

**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG
FACULTE DE PHARMACIE**

en cotutelle avec

**L'UNIVERSITE D'ABOMEY-CALAVI BENIN
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**

THESE

**Soutenu à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
le 14 décembre 2005 pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR de L' UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
(Mention Sciences Pharmaceutiques)
Domaine : PHARMACOGNOSIE**

présentée par

Latifou LAGNIKA

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DE SUBSTANCES NATURELLES ISOLEES DE PLANTES BENINOISES

JURY

Monsieur B. WENIGER

Monsieur le Professeur A. SANNI

Monsieur le Professeur M. HIBERT

Madame le Professeur V. COLLOT

Monsieur le Professeur K. DRAMANE

Directeur de Thèse

Co-Directeur de thèse

Rapporteur interne

Rapporteur externe

**Rapporteur externe non
membre du jury**

Nous tenons à remercier :

Monsieur Bernard WENIGER, Directeur de thèse

Maître de conférences en Pharmacochimie des Substances Naturelles à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

&

Monsieur Ambaliou SANNI, co-Directeur de thèse

Professeur de Biochimie et biologie moléculaire à la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey-calavi, Bénin

qui, durant ces trois années, ont bien voulu diriger mes travaux de thèse, en me faisant bénéficier de leur expérience, leur compétences et encouragements.

Monsieur Marcel HIBERT

Professeur de Pharmacochimie à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Strasbourg

Madame Valérie COLLOT

Professeur de Pharmacognosie à l'Université de Caen

qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger et de siéger dans le jury de thèse.

En témoignage de ma reconnaissance et respectueuse gratitude

Nous tenons à remercier :

L'Agence Universitaire Francophone (AUF), dans le cadre du projet scientifique inter-universitaire intitulé : Activité antipaludique et action réversante de la chloroquinorésistance d'extraits d'espèces médicinales et de biomolécules purifiées issues des pharmacopées traditionnelles béninoise et ivoirienne.

L'Ambassade de France au Bénin qui nous a attribué une bourse en alternance.

L'Union International de Biochimie et Biologie Moléculaire (IUBMB) pour l'allocation qu'elle nous a attribuée.

Nos remerciements vont également à toute les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et notamment à :

Madame Catherine VONTHRON-SENECHAU

Pour son aide constante et ses précieux conseils pendant tout la durée de ce travail. J'ai été très content d'avoir travaillé avec toi. Merci

Monsieur le Professeur Robert ANTON

Directeur du Laboratoire de Pharmacognosie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Pour l'accueil chaleureux que vous nous avez toujours réservé dans votre Laboratoire et je souhaite que cette collaboration initiée se poursuive. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

Madame Annelise LOBSTEIN

Pour votre accueil dès notre arrivé au Laboratoire, vos conseils et votre disponibilité. Mes sincères remerciements.

Monsieur Bernard KUBALLA

Pour votre simplicité et disponibilité

Martine BERNARD

Pour sa bonne humeur et disponibilité. Sincères remerciements

Monsieur le Professeur Jacques Henry WEIL

Pour votre engagement, votre aide et votre soutien quotidien durant toutes ces années. Vous êtes l'un des pionniers de la création des licence et maîtrise de Biochimie au Bénin. Toute notre gratitude.

Monsieur Cyril ANTREAUME

Pour sa gentillesse, sa grande compétence dans le domaine de la RMN et sa contribution à l'élucidation structurale des composés.

Monsieur le Professeur Karim DRAMANE

Rapporteur externe : vous avez accepté, prendre de votre temps, pour juger cette thèse. Tous nos remerciements.

Monsieur le Professeur Mansour MOUDACHIROU

Pour votre disponibilité et votre encouragement. Mes sincères remerciements.

Docteur Lamine Saïd BABA MOUSSA, Madame Lucie AYI FANOU, Monsieur Nicodème CHABI. Pour vos conseils et encouragement pendant les moments les plus difficiles.

Nous ne saurions oublier tous nos collègues et stagiaires du Laboratoire de Pharmacognosie et du Laboratoire de biochimie et Biologie moléculaire de l'UAC : Saliou N'GOM, CHAABI Mehdi, Inès EDAYE, Tom ADJOBIMEY, Patrice AVOGBE, Bérénice ASSOGBA et Michael MISSIHOUN, avec qui nous avons toujours su entretenir une ambiance chaleureuse et amicale.

ABREVIATIONS

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CH₃CN (ACN) : Acétonitrile

DDT : Dichloro-diphényl-trichloroéthane

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DHFR : Dihydrofolate synthétase

DHPS : Dihydroptéroate synthétase

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide ethylenediaminetetraacétique

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESI : Electrospray (ionisation par électronébulisation)

EtOH : Ethanol

FAB : Fast Atom Bombardment

FBS B : Fast Blue Salt B (3,3'-diméthoxy-biphényl-4,4'-bis (diazonium dichloride))

HCH : Hexachlorocyclohexane

HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyle transférase

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HRP : Histidine Rich Protéine

HSQC : heteronuclear single quantum correlation

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

IE : Impact Electronique

IgG : Immunoglobuline G

IgM : Immunoglobuline M

Jmod : J-modulated spin-echo

LDH : Lactate déshydrogénase

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NaHCO₃ : Carbonate de sodium
NaOH: Hydroxyde de sodium
NH₄OH: Hydroxyde d'ammonium
NP/PEG : Natural Product Polyéthylène glycol
NOESY : Nuclear overhauser effect spectroscopy
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PMA : phorbol myristate acetate
PCR : Polymérase Chain Reaction
QBC : Quantitative Buffy Coat
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RNA : Acide ribonucléique
Rf : Rapport Frontal
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
SbCl : Chlorure d'antimoine
SNIGS : Système national d'Information et de Gestion Sanitaire
TOCSY : Total Correlated Spectroscopy
WHO: World Health Organization

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
Première partie : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
Chapitre 1 : GENERALITES SUR LE PALUDISME.....	7
1. Epidémiologie du paludisme.....	8
1.1 Répartition géographique du paludisme.....	8
1.2 Des chiffres alarmants.....	9
2. Le parasite et le vecteur.....	11
2.1 Le parasite du genre« <i>Plasmodium</i> ».....	11
2.2 Le vecteur «l'Anophèle femelle».....	12
2.3 Cycle de reproduction des plasmodies.....	13
2.3.1 Cycle asexué ou schizogonique chez l'homme.....	13
2.3.2 Cycle sexué ou sporogonie chez l'Anophèle.....	14
3. Symptomatologie.....	16
3.1 Accès de primo-invasion.....	16
3.2 L'invasion.....	16
3.3 Les formes cliniques.....	17
3.4 Les reviviscences.....	17
3.5 Le rythme des accès.....	18
3.6 Particularités symptomatiques liées aux espèces.....	18
3.7 Fièvre bilieuse hémoglobinurique.....	19
4. Diagnostic.....	20
4.1 Diagnostic clinique.....	21
4.2 Diagnostic basé sur la mise en évidence du parasite.....	22
4.2.1 Diagnostic microscopique classique.....	22
4.2.2 Diagnostic basé sur la détection d'antigènes parasitaires.....	23
4.2.3 Diagnostic basé sur la détection du matériel génomique du parasite.....	24
5. Traitement du paludisme.....	25
5.1 Les produits disponibles.....	26
5.1.1 Les schizontocides.....	26
5.1.2 Les gamétocytocides.....	29
5.1.3 Les antibiotiques.....	29
5.1.4 Les associations d'antipaludiques.....	29
5.2 Les produits d'avenir.....	30
5.3 Traitement du paludisme par la médecine traditionnelle.....	30
6. Prévention.....	31
6.1. Prophylaxie générale.....	32
6.2. Prophylaxie individuelle.....	33

Chapitre 2 : NOUVELLES SUBSTANCES ANTIPALUDIQUES ET LES CIBLES THERAPEUTIQUES.....	34
1. Quelques substances naturelles antipaludiques.....	36
2. Cibles chimiothérapeutiques potentielles chez le <i>Plasmodium</i>.....	41
2.1. Cibles responsables des processus se produisant dans la vacuole digestive du <i>Plasmodium</i>	41
2.1.1. La dégradation de l'hémoglobine.....	42
2.1.2. La polymérisation de l'hème.....	42
2.1.3. Le stress oxydatif.....	43
2.2. Cibles intervenant dans la production des enzymes impliquées dans la synthèse macromoléculaires et des métabolites.....	44
2.2.1. La glycolyse.....	44
2.2.2. Le métabolisme des acides nucléiques.....	44
Chapitre 3: DESCRIPTION DES PLANTES ETUDIEES.....	48
1. La famille des Amaranthaceae et l'espèce <i>Gomphrena celosoides</i>.....	50
1.1 La famille des Amaranthaceae.....	51
1.1.1. Présentation.....	51
1.1.2. Intérêt pharmacologique, nutritionnel et commercial.....	51
1.1.3. Chimie des Amaranthaceae.....	52
1.2 Le genre <i>Gomphrena</i>	53
1.2.1. Présentation.....	53
1.2.2. Propriétés pharmacologiques des <i>Gomphrena</i>	54
1.2.3. Quelques exemples de composés isolés du genre <i>Gomphrena</i>	55
1.3 L'espèce <i>Gomphrena celosioïdes</i>	57
1.3.1. Classification.....	59
1.3.2. Description botanique.....	59
1.3.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	60
2. La famille des <i>Euphorbiaceae</i> et l'espèce <i>Croton lobatus</i>.....	61
2.1 La famille des <i>Euphorbiaceae</i>	62
2.1.1. Présentation.....	62
2.1.2. Intérêt pharmacologique, nutritionnel et commercial.....	63
2.1.3. Chimie des <i>Euphorbiaceae</i>	65
2.1.4. Quelques métabolites isolés des <i>Euphorbiaceae</i>	65
2.2 Le genre <i>Croton</i>	66
2.2.1. Présentation.....	66
2.2.2. Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre <i>Croton</i>	67
2.2.3. Quelques métabolites secondaires d'intérêt isolés du genre <i>Croton</i>	68
2.3 L'espèce <i>Croton lobatus</i>	70

2.3.1	Classification.....	72
2.3.2	Description botanique.....	72
2.3.3	Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	73
2.3.4	Travaux antérieurs sur <i>Croton lobatus</i>	74
3.	La famille des <i>Marantaceae</i> et l'espèce <i>Thalia geniculata</i>.....	78
3.1	La famille des <i>Marantaceae</i>	79
3.1.1	Présentation.....	79
3.1.2	Intérêt pharmacologique, nutritionnel et commercial.....	79
3.1.3	Chimie des <i>Marantaceae</i>	80
3.2	Le genre <i>Thalia</i>	80
3.2.1	Présentation.....	80
3.2.2	Propriétés pharmacologiques et chimie dans le genre <i>Thalia</i>	80
3.3	L'espèce <i>Thalia geniculata</i>	81
3.3.1	Classification.....	83
3.3.2	Description botanique.....	83
3.3.3	Utilisation dans la médecine traditionnelle.....	84
	Deuxième partie : MATERIEL ET METHODES D'ANALYSE.....	85
	Chapitre 1: Extraction, Isolement, purification des métabolites secondaires.....	86
1.	Matériel végétal.....	87
1.1	Récolte des plantes.....	87
1.2	Séchage des plantes.....	88
2.	Matériel et méthodes d'extraction.....	88
2.1	Extraction au Soxhlet.....	88
2.2	Extraction au Soxhlet.....	91
2.3	La macération.....	92
3.	Méthodes et techniques de purification.....	92
3.1	Méthodes et techniques chromatographiques.....	92
3.1.1	La chromatographie sur couche mince.....	94
3.1.2	La chromatographie sur couche mince préparative.....	96
3.1.3	Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	96
3.1.4	Chromatographie liquide à pression atmosphérique.....	97
3.1.5	Flash chromatographie.....	97
3.1.6	Chromatographie liquide haute pression.....	98
3.1.7	Filtration sur gel de dextrane : séphadex LH20.....	99
3.2	La recristallisation.....	101
4.	Les méthodes de détection et de caractérisation chimique.....	101
5.	Les techniques d'identification structurale.....	107

5.1	La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	107
5.2	La spectroscopie UV.....	109
5.3	La spectrométrie de masse.....	110
Chapitre 2 : Matériel et méthodes des tests biologiques.....		111
1.	Matériel et méthode de culture in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i>.....	112
2.	Evaluation de l'activité antipaludique.....	113
2.1	Souche Chloroquinosensible 3d7.....	113
2.2	Souche multirésistante K1.....	115
Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....		116
Chapitre 1 : ETUDE CHIMIQUE DE <i>CROTON.LOBATUS</i>.....		117
1.	Le matériel végétal.....	118
1.1	Récolte et séchage.....	118
1.2	Extraction.....	118
2.	Fractionnement et isolement des composés de l'extrait acétate d'éthyle.....	120
2.1	Fractionnement de la fraction A.....	121
2.2	Fractionnement de la fraction B.....	123
2.2.1	Fractionnement de B1.....	125
2.2.2	Fractionnement de B2.....	127
2.2.3	Conclusion.....	129
3.	Caractérisation chimique des composés isolés.....	130
4.	Elucidation structurale des composés isolés.....	131
4.1	Elucidation structurale des composés CL1, CL4 et CL5.....	131
4.1.1	Spectres UV des composés	131
4.1.2	Identification du composé CL1.....	134
4.1.3	Identification du composé CL4.....	144
4.2	Identification des composés CLI1 et CLI2.....	150
5.	Fractionnement de l'extrait méthanolique et isolement des métabolites métabolites des racines.....	163
Chapitre 2 : ETUDE CHIMIQUE DE <i>THALIA GENICULATA</i>.....		166
1.	Le matériel végétal.....	167
1.1	Récolte et séchage.....	167
1.2	Extraction.....	167
2.	Fractionnement de l'extrait dichlorométhanolique et isolement des composés	168
2.1.	Fractionnement de l'extrait A.....	168
2.1.1.	Purification du composé T2 à partir de la fraction 23-28.....	169
2.1.2.	Purification du composé T3 à partir de la fraction 30-36.....	170

2.1.3.	Purification du composé T4 à partir de la fraction 44-46.....	170
2.1.4.	Purification du composé T5 à partir de la fraction 48-56.....	171
2.1.5.	Conclusion.....	171
2.2.	Fractionnement de l'extrait B.....	172
2.3.	Conclusion.....	173
3.	Caractérisation chimique des composés isolés.....	174
4.	Elucidation structurale des composés isolés.....	175
4.1.	Elucidation structurale du composé T2.....	175
4.2.	Elucidation structurale du composé T3.....	181
4.3.	Elucidation structurale du composé T4.....	188
4.4.	Elucidation structurale du composé T5.....	198
Chapitre 3 :	ETUDE CHIMIQUE DE GOMPHRENA CELOISIOIDES.....	208
1.	Le matériel végétal.....	209
1.1.	Récolte et séchage.....	209
1.2.	Extraction.....	209
2.	Fractionnement de l'extrait A.....	209
2.1.	Purification de l'extrait cyclohexane/dichlorométhane.....	209
2.2.	Purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	210
2.2.1.	Purification de la sous-fraction C.....	211
2.2.2.	Purification de la sous-fraction D.....	212
3.	Caractérisation chimique des composés isolés.....	215
4.	Elucidation structurale des composés isolés.....	216
4.1.	Elucidation structurale du composé GC5.....	216
4.2.	Elucidation structurale du composé GC7.....	217
4.3.	Elucidation structurale du composé GC4.....	226
Quatrième partie :	TESTS BIOLOGIQUES SUR LES <i>PLASMIDIUM</i>.....	235
Chapitre 1 :	ACTIVITES BIOLOGIQUES DES CONSTITUANTS ISOLEES	
	RELEVES DANS LA LITTERATURE	236
1.	Les composés phénoliques.....	238
1.1.	Le tiliroside.....	238
1.2.	L'isovitexine.....	239
1.3.	La vitexine.....	
1.4.	L'acide chlorogénique.....	239
1.5.	L'acide dicafféoylquinique.....	239
2.	Les phytostérols.....	239
2.1.	Le β -sitostérol.....	240
2.2.	Le daucostérol.....	240
2.3.	Le sitoindoside I.....	241

2.4. Le géranylfarnésol.....	241
Chapitre 2 : RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES.....	242
1. Tests antipaludiques.....	243
2. Etude de la cytotoxicité.....	243
3. Résultats.....	244
CONCLUSION.....	245
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	248

INTRODUCTION

Endémie parasitaire majeure, le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle. La maladie sévit sous le mode endémo-épidémique et son incidence dépend étroitement de l'écologie du vecteur donc de la climatologie, de l'aménagement de l'espace (déforestation, hygroagriculture), des migrations des populations et des capacités économiques à entreprendre des travaux d'assainissement. Il n'est donc pas surprenant que de nos jours le niveau d'endémie soit étroitement lié au niveau de développement (Malvy et al., 2000)

Le mot paludisme vient de *palus* qui signifie marais et le nom malaria a été tiré de l'italien mal-aria (mal air) aussi connu autrefois sous le nom de fièvre romaine. Ceci montre que le paludisme est connu depuis la nuit des temps. Depuis toujours, les hommes en ont souffert et en sont morts. Ils ont essayé de le traiter et de le combattre en proposant différents moyens allant du plus farfelu au plus pertinent. La recherche scientifique a fait énormément avancer la connaissance de cette maladie, mais persiste toujours une inconnue: comment s'en débarrasser?

Deux milliards quatre cent millions de personnes sont exposées à un risque de paludisme à travers le monde et deux millions d'enfants de moins de cinq ans en meurent chaque année. Ces chiffres font de cette maladie la première endémie mondiale (OMS. 2000).

En 1955, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a déclaré que le paludisme pourrait être éradiquée. Cependant, la conviction des années 1960 qui devait voir aboutir l'éradication du paludisme a fait place à une confusion engendrée par la déception qui suivit l'échec du programme de l'OMS. Les *Plasmodium* profitaient du répit qui leur était donné pour développer une forme de lutte: la résistance. Cette résistance a entraîné un dérèglement des attitudes thérapeutiques conduisant à la sélection de souches résistantes.

Actuellement, malgré la panoplie de moyens mis en œuvre pour le maîtriser, le paludisme demeure la première endémie mondiale et reste dans les pays en développement un problème majeur de santé publique, avec une mortalité évaluée à plus d'un million par an (Touré et Oduola, 2004).

Paradoxalement, une demi douzaine seulement de médicaments antipaludiques sont disponibles sur le marché et accessibles aux populations concernées. Et qui plus est, on assiste à un désengagement des industries pharmaceutiques dans la recherche et le développement de nouveaux antipaludéens. Il est donc urgent d'intensifier d'une part la prospection de nouvelles sources de molécules douées d'activité antipaludique et d'autre part la recherche de molécules et/ou association de molécules pouvant potentialiser l'action de la chloroquine qui est aujourd'hui le médicament de première intention et le plus accessible dans les pays en développement.

L'expérience a montré que la richesse de la biodiversité végétale et la connaissance des thérapeutiques traditionnelles sont susceptibles comme ce fut le cas pour la quinine et l'artémisinine, d'ouvrir de nouvelles voies pour la thérapeutique antipaludéenne. Ces deux antipaludiques prescrits à l'heure actuelle sont issus de plantes médicinales, traditionnellement utilisées dans leur pays d'origine contre les fièvres et le paludisme; il s'agit de l'écorce d'un arbre originaire des flancs de la cordillère andine (*Cinchona calisaya* et autres espèces de *Cinchona*) et d'une herbacée originaire de Chine, *Artemisia annua*. La recherche de nouvelles molécules antipaludiques pourrait donc être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de l'ethnopharmacologie. Cette approche permettra de sélectionner les espèces les plus intéressantes pour leur activité antiplasmodiale potentielle. Il faut savoir également que le paludisme est un fléau qui touche particulièrement les pays du sud, dans lesquels la population a des difficultés d'accès aux soins de santé. L'étude des remèdes traditionnels antipaludiques utilisés par la population est donc primordiale et pourrait déboucher sur une validation d'usage traditionnel et/ou la découverte de nouvelles molécules à potentiel antipaludique.

Le Bénin dispose d'une grande biodiversité floristique à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Plusieurs plantes sont considérées comme ayant des propriétés antipaludiques et les populations locales les utilisent parfois conjointement à la chloroquine. Une enquête ethnopharmacologique centrée sur le thème du paludisme et des traitements réellement utilisés par la population a été effectuée par le Ministère béninois de la santé publique, listant 83 espèces végétales utilisées traditionnellement contre cette pathologie.

Une étude bibliographique des plantes répertoriées au cours de cette enquête nous a permis de sélectionner neuf espèces pour lesquelles l'on ne disposait que de peu d'informations de nature chimique et/ou biologique (*Canthium setosum*, *Croton lobatus*, *Dichapetalum guineense*, *Gomphrena celosioides*, *Hybanthus enneaspermus*, *Schrankia leptocarpa*, *Secamone afzelii*, *Pavetta corymbosa*, *Thalia geniculata*).

Nous avons réalisé un criblage antipaludique sur des extraits au dichlorométhane et au méthanol des espèces citées ci-dessus. Les résultats de ce tri biologique préliminaire sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Famille	Espèce	Extraits	IC ₅₀ (µg/ml)	
			3D7	K1
Rubiaceae	<i>Canthium setosum</i>	D	2.77 ± 2.29	4.80 ± 0.05
		M	6.21 ± 1.10	>20
Euphorbiaceae	<i>Croton lobatus</i>	D (pa)	3.74 ± 0.36	3.64 ± 0.47
		M (pa)	0.38 ± 1.85	>20
		D (r)	4.42 ± 1.43	2.80 ± 0.13
		M (r)	6.56 ± 3.71	4.91 ± 0.70
Dichapetalaceae	<i>Dichapetalum guineense</i>	D	>20	7.35 ± 1.62
		M	>20	15.70 ± 2.07
Amaranthaceae	<i>Gomphrena celosioides</i>	D	14.41 ± 4.76	6.83 ± 1.24
		M	4.26 ± 0.40	14.97 ± 1.25
Violaceae	<i>Hybanthus enneaspermus</i>	D	>20	2.57 ± 0.36
		M	>20	>20
Rubiaceae	<i>Pavetta corymbosa</i>	D	>20	5.54 ± 0.79
		M	>20	17.50 ± 2.25
Mimosaceae	<i>Schrankia leptocarpa</i>	D	16.58 ± 2.34	3.38 ± 0.57
		M	8.00 ± 5.49	>20
Asclepiadaceae	<i>Secamone afzelii</i>	D	>20	6.48 ± 1.25
		M	>20	>20
Marantaceae	<i>Thalia geniculata</i>	D	>20	14.33 ± 1.74
		M	2.83 ± 0.69	6.38 ± 2.32

D : Extrait dichlorométhane M : Extrait méthanolique
 pa : Parties aériennes r : Racines

Tableau 1 : Activité antiplasmodiale *in vitro* sur la souche 3D7 sensible à la chloroquine et la souche multirésistante K1 de *Plasmodium falciparum*

Ces résultats ont montré que 11 extraits sur 18 sont plus actifs sur la souche résistante K1 et 9 extraits se sont montrés plus actifs sur la souche sensible 3D7, avec des concentrations inhibitrices 50 inférieures à 8 µg/ml. Ces concentrations sont comparables à celles rapportées dans la littérature pour les extraits éthanoliques de *Artemisia annua* : IC₅₀ = 3.9µg/ml; souche résistante K1, et *Azadirachta indica* (IC₅₀ = 4.1-7.2µg/ml; souche résistante FcB1 (O'Neill et al., 1985; Benoît et al., 1996; Udeinya, 1993).

Ces résultats sont intéressants et apportent une validation à l'utilisation traditionnelle de ces espèces en tant qu'agents antimalariques. L'approche ethnopharmacologique utilisée dans cette étude préliminaire expliquerait le taux élevé de réponses positives. Seulement deux espèces sur neuf (*Gomphrena celosioides* et *Dichapetalum guineense*), avaient été précédemment étudiées pour leur activité antiplasmodiale. Pour les sept autres espèces, il s'agit de la première mise en évidence de leur activité antiplasmodiale.

Etant donné les valeurs des concentrations inhibitrices (CI₅₀) observés sur la souche résistante K1 de *Plasmodium falciparum*, six des espèces étudiées, *Hybanthus enneaspermus*, *Croton lobatus*, *Canthium setosum*, *Schrankia leptocarpa*, *Thalia geniculata* et *Gomphrena celosioides* méritent des recherches complémentaires visant à la mise en évidence des molécules responsables de l'activité observée. Parmi ces espèces d'intérêt, nous en avons choisi trois pour faire l'objet de cette étude: *Croton lobatus*, *Thalia geniculata* et *Gomphrena celosioides*. La partie principale de cette thèse sera consacrée à mes travaux personnels, à savoir l'étude chimique et à l'évaluation biologique des principaux métabolites secondaires isolés des espèces végétales les plus actives, sélectionnées dans les essais biologiques préliminaires.

Dans une première partie nous procéderons à une présentation synthétique du paludisme suivi par une bibliographie exhaustive des trois plantes béninoises à usage antipaludique sélectionnées pour cette étude.

La deuxième partie de notre thèse concernera la partie expérimentale de cette étude, avec une présentation des techniques d'isolement et d'analyse utilisées au cours de ce travail. Nous traiterons de l'extraction du matériel végétal, des protocoles utilisés au cours des tests biologiques ainsi que dans la détermination structurale des composés isolés.

La troisième partie présentera les résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.

Chapitre I

***GENERALITES SUR LE
PALUDISME***

1. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME

1.1. Répartition géographique du paludisme

Le paludisme pose aujourd'hui un problème de santé publique pour plus de 100 pays représentant un total de 2,4 milliards de personnes, soit environ 40% de la population mondiale. Ces pays sont essentiellement des pays en développement situés en Afrique, Asie et Amérique latine. Tous les ans, on recense 300 à 500 millions de personnes contaminées et environ trois millions de morts, la plupart en Afrique. Le nombre de décès excède aisément celui du SIDA. (Aris, 2000).

L'Afrique est le continent le plus particulièrement touché par le paludisme. Le danger est quasi nul en Afrique du Nord, mais majeur en Afrique de l'Est, en Afrique subsaharienne et en Afrique équatoriale.

En Asie, le paludisme est absent des grandes villes et plutôt rare dans les plaines côtières. Le danger est majeur dans les zones rurales du Cambodge, de l'Indonésie, du Laos, de la Malaisie, des Philippines, de la Thaïlande, du Vietnam et en Chine dans le Yunnan et à Hainan.

Dans les Antilles, le paludisme sévit à Haïti et près de la frontière de la République dominicaine. En Amérique centrale, il existe quelques micro-zones, mais le risque est relativement faible.

En Amérique du Sud, le risque est faible dans les grandes villes, mais réel dans les zones rurales en Bolivie, en Colombie, en Équateur, au Pérou et au Venezuela, et majeur dans toute la zone amazonienne.

Notons que les estimations sont le plus souvent difficiles du fait du manque de fiabilité des statistiques dans les différents pays concernés. En 2002, des chercheurs de la revue Nature estimaient à 515 millions le nombre de malades, soit deux fois plus que les estimations de l'OMS (Snow et al., 2005; Simon et al., 2004; <http://siteresources.worldbank.org>; page consulté le 12 juillet 2005)

1.2. Des chiffres alarmants

- Entre 300 millions à 500 millions de cas cliniques tous les ans
- Entre 1 à 3 millions de morts principalement des enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes.
- Trois mille enfants de moins de cinq ans en meurent chaque jour

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que la malaria coûte environ 1.3% du produit intérieur brut annuel des états dans lesquels la maladie sévit. Dans certaines régions de l'Afrique, les familles dépensent pas moins de 25% de leur revenu pour le traitement de la malaria. Et le fardeau de cette pathologie continue d'augmenter en raison de la résistance des parasites aux drogues existantes, à l'expansion géographique des moustiques résistants aux insecticides, au manque d'infrastructures médicales et à une incapacité chronique d'organisation pour aborder le problème (Rinaldi, 2004).

Les régions impaludées sont déterminées selon la résistance de la maladie à la chimioprophylaxie par la chloroquine et/ou la pyriméthamine/sulfadoxine (Figure 1 et 2).

Pays du groupe I: il s'agit des pays dans lesquels on n'observe pas de souches multirésistantes de *P. falciparum*

Pays du groupe II: présence de *P. falciparum* résistant à la chloroquine

Pays du groupe III: zones de prévalence élevée de chloroquinorésistance et/ou présence de souches de *P. falciparum* multirésistante.

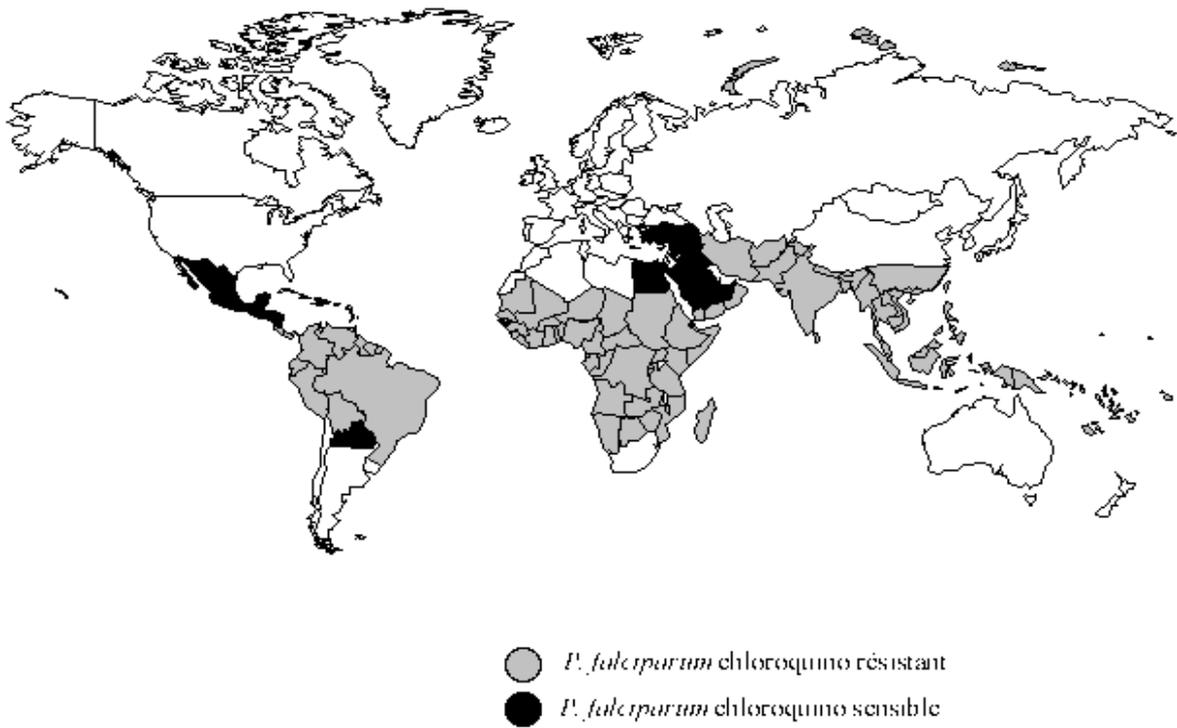


Figure 1: Répartition géographique de *P. falciparum* sensible et résistant à la chloroquine

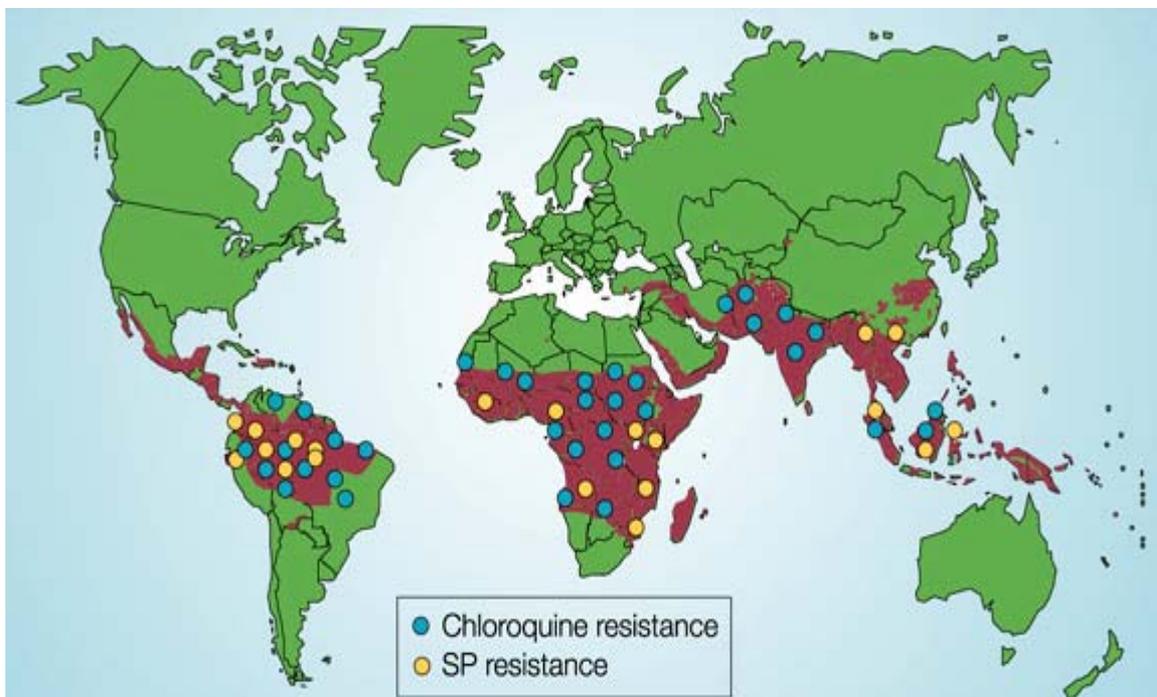


Figure 2: Répartition géographique de *P. falciparum* sensible et résistant à la chloroquine et au pyriméthamine/sulfadoxine (Touré et Oduola, 2004)

2. LE PARASITE ET LE VECTEUR

2.1. Les parasites du genre *Plasmodium*

En 1878, le médecin militaire Alphonse Laveran fut le premier à démontrer la nature parasitaire du paludisme en détectant des éléments pigmentés dans les globules rouges des malades atteints de fièvres palustres, en décrivant des éléments se présentant sous formes de croissant, de sphères ou de flagelles. Le parasite appartient à l'embranchement des Sporozoaires, parmi lesquels on distingue les Sarcosporidies et les Coccidiomorphes dont fait partie le genre *Plasmodium*. Les *Plasmodium* sont des parasites des hématies; c'est pourquoi on les nomme parfois hématozoaires. Ils appartiennent plus précisément à l'ordre des Hémosporidies ou Hémococcidies et à la famille des Plasmodiidae. Il existe de nombreuses espèces du genre *Plasmodium* parmi lesquels quatre peuvent être responsables d'une infection chez l'homme. Il s'agit de:

Plasmodium falciparum

Essentiellement retrouvé en Afrique tropicale, en Amérique centrale et du Sud, en Asie du Sud Est, il s'agit de l'espèce la plus dangereuse puisque le paludisme qu'elle occasionne est en général le seul qui puisse entraîner une mortalité importante. De plus, *Plasmodium falciparum* développe aujourd'hui une résistance contre la chloroquine dans de nombreux pays, posant ainsi le problème de la prévention médicamenteuse de la maladie. Il est important de noter que cette chimiorésistance ne cesse de s'étendre géographiquement d'année en année; ceci implique que la chimioprophylaxie pour un pays donné peut varier d'une année à l'autre.

Plasmodium vivax

C'est la deuxième espèce retrouvée en Afrique et surtout en Asie, en Amérique latine et, à un moindre degré, en Afrique de l'Est. Environ 10 à 20% des cas d'infection par *Plasmodium vivax* dans monde se produisent en Afrique au sud du Sahara. En Afrique australe et orientale, *Plasmodium vivax* représente autour 10% de cas de malaria mais dans moins de 1% de cas en Afrique centrale occidentale (Kamini et al., 2001).

Plasmodium malariae

C'est un parasite qui provoque des fièvres quarte puisque les crises cycliques d'infection se produisent toutes les 72 heures. Le *Plasmodium malariae* se range en troisième position dans la prédominance, mais possède une distribution étendue. Les parasites, dans leur forme trophozoïtes, se présentent sous un aspect compact prenant l'apparence d'une bande colorée ou la forme d'un panier.

Plasmodium ovale

Rencontré moins fréquemment, *Plasmodium ovale* infecte préférentiellement les globules rouges non matures ce qui limite la parasitémie. Les cellules infectées sont ovales et légèrement plus grandes que les cellules non infectées, et on note la présence de colorant malarique (granulations de Schuffner). Les trophozoïtes sont très souvent amiboïdes.

2.2. Le vecteur: «l'anophèle femelle»

Ce sont des moustiques culicidés de la famille des Anophélinés. Les anophèles femelles se reconnaissent à leur position de repos oblique par rapport au support sur lequel ils sont posés et à leurs appendices céphaliques.

Leur reproduction exige du sang, de l'eau et de la chaleur. La femelle fécondée ne peut pondre qu'après un repas sanguin, pris sur l'homme ou sur l'animal. Les gîtes de ponte varient selon l'espèce anophélienne: collections d'eau permanentes ou temporaires (persistant au moins dix jours consécutifs), claires ou polluées, douces ou saumâtres, ensoleillées ou ombragées. Dans l'eau, les œufs se transforment en larves puis en nymphes, dont naîtra une nouvelle génération d'adultes. Chaleur et humidité conditionnent également l'activité génitale des femelles: en zone tempérée, les anophèles ne pondent qu'à la belle saison; en zone équatoriale leur activité est permanente; en zone tropicale la saison sèche limite la prolifération par réduction du nombre de gîtes. Les femelles vivent environ un mois. Elles piquent surtout au crépuscule ou durant la nuit.

La plupart des anophèles ne s'éloignent guère de leur lieu de naissance ; ils sont parfois entraînés à de grande distance par les automobiles, les avions et à un moindre degré par les vents car les anophèles présentent une certaine fragilité (Gentilini, 1990). L'anophèle se dirige plus volontiers vers les lieux où la concentration en dioxyde de carbone est la plus importante, c'est-à-dire à l'intérieur des habitations, ou à proximité des humains même à l'extérieur de leurs habitations.

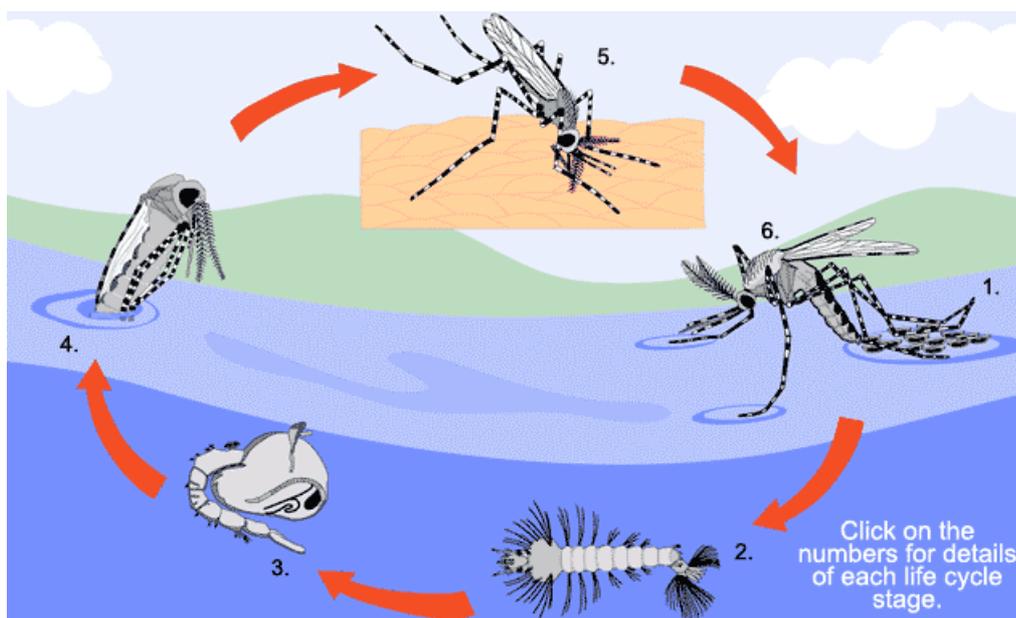


Figure 3: Cycle de reproduction de l'Anophèle

Source : <http://www.wellcome.ac.uk/.../html/Images/>, consulté le 14 Juillet 2005

2.3. Cycle de reproduction des plasmodies

Le cycle de développement du *Plasmodium* comprend une phase de multiplication asexuée qui se déroule chez l'Homme, et une phase de multiplication sexuée qui se déroule chez le moustique (Anophèle).

2.3.1. Cycle asexué ou schizogonique chez l'homme

Au cours de son repas sanguin, le moustique infecté injecte avec sa salive des centaines de parasites sous forme de sporozoïtes fusiformes qui gagnent rapidement le foie où s'effectue le cycle exoérythrocytaire primaire.

Les sporozoïtes pénètrent dans les cellules hépatiques où ils prennent le nom de cryptozoïtes. Ils grossissent, se divisent et constituent en une semaine les corps bleus (schizontes matures) volumineux, déformant l'hépatocyte et repoussant son noyau en périphérie. L'éclatement des corps bleus libère de nombreux mérozoïtes, qui pour la plupart passent dans la circulation sanguine.

En cas d'infestation par le *P. vivax* ou *P. ovale*, certains cryptozoïtes peuvent rester quiescents, pendant plusieurs mois à plusieurs années. Quand ces formes quiescentes, appelées hypnozoïtes, se divisent, effectuant un cycle exoérythrocytaire secondaire, ils sont susceptibles de réensemencer le sang en mérozoïtes et de déterminer ainsi des reviviscences schizogoniques érythrocytaire. *P. falciparum* et *P. malariae*, ne comportent ni hypnozoïte, ni schizogonie tissulaire secondaire.

Dans le sang s'effectue le cycle asexué érythrocytaire (schizogonie érythrocytaire). Chaque mérozoïte pénètre dans une hématie par endocytose et s'y transforme en trophozoïte. Il grossit et son noyau se divise, donnant alors un schizonte qui se charge de pigment malarique ou hémozoïne. La multiplication des noyaux dont chacun s'entoure d'une plage cytoplasmique forme un schizonte mûr ou un corps en rosace. Parallèlement, l'hémozoïne se dégrade et, dans l'hématie parasitée, apparaissent des granulations de Schuffner (*P. vivax* et *P. ovale*), ou des taches de Maurer (*P. falciparum*) ou aucune forme de colorant malarique (*P. malaria*).

Le corps en rosace dilaté et mûr éclate. Cet éclatement, responsable de l'accès fébrile, libère des mérozoïtes qui vont parasiter des hématies vierges et effectuer de nouveaux cycles schizogoniques érythrocytaire. Chaque cycle érythrocytaire dure 48 heures pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum*, et 72 heures pour *P. malariae*. Après plusieurs cycles schizogoniques, apparaissent dans les hématies des éléments à potentiels sexués que sont les gamétocytes mâles et femelles.

2.3.2. Cycle sexué ou sporogonique chez l'anophèle

Le gamétocyte femelle donnera chez le moustique un unique gamète femelle. Le gamétocyte mâle, en revanche, donnera naissance à quatre gamètes mâles, de forme

filamentaire (Mollaret, 1880). Après une piqûre sur un paludéen, le moustique absorbe des schizontes, des corps en rosace et des gamétocytes. Les éléments asexués sont digérés et seuls les gamétocytes ingérés poursuivent le cycle (Ministère de la Santé/SNIGS, 1994). Dans l'estomac du moustique, le gamétocyte mâle se transforme en gamète par exflagellation, le gamétocyte femelle par expulsion de corpuscules chromatinien. Cette exflagellation ne se produit pas dans l'organisme humain, mais peut-être obtenu dans le sang humain mis entre lame et lamelle, et grâce à des modifications physicochimiques. La fécondation du gamète femelle donne un œuf mobile, l'ookinète, qui traverse la paroi de l'estomac de l'anophèle, se fixe sur sa face externe, formant l'oocyste dans lequel s'individualisent les sporozoïtes. Libérés par l'éclatement de l'oocyste, ces derniers gagent les glandes salivaires de l'anophèle. La durée du cycle sporogonique varie entre 10 et 40 jours.

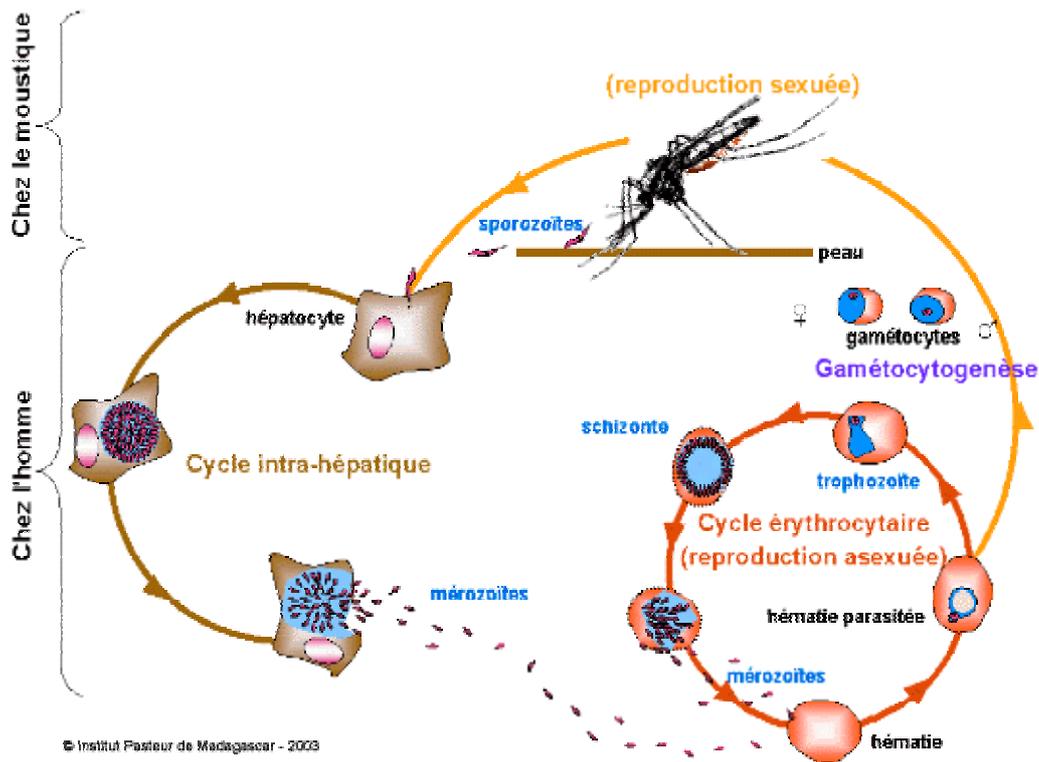


Figure 4: Cycle de vie du *Plasmodium* chez l'homme

Robert V & Boudin C. Bull Soc Path Exo 2003; 96 : 6-20 [En ligne].

Source: <http://www.pasteur.mg/cyclepaludisme.html>; page consulté le 3 octobre 2005

3. SYMPTOMATOLOGIE

Certains tableaux cliniques sont communs à toutes les espèces plasmodiales, avec des degrés dans l'intensité des signes selon le parasite. Ce sont les accès simples, c'est-à-dire les accès de primo invasion et les accès de reviviscence schizogonique à fièvre périodique. De même le paludisme viscéral évolutif peut en principe être causé par toutes les espèces. (Gentilini 1990 ; Malvy et al., 2000).

3.1. Accès de primo invasion

Ce stade apparaît souvent chez un sujet non immun, c'est-à-dire l'enfant de quatre mois à quatre ans ou plus vivant en zones d'endémie, chez l'adulte en provenance d'une zone indemne de paludisme, ou tout sujet ayant perdu sa prémunition. Il est précédé par une incubation cliniquement muette qui dure en moyenne quatorze jours pour *P. vivax* et *P. ovale*, douze jours pour *P. falciparum* et trente jours pour *P. malariae*.

3.2. L'invasion

L'invasion est marquée par une fièvre progressivement croissante qui devient continue, en plateau ou à grandes oscillations régulières avec plusieurs pics par jours, atteignant 39° ou 40°C. Cette fièvre ne possède à ce stade de périodicité régulière. Elle s'accompagne de myalgies, céphalées, douleurs abdominales souvent au premier plan, parfois vomissements et diarrhée. La rate n'est pas palpable au début. Le foie est parfois augmenté de volume et est sensible. Un bouquet d'herpès labial est souvent associé, ainsi qu'une diminution de la diurèse avec urines foncées contenant des traces de protéines.

A ce stade, le diagnostic sera apportée par le frottis sanguin et la goutte épaisse qui montre le *Plasmodium*. L'évolution est favorable sous traitement bien conduit en quelques jours. En l'absence de traitement, la fièvre persiste avec des rémissions et des recrudescences pendant 8 à 15 jours. La fièvre peut devenir intermittente, tous les deux ou trois jours accompagnée alors d'une splénomégalie. Le risque de passage à l'accès pernicieux est permanent s'il s'agit d'un *Plasmodium*

falciparum. Pour les autres espèces, la guérison est possible, sans pouvoir exclure des accès de reviviscences des mois ou des années plus tard.

3.3. Formes cliniques

Les formes cliniques de la primo-invasion ne sont que des variantes symptomatiques. La fièvre rémittente est caractérisée par l'importance des pics fébriles, l'existence de quelques rémissions de quelques heures, un syndrome infectieux sévère et une hépatomégalie. On parle de rémittente bilieuse lorsqu'un ictère s'y ajoute. Ces deux formes cliniques surviennent chez des sujets non immuns qui ont subi une infection massive. A l'inverse, les formes invasives frustes, paucysymptomatiques, rares avec *P. falciparum*, sont fréquentes avec les autres espèces.

3.4. Les reviviscences

Les accès palustres à fièvre périodique, dits accès intermittents, sont dus à un «réveil» d'un hypnozoïte intra hépatique (*P. vivax* ou *ovale*), ou à l'exacerbation d'une schizogonie sanguine dans le cas de *P. malariae*. Il peut suivre immédiatement une primo-invasion pour *P. falciparum*.

Chaque accès se déroule de manière identique, par la succession de trois stades-frissons, chaleur, sueurs qui se répètent selon un rythme régulier. Cette triade est parfois précédée de prodromes toujours identiques chez un même malade (herpès labial, céphalées, nausées).

Pendant la phase de frissons qui dure environ une heure, la fièvre monte, la rate augmente de volume, la pression artérielle diminue. Lors de la deuxième phase qui dure de 3 à 4 heures, les frissons disparaissent, la peau devient sèche et brûlante, la fièvre s'intensifie et le volume de la rate diminue. Le dernier stade est marqué par un effondrement brutal de la température jusqu'à l'hypothermie, des sueurs abondantes. La pression artérielle augmente, ce stade dure de 2 à 4 heures.

3.5. Le rythme des accès

Il est variable selon la durée de la schizogonie sanguine. Ainsi, les accès surviennent tous les deux jours si la schizogonie est de 48 heures et réalise une fièvre tierce. De même, la fièvre quarte est déterminée par des accès se produisant tous les trois jours, avec une schizogonie de 72 heures. Il peut exister des accès moins rythmés. Par exemple la fièvre quotidienne ou double tierce alternée qui proviendrait de deux cycles schizogoniques décalés de 24 heures.

3.6. Particularités symptomatiques liées aux espèces

P. falciparum peut déterminer des parasitémies élevées et réaliser des phénomènes de séquestration dans les capillaires viscéraux (Malvy et al., 2000). C'est la seule espèce plasmodiale à pouvoir évoluer vers un accès pernicieux souvent mortel. En revanche, sa longévité ne dépasse pas deux mois.

L'accès simple ne comporte pas de signe de gravité mais peut à tout moment évoluer vers la perniciosité. La fièvre est présente pendant l'invasion, les céphalées, myalgies, troubles digestifs sont intenses. Lors des recrudescences à la suite d'un traitement insuffisant ou à des réinvasions, la fièvre peut prendre un caractère périodique avec un rythme tierce (48 heures) souvent irrégulier parfois plus court (36 heures). La triade frissons, chaleur, sueurs n'est jamais nettement réalisée. L'accès simple peut revêtir un aspect atypique de gastro-entérite virale.

L'évolution spontanée est parfois favorable après une quinzaine de jours de fièvre mais peut à tout moment évoluer vers une défaillance multiviscérale définissant l'accès grave ou compliqué. Cette évolution est inéluctable chez le sujet non immun. C'est un neuropaludisme réalisant une «encéphalopathie aiguë fébrile» et représente 6 à 10% des accès à *P. falciparum*.

Un accès pernicieux associe présence de formes asexuées de *P. falciparum* à l'examen sanguin, coma stade II, état de choc, acidose et œdème pulmonaire. Il peut s'y associer une anémie grave (Hb en gr/dl, normocytaire), une insuffisance rénale organique (diurèse <400 ml, créatinine >265 µmol/l), une hypoglycémie (<2.2 mmol/l),

une hémoglobinurie massive, des crises convulsives généralisées (Gentilini, 1990 ; Malvy et al., 2000).

La parasitémie élevée (>5% chez un sujet non immun) n'est pas un facteur de gravité prise isolément (XIIème Conférence de Consensus sur le Paludisme en Thérapeutique Anti-Infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française. 14 avril 1999. Hôpital d'Instruction des Armées Bégin, Saint-Mandé).

3.7. Fièvre bilieuse hémoglobinurique

Il s'agit d'un syndrome lié à *P. falciparum*. Observé entre 1910 et 1940 par les malariologues français et anglais, il survient chez des Européens expatriés depuis plusieurs mois ou années en zone tropicale, ayant des antécédents d'accès à *P. falciparum*, et prenant irrégulièrement une prophylaxie et/ou un traitement par de la quinine ou de la méfloquine. Son mécanisme n'a jamais été clairement élucidé (Gentilini, 1990).

Le début est brutal avec des lombalgies, une fièvre élevée, une pâleur, puis apparaissent un ictère, une chute tensionnelle, une oligurie avec des urines foncées. Ces symptômes correspondent à une hémolyse intravasculaire aiguë avec hémoglobinurie et leur gravité est fonction de la présence associée d'un état de choc, de la profondeur de l'anémie aiguë et de l'impact de l'insuffisance rénale aiguë souvent oligo-anurique (Malvy et al., 2000).

Biologiquement, on retrouve une anémie, une insuffisance rénale et une hémoglobinurie. La parasitémie est nulle ou modérée ce qui permet de faire la différence avec un accès pernicieux.

Le paludisme viscéral évolutif (Gentilini, 1990 ; Malvy et al., 2000) survient en zone d'endémie chez les sujets soumis à des infestations palustres massives et répétées, ne se soumettant pas à une prophylaxie ou à un traitement efficace et se situant au début de la période d'acquisition de l'immunité. Il s'agit le plus souvent d'enfants des régions d'endémie. Il peut exister des paludismes viscéraux évolutifs chez des adultes expatriés en zone d'endémie depuis longtemps, se soumettant à une chimioprophylaxie ou à des

traitements par chloroquine insuffisants. La symptomatologie du paludisme viscéral évolutif associe pâleur, asthénie, anorexie, parfois dyspnée, oedèmes des membres inférieurs, souffle systolique anorganique, splénomégalie volumineuse et sensible, dyspepsie avec nausées et parfois diarrhées. La fièvre est modérée à 37.5°C avec des poussées intermittentes à 38 ou 38.5°C. Biologiquement, on retrouve une anémie rarement brutale, profonde, une leuconéutropénie, un syndrome inflammatoire, une hypergammaglobulinémie avec une élévation surtout des IgG. L'identification directe est rarement positive, tandis que le sérodiagnostic décèle un taux élevé d'anticorps antipalustre (Debacker, 2000).

Lorsque le paludisme viscéral évolutif n'est pas traité, il peut se compliquer d'accidents spléniques (ruptures spontanées ou traumatiques, infarctus) ou guérir lentement lors de l'acquisition de l'immunité avec parfois une splénomégalie modérée. Sous traitement, son évolution est lente mais très favorable.

Le syndrome de splénomégalie tropicale ou syndrome d'hyperréactivité splénique affecte des adultes ou des grands enfants en zone d'endémie à *P. falciparum*. Sa physiopathologie n'est pas élucidée. Elle associe une énorme splénomégalie, une augmentation polyclonale des IgM, une réponse positive clinique et biologique au traitement antimalarique prolongé.

Outre les fréquences des accès de reviviscence à fièvre périodique qui évoluent sur un rythme de tierce, *P. vivax* et *P. ovale* n'ont que peu de particularités. *P. malariae* se distingue par le rythme de quarte des accès de fièvre périodique (Gentilini, 1990).

4. DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

Le diagnostic de paludisme à *P. falciparum* repose essentiellement sur la mise en évidence du parasite (Kortepeter et al., 1998; DiMaggio et al., 1991). Ce diagnostic peut-être posé à partir d'un examen clinique ou parasitologique.

4.1. Diagnostic clinique

Comme la plupart des cas de paludisme sont encore traités sur la base d'un examen clinique, on ne peut éviter qu'un certain nombre de patients reçoivent des antipaludiques sans être atteints de la maladie. Inversement, le manque de sensibilité des critères cliniques de diagnostic peut conduire à ne pas traiter des patients pourtant malades qui risquent alors de voir leur état s'aggraver jusqu'à l'issue fatale. L'amélioration de la sensibilité des critères de diagnostic reste absolument prioritaire du fait qu'un paludisme à *P. falciparum* non traité comporte un taux de létalité élevée. Un bilan complet du malade est toujours nécessaire pour éviter de passer à côté d'une affection d'une autre nature, mais parfaitement curable. L'amélioration de ces critères de diagnostic permettrait de réduire le nombre d'erreurs thérapeutiques. Malheureusement, la symptomatologie du paludisme : fièvre, frissons, céphalées et anorexie n'est généralement pas spécifique. Des travaux récents ont permis d'identifier des symptômes qui, notamment quand ils sont simultanément présents, peuvent avoir une valeur diagnostic dans certaines situations épidémiologiques ou opérationnelles (Marsh , 1996 ; Redd 1996 ; Olaleye, 1998).

On ne peut toute fois pas utiliser un ensemble donné de critères cliniques pour le diagnostic de tous les types de paludisme dans l'ensemble des populations des maladies. Les critères cliniques de diagnostic varient d'une zone à l'autre en fonction de l'intensité de la transmission, de l'espèce parasitaire dominante, de l'incidence des autres causes possibles de fièvre, de la qualification du personnel soignant et de l'infrastructure médico-sanitaire.

En général dans les zones caractérisées par un faible risque de paludisme, le diagnostic du paludisme sans complication repose sur le degré d'exposition au risque, l'existence d'antécédent de fièvre sans signe d'une autre maladie grave. Le document sur la «Prise en charge intégrée des maladies de l'enfant » (WHO, 1997) propose des critères cliniques basés sur des données d'origine africaine pour le traitement des enfants peu exposés aux risques. Ces critères sont la fièvre sans écoulement nasal, ni rougeole, ni une autre cause de fièvre.

Dans les zones caractérisées par un risque important d'infection palustre, les critères retenus pour l'administration d'un traitement antipalustre sont :

- Jeune enfant de moins de 5 ans ou femme enceinte: antécédents de fièvre ou présence de signes cliniques d'anémie tels que pâleur de la paume de la main (Weber et al., 1997).
- Enfant de plus de 5 ans et la femme non enceinte: Les antécédents de fièvre constituent le seul et unique critère.
- En présence d'une situation à caractère épidémique, il faut traiter toutes les personnes qui ont des antécédents de fièvre.

4.2. Diagnostic basé sur la mise en évidence du parasite

La mise en évidence des plasmodies dans le sang peut être faite par l'examen microscopique, par capture immunologique d'antigènes parasitaires ou par la recherche du matériel génomique du *Plasmodium*.

4.2.1 Diagnostic microscopique classique

Ils permettent d'établir un diagnostic d'espèce en ne nécessitant qu'un microscope optique et des colorants d'un coût modéré. La qualité du résultat dépend cependant beaucoup de l'expérience de la personne réalisant cet examen.

- **Le frottis sanguin**

Dans le frottis, on réalise un prélèvement, soit par prélèvement capillaire au bout d'un doigt avec confection immédiate du frottis, soit par ponction veineuse avec prélèvement dans un tube contenant un anticoagulant (par exemple EDTA) et réalisation de la lame d'examen. Il permet l'appréciation de la densité parasitaire en pourcentage d'érythrocytes parasités (Wéry, 1999).

- **La goutte épaisse**

Il s'agit d'une technique de concentration utilisable également pour la recherche de trypanosomes et microfilaires (Deluol et al., 1998). Utilisée largement

depuis lors par des générations de responsables de laboratoire, elle reste la méthode de référence pour l'examen du sang d'un sujet suspect de paludisme (Wery 1999).

La goutte épaisse permet une reconnaissance approximative des espèces (surtout la distinction entre *P.falciparum* et *P. vivax*). Elle permet l'appréciation de la densité parasitaire en faisant la numération des parasites par rapport aux leucocytes (Peterson et al., 1996 ; Trape, 1985)

- **La centrifugation en tube capillaire**

Elle est couplée à la coloration par l'acridine orange et est décrite sous le nom de Quantitative Buffy Coat (QBC). Elle met à profit la baisse de densité des hématies parasitées qui se rassemblent avec les leucocytes au niveau de l'interface avec le plasma (Spielman et al., 1988)

4.2.2. Diagnostic basé sur la détection d'antigènes parasitaires

- **Parasight®**

Au cours du développement schizogonique du *Plasmodium*, la protéine hydrosoluble riche en histidine HRP-2 est la seule à être excrétée à travers la paroi de l'érythrocyte, parmi les produits cataboliques excrétés par *Plasmodium falciparum*. Cette protéine est donc un témoin privilégié de la présence de parasites dans le sang (Howard et al., 1986). Elle peut être détectée dans le plasma des personnes infectées. La réaction est spécifique de l'espèce *Plasmodium falciparum*.

Le test ParaSight®-F, commercialisé par Becton-Dickinson, utilise ensuite pour le marquage un anticorps monoclonal anti-HRP-2 de lapin conjugué à a rhodamine qui colore les endroits de la bandelette où il a pu détecter la présence de l'antigène.

Le test Malaquick®, commercialisé par ICT Diagnostics, se fonde sur la détection de la même protéine plasmatique (Wery, 1999).

- **Test Optimal[®]** (Lactate déshydrogénase)

L'hétérogénéité des déshydrogénases lactiques des *Plasmodium* a été soulignée par Sherman (Sherman, 1961) chez les *Plasmodium* d'oiseaux en 1961. Le principe du dosage de cet enzyme parasitaire spécifique a été repris pour l'appliquer au diagnostic des parasitémies par Makler et Hinrichs (Maker et Hinrichs, 1993). Le dosage peut être pratiqué et lu comme un test ELISA, dans une plaque à microtitration (Jelinek et al., 1996).

4.2.3. Diagnostic basé sur la détection du matériel génomique du parasite

- **Sondes génomiques**

Les sondes ont fait leur apparition dans le diagnostic du paludisme entre 1985 et 1987. Le but est de reconnaître dans un prélèvement de sang, à l'aide de sondes radioactives ou colorées, des fragments du génome du parasite dont on soupçonne la présence chez le patient. Cependant, la nécessité de marquage isotopique des sondes au ³²P est un obstacle technique à leur utilisation routinière et leur possibilité de détection ne va pas au delà du niveau de la goutte épaisse (50parasites/ μ l). (Holmberg et al., 1986)

- **La Polymérase Chain Réaction**

La Polymérase Chain Reaction (PCR) ou technique d'amplification génique, repère dans un prélèvement, à l'aide d'amorces synthétiques, une séquence nucléotidique sélectionnée et la multiplie au moyen de cycle de polymérisation. La Polymérase Chain Réaction est certainement la technique la plus sensible mais elle ne peut répondre aux diagnostics d'urgence car très coûteuse et nécessitant un équipement et une compétence très particulier. Plusieurs variantes de la polymérase chain reaction ont amélioré la sensibilité et la spécificité du diagnostic du paludisme. On peut citer :

- **Reverse transcriptase polymérase chain reaction (RT-PCR)**

La RT-PCR a été proposée en 1996 par Abdullah et al (Abdullah et al., 1996). Cette technique vise uniquement le diagnostic de *P. falciparum*. Dans cette technique,

l'amplification est réalisée à partir d'un rRNA, ce qui exige d'abord de faire une copie de l'ADN complémentaire par une transcription inverse, après quoi on initialise l'amplification. La RT-PCR nécessite deux enzymes: la transcriptase inverse et la Taq polymérase.

- **La PCR spécifique d'espèces plasmodiale**

Elle a été réalisée par Snounou. La spécificité de cette réaction est parfaite, mais la nécessité de pratiquer quatre PCR sur chaque échantillon est trop lourde pour un usage routinier du diagnostic du paludisme. (Snounou et al, 1993a)

- **La PCR biotinylée et hybridation en milieu liquide**

Elle a été proposée en 1995 par Oliveira à Sao Paulo et Kimura à Tokyo. Cette réaction permet le diagnostic d'espèce. La spécificité est parfaite pour chacune des quatre espèces plasmodiale. (Oliveira et al., 1995; Kimura et al., 1995)

- **La Nested PCR**

C'est une méthode d'amplification en deux paliers, proposée par Snounou en 1993. Elle permet également le diagnostic d'espèce. Depuis 1993, elle est restée la méthode la plus employée à cause du gain de sensibilité et de la spécificité d'espèces. (Snounou et al., 1993b)

En somme, la PCR est actuellement la technique la plus performante en termes de spécificité et de sensibilité (Iqbal et al., 1999; Rubio et al., 1999) même jusqu'au niveau des espèces plasmodiales. Toutefois, comme la recherche des *Plasmodium* est un acte d'urgence, les techniques microscopiques demeurent l'examen de première intention en raison de la lourdeur de la PCR classique.

5. TRAITEMENT DU PALUDISME

Le traitement du paludisme dépend de plusieurs facteurs notamment de l'espèce de parasite en cause, de la gravité de l'infection, de l'âge de la personne atteinte

et du profil de résistance aux médicaments antipaludéens dans la région du monde où la personne a contracté la maladie.

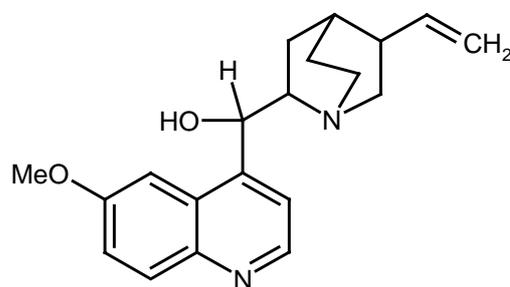
5.1. Les produits disponibles

Naturels ou de synthèse, ils appartiennent à différentes classes chimiques qui leur confèrent à chacun des propriétés spécifiques. On distingue deux groupes de médicaments antipaludiques: les schizontocides et les gamétocytocides (Gentilini, 1990)

5.1.1. Les schizontocides

Le groupe des schizontocides est séparable en deux parties. Les médicaments de la première sont d'action rapide et comprennent la quinine, les dérivés quinoléiques (amino-4-quinoléines et amino-alcools) et l'artémisinine et ses dérivés. La deuxième contient des produits d'action plus lente. Il s'agit des antifolates.

- **La quinine**



Quinine

Alcaloïde naturel du quinquina, la quinine est le plus ancien des ces amino-alcools. Ses propriétés pharmacologiques et en particulier la possibilité de l'administrer par voie intraveineuse en font le médicament de choix lors du traitement du paludisme grave, d'autant qu'il existe peu de résistances à ce produit (surtout en Asie).

Aux doses thérapeutiques (25mg/kg/j de quinine base), les effets secondaires sont limités (troubles auditifs avec bourdonnements d'oreilles, vertiges) mais les surdosages entraînent rapidement des troubles cardiaques graves. La voie intramusculaire doit être le plus possible évitée compte tenu des risques de nécrose

locale et de paralysie sciatique qui lui sont rattachés ainsi que son manque d'efficacité dans des formes déjà trop évoluées (Chaudenier et Dany, 1998).

- **Les amino-4-quinoléines de synthèse (Chloroquine, amodiaquine)**

Ces molécules de synthèse sont largement distribuées. La large diffusion des résistances de *Plasmodium falciparum* à la chloroquine est hélas devenu un facteur limitant leur emploi. En plus, des problèmes de prurit sont rencontrés chez les sujets à peau noire. Des troubles oculaires peuvent parfois apparaître après une très longue utilisation. Des agranulocytes et des hépatites ont été signalées lors d'administrations prolongées d'amodiaquine en prophylaxie. Ces molécules restent toutefois la référence thérapeutique de l'accès palustre simple pour la majorité des pays d'endémie.

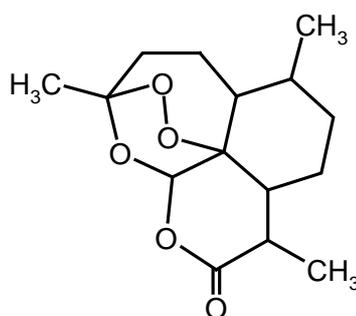
- **Les dérivés de synthèse de type amino-alcool: méfloquine, halofantrine, luméfantine**

L'utilisation de la méfloquine et de l'halofantrine qui avaient suscité de grands espoirs pour le traitement des accès simples à *P. falciparum* chloroquinorésistant est aujourd'hui nuancée du fait de leur coût et du recensement progressif d'effets secondaires préoccupants. Troubles dermatologiques, gastro-intestinaux, cardiologiques, hématologiques et neuropsychiques limitent à présent leur prescription. La très longue demi-vie de la méfloquine reste cependant un atout pour son utilisation en prophylaxie hebdomadaire dans les zones de chloroquinorésistance. L'halofantrine garde l'intérêt d'une assez bonne tolérance et d'une durée de traitement courte qui, en 12 heures, permet une observance bien meilleure que les traitements sur plusieurs jours.

Ces deux médicaments sont contre indiqués chez la femme enceinte et déconseillés chez l'enfant de moins de 10 ou 15 kg. Un autre amino-alcool synthétisé en Chine, le benflumétol ou luméfantine est en phase de développement en association.

- **L'artémisinine (qinghaosu)**

Active contre les schizontes, l'artémisinine est par contre, inactive contre les formes exo-érythrocytaires et les gamètes. Le produit pénètre rapidement dans les globules rouges et stoppe la maturation des schizontes.



Artémisinine

Concentré sur la membrane du parasite, le produit agit au niveau des ribosomes et du réticulum endoplasmique, bloquant la synthèse des protéines.

L'artémisinine et ses dérivés sont présents sur le marché en Asie et dans de nombreux pays d'Afrique. Trois molécules sont utilisées: l'artémisinine et deux dérivés plus actifs, l'artésunate et l'artéméther. L'action rapide de ces molécules ouvre des perspectives précieuses dans le traitement du paludisme grave (Malvy et al., 2000)

- **Les antifolates**

Ils sont répartis en deux familles:

Les antifoliques : Sulfones (Disulone® ou Dapsone®)

Sulfamides (Fanasil® ou Sulfalène®)

Les antifoliniques: Diguanides (Proguanil et Paludrine®)

Diaminopyrimidine (Pyriméthamine, Malocide® et triméthaprimine)

Tous ces produits agissent au niveau de la voie de synthèse des folates, qui sont essentiels à la biosynthèse des acides nucléiques du parasite. Les antifoliques inhibent la dihydroptéroate synthétase (DHPS) qui produit l'acide folique, les antifoliniques inhibent la dihydrofolate réductase (DHFR) qui produit l'acide folinique.

5.1.2. Les gamétocytocides

Les gamétocytocides actuellement connus sont les amino-8-quinoléines, toutes toxiques donc peu employées. Les dérivés de l'artémisinine (Artesunate, Artéméther) ont une action gamétocytocide qui réduit la transmission et limite les risques de voir émerger des résistances.

5.1.3. Les antibiotiques

Certains antibiotiques (cyclines: clindamycine et azithromycine) sont faiblement et lentement schizontocides. On les associe parfois à la quinine dans certaines régions où la sensibilité de *P. falciparum* à la quinine est diminuée.

Quand aux fluoroquinolones, ils n'ont pas confirmé leur intérêt comme antipaludique jusqu'à présent. La rifamicine, quant à elle, montre une bonne activité, mais risque de sélectionner des résistances bactériennes (Malvy et al., 2000).

5.1.4. Les associations d'antipaludiques

Un traitement combiné d'antipaludiques consiste à mettre à profit l'association synergique ou additive de deux composés, ou davantage, afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique et de retarder l'apparition d'une résistance à chacun des constituants de cette association. Ce traitement par association consiste dans l'administration simultanée d'au moins deux schizontocides sanguins, dont les modes d'action sont indépendants et dont les cibles biochimiques intraparasitaires sont différentes. (WHO, avril 2001; Ambroise-thomas, 2000; Danis, 2003).

Les nouveaux antimalariques qui ont fait l'objet de développement récents sont tous associés, en bithérapie au moins, et se démarquent de la plus ancienne des associations, la Sulfadoxine-Pyriméthamine (Fansidar®) capable de sélectionner rapidement des mutants résistants. Certaines sont fixes: atovaquone-Proguanil (Malarone®), arthémether-luméfantrine (Coartem, Riamet) et Chlorproguanil-dapsone (Lapdap™), d'autres libres associant toujours un dérivés de l'artémisinine vu la rapidité d'action, l'impact sur la transmission et l'absence de chimiorésistance de *P. falciparum* :

Artésunate-méfloquine, artésunate-amodiaquine ou artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine.

5.2. Les produits d'avenir

Ces produits sont pour le moment, soit au niveau de la recherche, soit au niveau de la pré-commercialisation. Il s'agit de :

- **L'association atovaquone-proguanil**

Cette association porte le nom de Malarone® et est très efficace dans le traitement de l'accès simple, surtout chloroquinorésistant, même quand celui-ci est dû à une souche résistante au proguanil. Cependant, la tolérance digestive de la malarone® n'est pas parfaite: 15 à 35% de nausées vomissement (Chaudenier et Danis, 1998).

- **La pyronaridine**

Médicament utilisé en Chine depuis de nombreuses années, il est actuellement en cours d'évaluation en Afrique centrale et en Asie. Très efficace sur les souches chloroquinorésistantes, il pourrait remplacer la chloroquine en traitement de première intention (Chaudenier et Danis, 1998).

- **Le G25**

C'est le plus avancé de cette nouvelle classe de produit qui, en interférant avec le métabolisme phospholipidique du *Plasmodium*, perturbent la construction des membranes du parasite lors de son développement intraérythrocytaire. Des études réalisées in vitro chez le singe *Aotus* ont suscité de grands espoirs dans cette nouvelle voie de recherche (Chaudenier et Danis, 1998)

5.3. Traitement du paludisme par la médecine traditionnelle

La médecine traditionnelle est définie comme un ensemble comprenant diverses pratiques, approches, connaissances et croyances sanitaires intégrant des médicaments à base de plantes, d'animaux et/ou de minéraux, des traitements spirituels,

des techniques manuelles et exercices, appliqués seuls ou en association afin de maintenir le bien-être et traiter, diagnostiquer ou prévenir une maladie. (Organisation Mondiale de la Santé, 2002). Elle est répandue et revêt une importance sanitaire et économique croissante. En Afrique, jusqu'à 80% de la population utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de santé (Organisation Mondiale de la Santé, 2000).

Cet usage répandu de la médecine traditionnelle est souvent attribuable à son accessibilité et à son faible coût compte tenu de la précarité de la population des pays endémiques. Les recherches effectuées au Ghana, au Kenya et au Mali indiquent qu'un traitement du paludisme par la Pyriméthamine/sulfadoxine peut coûter plusieurs dollars alors que dans ces pays, un habitant ne peut utiliser que 6 dollars par ans pour les soins de santé.

Inversement, les médicaments à base de plantes pour le traitement du paludisme sont considérablement moins chers et peuvent parfois même être payés en nature (Organisation Mondiale de la Santé, Genève. 2002).

Dans plusieurs pays, des études réalisées sur l'usage des plantes ont confirmé leur intérêt dans le traitement du paludisme. Parmi ces plantes utilisées dans le traitement du paludisme, nous pouvons citer : *Artemisia maritima* (Valecha et al., 1994) et *Argemone mexicana* (Adjobimey, 2002).

6. PREVENTION

Il n'existe pas à l'heure actuelle, de vaccin efficace contre le paludisme. Bien que les travaux se poursuivent dans les deux voies classiques, anti-sporozoïtes et anti-gamétocytes, rien de réellement nouveau n'est survenu depuis les essais très médiatisés mais hélas décevants chez l'homme du vaccin préventif Spf66 contre *P. falciparum* menés par M. Patarroyo. Un essai américain très préliminaire chez vingt volontaires avec un vaccin à base d'ADN nu bien toléré, et déterminant l'apparition de lymphocytes T cytotoxiques pour le sporozoïte, fut publié dans la revue science (Chaudenier et Danis, 1998).

Les résultats de récentes expérimentations en diverses régions impaludées semblent être très controversés. Le niveau de protection varie de 25 à 40%. Un autre vaccin est en cours d'études aux USA (Walter Reed Army Institute of Research) et en Australie. Les recherches continuent dans le monde mais il faudra probablement attendre encore plusieurs années avant qu'un vaccin, totalement efficace contre le paludisme soit développé. Il faut savoir également que les vaccins ne protègent pas la population à 100%. C'est pourquoi la prophylaxie antipalustre repose sur une stratégie globale de lutte contre le vecteur et contre le parasite par la prise de médicaments.

6.1. Prophylaxie générale

Le but est de contrôler le paludisme sur un territoire. Plusieurs méthodes sont utilisées:

- **La lutte anti-vectorielle**

Le but est de limiter la population d'anophèle par des mesures d'assainissement telles que la suppression des eaux stagnantes grandes ou petites, luttés anti-lavaire par épandage de pétrole, utilisation d'insecticides solubles répandus à la surface des eaux stagnantes, essemencement des eaux avec des prédateurs des anophèles (poissons mollusques), utilisation d'insecticides rémanents dans les habitations, dispersion de mâles stériles, utilisation d'écrans biologiques (espèces animales détournant les anophèles de l'homme). Cependant, l'apparition de résistances rend ces mesures peu efficaces. D'autre part, ces mesures ne sont efficaces que si le territoire est limité.

- **La lutte anti-plasmodiale chez le sujet porteur**

Le diagnostic et le traitement de masse de sujets porteurs est impossible et même nuisible : le traitement inconsidéré des porteurs en équilibre avec leur paludisme risque de diminuer leur immunité et d'en faire ensuite la cible d'une souche plus virulente et d'accentuer les chimiorésistances. La découverte d'un vaccin efficace contre la maladie constituera un moyen efficace de prévention.

6.2. Prophylaxie individuelle

Elle concerne essentiellement les mesures de protection contre les moustiques. L'anophèle femelle, vecteur de la maladie pique entre le coucher du soleil et le lever. Toutefois, le risque est maximum au crépuscule. Il convient donc de concentrer les efforts réduire le risque de piqûre à cette période de la journée par le port de vêtements clairs, amples et couvrants, par la mise en place des moyens mécaniques de protection, des ouvertures (grillages fins), et individuels pour la nuit (moustiquaire imprégnée d'insecticides), par l'utilisation d'insecticides sous toutes formes, le soir dans le lieu de sommeil (diffuseur électrique avec tablette, flacons de liquide ou spray insecticides).

Chapitre II

NOUVELLES SUBSTANCES ANTIPALUDIQUES ET CIBLES THERAPEUTIQUES

L'apparition et l'augmentation de la résistance aux médicaments antimalariques disponibles ont accentué le besoin de découvrir et de développer de nouvelles substances antimalariques. La découverte de nouvelles molécules est un processus qui repose essentiellement sur la connaissance des cibles pharmacologiques existants dans le parasite, sur l'identification de nouvelles cibles en étudiant les processus métaboliques et biochimiques de base du parasite, sur le développement de nouvelles méthodes d'analyses, la découverte de nouvelles substances naturelles, la synthèse des analogues pour évaluer les relations structure-activité (SAR) et l'optimisation des molécules intéressantes.

Comme les deux antipaludiques naturels majeurs (quinine et artémisinine), les organismes vivants animaux ou végétaux, constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives susceptibles de conduire à l'élaboration de nouveaux médicaments. La découverte récente de polyphénols antiparasitaires extraits de la réglisse chinoise et d'alcaloïdes antipaludiques extraites de plantes médicinales ivoiriennes utilisées contre le paludisme renforce l'intérêt de la recherche de substances naturelles issues de la médecine traditionnelle.

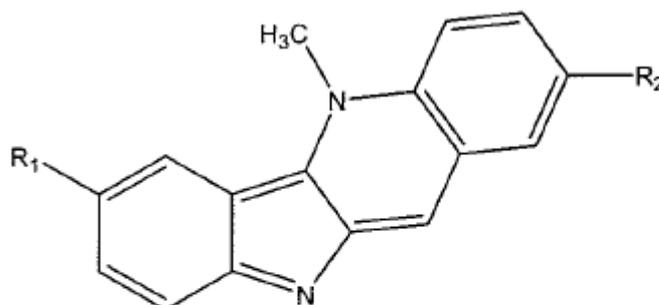
La recherche pharmaceutique dispose aujourd'hui de nouvelles technologies (chimie combinatoire, criblage à haut débit, robotique) pour réduire les délais de découverte d'un agent thérapeutique. Le séquençage achevé du génome de *P. falciparum*, accessible à toute la communauté scientifique, doit permettre de mettre en évidence de nouvelles protéines dans la mise au point d'un vaccin mais aussi de nouvelles cibles pharmacologiques pour trouver des ligands originaux, petites molécules capables de moduler ou d'inhiber le fonctionnement de protéines du parasite et entraînant ainsi sa mort. La diversité structurale des substances naturelles est un gage d'activité sur des cibles pharmacologiques variées dans le parasite.

1. QUELQUES SUBSTANCES NATURELLES ANTIPALUDIQUES

Depuis plusieurs années, la prospection de nouvelles sources de substances douées d'activités antipaludique est devenue une priorité face à l'augmentation de la résistance des *Plasmodium* aux antipaludiques existants. Les substances naturelles constituent des sources potentielles de telles molécules comme ce fut le cas pour l'artémisinine et la quinine. Plusieurs molécules douées d'activités antipaludiques particulièrement intéressantes ont été mises en évidence ces dernières années. Parmi celles-ci nous pouvons citer :

- **La cryptolépine**

Cette molécule a été isolée de *Cryptolepis sanguinolenta*, une plante grimpante utilisée traditionnellement en Afrique de l'ouest dans le traitement du paludisme. Son activité a été décrite pour la première fois sur la souche multirésistante K1 de *Plasmodium falciparum* puis confirmée en 2001 sur une souche chloroquinosensible de *Plasmodium falciparum*, avec une concentration inhibitrice CI_{50} de 0,44 $\mu\text{g/ml}$ (Kirby et al., 1995, Wrigth, 2005).



1: R₁ = R₂ = H : Cryptolepine (IC₅₀:0.44 μM *P. falciparum* K1)

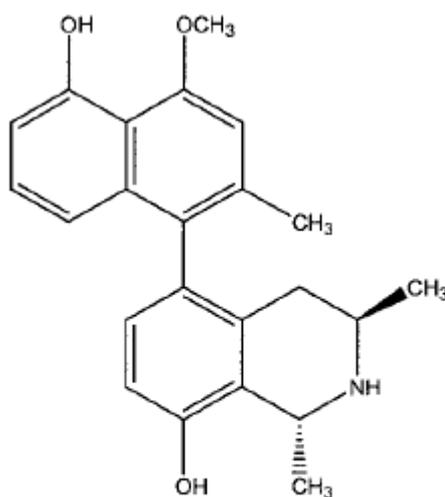
2: R₁ = R₂ = Br : 2,7-Dibromocryptolepine (IC₅₀: 49 nM *P. falciparum* K1)

Cependant, elle s'est révélée toxique et l'étude de son activité antipaludique n'a pas été poursuivie.

Récemment, des auteurs ont élaboré différentes voies de synthèse permettant la synthèse de 16 analogues de la cryptolépine. L'évaluation de l'activité antipaludique de ces dérivés a montré que six dérivés : 1,2-dichlorocryptolépine, 7-bromo-2-chlorocryptolépine, 7-bromo-2-fluorocryptolépine, 7-bromo-3-chlorocryptolépine, 2,8-dichlorocryptolépine et 2-bromo-7-nitrocryptolépine, avaient de bonne activité (IC_{50} inférieure à $0,1\mu M$), avec des concentrations inhibitrices dix fois plus faible que celle de la cryptolépine (Onyeibor et al., 2005).

- **La dioncophylline C**

Isolée de diverses espèces de lianes tropicales appartenant aux familles des *Dioncophyllaceae* et des *Ancistrocladaceae*, l'étude de l'activité antipaludique de cette molécule ainsi que celle de deux dérivés voisins, la dioncophylline B et le dioncopeltine A, isolés des même espèces, a montré une bonne corrélation entre l'activité antipaludique *in vitro* et *in vivo* (François et al., 1997).

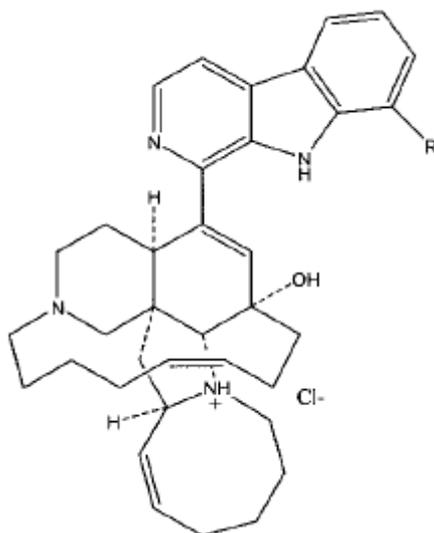


5: Dioncophylline C

La Dioncophylline C s'est révélée la plus intéressante. A une dose de 50 mg/Kg/j, *in vivo*, elle entraîne, sans effets toxiques apparents, une élimination complète des parasites après quatre jours d'administration par voie orale chez des souris infectées par *Plasmodium berghei*.

- **La manzamine :**

Isolée de plusieurs espèces d'éponges marines trouvées dans les eaux tropicales, la manzamine est un alcaloïde de la classe des β -carbolines, qui a montré avec un de ces dérivés (la 8-hydroxymanzamine), la capacité de prolonger la survie des souris fortement parasitées par *P. berghei*, après une injection intra péritonéale de 50 mg/ml, 95 nM) (Ang et al., 2000).



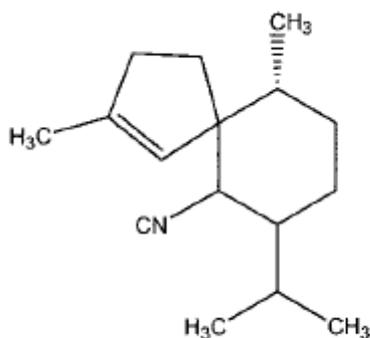
9: R = H: Manzamine A

10: R = OH : (-) 8-Hydroxymanzamine A:

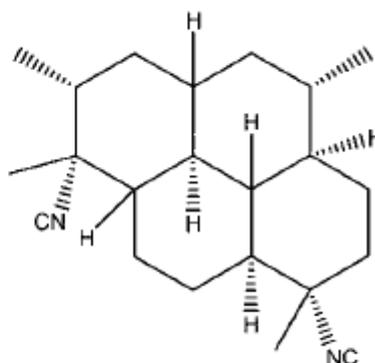
Puisque toutes les voies de synthèse de la manzamine A sont connues (Winkler et al., 1998), elles pourraient être exploitées pour la synthèse d'autres dérivés à des fins d'études de type structure-activité.

- **L'axisonitrile-3 et la diisocyanoadociane**

Isolés d'éponges marines, l'activité antimalarique et le mode d'action de ces isonitriles appartenant de la famille des terpènes, a été rapportée par Wright et collaborateurs (Wright et al., 1996 ; Wright et al., 2001).



12: axisonitrile-3



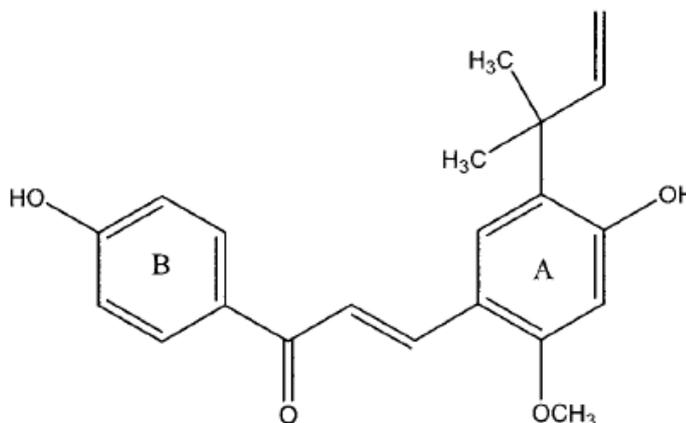
13: diisocyanoadociane

IC₅₀ 14.48 nM, *P.falciparum* D6

Ces travaux ont montré que l'axisonitrile-3 et la diisocyanoadociane interagissent avec la ferriprotoporphyrine du parasite en formant un complexe très solide.

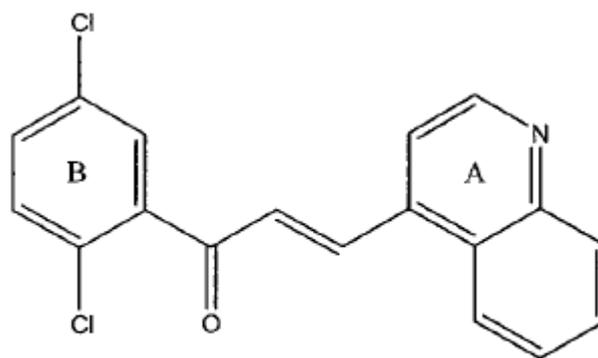
- **Licochalcone A**

Isolée des racines d'une plante chinoise appelée Gan Cao (Chen et al., 1994), cette molécule figure parmi les chalcones ayant montré une activité antipaludique intéressante (IC₅₀ = 1,8 μM). D'autres études de types structure-activité réalisées sur l'un des dérivés de cette molécule, la 1-(20,5 0-dichlorophényl)-3-(4-quinoliny)-2-propène-1-one, ont montré une activité huit fois plus intéressante que la licochalcone A avec une IC₅₀ de 0,23 μM.



21: Licochalcone A

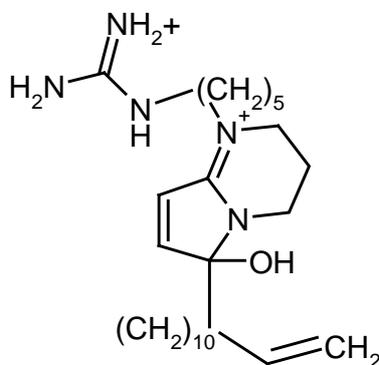
IC₅₀ 1.8 μM *P.falciparum* Dd2



1-(2',5'-dichlorophenyl)-3-(4-quinolinyl)-2-propen-1-one
 IC50 0.23 μ M *P.falciparum* W2

- **Phloéodyctines**

Parmi d'autres avancées récentes effectuées dans le domaine de la recherche de nouveaux antipaludiques, nous pouvons également citer les travaux d'une équipe de l'IRD et leurs partenaires du CNRS et du groupe industriel Pierre Fabre, sur des éponges du genre *Phloeodictyon* (Haploscléridées). En étudiant, la structure chimique de substances extraites de ces éponges vivant dans les eaux peu profondes du lagon de la Nouvelle Calédonie, ils ont mis en évidence l'activité antipaludique de 25 composés de la famille des phloéodyctines. Ces substances se sont révélées très actives contre une souche de *Plasmodium falciparum* chloroquinorésistante. Ces molécules aux structures originales constituent des candidats potentiellement intéressants pour l'élaboration de nouveaux médicaments antipaludiques.



Phloéodyctine A

2. CIBLES CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES POTENTIELLES

Dans le cadre de la recherche sur le paludisme, diverses cibles chimiothérapeutiques potentielles ont été identifiées ces dernières années chez le *Plasmodium*. Ces cibles se retrouvent à différents niveaux du métabolisme du parasite en allant de celles intervenant dans la vacuole jusqu'à celles impliquées dans la synthèse du matériel génétique du parasite dans le noyau (Schéma 1).

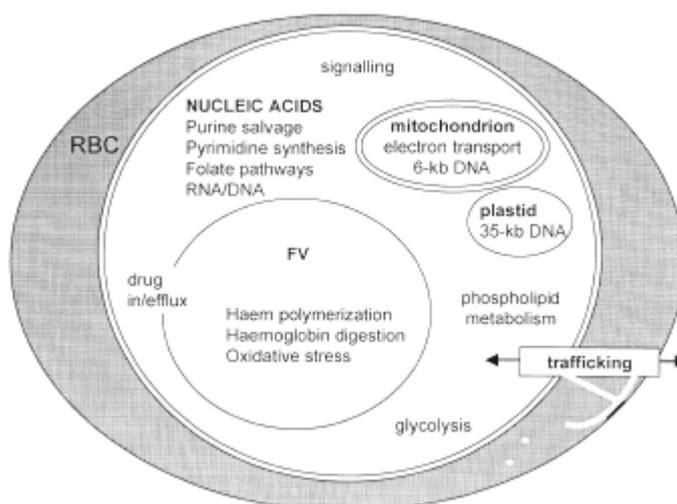


Schéma 1 : Représentation schématique des principales cibles chimiothérapeutiques du *Plasmodium* (Olliario and Yuthavong, 1999)

2.1. Les Cibles responsables des processus se produisant dans la vacuole digestive du *Plasmodium*

Les processus se produisant dans la vacuole digestive concernent la digestion de l'hémoglobine et la désintoxication hémique, les processus redox et la formation de radicaux libre (vacuole et cytoplasme du parasite et de la cellule hôte), ainsi que les réactions accompagnant la dégradation de l'hème suivi de sa polymérisation en hémozoïne.

2.1.1. La dégradation de l'hémoglobine

La dégradation de l'hémoglobine représente la principale source d'acides aminés indispensables pour la synthèse des protéines du parasite. On pense aujourd'hui que la dégradation de l'hémoglobine est assurée par trois protéases : deux protéases aspartiques appelées plasmepsine I (présent au stade anneau) et plasmepsine II (présent au stade trophozoïte et jeune schizonte) analogues de la cathepsine D (Gluzman *et al.*, 1994; Dame *et al.*, 1994; Francis *et al.*, 1994; Westling *et al.*, 1997) qui interviendraient dans le démêlage de l'hémoglobine pour faciliter la protéolyse, et une protéase cystéinique analogue de la cathepsine L (Rosenthal and Nelson, 1992; Dominguez *et al.*, 1997) qui agirait en aval des protéases aspartiques. Il faut noter que l'implication de ces différentes protéases n'est pas totalement clarifiée. Ces protéinases vacuolaires constituent néanmoins des cibles essentielles par leur spécificité dans le criblage et le développement de nouvelles substances antipaludique.

2.1.2. La polymérisation de l'hème

Nous savons que le produit de dégradation de l'hémoglobine est potentiellement toxique pour les membranes et les enzymes biologiques du parasite. Pour s'en débarrasser, le parasite séquestre l'hémine (forme oxydée de l'hème et contenant donc du fer III) dans un polymère cristallin insoluble appelé hémozoïne ou pigment malarique (Goldberg, 1992 ; Gluzman *et al.*, 1994).

Divers mécanismes, passés en revue par Ridley en 1996, avaient été proposés dans le processus de la polymérisation d'une protéine HRP (Histidine Rich Protein) (Sullivan *et al.*, 1996) dans l'amorçage de ce processus dans le parasite. L'étude *in vitro* à pH acide de la polymérisation non enzymatique de l'hémine a donné des résultats intéressants (Dorn *et al.*, 1995; Egan *et al.*, 1994). Bien que contesté, le polymère résultant de ces travaux, la β -hématine, semble garder les mêmes propriétés chimiques, spectroscopiques et biologiques que l'hémozoïne (Bohle *et al.*, 1997).

Il a été montré que les antipaludiques de la famille des quinoléines tel que la chloroquine empêcheraient la formation du colorant malarique, en formant des complexes quinoline-hémiques qui terminent la polymérisation des chaînes de

hémozoïne (Sullivan et al., 1996). En conséquence, la polymérisation de l'hémine demeure une cible très intéressante dans la recherche de nouvelles substances antipaludiques.

2.1.3. Le stress oxydatif

C'est un mécanisme important dans la destruction des *Plasmodium* et d'autres parasites intracellulaires (Schirmer et al., 1995). Il a été démontré que l'invasion d'un moustique par le *Plasmodium* induit plusieurs mécanismes de défense, dont l'activation de la cascade du stress oxydatif. Ce mécanisme aboutit à la destruction de 95 % des parasites dans le moustique (C. Brunel, F. Winter, I. Edaye, http://www-ibmc.u-strasbg.fr/arn/Ehresmann/them2_Ehres_fr.html#; 3 octobre 2005). L'utilisation des substances qui empêchent la défense antioxydante du parasite pourrait être une approche chimiothérapeutique intéressante.

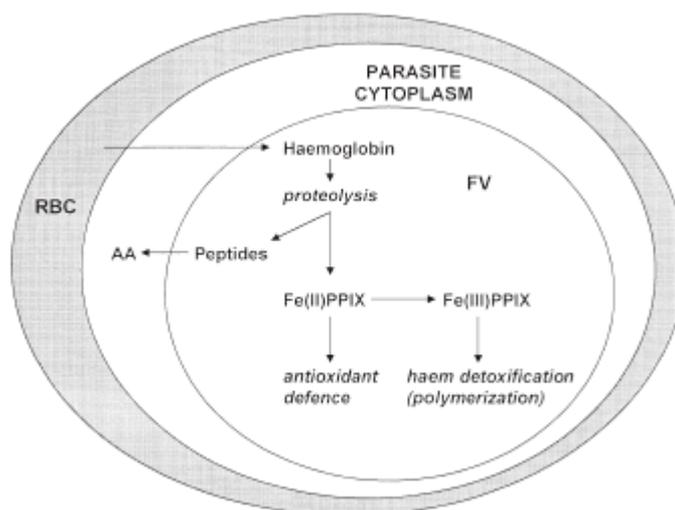


Schéma 2 : Métabolisme d'hémoglobine dans la vacuole digestive de parasite.

AA : acides aminés.

(Olliaro and Yuthavong, 1999)

2.2. Cibles intervenant dans la production des enzymes impliquées dans la synthèse macromoléculaire et des métabolites

Cette section concerne essentiellement la glycolyse, le métabolisme des acides nucléiques, le métabolisme des phospholipides et l'assemblage des tubulines.

2.2.1. La glycolyse

Le stade intra-érythrocytaire de *Plasmodium falciparum* dépend principalement de l'énergie générée par la glycolyse. Le NAD consommé pendant la glycolyse est régénéré par la fermentation du pyruvate dans le cytoplasme des cellules et/ou par la chaîne de transport d'électron dans les mitochondries. Contrairement aux cellules des mammifères et à la plupart des organismes aérobies, la lactate est le produit final de la voie glycolytique chez le *Plasmodium*. La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction de pyruvate en lactate en présence du NADH, ce qui exclut toute inhibition du substrat par le pyruvate. Ceci permet la production rapide d'énergie selon les exigences du parasite. La pLDH est aujourd'hui exprimée et une inhibition spécifique de cette enzyme constitue une cible potentielle pour des agents thérapeutiques antimalariques.

2.2.2. Le métabolisme des acides nucléiques

Les nucléotides sont les précurseurs de l'ADN et de l'ARN. Ils constituent des intermédiaires dans de nombreuses réactions de biosynthèses, et participent aux processus biochimiques aussi bien chez l'hôte que le parasite. Cependant il existe de grande différence entre le *Plasmodium* et l'homme quant aux différentes voies de synthèses et d'utilisation de ces nucléotides (Tableau 2). Notons que la biosynthèse des purines et des pyrimidines, le transport de folates et des électrons mitochondriaux sont intimement liés (Tableau 2, schéma 3).

Voies	<i>Plasmodium</i>	Mammifère
Pyrimidines	Synthèse <i>de novo</i> des pyrimidines ; Ne peut récupérer des bases/nucléotides	Peut synthétiser ou récupérer des nucléotides pyrimidiques
Purines	Pas de synthèse ; utilise les dérivés de l'hypoxanthine de l'hôte comme source de précurseur de purine	Peut synthétiser ou récupérer des nucléotides puriques ; Hypoxanthine déchet
Précurseurs des folates	Peut synthétiser ou récupérer des précurseurs de folates	Pas de synthèse ; utilise les sources extérieures

Tableau 2: Métabolisme des acides nucléiques chez l'homme et le *Plasmodium*

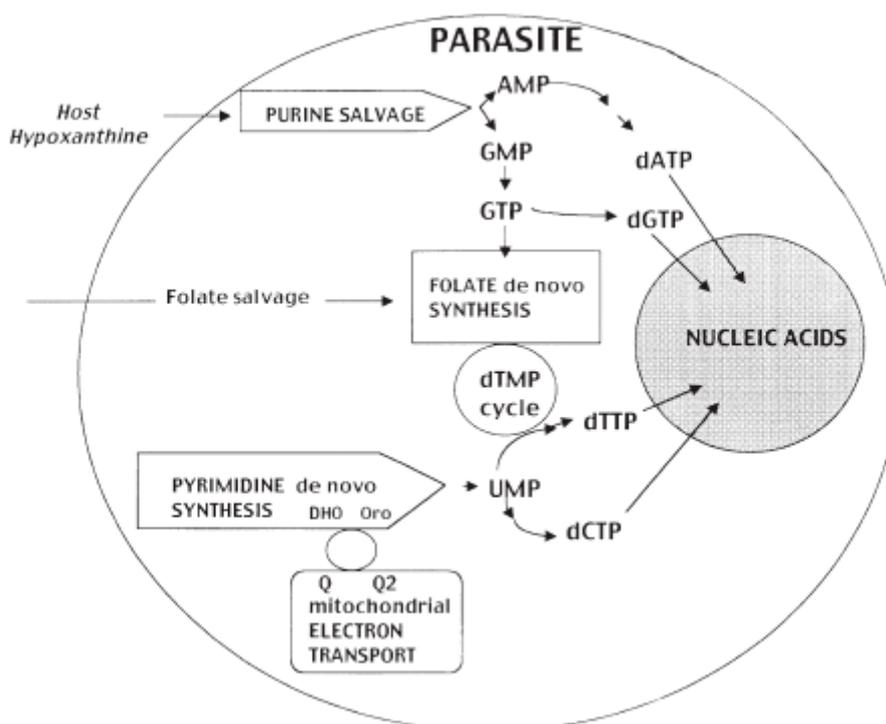


Schéma 3: les voies des purines, pyrimidines et folates dans la synthèse des acides nucléiques (Olliario and Yuthavong, 1999)

Dans la voie des pyrimidines, alors que les cellules des mammifères ont la capacité de synthétiser les nucléosides pyrimidiques et de récupérer des pyrimidines préformées, les *Plasmodium* ne peuvent pas incorporer les nucléosides pyrimidiques préformés mais doivent synthétiser leur propres pyrimidines (Sherman, 1979; Gero et O'Sullivan, 1990).

Les trois enzymes de la voie de synthèse des nucléosides pyrimidiques sont la carbamoylphosphate synthase, l'aspartate transcarbamylase et la dihydroorotase. L'inhibition sélective de ces enzymes constitue *a priori* un moyen très efficace de couper la voie de synthèse des nucléosides pyrimidiques. La dihydroorotase a été purifiée (Krungkrai et al., 1990), et divers inhibiteurs ont été synthétisés et testés (Krungkrai et al., 1992; Seymour et al., 1994).

Dans le cas des nucléosides puriques, le *Plasmodium* récupère l'hypoxanthine formée pendant le catabolisme de l'adénosine triphosphate. Le mécanisme de récupération de l'hypoxanthine de la cellule hôte par le parasite est une cible potentielle pour des éventuels agents thérapeutiques. Trois enzymes spécifiques au *Plasmodium* interviennent dans la récupération de l'hypoxanthine : l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), l'adenylsuccinate synthase et l'inosine déshydrogénase (Hassan et Coombs, 1988).

Le tétrahydrofolate est un coenzyme principal dans le métabolisme des nucléotides. Dans le *Plasmodium*, il peut être synthétisé ou récupérer dans la cellule hôte (Krungkrai et al., 1989 ; Asawamasakda et Yuthavong, 1993). Deux enzymes de cette voie sont déjà utilisées comme cible : il s'agit de la dihydropteroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR) (Pink et al., 2005).

D'autres enzymes intervenants dans le métabolisme du parasite constituent également des cibles potentielles. Les tableaux ci-dessous présentent les principales cibles chimiothérapeutiques identifiées chez le *Plasmodium* ainsi que quelques enzymes cibles et agents thérapeutiques actuellement identifiés correspondants.

Voies biochimiques	Enzymes/processus (cibles)
Métabolisme de l'hémoglobine	Plasmeptine I, II (protéases aspartiques, analogue de la cathepsine D) Falcipaine (protéase cystéinique, analogue de la cathepsine L) Polymérisation de l'hème
Métabolisme des folates	DHFR-TS PPPK-DHPS
Synthèse des pyrimidines, Transport des électrons	Carbamoyl-phosphate synthase II Dihydroorotate déshydrogénase Cytochrome oxidase
Récupération des purines	Hypoxantine-guanine phosphoribosyltransférase
RNA/DNA	RNA polymérase (35 Kb) Ribonucléotide réductase Topoisomérase I et II
Glycolyse	LDH
Métabolisme des phospholipides	Synthèse de la Phosphatidylsérine

Tableau 3: principales cibles chimiothérapeutiques identifiées chez le *Plasmodium*

Cibles	Voies biochimiques	Notes/Molécules
Dihydrofolate réductase	Biosynthèse des folates	Pyriméthamine, cycloguanil
Dihydroptéroate synthase	Biosynthèse des folates	Sulphones/sulphamides (Dapsone)
Cytochrome b	Transport des électrons	Cible de atovaquone ?
1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate réductoisomérase	Biosynthèse des isoprénoïdes	Fosmidomycine
Farnésyl pyrophosphate synthase	Biosynthèse des polyisoprènes	Risedronate

Tableau 4 : quelques enzymes cibles et molécules correspondantes.

Chapitre III
DESCRIPTION DES PLANTES ETUDIEES

Dans la première partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antipaludique de neuf espèces de plantes réparties dans huit différentes familles. Ces tests préliminaires ont permis de sélectionner trois espèces qui ont fait l'objet d'une étude plus approfondie.

Cette partie de notre thèse est consacrée à l'étude bibliographique exhaustive des trois espèces étudiées.

***1. LA FAMILLE DES AMARANTHACEAE
ET L'ESPECE GOMPHRENA
CELSIOIDES***

1.1. La famille des *Amaranthaceae*

1.1.1. Présentation

Les *Amaranthaceae* comprennent environ 850 espèces réparties en 74 genres :

Achyranthes, *Achyroopsis*, *Aerva*, *Allmania*, *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Arthroaerua*, *Blutaparon*, *Bosea*, *Brayulinea*, *Calicorema*, *Celosia*, *Centema*, *Centemopsis*, *Centrostachys*, *Chamissoa*, *Charpentiera*, *Chionothrix*, *Cyathula*, *Dasysphaera*, *Dasysphaera*, *Deeringia*, *Digera*, *Eriostylos*, *Froelichia*, ***Gomphrena***, *Gossypianthus*, *Guilleminea*, *Hebanthe*, *Hemichroa*, *Henonia*, *Herbstia*, *Hermbstaedtia*, *Indobanalia*, *Irenella*, *Iresine*, *Kyphocarpa*, *Lagrezia*, *Leucosphaera*, *Lithophila*, *Lopriorea*, *Marcelliopsis*, *Mechowia*, *Nelsia*, *Neocentema*, *Nothosaerva*, *Nototrichium*, *Nyssanthes*, *Pandiaka*, *Pfaffia*, *Philoxerus*, *Pleuropetalum*, *Pleuropterantha*, *Polyrhabda*, *Pseudogomphrena*, *Pseudopiantago*, *Pseudosericocoma*, *Psilotrichopsis*, *Psilotrichum*, *Ptilotus*, *Pupalia*, *Quaternella*, *Rosifax*, *Saltia*, *Sericocoma*, *Sericocomopsis*, *Sericorema*, *Sericostachys*, *Siamosia*, *Stilbanthus*, *Tidestromia*, *Trichuriella*, *Volkensinia*, *Woehleria*, *Xerosiphon*.

Ce sont généralement des plantes herbacées, à feuilles entières, alternes. Le plus souvent hermaphrodites, les fleurs sont généralement verdâtres, petites, parfaites ou non, diversement groupées formant de denses sommités. Elles sont largement réparties avec une préférence pour les régions tropicales. Quelques espèces sont cultivées pour l'ornement ou l'alimentation.

1.1.2. Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique

Les feuilles et racines de certaines espèces de la famille telles que *Beta vulgaris*, *Spinacia oleracea*, *Chenopodium spp.* et *Amaranthus spp.* sont utilisées dans l'alimentation. Les graines de plusieurs autres espèces sud américaines de *Chenopodium* et *Amaranthus* sont utilisées dans la fabrication de farine. (Watson et Dallwitz, 1992).

En culture ornementale d'intérieur, on retrouve quelques espèces du genre *Celosia*, *Gomphrena* et *Iresine*. Les espèces du genre *Amaranthus*, appelés populairement amarante ou queue de renard, fournissent surtout des plantes ornementales.

Dans la pharmacopée traditionnelle africaine, les *Amaranthaceae* sont utilisées dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux, le météorisme (ballonnement du ventre, dû à des gaz) et comme contrepoison pour conjurer l'action nocive du Tsingala, insecte venimeux qui se retrouve accidentellement dans les eaux potables. On note également l'utilisation comme diurétique ou antisiphilitique. Les *Amaranthaceae* sont également utilisées contre les céphalées infantiles et auraient un effet antidiarrhéique. Il a été rapporté qu'une plante de la famille des *Amaranthaceae* (*Aerva javanica*), est utilisée comme anti-histaminique, analgésique et anti-venin (El-Seed et al., 1999). Plusieurs études scientifiques ont confirmé l'intérêt pharmacologique d'un grand nombre d'espèces de la famille des *Amaranthaceae*. Entre autres :

Pfaffia glomerata

L'activité leishmanicide de l'extrait hydroalcoolique de cette plante a été montrée en 2004 par Netto et ses collaborateurs (Neto et al., 2004)

Blutaparon portulacoides

Les études réalisées en 2004 par Salvador et collaborateurs ont montré que l'extrait brut de *Blutaparon portulacoides* inhibe la croissance des amastigotes de *Leishmania amazonensis* (Salvador et al., 2002)

Celosia argentea

La moroidinè, peptide bicyclique isolé de fruit de *Celosia argentea* inhibe de manière significative la polymérisation de la tubuline (Hiroshi et al., 2000).

1.1.3. Chimie des *Amaranthaceae*

Divers groupes de composés ont été isolés des *Amaranthaceae*. On peut citer :

- les Flavonoïdes (Zhou et al., 1988; Ruiz et al., 1991; Sahu et Chakrabarty, 1993).
- les Anthraquinones (Ruiz et al., 1996)
- les Chromoalcaloïdes (Saenz et al., 1970)
- les Bétaïnes (Blunden et al., 1999)
- les Bétacyanines (Piattelli et Minale, 1964)

- les Saponines (Dogra et Ojbra, 1978; Penders et al., 1992)
- les Triterpènes (Macedo et al., 1999)
- les Stéroïdes (Patterson et al., 1991)

Plantes	Composés	Références
<i>Blutaparon portulacoides</i>	Méthylènedioxyflavonol	Salvador et al., 2002
	Stigmastéryl-3-β-O-glucoside-6'-O-palmitate	
<i>Celosia argentea</i>	(S)-Tryptophane-Betaxanthine	Willibald et al., 2001
<i>Blutaparon portulacoides</i>	3,5,3'-trihydroxy-4'-méthoxy-6,7-méthylènedioxyavone	Ferreira et al., 2000
<i>Alternanthera repens</i>	Saponines triterpéniques	Sanoko et al., 1999
<i>Froelichia florida</i>	2-déhydro-3-épi-20-hydroxyecdysone	Satyajit et al., 1998
<i>Achyranthes ferruginea</i>	N-transferuloyl-4-méthyl-dopamine	Tanaka et al., 1989
<i>Amaranthus paniculatus</i>	Umbelliférone	Bratoeff et al., 1997

Tableau 5: Quelques composés isolés des *Amaranthaceae*

1.2. Le genre *Gomphrena*

1.2.1. Présentation

Le genre *Gomphrena* fait partie des genres les plus importants de la famille des *Amaranthaceae* avec environ 100 espèces et variétés. Ce sont des plantes à ports buissonnants, aux rameaux dressés, raides et ramifiés. Nous donnons ci-dessous une liste non exhaustive de quelques espèces appartenant à ce genre.

Gomphrena arida, *Gomphren. atrorubra*, *Gomphrena connata*, *Gomphrena cucullata*, *Gomphren. eichleri*, *Gomphrena floribunda*, *Gomphrena humifusa*, *Gomphrena kanisii*, *Gomphrena lacunculata*, *Gomphrena magentitepala*, *Gomphrena occulta*, *Gomphrena rosula*; *Gomphrena affinis* Benth. subsp. *pilbarensis*, *Gomphrena brachystylis* F.Muell. subsp. *pindanensis*, *Gomphrena canescens* R.Br. subsp. *erythrina*, *Gomphrena diffusa* R.Br. subsp. *arenicola*, *Gomphrena. leptoclada* Benth. subsp. *Saxosa*, *Gomphrena affinis* Benth., *Gomphrena affinis* subsp. *pilbarensis* J.Palmer, *Gomphrena aggregata* C.L. Willdenow, *Gomphrena alba* Farmar Bull.Herb.; *Gomphrena brachystylis* F.Muell., *Gomphrena brasiliana* Linnaeus, *Gomphrena brasiliensis* Lamarck, *Gomphrena breviflora* F.Muell., *Gomphrena caespitosa* Torr, *Gomphrena canescens* R.Br., ***Gomphrena celosioides*** Mart, *Gomphrena conferta* Benth.,

Gomphrena conica R.Br., *Gomphrena connata* J.Palmer, *Gomphrena cucullata* J.Palmer Austral, *Gomphrena cunninghamii* Moq., *Gomphrena decumbens* Jacq, *Gomphrena dentata* Moench, *Gomphrena dispersa* Standl, *Gomphrena eichleri* J.Palmer, *Gomphrena flaccida* R.Br, *Gomphrena glauca* (Martius) Moquin-Tandon, *Gomphrena globosa* Linnaeus, *Gomphrena haageana* , *Gomphrena humifusa* J.Palmer, *Gomphrena kanisii* J.Palmer, *Gomphrena lanata* R.Br, *Gomphrena leptoclada* Benth., *Gomphrena leptophylla* (Benth.) J.Palmer, *Gomphrena Linnaeus*, *Gomphrena martiana* Gill., *Gomphrena nealleyi* J. M., *Gomphrena nitida* Rothrock, *Gomphrena occulta* J.Palmer Austral, *Gomphrena parviflora* Benth., *Gomphrena platandra* F.Muell.), *Gomphrena polygonoides* Linnaeus, *Gomphrena pusilla* Benth., *Gomphrena sordida* Farmar, *Gomphrena sessilis* Linnaeus, *Gomphrena serrata* L., *Gomphrena sonorae* Torr., *Gomphrena stenophylla* K.P. Sprengel, Argyle (T.E.H. Aplin et al. 458), *Gomphrena tenella* (Moq.) Benth, *Gomphrena vermicularis* Linnaeus, *Gomphrena viridis* Wooton, (Joanne Palmer, juillet 2005).

1.2.2. Propriétés pharmacologiques des *Gomphrena*

Le genre *Gomphrena* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle dans de nombreuses régions et les propriétés pharmacologiques de certaines espèces ont été démontrées dans des études scientifiques. Les maladies pour lesquelles ces espèces sont utilisées sont très diverses. On peut citer:

Gomphrena celosioides Mart et *Gomphrena officinalis* Mart

Utilisées dans certaines pharmacopées traditionnelles en Afrique et en Amazonie., *G. celosioides* et *G. officinalis* sont prescrits pour le traitement des convulsions et comme anti-asthénique.

Gomphrena globosa

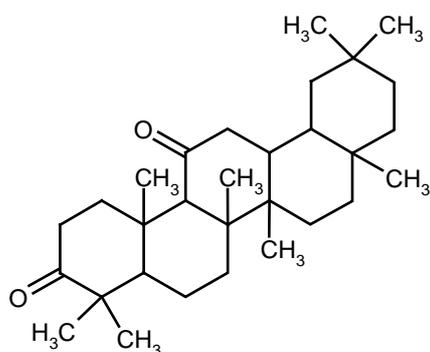
En médecine traditionnelle africaine, cette espèce est utilisée dans les périodes de stress, car il permet de se relaxer, de se détendre, d'être serein et plein d'énergie. Elle permet la relaxation des muscles en augmentant leur force, la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité. De plus, elle favorise le sommeil et permet également de stimuler la mémoire, d'augmenter sa concentration et sa lucidité. Elle possède également une action bénéfique sur la digestion. Ses propriétés anti-stress et

anti-oxydant permettent de lutter contre le vieillissement de la peau. Elle est aussi bien conseillée pour les personnes stressées, que les personnes de plus de 50 ans et les sportifs (<http://site.voila.fr/medicherb/gomphrena>; juillet 2005).

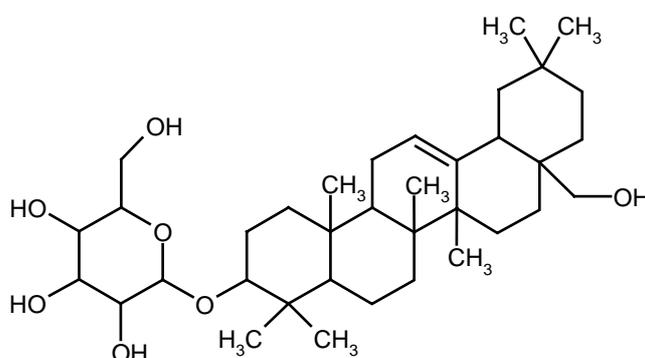
Gomphrena martiana

Des études ont montré que deux flavones trisubstitués : la 5,6-diméthoxy-7-hydroxyflavone et la 5,7-dihydroxy-6-méthoxyflavone, isolées de cette espèce diminuent de manière significative l'évolution de différentes sortes de tumeurs. (Pomilio et al., 1994)

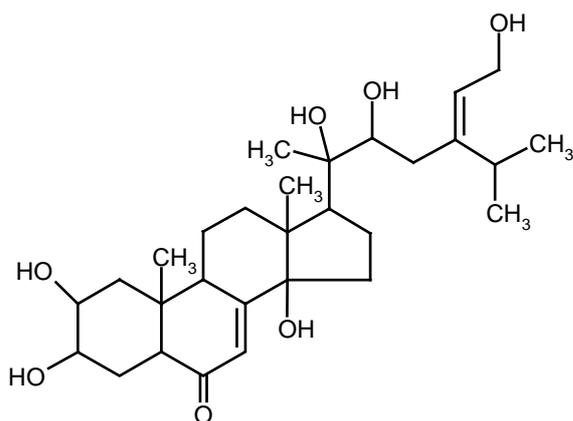
1.2.3. Quelques exemples de composés isolés du genre *Gomphrena*



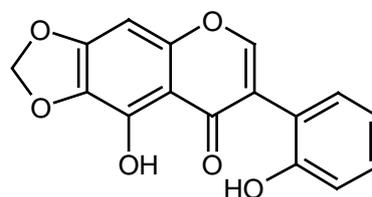
Oléan-12-ène-3,11-dione
(Ferreira et al., 2004)



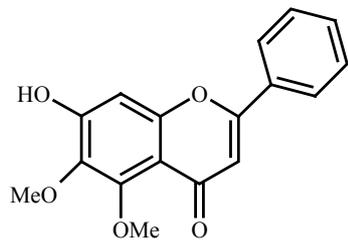
3-O-β-D-glucopyranosyl-erythrodiol
(Yong et al., 1997)



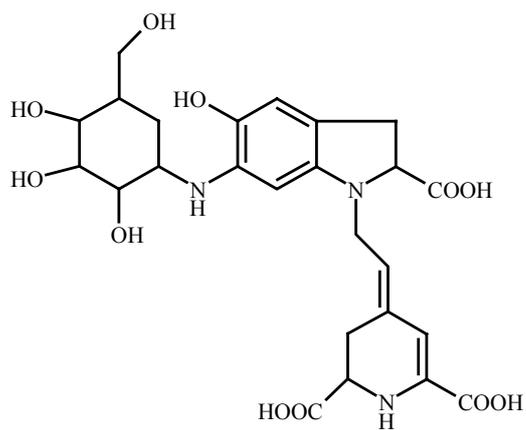
24(28)-dehydroamarasterone B
(Savchenko T. et Al., 1998)



Irisone B
(Ferreira et al., 2004)



5-6-diméthoxy-7-hydroxyflavone
(Buschi C. A. et al, 1981)



Gomphrenine I
(Heuer S. et al, 1992)

*L'espèce **Gomphrena celosioides***

L'espèce *Gomphrena celosioides*



Figure 5: Pieds et fleurs de *Gomphrena celosioides*

Source: Image google: members.iinet.net.au/~weeds/western_weeds/ph_...

(Consulter le 22/07/2005)

1.3. L'espèce *Gomphrena celosioides*

Thèse de Doctorat

Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin

Etude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles issues de Plantes Béninoises

1.3.1. Classification

Embranchement : Spermatophytes (plantes à graine)

Sous embranchement : Angiospermes (Magnoliophyta : plantes à fleur)

Classe : Dicotylédones (Magnoliopsida)

Sous classe : Caryophyllidae

Ordre : Caryophyllales

Famille : Amaranthaceae

Genre: Gomphrena

Espèce: Gomphrena celosioides Mart.

1.3.2. Description botanique

Gomphrena celosioides est une herbe annuelle pouvant atteindre 1 m de hauteur. Les tiges et les rameaux sont contractés aux nœuds, les feuilles sont opposées, obovées oblancéolées, courtement pétiolées et aiguës avec 5 à 8 cm de longueur et jusqu'à 3 cm de largeur. Les inflorescences sont en épis subglobuleux de 4,5 cm de longueur et de 2 cm de largeur avec 2 ou 3 bractées foliacées à la base. Les fleurs sont petites et blanchâtres.

C'est une espèce pantropicale poussant sur les terrains vagues. Elle est répertoriée dans certains pays, en Afrique, en Amérique du sud, en Australie et en Asie du sud-Est. Entre autre nous pouvons citer : l'Australie; le Bhutan; la Bolivie; le Brésil; le Burundi; l'Equateur; Guam; le Kenya; Madagascar; le Malawi; la Nouvelle Calédonie; la Papouasie Nouvelle Guinée; le Paraguay; l'Afrique du sud; la Tanzanie; la Thaïlande; l'Uganda; les Etats Unis et la Zambie. La figure 6 présente les régions où des exemplaires d'herbiers de cette espèce ont été récoltés.

2. LA FAMILLE DES EUPHORBIACEAE ET L'ESPECE CROTON LOBATUS

2.1. La famille des *Euphorbiaceae*

2.1.1. Présentation

Euphorbiaceae vient du genre le plus important de la famille, *Euphorbia*, lui-même dédié par le roi *Juba II* de Mauritanie à son médecin Euphorbos au 1er siècle avant Jésus Christ, et conservé par Linné.

Les *Euphorbiaceae* constituent une grande famille cosmopolite, qui compte entre 5000 et 8000 espèces réparties dans environ 300 genres:

Acalypha, *Acidocroton*, *Acidoton*, *Actephila*, *Adelia*, *Adenochlaena*, *Adenocline*, *Adenopeltis*, *Adenophaedra*, *Adriana*, *Aerisilvaea*, *Afrotrewia*, *Agrostistachys*, *Alchornea*, *Alchorneopsis*, *Aleurites*, *Algernonia*, *Alphandia*, *Amanoa*, *Amperea*, *Amyrea*, *Andrachne*, *Angostyles*, *Annesijoa*, *Anomalocalyx*, *Anthostema*, *Aparisthium*, *Apodiscus*, *Aporusa*, *Argomuellera*, *Argythamnia*, *Aristogeitonia*, *Ashtonina*, *Astrocasia*, *Astrococcus*, *Austrobuxus*, *Avellanita*, *Baccaurea*, *Baliospermum*, *Baloghia*, *Benoistia*, *Bernardia*, *Bertya*, *Beyeria*, *Blachia*, *Blotia*, *Blumeodendron*, *Bocquillonia*, *Bonania*, *Borneodendron*, *Bossera*, *Botryophora*, *Breynia*, *Bridelia*, *Calycopeplus*, *Canaca*, *Caperonia*, *Caryodendron*, *Casabitoa*, *Calvacoa*, *Celaenodendron*, *Celianella*, *Cephalocroton*, *Cephalomappa*, *Chaetocarpus*, *Chascotheca*, *Cheilosa*, *Chiropetalum*, *Chlamydojatropa*, *Chondrostylis*, *Chonocentrum*, *Choriceras*, *Chrozophora*, *Cladogelonium*, *Cladogynos*, *Claoxylon*, *Claoxylopsis*, *Cleidiocarpon*, *Cleidion*, *Cleistanthus*, *Clutia*, *Cnesmone*, *Cnidoscolus*, *Cocconerion*, *Codiaeum*, *Colliguaja*, *Conceveiba*, *Cordemoya*, *Croizatia*, ***Croton***, *Crotonogyne*, *Crotonogynopsis*, *Crotonopsis*, *Ctenomeria*, *Cubanthus*, *Cyrtogonone*, *Cyttaranthus*, *Dalechampia*, *Deuteromallotus*, *Deutzianthus*, *Dichostemma*, *Dicoelia*, *Didymocistus*, *Dimorphocalyx*, *Discocarpus*, *Discoclaoxylon*, *Dicocleidion*, *Discoglyprena*, *Dissiliaria*, *Ditaxis*, *Ditta*, *Dodecastigma*, *Domohinea*, *Doryxylon*, *Droceloncia*, *Drypetes*, *Duvigneaudia*, *Dysopsis*, *Elaeophorbia*, *Elateriospermum*, *Endadenium*, *Endospermum*, *Enriquebeltrania*, *Epiprinus*, *Eremocarpus*, *Erismanthus*, *Erythrococca*, *Euphorbia*, *Excoecaria*, *Fahrenheitia*, *Flueggea*, *Fontainea*, *Garcia*, *Gavarretia*, *Givotia*, *Glochidion*, *Glyphostylus*, *Grimmeodendron*, *Grossera*, *Gymnanthes*, *Haematostemon*, *Hamilcoa*, *Hevea*, *Heywoodia*, *Hippomane*, *Homonoia*, *Hura*, *Hyaenanche*, *Hieronima*, *Hylandia*, *Jablonskia*, *Jatropha*, *Joannesia*, *Keayodendron*, *Klaineanthus*, *Koilodepas*, *Lachnostylis*, *Lasiococca*, *Lasiocroton*, *Lautenbergia*, *Leeuwenbergia*, *Leidesia*, *Leptonema*, *Leptopus*, *Leucocroton*, *Lingelsheimia*, *Lobanilia*, *Loerzingia*, *Mabea*, *Macaranga*, *Maesobotrya*, *Mallotus*, *Manihot*, *Manihotoides*, *Manniophyton*, *Maprounea*, *Mareya*, *Mareyopsis*, *Margaritaria*, *Martretia*, *Megistostigma*, *Meineckia*, *Melanolepis*, *Mercurialis*, *Micrandropsis*, *Micrantheum*, *Micrococca*, *Mildbraedia*, *Mischodon*, *Moacroton*, *Monadenium*, *Monotaxis*, *Myladenia*, *Myricanthe*, *Nealchornea*, *Neoboutonia*, *Neoguillauminia*, *Neoholstia*, *Neoroepera*, *Neoscortechinia*, *Neotrewia*, *Octospermum*, *Oldfieldia*, *Oligoceras*, *Omalanthus*, *Omphalea*, *Omphellantha*, *Oreoporanthera*, *Ostodes*, *Pachystroma*, *Pachystylidium*, *Pantadenia*, *Paradrypetes*, *Paranecepsia*, *Parodiodendron*, *Pausandra*, *Pedilanthus*, *Pentabrachion*, *Petalodiscus*,

Petalostigma, Philyra, Phyllanoa, Phyllanthus, Piranhea, Plagiostyles, Platygyna, Plukenetia, Podadenia, Podocalyx, Pogonophora, Poilaniella, Polyandra, Poranthera, Protomegabaria, Pseudanthus, Pseudocroton, Pseudolachnostylis, Putranjiva, Reutealis, Reverchonia, Richeria, Richeriella, Ricinodendron, Rockinghamia, Sagotia, Sampantea, Sandwithia, Sapium, , Savia, Scagea, Schinziophyton, Sebastiania, Securinega, Seidelia, Senefeldera, Sibangea, , Speranksia, Sphyranthera, Spirostachys, Spondianthus, Strophoblachia, Sumbaviopsis, Suregada, Symphyllia, Synandenum, Syndyophyllum, Tacaruna, Tannodia, Tapoides, Tetracoccus, Tetrorchidium, Thecacoris, Thyrsanthera, Tragia, Tragiella, Trevia, Trigonopleura, Trigonostemon, Vernicia, Vigia, Wetria, Whyanbeelia, Wielandia, Zimmermannia, Zimmermanniopsis (Watson et Dallwitz, 1992).

D'aspect très variable, les plantes de cette famille se caractérisent essentiellement par leur latex blanc, irritant la peau, collant et épais; une évolution de la morphologie florale allant de fleurs classiques (sous-famille des *Crotonoideae*) à des fleurs simplifiées et réduites (sous-famille des *Euphorbioideae*); et, chez la grande majorité des espèces, un fruit à trois loges. Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, lianes, arbustes ou arbres dont certaines espèces sont succulentes et/ou en forme de cactus. Les feuilles généralement alternes et simples, souvent très réduites chez les espèces succulentes. Certains genres et espèces possèdent cependant des feuilles opposées et/ou palmées (ex: le Ricin). Les stipules sont souvent réduites à des soies, glandes ou épines. Les fleurs très variables pouvant être classiques, avec un vrai périanthe, à simplifiées et réduites sans périanthe, et disposées en racèmes, épis ou panicules cymeuses. Les fruits se présentent généralement sous forme d'une capsule à 3 (parfois 2, rarement 4-30) loges contenant chacune une seule graine. Les graines albuminées (souvent huileux) sont pourvues d'une caroncule, petite expansion charnue appréciée des insectes et autres animaux et favorisant la dissémination des graines (de Jussieu, 1789, de Jussieu, 1753).

2.1.2. Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique

Plusieurs espèces de la famille sont plus particulièrement cultivées par l'homme:

L'hévéa, (*Hevea brasiliensis* et espèces affines), est cultivé pour la production de caoutchouc à partir du latex recueillie par incision du tronc. Le développement de

l'automobile a favorisé l'introduction de cette culture dans tous les pays tropicaux mais l'apparition de caoutchouc synthétique a réduit son intérêt.

Le manioc ou *Manihot esculenta* possède des racines charnues d'où est tiré le tapioca. Ces racines riches en amidon sont la base alimentaire de nombreuses populations, notamment africaines. Elles sont cependant pauvres en d'autres éléments, ce qui en fait un aliment très incomplet. En revanche, elles contiennent des hétérosides cyanogénétiques toxiques responsable de l'apparition de goîtres et de troubles mentaux d'origine neurologique. C'est pourquoi le manioc amer doit être bouilli pour permettre une hydrolyse partielle de ces hétérosides, alors que pour le manioc doux, il suffit de peler la racine, les hétérosides étant concentrés dans la partie périphérique du tubercule.

Le Ricin ou *Ricinus communis* est exploité pour l'albumen huileux qui entoure sa graine et à partir duquel est produite la fameuse et purgative huile de ricin. Elle sert maintenant principalement dans le milieu industriel, par exemple dans la fabrication du nylon, ou pour la lubrification des moteurs d'avion. On retrouve également de plus en plus souvent cette plante aux feuilles palmées dans les parterres de fleurs de nos villes.

En culture ornementale d'intérieur, on trouve également les *Croton* aux feuilles panachées et *Euphorbia pulcherrima* également appelée *Poinsettia* ou Etoile de Noël. En extérieur, plusieurs espèces européennes et cultivars issus de ces espèces sont proposés. On trouve également *Euphorbia lathyris*, communément appelée herbe à taupes, qui a la réputation d'éloigner les insectivores.

Dans la médecine traditionnelle, les *Euphorbiaceae* sont utilisés dans de nombreuses régions dans le traitement de nombreuses affections telles que les maladies gastro-intestinales (Hernández et al., 2003). Ces espèces possèdent également des propriétés cicatrisantes (Esmeraldino et al., 2005), antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires (Mavar et al., 2004).

En Afrique, certaines plantes de la famille des *Euphorbiaceae* sont utilisées comme antihelminthiques et hémostatiques (Watt et Breyer-Brandwijk, 1962), comme purgatives (Mampane et al., 1987) et comme contraceptives (List et Horhammer, 1979).

Les *Euphorbiaceae* sont également utilisées dans le traitement du paludisme (Henning, 1997) des rhumatismes, des inflammations et dans le traitement de la syphilis (Chhabra et al., 1990).

2.1.3. Chimie des *Euphorbiaceae*

On retrouve diverses familles de composés tels que : les alcaloïdes (de Nazaré et al., 2005), les flavonoïdes, en général des flavonols (Hnawia et al., 1990), les composés cyanogénétiques (Hunsa et al., 1995), les cyanidines et delphinidine (Achenbach et Benirschke, 1997), l'acide ellagique (Mavar et al., 2004) et les saponines (Tripathi et Tiwari, 1980).

2.1.4. Quelques métabolites isolés des *Euphorbiaceae*

Le tableau ci-après donne quelques exemples de composés isolés des *Euphorbiaceae* :

Plantes	Composés	Références
<i>Croton macrostachys</i>	Néoclérodan-5,10-en-19,6-β-20,12-diolide	Kapingu et al., 2000
<i>Cluytia richardiana</i>	Cluytène C	Muhammad et al., 1994
<i>Euphorbia stygiana</i>	D-friédomadéir-14-èn-3b-yl acétate Madéiranyl-acétate	Lima et al., 2003
<i>Euphorbia supina</i>	fern-8-èn-3,7,11-trione	Tanaka et al., 1991
<i>Drypetes molunduana</i>	drypémolundéine A	Wandji et al., 2000
<i>Mallotus philippensis</i>	Kamalachalcone A	Tanaka et al., 1998
<i>Sebastiania corniculata</i>	3,4,8-triméthoxy-2-quinolone	de Nazaré et al., 2005
<i>Trigonostemon reidioides</i>	Lotthanongine	Kanchanapoom et al., 2002
<i>Mallotus pallidus</i>	Déhydropallidusol	Butsarakham et al., 2004
<i>Excoecaria agallocha</i>	excoecarine S (diterpène)	Konishi et al., 2003
<i>Jatropha gossypifolia</i>	Cléomiscosine A	Das et al., 2003
<i>Neoboutonia glabrescens</i>	Néoboutonine (diterpène)	Tchinda et al., 2003
<i>Chrozophora obliqua</i>	4-O-méthyl guaiacylglycérol 9-O-b-glucopyranoside	Mohamed et al., 2001
<i>Euphorbia salicifolia</i>	Salicifoline	Hohmann et al., 2001
<i>Euphorbia paralias</i>	Ségétanes (diterpène)	Samir et al., 2001

Tableau 6 : Quelques métabolites isolés des *Euphorbiaceae*

2.2. Le genre *Croton*

2.2.1. Présentation

Le genre *Croton* fait genres les plus importants avec plus de 1500 espèces et variétés évoluant des herbes, aux arbustes et aux grands arbres. Nous donnons ci-dessous une liste non exhaustive de quelques espèces appartenant à ce genre.

Croton moritibensis Baill.; *Croton lanjouwensis* Jabl., *Croton abeggii* Urb. & Ekman, *Croton aberrans* Müll. Arg.; *Croton abnormis* Baill., *Croton abutifolius* Croizat; *Croton adamantinus* Müll. Arg., *Croton adenodontus* Müll. Arg.; *Croton arboreus* Millsp., *Croton campestris* Müll. Arg.; *Croton chaetocalyx* Müll. Arg., *Croton cordiifolius* Baill.; *Croton agoensis* Baill.; *Croton agrarius* Baill., *Croton alabamensis* Chapm. var. *texensis*; *Croton alagoensis* Müll. Arg., *Croton alamosanum* Rose; *Croton albidus* Müll. Arg., *Croton argyratus* Blume, *Croton argyrodendron* Klotzsch; *Croton argyroglossum* Baill., *Croton argyrophyloides* Müll. Arg.; *Croton artibonitensis* Urb., *Croton ater* Croizat; *Croton carophyllus* Benth., *Croton desertorum* Müll. Arg., *Croton draconoides* Müll. Arg., *Croton echinocarpus* Müll. Arg., *Croton grewioides* Baill., *Croton horridulus* Baill., *Croton incertus* Müll. Arg., *Croton laurifolius* Baill., ***Croton lobatus*** L., *Croton lundianus* Müll. Arg., *Croton migrans* Casar., *Croton montevidensis* Spreng., *Croton moritibensis* Baill., *Croton piptocalyx* Müll. Arg., *Croton plagiograptus* Müll. Arg., *Croton pulegioides* Baill., *Croton pycnocephalus* Baill., *Croton sarcopetalus* Müll. Arg., *Croton sclerocalyx* Müll. Arg., *Croton claussenianus* Baill., *Croton cubanus* Müll. Arg., *Croton cueroensis* Britton & P. Wilson, *Croton cumingii* Müll. Arg., *Croton cumingii* Müll. Arg., *Croton cuncatus* Klotzsch, *Croton cuneatus* Klotzsch, *Croton cupreus* Elmer, *Croton cupulifera* McVaugh, *Croton curassavicus* Bold, *Croton curranii* Blake, *Croton curtiflorus* Elmer, *Croton cuyabensis* Pilg., *Croton cyanospermum* Gaertn., *Croton delpyi* Gagnep., *Croton dioicus* Cav., *Croton discolor* Willd., *Croton doctoris* S. Moore, *Croton dongnaiensis* Pierre, *Croton draconoides* Müll. Arg., *Croton dusenii* Croizat, *Croton ehrenbergii* Schltdl., *Croton ekmanii* Urb., *Croton elegnoides* S. Watson, *Croton elliotii* Chapm., *Croton emporiorum* Croizat, *Croton ericoides* Baill., *Croton erythroxyloides* Baill., *Croton excisus* Urb., *Croton fallax* Müll. Arg., *Croton gardneri* Müll. Arg., *Croton gardneri* Müll. Arg. var. *cordatus* Müll. Arg., *Croton gaudichaudii* Baill., *Croton glandulosa* L., *Croton glandulosepalus* Millsp., *Croton glanduloso-dentatus* Pax & K. Hoffm., *Croton glandulosus* L., *Croton glandulosus* L. var. *crenatifolius* A. M. Ferguson, *Croton glandulosus* L. var. *lindheimeri* Müll. Arg., *Croton glandulosus* Müll. Arg. var. *adenodontus* Müll. Arg., *Croton glechomifolius* Müll. Arg., *Croton glutinosus* Müll. Arg., *Croton xalapensis* Kunth, *Croton yerbalium* Chodat & Hassl., *Croton yucatanensis* Lundell, *Croton yungensis* Croizat, *Croton yunquensis* Griseb., *Croton zambalense* Merr.

(The New York Botanical Garden,

<http://sciweb.nybg.org/science2/hcol/lists/euphorbiaceae.html>; juillet 2005).

2.2.2. Propriétés pharmacologiques de quelques espèces du genre *Croton*

Les *Croton* constituent un énorme réservoir de molécules naturelles potentiellement actives contre les virus, les bactéries et certaines cellules cancéreuses. Différentes espèces de *Croton* sont utilisées en médecine traditionnelle et leur activité a été confirmée dans le traitement de plusieurs affections :

Croton lechleri

L'espèce est utilisée traditionnellement comme cicatrisant, anti-inflammatoire et dans le traitement du cancer. L'activité antioxydante a été démontrée (Lopes et al., 2004).

Croton cajucara

Utilisé dans la médecine traditionnelle pour le traitement du diabète, des affections gastro-intestinales et les inflammations; Une activité anti-ulcérogénique a été mise en évidence (de Almeida et al., 2003).

Croton celtidifolius

Communément connue sous le nom de «sangué-de-adave», les feuilles de cette plante sont utilisées sous forme d'infusion dans le traitement des maladies inflammatoires. L'évaluation *in vitro* des propriétés de l'extrait total et des différentes fractions issues de cette plante a montré des activités antioxydantes intéressantes (Nardi et al., 2003)

Croton schiedeanus

Utilisée traditionnellement dans le traitement de l'hypertension (García, 1975; Correa et Bernal, 1992), cette plante a été évaluée pour ses propriétés antihypertensives qui ont pu être confirmées (Guerrero et al., 2001).

Croton tiglium

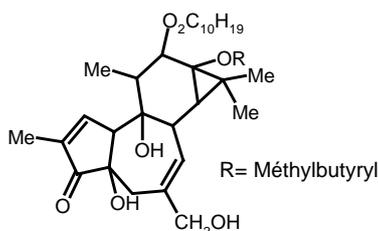
Des études ont montré que les extraits aqueux et méthanoliques des graines de *Croton tiglium*, plante utilisée dans la médecine traditionnelle égyptienne, montrent une activité dans l'infection liée au VIH 1 (Sahar et al., 2000).

Croton pseudopulchellus

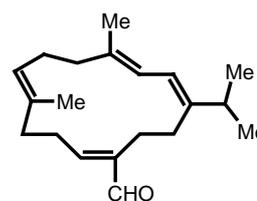
Plusieurs espèces de *Croton* sont utilisées traditionnellement comme antipaludique dans les zones endémiques à travers le monde. L'évaluation *in vitro* de l'activité antipaludique de *Croton pseudopulchellus* a confirmé l'usage traditionnel de cette plante avec une CI_{50} de 3,45 $\mu\text{g/ml}$ (Prozesky et al., 2001).

2.2.3 Quelques métabolites secondaires d'intérêt isolés du genre *Croton*

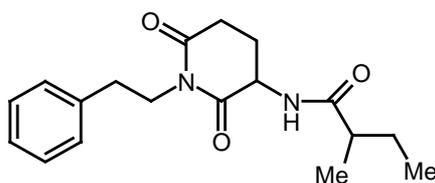
Du point de vue phytochimique, le genre *Croton* contient des alcaloïdes (Stuart et al., 1971), des flavonoïdes (Barton et al., 1967) et des diterpènes (Craveiro et al., 1982 ; Sato et al., 1981). Nous reportons ci-dessous quelques métabolites isolés dans le genre :



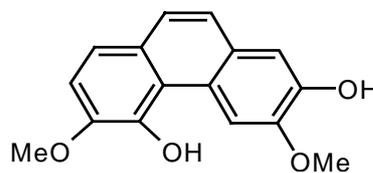
12-O-Décanoylphorbol-13-(2-méthylbutyrate)
isolé de *Croton tiglium*
(El-Mekkawy S. et al, 2000)



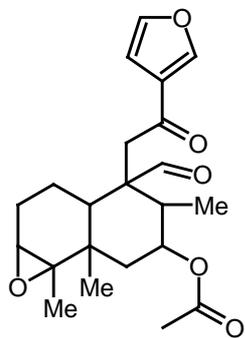
Néocrotocembranal
isolé de *Croton oblongifolius*
(Roengsumran S. et al, 1999)



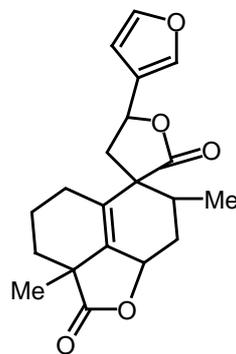
Julocrotine
isolé de *Croton membranaceus*
(Aboagye F.A. et al, 2000)



Crotoflavol
isolé de *Croton flavens*
(Eisenreich W.J. et al, 2001)



Cascarillin B
isolé de *Croton eluteria*
(Vigor C. et al, 2001)



Neoclerodan-5(10)-en-19,6b:20,12-diolide
isolé de *Croton macrostachys*
(Kapingu M.C. et al, 2000)

L'espèce Croton lobatus

L'espèce *Croton lobatus*



Figure 7 : *Croton lobatus*

Source : Guide des adventices d'Afrique de l'Ouest. Institut International d'Agriculture Tropicale, Ibadan: ISBN 978-131-0367 Okezie I. A. et Agyakwa C.W

2.3. L'espèce *Croton lobatus*

2.3.1. Classification

Embranchement : Spermaphyte (plante à graine)

Sous embranchement : Angiosperme (*Magnoliophyta* : Plantes à fleurs)

Classe : Dicotylédones (*Magnoliopsida*)

Sous classe : *Rosidae*

Famille : *Euphorbiaceae*

Genre : *Croton* L.

Espèce : *Croton lobatus* L.

2.3.2. Description botanique

Croton lobatus est une plante herbacée, annuelle ou semi-vivace de 30 à 60 cm de hauteur ou d'avantage, ramifiée dès la base. Les feuilles sont digitilobées alternées avec des limbes longs et larges de 6 à 10 cm pouvant porter 3 à 5 lobes ovales de 15 à 30 mm de largeur. Elle possède un pétiole de 2 à 7 cm de longueur finement pubescent de même que les tiges. L'inflorescence est en racème terminal, axillaire ou à la bifurcation des rameaux. Les fleurs mâles sont petites et situées au sommet du racème alors que les fleurs femelles sont courtement pédicellées ou subsessiles dans la partie inférieure. Les fruits en capsules trilobées, à lobes peu saillants de 8 à 9 mm de hauteur et de 6 à 8 mm de largeur, contiennent 3 graines cylindriques légèrement anguleuses, de couleur gris clair avec des groupes de petites mouchetures noirâtre légèrement saillantes. Elle est répandue en Afrique : au Sénégal, au Cameroun en passant par le Burkina faso le Ghana et le Nigéria. Elle s'étend en Egypte, en Ethiopie, au Soudan et en Arabie. (Adjanohoun et al., 1989). Elle a été répertoriée également aux Etats-Unis, à Costa Rica et au Brésil (Stuart et Graham, 1973), ainsi qu'en Argentine, à Belize, en Bolivie, en Colombie, à Cuba, en Equateur, au Salvador, au Guatemala, au Honduras, au Mexique, au Nicaragua, à Panama, au Paraguay, au Pérou, dans les îles Philippines, à Singapour et au Venezuela (<http://www.GBIF.org>, consulté le 20/09/05). Cette espèce a été répertoriée en Afrique et en Amérique. La carte ci-dessous présente ces différentes régions :

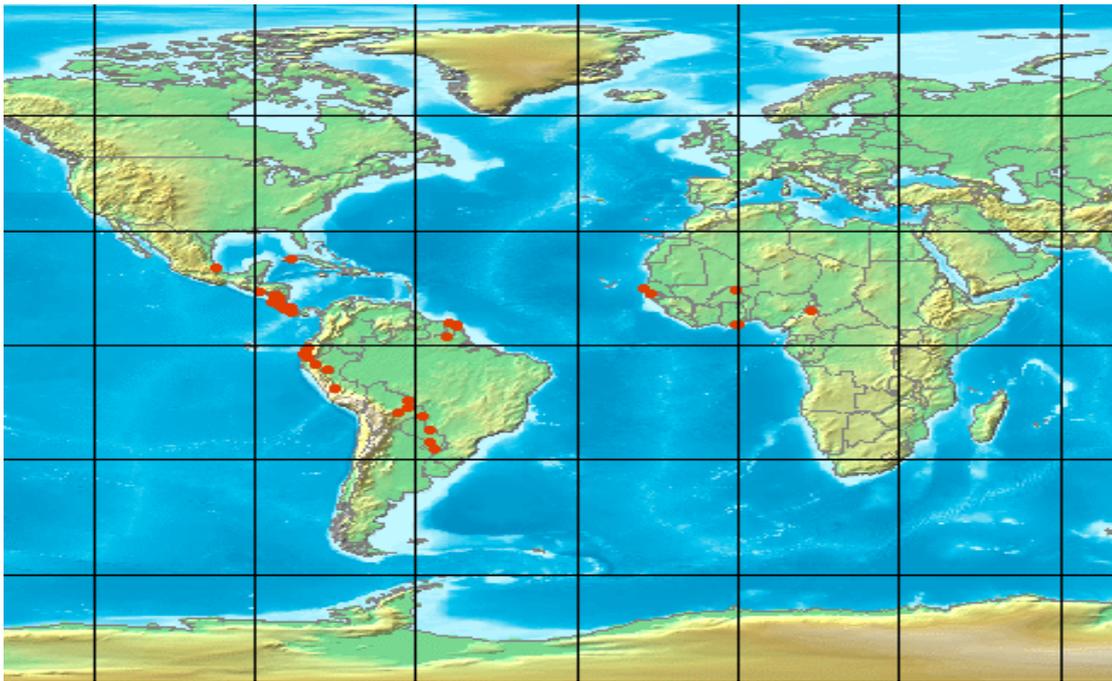


Figure 8: Régions dans lesquelles l'espèce *Croton lobatus* L. a été répertoriée (<http://www.GBIF.org>, page consultée le 20/09/05).

2.3.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle

Les feuilles ou les racines sont indiquées comme ayant une activité antispasmodique en décoction aqueuse *per os*, dans les menaces d'avortement ou le hoquet (Adjanooun et al., 1989).

Dans la médecine traditionnelle béninoise et togolaise, la décoction est également utilisée par les populations locales dans le traitement du paludisme (connu sous le nom de fièvre), en association avec les comprimés antipaludiques. Elle est également utilisée dans le traitement de nombreuses maladies (Aké, 1975) telles que:

- les troubles visuels
- les parasitoses
- l'asthénie sexuelle chez l'homme
- les problèmes liés à la grossesse (stérilité féminine, fausse couche)
- la carence protéino-calorique chez l'enfant (kwashiorkor)

2.3.4. Travaux antérieurs sur *Croton lobatus*

Contrairement à d'autres espèces du genre *Croton* qui ont fait l'objet de nombreuses études, *Croton lobatus* est l'une des espèces les moins étudiées. Citons l'étude phytochimique réalisée par Stuart et Woo-Ming publiés en 1975 et la thèse récente de Attioua (2005), soutenus après la publication de nos résultats concernant les essais biologiques sur *Plasmodium falciparum*.

- **Les travaux de Ming Stuart & Woo-Ming (1975)**

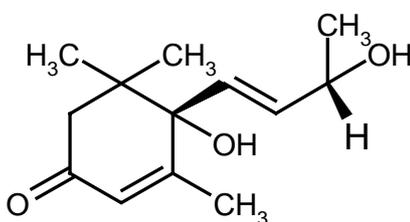
Cette étude effectuée sur les feuilles et les tiges de *Croton lobatus*, a conduit à l'isolement d'un composé, le vomifoliol.

Pour isoler ce composé, la poudre sèche de *Croton lobatus* a été extraite par une solution aqueuse d'acide tartrique (C₄H₆O₆) à 2%. Après évaporation à sec, 4,6 g d'extrait ont été obtenus. Cet extrait est ensuite traité avec de la soude (NaOH) à 5%. Cette opération a permis de séparer l'extrait en deux parties:

- la première, soluble dans la solution de soude et contenant les composés phénoliques.

- La deuxième, insoluble dans le solution de soude et contenant les composés non phénoliques

La partie non phénolique a ensuite été soumise à un fractionnement par chromatographie sur colonne d'alumine (Al₂O₃), puis à une purification sur chromatographie en couche mince, pour donner le vomifoliol.



Vomifoliol (C₁₃H₂₀O₃)

M=224,3g/mol

- **Les travaux de B. Attioua (2005)**

Ces travaux ont été effectués sur les tiges et feuilles de *Croton lobatus*. Cinq types d'extraction ont été effectués. Pour la première extraction, le matériel végétal a été extrait à l'éthanol. L'extrait obtenu après séchage a été soumis à une extraction liquide-liquide en présence du cyclohexane et de l'acétate d'éthyle. Cette opération a permis d'obtenir trois extraits :

- l'extrait hexanique
- l'extrait à l'acétate d'éthyle
- l'extrait polaire insoluble dans l'hexane et l'acétate d'éthyle

Le fractionnement des extraits hexanique et acétate d'éthyle par différentes méthodes telles que la chromatographie sur colonne de silice, la chromatographie sur couche mince préparative et la recristallisation ont permis l'isolement des six composés suivants :

- 7-déhydrocholestérol
- ergostérol
- 7-oxocholestérol
- *n*-nonadécane
- l'acide octacosanoïque
- l'acide triacontanoïque.

Dans la deuxième partie de ses travaux, B. Attioua a réalisé une deuxième extraction en milieu basique puis en milieu acide. Ainsi, le matériel végétal a été extrait avec le mélange AcOEt/NH₄OH (pH = 9). L'extrait obtenu est soumis à une extraction liquide-liquide en présence d'une solution d'acide sulfurique à 10% et d'acétate d'éthyle. Deux extraits ont ainsi été obtenus :

- l'extrait en milieu acide
- l'extrait à l'acétate d'éthyle

Le fractionnement de ces deux extraits par les mêmes méthodes a permis l'isolement de sept composés identifiés aux composés suivants :

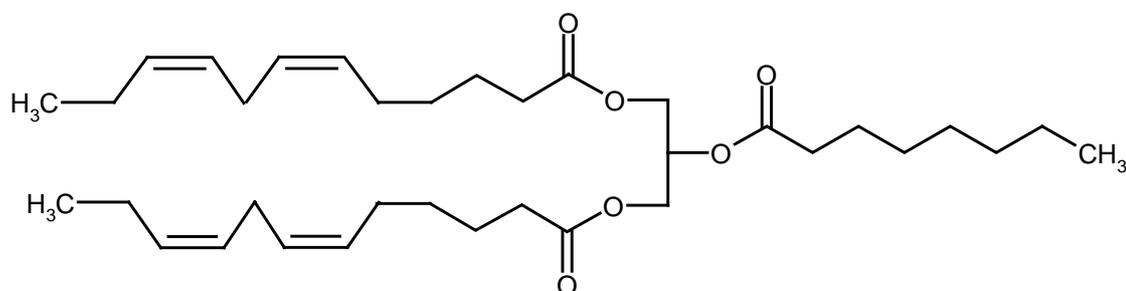
- 5- α -cholestan-3-one (**A1**)
- acide eicosanoïque

- 3-β-hydroxy-20-(29)-lupèn-28-oïque (**A3**)
- (E)-acide (4-méthoxy)-α-phenylcinnamique (**A4**)
- palmitamide
- N-(2-hydroxy-1-phenylpropyl) benzamide
- succinamide

La troisième partie de ces travaux a consisté à l'isolement et à la caractérisation structurale des huiles essentielles des tiges et feuilles de *croton lobatus*. Pour cette partie, le matériel végétal a été extrait à chaud (57°C) dans le mélange ternaire méthanol / dichlorométhane / acide acétique dans les proportions 4 :5 :1. Les fractionnements et purifications successives ont permis d'isoler six composés qui se présentent sous forme d'huile. Il s'agit des composés suivants :

- 9(Z), 12(Z), 15(Z)-octadécatriénoate de méthyle (**P1**)
- 1,3-bis [cis, cis-6,9-dodécadiénoate]-2-[(1-oxooctyl) oxy] propyle (**L1**)
- (9Z,12Z)-octadécadiénoate de (2E, 6E, 10E, 14)-3,7,11,15-tétraméthyl-2,6,10,14-hexadécatétraèneyle
- acide-8,11,17,21-tétraméthyl-8(E),10(E),17(E),21(E)-tétraèntétracosanoïque (**P3**)
- acide cérotique
- géranylgéraniol (**P4**)

Au total, dix neuf composés ont été isolés puis identifiés. Parmi ces composés, on retrouve des stéroïdes, des composés azotés, des acides gras, un hydrocarbure, un triterpène, des amphiphiles, un composé aromatique et un nouveau triglycéride dont la structure est présenté ci-dessous :



$C_{35}H_{58}O_6$ $M = 574,8$ g/mol
1,3-bis [cis, cis-6,9-dodécadiénoate]-2-[(1-oxooctyl)oxy]propyle

L'évaluation de l'activité antipaludique *in vitro* et de la cytotoxicité de sept des métabolites isolés (**A1**, **A3**, **A4**, **L1**, **P1**, **P3** et **P4**) a été réalisée respectivement sur la souche K1 de *Plasmodium falciparum* et sur la souche L6 des cellules myoblastiques du rat.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 7**.

Composés	<i>P. falciparum</i> (K1)	Cytotoxicité (L6)
	CI ₅₀ (µg/ml)	CI ₅₀ (µg/ml)
A1	>5	>90
A3	1,45	6,585
A4	4,86	47,9
L1	>5	7,455
P1	3,17	58,4
P3	3,91	>90
P4	1,074	27

Tableau 7 : Activité antiplasmodiale de quelques métabolites isolés par B. Attioua

3. LA FAMILLE DES MARANTACEAE ET L'ESPECE THALIA GENICULATA

3.1. La famille des *marantaceae*

3.1.1 Présentation

La famille des *Marantaceae* est une famille de plantes monocotylédones qui comprend 400 espèces réparties en 30 genres :

Afrocalathea K.Schum., *Ataenidia* Gagnep., *Calathea* G.Mey., *Cominsia* Hemsl., *Ctenanthe* Eichler., *Donax* Lour., *Halopegia* K.Schum., *Haumania* J. Leonard., *Hylaeanth* A.M.E.Jonker., *Hypselodelphys* K.Schum. Milne-Redh., *Ischnosiphon* Korn. *Koernickanthe* L.Andersson., *Maranta* L., *Marantochloa* Brongn., *Megaphrynium* Milne-Redh. *Monophrynium* K.Schum., *Monophyllanthe* K.Schum., *Monotagma* K.Schum. *Myrosma* L.f., *Phacelophrynium* K.Schum., *Phrynium* Willd., *Pleiostachya*,K.Schum., *Sanblasia* L.Andersson., *Saranthe* Regel & Korn. Eichler., *Sarcophrynium*., K.Schum. *Schumannianthus* Gagnep., *Stachyphrynium* K.Schum., *Stromanthe* Sond., ***Thalia*** L., *Thaumatococcus* Benth., *Thymocarpus* Nicolson, Steyer. & Sivad., *Trachyphrynium* Benth. (Watson et Dallwitz, 1992; <http://www.rbgekew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?>; août 2005).

Ce sont des plantes herbacées ou des lianes, rhizomateuses, parfois épiphytes, des régions sub-tropicales à tropicales. Les fleurs sont irrégulières, 3 sépales, 3 pétales ; ovaire à 3 loges et 3 ovules ; fruit capsulaire ou indéhiscent ; graines à albumen. Dans cette famille quelques espèces sont cultivées comme plantes d'appartement pour leurs grandes feuilles bigarrées.

3.1.2 Intérêt commercial, nutritionnel et pharmacologique

La famille des *Marantaceae* est bien connue en horticulture pour ses feuilles minutieusement modelées, présentes dans 20% des espèces (Kennedy, 1978). Certaines espèces appartenant aux genres *Calathea* et *Maranta* sont très populaires. Elles sont utilisées dans la conservation et comme plantes ornementales dans le jardinage tropical. L'espèce la plus utilisée en industrie alimentaire est *Maranta arundinacea*. Elle est l'espèce la plus cultivée dans des régions tropicales et dans le monde pour l'amidon de marante. Dans certaines localités en Afrique, *Thalia geniculata* est utilisé dans la fabrication des paniers, des pièges de poissons et des lits de camp de bébé (Kankam et Odum-Ewuakye, 2005).

Dans la médecine traditionnelle, les espèces telles *Taumatococcus daniellii* et *Arcophrynium brachystachys* sont respectivement utilisées comme édulcorant, et dans le traitement des abcès cutanés (Ahoussou et al., 1995).

3.1.3 Chimie des *Marantaceae*

Seules quelques études ont été répertoriées concernant la chimie des *Marantaceae*. Ces études ont permis de noter d'une part la présence de flavonoïdes avec la présence de flavonols dans 50% des espèces, de flavones dans 20% et de C-hétérosides flavoniques dans 40% des espèces (Williams et Harborne, 1977). D'autre part, on note la présence de proanthocyanidines (Watson et Dallwitz, 1992 ; <http://www.rbgekew.org.uk/cgi-bin/web.dbs/genlist.pl?>; août 2005).

3.2 Le genre *Thalia*

3.2.1 Présentation

Les espèces du genre *Thalia* ressemblent à de petits bananiers aux feuilles larges et vigoureuses. Au début de l'été, une inflorescence blanche légèrement crème, se développe curieusement au milieu d'une bractée rouge. Le genre *Thalia* fait partir des genres les moins étudiés dans la famille des *Marantaceae*. Ce genre comporte un nombre réduit d'espèces dont nous citons les principales :

Thalia barbata Small. (syn. *Thalia dealbata*), *Thalia canniformis* G. Forst, *Thalia dealbata* Fraser ex Roscoe, *Thalia densibracteata* Petersen (var. *angustissima* Suess.)

T. geniculata L., que nous avons étudiée, possède deux synonymes : *Thalia welwitschii* Ridl. et *thalia trichocalyx* Gagnepain.

3.2.2 Propriétés pharmacologiques et chimie dans le genre *Thalia*

Malgré les nombreuses recherches bibliographiques effectuées, aucune donnée biologique ni chimique sur le genre *Thalia* n'a été trouvée dans la littérature.

L'espèce *Thalia geniculata*

L'espece *Thalia geniculata*

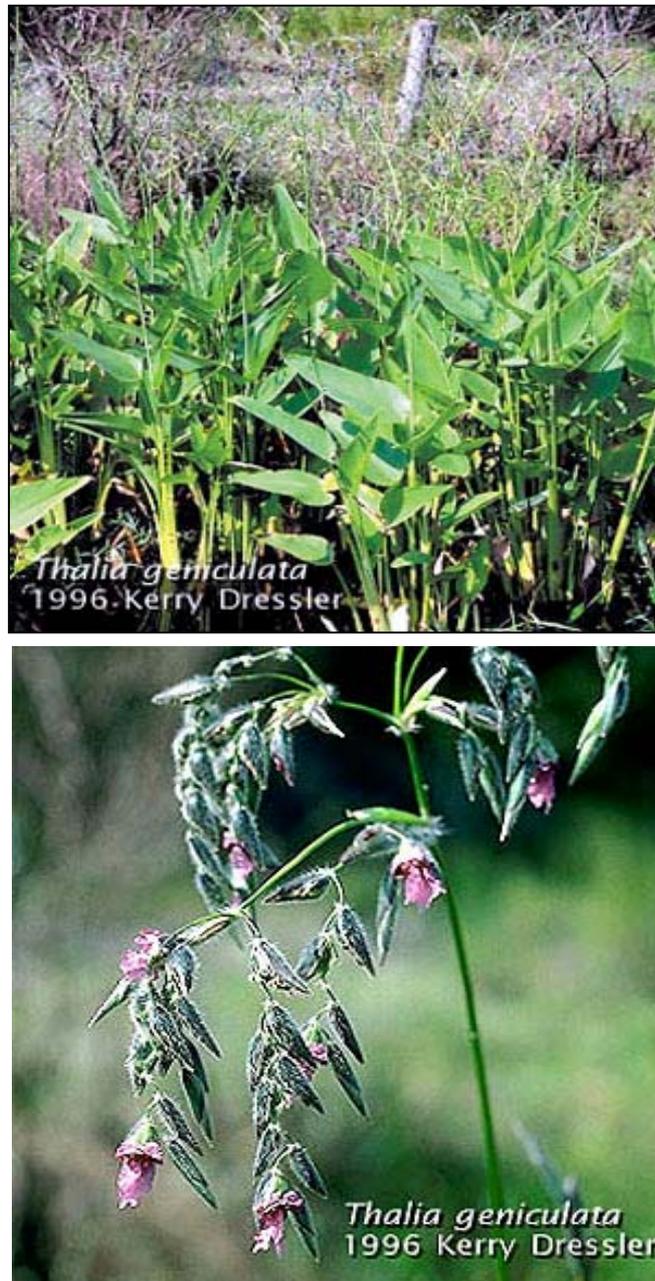


Figure 9: *Thalia geniculata*

Source: Wunderlin, R.P. and B.F. Hensen (2000) Atlas of Florida Vascular Plants.
Institute for Systematic Botany

3.3. L'espèce *Thalia geniculata*

3.3.1. Classification

Embranchement : Spermatophytes (plante à graine)

Sous embranchement : Angiosperme (*Magnoliophyta* plante à fleur)

Classe : Monocotylédones (*Liliopsida*)

Sous classe : *Zingiberidae*

Ordre : Zingiberales

Famille : *Marantaceae*

Genre: *Thalia* L.

Espèce: *Thalia geniculata* L.

3.3.2. Description botanique

Plante de 1 à 1,5 mètres de haut, à tige aérienne, en touffe, retrouvée généralement dans les zones humides ou les marécages. Les feuilles portent des pétioles longs de 5 à 40 cm. Les fleurs se présentent généralement sous forme d'une grande panicule lâchement ramifiée

Elle a été répertoriée principalement au Belize, en Bolivie, au Brésil, en Colombie, au Costa Rica, en Equateur, au Salvador; en Guyane, au Honduras, au Mexique, au Nicaragua, au Panama, au Paraguay, aux Etats-Unis, au Vénézuéla et en Zambie. La figure 10 présente les différentes régions dans lesquelles cette espèce a été répertoriée.

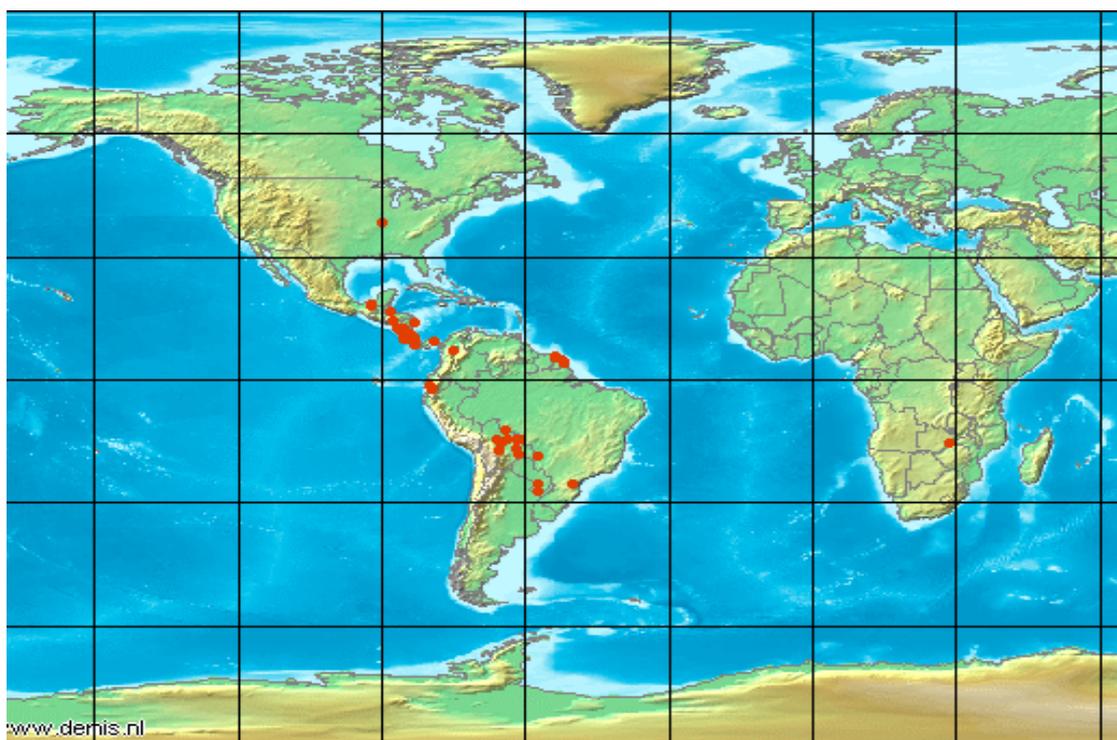


Figure 10 : Quelques régions où *Thalia geniculata* a été répertoriée
 (<http://www.GBIF.org>, page consultée le 20/09/05)

3.3.3. Utilisation dans la médecine traditionnelle

En médecine traditionnelle béninoise, la décoction aqueuse est utilisée en association avec *Nauclea latifolia* pour traiter le paludisme (Adjanooun et al. 1989).

Deuxième partie

***MATERIEL ET METHODES
D'ANALYSES***

Chapitre I

***EXTRACTION, ISOLEMENT ET
PURIFICATIONS DES METABOLITES
SECONDAIRES***

1. MATERIEL VEGETAL

Nous présentons ci-dessous les informations relatives à la récolte et à l'extraction de toutes les espèces médicinales considérées dans cette étude, y compris celles qui ont uniquement fait l'objet d'un tri biologique préliminaire.

1.1. Récolte des plantes

Les espèces sélectionnées ont été collectées dans leur habitat naturel. Les récoltes sont effectuées au Bénin dans la région de l'Ouémé (Sud Bénin) pour *Canthium setosum* Hiern. (*Rubiaceae*), *Pavetta corymbosa* (DC.) F.N. Williams (*Rubiaceae*), *Schrankia leptocarpa* DC. (*Mimosaceae*), *Hybanthus enneaspermus* (L.) F. Muell. (*Violaceae*) et *Dichapetalum guineense* (DC.) Keay (*Dichapetalaceae*); dans la région du Zou (Centre Bénin) pour *Secamone afzelii* (Schutt.) K. Schum. (*Asclepiadaceae*) et dans la région de l'atlantique (Sud Bénin) pour *Thalia geniculata* L. (*Maranthaceae*), *Gomphrena celosioides* Mart. (*Amaranthaceae*) et *Croton lobatus* L. (*Euphorbiaceae*). La détermination botanique des espèces a été réalisée par les taxonomistes de l'Herbier National de l'Université d'Abomey-Calavi au Bénin. Des échantillons justificatifs et numéros voucher ont été déposés au sein du même Herbier (Tableau 8).

Nom botanique	Famille	ZC	N° Voucher
<i>Canthium setosum</i>	<i>Rubiaceae</i>	O	Houngnon 3435
<i>Croton lobatus</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	A	Hp 565a
<i>Dichapetalum guineense</i>	<i>Dichapetalaceae</i>	A	Av 1551
<i>Gomphrena celosioides</i>	<i>Amaranthaceae</i>	A	Souza 46c
<i>Hybanthus enneaspermus</i>	<i>Violaceae</i>	O	Houngnon 3708
<i>Pavetta corymbosa</i>	<i>Rubiaceae</i>	O	Houngnon 4870
<i>Shrankia leptocarpa</i>	<i>Mimosaceae</i>	O	Houngnon 954b
<i>Secamone afzelii</i>	<i>Asclepiadaceae</i>	Z	Souza 1202a
<i>Thalia geniculata</i>	<i>Marantaceae</i>	A	Av 2468

ZC: zone de collection; O: Ouémé, (Sud Bénin); A: Atlantique (Sud Bénin); Z: Zou (Centre Bénin).

Tableau 8: liste des plantes étudiées et N° de récolte

1.2. Séchage des plantes

La récolte du matériel végétal a été réalisée entre le mois de décembre 2001 et de janvier 2002. Les parties récoltées ont ensuite été séchées à l'abri de la lumière du soleil. La durée du séchage a variée entre quatre et six semaines selon l'espèce.

2. MATERIEL ET METHODES D'EXTRACTION

Au cours de ce travail nous avons utilisé diverses techniques d'extraction dont les plus importantes sont décrites ci-dessous.

2.1 Extraction au Soxtec[®]

Cette extraction a été utilisée pour préparer de petites quantités d'extraits pour les tris biologiques préliminaires. Le Soxtec est un système automatique d'extraction, qui entre dans la nouvelle génération des systèmes d'extraction (figure 11). Le principe d'extraction est basé sur celui de l'extracteur de Soxhlet. Cependant, il possède de nombreux avantages du point de vue de la durée d'extraction, de la quantité de solvant utilisé et du nombre d'échantillons à traiter au cours d'une seule manipulation. En effet, le Soxtec permet à l'utilisateur de réaliser des extractions en lots allant jusqu'à six échantillons au cours d'une seule manipulation dont la durée est d'environ une heure.



Figure 11 : Extracteur Soxtec

Le tableau ci-dessous présente quelques unes de ses caractéristiques.

Volume maximal de l'échantillon	65 ml (cartouche de 33x88mm)
Capacité d'analyse	6 échantillons
Reproductibilité	1%
Intervalle de température	De 20 à 285°C en 8 à 10 minutes

Tableau 9: Caractéristiques du Soxtec.

La particularité du Soxtec par rapport au Soxhlet réside également dans l'existence de deux étapes d'utilisation du solvant :

- Une phase d'ébullition durant laquelle la cartouche contenant le matériel végétal est immergée dans le solvant bouillant permettant une humidification en profondeur du matériel végétal.
- Une phase de rinçage au cours de laquelle le solvant circule à travers la cartouche : c'est l'extraction à proprement parler. Cette étape, est suivie d'une phase de récupération du solvant d'extraction dans le collecteur de solvant via les condensateurs.

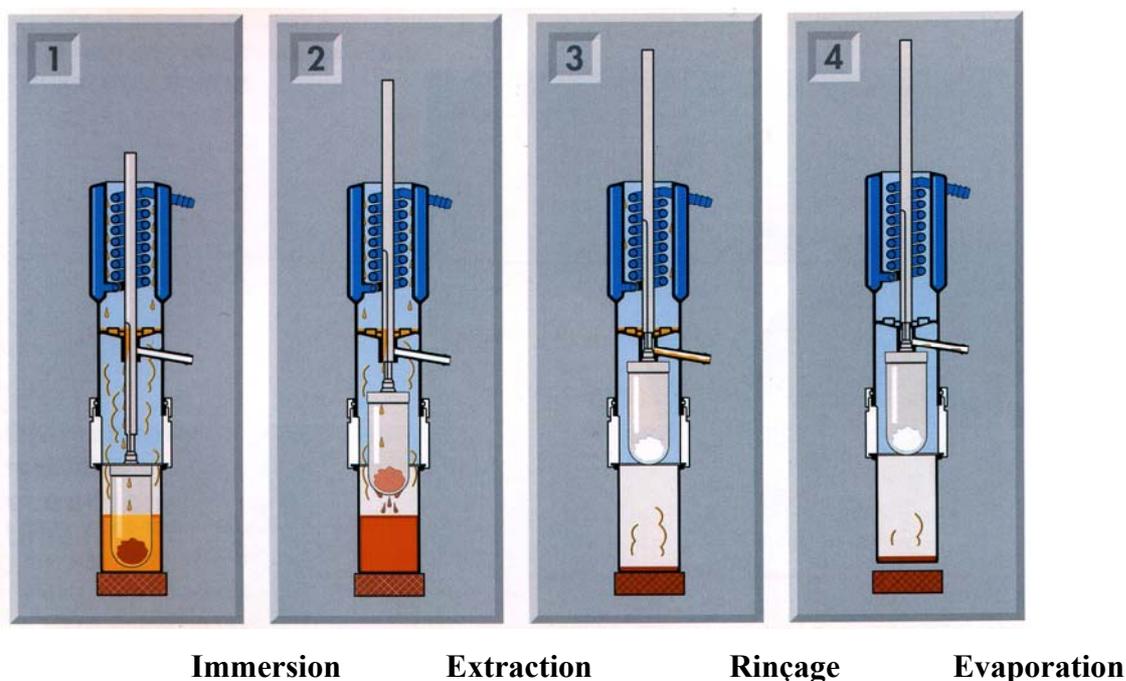


Figure 12 : Principe d'extraction du système Soxtec

Cette technique a été utilisée pour l'extraction de petites quantités de matériel végétal pour les essais préliminaires qui ont permis la sélection finale des espèces d'intérêt. Le matériel végétal sec de chaque espèce est broyé (0.2mm maille) puis extrait pendant 12 heures à température ambiante avec de l'hexane (200 ml). Le matériel végétal résiduel séché (marc) est ensuite extrait deux fois successivement à 40°C pendant 30 minutes avec du dichlorométhane (60 ml) en utilisant le Soxtec (Soxtec Avanti 2055 apparatus, Foss Tecator AB, Box 70, Se-263 21, Höganäs, Sweden). Le marc est ensuite séché avant d'être extrait deux fois successivement par du méthanol (60 ml) pendant 30 min à 64°C. Les extraits obtenus sont séchés sous vide puis conservés au réfrigérateur.

Conditions opératoires de l'extraction au Soxtec

- **Extraction à l'hexane (dégraissage)**

Phase	Volume : 60ml Température : 180°C	Volume : 60 ml Température : 180°C
1	10mn	10mn
2	15mn	15mn
3	10mn	10mn
4	05mn	05mn

- **Extraction au dichlorométhane**

Phase	Volume : 60ml Température : 180°C	Volume : 60 ml Température : 180°C
1	15mn	15mn
2	30mn	30mn
3	15mn	5mn
4	10mn	5mn

- **Extraction au Méthanol**

Phase	Volume : 60ml Température : 270°C	Volume : 60ml Température : 270°C
1	15mn	15mn
2	30mn	30mn
3	15mn	5mn
4	10mn	5mn

2.2. Extraction au Soxhlet

Nous avons utilisé cette méthode d'extraction pour l'extraction de quantité plus importante de poudre sèche de *Croton lobatus* en vue du fractionnement phytochimique. L'extracteur de Soxhlet permet le traitement de solides (matériel végétal) en plus grande quantité que le Soxtec, avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant. Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient de plus en plus clair c'est-à-dire sans une proportion significative de soluté (Houghton P. J. et Raman 1998). Les conditions opératoires sont les suivantes :

Conditions opératoires

- Quantité de matériel végétal : 10 g
- Volume de solvant : 1,5 L
- Température: 50 - 150°C

Hexane	Dichlorométhane	Méthanol
A chaud pendant 2 H	A chaud pendant 1H	A chaud pendant 1 H
A froid pendant 12 H	A froid pendant 12 H	A froid pendant 12 H
A chaud pendant 2 H	A chaud pendant 1H30'	A chaud pendant 2 H
Séchage pendant 10mn	Séchage pendant 10 mn	Evaporation à sec

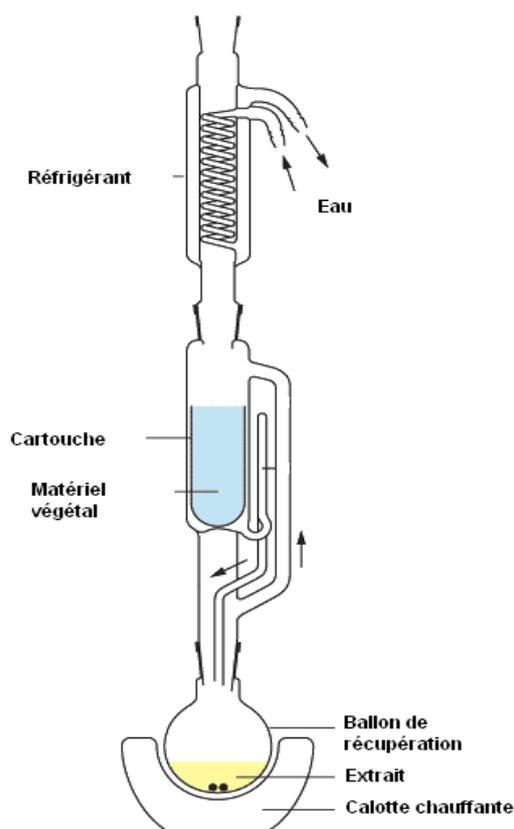


Figure 13 : Système d'extraction au Soxhlet

2.3. La macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante. La macération ne doit être confondue avec l'infusion ou la décoction. Nous avons effectué l'extraction de *Thalia geniculata* et de *Gomphrena celosioides* de cette manière, car l'utilisation traditionnelle de ces espèces se fait par ingestion d'une macération de ces plantes.

3. METHODES ET TECHNIQUES DE PURIFICATION

3.1. Méthodes et techniques chromatographiques

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes. Les facteurs qui interviennent dans le partage

des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique, la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers. Les différents types de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un de ces facteurs par rapport à l'autre, mais il faut noter que l'exclusivité d'un mécanisme n'est jamais totale au cours d'une séparation chromatographique. Il existe différentes sortes de chromatographies parmi lesquelles on peut citer :

- La chromatographie de partage : C'est une chromatographie liquide-liquide. Cette chromatographie est ainsi dénommée car elle est basée sur le partage du soluté dans les deux phases liquides.

- La chromatographie d'exclusion : elle est encore appelée chromatographie d'exclusion-diffusion, tamisage moléculaire, gel filtration, perméation de gel. La phase stationnaire est un solide poreux : les grosses particules sont exclues de la phase fixe, en revanche les petites particules incluses diffusent plus lentement dans les pores du gel.

- La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide polaire.

- La chromatographie d'adsorption en phase inverse : c'est une chromatographie liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire est apolaire.

- La chromatographie sur échangeurs d'ions ou la phase stationnaire est constituée par une résine porteuse de groupements ionisés négativement ou positivement, exerçant des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu.

- La chromatographie d'affinité ou la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte, sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser (affinité enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps).

En résumé, les différents principes de chromatographie résultent du fait que l'on a privilégié l'effet de l'un des facteurs suivants, afin de séparer des composés constituant un mélange:

- la solubilité dans un solvant liquide dans la chromatographie de partage
- la taille, la forme dans la chromatographie d'exclusion
- la polarité dans la chromatographie d'adsorption, et d'adsorption en phase inverse
- la charge électrique dans la chromatographie par échange d'ions
- la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers dans la chromatographie d'affinité

3.1.1. La chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel. La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tel que :

- Une cuve chromatographique : c'est un récipient en verre, de forme variable (selon les manipulations à effectuer) fermé par un couvercle maintenu étanche.
- Une phase stationnaire : c'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm. L'absorbant que nous avons utilisé est le gel de silice (Merck) qui permet la séparation de substances lipophiles et hydrophiles d'un mélange.
- La phase mobile : c'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.
- Les échantillons : ils sont le plus souvent solubilisés dans un solvant volatil qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Les échantillons à analyser sont appliqués en petits spots sous forme de points ou de bandes sur l'absorbant. La plaque est déposée

verticalement dans la phase mobile constituée, comme on a préalablement indiqué, par un ou plusieurs solvants organiques. Pour une bonne élution, la cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée (figure 14).

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254 \text{ nm}$ et 365 nm). Si nécessaire, les taches du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal :

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}}$$

- Le Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support «phase stationnaire» donné.
- Le Rf est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.
- Le Rf ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange

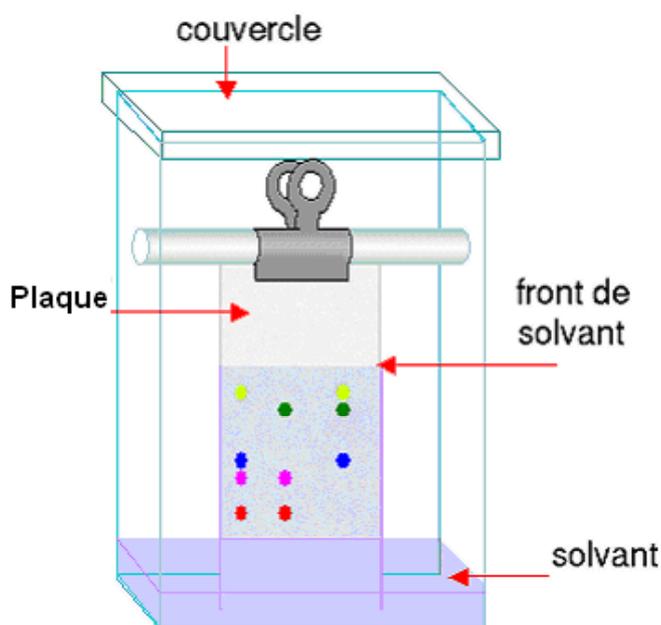


Figure 14: schéma du développement chromatographique d'une plaque

3.1.2. La chromatographie sur couche mince préparative

La CCM préparative est une technique chromatographique utilisée dans la séparation et l'isolement de divers métabolites présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle dérive de la chromatographie sur couche mince mais dans ce cas, les

zones de silice correspondants aux taches sont récupérées de la plaque contrairement à la CCM analytique. A cette différence s'ajoute la quantité d'échantillons appliquée sur la plaque chromatographique (20mg à 40mg) ainsi que l'épaisseur de la couche du gel de silice sur la plaque. Dans cette technique, les plaques que nous avons utilisées sont généralement des plaques en verre (Merck).

L'échantillon à séparer est solubilisé dans un solvant adéquat de manière à obtenir la dissolution totale. Il est ensuite déposé sur la plaque à l'aide d'un peigne spécial. La plaque est développée dans une cuve saturée contenant l'éluant adéquat. Comme dans la CCM analytique, la plaque est séchée à température ambiante ou avec une sèche-cheveux. On examine les taches des constituants sous lumière UV ou bien on révèle une frange de la plaque par pulvérisation avec le réactif adéquat. A l'aide d'un scalpel ou une spatule on récupère les composés d'intérêt fixés sur la silice. Cette dernière est ensuite dispersée dans une petite quantité de solvant, puis filtrée sous vide, pour permettre la récupération des composés d'intérêt.

3.1.3. Chromatographie d'adsorption sur colonne

L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes, par une phase stationnaire. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface (liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de Van der Waals) entre l'adsorbant et la molécule adsorbée. Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire est contenue dans une colonne. L'éluant qui peut-être sous la pression d'une pompe ou non, entre par une extrémité et sort par l'autre. Il peut-être un solvant unique ou un mélange de solvant.

Sous l'action de l'éluent et des liaisons qu'elles établissent avec l'adsorbant, les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard

les unes par rapport aux autres pendant la migration. Elles vont donc se présenter avec un certains retard en sortie de colonne.

L'élution peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analytique. Toutefois, l'élution peut-être accélérée grâce à l'addition progressive de solvant de plus en plus polaire par rapport à la phase initiale. Les différentes fractions sont collectées dans des erlenmeyers ou dans des piluliers. Ces fractions sont ensuite analysées comme décrit précédemment.

3.1.4. Chromatographie liquide à pression atmosphérique

C'est une méthode qui permet la séparation des constituants d'un mélange de substances en utilisant les propriétés qui les relient à un substrat déterminé. C'est une technique classique basée l'absorption sélective des composants d'un mélange sur une phase stationnaire solide, en offrant une grande surface d'adsorption. Dans ce cas, la phase mobile composée par un ou plusieurs solvants va permettre une élution différentielle en fonction de la polarité des composés, en éluant en premier les composés moins polaires. Pendant tout le processus d'élution, un phénomène constant d'échange se produit entre l'adsorbant et la phase mobile.

Nous avons utilisé au cours de nos travaux le gel de silice (Merck) phase normale pour chromatographie liquide.

Cette technique n'est pas sans inconvénient. Un des inconvénients majeurs est la lenteur de la phase mobile. En outre, les bandes des différents composés peuvent diffuser et s'élargir sur la colonne pendant leur séparation, ce qui diminue la capacité de séparation. Il existe une vitesse optimale d'élution pour obtenir une bonne résolution. Lorsque le débit de la phase mobile est élevé, l'équilibre n'est pas atteint et la séparation des composés n'est pas correctement menée.

3.1.5. Flash Chromatographie

C'est une technique de fractionnement et de purification utilisant un système manuel de pression hydraulique. La colonne de silice sous pression permet d'accélérer

la purification par rapport à un système équivalent à pression atmosphérique avec un débit élevé, une amélioration dans la résolution de séparation et une quantité plus élevée d'échantillon. Dans cette technique, le support chromatographique, qui peut être de la silice normale ou de la silice en phase inverse, est conditionné dans des cartouches. Les échantillons à purifier sont déposés sur des pré-colonnes de silice ou de phase inverse.

Le système est composé d'une bouteille d'air comprimé qui alimente une pompe pneumatique, d'une vanne d'injection, de deux modules de compression utilisable selon les quantité d'échantillon (Flash 12+M et 40+M) et d'un régulateur de pression (manomètre).

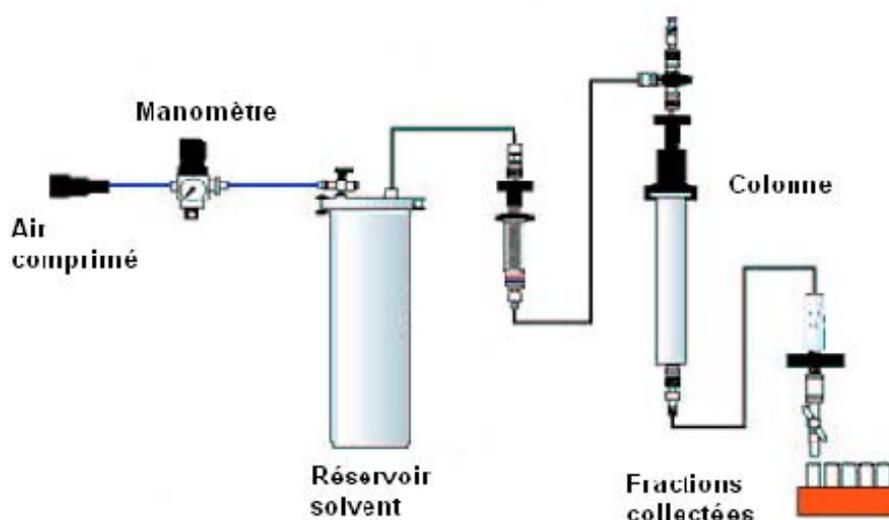


Figure 15 : Système flash chromatographie

3.1.6. Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

La chromatographie liquide à haute pression est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne sans en présenter les inconvénients que sont: la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire. C'est un appareillage plus sophistiqué qui permet de mettre en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, qui sont les plus courants, que des phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion. Cette technique a été utilisée au cours de la séparation des constituants de l'extrait méthanolique de *Croton lobatus*. La phase stationnaire est une colonne de silice en phase inverse C₁₈.

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire. Dans ce cas, la colonne est précédée d'une pré-colonne (phase inverse C₁₈ également) qui permet d'éviter les colmatages éventuels occasionnés par l'accumulation de molécules de très grosse taille. Ces colonnes en phase inverse (C₁₈) permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques.

La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluent.

Cette technique se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système. Il est souvent difficile de trouver rapidement les conditions opératoires qui mèneront à une bonne séparation. Dans ce cas, la phase analytique (HPLC analytique) conduit au choix des conditions expérimentales de la séparation.

3.1.7. Filtration sur gel de dextrane: Sephadex® LH20

Le Sephadex LH20 est un gel de séparation qui possède des propriétés lipophiles et hydrophiles. Le caractère lipophile de ce gel réticulé de dextrane dérive de la présence des groupements isopropyles obtenus par hydroxypropylation du Sephadex G-25. Son caractère hydrophile est dû aux nombreuses fonctions hydroxyles présentent. En raison de cette nature, le Sephadex LH-20 gonfle non seulement dans les solvants de faible et moyenne polarité mais également dans les solvants très polaires. A ces deux propriétés s'ajoute la récupération presque totale des échantillons au cours des expériences de séparation (Henke; 1995). Selon la nature des composés à séparer et la nature de l'éluant utilisé, différents mécanismes sont susceptibles d'intervenir en même temps tout au long du processus de séparation.

- *séparation par perméation selon le poids moléculaire*

Les substances sont éluées par ordre décroissant par rapport à leur poids moléculaire. Les solvants les plus utilisés sont le méthanol et l'éthanol, associés ou non au dichlorométhane ou au chloroforme.

- *Séparation par adsorption*

Le Sephadex LH-20 présente une affinité pour les substances aromatiques et cycliques. Les effets d'adsorption réversibles peuvent être observés. Ils peuvent donc être mis à profit pour obtenir la séparation de ces composés en utilisant généralement le méthanol ou l'éthanol.

- *Séparation par partition*

Lorsqu'on utilise un éluant composé de deux solvants organiques de polarités différentes, le séphadex retient spécifiquement le solvant polaire provoquant ainsi une différence nette entre les deux phases. Ce phénomène permet la séparation par partition de composés de polarité différente étant donné que les composés plus polaires sont retenus par la phase stationnaire.

Au cours des tests préliminaires, les extraits méthanoliques sont débarrassés de la chlorophylle et des tanins par chromatographie sur séphadex LH-20 (Houghton et Raman, 1998). Ces composés interfèrent dans les tests biologiques en donnant de faux positifs et/ou de faux négatifs.

Pour cela, environ 200 mg de chaque extrait sont dissous dans 1,5 ml d'éthanol puis déposés sur la colonne de Sephadex LH20. L'élution est faite avec 625 ml d'éthanol à 95-96%. Les éluants sont constitués d'une fraction de 25 ml et de trois fractions de 200 ml. La première fraction de 25 ml est le plus souvent éliminée car la CCM montre la présence de chlorophylle uniquement. Les trois fractions de 200 ml sont mélangées puis évaporées à l'évaporateur rotatif analyse sur plaque CCM. Les extraits liquides obtenus sont récupérés dans des piluliers puis concentrés au "speed vac".

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

Conditions opératoires

Adsorbant:	Sephadex LH20, 25 – 100 µm (Fluka)
Hauteur adsorbent:	135 mm
Diamètre de la colonne:	20mm
Eluent:	EtOH 95-96%
Récupération de la colonne:	Acétone/Eau (1:1) v/v

3.2. LA RECRISTALLISATION

C'est une méthode de purification utilisée dans la plus part des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle s'utilise même sur de petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides.

Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer. En effet, lorsqu'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape consiste à trouver le meilleur solvant de recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid.

Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid.

4. LES METHODES DE DETECTION ET DE CARACTERISATION

Les techniques de détection utilisées en chromatographie sur couche mince analytique et préparative sont simples et reproductibles. Elles sont également relativement sensibles car elles permettent la détection de la majorité des substances présentes même en faibles quantités. Dans le présent travail, de l'extraction, à la purification, à l'isolement et à la caractérisation, nous avons utilisé des réactifs adaptés à la chromatographie sur couche mince. Les principaux réactifs de pulvérisation sont les suivants :

- *Vanilline sulfurique*

C'est un réactif à spectre large qui permet la détection des terpenoïdes, des dérivés de type phenylpropane et des phénols. Elle est obtenue à partir du mélange (v/v) d'une solution éthanolique d'acide sulfurique et d'une solution éthanolique de vanilline à 1%. Les deux solutions sont préparées comme suit :

Solution I : mélanger à volume égal de l'éthanol à 96% et de l'acide sulfurique concentré.

Solution II : dissoudre 1g de vanilline dans de l'acide sulfurique à 96%.

La solution de pulvérisation est obtenue en effectuant un mélange à volume égal de la solution I et de la solution II. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 105 °C pendant une dizaine de minutes avant observation des taches obtenues.

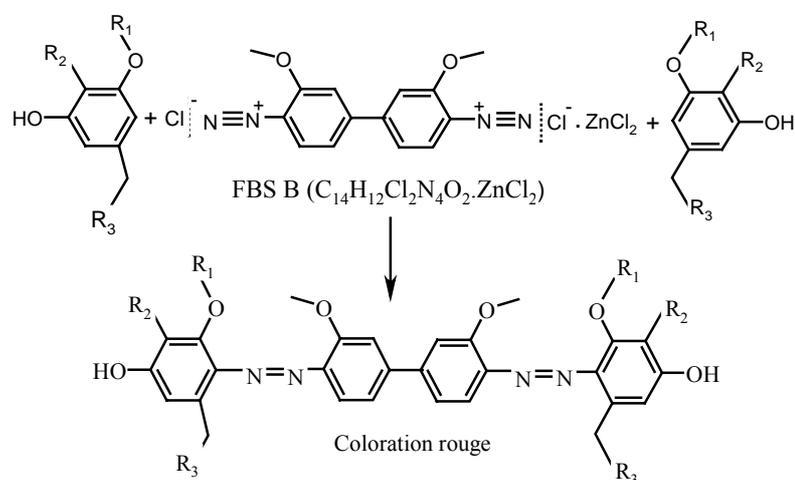
- *Le réactif de Million*

Ce réactif est préparé en dissolvant 3 ml de mercure dans 27 ml de d'acide nitrique fumant. Après homogénéisation, on ajoute un volume égal d'eau soit 30 ml d'eau. Cette solution est pulvérisée sur la plaque. La plaque est ensuite séchée. Le test est positif lorsqu'on observe après séchage, des taches allant du rouge au rouge orangé et indique la présence de groupement phénolique dans les composés isolés.

- *Le Fast Blue Salt B*

Le fast blue salt (3,3'-diméthoxy-biphenyl-4,4'-bis (diazonium dichloride) est un réactif utilisé dans la mise en évidence des composés phénoliques. C'est une solution à 0,5%. Il est préparé en dissolvant 0,5 g de FBS B dans 100 ml d'eau distillée suivi d'une agitation jusqu'à dissolution totale. La solution est conservée au réfrigérateur.

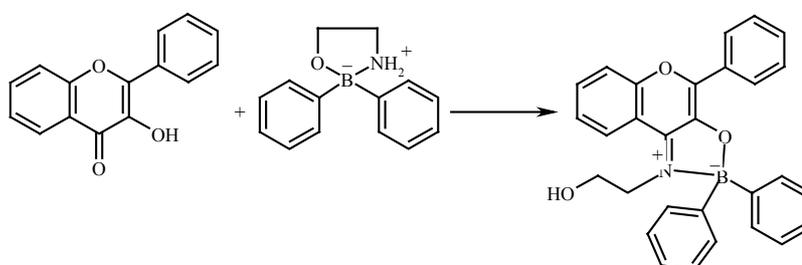
Pour chaque test, 5 à 8 ml de la solution de FBS B sont pulvérisés sur le chromatogramme. Ce dernier est séché puis observé dans le visible. Le test est positif lorsqu'on observe une coloration rouge. Le réactif forme un complexe avec le groupement phénol des composés considérés.



- *Le Réactif de NEU : NP/PEG*

Ce réactif est préparé à partir de deux solutions : une solution méthanolique de diphenylboryloxyéthylamine (solution I) et une solution éthanolique de polyéthylène glycol à 5% (solution II). Pour préparer ces deux solutions, on dissout 1,5 g de diphenylboryloxyéthylamine et 2,5 g de polyéthylène glycol, respectivement dans 50 ml de méthanol et 50 ml d'éthanol. Les deux solutions sont conservées à 4°C.

La réaction est positive lorsqu'on observe une fluorescence en UV à 365 nm après pulvérisation des deux réactifs. Cette fluorescence est due à la formation d'un complexe entre le groupement hydroxyl-flavones avec le réactif selon la réaction :



Le test se déroule en plusieurs étapes :

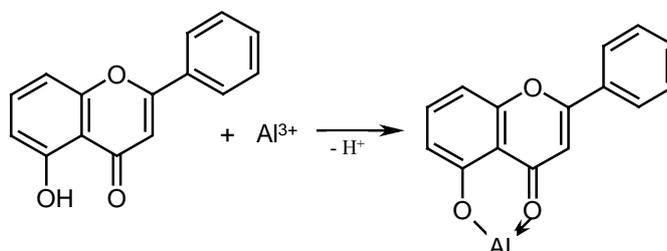
- On chauffe le chromatogramme pendant 10 minutes à 80°C puis on laisse refroidir
- La solution I est ensuite pulvérisée sur le chromatogramme
- Après séchage, on visualise les taches à la lumière UV (365 nm)
- Après 15 minutes, on pulvérise la solution II

Après pulvérisation des deux solutions, d'intenses fluorescences se produisent immédiatement ou après 15 minutes à la lumière UV (365 nm). La solution II permet d'augmenter l'intensité de la fluorescence.

- *Le chlorure d'aluminium*

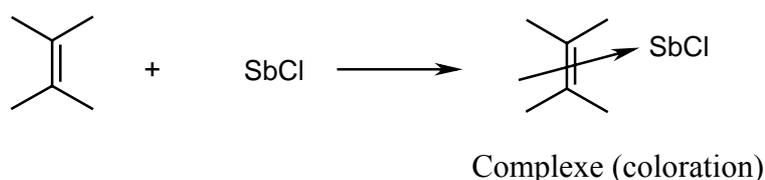
Pour ce test, nous avons utilisé une solution de chlorure d'aluminium à 1%. Elle est préparée en dissolvant 0,5 g de chlorure d'aluminium dans 100 ml d'éthanol. La solution est stockée à 4°C. Pour réaliser ce test, la solution de chlorure d'aluminium est pulvérisée sur le chromatogramme puis séché. Ce dernier peut être observé à la lumière UV (365 nm) ou dans le visible.

A 365 nm, on observe une fluorescence allant du bleu au brun. Dans le visible, on observe une coloration jaune. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.



- *Le chlorure d'antimoine* (réactif de Carr-Price)

Pour ce test nous avons utilisé une solution de chlorure d'antimoine. Cette solution est préparée en dissolvant 10 g de chlorure d'antimoine dans 100 ml de chloroforme. 10 à 20 ml de cette solution de SbCl fraîchement préparée est pulvérisée sur le chromatogramme. Ce dernier est séché puis chauffé à 100°C pendant 5 à 7 minutes. La plaque est évaluée dans le visible ou à la lumière UV à 365 nm. Le principe de la réaction est basé sur la formation par le SbCl, d'un complexe avec les doubles liaisons des composés d'intérêt.



Encore appelé réactif de Carr-Price, ce réactif permet la mise en évidence des composés tels que :

- Stéroïdes, sapogénines et saponosides (Ikan B. et al, 1964)
- Hétérosides (Horhammer L. et al 1964)
- Stérols (Mermet-Bouvier R., 1962)

- *Le réactif à l'anisaldéhyde : stéroïdes et sapogénines*

Ce réactif est préparé comme suit :

- mélanger 0,5 ml d'anisaldéhyde (4-méthoxybenzaldéhyde) avec 10 ml d'acide acétique glacial.
- ajouter 85 ml de méthanol puis mélanger
- Ajouter 5 ml d'acide sulfurique concentré

La solution ainsi obtenue est homogénéisée et gardée à 4°C pendant toute la durée d'utilisation. On pulvérise environ 10 ml de la solution sur le chromatogramme puis on chauffe à 100°C pendant 10 minutes. Le chromatogramme peut-être examiné à la lumière UV (365 nm).

Le mécanisme de la réaction de l'anisaldéhyde avec les stéroïdes n'est pas encore élucidé. Il a été rapporté que plusieurs réactions non quantitatives se produiraient simultanément. Ces réactions se produiraient au cours de la condensation d'un intermédiaire cyclopentenyl avec l'anisaldéhyde pour donner la coloration obtenue.

- *Le réactif de Meyer : Alcaloïdes*

La solution utilisée est celle du chlorure de mercure-iodure de potassium. Deux solutions sont préparées pour effectuer ce test.

- Solution 1 : dissoudre séparément 13,55 g de chlorure de mercure (II) et 49,8 g d'iodure de potassium dans 20 ml d'eau. Mélanger puis compléter à 1 L avec de l'eau distillée.
- Solution 2 : on prépare une solution d'acide chlorhydrique à 17%.

Les solutions à vaporiser sont :

- Solution de vaporisation I : mélange de dix volumes de la solution 1 et un volume de la solution 2
- Solution de vaporisation II : dissoudre 5 g de chlorure de zinc dans 80 ml d'eau, ajouter 15 ml d'acide chlorhydrique concentré à 37%.
- Solution de vaporisation III : on prépare une solution d'hydroxyde d'ammonium à 15%.

Le mode opératoire est le suivant : après vaporisation avec la solution I, les substances apparaissent sous forme de taches faiblement jaunes. Laver le chromatogramme pendant 10 minutes avec de l'eau ; après l'avoir égoutté, vaporiser les solutions II et III. Les colorations des taches en brun peuvent disparaître quelques temps après la révélation.

- *Le réactif de Dragendorff selon Munier* : composés azotés et alcaloïdes

Ce réactif est préparé comme suit :

- solution I : dissoudre 1,7 g de nitrate de bismuth et 20 g d'acide tartrique dans 80 ml d'eau.
- Solution II : dissoudre 16 g d'iodure de potassium dans 40 ml d'eau.
- Solution de réserve : mélanger des volumes égaux des solutions I et II. Cette solution est conservée au réfrigérateur.
- Solution de vaporisation : dissoudre 10 g d'acide tartrique dans 50 ml d'eau et additionner à la solution de réserve.

- *Le réactif de Liebermann Burchard*

Trois solvants sont utilisés dans la préparation du réactif et la réalisation de ce test. Il s'agit de l'éthanol, de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique. Pour réaliser ce test, on prépare une première solution composée d'un mélange à volume égal (5 ml) d'acide sulfurique et d'anhydride acétique. A cette solution, on rajoute 50 ml d'éthanol absolu. La préparation est effectuée à froid dans de la glace. Après pulvérisation, la plaque est chauffée à 100°C pendant une dizaine de minutes.

Ce test permet la mise en évidence des triterpènes de types oléanane, ursane, lupane ainsi que les stéroïdes. Selon le type de composé testé, on observe des taches de colorations diverses taches à la lumière UV à 365 nm :

- Coloration rouge pour les triterpènes de type oléanane et ursane
- Coloration jaune orangée pour les triterpènes de type lupane
- Coloration jaune /jaune-vert pour les stéroïdes.

5. LES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION STRUCTURALE

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, la spectroscopie de masse, la spectrométrie infrarouge, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone.

Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à la l'élucidation structurale. Les plus utilisées au cours de notre travail ont été :

5.1. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P , et l'azote ^{15}N .

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «le spin» (Boudonneu,1990; Canet., 1991).

La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine etc... Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques (Tableau 10). Le tube contenant l'échantillon est soumis au champs magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à la l'élucidation structurale.

Solvants	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)
Chloroforme- <i>d1</i>	7,27 (1)	77,0 (3)
Méthanol- <i>d4</i>	4,87 (1), 3,30 (5)	49,0 (7)
Pyridine- <i>d5</i>	8,71 (br), 7,55 (br), 7,19 (br)	149,9 (3), 135,5 (3), 123,5 (3)
DMSO- <i>d6</i>	2,49 (5)	39,5 (7)

Tableau 10: Déplacement chimique (en ppm) des solvants deutérés utilisés

Différentes techniques peuvent être utilisées :

- **RMN monodimensionnelle (RMN – 1D)**

- **RMN proton (¹H)**

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

- **RMN carbone (¹³C): DEPT 135° et Jmod**

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sur un spectre. Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH₃), secondaires (CH₂), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT 135° et le Jmod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le Jmod alors qu'ils ne le sont avec le DEPT.

- **RMN bidimensionnelles (RMN – 2D)**

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage (Gunther, 1994).

Corrélations homonucléaires

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

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

Corrélations hétéronucléaires

- **HSQC** ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$): cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.

- **HMBC** ($^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$): cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

5.2. La spectroscopie UV

Les techniques de spectroscopie UV visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales, et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins.

Dans notre étude, cette technique a été utilisée dans l'élucidation structurale des composés isolés par comparaison des spectres d'absorption avec des témoins disponibles au laboratoire.

5.3. La spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse. Celles utilisées au cours de mes travaux sont énumérées ci-dessous :

- l'électrospray ou l'ionisation par électronébulisation (ESI)
- l'ionisation par impact électronique (IE)
- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
- le Fast Atom Bombardment (FAB)

Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$. D'autres ions adduits peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient l'ion $[M+Na]^+$), ou de chlorure de potassium (on obtient l'ion $[M+K]^+$). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié.

Chapitre II

***MATERIEL ET METHODES DES
TESTS BIOLOGIQUES***

1. Culture *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

La condition de base dans la culture continue de *P. falciparum* est la stérilité. A cet effet, toutes les manipulations sont effectuées sous une hotte à flux laminaire vertical (HERAEUS) afin d'éviter la contamination des cultures par des germes exogènes qui pourraient envahir le milieu, inhiber ou perturber la croissance de *P. falciparum*.

Pour les tests biologiques, la souche de *P. falciparum* 3d7 a été utilisée. C'est une souche chloroquinosensible provenant du National Institute for Medical Research: division of Parasitology du Dr Jean Langhorne (Londres) et mise en culture continue. Les tests concernant la souche de *P. falciparum* K1 ont été effectués à l'Institut Tropical Suisse de Bâle.

Dans la culture cellulaire, le choix et la préparation des milieux de culture sont les paramètres les plus importants. Les milieux doivent être bien adaptés et la stérilité respectée.

- RPMI 1640 (GIBCO-BRL): c'est un milieu complexe, vitaminé, utilisé fréquemment pour la culture cellulaire. Il est composé de 10,5g de RPMI 1640 (GIBCO-BRL), 2,1g de NaHCO₃ à 25 mM (GIBCO-BRL), de 5,95g d'Hepès à 25mM (GIBCO-BRL), de 2g de glucose (Sigma), de gentamicine à 50-200µg/ml et d'une quantité suffisante d'eau distillée pour 1 litre.

- Albumax (sérum albumine bovine; GIBCO-BRL): il est utilisé en remplacement du sérum humain et est préparé à 5% dans de l'eau distillée. Ces deux milieux sont filtrés sur filtre millipore 0,22 µm (STERIVEX GS).

Les boîtes de cultures sont placées dans une cloche contenant une bougie et incubées dans une étuve bactériologique (Heraeus) maintenue à 37°C. Toutes les 24 heures, la croissance des parasites est évaluée en effectuant des frottis. La coloration des frottis se fait au Diff-Quick stain, au RAL ou au Giemsa puis les lames sont observées au microscope optique (Olympus BH-2) avec un objectif à immersion x100.

2. Evaluation de l'activité antipaludique

2.1. Souche chloroquinosensible 3D7

Le test utilisé est une adaptation du semi microtest microscopique précédemment décrit en 1978 par Rieckmann et al (1978) et adopté par l'OMS pour la surveillance épidémiologique de l'émergence de la résistance des parasites (*P. falciparum*) aux médicaments antipaludiques. Dans cette technique, seuls les parasites jeunes (trophozoite en anneau) sont utilisés. La culture continue *in vitro* de la souche 3D7 était maintenue suivant une version légèrement modifiée de la méthode de Trager and Jensen (1976). Les tests sont effectués en triple avec une gamme de concentration allant de 128 à 1µg/ml avec des dilutions successives de moitié. Pour réaliser ce test, le sang parasité et synchronisé est incubé à 37 °C en présence de la gamme de concentration d'extraits pendant 24 h. Les lames (frottis) correspondantes à chaque dilution sont réalisées, colorées au Giemsa et lues au microscope optique. Le nombre de schizontes dans chaque puits est compté. Le pourcentage d'inhibition qui exprime l'action des extraits sur la croissance des parasites est déterminé.

Protocole expérimental

Le test est effectué lorsque les cultures atteignent une parasitémie de 2% avec une prédominance de trophozoite jeunes et se déroule en quatre étapes:

- **Synchronisation de la culture au sorbitol**

Afin de partir exclusivement des globules infectés par des formes jeunes du parasite, il est recommandé de faire une synchronisation au sorbitol (Uhlemann et al, 2000). L'obtention exclusive de trophozoïtes jeunes résulte de la différence de résistance membranaire des érythrocytes infectés par les formes jeunes et ceux infectés par les formes âgées (schizontes), sous la pression du sorbitol à 5%.

- **Réalisation de la gamme de concentration**

La gamme de concentration est réalisée à partir d'une solution mère d'extrait de concentration 200 µg/ml. Cette solution est préparée comme suit: l'extrait est dissous dans un premier temps dans du DMSO. La solution obtenue permettra de préparer la solution mère avec du RPMI comme solution de travail. Dans la gamme de concentration la solution mère est notée S3.

Préparation de la gamme de concentration

C8: 128µg/ml	(160µl de S3 + 69µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C7: 64µg/ml	(80µl de S3 + 149µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C6: 32 µg/ml	(40µl de S3 + 189µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C5: 16µg/ml	(20µl de S3 + 209µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C4: 8µg/ml	(10 µl de S3 + 219µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C3: 4µg/ml	(5 µl de S3 + 224µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C2: 2µg/ml	(2,5 µl de S3 + 226,5µl de RPMI + 21µl de sang parasité)
C1: 1µg/ml	(1,25µl de S3 + 227,75µl de RPMI+ 21µl de sang parasité)

- **Incubation**

Les plaques de tests (plaques à 96 puits) sont incubées à 37°C dans une cloche contenant une bougie pendant 24 à 36 heures. Après 24 heures, un frottis de culture témoin est réalisé pour évaluer la maturation des parasites. Si les parasites ne sont pas matures, l'incubation est poursuivie jusqu'à 36 heures. Au-delà de 36 heures d'incubation, le test n'est plus valable.

- **Interprétation du test**

Les CI₅₀ (concentration d'extrait qui inhibe de 50% la croissance des parasites) et les coefficients de corrélation (R²) correspondants sont déterminés graphiquement, en utilisant la droite de régression représentant le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme décimal de la concentration de l'extrait testé.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\% \text{ schizontes dans le puits testés}}{\% \text{ schizontes dans le puits témoin}}$$

2.2. Souche multirésistante K1

L'évaluation quantitative de l'activité antipaludique *in vitro* sur la souche résistante K1 (multi-drug pyrimethamine/chloroquine resistant strain; Thaithong and Beale, 1981) est déterminée au moyen de la technique radio-isotopique basée sur la méthode précédemment décrite par Desjardins et al. (1979) et modifiée by Ridley et al. (1996).

Le test consiste à utiliser comme indicateur de viabilité des parasites, l'absorption de l' $[^3\text{H}]$ hypoxanthine. Les parasites sont maintenus en culture continue selon la méthode décrite préalablement par Trager and Jensen (1976). La concentration initiale de chaque extrait végétal ou composé pur est de 30 $\mu\text{g/ml}$. Sept (7) concentrations, dont la plus basse est de 0.47 $\mu\text{g/ml}$, sont obtenues en réalisant des dilutions successives de moitié. Après 48h d'incubation à 37 °C des parasites dans les extraits ou les composés purs, l' $[^3\text{H}]$ hypoxanthine (Amersham Int. Buckinghamshire, UK) est additionné à chaque puit et l'incubation est poursuivie pendant 24 heures à la même température. L' IC_{50} est calculé par interpolation linéaire entre les concentrations inférieures et supérieures à 50% (Huber and Koella, 1993). La chloroquine et l'artémisinine sont utilisées comme références positives.

Notons que lorsque la concentration inhibitrice (IC_{50}) est inférieure ou très proche de la dernière concentration, le test est repris avec des concentrations plus adaptées. Dans ce cas, la concentration finale est inférieure à 0,47 $\mu\text{g/ml}$ et 1 $\mu\text{g/ml}$.

Chapitre I

***ETUDE CHIMIQUE DE
CROTON LOBATUS***

1. LE MATERIEL VEGETAL

1.1. Récolte et séchage

Des récoltes complémentaires de parties aériennes et de racines de *Croton lobatus* ont été réalisées entre le mois de décembre 2001 et janvier 2002 dans leur habitat naturel situé dans la région du Zou (Centre Bénin). Elles ont été ensuite séchées au laboratoire à l'abri de la lumière du soleil. Un exemplaire d'herbier a été déposé à l'Herbier Nationale de l'Université d'Abomey-calavi au Bénin. Le séchage du matériel végétal est effectué durant 4 semaines à une température comprise entre 15 et 20°C. Le matériel végétal séché est réduit en poudre à l'aide d'un broyeur. La poudre est ensuite soumise à une extraction.

1.2. Extraction

Nous avons utilisé pour cette étude, une méthode d'extraction solide liquide. 515,35 g de poudre sèche de parties aériennes de *Croton lobatus* ont été extraits au Soxhlet successivement au cyclohexane, dichlorométhane et au méthanol. Les extraits bruts obtenus sont concentrés sous pression réduite et les rendements sont calculés. L'extrait méthanolique brut des parties aériennes a été soumis ensuite à des partitions liquide-liquide successives en présence de cyclohexane, de chloroforme et d'acétate d'éthyle (voir schéma 4).

Cette opération a permis de débarrasser l'extrait méthanolique de la chlorophylle, des cires, des pigments et des graisses résiduelles. Après séchage sous pression réduite, 2,73 g d'extrait acétate d'éthyle (AcOEt) sont obtenus.

Le schéma ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention de la fraction AcOEt.

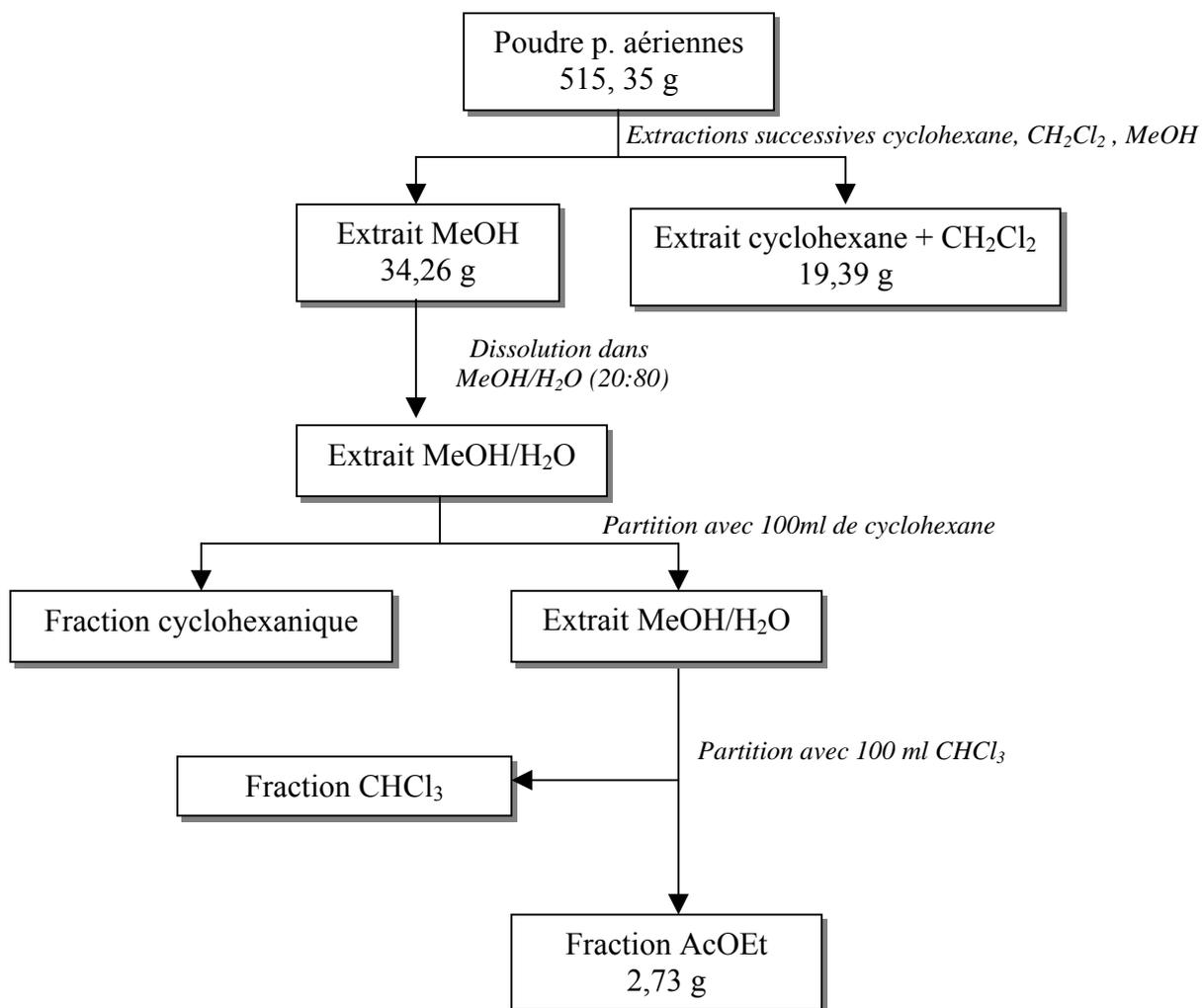


Schéma 4 : Différentes étapes de l'extraction des parties aériennes de *C. lobatus*

Matériel végétal	Extrait	Masse	Rendement
515,35 g (p.a.)	Extrait Cycl. + CH ₂ Cl ₂	19,39 g	3,76%
	Extrait MeOH	34,26 g	6,65%
	Extrait AcOEt	2,73 g	13,65%

Tableau 11 : Rendements des extractions

2. Fractionnement et isolement des composés de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait AcOEt est soumis à des fractionnements successifs par différentes méthodes chromatographiques conduisant à l'isolement des molécules pures. Dans cette première étape, nous avons soumis cet extrait à une chromatographie d'exclusion/adsorption sur colonne de Sephadex LH20. Deux fractions **A** et **B** ont été obtenues. Les conditions chromatographiques de la partition sont présentées ci-dessous :

Conditions Chromatographiques

- **Chromatographie d'exclusion sur colonne de séphadex LH20**

Adsorbent:	Sephadex LH20, 25 – 100 µm (Merck)
Hauteur adsorbent:	350mm
Diamètre de la colonne:	35mm
Eluent:	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (20:80)
Lavage de la colonne:	MeOH (100%)
Récupération de la colonne:	Acétone/Eau (1:1) v/v
Volume des fractions:	50ml
Nombres de fractions:	13 fractions

- **Chromatographie sur couche mince**

Support chromatographique:	plaque de gel de silice 60 F ₂₅₄ (Merck)
Phases mobile:	Acétate d'éthyle/Méthanol/Eau (100:17:13) v/v
Révélation:	Vanilline sulfurique (VS) + chauffage (105°C) UV (254nm, 365nm)

Les différentes fractions recueillies par volumes de 50 ml sont regroupées selon leur profil chromatographique en deux grandes fractions A et B :

- Les fractions (1-6) : fraction **A** : 855 mg
- Les fractions (7-13) : fraction **B** : 962 mg

2.1. Fractionnement de la fraction A

C'est une fraction polaire soluble dans le méthanol. Afin de rechercher les conditions optimales de séparation des constituants de cette fraction par HPLC préparative, nous avons réalisé un profil chromatographique sur HPLC analytique. Certaines sous-fractions recueillies sont purifiées sur CCM préparative et/ou sur colonne de séphadex LH-20. Les conditions chromatographiques de ce fractionnement sont présentées ci-dessous:

Conditions chromatographiques

- **HPLC analytique**

Pompe:	VARIAN 9010
Injecteur:	VARIAN 9100
Détecteur monochrome:	VARIAN 9065
Colonne:	Symmetry C ₁₈ , 5µm, 4,6 x 250mm
Débit:	1ml/mn
Volume d'injection:	30µl
Longueur d'onde:	254 nm
Concentration de l'échantillon:	5–30 µg/ml

Méthode d'élution

Tps (mn)	%AH ₂ O (HCOOH; 0,7%)	%B (CH ₃ CN)
00	00	100
05	95	05
35	00	100
45	00	100

- **HPLC Préparative**

Pompe programmable: Gilson (306-305)
 Module Manométrique: Gilson (806)
 Mélangeur Dynamique: Gilson (811B)
 Détecteur: Gilson (L200E)
 Pré Colonne: VP 50/21, Nucléodur 100-10 C₁₈ ec (Machery-Nagel)
 Colonne: VP 250/21, Nucléodur 100-10 C₁₈ ec (Machery-Nagel)
 Débit: 10ml/mn
 Volume d'injection: 250 – 500µl
 Longueur d'onde: 254nm
 Sensibilité: 0.2 ; 0.5 ; 1
 Concentration échantillon: 15-40mg/ml

Méthode d'élution

Tps (mn)	%A H₂O (HCOOH, 0,7%)	%B (CH₃CN)
00	00	100
10	00	100
20	95	00
60	20	80
65	00	100

- **Chromatographie sur Couche Mince préparative**

Support Chromatographie: Plaque en verre de Gel de silice 60F₂₅₄, (Merck)
 Epaisseur de la couche de SiO₂ : 0,5 mm
 Phase mobile: AcOEt / MeOH / H₂O (100 :17 :13) v/v
 Révélateur: UV 254/365 nm
 Solvants de récupération : CH₂Cl₂ / MeOH (80:20)

Après la mise au point des différentes méthodes de séparation, la fraction A est soumise à une chromatographie sur HPLC préparative, permettant d'obtenir, d'une part, le composé pur **CL1**, et, d'autre part, la sous-fraction **A₂**. Après purification par chromatographie sur couche mince préparative, on obtient le composé **CL4**. Le protocole d'isolement est résumé sur le schéma ci-dessous :

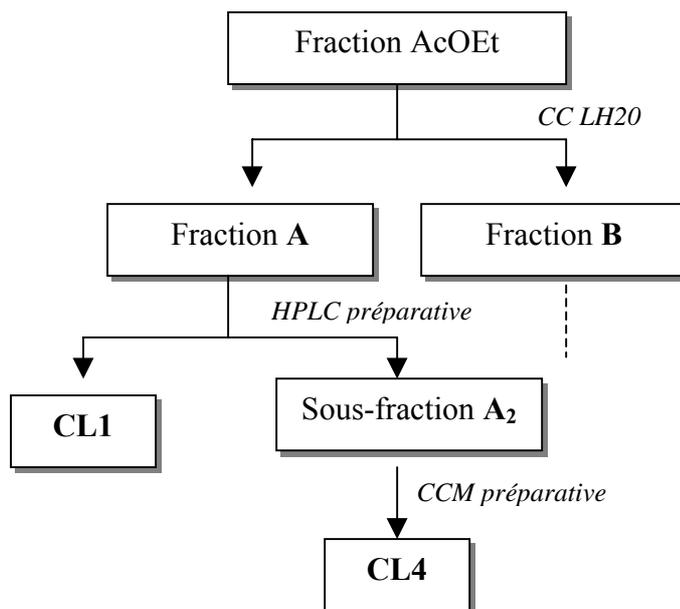


Schéma 5: Isolement des composés **CL1** et **CL4**

2.2. Fractionnement de la fraction B

Nous avons utilisé pour le fractionnement de cet extrait, presque les mêmes techniques que celle utilisées pour l'extrait A. Ce dernier est soumis à une séparation par flash chromatographie sur colonne de silice. 72 fractions de 50 ml chacune sont recueillies. Les conditions opératoires sont présentées ci-dessous :

Conditions chromatographiques

- **Flash chromatographie sur colonne en phase inverse C₁₈ (Système BIOTAGE)**

Colonne :	Flash 40 + M, KP-Sil, 40 x 150 mm
Débit :	35-40 ml/min
Eluant:	Gradient H ₂ O/MeOH
Volume des fractions :	50 ml
Conditionnement de la colonne :	1. 300 ml de MeOH (3Vo) 2. 300 ml de MeOH / H ₂ O (3Vo) 3. 300 ml de MeOH / H ₂ O (3Vo)

Fractions		1-6	7-12	13-24	25-30	31-36	37-50	51-72
Eluants (%)	H ₂ O	90	80	70	60	50	20	0
	MeOH	10	20	30	40	50	80	100
Vol (ml)		300	300	600	300	300	700	30

Tableau 12 : fractionnement de **B**

Le contrôle des sous-fractions éluées est effectué par CCM sur plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ dans le solvant utilisé précédemment (AcOEt/MeOH/H₂O; 100:17:13), avec la vanilline sulfurique comme réactif de révélation, a permis de les regrouper en trois sous-fractions principales B₁, B₂ et B₃ :

- la sous-fraction B₁ (5-18) : 71mg
- la sous-fraction B₂ (19-38) : 152 mg
- la sous-fraction B₃ (39-60) : 280 mg

Les sous-fractions B₁ et B₂ sont ensuite fractionnées en utilisant les différentes méthodes utilisées précédemment.

2.2.1. Fractionnement de B₁

Le fractionnement de B₁ sur HPLC préparative a permis d'obtenir deux sous-fractions nommées Sfb1 et Sfb2. La sous-fraction Sfb1, soumise à une chromatographie sur séphadex LH-20 a permis d'isoler à nouveau le composé **CL4**.

Quant à la sous- fraction Sfb2, elle est soumise à une CCM préparative pour donner le composé **CL5**. Les méthodes et conditions opératoires sont présentées ci-dessous :

Conditions chromatographiques

- **HPLC analytique** (recherche des conditions opératoires optimales)

Pompe:	VARIAN 9010
Injecteur:	VARIAN 9100
Détecteur à barrettes d'iodes:	VARIAN Pro star 330
Colonne:	Symmetry C ₁₈ , 5μm, 4,6x250mm
Débit:	1ml/min
Volume d'injection:	30μl
Longueur d'onde:	254nm
Concentration de l'échantillon:	1 mg/ml

Méthode d'élution

Tps (mn)	%AH ₂ O	%B (CH ₃ CN)
00	00	100
10	99	01
35	20	80
45	00	100

- **HPLC Préparative**

Pompe programmable: Gilson (306-305)
 Module Manométrique: Gilson (806)
 Mélangeur Dynamique: Gilson (811B)
 Détecteur: Gilson (L200E)
 Pré Colonne: VP 50/21, Nucléodur 100-10 C₁₈ ec (Machery-Nagel)
 Colonne: VP 250/21, Nucléodur 100-10 C₁₈ ec (Machery-Nagel)
 Débit: 10ml/mn
 Volume d'injection: 250 – 500µl
 Longueur d'onde: 254nm
 Sensibilité: 0.2 ; 0.5 ; 1
 Concentration de l'échantillon: 5-40mg/ml

Méthode d'élution

Tps (mn)	%A H₂O (HCOOH, 0,7%)	%B (CH₃CN)
00	00	100
10	00	100
20	100	00
60	20	80
65	00	100

- **Partition sur Colonne de Sephadex LH20**

Adsorbent: Sephadex LH20, 25 – 100 µm (Fluka)
 Hauteur adsorbent: 180 mm
 Diamètre de la colonne: 18 mm
 Eluent: CH₂Cl₂/MeOH (20:80)
 Lavage de la colonne: MeOH (100%)
 Récupération de la colonne: Acétone/Eau (1:1) v/v
 Volume des fractions: 3-5 ml

- **Chromatographie sur Couche Mince préparative**

Support Chromatographique:	Plaque en verre de Gel de silice 60F ₂₅₄ , 20 X 20 cm (Merck), épaisseur couche 0,5 mm
Phase mobile:	EtOAc / MeOH / H ₂ O (100 :17 :13)
Détection:	UV 254/365 nm, Vanilline + chauffage (105°C)
Solvants de récupération :	CH ₂ Cl ₂ / MeOH (80:20)

2.2.2. Fractionnement de B₂

La chromatographie sur couche mince de cette fraction a montré deux taches majoritaires. La purification des deux composés a été effectuée par chromatographie sur couche mince préparative qui a permis d'obtenir deux sous-fractions. La première correspondant au composé **CLI₁**. La deuxième sous-fraction est repurifiée par séphadex LH-20 pour donner le composé **CLI₂**. Les conditions de séparation sont résumées ci-dessous :

Conditions chromatographiques

- **Chromatographie sur Couche Mince préparative**

Support Chromatographique:	Plaque en verre de Gel de silice 60F ₂₅₄ , 20 X 20 cm (Merck), épaisseur couche 0,5 mm
Phase mobile:	CHCl ₃ / MeOH / H ₂ O (14 :6 :1) v/v
Révélateur:	UV 254/365 nm, Vanilline + chauffage (105°C)
Solvants de récupération :	CH ₂ Cl ₂ / MeOH (80:20) MeOH (100%)

- **Chromatographie d'adsorption sur Colonne de Sephadex LH20**

Adsorbent:	Sephadex LH20, 25 – 100 µm (Fluka)
Hauteur adsorbent:	180mm
Diamètre de la colonne:	18mm

Eluent: CH₂Cl₂/MeOH (20:80)
 Lavage de la colonne: MeOH (100%)
 Récupération de la colonne: Acétone/Eau (1:1) v/v
 Volume des fractions: 3-5 ml

Deux composés, **CLI₁** et **CLI₂**, ont été isolés de la sous-fraction B₂. Les différentes étapes de l'isolement sont résumées sur le schéma ci-dessous :

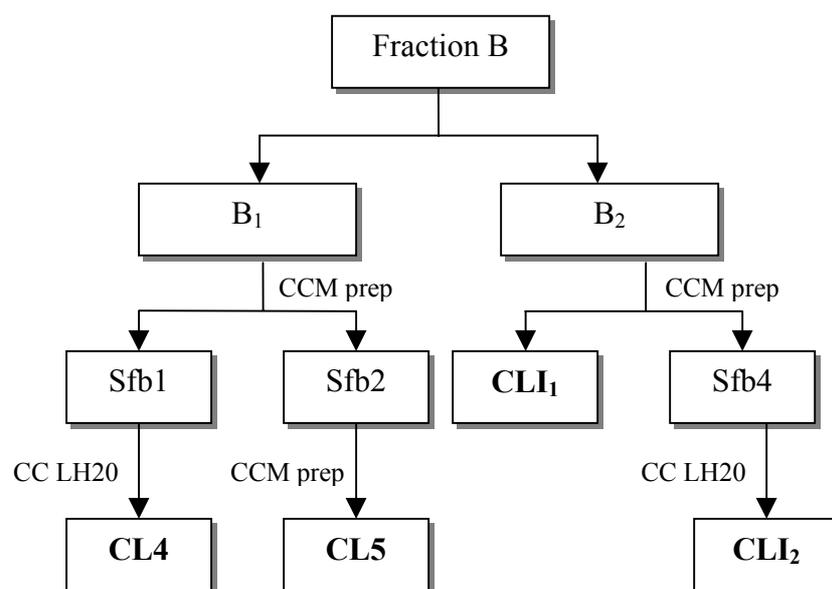


Schéma 6 : Fractionnement et isolement des métabolites de la fraction B

En conclusion, quatre composés ont été isolés. Les rendements sont indiqués dans le tableau ci-dessous. Ces rendements sont calculés par rapport à la quantité de fraction acétate d'éthyle (2,73 g).

		Solubilité	Masse	Rendements
Composés	CL1	MeOH	20,7 mg	0,76%
	CL4	MeOH	10,4 mg	0,38%
	CL5	MeOH	7,8 mg	0,28%
	CLI₁	MeOH	4,15 mg	0,30%
	CLI₂	MeOH	5,6 mg	0,15%

Tableau 13 : Rendement des composés isolés de l'extrait B

2.2.3. CONCLUSION

Les extractions et fractionnement réalisés sur la poudre sèche des feuilles et tiges de *Croton lobatus* ont donné deux fractions A et B. L'isolement des constituants des deux fractions par différentes méthodes chromatographiques a permis l'isolement de 5 composés. Le schéma ci-dessous présente une synthèse des différentes étapes de l'isolement des 5 composés.

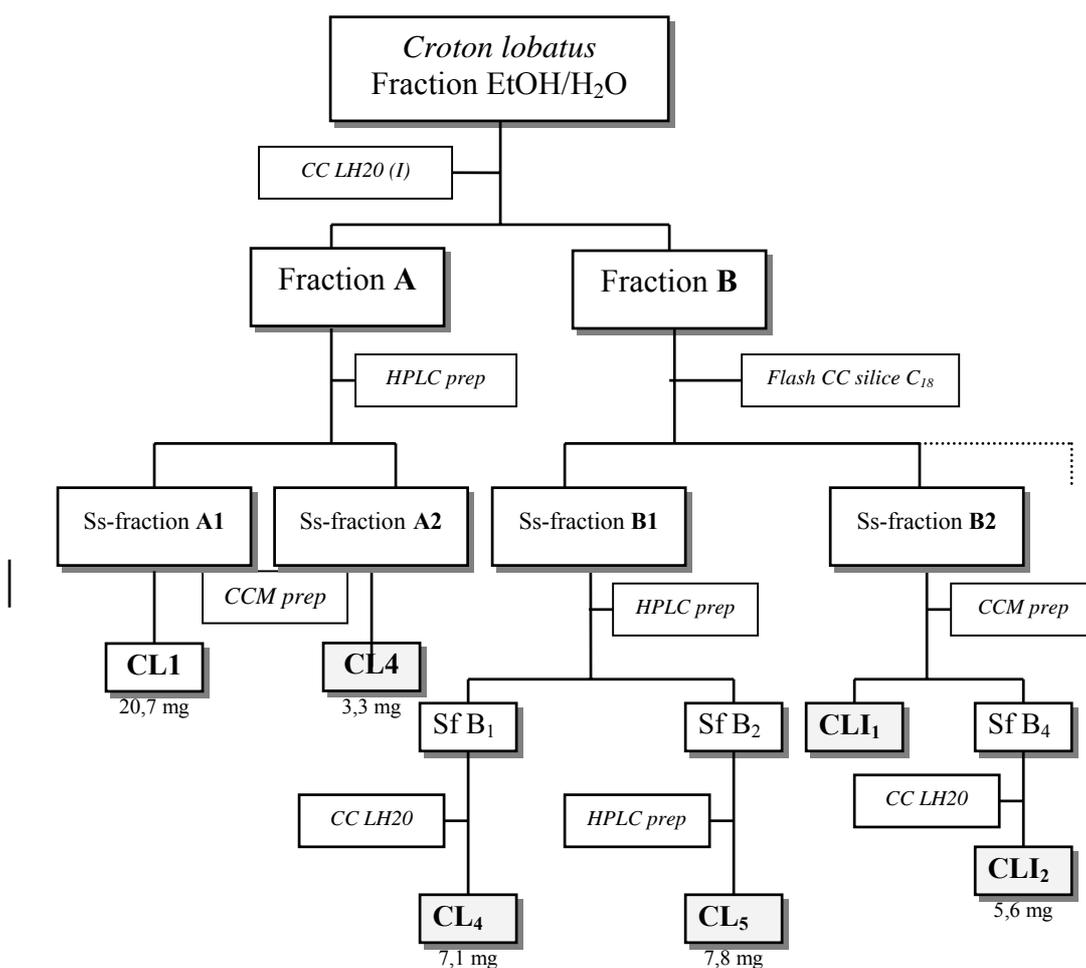


Schéma 7 : Protocole de fractionnement et d'isolement des constituants majoritaires des parties aériennes de *Croton lobatus*

CC LH20: Perméation sur colonne de Sephadex LH20

CCM prep: Chromatographie sur couche mince préparative

HPLC prep: Chromatographie Liquide Haute Performance

3. Caractérisation chimique des composés isolés

Les tests de caractérisation chimique permettent de déterminer à quelle famille chimique appartiennent les composés isolés, facilitant ainsi la détermination future de leurs structures. Les tests effectués sont choisis en fonction de certains critères dont :

- le type d'extrait qui a permis l'isolement des composés
- l'aspect physique des composés isolés (couleur)
- les données bibliographiques de nature chimique obtenues sur la famille botanique
- les données bibliographiques obtenus sur le genre *Croton*.

Divers groupes de substances telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponines et les terpènes sont retrouvées dans la famille des *Euphorbiaceae*.

Quatre tests caractéristiques des phénols et des flavonoïdes ont été réalisés sur chacun des composés isolés. Ces tests ont permis de préciser leurs groupes chimiques respectifs. Les résultats sont consignés dans le tableau 14.

Tests Composés	FBS B (phénol)	Réact. de Millon (phénol)	NP/PEG (Flavonoïdes)	AlCl ₃ (Flavonoïdes)
CL1	+	+	+	+
CL4	+	+	+	+
CL5	+	+	+	+
CLI1	+	+	-	-
CLI2	+	+	-	-

FBS B : Fast Blue Salt B
AlCl₃ : Chlorure d'aluminium

NP/PEG : Natural Product/Polyéthylène Glycol

Tableau 14 : Résultats des tests préliminaires de caractérisation chimique

Au vu de ces résultats, nous déduisons que les composés **CL1**, **CL4**, **CL5** sont des flavonoïdes alors que les composés **CLI1** et **CLI2** sont des composés phénoliques ou possèdent des groupements phénols dans leur structure.

4. Elucidation structurale des composés isolés

4.1. Elucidation structurale des composés CL1, CL4 et CL5

4.1.1. Spectres UV des composés

Les spectres UV des composés isolés ont été déterminés par un système HPLC possédant un détecteur muni d'une barrette de diodes. Les conditions instrumentales sont identiques à celles utilisées dans l'isolement des composés concernés. Le paragraphe ci-dessous présente ces conditions :

Conditions opératoires

- HPLC analytique

Pompe:	VARIAN 9010
Injecteur:	VARIAN 9100
Détecteur à barrettes de diodes:	VARIAN Pro star 330
Colonne:	Symmetry C ₁₈ , 5µm, 4,6 x 250 mm
Débit:	1ml/min
Volume d'injection:	20µl
Longueur d'onde:	254 nm
Concentration de l'échantillon :	0,5 – 0,25 mg/ml

Méthode d'élution:

T (mn)	A (H ₂ O ; 0,7 HCOOH)	B (ACN)
0	0%	100%
10	90%	5%
35	20%	80%
45	0%	100%

Les chromatogrammes et spectres UV correspondants aux composés **CL1**, **CL4** et **CL5** sont présentés ci-dessous :

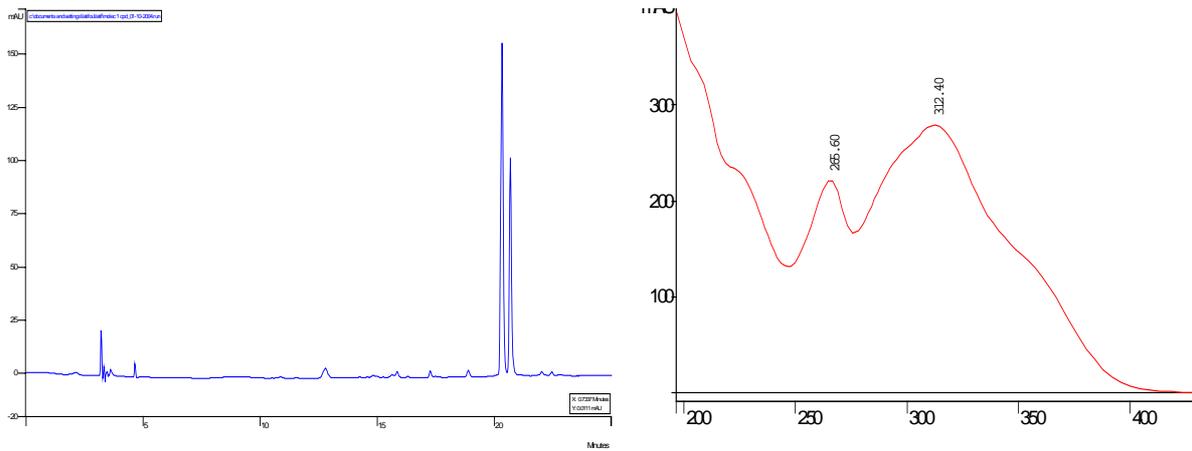


Figure 16 : Chromatogramme et spectre UV du composé CL1

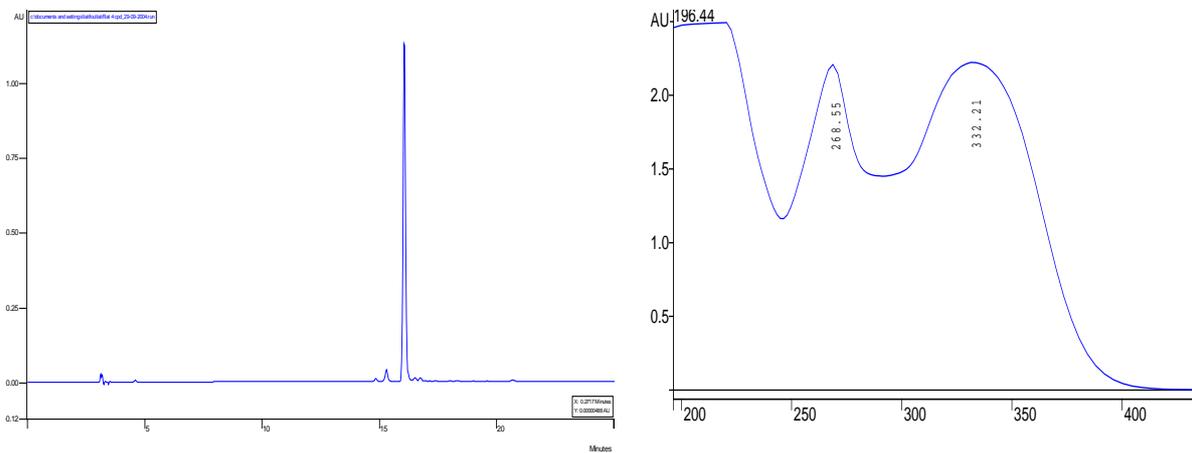


Figure 17 : Chromatogramme et spectre UV du composé CL5

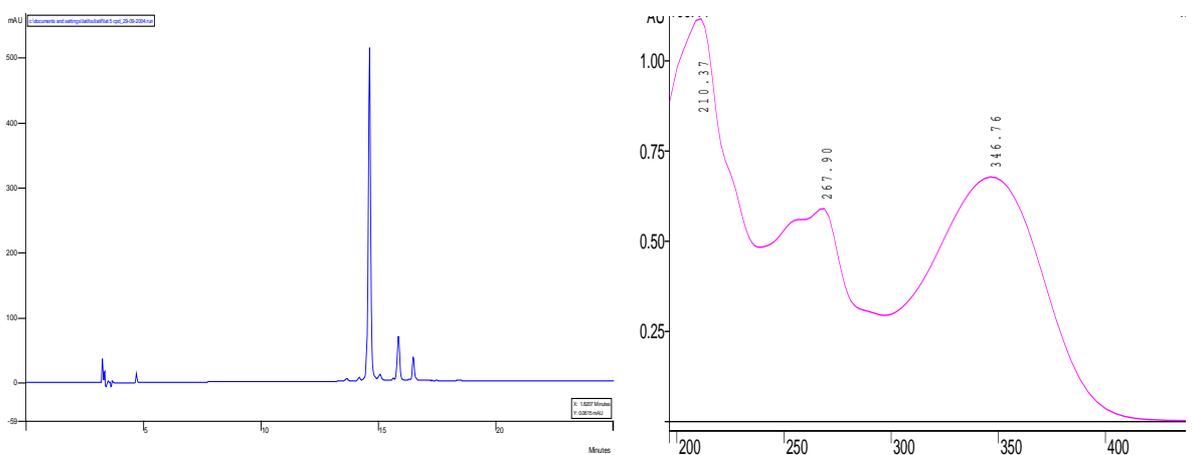


Figure 18: Chromatogramme et spectre UV du composé CL4

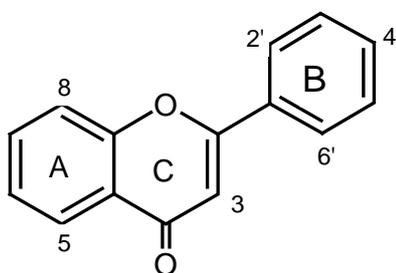
Les spectres UV des flavonoïdes sont caractérisés par la présence de deux pics d'absorption maximale. La première dans la gamme 240-285 nm (bande II, principalement due à l'absorption du cycle A), et la deuxième dans la gamme 300-550 nm (bande I, due à l'absorption du cycle B). La position précise et les intensités relatives de ces absorptions maximales fournissent des informations intéressantes concernant la nature du flavonoïde et des positions hydroxylées dans la structure. Les absorptions obtenues sont présentées dans le tableau 15 ci-dessous :

Composés	λ_2 (nm)	λ_1 (nm)	Tr (min)
CL1	266,60	312,40	20,29
CL4	268,55	332,21	16,027
CL5	267,90	346,76	14,58

Tableau 15 : Absorption UV des composés CL1, CL4 et CL5

Au vu de ces résultats, nous déduisons que les trois composés, CL1, CL4 et CL5 sont des flavonoïdes.

L'interprétation des spectres RMN protons et carbone des trois composés permettra de déterminer la structure définitive de chacun de ces composés. L'interprétation des spectres RMN d'un flavonoïde passe par l'analyse des protons aromatiques des cycles A et B, et des protons H-2 et H-3 du cycle C.



Les protons du cycle B correspondent aux protons H-2', H-3', H-5' et H-6'. Ils apparaissent généralement dans les zones comprises entre 6,7 et 7,9 ppm (Mabry et al., 1970). Dans le cas des flavonoïdes oxygénés en position H-4' du cycle B, on observe quatre pics qui correspondent à deux doublets avec des constantes de couplage d'environ 8,5 Hz. Le doublet correspondant aux protons H-3' et H-5' est décalé vers les déplacements les plus faibles (déplacé vers la droite) alors que le doublet correspondant aux protons H-2' et H-6' se retrouve généralement dans la zone comprise entre 6,65 et 7,1 ppm. L'apparition du doublet correspondant à H-2' et H-6' dépend du degré d'oxydation du cycle C.

4.1.2. IDENTIFICATION DU COMPOSE CL1

a- Propriétés physico-chimiques

- Poudre jaune
- Rf dans le système Acétate d'éthyle / méthanol / eau (14 : 6 : 1) : 0,85
- Révélation en CCM : vanilline sulfurique + chauffage (105°C)

b- RMN ¹H de CL1 (300 MHz; MeOH-d4)

(Voir figure 19)

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux, les constantes de couplages et les corrélations ²⁻³J sont présentés dans le tableau 16.

H	δH (ppm)	signal	J (Hz)	$^1H^{13}C$ (^2-3J) HMBC
H-6	6,12	d	1,86	C-5, C-7, C-8, C-10
H-8	6,21	d	1,86	C-7, C-6, C-9, C-10
H-2'	7,98	d	8,73	C-2, C-1', C-3', C-4', C-6'
H-3'	6,80	d	8,73	C-1', C-2', C-4', C-5'
H-5'	6,80	d	8,73	C-1', C-3', C-4', C-6'
H-6'	7,98	d	8,73	C-2, C-1', C-2', C-4', C-5'
H-1''	5,23	---	7,5	C-3, C-2'', C-3'', C-5''
H-2''	4,18	m	---	C-3'', C-4''
H-3''	4,18	m	---	C-2'', C-3'', C-5''
H-4''	4,18	m	---	C-2'', C-3'', C-5'', C-6''
H-5''	3,45	m	---	C-3'', C-4'', C-6''
H-6''	4,29	dd	10-11,85	C-4'', C-5''
H- α	6,06	d	15,9	C-1''', C-3''', C-4''', C-5'''
H- β	7,39	d	15,9	C-1''', C-2''', C-4''', C-5'''
H-5'''	7,30	d	8,43	C-3''', C-4''', C-6''', C-7'''; C-9'''
H-6'''	6,78	d	8,73	C-4''', C-5''', C-7'''; C-8'''
H-8'''	6,78	d	8,73	C-4''', C-9''', C-7''', C-6'''
H-9'''	7,30	d	8,43	C-3''', C-4'''; C-5''', C-8''', C-7'''

Tableau 16 : Données RMN 1H et corrélations 2J et 3J (HMBC)

c- RMN ^{13}C de CL1 (300 MHz ; MeOH-d₄)

(Voir Figure 20)

Les déplacements chimiques en RMN ^{13}C et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau 17

Carbones	δ (ppm)	Carbones	δ (ppm)
2	158,4	1''	103,9
3	135,2	2''	75,8
4	179,4	3''	77,9
5	162,9	4''	71,7
6	99,9	5''	75,7
7	165,9	6''	64,3
8	94,8		
9	161,5	1'''	168,8
10	105,6	α	114,7
		β	146,5
1'	122,7	4'''	127,1
2'	132,2	5'''	131,2
3'	116,8	6'''	116,02
4'	161,2	7'''	159,3
5'	116,8	8'''	116,02
6'	132,2	9'''	131,2

Tableau 17: Données RMN ^{13}C de CL1

d- Spectre de masse de CL1

Le spectre de masse réalisé en électroSpray Ionization (ESI) indique un pic moléculaire m/z à 595,1473 correspondant à la masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ (figure 21) et à un poids moléculaire de 594. Ce qui est compatible avec le tiliroside de formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$. Les signaux obtenus à 617,1288, et 633,1024 correspondent respectivement aux adduits $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[\text{M}+\text{K}]^+$ (figure 22). Ce spectre donne également deux autres adduits correspondant à $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[2\text{M}+\text{K}]^+$ (figure 23).

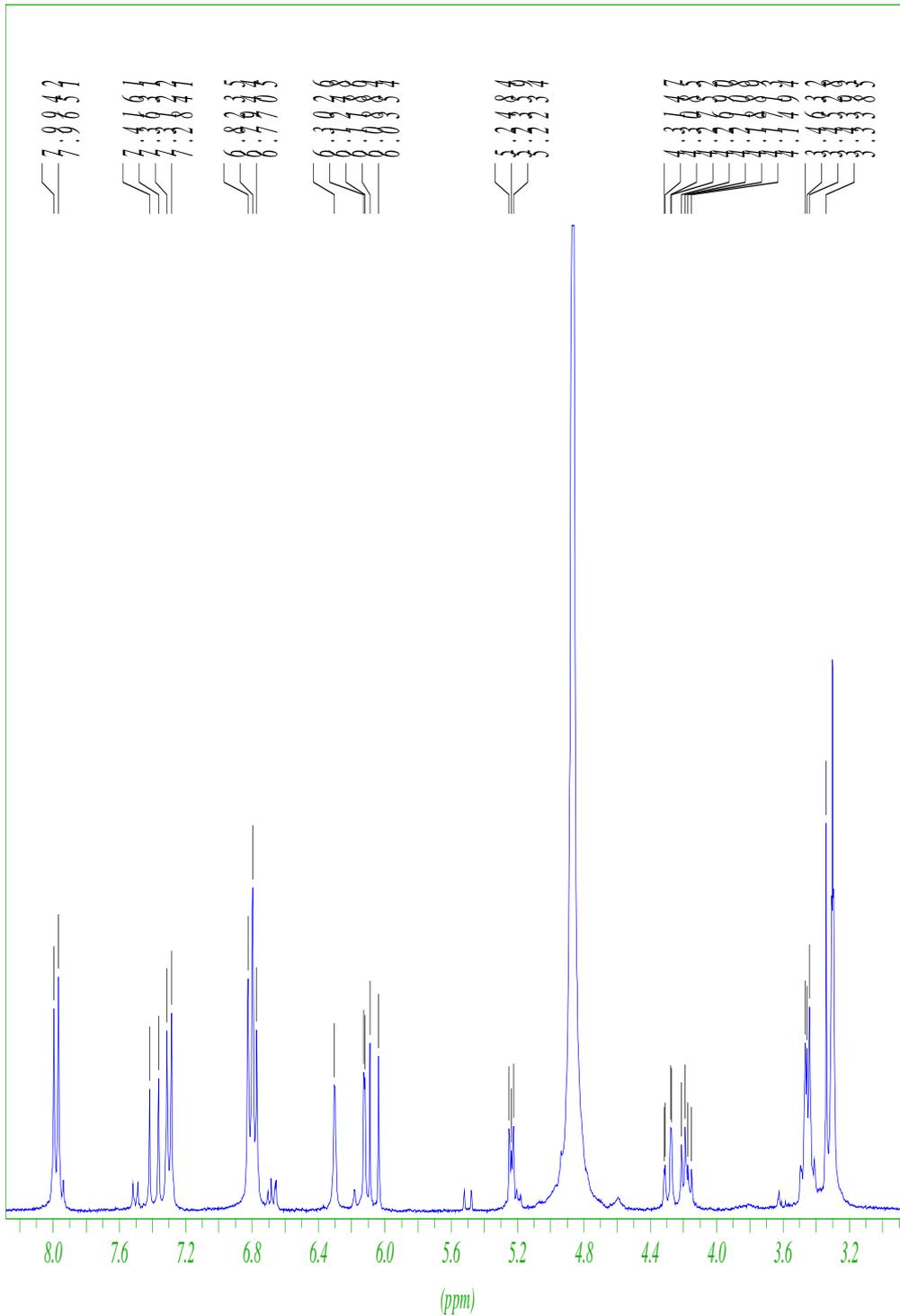


Figure 19 : Spectre RMN ^1H (300MHz) de **CL1** dans le MeOH-d4

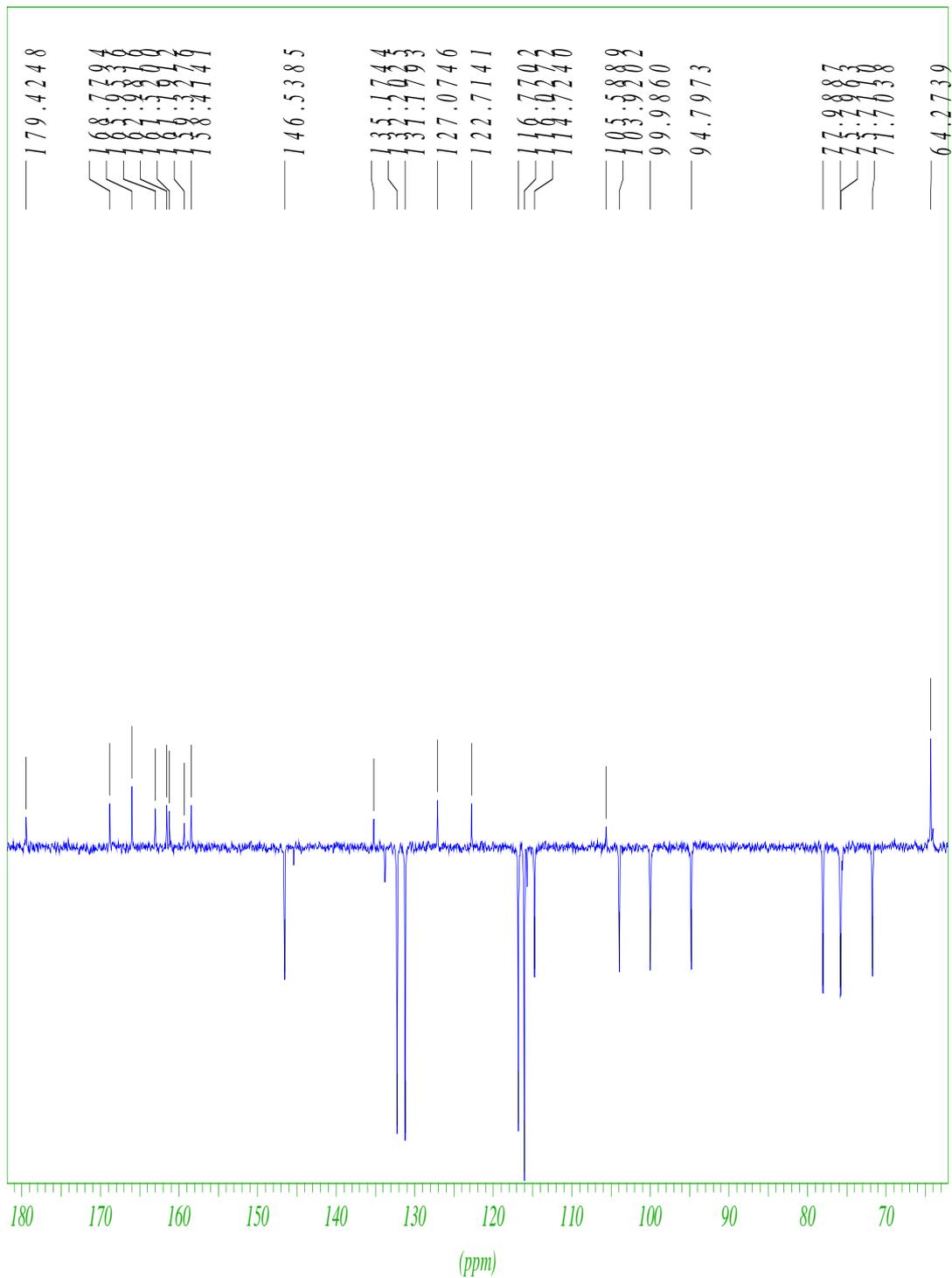


Figure 20: Spectre RMN ^{13}C (300MHz) de CL1 dans le MeOH- d_4

Analysis Info
 Analysis Name: pww0597000001.d
 Sample Name: TIL
 Comment:
 Acquisition Date: 09/19/2005 06:25:01 PM
 Method: pww0597000001.d
 Administrator: michroTOF
 Operator: Instrument

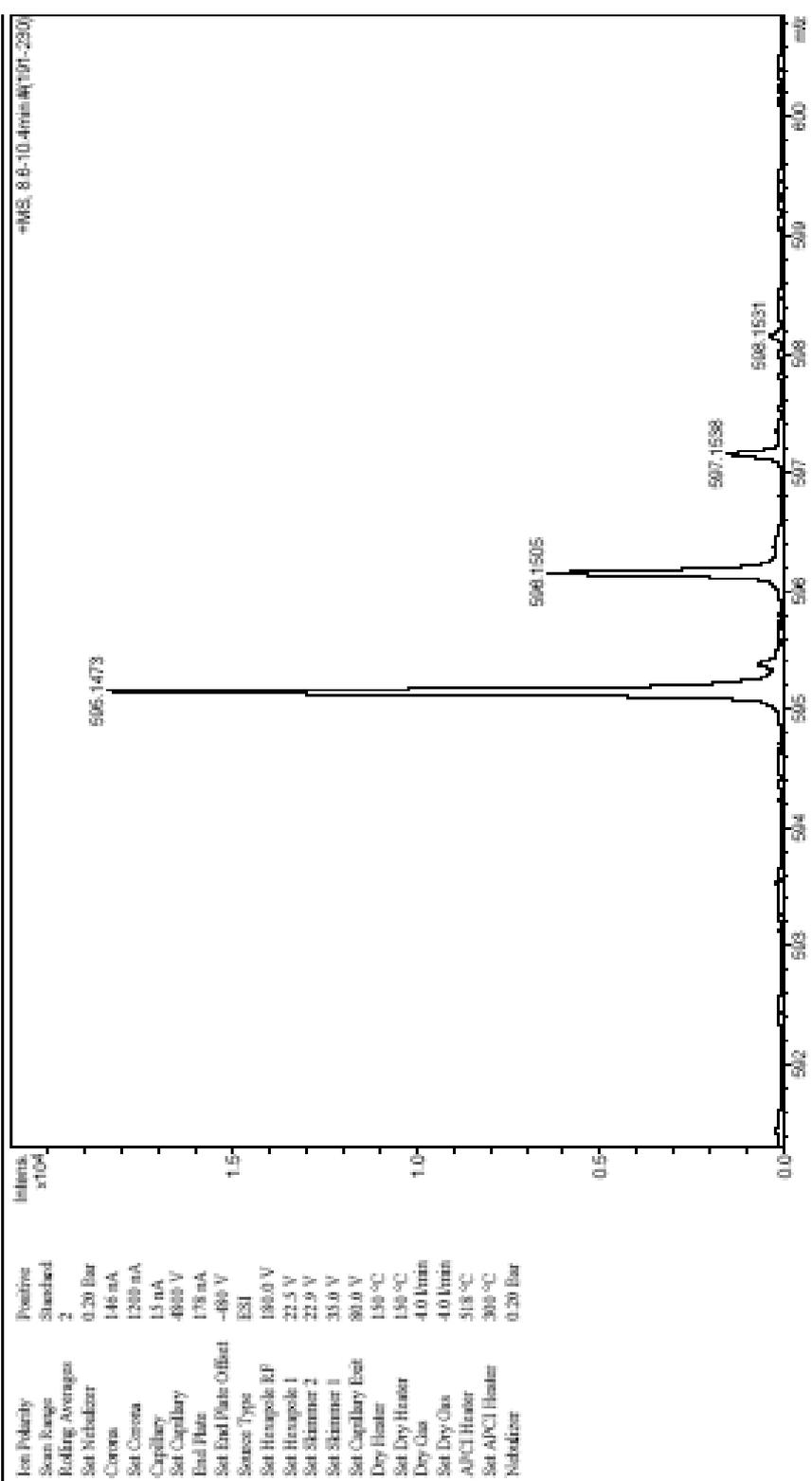


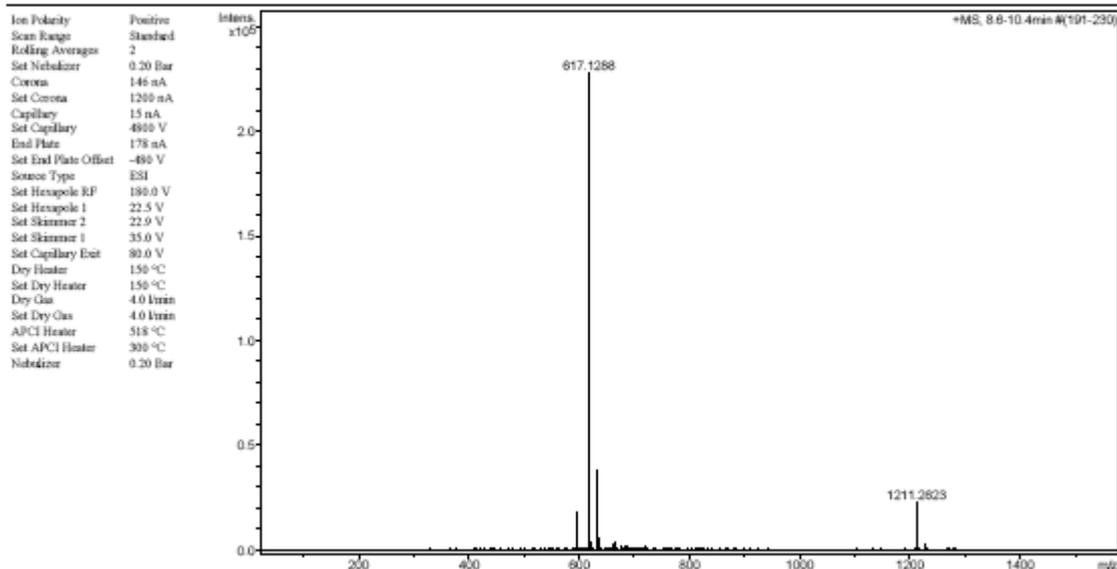
Figure 21 : spectre de masse de CL1

Analysis Info

Analysis Name pw0697000001.d
 Sample Name TIL
 Comment

Acquisition Date 09/19/2005 06:26:01 PM
 Method pwesipos.m

Operator Instrument Administrator
 microTOF



Brucker Daltonics DataAnalysis 3.1

printed: 09/19/2005 07:00:00 PM

Page 1 of 1

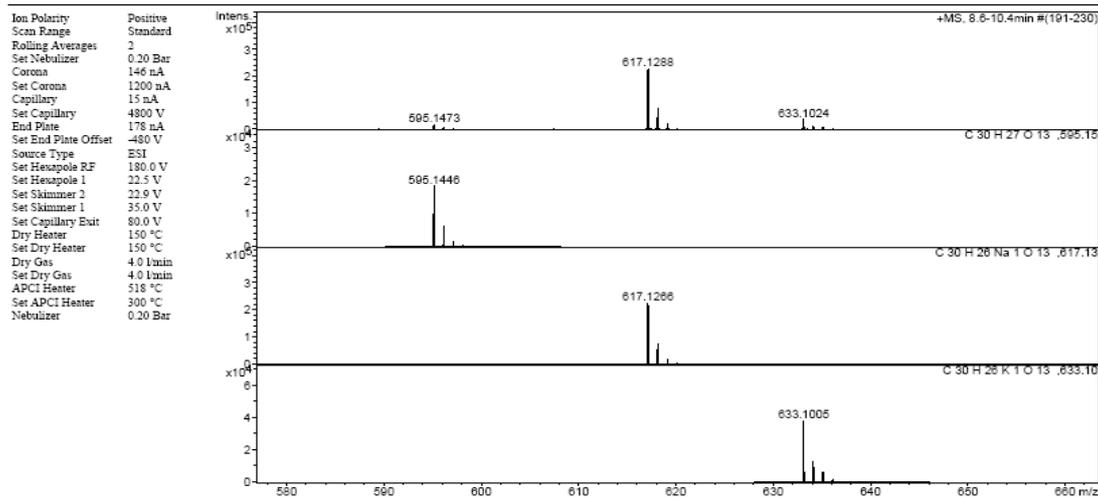
Figure 22: spectre de masse de CL1

Analysis Info

Analysis Name pw0697000001.d
 Sample Name TIL
 Comment

Acquisition Date 09/19/2005 08:26:01 PM
 Method pwesipos.m

Operator Instrument Administrator
 microTOF



Brucker Daltonics DataAnalysis 3.1

printed: 09/19/2005 08:58:50 PM

Page 1 of 1

Figure 23 : spectre de masse de CL1

L'analyse du spectre RMN ^1H (figure 19) montre deux multiplets à 3,43-3,46 et à 4,14-4,21 (protons glycosyliques, H-5'' et les protons H-2'', H-3'', H-4''); un doublet dédoublé entre 4,26 et 4,31 correspondants aux deux protons méthyléniques d'un glucose ; un doublet à 5,24 ppm (H-1'', $J = 7,5$ Hz) qui correspond au proton anomérique ; un doublet à 6,12 ppm (H-6, $J = 1,86$ Hz), un doublet 6,30 ppm (H-8, $J=1,86$ Hz) ; un doublet à 6,80 ppm (H-3' et H-5', $J = 8,73$ Hz) et un doublet à 7,97 ppm (H-2' et H-6', $J = 8,73$ Hz).

Ce spectre montre également d'autres signaux correspondants à des protons éthyléniques d'un cycle aromatique et deux signaux correspondants aux déplacements chimiques de protons en position alpha et bêta d'un groupement carbonyle. Ceci pourrait correspondre à un dérivé cafféoyl. Ces protons apparaissent sous forme de doublet à 6,06 ppm (H- α , $J = 15,9$ Hz) ; à 7,39 ppm (H- β , $J = 15,9$ Hz). Les pics à 6,78 ppm (H-5''' et H-9''', $J = 8,43$ Hz) ; à 7,30 ppm (H-6''' et H- 8''', $J = 8,73$ Hz) correspondent à un système de type « cycle B » d'un flavonoïde.

Le spectre RMN ^{13}C révèle la présence de 26 pics. L'analyse de ce spectre révèle la présence de 12 carbones quaternaires dont deux carbonyles à 179,42 ppm et 168,77 ppm ; un carbone secondaire oxygéné à 64,27 ppm ainsi que quatre carbones tertiaires glycosidiques entre 75,79 et 71,70 ppm. Le pic à 103,92 correspond à un carbone anomérique, ce qui confirme la présence d'un sucre.

Ces données sont identiques à celles indiquées dans la littérature pour le 3-O- β -6''-cafféoylglucoside de kaempférol (Agrawal, 1989 ; Bajaj et al., 1986 ; Backhouse et al., 2002).

Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons comparé les spectres proton ^1H ^{13}C de CL1 à ceux de la molécule du tiliroside. Les spectres obtenus (Figure 24) à partir de la molécule commerciale sont identiques aux spectres de la molécule isolée.

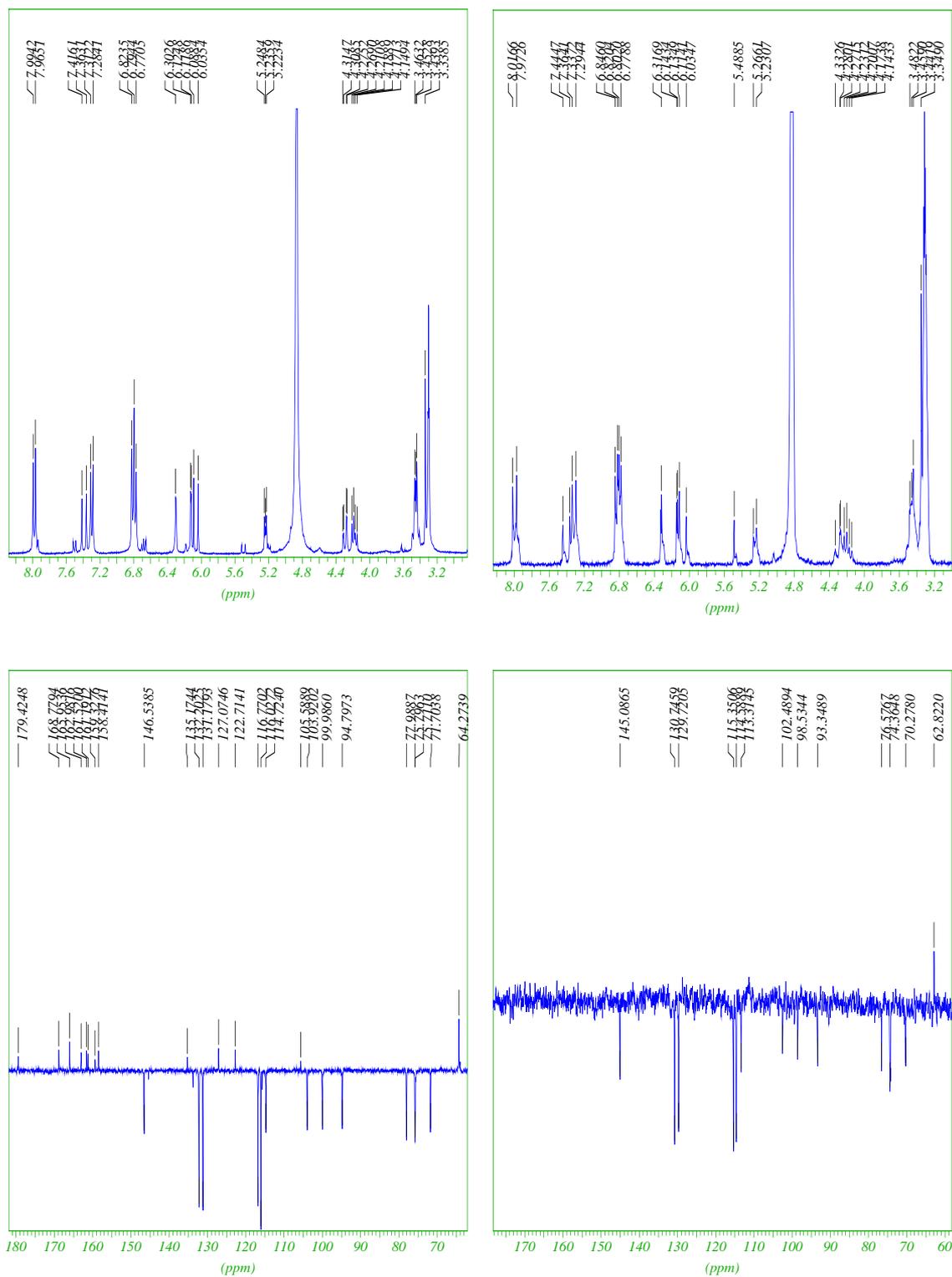
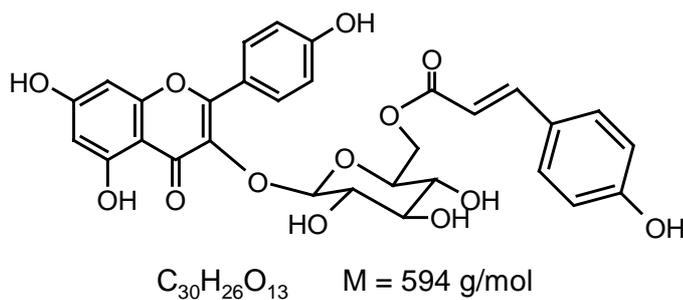


Figure 24 : Spectre RMN ^1H et ^{13}C du tiliroside et du composé **CL1**

Ces données montrent que le composé CL1 correspond effectivement au 3-O- β -6''-cafféoylglucoside de kaempférol encore appelé tiliroside et les spectres observés sont comparables à ceux décrit par Agrawal et Harborne (Agrawal, 1989 ; Harborne et Mabry, 1982).



Tiliroside

3-O- β -6''-cafféoylglucoside de kaempférol

4.1.3. IDENTIFICATION DU COMPOSE CL4

a- Propriétés physicochimiques

- Poudre jaune
- Rf : 0,5 dans le système acétate d'éthyle / méthanol / eau (100 : 17 : 13)
- Détection en CCM par pulvérisation de vanilline sulfurique + chauffage

b- RMN ¹H de CL4 (200 MHz; MeOH-d4)

(Voir figure 25)

L'analyse du spectre RMN ¹H du composé CL4 (figure 25) montre un doublet à 7,23 ppm (2H, J = 8,8 Hz, H-3' et H-5') ; un doublet à 7,88 ppm (2H, J = 8,8 Hz, H-2' et H-6') ; ces données suggèrent la présence d'un cycle parahydroxyphényle correspondant au noyau B. Ce spectre donne également un singulet à 6,86 ppm (1H, H-3) et un singulet à 6,76 ppm (1H, H-8). Les signaux obtenus entre 5,2 ppm et 4,43 ppm correspondent aux carbones anomérique du glucose. Les déplacements chimiques en RMN du proton (¹H), la nature du signal, les constantes de couplage et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau 18.

Protons	δ H (ppm)	Multiplicité	J (Hz)
H-3	6,86	s	
H-8	6,76	s	
H-2'	7,88	d	8,8
H-3'	7,21	d	8,3
H-5'	7,21	d	8,3
H-6'	7,88	d	8,8
H-1''	5,85	d	9,78
H-2''	4,5-4,4	m	
H-3''	4,5-4,4	m	
H-4''	4,5-4,4	m	
H-5''	5,25-5,17	m	
H-6''	4,5-4,4	m	

Tableau 18 : Données RMN ¹H de CL4

c- RMN ¹³C de CL4 (200 MHz ; MeOH-d4)

(Voir figure 26)

Les déplacements chimiques en RMN ¹³C et les attributions des signaux sont présentés dans le tableau 19.

Carbone	δC (ppm)	Carbone	δC (ppm)
2	164,72	2'	129,27
3	104,26	3'	117,25
4	183,32	4'	162,50
5	163,10	5'	117,25
6	110,57	6'	129,27
7	165,31	1''	75,92
8	95,08	2''	73,24
9	157,88	3''	81,07
10	105,25	4''	72,39
		5''	83,41
1'	122,59	6''	63,22

Tableau 19: Données RMN ¹³C de CL4

d- Spectre UV de CL4

Le spectre UV montre que le composé Clb4 est un flavonoïde avec une absorption maximale de 268,55 nm pour la bande II et 332,21 nm pour la bande I. L'analyse des spectres en présence de chlorure d'aluminium (AlCl₃), d'acide chlorhydrique (HCl), d'acétate de sodium (AcONa) et d'acide borique (H₃BO₃) donne les résultats suivants: UV max (MeOH) 272 nm, 334 nm ; UV max (MeOH + AlCl₃) 280 nm, 304nm, 351 nm, 383 nm ; UV max (MeOH + AlCl₃ + HCl) 280 nm, 304 nm 348 nm, 383 nm ; (NaOAc) 273, 338 ; (NaOAc/H₃BO₃) 272, 335 (5-OH et 7-OH). Le décalage bathochromique (50 nm) observé en présence d'AlCl₃ indique l'absence de groupement hydroxyle en position C-6 et C-8.

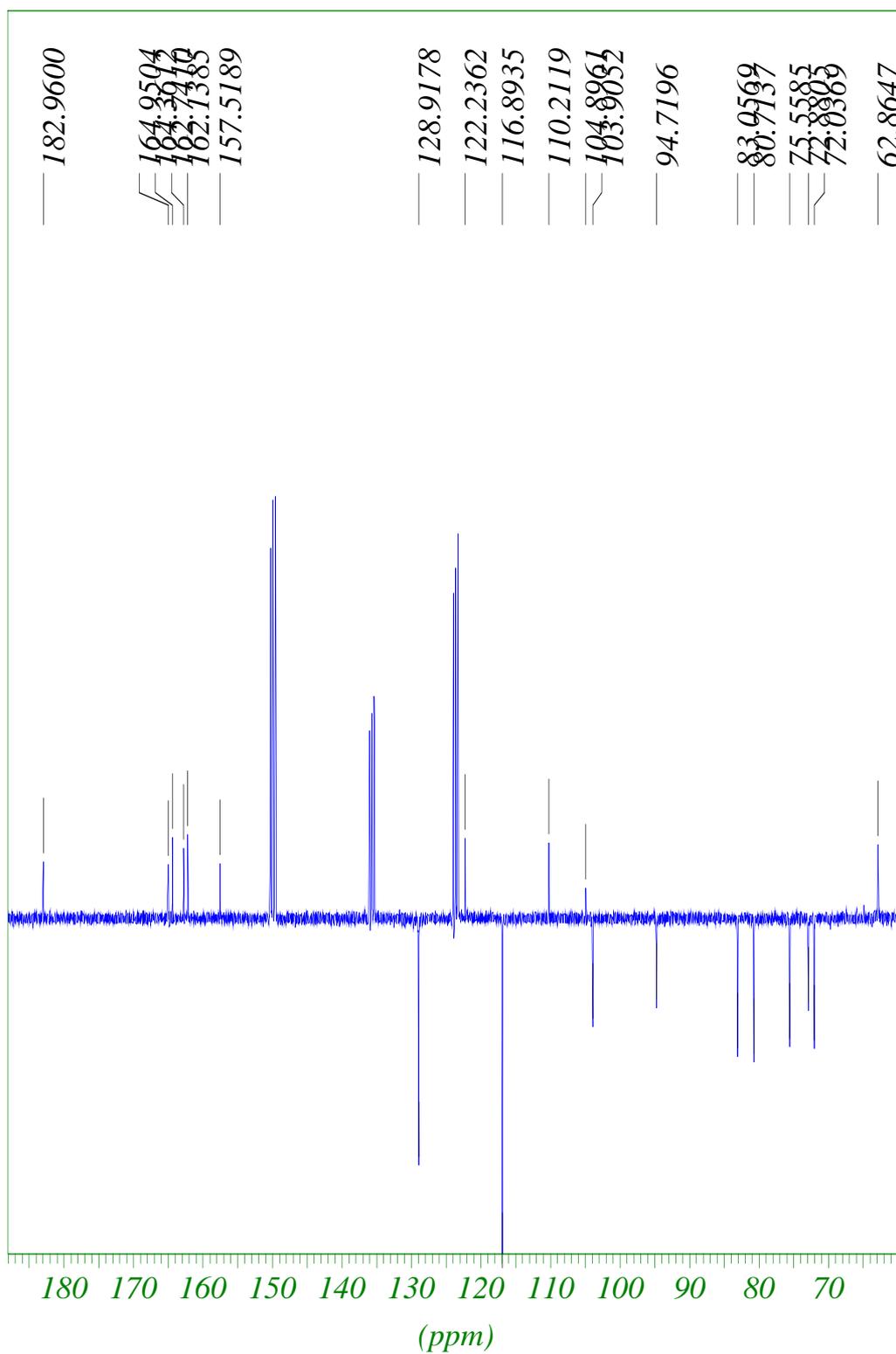


Figure 26 : Spectre RMN ^{13}C (200MHz) de **CL4** dans la pyridine-d5

CNRS-FR2351 Spectrometrie de masse ULP-Strasbourg

Analysis Info

Analysis Name pw0708000001.d
 Sample Name PET0509211
 Comment

Acquisition Date 08/22/2006 02:35:00 PM Administrator
 Method pwsipos.m Instrument microTOF

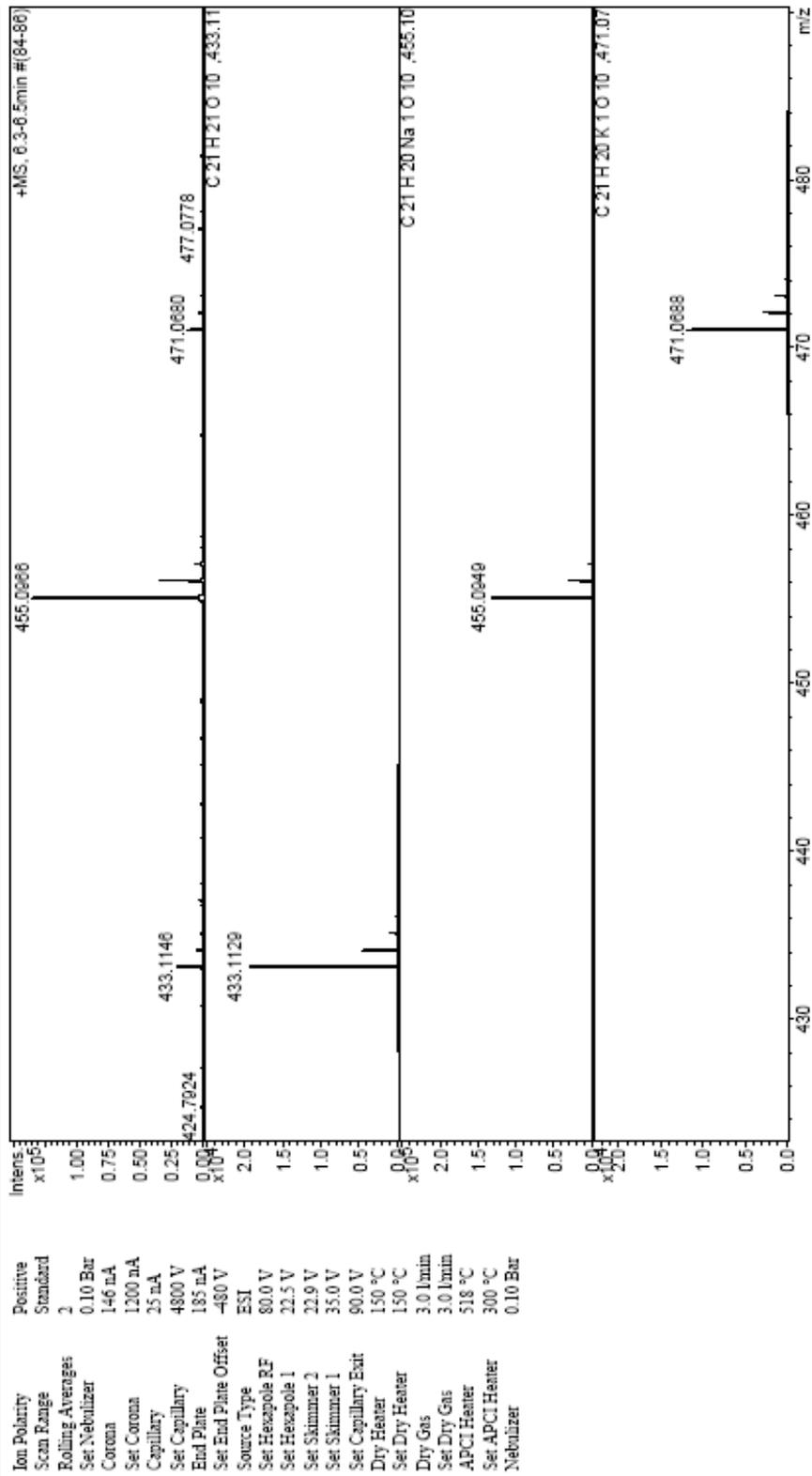


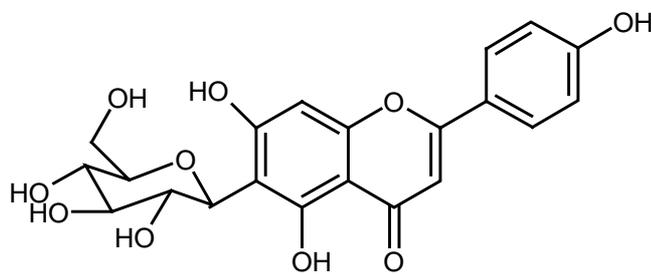
Figure 27 : spectre de masse de CL4

e- Spectre de masse (ESI et FAB)

(Voir figure 27)

Le spectre de masse réalisé en FAB mode positif (Fast Atom Bombardment) montre le pic de l'ion moléculaire à m/z 433,2, ce qui correspond à l'ion $[M+H]^+$. Un autre signal obtenu à m/z 415,3 correspond à la perte d'une molécule d'eau par la molécule, soit $[M-H_2O]$. Un second spectre réalisé en présence d'iodure de sodium, donne le pic de l'ion moléculaire m/z à 455,2, ce qui correspond à l'ion $[M+Na]$. Les analyses réalisées en électrospray donne les mêmes adduits qui correspondent à une masse molaire de 432 g/mol et une formule brut $C_{21}H_{20}O_{10}$.

De ces données nous en déduisons que le composé CL4 correspond au 6-C- β -D-glucopyranoside d'apigénine, encore appelé isovitexine. Les signaux du spectre RMN ^{13}C sont comparables à ceux obtenus dans la littérature (Agrawal, 1989 ; Ramarathnam, 1989). Ce composé avait été préalablement isolé de *Vitex lucens* et de *Patrinia villosa* (Peng et al., 2005).



Isovitexine

6-C- β -D-glucopyranoside d'apigénine

4.2. IDENTIFICATION DES COMPOSE CLI1 et CLI2

a- Propriétés physicochimiques de CLI1

- Poudre brunâtre
- Rf : 0,1 dans le système chloroforme/ méthanol/ eau (14: 6: 1)
- Détection en CCM par pulvérisation de vanilline sulfurique + chauffage

b- Propriétés physicochimiques de CLI2

- Poudre brunâtre
- Rf : 0,15 dans le système chloroforme/ méthanol/ eau (14 : 6 : 1)
- Détection en CCM par pulvérisation de vanilline sulfurique + chauffage

c- Spectres UV des composés CLI1 et CLI2

(Figure 28 et 29)

- λ_{\max} CLI1 (ACN/H₂O) nm : 231,11 (I); 322,80 (II) ; Tr = 3,5 mn
- λ_{\max} CLI2 (ACN/H₂O) nm : 239,77 (I); 321,22 (II) ; Tr = 4,1 mn

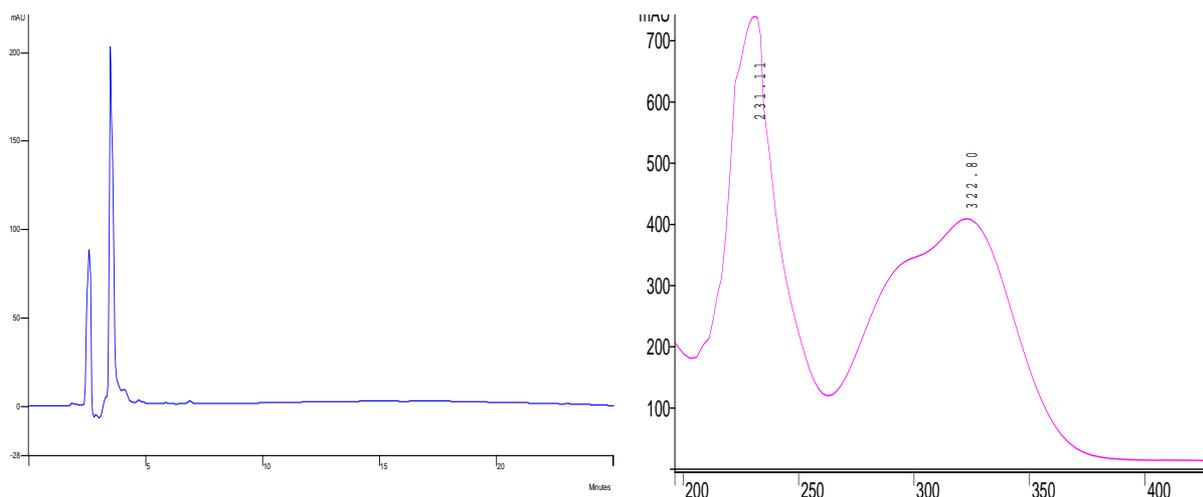


Figure 28: Chromatogramme et spectre UV du composé CLI1

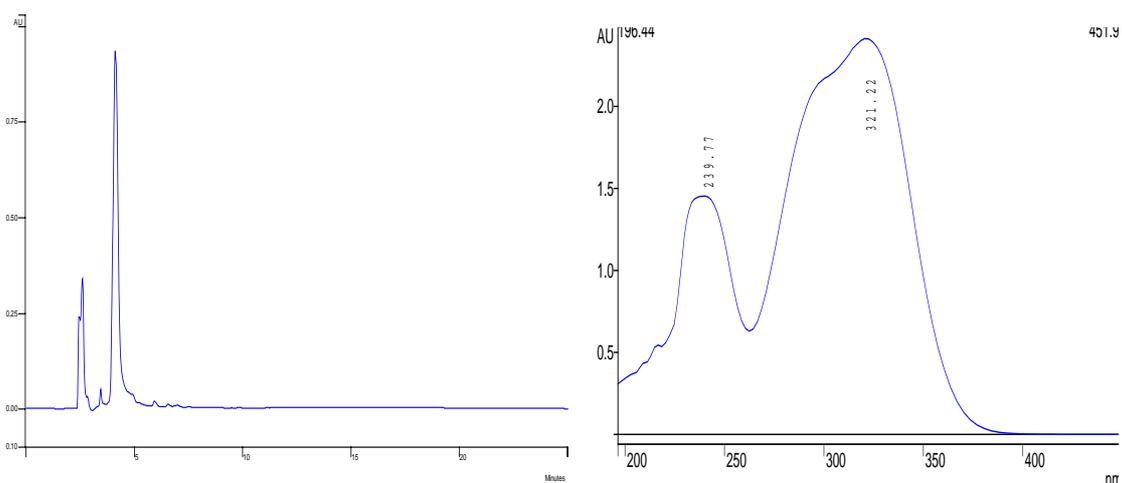


Figure 29 : Chromatogramme et spectre UV du composé CLI2

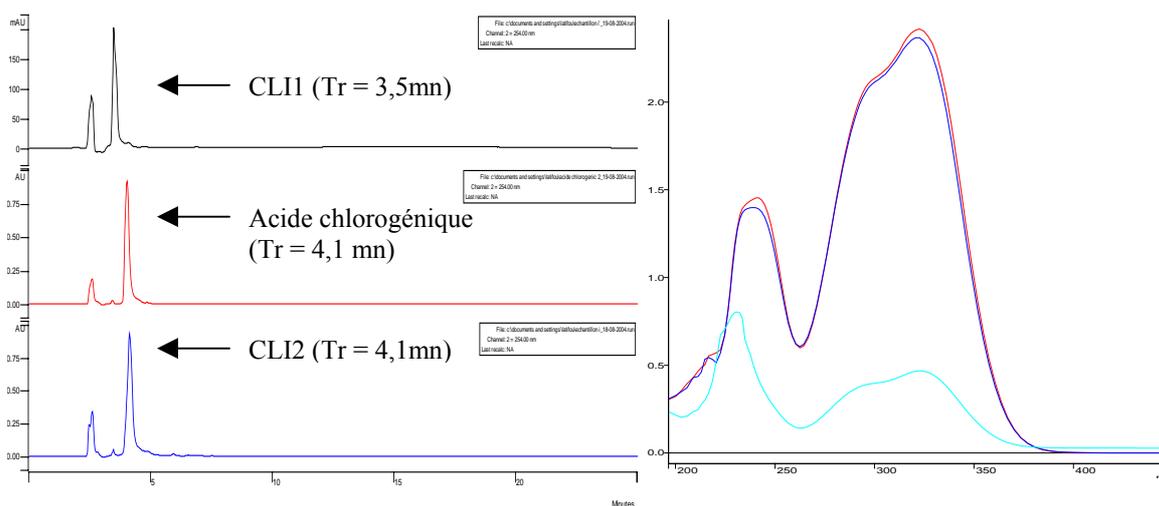


Figure 30 : Chromatogrammes et spectres d'absorption UV comparés des composé ClbI1, ClbI2 et l'acide chlorogénique

Composés	λ_2 (nm)	λ_1 (nm)	Tr (min)
CLI1	231,11	322,80	3,5
CLI2	239,77	321,22	4,1
Ac. chlor.	241,17	322,38	4,1

Tableau 20 : Absorption UV des composés CLI1, CLI2 et de l'acide chlorogénique

Les spectres UV obtenus montrent deux bandes d'absorption avec un épaulement remarquable sur la bande I (Figure 28 et 29). Ces spectres sont caractéristiques des acides phénoliques.

La comparaison des spectres et chromatogrammes des composés CLI1 et CLI2 avec ceux de l'acide chlorogénique (Figure 30) donne les résultats présentés dans le tableau 22. Ces résultats montrent une parfaite similitude entre le spectre d'absorption et le chromatogramme du composé CLI2 et de l'acide chlorogénique. Nous en déduisons que le composé CLI2 correspond à l'acide chlorogénique. Nous avons confirmé cette structure par l'interprétation des spectres RMN proton ^1H (figures 31, tableaux 23), carbone ^{13}C (Figure 32 ; tableau 24) et masse (figure 33).

d- Spectre de masse de CLI2

(Voir figure 33)

- ESI- MS, mode positif
- 377 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 393 $[\text{M}+\text{K}]^+$, 731 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$: correspondant à un poids moléculaire de 354.

e- Spectres RMN ^1H de CLI2 (300 MHz, MeOH-d4)

(Voir figure 31)

Les déplacements chimiques en RMN ^1H , la nature du signal, les constantes de couplage et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau 23.

f- Spectres RMN ^{13}C de CLI2 (300 MHz, MeOH-d4)

(Voir figure 32)

Les déplacements chimiques en RMN ^{13}C , sont présentés dans le tableau 24.

Protons	δ H (ppm)	signal	J (Hz)
H-2	2,13	m	---
H-3	4,12	br	---
H-4	3,67	m	---
H-5	5,33	br	---
H-6	1,97	m	---
H-2'	7,57	d	15,93
H-3'	6,30	d	15,86
H-5'	7,04	d	1,83
H-8'	6,76	d	8,22
H-9'	6,94	d	8,07

Tableau 21 : Données RMN ^1H de CLI2

Carbone	δ C (ppm)	Carbone	δ C (ppm)
1	79,21	1'	168,99
2	38,55	2'	115,25
3	73,66	3'	147,11
4	69,61	4'	127,86
5	72,02	5'	115,36
6	42,61	6'	146,79
7	179,04	7'	149,53
		8'	116,47
		9'	122,95

Tableau 22 : Données RMN ^{13}C de CLI2

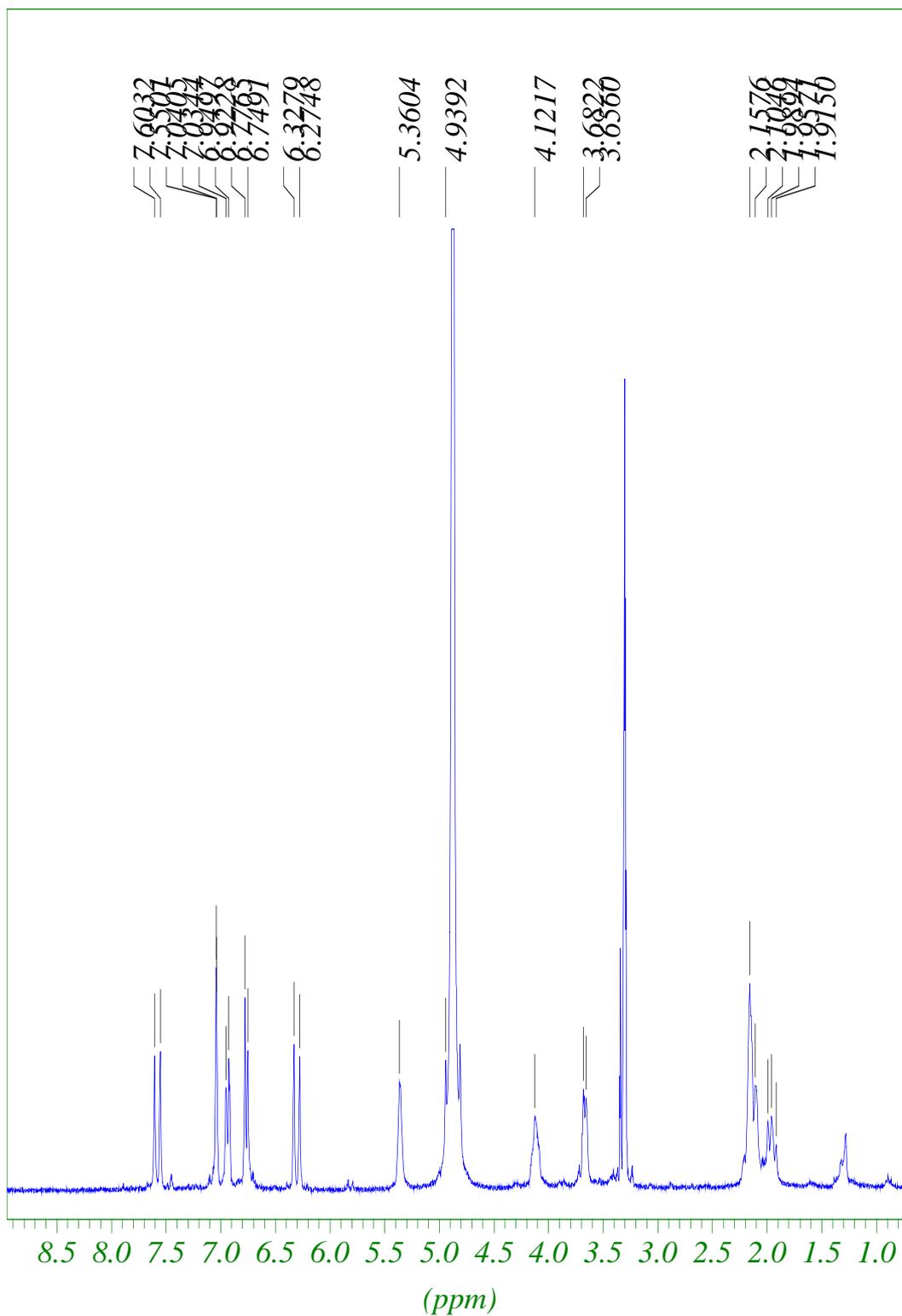


Figure 31: Spectre RMN ^1H (300MHz) de **CLI2** dans le MeOH-d₄

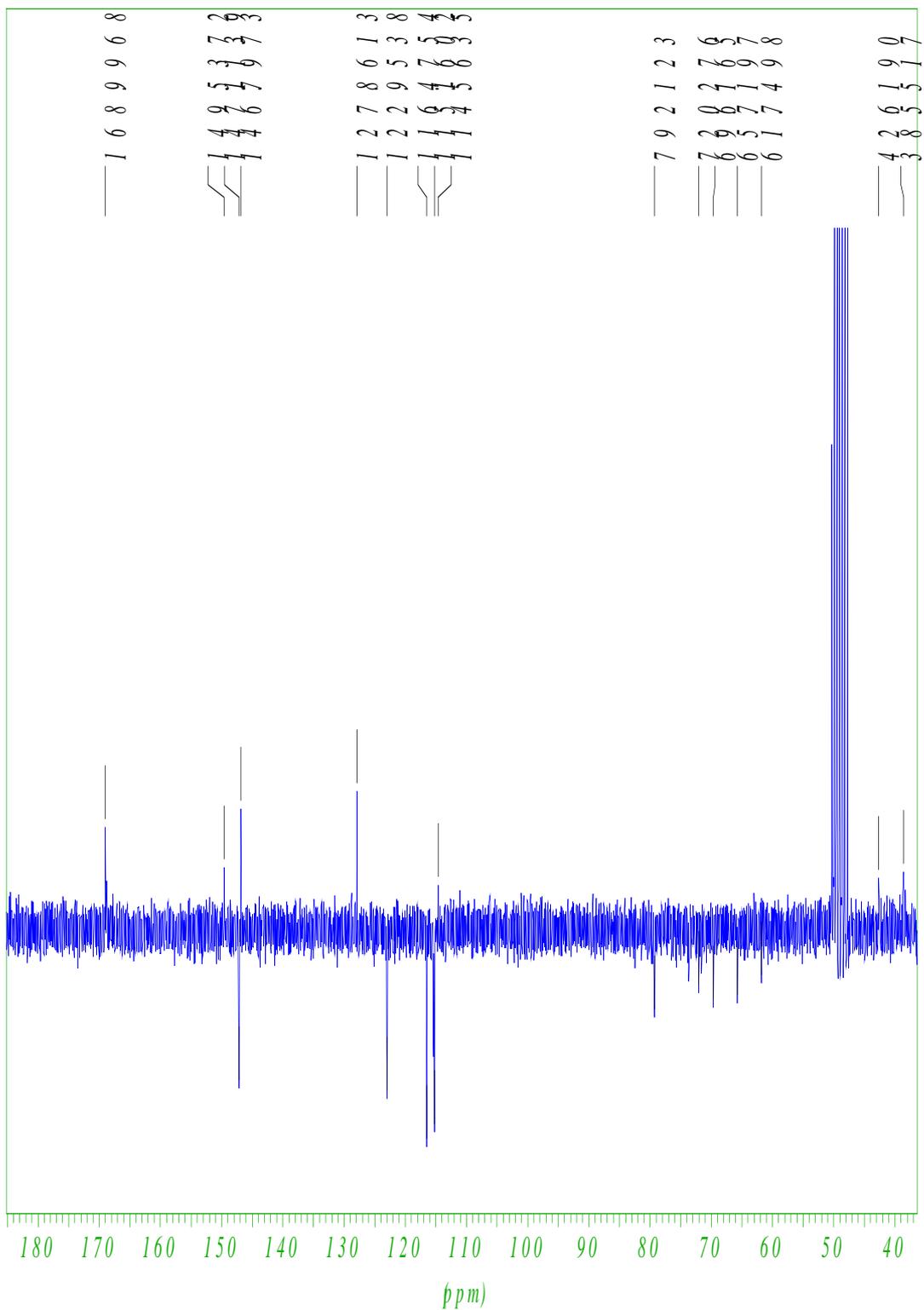


Figure 32: Spectre RMN ^{13}C (300MHz) de CLI2 dans le MeOH-d4

CNRS-FR2351 Spectrometrie de masse ULP-Strasbourg

Analysis Info
 Analysis Name pw06990000002.d Administrator
 Sample Name I2 Acquisition Date 09/20/2006 03:51:55 PM Operator
 Comment Method pwsipos.m Instrument microTOF

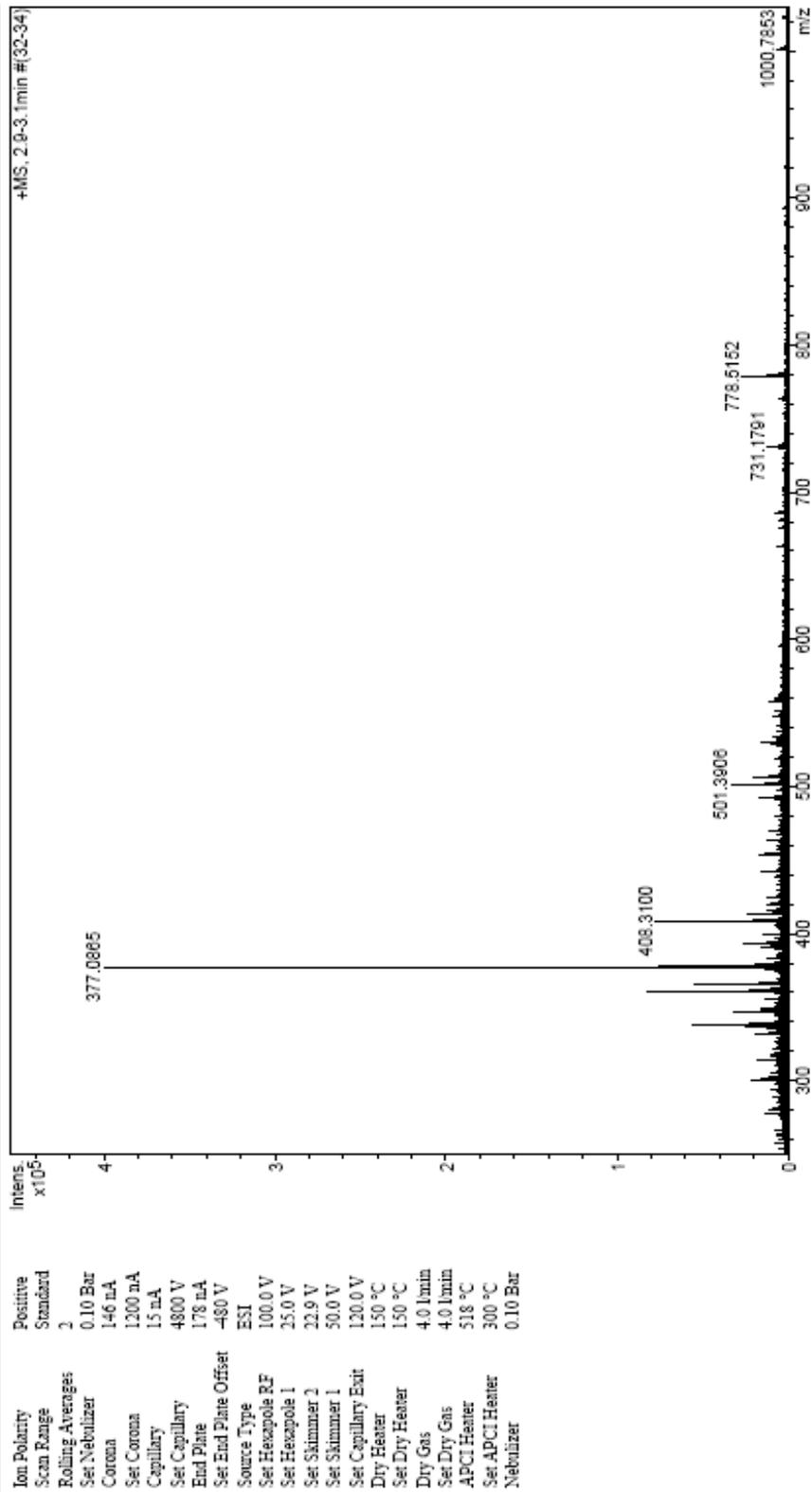
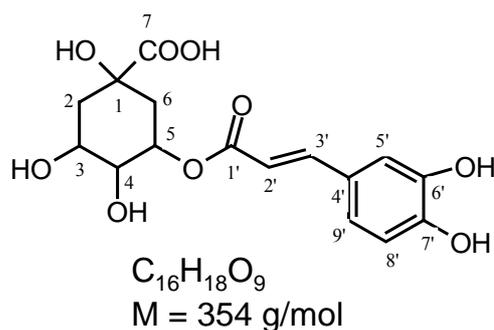


Figure 33 : spectre de masse de CLI2

L'électrospray en mode positif donne des adduits à 377 [M+Na]⁺, 393 [M+K]⁺ et 731 [2M+Na]⁺: correspondant à un poids moléculaire de 354 et une formule brute de C₁₆H₁₈O₉.

Le spectre ¹H révèle la présence d'un doublet à 7,57 ppm (H-2', J = 15,93 Hz), un doublet à 7,04 ppm (H-5', J = 1,83 Hz), un doublet 6,94 ppm (H-9', J=8,07 Hz); un doublet à 6,76 ppm (H-8', J = 8,22 Hz) et un doublet à 6,30 ppm (H-3', J = 15,86 Hz); un pic à 5,33 ppm (H-5, J = 7,87 Hz), un pic non à 4,12 ppm (H-3), un multiplet à 2,13 ppm (H-2); un multiplet à 1,97 ppm (H-6); un multiplet à 3,67 ppm (H-4).

Ces données sont identiques à celles obtenues dans la littérature (Kurkin, 2003)



Acide 5-*O*-cafféoylquinique =
acide chlorogénique

g- Spectres RMN ¹H de CLI1 (300 MHz, MeOH-d4)

(Voir figure 34)

Les déplacements chimiques en RMN ¹H, la nature du signal, les constantes de couplage et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau 23.

Protons	δ H (ppm)	signal	J (Hz)	Protons	δ H (ppm)	signal	J (Hz)
H-2	2,05	br	---				---
H-3	4,29	br	---				---
H-4	4,94	br	---				---
H-5	5,33	br	---				---
H-6	2,18	br	---				---
H-2'	6,38-6,33	d	16,02	H-2''	6,28-6,23	d	16,02
H-3'	7,65-7,52	d	16,02	H-3''	7,57-7,52	d	16,02
H-5'	7,04	d	1,83	H-5''	7,04	d	1,83
H-8'	6,78-6,75	d	8,1	H-8''	6,78-6,75	d	8,1
H-9'	6,96-6,94	d	7,5	H-9''	6,96-6,94	d	7,5

Tableau 23 : Données RMN ¹H du composé CLI1

h- Spectres RMN ¹³C de CLI1 (300 MHz, MeOH-d4)

(Voir figure 35)

Les déplacements chimiques en RMN ¹³C et les attributions des signaux observés sont présentés dans le tableau 24.

	δ C (ppm)		δ C (ppm)
1	79,2		
2	38,6		
3	73,7		
4	69,6		
5	72,0		
6	42,6		
7	179,0		
1'	168,9	1''	168,7
2'	115, »	2''	115,2
3'	147,1	3''	147,1
4'	127,9	4''	127,8
5'	115,4	5''	115,4
6'	146,8	6''	146,8
7'	149,5	7''	149,5
8'	116,5	8''	116,5
9'	122,9	9''	122,9

Tableau 24 : Données RMN ^{13}C du composé **CLI1**

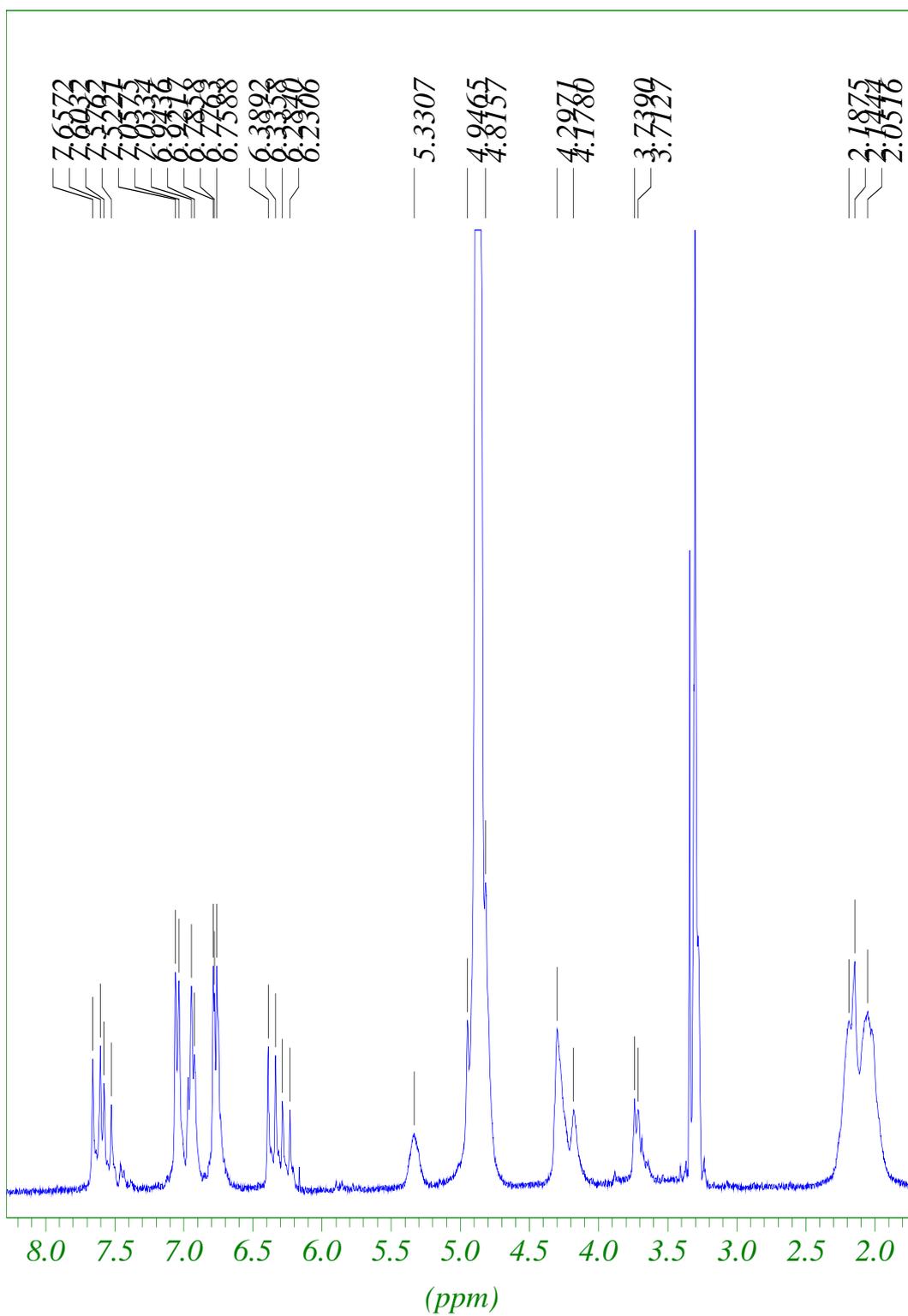


Figure 34: Spectre RMN ^1H (300MHz) de CLI1 dans le MeOH- d_4

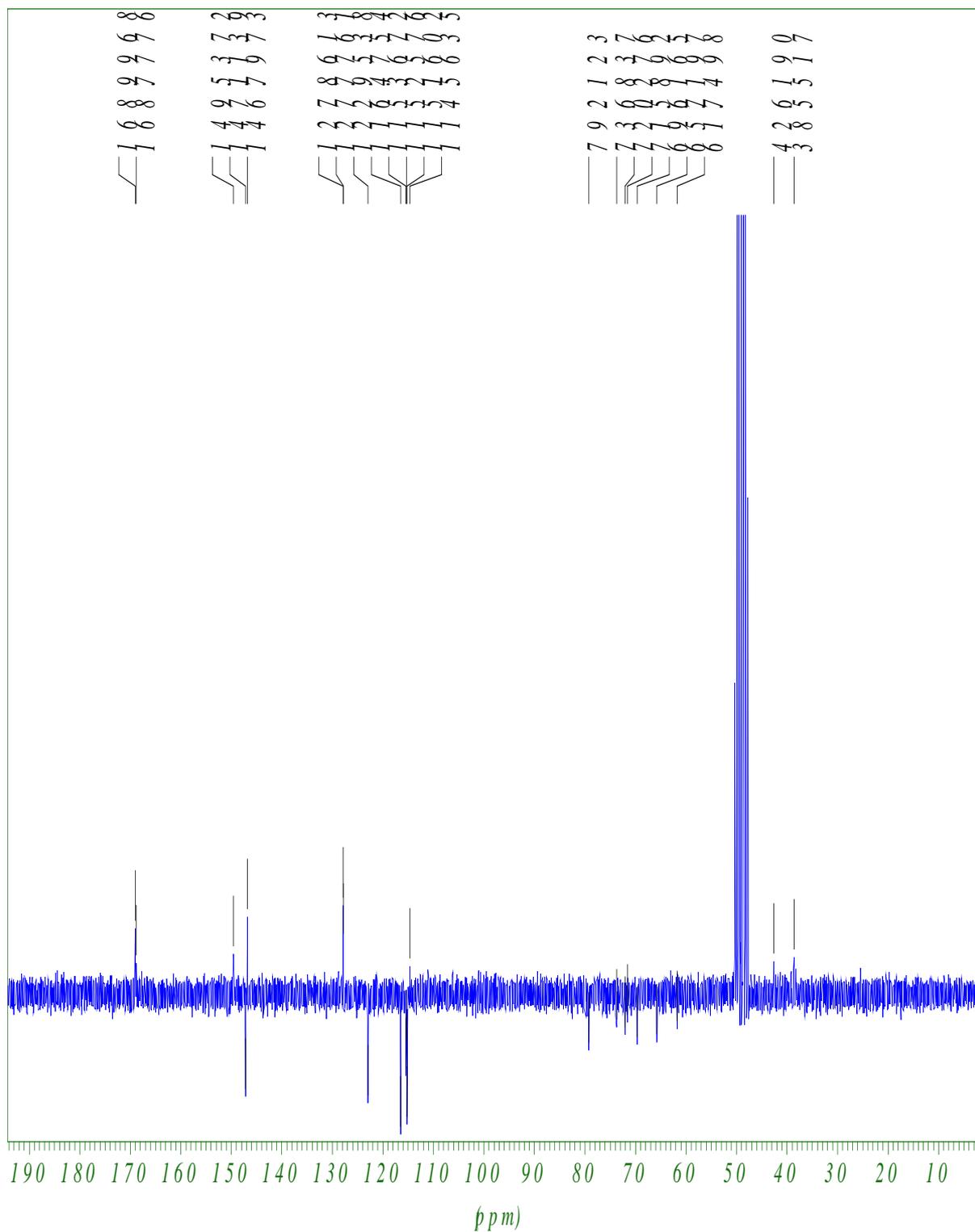
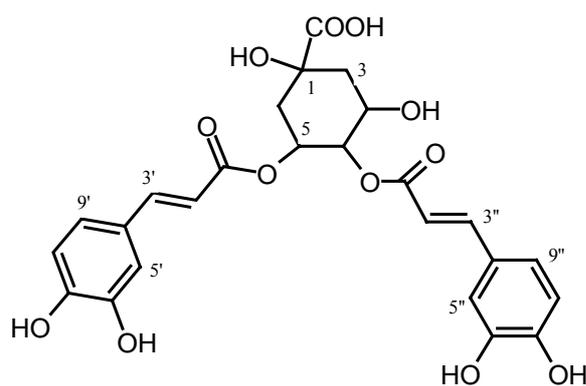


Figure 35: Spectre RMN ^{13}C (300MHz) de CLI1 dans le MeOH-d_4

Les spectres ^1H et ^{13}C (figure 34 et 35) du composé **CLI1** révèle la présence de deux groupements cafféoyl, confirmée par le dédoublement des signaux correspondant à ce groupement. L'analyse des données du spectre ^1H et spectre ^{13}C montre que le composé **CLI1** correspond à l'acide 4,5-dicafféoylquinique. La position du deuxième dérivé cafféoyl est confirmée par le couplage observé en HMBC entre le proton H-4 et le carbone C-1''.



Acide 4,5-O-dicafféoylquinique

5. Fractionnement de l'extrait méthanolique et isolement des métabolites des racines

Nous avons réalisé un fractionnement de l'extrait par chromatographie sur colonne de silice. L'éluant utilisé est composé de trois solvants : CH₂Cl₂/MeOH/AcOEt. 62 fractions de 20 à 50 ml ont été obtenues. Les fractions sont ensuite regroupées en quatre sous-fractions suivant leur profil sur CCM analytique. Les conditions opératoires sont présentées ci-dessous :

Chromatographie sur colonne se silice

Diamètre de la colonne : 2,7 cm
Hauteur de la silice : 32 cm
Eluent : gradient CH₂Cl₂/MeOH/AcOEt

Fractions	1-16	17-43	44-50	51-62
Eluants	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ /AcOEt	CH ₂ Cl ₂ /MeOH	MeOH

La sous-fraction 17-43 a ensuite été fractionnée par la même méthode. Six autres sous-fractions sont obtenues. Un composé a pu être isolé à partir de cette sous-fraction. Le même composé est isolé à nouveau à partir de la fraction 51-62 par chromatographie d'adsorption sur colonne de séphadex LH20.

L'analyse des spectres RMN ¹H et ¹³C (Figure 36 et 37) de ce composé de couleur blanchâtre, possédant un R_f de 0,03 dans le mélange CHCl₃/MeOH/H₂O; 14 :6 :1, a permis de l'identifier à un sucre simple en C₁₂. Nous n'avons pas jugé utile de poursuivre la détermination complète de ce composé.

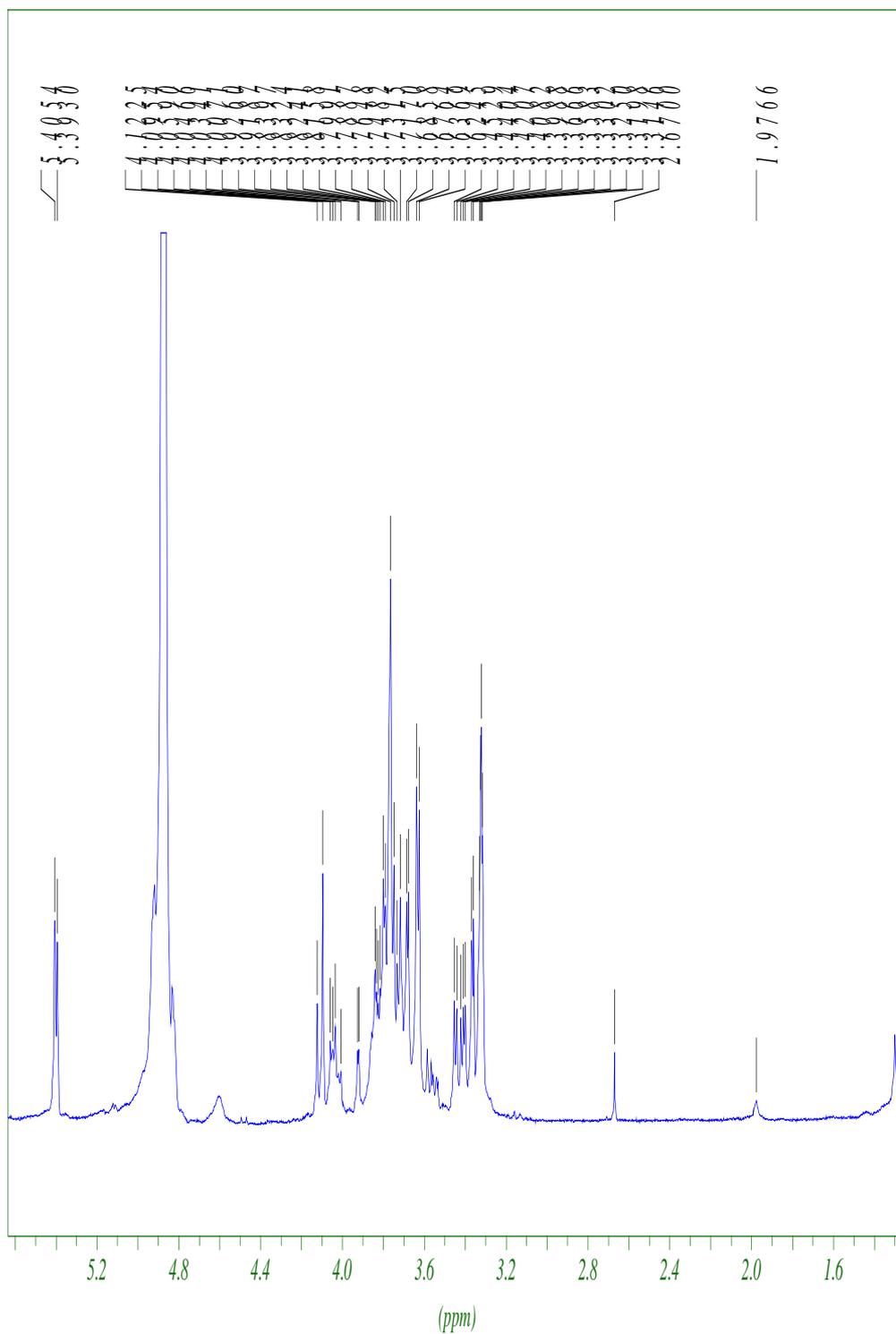


Figure 36 Spectre RMN ^1H (300MHz) dans le MeOH-d4

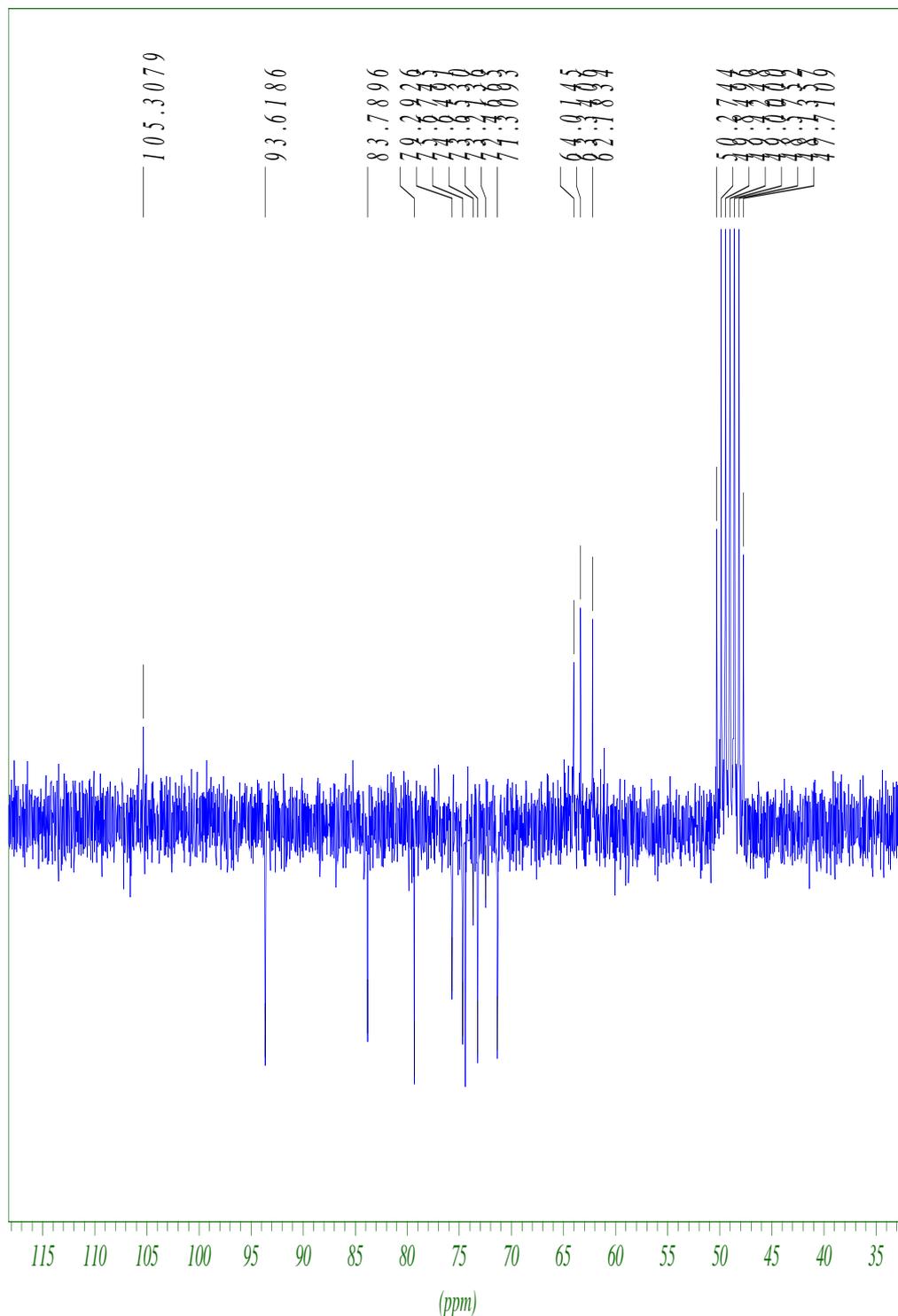


Figure 37 Spectre RMN ^{13}C (300MHz) dans le MeOH-d4

Chapitre II

***ETUDE CHIMIQUE DE
THALIA GENICULATA***

1. LE MATERIEL VEGETAL

1.1. Récolte et séchage

La récolte des feuilles, racines et tiges de *Thalia geniculata* a été réalisée courant janvier 2005 dans la région de Godomey, dans le département de l'Atlantique (Sud Bénin). Elles ont été ensuite séchées au laboratoire à l'abri de la lumière du soleil. Le séchage a été effectué durant 4 à 6 semaines selon que ce soit les feuilles, tiges ou racines. Le matériel végétal séché a été réduit en poudre à l'aide d'un broyeur puis ensuite soumis à l'extraction.

1.2. Extraction

160 g de poudre sèche de *Thalia geniculata* ont été extraits par macération et à température ambiante pendant 72 heures. 29,27 g d'extrait méthanolique ont été obtenus après séchage total de l'extrait méthanolique.

L'extrait brut méthanolique est dissous dans une faible quantité de méthanol puis transféré dans une ampoule à décanter. 300 ml de dichlorométhane sont ajoutés dans l'ampoule. Le mélange obtenu est agité puis laissé au repos. Après 30 minutes, on observe :

- un précipité déposé au fond de l'ampoule
- une phase dichlorométhanolique surnageante

La phase dichlorométhanolique est récupérée alors que le précipité est repris par du méthanol. L'extraction est reprise trois fois de suite. Les phases dichlorométhanoliques récupérées sont concentrées. Les précipités qui se déposent au fond de l'ampoule sont repris par du méthanol puis évaporés. On obtient :

- 21,08 g d'extrait dichlorométhanolique (extrait A)
- 8,92 g d'extrait méthanolique (extrait B)

Le schéma ci-dessous présente les différentes étapes de l'extraction jusqu'à l'obtention des extraits **A** et **B**.

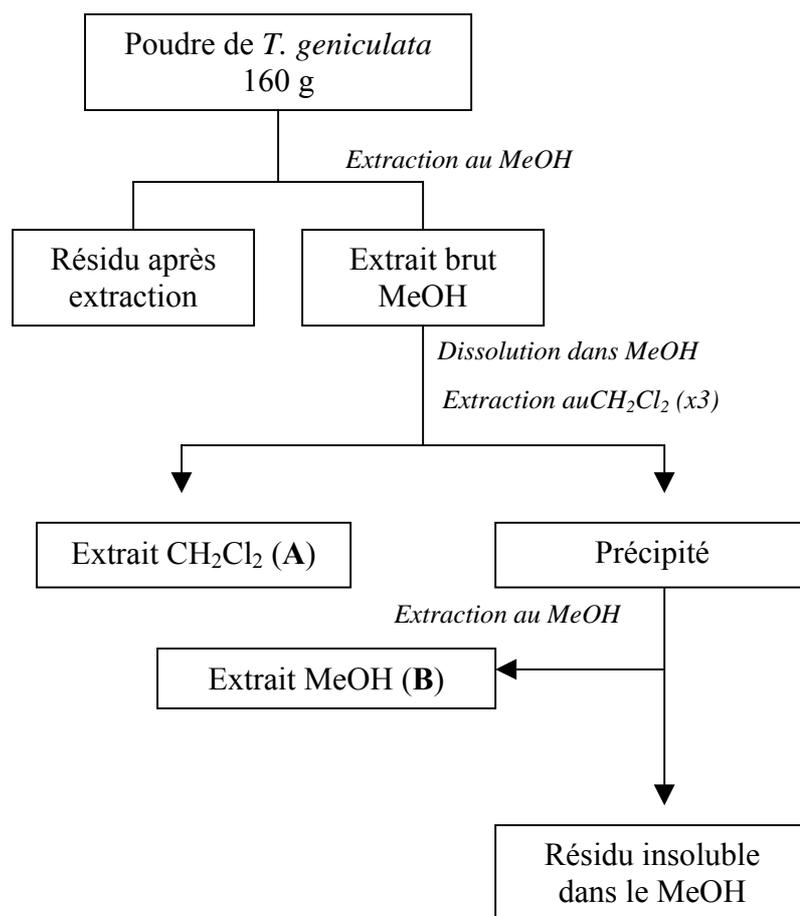


Schéma 8 : Différentes étapes de l'extraction

2. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DICHLOROMETHANOLIQUE ET ISOLEMENT DES COMPOSES

2.1. Fractionnement de l'extrait A

L'extrait A (21,08 g) a été fractionné sur colonne de silice de diamètre 7 cm. La hauteur de la silice est de 10,5 cm. L'élution a été effectuée avec quatre solvants : le cyclohexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les solvants d'élution sont en mélange binaire suivant un gradient de polarité.

Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince. Parmi les fractions recueillies, quatre ont été purifiées :

- Fraction 23-28 de masse 80 mg
- Fraction 30-36 de masse 110 mg
- Fraction 44-46 de masse 170 mg
- Fraction 48-54 de masse 60 mg

Chacune des fractions a été purifiée par flash-chromatographie ou par recristallisation des produits d'intérêt, ou par combinaison des deux méthodes.

2.1.1. Purification du composé T2 à partir de la fraction 23-28

Le composé T2 a été purifié par flash-chromatographie sur colonne de silice. Les conditions opératoires sont présentées ci-dessous :

Conditions chromatographiques

- Colonne de silice Flash 12 + M HP-Sil, 12 x 75 mm, FPK0-1107-15046
- Précolonne Flash 12 + Silica, KP-Sil 12 mm, SAM-1107-1421J
- Pompe Horizon Pump, Biotage Inc
- Eluants Cyclohexane/CH₂Cl₂ (30:70) v/v
- Débit 8 ml/min
- Volume des fractions 5 ml
- Nombre de fractions 30

Le contrôle des sous-fractions éluées a été effectué par CCM sur plaques de gel de silice 60 F₂₅₄ (solvant : cyclohexane/dichlorométhane, 10:90 ; révélation : vanilline sulfurique suivie d'un chauffage à 105°C). Le composé T2 est obtenu pur à partir des sous-fractions 23-30.

2.1.2. Purification du composé T3 à partir de la fraction 30-36

La fraction 30-36, soluble dans le dichlorométhane, a été purifiée par recristallisation. Par séchage lent dans le mélange CH₂Cl₂/MeOH (1:10), il se forme un précipité blanc avec un surnageant vert. Le précipité blanc (composé T3) insoluble dans le méthanol est purifié par lavages successifs au méthanol.

2.1.3. Purification du composé T4 à partir de la fraction 44-46

Cette fraction, soluble dans le dichlorométhane, est insoluble dans le cyclohexane et le méthanol. Elle a été purifiée par flash-chromatographie :

Conditions chromatographiques

- Colonne de silice Flash 12 + M HP-Sil, 12 x 75 mm, FPK0-1107-15046
- Précolonne Flash 12 + Silica, KP-Sil 12 mm, SAM-1107-1421J
- Pompe Horizon Pump, Biotage Inc
- Eluants CH₂Cl₂/MeOH (95 : 5) ; (97 : 3)v/v
- Débit 8 ml/min
- Volume des fractions 3-5 ml
- Nombre de fractions 41

La CCM des 41 sous-fractions obtenues a permis de les regrouper en trois sous-fractions d'après leur profil chromatographique :

- Sous-fraction 1-4
- Sous-fraction 5-14
- Sous-fraction 15-41

La sous-fraction 15-41 repurifiée dans les mêmes conditions que précédemment, a permis d'obtenir le composé T4 par recristallisation dans le méthanol.

2.1.4. Purification du composé T5 à partir de la fraction 48-56

La purification de ce composé a été effectuée par flash-chromatographie. Les conditions chromatographiques ont été les suivantes:

Conditions chromatographiques

- Colonne de silice Flash 12 + M HP-Sil, 12 x 75 mm, FPK0-1107-15046
- Précolonne Flash 12 + Silica, KP-Sil 12 mm, SAM-1107-1421J
- Pompe Horizon Pump, Biotage Inc
- Eluants CH₂Cl₂/MeOH (90:10) v/v
- Débit 8 ml/min
- Nombre de fractions 40

Le composé T5 est obtenu pur à partir des sous-fractions 20-40.

2.1.5. Conclusion

Le fractionnement de l'extrait A, a permis d'isoler cinq composés dont les caractéristiques et rendements par rapport à l'extrait brut méthanolique, sont indiquées dans le tableau 25.

	Composés obtenus	Solubilité	Masse (mg)	Rdt (%)
Extrait A	T2	CH ₂ Cl ₂	26	0,13
	T3	CH ₂ Cl ₂	26,3	0,12
	T4	CH ₂ Cl ₂	10	0,05
	T5	C ₅ H ₅ N	11,4	0,05

Tableau 25 : Récapitulatifs des composés isolés de l'extrait méthanolique de *Thalia geniculata*

2.2. Fractionnement de l'extrait B

L'extrait **B** (8,92 g) est un extrait méthanolique de couleur brune et d'aspect brillant. Il a été fractionné par chromatographie liquide sur colonne de diamètre 3,5 cm. La hauteur de la silice était de 5,5 cm. L'élution a été effectuée avec le mélange binaire méthanol-dichlorométhane (30 :70).

Le solvant de chromatographie sur couche mince utilisé était un mélange ternaire composé de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (70 :30 :5) avec comme révélateur, une solution de vanilline sulfurique suivie par un chauffage de la plaque à 105°C. Les 14 fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique en couche mince :

- Fraction 1-6 (**B1**) de masse 67 mg
- Fraction 7-14 (**B2**) de masse 3,87 g

Après séchage, nous n'avons pas pu resolubiliser la fraction **B1** dans le méthanol. Par contre l'addition progressive de méthanol à la fraction **B2** permet d'obtenir une phase soluble dans le méthanol et une gomme de couleur brune. La phase soluble est concentrée puis purifiée de nouveau sur colonne de silice selon le protocole décrit précédemment. Les fractions recueillies sont regroupées en trois sous-fractions désignées par :

- B2_1 de masse 54 mg
- B2_2 de masse 965 mg
- B2_3 de masse 26 mg

La comparaison par CCM des trois sous fractions avec des témoins de glucose et de saccharose montre que ces fractions sont constituées majoritairement de sucres. En conséquence, la détermination structurale de ces constituants n'est pas poursuivie.

2.3. CONCLUSION

L'extraction et le fractionnement de l'extrait méthanolique de la poudre sèche de partie aériennes de *Thalia geniculata* ont fourni deux extraits (**A** et **B**). L'isolement des constituants par les méthodes chromatographique et de recristallisation a permis d'obtenir quatre composés. L'extrait **B** est constitué de sucres. Les étapes de la purification sont indiquées sur le schéma 6.

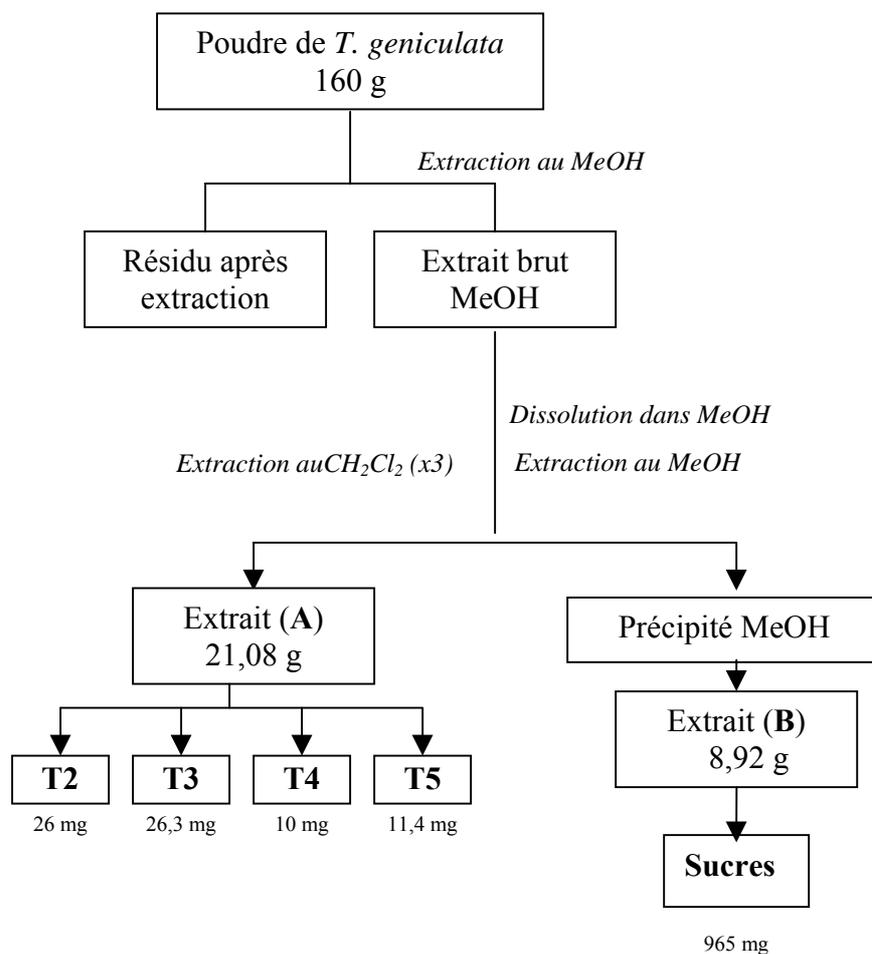


Schéma 9 : Différentes étapes du fractionnement

3. CARACTERISATION CHIMIQUE DES COMPOSES ISOLEES

La purification de l'extrait méthanolique de *Thalia geniculata* nous a permis d'isoler cinq composés. Dans cette partie de notre travail, nous présentons les essais de caractérisation permettant de déterminer à quelle famille chimique appartient chacun des composés isolés, facilitant ainsi la détermination future de leur structure.

La CCM récapitulative sur plaque de gel de silice F₂₅₄, avec comme révélateur la vanilline sulfurique suivi d'un chauffage de la plaque, montre une coloration bleue violacée pour ces quatre composés. Cette coloration, l'aspect physique des composés, leur solubilité, nous amènent à penser qu'il s'agit de stéroïdes ou de terpénoïdes. Nous avons donc privilégié les tests caractéristiques des stéroïdes, des terpènes ainsi que les tests vérificatifs des composés azotés et alcaloïdes.

Quatre essais caractéristiques des stérols, des saponines, des composés azotés et des hétérosides à génine stéroïdique ont été réalisés sur chacun des composés. (Tableau 26). Notons que ces différents tests ne sont pas spécifiques, mais uniquement indicatifs quant aux familles chimiques auxquelles appartiennent ces composés. Les spectres RMN permettront ultérieurement de réaliser les déterminations structurales précises.

Tests Composés	SbCl (Stéroïdes)	Anisaldéhyde (Stéroïdes)	Meyer (Composés Azotés)	Dragendorff (Composés Azotés)
T2	-	-	-	-
T3	+	+	-	-
T4	+	+	-	-
T5	+	+	-	-

Tableau 26 : résultats des tests de caractérisation chimique

Au vu de ces résultats, nous déduisons que les composés **T2**, **T3**, **T4** sont des dérivés stéroïdiques alors que le composé **T2** pourrait être de nature terpénique.

4. ELUCIDATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES

4.1. Elucidation structurale du composé T2

f- Propriétés physicochimiques

- Huile jaune verdâtre
- Rf : 0,2 dans le système Cyclohexane/dichlorométhane (10:90)
- Coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique (+ t°)

e- RMN proton (¹H) de T2

(300 MHz; CHCl₃-d)

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux, les constantes de couplages et les corrélations ²⁻³J sont présentés dans le tableau 27.

H	δH (ppm)	signal	J (Hz)
1	4,12	d	6,78
2	5,39	t	6,42 (Z)
3	---	---	---
4	2,03– 1,98	m	
5	2,03– 1,98	m	
6	5,08	t	6,42
7	---	---	---
8	2,03 – 1,98	m	
9	2,03 – 1,98	m	
10	5,08	t	6,42
11	---	---	
12	2,03 – 1,98	m	
13	2,03 – 1,98	m	
14	5,08	t	6,42
15			
16	2,03– 1,98	m	
17	2,03– 1,98	m	
18	5,08	t	6,42
19			
20	1,23	s	
21	1,61	s	
22	1,61	s	
23	1,61	s	
24	1,61	s	
25	1,23	s	

Tableau 27 : Données RMN ¹H du composé T2

f- RMN carbone (^{13}C) de T2

(300 MHz; $\text{CHCl}_3\text{-d}$)

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux sont présentés dans le tableau 28.

Positon	δC (ppm)	Positon	δC (ppm)
1	59,3	14	124,17
2	123,21	15	134,85
3	139,76	16	39,62
4	39,48	17	29,61
5	26,24	18	124,32
6	123,68	19	131,17
7	135,33	20	25,61
8	39,48	21	16,21
9	26,58	22	15,92
10	124,11	23	15,94
11	134,91	24	15,94
12	39,62	25	17,59
13	26,69		

Tableau 28 : Données RMN ^{13}C du composé T2

g- Spectre de masse de T2

Le spectre de masse réalisé en electrospray ionisation (ESI) donne un pic moléculaire m/z à 359,3308 correspondant à la masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ et un pic moléculaire à m/z 341,3203 qui correspond à la masse $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (figure 36). Ces pics moléculaires correspondent à un poids moléculaire de 358 et une formule brute de $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}$.

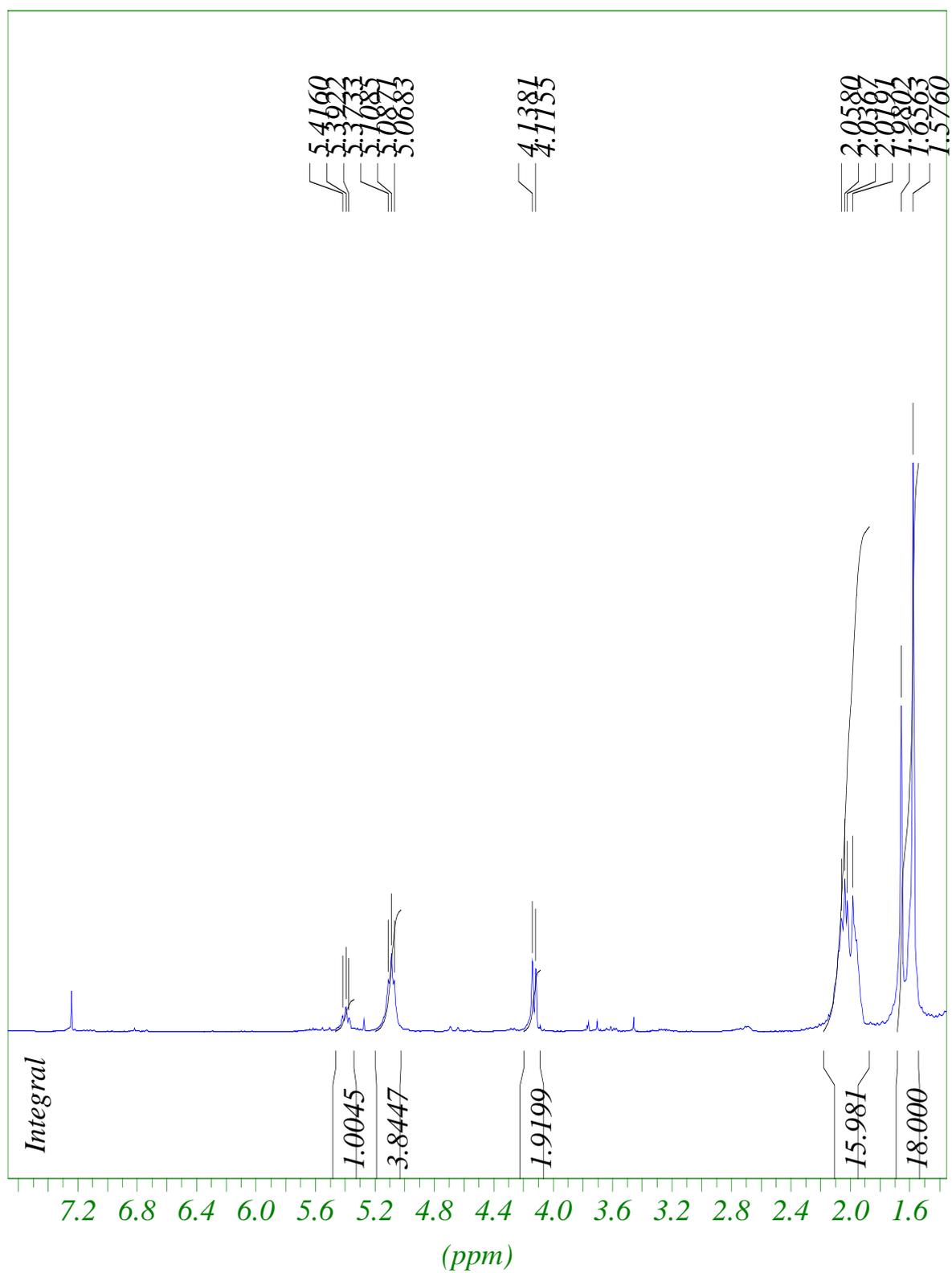


Figure 38 : Spectre RMN ^1H (300MHz) de T2 dans le $\text{CHCl}_3\text{-d}$

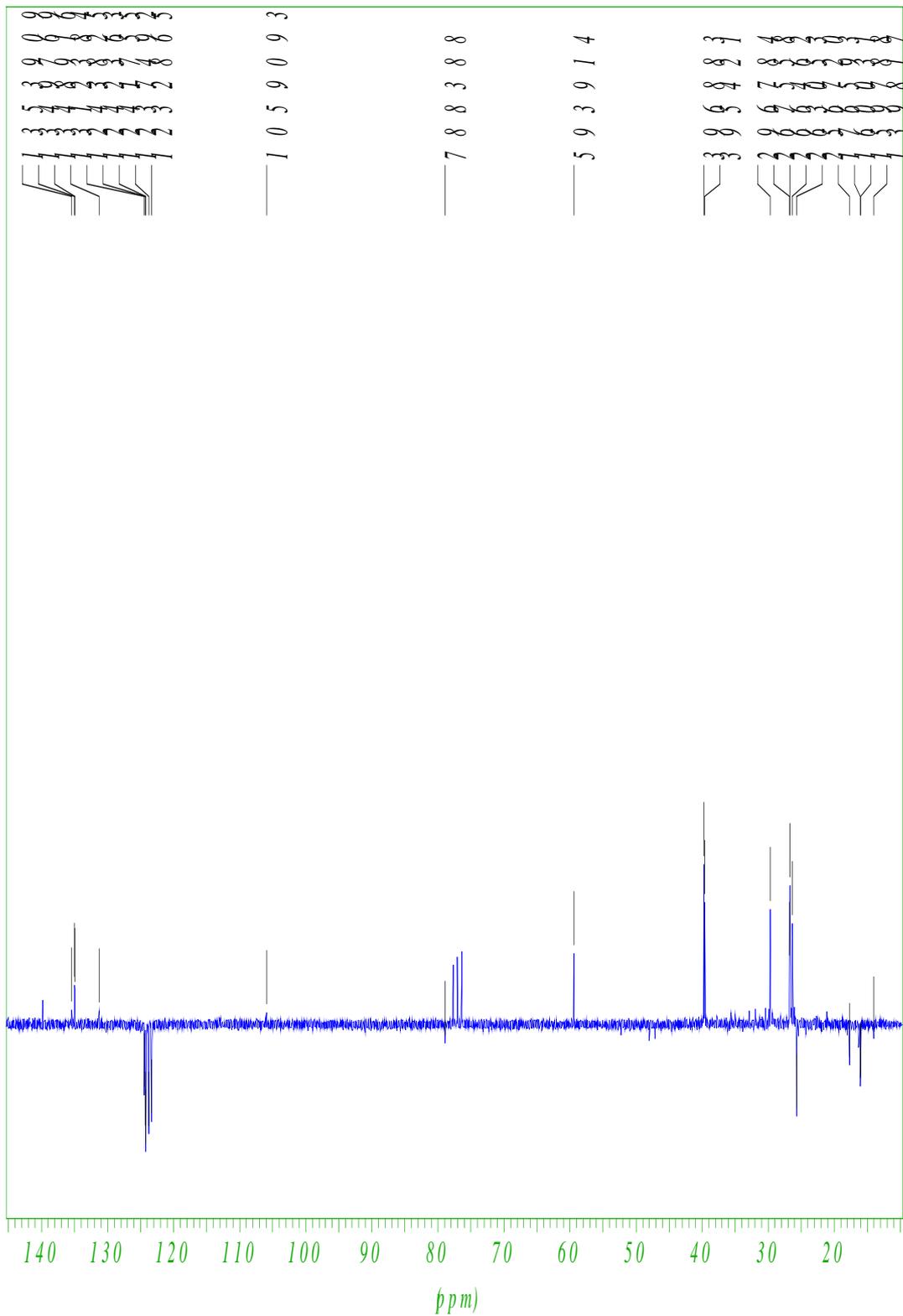


Figure 39 : Spectre RMN ¹³C (300MHz) de **T2** dans le CHCl₃-d

CNRS-FR2351 Spectrometrie de masse ULP-Strasbourg

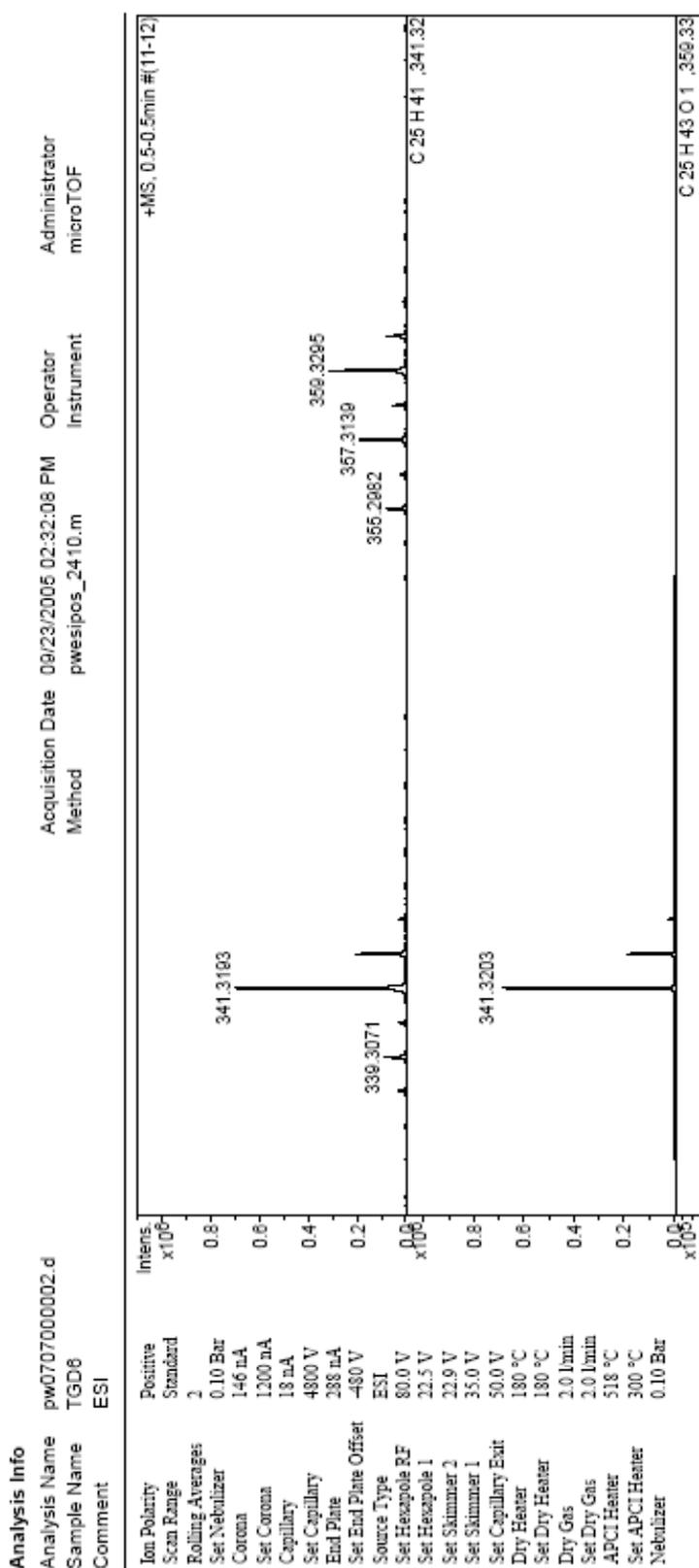
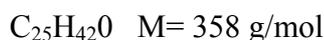
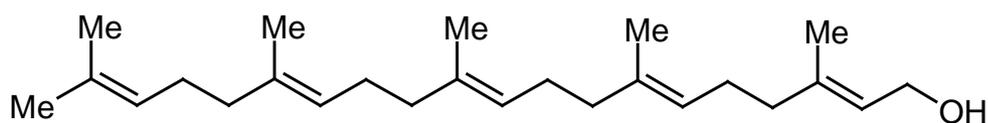


Figure 40 : spectre de masse de T2

Le spectre RMN du proton montre deux singulets à 1,65 ppm et 1,57 ppm. Ces deux signaux indiquent la présence de groupements méthyles liés à des carbones quaternaires éthyléniques. L'intégration des deux pics donne 18 protons soit 6 groupements -CH₃. Les signaux à 5,39 ppm et 5,08 ppm correspondent à quatre protons oléfiniques (J = 6,42) avec un groupement -CH₂ en alpha (C=CH-CH₂-). Cette constante de couplage indique une conformation trans au niveau des doubles liaisons. Le doublet à 4,13 ppm correspond à un proton porté par un carbone en alpha d'un groupement hydroxyle. La constante de couplage de 6,78 indique que nous avons deux protons en position vicinale. Le signal à 2,03 ppm montre un triplet dédoublé qui correspond aux protons adjacents à des groupes fonctionnels insaturés de types -C=CH-CH₂-. Le signal étant dédoublé, on pourrait pensé à deux groupements -CH₂ en chaîne soit =CH-CH₂-CH₂-.

En intégrant les signaux du spectre proton, le signal à 5,08 ppm donne 4 protons soit quatre systèmes C=CH-CH₂-CH₂. Le signal à 4,13 ppm donne 2H correspondant à deux protons liés au carbone qui porte le groupement hydroxyle (-CH₂-OH). Le signal entre 2,03 ppm et 1,98 ppm donne 16 H qui correspondent aux huit carbones secondaires (-CH₂) liés au carbones éthyléniques.

L'analyse du spectre carbone (¹³C Jmod) indique la présence de cinq carbones quaternaires respectivement à 131,2 ppm, 134,8 ppm, 134,9 ppm, 135,3 ppm, 139,8 ppm et la présence de cinq carbones tertiaires -CH entre 123,2 ppm et 124,3 ppm. Ces dix signaux entre 123,2 ppm et 139,8 ppm correspondent à 5 doubles liaisons. Ces données nous amènent à conclure que le composé T2 correspond au 3, 7, 11, 15, 19-pentaméthyl-2, 6, 10, 14, 18-eicosapentaèn-1-ol encore appelé géranylfarnésol. Les données obtenues sont comparables à celles de la littérature (Akihisa et al., 1999).



3, 7, 11, 15, 19-pentaméthyl-2, 6, 10, 14, 18-eicosapentaèn-1-ol (géranylfarnésol)

4.2. ELUCIDATION STRUCTURALE DU COMPOSE T3

a- Propriétés physicochimiques

- Aiguilles blanches
- Rf : 0,45 dans le système dichlorométhane/méthanol (99 : 1)
- Coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique + chauffage

b- RMN proton (^1H) de T3

(300 MHz; $\text{CHCl}_3\text{-d}$)

Les déplacements chimiques, les attributions des signaux et les constantes de couplages sont présentés dans le tableau 29.

Position	δH (ppm)	Position	δH (ppm)
1	1,84; m	15	1,57
2	1,80. m	16	1,25
3	3,52 ; m	17	1,18
4	2,33; m	18	0,67; s
5	---	19	0,98 ; s
6	5,35; d	20	2,02; m
7	1,96	21	1,01
8	1,45	22	5,15
9	0,94	23	5,04; dd
10	---	24	1,51 ; m
11	1,50	25	0,80 ; m
12	2,02	26	0,83; d ; 6,24
13	---	27	0,86
14	1,03	28	0,79
		29	0,79

Tableau 29: Données RMN ^1H de T3

c- RMN carbone (^{13}C) de T3

(300 MHz; $\text{CHCl}_3\text{-d}$)

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux sont présentés dans le tableau 30.

C	δC (ppm)	C	δC (ppm)
1	37,2	15	24,28
2	31,65	16	28,24
3	71,79	17	56,03
4	42,29	18	11,84
5	140,74	19	19,39
6	121,70	20	40,48
7	31,93	21	21,20
8	31,88	22	138,30
9	50,11	23	129,26
10	36,48	24	50,14
11	21,06	25	31,88
12	39,75	26	19,80
13	42,29	27	19,02
14	56,75	28	25,81
		29	11,96

Tableau 30: Données RMN ^{13}C de T3

Le spectre RMN du proton (1H) présente une série de pics très denses dans l'intervalle 0,67 ppm à 2,27 ppm. Ceci suppose la présence d'un nombre élevé de carbones primaires, secondaire et tertiaires (CH_3 , CH_2 et CH) dans la chaîne carbonée de la molécule. Ce spectre est caractéristique des dérivés stéroïdiques. Le triplet observé à 3,52 ppm correspond à un proton porté par un carbone en alpha d'un groupement hydroxyle. Le signal à 5 ppm et 5,35 ppm, correspond aux déplacements chimiques de proton éthyléniques.

Le spectre carbone montre un carbone quaternaire à 140,74 ppm, et trois carbones éthyléniques à 138,30 ppm, 129,26 ppm et 121,70 ppm. Ces signaux correspondent à deux doubles liaisons. La présence de ces quatre signaux suppose que la molécule comporte au moins deux doubles liaisons non équivalentes. Le signal à 71,79 indique la présence d'un groupement hydroxyle ($-OH$). Ce spectre met en évidence six groupements $-CH_3$, onze groupements $-CH$ et un carbone quaternaire.

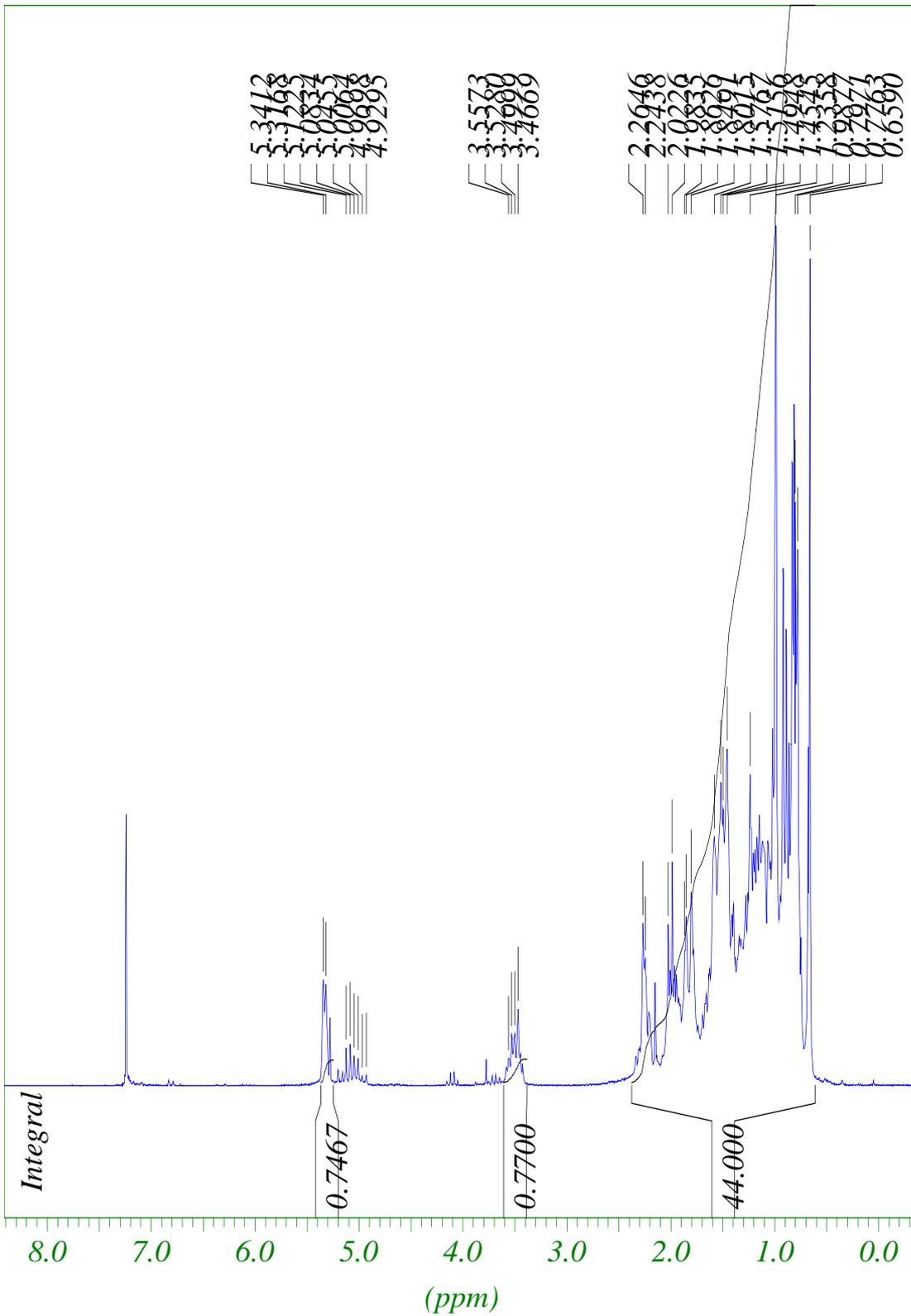


Figure 41 : spectre RMN ¹H de T3

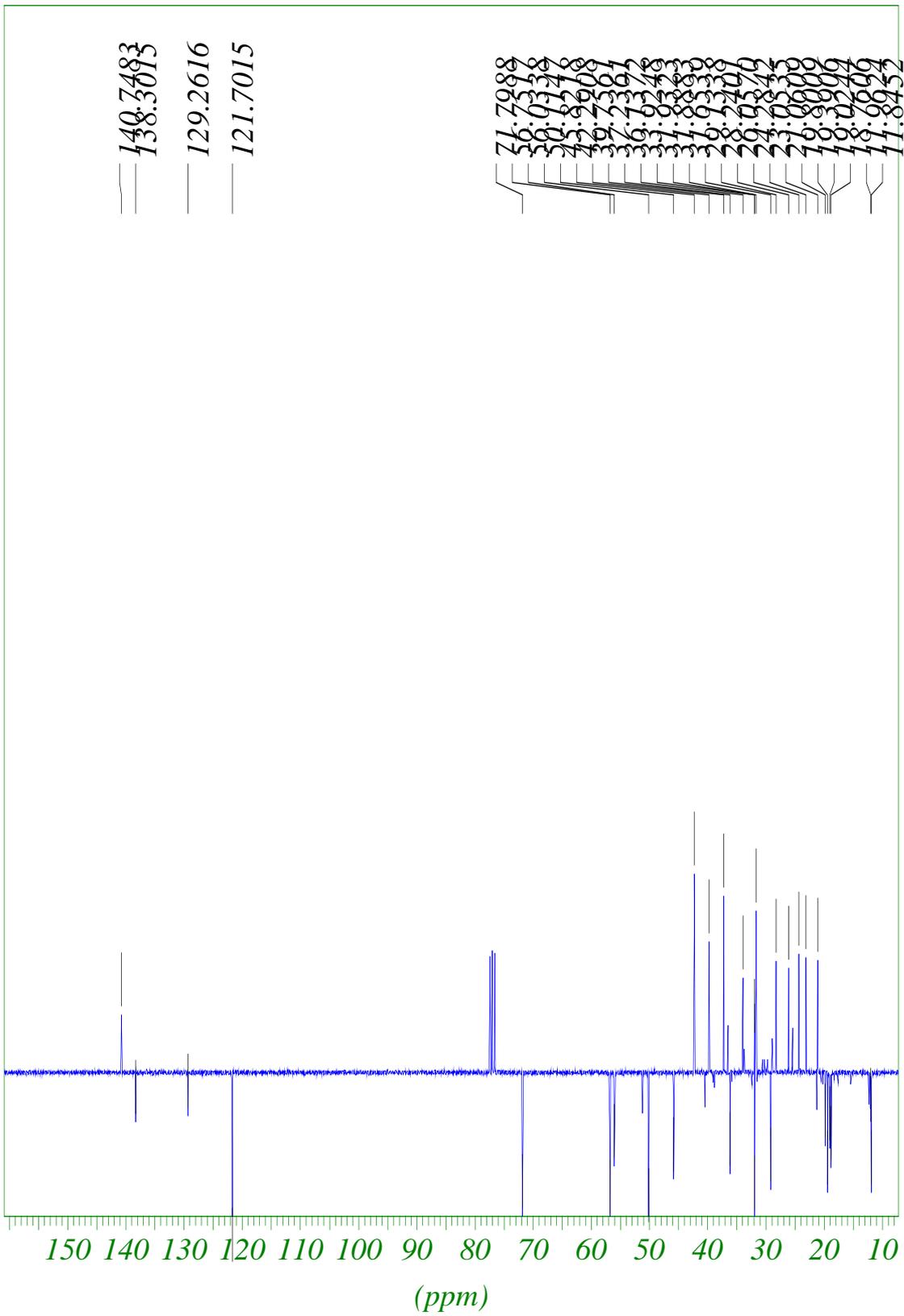


Figure 42 : spectre RMN ¹³C de T3

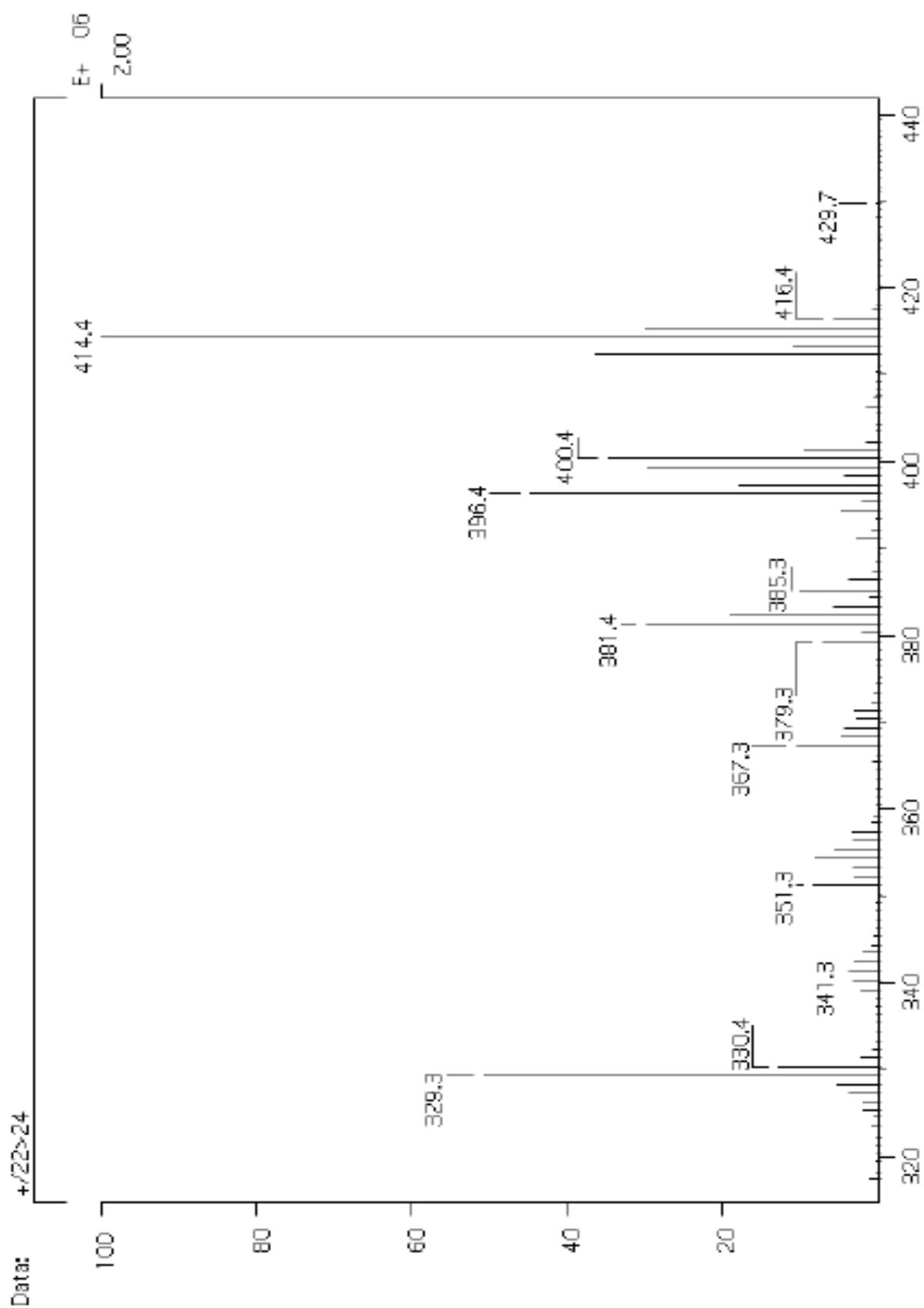


Figure 43 : spectre de masse de T3

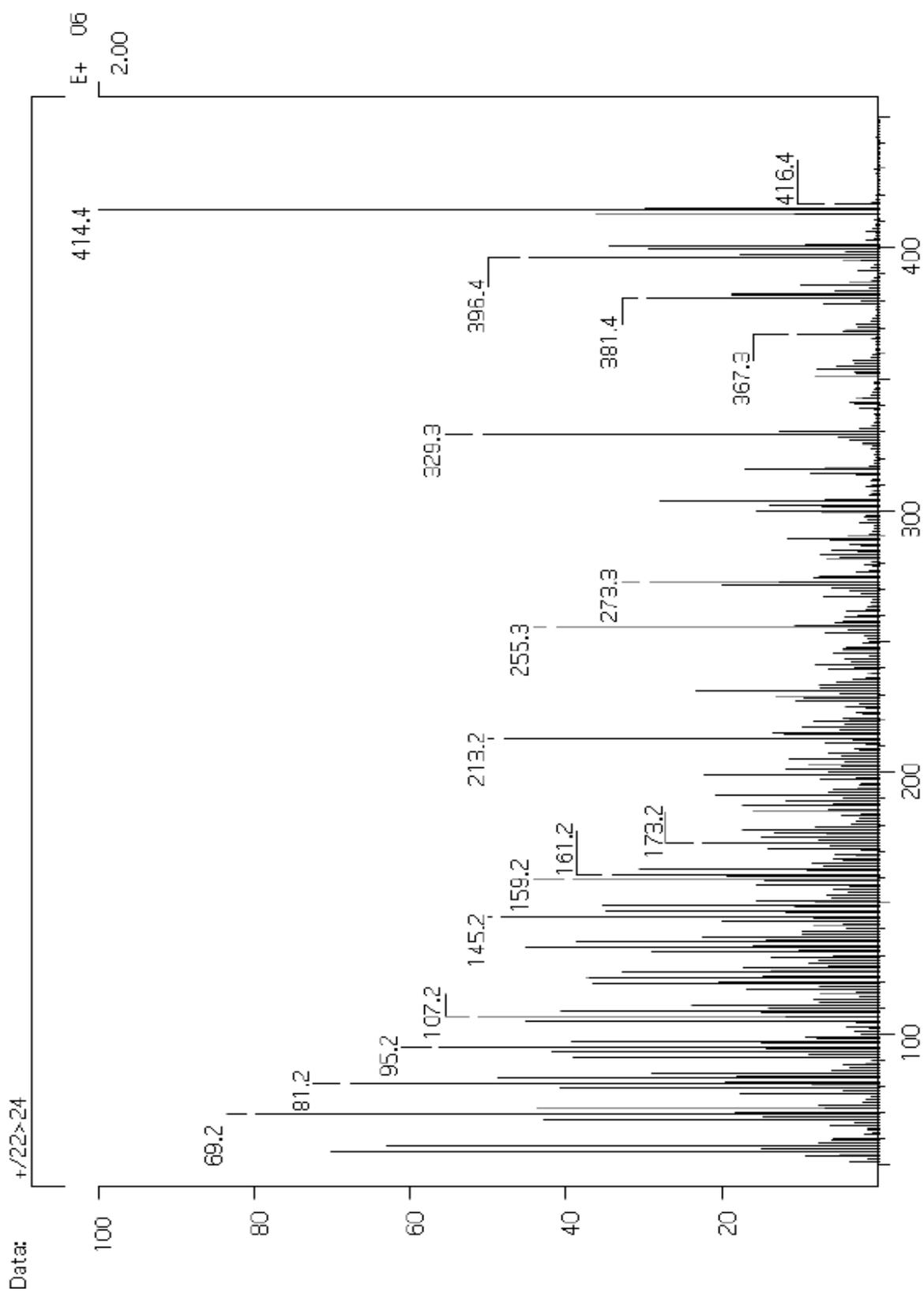


Figure 44: spectre de masse de T3

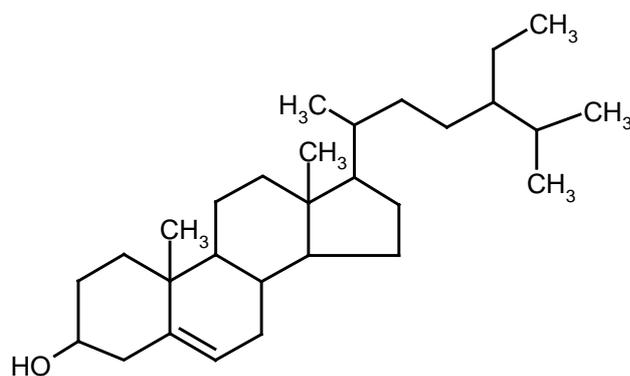
h- Spectre de masse du composé T3

(Voir figure 43 et 44)

Le spectre de masse réalisé en impact électronique (IE) donne les fragments suivants :

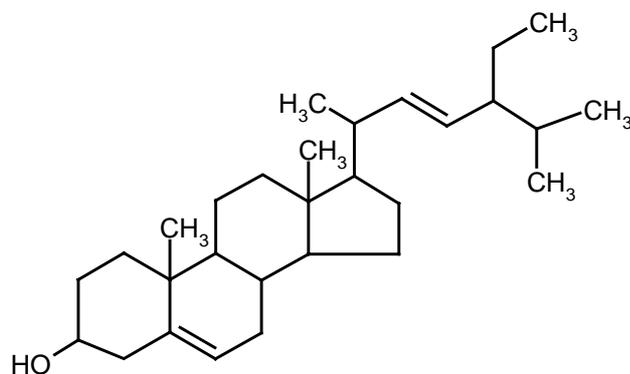
414 (100) [M], 412 (50) [M-2] : isomère déshydrogéné (le stigmastérol), 396 (50) [M-H₂O] : perte d'une molécule d'eau par la molécule soit une masse molaire de 414 g/mol et une formule brute de C₂₉H₅₀O.

Ces données ont permis de déterminer que le composé T2 est un mélange de stigmastérol et de son isomère déshydrogéné en position 22 et 23, β-sitostérol comme rapporté précédemment dans la littérature (Wanchai et al., 2003 ; Khalil and Idler, 1980).



C₂₉H₅₀O M = 414 g/mol

β-sitostérol



C₂₉H₄₈O M = 412 g/mol

stigmastérol

4.3. ELUCIDATION STRUCTURALE DU COMPOSE T4

a- Propriétés physicochimiques

- Cristaux blancs huileux
- Rf : 0,15 dans le système dichlorométhane/méthanol (95 : 5)
- Coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique (+ t°)

b- RMN proton (¹H) et carbone (¹³C) de T4

(500 MHz; CHCl₃-d, voir figure 45, 46)

Les déplacements chimiques, les attributions des signaux et corrélations ²⁻³J sont présentés dans le tableau 31.

	δH	δC (ppm)	² J- ³ J HMBC corrélations
1	1,84; 1,04	37,15	C-19, C-2, C-10, C-3
2	1,92-1,95	29,62	
	1,30-1,48		
3	3,53	79,52	
4	2,36-2,26	38,79	C-2 ; C-3 ; C-6 ; C-5 ; C-10
5	---	140,18	
6	5,36-5,35	122,00	C-4, C-5, C-7 ; C-10
7	1,54-1,59	31,80	C-5, C-6, C-8, C-9, C-14
	1,95-2,02		
8	1,43-1,48	31,74	
9	0,89-0,99	50,05	
10	---	36,58	
11	1,44-1,56	20,94	
12	1,18	39,65	C-18 ; C-11, C-13, C-9, C-14
	2,00-2,06		
13	---	42,21	
14	0,98	56,64	
15	1,15 ; 1,57	24,84	
16	1,72 ; 1,84	28,11	C-13, C-17

Tableau 31: Données RMN ¹H, ¹³C et les corrélations ²J et ³J (HMBC) de T4

	δH	δC (ppm)	2J - 3J HMBC corrélations
17	1,09-1,17	56,00	
18	0,67 ; s	11,72	C-12, C-13, C-14, C-17
19	1,02 ; s	19,68	C-1, C-4, C-5, C-9, C-10
20	1,43	36,03	
21	0,92 ; d	18,65	
22	1,02 ; 1,33	34,13	
23	1,15-1,20	26,02	
24	0,91-0,98	45,71	C-22, C-26, C-27, C-28, C-29,
25	1,64-1,68	29,03	C-22, C-24, C-26, C-27
26	0,85 ; d	19,23	
27	0,85 ; d	18,90	
28	1,21-1,32 ;	22,94	
29	0,86	11,84	
1'	4,37	101,09	
2'	3,35	73,39	$C^{3'}$ _{75,94} ; $C^{1''}$ _{174,39}
3'	3,55	75,94	$C^{4'}$ _{70,11} ; $C^{5'}$ _{73,73} ; $C^{1'}$ _{101,09}
4'	3,38	70,11	$C^{6'}$ _{63,24} ; $C^{3'}$ _{75,94}
5'	3,46	73,73	$C^{4'}$ _{70,11}
6'	4,37	63,24	$C^{5'}$ _{73,73} ; $C^{4'}$ _{70,11} ; $C^{1''}$ _{174,39}
1''	---	174,39	
2''	2,34-2,31	34,13	C-1'' ; C-3'' ; C-4''
3''	1,61	24,84	C-1'' , C-2'' , C-4''
4''	1,25	29,61	
5''	1,25	29,56	
6	1,25	29,56	
7''	1,25	29,56	
8''	1,25		
9''	1,25	29,47	
10	1,25	29,47	
11	1,25	29,26	
12	1,25	29,24	
13	1,25	29,13	
14	1,25	28,11	
15	1,25	22,56	
16	0,87	13,98	

Tableau 31' : Données RMN 1H , ^{13}C et les corrélations 2J et 3J (HMBC) de **T4**

Le spectre proton obtenu pour ce composé est caractéristique des dérivés stéroïdiques. Il indique la présence de deux méthyles tertiaires qui apparaissent sous forme de singulet à 0,67 ppm (H-18) et 1,02 ppm (H-19), trois méthyles secondaires à 0,85 ppm (H-26), 0,84 ppm (H-27) et 0,92 ppm (H-21), deux méthyles primaires à 0,86 ppm (H-29) et 0,87 ppm (H-16''), un proton oléfinique à 5,35 ppm (H-6) ainsi qu'un proton oxygéné à 3,53 ppm (H-3). Les signaux obtenus sur le spectre carbone sont comparables à ceux obtenus avec le composé **T3**. Les signaux à 11,7, 11,8, 18,7, 18,9, 19,2, et 19,7 correspondent aux déplacements chimiques des méthyles. Les signaux obtenus à 122,0, et 140,2 ppm correspondent aux carbones oléfiniques C-6 et au carbone quaternaire C-5.

Les signaux, 3,35; 3,38; 3,46; 3,5 ; 4,35 et 4,37 ppm obtenus, d'une part sur le spectre proton, et 75,9; 73,7; 73,4; 70,1 et 63,2 ppm, d'autre part sur le spectre carbone, correspondent à glucose lié au stérol en position C-3 (corrélations 3J , HMBC H-1'/C-3).

Les signaux à 174,3 et 29,5 ppm sur le spectre carbone, et 1,25 ppm sur le spectre proton, ainsi que les corrélations 3J H-6'/C=O, H-2''/C=O et H-3''/C=O indiquent la présence d'un acide gras saturé lié au glucose par une fonction ester en position C-6.

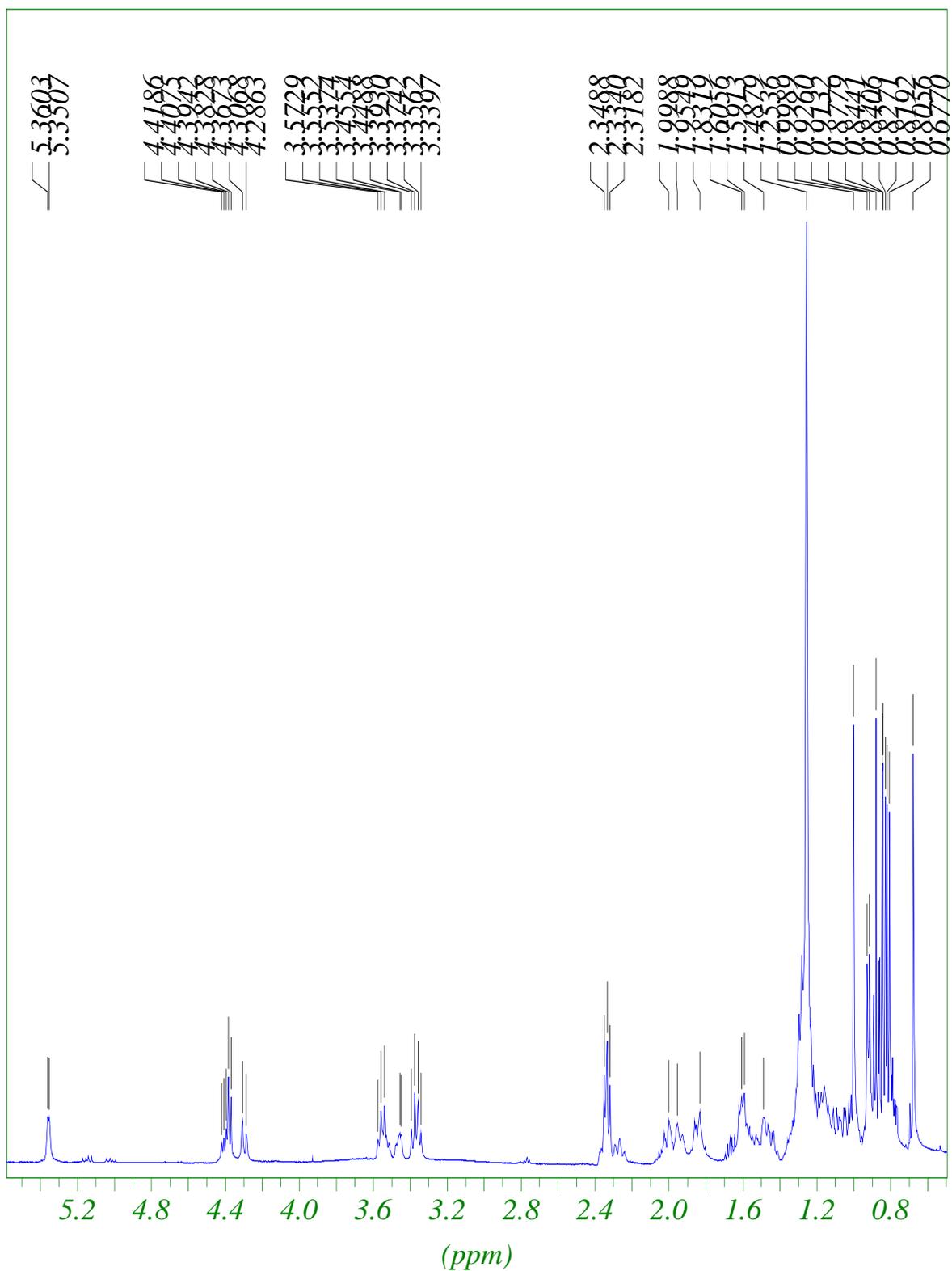


Figure 45 : Spectre RMN ^1H (500MHz) de T4

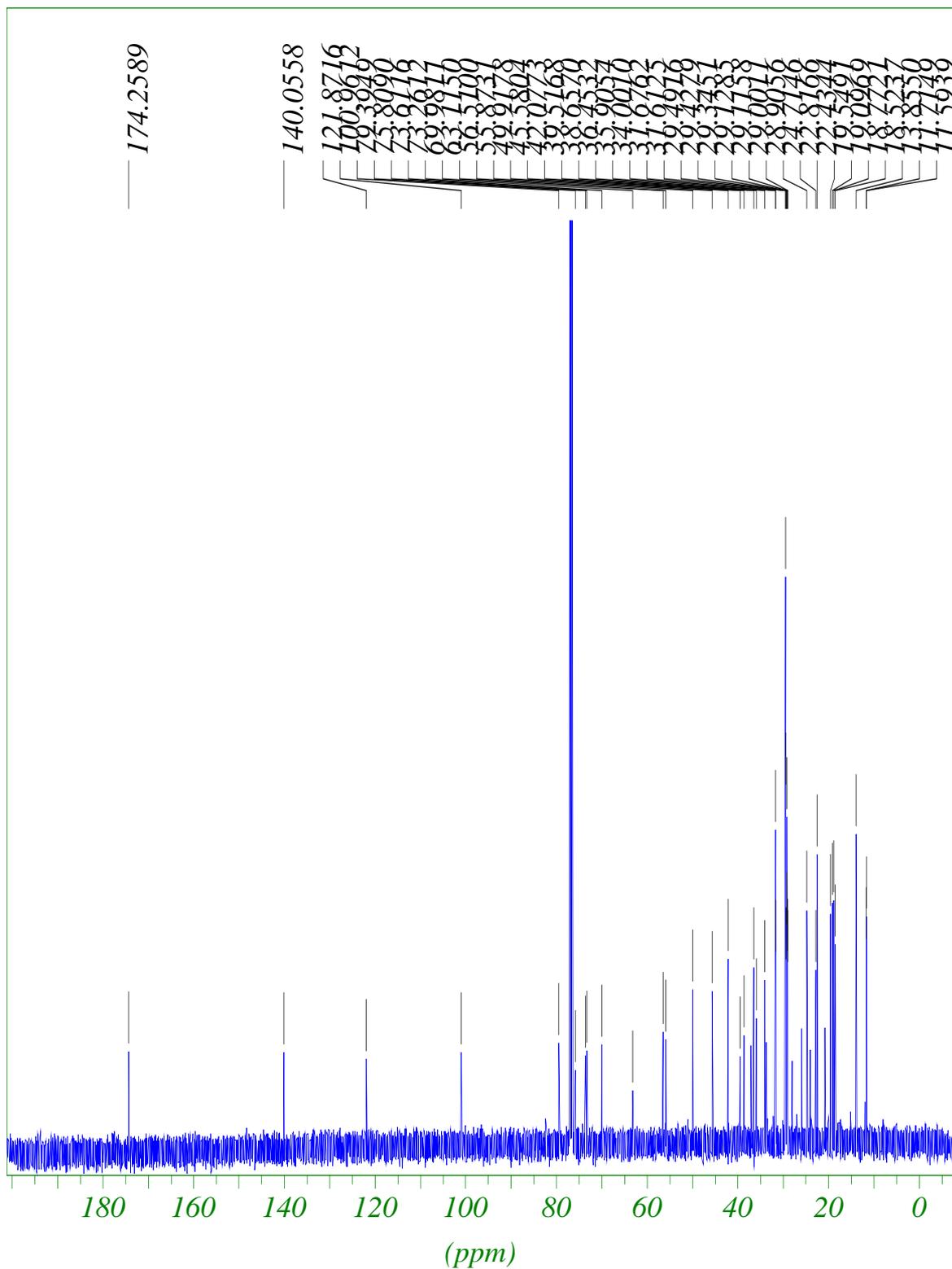


Figure 46 : Spectre RMN carbone (^{13}C) à 500MHz de T4

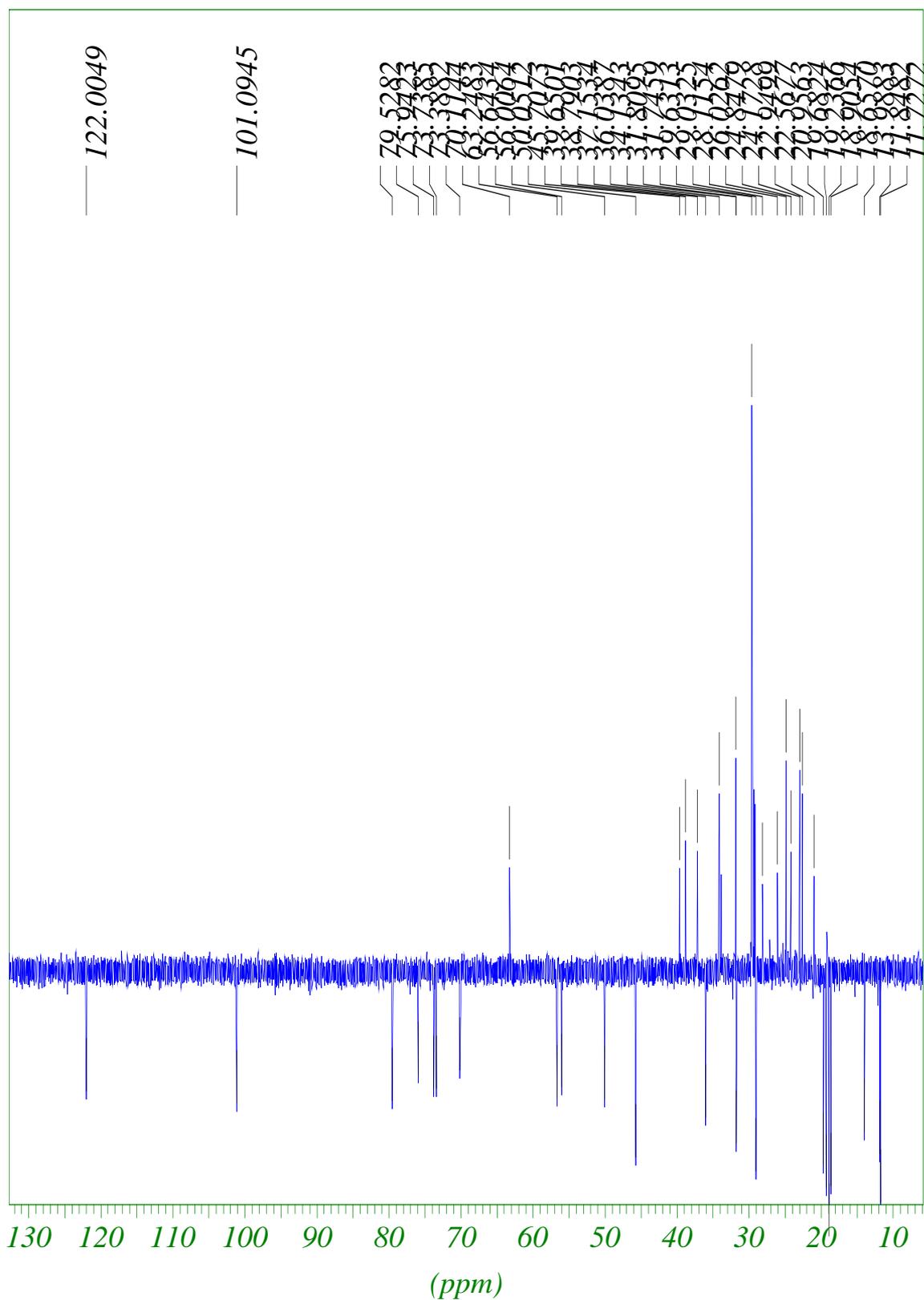


Figure 47 : Spectre RMN ^{13}C (DEPT) à 500MHz de T4

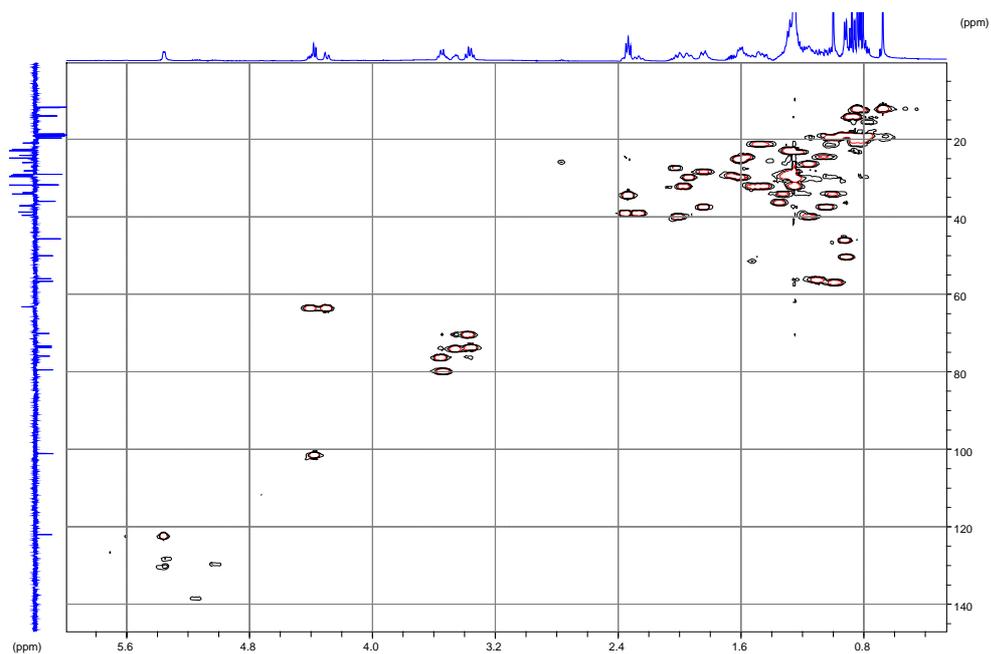


Figure 48 : spectre HSQC $C-H$ à 500MHz de T4

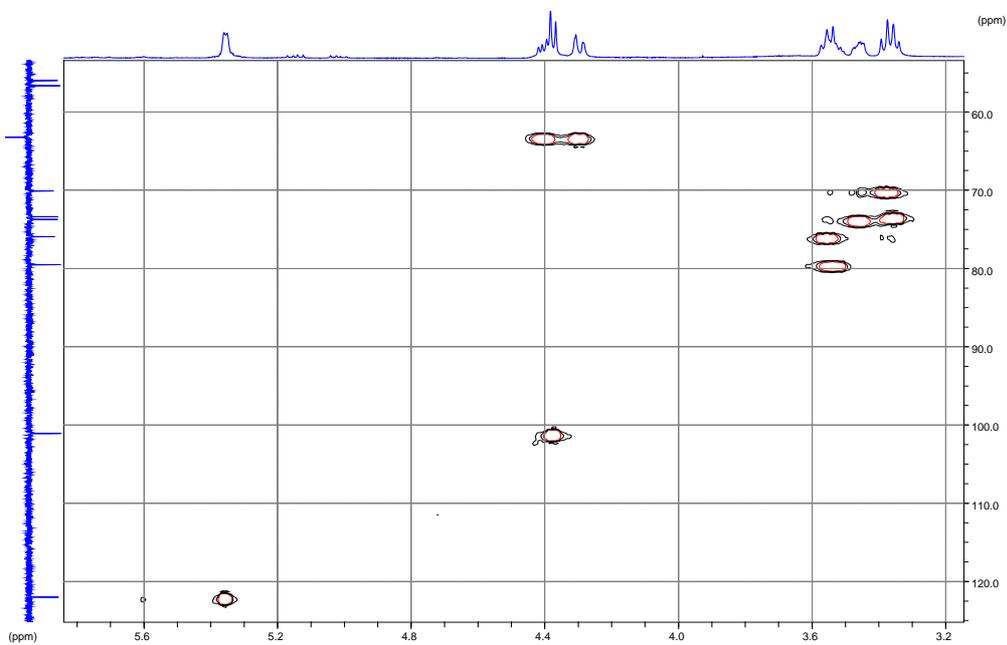


Figure 49 : spectre HSQC $C-H$ à 500MHz de T4

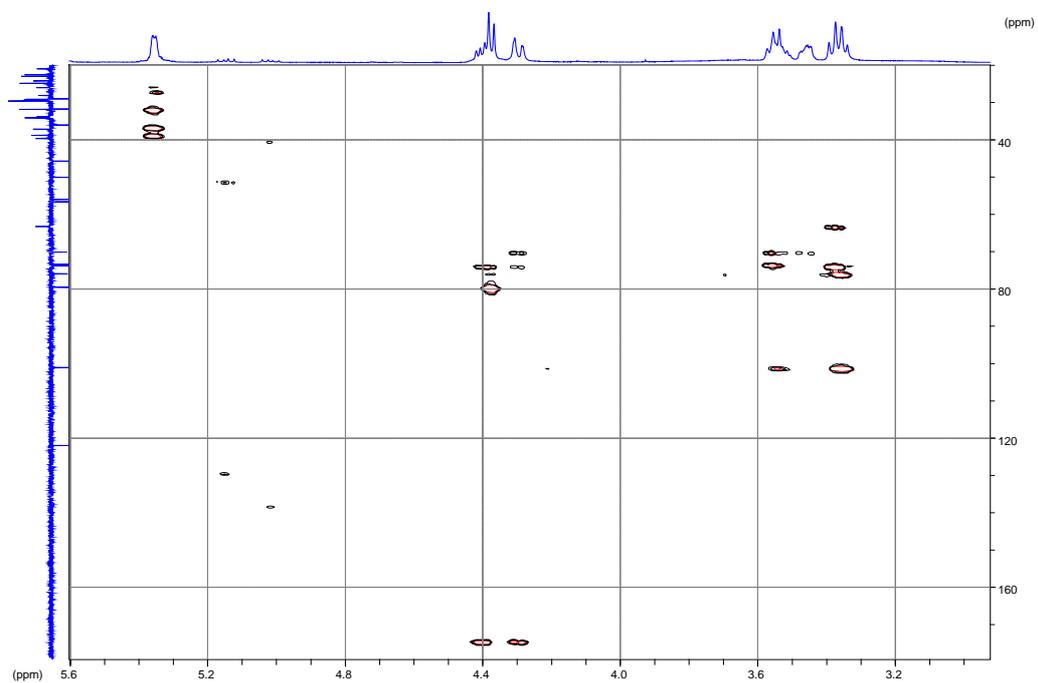


Figure 50 : Spectre HMBC ^{2-3}J à 500MHz de T4

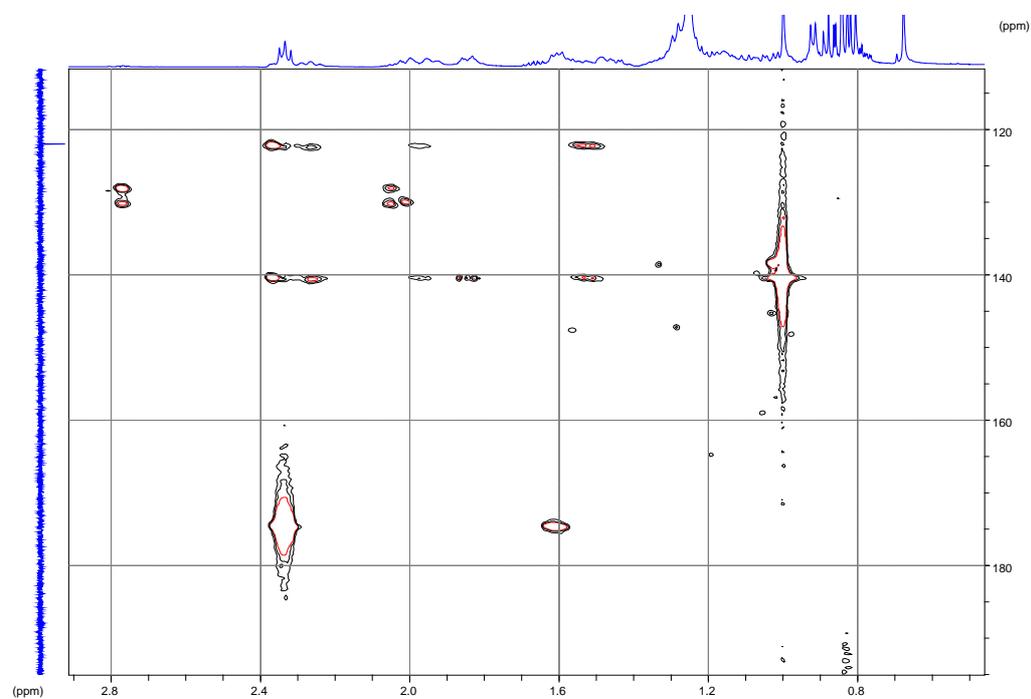
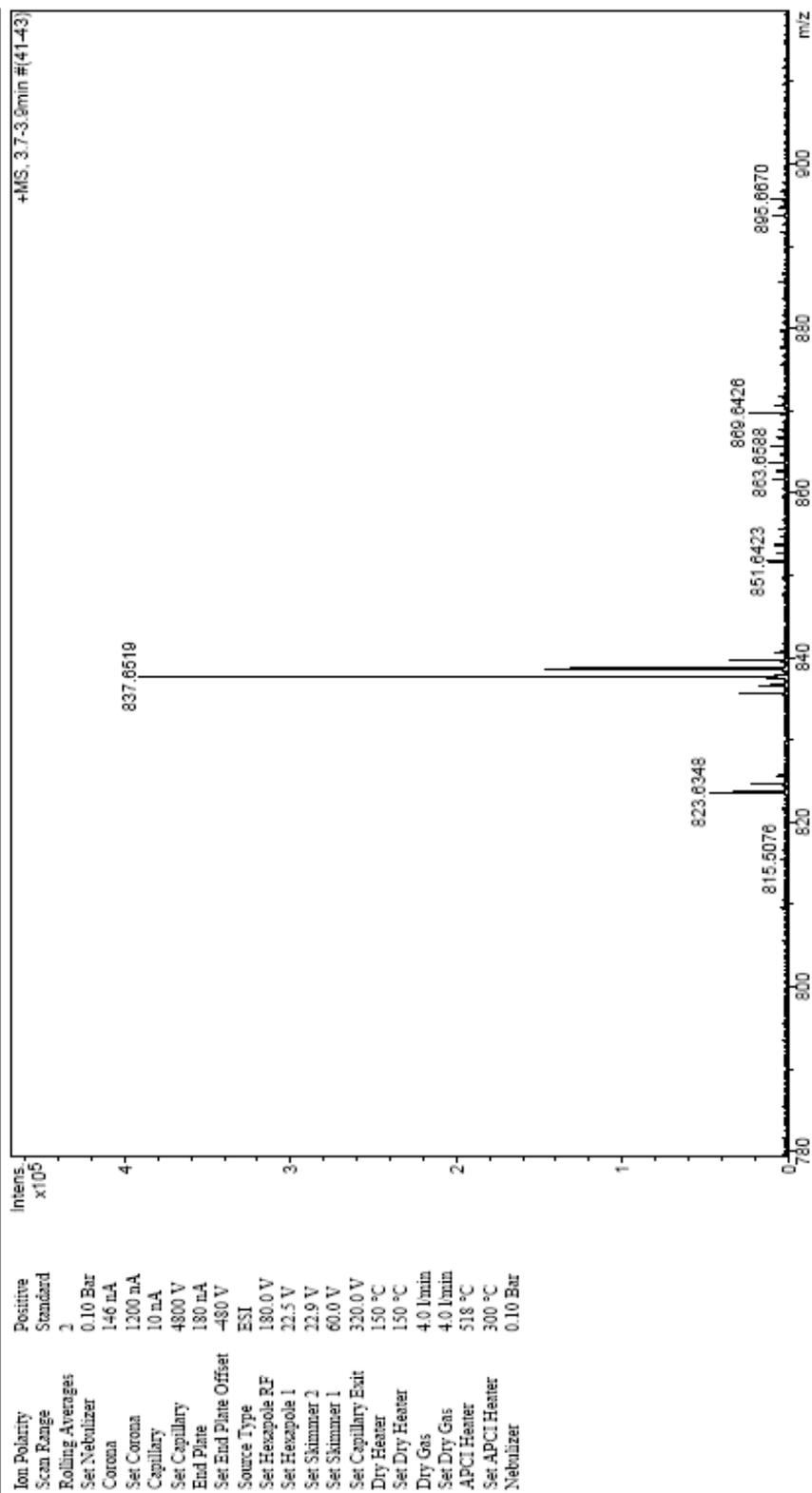


Figure 51 : Spectre HMBC ^{2-3}J à 500MHz de T4

CNRS-FR2351 Spectrometrie de masse ULP-Strasbourg

Analysis Info
 Analysis Name: pw0634000002.d
 Sample Name: F10
 Comment:
 Acquisition Date: 09/27/2005 08:40:48 PM
 Method: pweispos.m
 Administrator: microTOF



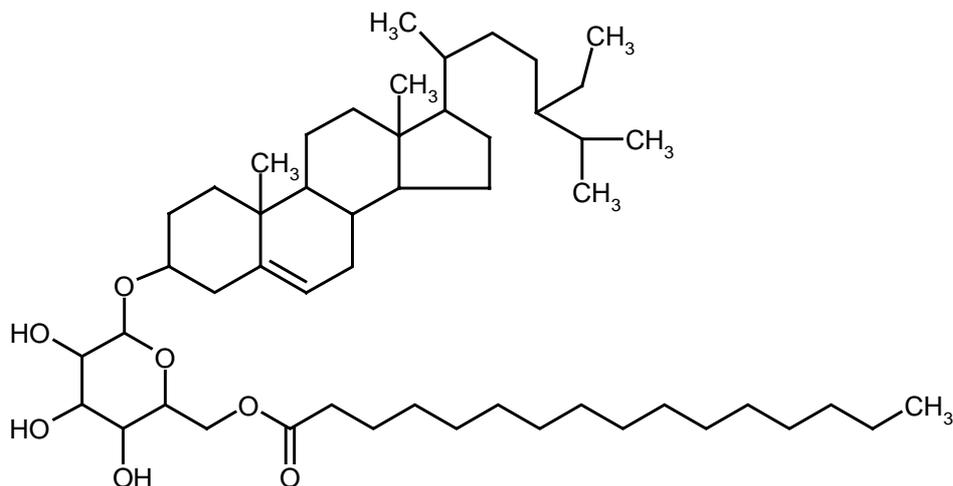
Ion Polarity: Positive
 Scan Range: Standard
 Rolling Averages: 2
 Set Nebulizer: 0.10 Bar
 Corona: 1.46 nA
 Set Corona: 1200 nA
 Capillary: 10 nA
 Set Capillary: 4800 V
 End Plate: 180 nA
 Set End Plate Offset: -480 V
 Source Type: ESI
 Set Hexapole RF: 180.0 V
 Set Hexapole 1: 22.5 V
 Set Skimmer 2: 22.9 V
 Set Skimmer 1: 60.0 V
 Set Capillary Exit: 320.0 V
 Dry Heater: 150 °C
 Set Dry Heater: 150 °C
 Dry Gas: 4.0 l/min
 Set Dry Gas: 4.0 l/min
 APCI Heater: 518 °C
 Set APCI Heater: 300 °C
 Nebulizer: 0.10 Bar

Figure 52 : Spectre de masse du composé T4

c- Spectre de masse du composé T4

(microTOF, ESI ; mode positif)

L'analyse réalisée en spectrométrie de masse (ESI) donne les pics moléculaires à 837 et 823. Ces pics correspondent respectivement aux adduits $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$. En milieu acide, on observe le pic moléculaire à 815 $[M+H]^+$. On observe également un pic moléculaire à m/z 599,1. Ce pic correspond à l'adduit obtenu avec le sodium, après la rupture de la liaison ester. Ces différentes données nous amènent à conclure que le composé T4 correspond au 6-*O*-hexadécanoyl-3-*O*- β -D-glucopyranoside de stigmast-5-ène représentée ci-dessous :



6-*O*-hexadécanoyl-3-*O*- β -D-glucopyranoside de stigmast-5-ène

Sitoindoside I

4.4. ELUCIDATION STRUCTURALE DU COMPOSE T5

a- Propriétés physicochimiques

- Cristaux blancs
- Rf : 0,32 dans le système dichlorométhane/méthanol (90:10)
- Coloration violette après révélation à la vanilline sulfurique (+ t°)

b- RMN ¹H du composé T5

(500 MHz; CHCl₃-d, voir figure 53)

Les déplacements chimiques, les attributions des signaux et corrélations ²⁻³J sont présentés dans le tableau 32.

Position	δH (ppm)	Position	δH (ppm)
1	1,77 ; m	19	1,03 ; s
2	2,12-1,73 ; m	20	1,34-1,42 ; m
3	4,28	21	0,93, d ; J = 8,6
4	2,73-2,47	22	1,38-1,08 ; m
5	---	23	1,23 ; m
6	5,36-5,39	24	0,99 ; m
7	1,53-1,59 ; m	25	1,64-1,68 ; m
8	1,43-1,50 ; m	26	0,84-0,86 ; d ; J = 6,85
9	0,90-0,98 ; m	27	0,86 ; d ; J = 6,85
10	---	28	1,32-1,26 ; m
11	1,42-1,55 ; m	29	0,86
12	1,98-1,09 ; m	1'	5,06 ; d ; J = 7,8
13	---	2'	4,04-4,08 ; m
14	0,97 ; m	3'	4,30-4,27 ; m
15	1,56-1,03 ; m	4'	4,30-4,27 ; m
16	1,83-1,90, m	5'	4,07-3,95 ; m
17	1,11 ; m	6'	4,57-4,41 ; m
18	0,65 ; s	-OH	3,34

Tableau 32 : Données RMN ¹H (500MHz) de T5

c- RMN ¹³C du composé T5 (500 MHz; CHCl₃-d)

Les déplacements chimiques, les attributions des signaux sont présentés dans le tableau 33 (Figure 54).

C	δC (ppm)	C	δC (ppm)
1	37,45	18	11,9
2	30,23	19	19,39
3	78,58	20	36,36
4	39,32	21	18,80
5	140,89	22	34,19
6	121,88	23	26,37
7	32,03	24	46,02
8	32,15	25	29,45
9	50,32	26	19,94
10	36,90	27	19,18
11	21,26	28	23,37
12	39,92	29	12,11
13	42,33	1'	102,55
14	56,80	2'	75,31
15	24,48	3'	78,58
16	28,50	4'	71,68
17	56,22	5'	78,45
		6'	62,82

Tableau 33 : Données RMN ¹³C (500MHz) de T5

L'analyse du spectre proton indique la présence de deux méthyles tertiaires qui apparaissent sous forme de singulet à 0,65 ppm (H-18) et 1,06 ppm (H-19), trois méthyles secondaires à 0,86 ppm (H-26), 0,85 ppm (H-27) et 0,93 ppm (H-21), deux méthyles primaire à 0,87 ppm (H-29) et 0,87 ppm (H-16''), un proton oléfinique à 5.35 ppm (H-6) ainsi qu'un proton oxygéné à 3.53 ppm (H-3). Les signaux à 11,9 ; 12,1 ; 19,0 ; 19,2, 19,4 ; et 19,9 correspondent aux déplacements chimiques des carbones des méthyles. Les signaux obtenus à 121,9, et 140,9 ppm correspondent aux carbones oléfiniques C-6 et au carbone quaternaire C-5.

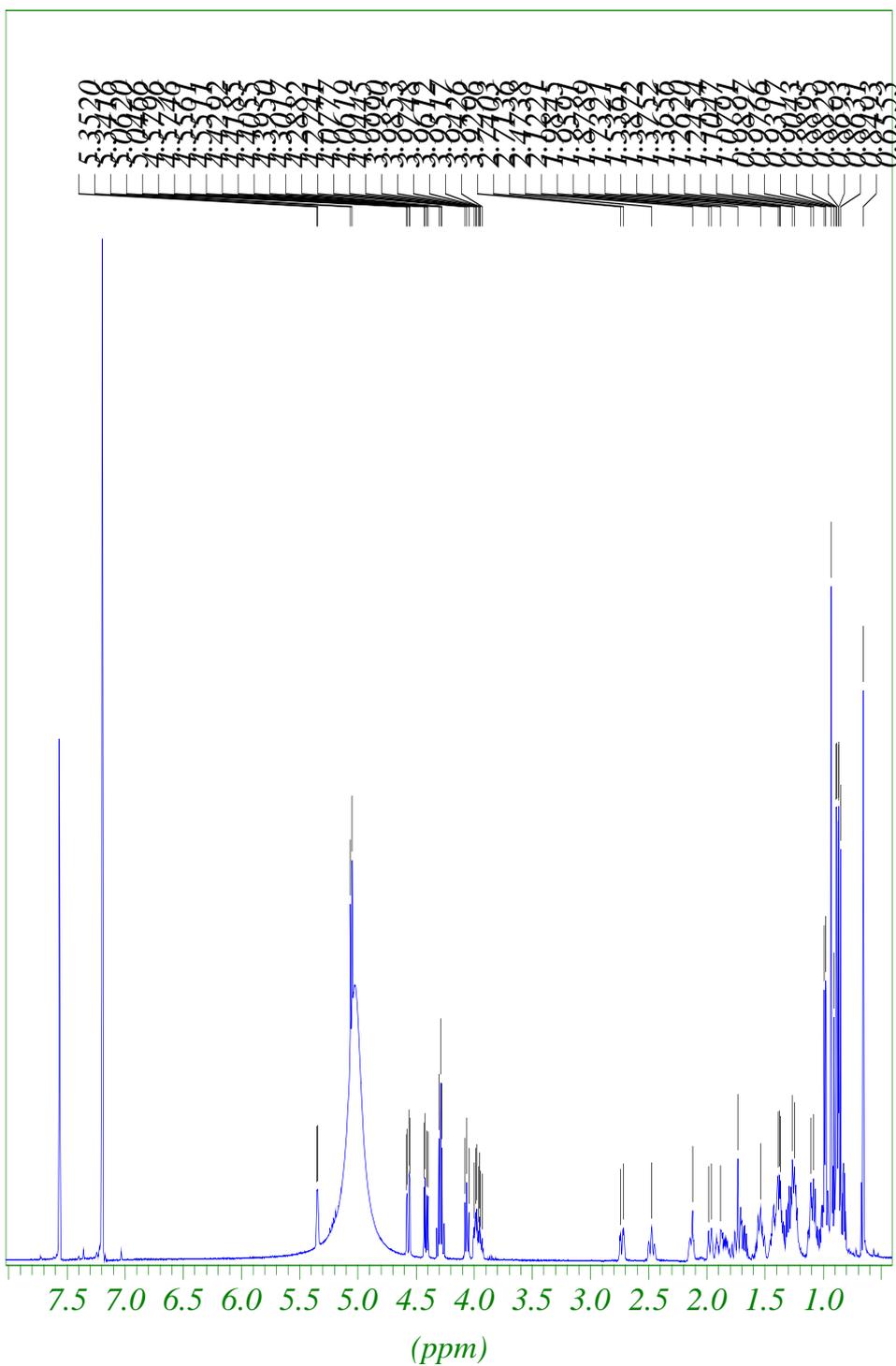


Figure 53 : Spectre RMN ^1H de T5

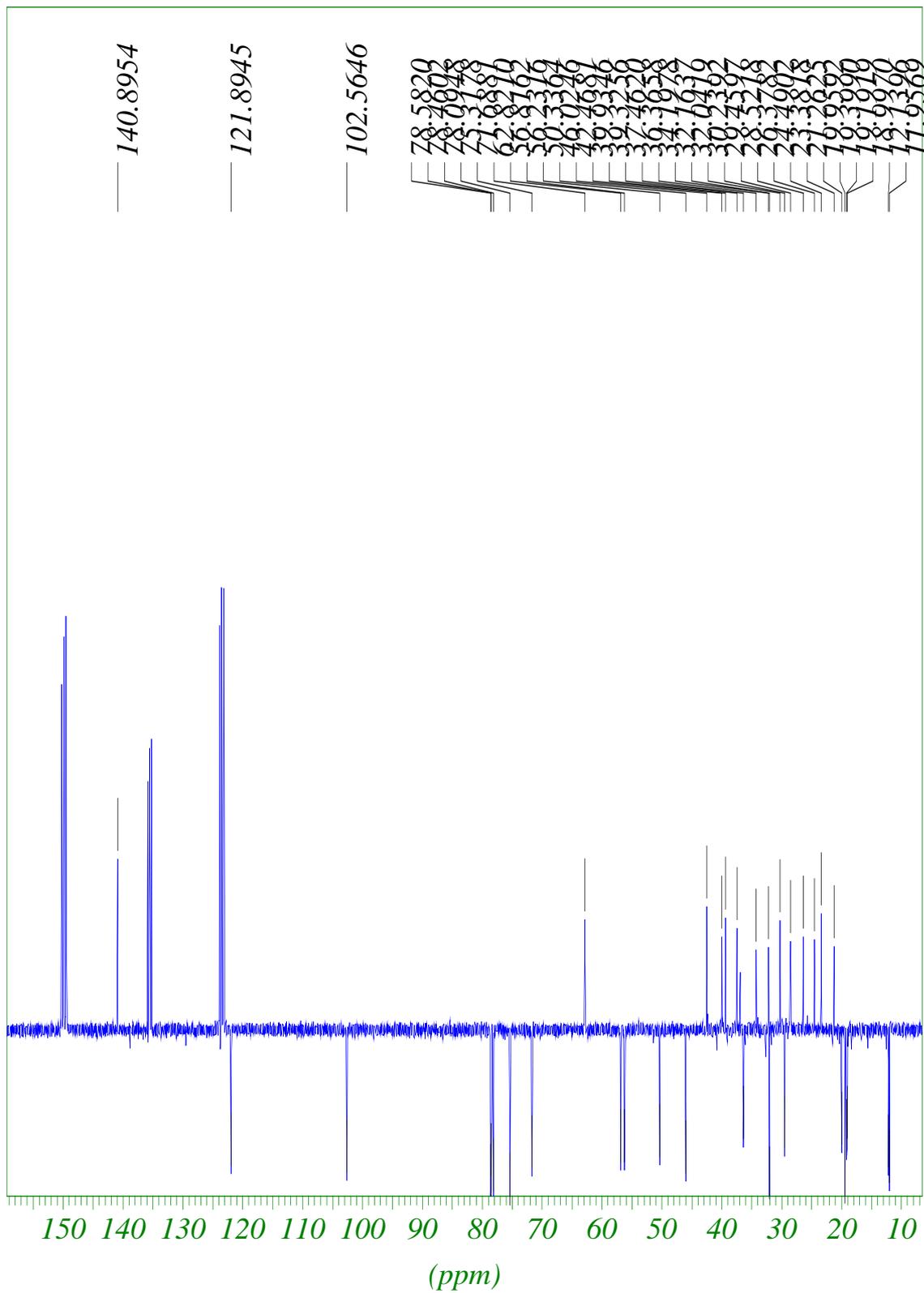


Figure 54 : Spectre RMN ^{13}C DEPT à 500MHz de T5

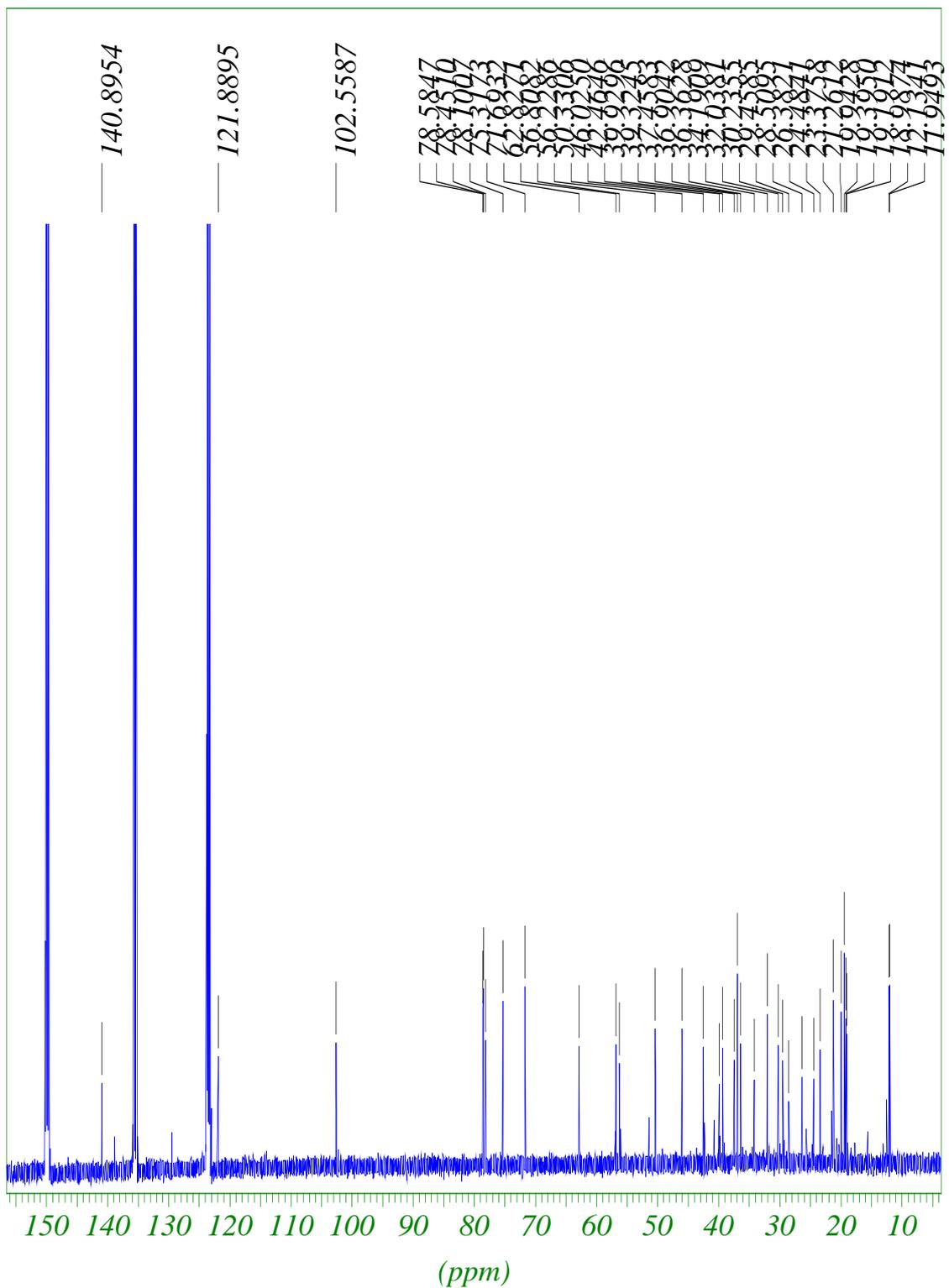


Figure 55 : Spectre RMN carbone (^{13}C) de T5

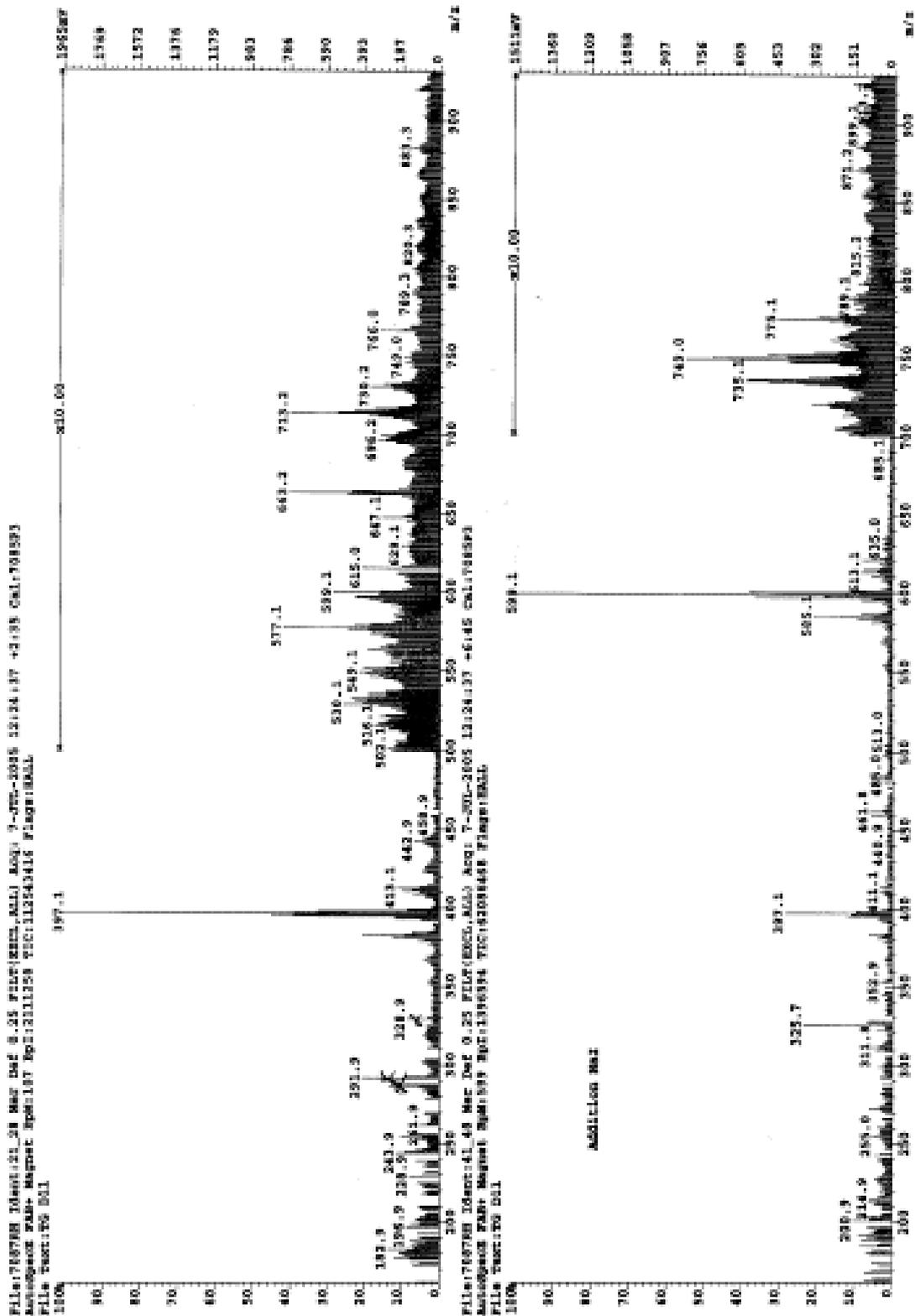


Figure 56 : Spectre de masse de T5

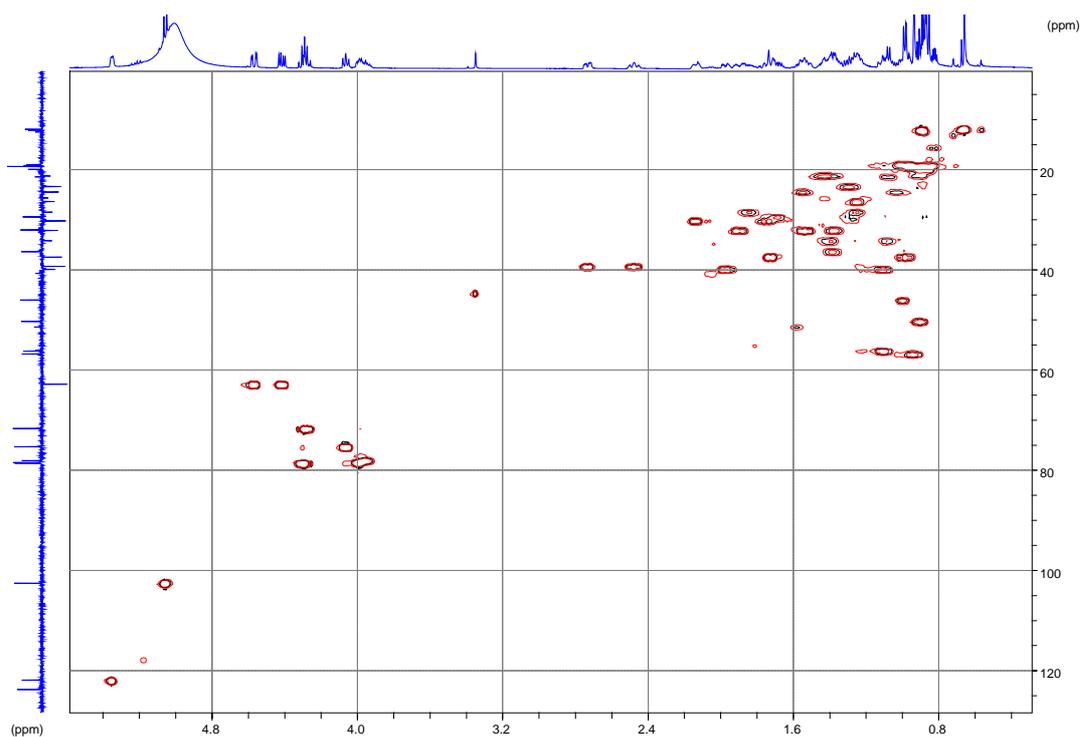


Figure 57 : Spectre RMN HSQC de T5

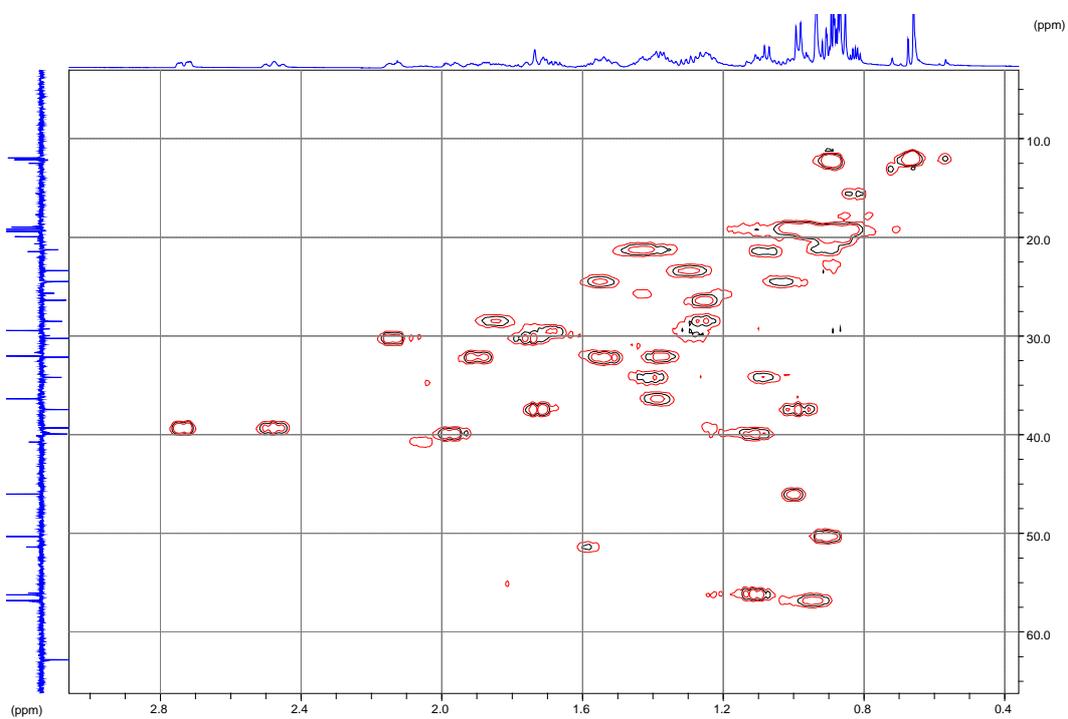


Figure 58 : Spectre RMN HSQC de T5

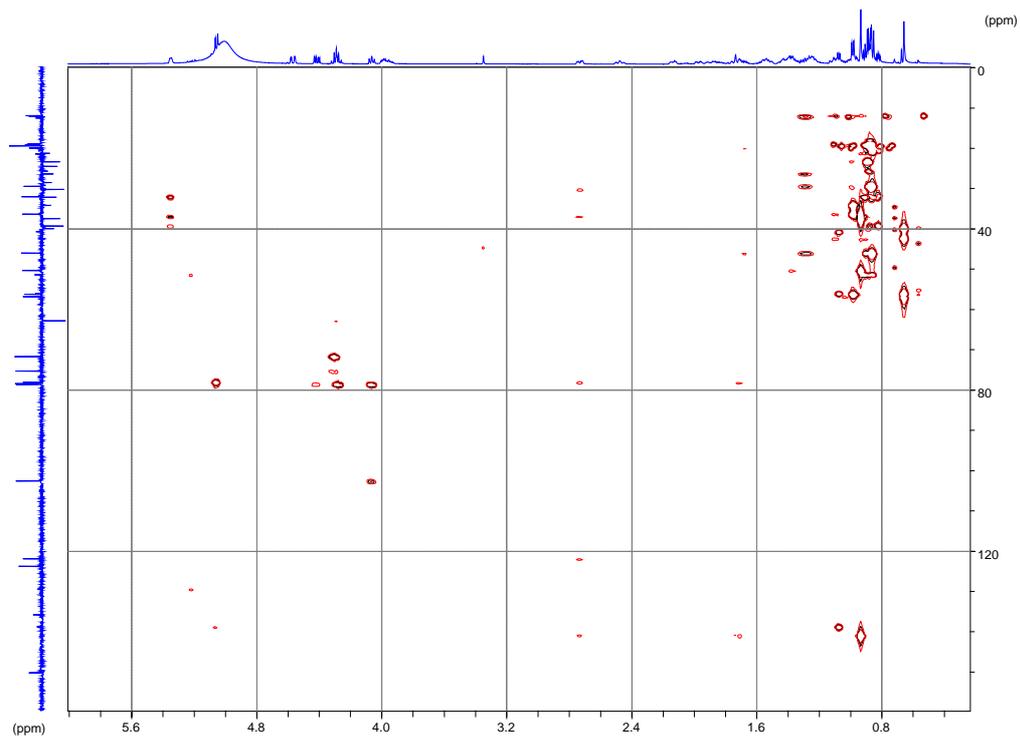


Figure 59 : Spectre RMN HMBC de T5

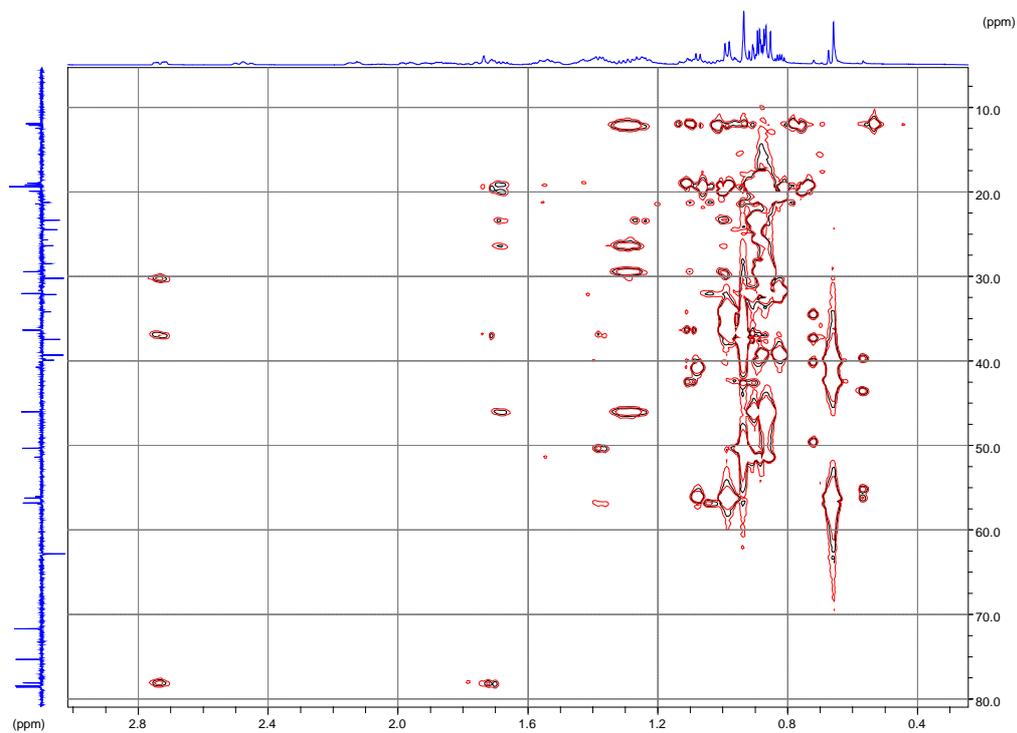


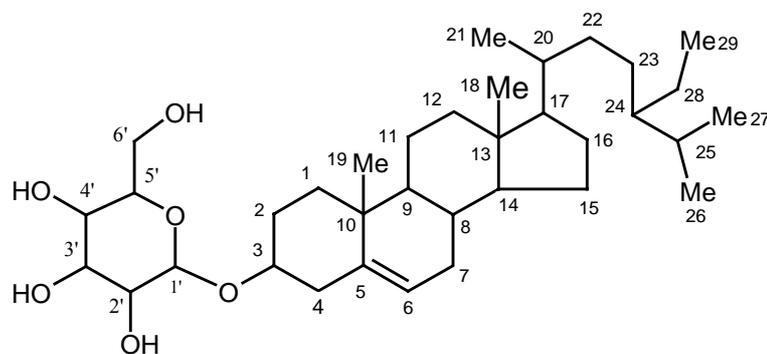
Figure 60 : Spectre RMN HMBC de T5

Les signaux, 3,35 ; 3,38 ; 3,46 ; 3,55 ; 4,35 et 4,37 ppm obtenus, d'une part sur le spectre proton, et 102,6 ; 78,6 ; 78,5 ; 75,3 ; 71,7 et 62,8 ppm, d'autre part sur le spectre carbone, correspondent aux protons et carbones glucosidiques du sucre lié au stérol en position C-3 (corrélation 3J , HMBC H-1'/C-3). Le carbone anomérique correspond au signal à 102,6 ppm.

d- Spectre de masse du composé T5

Le spectre de masse réalisé en FAB (Fast Ion Bombardment), mode positif, montre le pic de l'ion moléculaire à m/z : 577,1. Cet ion correspond à la fixation d'un proton par la molécule, soit $[M+H]^+$. En présence de l'iodure de sodium (NaI), le pic de l'ion moléculaire est observé à m/z : 599,1. Cet ion correspond à la fixation du sodium par la molécule, soit $[M+Na]^+$ avec Na égal à 23 g/mol. Nous en déduisons que la masse molaire de composé T5 est $M = 576$ g/mol. Le pic moléculaire observé à 413,1 g/mol correspond à l'ion obtenu après la rupture du pont reliant le sucre au stérol. Ce qui confirme notre hypothèse.

Ces données ont permis de donner la structure ci-dessous :



3-O- β -D-glucopyranoside de stigmast-5-ène

Daucostérol

Le spectre HMBC et COSY ont permis de confirmer cette structure avec les corrélations observées entre le carbone C-6 et les carbones C-4, C-8 et C-10. On observe une étroite corrélation entre le carbone C-3 à 78,5 ppm avec le carbone anomérique du sucre. Le carbone C-9 à 50,4 ppm montre également une corrélation avec le carbone C-5.

Pour attribuer les déplacements chimiques correspondant aux protons et carbones des composés, la chaîne carbonée est numérotée comme indiqué ci-dessous. (Remarque : notons qu'il existe une grande similitude entre les spectres RMN réalisés sur ce composé et les spectres réalisés sur le composé **T4**).

Chapitre III

***ETUDE CHIMIQUE DE
GOMPHRENA CELOSIOIDES***

1. MATERIEL VEGETAL

1.1. Récolte et séchage

Des récoltes complémentaires de la plante entière de *Gomphrena celosioides* a été réalisée en décembre 2005 à Abomey-calavi, dans le département de l'Atlantique (Sud Bénin). Elles ont ensuite été séchées à l'abri de la lumière du soleil durant 4 semaines. Le matériel végétal séché a été réduit en poudre puis soumis à l'extraction.

1.2. Extraction

750 g de poudre sèche de *Gomphrena celosioides* sont extraits par macération, dans le méthanol pendant 72 heures. Après séchage total sous pression réduite, 33,7 g d'extrait méthanolique sont obtenus. Cet extrait est soumis à une solubilisation en présence de dichlorométhane. On obtient un précipité et un surnageant dichlorométhanique.

La phase dichlorométhanique est récupérée, alors que le précipité est repris dans le méthanol. Après séchage, on obtient deux extraits :

- extrait dichlorométhanique 15,27 g (extrait **A**)
- extrait méthanolique 5,71 g (extrait **B**).

Les extraits **A** et **B** sont ensuite fractionnés et les fractions recueillies sont purifiées.

2. Fractionnement de l'extrait A

L'extrait A est soumis à une extraction liquide-liquide en présence du mélange binaire cyclohexane/dichlorométhane (80 :20) et d'acétate d'éthyle.

2.1. Purification de l'extrait cyclohexane/dichlorométhane

Cet extrait est fractionné par chromatographie sur colonne de silice de diamètre 35 mm et de hauteur 180 mm. L'élution est effectuée avec un mélange binaire composé du dichlorométhane et du méthanol dans les proportions 98 :2 (v/v).

37 fractions ont été recueillies puis regroupées suivant leur similitude sur plaque CCM et révélation avec 10% d'acide sulfurique dans l'éthanol. Les fractions sont ensuite séchées sous pression réduite.

- sous-fraction 22-32 (GC6)
- sous-fraction 33-34 (GC7)
- sous-fraction 35-36 (GC8)

Parmi les sous-fractions recueillies, seules, les sous-fractions **G7** et **G8** ont été purifiées et étudiées jusqu'à la détermination structurale des principaux composés présents.

- **Purification des fractions GC7 et GC8**

La purification de cette sous-fraction a été effectuée par recristallisation. Elle est soluble dans le dichlorométhane mais insoluble dans l'acétate d'éthyle. Elle a été dissoute dans un minimum de dichlorométhane et saturée à l'acétate d'éthyle. Le mélange est chauffé à 50°C au bain marie. Laisse au repos, il se forme un précipité.

Après plusieurs lavage à l'acétate d'éthyle puis filtration sur fritté, on obtient une poudre jaunâtre de masse 30,7 mg. C'est le composé **G7**.

Notons que la fraction **G8** a été purifiée par la même méthode pour donner un composé de masse 19,6 mg identique au composé **G7**.

Le mélange des deux composés est appelé composé **G7** de masse 50,3 mg.

2.2. Purification de l'extrait acétate d'éthyle

Cet extrait a été fractionné par Flash chromatographie. L'élution a été réalisée par un gradient de solvants organiques composé du dichlorométhane et du méthanol. Les conditions chromatographiques et les paramètres d'élution sont présentés ci-dessous :

Conditions chromatographiques (Système Biotage)

Pompe :	HORIZON, Pump ; Biotage, Inc.
Précolonne :	Silice FLASH, 40 + silica samplet, KP-Sil 40 mm samplet, SAM 1107, Biotage
Colonne :	Silice FLASH, 40 + M, KP-Sil, 40x150mm FPKO-1107-17046, Biotage
Eluant :	Gradient CH ₂ Cl ₂ /MeOH
Débit :	25 ml/min
Volume des fractions :	25 - 40 ml

Fractions		1-11	12-24	25-39	40-47	48-56	57-64	65-74
Eluants (%)	CH ₂ Cl ₂	100	95	90	85	80	70	50
	MeOH	00	05	10	15	20	30	50
Vol (ml)		275	520	600	320	360	320	400

Tableau 34 : Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Les différentes fractions sont regroupées en cinq sous-fractions selon leur similitude sur plaque CCM :

- sous fraction 1-11(A)
- sous fraction 12-24(B)
- sous fraction **25-39 (C)**
- sous fraction **40-56 (D)**
- sous fraction 57-74 (E)

Des cinq sous-fractions, seules les sous-fractions **C** et **D** ont été purifiés.

2.2.1. Purification de la sous fraction C

Cette sous-fraction montre à la lumière UV 365 nm, une tache majoritaire qui apparaît colorée en brun. L'isolement de ce composé est effectué par CCM préparative.

Conditions opératoires

Support Chromatographique:	Plaque en verre de Gel de silice 60F ₂₅₄ , 20 X 20 cm (Merck), épaisseur de la couche 0,5 mm
Phase mobile:	AcOEt / MeOH / H ₂ O (100 :17 :13)
Révéléateur:	UV 365 nm
Solvants de récupération :	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (70 :30 ; 50 :50)

Avec une masse de 2,8mg et un Rf de 0,35 dans le solvant composé de chloroforme / méthanol / eau (14 :6 :1), la détermination structurale complète de ce composé n'a pas pu être effectuée à cause de la quantité très faible de produit obtenu.

2.2.2. Purification de la sous fraction D

Cette fraction a été purifiée successivement par HPLC préparative et par CCM préparative après une analyse préalable sur HPLC analytique. Cette analyse sur HPLC analytique, a permis de rechercher les conditions optimales de séparation des composés sur l'HPLC préparative. Les paramètres d'analyse et de purification sont présentés ci-dessous :

HPLC analytique

Pompe:	VARIAN 9010
Injecteur:	VARIAN 9100
Détecteur à barrettes d'iodes:	VARIAN Pro star 330
Colonne:	Symmetry C18, 5µm, 4,6x250mm
Débit:	1ml/min
Volume d'injection:	30µl
Longueur d'onde:	205 et 254nm
Concentration de l'échantillon:	1 mg/ml

Méthode d'élution

Tps (mn)	%AH ₂ O	%B (CH ₃ CN)
00	00	100
10	99	01
35	37	63
40	00	100

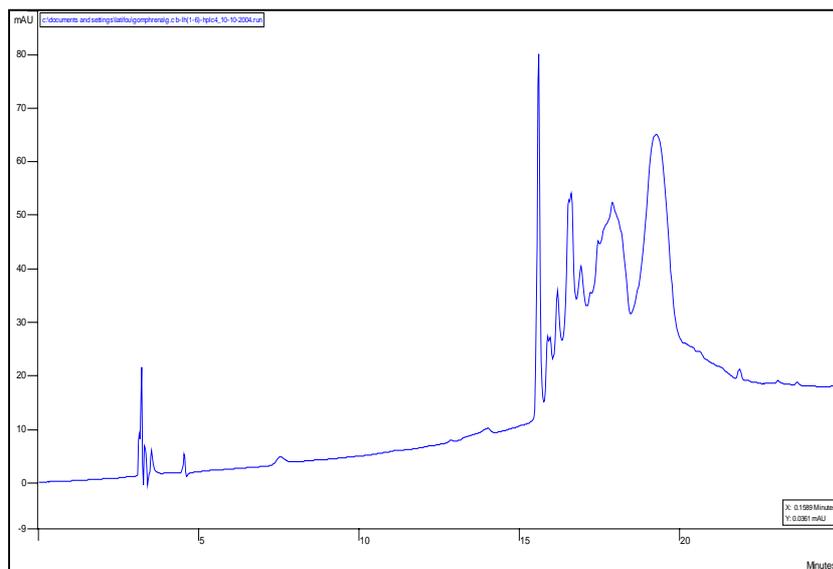


Figure 61 : Chromatogramme de la sous fraction D

HPLC Préparative

Pompe programmable:	Gilson (306-305)
Module Manométrique:	Gilson (806)
Mélangeur Dynamique:	Gilson (811B)
Détecteur:	Gilson (L200E)
Pré Colonne:	VP 50/21, Nucléodur 100-10 C18 ec (Machery-Nagel)
Colonne:	VP 250/21, Nucléodur 100-10 C18 ec (Machery-Nagel)
Débit:	10ml/mn
Volume d'injection:	250 – 500µl
Longueur d'onde:	254nm
Sensibilité:	1
Concentration de l'échantillon:	40mg/ml

Méthode d'élution

Tps (mn)	%A H ₂ O	%B (CH ₃ CN)
00	00	100
10	99	01
35	37	63
40	00	100

La purification de cette sous-fraction par HPLC préparative a permis d'obtenir deux composés :

- Composé **G4** de masse 30,4 mg
- Composé **G 5** de masse 2,3 mg

Au total, trois composés ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique de la plante entière de *Gomphrena celosioides*. Les rendements calculés par rapport à quantité d'extrait brut (33,26 g) sont indiqués dans le tableau 35.

		Solubilité	Masse	Rendement (%)
Composés	GC5	MeOH	5 mg	0,015
	GC4	MeOH	30,4 mg	0,09
	GC7	Pyridine	50,3 mg	0,15

Tableau 35: Rendement des composés isolés de l'extrait B

3. CARACTERISATION CHIMIQUE DES COMPOSES ISOLEES

Quatre tests caractéristiques des stérols, des saponines, des composés azotés et stéroïdes glycosides ont été réalisés sur les différents composés (tableau 36).

Avec la vanilline sulfurique, une coloration rouge violette est observée pour GC1 et GC7 alors que GC4 se colore en bleu puis au jaune après quelques minutes.

Avec le chlorure d'antimoine, les composés GC4 et GC7 ont donné une réaction positive en donnant des taches colorées en jaune et rouge violet respectivement.

L'anisaldéhyde donne une coloration bleue violette pour le composé GC4 et une coloration rouge violette pour le composé GC7. T4 et T5.

Le composé GC7 a donné un faux positif avec le Dragendorff alors que avec le Meyer, le test est négatif. Ceci suppose que les tests sont négatifs et que ces composés ne comportent pas d'atome d'azote dans leur structure.

Au vu de ces résultats, nous émettons l'hypothèse selon laquelle le composé GC7 est un stéroïde alors que les résultats des tests n'ont pas permis de dégager une conclusion en ce qui concerne la nature de GC4. Le composé GC1 a donné une coloration rouge violette en présence de la vanilline sulfurique, ce qui nous fait penser à un terpène.

		VS	SbCl	Anisaldéhyde	Meyer	Dragendorff
Composés	GC4	+	-	+	-	-
	GC5	+	+	+	-	-
	GC7	+	+	+	-	-

Tableau 36: Résultats des tests de caractérisation chimique

4. ELUCIDATION STRUCTURALE DES COMPOSES ISOLES

4.1. Elucidation structurale du composé GC5

i- Propriétés physico-chimiques

- Patte jaune
- Rf dans le système $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ (14 : 6 : 1) : 0,35
- Révélation en CCM : vanilline sulfurique + chauffage (105°C)

j- Spectre UV du composé GC5

Les conditions opératoires sont identiques à celle utilisées précédemment. Le chromatogramme et spectre UV sont présentés sur la figure 62.

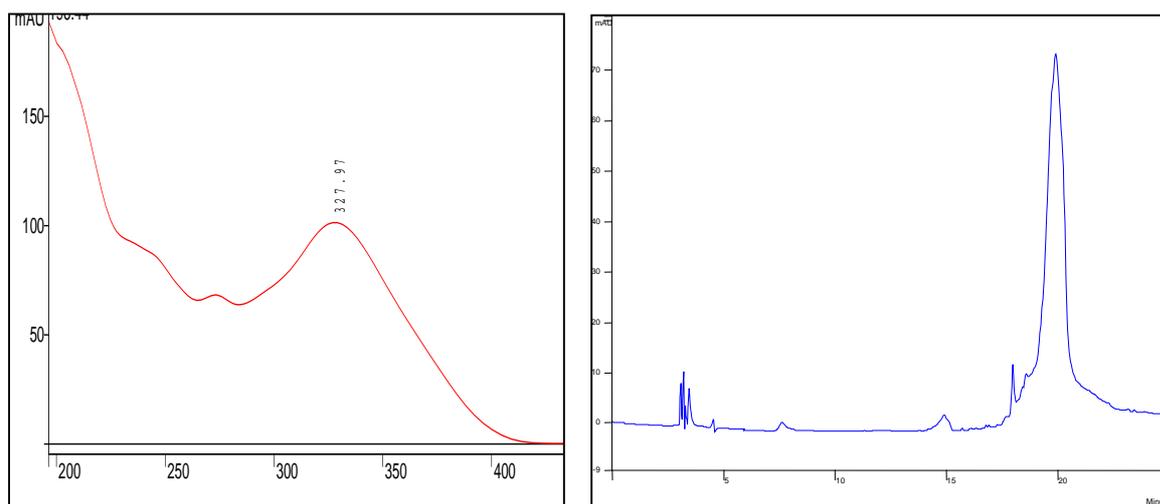


Figure 62 : chromatogramme et Spectre UV du composé **G5**

Au vu de ces résultats, nous concluons que le composé GC5 est un composé phénolique. Cependant, sa détermination structurale complète n'a pas été effectuée à cause de sa masse très faible et de trace d'impuretés, comme le montre le chromatogramme.

4.2. Elucidation structurale du composé GC7

a- Propriétés physico-chimiques

- Poudre blanche
- Rf dans le système CH₂Cl₂ / MeOH (90 :10) : 0,5
- Révélation en CCM : vanilline sulfurique + chauffage (105°C)

b- RMN ¹H de GC7 (500 MHz; Pyridine-d)

(Voir figure 63)

Les déplacements chimiques et les attributions des signaux, les constantes de couplages et les corrélations ²⁻³J sont présentés dans le tableau 37.

Positon	δH (ppm)	Position	δH (ppm)
1	1,77 ; m	19	1,07 ; s
2	2,12-1,73 ; m	20	1,34-1,42 ; m
3	4,29	21	0,93, d ; J = 8,6
4	2,73-2,47	22	1,38-1,08 ; m
5	---	23	1,23 ; m
6	5,35	24	0,99 ; m
7	1,53-1,59 ; m	25	1,64-1,68 ; m
8	1,43-1,50 ; m	26	0,84-0,86 ; d ; J = 6,85
9	0,90-0,98 ; m	27	0,86 ; d ; J = 6,85
10	---	28	1,32-1,26 ; m
11	1,42-1,55 ; m	29	0,86
12	1,98-1,09 ; m	1'	5,06 ; d ; J = 7,8
13	---	2'	4,04-4,08 ; m
14	0,97 ; m	3'	4,30-4,27 ; m
15	1,56-1,03 ; m	4'	4,30-4,27 ; m
16	1,83-1,90, m	5'	4,07-3,95 ; m
17	1,11 ; m	6'	4,57-4,41 ; m
18	0,66 ; s		

Tableau 37 : Données RMN ¹H à 500MHz de GC7

c- RMN carbone (¹³C) de GC7 (500 MHz; pyridine-d) (Voir figure 64)

Les déplacements chimiques, les attributions des signaux sont présentés dans le tableau 38.

C	δC (ppm)	C	δC (ppm)
1	37,54	18	12,02
2	30,31	19	19,47
3	78,66	20	36,44
4	39,40	21	18,98
5	140,97	22	34,27
6	121,97	23	26,46
7	32,11	24	46,01
8	32,23	25	29,53
9	50,40	26	20,02
10	36,98	27	19,26
11	21,33	28	23,45
12	39,01	29	12,21
13	42,54	1'	102,64
14	56,88	2'	75,40
15	24,56	3'	78,53
16	28,59	4'	71,77
17	56,30	5'	78,17
		6'	62,90

Tableau 38 : Données RMN carbone à 500MHz de **GC7**

L'analyse du spectre proton indique la présence deux méthyles tertiaires qui apparaissent sous forme de singulet à 0,65 ppm (H-18) et 1,06 ppm (H-19), trois méthyles secondaires à 0.86 ppm (H-26), 0.85 ppm (H-27) et 0,93 ppm (H-21), un méthyle primaire à 0,87 ppm (H-29), un proton oléfinique à 5.35 ppm (H-6) ainsi qu'un proton oxygéné à 4,29 ppm (H-3). Les signaux à 11,9 ; 12,1 ; 19,0 ; 19,2 ; 19,34, et 19,9 correspondent aux déplacements chimiques des méthyles. Les signaux obtenus à 122,0 et 1401,0 ppm correspondent aux carbones oléfiniques C-6 et au carbone quaternaire C-5. Ces données sont identiques à celles obtenus avec le composé **T5**.

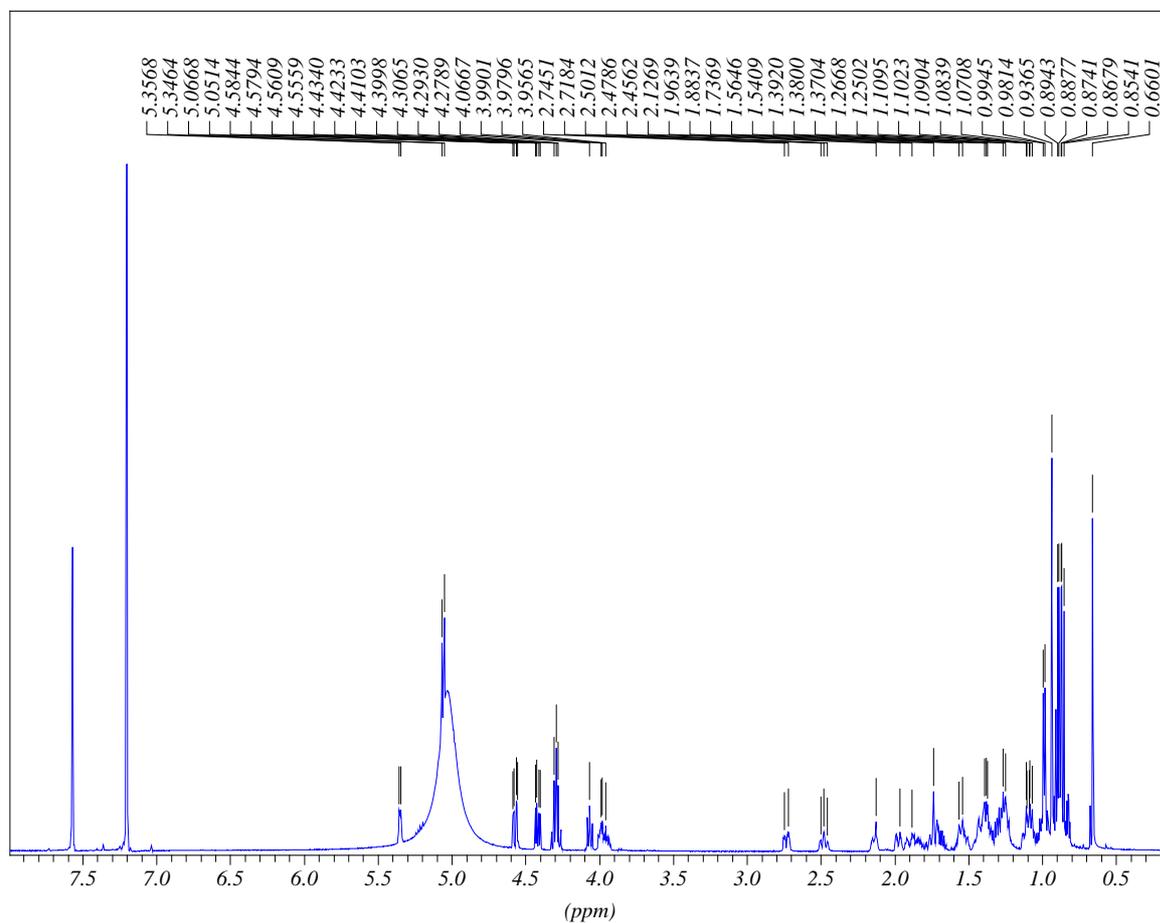


Figure 63 : Spectre RMN ^1H de GC7

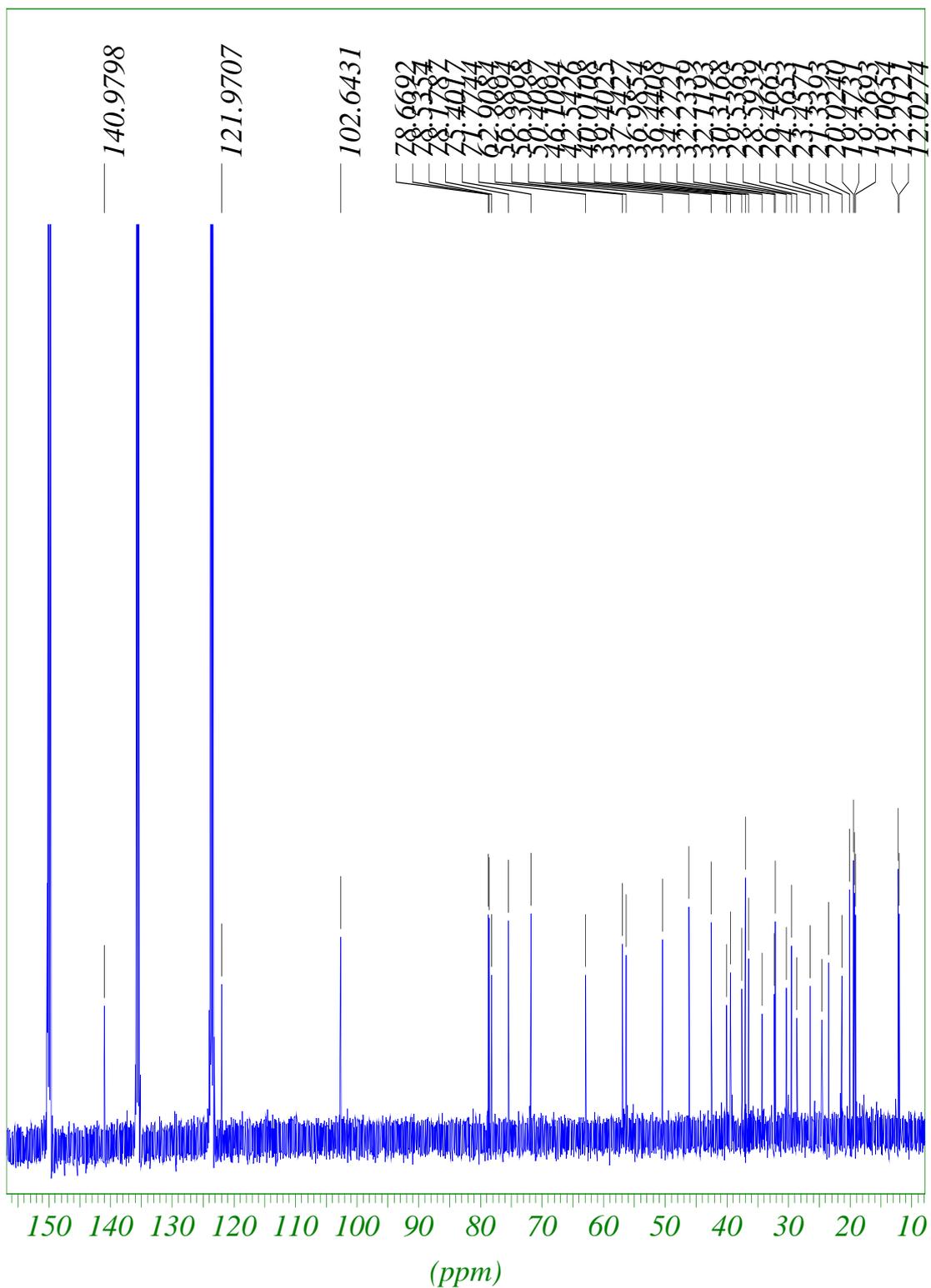


Figure 64 : Spectre RMN ^{13}C de GC7

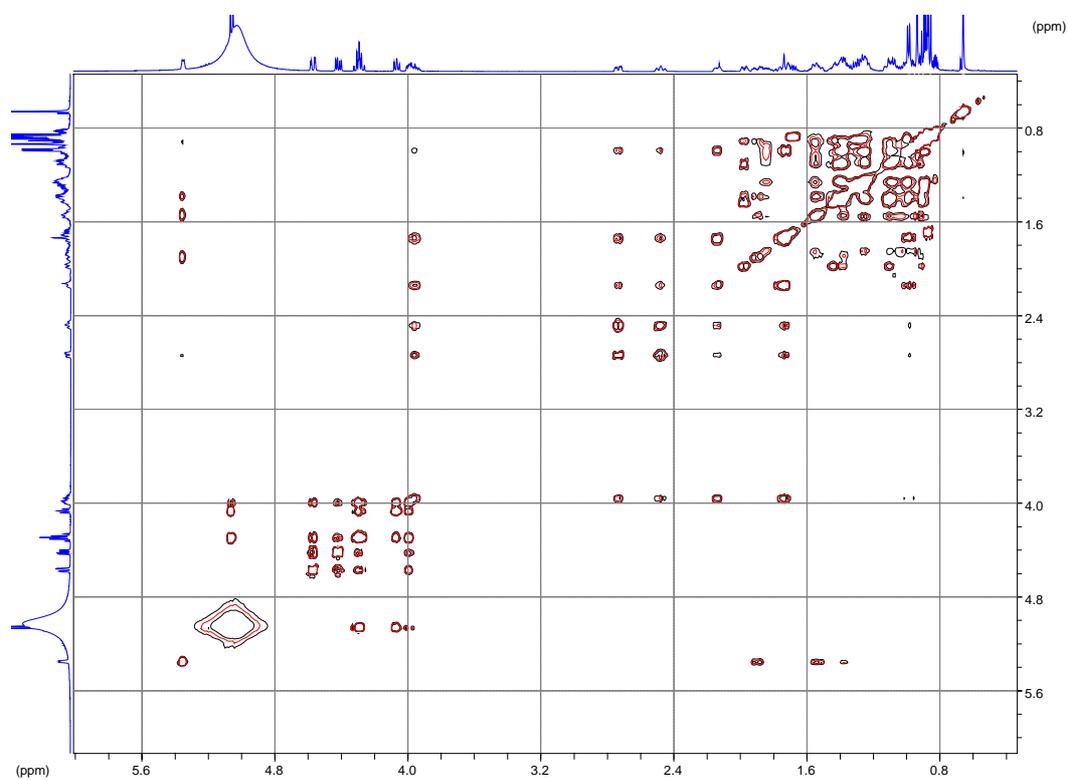


Figure 65 : Spectre RMN TOCSY $^{\text{H-H}}$ J GC7

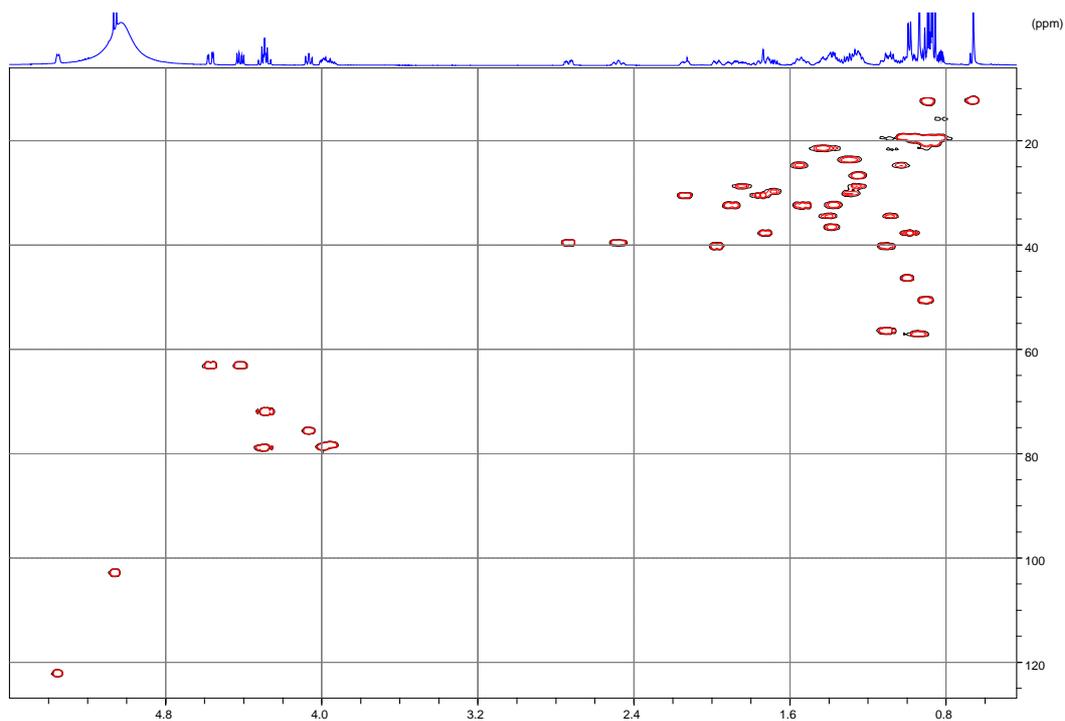


Figure 66 : Spectre RMN HSQC (^1H - ^{13}C) de GC7

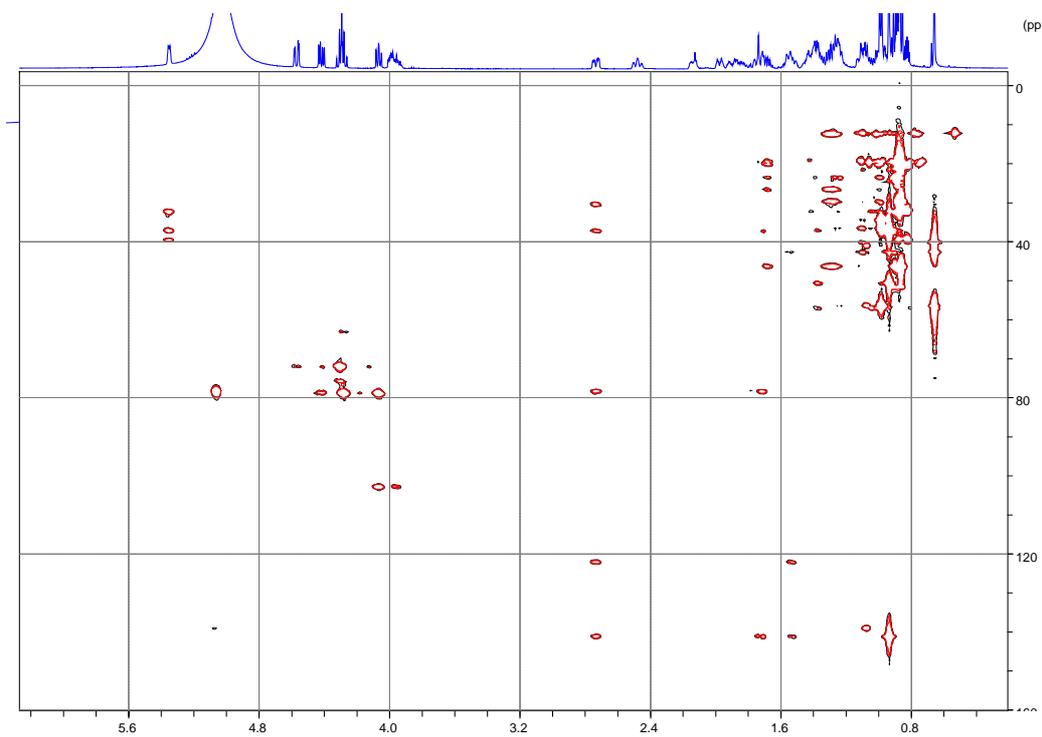


Figure 67 : Spectre RMN HMBC ^2J - ^3J de GC7

CNRS-FR2351 Spectrometrie de masse ULP-Strasbourg

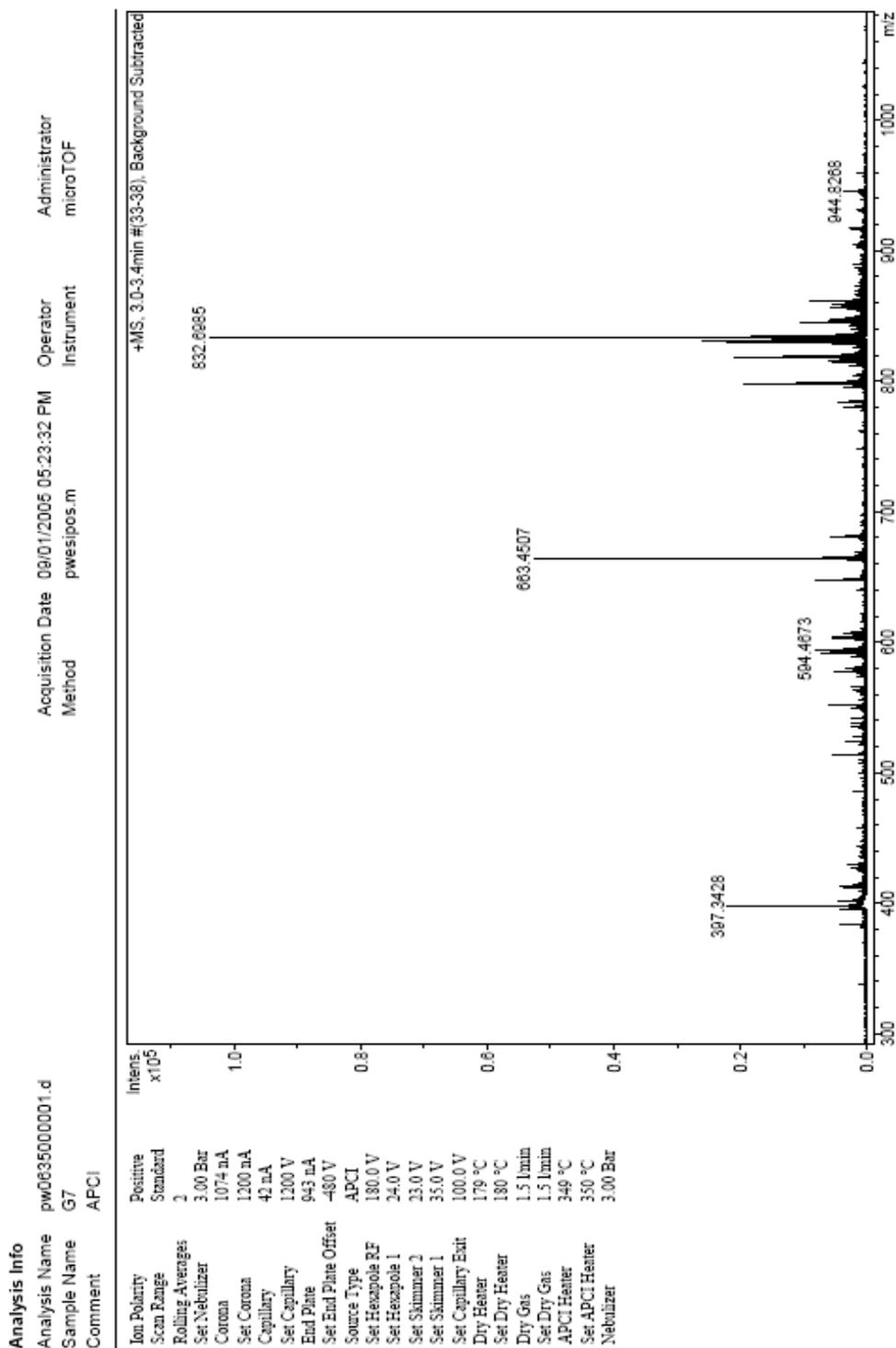


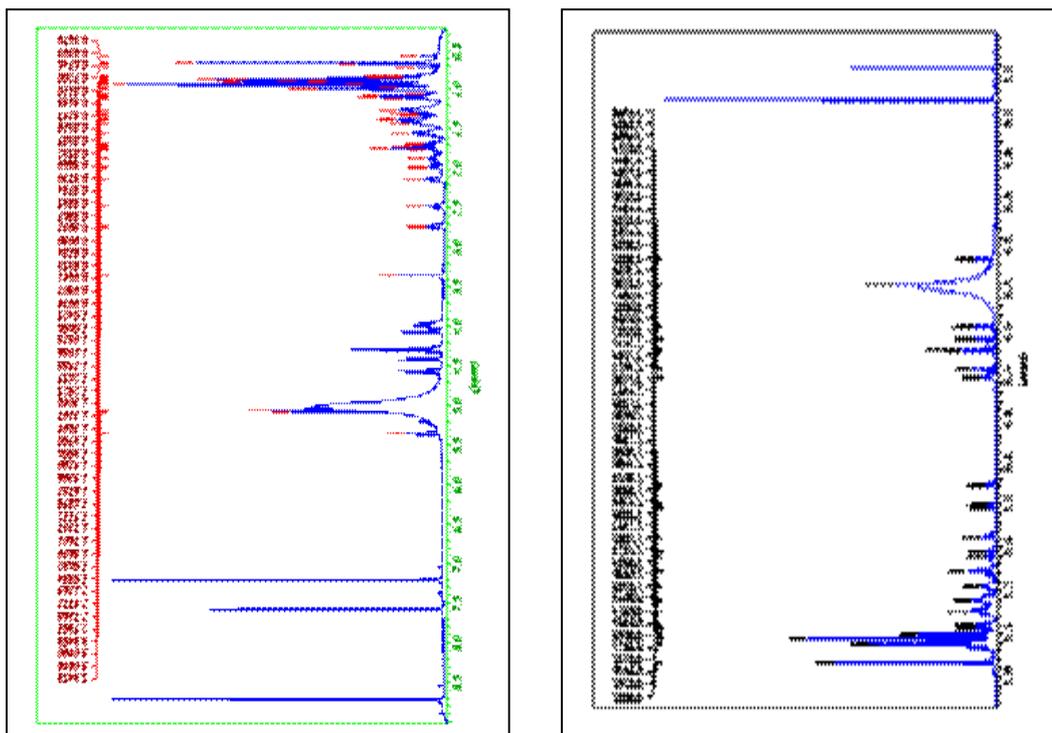
Figure 68 : Spectre de masse de GC7

d- Spectre de masse du composé GC7

(Autospace FAB+ ; microTof-APCI, mode positif ; Voir figure 68)

Le spectre de masse réalisé en FAB en mode positif, donne le pic de l'ion moléculaire à m/z : 577 soit $[M+H]^+$. Un second pic observé à m/z : 397 (100) correspond à la perte du glucose par la molécule, soit $[M-S]^+$ avec S=glucose. En présence de l'iodure de sodium (NaI), l'ion moléculaire m/z 599 est obtenu, soit $[M+Na]^+$. Les analyses réalisées en ionisation électronique, mode positif, donne le même pic moléculaire à m/z : 397(22).

La comparaison des spectres RMN 1H et ^{13}C du composé **GC7** avec ceux du composé **T5**, isolé de *Thalia geniculata*, montre que les spectres sont identiques (Figure 69). Cette hypothèse est confirmée par le spectre de masse.



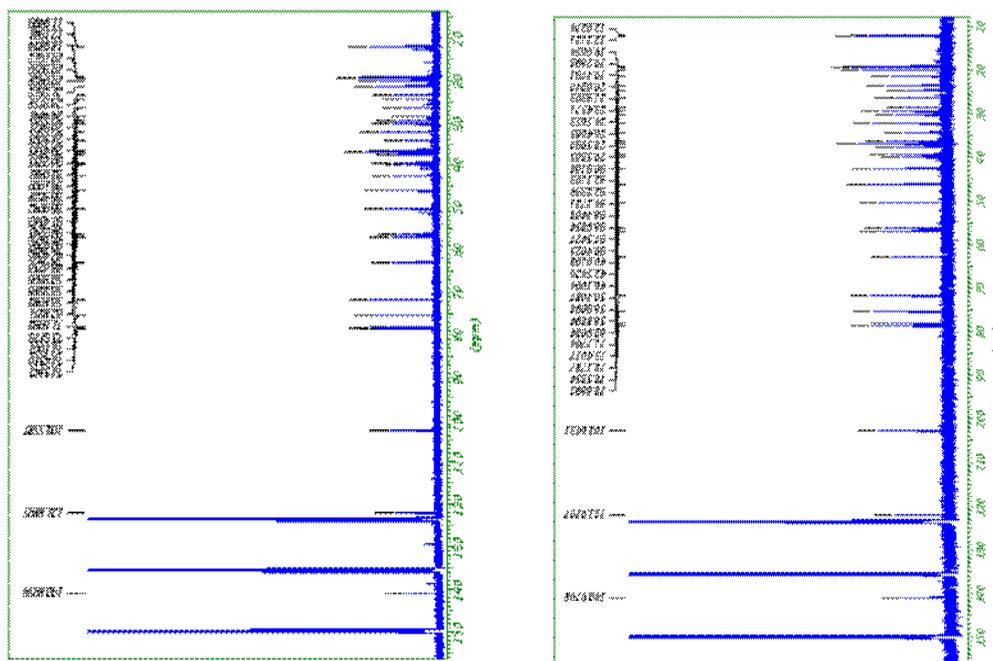
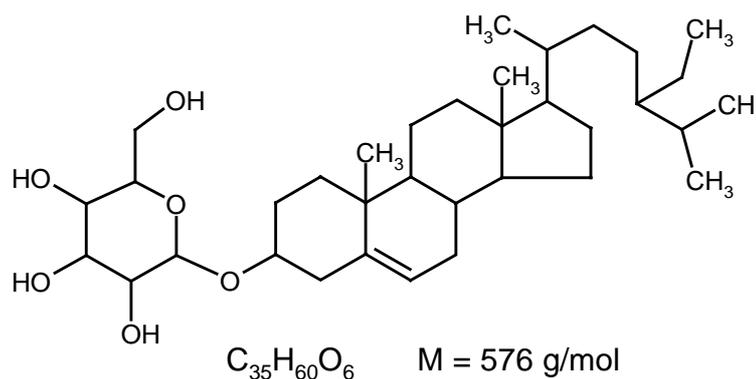


Figure 69 : Spectre ^1H et ^{13}C comparés de **GC7** et **T5**

Ces données confirment que le composé GC7 correspond au daucostérol avec une masse molaire de 576 g/mol.



3-O-β-D-glucopyranoside de stigmast-5-ène
Daucostérol

4.3. Elucidation structurale du composé GC4

a- Propriétés physico-chimiques

- Poudre jaune
- Rf dans le système CHCl₃ / MeOH / H₂O (14 : 6 : 1) : 0,35
- Révélation en CCM : vanilline sulfurique + chauffage (105°C)

b- Spectre UV du composé GC4

Les conditions opératoires sont identiques à celle utilisées précédemment. Le chromatogramme et spectre UV sont présentés sur la figure 70.

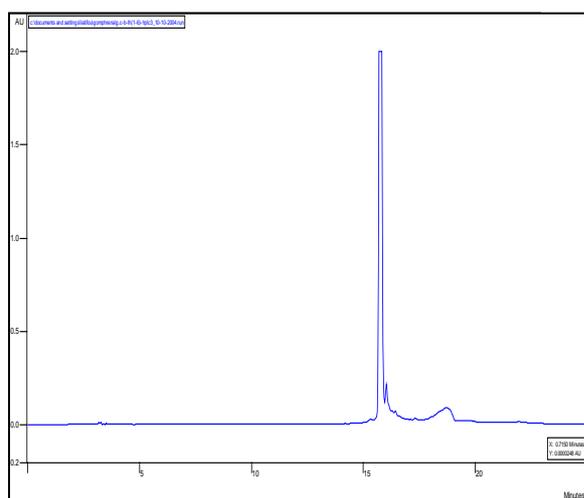


Figure 70 : chromatogramme et Spectre UV du composé G4

c- RMN ¹H de GC4 (500 MHz; MeOH-d₄)

(Voir figure 71)

d- RMN carbone (¹³C) de GC4 (500 MHz; MeOH-d₄)

(Voir figure 72, 73)

e- Spectre de masse de GC4 (FAB ; APCI mode positif)

(Voir figure 74)

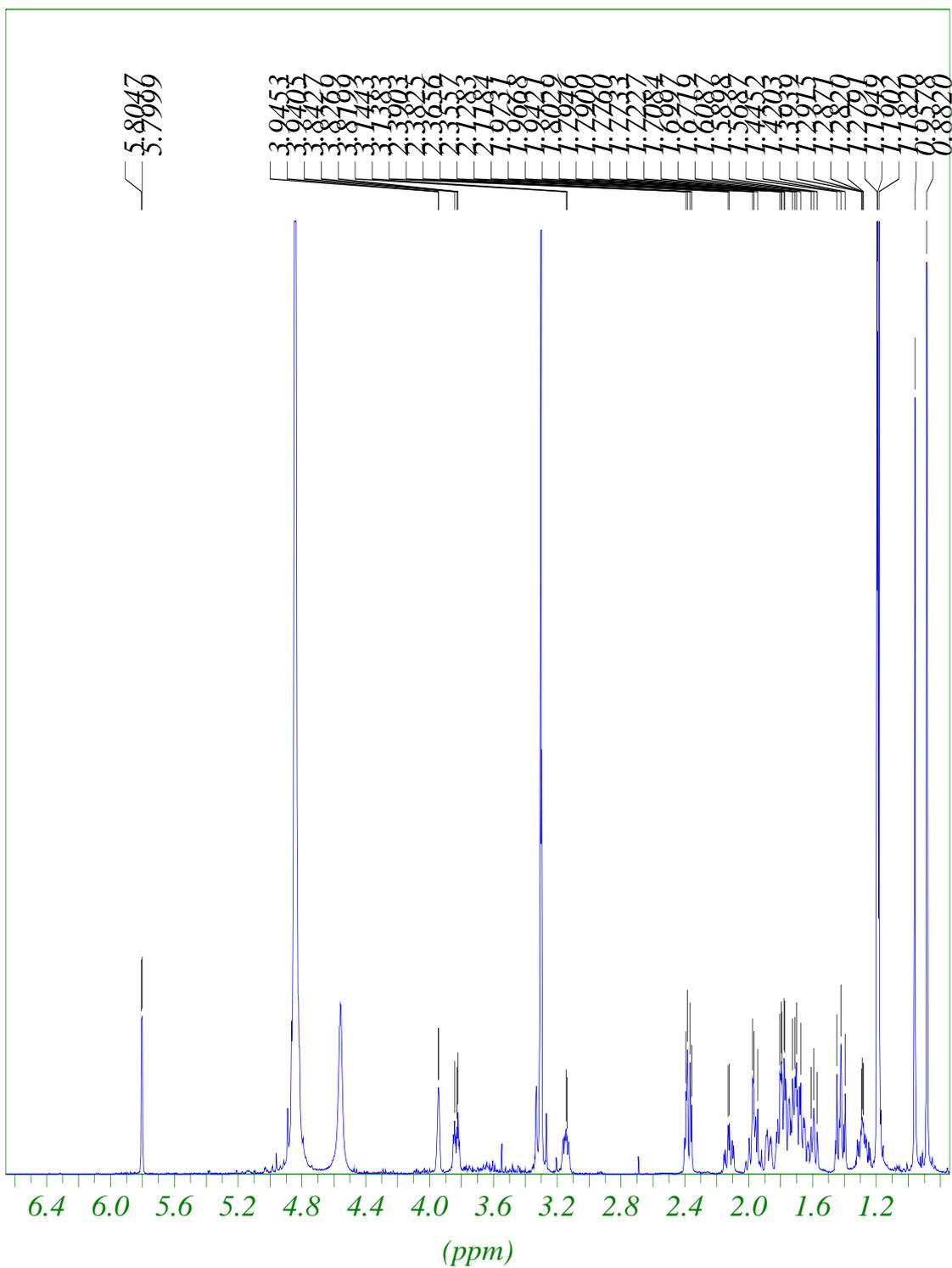


Figure 71 : Spectre RMN ¹H de GC4

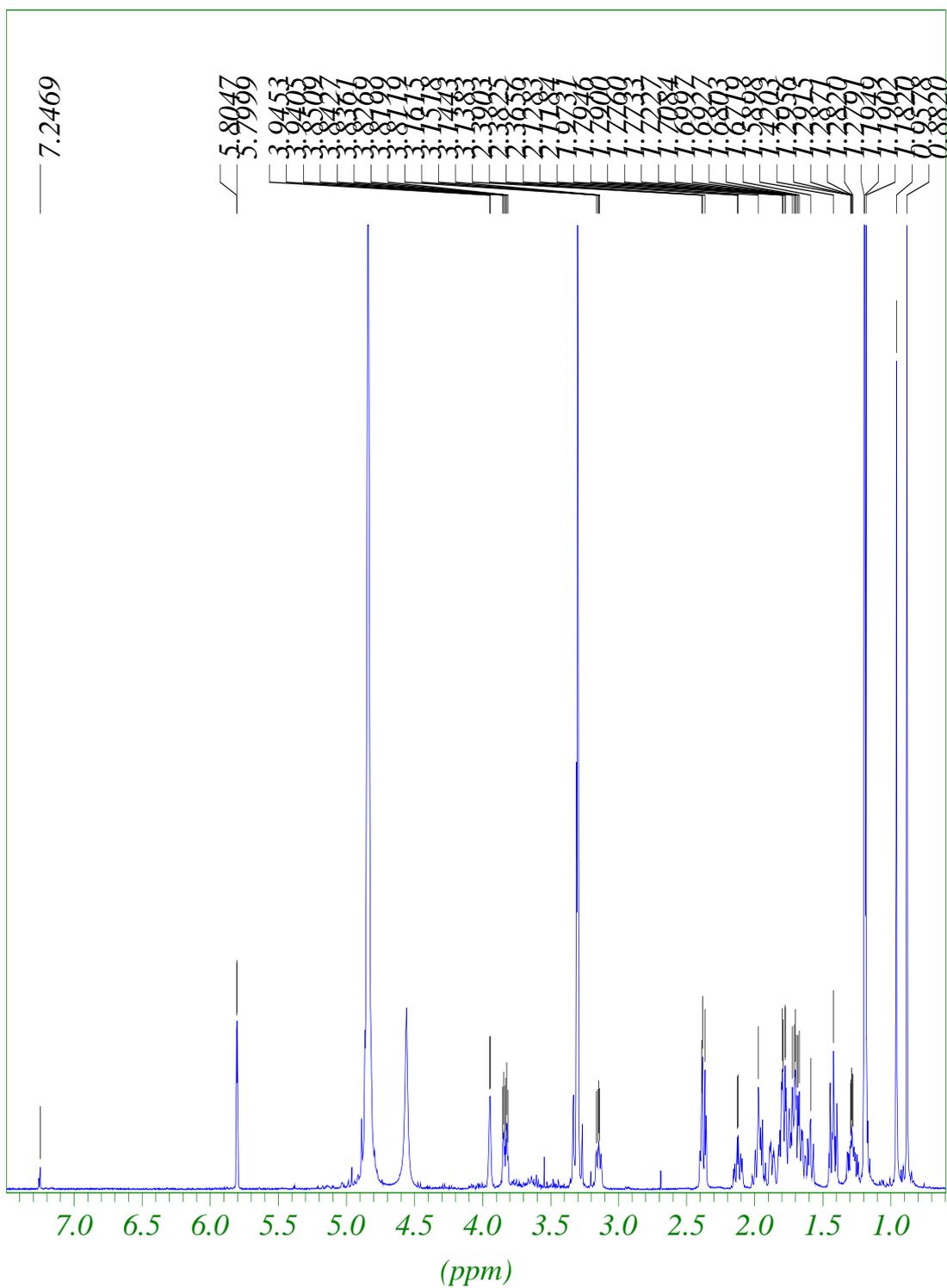


Figure 71 : Spectre RMN ¹H de GC4

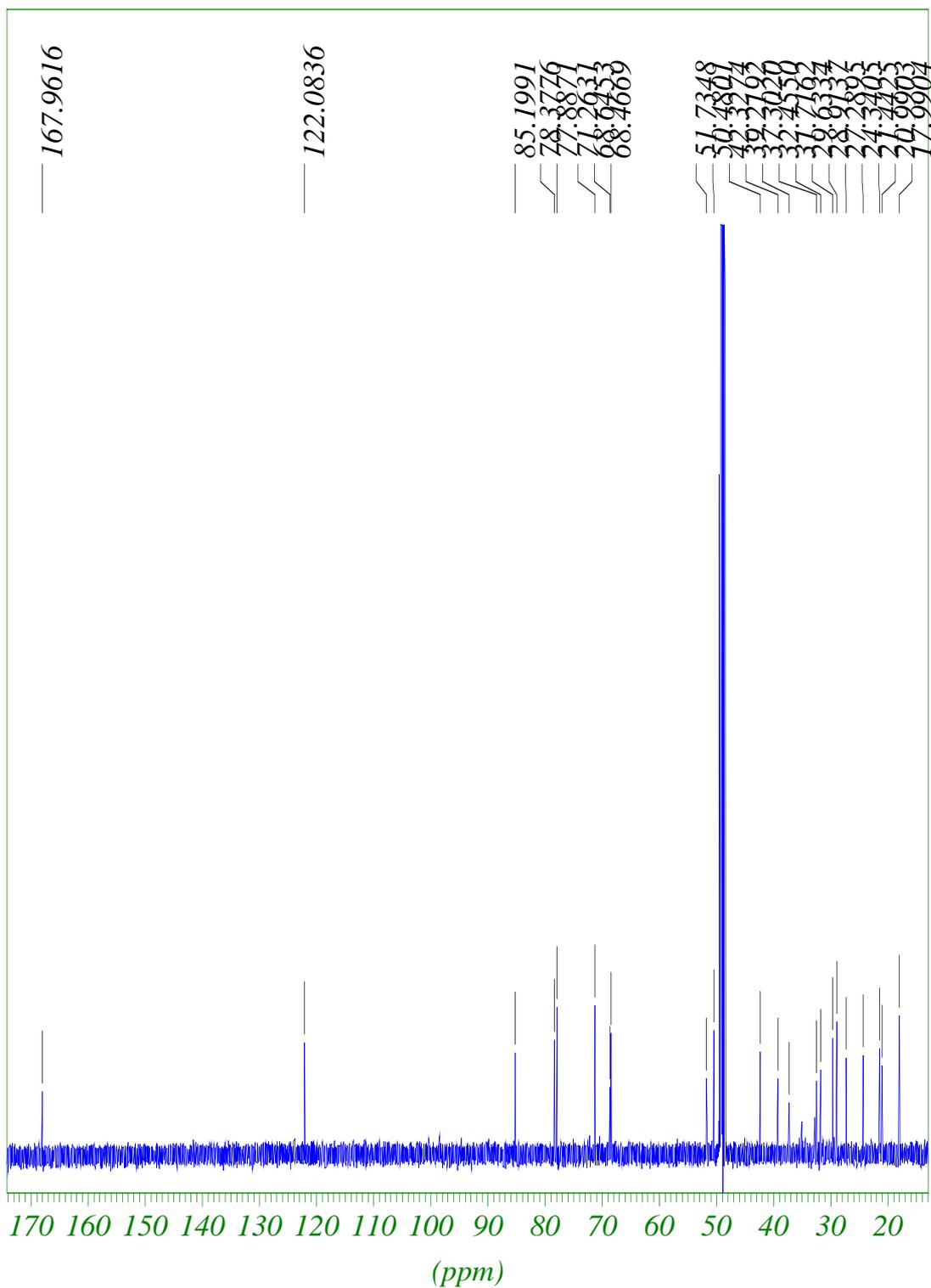


Figure 72 : Spectre RMN ^{13}C de GC4

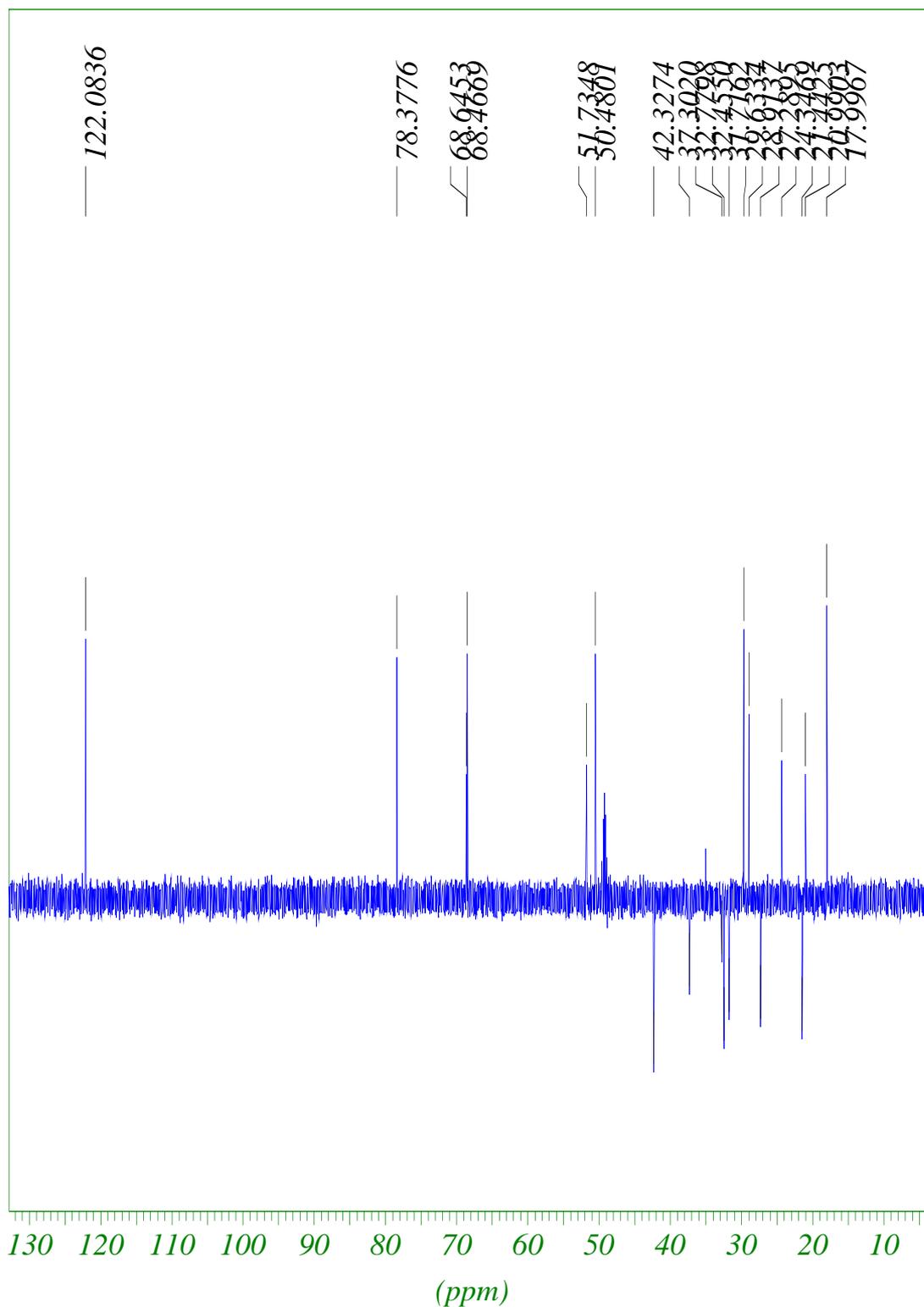


Figure 73 : Spectre RMN ^{13}C (DEPT) de GC4

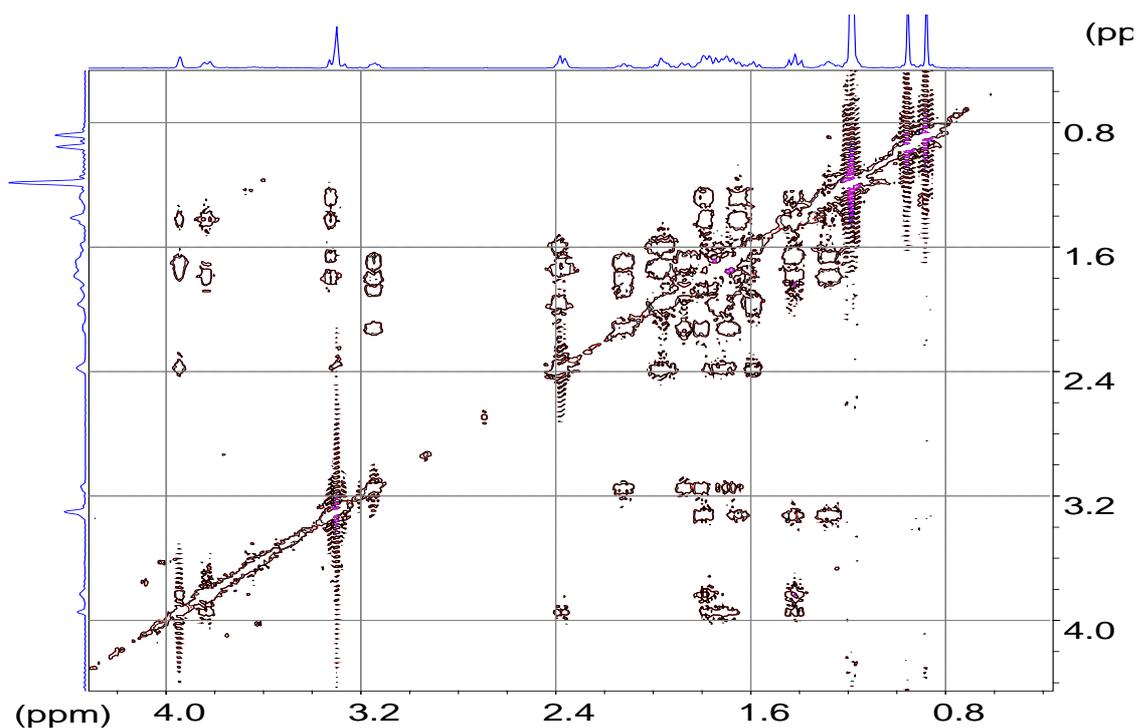


Figure 74 : Spectre RMN TOCSY $^{\text{H-H}}$ J de GC4

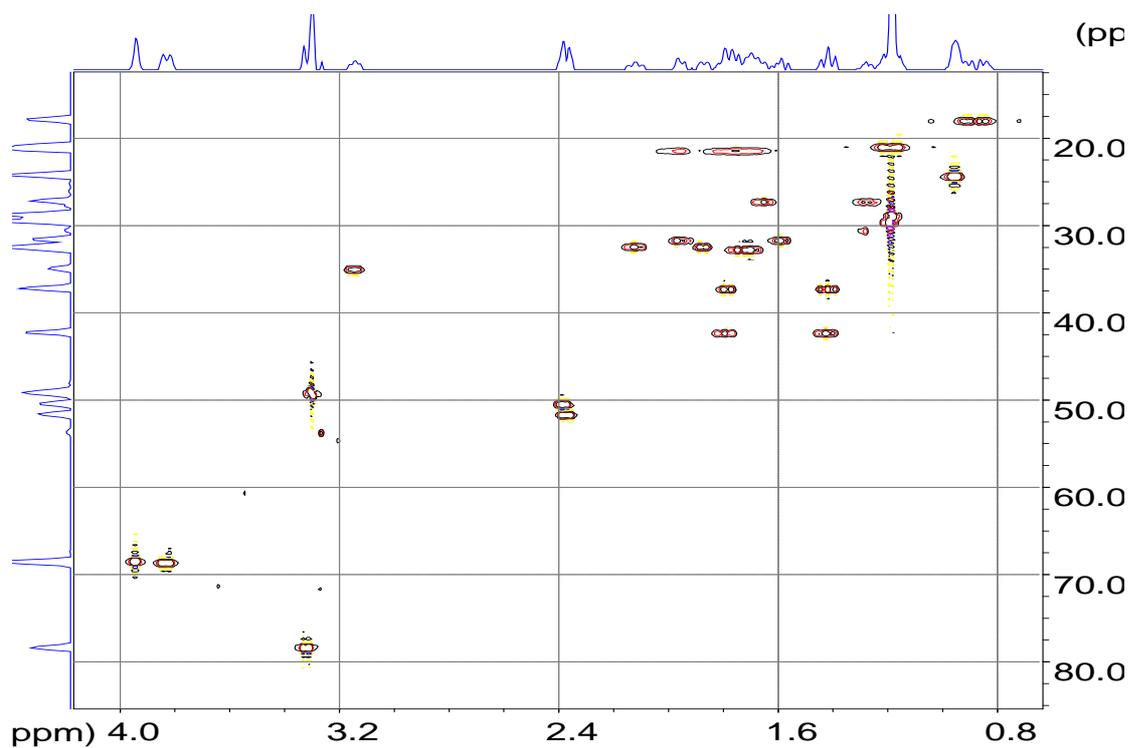


Figure 75 : Spectre RMN HSQC ($^{\text{H-C}}$ J) de GC4

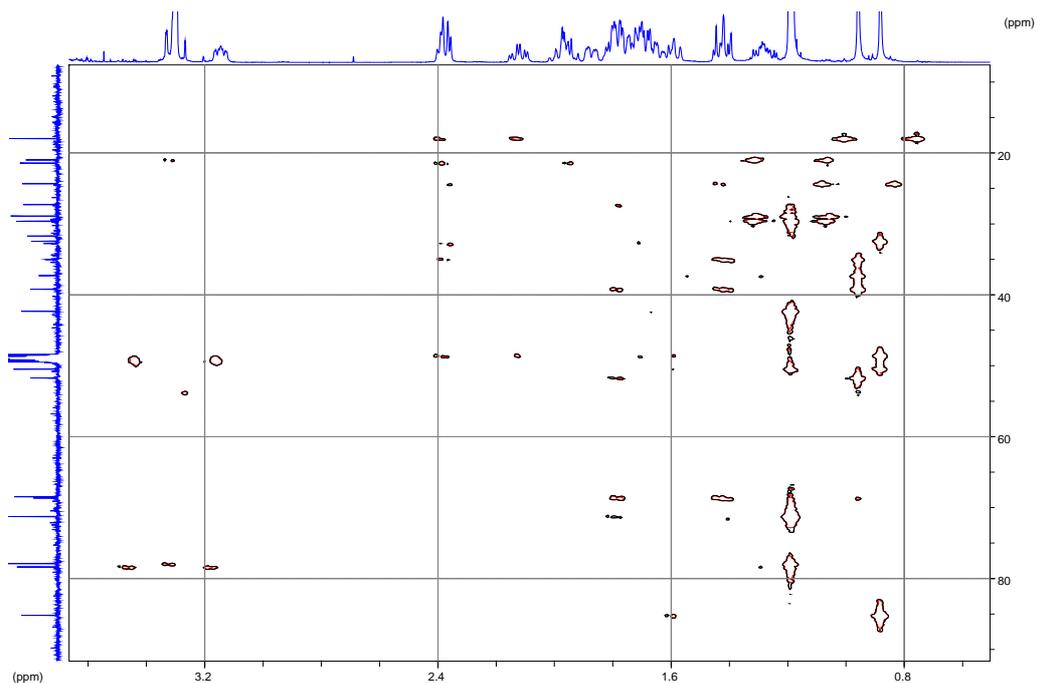


Figure 76 : Spectre RMN HMBC ${}^2J, {}^3J$ de GC4

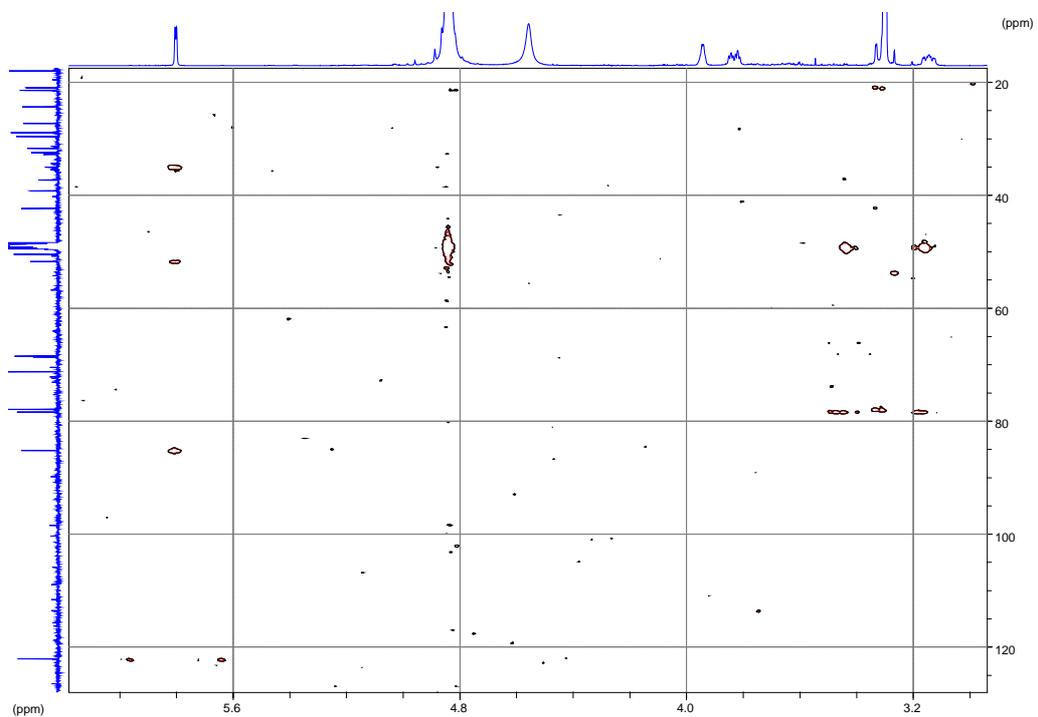


Figure 77 : Spectre RMN HMBC ${}^2J-{}^3J$ de GC4

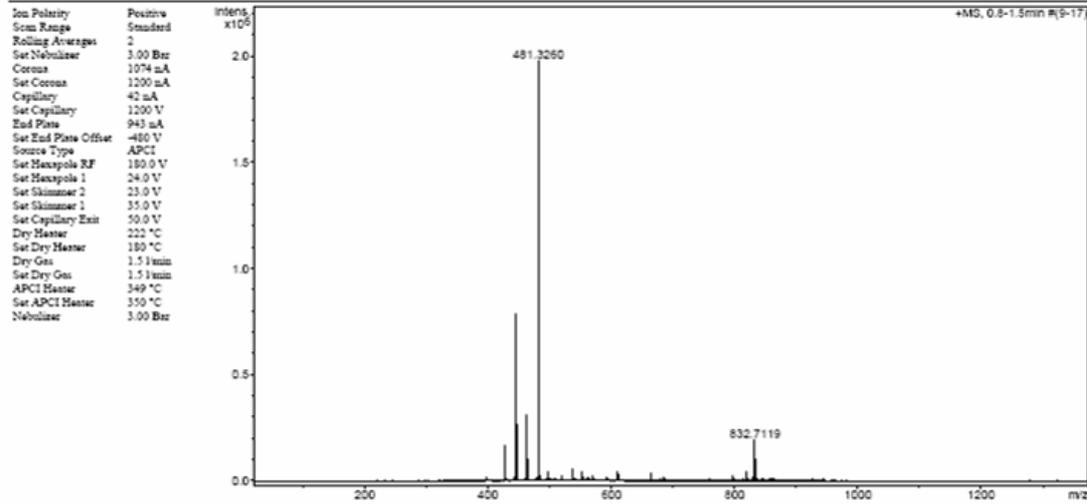
Analysis Info

Analysis Name pw0636000001.d
 Sample Name G4
 Comment APCI

Acquisition Date 09/01/2005 06:04:14 PM
 Method pvesipos.m

Operator Instrument

Administrator microTOF



Brucker Daltonics DataAnalysis 3.1

printed: 09/02/2005 09:34:07 AM

Page 1 of 1

Figure 78 : Spectre de masse de GC4

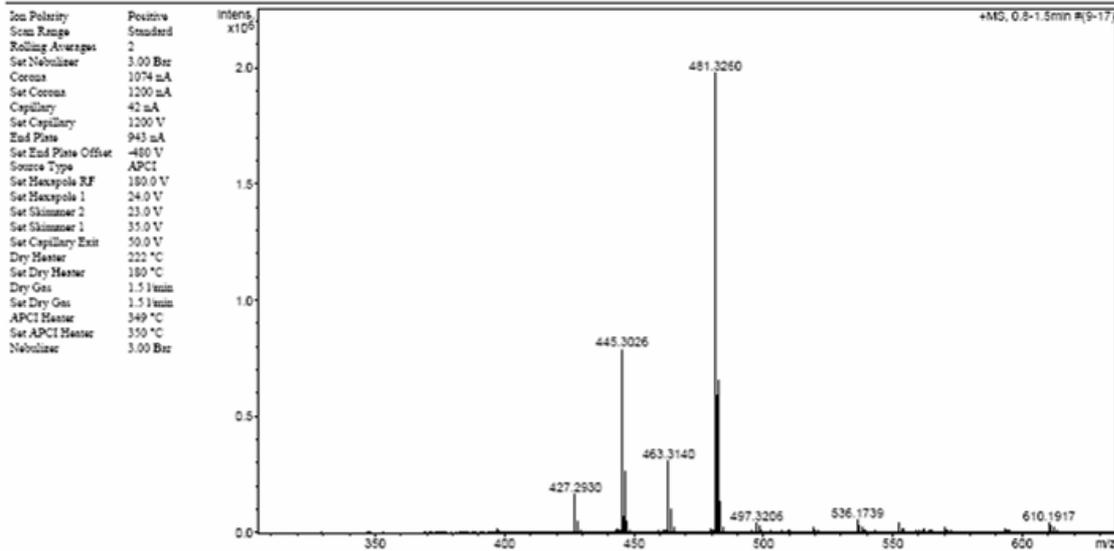
Analysis Info

Analysis Name pw0636000001.d
 Sample Name G4
 Comment APCI

Acquisition Date 09/01/2005 06:04:14 PM
 Method pvesipos.m

Operator Instrument

Administrator microTOF



Brucker Daltonics DataAnalysis 3.1

printed: 09/02/2005 09:34:45 AM

Page 1 of 1

Figure 79 : Spectre de masse de GC4

La détermination structurale définitive de ce composé n'est pas complètement réalisée. Cependant, les informations obtenues jusqu'à présent des spectres RMN et du spectre de masse indiquent qu'il s'agit très probablement d'un alcool diterpénique.

Quatrième partie

***TESTS BIOLOGIQUES SUR
PLASMODIUM FALCIPARUM***

Chapitre I

***ACTIVITES BIOLOGIQUES DES
CONSTITUANTS ISOLES RELEVÉES
DANS LA LITTÉRATURE***

Le fractionnement phytochimique des trois espèces étudiées a permis d'isoler dix composés qui peuvent être regroupés en deux groupes de composés : les composés phénoliques d'une part, les phytostérols et terpènes (polyprénylalcool) d'autre part. Sans vouloir présenter une revue exhaustive des propriétés pharmacologiques attribuées à ces groupes de molécules, nous présentons dans cette partie de notre thèse une synthèse des principales propriétés pharmacologiques connues rapportées dans la littérature. Nous aborderons ensuite notre domaine d'étude qui concerne l'évaluation de l'activité antipaludique des différents métabolites isolés des trois plantes béninoises.

1. Les composés phénoliques

Thèse de Doctorat

Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin

Etude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles issues de Plantes Béninoises

Les phénols simples, acides phénoliques et les flavonoïdes jouent un rôle capital dans l'élimination et la détoxification des radicaux libres, et permettent d'augmenter la résistance des LDL à l'oxydation et d'inhiber la peroxydation des lipides.

Par ailleurs, ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires et antihémorragiques, des propriétés antibactériennes et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes (Bruneton, 1999 ; Kurkin, 2003).

1.1. Tiliroside

Isolé de plusieurs espèces telles que :

- ✓ *Waltheria indica* (Rao et al., 2005).
- ✓ *Platanus orientalis* L. (Dimas et al., 2000).
- ✓ *Helichrysum italicum* (Sala et al., 2003)
- ✓ *Lamium album* (Budzianowski et al., 1995)

Diverses propriétés pharmacologiques de cette molécule ont été mises en évidence dans plusieurs études. Entre autre nous pouvons citer :

- Inhibition significative et sans effet cytotoxique de la production de médiateurs inflammatoires (NO, TNF alpha, IL-12, LPS, IFN), chez les macrophages péritonéaux murins (Rao et al., 2005).
- Bonne propriété antioxydante mise en évidence dans un essai réalisé utilisant le DPPH (IC₅₀ = 6 µM), (Sala et al., 2003).
- Inhibition significative de la peroxydation enzymatique et non enzymatique des lipides pour des concentrations inhibitrices 50 respectives de 12.6 et 28 µM (Sala et al., 2003).

1.2. Isovitexine

Isolée récemment de :

- ✓ *Lythrum salicaria* (Becker et al., 2005).
 - ✓ *Patrinia villosa* (Peng et al., 2005)
 - ✓ *Thlaspi arvense* (Pedras et al., 2003)
 - ✓ *Ziziphus jujube* (Cheng et al., 2000)
-
- Propriété antioxydante (Pedras et al., 2003)

1.3. Acide chlorogénique

L'acide chlorogénique montre des activités anti-MMP-9, susceptibles d'empêcher la formation de métastases à partir de cellules tumorales (Un-Ho Jin et al., 2005). Il possède également des propriétés antiradicalaires vis-à-vis de l'anion superoxyde (Kima et al., 2005) et des propriétés cholagogues (Kurkin, 2003).

1.4. Acide dicafféoyquinique

La seule activité retrouvée dans la littérature pour l'acide dicafféoylquinique concerne l'inhibition de la croissance des cellules tumorales HL-60 par induction de l'apoptose (Satoshi et al., 2005).

2. LES PHYTOSTEROLS

Les phytostérols sont des composés naturellement présents dans les plantes. Ils ne sont synthétisés ni par l'homme ni par les animaux. Ils sont présents dans le régime alimentaire sous plusieurs formes, mais les deux formes les plus abondantes sont représentées par le β -sitostérol et le campestérol (Awad et al., 2000).

On les retrouve également dans des aliments comme les germes de blé ou de soja, les huiles végétales comestibles telles que l'huile de graine de tournesol ou de maïs. La fonction des stérols dans les plantes est identique à celle du cholestérol chez l'homme : maintenir la structure et la fonction de la membrane cellulaire.

2.1. β -Sitostérol

Il s'agit d'une molécule ubiquitaire, préalablement isolée de très nombreuses espèces végétales dont récemment de :

- ✓ *Sideritis taurica* (Aboutalb et al., 2002).
- ✓ *Mallotus peltatus* (Chattopadhyay et al., 2002).
- ✓ *Salvia officinalis* (Miura et al., 2001)
- ✓ *Croton cajucara* (Aparecida et al., 2000)

Le β -sitostérol a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques qui ont montré qu'il possède des propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique (Nutra news, Le bêta-sitostérol, un phytostérol prometteur, page consultée le 19 octobre 2005), des propriétés immunomodulatrices (Dae-Sup et al., 2003 ; Bouic et al., 1999), et antimutagénique (Kun-Young et al., 2003). D'autres travaux, notamment sur l'homme, ont montré des effets prometteurs sur la normalisation du fonctionnement des cellules T, impliquées dans la diminution des réponses trop actives des anticorps, ainsi qu'au niveau de la normalisation de l'équilibre DHEA/cortisol.

Le bêta-sitostérol, seul ou en association avec d'autres phytostérols, diminue les niveaux sanguins de cholestérol. Enfin, plusieurs études montrent l'intérêt du β -sitostérol dans le traitement de l'hyperplasie de la prostate (Klippel et al., 1997 ; Kadow et al., 1986). Il a été également montré qu'il possède des propriétés antioxydantes, diminuant la production des anions superoxyde (O_2^-) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), induite par le PMA dans les macrophages (Moreno, 2003).

2.2. Daucostérol

Le daucostérol est un dérivé glucosidique du β -sitostérol. Il a été isolé dans de nombreuses espèces végétales, dont voici quelques exemples :

- ✓ *Zea mays* L., Poaceae
- ✓ *Arctium lappa* L., Asteraceae
- ✓ *Caulophyllum thalictroides*, Berberidaceae
- ✓ *Avena sativa* L., Poaceae

Comme le β -sitostérol, il a montré un certain nombre de propriétés biologiques, dont les principales sont les suivantes :

- Inhibition de l'aldose-réductase (Sanghyun, et al., 2005 ; Fujita et al., 1995)
- Activités antileucémique, antispasmodique, antitumorale et hypoglycémique (Ducke's. Phytochemical and Ethnobotanical Databases, page consultée le 19 octobre 2005).

2.3. Sitoindoside I

Une recherche bibliographique a permis de mettre en évidence que ce composé n'a été isolé qu'à partir de trois espèces végétales seulement, contrairement à ces isomères de fonction cités précédemment :

- ✓ *Musa paradisiaca* (Ghosal et al., 1984)
- ✓ *Gnetum pendulum* (Ligin Wang 2005)
- ✓ *Cremanthodium ellisii* (Wang Ai-Xia et al., 2004)

En ce qui concerne notre travail, c'est la première fois que le sitoindoside I est décrit dans la famille des *Marantaceae*. La seule propriété pharmacologique retrouvée dans littérature concerne un effet antiulcérogénique (Ghosal et al., 1984).

2.4. Geranylfarnésol

Cette molécule possède la capacité d'induire l'apoptose des lignées cellulaires NB4, APL et MDS92 (Yaguchi et al., 1997).

Chapitre II

***RESULTATS DES TESTS
BIOLOGIQUES***

1. Tests antipaludiques

Parmi les différents composés isolés, seul neuf ont été évalués pour leur activité antipaludique et leur toxicité.

L'évaluation de l'activité antipaludique *in vitro* a été effectuée sur la souche multirésistante K1 (multi-drug pyrimethamine/chloroquine resistant strain; Thaithong and Beale, 1981). Les tests ont été effectués au moyen de la technique radio-isotopique basée sur la méthode précédemment décrite par Desjardins et al. (1979) et modifiée by Ridley et al. (1996).

Le test consiste à utiliser comme indicateur de viabilité des parasites, l'absorption de l' $[^3\text{H}]$ hypoxanthine. Les parasites sont maintenus en culture continue selon la méthode décrite préalablement par Trager and Jensen (1976). La concentration initiale de chaque extrait végétal ou composé pur est égale à 30 $\mu\text{g/ml}$. Sept (7) concentrations, dont la plus faible est de 0.47 $\mu\text{g/ml}$, sont obtenues. Les composés sont considérés actifs lorsque la concentration inhibitrice est inférieure à 5 $\mu\text{g/ml}$.

2. Etude de la cytotoxicité

La cytotoxicité des composés isolés a été évaluée selon la méthode de Pagé et coll. (1993), modifiée par Ahmed et coll. (1994). Les cellules L6 (myoblastes des muscles squeletiques de rat) ont été cultivées dans des plaques de culture cellulaire COSTAR de 96 puits dans le milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) contenant 10% de sérum foetal de veau (FCS) inactivé. Les composés à tester précédemment dissous dans du DMSO (avec une concentration finale n'excédant pas 0.1%) ont été filtrés sur filtre de 0.22 μm puis redissous dans le milieu de culture. La cytotoxicité a été évaluée en utilisant les mêmes concentrations que celles utilisées pour évaluer l'activité antiplasmodiale *in vitro*. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 72h dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Après adjonction de bleu Alamar comme indicateur de viabilité et deux heures complémentaires d'incubation (Ahmed et al., 1994), la densité optique des puits a été évaluée par un scanner à fluorescence en utilisant une longueur d'onde excitatrice de 536 nm et une longueur d'onde d'émission de 588 nm (SpectraMax GeminiXS, Molecular Devices). Les CI₅₀ ont été calculées à partir de la

courbe sigmoïde d'inhibition. La même méthode a été utilisée pour évaluer l'activité antitrypanosomale et antileishmaniale des molécules. Le Mélarsozol, le benznidasol et le miltefosine ont été utilisés comme témoin.

3. Résultats

L'évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro* des molécules isolées sur la souche résistante K1 de *Plasmodium falciparum* a montré que trois de ces molécules, le tiliroside, la vitexine isolés de *Croton lobatus* et le géranylfarnésol isolé de *Thalia geniculata*, possède une bonne concentration inhibitrice 50, dans le modèle utilisé, sur les parasites étudiés. L'activité la plus intéressante a été obtenue avec la vitexine qui s'est montrée très active sur *Leishmania donovani* avec une concentration inhibitrice de 1,43 μM , comparable à la concentration inhibitrice de la molécule de référence (1,35 μM).

Notons que les tests biologiques réalisés à Bâle sont relativement sévères dans la mesure où les activités ne sont mesurées qu'en deça de 20 $\mu\text{g/ml}$ (*P. falciparum*), 30 $\mu\text{g/ml}$ (*Trypanosoma* et *Leishmania*), pour les extraits et 5 $\mu\text{g/ml}$ pour les composés purs. Il n'est donc pas impossible que les molécules isolées possèdent une activité comprise entre 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$.

L'évaluation de l'activité cytotoxique des molécules isolées montre un bon indice de sélectivité (SI = cytotoxicité / activité antiplasmodiale), supérieur à 10 pour le tiliroside et le géranylfarnésol. On considère généralement que l'activité antiplasmodiale n'est pas due à une cytotoxicité aspécifique lorsque l'indice de sélectivité est supérieur ou égal à 10.

Tableau 39 : Résultats des tests biologiques

	<i>P. falc. K1</i>	<i>T. r.rhod.</i>	<i>T. b.cruzi</i>	<i>L. don. ax.</i>	<i>L. don. mac.</i>	Cytotox. L6
	CI ₅₀ (µM)					
Composés						
Tiliroside	7,14	22,3	>30	>30	>30	>90
Vitexine	4,4	0,14	28	0,55	1,43	3
Géranylfarnésol	12,5	26	55,3	13	>30	>85
Standard						
Chloroquine	0,6					
Artémisinine	0,17					
Melarsoprol		0,013				
Benznidazole			3,5			
Miltéfosine				0,3	1,35	

CONCLUSION

L'objet de notre étude a porté sur l'étude phytochimique de trois espèces médicinales, *Croton lobatus* L (*Euphorbiaceae*), *Thalia geniculata* L. (*Maranthaceae*) et *Gomphrena celosioides* Mart. (*Amaranthaceae*), utilisées dans la pharmacopée traditionnelle béninoise, pour le traitement de plusieurs pathologies et en particulier du paludisme, ainsi que sur l'évaluation de l'activité antiparasitaire et de la cytotoxicité des métabolites secondaires isolés à partir de ces espèces médicinales.

L'étude bibliographique préalable réalisée sur les trois espèces a montré que l'on disposait que de peu d'information de nature chimique et/ou biologique. Cependant, notons que récemment, une thèse réalisée à l'ULP par B. Attioua a eu pour thème l'étude phytochimique partielle de l'une des espèces choisies, *Croton lobatus*.

Au cours de nos travaux, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires des trois espèces citées ci-dessus. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solides-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince, flash chromatographie, chromatographie par filtration sur le gel de Sephadex LH-20 et chromatographie liquide de haute performance).

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

En ce qui concerne la spectrométrie de masse, des techniques telles que la FAB, l'ionisation électronique, l'ionisation chimique et les techniques de haute résolution ont rendu possible la détermination du poids moléculaire ainsi que la formule brute des métabolites secondaires isolés.

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

La spectroscopie UV, par analyses de témoins sur HPLC analytique, a été utile pour l'identification de certains métabolites secondaires présents dans nos extraits.

L'étude phytochimique des feuilles et tiges de *Croton lobatus* a permis d'isoler des dérivés flavonoïdiques, le tiliroside, l'isovitexine, la vitexine et deux acides phénoliques, l'acide chlorogénique et l'acide 4,5-*O*-dicafféoylquinique. Quatre composés dont trois stéroïdes et un terpène : le daucaustérol, le stigmastérol, le géranylfarnésol et le 6-*O*-hexadécanoyl-3-*O*- β -D-glucopyranoside de stigmast-5-ène (sitoindoside I), ont été isolés à partir des parties aériennes et de la racine de *Thalia geniculata*. Trois composés ont été isolés à partir des parties aériennes et de la racine de *Gomphrena celosioides* : le premier a été identifié au daucostérol, le second étant un flavonoïde et le troisième, un alcool diterpénique. La détermination structurale des deux derniers composés est en cours. Ces résultats est une contribution à l'étude phytochimique des plantes de la pharmacopée béninoise.

Dans la partie biologique de notre travail, nous avons étudié l'activité biologique ainsi que la cytotoxicité des métabolites secondaires isolés sur la souche multirésistante K1 de *Plasmodium falciparum*, sur *Trypanosoma rhodensiense*, sur *Trypanosoma cruzi* et sur *Leishmania donovani*. La toxicité des différentes molécules a été évaluée sur les cellules myoblastiques L6 de rats. Les résultats obtenus ont montré la bonne activité antipaludique et l'absence de cytotoxicité du tiliroside isolé à partir de *Croton lobatus* et du géranylfarnésol isolé de *Thalia geniculata*. La vitexine, isolée de *croton lobatus* s'est également montrés très active sur *Leishmania donovani* Ces résultats apportent des éléments de validation scientifique de l'usage traditionnel d'espèces de la pharmacopée béninoise pour leur activité antiparasitaire et en particulier, pour leur activité antipaludéenne.

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- Poursuivre l'étude phytochimique des espèces *Thalia geniculata* et *Gomphrena celosioides* afin d'isoler d'autres métabolites secondaires contenus dans les extraits.

- Etudier l'activité antipaludique et la cytotoxicité de ces métabolites afin de confirmer ou d'infirmer l'activité antipaludique attribuée à ces plantes.
- Réaliser l'étude *in vivo* et les études relation structure-activité des molécules actives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdullah N. R., Furuta T., Taib R., Kita K., Kijima S., Wah J., 1996. Development of a new diagnostic method for *Plasmodium falciparum* infection using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **54**: 163-163.

Aboagye F. A., Sam G. H., Massiot G., Lavaud C., 2000. Julocrotine, a new glutarimide alkaloid from the roots of *Croton membranaceus*. *Fitoterapia* **71** (4): 461-462.

Aboutalb S., Nassar M.I., Elsakhawy F.M., Maklad Y.A., Osman A.F., El-Khrisy E.A.M., 2002. Phytochemical and pharmacological studies of *Sideritis taurica*. *Journal of Ethnopharmacology* **82**: 177-184.

Achenbach H. and Benirschke G., 1997. Sialactone and other compounds from *Joannesia princeps*. *Phytochemistry* **45** (1): 149-157.

Adjanohoun E.J., Adjakidjè V., Ahyi M.R.A., Akeassi L., Akoegninou A., d'Almeida J., Apovo F., Boukef K., Chadare M., Dramane K., Eyme J., Gassita J.N., Gbaguidi N., Goudoté E., Guinko S., Houngnon P., Issa Lo, Keita A., Kiniffo H.V., Koné-Bamba D., Musampa Nseyya A., Saadou M., Sogodandji Th., de Souza S., Tchabi A., Zinsou Dossa C., Zohoun Th., 1989. Médecine traditionnelle et pharmacopée. Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République du Bénin. Agence de Coopération Culturelle et Technique, ISBN 92 - 9028 152.9.

Adjobimey T., 2002. Etude in vitro de l'activité antiplasmodiale de quatre plantes médicinales de la pharmacopée béninoise. Mémoire du DEA, option Pharmacologie des Substances naturelles, Université de Lomé.

Agrawal P.K., 1989. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier. ISBN 0-444-8744-6. New-york.

Ahoussou N., Goli K., Abdourahamane S., Alassane S., 1995. Côte d'ivoire: Rapport de pays pour la conférence technique internationale de la FAO sur les Ressources phytogénétiques.

Aké L. A., 1975. *Médecine traditionnelle et pharmacopée*. In Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques au Togo, p 153.

Akihisa T., Koike K., Kimura Y., Sashida N., Matsumoto T., Ukiya M., Nikaido T., 1999. Acyclic and incompletely cyclized triterpene alcohols in the seed oils of Theaceae and Gramineae. *Lipids* **34** (11): 1151-1157.

de Almeida A.B.A., Melo P.S., Hiruma-Lima C.A., Gracioso J.S., Carli L., Nunes D.S., Haun M. and Souza Brito A.R.M., 2003. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. *European Journal of Pharmacology* **472** (3): 205-212.

Ambroise-thomas P., 2000. Traitement du paludisme: prévenir les résistances par les associations d'antipaludiques. *Médecine Tropicale* **60**: 219-222

Ang K., Holmes M.J., Higa T., Hamann M.T., Kara U., 2000. *In vivo* antimalarial activity of the beta-carboline alkaloid Manzamine A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1645-1649.

Aparecida M.M., Pinto A.C., Arruda A.C., Pamplona S.R., Vanderlinde F.A., Lapa A.J., Echevarria A., Grynberg N.F., Colus I.M.S., Farias R.A., Luna Costa A.M., Rao V.N., 2000. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *Journal of Ethnopharmacology* **70**: 41-55.

Aris P., 2000. Malaria. *Nature Biotechnology* **18**: 111-112.

Asawamahasakda V. and Yuthavong Y., 1993. The methionine synthesis cycle and salvage of methyltetrahydrofolate from host red cells in the malaria parasite (*Plasmodium falciparum*). *Parasitology* **107**: 1-10.

Aubry P. Paludisme, Actualités. <http://medecinetropicale.free.fr>; consulté le 25 juillet 2005.

Awad A.B., Fink C.S., 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *Journal of Nutrition* **130**: 2127-2130

Backhouse N., Delporte C., Negrete R., Feliciano S. A., Lopez-Perez J. L., 2002. *Phytotherapy Research* **16**: 562-566.

Bajaj R., Chang C.J., McLaughlin J.L., Powell R.G., Smith C.R., 1986. Tiliroside from the seeds of *Eremocarpus setigerus*. *Journal of Natural Products* **49**(6): 1174-1175.

Barton D.H., Bhakuni D.S., Chapman G.M., Kirby G.W., Haynes L.J., Stuart K.L., 1967. Phenol oxidation and biosynthesis. XIV. (Alkaloids from *Croton* species. VII.) The biosynthesis of crotonosine. *Journal of the Chemical Society. Perkin transactions I* (14): 1295-1298

Becker H., Jochen M.S., Speakman J.B., Zapp J., 2005. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia* **76** : 580-584

Benoit, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Diafouka, F., Marion, C., Koné-Bamba, D., Mallié, M., Yapo, A., Bastide, J.M., 1996. In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in Western African traditional medicine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **54**: 67–71.

Blunden G., Yang M., Janicsak G., Mathe I., Carabot-Cuervo A., 1998. Betaine distribution in the Amaranthaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**(1): 87-92.

Bohle D.S., Dinnebier R.E., Madsen S.K. and Stephens P.W., 1997. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 713-716.

Boudonneu M., 1990. La détection inverse en RMN, *Analysis n°1*, Vol. 18.

Bouic P.J.D. and al., 1999. The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glycoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *International Journal of Sports and Medicine*, **20**: 258-262

Bratoeff E., Perez-Amador M.C., Ramirez E., Flores G., Valencia N., 1997. Xanthonés, flavones and coumarins from *Amaranthus paniculatus* Schinz (Amaranthaceae). *Phyton (Buenos Aires)* **60**(1/2): 103-107.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie Plantes médicinales. Editions TEC et DOC. ISBN : 2-7430-0315-4.

Budzianowski J., Skrzypczak L., 1995. Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. *Phytochemistry* **38** (4): 997 1001

Buschi C.A., Pomilio A.B., Gros E.G., 1981. 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. *Phytochemistry* **20**(5):1178-1179.

Butsarakhm S., Likhitwitayawuid K. and Houghton P.J., 2004. Phloroglucinol derivatives from *Mallotus pallidus*. *Phytochemistry* **65** (8): 2589-2594.

Canet D., 1991. La RMN : concepts et méthodes. Inter éditions. Paris.

Chattopadhyay D., Arunachalam G., Mandal A.B., Tapas K.S., Mandal S. C., Bhattacharya S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **82**: 229-237

Chaudenier J. et Danis M., décembre 1998. Le traitement du paludisme : Actualité et perspectives. *Développement et santé*, n° 138.

Chhabra S.C., Mahunnah L.A., Mshiu E.N., 1990. Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania. III Angiosperms (Euphorbiaceae to Menispermaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **28**: 255-283.

Cheng G., Yanjing B., Yuying Z., Tao J., Liu Y., Guangzhong T., Libin M., Ning L., Xiaojie X., 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*. *Tetrahedron* **56**: 8915-8920

Chen M., Theander T.G., Christensen S.B., Hviid L., Zhai L., Kharazmi A., 1994. Licochalcone A: a new antimalarial agent inhibits *in vitro* growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* and protects mice from *P. yoelii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**: 1470-1475.

Correa J., Bernal H., 1992. Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello. Santafe de Bogotá, Colombia, Tome VII, pp. 314–322.

Craveiro A.A., Silveira R.E., 1982. Two cleistanthane type diterpenes from *Croton sonderianus*. *Phytochemistry* **21** (10): 2571-2574.

Dae-Sup P., Choi S.Z., Ran K.K., Mee L.S., Ro L.K., Suhkneung P., 2004. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album* L. *Journal of Applied Pharmacology* **11**(1): 1-4.

Dame J.B., Reddy G.R., Yowell C.A., Dunn B.M., Kay J. and Berry C., 1994. Sequence, expression and modeled structure of an aspartic proteinase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **64**: 177-190.

Danis M., 2003. Avancées thérapeutiques contre le paludisme. *Médecine Tropicale* **63**, 267-270.

Das B., Kashinatham A., Venkataiah B., Srinivas K.V.N.S., Mahender G. and Ravinder M.R., 2003. Cleomiscosin A, a coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**(10): 1189-1191

Debacker M.J., 2000. Paludisme: historique, mythes, croyances et idées reçues. Thèse de Médecine de l'Université Paris Val de Marne.

Deluol A.M., Levillayer H., Poirot J.L., 1998. Diagnostic du paludisme. *Développement et Santé*, n° 138.

Desjardins R.E., Canfield C.J., Haynes J.D., Chilay J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro was determined by a semi-automated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **16**: 710–718.

DiMaggio C.J., D'Addesio J., 1991. Malaria in an urban emergency department: epidemiology and diagnostic features of 25 cases. *American Journal of Emergency Medicine*. **9**: 347-349.

Dimas K., Demetzos C., Mitaku S., Marselos M., Tzavaras T., Kokkinopoulos D., 2000. Cytotoxic activity of kaempferol glycosides against human leukaemic cell lines in vitro. *Pharmacological research* **41**, no. 1.

Dogra J.V.V., Ojha O.P., 1978. Saponin from *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Grise *Comparative Physiology and Ecology* **3**(1): 5-6.

Dominguez J.N., Lopez S., Charris J., Iarruso L., Lobo G., Semenov A., Olson J. E. and Rosenthal P. J., 1997. Synthesis and antimalarial effects of phenothiazine inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine protease. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**: 2726-2732.

Dorn A., Stoffel R., Matile H., Bubendorf A. and Ridley R., 1995. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* **374**: 269–271.

Duke's. Phytochemical and Ethnobotanical Databases: Daucoesterol. [En ligne]. <http://sun.arsgrin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/chemdisp.xsql?chemical=DAUCOSTEROL>; page consulté le 19 octobre 2005

Egan T.J., Ross D.C. and Adams P.A., 1994. Quinoline antimalarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS Letters* **352**: 54-57.

Eisenreich W.J., Bracher F., 2001. Crotoflavol, a new phenanthrene from *Croton flavens*. *Natural Product Letters* **15** (2): 147-150.

El-Mekkawy S., Meselhy M. R., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T., Otake T., 1999. Five new phorbol diesters from the seeds of *Croton tiglium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **47** (9): 1346-1347.

El-Seed H.R., Sobaih S.A., 1999. Triterpenes and flavonol glycosides from *Aerva javanica*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **27** (1): 17-21.

Esmeraldino L.E, Souza A.M. and Sampa S.V., 2005. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (*Euphorbiaceae*) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. *Phytomedicine* **12** (8): 570-576.

Ferreira E.O., Dias D. A., 2000. A methylenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*. *Phytochemistry* **53** (1): 145-147.

Ferreira E. O. and. Dias D. A., 2004. Phytochemical investigation of *Gomphrena clausenii* Moq. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**(9): 823-827

Francis S.E., Gluzman I.Y., Oksman A., Knickerbocker A., Mueller R., Bryant M.L., Sherman D.R., Russel D. G. and Goldberg D. E., 1994. Molecular characterization and inhibition of a *Plasmodium falciparum* aspartic hemoglobinase. *EMBO Journal* **13**: 306-317.

Francois G., Timperman G., Eling W., Ake Assi L., Holenz J., Bringmann G., 1997. Naphthylisoquinoline alkaloids against malaria: Evaluation of the curative potential of dioncophylline C and dioncopeltine A against *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**:2533-2539.

Fujita T., Ohira K., Miyatake K., Nakano Y., Nakayama M. 1995. Inhibitory Effect of Perillosides A and C, Related Monoterpene Glucosides on Aldose Reductase and Their Structure-Activity Relationships. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **43**(6): 920-926

Garcia H., 1975. Flora Medicinal de Colombia. Santafe de Bogota, Colombia, Tome II, pp. 87-91.

Gentilini M., 1990. Le paludisme dans Médecine Tropicale. Paris, Flammarion, 91-122.

Gero A.M. and O'Sullivan W.J., 1990. Purines and pyrimidines in malarial parasites. *Blood Cells* **16**: 467-484.

Gessler M.C., Nkunyak M.H.H., Mwasumbi L.B., Heinrich M., 1994. Screening of Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Tropica* **56**: 65-77.

Gluzman I.Y., Francis S.E., Oksman A., Smith C., Duffin K. and Goldberg D. E., 1994. Order and specificity of the *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation pathway. *Journal of Clinical Investigation* **93**: 1602-1607.

Goldberg D.E., 1992. Plasmodial hemoglobin degradation: an ordered pathway in a specialized organelle. *Infectious Agents Disease I*: 207-211.

Ghosal S., Kulwant S., 1984. Sitoindosides I and II, two new antiulcerogenic sterylacylglucosides from *Musa paradisiaca*. *Journal of Chemical Research, Synopses 4*: 110.

Gunther H., 1994. La spectroscopie de RMN, Masson, Paris.

Guerrero M.F., Carrón R., Martín M.L., San Román L. and Reguer M.T., 2001. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *Journal of Ethnopharmacology 75* (1): 33-36.

Harborne J.T., Mabry T.J., 1982. The flavonoïds: Advances in research. ISBN 0-412-22480-1. Chapman and Hall. London.

Henke H., 1995. Preparative gel chromatography on sephadex LH-20. Heidelberg: Huthig, Chromatography methods. ISBN 3-7785-2428-3.

Hassan H.F. and Coombs G.H., 1988. Purine and pyrimidine metabolism in parasitic protozoa. *FEMS Microbiology Review. 4*: 47-83.

Henning K., 1997. Fuel production improves food production: the *jatropha* project in Mali In: Biofuels and Industrial Products from *Jatropha Curcas*. Gibitz, G.M., Mittelbach M., Trabi M. (Eds.), 92-97. Graz, Autriche.

Hernández T., Canales M., Avila J.G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar A. and Lira R., 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (Mexico). *Journal of Ethnopharmacology, 88* (2-3): 181-188.

Heuer S., Wray V., Metzger J.W., Strasck D., 1992. Betacyanins from flowers of *Gomphrena globosa*. *Phytochemistry 31* (5): 1801-1807.

Hiroshi M., Kazutaka S., Hideyuki S. and Junichi K., 2000. Antimitotic activity of moroidin, a bicyclic peptide from the seeds of *Celosia argentea*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10* (5): 469-471.

Hnawia E., Thoison O., Guéritte-Voegelien F., Bourret D. and Sévenet T., 1990. A geranyl substituted flavonol from *Macaranga vedeliana*. *Phytochemistry 29* (7): 2367-2368.

Hohmann J., Ferenc E., Dombi G. and Szabó P., 2001. Salicifoline and salicinolide, new diterpene polyesters from *Euphorbia salicifolia*. *Tetrahedron Letters* **42** (37): 6581-6584

Hoerhammer L., Wagner H., Hein K., 1964. Silica gel-thin layer chromatography of flavonoids. *Journal of chromatography* **13**: 235-7.

Howard R.J.S., Uni M., Aikawa S.B., Aley J.H., Leech A.M., Lew T.W., Wellem J.R., Reuer J., Taylor D.W., 1986. Excretion of a malaria histidine-rich protéine (PfHRP-II) from infected erythrocytes. *Journal of Cellular Biology* **103**: 1269-1277.

Holmberg M., Bjorkman A., Franzen L., Aslund L., Labbord M., Petterson U., Wigzell H. 1986. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection by spot hybridization assay: specificity, sensitivity and field applicability. *Bulletin WHO* **64**: 579-585.

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

Huber W., Koella J.C., 1993. A comparison of the three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasite. *Acta Tropica* **55**: 257-261.

Hunsa P., Chulabhorn M., Ruchirawat S., Prawat U., Tuntiwachwuttikul P., Tooptakong U., Taylor W.C., Pakawatchai C., Brian W., Skelton and Allen H., 1995. White Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry*, **40** (4): 1167-1173.

Ikan R., Kashman J., Bergmann E.D., 1964. Thin-layer chromatography of tetra- and pentacyclic triterpenes. *Journal of chromatography* **14**: 275-9.

Iqbal J., Sher A., Hira P.R., AL-Owaish R., 1999. Comparaison of the optimal Test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 3644-3646.

Jelinek T., Kilian A.H.D., Mughusu E.B., Nothdurft H.D., Lischer T., Knobloch J., Sonnenburg F.V., 1996. Parasite-specific lactate dehydrogenase for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in an endemic area in West Uganda. *Tropical Medicine and International Health* **1**: 227-230.

Joanne Palmer *Australian Systematic Botany*; [En ligne].

<http://florabase.calm.wa.gov.au/search/advanced?genus=gomphrena&page=1>; consulté le 12 juillet 2005.

de Jussieu A.L., 1789; 1753. *Genera Plantarum* 384, genre type: *Euphorbia* L.; *Species Plantarum I*: 450.

Kadow C. et al., 1986. A double-blind trial of the effect of β -sitosterol glucoside in the treatment of benign prostate hyperplasia. *European Urology* **12**: 187-189

Kamini M., Barbara J.S., Marchesini P., Carter R., 2001. The Neglected Burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **64** (1.2): 97-106.

Kankam C.K. and Odum-Ewuakye B, 2005. Babadua reinforced concrete two-way slabs subjected to concentrated loading. *Construction and Building Materials*, In Press, Corrected Proof, Available online 23 March 2005.

Kanchanapoom T., Kasai R., Chumsri P., Kraisintu K. and Yamasaki K., 2002. Lotthanongine, an unprecedented flavonoidal indole alkaloid from the roots of Thai medicinal plant, *Trigonostemon reidioides*. *Tetrahedron Letters* **43** (16) : 2941-2943.

Kapingu M. C., Guillaume D., Mbwambo Z. H., Moshi M. J. Uliso F.C., Mahunnah R. L. A., 2000. Three novel diterpenoids from the roots of *Croton macrostachys*. *Phytochemistry* **54** (8): 767-770.

Kennedy, H. 1978. Systematics and pollination of the "closed-flowered" species of *Calathea* (*Marantaceae*). *University California Publication Botanic* **71**: 1-90, plates 1-20.

Khalil M.V., Idler D.R., Patterson G.W., 1980. Sterols of Scallop III. Characterization of some C-24 epimeric sterol by high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lipids* **15** (1): 69-73.

Kima M.Y., Kunihiya I., Matsue H., 2005. Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. Fruits and their antiradical properties. *Journal of Food Composition and Analysis* **18**: 789-802.

Kimura M., Miyake H., Kim H.S., Tanabe M., Arai M., Kawal S., Yamahe A., Wataya Y., 1995. Species specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: Clinical study with malaria patients. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2342-2346.

Kirby G.C., Paine A., Warhurst D.C., Noamese B.K., Phillipson J.D., 1995. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant derived indoloquinoline. *Phytotherapy Research* **9**: 359-363.

Klippel K.F. et al., 1997. A multicentric placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol for the treatment of benign prostate hyperplasia. *British Journal of Urology* **80**:427-432.

Konishi T., Yamazoe K., Konoshima T. and Fujiwara Y., 2003. Seco-labdane type diterpenes from *Excoecaria agallocha*. *Phytochemistry* **64**(4): 835-840

Kortepeter M., Brown J., 1998. A review of 79 patients with malaria seen at a military hospital in Hawaii from 1979 to 1995. *Military Medicine* **163** (26): 84-89.

Krungkrai J., Cerami A. and Henderson G.B., 1990. Pyrimidine biosynthesis in parasitic protozoa: purification of a monofunctional dihydroorotase from *Plasmodium berghei* and *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* **29**: 6270-6275.

Krungkrai J., Krungkrai S.R. and Phakanont K., 1992. Antimalarial activity of orotate analogs that inhibit dihydroorotase and dihydroorotate dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology* **17**: 1295-1301.

Krungkrai J., Webster H.K. and Yuthavong Y., 1989. De novo and salvage biosynthesis of pteroyl pentaglutamates in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **32**: 25-38.

Kun-Young P., Jung K.O., Rhee S.H., Yung H.C., 2003. Antimutagenic effects of *doenjang* (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutation Research* 523-524

Kurkin V. A., (2003). Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity. *Chemistry of Natural Compounds* **39**, No. 2.

Lima E.M.C., Medeiros J.M.R. and Davin L.B., 2003. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry* **63**(4): 421-425

Liqin W., 2005. Phytochemical constituents of five plants. [En ligne]: <http://www.Kib.ac.cn/KIBEnglish/soft/99.htm>

List P.H., Horhammerl L., 1979. Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer, Berlin

Lopes M.I., Saffi J., Echeverrigaray S., Pêgas Henriques J.A. and Salvador M., 2004. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *Journal of Ethnopharmacology* **95** (2-3) : 437-445.

- Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., 1970. The systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. Berlin.
- Macedo A.F., Barbosa N.C., Esquibel M.A., Souza M.M., Cechinel V., 1999. *Pharmazie* **54**: 776.
- Makler M.T., Hinrichs D., 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **48**: 205-210.
- Malvy D., Djossou F., Thiebaut R., Le Bras M., 2000. Plasmodies-Malaria. Formes cliniques et diagnostic dans Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris, Elsevier **8**: 507-520.
- Malvy D., Djossou F., Receveur M.C., Le Bras M., 2000. Plasmodies : Traitement, prévention. Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris : Elsevier **8**: 507-525.
- Mampane K.J., Joubert P.H., Hay I.T., 1987. *Jatropha curcas*: use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. *Phytotherapy Research* **1**: 50-51.
- Marsh K. 1996. Clinical algorithm for malaria in africa. *Lancet* **347**: 1327-1329.
- Mavar M.H., Brick D., Marie D. E. P., Quetin-Leclercq J., 2004. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (*Euphorbiaceae*). *Journal of Ethnopharmacology* **92** (2-3): 209-214
- Mermet-Bouvier R., 1962. *J Chromatography* **9**, 345-347.
- Ministère de la Santé/SNIGS, 1994. Système national d'Information et de Gestion Sanitaire) Statistique sanitaire, République du Bénin.
- Miura K., Kikuzaki H., Nakatani N. 2001. Apianane terpenoids from *Salvia officinalis* (*Labiatae*). *Phytochemistry* **58**: 1171-1175
- Mohamed K.M., 2001. Phenylpropanoid glucosides from *Chrozophora oblique*. *Phytochemistry* **58** (4): 615-618.
- Mollaret P., 1880. Découverte par Alphonse Laveran de l'agent du paludisme. Constantine. *Nouvelle Presse Médicale* **9**: 3055-3063.

Moreno J., 2003. Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7. *Free Radical Biology and Medicine* **35**: 1073-1081

Muhammad I., Mossa J.S., Al-Yahya M., Mirza H.H., El-Feraly F.S. and Mcphail A.T., 1994. Modified labdane diterpenoids from *Cluytia richardiana*. *Phytochemistry* **37** (5): 1377-1381.

de Nazaré D.M.M., Sebastião F. Palmeira J., Conserva L.M. and Lyra Lemos R.P., 2005. Quinoline alkaloids from *Sebastiania corniculata* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **33** (5): 555-558.

Nardi G.M., Felippi R., DalBó S., Siqueira J.M., Arruda D.C., Monache D.F., Timbola A.K., Pizzolatti M.G., Ckless K. and Ribeiro-do-Valle R.M., 2003. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. *Phytomedicine* **10** (2-3): 176-184.

Neto A.G., da Silva Filho A.A., Costa J.M.L.C., Vinholis A.H.C., Souza G.H.B., Cunha W.R., Silva M.L.A.E., Albuquerque S., Bastos J.K., 2004. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. *Phytomedicine* **11** (7-8): 662-665.

Nutra news. Le bêta-sitostérol, un phytostérol prometteur. [En ligne] <http://www.nutranews.org/fra/index.php?page=numindex&magazineid=150>. Page consulté le 19 octobre 2005

Okezie I.A., Agyakwa C.W. Guide des adventices d'Afrique de l'Ouest. Institut International d'Agriculture Tropicale, Ibadan: ISBN 978-131-0367

Olaleye B.O. et al., 1998. Clinical predictors of malaria in Gambian children with fever or a history of fever. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiène* **92**: 300-304.

Olliaro L. P., Yuthavong Y., 1999. An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial Drug Discovery. *Pharmacology & Therapeutics* **81** (2): 91-110.

Oliveira D.A., Holloway B.P., Durigon E.L., Collins W.E., Lol A.A., 1995. Polymerase chain reaction and a liquid phase non isotopic hybridization for species specific and sensitive detection of malaria infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52** : 139-144.

OMS, 2000. La situation actuelle du paludisme dans le monde. Comité OMS expert du paludisme. p.3 Genève.

- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., 1985. Plants as sources of antiparasitic drugs. Part 1. *Planta Medica* **61**: 394-398.
- Onyeibor O., Croft S.L., Dodson H.I., Feiz-Hadda M., Kendrick H., Millington N.J., Parapini S., Phillips R.M., Seville S., Shnyder S.D., Taramelli D., Wright C.W., 2005. Synthesis of Some Cryptolepine Analogues, Assessment of Their Antimalarial And cytotoxic Activities, and consideration of their Antimalarial Mode of Action. *Journal of Medicinal chemistry* **48**: 2701-2709.
- Organisation mondiale de la santé, Genève, 2002^a. Promoting the role of Traditional Medicine in health System: a Strategy for African Region 2001 – 2010. Harare, OMS: Ref document AFR/RC50/Doc.9/R.
- Organisation Mondiale de la Santé, Genève. (2002)^b. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002 - 2005. WHO/EDM/TRM.
- Patterson G.W., Xu S., Salt T.A., 1991. Sterols of Caryophyllales with emphasis on Amaranthaceae. *Phytochemistry* **30**: 523-526.
- Pedras M.S.C., Chumala P.B., Suchy M., 2003. Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptosphaeria maculans*: structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry* **64**: 949-956
- Penders A., Kapundu M., Delaude C., 1992. Structural analysis of major saponins of *Alternanthera sessilis*. *Bulletin des Societes Chimiques Belges* **101**(3): 227-232.
- Peng J., Fan G., Hong Z., Chai Y., Wu Y., 2005. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Ethnopharmacology A* **1074**: 111-115.
- Petersen E., Marbiah N.T., New L., Gottschau A., 1996. Comparaison of two methods for enumerating malaria parasites in thick blood films. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**: 485-489.
- Piattelli M., Minale L., 1964. Pigments of Centrospermae II: Distribution of betacyanins *Phytochemistry* **3**: 547.
- Pink R., Hudson A., Mouriès M-A. and Bendig M., 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature reviews* **4**.
- Pomilio A.B., Sola G.A., Mayer A.M., Rumi L.S., 1994. Antitumor and cytotoxic screen of 5,6,7-trisubstituted flavones from *Gomphrena martiana*. *Journal of Ethnopharmacology* **44** (1) : 25-33.

Prozesky E.A., Meyer J.J.M., Louw A.I., 2001. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* **76** : 239-245.

Ramarathnam N., Osawa T., Namiki M., Kawakishi S., 1989. Chemical studies on novel rice hull antioxidants. Identification of isovitexin, a C-glycosyl flavonoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **37**(2): 316-19.

Rao Y.K., Fang S., Tzeng Y., 2005. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- α and IL-12 in activated macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28**(5): 912-915.

Redd S.C., 1996. Clinical algorithm for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Lancet* **347**: 223-227.

Ridley R.G., Werner H., Hugues M., Catherine J., Arnulf D., Raffaello M., Synese J., Wolfgang F.R., Alberto G., Maria-A G., Heinrich U., Werner H., Sodsri T., Wallace P., 1996. 4-Aminoquinoline analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 1846-1854.

Ridley, R., 1996. Haemozoin formation in malaria parasites: is there a haem polymerase? *Trends Microbiology* **4**: 253-254

Rieckmann, K.H., Sax, L.J., Campbell, G.H., Mrema, J.E., 1978. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in vitro* microtechnique. *The Lancet* **I**: 22-23.

Rinaldi A., 2004. Fighting malaria at the crossroads. *EMBO reports* **5**, 847-851

Roengsumran S., Singtothong P., Pudhom K., Ngamrochanavanich N., Petsom A. Chaichantipyuth C., 1999. Neocrotocembranal, a new cembranoid diterpene from the stem bark of *Croton oblongifolius*. *Journal of Natural Product* **62** (8): 1163-1164.

Rosenthal P J. and Nelson R G., 1992. Isolation and characterization of a cysteine proteinase gene of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemistry Parasitology* **51**: 143-152.

Rubio J.M., Benito A., Berzosa P.J., Roche J., Puente S., Subirats M., 1999. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 3260-3264.

- de Ruiz R.E.L., Fusco M., Rapisarda A.M.P., Sosa A., Ruiz S.O., 1991. Phytochemical study of yerba del pollo (*Alternanthera pungens* H.B.K., Amaranthaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense* **10**(1): 25-27
- de Ruiz R.E.L., Fusco M.R., Sosa A., Ruiz S.O., 1996. Isolation of anthraquinones and flavonoid pigments from fruits of 'Yerba del pollo (*Alternanthera pungens* H.B.K., Amaranthaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense* **15**(1): 63-66.
- Saenz R.J.A., Nassar C.M., 1970. Phytochemical screening of Costa Rican plants: Alkaloid analysis. *Revista de Biología Tropical* **18**(12): 129-138.
- Sahar E., Meselhy R.M., Nakamura N., Hattori M., Kawahata T. and Otake T., 2000. Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* **53** (4-9): 457-464.
- Sahu B.R., Chakrabarty A., 1993. A flavone glycoside, robinetin-7-O- β -D-glucopyranoside from *Alternanthera sessilis*. *Asian Journal of Chemistry* **5**(4): 1148-1150.
- Sala A.M., Recio C., Schinella G.R., Manez S., Giner R.M., Cerda-Nicolas M., Rios J.L., 2003. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology* **461** : 53-61
- Salvador M.J., Ferreira E.O., Pral E.M.F., Alfieri S.C., Albuquerque S., Ito I.Y. and Dias D.A., 2002. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparion portulacoides* (Amaranthaceae). *Phytomedicine* **9** (6): 566-571.
- Samir A.M.A., Shehata M. I. K., Matsumi D., Masanori B. and Nakatani M., 2001. Diterpenoids from *Euphorbia paralias*. *Phytochemistry* **58** (7): 1135-1139.
- Sanghyun L., Shim, Hee S.K., Sun J., Hyun S.K., Kang S.S., 2005. Aldose reductase inhibitors from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **28** (6): 1103-1105
- Sanoko R., G. Speranza C.P. and De Tommasi N., 1999. Triterpene saponins from *Alternanthera repens*. *Phytochemistry* **51** (8): 1043-1047.
- Sato A., Kurabayashi M., Ogiso A., Kuwano H., 1981. Poilaneic acid, a cembranoid diterpene from *Croton poilanei*. *Phytochemistry* **20**: 1915-1918.

Satoshi M., Yoshikazu I., Yukio N., Ohta S., Sakamoto T., Araki Y., Suzuki K.M., Yukihiko A., Yoshinori N., 2005. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**: 5814-5818

Satyajit D. Sarker V.S., Huw H.R. and Dinan L., 1998. 2-Dehydro-3-epi-20-hydroxyecdysone from *froelichia florida*. *Phytochemistry* **49** (8): 2311-2314.

Savchenko T., Pensri W., Satyajit D.S., Dinan L., 1998. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena spp.* (*Amaranthaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* **26** (3): 337-346.

Schirmer R.H., Müller J.G. and Krauth-Siegel R.L., 1995. Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**: 141-154.

Seymour K.K., Lyons S.D., Phillips L., Rieckmann K.H. and Christopherson R.I., 1994. Cytotoxic effects of inhibitors of *de novo* pyrimidine biosynthesis upon *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry* **33**: 5268-5274.

Sherman I.W., 1979. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasite). *Microbiology. Review* **43**: 453-495

Sherman I. (1961). Molecular heterogeneity of lactate dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*). *J. Exp.Med.* **114**: 1049-1062.

Simon I.H., Guerra C.A., Andrew J. Tatem, A.M., Snow R.W., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *THE LANCET Infectious Diseases* **4**: 327-336. [En ligne].
<http://siteresourcesworldbank.org/INTMALARIA/Resources/HayLancetJune04.pdf>
(page consulté le 13 juillet 2005).

Snounou G., Virigakosol S., Zhu X.P., Jarra W., Pinheiro L., do Rosario V.E., Thaitong S., Brown K.N., 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Journal of Molecular and Biochemistry Parasitology* **61**: 315-320a

Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaitong S., Brown K. N., 1993. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Journal of Molecular and Biochemistry Parasitology* **58**: 283-292b.

- Snow R. W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H. Y., Hay S. I., 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature* **434**: 214-217. [En ligne].
<http://siteresourcesworldbank.org/INTMALARIA/Resources/HayLancetJune04.pdf>
 (page consulté le 13 juillet 2005).
- Spielman A., Perrone J.B., Teklehaimanot A., Balcha F., Wardlaw SC., Levine RA, 1988. Malaria diagnosis by direct observation of human of centrifuged samples of blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **39**: 337-342
- Stuart K. L., Woo-Ming B.R., 1975. Vomifoliol in *Croton* and *Palicourea* species. *Phytochemistry* **14** (2): 594-595.
- Stuart K. L., Graham L., 1973. Alkaloids biosynthesis in *Croton flavens*. *Phytochemistry* **12**: 1967-1972.
- Stuart K. L., Byfield D. Y., 1971. Alkaloids from *Croton humilis*. *Phytochemistry* **10**: 460-462.
- Sullivan D., Gluzman I. and Goldberg D., 1996. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science* **271**: 219-222.
- Tanaka H., Nakamura T., Ichino K., Ito K., 1989. A phenolic amide from *Actinodaphne longifolia*. *Phytochemistry* **28**: 2516-2517.
- Tanaka R. and Matsunaga S., 1991. Fernane and unusually migrated fernane triterpenes from *Euphorbia supine*. *Phytochemistry* **30** (1): 293-296.
- Tanaka T., Ito T., Iinuma M., Takahashi Y. and Naganawa H., 1998. Dimeric chalcone derivatives from *Mallotus philippensis*. *Phytochemistry* **48** (8): 1423-1427.
- Tchinda A.T. Tsopmo A., Tene M., Kamnaing P., Ngnokam D., Tane P., Ayafor J.F., Connolly J.D. and Farrugia L.J., 2003. Diterpenoids from *Neoboutonia glabrescens* (*Euphorbiaceae*). *Phytochemistry* **64** (2) : 575-581.
- Trager W., Jensen J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193** : 673-675.
- Trape J.F., 1985. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick blood smear examination for epidemiological investigations. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **79**: 181-184.

- Touré Y.T., Oduola A., 2004. Malaria. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 276-277.
- Tripathi R.D. and Tiwari K.P., 1980. Genticulatin, a triterpenoid saponin from *Euphorbia geniculata*. *Phytochemistry* **19** (10): 2163-2166.
- Udeinya, I.J., 1993. Anti-malarial activity of Nigerian neem leaves. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **87**: 471.
- Uhlemann A-C., Staalsoe T., Klinkert M-Q., and Hviid L., 2000. Analysis of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *MACS & more* **4**, N°2.
- Un-Ho J.R., Lee J.Y., Kang S.K., Kim J.K., Park W.H., Kim J.G., Moon S.K., Kim C.H.T., 2005. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences* **77**: 2760-2769
- Valecha N., Biswas S., Badoni V., Bhandari K.S., Sati O.P., 1994. Antimalarial Activity of *Artemisia japonica*, *Artemisia maritima* et *Artemisia nilegarica*. *Indian Journal of Pharmacology* **26**: 144-146.
- Vigor C., Fabre N., Fouraste I., Moulis C., Cascarillins B-D., 2001. Three new clerodane diterpenoids from the stem bark of *Croton eluteria*. *Phytochemistry* **57** (8): 1209-1212.
- Wanchai D-E., Bupparchart P., 2003. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. *Phytochemistry* **62**: 389-398.
- Wandji J., Wansi J. D., Fuendjiep V., Dagne E., Mulholland D.A., Tillequin F., Fomum Z.T., Sondengam B.L., Nkeh B.C. and Njamen D., 2000. Sesquiterpene lactone and friedelane derivative from *Drypetes molunduana*. *Phytochemistry* **54** (8): 811-815
- Wang A.X., Qi Zhang Z.J., 2004. Phenylpropanosids, lignans and other constituents from *Cremanthodium ellisii*. [en ligne]. <http://www.extenza-eps.com/GVR/doi/abs/10.5555/phmz.2004.59.11.889>. (Page consultée le 19 octobre 2005).
- Watt J.M., Breyer-Brandwijk M.G., 1962. The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa, E & S Livingstone, Edinburgh.
- Watson L., Dallwitz M. J., (1992 onwards). The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 14th december 2000. [En ligne]. <http://biodiversity.uno.edu/delta/>, (site consulté le 24 juillet 2005).

Weber M.W., et al., 1997. Pallor as a clinical sign of severe anaemia in children: an investigation in the Gambia. *Bulletin of the World Health Organization*, **75** (1): 113-118.

Wery M., 1999. Revue des méthodes de diagnostic du paludisme au laboratoire, *Immunoanalyses Biologiques Spéciales* **14** : 318-327.

WHO, Les combinaisons thérapeutiques antipaludiques. Rapport d'une consultation technique de l'OMS. 4 – 5 avril 2001. WHO/CDS/RBM/2001.35

Westling J., Yowell C.A., Majer P., Erickson J.W., Dame J.B. and Dunn B.M., 1997. *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, and *P. malariae*: a comparison of the active site properties of plasmepsins cloned and expressed from three different species of the malaria parasite. *Experimental Parasitology* **87**: 185-193

Williams C.A. and Harborne J. B., 1977. The leaf flavonoids of the Zingiberales. *Biochemical Systematics and Ecology* **5** (3): 221-229.

Willibald S., Yizhong C., Degenkolb T., Schmidt J. and Corke H., 2001. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry* **58** (1): 159-165.

Winkler J.D., Axten J.M., 1998. The first total synthesis of Ircinol A, Ircinal A, and manzamine A and D. *Journal of American Chemistry Society* **120**: 6425-6426

World Health Organization, 1997. Integrated management of childhood illness. Geneva,: unpublished document WHO/CHD/97.3.A-L ; available on request from child and Adolescent Health and Development, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland)

Wright C. W. 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarials drugs. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 67-71.

Wright A.D., König G.M., Angerhofer C.K., Greenidge P., Linden A., Desqueyroux-Faundez R., 1996. Antimalarial activity: The search for marine-derived natural products with selective antimalarial activity. *Journal of Natural Product* **59**: 710-716.

Wright A.D., Wang H., Gurrath M., König G.M., Kocak G., Neumann G., Loria P., Foley M., Tilley L., 2001. Inhibition of heme detoxification processes underlies the antimalarial activity of terpene isonitrile compounds from marine sponges. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**: 873-885.

Wunderlin, R.P. and B.F. Hensen – 2000 Atlas of Florida Vascular Plants. Institute for Systematic Botany

Yaguchi M., Miyazawa K., Katagiri T., Nishimaki J., Kizaki M., Tohyama K., Toyama K., 1997. Vitamin K2 and its derivatives induce apoptosis in leukemia cells and enhance the effect of all-trans retinoic acid. *Leukemia*. **11** (6):779-787.

Young M.C.M., Potomati A., Chu E. P., Haraguchi M., Yamamoto M. and Kawano T., 1997. ¹³C NMR analysis of monodesmosidic saponins from *Gomphrena macrocephala*. *Phytochemistry* **46** (7): 1267-1270.

Zhou B.N., Blasko G., Gordell G.A., 1988. Althernanthin, A C-glycosylated flavonoid from *Althernantera philoxeroides*. *Phytochemistry* **27**: 3633.

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique de trois espèces médicinales béninoises, *Croton lobatus* L., *Thalia géniculata* L. et *Gomphrena celosioides* Mart., ainsi que l'évaluation de l'activité antipaludique et de la cytotoxicité des composés isolés.

L'isolement des composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques, et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire, ont permis d'isoler dix composés dont deux dérivés flavonoïdiques: le tiliroside et l'isovitexine, deux acides phénoliques: l'acide chlorogénique et l'acide 4,5-*O*-dicafféoylquinique, trois dérivés stéroïdiques: le daucostérol, le stigmastérol, le sitoindoside I, un polyprénylalcool: le géranylfarnésol, et un alcool diterpénique. Les résultats obtenus dans les essais biologiques montrent une bonne activité antipaludique et une absence de cytotoxicité pour le tiliroside isolé à partir de *Croton lobatus*.

Mots clés : *Croton lobatus*, *Euphorbiaceae*, *Thalia géniculata*, *Marantaceae*, *Gomphrena celosioides*, *Amaranthaceae*, pharmacopée traditionnelle, tiliroside, flavonoïdes, terpènes, phytostérols, activité antimalarique, cytotoxicité

Abstract

This work concerned the phytochemical study of three Beninese medicinal species, *Croton lobatus* L., *Thalia geniculata* L. and *Gomphrena celosioides* Mart., together with the evaluation of the antimalarial activity and the cytotoxic effect of the isolated compounds.

The extraction and purification of the different constituents, based on the use of a combination of chromatographic methods, and their structural determination, performed by physicochemical and spectroscopic methods, such as ultraviolet, mass and nuclear magnetic resonance spectrometries, allowed us to isolate two flavonoid derivatives: tiliroside and isovitexin, two phenolic acids: chlorogenic acid and 4,5-*O*-dicafféoylquinic acid, three steroidal derivatives: daucostérol, stigmastérol, and sitoindoside I, one polyprenylalcohol: géranylfarnésol and one diterpenic alcohol. The results of the biological assays showed good antimalarial activity without cytotoxicity for tiliroside isolated from *Croton lobatus*.

Key words: *Croton lobatus*, *Euphorbiaceae*, *Thalia geniculata*, *Marantaceae*, *Gomphrena celosioides*, *Amaranthaceae*, traditional pharmacopoeia, tiliroside, flavonoids, terpenoids, phytosterols, antimalarial activity, cytotoxicity