 gouttes de réactif.

Le test est positif s'il y a un précipité dont l'intensité doit être appréciée. Un précipité n'implique pas forcément la présence d'alcaloïde, celui-ci pouvant être produit par divers corps (chlorures, amines diverses, protides solubles etc...). Il est donc nécessaire de confirmer la présence d'alcaloïdes par une extraction en milieu alcalin.

Milieu acide (non spécifique aux alcaloïdes) test 2

5 grammes de poudre végétale sont mis à macérer pendant 30 minutes avec 30 ml d'HCl 1N dans un tube à essai. Après filtration, ajouter 5 gouttes de réactif de Dragendorff ou de réactif de Valser-Mayer ou réactif de silico-tungstique dans 1 ml de filtrat selon le test. Le test est positif s'il y a un précipité dont l'intensité doit être appréciée.

Milieu basique (spécifique des alcaloïdes) test 1

Dans une fiole, mouiller 5 à 10 g de poudre avec 1 ml d'ammoniaque 1N, ajouter 30 ml de mélange de solvant, éther-chloroforme (3-1), boucher et laisser macérer 24 heures en agitant. Filtrer et épuiser le filtrat par 10, 5 et 5 ml de solution d'acide chlorhydrique 2N. Les tests sont faits sur 1 ml de la phase aqueuse dans des tubes à hémolyse en ajoutant 5 gouttes de réactif (Dragendorff, Valser-Mayer ou silico-tungstique).

Milieu basique (spécifique des alcaloïdes) test 2

Dans une fiole, mouiller 5 à 10 g de poudre avec 1 ml d'ammoniaque 1N. Ajouter 30 ml de mélange de solvant, éther-chloroforme (3-1), boucher et laisser macérer 24 heures en agitant. Filtrer et épuiser le filtrat par 10, 5 et 5 ml de solution d'HCl 2N. Les tests sont faits sur 1 ml de la phase aqueuse dans des tubes à hémolyse en ajoutant 5 gouttes de réactif (Dragendorff, Valser-Mayer ou silico-tungstique).

Protocole : Polyphénols

Préparation de l'infusé 1 : Mettre 20 g de poudre végétale dans 200 ml l'eau bouillante dans un erlenmeyer, boucher, puis laisser infuser 20 minutes. Filtrer après refroidissement.

Préparation de l'infusé 2 : Mettre 5 g de poudre végétale à bouillir avec 100 ml d'eau. Filtrer après refroidissement.

Les phénols

Dans un tube à hémolyse, mélanger 2 ml d'infusé 1 et 1 ml de FeCl₃ à 3% dans une solution d'HCl 0,5 N. Le résultat est positif pour une coloration bleue virant au noir.

- Les flavonoïdes (1)

Mélanger dans l'ordre, les 3 réactifs : 2 ml d'infusé (1), 2 ml d'HCl 37% (0,1M) et 0,2 g de magnésium en poudre. Le résultat est positif pour la coloration orangée ou rouge.

- Les flavonoïdes (2)

Cette réaction dite de la « cyanidine » consiste à traiter les solutions hydroalcooliques de ces pigments en milieu acide chlorhydrique par le magnésium. Dans un tube à essai, mélanger 5 ml d'infusé (2), 5 ml d'HCl 37% (0,1M), et 0,5 g de magnésium puis faire glisser 1 ml d'alcool iso amylique doucement sur la paroi du tube, il doit surnager.

Les colorations :

- Orangée = flavones
- Rouge-cerise = flavonols
- Rouge-violacée = flavanones

La réaction est négative avec les chalcones et les isoflavones.

Protocole : Triterpènes et Stérols (1)

Agiter pendant 20 minutes 5 g de poudre végétale et 25 ml de chloroforme. Filtrer et concentrer le filtrat.

- A 3 ml du filtrat, ajouter 1 ml d'anhydride acétique puis 1 ml d'acide sulfurique. La réaction est positive si la coloration rouge-brune vire au brun-violacé.
- A 1 ml du filtrat, ajouter 1 ml d'acide chlorosulfonique. La réaction est positive si la coloration est rouge-violacée.

- **Les triterpènes et les stérols (2)**

Faire macérer 1 g de matière végétale avec 20 ml d'éther dans un flacon fermé pendant 24 heures. Filtrer et évaporer à l'air. Dans le résidu ajouter 2 gouttes l'anhydride acétique puis 1 goutte d'acide. La réaction est positive si la coloration mauve vire au violet

- **Les anthocyanes**

Dans un tube, mélanger dans l'ordre les 3 réactifs : 2 ml d'infusé 1, 2 ml d'HCl 0,1M et quelques gouttes d'ammoniaque concentrée. Le résultat est positif pour une coloration rose-rouge virant au bleu-violacé.

- **Les flavanes**

Mélanger 2 ml d'infusé 1 à quelques gouttes de vanilline 2% dilués dans l'acide chlorhydrique concentré. La réaction est positive pour une coloration rouge.

- **Les proanthocyanidols**

Mélanger 2 ml d'infusé 1 à 2 ml d'acide chlorhydrique concentré dans un tube à essai, qui sera placé dans un bain marie bouillant pendant 5 minutes. La réaction est positive pour une coloration rouge.

- **Les coumarines**

Dans un tube à essai, mettre 1 à 2 g de poudre et 1 ml d'eau. Placer un papier imprégné de soude 0,2 N dans la partie supérieure du tube. Placer ensuite le papier sur une lampe UV. La réaction est positive pour une fluorescence jaune.

- **Les saponosides**

Dans un tube à essai de 160 mm de diamètre : agiter 15 ml d'infusé 1 pendant 10 secondes à l'horizontale et laisser au repos 10 minutes. Noter la hauteur de la mousse en mm, s'il y a eu de la mousse.

- **Les tanins**

5 ml d'infusé 2 sont mis en présence de quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 1%. Une coloration pâle indique une faible teneur en tanins ($< 0,1\% \rightarrow +$) ; une coloration franche avec faible précipité, une teneur ($< 2\% \rightarrow + +$) ; enfin une couleur foncée accompagnée d'un précipité abondant est signe d'une teneur élevée en tanins (pouvant aller jusqu'à 50 à 70% $\rightarrow + + +$). Coloration bleu-noire : tanins galliques.

- Coloration brun-verte : tanins catéchiques

La réaction de la gélatine salée sur l'infusé permet de confirmer le résultat.

5 ml d'infusé 2 sont additionnés de 5 ml de gélatine à 10%. On dissout le chlorure de sodium dans l'eau distillée à chaud et on ajoute la gélatine. La solution limpide s'obtient par agitation fréquente au bain-marie. La rapidité avec laquelle se produit la floculation donne une indication sur l'importance de la teneur en tanins du décocté étudié.

- **Les dérivés anthraquinoniques**

- Les anthraquinones libres

Épuiser 2 ml d'infusé 1 par 5 ml de chloroforme et ajouter 0,5 ml d'ammoniaque 1N à la phase organique. Le résultat est positif si la phase aqueuse devient rose.

- Les hétérosides anthraquinoniques

Mélanger 2 ml d'infusé 1, 0,5 ml d'acide sulfurique 2N et 0,5 ml de FeCl₃ à 5%. Mettre le mélange au bain-marie bouillant pendant 30 minutes. Après refroidissement, épuiser le mélange par 5 ml de chloroforme. Ajouter 0,5 ml d'ammoniaque à 10% à la phase organique. Le résultat est positif si la phase aqueuse devient rouge.

- Les quinones

Humecter 1g de poudre végétale avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique 0,2 N, ajouter 5 ml de mélange de solvant éther-chloroforme (3-1). Laisser macérer 24 heures dans une fiole fermée. Filtrer.

- A 2 ml de filtrat, on ajoute 2 ml de la solution de soude à 0,1 N. Le résultat est positif si la coloration vire du rouge au violet.
- Évaporer à l'air 5 ml de filtrat, ajouter au résidu quelques gouttes d'éthanol, et d'acétate de nickel 5%. Résultats :
- Coloration bleue + précipité = benzoquinones
- Coloration violette = naphthoquinones
- Coloration rouge = anthraquinones

- **Les hétérosides cyanogénétiques**

Dans un tube, mélanger 1 à 2 g de poudre et 5 à 10 gouttes de toluène, boucher en coinçant à l'intérieur le papier imprégné de réactif micro-sodé. Placer le tube au bain-marie à 35°C pendant une nuit. Mettre le papier coloré en jaune clair en présence de vapeur d'acide cyanhydrique. Le résultat est positif si la coloration est rouge.

16.1.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles de *Nectandra membranacea* a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger.

M_v g de matière végétale fraîche est introduite dans un volume V d'eau, l'ensemble est porté à ébullition pendant 8 heures. Les vapeurs chargées d'essences, traversent le réfrigérant, se condensent et tombent dans un tube gradué pour décanter. L'eau et l'extrait volatil se séparent par différence de densité. L'huile essentielle est séchée sur du Na_2SO_4 , puis conservée dans un tube scellé sous azote et conservée à 4°C.

Tableau 50 : Masse de matières végétales fraîches récoltées

Partie de la plante	M_v : masse végétale (g)	V : volume d'eau
Feuilles ^a	1151,83 g	3,00 L
Feuilles ^b	2353,20 g	5,80 L
Ecorces ^a	1064,50 g	2,00 L
Ecorces ^b	1474,60 g	1,50 L
Fruits	151,60 g	0,13 L

16.1.2. Extraction des composés non-volatils

La méthode utilisée pour nos extraits est basée sur l'extraction par ultrasons. C'est une méthode simple, efficace, facile à mettre en oeuvre et peu coûteuse. Elle permet une augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique par rapport à une extraction classique.

Cette méthode permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. La nature de la matrice végétale est dépendante du rendement et de la cinétique d'extraction. La filtration est une étape limitante lorsque l'étude est réalisée sur de grandes quantités.

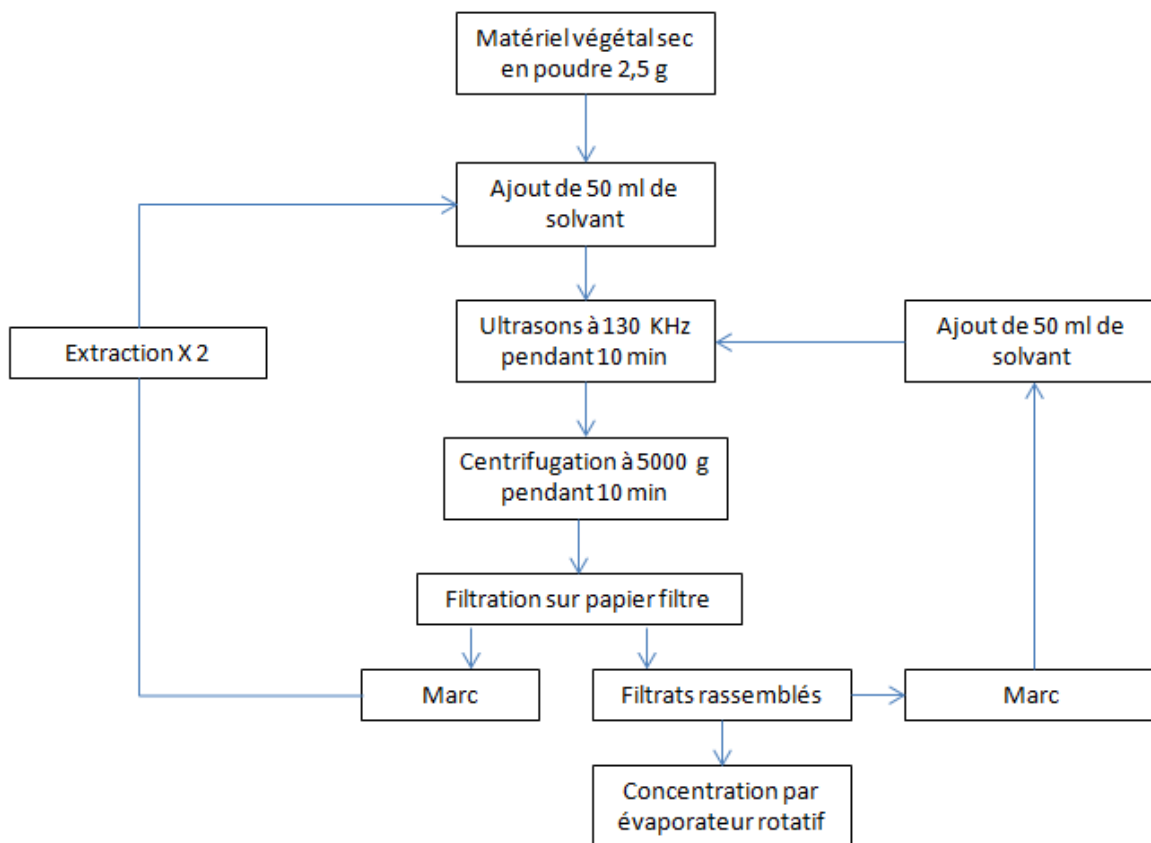


Figure 174: Schéma du protocole d'extraction des polyphénols

L'extraction a été réalisée sur 50 g de matière végétale pour les feuilles, écorces et fruits. La matière végétale subit d'abord un dégraissage au cyclohexane, puis l'extraction est réalisée de façon non successive à l'aide des solvants suivants : acétone, méthanol, éthanol.

Préparation de l'extrait pour l'isolation des polyphénols.

L'extrait le plus actif est concentré sous pression réduite puis dissout dans de l'eau distillée. Une extraction liquide-liquide est réalisée à l'aide des solvants suivants : tout d'abord au dichlorométhane afin de récupérer les composés apolaires suivi de l'acétate d'éthyle pour concentrer les composés polyphénoliques puis un rinçage au méthanol.

Les CCM des différentes fractions sont réalisées. La fraction aqueuse est chargée sur une colonne Diaion HP-20 et éluée avec 100% d'eau distillée puis avec un gradient de 30, 50, 80 et 100% de MeOH. Les fractions éluées possédant les mêmes motifs sur CCM sont regroupées. La séparation finale des polyphénols par HPLC-préparative munie d'une colonne C18 en phase inverse éluée avec un gradient ACN/H₂O acidifié 0,1% HCOOH.

16.2. Méthode de séparation

16.2.1. Huiles essentielles (GC/MS, GC/FID)

Les analyses de la composition chimique des huiles essentielles ont été réalisées au Laboratoire LASEVE (Québec, Canada) par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse MS. Les résultats ont été confirmés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur d'ionisation de flamme FID.

Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle par GC/MS et GC/FID.

L'analyse des constituants volatils est déterminée par chromatographie gazeuse GC sur Hewlett-Packard 6890 (détecteur FID) équipé d'une colonne polaire Supelcowax 10 (30 m×0,25 mm×0,25µm) et d'une colonne apolaire DB-5 (30 m×0,25 mm×0,25µm). Les analyses par GC-MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse Hewlett-Packard 5972 à 70 eV Hewlett-Packard 6890 couplé à une HP 6890 équipé d'une colonne DB-5 (la même que précédemment). Le programme de température est de 40°C pendant 2 min, puis un gradient de température de 2°C/min jusqu'à 210°C et enfin un palier pendant 33 min. Pour l'injection (split injector), 5mL d'huile essentielle est diluée dans 500 mL d'hexane, et 5 µL de la solution de dilution est injectée.

16.2.2. Extrait apolaire GC/MS et GC/FID

Préparation des extraits bruts pour analyse en GC/MS et GC /FID

Environ 500 mg d'extraits bruts sont pesés dans un vial ambré de 25 ml puis dilués dans un volume minimal de dichlorométhane. Afin d'enlever la chlorophylle, du charbon activé est ajouté (même quantité que le matériel organique solubilisé) puis filtré sur papier n° 4. Les échantillons sont évaporés puis mis sous vide.

Tableau 51 : Masse de produit après passage au charbon activé

Parties étudiées	Masse en g pesée dans un vial de 25 mL	Masse après passage sur charbon activé
Fruits	0,4756	0,1242
Feuilles^a	0,5482	0,3116
Feuilles^b	0,5077	0,2689
Ecorces^a	0,6653	0,0706
Ecorces^b	0,3432	0,0824

Environ 5mg de l'échantillon sont pesés pour procéder à la méthylation : activation du dichlorométhane avec le diazométhane, puis 300 à 400 µL de ce solvant est rajouté dans le vial de 1,5 ml contenant l'échantillon à méthyler. La solution est solubilisée à l'ultrason pendant quelques minutes. Afin de quantifier, 300 µL d'un standard interne est rajouté.

La solution du standard interne est préparée comme suit : à l'aide d'une micropipette, 40 µl caprate de méthyle (décanoate de méthyle), est placé dans une fiole jaugée de 10 ml, puis complété avec le dichlorométhane CH₂Cl₂ (densité du caprate de méthyle : 0,8730 g/mL).

Préparation des blancs : Les deux blancs sont analysés par GC/FID et par GC/MS suivant le protocole utilisé.

Blanc 1 : Dans un vial ambré de 25 ml, placer 10 ml de CH₂Cl₂, et ajouter 2 pointes de spatule de charbon activé. Agiter quelques secondes, et filtrer sur papier n°4. Évaporer le solvant jusqu'à 1 ml. 300 µl de ce solvant et 300 µl du standard interne préparé précédemment sont rajoutés.

Blanc 2 : Avec le montage et les réactifs pour la méthylation avec le diazométhane, 7 ml de CH₂Cl₂ sont traités. Puis, 300 µl du CH₂Cl₂ traité au diazométhane sont ajoutés à 300µl du standard interne préparé précédemment.

Analyse des extraits bruts pour analyse en GC/MS et GC/FID

La procédure d'analyse utilisée en GC/MS/FID est la même que celle appliqué pour les huiles essentielles. Seule la programmation de la température de l'enceinte thermostatée est modifiée.

Température initiale du four : 40 °C pendant 2 min.

Vitesse de chauffage du four de 40 à 210 °C : 2°C/min.

Température stationnaire à 210°C pendant 33 min.

Vitesse de chauffage du four de 210 à 260 °C : 10 °C/min.

Température finale du four à 260 °C pendant 25 min.

Temps total pour la chromatographie : 150 minutes.

16.2.3. Polyphénols HPLC/DAD-MS

La colonne chromatographie analytique utilisée est de la marque VARIAN Microsorb 100 C18, de dimensions 100 X 4,6 mm et la taille des particules de 3µm. La phase mobile est un gradient d'acétonitrile dans l'eau acidifiée à l'acide formique 0,1%. La concentration des échantillons est de 10 mg/mL. Avant analyse, l'échantillon est filtré à travers un filtre PTFE 0,45µm. Le volume d'échantillon injecté est de 20 µL. Les chromatogrammes sont enregistrés en UV visible par un détecteur à barrettes diodes entre 200 et 800nm. Les longueurs d'onde de visualisation sont : 280, 360, et 520 nm. Le temps d'analyse est de 45 min avec un débit de 1ml/min.

16.2.4. Alcaloïdes HPLC/DAD, GC/MS

L'analyse en HPLC/DAD est réalisée sur une colonne PHENOMENEX Luna 5µm PFP 100 A (250 X 10 mm). La phase mobile est composée d'un mélange d'un tampon phosphate de concentration 0,02 M ajusté à pH 4,5 avec une solution ammoniacale, d'acétonitrile et de méthanol (390/104/9). Le temps d'analyse est de 40 min et le débit de 3ml/min avec un volume

d'injection de 10 μ L. Les longueurs d'onde d'analyse sont 200 et 254 nm. Ces analyses permettent d'obtenir un profil chromatographique et une première séparation des extraits.

L'analyse en GC/MS des extraits bruts d'alcaloïdes est réalisée sur une colonne Agilent Technologie de 30 m avec un diamètre interne de 0,25 mm, de taille 0,25 μ m (serie US 6576616H). Les conditions d'étude sont les suivantes : le four est chauffé de 60 °C pendant 2min à 320 °C (15 min) (rampe 3°C/min), l'injecteur (inlet) 250°C et le split 50°C. Le volume d'injection est de 5 μ L et débit, constant, est de 1ml/min.

Séparation par chromatographie ouverte sur colonne de silice de l'extrait alcaloïde de feuilles

1,3113 g de l'extrait brut alcaloïdes de feuilles est séparé sur 150 g de silice (Silicycle 40-63 μ M). La colonne est conditionnée avec la silice et 500 ml de chloroforme.

L'élution se fait dans les conditions suivantes :

Système CHCl₃/MeOH	Volume (L)
40 : 1	11
35 : 1	1
30 : 1	1
20 :1	1
1 :1	1
Rinçage MeOH	0,5
Rinçage MeOH + 2% NH₄OH	0,5

Les CCM de contrôle sont réalisées dans un système CHCl₃/MeOH 7 :1, révélées sous UV 254 et 356 nm puis au réactif de Dragendorff.

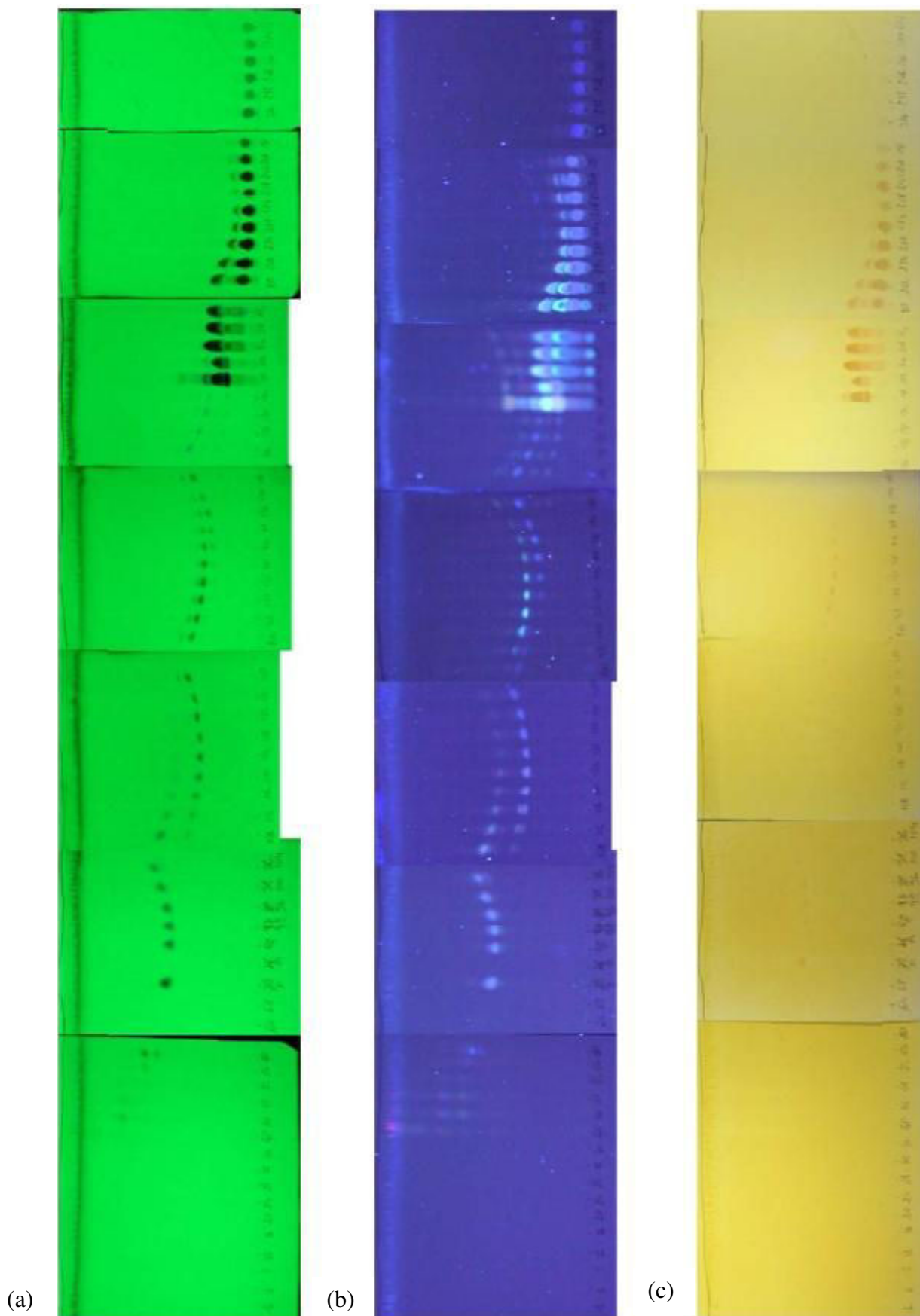


Figure 175 : CCM des fractions de la colonne ouverte de silice 254 nm (a), 365 nm (b), réactif de Dragendroff (c)

16.2.5. Analyse fractions E et F (HPLC analytique)

5,4 mg de JA sont prélevés et mis en solution dans 540 µL de MeOH (10 mg/mL) afin d'être analysé en LC-MS

Colonne		Agilent Zorbax Eclipse XDBC-18	
Longueur		250 mm	
Diamètre		4,6 mm	
Taille		5µm	
# série		USXW001361	
Conditions chromatographiques			
Solvant A		H ₂ O + HCOOH (0,1%)	
Solvant B		ACN + HCOOH (0,1%)	
Injection		5µL	
Débit		1mL/min	
Température colonne		30°C	
Méthode		10% B (5min) →30% B (5min) pendant 30 min	
DAD		Réf	
Longueur d'onde	BW.	Longueur d'onde	BW.
254 nm	100	360 nm	4
MS			
Mode		Scan	Positif
Masse range			
Low	50	High	100
fragmentor	70 V	Gain	1
MS spray chamber			
Ionisation mode		APCI	
Drying gaz flow		50 mL/min	
Nebulizer pressure		60 psig	
Drying gaz		350 °C	

Vaporizer	350 °C
Capillary voltage	
Positif	3000 V
Corona current	4 μ A

Chromatogramme obtenu :

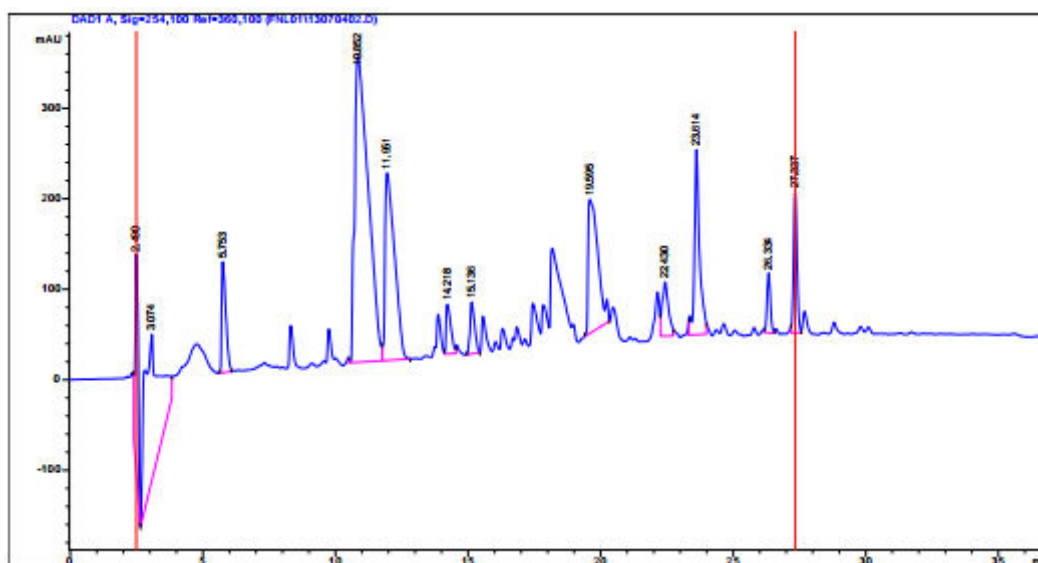


Figure 176 : Chromatogramme de la fraction JA sur HPLC/DAD

HPLC-préparative

La masse d'échantillon restante soit 96,2 mg est dissoute dans du MeOH à 100 mg/mL puis injectée sur préparative.

Colonne	Agilent Zorbax Eclipse XDBC-18
Longueur	250 mm
Diamètre	21,2 mm
Taille	7 μ m
# série	USAFP01179
Conditions chromatographiques	

Solvant A		H ₂ O + HCOOH (0,1%)	
Solvant B		ACN + HCOOH (0,1%)	
Injection		20 – 100 µL	
Débit		20 mL/min	
Température colonne		30°C	
Méthode		10% B (5min) → 30% B (5min) pendant 30 min	
DAD		Réf	
Longueur d'onde	BW.	Longueur d'onde	BW.
254 nm	100	360 nm	4

13 injections sont faites et sont rassemblées en 7 fractions selon le chromatogramme suivant :

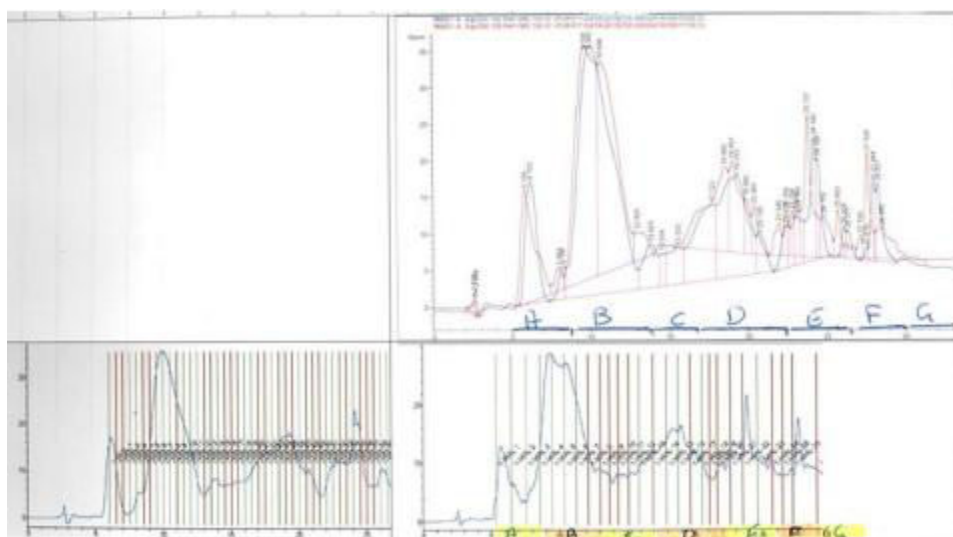
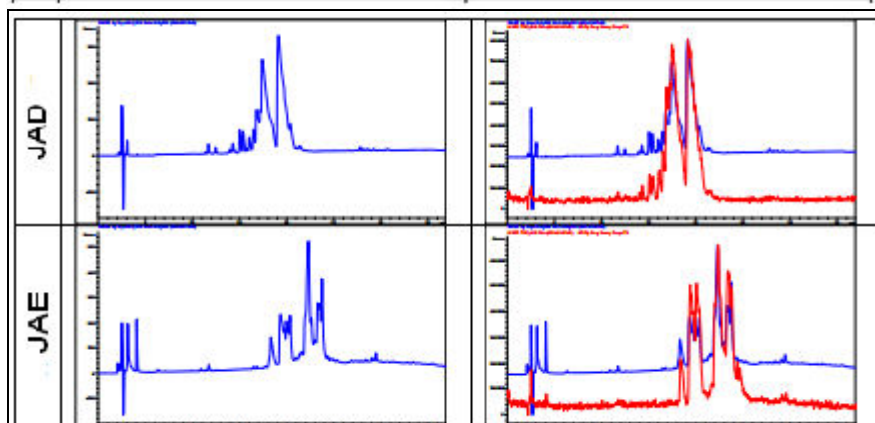
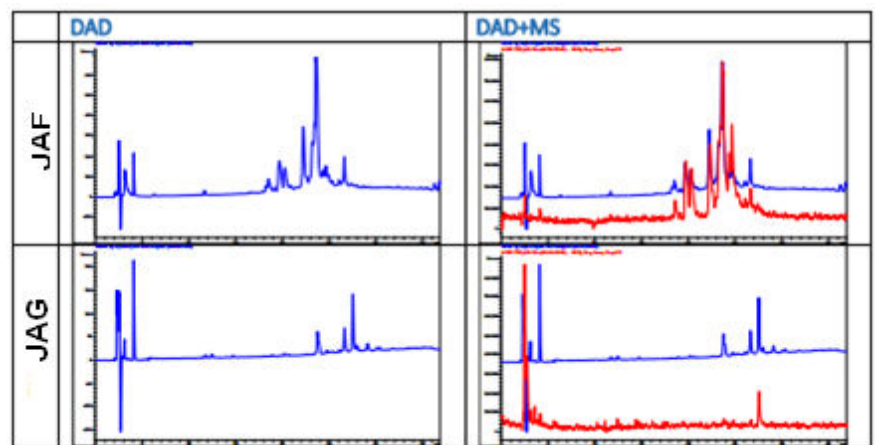
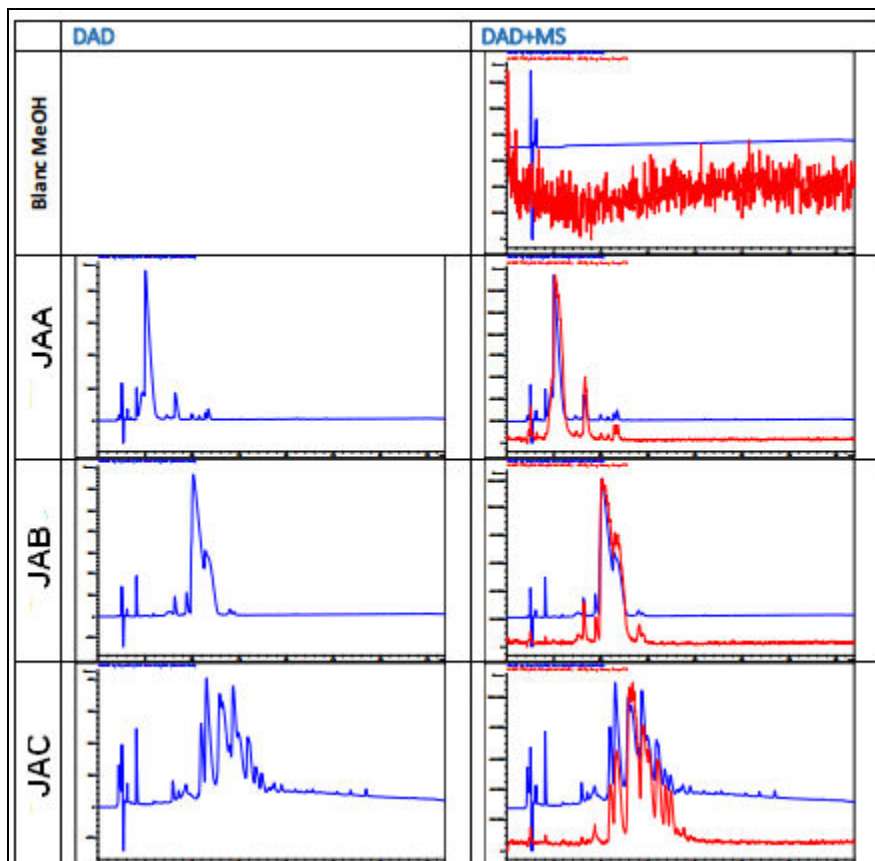


Figure 177 : Chromatogramme de la séparation de la fraction JA sur HPLC préparative

Les fractions sont injectées sur HPLC/DAD dans les mêmes conditions que précédemment.



Les fractions JAA et JAB, dissoutes dans 25 μL de DMSO, sont analysées par RMN.

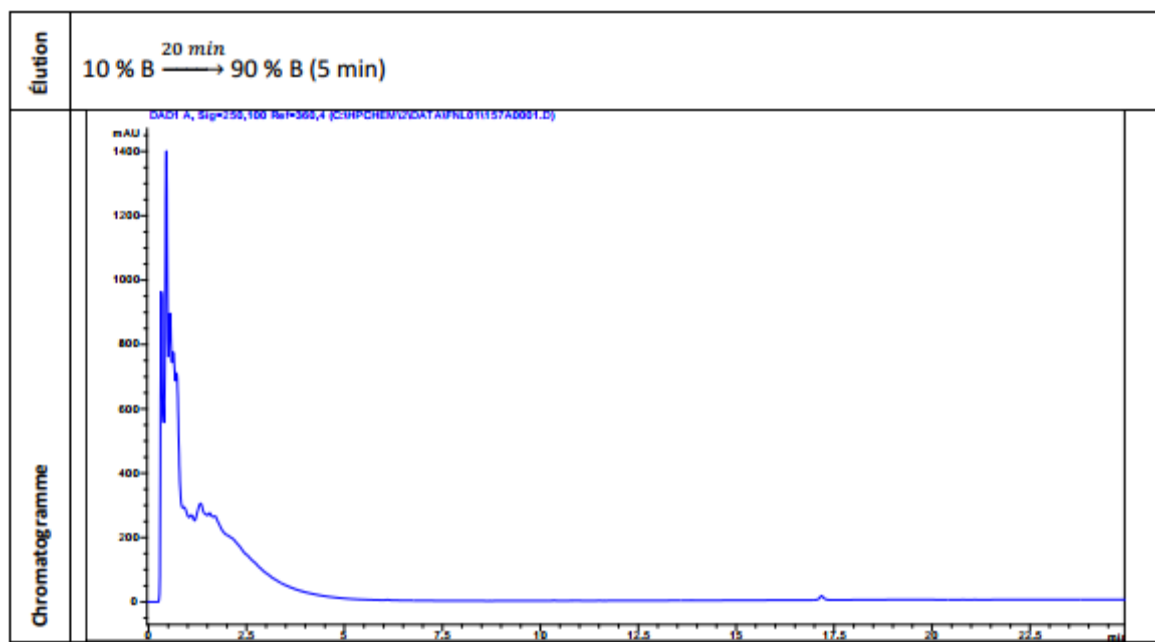
Pour l'analyse GC-MS, toutes les fractions sont dissoutes dans du CHCl_3 .

Colonne	Agilent Technologie	
Longueur	30 m	
Diamètre	0,25 mm	
Taille	0,25 μm	
# série	US 6576616H	
Méthode four	60°C (2min) \rightarrow 320°C (15min) ramp : 3°C/min	
Injecteur (inlet)	250°C	
Split	50°C	
Injection	5 μL	
Débit	Constant 1 mL/min	
MS		
Scan parameter	50 1000	

16.2.6. Analyse fraction C (HPLC/DAD)

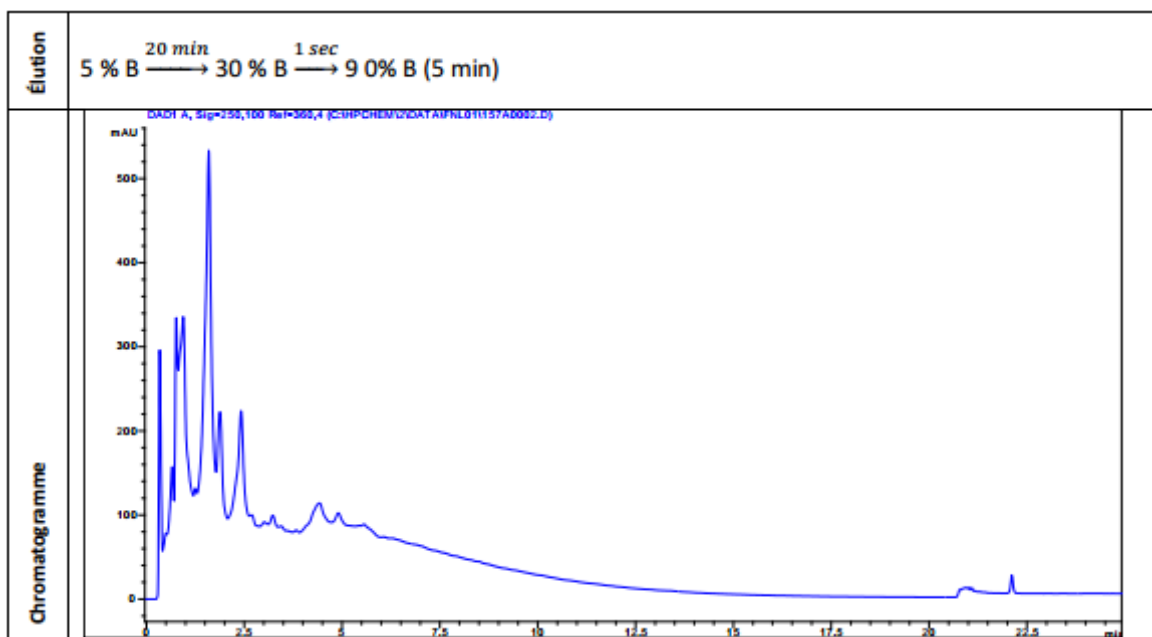
Colonne	Chromolith Performance RP 18°	
Longueur	100 mm	
Diamètre	3 mm	
Taille		
# série	UM9014	
Conditions chromatographiques		
Solvant A	H_2O	
Solvant B	ACN	
Injection	5 μL	
Débit	2 mL/min	
Température colonne	30°C	

DAD		Réf	
Longueur d'onde	BW.	Longueur d'onde	BW.
250 nm	100	360 nm	4
254 nm	4	369 nm	4
360 nm	4		

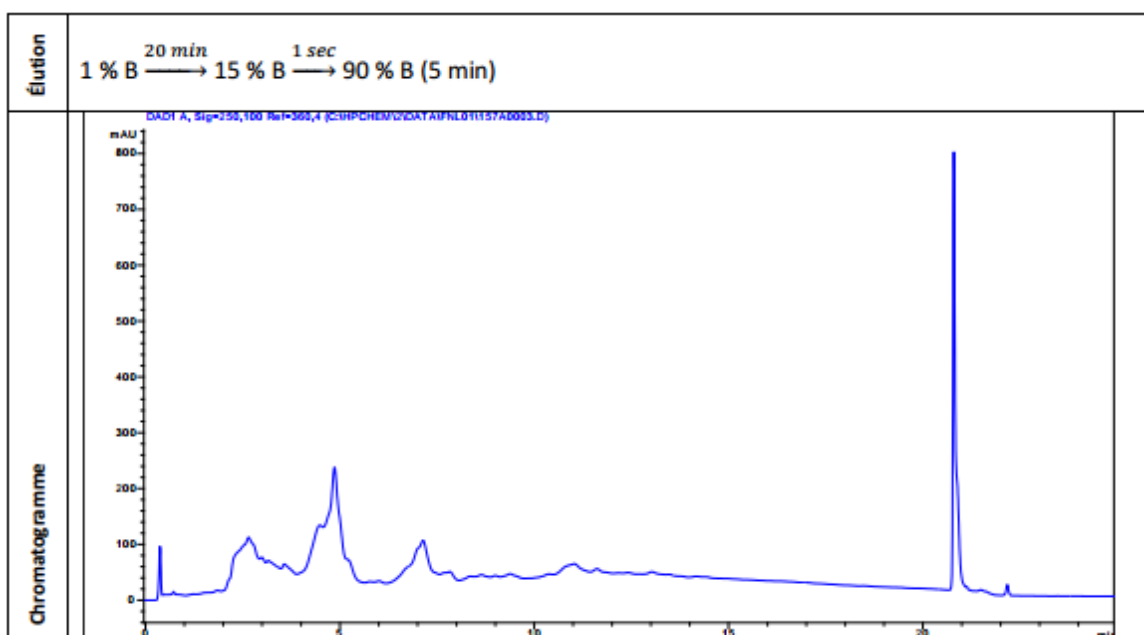


A la vue de ce chromatogramme, le gradient de solvant choisi doit être modifié.

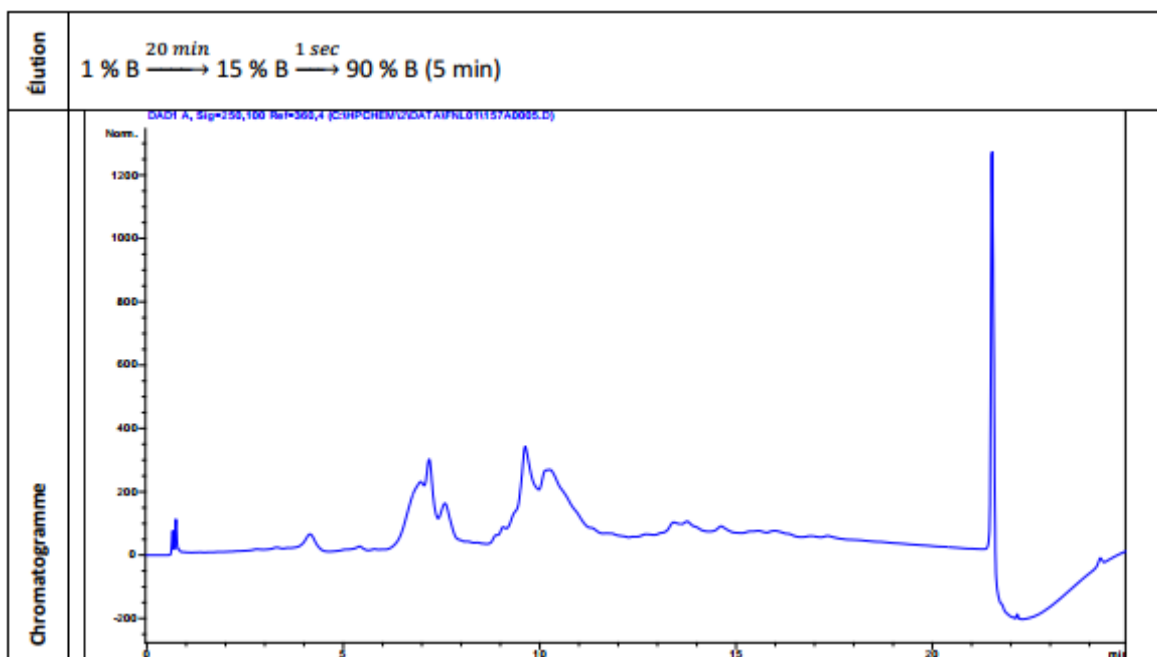
Les produits sortant trop tôt, nous allons donc diminuer la quantité du solvant B au départ.



La séparation s'améliore mais les pics sortent encore trop tôt. Diminution du gradient de départ à 1%.



Une mauvaise séparation est obtenue. Les solvants sont acidifiés avec de l'acide formique 0,1% et le débit est diminué à 1mL/min.



La méthode de séparation n'est toujours pas satisfaisante.

Il s'agirait peut-être d'alcaloïdes. Une analyse en GC/MS est donc réalisée.

1,3 mg de l'extrait est dissous dans 1,3 ml de THF et le mélange est chauffé et soniqué afin d'être parfaitement soluble. Une solution de diazométhane est préparée en introduisant du MeOH dans un tube contenant 10 ml de soude à 10% et une pointe de spatule de diazald dissout dans 10 ml d'éther éthylique. Un courant d'argon barbote dans ce premier tube et envoie le gaz formé dans un deuxième tube contenant le même solvant de dissolution que l'échantillon soit du THF. Au bout de 2 minutes, le THF est saturé en diazométhane.

500 μL de THF saturé en diazométhane sont additionné à 500 μL de solution de l'échantillon.

16.3. Méthodes de dosage

16.3.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par une méthode adaptée par Singleton et Ross 1965 avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Le réactif, formé d'acide phosphotungestique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_4$, est réduit lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_3). Le dosage des phénols dans le visible se fait à une longueur d'onde de 750 nm.

Réactifs et matériels :

- Réactif de Folin-Ciocalteu
- Carbonate de sodium à 20 %
- Acide gallique
- Vortex
- Spectrophotomètre

Mode opératoire :

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de différentes concentrations. A 2370 μ L d'eau distillée, 30 μ L de chaque solution ont été introduits à l'aide d'une micropipette dans des tubes à essais, suivis de l'addition de 150 μ L du réactif de Folin-Ciocalteu. Après incubation pendant 2 minutes, 450 μ L de carbonates de sodium à 20 % ont été ajoutés, puis les solutions ont été secouées immédiatement puis maintenues à l'obscurité pendant 120 minutes à température ambiante. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 750 nm contre un blanc sur un spectrophotomètre.

Les lectures de la densité optique, à 750 nm, des solutions ainsi préparées ont permis de tracer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. L'analyse quantitative des phénols totaux des extraits phénoliques a été réalisée par la même procédure.

Courbe étalon de l'acide gallique

La gamme de concentrations est établie en utilisant l'acide gallique comme référence. Les absorbances respectives mesurées à 750 nm sont représentées dans le tableau.

Tableau 52 : Absorbance de l'acide gallique en fonction de la concentration

Concentration Acide gallique (mg/L)	Absorbance
0	0,0122+/-0,0003
200	0,1581+/- 0,0001
400	0,3509+/-0,0244
600	0,5772+/-0,0021
800	0,7792+/-0,0028
1000	0,9614+/-0,0014

Ci-dessous est présentée la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Cette courbe est établie avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9969$.

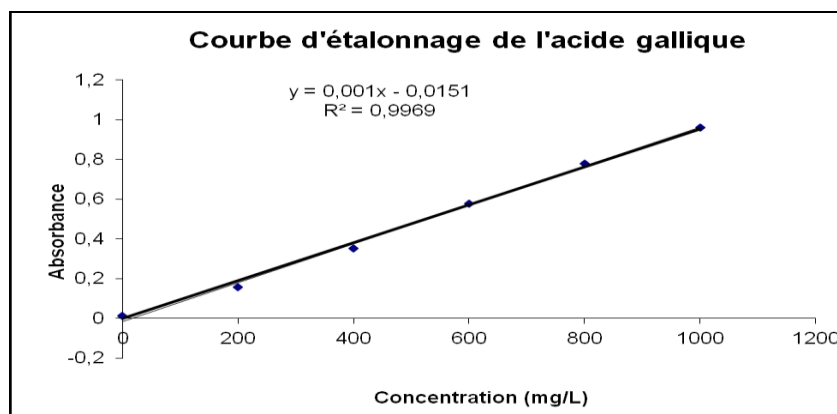


Figure 178 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Calcul et expression des résultats :

La quantité de polyphénols totaux contenus dans les extraits est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par litre (mg d'EAG/L).

$$\frac{\text{Concentration en mg d'EAG}}{L} = \frac{(\text{absorbance} - b)}{a}$$

b = ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage de l'acide gallique

a = pente de la droite d'étalonnage de l'acide gallique

On peut aussi l'exprimer :

- La quantité de polyphénols totaux en mg d'EAG/g d'extrait sec :

$$\frac{\text{Mg d'EAG}}{\text{g d'extrait sec}} = \frac{\text{Concentration en } \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ d'EAG}}{\text{Concentration de l'extrait}}$$

- ou en mg d'EAG/g de Matière végétale sèche :

$$\frac{\text{Mg d'EAG}}{\text{g de MVS}} = \frac{\text{mg d'EAG}}{\text{g d'extrait sec}} \times \text{rendement}$$

16.3.2. Dosage de l'activité antioxydante : Méthode chimique

16.3.2.1. Test du DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyl)

Réactifs et matériels

- 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 0,1 mM Aldrich chemistry
- Trolox Acros organics
- Méthanol Sigma
- Spectrophotomètre UV/Visible lambda 19 Perkin Elmer.

Mode opératoire

Le test utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Kordali et al (Kordali, Cakir et *al.* 2005) en y apportant quelques modifications.

Le test consiste à mélanger dans un tube à hémolyse en verre, 3900 μl de solution DPPH \bullet avec 100 μl d'extrait pur ou dilué, ou 100 μl de méthanol (pour le témoin). L'absorbance est mesurée à 515 nm contre le témoin après avoir laissé incuber la réaction, à l'obscurité, pendant le temps déterminé lors des tests préliminaires.

Les absorbances mesurées permettent d'obtenir la gamme étalon du Trolox qui est tracée de 100 à 200 μM .

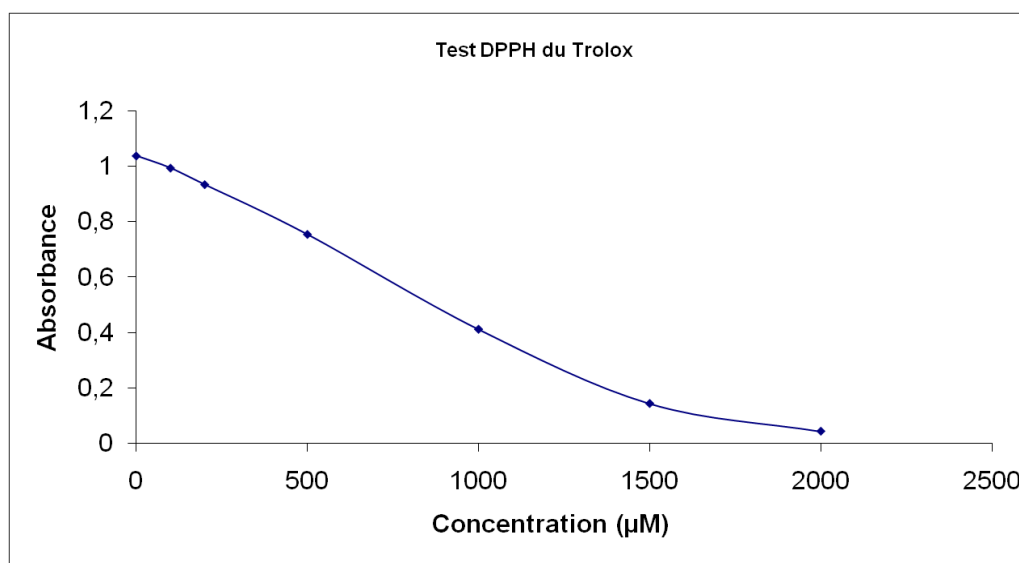


Figure 179 : Courbe de l'absorbance en fonction de la concentration en Trolox

Calculs et expressions des résultats :

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre, est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol.

L'activité antioxydante est exprimée par le tracé de la courbe du pourcentage de l'activité antiradicalaire (%AA) en fonction de la concentration en matière sèche (MS) de l'extrait.

$$\%AA = 1 - \frac{\text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle négatif}} * 100$$

Abs_{orbance échantillon} : absorbance lue après réaction de l'extrait ou étalon avec le radical DPPH'

Abs_{orbance contrôle négatif} : absorbance lue en remplaçant l'extrait ou l'étalon par le solvant utilisé.

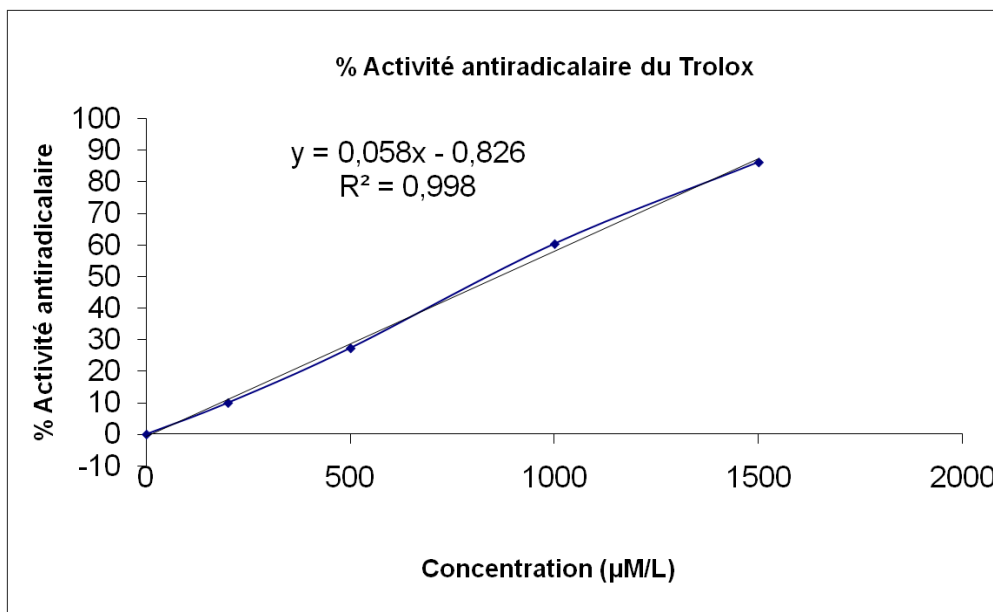


Figure 180 : Courbe d'étalonnage du Trolox

A partir de la courbe % AR = f [extrait], il est possible de déterminer l'IC₅₀ de la réaction. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures +/- écart type. La valeur IC₅₀ a été déterminée pour chaque extrait et est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH. Autre définition : c'est la concentration de l'échantillon exigée pour donner une diminution de 50% de l'absorbance de la solution contrôle constituée de méthanol et de DPPH.

Les valeurs IC₅₀ moyennes ont été calculées par régression linéaire de trois essais séparés ou l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (Mensor L.L 2001).

C'est la concentration minimale de l'extrait qui permet d'inhiber 50% du radical DPPH :

$$IC_{50} = \frac{50}{\text{pente de la régression linéaire}}$$

Pour chaque extrait, l'activité anti radicalaire est exprimée en mg d'ET/g d'extraits sec :

$$\text{mg d'ET/g d'extrait sec} = \frac{IC_{50} \text{ référence}}{IC_{50} \text{ extrait}} * 1000$$

ou en mg d'ET/g de matière végétale sèche (MVS) :

$$\text{mg d'ET/g de matière sèche} = \text{mg} \frac{\text{d'ET}}{\text{g}} \text{ d'extrait sec} * \text{Rdt d'extraction}$$

16.3.2.1. Test de l'ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La perte de fluorescence de la fluorescéine est suivie durant 35 minutes à 37°C et les courbes dose-réponse des produits testés et du contrôle Trolox sont calculées à partir des aires sous la courbe des concentrations ayant affiché une diminution d'au moins 95% de la fluorescence.

16.4. Méthode d'évaluation des activités biologiques

16.4.1. Test anti-oxydant cellulaire

Les tests de potentiel antioxydant sur cellules ont été réalisés comme suit. Des cellules WS-1 (fibroblastes) ont étéensemencées à 10 000 cellules par puit dans des microplaques 96 puits à fonds plats transparents et ont été incubées durant 24 heures à 37°C et 5% CO₂.

Les cellules ont ensuite été lavées avec 150µL de PBS (Phosphate-Buffered Saline ou Tampon phosphate salin) après quoi la dichlorofluorescéine-diacétate (DCFH-DA) a été administrée à 5 µM durant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées de nouveau au PBS après quoi les produits testés ont été administrés selon un gradient de 6 concentrations (dilution 1:4)

Les plaques ont ensuite été incubées une heure à 37°C et 5% CO₂ après quoi le stress oxydatif a été appliqué au *tert*-butylhydroperoxyde 200 µM. Une lecture de fluorescence a été prise immédiatement après l'administration du stress oxydatif et une seconde lecture a été prise après 1h30 d'exposition. Les valeurs d'IC₅₀ sont calculées à partir des valeurs d'augmentation de la fluorescence par rapport au contrôle négatif (sans antioxydant).

16.4.2. Activité anticancéreuse

Le test anticancéreux se fait sur plaque 96 puits (BD Falcon). Les trois lignées cellulaires utilisées sont : A-549 (cancer du poumon), DLD-1 (cancer du colon) et WS-1 (fibroblastes). Ces trois lignées proviennent d'ATCC (American Type Cellule Collection).

Les cellules sontensemencées à 5000 cellules par puits dans 100 µL du milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium : milieu de culture contenant plus de vitamines et de glucose que la formule originale) contenant 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal). Les cellules adhèrent ensuite pendant 24h. Par la suite, les extraits sont ajoutés à 8 concentrations différentes (dilution 1 : 2) dans 100 µL de milieu après avoir dilué 400X pour atteindre une concentration de solvant de 0,25% non toxique pour les cellules.

Après 24h, des observations au microscope sont faites pour déterminer où se situe la concentration qui tue 50 % des cellules, la présence d'un précipité ou tout autre anomalie. Les cellules sont ensuite remises à l'incubateur pour 24h supplémentaires. Par la suite, le milieu est enlevé, un lavage avec 100 µL de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) est fait et 150 µL d'une solution 2% de résazurine (1 mg/mL stock) est ajoutée. Puis, les plaques sont incubées à 37°C pour 1h avant d'être lues à l'aide d'un fluorimètre (Fluoroskan Ascent FL) à la longueur d'onde d'excitation : 530 nm, et la longueur d'onde d'émission : 590 nm.

Les plaques sont vidées et placées au congélateur pour 24h. Une fois sorties du congélateur, 100 µL d'une solution de SDS (DodécylSulfate de Sodium) 0.01% est ajoutée et les plaques sont incubées à température de la pièce pendant 3h avant de retourner au congélateur. 24h plus tard, les plaques sont décongelées et 100 µL d'une solution de Hoechst 33342 à 3µg/mL préparée dans du TNE, solution tampon, 2x pH 7,2 est ajoutée. Les plaques sont enfin incubées dans le noir pour 2h à température de la pièce avant d'être lues au fluorimètre à la longueur d'onde d'excitation : 355 nm et la longueur d'onde d'émission: 460 nm.

16.4.3. Activité antibactérienne

Le test antibiotique se fait sur plaque 96 puits (BD Falcon). Les deux lignées bactériennes utilisées sont *E. coli* (Gram -) et *S. aureus* (Gram +). Ces lignées proviennent d'ATCC. *E. coli* estensemencé à 5000 bactéries par puit tandis que *S. aureus* est à 40 000 bactéries par puit, dans 100 µL de Nutrient Broth.

Par la suite, les extraits d'eau ou de sirop d'érables sont ajoutés à 8 concentrations différentes (dilution 1 : 2) dans 50 μ L de milieu après avoir dilué 400X pour atteindre une concentration de solvant de 0,25% non toxique pour les bactéries. Puis, 50 μ L de résazurine 4% (1 mg/mL stock) est ajoutée. Les plaques sont ensuite incubées pendant 6h et par la suite, elles sont lues à l'aide d'un fluorimètre (Fluoroskan Ascent FL) à la longueur d'onde d'excitation de : 530 nm et la longueur d'onde d'émission : 590 nm.

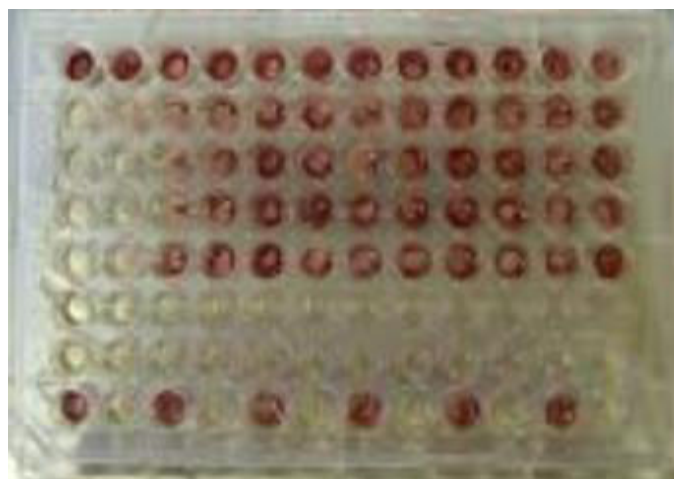


Figure 181 : Plaque 96 puits

16.4.4. Activité antifongique

Le test antifongique est réalisé sur plaque 96 puits (BD Falcon). La lignée fongique utilisée est *Candida albicans*. Cette lignée provient d'ATCC. *Candida albicans* est ensemencé à 2000 levures par puit dans 100 μ L de Sabouraud dextrose.

Les extraits d'eau ou de sirop d'érables sont ajoutés à 8 concentrations différentes (dilution 1 : 2) dans 100 μ L de milieu après avoir dilué 400X pour atteindre une concentration de solvant de 0,25% non toxique pour les bactéries. Les plaques sont ensuite incubées pendant 18h et par la suite, elles sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre (Varioskan Ascent FL) à 540 nm.

16.4.5. Activité anti-inflammatoire

Le test consiste à mettre en plaque des macrophages de souris et de les incuber avec les échantillons à différentes concentrations. Du LPS (lipopolysaccharide) est ajoutée dans les

plaques pour provoquer une réaction inflammatoire chez les macrophages et stimuler la production de NO (monoxyde d'azote).

Après incubation, les surnageants sont recueillis et mis en contact avec un réactif de Griess qui change de couleur en présence de NO. Une mesure de l'absorbance de chaque puit est effectuée au lecteur de plaque Varioskan. Les plaques vidées de leur surnageant sont utilisées pour faire un test d'activité métabolique à la résazurine. Les lectures de fluorescence sont prises au lecteur de plaque Fluoroskan.

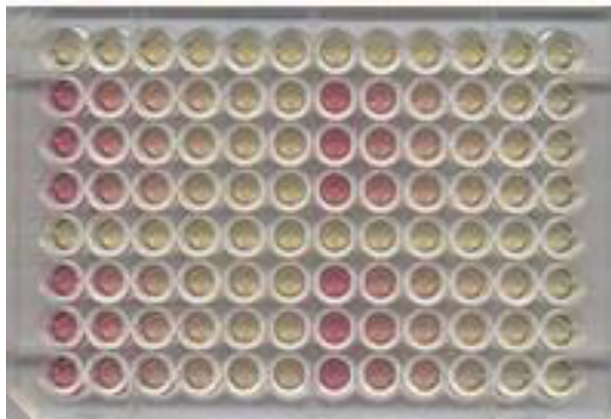


Figure 182 : Plaque après incubation et dosage colorimétrique

Le test anti-inflammatoire se fait sur plaque 24 puits. Les cellules utilisées sont les RAW 264,7, macrophages de souris provenant d'ATCC. Les cellules sont ensemencées dans 400 μ L de DMEM+10% de FBS (Fetal Bovin Serum) à une concentration de 500 000 cellules par mL. Les cellules adhèrent pendant 24h.

Puis, les extraits sont ajoutés à une concentration non toxique déterminée par les cellules WS-1 du test anticancéreux. Quatre dilutions 1 : 2 sont faites et 400 μ L d'extrait dilué est ajouté sur 1 cellule et dans une plaque sans cellules contenant déjà 400 μ L de milieu qui servira de blanc lors de l'analyse des résultats. Deux contrôles L-Name 250 μ M et 1mM sont aussi ajoutés sur les cellules et dans la plaque contrôle dans 400 μ L de milieu.

Puis, 200 μ L de LPS ou d'interféron gamma est ajouté comme stimulus inflammatoire. Les plaques sont par la suite incubées 24h à 37°C 5% CO₂. Par la suite, le surnageant des plaques contenant des cellules est transféré dans une nouvelle plaque 24 puits pour qu'un test de résazurine soit effectué sur les cellules afin de s'assurer que les extraits n'ont aucune toxicité. 100 μ L de surnageant des plaques avec et sans cellules est transféré dans une plaque 96 puits

auquel sera ajouté 100µL de réactif de Greiss. Les plaques sont alors incubées 30 min à température de la pièce dans le noir enfin d'être lues au spectrophotomètre pour plaque (Varioskan, Thermo) à 550 nm.

16.4.6. Activité antivirale sur Herpès HSV-1 (Herpes simplex virus)

4 méthodes d'infection ont été testées afin de déterminer en partie le mode d'action.

Afin de voir l'effet de l'extrait sur l'incorporation du virus à l'intérieur de la cellule, deux traitements distincts sont faits :

- Plaque 1 : les cellules sont prétraitées avec l'extrait ou l'acyclovir pendant 1 heure à 37°C puis les cellules sont lavées avant l'infection avec le virus.
- Plaque 2 : l'extrait est ajouté sur les cellules au même moment que le virus lors de l'infection et le tout est incubé pendant 1 heure à 37°C.

Afin de voir l'effet de l'extrait sur la réplication du virus :

- Plaque 3 : l'extrait est ajouté au MEM (Non-Essential Amino Acid Solution) contenant 1% de méthylcellulose après l'infection des cellules avec HSV-1. L'extrait reste donc pendant 72 heures en contact avec les cellules infectées.

Afin de voir si l'extrait inactive directement HSV-1 :

- Plaque 4 : la suspension de virus est pré-incubée avec l'extrait pendant 1 heure à 37°C avant l'infection des cellules avec cette même solution.

Procédure :

Pour la plaque 1 :

Mettre 1000 µL d'acyclovir ou d'extrait dans 1000 µL de milieu. Incuber 1 heure. Laver avec 1 ml de PBS. Ajouter 250 µL de virus et 250 µL de milieu. Incuber 1 heure. Puis, enlever le virus et laver avec 1 ml de PBS et mettre 1ml de MEM + méthyle cellulose. Incuber 72 heures.

Pour la plaque 2 :

Dans le milieu, mettre 250 μL d'acyclovir ou d'extrait + 250 μL de virus. Incuber 1 heure. Enlever le virus et laver avec 1ml de PBS. Puis, mettre 1 ml de MEM + méthylcellulose. Incuber 72 heures.

Pour la plaque 3 :

Mettre 250 μL de virus + 250 μL de milieu. Incuber 1 heure. Enlever le virus et laver avec 1 ml de PBS. Mettre 500 μL d'acyclovir ou d'extrait et 500 μL de MEM + méthylcellulose. Incuber 72 heures.

Pour la plaque 4 :

Mettre sur une plaque neuve 500 μL d'acyclovir ou d'extrait et 500 μL de virus. Incuber 1 heure. Mettre 500 μL de ces virus-extraits sur les cellules. Incuber 1 heure. Enlever le virus et laver avec 1ml de PBS. Mettre 1ml de MEM + méthylcellulose. Incuber 72 heures.

Quelque soit la procédure suivie, après 72 heures d'incubation, colorer les plaques au crystal violet. Compter les plages de lyse.



Figure 183 : Plaque de lyse des cellules

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ademar A. Da Silva Filho (2004). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauracea) in mice and rats. *Journal of pharmacy and pharmacology* **56**, 1179-1184.
2. Adil el Hadri, Maria Angeles Gomez del Rio, Jesus Sanz, Azucena Gonzales Coloma, Mohamed Idaomar, Bartolome Ribas Ozonas, Juana Benedi Gonzales, Maria Isable Sanchez Reus (2010). Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. **76** (3) : 343-356.
3. Adsersen, A. Kjolbye A. Dall, O. Jager, AK. (2007) Acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase inhibiteur composés de *Corydalis cava* Schweigg & Kort. *Journal d'Ethnopharmacologie* **113**(1) : 179-182.
4. AFNOR (1997) Normes Françaises sur les huiles essentielles.
5. Agrawal P. K. (Ed.) Elsevier, Amsterdam, 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids.
6. Airaksinen M, Saarma M (2002). « La famille GDNF : signalisation, les fonctions biologiques et de la valeur thérapeutique » *Nature Review Neuroscience* **3**(5), 383-94.
7. Alibert G., Ranjeva R.; et Boudet M.A. (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiology Vegetal*. **15**, 279-301.
8. Allen, M.P.; Tildesley, D. J. (1987). Computer Stimulation of liquids. Clarendon Press: Oxford.
9. Alzheimer 's Disease Research, programme de L'American Health Assistance Foundation
10. APG: The Angiosperm Phylogeny Group (2009). Botanical Journal of the Linnean Society. An update of the Angiosperm Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **161**, 105-121.

11. Appleman, O. 1944. Preliminary report on toxicity of avocado leaves. Calif. Avocado. Soc. Yearbook, 37.
12. Arnobio A., S.R.F. Moreno, L.Q.A Caldas. (2011). Evaluation of the genotoxicity potential of *Nectandra membranacea* extract employing in vitro micronucleous test with metabolic activation. *Abstracts/Toxicology Letters* **2055**, S60-S179.
13. Asai M. Lee JW. Itakyura Y. (2012). Effects of veraguensin and galgavin on osteoclast differentiation and function. *Cytotechnology*, **64**(3) : 315-22.
14. Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC. (1998). Beta-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Research*. **18**, 471-3.
15. Awad AB, Downie AC, Fink CS. (2000). Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *Int. J. Mol. Med*. **5**:541-5.
16. Awad AB, Chen YC, Fink CS, Hennessey T. (1996) beta-Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Research*. **16**, 2797-804.
17. Ayres DC et Loïke JD. (1990) Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties. Cambridge University Press, Unites Kingdom. 402.
18. Backhouse N., Delporte C., Givernau M., Cassels BK. Valenzuela A., Speisky H.(1994) Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine *Agents Actions*. **42** (3-4): 114-7.
19. Baralle, F., Busch, A. Vernengo, M. J. and Kick, A.M. (1972). Isolation of codeine from *Nectandra saligna* and *Poebe porfiria*. *Lloydia* **35**,300-302.
20. Barbosa-Filho. (1989). Lignoids from *N.amazonum* and *Nectandra glabrescens*. *Phytochemistry* **28**, n°7, 1991.

21. Barrera Ericsson David Coy, Cuca Suarez Luis Enrique. Three New 7.3', 8.5'-connected bicycle [3.2.1]octanoids and other neolignans from leaves of *Nectandra amazonum* (2009). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **57**, (6) 639-642.
22. Bernadi, L. (1962). Lauraceas. Merida. (1967): *Candollea* **22**, 91-101.
23. Berthod A., Billardello B. et Geoffroy S. (1999) Polyphenols in countercurrent chromatography. An Example of large scale separation 1. Analysis. EDP Sciences; Wiley-VCH. **27**, 750- 757.
24. Beta T., Nam S., Dexter J.E. et Sapirstein H.D. (2005). Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal Chemistry journal* **82** (4), 390-393.
25. Bick, I.R; C. and Sinchai, W. (1978). Alkaloids of the Lauracea. *Heterocycles* **9**: 903-945.
26. Binns AN, Chen RH, Wood HN, Lynn DG. (1987). Cell division promoting activity of naturally occurring dehydrodiconiferyl glucoside: do cell wall components control cell division. *PNAS*. **84** (4): 980-984.
27. Blasko, G., Cordell, G.A. (1988) Morphinandienone alkaloids. *Heterocycles* **27**:1269-1300.
28. Böhlke, M., Guinaudeau, H., Angerhofer, C.K., Wongpanich, V., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Mora, G.A., Poveda, L.J., (1996). Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. *Journal of Natural Products*. **59** :576-580.
29. Bravo L. 1998 Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Review*. **56**: 317-333.
30. Bruneton (1993). *Journal of Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales*. 2^{ème} édition. (Technique et documentation, rue Lavoisier Paris 11). 915.

31. Bruneton Jean (1995). Pharmacognosie. *Phytochimie*, plantes médicinales », 3^{ème} édition.
32. Bruneton Jean (1999). Plantes Toxiques Végétaux dangereux pour l'Homme et les animaux.
33. Bruneton Jean (2009). Pharmacognosie. *Phytochimie*, plantes médicinales », 4^{ème} édition.
34. Cacilda J. Aiba, Otto R. Gottlieb, Frida M. Pagliosa, Massayoshi Yoshida, Mauro T., Magalhaes. neolignans from *Nectandra miranda* (1977) *Phytochemistry* **16**, 745-748.
35. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. (2002). Antioxidant and prooxidant behavior of Flavonoids: Structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*. **13** (10), 572-584.
36. Carbin BE, Larsson B, Lindahl O. (1990). Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols. *Br. Journal of Urology*. **66**, 639-41.
37. Castro, O., Hasbun, C. and Calderon M. (1991). A new aporphine alkaloids from *Nectandra sinuata*. *Fitoterapia* **62**, 72-73.
38. Castro, O., Rodriguez, G. and Poveda, L. (1989). Proaporphine and aporphine alkaloids of *Nectandra membranacea*. *Fitoterapia* **60**, 474.
39. Chaverri C., Ciccio J. F., Diaz C., Wuim. Nova (2009) **32**, 417.
40. Cherigo Lilia, Polanco Venancio, Ortrga- Barria Eduardo, Heller V. Maria, Capson L. Todd, Rios Cubilla Luis.(2005). Antitrypanosomal activity of a novel norlignan purified from *Nectandra lineata*. *Natural Product Research* **9** (4):373-377.
41. Choi JJ, Kwon OK. (2012). The effect of isolancifolide on the apoptosis in HL-60 cells through caspase-8-dependent and independent pathways. *Archives of Phamacal Research* **35** (1) 137-43.

42. Cicio, Jose F.; Chaverri, Carlos; Diaez, Cecilia. (2009). Volatile compound of *Nectandra salicina* (Lauracea) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines. *Quimida Nova*. **32**, n° 2, 417-420
43. Collins Peter M. 2005. Dictionary of carbohydrates, CRC Press.
44. Cronquist 1998. The Evolution and Classification of Flowering Plants.
45. Cuca Luis E., Carlos A. Ramos, Ericsson D. Coy-Barrera (2013). Novel cadinane-related sesquiterpenes from *Nectandra amazonum*. *Phytochemistry Letters* **6**, 435-438.
46. De Carvalho G. Mario, Massayoshi Yoshida (1986). Lignans from *Nectandra turbacensis*. *Phytochemistry* **23**, Issue 1, 265-267.
47. Di Carlo, G., Mascolo, N.; Izzo, A. A., Capasso, F., (1999) Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*; **65**, (4), 337-353.
48. Dictionnaire Médical Dorlands à Merck
49. Dragendorff G.: Die Heilpflanzen der Verschiedenen Volker und Zeiten.F. Enke, Stuttgart, (1898).
50. Duke J. A. (1998) Phytochemical Database. USDA-ARS-NGRL (ed) Beltsville *Agricultural Research Center*, Beltsville, Maryland.
51. Duke, J. A. Vasquez, R. in Amazonian (1994). CRC Press, Boca Raton, FL. *Ethnobotanical Dictionary*. 122-123.
52. *Efsa Journal* (2012). Scientific opinion of stigmasterol-rich plant sterols as food additive. **10**(5): 2659, 39.
53. El Atyqy M. (2007) Chimie alimentaire.

54. Fargeix, D. (2000). Etude des mécanismes d'oxydation des flavonoïdes en relation avec leur activité antioxydante. Effets anti- et pro-oxydants dans l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes. Université Claude Bernard- Lyon 1, Lyon.
55. Faure M. Lissi E., Torres R et Videla LA. (1990) Antioxidant activities of lignans and flavonoids. *Phytochemistry* **29** (12):3773-3775.
56. Fernandez J, Lagos P, Rivera P, Zamorano-Ponce E. (2009). Effet of boldo (*Peunmus boldus* Molina) infusion on lipoperoxidation induced by cisplatin in mice liver. *Phytotherapie Research* **23** (7) : 1024-7.
57. Fernanda R. Garcez (1999). A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Medica* **65**, 775.
58. Fernanda R. Garcez and all. Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. (2010). *Quimida Nova* **33**, n° 8, 1739-1742.
59. Fernandez R. Garcez, Walmir S. Garcez. (2009). Fenilpropanoides e outros constituents bioactivos de *Nectandra megapotamica*. Phenylpropanoids and other bioactive constituents from *Nectandra megapotamica*. *Quimida Nova* **32**, n°2, 407- 411.
60. Ferrari, G. Fervidi, O. and Ferrari, M. (1971). Occurrence of isoboldine in *Nectandra pichurium*. *Phytochemistry* **10**, 465-466.
61. Franca N.C., O. R. Gottlieb (1972). Constitution of rubrenolide and rubrynolide: an alkene-alkyne pair from *Nectandra rubra*. By *Journal of the Chemical Society Chemical Communication*.
62. Frenot, M. et Vierling, E. (2001). Biochimie des aliments. Diététique du sujet bien portant. Science des aliments. 2ème Ed. Doin. 79-102.
63. Fournet Jacques: Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et Martinique Nouvelle édition revue et augmentée (2002) CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement).

64. Fuller, T.C. McClintock E. (1986) *Poisonous Plants of California*. Univ. California Press, Berkeley, Calif. USA 432.
65. Gang DR, Kasahara H, Xia ZQ, Vander Mijnsbrugge K, Bauw G, Boerjan W; Van Montagu M, Davin LB et Lewis NG (1999) Evolution of plant defense mechanisms. Relationships of phenylcoumaran benzylic ether reductases to pinoresinol-lariciresinol and isoflavone reductases. *Journal of Biological and Chemistry* **274** (11): 7516-7527.
66. Gao R, Gao C, Tian X, Yu X, Di X, Xian H et Zhang X. (2004). Insecticidal activity of deoxypodophyllotoxin, isolated from *Juniperus sabina* L., and related lignans against larvae of *Pieris rapae* L. *Pest. Manag. Sci.* **60** (11): 1131-1136.
67. Gasteiger J.; Marsili, M., (1980). *Tetrahedron* **36**,3219-3288.
68. Garcez, F.R., Francisca Da Silva, A.G., Garcez, W.S., Linck, G., De Fatima Matos, M.C., Santos, E.C.S., Queiroz, L.M.M., (2011). Cytotoxic aporphine alkaloids from *ocotea acutifolia*. *Planta Med.* **77**, 383-387.
69. Giants of the Past. *lipidlibrary.aocs.org*.
70. Giorgi-Renault S. (2005). 4-aza-2,3-didéhydropodophyllotoxines : nouveaux lignanes à activité antitumorale obtenus par une synthèse en une seule étape. *Annales Pharmaceutiques Françaises.* **63**, 63-68.
71. Gracin, S.; Brinck,T. ; Rasmuson, A.C., (2002). Prediction of solubility of solis organic compounds in solvents by UNIFEAC, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**, (20), 5114-5124
72. Grundon, M.F. and McGarvey, J.E.B (1966).:Alkaloids from greenheart. Part III. The structure of rodiasine. Mass spectra of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Chemical Society (C)* 1082-1084.
73. Guinaudeau,H., and Bruneton,J. : Isoquinoline Alkaloids. Chapter 10.In: Waterman, P.G. (Ed) (1993). *Methods in Plant Biochemistry.* **8**. Academic Press, New York. 373-419.

74. Guinaudeau, H. Leboeuf, M. Cavé A. (1975) *Journal of Natural Products*.**38**, 265-338.
75. Guinaudeau, H. Leboeuf, M.Cavé, A. (1979). *Journal of Natural Products*.**42**, 325-360.
76. Guinaudeau, H. Leboeuf, M. Cavé, A. (1983). *Journal of Natural Products*.**46**, 761 - 835.
77. Guinaudeau, H. Leboeuf, M. Cavé, A. (1988). *Journal of Natural Products*.**51**, 389 - 474.
78. Guinaudeau, H. Leboeuf, M. Cavé, A. (1994). *Journal of Natural Products* **57**, 1033 - 1135.
79. Guinaudeau, H. Bruneton, J. (1993) Isoquinoline alkaloids. Chapter 10.In. Waterman, P.G. (Ed.) *Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, New York*. **8**, 373 - 419.
80. Hadi M. (2004) La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro*oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse Pharmacochimie 155.
81. Han R. M., Tian Y. X., Liu Y., Chen C. H., Ai X. C., Zhang J. P. et Skibsted L. H., « Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants », *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, vol. **57**, n° 2009, p. 3780-3785.
82. Harmatha J., Nawrot J., (1984). Comparaison of the feeding deterrent activity of some sesquiterpenes lactones and lignane towards selected insect storage pests. *Biochem Syst. Ecol.* **12**: 95-98.
83. Hasel, W.; Hendrickson, T.F.; Still, W.C., (1988). *Tet. Comput. Met.* **1**, 103-116.
84. Hasbun, C., Calderon, M. and Castro, O. (1991). *Nectandra membranacea*: alkaloids of the wood and bark. *Ing.Cienc.Quim.* **13**, 19.
85. Heckel, E.: les plantes Médicinales et Toxiques de la Guyane Française (1897). Protat Frères, Macon 76-77.

86. Heller, W., Forkmann, G., 1993 The flavonoids. Harborne J.B. ed.; London 449.
87. Hemingway S.R. J. D. Philipson, and R. Verpoorte, Meconopsis cambric alkaloids. 1991. *Journal of Natural Products*, **44**(1) 67-74.
88. Heywood V. H., Moore D. M., Richardson I. B. K. et Stearn W. T.; (1996). Les plantes à fleurs 306 Familles de la flore mondiale 218-219.
89. Hogg, John A. (1992). "Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: A profile of innovation". *Steroids* **57**, (12), 593–616.
90. Hollman; P. C. H., Katan, M. B., Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* (1999), **37**, (9-10), 937-942.
91. Hsieh TJ., Liu TZ., Lu FJ., Hsieh PY., Chen CH. (2006). Actinodaphnine induces apoptosis through increased nitric oxide, reactive oxygen species and down-regulation of N-kappaB signaling in human hepatoma. *Mahlavu cells*.**44** (3):344-54.
92. Indra,B. Matsunaga, K., Hoshino, O., Suzuki, M. Ogasawara, H. Muramatsu, I. Taniguchi, T. Ohizumi, Y. (2002)(+/-)-domesticine, a novel and selective alpha 1D-adrenoceptor antagonist in animal tissues and human apha-1-adrenoceptors. *European journal of pharmacology* **445** (1-2): 21-9.
93. Inouye S., S. Abe, repot, (2003). Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaeous and solution contacts. *International Journal ofAromatherapy*, **13**, 33-41.
94. Jang YY. Song JH. Shin YK, Han ES., Lee CS., (2000). Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*. **42**(4):361-71.

95. Jiménez I., Garrido A., Bannach R., Gotteland M., Speisky H. (2000) Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. *Phytotherapy Research*. 14(5):339-43.
96. Kametani T, Furuyama H. (1987). Synthesis of vitamin D3 and related compounds. *Med Res Rev*. 7 (2), 147–171.
97. Kanko C., Sawaliho BE, Kone S., Koukoua G., N' Guessan YT. (2004). Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *Comptes rendus Chimie* 7 :1039-1042.
98. Kitts DD, Yuan YV, Wijewickreme AN et Thompson LU. (1999). antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Molecular and Cellular. Biochemistry*. 202 (1-2): 91-100.
99. Klaus Kubitzki. A note on *Nectandra* (Lauracea), with the description of a new species. (1981). *Acta Amazonica* 11(2), 307-308.
100. Klippel KF, Hiltl DM, Schipp B. A multicentric, placebo-controlled, double-blind clinical trial of beta-sitosterol (phytosterol) for the treatment of benign prostatic hyperplasia. (1997). German BPH-Phyto Study group. *British Journal of Urology*. 80, 427-32.
101. Koltei M. Hosford D. Guinot, P. Esanu A., Braquet P. (1991). *Drugs* 42, 174-204.
102. Koltei M. Hosford D. Guinot, P. Esanu A., Braquet P. (1991). *Drugs* 42, 9-29.
103. Kostermans A.J.G.H (1952). *J.Scient Research Indonesia* 1,141-159 (1957) *Reiwardtia* 4, 193-256.
104. Kozawa M., Baba K., Matsuyama Y, Kido T, Sakai M., et Takemoto M. (1982). Components of the Root of *Anthriscus sylvestris* Hoffm. II. Insecticidal Activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 30(5):2885-2888.

105. Kurzweil Accelerating Intelligence. A noninvasive avenue for Parkinson's disease gene therapy.
106. Lee K. W., Kim Y. J. et Mee C. Y. 2003 Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 7292-7295.
107. Legault J. Pichette A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **59** (12): 1643-7.
108. LeQuesne, P.W., Larrahondo, J.E. and Raffauf, R.F. (1980). Antitumor plants. X. Constituents of *Nectandra rigida*. *Journal of Natural Products*. **43**, 353-359.
109. Lewis NG et Davin LB. (1999) Lignans: Biosynthesis and function. *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Oxford), 639-712.
110. Lilia Cherigo, Venancio Polanco, Eduardo Ortega-Barria Maria V. Hellers, Todd L. Capson and Luis Cubilla Rios. (2005). Antitrypanosomal activity of a novel norlignan purified from *Nectandra lineate*. *Natural Product Research*, **9**, No. 4, 373-377.
111. Lotito, S.B.; Actis-Goretta, L. Renard, M.L. Caliguiri, M.; Rein, D.; Schmitz, H.H.; Steinberg, F. M.; Keen, C.L.; Fraga C. G.; Influence of Oligomer Chain Length on the Antioxidant Activity of Procyanidins (2000). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**, (3), 945-951.
112. Lopez, J. A. Barillas, W. Gomez-Laurito, J. Lin, F-T., Al-Rehaily, A.J., Sharaf, M.H.M. and Schiff Jr. P.L.: (1995). Aporphine alkaloids of selected species of *Nectandra* and *Ocotea*. *Planta Medica*. **61**, 589.
113. Lopez, L. Hernandez, A. Charmorro, G. Mendonza-Fogueroa, T. (1993). α -asarone toxicity in long-term cultures of adult rat hepatocytes. *Planta Medica*. **59**, 115-120.

114. Lugasi A., Hovari J., Sagi K. V. et Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* **47** (1-4), 119-125.
115. Liu Jing, Zhang Ye, Qu Jinglei, Xu Ling, Hou Kezuo, Azhang Xiujuan Qu, Liuy Yunpeng. (2011). β -éléémène-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. *BMC cancer*.**11**:183.
116. Lynn DG, Chen RH, Manning KS et Wood HN (1987) The structural characterization of endogenous factors from *Vinca rosae* crown gall tumors that promote cell division of tobacco cells. *Proceedings of the National academy and sciences. Acad. Sci.* **84** (2): 615-619.
117. Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M., (1970). The systematic identification of flavonoids. *Springer*.
118. MacRae, W.D., Towers, G. H. N. Biological activities of lignans. *Phytochemistry* (1984) **23**, 1207-1220.
119. Markkanen T., Makinen ML., Maunuksela E., et Himaen P. (1981) Podophyllotoxin lignans under experimental antiviral research . *Drugs under Experimental and Clinical Research*. **7** (1): 711-718.
120. Markham K. R. 1982 Techniques of flavonoïd identification. Biological Techniques Series. Ed. Treherne J. E. et Rubery P.H. *Academic Press* **1**, 113.
121. Margoth Suarez and all. Dehydrodieugenols from *N.polita*. (1983). *Phytochemistry* **22**, (2): 609-610.
122. Maruzzela, J.C., Scrandis, D.A., Scrandis, J. B. and Grabon, G. (1960). Action of odoriferous organic chemicals and essential oils on wood-destroying fungi. *Plant Disease Report*. **44**: 789-792.
123. May, V.G. and Willuhn, G.: Antivirale wirkung wäbriger pflanzenextrakte in gewebekulturen (1978). *Arzneim-Forsch* **28**:1-7.

124. Medic-Saric M., Jasprica I., Smolcic-Bubalo A. et Mornar A. (2004) Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*. **77** (1-2):361-366.
125. Melo Juilana Oliveira, Maria da Conceição Torrado Truitti (2006). Anti-inflammatory - activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **29**, (11) 2241-2245.
126. Mensor L.L., Menezes F.S., Leitao G.G., Reis A.S., Santos T.C. ; Coube C.S. et Leitao S.G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method *Phytotherapy Research*. **15**, 127-130.
127. Mihelic, F. (1958). Anti-oxidizing drugs. *Croat. Chem. Acta* **30**, 189-198.
128. Mothes, K., Schütte, H.R. and Lickner, M. (1985) *Biochemistry of alkaloids*. VCH Publishers, Deerfield Beach, Florida, pp. 226-231.
129. Morais, A. A. fr Mourao, J. C., Gottlieb, O. R., Koketsu, M., Moura, L. L., Da Silva M.L., Marx, M.C., Mendes, P.H, Magalhaes, M. T., (1972). *An. Acad. Bras. Cienc.* **44**, 320.
130. Moreno, P.R.H. von Poser, G.L., Rates, S. M. K. Yoshida, M., Gottlieb, O.R. Souza, I.A. and Henriques, A.T.: (1993). Chemical constituents and antitumor activity of *Nectandra grandiflora*. *International Journal of Pharmacognosy*. **31**, 189-192.
131. Moreno Silvana Ramos Farias, Adriano Arnobio, Jorge José de Carvalho Ana Lucia Nascimento (2007). The ingestion of a *Nectandra membranacea* extract changes the bioavailability of technetium-99m radiobiocomplex in rat organs. *Biological Research*. **40**, 131-135.
132. Moro José C. (1987). Neolignans from *Nectandra puberula*. *Phytochemistry* **26**, No 1, 269-272.

133. Morton, J.F. Charles C. Thomas (1981). *In Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Springfield. 234-236.
134. Naït Said Nadia (2007) Etude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes *Pituranthos chlorantus* et *Marrubium vulgare*. Mémoire de magister en chimie organique, 85-86.
135. Naudet M. (1992) Manuel des corps gras Tome 1. Ed: Technique et Documentation Lavoisier, Paris 43-45.
136. Nova Transcripts: Frogotten Genius (2007). *PBS Org.* **6**.
137. Novaes, A. C., Silva, M. L. A., Bastos, J. K., (1998) *Rev. Bras. Farm.* **79**, 17.
138. Nitsh J.P. et Nitsch C. 1961. *Synergistes naturels des auxines et des giberellines*. Bull. Soc. Fr. **26**, 2237- 2240.
139. O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speicky H., (2006) Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interaction*. **159**(1):1-17.
140. Orr, J. D., D. G. Lynn. (1992). Biosynthesis of tobacco cell growth. *Plant Physiol.* **98**: 343-352.
141. Ouensanga Christian. Plantes médicinales et remèdes créoles. Tome 1 Editions Desormeaux.
142. Palikur Wayasi, Pierre Grenand, Christian Moretti, Henri Jacquenin, *Pharmacopée Traditionnelles en Guyane*, Créoles. Number 39.
143. Pino Jorge A., Marbot Rolando, Payo Armando, Chao Daniel, Herrera Pedro 2005 Aromatic Plants from Western Cuba. III. Composition of the leaf oils of *Lippia strigulosa* (Mart. et Gal.) Mold. and *Nectandra coriacea* (Sw.) Griseb. *Journal of Essential Oil Research*.

144. Polnoveski M., P. Boulanger, J. Polonovski, F. Tayeau, P. Mandel, et G. Biserte (1977) *Biochimie médicale* tome 1 Ed. Masson, 133-165.
145. Porter N. (2001). Essential oils and their production. *Crop & Food Research*.
146. Qian J. et Qin S. (1999). Pharmacological and clinical studies of elemene, a new anticancer drug. *Chin Clin Cancer* **26**: 1-3.
147. Qingdi Q. Li, Gangduo Wang, Manchaozhang, Christopher F. Cuff, Lanhuang and Eddie Reed (2009). β -elemene, a novel plant-derived antineoplastic agent increases cisplatin chemosensitivity of lung tumor cells by triggering apoptosis. *Oncology Reports*, **22**: 161-170.
148. Rai M. K., Acharya D. et Wadegaonkar P. (2003). Plant derived-antimycotics: Potential of Asteraceous plants, In: Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects, Haworth press, N-York, London, Oxford, 165-185.
149. Reynaud C., Tapin-Lingua S., Elegir G., Petit-Conil M. Baumberger S. (2013). Phenomena responsible for the hydrophobic properties conferred to Kraft pulp by a laccase-catalyzed treatment with lauryl gallate. *Journal of Biotechnology* **167**: 302-308.
150. Ribeiro Alan B. (2005). A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. *Journal of Brazilian Chemical Society*. **6**, n° 3B, 526-530.
151. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. **20**: 933-956.
152. Richter, H.C (1980). Holz und rindenanatomische Untersuchungen a Lauraceen. Doctoral thesis, University of Hamburg.
153. Rohwer. J.G Jens G. Lauraceae: *Nectandra* Organization for Flora Neotropica. (1958). Publié par l'Organisation *Flora Neotropica by the New York Botanical Garden* (1993).

154. Saguez J., Attoumbré J. Giordanengo P., Baltora-Rosset S. (2013). Biological activities of lignans and neolignans on the aphid *Myrus persicae* (Sulzer) *Arthropod-plant Interactions*, **7** (2) 225-233.
155. Sällström Baum S., Hill R., Kilanmaa K. Rommelspacher H. (1999). Effect of ethanol on (R) and (S)-salsolinol, salsoline, and THP in the nucleus cumbens of AA and ANA rats. *Alcohol* **18**(2-3): 165-9.
156. Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P.C.H., De Vries, J. H. M., Katan, B., (2002) Flavonoid and Flavone Intakes in US Health Professionals. *Journal of the American Dietetic Association*. **102** (10), 1414-1420.
157. Schin, JS, Kim, KT, Lee MK (1998) Effets inhibiteurs de biosynthèse de la dopamine sur bulbo-capsulaire dans les cellules PC 12. *Neuroscience Letters* **244** (3): 161-164.
158. Schiff Jr., P.L. (1991) Bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*. **54**: 645-749.
159. Schules, R.E. and Raffauf, R.F.: (1994). De plantis toxicaris e mundo novo tropicale. Commentationes XXXIX. Fébrifuges of northwest Amazonia. Harvard Pap. In Bot. **5**, 50-68.
160. Schultes, R.E.: (1993). Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon *Journal of Ethnopharmacology*. **38**, 129-135.
161. Shamma, M. (1972). The isoquinoline alkaloids: Chemistry and Pharmacology. *Academic Press, New York*.
162. Smadi Abla (2007) Etude de l'extrait chloroformique d'*Oudneya africana*. Mémoire de magister en chimie organique, p. 54-55.
163. Soy Infocenter (2009). History of Soybean and Soyfoods in Mexico and Central America 1877.

164. Speisky H., Cassels BK, Lissi EA, Videla LA. (1991). Antioxidant properties of the alkaloids boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biochem Pharmacol.* **41**(11):1575-81.
165. Stevens, P.F, (2001). onwards, *Angiosperm Phylogeny website*.
166. Still, W.C.; Tempezyk, A.; Hawley, R.C.; Hendrickson, T. (1990). *Journal of the American Chemical Society* **112**, 6127-6129.
167. Sundararaman P, Djerassi C. (1977). A convenient synthesis of progesterone from stigmaterol. *J of Organic Chemistry.* **42** (22), 3633–3634.
168. Surdin Dina. (2013) *Encyclopédie Universalis* "Lactones ou olides".
169. Torres, Ana M. Ricciardi, Gabriela A.L. (2005). Examen del aceite esencial de *Nectandra angustifolia* (Schrad.) Universidad Nacional del Nordeste. *Comunicaciones Cientificas y tecnologicas*.
170. Valley Morena Peter Scora, Scora .W. CA Rainer (1999) Phytochemistry of *Nectandra umbrosa* Berries, Cloudforest Food of the Resplendent Quetzal. **83**, 163-171.
171. Wang XS, Yang W. Tao SJ, Li.K, Li.M. Dong JH, Wang MW. (2006). Effet of delta-elemene on Hela cell lines by apoptosis induction. *Yakugaku Zasshi* **126** (10): 979-90.
172. Wagner H. S. Blatt (1996). Plant Durg Analysis. A thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition. Springer.
173. Wang J. et Mazza G. (2002) Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the Production of Tumor Necrosis Factor α in LPS/IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 4183-4189.
174. Watterman, A.M.: (1946). The effect of water-soluble extractives from the heartwood of tropical American woods on the growth of two wood-decay fungi. *Trop. Woods* **88**,1-11.

175. Weniger B., C. Moretti et M. Sauvain (1996). *Pharmacopée Caribéenne*. Le dictionnaire des plantes médicinales.
176. Weniger, B. Rouzier, M., Daguilh, R. Henrys, D. Henrys, J.H., and Anton, R.: (1986). La médecine populaire dans le plateau central d'Haïti. 2. Inventaire ethno pharmacologique. *Journal of Ethnopharmacology*. **17**, 13-30.
177. Wilt TJ, MacDonald R, Ishani (1999). A. beta-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU.Int.* **83**,976-83.
178. Xian Yang, Xue Zhang, Shui-Yang, Wei-Qi Liu. (2013) Evaluation of the antibacterial activity of Patchouli Oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **12** (3): 307-316.
179. Xiujun Wu, Bernahrd Vogler (2006). A phytochemical investigation of *Nectandra membranacea* from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communication* **1**, (5), 465-468.
180. Yuan J, Gu ZL, Chou WH et Kwok CY. (1999). Elemene induces apoptosis and regulates expression of bcl-2 protein in human leukemia K562 cells. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **20**: 103-106,
181. Zamora-Martinez, M.C. et Pola, C.N. DeP.: (1992). Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico *Journal of Ethnopharmacology*. **35**, 229-257.
182. Zhang, YH., Shin JS., Lee SS. Kim SH., Lee MK (1997) L'inhibition de la tyrosine hydroxylase par bulbocapnine. *Planta Medica* **63** (4): 362-363.
183. Zheng QX; Xu ZJ, Sun XF, Gueritte F, Cesario M, Sun HD, Cheng CHK, HaoXJ, Zhao Y. (2003). Eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from *Laggera alata*. *Journal of Natural Products*, **66**, 1078-1081.

184. Zheng S, Yang H, Zhang S, Wang X, Yu L, Lu J et Li J. (1997). Initial study on naturally occurring products from traditional Chinese herbs and vegetables for chemoprevention. *J Cell Biochem* **27**: S106-S112.
185. Zhou H, Shen J, Hou J, Qiu Y et Luo Q. (2003). Experimental study on apoptosis induced by elemene in glioma cells. *Ai Zheng* **22**:959-963.
186. Zou L, Liu W et Yu L. (2001). β -Elemene induces apoptosis of K562 leukemia cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **23**: 196-198.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Problématique de la différenciation

Nectandra et *Ocotea*

Bien que de nombreuses espèces de *Nectandra* soient largement distribuées dans tout le Brésil, la classification du genre *Nectandra* a été négligée. Cette négligence prête une certaine confusion entre les genres *Nectandra* et *Ocotea*. La distinction morphologique entre les deux genres est la position des cellules des anthères qui dans le genre *Ocotea* sont disposés par paires les unes au-dessus des autres en forme d'arc.

Certains botanistes, comme Kostermans (1952, 1957), ne considèrent pas cette différence comme suffisant pour la séparation ou pour la fusion des deux genres. Le botaniste, Bernadi (1962) semble être du même avis. En ce qui concerne certaines espèces, la distinction entre les genres *Ocotea* et *Nectandra* est en effet difficile. Le caractère utilisé pour leur distinction, à savoir la disposition des cellules des anthères, n'est pas d'une grande importance en taxonomie. Bernadi préfère garder les deux genres distincts. Après une étude sur l'anatomie de l'écorce et du bois de Richter en 1980, Klaus conclut que quelque soit leur différente taille, ils sont extrêmement diversifiés. Le noyau de *Nectandra* est caractérisé par un assemblage très homogène, par la présence de feuilles nervures en forme d'arc recouvert de poils denses et par les tépales papilleuses.

En 1978, dans son ouvrage « Flore illustrée des phanérogames de Guadeloupe et de Martinique » le botaniste Jacques FOURNET, se base sur la classification d'Emberger et distingue clairement les deux genres :

Ocotea Aubl. : Arbres, rarement arbustes. Feuilles alternées, coriaces. Fleurs petites, parfaites, polygames ou dioïques. Calice 6-fide, à lobes subégaux décidus ou persistants. Etamines parfaites 9, même parfois dans les fleurs femelles, en 3 séries, celles des 2 premières séries sans glandes ; anthères introrses (face dont l'ouverture s'ouvre vers l'intérieur de la fleur) à 4 loges ; staminodes présents ou absents. Ovaires entièrement ou partiellement inclus dans le tube du

périanthe ; style court. Baie oblongue ou globuleuse, partiellement et incluse dans une cupule basale. Selon Kostermans 1961, ce genre est à fondre dans le genre *Cinnamomum*.

Nectandra Roll. Ex Rottb. Arbres ou arbustes. Feuilles alternées, rigides ou characées. Inflorescences axillaires et subterminales, en général en panicules. Fleurs parfaites, parfois dioïques ; périanthe tubuleux ou non, 6 segments subégaux, étalés ou réfléchis, le plus souvent caducs. Etamines 9 staminodes petits. Filets les 2 premiers cycles en général courts, ceux du 3^{ème} avec 2 glandes sessiles ; anthères en général papilleuses, à 4 loges sur un rang droit ou courbe, les 6 extérieurs introrses, les 3 intérieurs extrorses (face dont l'ouverture s'ouvre vers l'extérieur de la fleur) . Ovaires le plus souvent glabre ; style en général court ; stigmate discoïde ou subcapité. Fruit globuleux ou elliptique, inséré dans une cupule plate ou hémisphérique à marge simple entière, pédicelle élargi

Mais, dans un second ouvrage édité en 2002, Jacques Fournet se base sur la classification de Cronquist et fusionne les deux genres *Nectandra* Roll. Ex Rottb. et *Ocotea* Aubl. en un seul et unique genre *Ocotea* Aubl. Voici la description générale qu'il propose :

Arbres ou arbuste. Feuilles pétiolées, alternées, membraneuses, chartacées ou coriaces, à nervures pennées, portant souvent des dogmatises aux aisselles des nervures en dessous. Inflorescences axillaires, paniculées. Fleurs parfaites ou polygames, ou plante monoïque ou dioïque. Périanthe 6-mère, à lobes blanc-jaunâtres, en général égaux, érigés ou réfléchis à l'anthèse, persistants ou caduques ; hypanthium petit, un peu accru au fruit. Etamines parfaites 9, en 3 cycles ; deux cycles externes sans glandes, à anthères introrses, 4-loculaires, le 3^{ème} extrorse, à filets portant 2 glandes basales, 4^{ème} cycle staminodial, très réduit ou nul. Pistil globuleux ; style court, glabre ou pubescents. Baie oblongue à globuleuse, insérée ou incluse dans l'extrémité expansée du pédicelle.

Nectandra ou *Ocotea*

Le genre *Nectandra*, est décrit en premier par Rottboell en 1778, avec deux espèces, *N. sanguinea* et *N. bijuga*, basé sur les notes manuscrites de Rolander. Le nom de *Nectandra* remonte à une interprétation erronée de la structure des fleurs. Rottboell décrit les neuf étamines comme des lobes de nectaires, et leurs volets comme des anthères, découlant à partir des pores vers le nectaire.

Comme l'indique l'épithète *bijuga*, les valves des anthères sont disposées en deux paires dans cette espèce, alors que pour le *N. sanguinea*, ils sont disposés en une rangée. La dernière espèce a toujours été considérée comme du type *Nectandra* et la disposition des sacs de pollen est devenue le plus important caractère générique.

La dernière monographie de *Nectandra* date de plus d'un siècle. Il a fait partie des *Lauracea Americanae* de Mez, qui à ce jour est resté la source la plus importante de référence pour cette famille dans le Neotropics.

Beaucoup de genres ont été révisés depuis, sauf les deux plus grands, *Nectandra* et *Ocotea*. Le genre *Ocotea* est susceptible de rester ainsi en raison de son très grand nombre d'espèces. C.K. Allen a tenté des modifications sur le genre *Nectandra* mais, elles n'ont jamais été achevées.

En 1791, Schreber est le premier à faire fusionner les genres *Ocotea* et *Nectandra* sous le nom illégitime de *Porostema*. Swartz, en 1798, est allé encore plus loin, en plaçant les *Nectandra* dans les *Laurus*. Non pas en raison de similitude entre les deux, mais simplement parce qu'il était plus pratique de traiter tous les *Lauraceae* comme des *Laurus*.

En 1825, Sprengel, regroupe toutes les espèces d'*Ocotea* et *Nectandra* dans le genre *Persea*, sans donner de caractères génériques ou d'explications.

Nees, 1833, est le premier à circonscrire *Nectandra* dans le sens moderne du terme, en mettant l'accent sur la position des sacs de pollen. Nees, publie dix nouvelles espèces, et il divise le genre en deux sous genres, *Pomatium* et *Nectandra*. Il ne mentionne pas l'espèce *Nectandra sanguinea*.

Dans la même année, il publie la première classification majeure de la famille des *Lauraceae*, incluant 43 genres. *Nectandra* est placé dans une tribu de sa propre initiation, loin des genres *Persea* et *Ocotea*. En 1836, il reconnaît au total 42 espèces dans le genre *Nectandra*.

Le traitement des *Lauraceae* établi par Meissner, en 1864, place les *Nectandra* et ses parents proches dans une même tribu appelée *Oreodaphneae*. Dans cette même tribu, il décrit le genre *Synandrodaphne*, plus tard il y place les *Nectandra*.

Meissner reconnaît 72 espèces dans les *Nectandra*, mais ses concepts sont assez douteux d'après Rohwer. A plusieurs reprises, il cite les mêmes espèces dans différents genres.

En 1880, Bentham propose une nouvelle classification complète de la famille. Le nombre de genre est radicalement réduit, et beaucoup d'entre eux ont atteint leur restriction moderne. *Nectandra* n'est pas affecté par ces changements, mais, Bentham a exprimé des doutes sur sa subdivision et a noté des similitudes avec les *Ocotea*.

La plus récente monographie est publiée par Mez, en 1889, pas seulement du genre *Nectandra* mais de toutes les *Lauraceae* du Nouveau Monde. *Synandrodaphne* est traité comme un sous genre de *Nectandra* et le sous-genre typique est appelé *Eunectandra*.

Britton et Millspaugh, 1920, place les *Nectandra* dans la synonymie d'*Ocotea*, sans expliquer leur décision.

En 1935, le Sixième Congrès International Botanique a décidé de conserver le nom de *Nectandra* Rolander ex Rottboell. Kostermans en 1952, rejette le caractère générique basé sur la position des sacs de pollen, et transfère les espèces de *Pleurothyrium* dans *Ocotea* puis suggère que la même chose devrait être faite avec les *Nectandra*. Cinq ans plus tard, il classe *Nectandra* et *Pleurothyrium* comme des sous genre d'*Ocotea*.

Bernardi, en 1962, garde *Nectandra* séparé de nouveau, bien qu'il reconnaisse les particularités variées et compliquées des *Nectandra*. Comme Bernardi, Hutchinson en 1964 considère *Nectandra* comme un genre unique. Il se base sur très peu d'observation personnelle et sur la littérature copiée qui comprend beaucoup d'erreurs.

Le statut générique de *Nectandra*, *Ocotea* et *Pleurothyrium* est encore très discuté par Allen en 1966. En se basant essentiellement sur la forme des anthères, Allen conclut qu'il y a de bonnes raisons de maintenir les deux genres *Nectandra* et *Pleurothyrium* séparés.

D'autre part, Howard en 1981, recommande de fusionner *Nectandra* et *Ocotea*, dans le but de limiter la flore des Petites Antilles.

ANNEXE 2 : Espèces du genre *Nectandra*

Le tableau récapitulatif ci-dessous présente les 114 espèces de *Nectandra* répertoriées avec en gras les espèces présentes aux Petites Antilles.

Tableau 53 : Espèces de *Nectandra* répertoriées (En gras les *Nectandra* présentes aux Petites Antilles) [Rohwer 1958]

Espèces du genre <i>Nectandra</i>		
<i>Nectandra acutifolia</i>	<i>Nectandra amazonium</i>	<i>Nectandra ambigens</i>
<i>Nectandra angusta</i>	<i>Nectandra angustifolia</i>	<i>Nectandra apiculata</i>
<i>Nectandra astyla</i>	<i>Nectandra aurea</i>	<i>Nectandra baccans</i>
<i>Nectandra barbellata</i>	<i>Nectandra bartlettiana</i>	<i>Nectandra belizensis</i>
<i>Nectandra bicolor</i>	<i>Nectandra brittonii</i>	<i>Nectandra brochididroma</i>
<i>Nectandra canaliculata</i>	<i>Nectandra canescent</i>	<i>Nectandra caudatoacuminata</i>
<i>Nectandra cerifolia</i> ,	<i>Nectandra cissiflora</i>	<i>Nectandra citrifolia</i>
<i>Nectandra coeloclada</i>	<i>Nectandra colorada</i>	<i>Nectandra cordata</i> ,
<i>Nectandra coriacea</i>	<i>Nectandra crassiloba</i>	<i>Nectandra cufodontisii</i>
<i>Nectandra cuneatocordata</i>	<i>Nectandra cuneatocordata</i>	<i>Nectandra cuspidata</i>
<i>Nectandra dasystyla</i>	<i>Nectandra debilis</i>	<i>Nectandra discolour</i>
<i>Nectandra egensis</i>	<i>Nectandra embirensis</i>	<i>Nectandra filiflora</i>
<i>Nectandra fragans</i>	<i>Nectandra fulsa</i>	<i>Nectandra gardneri</i>
<i>Nectandra globosa</i>	<i>Nectandra gracilis</i>	<i>Nectandra grandiflora</i>
<i>Nectandra grisea</i>	<i>Nectandra guararipo</i>	<i>Nectandra herrerae</i>
<i>Nectandra heterotricha</i>	<i>Nectandra hihua</i>	<i>Nectandra hirtella</i>
<i>Nectandra hypoleuca</i>	<i>Nectandra impressa</i>	<i>Nectandra japurensis</i>
<i>Nectandra krugii</i>	<i>Nectandra lanceolata</i>	<i>Nectandra latissima</i>
<i>Nectandra laurel</i>	<i>Nectandra leucantha</i>	<i>Nectandra leucocorne</i>
<i>Nectandra lineata</i>	<i>Nectandra lineatfolia</i>	<i>Nectandra logifolia</i>
<i>Nectandra longicaudata</i>	<i>Nectandra longipetiolata</i>	<i>Nectandra lundellii</i>
<i>Nectandra martinicensis</i>	<i>Nectandra matogrosensis</i>	<i>Nectandra matthewsii</i>
<i>Nectandra matudai</i>	<i>Nectandra maynensis</i>	<i>Nectandra megapotamica</i>
<i>Nectandra membranacea</i>	<i>Nectandra micranthera</i>	<i>Nectandra microcarpa</i>
<i>Nectandra minima</i>	<i>Nectandra miraflores</i>	<i>Nectandra nitida</i>
<i>Nectandra nitidula</i>	<i>Nectandra obtusata</i>	<i>Nectandra olida</i>

Espèces du genre <i>Nectandra</i>		
<i>Nectandra oppositifolia</i>	<i>Nectandra paranaensis</i>	<i>Nectandra parviflora</i>
<i>Nectandra patens</i>	<i>Nectandra paucinervia</i>	<i>Nectandra pearcei</i>
<i>Nectandra pichurium</i>	<i>Nectandra psammophila</i>	<i>Nectandra pseudocotea</i>
<i>Nectandra puberula</i>	<i>Nectandra pulchra</i>	<i>Nectandra pulverulenta</i>
<i>Nectandra purpurea</i>	<i>Nectandra ramonensis</i>	<i>Nectandra reflexa</i>
<i>Nectandra reticulata</i>	<i>Nectandra riparia</i>	<i>Nectandra rudis</i>
<i>Nectandra rufooramula</i>	<i>Nectandra salicifolia</i>	<i>Nectandra salicina</i>
<i>Nectandra sanguinea</i>	<i>Nectandra smithii</i>	<i>Nectandra sordida</i>
<i>Nectandra spicata</i>	<i>Nectandra subbullata</i>	<i>Nectandra truxillensis</i>
<i>Nectandra turbacensis</i>	<i>Nectandra umbrosa</i>	<i>Nectandra utilis</i>
<i>Nectandra venulosa</i>	<i>Nectandra vubiurnoides</i>	<i>Nectandra warmingii</i>
<i>Nectandra weddellii</i>	<i>Nectandra wurdackii</i>	<i>Nectandra yarinensis</i>

ANNEXE 3 : Description botanique des *Nectandra* des Petites Antilles Françaises (Fournet 1978 et Rohwer 1993)

1. *Nectandra patens* (Swartz) Grisebach 1860

Noms vernaculaires en Martinique et Guadeloupe : Laurier Isabelle rouge, Laurier gland, Laurier doux, bois doux, bois petit-jean.

Localisation : Aux Antilles sauf à Cuba, de plus en plus présents dans les forêts sèches et les arbustes, généralement sur du calcaire et dans les forêts humides. On les retrouve au niveau de la mer à environ 1500 m d'altitude. Guadeloupe : Trois-Rivières, Capesterre. Martinique : Fontaine Chaude, Rivière Pilote, St Esprit, Fort Desaix, Rivière Madame.

Phénologie : La floraison a lieu principalement de juin à novembre, aux « Petites Antilles », quelques fois plus tôt. La collecte de fruits se fait à partir du mois de mars jusqu'à juillet.

Nectandra Patens est reconnue par ses tépales plus ou moins elliptiques, qui sont généralement légèrement papillosoes à l'intérieur. Elle possède un filament relativement long et des sacs de pollen qui sont soit rangés par paire de deux, l'un au-dessus de l'autre, parfois de taille inégale. C'est un groupe très hétérogène. La population est différente d'île en île. Aux Petites Antilles, *Nectandra patens*, a peut être été modifiée par une hybridation à partir de *Nectandra coriacea*, ou à partir de *Nectandra purpurea*. En effet, *Nectandra patens* et *Nectandra purpurea* ont pratiquement la même structure de fleur, et dans les deux espèces, les feuilles sont plutôt variables.

Ce sont des arbustes ou pour la plupart de petits arbres, qui atteignent rarement 20 m, aux rameaux légèrement pubescent de couleur gris brun. Le tronc est de forme cylindrique avec une écorce noirâtre.

Les feuilles sont alternes, ovales à elliptiques de longueur 7-20 cm et largeur de 3-9 cm. Leur base est aigüe ou arrondie, à l'apex acuminé, vert sombre, au revers pubescent. Les nervures

sont très imprimées au dessus et saillantes au dessous, avec parfois des touffes de poils courts aux aisselles. Les nervilles sont grossièrement réticulées sur les deux faces. Les panicules axillaires sont très ouvertes, ramifiées dès la base.

Les fleurs sont petites et unisexuée, verdâtres de longueur 2,5 mm. Elles sont groupées en panicules plus ou moins ramifiées, aux axes légèrement pubescents. Odorantes, elles ont des tépales elliptiques de longueur 2 à 2,5 mm et de largeur 1,2 à 1,5 mm, blancs, et pubescents sur les deux faces.

Les fruits sont oblongs ellipsoïdes à oblongs ovoïdes de longueur 20-25 mm de couleur blanchâtre, puis noire à maturité, enchâssés dans une cupule rougeâtre.



Figure 184 : Fruits et feuilles de *Nectandra patens*

2. *Nectandra coriacea* (Swartz) Grisebatch 1860

Noms vernaculaires : En Guadeloupe : bois fourmi, bois négresse, laurier. En Martinique : bois négresse, laurier, laurier fine.

Localisation : En Floride, aux Antilles et dans la péninsule du Yucatan habituellement dans les régions sèches ou humides. En Guadeloupe : Basse-Terre, bois de Trois-rivières, Bains Jaunes, Houelmont, Grande-Terre, Petit Canal, Morne Agathe, Marie Galante. En Martinique: Fort de France, Camp de Balata, arbres de 12-14 m (fleurs et fruits), Péninsule de la Caravelle 25 m (fleurs).

Phénologie : Les fleurs ont été collectées tout au long de l'année, mais dans l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce, les principales périodes de floraison sont comprises de mars à juin. La fructification a lieu sur une période moins longue, souvent de juillet à septembre.

Utilisations : Il est utilisé pour son bois en Martinique et aux îles Canouan.

Description : *Nectandra coriacea* est reconnu par ses inflorescences en grappes, qui sont plus ou moins allongées, des tépales nettement papillosoes, sa petite anthère, et par ses feuilles glabre. La partie supérieure de feuilles et du pétiole est glabre, tandis que sur la surface inférieure quelques poils apparaissent au moins sur les jeunes feuilles. Des poils peuvent être également présents dans les aisselles des veines secondaires, mais ce caractère est fréquent seulement à Porto- Rico.

Aux Antilles, *Nectandra coriacea*, est probablement l'espèce la plus commune de la famille. Stérile, la fructification n'est pas facilement séparable de celle de *Nectandra patens*, qui se différencie dans la fleur par ses tépales moins papillosoes, très elliptiques, par ses longs filaments, et dans la plupart des cas, par des inflorescences insérées dans les aisselles du feuillage.

Les feuilles de *Nectandra coriacea* sont obtues, cartilagineuses, glabres ou presque, de longueur 6-15 cm et de largeur 2 à 5,5 cm. La base de la feuille est atténuée, et la pointe est aigüe ou acuminée. La face supérieure est verte sombre, luisante. L'intérieur est terne, vert grisâtre. Les nervures sont réticulées. Les panicules axiales sont pédiculées, pubérulantes et pluri-multiflores, plus ou moins pendantes et plus courtes que les feuilles pédicelles de longueur 4-7 mm.

Les fruits sont des ovoïdes subglobuleux, bleus sombres à noirs à maturité, de longueur 10-18 mm. La cupule est rouge ou jaune. Les fleurs ont des tépales rotacés (en roue) blancs, à l'ovaire glabre, groupées en panicules naissant plus ou moins pileux.



Figure 185 : fleurs et fruits de *Nectandra coriacea*

3. ***Nectandra antillana*** (Ruiz et Pavon) Rohwer, Meissner 1864

Noms vernaculaires aux Antilles : Bois-laurier, laurier-cerise.

Localisation : Guadeloupe : Bois de Vieux-Habitants, de Dugommier, de Dehaies, hauteurs de Capesterre et de Sainte-Marie. Martinique : Bois dégradés de Fontaine Didier, Fontaine Absalon, Calebasse, Lorrain (Grand Anse), Balata, Alma.

Phénologie : La floraison a lieu à deux périodes : de janvier à avril et de juin à novembre. Les fruits sont récoltés beaucoup moins fréquemment. Dans le nord, la plupart des fruits est collectée entre février et mai, souvent avec les fleurs, certains en août et septembre.

Utilisation : Assimilée à *Nectandra hihua*, c'est une espèce assez commune dans certaines régions et l'utilisation pour son bois n'a été signalé qu'une seule fois.

Description : Ce sont des arbres pouvant atteindre les 30 m ou parfois des arbustes dont émane un agréable parfum. L'écorce est de couleur rouge-brun foncée, à écailles épaisses. Quand les inflorescences apparaissent, les feuilles sont matures, axillaires et sont coriaces de longueur 6-23 cm et de largeur allant de 2 à 8 cm. Leur base est aigue avec un apex obtusément acuminé. Les nervures latérales sont très irrégulièrement alternées. Elles sont planes en dessus et saillantes en dessous. Les nervilles sont souvent peu visibles. Les pétioles ont une longueur de 5-17 mm plus ou moins pubérulants. Les panicules sont multicolores confinées aux extrémités, avec des branches étalées, pubérulantes.

Les fleurs sont nombreuses. Celles-ci sont de couleurs blanches, bisexuelles, de diamètre 5 à 17 mm, de longueur 4-4,5 mm tomenteuses sur les deux faces avec des tépales caducs. Les fruits sont globuleux de diamètre 8-10 mm de couleur bleu-noire à maturité, avec des cupules rouges de diamètre 7-9 mm. Ils sont souvent plus gros suite à des piqûres d'insectes et sans noyau.



Figure 186 : Feuilles de *Nectandra antillana*

4. *Nectandra dominicana*

Cette espèce n'est pas considérée comme une Nectandra d'après Rohwer qui l'a classé dans la catégorie « Noms douteux et Exclu du Taxon ». Or, certains botanistes spécialistes du genre et chercheurs (Lurel, Rousteau) aux Antilles, certifie que cette espèce appartient bien au genre Nectandra.

Noms vernaculaires: Laurier blanc, laurier noir, laurier gombo, bois doux muscade, laurier avocat, laurier poivre.

Localisation en Guadeloupe : Matouba, bois de bains jaunes. Martinique : bois de l'Apajou-Bouillon, Lorrain, Fonds Saint Denis, bases des Pitons du Carbet, Alma, Colson, Trace, Deux-Choux (Gros Morne), Morne vert (Prise d'eau, Bernadette).

Phénologie : La floraison a lieu d'août à septembre.

Description : C'est un arbre persistant de 12 m de haut, à tronc nu dont l'écorce est lisse, épaisse et verdâtre. Les feuilles sont oblongues ou elliptiques à ovales, lancéolées, de longueur 13-18 cm, et de largeur de 6-13 cm, coriaces, à la base obtuse, à l'apex obtus ou aigu, au pétiole glabrescent de longueur 30 mm.

Les fleurs sont unisexuées, vertes à pourpres, subcampanulées de diamètre 5-6 mm, groupées en panicules axillaires. Les drupes sont subcylindriques à ellipsoïdes et noires de longueur 40

mm, et diamètre de 13-18 mm, enchâssées dans une cupule subpatériforme et verruqueuse de diamètre 15 mm.



Figure 187 : Feuilles de *Nectandra dominicana* (Guadeloupe)

5. *Nectandra krugii* Mez, Jahrb. Königl.Bot.Gart. 1889

Noms vernaculaires en Guadeloupe : bois doux avocat, bois doux jaune, laurier caillé, bois doux desbonnes. Martinique : laurier gland.

Localisation : Guadeloupe : hauteurs de Capesterre Belle-eau.

Phénologie : Les fleurs sont récoltées en juin, août, septembre, novembre et décembre et les fruits en décembre, mars et avril.

Utilisations : Duss indique sur une étiquette dès 1896 que l'espèce est devenue rare en raison de la surexploitation de son bois. *Nectandra krugii* est facilement reconnue par la diffusion jaunâtre sur les jeunes rameaux et les fleurs. Dans les Antilles, c'est l'espèce qui a la plus grande quantité de fleurs. La structure des fleurs suggère une relation avec le groupe de *Nectandra acutifolia*. Mais, *Nectandra krugii* ne peut être confondue avec les autres espèces des Antilles.

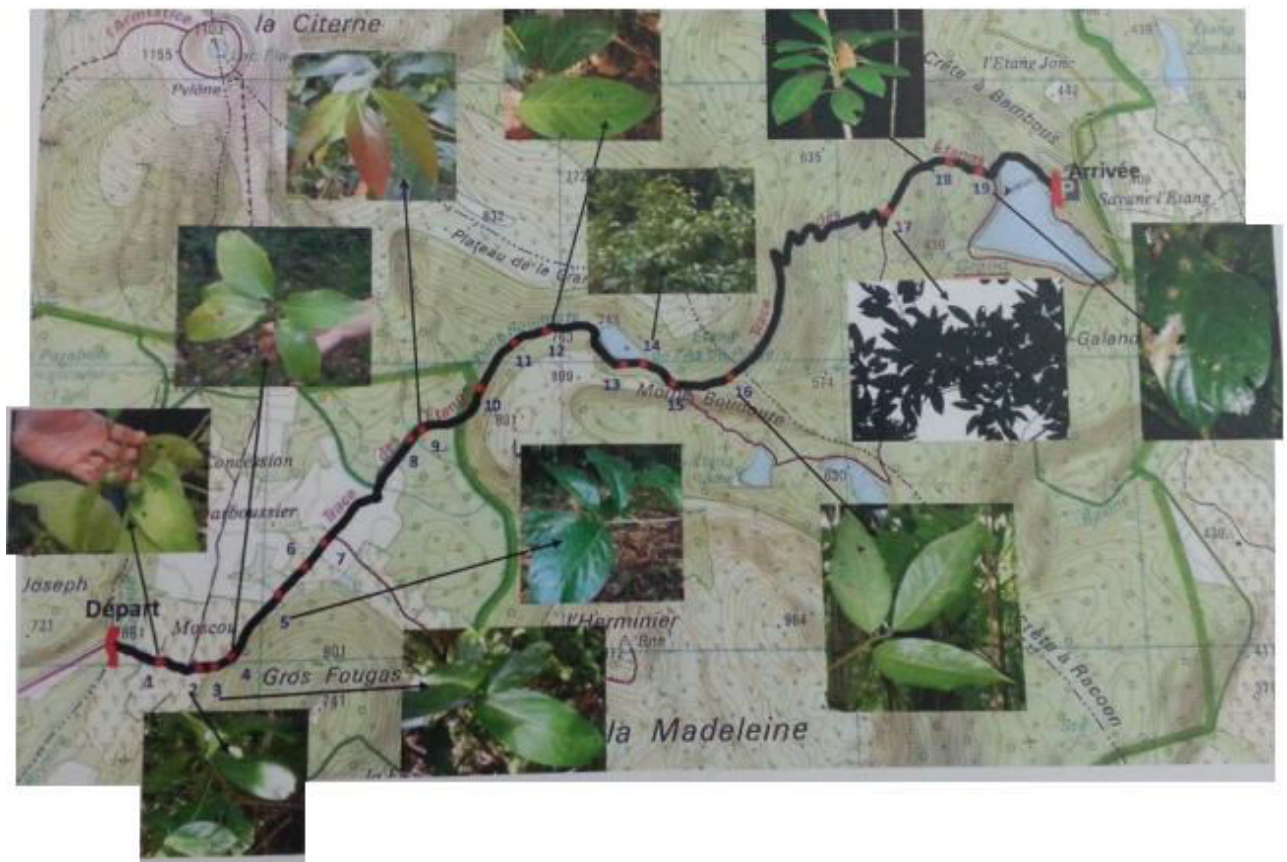
Description : Arbre persistant de 10 à 25 m, aux rameaux naissants tomenteux. Les feuilles sont elliptiques, ovales lancéolées de longueur 11-25 cm et largeur 3-9 cm, subcoriaces, à la base aigüe ou obtuse. L'apex est acuminé, avec un pétiole, tomenteux ou pubescens, long de 10-25 mm. Les nervilles latérales sont déprimées en dessus et saillantes au dessous. Les fleurs sont unisexuées de couleur blanche avec un diamètre de 8-10 mm, groupées en panicules axillaires. Les drupes sont elliptiques, longues de 15-18 mm et de diamètre 8-10 mm, enchassées dans une cupule hémisphérique longue de 5 mm et de diamètre 10 mm.

ANNEXE 4 : Prospection sur le terrain

TRACE VICTOR HUGO MATOUBA : LOCALISATION DES LAURACEAE



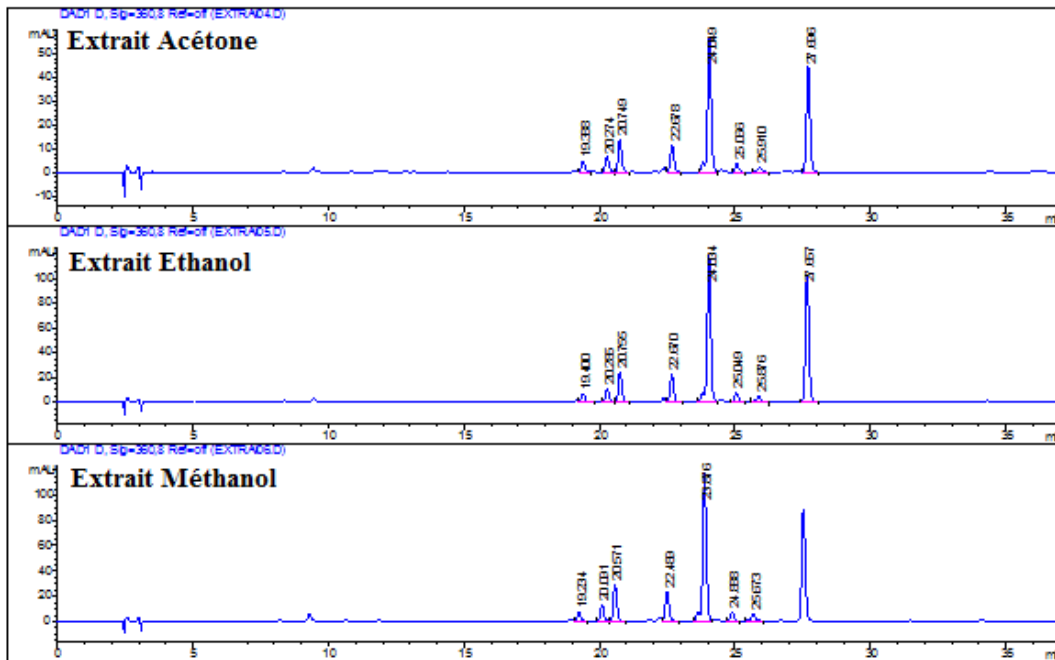
TRACE DES ETANGS



ANNEXE 5 : Chromatogramme UV et MS des extraits polaires de feuilles stade B

Chromatographie liquide à haute performance à détecteur UV

a)



b)

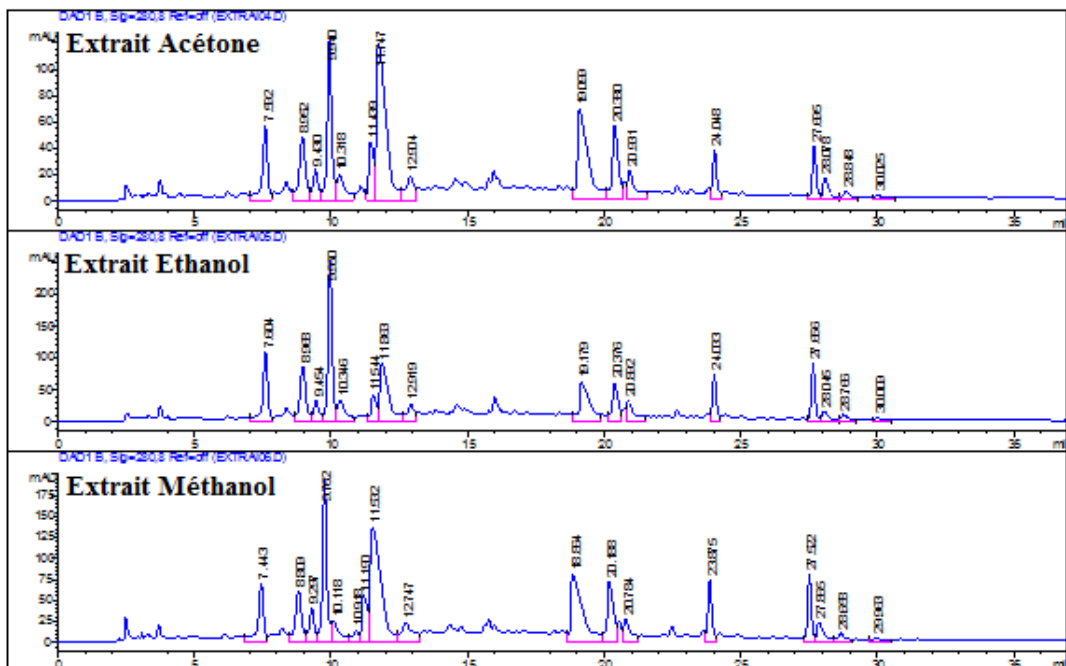


Figure 188 : Chromatogrammes des extraits acétone, éthanol et méthanol de feuilles (stade B) a) 280 nm et b) 360 nm

Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode positif

Le profil des chromatogrammes obtenus pour les différents solvants d'extraction ne présentent pas de différences significatives.

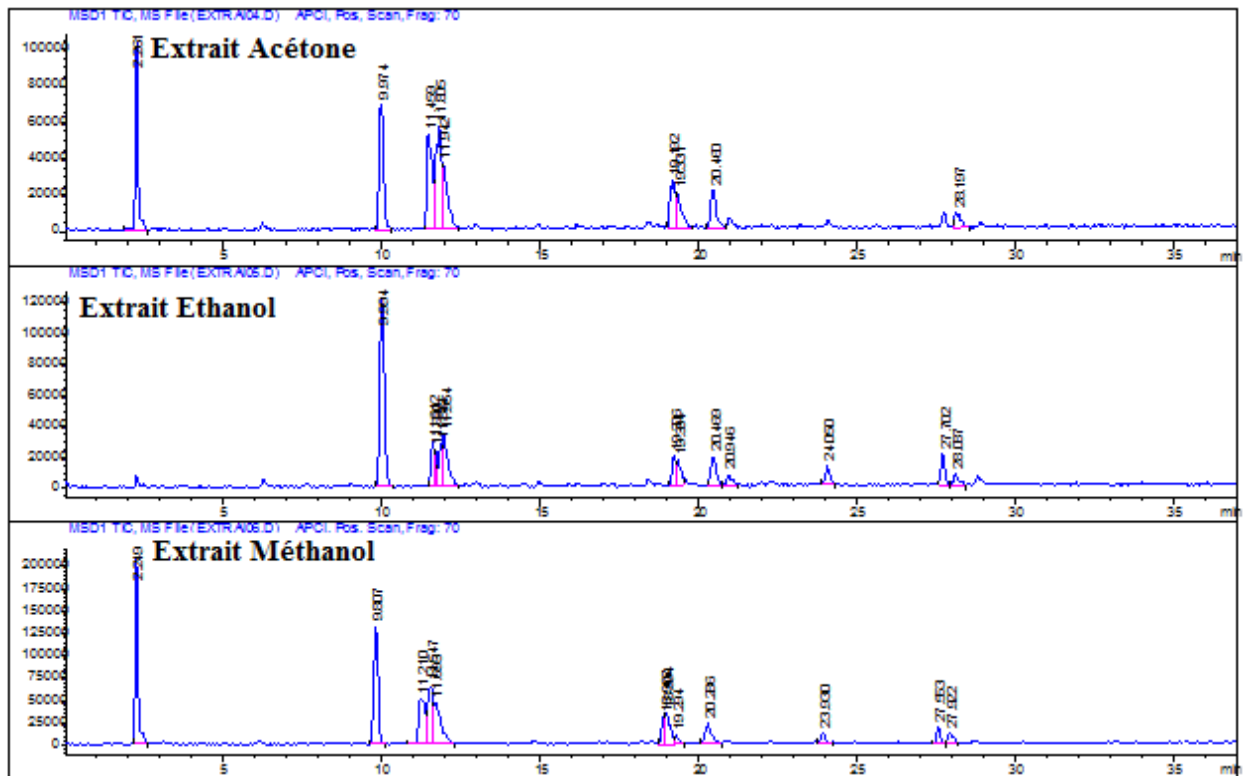


Figure 189 : Chromatogramme MS des extraits acétone, éthanol et méthanol des feuilles (Stade B)

Les chromatogrammes HPLC/DAD à 280 et 360 nm et LC/MS (mode positif) sont pratiquement identiques pour tous les extraits de feuilles récoltés au stade B, quelque soit le solvant utilisé. Ces 3 extraits sont donc rassemblés afin d'avoir suffisamment de masse pour le fractionnement.

ANNEXE 6 : Activité antifongique sur *Candida albicans*
des extraits cyclohexane de *N. membranacea*

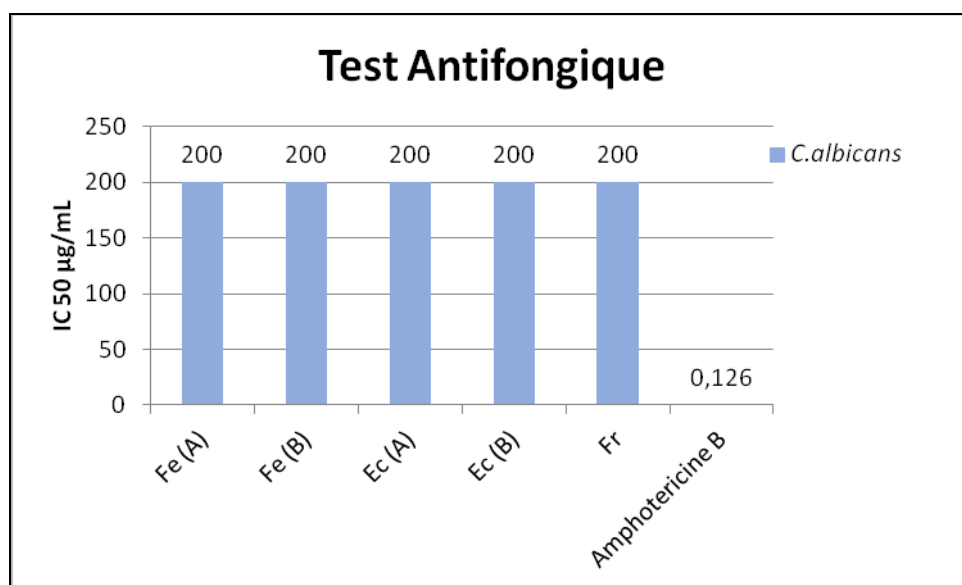


Figure 190 : Evaluation de l'activité antifongique des extraits cyclohexane

ANNEXE 7 : Activité antibactérienne sur *S. aureus* et *E. coli*
des extraits cyclohexane de *N. membranacea*

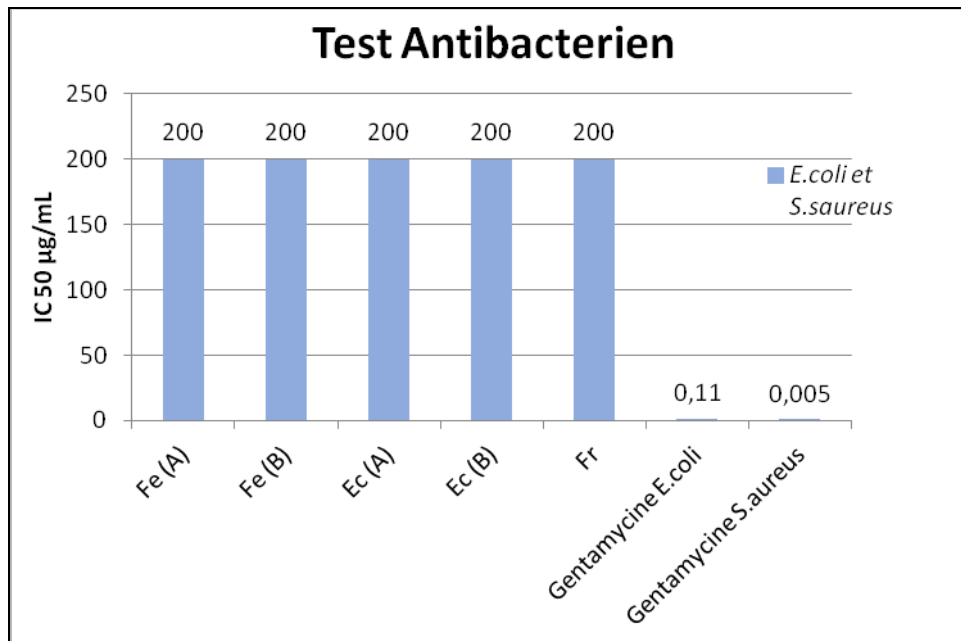


Figure 191 : Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits cyclohexane

ANNEXE 8 : Activité anticancéreuse des extraits bruts polaires de *N. membranacea*

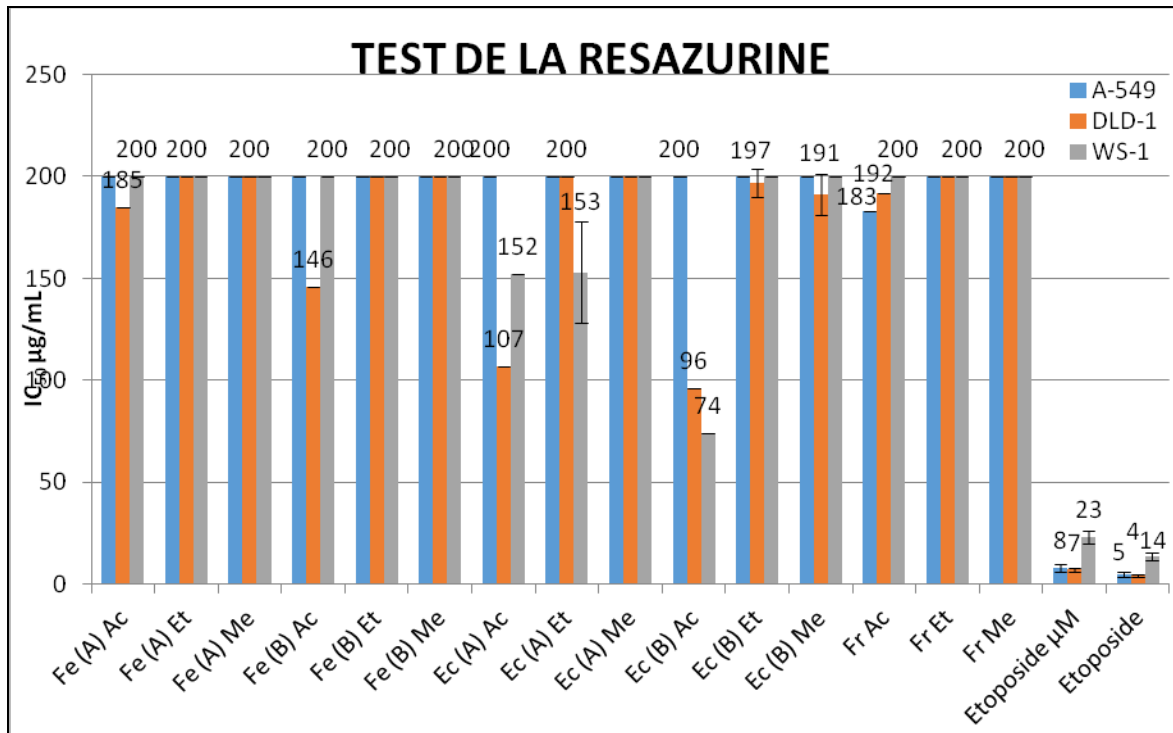


Figure 192 : Activité anticancéreuse des extraits polaire par test de la Resazurine

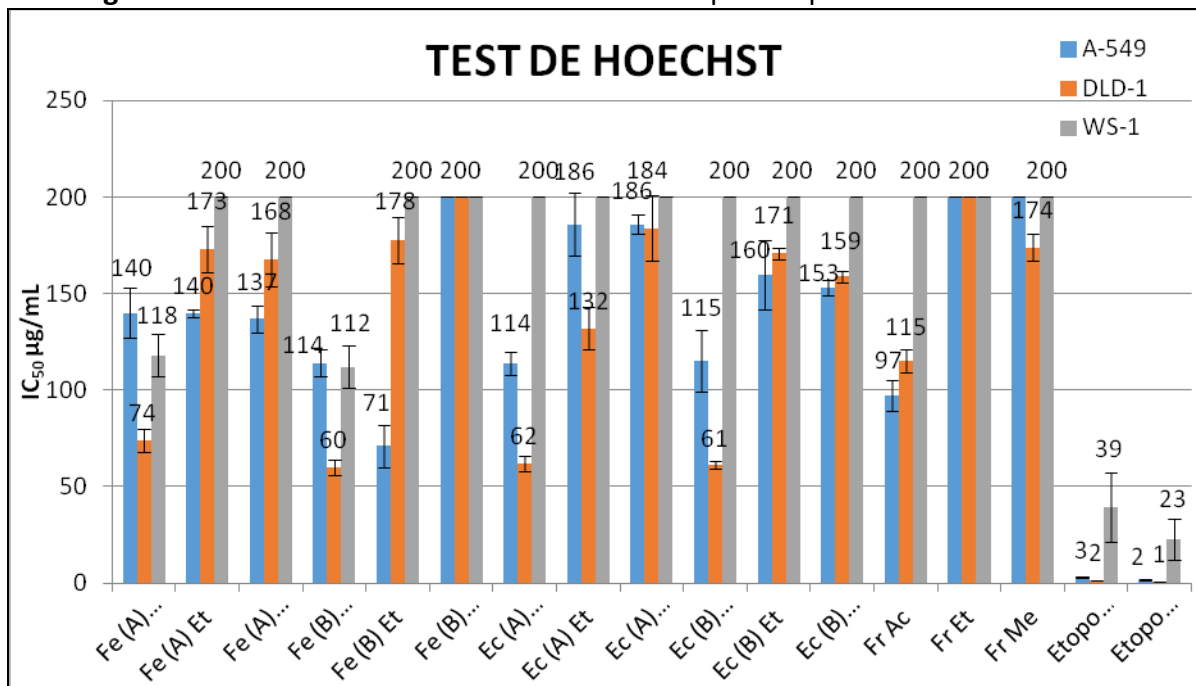


Figure 193 : Activité anticancéreuse des extraits polaires par le test de Hoechst

ANNEXE 9 : Activité antibactérienne sur *S.aureus* et *E.coli*
des extraits bruts polaires de *N. membranacea*

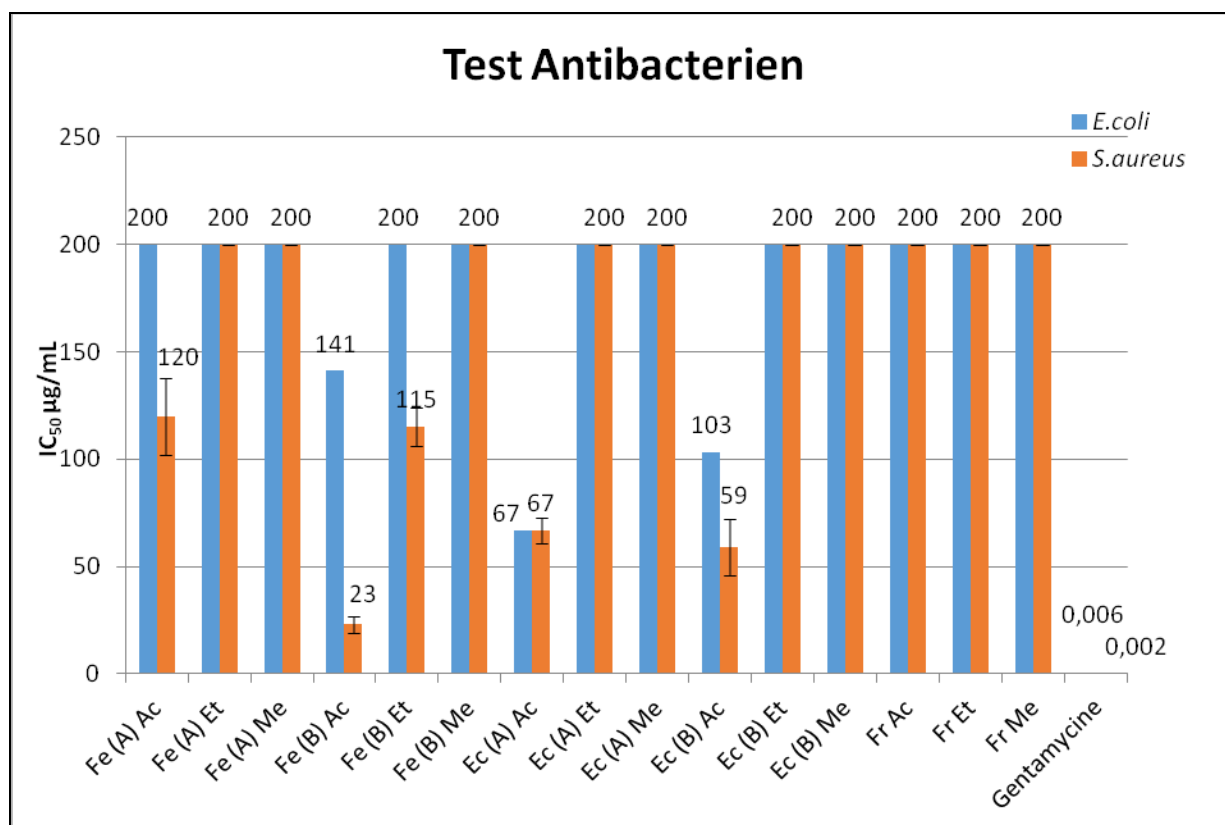


Figure 194 : Evaluation de l'activité antibactérienne sur *E. coli* et *S. aureus* des extraits polaires de *N. membranacea*

ANNEXE 10 : Activité antifongique sur *Candida albicans*
des extraits bruts polaires de *N. membranacea*

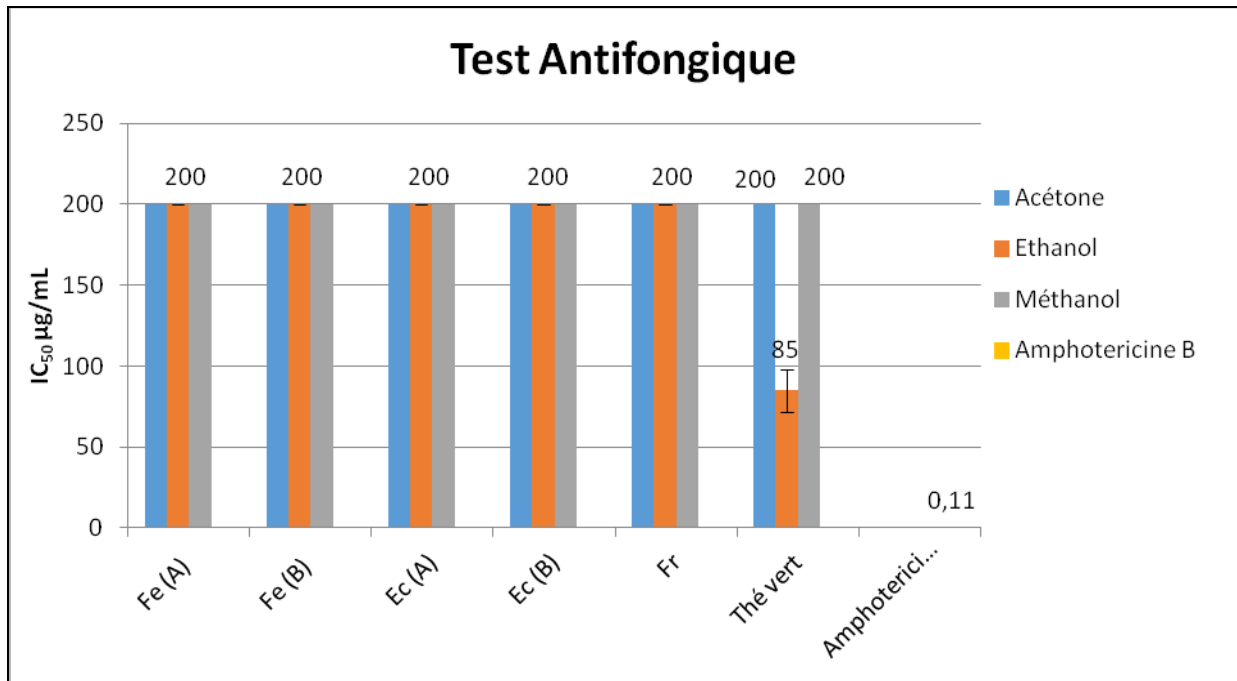


Figure 195 : Evaluation de l'activité antifongique des extraits bruts

ANNEXE 11 : Activité antibactérienne sur *S. aureus* et *E. coli*
des extraits alcaloïdes de *N. membranacea*

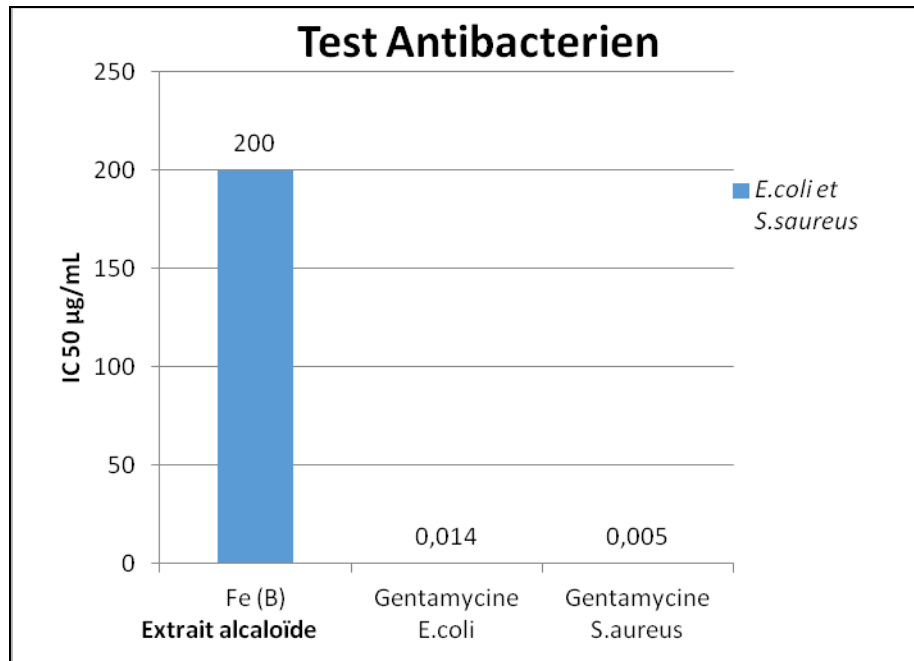


Figure 196 : Evaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait brut alcaloïdes de feuilles stade B