



FACULTE DES SCIENCES

Institut de Pharmacognosie et Phytochimie

**Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine
Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepernick et Timler
(Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.)
(Rutaceae)**

Thèse de doctorat

présentée à la

Faculté des Sciences de
l'Université de Lausanne

par

Fatima CHAIB KOURI

Pharmacienne diplômée de l'Université de Genève

Jury

Prof. Jean Hernandez, Président
Prof. Kurt Hostettmann, Directeur de thèse
Prof. Anne-Marie Mariotte, Expert
Dr. Emerson Ferreira Queiroz, Expert
Dr. Andrew Marston, Expert

LAUSANNE
2004

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

Président	Monsieur le Professeur Jean Hernandez
Directeur de thèse	Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann
Rapporteur	
Experts	Madame le Professeur Anne-Marie Mariotte
	Monsieur le Docteur Emerson Ferreira Queiroz
	Monsieur le Docteur Andrew Marston

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Madame Fatima Chaib Kouri

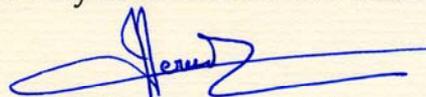
Pharmacienne diplômée de l'Université de Genève

intitulée

Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaine
Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepernick et Timler (Syn.
Fagara zanthoxyloides L.)
(Rutaceae)

Lausanne, le 5 novembre 2004

Le Doyen de la Faculté des Sciences



Professeur Jean **Hernandez**

A la mémoire de mon père

A ma mère et à son courage

A mon mari

A tous les membres de ma famille

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann, pour m'avoir accueilli au sein de son institut et permis de réaliser cette thèse. Son dynamisme pour la recherche des produits naturels a été pour moi une source de motivation. Je tiens également à le remercier pour m'avoir permis de présenter quelques uns de mes résultats lors de congrès internationaux et de m'avoir fait confiance dans les diverses tâches qui m'étaient attribuées en tant qu'assistante d'enseignement.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Jean Hernandez, de l'Université de Lausanne, d'avoir accepté de présider la séance de mon examen privé et ma soutenance publique.

J'aimerais également remercier Madame le Professeur Anne-Marie Mariotte, de l'Université de Grenoble et Messieurs les Docteurs Emerson Ferreira Queiroz et Andrew Marston, tous deux de l'Université de Lausanne pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'ai apprécié notre interaction lors de mon examen de thèse et lors de ma soutenance publique.

Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude à Messieurs les Docteurs Emerson Ferreira Queiroz et Andrew Marston pour leur disponibilité et leurs conseils tout le long de mon travail de thèse.

Un grand merci au Professeur Jean-Luc Wolfender pour ses nombreux conseils dans le domaine de l'analytique malgré un emploi de temps surchargé.

J'aimerais encore remercier Monsieur le Docteur Drissa Diallo, de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali, pour ses précieux conseils au début de ma thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Kurt Schenk, de l'Institut de Cristallographie de l'Université de Lausanne, pour son analyse cristallographique.

Je souhaite encore remercier le Professeur Celso Vataru Nakamura, de la Fundação Universidade Estadual de Maringá, Brasil pour le test sur *Streptococcus mutans*.

Un merci collectif à tous les membres de l'IPP, en particulier Aly, Lalao, Patrice, Milena, Boris et Max.

Finalement, toute ma gratitude va à mes parents qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont aidé et encouragé tout au long de mes études, à mes frères et sœurs et à mon mari pour sa patience et son soutiens pendant la période ardue qu'est la rédaction.

Communications scientifiques

La présente étude a été réalisée de septembre 2000 à juillet 2004 à l'Institut de Pharmacognosie et phytochimie (IPP) de l'Université de Lausanne, sous la direction de Monsieur le Professeur Kurt Hostettmann. Les résultats de ce présent travail ont été partiellement publiés ou présentés sous forme de posters lors de congrès internationaux :

Publications

Chaaib, F., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., Diallo, D., Hostettmann, K. (2003). Antifungal and Antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides*. *Planta Medica* **69**, 316-320.

Chaaib, F., Queiroz, E.F., Diallo, D., Hostettmann, K. (2004). A new endoperoxide from the root bark of *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.), en preparation.

Posters

Chaaib, F., Queiroz, E.F., Diallo, D., Hostettmann, K. (2001). Antifungal compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* L. *International Symposium of the Phytochemical Society of Europe (PSE), Lausanne, Switzerland, September 12-14, 2001.*

Chaaib, F., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., Diallo, D., Hostettmann, K. (2002). Isolation of bioactive compounds from *Fagara zanthoxyloides* L. using CPC and dereplication of alkaloids by LC-MS. *50th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Barcelona, Spain, September 8-12, 2002.*

Table des matières

1. BUT DU PRESENT TRAVAIL	1
2. INTRODUCTION.....	5
2.1 Sélection des plantes et des extraits	7
2.1.1 Introduction	7
2.1.2 Critères de sélection des plantes.....	7
2.1.3 Critères de sélection des extraits	9
2.2 La famille Rutaceae.....	11
2.2.1 Introduction	11
2.2.2 Classification systématique et aspects botaniques	12
2.3 Présentation du genre <i>Zanthoxylum</i> (=Fagara).....	17
2.3.1 Introduction	17
2.3.2 Caractéristiques botaniques de <i>Zanthoxylum</i>	17
2.3.3 Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Zanthoxylum</i>	18
2.3.3.1 Flavonoïdes	18
2.3.3.2 Lignanes et composés apparentés.....	21
2.3.3.3 Alcaloïdes.....	22
2.3.3.4 Amides.....	25
2.3.3.5 Huiles essentielles	26
2.3.3.6 Coumarines.....	27
2.3.3.7 Divers	28
2.3.4 Propriétés biologiques et pharmacologiques de <i>Zanthoxylum</i>	30
2.3.4.1 Utilisation en médecine traditionnelle.....	30
2.3.4.2 Activités biologiques reconnues.....	31
2.3.5 Toxicité de <i>Zanthoxylum</i>	31
2.4 <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepernick et Timler	33
2.4.1 Introduction	33
2.4.2 Aspects botaniques et répartition géographique.....	34
2.4.3 Toxicité.....	36
2.4.4 Travaux antérieurs sur <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepernick et Timler ...	36
2.5 <i>Zanthoxylum macrophyllum</i> Oliv.....	38
2.5.1 Aspects botaniques et répartition géographique.....	38
2.5.2 Travaux antérieurs sur <i>Zanthoxylum macrophyllum</i> Oliv.....	38
2.6 <i>Zanthoxylum madagascariensis</i> Baker.....	40
2.6.1 Aspects botaniques et répartition géographique.....	40
2.6.2 Travaux antérieurs sur <i>Zanthoxylum madagascariensis</i> Baker.....	41
2.7 D'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle dans l'hygiène buccale.....	42
3. RESULTATS	45
3.1. Screening biologique des plantes récoltées au Mali.....	47
3.1.1. Introduction	47
3.1.2. Discussion	49
3.2. Investigation phytochimique de l'écorce de racines de <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepernick et Timler.....	51

3.2.1. Introduction	51
3.2.2. Screening chimique général et analyses LC/DAD-UV et LC-UV (DAD)-MS des extraits dichlorométhanique et méthanolique de l'écorce de racines de <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepernick et Timler	51
3.2.3. Résultats et discussions	53
3.2.4. Fractionnement de l'extrait dichlorométhanique et isolement des composés A-K....	58
3.2.5. Fractionnement de l'extrait méthanolique et isolement des composés L-O	60
3.2.6. Détermination de structure des composés A-K isolés de l'extrait dichlorométhanique	61
3.2.6.1. Détermination de structure du composé A	61
3.2.6.2. Détermination de structure des composé B-D	68
3.2.6.3. Détermination de structure des composé E-F	77
3.2.6.4. Détermination de structure des composé G	84
3.2.6.5. Détermination de structure des composé H	87
3.2.6.6. Détermination de structure des composé I-J	91
3.2.6.7. Détermination de structure des composé K	97
3.2.7. Détermination de structure des composés L-O isolés de l'extrait méthanolique	100
3.2.7.1. Détermination de structure du composé L	100
3.2.7.3. Détermination de structure du composé M	105
3.2.7.4. Détermination de structure du composé N	112
3.2.7.5. Détermination de structure du composé O	114
3.2.8. Activités biologiques des composés isolés	117
3.2.8.1. Activités antifongiques, antibactérienne, inhibitrice de l'acétylcholinestérase, antiradicalaire et larvicide	117
3.2.8.2. Activité anti-carie contre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	119
3.3. Etude HPLC-UV-MS des extraits dichlorométhaniques de trois espèces de <i>Zanthoxylum</i>	122
3.4. Etude HPLC-UV-MS des extraits méthanoliques de trois espèces de <i>Zanthoxylum</i>	124
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	127
5. PARTIE EXPERIMENTALE	137
5.1. Matériel végétal et extraction	139
5.2 Méthodes chromatographiques analytiques	140
5.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	140
5.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diodes (LC/DAD-UV)	142
5.2.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)	143
5.3. Méthodes chromatographiques préparatives	144
5.3.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	144
5.3.2. Chromatographie liquide à basse pression (LPLC, Lobar)	144
5.3.3. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)	145
5.3.4. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative	145
5.3.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)	146
5.4. Méthodes physico-chimiques	146
5.4.1. Point de fusion (P.F.)	146
5.4.2. Pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$)	147

5.4.3. Spectres ultraviolets (UV)	147
5.4.4. Spectres de masse (MS)	149
5.4.5. Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	149
5.4.6. Spectres infra-rouge (IR).....	150
5.5. Méthodes chimiques.....	150
5.5.1. Acétylation des composés A et M.....	150
5.5.2. Hydrolyse acide des flavonoïdes O-glycosylés.....	151
5.5.3. Test antioxydant	151
5.5.4. Test pour la détection d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	152
5.6. Méthodes biologiques.....	152
5.6.1. Activité antifongique contre <i>Cladosporium cucumerinum</i>	152
5.6.2. Activité antifongique contre <i>Candida albicans</i>	153
5.6.3. Activité antibactérienne contre <i>Bacillus subtilis</i>	155
5.6.4. Activité antibactérienne contre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	156
5.6.5. Activité larvicide contre <i>Aedes aegypti</i>	156
5.6.6. Activité molluscicide contre <i>Biomphalaria glabrata</i>	157
5.7 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés	158
6. REFERENCES.....	177
7. RESUME.....	193
8. ABSTRACT	197

Abréviations, symboles et conventions

$[\alpha]_D$: pouvoir rotatoire
δ	: déplacement chimique
ε	: coefficient d'extinction molaire (UV)
1, 2, 3,...	: désignation des composés mentionnés dans l'introduction
A, B, C,...	: désignation des composés naturels isolés dans le présent travail
AChE	: Acétylcholinestérase
AcOEt	: acétate d'éthyle
APCI	: ionisation chimique à pression atmosphérique (<i>Atmospheric Pressure Chemical ionization, MS</i>)
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i> (catalogue de microorganismes)
CCM	: chromatographie sur couche mince
<i>d</i>	: Doublet (RMN)
<i>dd</i>	: Doublet de doublet
Da	: Dalton (unité de masse moléculaire)
DAD-UV	: Détecteur ultraviolet à barrettes de diodes (<i>Diode Array Detector</i>)
D/CI	: Ionisation par désorption (<i>Desorption Chemical Ionisation</i>)
DCM	: Dichlorométhane
DEPT	: Séquence <i>Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DPPH	: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
DQCOSY	: <i>Double-Quantum filtered Correlation Spectroscopy</i>
EI	: Ionisation par impact électronique (<i>Electron Impact ionization</i>)
ESI	: Ionisation par électrospray (<i>ElectroSpray Ionization, MS</i>)
EtOH	: éthanol
gDQCOSY	: <i>Gradient Double-Quantum filtered Correlation Spectroscopy</i>
gHMBC	: <i>Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
gHSQC	: <i>Gradient Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Glc	: Glucose
HMBC	: <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>

HPLC	: chromatographie liquide à haute performance
HPLC/UV	: chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie ultraviolette
HPLC/UV/MS	: chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectroscopie ultraviolette et à la spectroscopie de masse
hr	: Haute Résolution (<i>High Resolution, MS</i>)
IC ₅₀	: Concentration inhibitrice de 50 %
<i>J</i>	: Constante de couplage
LC ₁₀₀	: Concentration Léthale pour 100 % de la population
LPLC	: Chromatographie Liquide à basse pression
<i>m</i>	: multiplet
<i>m/z</i>	: masse / charge électrique
MeCN	: acétonitrile
MeOH	: méthanol
MeOH- <i>d</i> ₄	: méthanol tétradeutérié (RMN)
MPLC	: chromatographie liquide à moyenne pression
MS	: spectrométrie de masse
NaOMe	: méthoxyle de sodium
NaOAc	: acétate de sodium
NH ₄ OAc	: acétate d'ammonium
NOE	: <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	: <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
PAF	: Facteur d'agrégation plaquettaire
P.F.	: Point de fusion
R _f	: Facteur de rétention
Rha	: Rhamnose
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
<i>s</i>	: singulet
SDA	: <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
semi-prep	: Semi-préparative
sh	: Shoulder, désigne un épaulement sur un pic
SiO ₂	: Silice

spp.	: Espèce
<i>t</i>	: Triplet
TFA	: Acide Trifluoroacétique
THF	: Tétrahydrofurane
TMS	: Tétraméthylsilane
tr	: Temps de rétention
TSP	: Thermospray
uma	: Unité de masse atomique
UV	: Ultraviolet

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature. C'est pour cela qu'elles sont surtout issues de terminologie anglo-saxonne.

1. BUT DU PRESENT TRAVAIL

Malgré les progrès réalisés en médecine au cours des dernières décennies, de nombreux traitements médicamenteux restent insuffisants face aux fléaux tels que: malaria, première cause de mortalité dans le monde, cancer, Alzheimer, infections virales et bactériennes. A ceci, s'ajoute l'augmentation de l'incidence des infections fongiques avec l'émergence de nouvelles maladies qui affaiblissent le système immunitaire (SIDA), le recours aux traitements immunosuppresseurs (afin d'éviter les rejets de greffes), les traitements antinéoplasiques de plus en plus agressifs, ainsi que l'apparition de souches de microorganismes de plus en plus résistantes aux traitements connus.

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre ces fléaux. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances ou de nouveaux "lead compounds", si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires (Hostettmann et Marston, 2002). En effet, sur environ les 300'000 à 500'000 espèces végétales (Principe, 1989), seule une petite partie a fait l'objet d'investigations phytochimiques.

Le présent travail s'inscrit donc dans cette recherche de nouveaux composés qui peuvent trouver une utilisation en thérapeutique. Pour cela, une plante de la famille Rutaceae, *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.), originaire du Mali, a fait l'objet d'une investigation approfondie. La sélection de cette espèce s'est basée sur des considérations chimiotaxonomiques, sur son utilisation en médecine traditionnelle africaine, ainsi que sur le résultat du criblage biologique. En effet, les racines et les tiges de cette espèce sont utilisées en usage interne contre les entérites, les dysenteries, les diarrhées profuses, les urétrites et comme vermifuge. L'écorce de la racine et les feuilles sont fréquemment utilisées comme anti-odontalgique et pour traiter les stomatites, les gingivites et les caries (Kerharo et Adam, 1974). Par ailleurs, l'extrait aqueux de cette plante est employé comme antidrépanocytaire (Sofowora *et al.*, 1975).

Ainsi, les extraits dichlorométhanique et méthanolique de l'écorce des racines de cette plante furent soumis à une série de tests de dépistage d'activités biologiques: antifongiques contre *Cladosporium cucumerinum*, un champignon phytopathogène qui s'attaque particulièrement aux membres de la famille Cucurbitaceae, et *Candida albicans*, une levure pouvant provoquer

des mycoses locales et systémiques chez les personnes immunodéprimées ; molluscicide contre *Biomphalaria glabrata*, un escargot impliqué dans la transmission de la schistosomiase et larvicide contre *Aedes aegypti*, un moustique vecteur de la fièvre jaune. De plus, l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme-clé dans la maladie d'Alzheimer, et l'activité anti-radicalaire au DPPH ont aussi été testées afin d'en isoler de nouveaux produits actifs.

Par ailleurs, certaines techniques analytiques couplées de pointe, telle que la LC/MS et la LC/MSⁿ, sont aussi utilisées dans le présent travail, afin d'effectuer une comparaison entre l'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler. et les espèces: *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv., originaire de Guinée et *Zanthoxylum madagascariensis* Baker, originaire de Madagascar, ceci permet de montrer l'utilité de ces techniques dans le domaine de la dérégulation d'extraits bruts.

2. INTRODUCTION

2.1 Sélection des plantes et des extraits

2.1.1 Introduction

Afin d'isoler des substances nouvelles de plantes pouvant trouver une application thérapeutique et de rendre la stratégie d'isolement moins laborieuse, il convient de sélectionner avec soin les plantes et les extraits à investiguer. Certains critères sont à prendre en considération par le phytochimiste pour mener à bien son étude.

2.1.2 Critères de sélection des plantes

Du choix du matériel végétal dépend en grande partie la réussite du travail entrepris par le phytochimiste et plusieurs critères peuvent guider ce choix :

- utilisations en médecine traditionnelle
- observations du matériel végétal sur le terrain
- aspects botaniques et chimiotaxonomiques
- littérature
- hasard

Utilisations en médecine traditionnelle

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle est l'un des principaux critères de choix pour un phytochimiste. En effet, depuis la nuit des temps, les plantes ont été utilisées aussi bien comme médicament que comme poison de chasse. Cependant, il faut garder à l'esprit que les résultats obtenus lors de notre étude et l'application en médecine traditionnelle ne doivent pas systématiquement être mis en relation et ceux pour plusieurs raisons: Tout d'abord, les moyens de diagnostic en médecine traditionnelle et en médecine moderne diffèrent largement et si une explication scientifique devrait être donnée à l'utilisation d'une plante en médecine traditionnelle, une cible biologique doit être trouvée et la mise au point d'un test pharmacologique correspondant à la maladie à traiter s'impose. D'autre part, la thérapie en

médecine traditionnelle s'appuie sur des rites impliquant des esprits ou des causes surnaturelles qui sont associés à la pathologie concernée, ceci relève du domaine ethno-anthropologique et le traiter dépasse notre compétence.

Observations du matériel végétal sur le terrain

Les observations du matériel végétal et son milieu lors de sa cueillette peuvent donner des informations précieuses. Ainsi, une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires (substances chimiques synthétisées par les plantes) qui lui permettent de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne, anti-parasitaire ou antioxydante par exemple).

Aspects botaniques et chimiotaxonomiques

Quand la classification des végétaux en s'appuyant sur les caractères morphologiques fait défaut, l'utilisation des métabolites secondaires pour les classer en taxons sera utilisée. C'est ce qu'on appelle classification chimique ou chimiotaxonomique. Actuellement, le recours aux séquences de gènes ou d'ADN par les systématiciens (systématique moléculaire) pour la classification complète les deux approches précédentes.

Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et qui poussent dans le même biotope sont susceptibles de synthétiser les mêmes molécules chimiques. De plus, si ces substances sont particulièrement connues pour leur pouvoir thérapeutique, l'appuie sur les critères chimiotaxonomiques pour étudier une espèce faisant partie de telles familles aura de fortes chances d'aboutir à l'isolement d'au moins un composé susceptible de nous intéresser.

L'endémicité des espèces est aussi à prendre en considération. Sachant que la distribution géographique de telles espèces est restreinte et que des études phytochimiques antérieures effectuées sur ces espèces sont rares, la probabilité d'obtenir de nouvelles molécules serait grande.

La littérature

Avant d'entreprendre une investigation phytochimique d'une espèce végétale donnée et dans le but d'isoler de nouvelles substances qui peuvent avoir un intérêt en thérapeutique, il est nécessaire de faire une recherche approfondie de littérature. Ainsi, il est plus judicieux de choisir pour notre travail une plante peu ou pas étudiée. Cependant, même pour une plante largement étudiée, mais pour laquelle une approche différente serait employée: procédé analytique différent, cibles biologiques différentes, etc. les résultats obtenus peuvent être prometteurs.

Le hasard

La grande diversité des métabolites secondaires synthétisés par les plantes constitue un énorme potentiel pour les phytochimistes de trouver de nouveaux produits. En effet, sur environ 300'000 à 500'000 espèces végétales (Principe, 1989), seule une petite partie a été étudiée. De ce fait, le hasard doublé d'une bonne intuition augmente fortement notre chance d'aboutir à de nouveaux composés.

2.1.3 Critères de sélection des extraits

Plusieurs méthodes sont mises à disposition du phytochimiste pour évaluer les extraits bruts. Il s'agit de:

- criblage chimique et biochimique
- criblage biologique

Criblage chimique et biochimique

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM) et les observations sous les lampes UV à 254 nm et 366 nm et après révélation avec des réactifs chimiques spécifiques (*cf.* 5.2.1), nous permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les classes de

composés des extraits testés. D'autres tests sur CCM pour évaluer le pouvoir antioxydant, en utilisant le réactif au DPPH, et inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE) des extraits sont aussi mis à disposition dans notre laboratoire. Le principe de ces tests est décrit au chapitre 5.5.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée avec des méthodes de détection par spectrophotométrie UV et par spectrométrie de masse (MS) des extraits bruts permet de déduire des informations importantes sur la composition de ces extraits. En effet, certains composés présentent un spectre UV caractéristique et sont facilement détectables dans l'extrait brut (flavonoïdes par exemple). Le spectre TSP-MS donne des informations sur la masse moléculaire de ces composés. D'autre part, certains fragments spécifiques apportent des informations supplémentaires pour déduire la structure de base de ses substances.

Criblage biologique

Pour guider l'isolement de nouvelles molécules actives, chaque extrait est soumis à une multitude de tests biologiques. Ces tests doivent être simples, rapides et spécifiques pour permettre une sélection efficace des extraits. Notons toutefois qu'un résultat négatif, obtenu pour un extrait testé sur une cible biologique donnée, ne doit pas exclure la présence de substances actives dans cet extrait. En effet, la concentration de ces substances est peut être très faible pour que l'on puisse détecter leurs activités sur plaque CCM. Par conséquent, d'autres tests sont à envisager avant d'éliminer tel ou tel extrait.

Les activités mises en évidence dans notre institut sont les suivantes:

- antifongiques sur *Candida albicans* et *Cladosporium cucumerinum*
- larvicide sur *Aedes aegypti*
- bactéricide sur *Bacillus subtilis*
- molluscicide sur *Biomphalaria glabrata*

Ces différents tests sont présentés en détail au chapitre 5.6.

2.2 La famille Rutaceae

2.2.1 Introduction

Cette famille doit son nom à la rue (*Ruta graveolens* L.), un petit arbuste aromatique rustique qui a été cultivé durant des siècles dans les jardins comme plante médicinale.

Les représentants de cette famille, répartis en 150 genres et 1500 espèces (Cronquist, 1988), sont principalement rencontrés dans les régions tropicales et tempérées chaudes du globe (Heywood, 1996 ; cf. Figure 2.1). Se sont essentiellement des arbres, des arbustes parfois épineux ou plus rarement des plantes herbacées caractérisées par des poches sécrétrices d'un type particulier: dites schizolysigènes.

C'est une famille d'une grande importance tant pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Les fruits les plus cultivés appartiennent aux genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus* (Heywood, 1996).

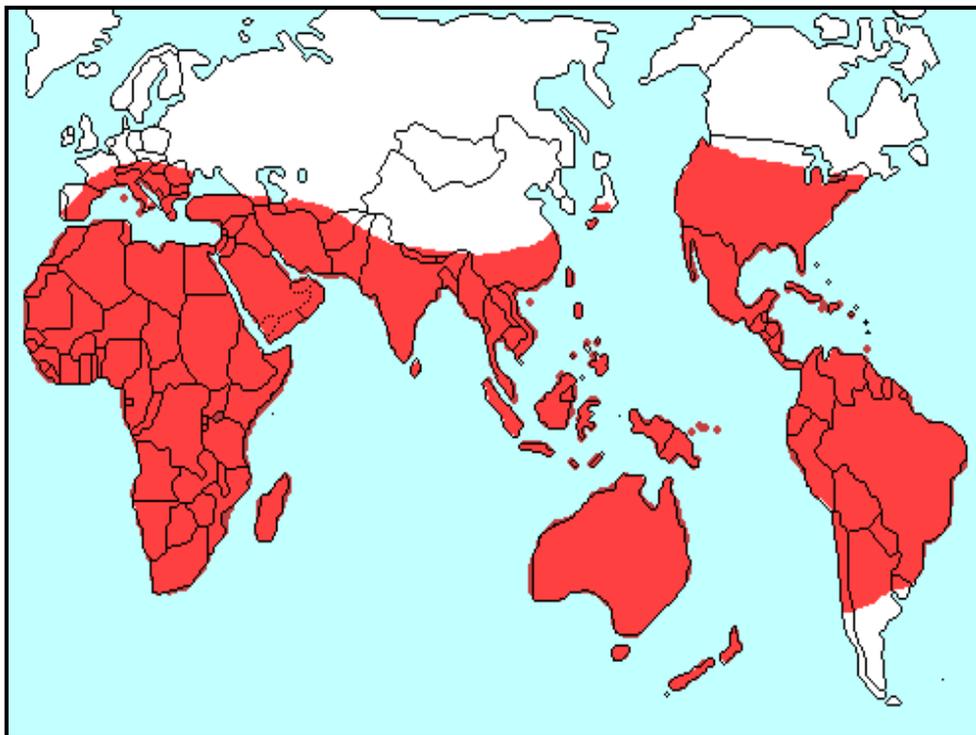


Figure 2.1 - Distribution géographique des Rutaceae d'après Heywood (1996).

2.2.2 Classification systématique et aspects botaniques

La classification de cette famille a été souvent contestée et les études phytochimiques, les données botaniques, ainsi que la connaissance de la biogenèse des métabolites secondaires ont permis de clarifier la position de certains taxons au sein de cette famille (Das Graças *et al.*, 1988).

En effet, Engler (1931) avait placé cette famille dans le sous-ordre des Rutineae de l'ordre des Rurales et l'avait subdivisée, selon le type du fruit et la genèse de l'appareil sécréteur, en sept sous-familles et treize tribus, selon le schéma présenté dans la Figure 2.2:

Dans un article sur l'anatomie florale et la phylogénie des Rutaceae, Moore (1936) avait souligné l'hétérogénéité de la morphologie florale au sein des sous-familles et tribus des Rutaceae ce qui l'a amené à conclure que la classification de cette famille telle qu'elle a été relatée par Engler ne peut être satisfaisante. Ceci a été confirmé par les travaux de Das Graças *et al.* (1988), qui se sont basés sur les caractères morphologiques, la connaissance des métabolites secondaires et la distribution géographique des Rutaceae pour conclure que le genre *Zanthoxylum* présente des caractères floraux et des métabolites secondaires primitifs par rapport aux autres genres de la tribu des *Zanthoxyloae*. Ainsi, la transition d'un périanthe double à un périanthe simple par avortement de quelques-uns ou de tous les sépales et le passage des alcaloïdes de type benzyloquinoline présents dans *Zanthoxylum* aux alcaloïdes dérivant de l'acide anthranilique et la présence des limonoïdes et des coumarines: polycycliques, furano- et pyranocoumarines, linéaires et angulaires dans les autres sous-familles et tribus des Rutaceae a permis de reconsidérer la classification proposée par Engler.

Cronquist (1988) a placé cette famille dans l'ordre des Sapindales qui compte environ 5400 espèces (*cf.* Figure 2.3). Plus de la moitié de ces espèces appartiennent aux deux familles: Sapindaceae et Rutaceae qui comptent à elles seules environ 1500 espèces.

Famille : Rutaceae

Sous- famille : Rutoideae

Tribu : Zanthoxyleae

Genres : Zanthoxylum, Fagara, *Evodia*, *Orixa*, *Choisya*, *Platydesma*

Tribu : Ruteae

Tribu : Boronieae

Tribu : Diosmeae

Tribu : Cusparieae

Sous- famille : Dictyolomatoideae

Genre : *Dictyoloma*

Sous- famille : Flindersioideae

Genres : *Flindersia*, *Chloroxylon*

Sous- famille : Spathelioideae

Genres : *Spathelia*, *Diomma*

Sous- famille : Toddalioideae

Tribu : Phellodendrineae

Tribu : Sohnreyiineae

Tribu : Pteleineae

Tribu : Oriciineae

Tribu : Toddaliineae

Tribu : Amyridineae

Genres : *Amyris*, *Teclea*, *Stauranthus*

Sous- famille : Aurantioideae

Tribu : Clauseneae

Tribu : Citreae

Sous- famille : Rhabdodendroideae

Genre : *Rhabdodendron*

Figure 2.2 - Systématique des Rutaceae d'après Engler (1931)

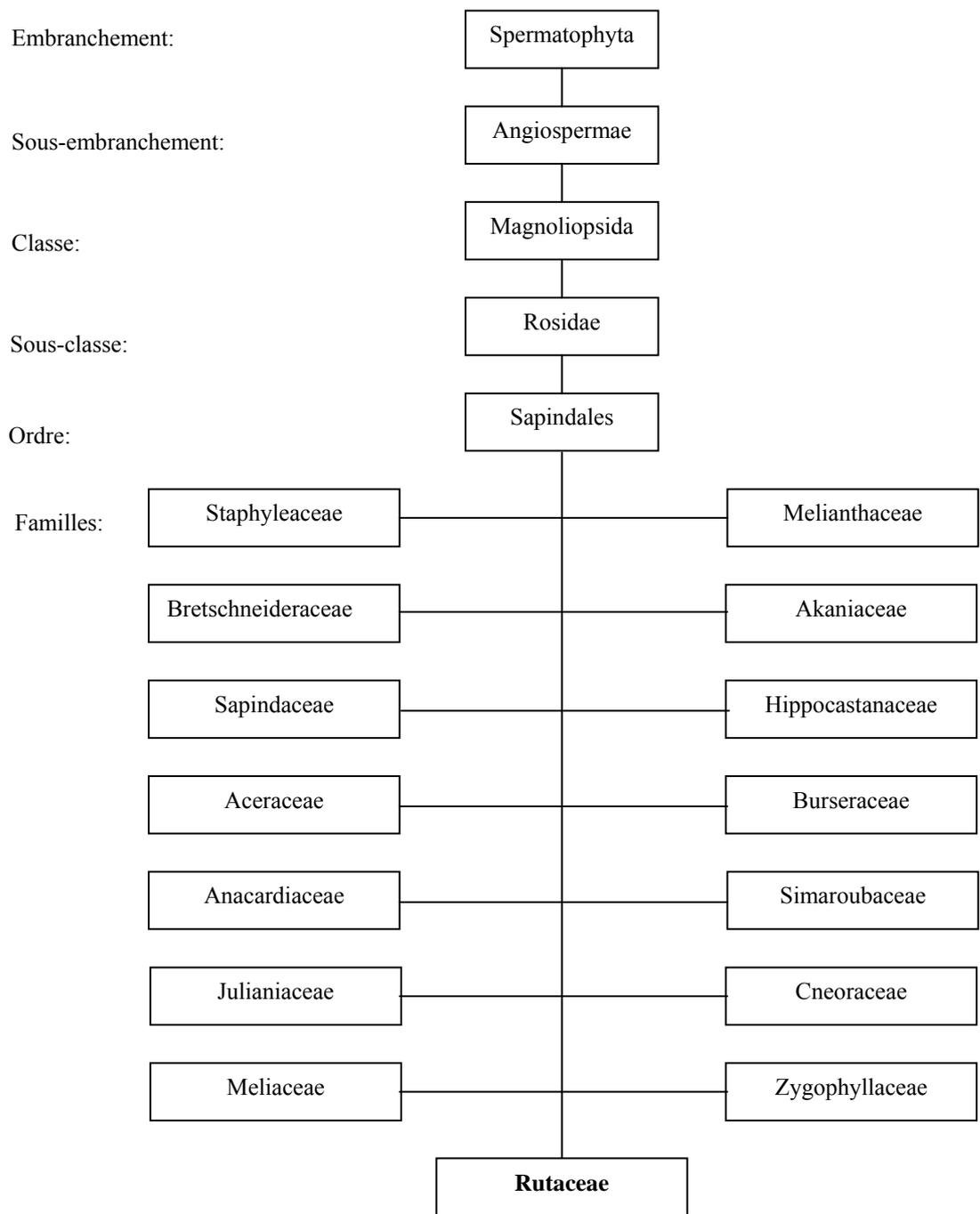


Figure 2.3 - Systématique des Rutaceae d'après Cronquist (1988)

Heywood (1996) a subdivisé cette famille en quatre sous-familles selon le schéma présenté dans la Figure 2.4:

Famille : Rutaceae

Sous- famille : Rutoideae

Tribu : Zanthoxyleae

Genres : Zanthoxylum, Fagara, *Evodia*, *Choisya*, *Melicope*, *Pelea*

Tribu : Ruteae

Genres : *Ruta*, *Dictamnus* et *Thamnosma*

Tribu : Boronieae

Tribu : Diosmeae

Tribu : Cusparieae

Sous- famille : Toddalioideae

Sous- famille : Rhabdodendroideae

Genre : *Rhabdodendron*

Sous- famille : Aurantioideae

Genres : *Aegle*, *Citrus*, *Atalantia*, *Glycosmis*, *Murraya*, *Clausena*, *Micromelum*

Figure 2.4 - Systématique des Rutaceae d'après Heywood (1996)

Nous remarquons que Heywood avait considéré *Zanthoxylum* et *Fagara* comme deux genres distincts alors que Hartley les avait regroupé sous le nom de *Zanthoxylum* depuis 1966 (Fish et Waterman, 1973).

Avec le développement de la cladistique moderne, ou la systématique moléculaire basée sur l'analyse de séquences de gènes ou d'ADN, à la fin des années 80, les différents systèmes de classification sont devenus obsolètes. Si certains résultats sont en accord avec les systèmes de classification traditionnels, d'autres les remettent en question et reconsidèrent le monophylétisme (dont l'évolution des membres à partir d'un seul ancêtre commun). En effet, la parenté phylogénétique entre différents taxons n'est établie que s'ils partagent les mêmes caractères dérivés (Synapomorphies). Le gène le plus utilisé dans cette classification est *rbcL* (*L = large*), qui code pour la grande sous-unité de RUBISCO, une des enzymes les plus importantes impliquées dans la photosynthèse (Spichiger *et al.*, 2000). D'autres travaux ont suivi, d'autres gènes sont utilisés, et ces travaux ont culminé en 1998 avec la publication

d'une nouvelle classification ordinale des plantes à fleurs par un groupe de chercheurs : *the Angiosperm Phylogeny Group* (Angiosperm Phylogeny Group (APG), 1998).

Sur la base des connaissances actuelles, la position systématique des Rutaceae est représentée par la Figure 2.5:

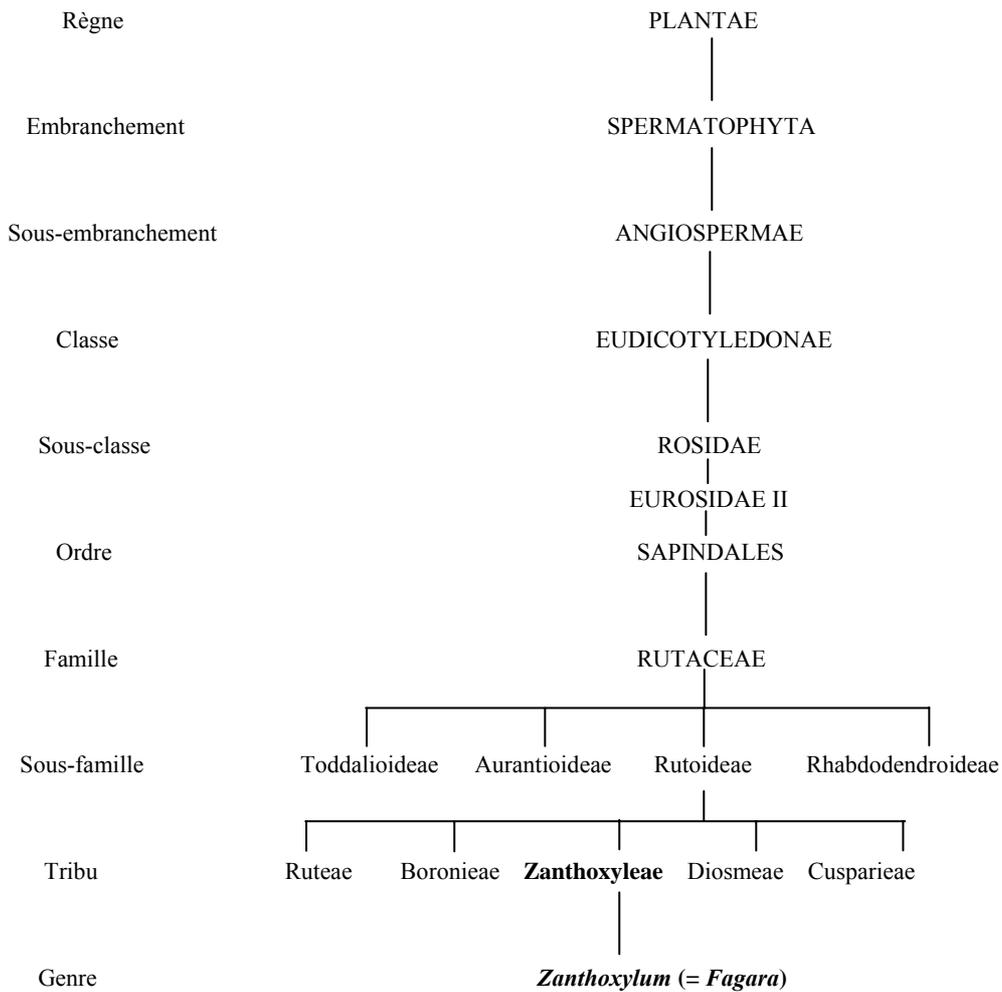


Figure 2.5 - Position systématique des Rutaceae d'après APG (1998) et Heywood (1996).

Seul le genre *Zanthoxylum* est représenté sur cette Figure.

2.3 Présentation du genre *Zanthoxylum* (= *Fagara*)

2.3.1 Introduction

Le terme *Zanthoxylum* est une modification du mot *Xanthoxylum* qui vient du grecque: *xanthon xylon* “bois jaune” et de l’allemand: *Gelbholzbaum* “yellow-wood tree” (D’après Le Petit Robert), d’où l’utilisation par certains auteurs du terme *Zanthoxylum* ou *Xanthoxylum*.

Le genre *Zanthoxylum* a été créé par Linné en 1757 et confondu avec le genre *Fagara*. En 1896, Engler a fait la distinction entre les deux genres par les caractères suivants: Les espèces appartenant au genre *Zanthoxylum* présentent un périanthe simple, alors que celui des espèces appartenant au genre *Fagara* est double. Les travaux de Brizicky en 1962, grâce à la découverte d’espèces présentant un périanthe intermédiaire entre celui de *Zanthoxylum* et celui de *Fagara*, ont démontré que le périanthe simple de *Zanthoxylum* dérivait de celui de *Fagara* par avortement de quelques sépales, voir tous les sépales. De là, il a conclu que le genre *Fagara* était un sous- genre de *Zanthoxylum*. Ce n’est qu’en 1966 que Hartley regroupa *Zanthoxylum* et *Fagara* sous le nom de *Zanthoxylum* (Fish et Waterman, 1973), ce qui a été confirmé par Zepernick et Timler en 1981 et c’est sous cette dernière appellation que ce genre est repertorié dans «*International Index of Plant Name*». Néanmoins, certains auteurs continuent d’utiliser le terme *Fagara*.

2.3.2 Caractéristiques botaniques de *Zanthoxylum*

Les représentants du genre *Zanthoxylum* sont estimés à 250 espèces dont plus de 80 espèces africaines (Schatz, 2001). Ils présentent des caractères floraux et des métabolites secondaires primitifs par rapport aux autres genres de la tribu des *Zanthoxyleae* (Moore, 1936 ; Das Graças *et al.*, 1988).

Se sont des arbres, des arbustes parfois épineux ou plus rarement des plantes herbacées, répandues dans les régions tropicales et tempérées chaudes du globe (Heywood, 1996).

Les feuilles sont imparipennées, alternes mais rapprochées en bouquet au sommet des rameaux ; les inflorescences sont des panicules, axillaires ou terminales de petites fleurs. Les sépales sont libres ou soudées à leur base, les pétales sont libres, caducs. Le gynécée est constitué par un seul carpelle, libre, un peu excentrique, biovulé, à ovules collatéraux, plus ou moins contracté à la base, déhiscent à maturité en deux valves, monosperme (Neuwinger, 1996).

2.3.3 Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Zanthoxylum*

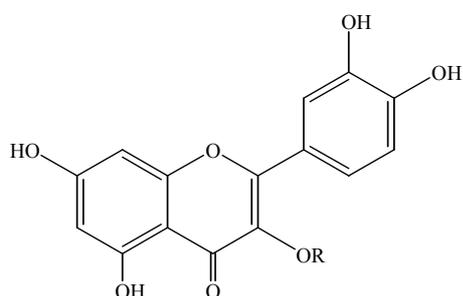
Le genre *Zanthoxylum* fait partie de la famille Rutaceae dont les représentants, de part leur intérêt économique et thérapeutique, ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Néanmoins, vu le nombre d'espèces non encore étudiées, ce genre constitue encore une source importante de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique.

2.3.3.1 Flavonoïdes

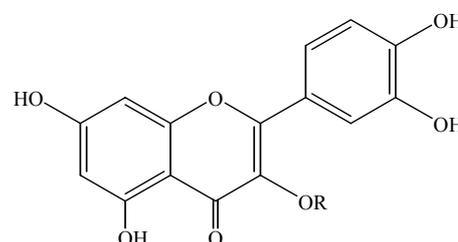
Les flavonoïdes sont des composés phénoliques très répandus dans ce genre. Ils sont présents dans presque tous les organes de la plante et jouent un rôle important dans le système de défense comme antioxydants. Ces métabolites secondaires sont connus pour leurs diverses propriétés biologiques telles que antioxydante, anti-inflammatoire, antithrombique, antibactérienne, antihépatotoxique, antitumorale, antihypertensive, antivirale et antiallergique (Andersson *et al.*, 1996). Récemment, l'activité oestrogénique de certaines isoflavones a été mise en évidence (Harborne et Williams, 2000).

Chez le genre *Zanthoxylum*, les flavonoïdes sont surtout représentés par des hétérosides de flavones, flavonols et flavanones. Nous n'allons citer dans ce chapitre que ceux des espèces les plus connues ou ceux caractéristiques de ce genre.

Le genre *Ruta*, genre type des Rutaceae, a donné son nom au flavonoïde rutine (quercétine 3-rutinoside) (**1**) qui fut isolé de l'espèce *Zanthoxylum piperitum* var. *inerme* DC. et qui est utilisé actuellement en thérapeutique pour renforcer la résistance capillaire seule ou en association avec d'autres flavonoïdes (Harborne, 1983). De la même espèce furent isolés et identifiés les flavonoïdes suivants: le quercétine-3-*O*-rhamnoside (**2**), le quercétine-3-*O*-galactoside (**3**), le cyanidine-3-*O*-xyloside (**4**) et le cyanidine-3-*O*-rhamnoside (**5**) (Harborne, 1983).

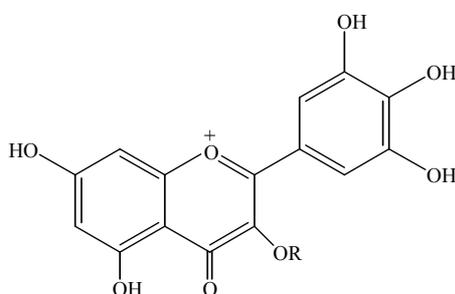


1 : R = Glc⁶-¹Rha



2 : R = Rha

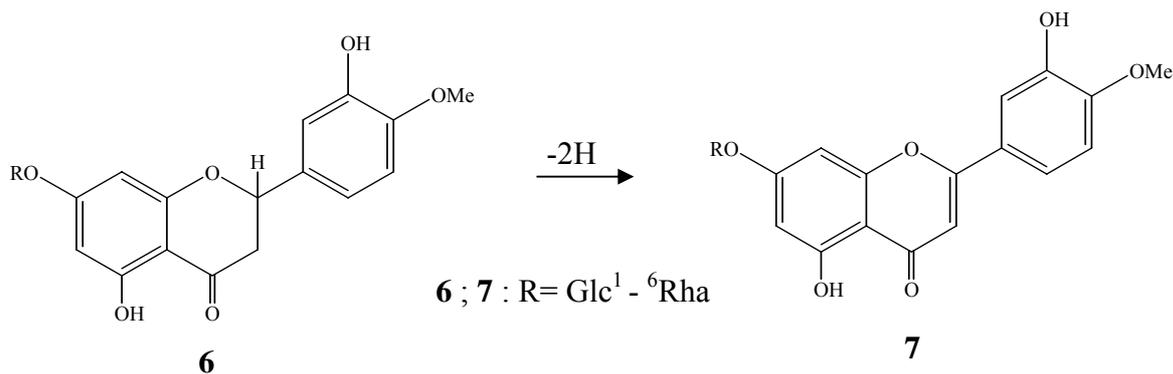
3 : R = Gal



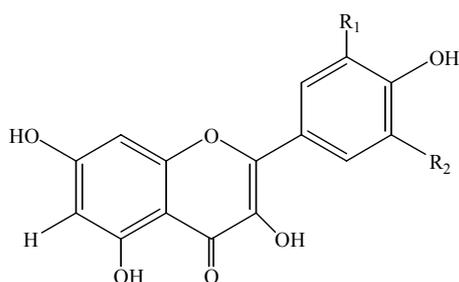
4 : R = Xyl

5 : R = Rha

La flavanone glycosylée hespéridine (**6**) est largement répandue chez le genre *Zanthoxylum*, elle subit une oxydation et se transforme en diosmine (**7**) (Bruneton, 1999). En effet, *in vitro*, cette réaction se fait rapidement. De cela, il est facilement concevable que chez les Rutaceae, les flavanones sont probablement des précurseurs des flavones correspondantes (Harborne, 1983).



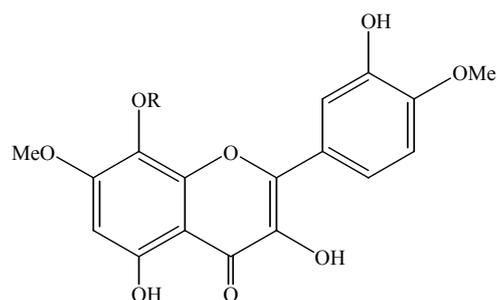
La présence de flavonols hydroxylés en position 6 ou 8, comme le kaempférol (**8**), la quercétine (**9**) ou la myricétine (**10**), ainsi qu'un flavonol *O*-glycosylé, la tambulétine (**11**) chez quelques espèces du genre *Zanthoxylum* a été mise en évidence. Ces flavonols, en plus des caroténoïdes, sont responsables de la coloration jaune des fleurs chez certaines variétés d'angiospermes. Ainsi, les *C*-glycosylflavones orientine (**12**), vitexine (**13**) et isovitexine (**14**) ont été mises en évidence chez *Zanthoxylum nitidum* Roxb. (Harborne, 1983).



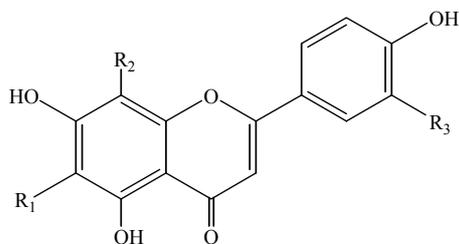
8 : R₁ = R₂ = H

9 : R₁ = H R₂ = OH

10 : R₁ = R₂ = OH



11 : R = Glc



12 : R₁ = Glc R₂ = H R₃ = OH

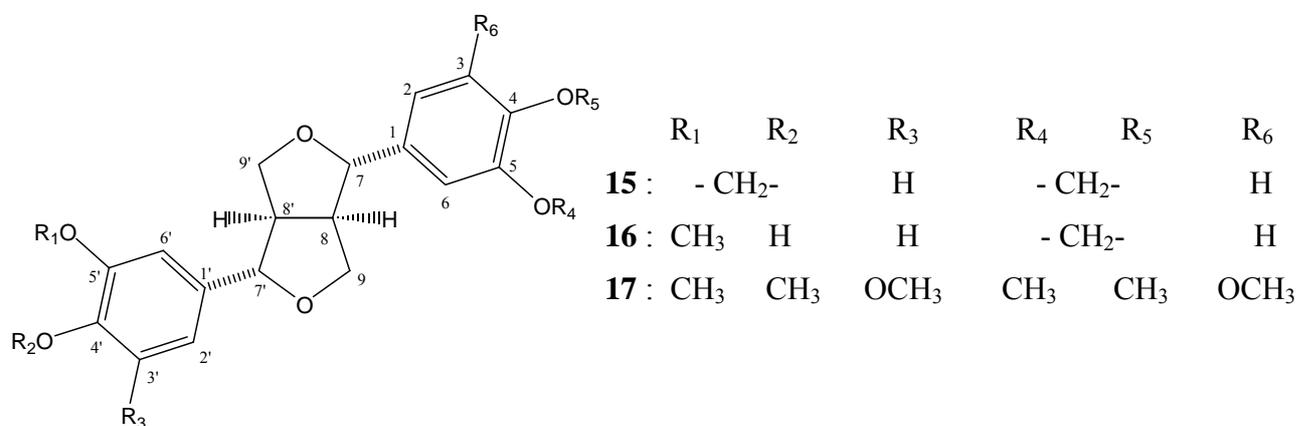
13 : R₁ = R₃ = H R₂ = Glc

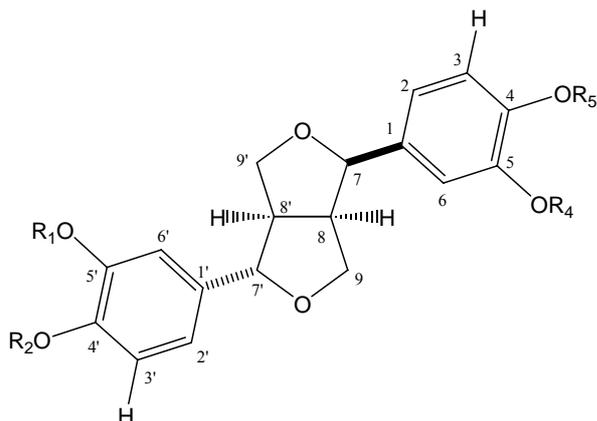
14 : R₁ = Glc R₂ = R₃ = H

2.3.3.2 Lignanes et composés apparentés

Les lignanes sont issus de la condensation de deux unités phénylpropaniques (C₆-C₃). Ces composés sont très répandus dans le règne végétal et possèdent de nombreuses activités biologiques qui leur confèrent une importance non négligeable en thérapeutique. Ils ont montré des propriétés antibactérienne, antifongique, antioxydante, antitumorale, antivirale, antihépatotoxique (flavanolignanes des akènes du chardon-Marie), inhibitrice de la phosphodiesterase de l'AMP cyclique, anti-PAF (*Platelet Activating Factor*), antinutritives, insecticides et oestrogéniques pour ne citer que les plus importantes (Ayres et Loike, 1990).

Six groupes structuraux fondamentaux de lignanes ont été caractérisés chez différentes familles du règne végétal. Les plus simples sont des dibenzylbutanes (liaison 8-8') qui, par cyclisation, peuvent engendrer trois types de lignanes monofuraniques (cyclisation 9-O-9', 7-O-9', ou 7-O-7') et des butyrolactones. Un type, le 2 α ,6 α -diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane, semble caractériser certaines espèces appartenant au genre *Zanthoxylum* chez lesquels les composés suivants ont été isolés: la sésamine (**15**), un constituant de l'huile de sésame qui fut isolé aussi de *Zanthoxylum piperitum* DC. tout comme le pipéritol (**16**) (Abe *et al.*, 1974); le diméthyle ether liriioresinol B (**17**) isolés de *Zanthoxylum leuprieurii* Guill. et Perr. ; l'asarinine (**18**) isolé de *Zanthoxylum acanthopodium* DC. ; le xanthoxylol (**19**) isolé de *Zanthoxylum acanthopodium* DC. et *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et timler ; le pluviatilol (**20**) isolé de *Zanthoxylum pluviatile* L. et l'epieudesmine (**21**) isolé de *Zanthoxylum armatum* DC. pour ne citer que les plus importants (O'Sullivan, 1983).





	R ₁	R ₂	R ₄	R ₅
18 :	- CH ₂ -		- CH ₂ -	
19 :	CH ₃	H	- CH ₂ -	
20 :	- CH ₂ -		CH ₃	H
21 :	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃

2.3.3.3 Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une classe chimique très importante du genre *Zanthoxylum*. La majeure partie de ces alcaloïdes dérive de deux voies biosynthétiques dont celle de l'acide anthranilique qui aboutit à la plupart des alcaloïdes de la famille Rutaceae et celle de la tyrosine qui aboutit aux alcaloïdes de type benzylisoquinoline, aporphine, protoberberine, protopine et benzo[*c*]phenanthridine, qui caractérisent le genre *Zanthoxylum* (Fish et Waterman, 1973 ; Hesse, 2002).

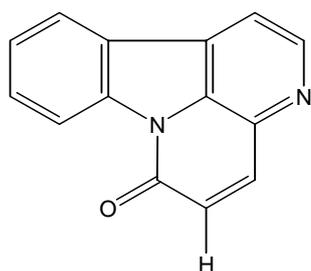
Des alcaloïdes dérivant d'autres acides aminés ont été trouvés uniquement chez certains genres de la famille Rutaceae à savoir:

- ceux dérivant de l'histidine chez le genre *Pilocarpus*
- ceux dérivant de l'ornithine chez quelques espèces du genre *Citrus*
- ceux dérivant de la lysine chez quelques espèces du genre *Zanthoxylum*

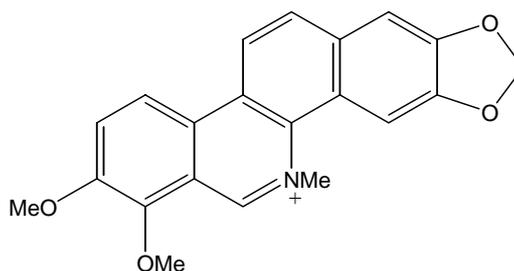
Actuellement, plus de 470 structures d'alcaloïdes ont été définies dans la famille Rutaceae (Mester, 1983) et nous n'allons présenter que ceux caractéristiques du genre *Zanthoxylum* ou ceux pour lesquels une activité pharmacologique a été décrite.

Activité antimicrobienne:

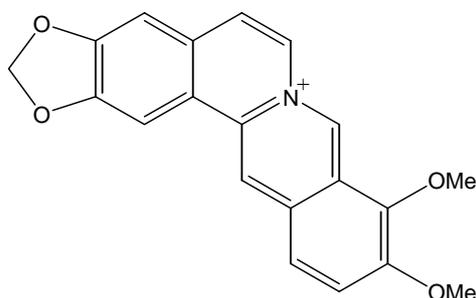
Des racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, Odebiyi et Sofowora (1979) ont pu isoler et identifier la canthin-6-one (**22**), la chélérythrine qui fut isolée la première fois de *Chelidonium majus* L. (**23**) et la berbérine (**24**), alcaloïdes responsables de l'activité antimicrobienne de cette espèce (Lewis, 1983).



22



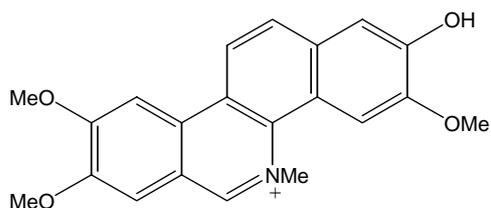
23



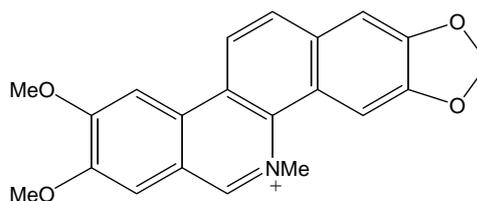
24

Activité antitumorale:

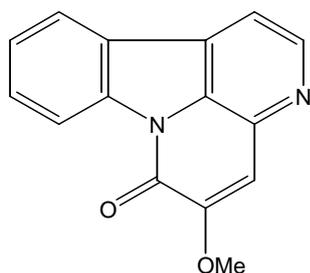
Plusieurs travaux ont été effectués sur plusieurs espèces de genre *Zanthoxylum* (Lewis, 1983), afin d'isoler les composés possédant une activité antitumorale spécifique contre certains types de cancers. Il s'agit de la berbérine (**24**), la fagaronine (**25**), la nitidine (**26**), la 5-méthoxycanthin-6-one (**27**), la 4-méthylthiocanthin-6-one (**28**), l'acronycine (**29**), et la skimmianine (**30**).



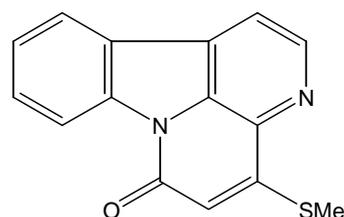
25



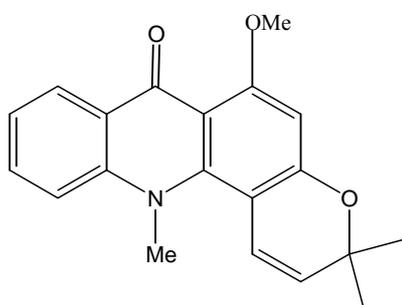
26



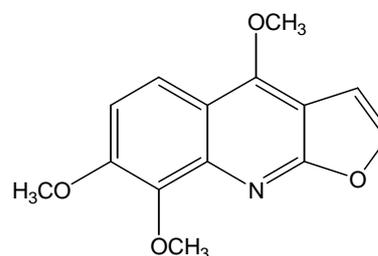
27



28



29

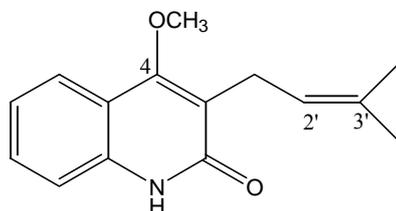


30

Activité anthelminthique:

L'atanine (3-diméthylallyl-4-methoxy-2-quinolone) (**31**), fut isolée de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler et de deux espèces chinoises *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. et *Evodia hupehensis* Dode. Au cours des essais effectués, *in vitro*, cet alcaloïde a montré une activité antiparasitaire sur les larves de *Schistosoma mansoni* et *Ostertagia*

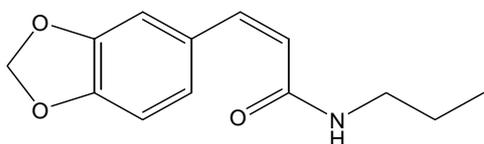
circumcincta, des trématodes qui infectent l'homme et la forme adulte et larvaire de *Caenorhabditis elegans*, un nématode terrestre (Perrett et Whitfield, 1995).



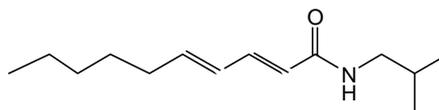
31

2.3.3.4 Amides

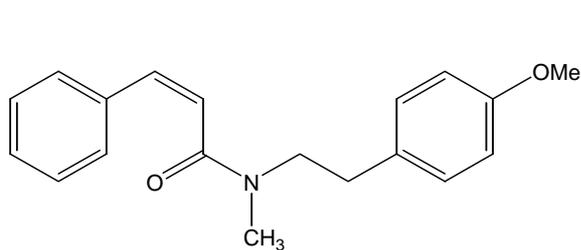
Une isobutylamide à activité insecticide, la fagaramide (**32**), ainsi que la N-isobutyldécadiénamide (**33**), un anesthésique local, ont été isolées de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler. D'autres amides ont été isolés de d'autres espèces du genre *Zanthoxylum* à savoir: l'herclavine (**34**), la tembamide (**35**) et la néoherculine (**36**) (Fish et Waterman, 1973 ; Adesina, 1986).



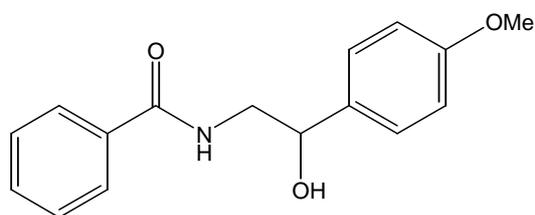
32



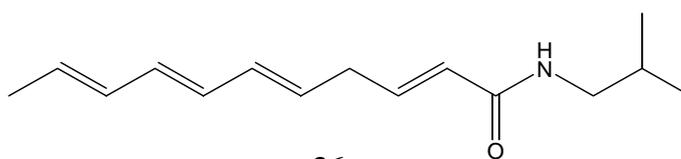
33



34



35



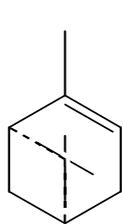
36

2.3.3.5 Huiles essentielles

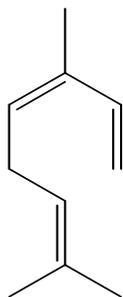
La plupart des représentants des Rutaceae possèdent des poches sécrétrices d'un type particulier appelées poches schizolysigènes dans lesquelles seront élaborées les huiles essentielles. Ces composantes sont assez abondantes dans les fruits, mais aussi dans d'autres organes de la plante tels que: feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes et graines. Pour une même plante, leur composition est différente pour chaque organe et pour la même espèce (Bruneton, 1999). Une variation dans la composition de cette huile essentielle est aussi possible pour la même espèce selon la saison, comme c'est le cas pour certaines espèces du genre *Pilocarpus* (Taveira *et al.*, 2003). Ces huiles essentielles sont souvent de composition complexe à savoir: des monoterpènes, des hydrocarbures monocycliques, bicycliques, des alcools acycliques et monocycliques et leurs esters ainsi que des sesquiterpènes bicycliques.

Avec le développement des techniques analytiques comme la GC/MS, plusieurs espèces du genre *Zanthoxylum* ont été investiguées pour déterminer leur composition en huile essentielle. Les travaux de Ngassoum *et al.* (2003), ont permis de mettre en évidence dans les fruits secs de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, de nombreux composés volatils, qui ont montré une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia faecalis*, parmi lesquels le α -pinène (37), composé majoritaire de cette huile essentielle, le *trans*- β -ocimène (38), le citronellol (39), l'acétate de citronellyl (40), le α -terpinolène (41), le α -phellandrène (42), le géraniol (43), le limonène (44) et le β -myrcène (45).

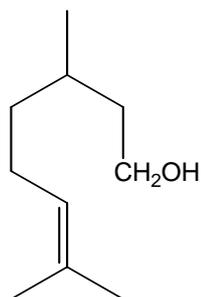
D'autres composantes ont été isolées des feuilles et des fruits de *Zanthoxylum rhoifolium* DC., dont le germacrène D (46) en plus du β -myrcène, du linalol entre autre constituants déjà cités ci-dessus et qui ont montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Salmonella setubal* (Gonzaga *et al.*, 2003).



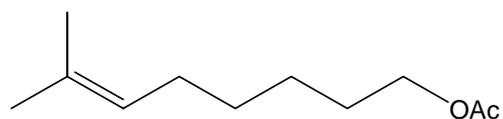
37



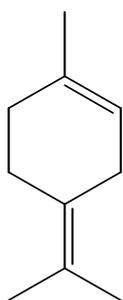
38



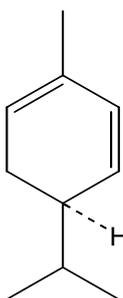
39



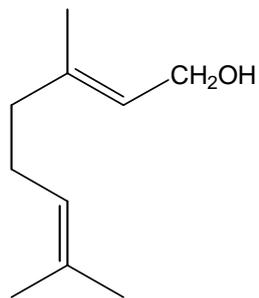
40



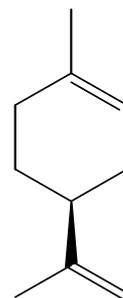
41



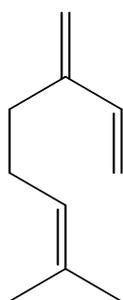
42



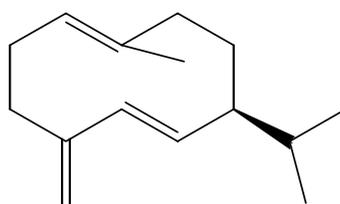
43



44



45

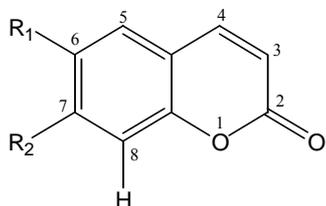


46

2.3.3.6 Coumarines

Les coumarines sont très répandues dans le genre *Zanthoxylum*, on les trouve sous forme de coumarines simples, furo- et pyrano-coumarines ainsi que de dimères de coumarines avec liaisons C-C ou éther (Gray, 1983).

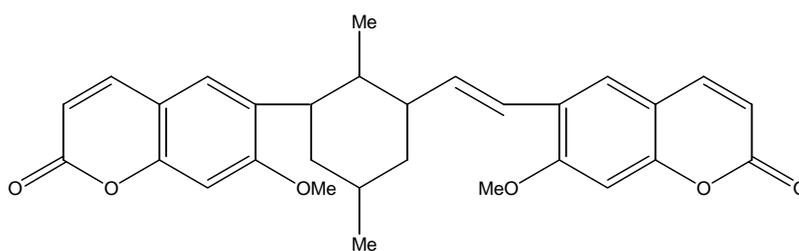
De l'espèce *Zanthoxylum ailanthoides* Engl., l'esculétine (**47**) et la scopolétine (**48**), des coumarines largement répandues chez les végétaux supérieurs, ont été isolées (Gray, 1983).



47 : R₁ = R₂ = OH

48 : R₁ = OCH₃, R₂ = OH

En plus des coumarines simples, certaines bicoumarines ont été répertoriées dans le genre *Zanthoxylum*. En effet, les études de Kutney *et al.* (1968 et 1970) sur certaines espèces du genre *Zanthoxylum* et sur *Thamnosma montana* Torr. et Frem. ont permis l'isolement de la bicoumarine, thamnosine (**49**).

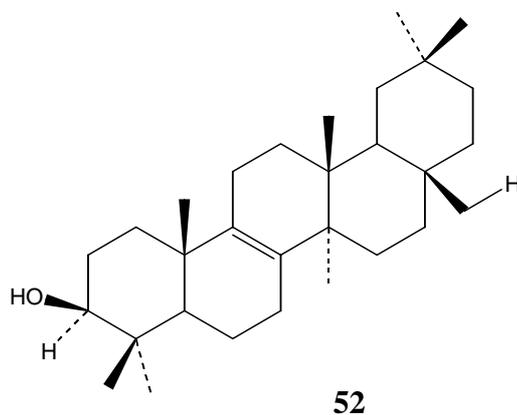
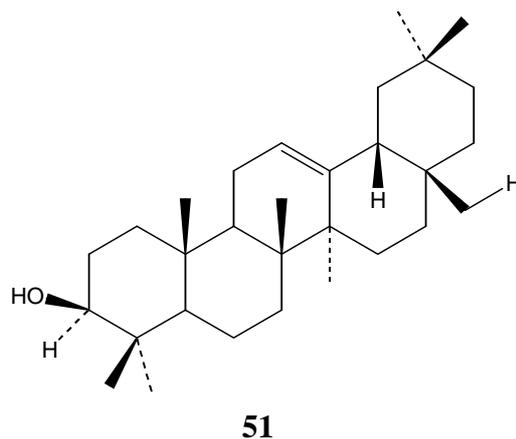
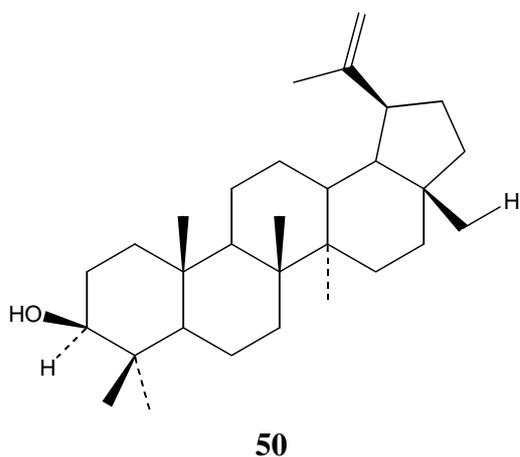


49

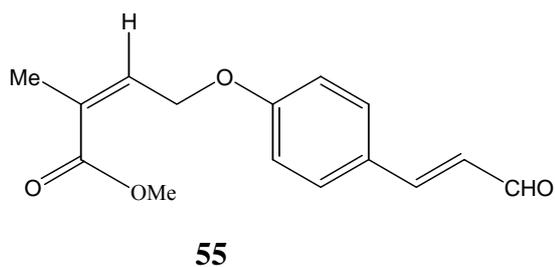
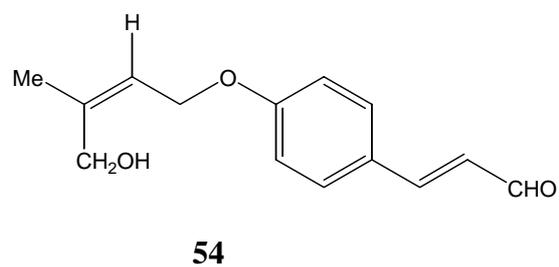
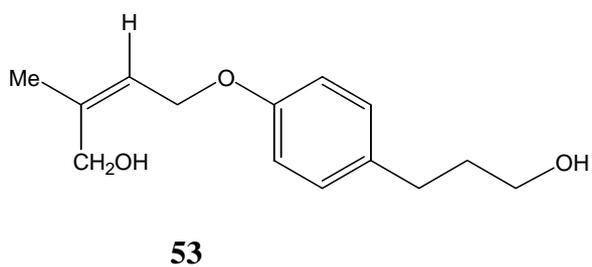
2.3.3.7 Divers

Les stérols ont été mis en évidence dans le genre *Zanthoxylum* et sont principalement représentés par le β -sitostérol, qui est ubiquitaire dans le règne végétal (Adesina, 1986).

Quelques triterpènes ont été mis en évidence dans certains représentants de ce genre. Ainsi, Vaquette *et al.* (1973) ont isolé de l'écorce de tiges de *Zanthoxylum decaryi* H. Perrier des triterpènes de type lupane (lupéol ; **50**) et oléanane (β -amyrine et isomultiflorénol ; **51-52**).



Les travaux effectués sur certaines espèces du genre *Zanthoxylum* par Ishii *et al.* (1982) ont permis d'isoler le cuspidiol, le boninéal et le méthyl-boninéalate (**53-55**) trois dérivés du phénylpropane rencontrés également chez certaines espèces du genre *Citrus* (Chihiro *et al.*, 1988).



Les saponines semblent très rares dans ce genre. Lorsqu'elles existent, il s'agit généralement de diglycoside de stigmastadiénol (Hegnauer, 1973 et 1983 ; Bhatt *et al.*, 1981). Quant aux tanins, ils n'ont jamais été isolés des représentants de ce genre (Hegnauer, 1990).

2.3.4 Propriétés biologiques et pharmacologiques de *Zanthoxylum*

2.3.4.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces appartenant au genre *Zanthoxylum* suscitent un intérêt tout particulier et les deux espèces: *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler et *Zanthoxylum leuprieurii* Guill. et Perr. sont particulièrement appréciées des guérisseurs africains. En effet, *Zanthoxylum zanthoxyloides* est utilisée comme parasiticide interne et externe. Les racines de cette plante constituent des frotte-dents particulièrement appréciés. Quant à *Zanthoxylum leuprieurii*, en usage interne, les racines de cette plante constituent un excellent remède contre les maux de ventre et surtout pour le déparasitage intestinal. En usage externe, sous forme de poudre de racines, en lotions ou en bains de vapeurs, elle est utilisée pour soulager les maux de reins, les douleurs articulaires et celles du bas-ventre (Kerharo et Adam, 1974).

L'espèce *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. est utilisée en médecine traditionnelle africaine contre les maux de tête, comme brosse à dents, contre les affections rhumatismales et urogénitales, ainsi que comme poison de flèches (Neuwinger, 1996).

Par ailleurs, l'espèce *Zanthoxylum madagascariensis* Baker (Syn. *Zanthoxylum tsihanimposa* Baker) est utilisée par les populations de la région ouest de Madagascar pour traiter la malaria (tazo) (Randrianariveლოსია *et al.*, 2003).

Une autre espèce, *Zanthoxylum chalybeum* Engler est utilisée par les populations de l'Afrique de l'ouest pour traiter les affections de la peau, les douleurs, la fièvre et comme antidiarrhéique (Neuwinger, 1996).

2.3.4.2 Activités biologiques reconnues

De l'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, l'acide hydroxy-2-méthyl-benzoïque fut isolé et commercialisé sous forme de comprimés par un laboratoire togolais, qui a reçu une autorisation de sa mise sur le marché, sous le nom de Drépanostat® pour le traitement de la drépanocytose (Pousset, 2002). Les autres représentants du genre *Zanthoxylum* n'ont pas d'indications connues en thérapeutique à cause de leur toxicité démontrée (Neuwinger, 1996).

Par ailleurs, vu l'importance de la famille Rutaceae dont fait partie le genre *Zanthoxylum*, rappelons les activités biologiques de certaines espèces du genre *Citrus*, qui sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour en extraire les flavonoïdes, qui seront commercialisés seuls ou en mélange pour améliorer les symptômes liés aux insuffisances veineuses. Les fruits de ces espèces confèrent à cette famille son importance dans l'industrie agro-alimentaire. En effet, les pectines et les huiles essentielles qui en seront extraites (*Citrus bergamia* Risso), seront utilisées en parfumerie (Bruneton, 2001).

Par ailleurs, des espèces *Pilocarpus jaborandi* L. et *Pilocarpus microphyllus* L., des arbustes sud-américains, on extrait la pilocarpine, un alcaloïde excitant parasymphatique, utilisé contre le glaucome (Heywood, 1996).

2.3.5 Toxicité de *Zanthoxylum*

La toxicité de *Zanthoxylum* a été établie aussi bien chez l'homme que chez l'animal. En effet, en 1930 en Indiana (Etats-Unis), la toxicité de ce genre a été suspectée suite au décès d'ovins et de bovins qui ont ingéré l'écorce de *Zanthoxylum americanum* Miller. Ceci a été confirmé après l'accident survenu en Georgie où huit bovins ont trouvé la mort suite à l'ingestion de l'écorce du *Zanthoxylum clava-herculis* L. Il semblerait que les substances responsables de cette toxicité soient des alcaloïdes et qu'ils agiraient au niveau de la transmission neuromusculaire (Bowen *et al.*, 1996).

D'autres espèces, à savoir *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et timler, *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. et *Zanthoxylum madagascariensis* Baker sont connues pour leur toxicité (par voie s.c, i.m et i.v), qui est utilisée à profit en Afrique de l'ouest pour fabriquer des poisons de chasses efficaces à partir de l'écorce des racines et des tiges (Neuwinger, 1996).

Etant donné que ce genre fait partie de la famille Rutaceae, il serait utile de rappeler que le principal problème que peuvent poser les représentants de cette famille est d'ordre dermatologique. En effet, les Rutaceae sont riches en furanocoumarines photosensibilisantes, qui sont responsables de manifestations phototoxiques. Le contact avec une plante de la famille (surtout les agrumes) ou l'un des produits qui en est issu: huile essentielle, produit cosmétique, etc., en présence de soleil, provoque un érythème, souvent suivi par la formation de vésicules qui fusionnent donnant naissance à des bulles. Par la suite, nous observons une hyperpigmentation de la zone affectée due à la stimulation de la mélanogenèse. Ces réactions passent souvent inaperçues et sont souvent attribuées à des dermatites allergiques: impétigo, infection par les champignons, etc. (Coffman *et al.*, 1985).

L'hyperpigmentation provoquée par l'application de certaines Rutaceae et Apiaceae riches en furanocoumarines a été mise à profit par les Egyptiens, la médecine ayurvédique et Dioscoride pour traiter le psoriasis, le vitiligo et d'autres affections dermatologiques. La médecine contemporaine a repris ces pratiques anciennes pour traiter les mêmes affections. Cette photochimiothérapie (PUVAthérapie) consiste en l'ingestion par le patient d'une dose voisine de 0,6 mg/kg de xanthotoxine et ensuite, il doit être soumis à une exposition contrôlée de rayons UV longs (320-380 nm) (Béani, 1991). Cette pratique n'est pas sans risque et peut être la cause de cancérogenèse, si l'on considère la photosensibilisation de ces furanocoumarines en cas d'exposition solaire (Lindelöf *et al.*, 1991). La présence de ces furanocoumarines dans l'huile essentielle de *Citrus aurantium* L. ssp. *bergamia* Engler, a poussé l'Union Européenne, en juin 1995, à interdire la commercialisation des préparations destinées à accélérer le bronzage et dont la teneur en bergaptène dépassait 0,2 % (Folléa, 1995 ; Bruneton, 2001).

Par ailleurs, il a été observé des lésions chez les jardiniers qui cultivaient l'espèce, *Dictamnus albus* L. (le dictame blanc), à des fins ornementales. Les substances responsables de ces

dermatites sont les furanocoumarines 5-méthoxypsoralène et 8-méthoxypsoralène, ainsi que l'alcaloïde dictamnine pour lequel l'activité phototoxique a été récemment découverte (Schempp *et al.*, 1996).

D'autres espèces appartenant au genre *Ruta* à savoir : *Ruta graveolens* L. et *Ruta corsica* L. dont les feuilles sont frottées contre la peau pour éloigner les moustiques ou le diable (!) (Ena et Camarda, 1990) et certaines espèces hawaïennes dont *Pelea anisata* H. Mann. utilisées pour la fabrication de guirlandes de fleurs et de fruits à porter en collier (Elpern et Mitchell, 1984) sont aussi impliquées dans les phyto-photodermatoses.

2.4 *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

Parmi les espèces appartenant au genre *Zanthoxylum*, l'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler a retenu particulièrement notre attention pour une investigation plus poussée. Son utilisation en médecine traditionnelle et les criblages biologique et chimique effectués auparavant ont guidé ce choix (Cf. 3.1 et 3.2).

2.4.1 Introduction

Syn. *Fagara zanthoxyloides* L., *Fagara xanthoxyloides* L., *Xanthoxylum xanthoxyloides* L., *Fagara senegalensis* (DC.) A. Chev., *Zanthoxylum senegalense* (DC.) A. Chev., *Zanthoxylum polygamum* Schum.,

Noms africains - Wolof :	Guene gui deg
- Bambara :	Wo, Gozo ngua
- Peuhl :	Barkeley, Bulabarkele
- Hausa :	Fasahuari
- Toucouleur :	Dori

En médecine traditionnelle, les racines et les tiges de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler sont utilisées en usage interne contre les entérites, les dysenteries, les diarrhées profuses, les urétrites et comme vermifuge. L'écorce de la racine et les feuilles sont fréquemment utilisées comme anti-odontalgique et pour traiter les stomatites, les gingivites et les caries (Rotimi *et al.*, 1988). Les racines constituent des frotte-dents particulièrement appréciés. En usage externe, l'écorce des racines est utilisée pour traiter les plaies suppurantes et les morsures de serpents. Les feuilles et les écorces de tiges écrasées sont utilisées en aromathérapie contre les migraines et les névralgies (Kerharo et Adam, 1974). Par ailleurs, l'extrait aqueux de cette plante est employé comme antidrépanocytaire et les principes actifs responsables de cette activité ont été isolés. Il s'agit de l'acide hydroxyméthyl-benzoïque et du xanthoxylol (Sofowora *et al.*, 1975).

2.4.2 Aspects botaniques et répartition géographique

C'est un arbuste glabre de 6 à 7 m de haut, qui suit les secteurs côtiers dans les sols frais de la région ouest africaine. Il est ramifié à la base, les branches sont ornementées de nombreuses épines crochues, robustes. Tous les organes dégagent une odeur très aromatique poivrée citronnée, les feuilles sont alternes, composées imparipennées. Les fleurs sont petites, blanches, parfumées, groupées en panicules lâches, axillaires ou terminales (Kerharo et Adam, 1974).

Pour le présent travail, l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler a été achetée au marché de Bamako au Mali, en mai 2000. L'identification de l'espèce a été effectuée par un botaniste local et un échantillon de référence se trouve à l'herbier de l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie de l'Université de Lausanne, Switzerland (n° 2000022).



Figure 2.6: Racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler d'après Pousset (1989)

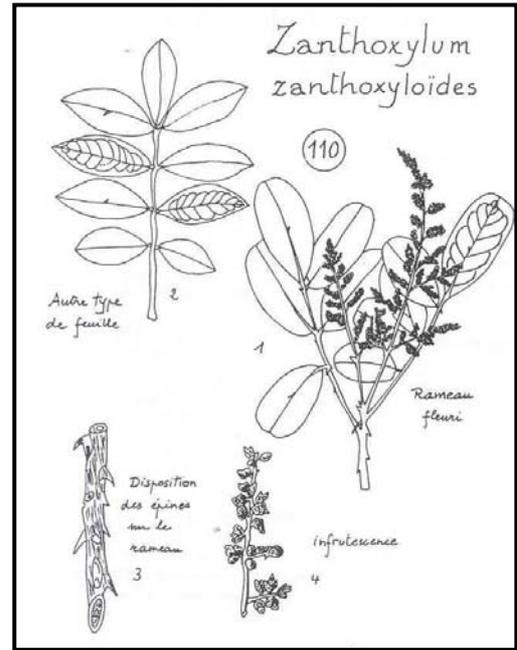


Figure 2.7: *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler d'après Malgras (1992)



Figure 2.8: Photographie d'un rameau de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler



Figure 2.9: Photographie du marché de Bamako

2.4.3 Toxicité

Les études menées sur *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler n'ont démontré aucune toxicité de la plante entière par voie orale et pour les autres voies d'administration, cette toxicité est très faible (Pousset, 1989). Par contre, les essais de toxicité effectués sur la souris ont montré que l'écorce des racines est toxique et que son administration par voie sous-cutanée, à une dose correspondant à 10g/kg, provoque la mort de 80% des souris. Cette toxicité est due à la présence d'alcaloïdes: fagaronine, skimmianine et atanine. L'écorce des tiges, ainsi que les feuilles se sont révélées moins toxiques (Neuwinger, 1996).

2.4.4 Travaux antérieurs sur *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

Les travaux de Okogun et Essien (1976) sur les racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* ont permis d'isoler et d'identifier la flavanone glycosylée, hespéridine (**6**) ; les lignanes: sésamine (**15**), asarinine (**18**), ainsi que le xanthoxylol (**19**), composé responsable de l'activité drépanocytaire de cette espèce.

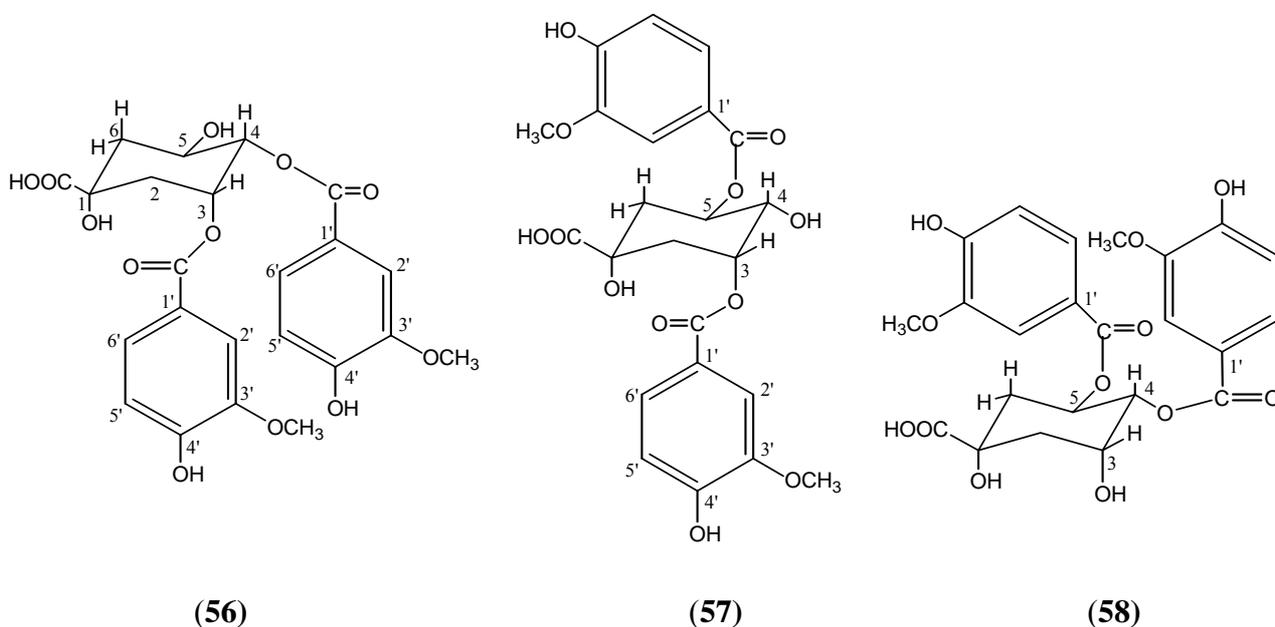
Odebiyi et Sofowora (1979) ont pu isoler et identifier la canthin-6-one (**22**), la chélérythrine (**23**) qui fut isolée la première fois de *Chelidonium majus* L. et la berbérine (**24**), alcaloïdes responsables de l'activité antimicrobienne de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lewis, 1983). La fagaronine (**25**), la nitidine (**26**), la 5-méthoxycanthin-6-one (**27**), la 4-méthylthiocanthin-6-one (**28**), l'acronycine (**29**), et la skimmianine (**30**) ont aussi été isolés et ont montré une activité antitumorale (Adesina, 1986).

Les travaux de Perrett et Whitfield (1995) ont montré au cours des essais effectués, *in vitro*, une activité antiparasitaire de l'atanine (3-diméthylallyl-4-méthoxy-2-quinolone) (**31**), sur les larves de *Schistosoma mansoni* et *Ostertagia circumcincta*, des trématodes qui infectent l'homme et la forme adulte et larvaire de *Caenorhabditis elegans*, un nématode terrestre

Une isobutylamide à activité insecticide, la fagaramide (**32**), la N-isobutyldécadièneamide (**33**), un anesthésique local, ainsi qu'un stérol, le β -sitostérol et un triterpène de type lupane, le lupéol (**50**) furent aussi isolés de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Adesina, 1986).

Par ailleurs, les travaux de Ngassoum *et al.* (2003), ont permis de mettre en évidence dans les fruits secs de *Zanthoxylum zanthoxyloides* de nombreux composés volatils, qui ont montré une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia faecalis*, parmi lesquels le α -pinène (**37**), composé majoritaire de cette huile essentielle, le *trans*- β -ocimène (**38**), le citronellol (**39**), l'acétate de citronellyl (**40**), le α -terpinolène (**41**), le α -phellandrène (**42**), le géraniol (**43**), le limonène (**44**) et le β -myrcène (**45**).

Récemment, Ouattara *et al.* (2004), ont permis d'identifier, grâce à l'utilisation des techniques analytiques couplées LC/MS et LC/RMN, trois dérivés de l'acide quinique et vanillique. Il s'agit de l'acide 3,4-*O*-divanilloylquinique, l'acide 3,5-*O*-divanilloylquinique et l'acide 4,5-*O*-divanilloylquinique. Ces trois nouveaux composés ont été nommés Burkinabines A, B et C (**56-58**).



Par ailleurs, étant donné que les extraits dichlorométhaniques et méthanoliques des écorces de tige de deux autres espèces du même genre: *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv., originaire de Guinée et *Zanthoxylum madagascariensis* Baker, originaire de Madagascar, se trouvent dans notre institut, une comparaison des trois espèces par LC/UV/MS sera effectuée.

2.5 *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv.

2.5.1 Aspects botaniques et répartition géographique

Syn. *Zanthoxylum gillettii* Waterm.

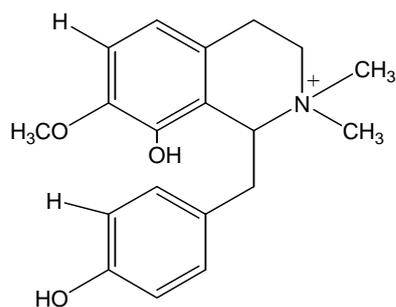
L'espèce *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. est un arbuste glabre de 5 à 6 m de haut, que l'on rencontre de la Sierra Leone jusqu'au Kenya, en Angola, au Malawi, en Zambie, au Soudan et en Côte d'Ivoire. Il est ramifié à la base, les branches sont ornementées de nombreuses épines crochues, robustes. Tous les organes dégagent une odeur très aromatique poivrée citronnée les feuilles sont en forme de rosettes. Les fleurs sont petites, rouges-brunes à blanches-roses ou vertes, parfumées, groupées en panicules lâches, axillaires ou terminales. Les fruits sont des capsules d'environ 5 à 8 mm de diamètre, qui contiennent une seule graine ronde de couleur bleu foncé et dont le goût rappelle celui de la menthe (Neuwinger, 1996).

Cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle africaine contre les maux de tête, comme brosse à dents, contre les affections rhumatismales et urogénitales et comme poison de flèches (Neuwinger, 1996).

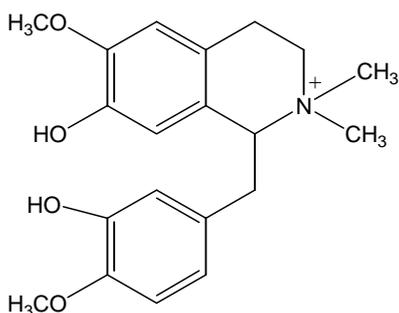
2.5.2 Travaux antérieurs sur *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv.

Les travaux antérieurs effectués sur cette espèce ont permis d'isoler de son écorce: le lignane: sésamine (15); les alcaloïdes: oblongine (59), tembetarine (60), magnoflorine (61), 1-hydroxy-3-méthoxy-N-méthylacridone (62), arborinine (63), xanthoxoline (64), 1-hydroxy-3-

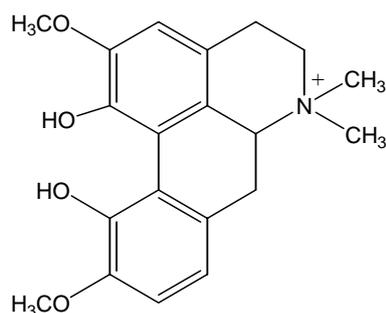
méthoxyacridone (**65**), skimmiannine (**30**), chélérythrine (**23**), dihydro-chélérythrine (**66**), nitidine (**26**) ; les amides : fagaramide (**32**), arnottianamide (**67**), N-isobutyl-(2*E*,4*E*)-décadiénamide (**33**), N-isobutyl-2,4,8,10,12-tétradécapentaénamide (**68**) ; le triterpène: lupéol (**50**) ; le stérol: β -sitostérol et la flavanone: hespéridine (**6**) (Monroe *et al.*, 1987 ; Tringali *et al.*, 2001).



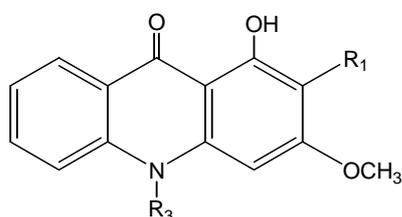
(59)



(60)



(61)

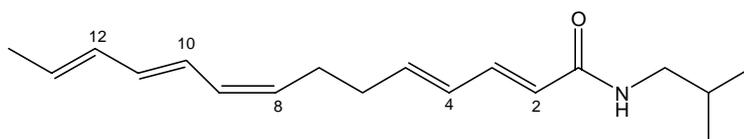


(62) $R_1=H$; $R_3=CH_3$

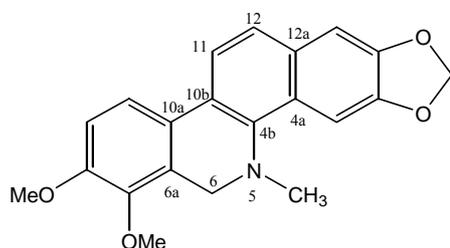
(63) $R_1=OCH_3$; $R_3=CH_3$

(64) $R_1=OCH_3$; $R_3=H$

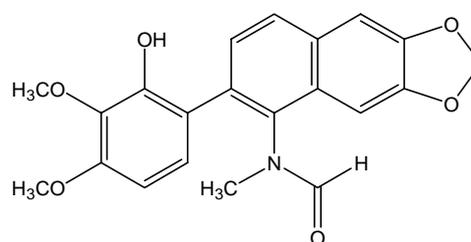
(65) $R_1= R_3=H$



(68)



(66)



(67)

2.6 *Zanthoxylum madagascariensis* Baker

2.6.1 Aspects botaniques et répartition géographique

Syn. *Zanthoxylum tsihanimposa* Baker

Nom vernaculaire: Tsihanihimposa

C'est un arbre dioïque pouvant atteindre 15 m de haut, très épineux pendant le stade de jeunesse, mais presque inerme, à rameaux florifères le plus souvent inermes à l'état adulte. Les feuilles sont glabres de 10 à 25 cm. De long, à 5-7 paires de folioles ; les inflorescences sont des panicules, axillaires ou terminales de petites fleurs. Les sépales sont deltoïdes, aussi larges à la base que hauts, imbriqués-décussés, les pétales sont oblongs, glabres à l'extérieur, valvulaires. Le gynécée est constitué par un seul carpelle glabre. Le fruit est subglobuleux, contracté en col à la base ; la graine est d'un noir brillant, globuleuse (Schatz, 2001).

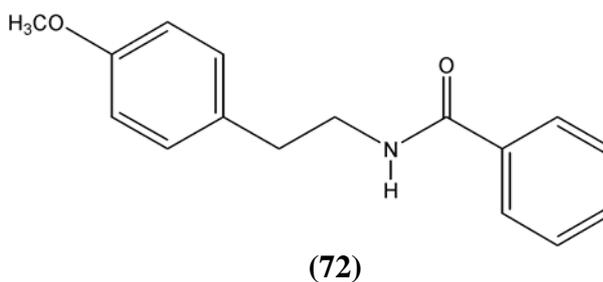
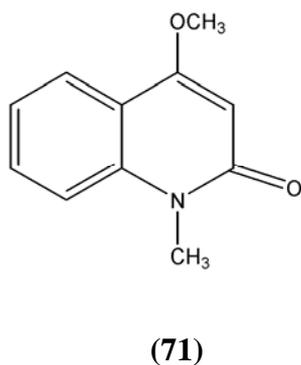
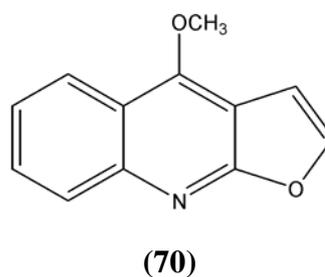
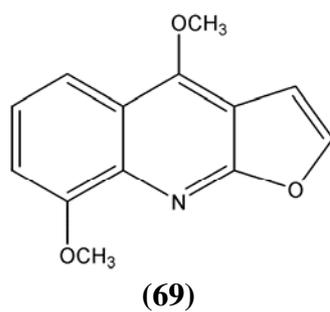
Cette espèce est utilisée par les populations de la région ouest de Madagascar pour traiter la malaria (tazo). Ce sont les alcaloïdes isolés de l'écorce de tige: skimmianine, γ -fagarine, dictamnine, N-benzoyltyramine- méthyléther et 4-méthoxy-1-méthyl-2-quinolinone qui sont responsables de cette activité (Randrianarivelosia *et al.*, 2003).



Figure 2.10- Photographie de *Zanthoxylum madagascariensis* Baker d'après Milijaona Randrianarivelosia (Randrianarivelosia *et al.*, 2003).

2.6.2 Travaux antérieurs sur *Zanthoxylum madagascariensis* Baker

Les travaux antérieurs effectués sur cette espèce ont permis d'isoler de l'écorce de tige: les alcaloïdes: tembétarine (60), chélérythrine (23), skimmiannine (30), γ -fagarine (69), dictamnine (70), 4-méthoxy-1-méthyl-2-quinolinone (71) et N-benzoyltyramine-méthyl-éther (72), (Decaudain *et al.*, 1974 ; Randrianariveლოსია *et al.*, 2003).



2.7 D'autres plantes utilisées en médecine traditionnelle dans l'hygiène buccale

L'utilisation des plantes pour se frotter les dents remonte à la plus haute antiquité, à l'époque des Babyloniens (5000 ans avant J.-C.). Cette pratique s'est répandue chez les Grecs et les Romains et reste toujours d'actualité parmi certaines communautés d'Afrique, de l'Asie du sud, d'Amérique tropicale et chez certaines populations Indiennes des Etats-Unis d'Amérique. Dans une étude réalisée par MacGregor (1963), il a été démontré que chez les tribus du Ghana préférant les frotte-dents à base de plantes aux techniques modernes de brossage, l'incidence de la carie dentaire est plus faible. En effet, un grand nombre de ces plantes possède des propriétés médicinales: antibactérienne, antifongique, antitumorale, antitumorale, anti-inflammatoire ou analgésique pour ne citer que les plus étudiées de ces propriétés. Le tableau 2.2 représente quelques espèces des plus utilisées comme frotte-dents avec les emplois reconnus en médecine traditionnelle (d'après Lewis et Elvin-Lewis, 1977). Sont absentes de cette liste (non exhaustive) les plantes utilisées sous forme de gommes, les plantes utilisées sur les dents, sous forme de poudre, pour permettre leur extraction de façon non chirurgicale, ainsi que d'autres plantes utilisées pour traiter les aphtes et l'herpès labial, car elles nécessiteraient à elles seules un chapitre sur l'hygiène buccale.

Tableau 2.2 – Quelques plantes utilisées en médecine traditionnelle comme frotte-dents (d'après Lewis et Elvin-Lewis, 1977)

Pante	Organe	Utilisation	Région
<u>Ebenaceae</u>			
<i>Diospyros usambarensis</i> A.DC.	tige	antibactérienne, antifongique, molluscicide	Afrique de l'ouest et centrale
<i>Diospyros barteri</i> L.	tige	antibactérienne	Afrique de l'ouest
<i>Diospyros elliotii</i> A. DC.	tige	antibactérienne,	Afrique de l'ouest
<i>Diospyros heudelotii</i> A. DC	tige	antibactérienne	Sierra Leone
<i>Diospyros lycioides</i> A. DC (kaki)	racine	antibactérienne	Zambie

Pante	Organe	Utilisation	Région
<u>Ebenaceae</u>			
<i>Diospyros tricolor</i> Hiern	racine	antibactérienne, anticariogénique	Zambie
<u>Rutaceae</u>			
<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepernick et Timler	tige	anti-carie, dysenterie, fébrifuge, ulcères buccales, vermifuge, antidrépanocytaire, morsures de serpents, etc.	Afrique de l'ouest
<i>Fagara chalybaea</i> Engl.	rameau	utilisé en gargarisme, émétique, anti- oedémateux, etc.	Afrique du sud
<i>Fagara deremensis</i> L.	rameau	maux d'estomac	Afrique du sud
<i>Citrus aurantifolia</i> L.	rameau	aphrodisiaque, dysenterie, maux de tête, fébrifuge, vermifuge, infections buccales, etc.	Afrique de l'ouest
<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.	rameau	dysenterie	Inde, Pakistan
<i>Clausena anisata</i> (Willd.) J.D. Hook. Ex. Benth	tige	dysenterie, affections respiratoires, maux de tête	Afrique de l'ouest, Afrique du sud, Kenya
<i>Glycosmis pentaphylla</i> (Retz.) Corr.	tige	fébrifuge, hépatite, vers intestinaux, etc.	Inde
<i>Teclea verdoorniana</i> Excell et Mendonça	rameau	toux, problèmes oculaires	Afrique de l'ouest,
<u>Fabaceae</u>			
<i>Cassia sieberiana</i> DC.	racine	aphrodisiaque, dysenterie, fébrifuge, vermifuge, etc.	Sierra Leone
<i>Acacia nilotica</i> Willd.	rameau	aphrodisiaque, dysenterie,	Afrique tropicale,
<i>Acacia arabica</i> Willd.	rameau	dysenterie, fébrifuge, vermifuge, ulcères buccaux, etc.	Pakistan
<i>Acacia pinnata</i> Willd.	rameau, tige et racine	aphrodisiaque,	Afrique tropicale, Inde
<u>Anacardiaceae</u>			
<i>Rhus cotinus</i> L.	rameau	en gargarisme	Tanzanie
<i>Rhus glabra</i> L.	rameau	anti-carie	USA (Indiens)

Pante	Organe	Utilisation	Région
<u>Rubiaceae</u>			
<i>Adina microcephala</i> Salisb.	racine	infections buccale	Afrique tropicale
<i>Coffea laurinum</i> L.	tige	aphrodisiaque, fébrifuge, vermifuge	Tanzanie
<i>Oxyanthus speciosus</i> DC.	plante entière	fébrifuge	Afrique tropicale
<u>Rhamnaceae</u>			
<i>Gouania lupuloides</i> Jacq.	tige	en solution buccale	Amérique tropicale
<u>Amaranthaceae</u>			
<i>Achyranthes aspera</i> L.	branche	émétique, morsures de serpents	Arabie, Panama
<u>Salicaceae</u>			
<i>Populus</i> spp.	rameau	antibactérienne	Sud Est des USA
<u>Clusiaceae</u>			
<i>Garcinia afzelii</i> L.	rameau	aphrodisiaque, dysenterie	Afrique de l'ouest
<i>Garcinia kola</i> Heckel	racines	aphrodisiaque, dysenterie, maux de tête, tumeurs malignes, etc.	Afrique de l'ouest
<i>Garcinia mangostana</i> L.	rameau	dysenterie	Afrique de l'ouest
<i>Garcinia mannii</i> L.	racine, tige	diurétique	Ghana
<u>Sapindaceae</u>			
<i>Paullinia pinnata</i> L.	racine	aphrodisiaque, dysenterie, ulcères buccales, diurétique, morsures de serpents, etc.	Afrique de l'ouest
<u>Persicaceae</u>			
<i>Salvadora persica</i> L. (Miswak ou Arak)	rameau	Antibactérienne, cariogénique	Moyen Orient, Afrique du nord et centrale

3. RESULTATS

3.1. Screening biologique des plantes récoltées au Mali

3.1.1. Introduction

Dans le présent travail, et dans le but d'isoler des composés actifs, 12 extraits bruts de certaines plantes de la flore du Mali, choisis sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle, ont été préparés selon le protocole d'extraction standard décrit au chapitre 5.1. Il s'agit dans notre cas d'extraits dichlorométhaniques, méthanoliques et aqueux. Ces extraits sont ensuite soumis à une série de tests biologiques, chimique et enzymatique utilisés en routine par notre laboratoire, afin de cibler rapidement les extraits actifs qui sont intéressants (Hamburger et Hostettmann, 1991). Il s'agit des activités suivantes :

- antifongique contre *Cladosporium cucumerinum* (C.c.) (Homans et Fuchs, 1970) ;
- antifongique contre *Candida albicans* (C.a.) (Rahalison *et al.*, 1991) ;
- larvicide contre *Aedes aegypti* (A.a.) (Cepleanu, 1993) ;
- activité molluscicide contre *Biomphalaria glabrata* (B.g.) (Hostettmann *et al.*, 1982) ;
- antioxydante au DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) (Takao *et al.*, 1994 ; Cuendet *et al.*, 1997) ;
- inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) (Marston *et al.*, 2002).

Le principe de ces différents tests est exposé au chapitre 5.6. et le résultat du criblage biologique de ces extraits bruts est présenté dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 - Résultats du screening biologique effectué sur les extraits bruts d'une sélection de plantes du Mali

Famille	Espèce	Organe	Extrait	Masse [g]	<i>C.a.</i>	<i>C.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>A.a.</i>	<i>B.g.</i>	DPPH	AChE
Rutaceae	<i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepernick et Timler	Ecorce de racines	DCM	16.7	++	++	++	++	+	+	+
			MeOH	19	++	++	++	++	-	+	+
			H ₂ O	3	-	-	-	n.d.	-	n.d.	n.d.
Leguminosae	<i>Parkia biglobosa</i> (Jacq.) Benth.	Fruits	DCM	20	-	+	-	-	-	-	n.d.
			MeOH	179	-	(+)	-	-	-	+	n.d.
			H ₂ O	6.97	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.
Capparaceae	<i>Boscia angustifolia</i> Lam.	Ecorce de tiges	DCM	4.35	-	-	-	-	-	-	n.d.
			MeOH	24.4	-	-	-	-	-	+	n.d.
			H ₂ O	11.69	nd	nd	nd	nd	-	-	n.d.
Meliaceae	<i>Pseudocedrela kotschy</i> Harms	Racines	DCM	17	-	+	-	-	-	-	n.d.
			MeOH	45	-	(+)	-	-	-	+	n.d.
			H ₂ O	1.69	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.

- : pas d'activité

(+) : activité faible

+ : activité moyenne

++ : activité forte

n.d. : activité non déterminée

3.1.2. Discussion

Les tests antifongiques, antibactérien, antiradicalaire et anticholinestérasique ont été réalisés sur CCM. C'est un support qui présente divers avantages dont ceux d'être peu coûteux, reproductible, rapide et de plus, l'échantillon à tester peut être solubilisé dans un solvant approprié. Par ailleurs, leur utilisation en routine dans notre institut nous a permis de cibler le fractionnement et l'isolement des produits actifs.

Parmi les extraits testés, les extraits dichlorométhanique et méthanolique de l'écorce de racine de *Zanthoxylum zanthoxyloides* ont montré une forte activité antifongique, antibactérienne et une toxicité à 100 % envers les larves du moustique *Aedes aegypti*.

Pratiquement tous les extraits méthanoliques ont réagi positivement au test antiradicalaire avec le DPPH. Ceci s'explique par la présence de composés phénoliques dans les extraits polaires, dont l'activité antiradicalaire a été largement étudiée (Potterat, 1997). L'extrait dichlorométhanique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* a lui aussi montré une activité antiradicalaire avec le DPPH, ce qui suggère la présence de substances phénoliques dans cet extrait également.

Seul l'extrait dichlorométhanique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* a donné un résultat positif sur *Biomphalaria glabrata*. Ceci peut être dû à la contribution de saponines (Marston *et al.*, 1993). En effet, un di-glycoside de stigmastadienol (*cf.* 2.2.3) a été isolé des feuilles de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Hegnauer, 1973 et 1983 ; Bhatt *et al.*, 1981). Puisque les tanins n'ont jamais été décrits dans cette espèce (en général se sont les tanins qui sont responsables de l'effet molluscicide, comme l'ont montré Schaufelberger et Hostettmann (1982) avec la disparition de l'effet après que les extraits actifs ont été débarrassés de ces dérivés polyphénoliques).

Les deux extraits polaire et apolaire de *Zanthoxylum zanthoxyloides* possèdent une activité bloquant la dégradation de l'AChE, enzyme qui joue un rôle important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Ce sont généralement les alcaloïdes (physostigmine, galanthamine, alcaloïdes stéroïdiques des Solanaceae, etc.) qui sont responsables de cet effet

(Marston *et al.*, 2002). L'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* contient des alcaloïdes de type benzo[c]phénanthridines (*cf.* 2.2.3), qui peuvent contribuer à cette activité (Ulrichova *et al.*, 1983). L'utilisation de certains insecticides synthétiques (dérivés organophosphorés, carbamates, etc.), qui se sont révélés de puissants inhibiteurs de cholinestérases (Mendoza et Shields, 1973 ; Weins et Jork, 1996) pour protéger la culture de cette plante et qui peut induire des faux positifs est à exclure, car l'espèce se trouve à l'état sauvage au Mali.

Ces résultats sont à considérer d'un œil critique. L'activité d'un extrait brut étant due à l'activité intrinsèque des composantes actives et de leur quantité relative, un résultat négatif peut être la conséquence de la présence d'une faible quantité de produits actifs dans l'extrait que d'une grande quantité de produits non actifs. Par conséquent, ce criblage biologique nous a permis la sélection des extraits intéressants à étudier et que les autres extraits ne sont en aucun cas à exclure, mais que leur investigation peut être faite ultérieurement.

De ce fait, l'espèce qui a retenue notre attention pour une étude phytochimique approfondie est *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler.

3.2. Investigation phytochimique de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

3.2.1. Introduction

La Rutaceae *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler a particulièrement retenue notre attention et a été sélectionnée pour être soumise à une investigation phytochimique approfondie. En effet, son utilisation en médecine traditionnelle du Mali, comme frotte-dents, antiseptique, anti-inflammatoire, antirhumatismal, etc. (Kerharo *et al.*, 1974), les résultats obtenus lors du criblage biologique, la rapide analyse LC/DAD-UV et LC-UV(DAD)-MS des extraits bruts dichlorométhanique et méthanolique et le peu de travaux phytochimiques répertoriés pour cette espèce ont guidé notre choix.

Zanthoxylum zanthoxyloides a été achetée au marché de Bamako au Mali, en mai 2000. La plante a été identifiée par un botaniste local et un échantillon de référence se trouve à l'herbier de l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie de l'Université de Lausanne (n° 2000022).

3.2.2. Screening chimique général et analyses LC/DAD-UV et LC-UV (DAD)-MS des extraits dichlorométhanique et méthanolique de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

La chromatographie sur couche mince (CCM), ainsi que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée avec des méthodes de détection par spectrophotométrie UV et par spectrométrie de masse (MS) sont des techniques qui jouent un rôle important dans l'investigation phytochimique d'un extrait brut (Wolfender et Hostettmann, 1996). Ces techniques furent utilisées pour analyser les extraits dichlorométhanique et méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, afin d'avoir des indications sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce.

Pour la CCM, les extraits bruts ont été solubilisés à raison de 10 mg/ml dans un solvant approprié: le dichlorométhane pour l'extrait apolaire et le méthanol pour l'extrait polaire et séparés selon les conditions décrites sous 5.2.1. En plus de l'observation sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm, les plaques ont été révélées à l'aide des réactifs chimiques présentés au chapitre 5.5.1, pour permettre une première identification de la classe de composés contenus dans les échantillons à analyser.

Pour les analyses LC/DAD-UV, les échantillons ont été solubilisés à raison de 10 mg/ml dans un solvant approprié: l'acétonitrile additionné de tétrahydrofurane (THF) pour l'extrait apolaire et le méthanol pour l'extrait polaire. Après centrifugation et décantation, pour éliminer les particules en suspension, les solutions obtenues sont injectées dans un système HPLC, dont les paramètres expérimentaux sont décrits au chapitre 5.2.2.

Pour l'analyse LC-UV(DAD)-MS(APCI) en mode positif de l'extrait dichlorométhanique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, plusieurs essais ont été effectués avec une colonne RP-18 Nova-Pak® 250 mm, mais le courant ionique total (TIC) obtenu lors de cette analyse ne permet pas de mettre en évidence tous les composés isolés de l'extrait dichlorométhanique de cette espèce (*cf.* Fig. 3.1a). Afin d'obtenir une meilleure résolution, deux colonnes HPLC (Zorbax Eclipse XDB-Phenyl) de 250 mm de longueur connectées en série, ont été utilisées (*cf.* Fig. 3.1b). La préparation des échantillons s'est faite de la même façon que pour les analyses LC/ DAD-UV et les paramètres expérimentaux sont décrits au chapitre 5.2.3.

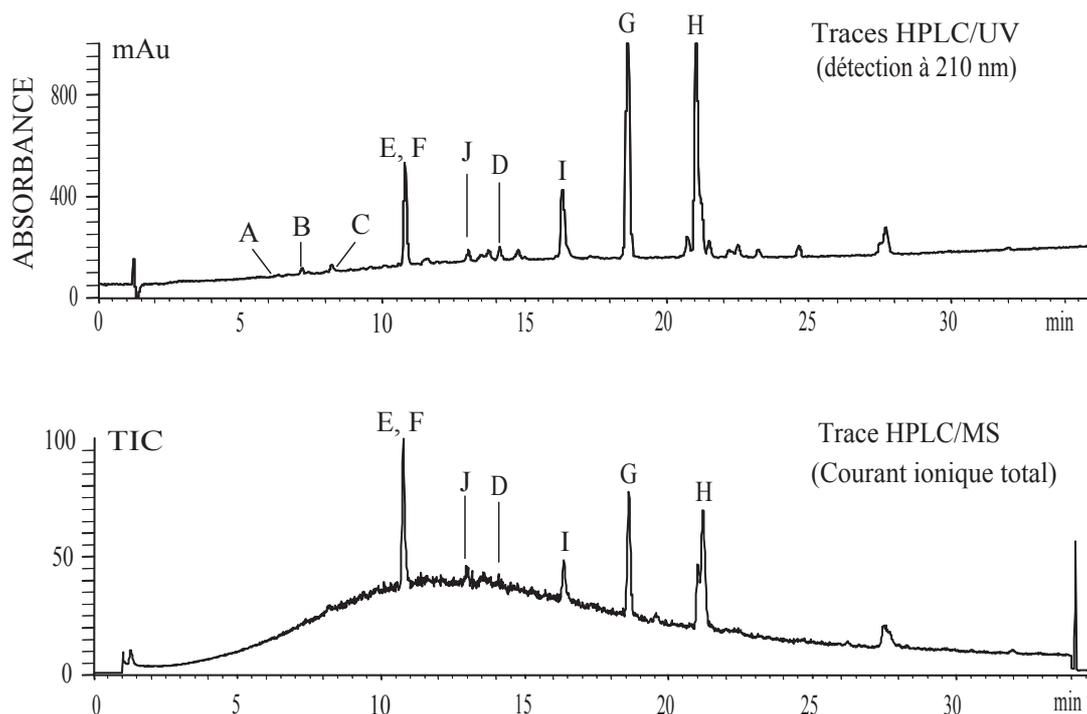


Figure 3.1a - Chromatogramme HPLC/UV/APCI-MS de l'extrait dichlorométhanique de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

Conditions de séparation : colonne RP-18 Nova-Pak® 250 mm; éluant : MeCN/H₂O

20 à 100 % sur 35 min., $\lambda = 210$ nm

3.2.3. Résultats et discussions

Le criblage chimique sur plaque CCM a permis de mettre en évidence la présence d'alcaloïdes (Dragendorff, coloration orange), de coumarines (acétate de plomb, fluor. vertes à 366 nm) et de flavonoïdes (NST/PEG, fluor. colorées à 366 nm) dans les extraits bruts apolaire et polaire de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Wagner et Bladt, 1996).

Les résultats des analyses LC/UV/APCI-MS des extraits dichlorométhanique et méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* sont présentés dans les figures 3.1b et 3.2.

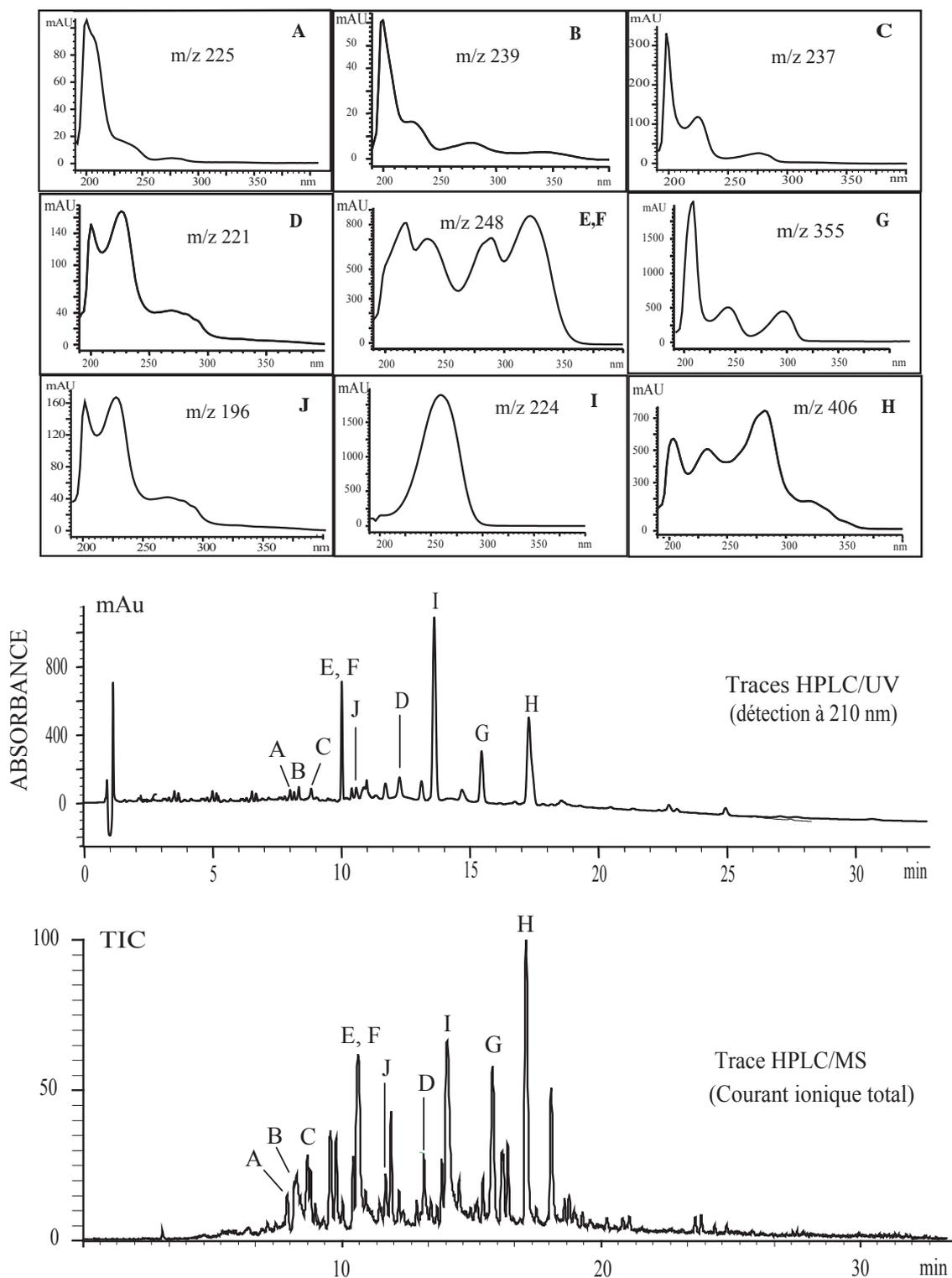


Figure 3.1b - Chromatogramme HPLC/UV/APCI-MS de l'extrait dichlorométhane de l'écorce de racines de

Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepernick et Timler

Conditions de séparation : 2 colonnes HPLC Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 250 mm ; éluant : MeCN/H₂O

20 à 100 % sur 35 min., $\lambda = 210$ nm

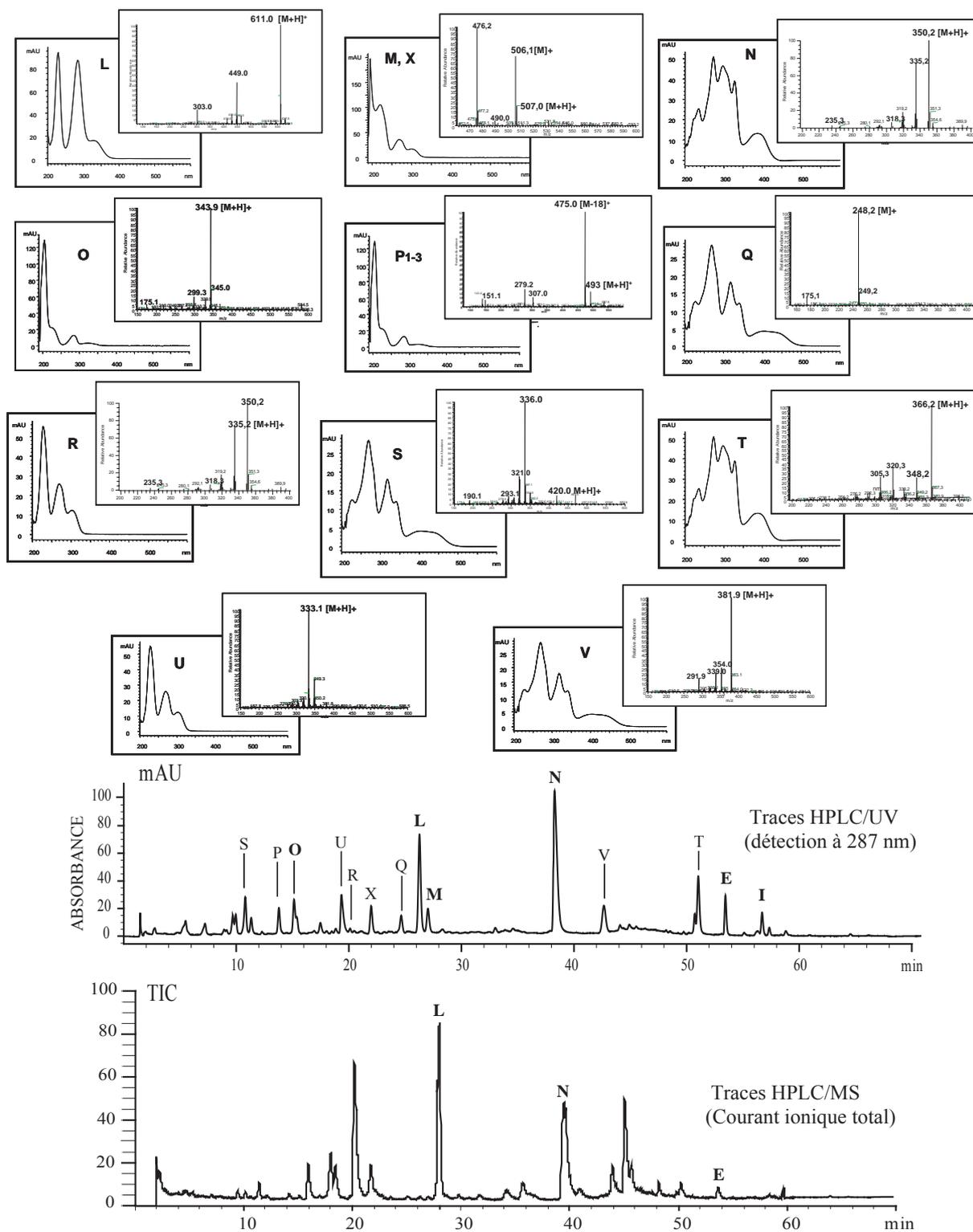


Figure 3.2 - Chromatogramme HPLC/UV/APCI-MS de l'extrait MeOH de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler

Conditions de séparation : colonne RP-18 Nova-Pak® 250 mm, gradient : MeCN/H₂O

2:98 → 100:0 sur 60 min., puis 100:0 sur 5 min., λ = 287 nm

Les analyses LC/DAD-UV et LC/UV/APCI-MS en mode positif ont montré une certaine diversité dans les classes de composés que l'on trouve dans les extraits dichlorométhanique et méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Ainsi, pour l'extrait DCM, le profil des spectres UV appartenant aux composés **A-D** montre des maxima d'absorption à 204 et 278 nm, et un épaulement vers 230 nm, ces composés peuvent appartenir à la même classe de composés. Le profil des spectres UV appartenant aux composés **E-H** est variable.

Par ailleurs, les composés **E**, **H** et **I** présentent respectivement un pic pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ à m/z 248, 406 et 224 correspondant à la fagaramide, l'acétyldihydrochélérythrine et la pellitorine, composés préalablement isolés de *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Cependant, vu l'intérêt biologique de ces composés, leur isolement est souhaité.

Le composé **L** montre un profil de spectre UV avec un maximum d'absorption à 284 et un épaulement à 328 nm caractéristiques d'une flavanone.

Les composés **M** et **X** montrent un profil de spectre UV avec deux maxima d'absorption à 198 et 265 nm, et deux épaulements à 224 et 298 nm. Ils ne nous rappellent aucune classe de composés connus.

D'autres composés, préalablement isolés de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, furent identifiés dans l'extrait méthanolique par dérégulation, après comparaison de leurs spectres UV et de leurs masses obtenues *on-line* après l'analyse HPLC/UV/APCI-MS. Il s'agit probablement de l'un des trois dérivés de l'acide quinique et vanillique: à savoir l'acide 3,4-*O*-divanilloylquinique, l'acide 3,5-*O*-divanilloylquinique, et l'acide 4,5-*O*-divanilloylquinique (**Burkinabine A**, **Burkinabine B** et **Burkinabine C**) (m/z 493) (**P**) récemment identifiés dans l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* par Ouattara et al. (2004), ainsi que de la chélérythrine (**Q**) (m/z 349) et quatre de ses dérivés: norchélérythrine (**R**) (m/z 335), 6-(2-oxybutyl) dihydrochélérythrine (**S**) (m/z 420), 6-hydroxy dihydrochélérythrine (**T**) (m/z 366) et avicine (**U**) (m/z 333), ainsi que l'amide phénolique l'arnottianamide (**V**) (m/z 382).

En effet, l'analyse HPLC/UV/APCI-MS en mode gradient, nous a permis de mettre en évidence un pic (**P**) ($T_R = 14.12$ min), dont le spectre de masse en APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) en mode positif, présente un ion moléculaire protoné à m/z 493

$[M+H]^+$, un fragment à m/z 475 $[M-18]^+$ compatible avec la perte d'une molécule d'eau par l'ion moléculaire et un fragment à m/z 151 $[M-342]^+$, correspondant à l'acide vanillique dihydraté. Cette fragmentation est celle observée par Ouattara *et al.* (2004) pour les trois dérivés de l'acide quinique et vanillique (**Burkinabine A**, **Burkinabine B** et **Burkinabine C**) qu'ils ont récemment isolés de *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Nous nous pouvons confirmer l'identité de ce composé **P** par la seule technique LC/MSⁿ dans l'extrait méthanolique. Une analyse LC/RMN est donc souhaitable pour pouvoir confirmer sa structure.

Par ailleurs, sur les traces d'ion sélectives (*Selective Ion Monitoring*, SIM) des analyses HPLC/UV/APCI-MS et LC/MSⁿ, six autres pics (**Q-V**) avec des ions à m/z 349 ($T_R = 25.48$ min), m/z 335 ($T_R = 20.62$ min), m/z 420 ($T_R = 10.99$ min), m/z 366 ($T_R = 50.92$ min), m/z 333 ($T_R = 19.74$ min) et m/z 382 ($T_R = 43.85$ min) ont aussi été mis en évidence grâce à cette technique.

Prenons l'exemple du composé **T**, le spectre de masse en APCI, en mode positif, de ce composé présente un ion moléculaire majoritaire à m/z 366 $[M+H]^+$, un fragment à m/z 348 $[M-18]^+$ compatible avec la perte d'une molécule d'eau par l'ion moléculaire et un fragment à m/z 333 $[M-18-15]^+$, correspondant à la perte d'une molécule d'eau et d'un groupement méthyle par l'ion moléculaire. Cette fragmentation est caractéristique des benzophénanthridines substituées en 6 (Decaudain *et al.*, 1974 ; Perez Gutierrez *et al.*, 2002). La figure 3.2a représente les spectres MSⁿ du composé **T**.

Le spectre d'absorption UV est voisin de celui de la dihydrochélérythrine avec quatre maxima à 225 nm, 245 nm, 285 nm, 355 nm et un épaulement à 325 nm, qui sont caractéristiques des benzophénanthridines oxygénées en 2, 3, 7 et 8 (Chen *et al.*, 1994).

La même démarche a été utilisée pour pouvoir identifier *on-line*, par HPLC/UV/APCI-MS et LC/MSⁿ, les autres composés de l'extrait méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*.

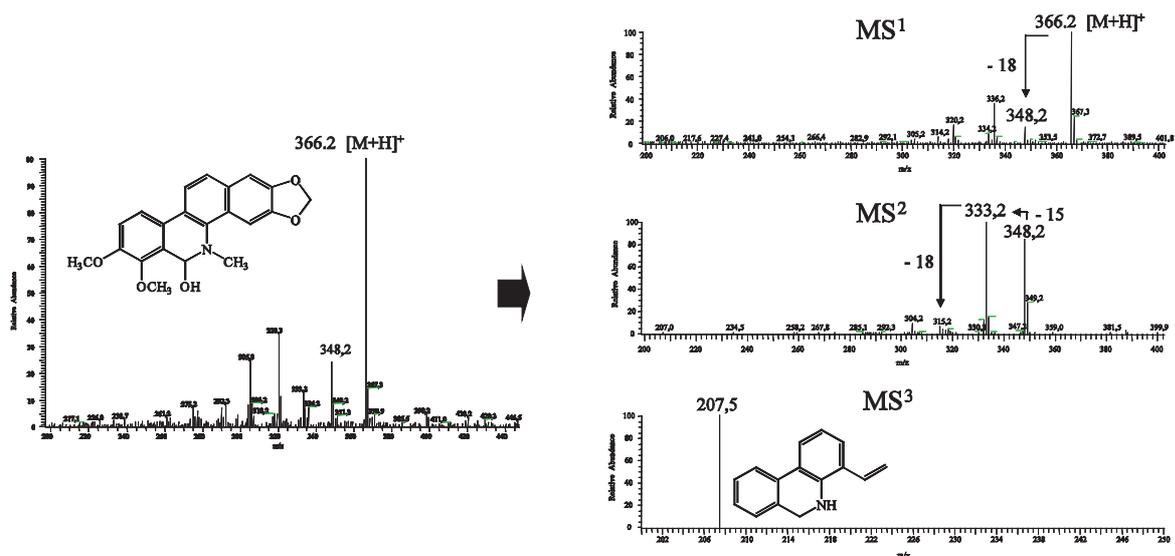


Figure 3.2a - Spectres MSⁿ du composé T.

Vu l'intérêt que les extraits dichlorométhanique et méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* ont suscités tant lors du criblage biologique que chimique, leur fractionnement a été entrepris. Ainsi, de l'extrait DCM les composés **A-K** ont été isolés et de l'extrait MeOH les composés **L-O** ont été isolés.

3.2.4. Fractionnement de l'extrait dichlorométhanique et isolement des composés A-K

Le schéma de fractionnement de l'extrait brut DCM guidé par l'activité biologique sur *Cladosporium cucumerinum* sur plaque est présenté dans la figure 3.3.

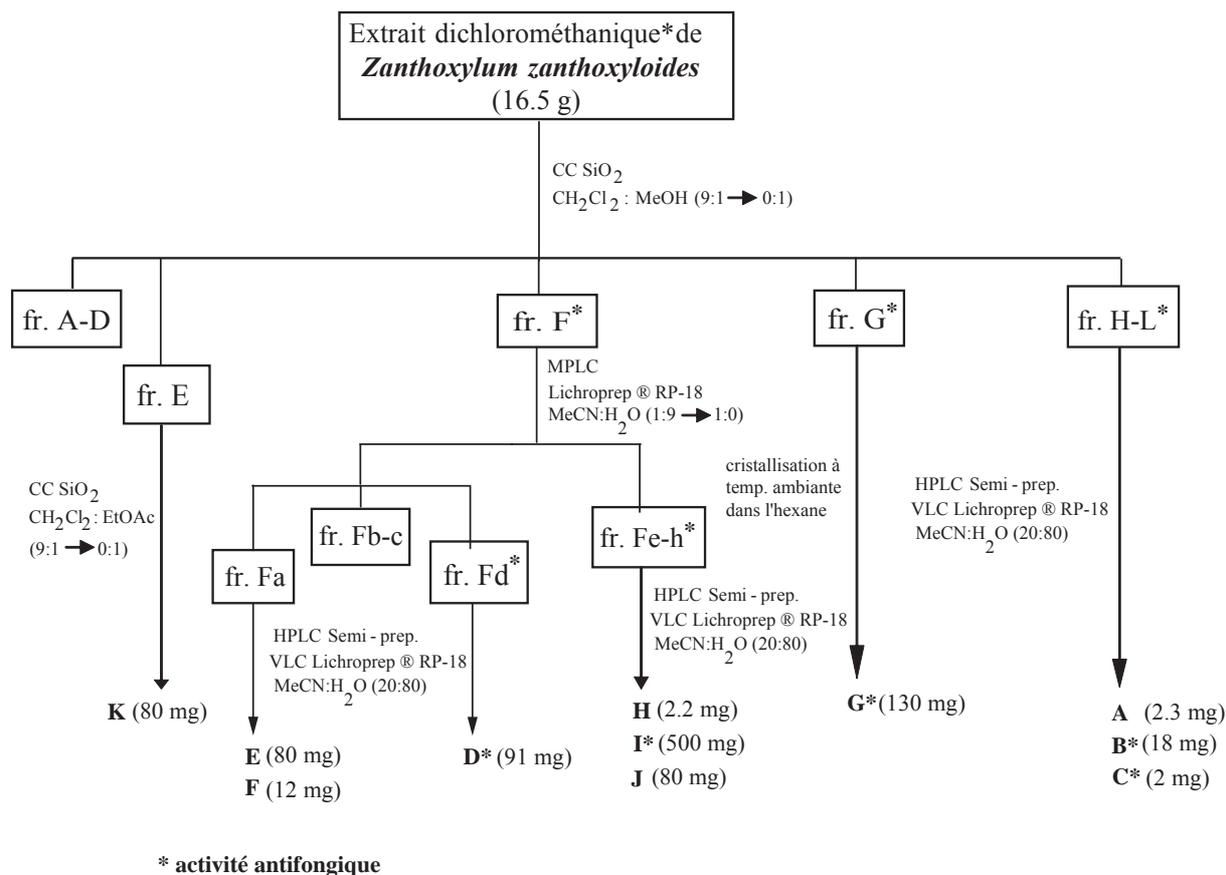


Figure 3.3 - Schéma de fractionnement de l'extrait dichlorométhanique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*.

L'extrait brut dichlorométhanique (16.5 g) a subi un premier fractionnement par chromatographie d'adsorption sur une colonne de silicagel, en utilisant un gradient de dichlorométhane et de méthanol (9:1 à 0:1) pour donner 12 fractions (fr. A-L). La fraction Fr. H-L a été fractionnée par chromatographie préparative en phase inverse à haute pression (HPLC semi-préparative) et a permis d'obtenir les composés **A-C**. La fraction fr.F a subi un fractionnement par chromatographie préparative en phase inverse à moyenne pression (MPLC) pour donner 8 fractions (fr. Fa-h). Les fractions Fa, Fd et Fe-h ont été ensuite fractionnées par HPLC semi-préparative en phase inverse pour donner les composés **D, E, F, H, I** et **J**. Une cristallisation à température ambiante dans l'hexane de la fraction fr.G a permis d'obtenir le composé **G**. La fraction fr.E, quant à elle, a été fractionnée sur une deuxième colonne de silicagel permettant ainsi d'obtenir le composé **K**.

3.2.5. Fractionnement de l'extrait méthanolique et isolement des composés L-O

Comme pour l'extrait DCM, le fractionnement de l'extrait brut MeOH a été guidé par l'activité biologique sur *Cladosporium cucumerinum* sur plaque (Cf. Figure 3.4).

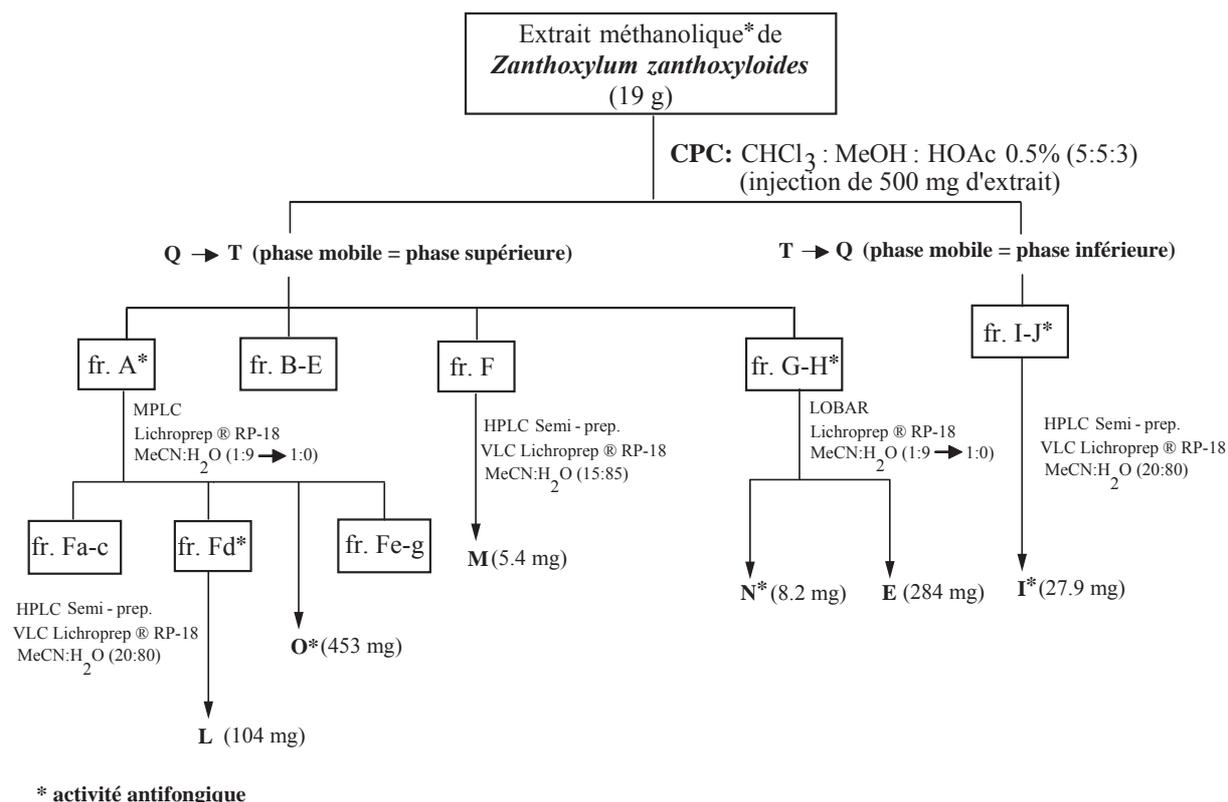


Figure 3.4 - Schéma de fractionnement de l'extrait méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*.

L'extrait brut méthanolique (19 g) a subi un premier fractionnement par chromatographie de partage centrifuge (CPC), à l'aide d'un mélange CHCl₃-MeOH-HOAc 0.5% (5 :5 :3) où la phase supérieure constitue la phase mobile, pour donner 10 fractions (fr.A-J). La fraction fr.A a subi un fractionnement par chromatographie préparative en phase inverse à moyenne pression (MPLC) pour donner 7 fractions (Fa-g), ainsi que le composé **O**. La fraction Fd a été ensuite fractionnée par HPLC semi-préparative en phase inverse pour donner le composé **L**. La fraction fr.G-H a subi un fractionnement par chromatographie préparative en phase inverse à faible pression (Lobar®) pour donner les composés **N** et **E**. Quant aux composés **M** et **I**, ils ont été obtenus par HPLC semi-préparative en phase inverse des fractions fr.F et fr.I-J respectivement. Les composés **E** et **I** furent préalablement isolés de l'extrait DCM et ont été

facilement caractérisés dans l'extrait MeOH grâce à la déréplication de cet extrait par LC/UV/APCI-MS en mode positif.

3.2.6. Détermination de structure des composés A-K isolés de l'extrait dichlorométhanique

3.2.6.1. Détermination de structure du composé A

Le composé **A** se présentait sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 198 nm ($\log \epsilon = 2.07$), à 224 nm ($\log \epsilon = 2.35$) et 279 nm ($\log \epsilon = 2.44$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **A** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 224 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 137 $[M-87]^+$, à m/z 108 $[M-116]^+$ et à m/z 107 $[M-117]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 225 $[M+H]^+$ et 242 $[M+NH_4]^+$ (Cf. Fig. 3.5).

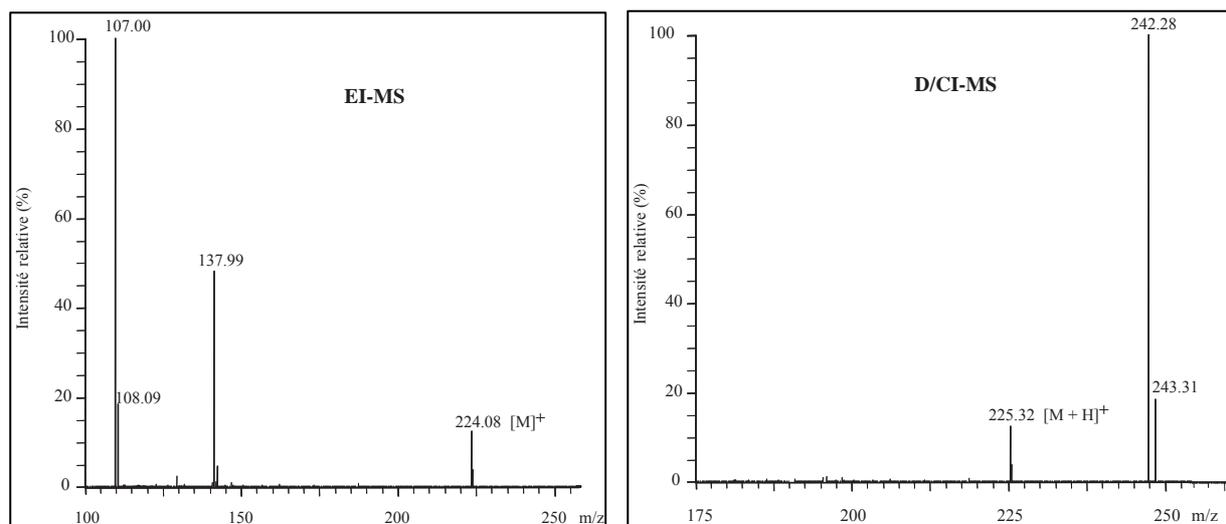


Figure 3.5 – Spectres de masse EI-MS et D/CI-MS du composé A.

Pour nous assurer de la masse moléculaire de 224 Da, déduite des deux mesures précédentes et obtenir la formule brute de ce composé, une analyse de spectrométrie de masse à haute résolution par électrospray (hrESI-MS) a été effectuée. Le spectre ainsi obtenu (Fig. 3.6) montre un adduit de l'ion moléculaire avec le sodium à m/z 247.13084 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{13}H_{20}O_3$ pour le composé **A** (calculé: m/z 247.13046).

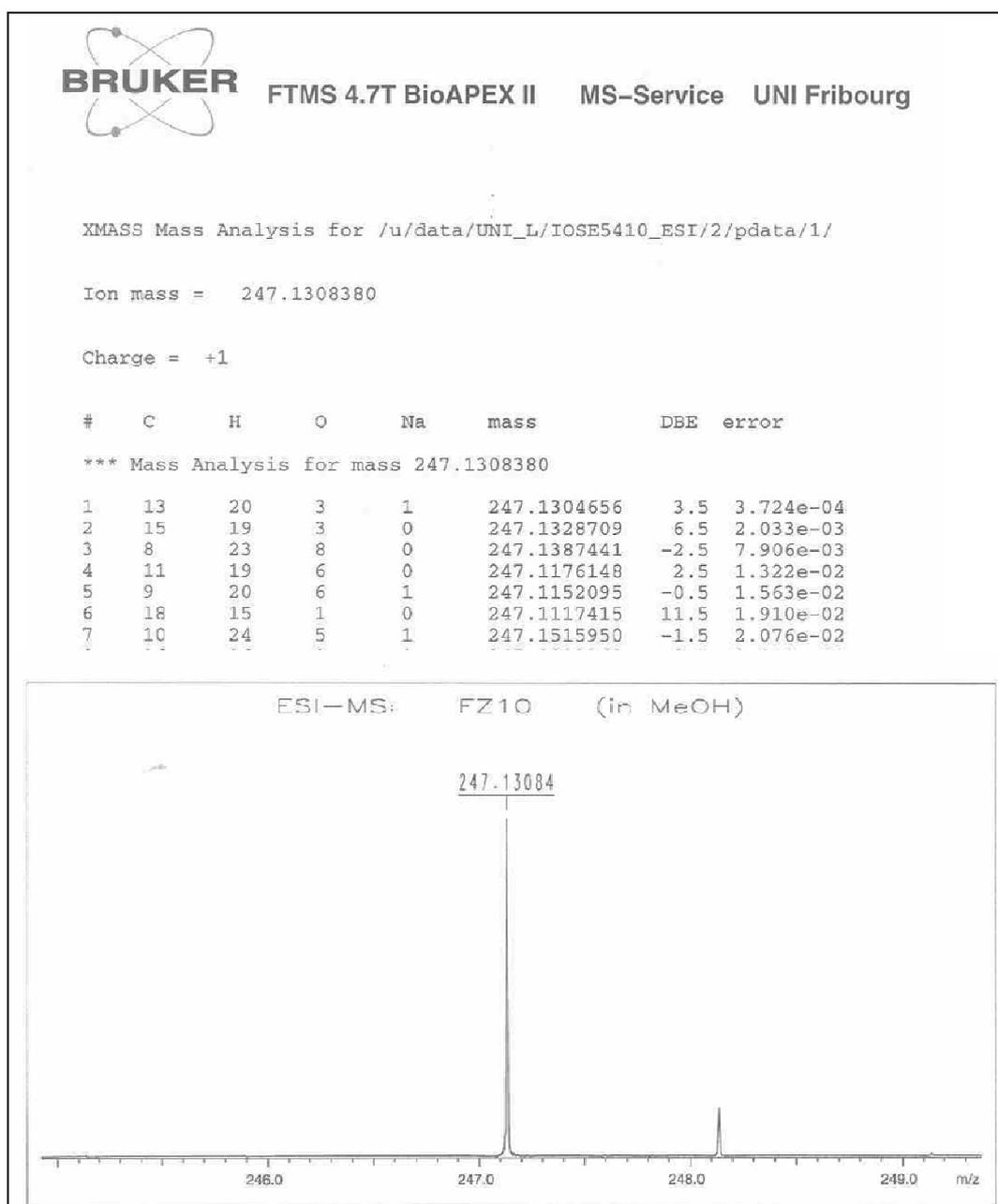


Figure 3.6 – Rapport d'analyse hrESI-MS du composé **A**.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **A** (Fig. 3.7). a montré un profil relativement simple et a permis de mettre en évidence la présence de: quatre protons aromatiques à δ 6.86 ppm (d , $J=8.3$ Hz, 2H) et δ 7.11 ppm (d , $J=8.3$ Hz, 2H) dans la région des bas champs, dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*, une unité *O*-prényle est visible avec deux multiplets à δ 4.02 ppm et δ 1.67 ppm et un doublet à δ 3.55 ppm ($J=5.7$ Hz, 2H) correspondant à trois groupes méthylènes et un multiplet à δ 1.05 ppm correspondant aux protons d'un groupe méthyle. La valeur déblindée du groupe méthylène à δ 4.02 ppm est révélatrice de la présence d'un atome d'oxygène adjacent à ce groupe. Deux multiplets à δ 3.82 ppm et δ 2.81 ppm intégrant chacun pour deux protons ont aussi été mis en évidence.

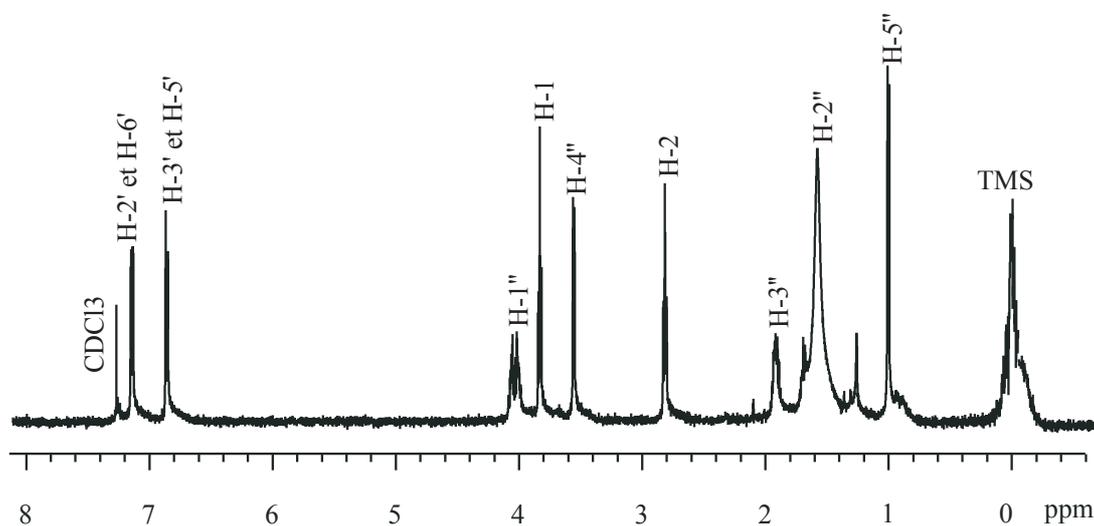


Figure 3.7 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **A**.

L'analyse du spectre ^{13}C -RMN (Fig. 3.8) a fourni plus d'indications. Ce spectre a ainsi montré deux signaux à δ 157.8 et δ 130.1 ppm, caractéristiques des carbones quaternaires, deux signaux à δ 129.9 et δ 114.6 ppm représentant chacun une paire de carbones magnétiquement équivalents, cinq signaux à δ 63.8, δ 38.2, δ 66.1, δ 32.8 et δ 67.9 ppm correspondant aux groupes méthylènes et un signal à δ 16.8 correspondant à un groupement méthyle. Par ailleurs, les 13 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ correspondant à un poids moléculaire de 224 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

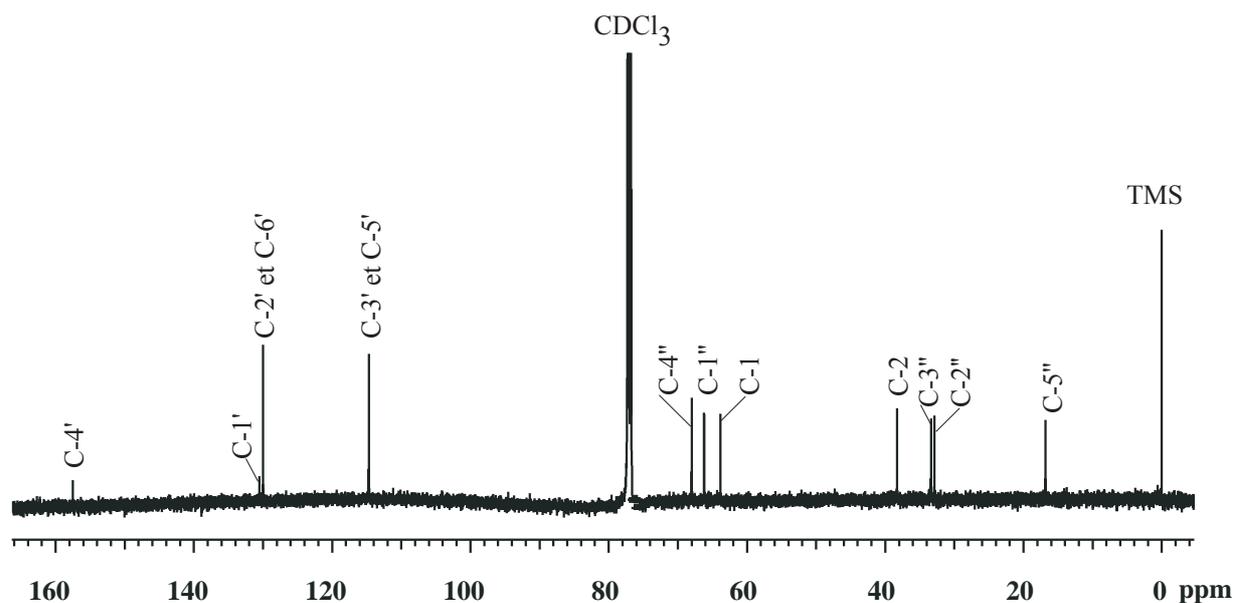


Figure 3.8- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) du composé A.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY (Fig. 3.9) et hétéronucléaires HSQC (Fig. 3.10) et HMBC (Fig. 3.11). Ainsi les quatre protons aromatiques, qui présentent entre eux un couplage dans l'expérience COSY, apparaissent sous forme de deux doublets intégrant chacun pour 2 H à δ 6.86 ($J=8.3$ Hz) et 7.11 ($J=8.3$ Hz), ce qui caractérise un système AA'XX'.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé A. Il a ainsi pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ 6.86 et δ 7.11 ppm étaient attachés aux CH respectivement situés à δ 129.9 et δ 114.6 ppm et que l'unité *O*-prényle était attaché au carbone quaternaire à δ 157.8 ppm.

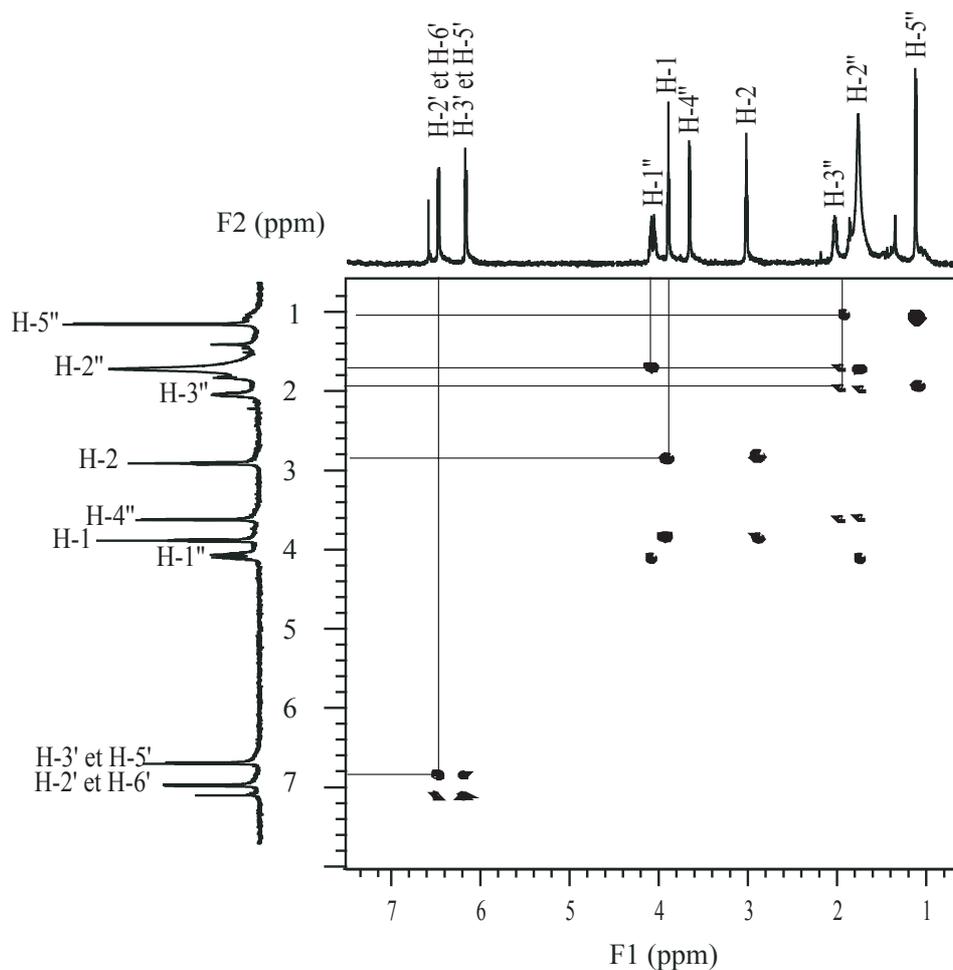


Figure 3.9- Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé A.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance (HMBC) a montré les corrélations entre les protons à 3.82 ppm et le carbone situé à 130.1 ppm suggérant l'attachement d'un groupe éthyle en C-1', ainsi que les corrélations entre les protons à 4.02 ppm et le carbone situé à 157.8 ppm confirmant la position de l'unité *O*-prényle sur le cycle.

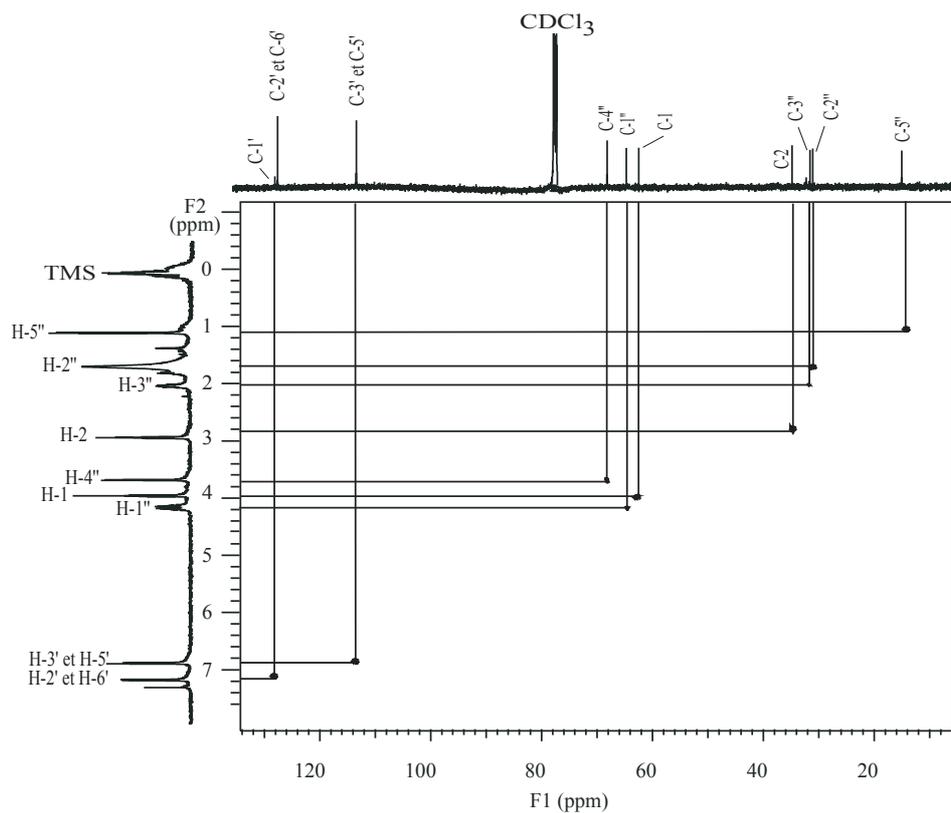


Figure 3.10- Spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé A.

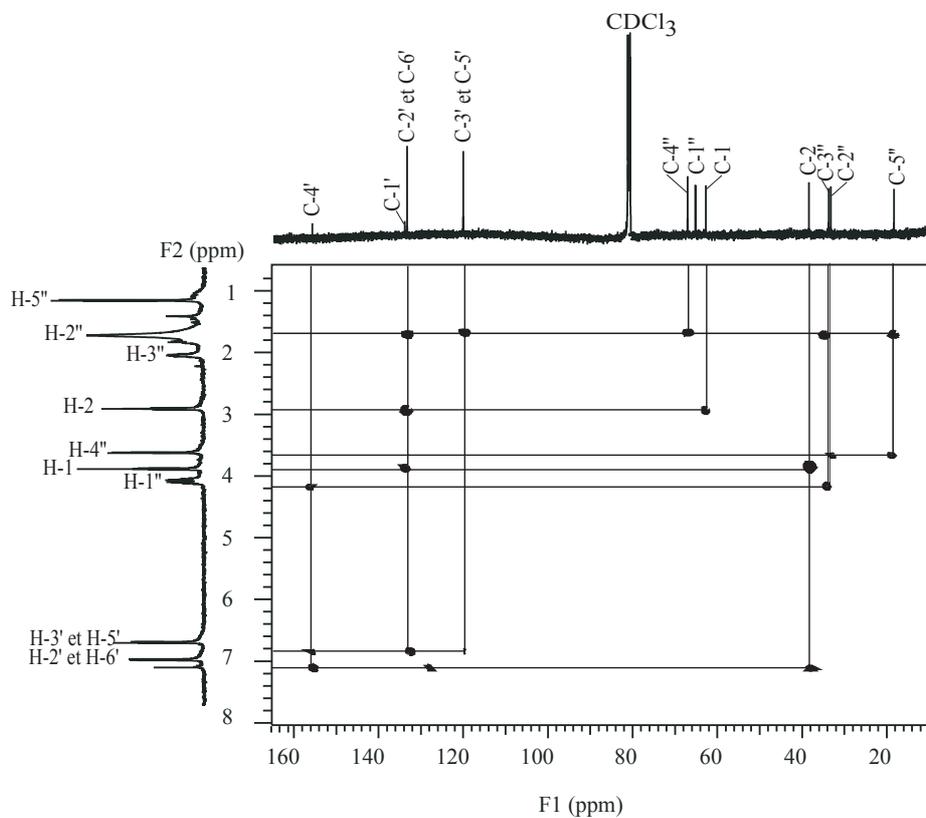


Figure 3.11- Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé A.

Afin de confirmer le nombre et la position des groupements OH sur le composé **A**, une acétylation a été effectuée. La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **A acétylé (A-a)** a montré un adduit de l'ion moléculaire avec deux groupements acétyles à m/z 308 $[M+2Ac]^+$, correspondant à la formule brute $C_{17}H_{24}O_5$ pour le composé **A-a**.

L'étude du spectre 1H -RMN du composé **A-a** (Fig. 3.12) a permis de mettre en évidence la présence de deux singulets supplémentaires à δ 2.05 et δ 2.07 ppm, intégrant chacun pour 3 protons et correspondant aux deux groupes acétyles en C-1 et C-4'', ce qui confirme la présence de deux groupements OH dans le composé **A**.

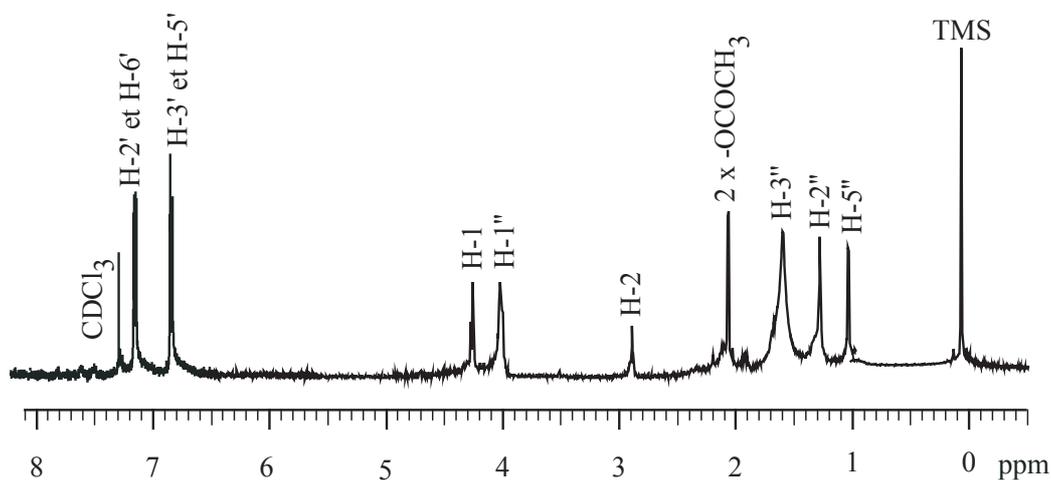
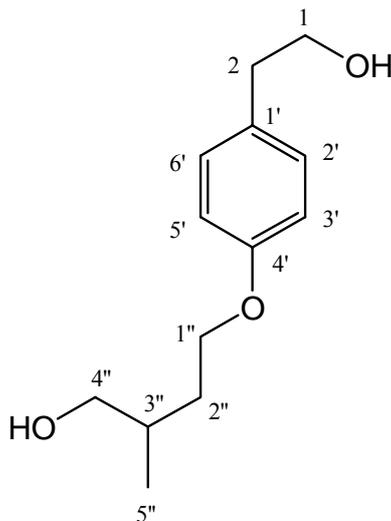


Figure 3.12 - Spectre 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé **A-a**.

Sur la base de ces résultats, la structure du composé **A**, présentée ci-dessous, a pu être établie comme la 4'-(4''-hydroxy-3''-méthylbutyloxy)-2-phényléthanol. Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. Il s'agit donc d'un nouveau produit naturel (Chaaib *et al.*, 2003).



Structure du composé **A**

3.2.6.2. Détermination de structure des composé **B–D**

Composé **B**

Le composé **B** possédait des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles du composé **A**. Il se présentait sous forme de cristaux incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 224 nm ($\log \varepsilon = 2.35$) et 278 nm ($\log \varepsilon = 2.43$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **B** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 236 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 152 $[M-84]^+$, à m/z 134 $[M-102]^+$ et à m/z 108 $[M-128]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 237 $[M+H]^+$ et 254 $[M+NH_4]^+$.

L'étude du spectre $^1\text{H-RMN}$ du composé **B** (Fig. 3.13) a montré un profil relativement simple et a permis de mettre en évidence la présence de: quatre protons aromatiques à δ 6.83 ppm (d , $J=8.3$ Hz, 2H) et δ 7.11 ppm (d , $J=8.3$ Hz, 2H) dans la région des bas champs, dont les

constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*. Une unité *O*-prényle est visible avec un multiplet à δ 4.57 ppm, un doublet à δ 4.07 ppm ($J=6.34$ Hz, 2H) correspondant aux protons des groupes méthylènes et un multiplet à δ 5.77 ppm correspondant aux protons d'un méthyne, et un singulet à δ 1.76 ppm correspondant aux protons d'un méthyle. La valeur déblindée du groupe méthylène à δ 4.57 ppm est révélatrice de la présence d'un atome d'oxygène adjacent à ce groupe. Deux multiplets à δ 3.67 ppm et à δ 1.87 ppm, ainsi qu'un triplet à δ 2.66 ppm ($J=7.8$ Hz, 2H) ont aussi été mis en évidence.

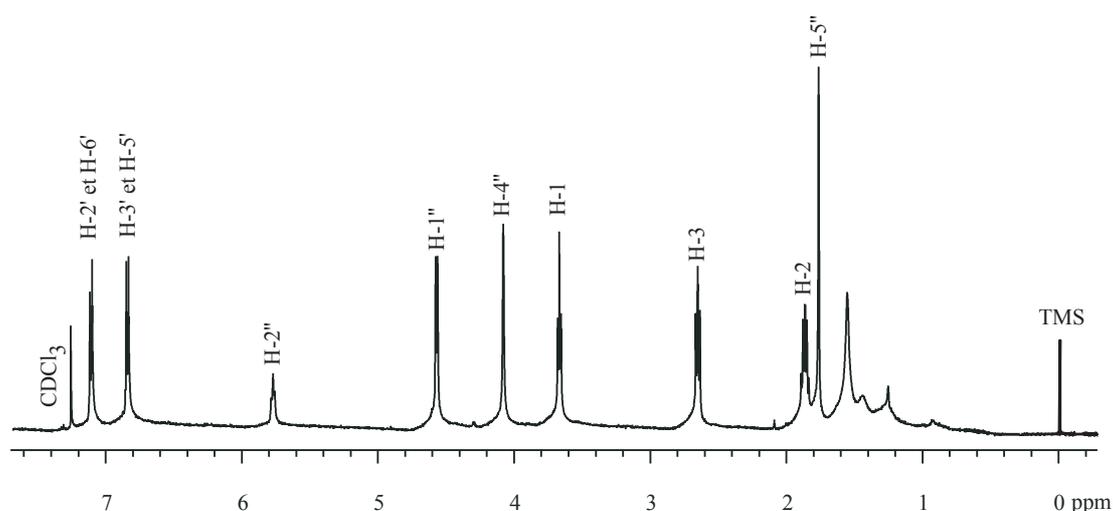


Figure 3.13 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé B.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Figure 3.14) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: quatre carbones aromatiques (4 CH), 5 CH_2 à δ 62.2, δ 34.3, δ 31.1, δ 64.2 et δ 67.8 ppm, 1 CH à δ 139.8 ppm, 3 carbones quaternaires à δ 156.8, δ 133.9 et δ 120.1 ppm, et 1 CH_3 à δ 13.9 ppm.

Par ailleurs, les 14 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_3$ correspondant à un poids moléculaire de 236 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

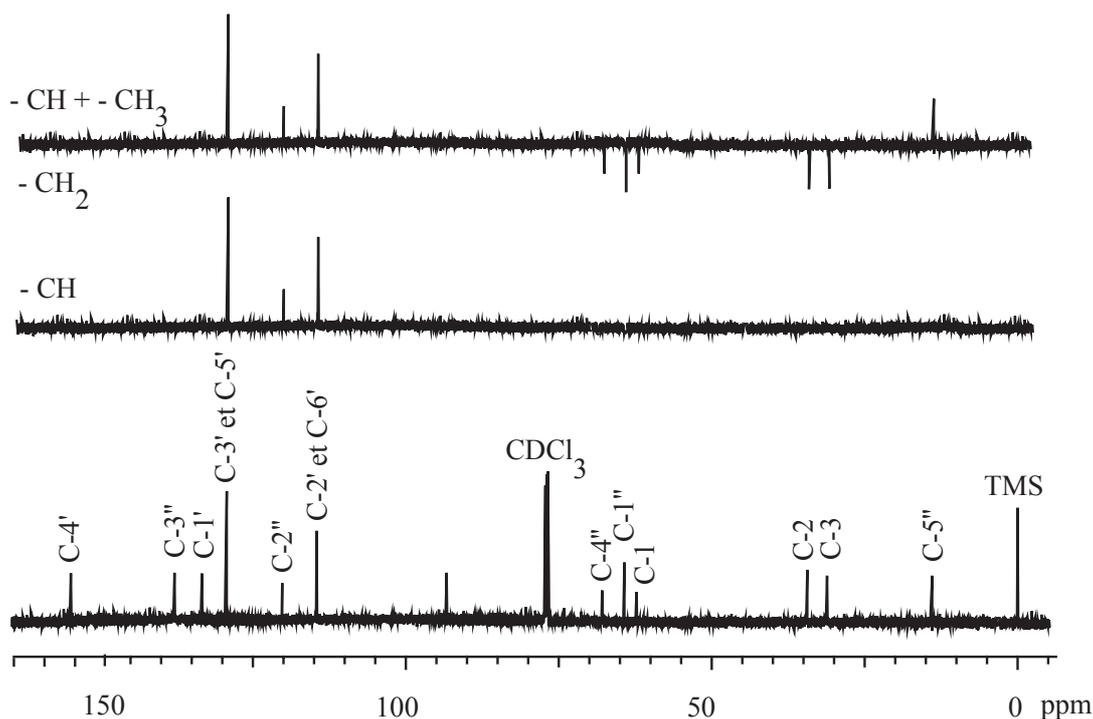


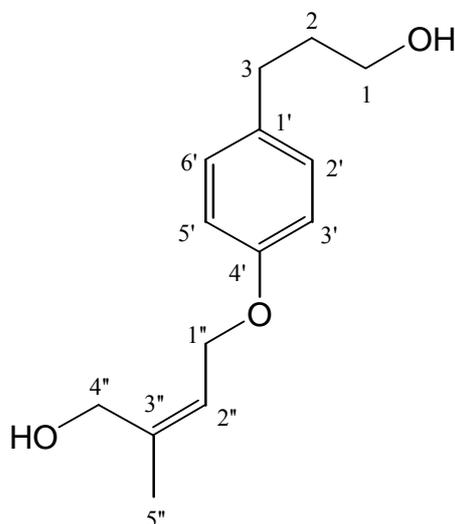
Figure 3.14- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) et sous-spectres DEPT du composé B

Comme pour le composé A, l'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations hétéronucléaires HSQC et HMBC et homonucléaire COSY. Ainsi, les quatre protons aromatiques, qui présentent entre eux un couplage dans l'expérience COSY, apparaissent sous forme de deux doublets intégrant chacun pour 2 H à δ 6.83 ppm ($J=8.3$ Hz) et 7.19 ppm ($J=8.3$ Hz), ce qui caractérise un système AA'XX'.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé B. Il a ainsi pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ 6.83 et 7.11 ppm étaient attachés aux CH respectivement situés à δ 129.2 et 114.5 ppm et que l'unité *O*-prényle était attaché au carbone quaternaire à δ 156.8 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance (HMBC) a montré les corrélations entre les protons à 3.67 ppm et le carbone situé à 133.9 ppm suggérant l'attachement d'un groupe propyle en C-1' ainsi que les corrélations entre les protons à 4.57 ppm et le carbone situé à 156.8 ppm confirmant la position de l'unité *O*-prényle sur le cycle.

Par comparaison des données de la littérature (Ishii *et al.*, 1982) avec ceux du composé **B**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **B**

Il s'agit du cuspidiol, un dérivé du phénylpropane qui fut isolé de l'écorce de *Fagara cuspidata* Engl. (Rutaceae) (Ishii *et al.*, 1982).

Composé C

Le composé **C** possédait des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles du composé **B**. Il se présentait sous forme de cristaux incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Son point de fusion est de 52-53 °C (non corrigé). Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à -9.5° dans le méthanol à une concentration de 0.1 mg/ml [littérature: $[\alpha]_D^{24}$: $-9,2^\circ$ dans le méthanol à une concentration de 0.22 mg/ml (Hsiao et Chiang, 1995)], indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 225 nm ($\log \varepsilon = 2.36$) et 279 nm ($\log \varepsilon = 2.44$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **C** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 238 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 153 $[M-85]^+$, à m/z 151 $[M-87]^+$, à m/z 134 $[M-104]^+$, à m/z 133 $[M-105]^+$, à m/z 121 $[M-117]^+$, à m/z 108 $[M-130]^+$ et à m/z 106 $[M-132]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 239 $[M+H]^+$ et 256 $[M+NH_4]^+$.

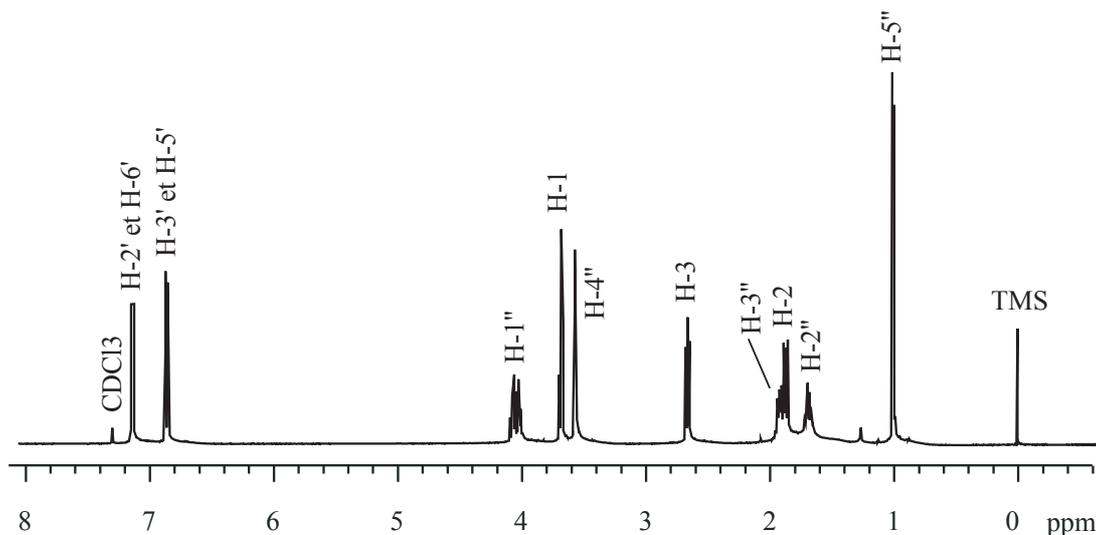


Figure 3.15 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **C**.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **C** (Fig. 3.15) a montré un profil relativement simple et a permis de mettre en évidence la présence de: quatre protons aromatiques à δ 6.83 ppm (d , $J=8.0$ Hz, 2H) et δ 7.01 ppm (d , $J=8.0$ Hz, 2H) dans la région des bas champs, dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*, une unité *O*-prényle est visible avec deux multiplets à δ 4.01 ppm et δ 1.69 ppm, un doublet à δ 3.54 ppm ($J=5.8$ Hz, 2H) correspondant aux protons du méthylène et un multiplet à δ 0.99 ppm correspondant aux protons d'un groupe méthyle. La valeur déblindée du groupe méthylène à δ 4.01 ppm est révélatrice de la présence d'un atome d'oxygène adjacent à ce groupe. Deux multiplets à δ 3.65 ppm et δ 1.88 ppm, ainsi qu'un triplet à δ 2.66 ppm ($J=8,0$ Hz, 2H) ont aussi été mis en évidence.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Fig. 3.16) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: quatre carbones aromatiques (4 CH), 6 CH_2 à δ 62.2, δ

34.5, δ 31.1, δ 66.2, δ 32.9 et δ 67.9 ppm, 2 carbones quaternaires à δ 157.1 et δ 134.0 ppm, 1 CH à δ 33.3 ppm et 1 CH₃ à δ 16.9 ppm.

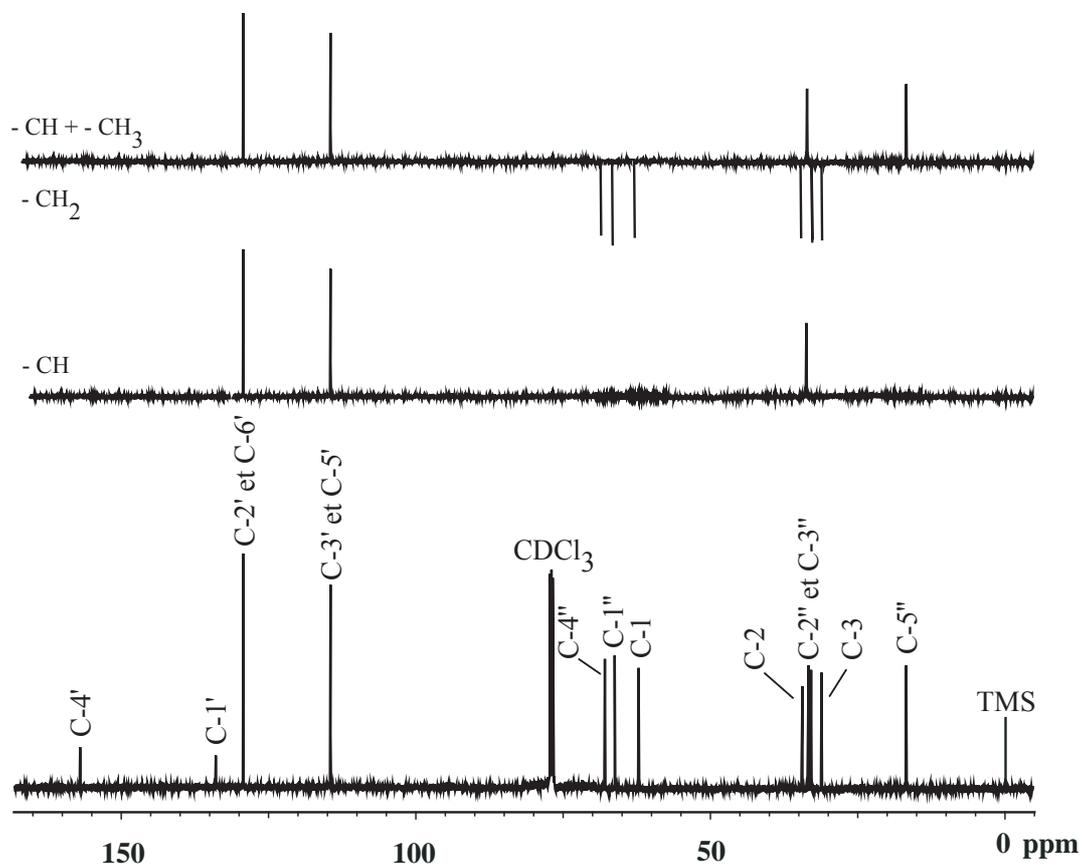
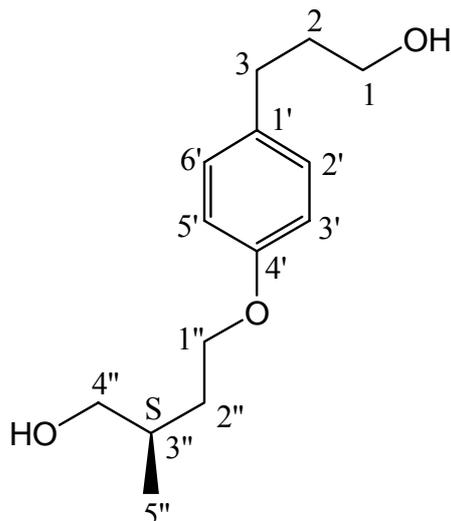


Figure 3.16- Spectre ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃) et sous-spectres DEPT du composé C

Par ailleurs, les 14 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute C₁₄H₂₂O₃ correspondant à un poids moléculaire de 238 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

Comme pour le composé **B**, l'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations hétéronucléaires HSQC et HMBC et homonucléaires COSY.

Par comparaison des données de la littérature (Ishii *et al.*, 1982 ; Hsiao et Chiang, 1995) avec ceux du composé **C**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **C**

Il s'agit du dihydrocuspidiol, un dérivé synthétisé à partir du cuspidiol (Ishii *et al.*, 1982) et qui fut aussi isolé de *Aralia bipinnata* L. (Araliaceae), (Hsiao et Chiang, 1995). La stéréochimie du composé **C** a pu être établie grâce à la comparaison de son pouvoir rotatoire mesuré avec celui de la littérature (Hsiao et Chiang, 1995).

Composé **D**

Le composé **D** possédait des données physico-chimiques et spectrales qui se rapprochent de celles des composés **B** et **C**. Il se présentait sous forme d'une huile incolore miscible avec le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 225 nm ($\log \epsilon = 2.36$) et 275 nm ($\log \epsilon = 2.40$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **D** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 220 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 151 $[M-69]^+$, à m/z 106 $[M-114]^+$ et à m/z 69 $[M-151]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 221 $[M+H]^+$ et 238 $[M+NH_4]^+$.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **D** (Fig. 3.17). a permis de mettre en évidence la présence de: quatre protons aromatiques à δ 6.87 ppm (*d*, $J=8.79$ Hz, 2H) et δ 7.15 ppm (*d*, $J=8.79$ Hz, 2H) dans la région des bas champs, dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*. Une unité *O*-prényle est visible avec deux multiplets à δ 4.45 ppm et δ 5.55 ppm correspondant aux protons des groupements méthylènes, deux singlets à δ 1.83 et δ 1.88 ppm, intégrant chacun pour trois protons et correspondant aux protons des groupes méthyles. La valeur déblindée du groupe méthylène à δ 4.45 ppm est révélatrice de la présence d'un atome d'oxygène adjacent à ce groupe. Deux multiplets à δ 3.63 ppm et δ 1.88 ppm, ainsi qu'un triplet à δ 2.63 ppm ($J=7.33$ Hz, 2H) ont aussi été mis en évidence.

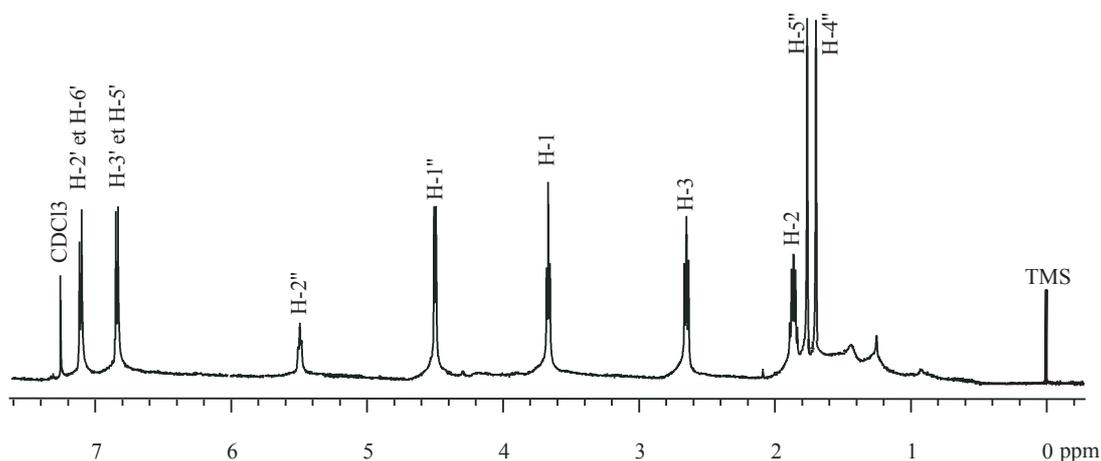


Figure 3.17 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **D**.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Fig. 3.18) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: quatre carbones aromatiques (4 CH), 4 CH_2 à δ 62.9, δ 35.1, δ 31.8 et δ 65.4 ppm, deux carbones quaternaires à δ 157.7 et δ 134.4 ppm, deux signaux à δ 129.9 et δ 115.2 ppm représentant chacun une paire de carbones magnétiquement équivalents et deux signaux à δ 26.5 ppm correspondant aux méthyles.

Par ailleurs, les 14 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $C_{14}H_{20}O_2$ correspondant à un poids moléculaire de 220 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

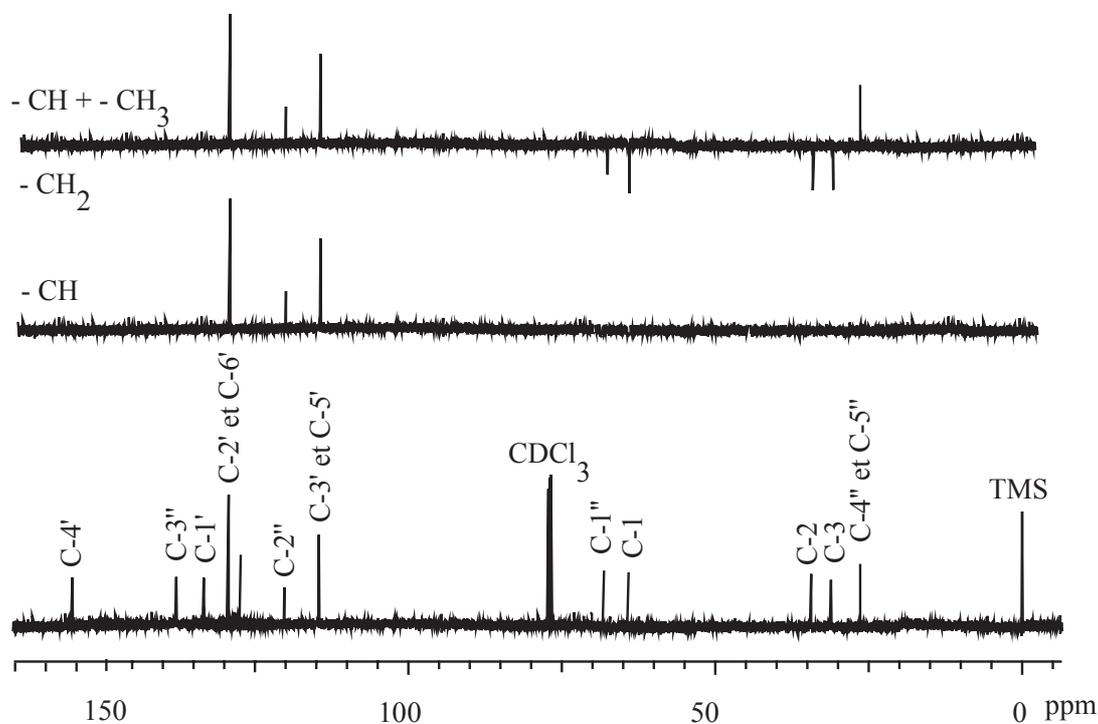
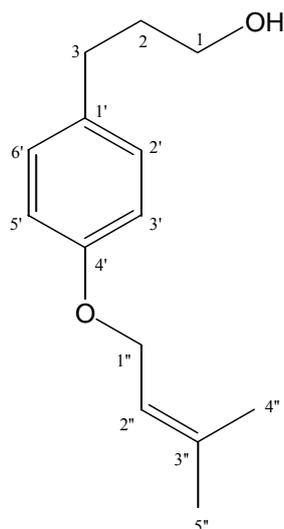


Figure 3.18- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$) et sous-spectres DEPT du composé **D**.

Comme pour les composés **B** et **C**, l'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations hétéronucléaires HSQC et HMBC et homonucléaires COSY.

Par comparaison des données de la littérature (Reisch *et al.*, 1989) avec ceux du composé **D**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **D**

Il s'agit du 4'-O-(3''-méthylbut-2''-enyloxy)-3-phénylpropanol, un dérivé du phénylpropane, préalablement isolé de l'écorce de *Flindersia australis* Br., R. (Rutaceae) (Reisch *et al.*, 1989).

3.2.6.3. Détermination de structure des composé **E–F**

Composé **E**

Les composés **E** se présentait sous forme de cristaux incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait quatre maxima à 215 nm ($\log \varepsilon = 2.25$), 235 nm ($\log \varepsilon = 2.46$), 290 nm ($\log \varepsilon = 3.04$) et 325 nm ($\log \varepsilon = 3.41$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **E** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 247 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 190 $[M-57]^+$, à m/z 175 $[M-72]^+$, à m/z 145 $[M-102]^+$ et à m/z 117 $[M-130]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 248 $[M+H]^+$ et 265 $[M+NH_4]^+$.

L'analyse du spectre infra-rouge du composé **E** a montré la présence de bandes possédant un ν_{\max} à 3326, 2961, 1652 et 1540 cm^{-1} , suggérant la présence d'une fonction amide dans ce composé.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **E** (Figure 3.19) a permis de mettre en évidence les signaux à δ 3.22 ppm, intégrant pour 2 protons, deux multiplets à δ 1.87 et 0.95 ppm, intégrant respectivement pour 1 proton et 6 protons, indiquant la présence d'une fonction isobutylamide dans le composé **E** (Su et Horvat, 1981). Par ailleurs, d'autres signaux à δ 6.35 ppm (d , $J=15.6$ Hz) et δ 7.53 ppm (d , $J=15.6$ Hz), intégrant chacun pour 1 proton et dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une configuration *trans* pour la paire de protons oléfiniques (Greger et Hofer, 1987 ; Bauer *et al.*, 1989) ont aussi été mis en évidence. L'analyse de ce spectre a permis également de mettre en évidence la présence de trois protons aromatiques formants des doublets à δ 6.97 ($J=1.95$ Hz), δ 6.94 ($J=8.20$ Hz) et δ 6.75 ($J=15.6$ Hz) ppm dont les constantes de couplage indiquent que les protons à plus hauts champ sont en position *ortho* (H-5,6), tandis que le plus déblindé (H-2) est en position *mé*ta par rapport à H-6 et *para* par rapport à H-5. Un singulet à δ 5.95 ppm (2 protons) caractéristique du groupe méthylène-dioxy a aussi été observé.

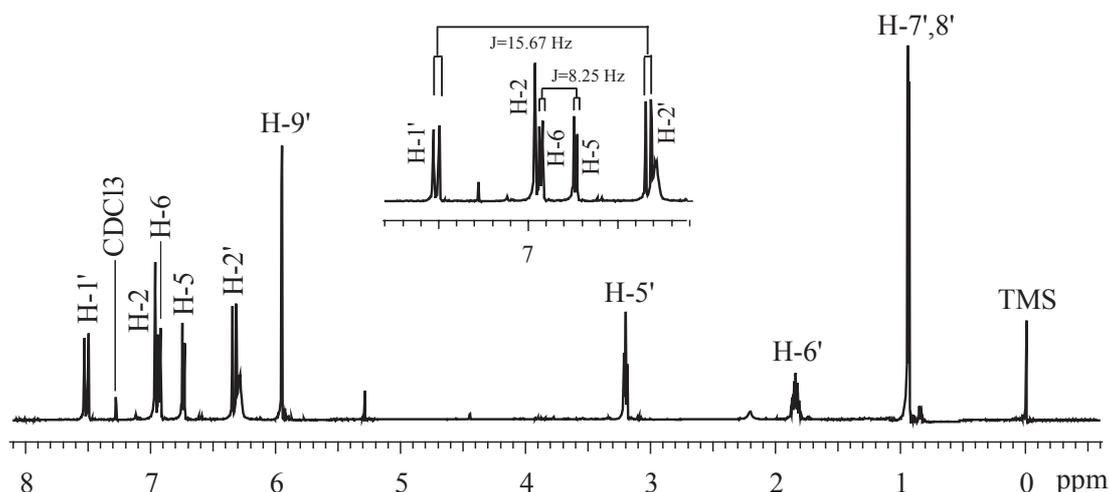


Figure 3.19 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **E**.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Figure 3.21) du composé **E** a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: six carbones aromatiques (3 CH, 3 carbones quaternaires), un signal à δ 101.2 ppm correspondant au groupe méthylène-dioxy, un signal à δ 166.2 ppm, un déplacement à bas champs attribuable au groupe carbonyle de la fonction amide, des signaux à δ 140.2 et à δ 119.0 ppm, des déplacements à bas champs attribuable au groupement alcène, 1 CH_2 à δ 47.0 ppm, proche d'un atome d'azote. On y observe également des méthyles à δ 28.5 et δ 20.1 ppm.

Par ailleurs, les 14 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ correspondant à un poids moléculaire de 247 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

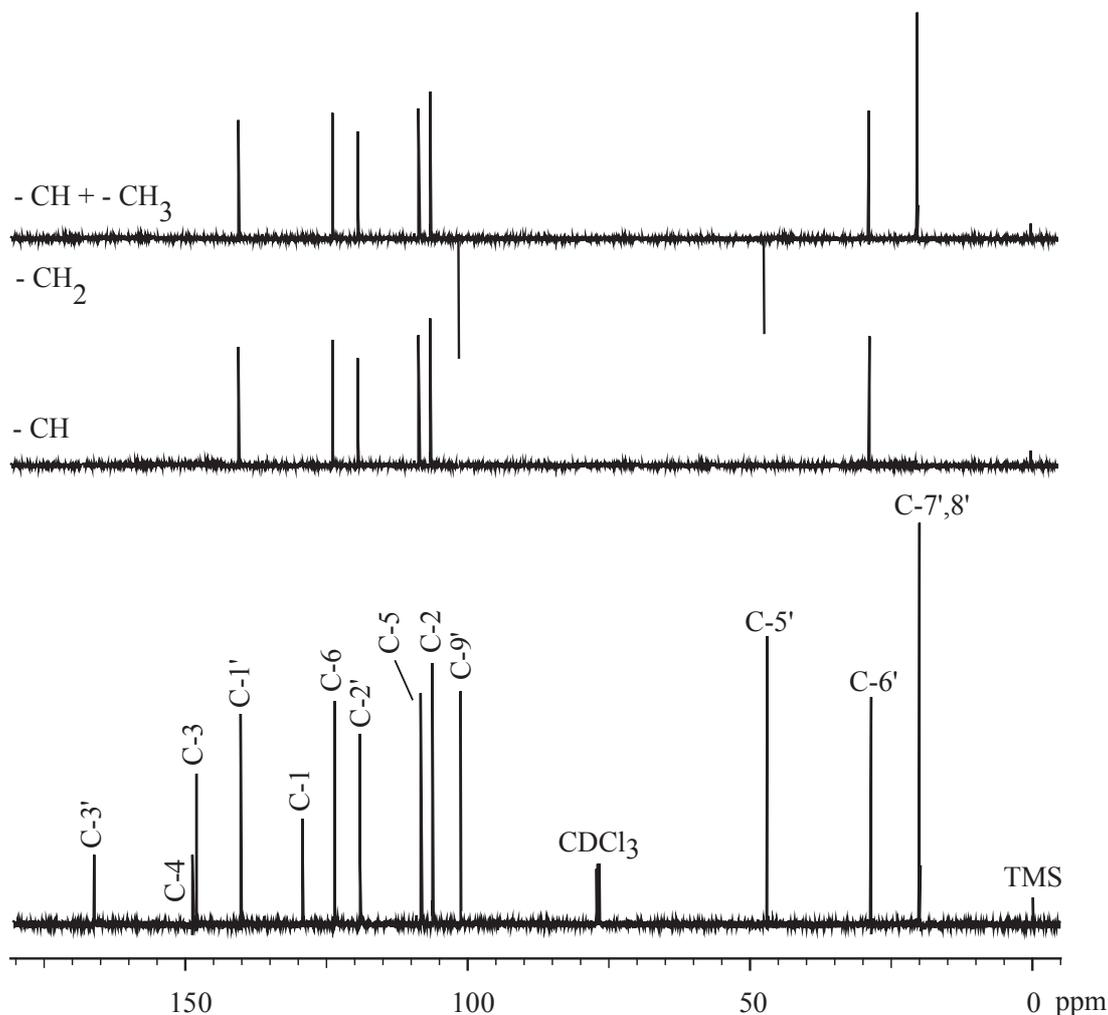


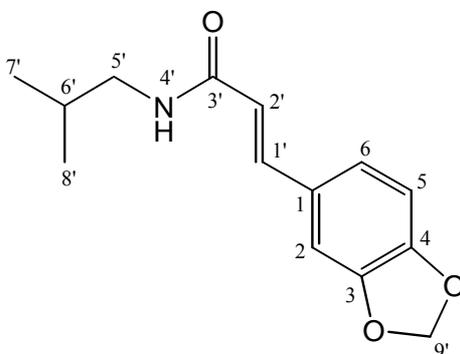
Figure 3.21- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) et sous-spectres DEPT du composé **E**.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC a conduit à l'établissement des connexions géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé **E**. Il a ainsi pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ 6.97, 6.94 et 6.75 ppm étaient attachés aux CH respectivement situés à δ 106.2, 123.5 et 108.3 ppm et que le groupement isobutylamide était attaché au carbone de l'alcène à δ 119.0 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance (HMBC) a montré la corrélation existant entre le proton à 6.35 ppm et le carbone situé à 129.2 ppm suggérant l'attachement d'une fonction alcène au carbone C-1, suivi de la fonction isobutylamide.

Par comparaison des données de la littérature (Paris et Moyse-Mignon, 1951 ; Okorie, 1976) avec ceux du composé **E**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **E**

Le composé **E** est ainsi la *trans*-fagaramide, préalablement isolé de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler et d'autres espèces du genre *Zanthoxylum* (Paris et Moyse-Mignon, 1951 ; Adesina, 1986). Ce composé est connu pour son faible activité antimalariale, ainsi que pour ses propriétés insecticides (Weenen *et al.*, 1990). L'action antiinflammatoire de la fagaramide fut aussi démontrée, il semblerait que ce produit agit en inhibant la synthèse des prostaglandines (Oriowo, 1982).

Composé F

Les composés **F** se présentait sous forme de cristaux incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait quatre maxima à 215 nm ($\log \varepsilon = 2.25$), 235 nm ($\log \varepsilon = 2.46$), 290 nm ($\log \varepsilon = 3.04$) et 325 nm ($\log \varepsilon = 3.41$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **F** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 247 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 190 $[M-57]^+$, à m/z 175 $[M-72]^+$, à m/z 145 $[M-102]^+$ et à m/z 117 $[M-130]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 248 $[M+H]^+$ et 265 $[M+NH_4]^+$.

L'analyse du spectre infra-rouge du composé **F** a montré la présence de bandes possédant un ν_{\max} à 3326, 2961, 1652 et 1540 cm^{-1} , suggérant la présence d'une fonction amide dans ce composé.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **F** (Figure 3.20) a permis de mettre en évidence les mêmes signaux que pour le composé **E**, à savoir un multiplet à δ 3.10 ppm, intégrant pour 2 protons, deux multiplets à δ 1.75 et 0.83 ppm, intégrant respectivement pour 1 proton et 6 protons, indiquant la présence d'une fonction isobutylamide dans le composé **F** (Su et Horvat, 1981). Par ailleurs, d'autres signaux à δ 5.88 ppm (d , $J=15.6$ Hz) et δ 6.63 ppm (d , $J=12.3$ Hz), intégrant chacun pour 1 proton et dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une configuration *cis* pour la paire de protons oléfiniques (Greger et Hofer, 1987 ; Bauer *et al.*, 1989) ont aussi été mis en évidence. L'analyse de ce spectre a permis également de mettre en évidence la présence de trois protons aromatiques formants des doublets à δ 7.11 ($J=1.95$ Hz), δ 6.93 ($J=8.30$ Hz) et δ 6.76 ($J=8.3$ Hz) ppm dont les constantes de couplage indiquent que les protons à plus hauts champ sont en position *ortho* (H-5,6), tandis que le plus déblindé (H-2) est en position *méta* par rapport à H-6 et *para* par rapport à H-5. Un singulet à δ 5.98 ppm (2 protons) caractéristique du groupe méthylène-dioxy a aussi été observé.

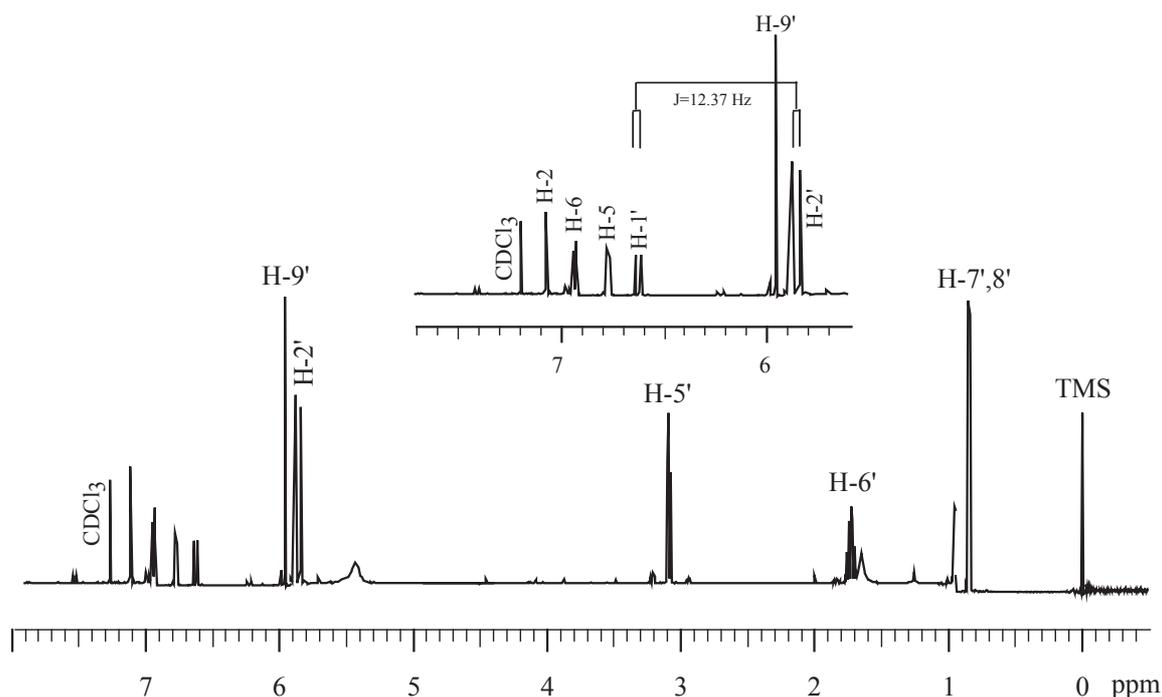


Figure 3.20 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé F.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Figure 3.21) du composé **F** a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: six carbones aromatiques (3 CH, 3 carbones quaternaires), un signal à δ 101.2 ppm correspondant au groupe méthylène-dioxy, un signal à δ 166.2 ppm, un déplacement à bas champs attribuable au groupe carbonyle de la fonction amide, des signaux à δ 140.2 et à δ 119.0 ppm, des déplacements à bas champs attribuables au groupement alcène, 1 CH_2 à δ 47.0 ppm, proche d'un atome d'azote. On y observe également des méthyles à δ 28.5 et δ 20.1 ppm.

Par ailleurs, les 14 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ correspondant à un poids moléculaire de 247 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

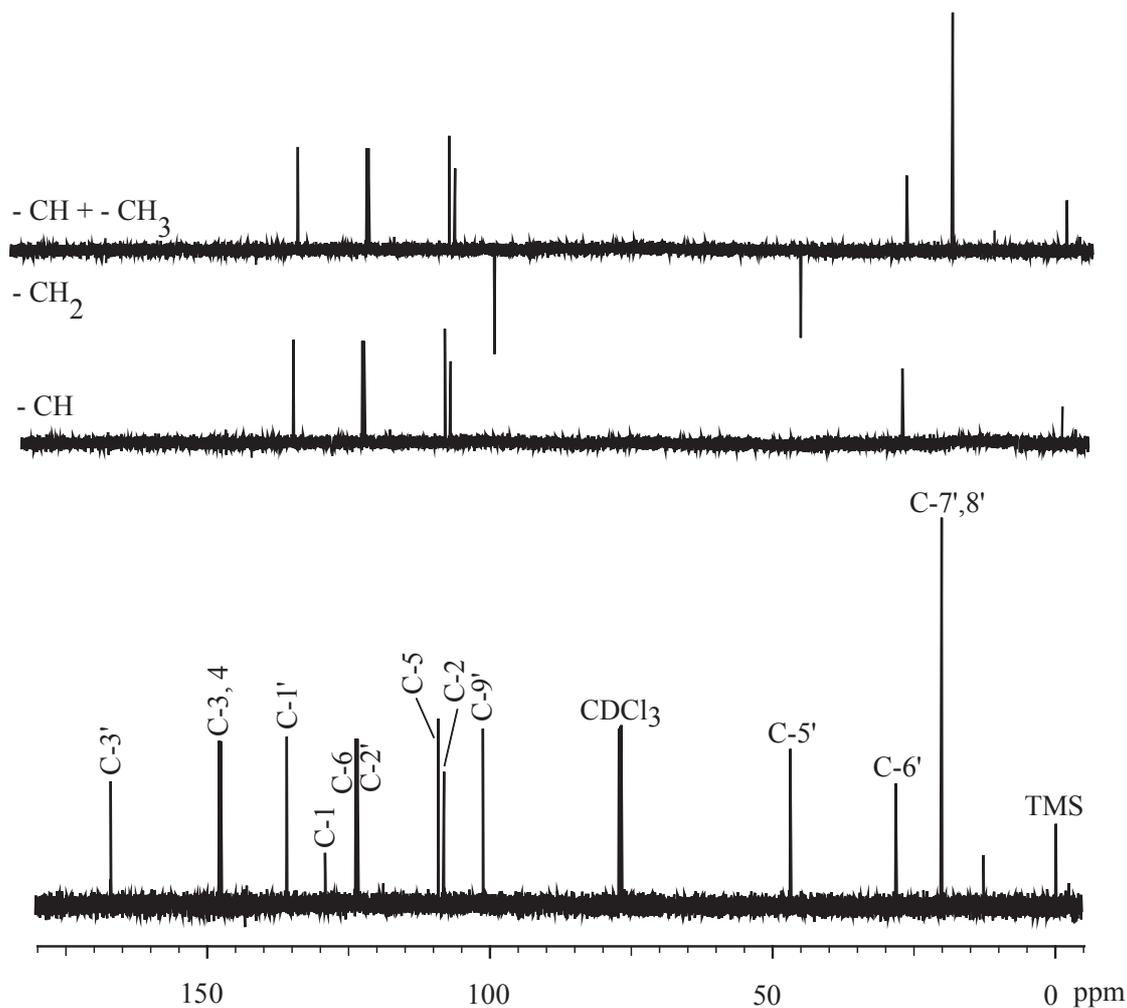
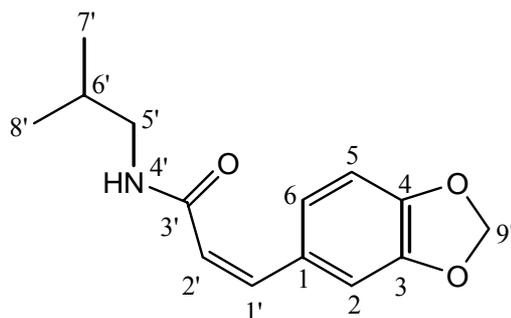


Figure 3.22- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) et sous-spectres DEPT du composé **F**.

Cette analyse nous permet de constater que les composés **E** et **F** sont des isomères qui ne diffèrent que par la configuration relative de la double liaison.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC. Comme pour le composé **E**, les mêmes remarques sont valables pour le composé **F**.

Par comparaison des données de la littérature (Paris et Moysse-Mignon, 1951 ; Okorie, 1976) avec ceux du composé **F**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **F**

Le composé **F** est ainsi la *cis*-fagaramide, ce composé n'a jamais été isolé de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler. La faible quantité obtenue pour ce produit indique qu'il y a probablement une transformation de la forme *cis* en forme *trans* dans la plante (Okorie, 1976).

3.2.6.4. Détermination de structure des composé **G**

Le composé **G** se présente sous forme de cristaux jaunes solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Son point de fusion est de 122-124°C (non corrigé). Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à + 73° dans le chloroforme à une concentration de 0.1 mg/ml [littérature: $[\alpha]_D^{20}$: + 40,3° dans le chloroforme à une concentration de 0.3 mg/ml (He *et al.*, 2002)], indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 245 nm ($\log \varepsilon = 3.75$) et 286 nm ($\log \varepsilon = 3.86$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **G** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 354 $[M]^+$, un ion à m/z 323 $[M-31]^+$ qui peut résulter de la perte d'un groupe méthoxyle, ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 355 $[M+H]^+$ et 372 $[M+NH_4]^+$.

La mesure des spectres ^1H -RMN (Figure 3.23) et ^{13}C -RMN (Figure 3.24) a montré une évidente symétrie dans la molécule. En effet, les signaux étaient soit superposés, soit très proches. L'étude de l'intégration du spectre RMN du proton nous a indiqué le nombre de protons présents dans la molécule, et le nombre de signaux dans le spectre RMN du carbone nous ont conduit à la formule brute suivante : $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ correspondant à un poids moléculaire de 354 uma.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **G** a permis de mettre en évidence la présence de: six protons aromatiques formants des multiplets (δ 6.76 et δ 6.84 ppm) correspondant à deux systèmes ABC superposés avec des couplages *ortho*, *mé*ta et *ortho-mé*ta, un singulet à δ 5.94 ppm (4 protons) caractéristique de deux groupes méthylène-dioxy et la présence de huit protons de type oléfinique, proches ou non d'un atome d'oxygène.

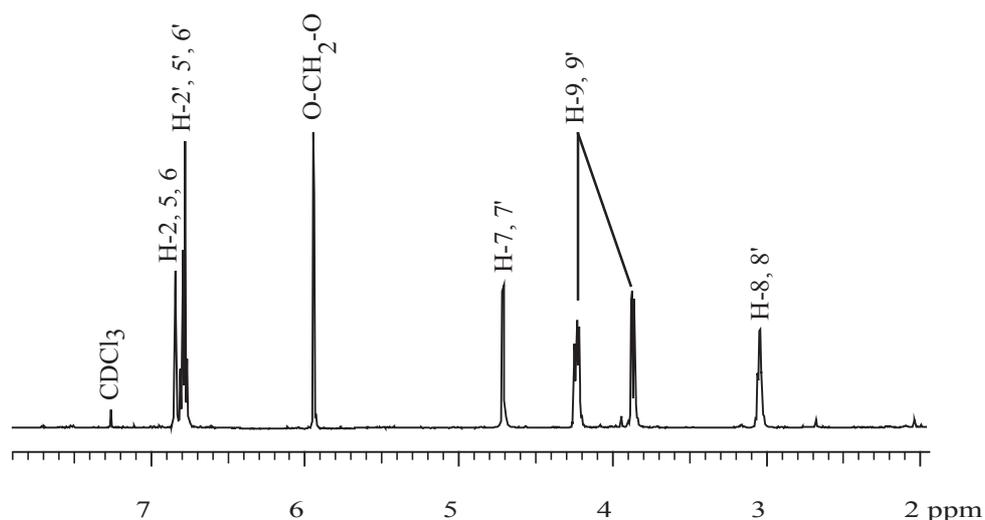


Figure 3.23 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **G**.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi: douze carbones aromatiques (6 CH, 6 carbones quaternaires), 2 CH_2 à δ 101.04 ppm correspondant aux deux groupes méthylène-dioxy, 2 CH de type oléfinique à δ 85.78 ppm proches d'un atome d'oxygène chacun, 2 CH_2 à δ 71.70 ppm et possédant les mêmes propriétés et 2 CH à δ 54.33 ppm.

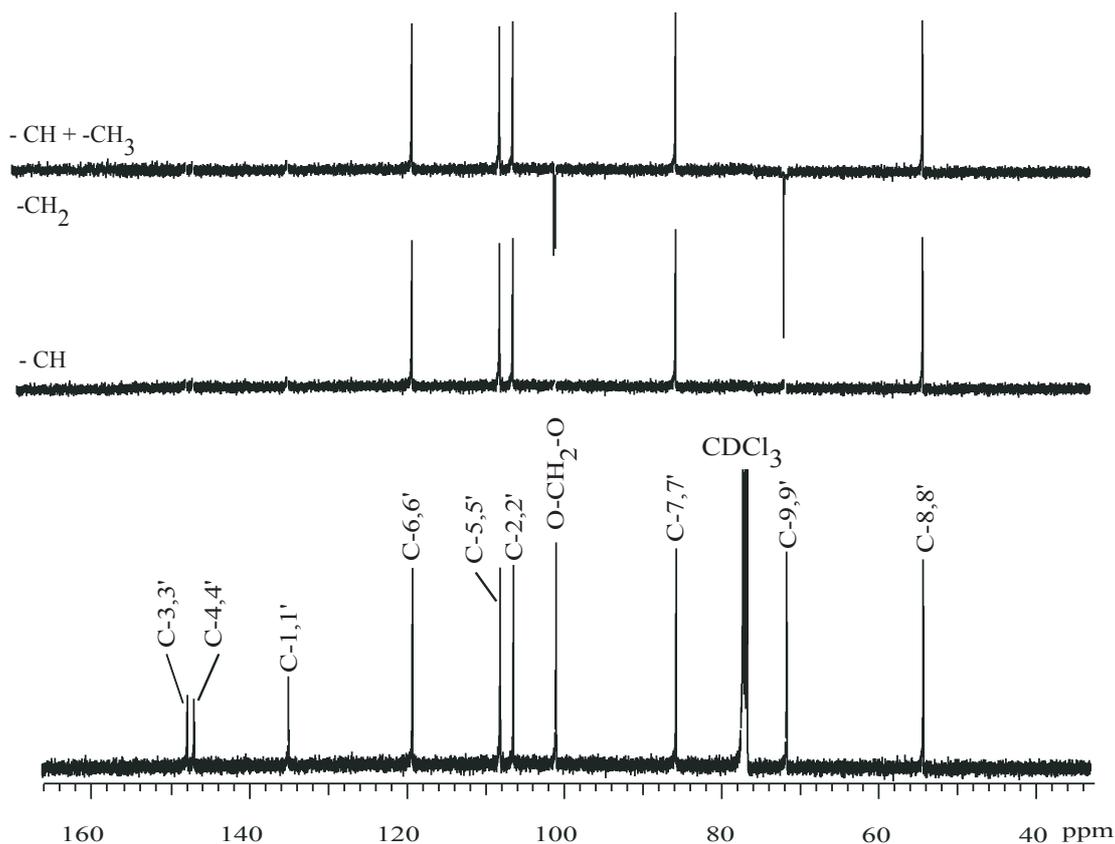
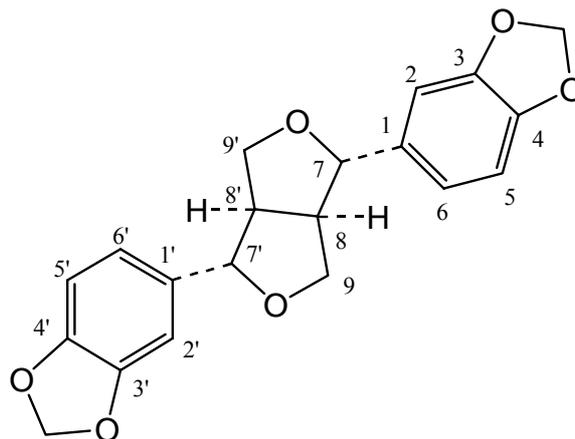


Figure 3.24- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) et sous-spectres DEPT du composé **G**.

Toutes ces données structurales nous ont amenés à penser à la présence d'un lignane, appellation donnée à la structure formée biosynthétiquement par la condensation de deux groupes phénylpropanes. La comparaison des données RMN ^{13}C (Agrawal et Thakur, 1985) avec ceux du composé **G** a permis d'établir la configuration $2\alpha,6\alpha$ -diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane et, par comparaison avec les données de la littérature (Abe *et al.*, 1974), la structure suivante a été attribuée au composé **G**:



Structure du composé **G**

Il s'agit de la sésamine, l'un des lignanes les plus connus. C'est un constituant de l'huile de sésame (Hegnauer, 1969), qui peut exister dans la nature sous deux formes énantiomériques. Par comparaison du $[\alpha]_D^{20}$ de littérature avec celui mesuré (He *et al.*, 2002), le composé **G** est la (+)-sésamine, préalablement isolée par Priess en 1909 de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Kerharo et Adam 1974). La (-)-sésamine est aussi très répandue, on la trouve en l'occurrence chez *Zanthoxylum piperitum* D.C. (Abe *et al.*, 1974).

3.2.6.5. Détermination de structure des composé **H**

Le composé **H** se présente sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à -135° dans le chloroforme à une concentration de 0.1 mg/ml, indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule. Le spectre d'absorption UV est voisin de celui de la dihydrochélérythrine avec quatre maxima à 225 nm ($\log \epsilon = 2.36$), 245 nm ($\log \epsilon = 2.57$), 285 nm ($\log \epsilon = 2.99$), 355 nm ($\log \epsilon = 3.67$) et un épaulement à 325 nm ($\log \epsilon = 3.41$) qui sont caractéristiques des benzophénanthridines oxygénées en 2, 3, 7 et 8 (Chen *et al.*, 1994).

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **H** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 405 $[M]^+$, un ion majoritaire à m/z 348 $[M-57]^+$ qui résulte de la perte

du groupe ($\text{CH}_3\text{COCH}_2-$), ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Cette fragmentation est caractéristique des benzophénanthridines substituées en 6 (Decaudain *et al.*, 1974 ; Perez Gutierrez *et al.*, 2002). Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 406 $[\text{M}+\text{H}]^+$ et 423 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **H** (Figure 3.25) a permis de mettre en évidence la présence d'un singulet à δ 2.64 ppm, intégrant pour 3 protons correspondant au groupement N-méthyle, deux singulets à δ 3.92 et 3.95 ppm, intégrant chacun pour 3 protons, caractéristiques de deux groupements méthoxyle, ainsi qu'un singulet à δ 6.04 ppm (2 protons) caractéristique d'un groupe méthylène-dioxy. Deux paires de protons aromatiques apparaissant sous forme de deux paires de doublets à δ 6.95, 7.53 ppm (1 H chacun, $J=8.6$ Hz) et à δ 7.47, 7.71 ppm (1 H chacun, $J=9.1$ Hz), dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*, ainsi que deux singulets à δ 7.51 et δ 7.11 ppm, intégrant chacun pour un proton et correspondant à des protons aromatiques, sont aussi visibles sur ce spectre. Par ailleurs, les signaux observés à δ 2.27 (*d*, $J=9.5$ Hz, 1H), δ 2.60 (*t*, $J=4.5$ et 9.5 Hz, 1H), δ 2.63 (*s*, 3H) et δ 5.03 (*d*, $J=9.5$ Hz, 1H) ppm indiquent que le groupe fixé en position 6 est $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$.

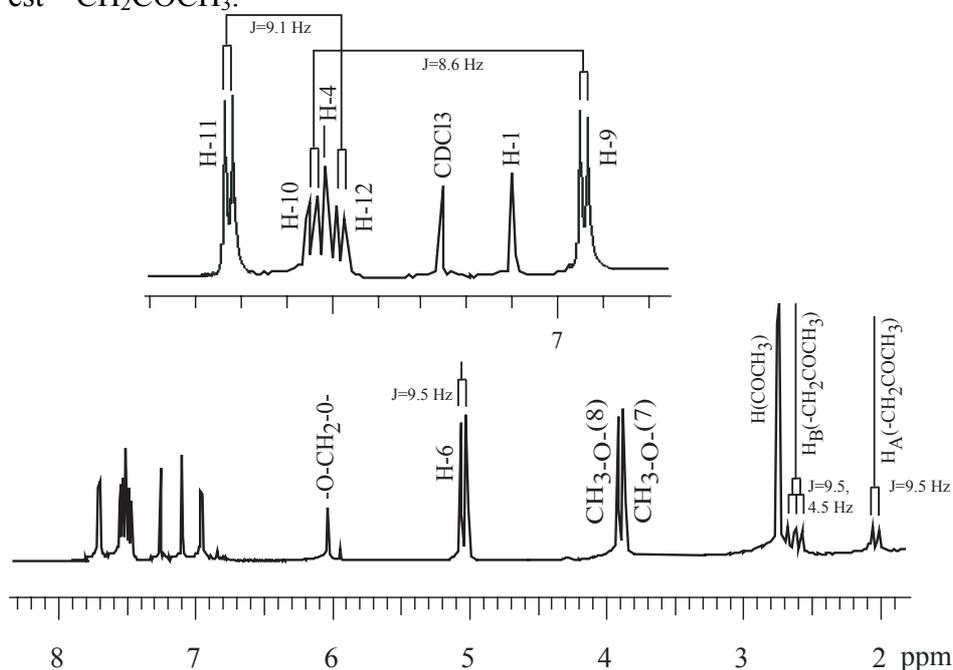


Figure 3.25 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **H**.

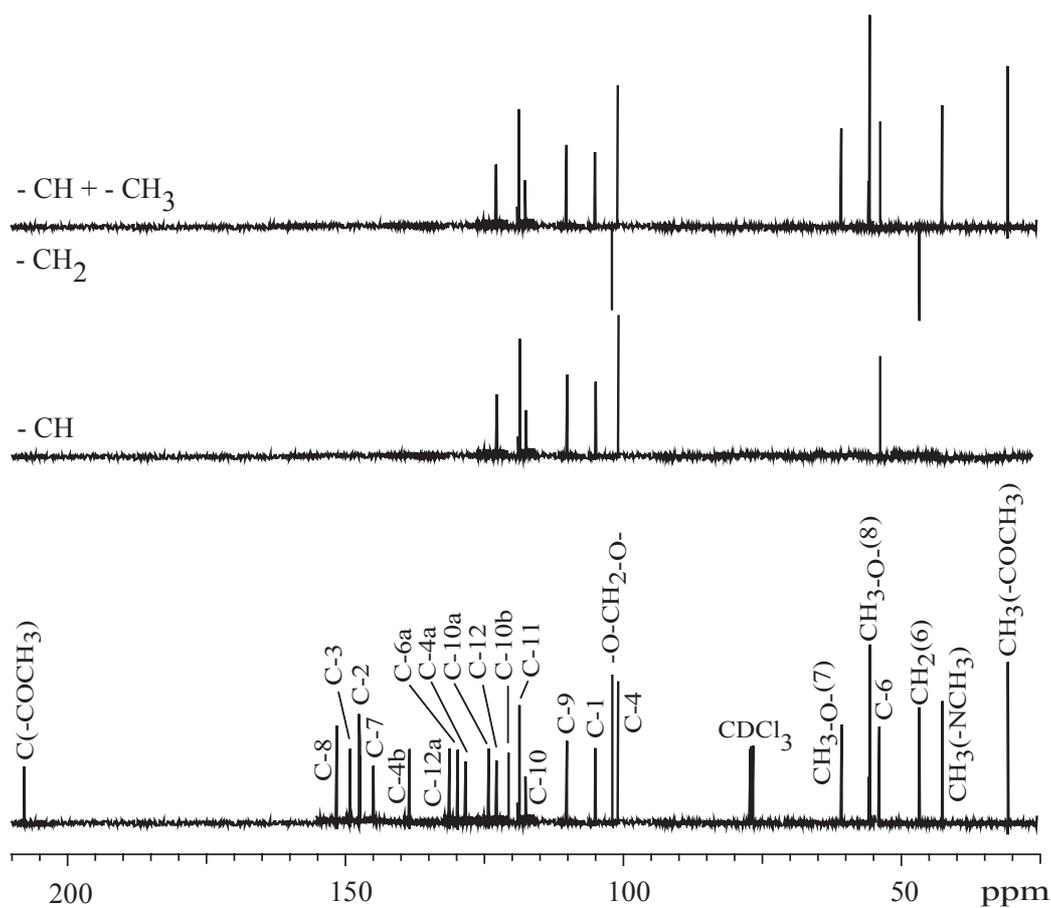


Figure 3.26- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) et sous-spectres DEPT du composé H.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Figure 3.26) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: un signal à $\delta 208$ ppm, un déplacement à bas champs attribuable à un groupe carbonyle d'une fonction aldéhyde ou cétone (Vollhardt, 1990), seize carbones aromatiques (6 CH, 10 carbones quaternaires), 1 CH_2 à $\delta 101.0$ ppm correspondant au groupe méthylène-dioxy, 1 CH_2 à $\delta 46.8$ ppm, 1 CH de type oléfinique à $\delta 54.8$ ppm proche d'un atome d'azote (N-CH_3). On y observe également des signaux à $\delta 42.8$ et $\delta 31.1$ ppm, relatifs respectivement aux méthyles du N-CH_3 et $-\text{COCH}_3$, ainsi que deux méthoxyles à $\delta 60.9$ et $\delta 55.7$ ppm.

Par ailleurs, les 24 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ correspondant à un poids moléculaire de 405 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

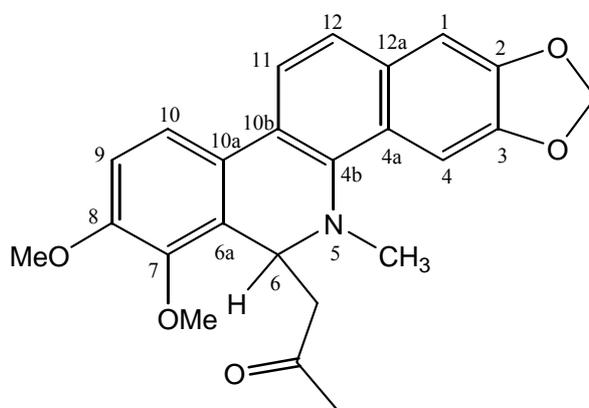
L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et NOESY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé **H**. Il a ainsi pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ 6.95, δ 7.11, δ 7.51 et δ 7.13 ppm étaient attachés aux CH respectivement situés à δ 111.4, δ 104.3, δ 100.6 et δ 118.7 ppm et que le groupement $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ était attaché au carbone tertiaire à δ 54.8 ppm.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance (HMBC) a montré les corrélations entre les protons à 5.03 ppm et le carbone situé à 42.8 ppm suggérant l'attachement d'un groupe N-CH₃ en C-5 ainsi que les corrélations entre les protons à δ 2.60 ppm et le carbone situé à δ 54.8 ppm d'une part, et les corrélations entre les protons à δ 2.27 ppm et le carbone situé à δ 208.0 ppm d'autre part, confirmant ainsi la position du groupement $-\text{CH}_2\text{COCH}_3$ en position 6.

L'emplacement des groupements méthoxyles en C-7 et C-8 a été déterminé grâce à des corrélations homonucléaires NOESY observées entre les protons du méthoxyle en C-8 et ceux attachés en position 9 d'une part, et celles observées entre les protons de ces deux fonctions d'autre part.

Par comparaison des données de la littérature (Decaudain *et al.*, 1974 ; Martinez *et al.*, 2002) avec ceux du composé **H**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **H**

Il s'agit du 6-acétonyldihydrochélérythrine, un alcaloïde appartenant au groupe des benzophénanthridines. Ainsi, Decaudain *et al.* (1974) ont isolé ce composé des écorces de *Zanthoxylum tsihanimposa* H. Perr., de *Toddalia aculeata* Juss. et de *Bocconia arborea* L. Chou *et al.* (1977) ont entrepris la synthèse de cette substance à partir de la chélérythrine.

Pendant longtemps, ce composé fut considéré comme un artéfact, obtenu lors de l'extraction du matériel végétal par réaction de l'acétone avec la chélérythrine pour former l'acétonyldihydrochélérythrine Chou *et al.* (1977). Martinez *et al.* (2002) ont démontré que ce composé peut être un artéfact et également un véritable produit naturel existant dans la nature sous forme racémique (RS).

3.2.6.6. Détermination de structure des composé **I–J**

Composé **I**

Le composé **I** se présente sous forme de cristaux incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait un maximum à 258 nm ($\log \epsilon = 2.71$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **I** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 223 $[M]^+$, un ion à m/z 208 $[M-15]^+$ qui peut résulter de la perte d'un groupe méthyle, ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 224 $[M+H]^+$ et 241 $[M+NH_4]^+$.

L'analyse du spectre infra-rouge du composé **I** a montré la présence de bandes possédant un ν_{max} à 3298, 2990, 1656 et 1540 cm^{-1} , suggérant la présence d'une fonction amide dans ce composé et de bandes possédant un ν_{max} à 1630 et 995 cm^{-1} , caractéristiques des doubles liaisons de type oléfinique.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **I** (Figure 3.27) a permis de mettre en évidence: un signal à δ 3.13 ppm (*t*, $J=14.5$ et 6.8 Hz), intégrant pour 2 protons, deux multiplets à δ 1.90 et 0.96 ppm, intégrant respectivement pour 1 proton et 6 protons, indiquant la présence d'une unité isobutylamide dans le composé **I** (Su et Horvat, 1981). Par ailleurs, d'autres signaux à δ 5.83 (*d*, $J=15.6$ Hz) ppm, δ 7.15 (*dd*, $J=15.6$ et 11.8 Hz) ppm, δ 6.10 (*t*, $J=15.6$ et 11.8 Hz) ppm et δ 6.05 (*t*, $J=15.6$ et 11.8 Hz) ppm, intégrant chacun pour 1 proton et dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une configuration *trans-trans* pour chaque paire de protons oléfiniques (Greger et Hofer, 1987 ; Bauer *et al.*, 1989) ont aussi été mis en évidence. L'analyse de ce spectre a permis également de mettre en évidence des signaux à δ 2.05, δ 1.95, δ 1.35, δ 1.40 et δ 0.95 ppm, caractéristiques d'une chaîne aliphatique.

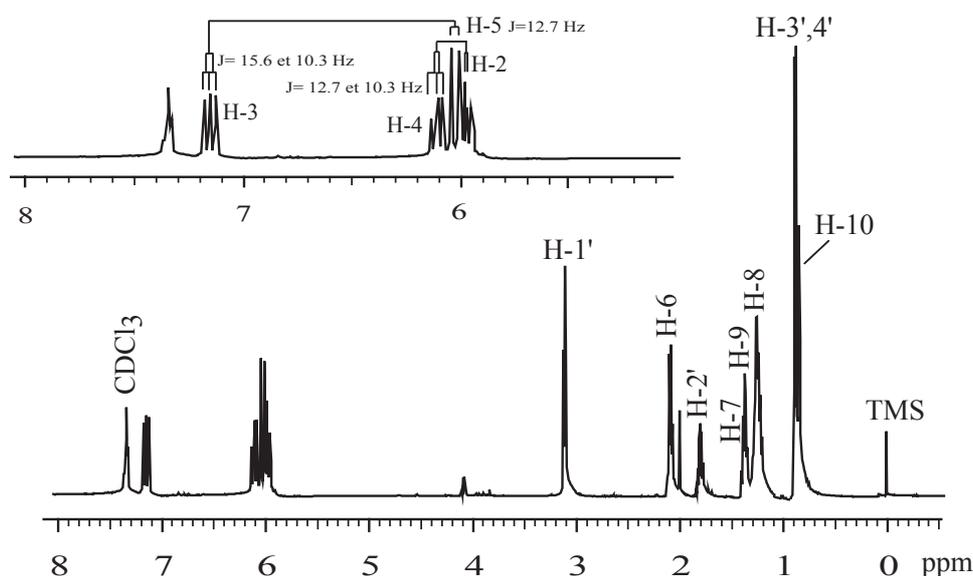


Figure 3.27 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **I**.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Figure 3.28) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: un signal à δ 166.6 ppm, un déplacement à bas champs attribuable au groupe carbonyle de la fonction amide, des signaux à δ 122.3, δ 128.5, δ 140.1 et à δ 141.9 ppm, des déplacements à bas champs attribuables aux groupements alcènes, 4 CH_2 à δ 32.5, δ 31.0, δ 28.6 et δ 28.1 ppm correspondant aux groupes méthylènes, 1 CH_2 à δ 46.1 ppm, proche d'un atome d'azote. On y observe également des signaux à δ 13.6 et δ 19.8 ppm, relatifs respectivement aux méthyles en position 10 et 3', 4'.

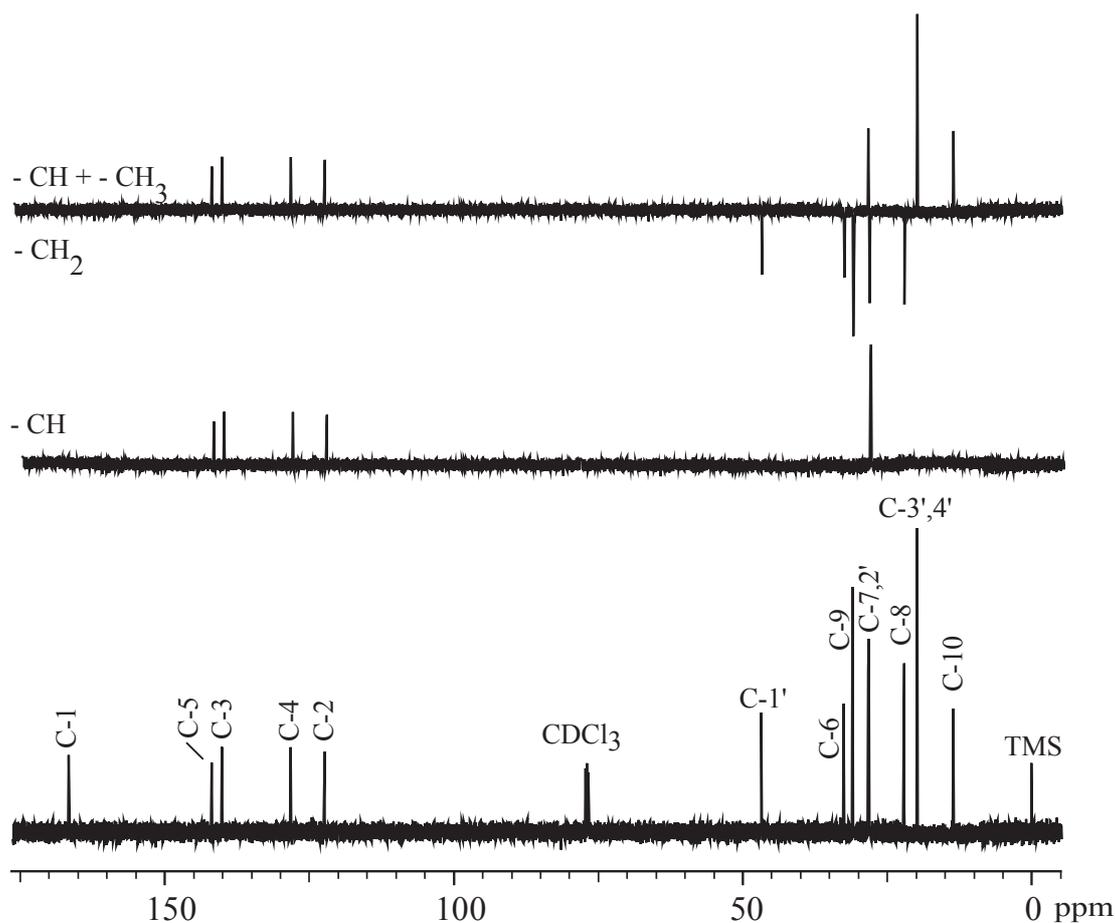
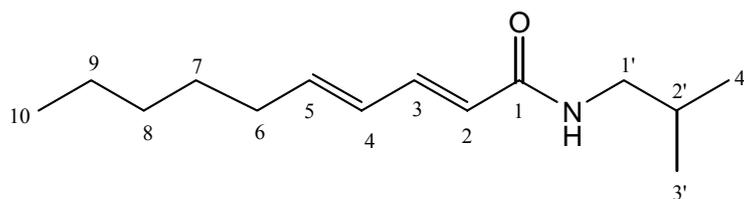


Figure 3.28- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) et sous-spectres DEPT du composé **I**.

Par ailleurs, les 14 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}$ correspondant à un poids moléculaire de 223 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse du spectre de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

Par comparaison des données de la littérature (Su et Horvat, 1981) avec ceux du composé **I**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **I**

Il s'agit du N-isobutyl-(2*E*,4*E*)-déca-2,4-diènamide (Pellitorine), un diènamide largement répandu dans la famille Rutaceae. Ce composé est connu pour son activité anesthésique local, antimalariale, ainsi que pour ses propriétés insecticides (Weenen *et al.*, 1990). Ainsi, Dunstan et Garnett (1895) ont isolé ce composé de *Anacyclus pyrethrum* (L.) Lagasca. Adesina (1986) a isolé ce composé des racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler. Vaquette *et al.*, (1973) l'ont également isolé de l'écorce de tiges de *Zanthoxylum decaryi* H. Perrier.

Composé J

Le composé **J** se présente sous forme de cristaux incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 230 nm ($\log \varepsilon = 2.41$) et 278 nm ($\log \varepsilon = 2.91$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **J** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 195 $[M]^+$, un ion à m/z 180 $[M-15]^+$ qui peut résulter de la perte d'un groupe méthyle, ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 196 $[M+H]^+$ et 213 $[M+NH_4]^+$.

Comme pour le composé **I**, l'analyse du spectre infra-rouge du composé **J** a montré la présence de bandes possédant un ν_{\max} à 3300, 2995, 1650 et 1542 cm^{-1} , suggérant la présence d'une fonction amide dans ce composé et de bandes possédant un ν_{\max} à 1630 et 955 cm^{-1} , caractéristiques des doubles liaisons de la fonction alcène.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **J** (Figure 3.29) a permis de mettre en évidence les mêmes signaux que pour le composé **I**, à savoir: un signal à δ 3.16 ppm (*t*, $J=13.1$ et 6.8 Hz), intégrant pour 2 protons, deux multiplets à δ 1.79 et 0.97 ppm, intégrant respectivement pour 1 proton et 6 protons, indiquant la présence d'une unité isobutylamide dans le composé **J** (Su et Horvat, 1981). Par ailleurs, la présence d'autres signaux à δ 5.76 ppm (*d*, $J=15.6$ Hz), à δ 7.19 ppm (*t*, $J=15.6$ et 10.3 Hz), à δ 6.10 ppm (*t*, $J=12.7$ et 10.3 Hz) et à δ 6.09 ppm (*t*, $J=12.7$ et 10.3 Hz), intégrant chacun pour 1 proton et dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une configuration *trans-cis* pour chaque paire de protons oléfiniques (Greger et Hofer, 1987 ; Bauer *et al.*, 1989) ont aussi été mis en évidence. L'analyse de ce spectre a permis également de mettre en évidence des signaux à δ 2.17, à δ 1.46 et à δ 0.96 ppm, caractéristiques d'une chaîne aliphatique.

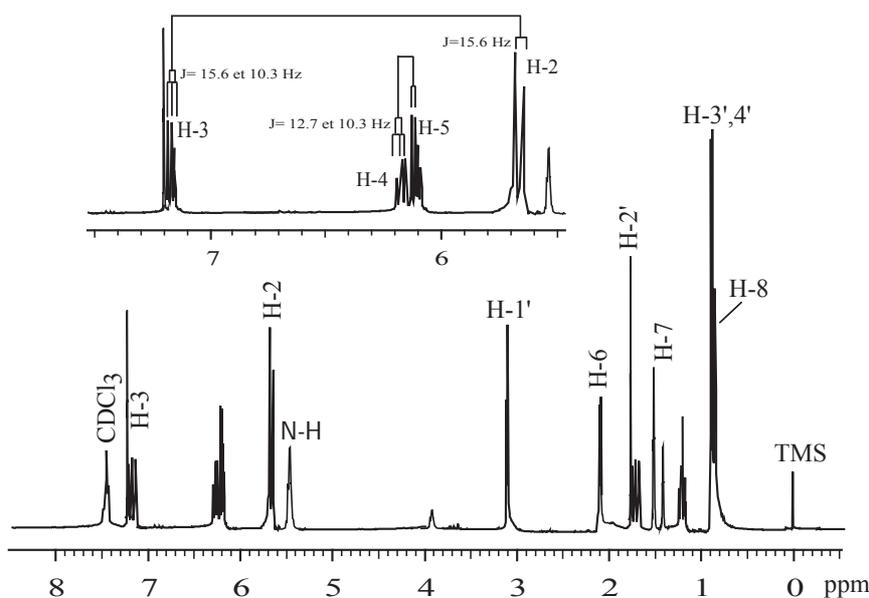


Figure 3.29 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) du composé **J**.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Figure 3.30) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: un signal à δ 166.0 ppm, un déplacement à bas champs attribuable au groupe carbonyle de la fonction amide, des signaux à δ 121.7, à δ 128.3, à δ 141.2 et à δ 142.9 ppm, des déplacements à bas champs attribuables aux groupements alcènes, 2 CH_2 à δ 34.9 et à δ 22.0 ppm correspondant aux groupes méthylènes, 1 CH_2 à δ 46.9 ppm, proche d'un atome d'azote. On y observe également des signaux à δ 13.7 et à δ 20.1 ppm, caractéristiques des méthyles.

Par ailleurs, les 12 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $C_{12}H_{21}NO$ correspondant à un poids moléculaire de 195 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

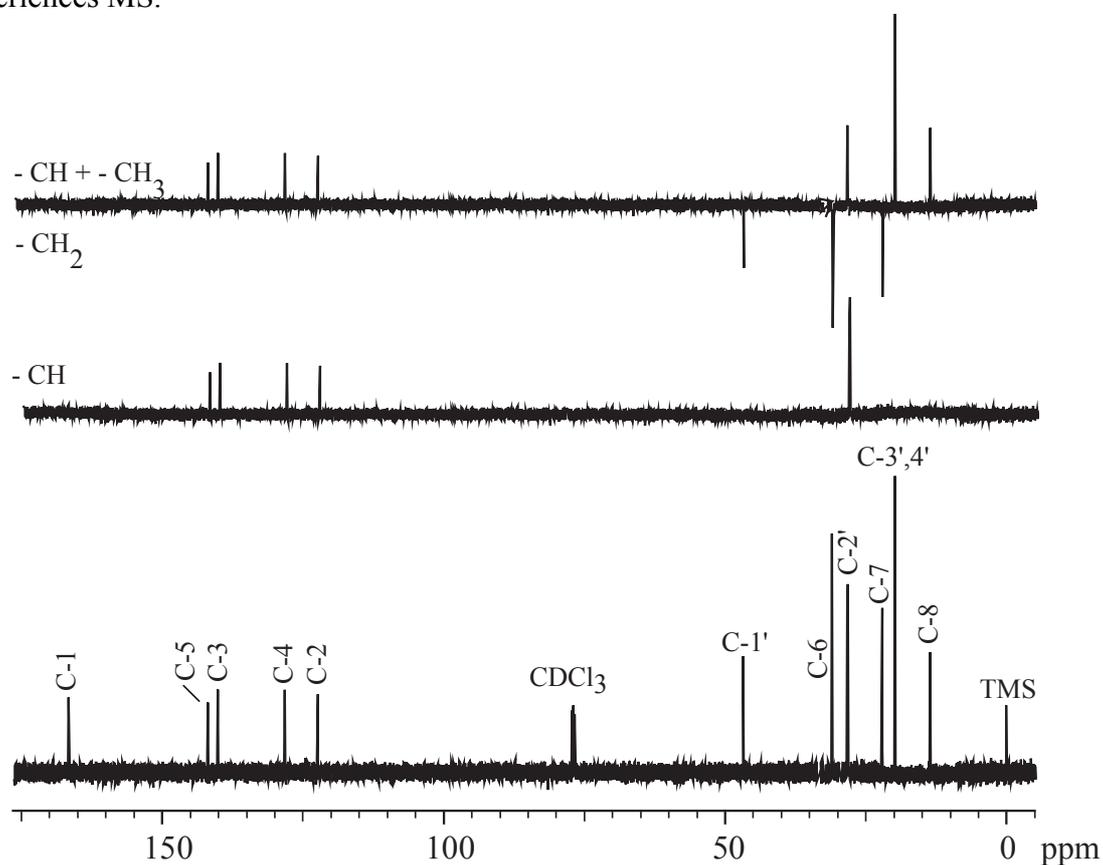
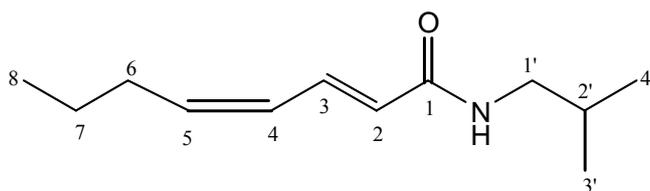


Figure 3.30- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, $CDCl_3$) et sous-spectres DEPT du composé **J**.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse du spectre de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

Par comparaison des données de la littérature (Elliot *et al.*, 1974) avec ceux du composé **J**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **J**

Il s'agit du N-isobutyl-(2*E*,4*Z*)-octa-2,4-diènamide, un diènamide peu répandu dans la famille Rutaceae (Elliot *et al.*, 1974).

3.2.6.7. Détermination de structure des composé **K**

Le composé **K** se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, ainsi que dans d'autres solvants apolaires. Ce composé prend une coloration violette après pulvérisation de la plaque TLC avec le réactif de Godin, suggérant ainsi la présence d'un triterpène. Son point de fusion est de 212-219 °C (non corrigé). Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à + 23° dans le chloroforme à une concentration de 0.1 mg/ml [littérature: $[\alpha]_D^{20}$: + 26,5° dans le chloroforme à une concentration de 0.98 mg/ml (Mallavadhani *et al.*, 1998)], indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **K** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 426 $[M]^+$, un ion à m/z 408 $[M-18]^+$ qui peut résulter de la perte d'une molécule H₂O, ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 427 $[M+H]^+$ et 444 $[M+NH_4]^+$.

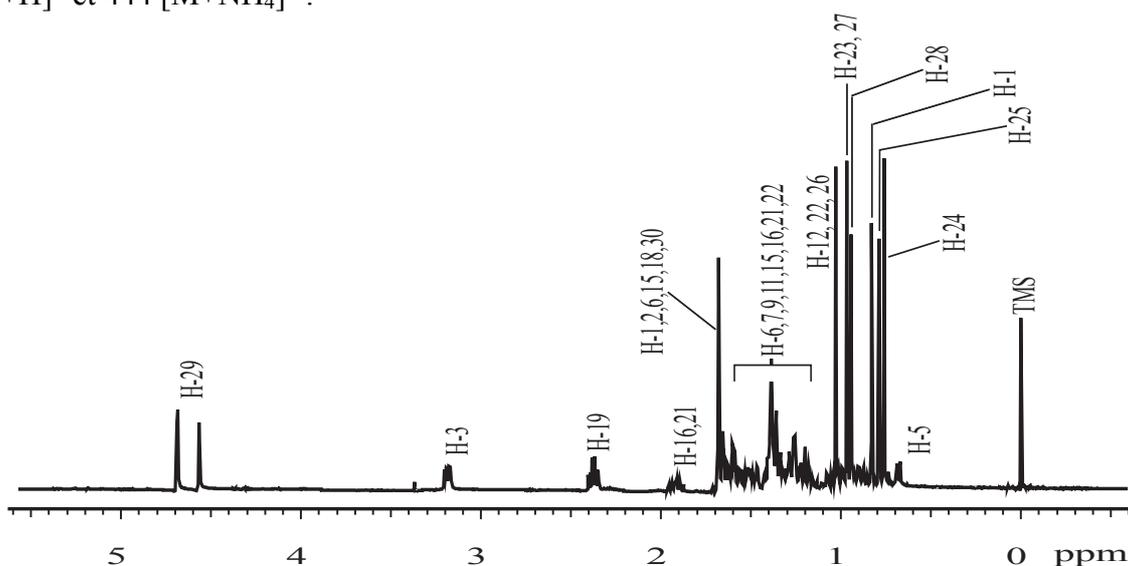


Figure 3.31 - Spectre ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃) du composé **K**.

La majorité des signaux du spectre ^1H -RMN (Figure 3.31) du composé **K** ont été observés dans la région des hauts champs, indiquant ainsi la présence de protons aliphatiques. Parmi eux, sept groupes méthyles à δ 0.76, δ 0.82, δ 0.94, δ 0.96, δ 1.01, δ 1.03 et δ 1.67 ppm ont été mis en évidence. Des résonances à δ 4.56 et 4.68 ppm correspondant aux groupements méthylènes, ont été observés avec les résonances à δ 3.17 et δ 3.20 ppm.

L'analyse du spectre ^{13}C -RMN (Figure 3.32) a fourni plus d'indication. Les 30 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ correspondant à un poids moléculaire de 426 uma.

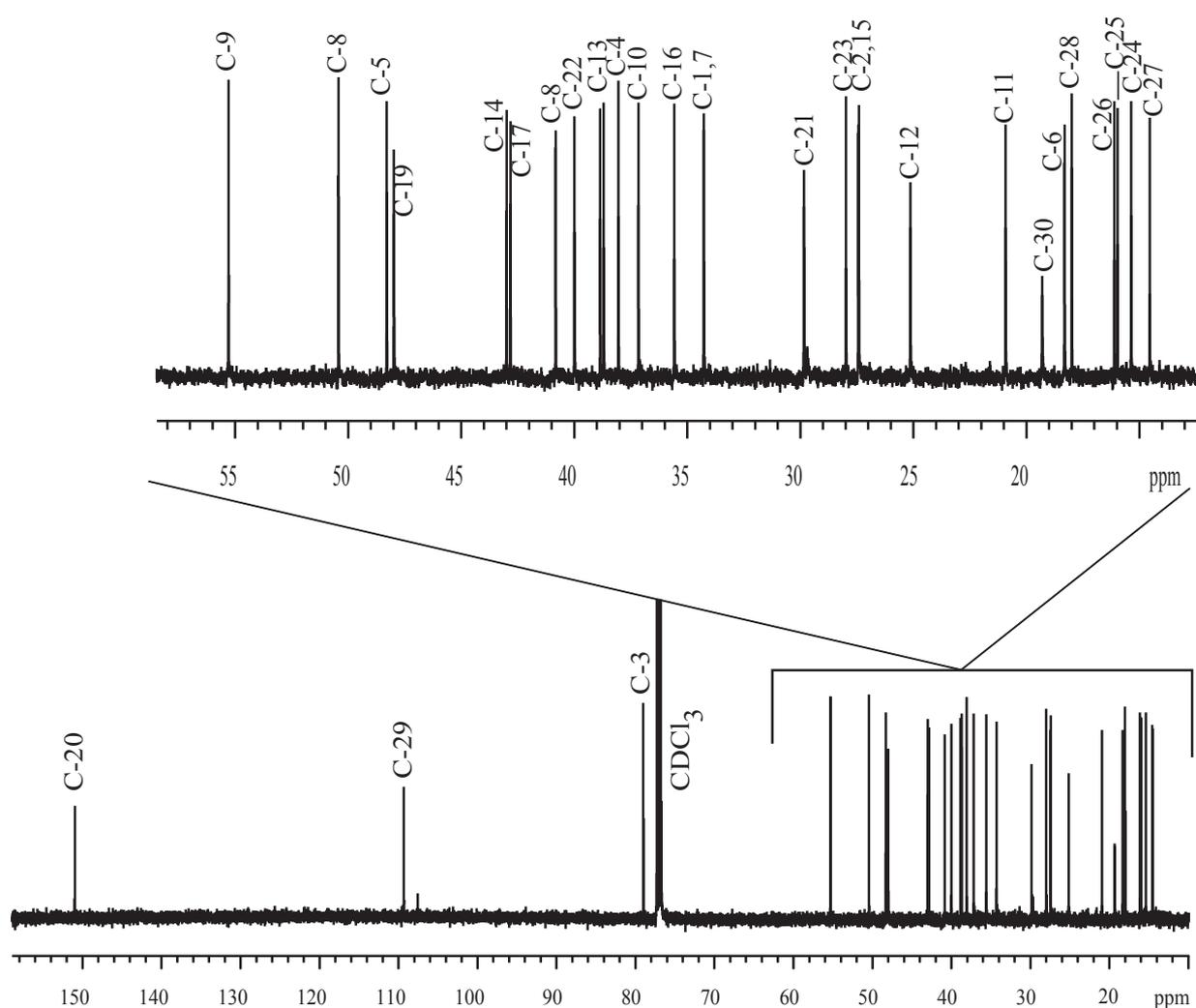
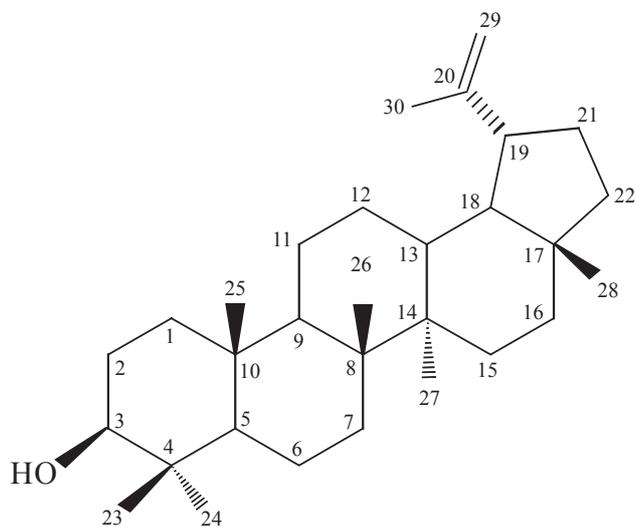


Figure 3.32- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) du composé **K**.

Par comparaison du $[\alpha]_D^{23}$, et des données RMN de la littérature (Mallavadhani *et al.*, 1998) avec ceux du composé **K**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **K**

Il s'agit du lupéol, un triterpène largement répandu dans la famille Rutaceae. Ainsi, Adesina (1986) a isolé ce composé des racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler et Vaquette *et al.* (1973) l'ont également isolé de l'écorce de tiges de *Zanthoxylum decaryi* H. Perrier.

3.2.7. Détermination de structure des composés L-O isolés de l'extrait méthanolique

3.2.7.1. Détermination de structure du composé L

Le composé L se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, ainsi que dans d'autres solvants polaires.

L'analyse HPLC-APCI-MS, en mode d'ionisation positive, a montré un ion moléculaire à m/z 611 $[M+H]^+$ et des fragments à m/z 465 $[M+H-146]^+$ et à m/z 303 $[M+H-308]^+$, correspondant au départ de deux sucres, ce qui suggère la présence d'un diglycoside de flavone.

Le spectre d'absorption UV montrait un maximum à 288 nm ($\log \varepsilon = 3.01$), relatif à la bande II, et un épaulement à 330 nm ($\log \varepsilon = 3.45$), relatif à la bande I, caractéristiques d'une flavanone.

Afin de déterminer la structure de ce composé, une analyse par spectrophotométrie UV à l'aide des réactifs de déplacement a été menée d'après Markham (1982) (*cf.* 5.4.3). Le tableau 3.2 présente les résultats obtenus sur le composé L.

Tableau 3.2 - Résultats de l'analyse des spectres UV avec les réactifs de déplacement du composé L d'après Markham (1982).

Réactif	Bande II	Bande I	Conclusion
MeOH	288	ép., 330	Flavanone
MeONa	288		
NaOAc	288		
NaOAc+H ₃ BO ₃	288	ép., 330	5-OH
AlCl ₃	310	+22 nm	
AlCl ₃ /HCl	306	+18 nm	

D'après ces observations, nous remarquons que le spectre UV du composé **L** dans le méthanol est caractéristique d'une flavanone.

Le déplacement de la bande II (+22 nm) suite à l'ajout d' AlCl_3 signale un hydroxyle en position C-5. L'addition d'une base (MeONa ou NaOAc) n'a provoqué aucun déplacement, indiquant l'absence d'un hydroxyle en position C-7.

Afin de déterminer la nature des deux sucres mis en évidence par l'analyse HPLC-APCI-MS, l'hydrolyse acide du composé **L** a été entreprise. L'analyse par spectrophotométrie UV à l'aide des réactifs de déplacement a été ensuite menée sur l'aglycone. Le tableau 3.3 résume les résultats obtenus.

Tableau 3.3 - Résultats de l'analyse des spectres UV avec les réactifs de déplacement du composé L hydrolysé d'après Markham (1982).

Réactif	Bande II	Bande I	Conclusion
MeOH	290	ép., 330	Flavanone
MeONa	325	+35 nm	
NaOAc	325	+35 nm	
NaOAc+ H_3BO_3	290	ép., 330	5-OH
AlCl_3	312	+22 nm	
AlCl_3/HCl	308	+18 nm	

D'après ces observations, nous remarquons que le spectre UV de l'aglycone dans le méthanol est caractéristique d'une flavanone.

Le déplacement bathochrome de la bande II (+35 nm) suite à l'ajout de la base forte (MeONa) ou la base faible (NaOAc), indique la présence d'un hydroxyle en position C-7 (Bacon et Mabry, 1976). En comparant les résultats obtenus avant et après hydrolyse, la position des sucres a pu être déterminée. Les deux sucres sont donc attachés en position C-7.

L'analyse de la région aromatique du spectre ^1H -RMN (Figure 3.33) a permis de mettre en évidence la présence de: deux protons aromatiques à δ 6.95 (*d*, $J=8.3$ Hz, 2H) ppm et à δ 6.91

(*d*, $J=8.3$ Hz, 2H) ppm dans la région des bas champs, dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*, ainsi qu'un singulet à δ 6.94 (1H) ppm, confirmant la présence d'un système ABX sur le cycle B. Deux doublets (*d*, $J=2.1$ Hz), intégrant chacun pour un proton à δ 6.14 (H-8) et δ 6.12 ppm (H-6), dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *mé*ta sur le cycle A. Par ailleurs, des signaux à δ 2.76 (1 H, *dd*, $J=2.9$ et 17.1 Hz) ppm, δ 3.28 (1H, *m*) ppm et à δ 5.51 (1 H, *dd*, $J=2.9$ et 12.2 Hz) ppm ont aussi été observés. Un singulet à δ 3.80 ppm, intégrant pour 3 protons et typique d'un groupe méthoxyle a aussi été mis en évidence.

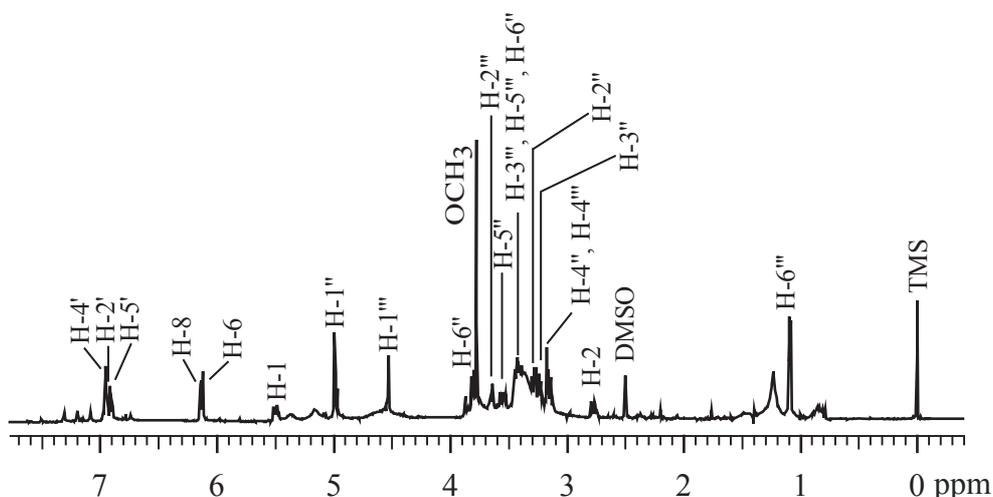


Figure 3. 33 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé L.

L'analyse du spectre ^{13}C -RMN (Fig. 3.34) a fourni plus d'indications. Ce spectre a ainsi montré un signal à δ 198.0 ppm, caractéristique d'un groupement carbonyle, et un carbone aliphatique à δ 42.2 ppm. Par ailleurs, des signaux déblindés entre δ 162 et δ 166 ppm, caractéristiques des carbones quaternaires ont été observés, ainsi qu'un signal à δ 55.8 ppm relatif au groupement méthoxyle.

Ainsi, les 28 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ correspondant à un poids moléculaire de 610 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

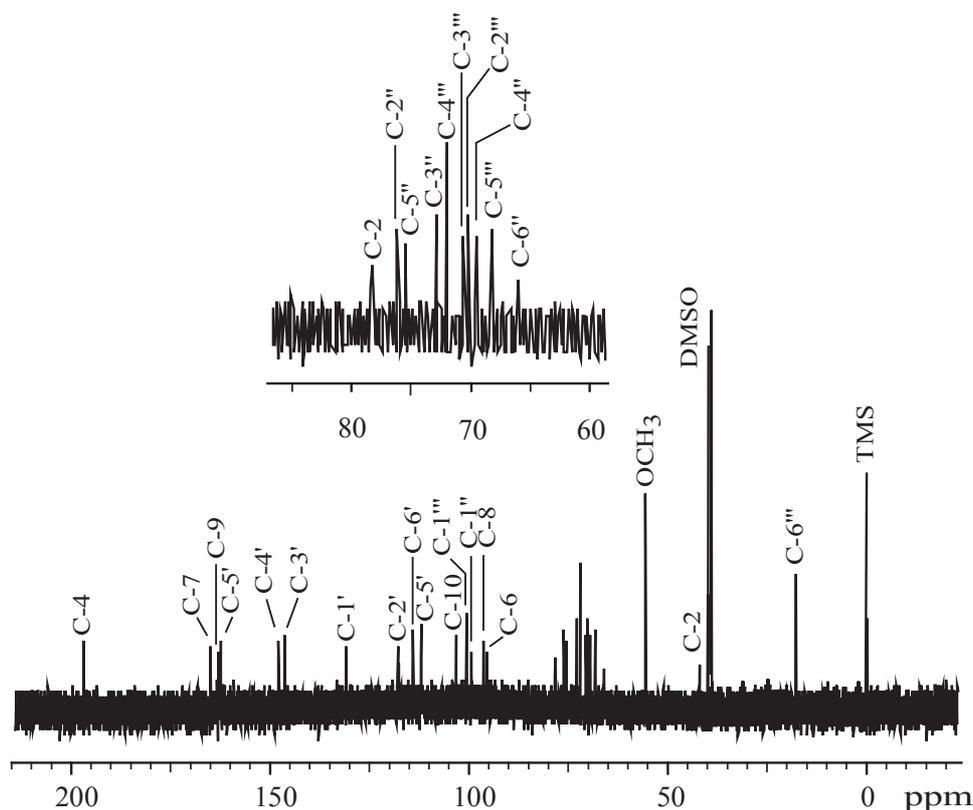


Figure 3.34- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé **L**.

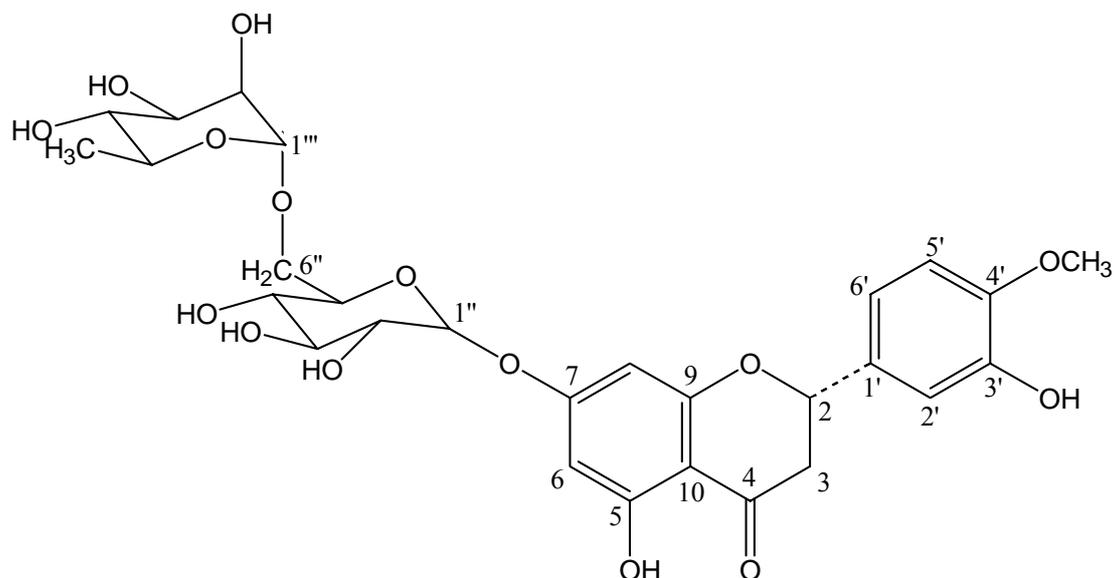
L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé **L**. Il a ainsi pu être démontré que les protons localisés à δ 4.52 et δ 4.97 ppm corrélient aux signaux situés entre δ 66 et δ 80 ppm, ainsi qu'aux carbones anomériques situés à δ 99.6 et δ 100.7 ppm, ce qui confirme la présence de deux sucres dans le composé **L** (Markham, 1982).

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance (HMBC) a permis la confirmation de la liaison du sucre à l'aglycone en montrant clairement le couplage du proton anomérique du glucose ($\text{H-1}''$) avec le carbone C-7 de l'aglycone. Les déplacements dans la région des sucres sont caractéristiques d'un glucose, dont on note la configuration β (*d*, $\text{H-1}''$, $J=7.3$ Hz) grâce à la constante de couplage typique de son proton anomérique (Harborne, 1986). La localisation du méthoxyle en C-4' a aussi pu être possible.

Par ailleurs, les corrélations observées entre les protons à δ 4.52 ppm (H-1''') et le carbone situé à δ 66.8 ppm (C-6'') ont permis d'identifier le diglycoside. Il s'agit du rutinose [rhamnosyl-(α 1 \rightarrow 6)-glucose], cette configuration α du rhamnose a pu être possible en observant les déplacements chimiques des carbones dont la configuration α et β diffère (Agrawal *et al.*, 1985 ; Hostettmann et Marston, 1995)

Par comparaison avec les données de la littérature, le composé **L** est identifié comme étant la (7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosyl]-3', 5, 7-trihydroxy-4'-méthoxy-4'-méthoxyflavanone) ou hespéridine. La co-élution de ce composé avec un standard hespéridine sur CCM a permis de confirmer son identité.



Structure du composé **L**

L'héséridine est très répandue dans la famille Rutaceae. Elle possède de nombreuses activités: antimicrobienne, anticarcinogène, antioxydante, antiinflammatoire, protectrice des capillaires en cas de troubles veineux et immunomodulatrice (Garg *et al.*, 2001).

3.2.7.3. Détermination de structure du composé **M**

Le composé **M** se présente sous forme d'une poudre jaune amorphe soluble dans le méthanol, ainsi que dans d'autres solvants polaires. Son point de fusion est de 136-139 °C (non corrigé). Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à - 66° dans le méthanol à une concentration de 0.1 mg/ml, indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 208 nm ($\log \epsilon = 2.18$) et 270 nm ($\log \epsilon = 2.83$), ainsi que deux épaulements à 220 nm ($\log \epsilon = 2.30$) et 287 nm ($\log \epsilon = 3.01$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **M** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 506 $[M]^+$, ainsi que divers ions à m/z 492 $[M-14]^+$, à m/z 474 $[M-32]^+$ et à m/z 446 $[M-60]^+$ résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre HPLC-APCI-MS, en mode d'ionisation positive, qui donnait un ion pseudomoléculaire à m/z 507 $[M+H]^+$ et un fragment à m/z 490 $[M-H_2O+H]^+$ (Cf. Fig. 3.35), qui correspondent à une masse de 506 Da.

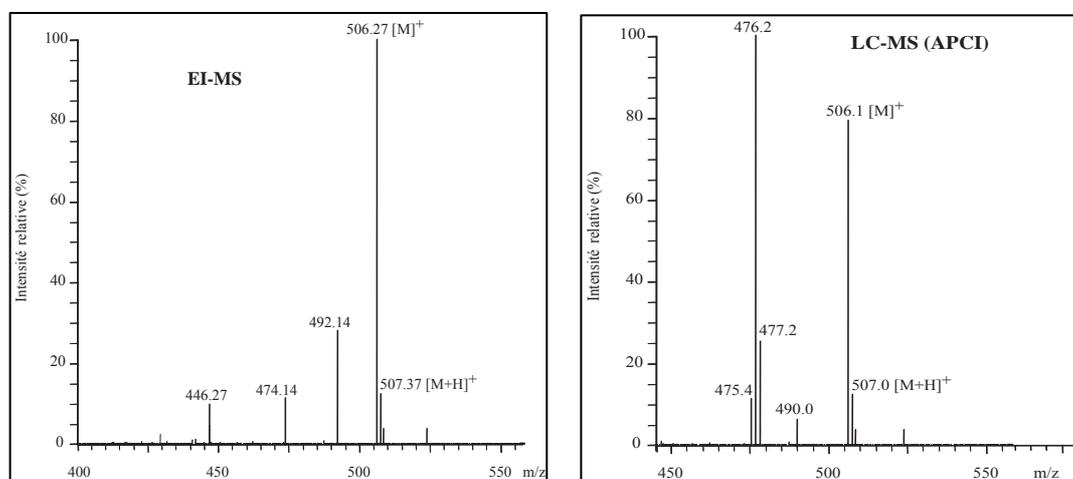


Figure 3.35 – Spectres de masse EI-MS et HPLC-APCI-MS du composé **M.**

Pour nous assurer de la masse moléculaire de 506 Da, déduite des deux mesures précédentes et obtenir la formule brute de ce composé, une analyse de spectrométrie de masse à haute résolution par électrospray (hrESI-MS) a été effectuée. Le spectre ainsi obtenu (Fig. 3.36) montre un adduit de l'ion moléculaire avec le sodium à m/z 529.13162 $[M+Na]^+$, correspondant à la formule brute $C_{24}H_{26}O_{12}$ pour le composé **M** (calculé: m/z 529.13164).

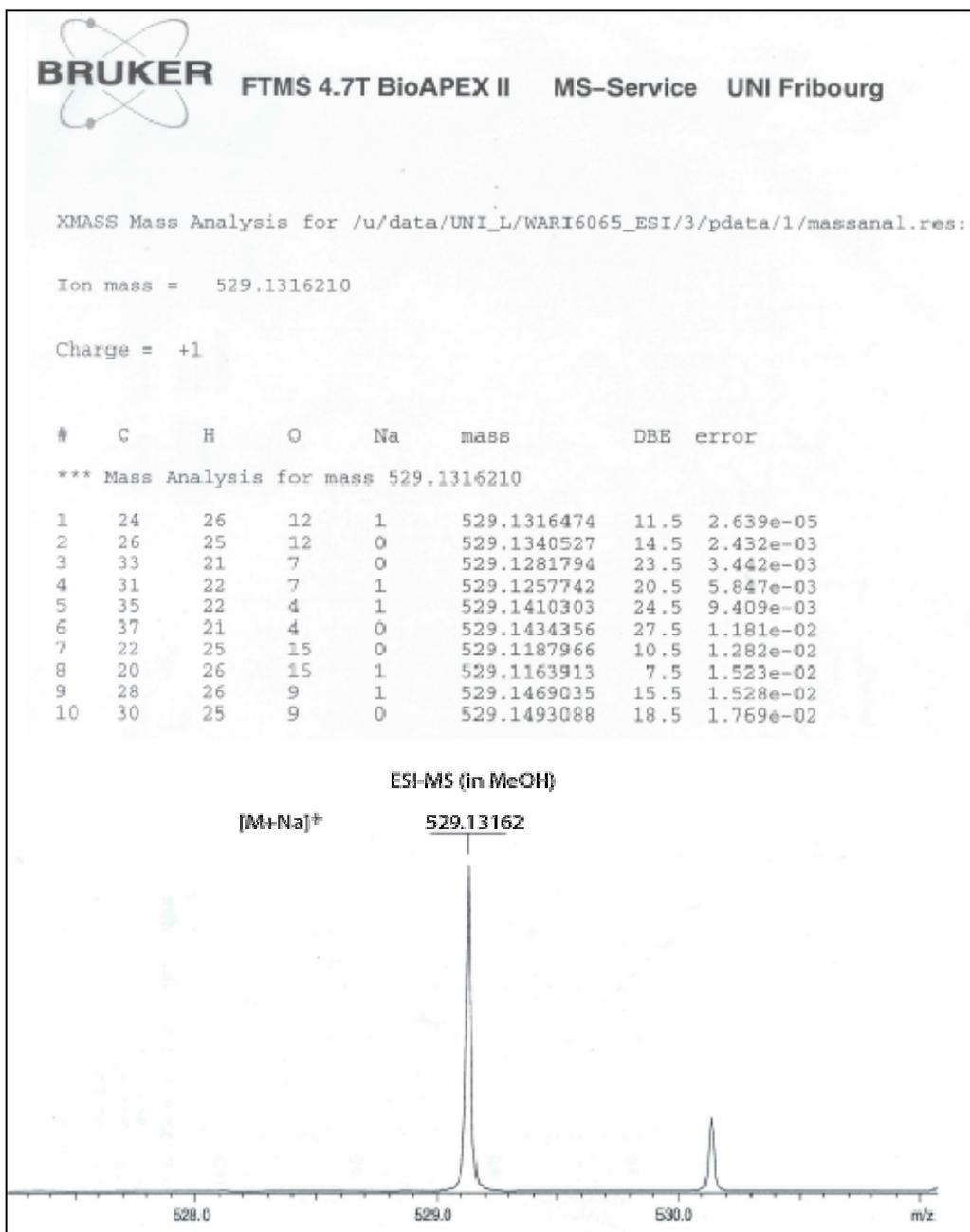


Figure 3.36 – Rapport d’analyse hrESI-MS du composé M.

La mesure des spectres ^1H -RMN et ^{13}C -RMN a montré une évidente symétrie dans la molécule. En effet, les signaux étaient soit superposés, soit très proches. L’étude de l’intégration du spectre RMN du proton nous a indiqué le nombre de protons présents dans la molécule, et le nombre de signaux dans le spectre RMN du carbone nous ont conduit à la formule brute suivante: $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ correspondant à un poids moléculaire de 506 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

L'étude du spectre ^1H -RMN du composé **M** (Figure 3.37) a permis de mettre en évidence la présence de: six protons aromatiques formant des multiplets à δ 6.85, δ 7.36 et δ 7.43 ppm dans la région des bas champs, intégrant chacun pour deux protons, un singulet à δ 3.76 ppm, intégrant pour six protons, caractéristique de la présence de deux groupements méthoxyles dans le composé **M**. Trois multiplets à δ 4.28, δ 5.12, et δ 5.50 ppm correspondant aux protons de type oléfinique, dont les valeurs déblindées observées sont révélatrices de la présence d'atome d'oxygène adjacent, sont aussi visibles. Deux multiplets entre δ 1.95 – 2.38 ppm et entre δ 1.90 – 2.35 ppm, correspondant aux protons de groupements méthylènes ont aussi été mis en évidence.

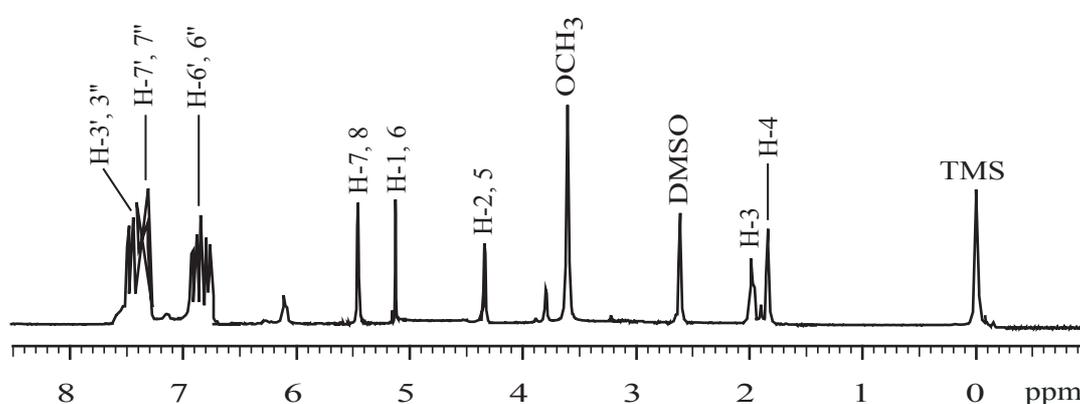


Figure 3.37 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé **M**.

L'analyse des spectres ^{13}C -RMN et DEPT (Fig. 3.38) a permis la confirmation de ces éléments révélant ainsi la présence de: douze carbones aromatiques (6 CH, 6 carbones quaternaires), un signal à δ 165.7 ppm, caractéristique des deux fonctions carbonyles des esters, 6 CH de type oléfinique à δ 66.7, δ 68.9 et δ 74.5 ppm, proches d'un atome d'oxygène chacun, 2 CH_2 à δ 23.8 et à δ 23.5 ppm, ainsi qu'un signal à δ 56.2 ppm, caractéristique du groupement méthoxyle.

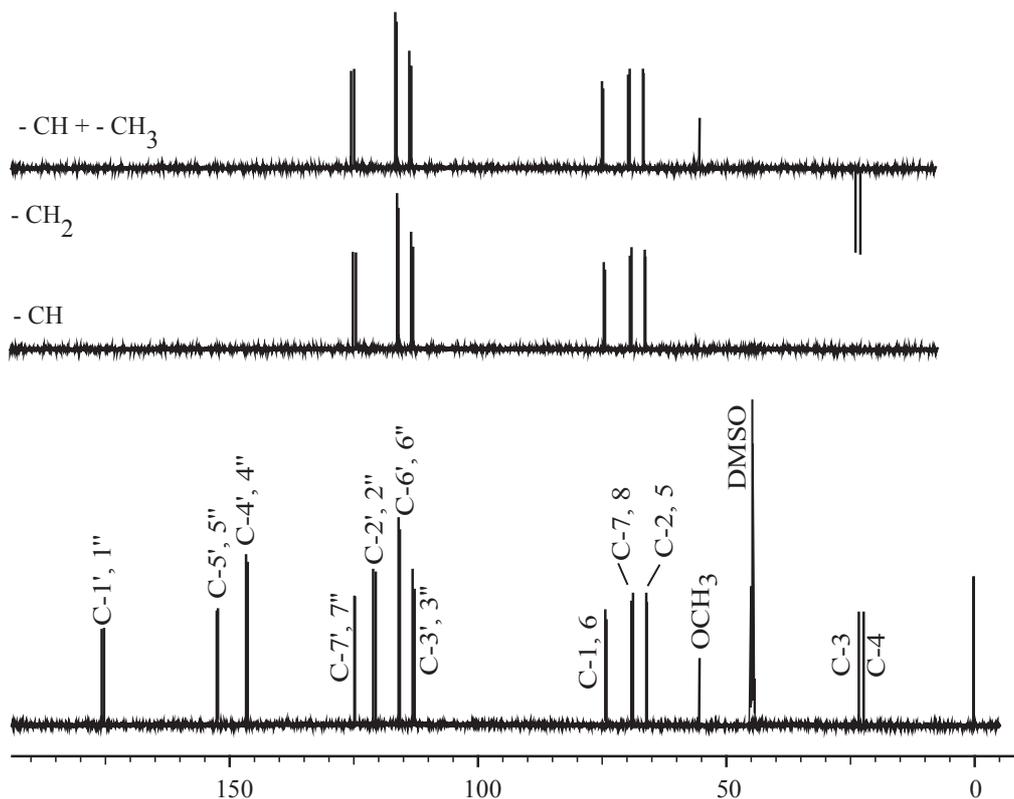


Figure 3.38- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) et sous-spectres DEPT du composé **M**.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY (Fig. 3.39) et NOESY et hétéronucléaires HSQC (Fig. 3.40) et HMBC (Fig. 3.41).

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC a conduit à l'établissement des connections géminales ^1H - ^{13}C -RMN du composé **M**. Il a ainsi pu être démontré que les protons aromatiques localisés à δ 6.85, δ 7.36 et δ 7.43 ppm étaient attachés aux CH respectivement situés à δ 115.8, δ 124.2 et δ 113.2 ppm et que les protons en positions 7 et 8 ont subi des déplacements vers les bas champs et qu'ils sont, de ce fait proches des fonctions esters. L'analyse du spectre de corrélations homonucléaires ^1H - ^1H COSY montre en effet un couplage entre les protons H-1,6 et les protons à δ 5.50 ppm (H-7,8), dont le déplacement chimique ^{13}C à δ 68.9 ppm indique une liaison avec un atome d'oxygène.

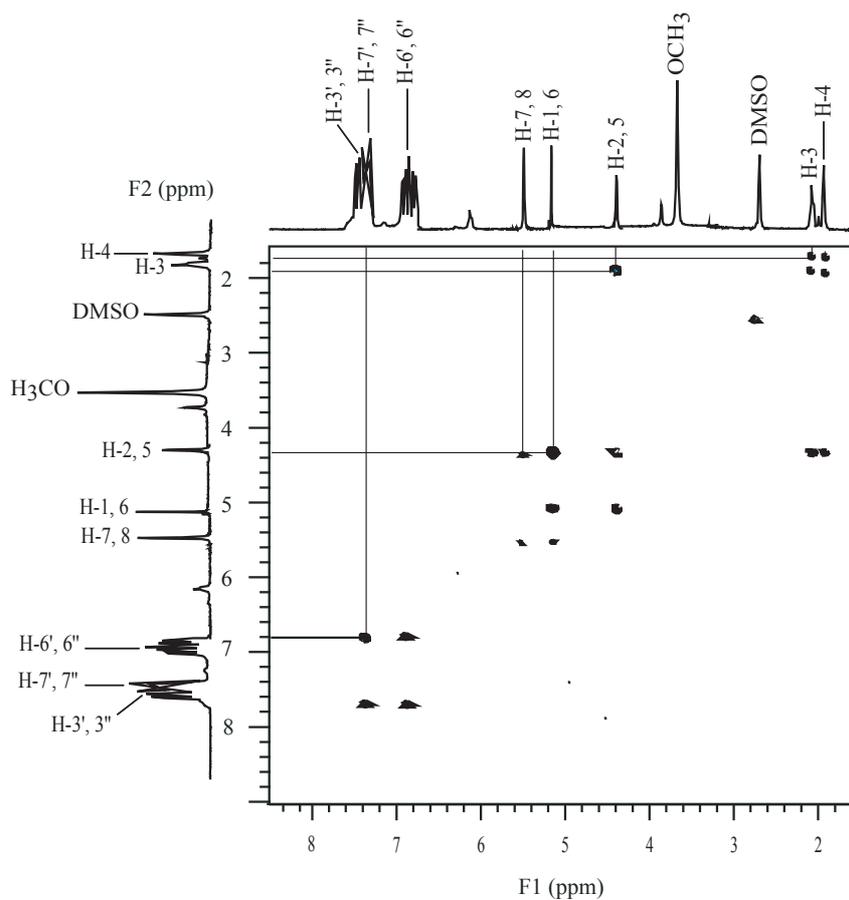


Figure 3.39- Spectre de corrélations homonucléaires COSY du composé **M**.

La mesure du spectre de corrélations hétéronucléaires observées à longue distance (HMBC) a montré les corrélations entre les protons à δ 5.50 ppm et les carbones situés à δ 165.7 ppm suggérant l'attachement des dérivés de l'acide benzoïque en C-7 et C-8. Par ailleurs, les corrélations entre les protons à δ 5.12 ppm et le carbone situé à δ 23.8 ppm d'une part, et les carbonyles d'autre part, laisse suggérer que les groupes méthylènes en C-3 et C-4 ne sont pas équivalents et que la fonction endoperoxyde est située soit en position C-1 et C-6 soit en position C-2 et C-5.

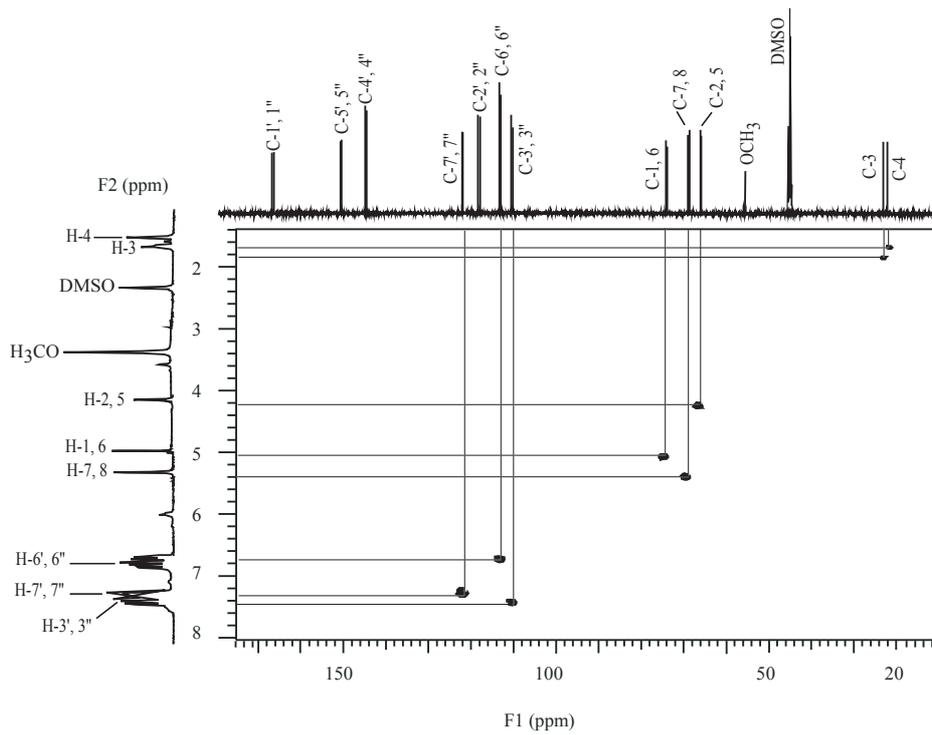


Figure 3.40- Spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé M.

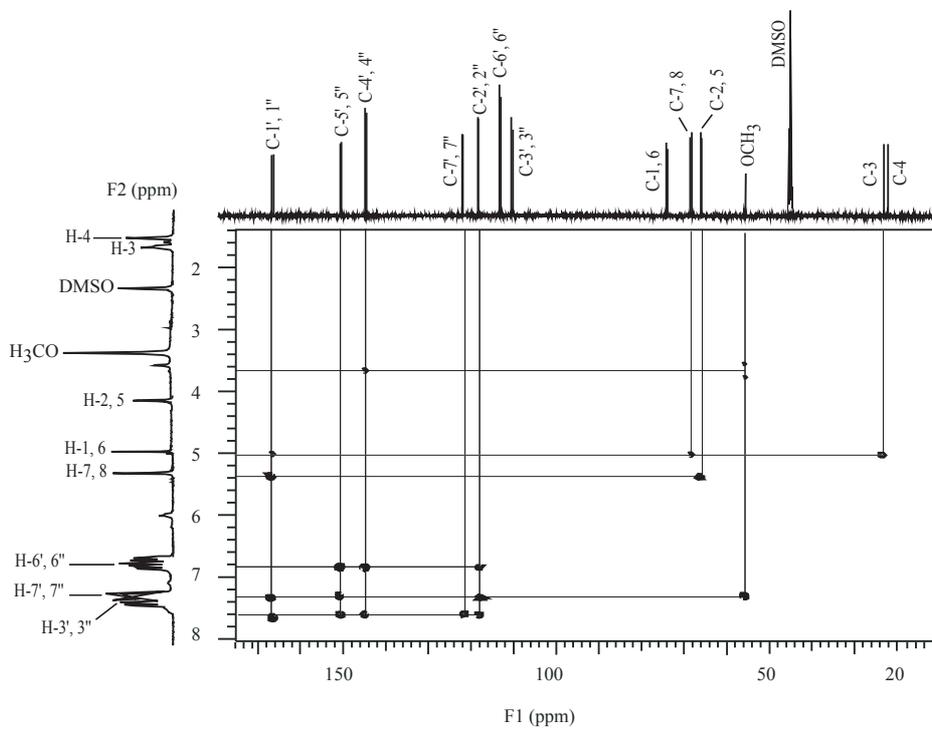
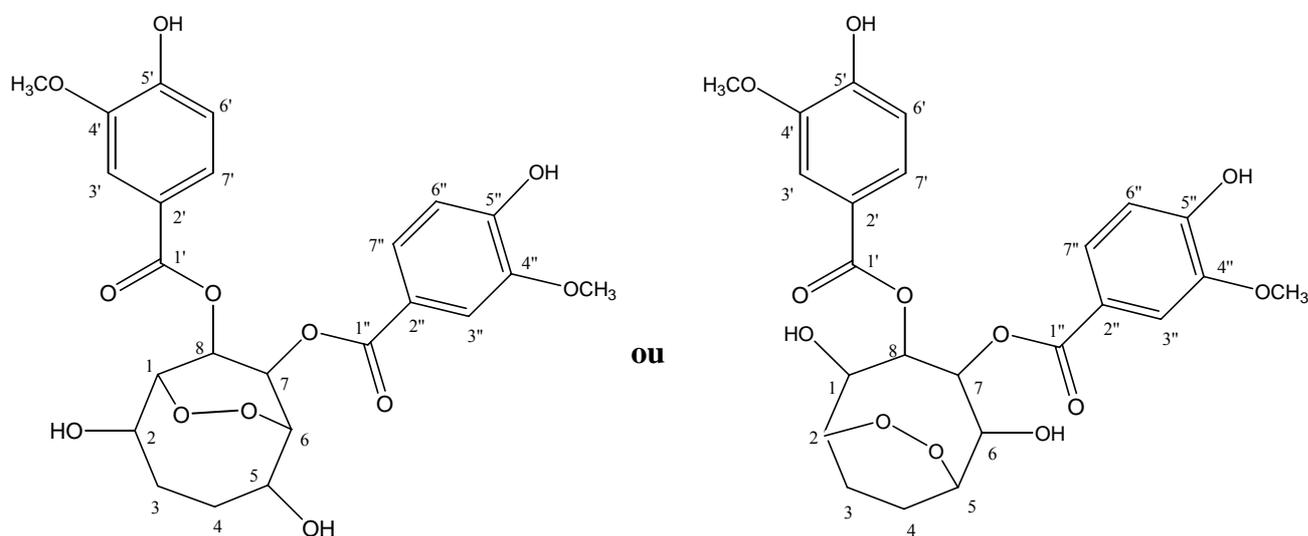


Figure 3.41- Spectre de corrélations hétéronucléaires HMBC du composé M.

Sur la base de ces résultats et à ce stade de notre analyse, deux structures sont proposées pour le composé **M**:



Structures proposées pour le composé **M**

Il s'agit soit du 7,8-di-O-(3-méthoxy-4-hydroxybenzoyl)-2,5-dihydroxycyclooctane-1,6-endoperoxyde, soit du 7,8-di-O-(3-méthoxy-4-hydroxybenzoyl)-1,6-dihydroxycyclooctane-2,5-endoperoxyde. Ce composé n'avait jamais été cité jusqu'à ce jour dans la littérature. C'est donc un nouveau produit naturel.

Afin de confirmer le nombre et la position des groupements OH sur le composé **M**, une acétylation a été effectuée. Les spectres de masse obtenus par EI et par HPLC-APCI-MS en mode positif du composé **M acétylé (M-a)** donnent respectivement des ions moléculaire à m/z 674 $[M+4Ac]^+$ et pseudomoléculaire à m/z 675 $[M+H+4Ac]^+$, correspondant à la formule brute $C_{32}H_{34}O_{16}$ pour le composé **M-a**.

L'étude du spectre 1H -RMN du composé **M-a** (Fig. 3.42) a permis de mettre en évidence la présence de deux signaux supplémentaires à δ 2.05 et δ 2.26 ppm, intégrant chacun pour 6 protons et correspondant aux protons des méthyles des quatre groupes acétyles en C-5' et C-5'' et en C-2 et C-5, ce qui confirme la présence de quatre groupements OH libres dans le composé **M**.

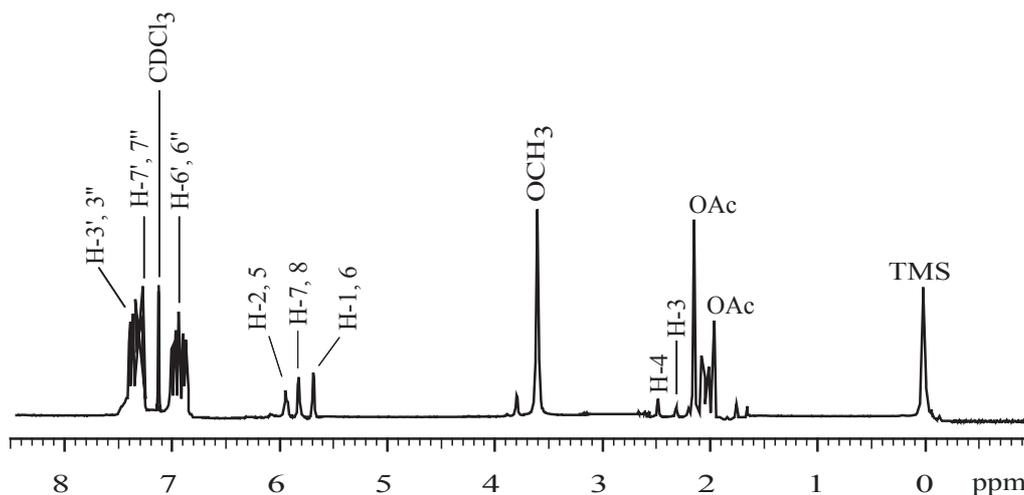


Figure 3.42 - Spectre ^1H -RMN (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) du composé **M-a**.

Par ailleurs, l'analyse du spectre de corrélations homonucléaires ^1H - ^1H NOESY du composé acétylé a permis de mettre en évidence les corrélations entre les protons de l'acétyle en C-2 respectivement en C-5, avec le proton situé en C-1 respectivement en C-6. D'autres corrélations permettant de confirmer la position de la fonction endoperoxyde n'ont pas été observées sur ce spectre.

La cristallisation de ce composé acétylé a été effectuée (la cristallisation du composé **M** n'avait pas abouti à la formation de cristaux) et l'analyse de sa structure par diffraction aux rayons X est en cours, afin de déterminer avec certitude la position de cette fonction endoperoxyde.

3.2.7.4. Détermination de structure du composé **N**

Le composé **N** se présente sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme. Son point de fusion est de 190-193 °C (non corrigé). Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à - 11° dans le chloroforme à une concentration de 0.1 mg/ml, indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule. Le spectre d'absorption UV est caractéristique de la dihydrochélérythrine avec quatre maxima à 225 nm ($\log \varepsilon = 2.36$), 245 nm ($\log \varepsilon = 2.57$), 285 nm ($\log \varepsilon = 2.99$) et 355 nm ($\log \varepsilon = 3.67$), ainsi qu'un épaulement à 325 nm ($\log \varepsilon = 3.41$)

qui sont caractéristiques des benzophénanthridines oxygénées en 2, 3, 7 et 8 (Chen *et al.*, 1994).

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **N** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 349 $[M]^+$, ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 350 $[M+H]^+$ et 367 $[M+NH_4]^+$.

L'étude du spectre 1H -RMN du composé **N** (Figure 3.43) a permis de mettre en évidence la présence d'un singulet à δ 3.49 ppm, intégrant pour 3 protons correspondant au groupement N-méthyle, deux singulets à δ 4.13 et 4.28 ppm, intégrant chacun pour 3 protons, caractéristiques de deux groupements méthoxyles, ainsi qu'un singulet à δ 6.26 ppm (2H) caractéristique d'un groupe méthylène-dioxy. Deux paires de protons aromatiques apparaissant sous forme de deux paires de doublets à δ 8.21, δ 8.66 ppm (1H chacun, $J=8.6$ Hz) et à δ 8.20, δ 8.26 ppm (1H chacun, $J=9.1$ Hz), dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*, ainsi que deux singulets à δ 7.56 et δ 8.19 ppm, intégrant chacun pour un proton et correspondant à des protons aromatiques, sont aussi visibles sur ce spectre.

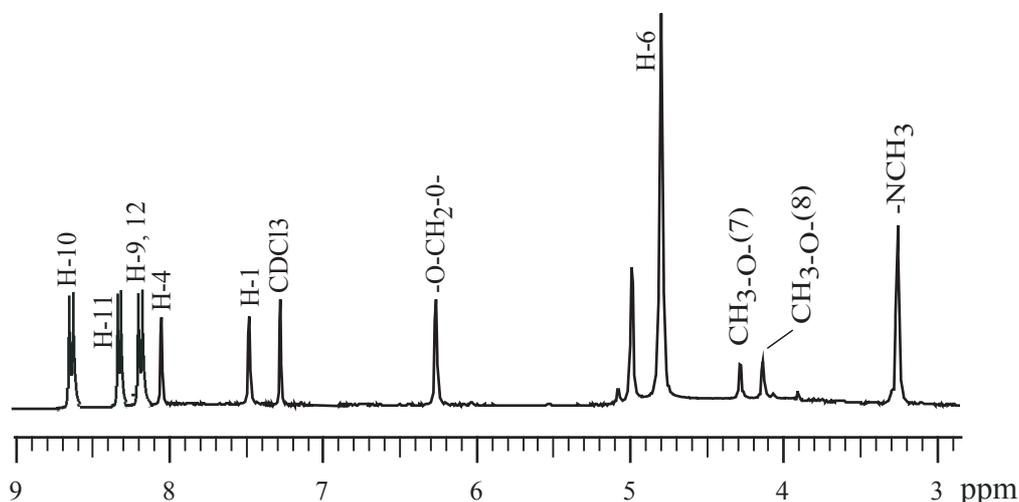


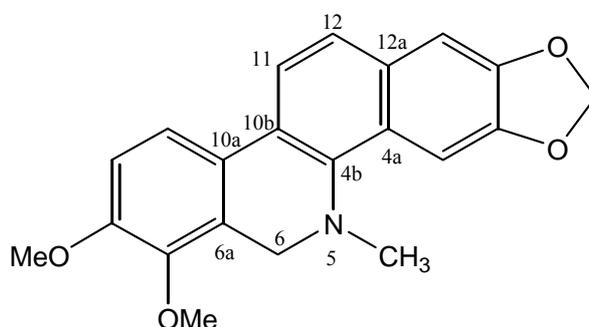
Figure 3.43 - Spectre 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé **N**.

Le spectre ^{13}C -RMN du composé **N** est très similaire à celui du composé **H** et a permis de confirmer les éléments précédents.

Par ailleurs, les 21 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $C_{21}H_{19}NO_4$ correspondant à un poids moléculaire de 349 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et NOESY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

Par comparaison des données de la littérature (Decaudain *et al.*, 1974) avec ceux du composé **N**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **N**

Il s'agit de la dihydrochéleréthrine, un alcaloïde appartenant au groupe des benzo[*c*]phénanthridines, largement répandu dans le genre *Zanthoxylum*. Ce composé fut isolé de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler et *Bocconia arborea* L. (Decaudain *et al.*, 1974 ; Oechslin *et al.*, 1991).

3.2.7.5. Détermination de structure du composé **O**

Le composé **O** se présente sous forme de poudre jaune amorphe soluble dans le chloroforme. Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{23}$ mesuré à $+197^\circ$ dans le chloroforme à une concentration de 0.1 mg/ml, indiquait la présence d'un ou plusieurs centres de chiralité dans la molécule. Le spectre d'absorption UV montrait deux maxima à 214 nm ($\log \epsilon = 2.24$) et 287 nm ($\log \epsilon = 3.01$) et un épaulement à 235 nm ($\log \epsilon = 2.46$), suggérant la présence de fragments phénoliques dans la molécule.

La mesure du spectre de masse EI en mode positif du composé **O** a indiqué la présence d'un ion moléculaire à m/z 342 $[M]^+$, ainsi que divers ions résultant de la fragmentation de la molécule. Ceci a été confirmé par la mesure du spectre D/CI, qui donnait des ions pseudomoléculaires à m/z 343 $[M+H]^+$ et 360 $[M+NH_4]^+$.

L'étude du spectre 1H -RMN du composé **O** (Figure 3.44) a permis de mettre en évidence la présence de: trois protons aromatiques dans la région des bas champs, deux doublets à δ 7.00 (d , $J=8,0$ Hz, 1H) ppm et à δ 6.98 (d , $J=8,0$ Hz, 1H) ppm, dont les constantes de couplage indiquent qu'ils ont une position relative *ortho*, ainsi qu'un singulet à δ 6.92 ppm (1H). On observe aussi deux singulets à δ 2.93 et δ 3.37 ppm, intégrant chacun pour 3 protons correspondant aux groupements N-méthyle, deux singulets à δ 3.81 et δ 3.84 ppm, intégrant chacun pour 3 protons, caractéristiques de deux groupements méthoxyles. Trois singulets à δ 2.39, δ 3.65 et δ 3.75 ppm, intégrant chacun pour 2 protons, ainsi qu'un doublet ($J=7.9$ Hz, 1H) à δ 4.45 ppm sont aussi visibles sur ce spectre.

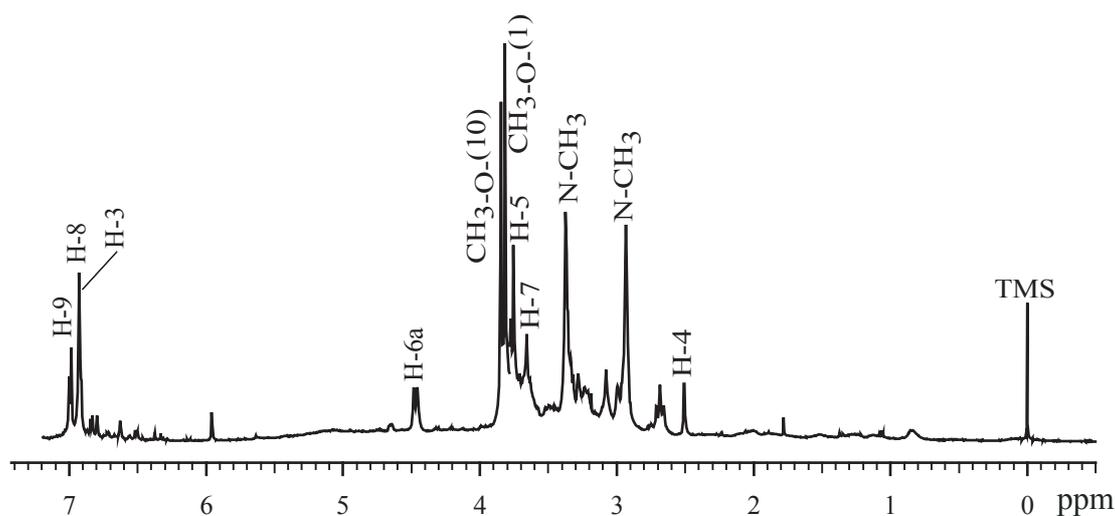


Figure 3.44- Spectre 1H -RMN (500 MHz, $CDCl_3$) du composé **O**.

Le spectre ^{13}C -RMN du composé **O** (Figure 3.45) a permis de confirmer les éléments précédents.

Par ailleurs, les 20 signaux dénombrés ont permis le calcul de la formule brute $C_{20}H_{24}NO_4^{(+)}$ correspondant à un poids moléculaire de 342 uma en accord avec les résultats fournis par les expériences MS.

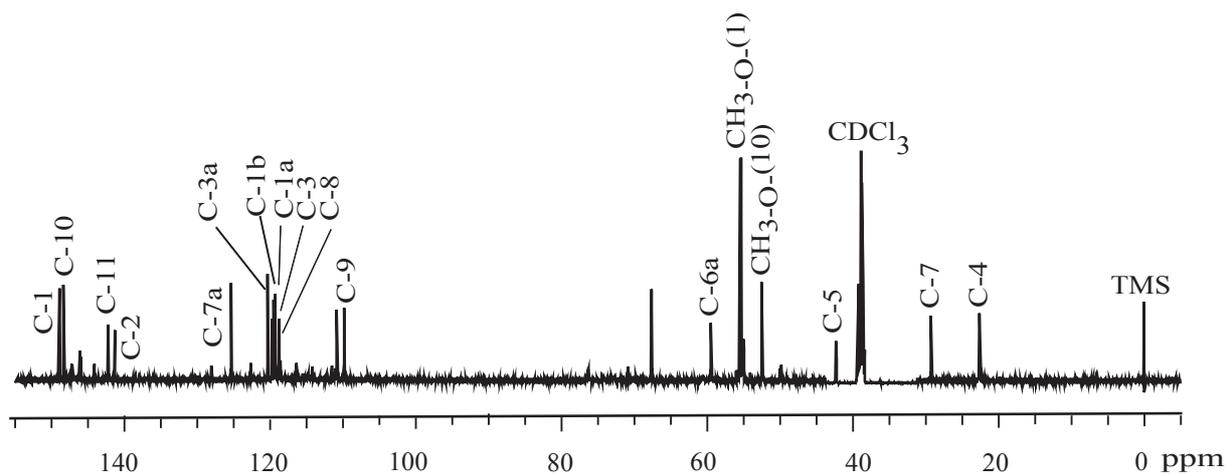
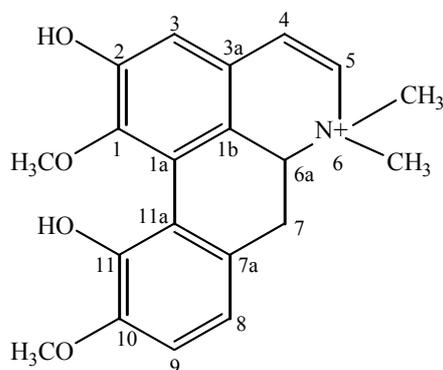


Figure 3.45- Spectre ^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3) du composé **O**.

L'attribution complète des signaux a été réalisée par l'analyse des spectres de corrélations homonucléaires COSY et NOESY et hétéronucléaires HSQC et HMBC.

Par comparaison des données de la littérature (Rasoanaivo *et al.*, 1998) avec ceux du composé **O**, la structure suivante a été attribuée à ce composé:



Structure du composé **O**

Il s'agit du N,N-diméthyllindcarpine, un alcaloïde appartenant au groupe des aporphines, préalablement isolé de certains représentants des familles: Menispermaceae, Magnoliaceae et Ranunculaceae (Guinaudeau *et al.*, 1975).

3.2.8. Activités biologiques des composés isolés

3.2.8.1. Activités antifongiques, antibactérienne, inhibitrice de l'acétylcholinestérase, antiradicalaire et larvicide

Les extraits bruts DCM et MeOH ont démontrés des activités antifongiques contre *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans*, une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, des activités inhibitrice de l'acétylcholinestérase et antiradicalaire au DPPH. De plus, ces extraits ont montrés une forte activité larvicide contre *Aedes aegypti* (Cf. Fig. 3.46 et 3.47).

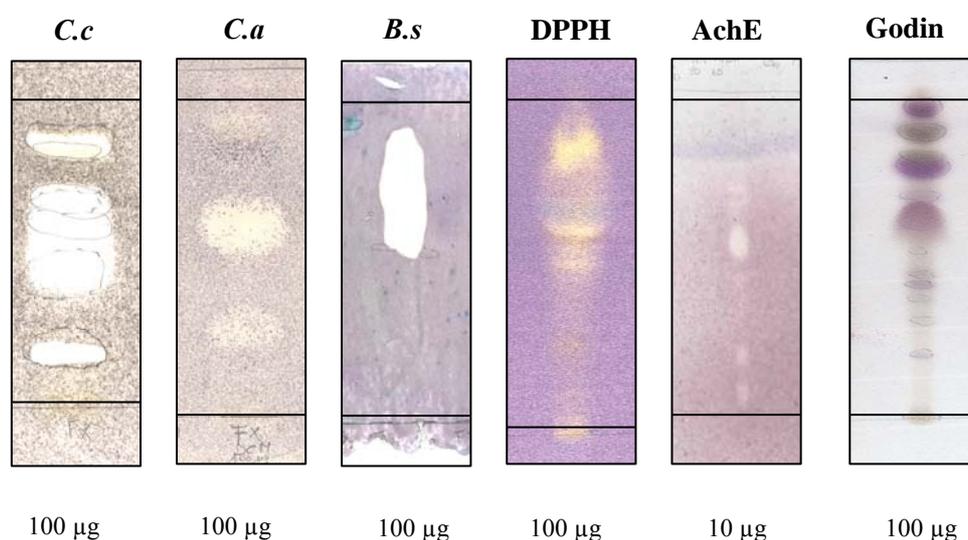


Figure 3.46 – Screening d'activités sur plaque CCM de l'extrait DCM de *Zanthoxylum zanthoxyloides*.

Système d'élution: CH₂Cl₂-MeOH (90:10)

Ces activités ont été aussi évaluées sur les produits purs. Ainsi, l'activité antifongique et l'activité antibactérienne ont été évaluées sur plaque CCM et testées en dilution dans l'agar (Rahalison, 1994), afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les activités inhibitrice de l'acétylcholinestérase et antiradicalaire ont été réalisées sur plaque CCM. Les activités larvicides des produits purs isolés ont été mesurées en solution. Les résultats enregistrés lors des différents tests ont été récapitulés dans le tableau 3.4.

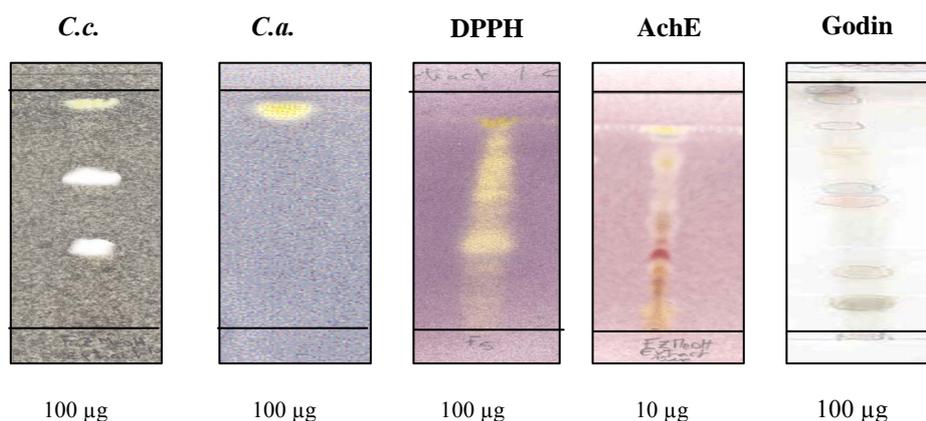


Figure 3.47 – Screening d’activités sur plaque CCM de l’extrait MeOH de *Zanthoxylum zanthoxyloides*.

Système d’élution: CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:5)

D’après ces résultats, nous constatons que les produits **B**, **C**, **E** et **I** ont montré une activité particulièrement importante contre *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans*, ainsi que contre *Bacillus subtilis*.

Pour les produits **E** et **I**, l’activité antibactérienne s’est révélée plus importante que celle du chloramphénicol.

Les composés **D**, **G**, **H**, **L**, **N** et **O** ont été actifs contre *Cladosporium cucumerinum*, *Bacillus subtilis* et ont montré une activité antiradicalaire. Par ailleurs, seuls les composés **E** et **I** se sont révélés actifs en solution contre *Aedes aegypti*, ces deux produits ont été déjà mentionnés à plusieurs reprises pour leur activité insecticide (Weenen *et al.*, 1990). Une inhibition de l’acétylcholinestérase a été observée pour les composés **E**, **I** et **M**. Cependant, cette activité reste faible comparée à celle de la galanthamine, substance de référence qui est active à 0.01µg (Marston *et al.*, 2002).

Tableau 3.4 – Evaluation des activités biologiques des produits purs isolés.

Produits purs	<i>C. cucumerium</i> **	<i>C. albicans</i> *	<i>B. subtilis</i> *	AChE*	DPPH*	<i>Aedes aegypti</i>
A	-	-	-	-	-	-
B	2 µg/ml	10 µg	10 µg	-	-	-
C	5 µg/ml	10 µg	10 µg	-	-	-
D	2 µg/ml	-	10 µg	-	-	-
E	2.5 µg/ml	5 µg	0.1 µg	0.2 µg	10 µg	12 µg/ml
F	-	-	-	-	10 µg	-
G	10 µg/ml	-	10 µg	-	10 µg	
H	20 µg/ml	-	10 µg	-	10 µg	-
I	2 µg/ml	5 µg	0.1 µg	1 µg	-	10 µg/ml
J	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-
L	10 µg/ml	-	10 µg	-	10 µg	-
M	-	-	-	5 µg	10 µg	-
N	10 µg/ml	-	10 µg	-	10 µg	-
O	10 µg/ml	-	10 µg	-	10 µg	-
Référence	Miconazole 1 µg	Miconazole 0.1 µg	Chloramphenicol 1 µg	Galanthamine 0.01 µg	Quercétine 1 µg	β-asarone 15 µg/ml

** quantité minimale de composé (µg/ml) nécessaire pour inhiber la croissance lors de test de dilution dans l'agar.

* quantité minimale de composé (µg) nécessaire pour inhiber la croissance sur plaque CCM.

3.2.8.2. Activité anti-carie contre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Streptococcus mutans ATCC 25175 est une bactérie gram positif, présente de façon prédominante dans la cavité buccale. C'est l'un des principaux microorganismes impliqués dans la genèse de la carie dentaire (Ferron, 1994).

Les extraits DCM et MeOH de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, ainsi que les produits purs ont été testés en dilutions contre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 par Monsieur le Prof. Celso Vataru Nakamura de la Fundação Universidade Estadual de Maringá, Brasil (Cf. Fig. 3.48). Les résultats enregistrés lors de ce test ont été récapitulés dans le tableau 3.5.

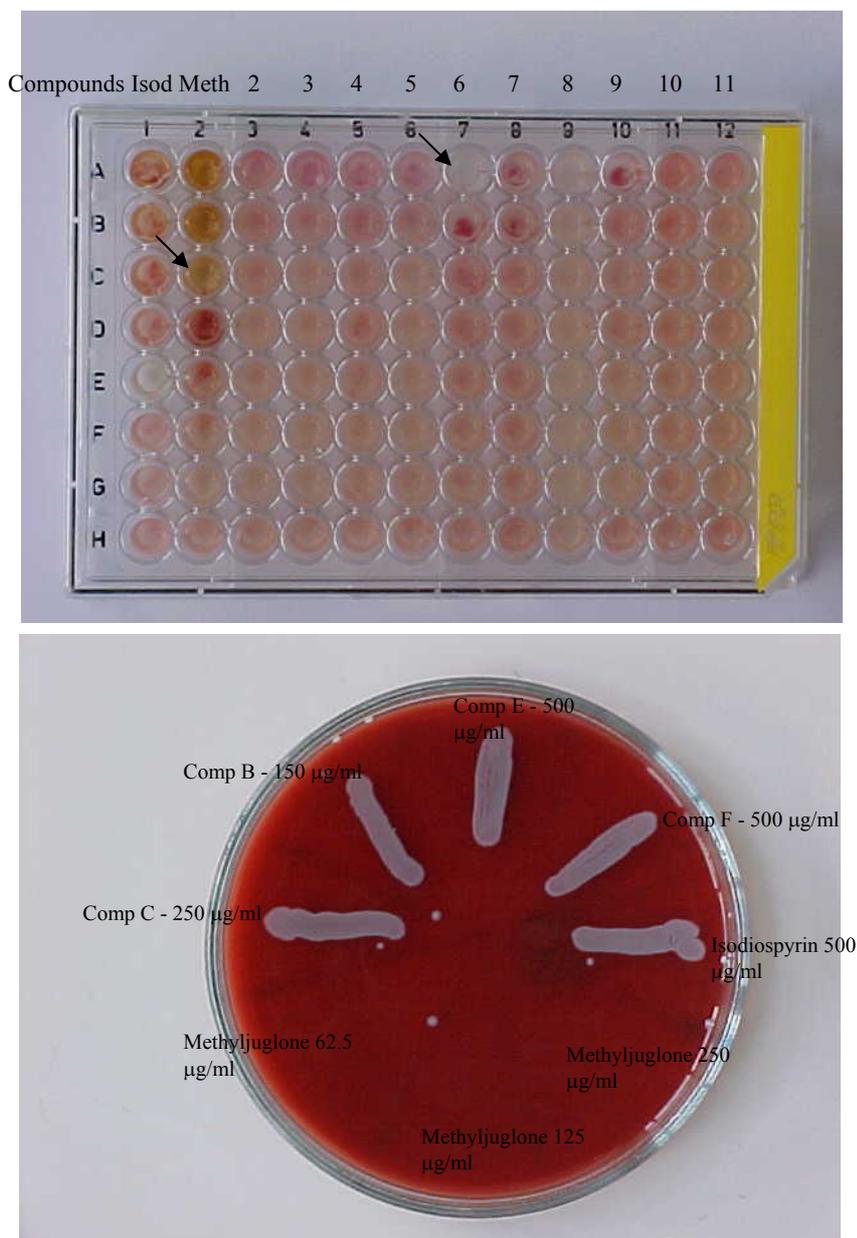


Figure 3.48 – Evaluation de l’activité antibactérienne contre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 sur microplaque.

Tableau 3.5 – Evaluation de l’activité antibactérienne contre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Extraits / Produits purs	(CMI) µg/ml	(CMB) µg/ml
<i>F. z.</i> DCM	125	125
<i>F. z.</i> MeOH	>1000	>1000
B	>150	>150
C	>250	>250
D	500	500
E	>500	>500
F	>500	>500
G	>500	>500
H	>500	>500
I	>500	>500
J	>500	>500
K	>500	>500
L	n.d.	n.d.
M	n.d.	n.d.
N	n.d.	n.d.
pénicilline	0.00975	-

CMI : Concentration minimale inhibitrice (µg/ml).

CMB: Concentration minimale bactéricide (µg/ml).

n.d. : activité non déterminée

L'évaluation de l'activité se fait selon la méthode proposée par Pessini *et al.* (2003):

- pour une CMI < 100 µg/ml, l'activité antibactérienne est bonne
- pour 100 < CMI < 500 µg/ml, l'activité antibactérienne est moyenne
- pour une 500 < CMI < 1000 µg/ml, l'activité antibactérienne est faible
- pour une CMI > 1000 µg/ml, l'activité antibactérienne est nulle

D'après ces résultats, nous constatons que l'extrait dichlorométhane a montré une activité bactérienne importante, tandis que l'extrait méthanolique est inactif. Les produits **B**, **C** et **D** ont aussi montré une activité contre *Streptococcus mutans*, mais cette activité reste modérée comparée à celle de la pénicilline, substance de référence utilisée pour ce test, avec laquelle une quantité minimale de 0.00975 µg/ml est suffisante pour observer un effet (Pessini *et al.*, 2003). Quant aux produits **E-K**, leur activité est faible. Par conséquent, on peut dire que tous ces produits agissent en synergie et qu'ils sont responsables de l'importante activité antibactérienne de l'écorce de racine de *Zanthoxylum zanthoxyloides* Zepernick et Timler.

3.3. Etude HPLC-UV-MS des extraits dichlorométhaniques de trois espèces de *Zanthoxylum*

Les extraits dichlorométhaniques de l'écorce des racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Mali), et de l'écorce des tiges de *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. (Guinée) et de *Zanthoxylum madagascariensis* Baker (Madagascar). ont été analysées par HPLC/UV/APCI-MS, en mode positif, afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la nature chimique et la masse des constituants (Fig. 3.49). Les extraits ont été injectés sur deux colonnes HPLC (Zorbax Eclipse XDB-Phenyl, 250 mm) connectées en série, pour obtenir une meilleure résolution.

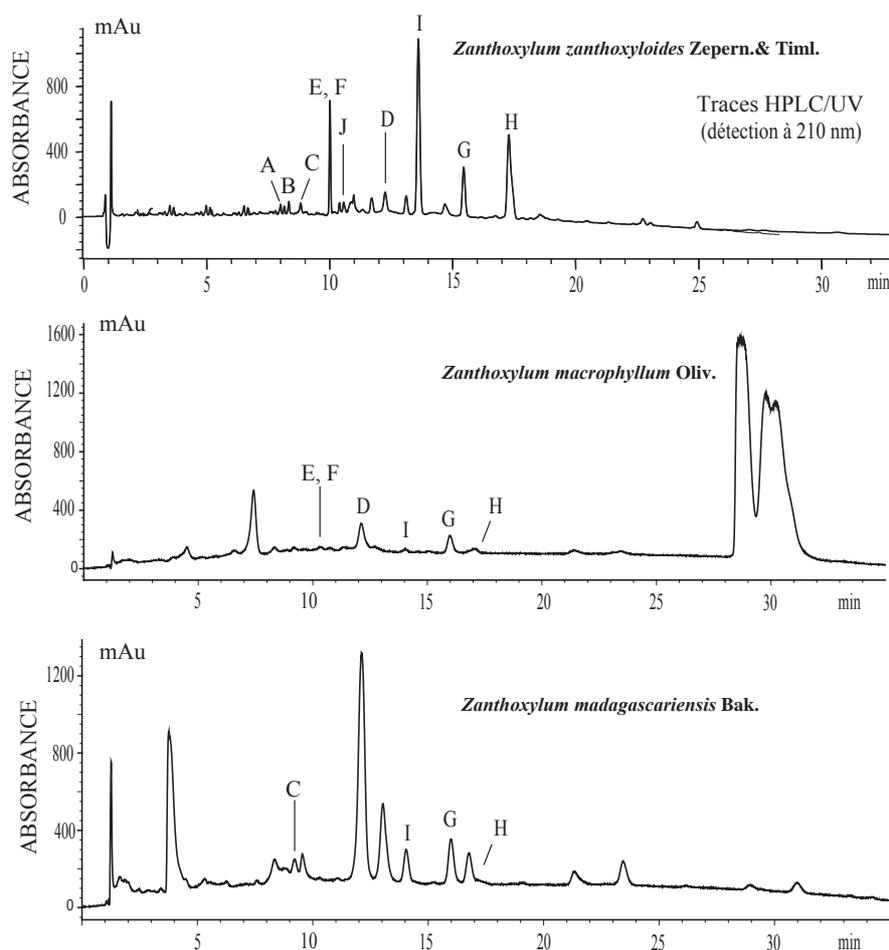


Figure 3.49 - Profil chromatographique des extraits dichlorométhaniques des *Zanthoxylum* analysés par HPLC/UV/APCI-MS

Conditions de séparation : 2 colonnes HPLC Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 250 mm ; éluant : MeCN/H₂O
20 à 100 % sur 35 min., $\lambda = 210$ nm

Cette analyse vient compléter l'étude effectuée sur l'extrait dichlorométhanique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Ainsi, après comparaison des spectres UV et des masses obtenues *on-line* des différents pics, nous observons une certaine similitude dans la composition de *Zanthoxylum zanthoxyloides* et *Zanthoxylum macrophyllum*. Par contre, seuls les composés **C**, **I**, **G** et **H** ont pu être détectés chez l'espèce *Zanthoxylum madagascariensis*.

Par ailleurs, peu de travaux sur l'espèce *Zanthoxylum madagascariensis* ont été entrepris, ce qui permet de conclure que son investigation est souhaitable.

3.4. Etude HPLC-UV-MS des extraits méthanoliques de trois espèces de *Zanthoxylum*

Les extraits méthanoliques de l'écorce des racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, de la racine de *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. et de l'écorce des tiges de *Zanthoxylum madagascariensis* Baker ont été analysés par HPLC/UV/APCI-MS, en mode positif, afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir une information sur la nature chimique et la masse des constituants (Fig. 3.50).

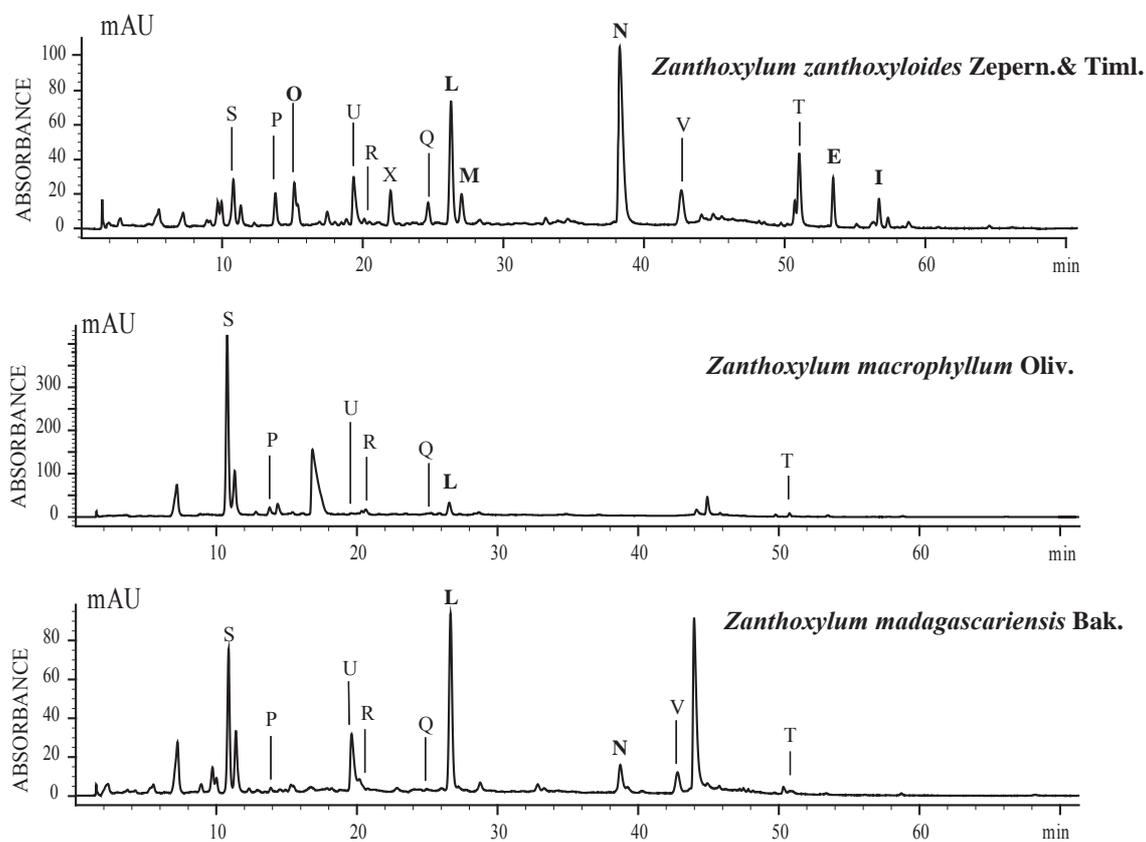


Figure 3.50 - Profil chromatographique des extraits méthanoliques des *Zanthoxylum* analysés par HPLC/UV/APCI-MS

Conditions de séparation : colonne RP-18 Nova-Pak® 250 mm, gradient : MeCN/H₂O 2:98 → 100:0 sur 60 min., puis 100:0 sur 5 min., $\lambda = 287$ nm

Les profils chromatographiques des trois espèces apparaissent assez similaires. Ainsi, après comparaison de leurs spectres UV et de leurs masses obtenues *on-line* après l'analyse HPLC/UV/APCI-MS, les composés suivants furent identifiés dans les extraits méthanoliques des trois espèces. Il s'agit de: l'héspéridine (**L**) (m/z 611), l'un des dérivés de l'acide quinique et vanillique (**Burkinabine A**, **Burkinabine B** et **Burkinabine C**) (m/z 493) (**P**), récemment identifiés dans l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* par Ouattara et al. (2004), ainsi que de la chélérythrine (**Q**) (m/z 349) et quatre de ses dérivés: norchélérythrine (**R**) (m/z 335), 6-(2-oxybutyl) dihydrochélérythrine (**S**) (m/z 420), 6-hydroxy-dihydrochélérythrine (**T**) (m/z 366) et avicine (**U**) (m/z 333), ainsi que l'amide phénolique l'arnottianamide (**V**) (m/z 382).

Seule l'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* semble contenir le composé **M**, composé possédant une fonction endoperoxyde.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de la présente étude ayant pour objectif la recherche de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique, 12 extraits provenant de 4 espèces maliennes choisies sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle, ont été évalués à l'aide de méthodes de criblage chimique et biologique, afin de mettre en évidence les espèces les plus intéressantes du point de vue de l'activité. Sur la base des résultats obtenus lors de ce screening, l'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae) a ainsi été sélectionnée pour une investigation phytochimique approfondie, ce qui a permis d'isoler 15 composés (**A-O**), dont 2 nouveaux produits naturels, 10 produits naturels antifongiques et antibactériens et de caractériser 7 autres composés par LC/MSⁿ (**P-V**).

Parmi ces produits actifs, les amides phénolique et oléfinique **E** et **I**, ont montré une activité antibactérienne qui s'est révélée plus importante que celle du chloramphénicol, substance de référence utilisée pour dépister l'activité contre *Bacillus subtilis*. Par ailleurs, ces composés ont été actifs en solution contre *Aedes aegypti* et sont de ce fait responsables de l'activité larvicide observée pour l'extrait DCM.

Trois dérivés du phénylpropane **B**, **C** et **D** ont montré une activité particulièrement importante contre *Cladosporium cucumerinum*, ainsi que contre *Bacillus subtilis*. Cette activité est plus importante pour les composés **B** et **D**, dont l'unité *O*-prényle possède une fonction alcène. Ces produits ont aussi montré une faible activité contre *Streptococcus mutans* comparée à celle de la pénicilline, utilisée comme témoin positif.

Les composés **E**, **F**, **G**, **H**, **L**, **M**, **N** et **O** ont montré une faible activité antiradicalaire par rapport à la quercétine. Une inhibition de l'acétylcholinestérase a été observée pour les composés **E**, **I** et **M**. Cependant, cette activité reste faible comparée à celle de la galanthamine, substance de référence qui est active à 0.01 µg.

L'utilisation des techniques analytiques couplées LC/UV, LC/MS et LC/MSⁿ pour comparer le profil chromatographique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, originaire du Mali, avec ceux de deux autres espèces *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv., originaire du Guinée, et *Zanthoxylum madagascariensis* Baker, originaire de Madagascar, et obtenir une information sur la nature chimique et la masse des constituants, a permis de mettre en évidence *on-line* 7 composés connus dans les extraits méthanoliques. Parmi ces composés,

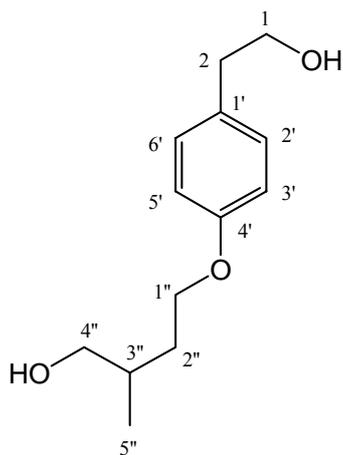
se trouve les dérivés de l'acide divanilloylquinique (**P₁₋₃**), la chélérythrine (**Q**) et quatre de ses dérivés: norchélythrine (**R**), 6-(2-oxybutyl)-dihydrochélythrine (**S**), 6-hydroxy-dihydrochélythrine (**T**) et avicine (**U**), ainsi qu'une amide phénolique l'arnottianamide (**V**).

L'analyse de l'extrait méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* par LC/MSⁿ a permis en outre, de mettre en évidence un composé inconnu **X**, dont le spectre UV et le spectre de masse sont similaires à ceux du composé **M**, un nouveau produit naturel possédant une fonction endoperoxyde et qui avait présenté une faible activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, une enzyme impliquée dans la maladie d'Alzheimer. L'isolement de ce produit n'a pas été possible au cours du présent travail.

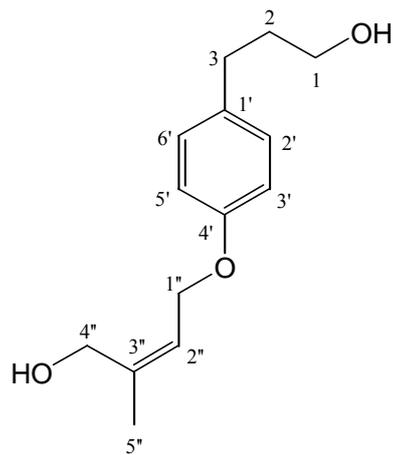
L'activité antimalarique du composé **M**, vu la présence de la fonction endoperoxyde tout comme l'artémisinine, fut aussi testée, le résultat négatif obtenu ne justifie pas le développement ultérieur dans ce domaine, mais cela n'empêche pas de l'essayer sur d'autres cibles biologiques.

En conclusion, les activités fongicides contre *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans* et bactéricides contre *Bacillus subtilis* et *Streptococcus mutans*, mises en évidence sur plaque CCM et par les tests de dilution dans l'agar des composés isolés, permettent de justifier l'utilisation de *Zanthoxylum zanthoxyloides* comme brosse à dents africaine. Des tests d'adhérence contre d'autres cibles bactériennes sont en cours à la Fundação Universidade Estadual de Maringá, Brasil chez le Prof. Celso Vataru Nakamura.

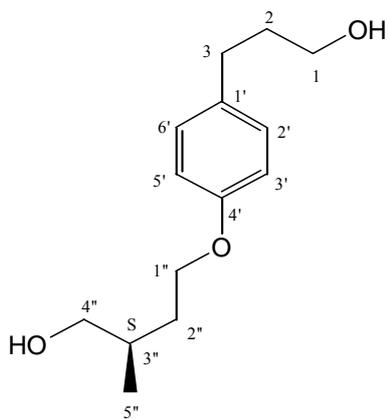
Les techniques couplées de pointe LC/UV, LC/MS et LC/MSⁿ utilisées dans cette étude ont montré leur apport inestimable dans le domaine de la recherche phytochimique et les applications futures dans le domaine de dérégulation d'extraits bruts, une procédure utilisée en phytochimie pour éviter de ré-isoler des produits connus. En effet, de très faibles quantités de matériel végétal sont nécessaires, ce qui permet de sauvegarder les espèces menacées de disparition.



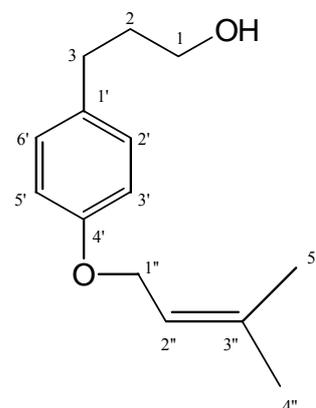
A* : 4'-O-(4''-hydroxy-3''-méthylbutyloxy)-2-phénylethanol



B: 4'-O-(4''-hydroxy-3''-méthylbut-2''-enyloxy)-3-phénylpropanol (Cuspidiol)

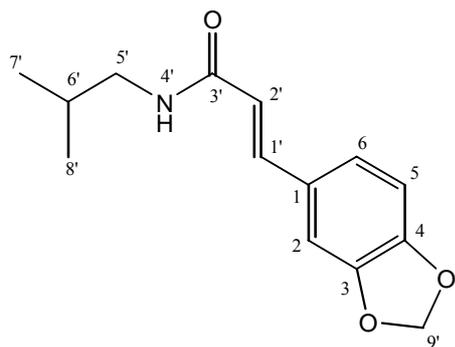


C: 4'-O-(4''-hydroxy-3''-méthylbutyloxy)-3-phénylpropanol (Dihydrocuspidiol)

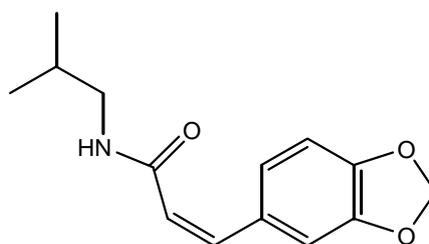


D: 4'-O-(3''-méthylbut-2''-enyloxy)-3-phénylpropanol

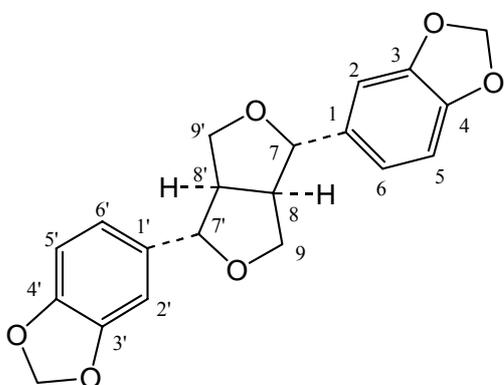
* produit nouveau



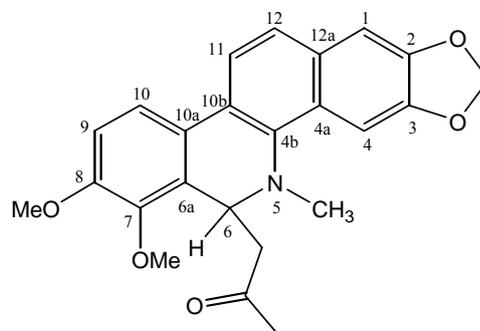
E : *trans*-Fagaramide



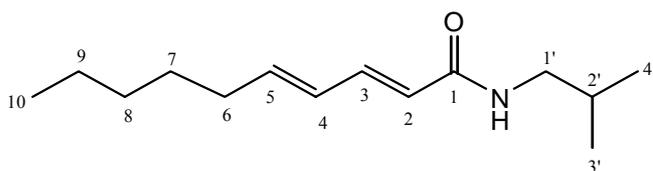
F : *Cis*-Fagaramide



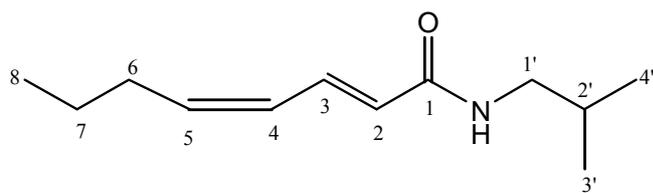
G : (+)-Sésamine



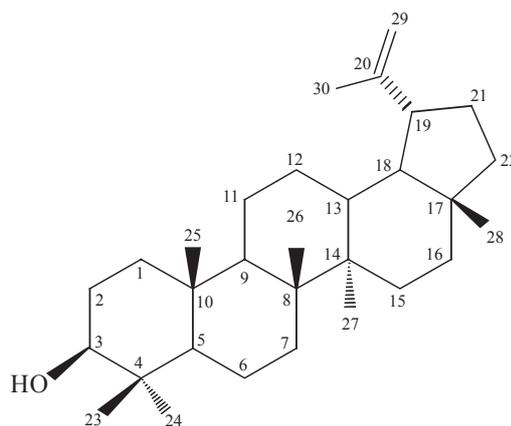
H : 6-Acétyldihydrochélérythrine



I: N-isobutyl-(*2E,4E*)-déca-2,4-diènamide
(Pellitorine)

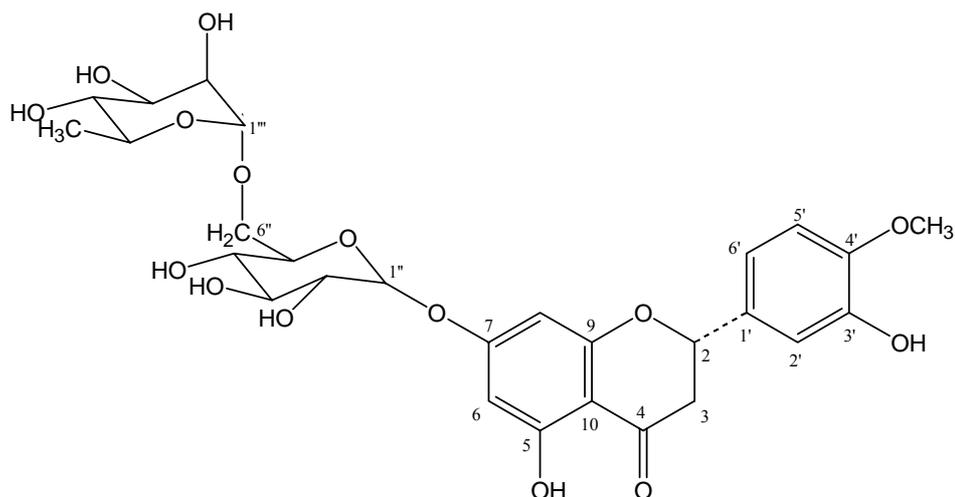


J: N-isobutyl-(2*E*,4*Z*)-octa-2,4-dièneamide

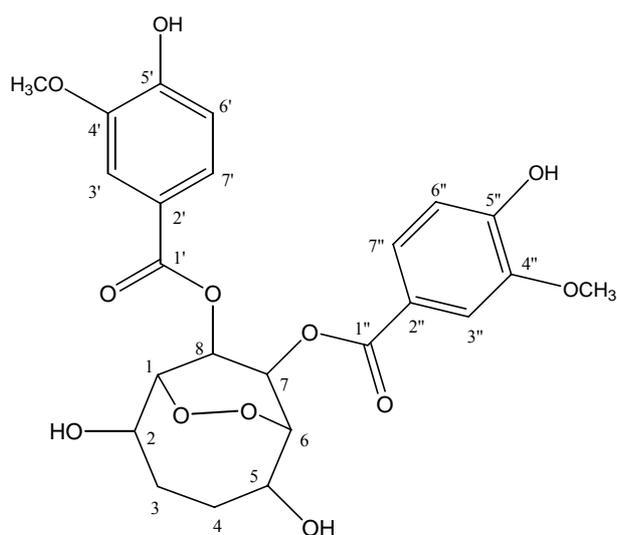


K: Lupéol

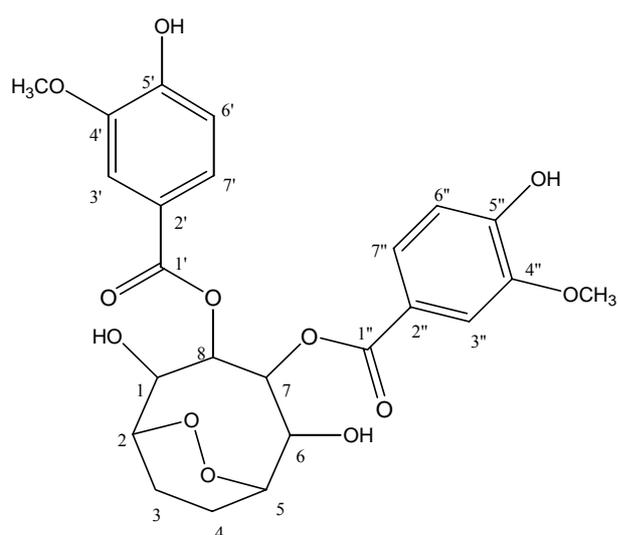
Figure 4.1 – Structures et noms des composés isolés de l'extrait DCM de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler.



L : Hespéridine (7-*O*-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosyl]-3', 5, 7-trihydroxy-4'-méthoxy-4'-méthoxyflavanone)



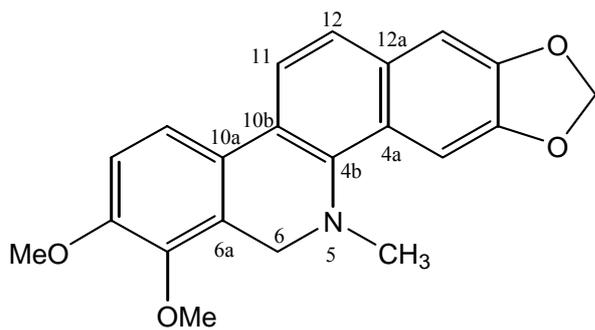
ou



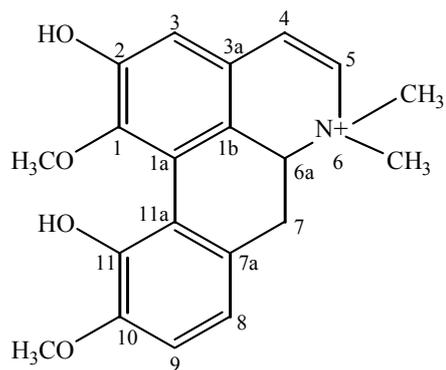
M*: 7,8-di-*O*-(3-méthoxy-4-hydroxybenzoyl)-2,5-dihydroxycyclooctane-1,6-endopéroxyde .

M*: 7,8-di-*O*-(3-méthoxy-4-hydroxybenzoyl)-1,6-dihydroxycyclooctane-2,5-endopéroxyde .

* produit nouveau

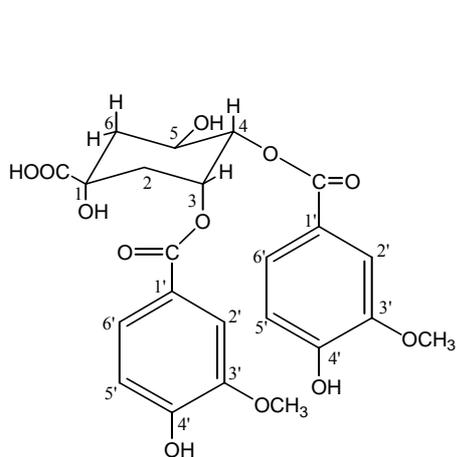


N: Dihydrochélythrine

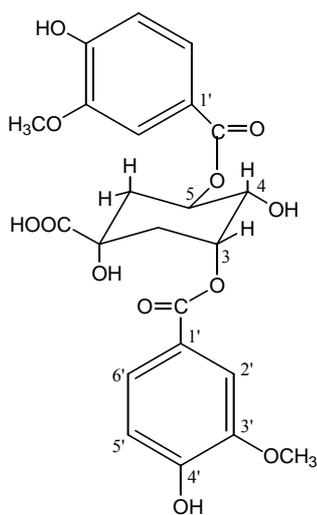


O : N,N-diméthyllindcarpine

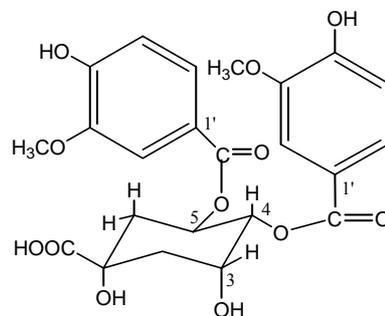
Figure 4.2 – Structures et noms des composés isolés de l'extrait MeOH de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler.



Burkinabine A

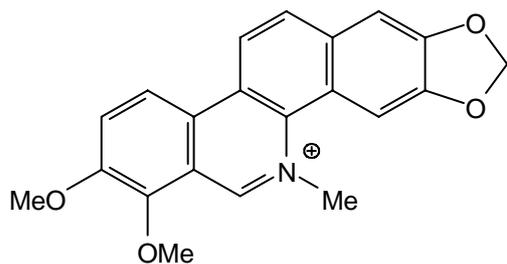


Burkinabine B

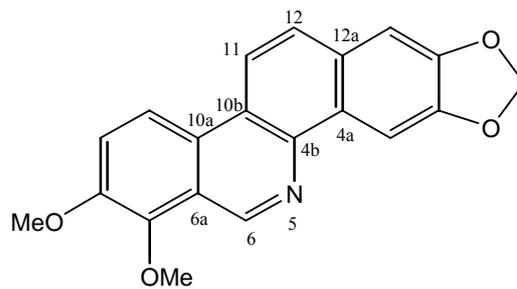


Burkinabine C

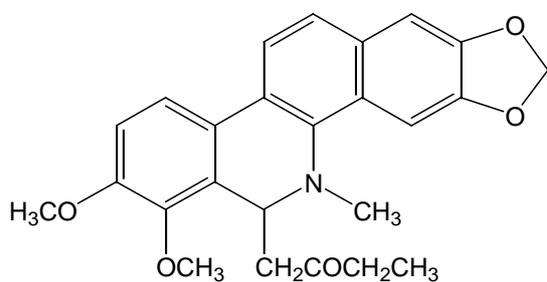
P₁₋₃: Dérivés de l'acide divanilloylquinique



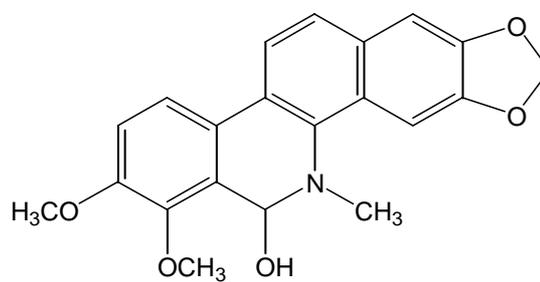
Q: Chélérythrine



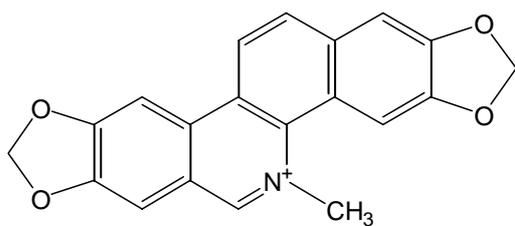
R: Norchélythrine



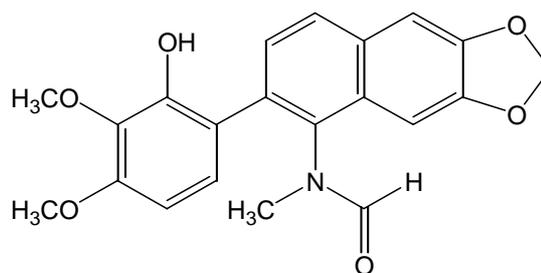
S: 6-(2-oxybutyl) dihydrochélythrine



T: 6-hydroxy-dihydrochélythrine



U: Avicine



V: Arnottianamide

Figure 4.3 – Structures et noms des composés mis en évidence *on-line* dans l'extrait MeOH de l'écorce de racines de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timle

5. PARTIE

EXPERIMENTALE

5.1. Matériel végétal et extraction

L'écorce de racines de l'espèce *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Rutaceae) a été achetée au marché de Bamako au Mali, en mai 2000. La plante a été identifiée par un botaniste local et un échantillon de référence se trouve à l'herbier de l'Institut de Pharmacognosie et Phytochimie de l'Université de Lausanne, Switzerland (n° 2000022).

Dans un premier temps, le matériel végétal a été broyé en présence d'azote liquide (N₂), afin d'éviter toute dégradation thermique. Ainsi, la drogue pulvérisée présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, ce qui permettra d'améliorer le rendement d'extraction.

Dans notre laboratoire, la méthode d'extraction de routine employée est la macération successive par deux solvants de polarité croissante: le dichlorométhane et le méthanol. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas, 1,5 l de solvant pour 250 g de drogue). L'extraction est effectuée trois fois pour chaque solvant sous agitation continue et à température ambiante durant 24 heures. Après filtration, évaporation du solvant et lyophilisation, on obtient 16.5 g (5.37 %) d'extrait brut dichlorométhanique (DCM), respectivement 19 g (6.19 %) d'extrait brut méthanolique (MeOH).

Un extrait aqueux (H₂O) a été aussi effectué. Ainsi, la drogue pulvérisée (50 g) a été extraite avec 500 ml d'eau de la même façon que celle décrite ci-dessus. Dans ce cas précis et afin de favoriser le contact entre la drogue et le solvant, un passage préalable du mélange dans un bain à ultrasons était nécessaire. Après filtration et lyophilisation, on obtient 3 g (2.07 %) d'extrait brut aqueux (H₂O).

La même méthode d'extraction a été appliquée aux deux autres espèces *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv., originaire originaire de Guinéeet *Zanthoxylum madagascariensis* Baker, originaire de Madagascar.

5.2 Méthodes chromatographiques analytiques

5.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses sur couche mince (CCM, TLC en anglais) sont effectuées en phase normale, dans la plupart des cas, avec des plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ déposées sur feuille d'aluminium (Merck), ce qui constitue la phase stationnaire. Ces plaques sont ensuite plongées dans des cuves conventionnelles en verre (Camag), remplies à environ 0,5 cm avec une phase mobile, qui peut être généralement un mélange binaire ou ternaire de solvants, selon le type de séparation recherchée. Dans notre cas, les systèmes de solvants ainsi que les réactifs utilisés pour les différentes classes de composés sont les suivants:

Extrait DCM : CH₂Cl₂-MeOH (95:5)

Extrait MeOH : CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:5)

Après son développement, la plaque CCM est observée à l'extinction de la fluorescence à 254 nm et à 366 nm et après dérivatisation chimique avec l'un des réactifs chimiques en solution afin de mettre en évidence des constituants ou classes de constituants présents dans l'extrait brut. L'utilisation d'un réactif polyvalent, comme le réactif de Godin, est particulièrement utile pour réunir de façon judicieuse les fractions primaires récoltées suite à une séparation préparative ou semi-préparative. Ainsi, les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants:

Réactif de Godin (Godin, 1954): réactif polyvalent

Le réactif de Godin est préparé en mélangeant des volumes égaux d'une solution éthanolique de vanilline 1% avec une solution d'acide perchlorique à 3%. Les plaques de silice sont giclées successivement avec ce réactif, puis avec une solution éthanolique d'acide sulfurique à 10%. Elles sont ensuite chauffées à 100°C jusqu'à apparition de taches de couleurs diverses à la lumière visible.

NST/PEG (Naturstoff-Polyethylenglykol):

Vaporiser successivement une solution méthanolique de diphenylboryloxy-éthylamine à 1% (= NST) et une solution éthanolique de polyéthylène glycol 4000 à 5% (= PEG) sur les plaques. Les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescences, orange, rouge, jaune, bleue et verte sous UV à 366nm (Wagner et Blatt, 1996).

Réactif de Dragendorff (Ph. Eur. III): détection des alcaloïdes

Préparer une solution composée de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dans 40 ml d'eau (= A) et une solution contenant 16 g de KI dans 40 ml d'eau (= B). Mélanger extemporanément 5 ml de A, 5 ml de B, 100 ml d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque. Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange (Wagner et Blatt, 1996).

Acétate de plomb: détection des coumarines

Préparer une solution d'acétate de plomb à 5 % et la vaporiser sur la plaque. Les coumarines apparaissent sous forme de taches fluorescentes vertes à 366 nm (Wagner et Blatt, 1996).

Par ailleurs, cette technique est simple d'emploi, peu coûteuse et reste un outil de choix pour l'analyse phytochimique de routine d'extraits bruts, de fractions, ainsi que des produits purs isolés. C'est également un support facile d'emploi, pour la mise en évidence des activités sur certaines cibles chimiques, biologiques et enzymatiques utilisées en routine dans notre laboratoire. Les quantités déposées sont généralement de l'ordre de 100 µg pour les extraits bruts et de 10 µg pour les produits purs.

5.2.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection UV-visible à barrettes de diodes (LC/DAD-UV)

Les analyses LC/DAD-UV ont été effectuées à l'aide d'un HPLC couplé à un détecteur UV à réseau de diodes intégré de type HP-1090 series II et HP-1100 (Hewlett Packard). Ces appareillages, pilotés par le logiciel HP ChemStations, permettent de travailler en mode isocratique, où la phase mobile est de composition constante, ou en mode gradient, où la composition de la phase mobile est variable en cours d'analyse.

Ces analyses ont été principalement réalisées en phase inverse avec des colonnes RP-18 Nova-Pak (Waters) (4 μm , 150 \times 3.9 mm d.i.) et (4 μm , 250 \times 4.6 mm d.i.) en utilisant dans les deux cas une précolonne Nova-Pak Guard RP-18 (Waters).

Les conditions chromatographiques standard utilisées pour *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, *Zanthoxylum madagascariensis* L. et *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. ont été:

- un gradient MeCH/H₂O 20 % à 100 % en 35 minutes pour les extraits DCM ;
- un gradient MeCH/H₂O 2:98 \rightarrow 100:0 sur 60 minutes, puis 100:0 sur 5 min pour les extraits MeOH.

Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité HPLC (SpS, Romil), additionnés de 0.05 % d'acide trifluoroacétique (TFA), le débit est réglé à 1 ml/min, la pression de travail d'environ 100-150 bars et les longueurs d'onde de mesure fixées à 210, 254 et 287 nm.

En règle générale, pour l'analyse HPLC/UV des extraits bruts, des solutions à 10 mg/ml ont été utilisées. Le solvant d'injection était de composition identique à celui employé lors de l'analyse et le volume d'injection fixé à 10 μl .

5.2.3. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS)

Les analyses LC/UV/MS ont été effectuées sur l'appareillage constitué des éléments suivants :

- un système HPLC HP-1100 (dégazeur, pompe, injecteur et détecteur DAD-UV) permettant l'élution en mode gradient ;
- une interface de type APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) qui permet l'élimination de la phase éluante avant l'ionisation ;
- un spectromètre de masse LCQ (Finnigan MAT) à analyseur à piège d'ions (*ion trap*).

Les paramètres utilisés lors de l'ionisation en mode APCI étaient les suivants : génération d'ions positifs ; courant de décharge de l'électrode (*corona discharge*): 5,0 μA ; température du capillaire: 150°C ; température du vaporisateur: 370°C ; pression du gaz de nébulisation (*sheath gas* ; N_2): 80 psi. Les ions obtenus en mode positif sont de type $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Afin d'obtenir une meilleure résolution, les extraits DCM ont été injectés sur deux colonnes HPLC Zorbax Eclipse XDB-Phenyl (250 \times 4.6 mm d.i.), connectées en série.

Les conditions chromatographiques standard utilisées pour *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler, *Zanthoxylum madagascariensis* L. et *Zanthoxylum macrophyllum* Oliv. ont été:

- un gradient MeCH/H₂O 2:98 \rightarrow 100:0 sur 60 minutes, puis 100:0 sur 5 min pour les extraits MeOH.

Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité HPLC (SpS, Romil), additionnés de 0.2 % d'acide acétique, le débit est réglé à 0.7 ml/min, la pression de travail est de 400 bars et les longueurs d'onde de mesure fixés à 210, 254 et 287 nm.

En spectrométrie de masse tandem à plusieurs étapes (*multiple stage tandem mass spectrometry, MSⁿ*), les ions sont isolés dans l'analyseur à trappe d'ions et excités sélectivement, afin de produire des fragments qui sont à leur tour détectés. Cette opération, abrégée MS², peut être répétée sur les fragments, générant ainsi des spectres MSⁿ à plusieurs étapes.

5.3. Méthodes chromatographiques préparatives

5.3.1. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Le premier fractionnement de l'extrait brut DCM de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une phase stationnaire de silicagel 60 (63-200 µm, Merck). Les mécanismes de séparation sont les mêmes que ceux qui ont été décrits pour la TLC (Cf. 5.2.1). La taille de la colonne a été choisie en fonction de la quantité d'extrait à disposition. Les systèmes d'élution utilisés étaient composés de gradients CH₂Cl₂-MeOH dans des proportions déterminées au préalable sur couche mince avant la séparation. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse et l'introduction de l'extrait a donc eu lieu sous forme solide.

5.3.2. Chromatographie liquide à basse pression (LPLC, Lobar)

La chromatographie liquide à basse pression a été réalisée à l'aide d'une pompe Duramat 80 (CfG ProMinent), d'un détecteur UV à longueur d'onde fixe 2238 UVICORD S II (LKB Bromma) et d'un enregistreur Pharmacia LKB.REC 1. Les phases employées ont été de type RP-18 (40-63 µm, Merck) sur une colonne LiChroprep RP-18 (310 × 25 mm, Merck). Les systèmes d'élution utilisés étaient des mélanges binaires MeCN-H₂O dans des proportions variables au cours de l'analyse (*step gradient*). L'introduction de l'échantillon à séparer, préalablement dissout dans la phase mobile, s'est faite sous forme liquide. Les fractions sont

récoltées dans des tubes de 20 ml sur un collecteur Retriever II (ISCO). Le débit choisi était de 2 ml / min.

5.3.3. Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)

La chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) a été réalisée à l'aide d'une pompe Büchi 681, d'un détecteur à longueur d'onde fixe UV detector K 2001 (Knauer) et d'un enregistreur Pharmacia LKB.REC 1. La séparation a été réalisée sur une colonne LiChroPrep RP-18 (450 x 16 mm, Büchi) équipée d'une précolonne (Büchi) toutes deux remplies avec une phase inverse de type RP-18 (15-25 μm ; Merck). L'échantillon est introduit, sous forme solide mélangé à la phase inverse, dans une cartouche complétée avec du sable et reliée à la pré-colonne. Les systèmes d'élution utilisés étaient des mélanges binaires MeCN-H₂O dans des proportions variables au cours de l'analyse (*step gradient*). Les conditions chromatographiques ont été déterminées préalablement par analyse HPLC de l'échantillon sur une colonne Nova-Pak RP-18 (4 μm , 250 × 4.6 mm d.i.; Waters). Les fractions ont été récoltées avec un collecteur Büchi 684.

5.3.4. Chromatographie liquide à haute pression semi-préparative

Deux types d'appareillage de chromatographie liquide à haute pression semi-préparative ont été utilisés :

- Un système HPLC semi-préparative/analytique constitué d'une pompe Shimadzu LC-10AD, d'un détecteur UV LKB 2210 (LKB Bromma) et d'un enregistreur LKB 2151 (LKB Bromma). La séparation a été réalisée sur une colonne à compression radiale RCM 8 x 10 (Waters) avec une phase stationnaire $\mu\text{Bondapack C18}$ (10 μm). Le système de solvants MeCN-H₂O additionné de 0.05% de TFA a été employé. Les fractions ont été collectées manuellement.

- Un système de chromatographie à haute pression semi-preparatif de type Shimadzu SCL-8A, constitué d'une pompe Shimadzu LC-8A, d'un détecteur UV à longueurs d'onde variables LKB Bromma 2151 et d'un enregistreur LKB 2210 (LKB Bromma). Les conditions de séparation ont été optimisées par HPLC analytique Shimadzu LC-10AD en utilisant une colonne à compression radiale RCM 8 x 10 (Waters) avec une phase stationnaire μ Bondapack C18 (10 μ m). La séparation a été faite sur une colonne à compression radiale PrepLC 25 mm (Waters) avec la même phase stationnaire, μ Bondapack C18 (10 μ m). Le système de solvants MeCN-H₂O additionné de 0.05% de TFA a été employé. Les fractions ont été collectées manuellement.

5.3.5. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La chromatographie de partage centrifuge (CPC) a été utilisée pour séparer initialement les composés de l'extrait méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides*. Ce fractionnement a été effectué grâce à un appareil ITO (Multi-Layer-Coil-Separator-Extractor Model#1) avec une vitesse de rotation de 800 tours/min. Le système d'élution, constitué de la phase supérieure (Q→T) du mélange ternaire CHCl₃-MeOH-HOAc 0.5 % (5:5:3) était délivré par une pompe LC 300 de chez (Scientific Systems Inc. USA). La détection des composés a été réalisée grâce à un détecteur UV Multiwavelength (Knauer) à la longueur d'onde de 254 nm et les fractions ont été recueillies grâce à un collecteur automatique RediFrac (Pharma Biotech), et regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

5.4. Méthodes physico-chimiques

5.4.1. Point de fusion (P.F.)

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil à plaque chauffante de type FP 80/82 (Mettler). Les valeurs ont été relevées après observation du changement d'état au microscope et n'ont pas été corrigées.

5.4.2. Pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$)

Le pouvoir rotatoire des composés présentant un ou plusieurs carbone(s) asymétrique(s) a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type PE-241 MC (Perkin-Elmer). La mesure a été réalisée dans une cuve de 10 cm, à température ambiante, en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. La valeur de $[\alpha]_D$, exprimée en degrés, a été calculée au moyen de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha \times 1000}{C \times l}$$

α : angle de rotation en degrés lu sur le polarimètre

C : concentration de la solution mesurée en g/l.

l : longueur de la cuve de mesure en dm

Dans le chapitre 5.7, les concentrations se rapportant aux mesures polarimétriques sont exprimées par convention en g/100ml.

5.4.3. Spectres ultraviolets (UV)

Les spectres UV des composés isolés ont été mesurés en solution méthanolique à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis de type PE Lambda 20 (Perkin-Elmer), piloté par un ordinateur Celebris 466 (Digital) et géré par le logiciel d'applications PE (Perkin Elmer). Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre 5.7 sous la forme: λ_{\max} nm (log ϵ), où λ_{\max} nm représente les longueurs d'onde des maxima en nm. ϵ est l'absorbance molaire à ces longueurs d'onde, si la couche de solution traversée (b) est exprimée en centimètres et la concentration (c) en moles par litre dans la formule suivante (loi de Beer-Lambert):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Les réactifs de déplacement (d'après Markham, 1982) ont été utilisés pour la confirmation partielle de la structure du flavonoïde **L** par spectrophotométrie UV.

Les réactifs suivant ont été ajoutés:

NaOMe (base forte):

Ajouter 3 gouttes d'une solution de NaOMe (2.5 g de sodium métallique dans 100 ml de MeOH) à la solution méthanolique de flavonoïde. Ce réactif déprotone tous les groupes hydroxyles phénoliques.

NaOAc (base faible):

Ajouter une pointe de spatule de NaOAc anhydre à la solution méthanolique de flavonoïde. Ce réactif ne déprotone que les groupes hydroxyles les plus acides (OH-4' et OH-7').

NaOAc + H₃BO₃:

Ajouter une pointe de spatule d'acide borique à la solution méthanolique de flavonoïde additionnée de NaOAc. Ce réactif entraîne la formation de complexes avec les groupes *o*-dihydroxyles.

AlCl₃:

Ajouter 6 gouttes d'une solution méthanolique d'AlCl₃ 5 % à la solution méthanolique de flavonoïde. Ce réactif entraîne la formation de complexes acido-resistantes entre les hydroxyles et les fonctions cétones voisines, et des complexes acido-labiles avec les groupes *o*-dihydroxyles.

AlCl₃/HCl:

Ajouter 3 gouttes de HCl à 4 M à la solution méthanolique de flavonoïde additionnée d'AlCl₃. Ce réactif entraîne la formation de complexes hydroxy-cétoniques.

5.4.4. Spectres de masse (MS)

Les spectres de masse des produits purs isolés ont été obtenus en modes d'ionisation par impacte électronique (EI) et d'ionisation chimique par désorption (D/CI). L'appareillage utilisé dans notre laboratoire est un spectromètre de masse quadripolaire tandem du type TSQ 700 (Finnigan MAT) dont les paramètres sont les suivants :

- EI : Une énergie de 70eV a été appliquée sur le filament lors des analyses. La température de la sonde augmente de façon linéaire de 50 °C à 300 °C en 1 min. La température de la source et celle des quadripôles, quant à elles, sont maintenues respectivement à 150 °C et 70 °C.
- D/CI : Les produits déposés sur un filament ont été désorbés par une rampe de 50 à 1000 °C en 1 min. De l'ammoniac à une pression de 7-8 Torr dans la source est utilisé comme gaz réactif pour générer des ions positifs. La température de la source et celle des quadripôles sont maintenues respectivement à 150 °C et 70 °C.

Les spectres de masse à haute résolution ont été enregistrés en mode positif sur un spectromètre de masse à électrospray Bruker FTMS 4.7 T BioAPEX II (hrESI-MS). Ces analyses ont été menées par le Laboratoire de Chimie Organique du Prof. T. Jenny à l'Université de Fribourg.

5.4.5. Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été mesurés sur un appareil de type Unity Inova 500 (Varian), contenant une sonde multi-nucléaire (5 mm i.d.) et piloté par le logiciel Solaris VNMR (Varian) à des fréquences de 499.87 (¹H) et 125.70 MHz (¹³C). Les programmes de séquences impulsionsnelles fournies par le même fabricant ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, HSQC, NOESY et HMBC ainsi que les spectres NOE et DEPT. La caractérisation de la multiplicité des signaux ¹³C-NMR (expériences DEPT) a été effectuée

sous des angles θ de 90 °C (signaux CH positifs) et 135 ° (signaux CH et CH₃ positifs, CH₂ négatifs).

Les échantillons ont été solubilisés dans le chloroforme deutéré CDCl₃, DMSO-*d*₆, CD₃OD (Dr. Glaser SA). Les valeurs des déplacements chimiques (δ) sont exprimées en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne.

5.4.6. Spectres infra-rouge (IR)

Les spectres infra-rouge des composés **E**, **F**, **I** et **J** ont été mesurés sur un appareil de type Philips PU 9716. Pour cela, une quantité de 2 mg d'échantillon a été mélangée à 200 mg de KBr (qualité IR). La pastille a été obtenue à l'aide d'une presse Specadie P/N 3700 (Graseby Specac). Le balayage des nombres d'onde a été fait entre 4000 et 600 cm⁻¹ sur une durée de 20 minutes.

5.5. Méthodes chimiques

5.5.1. Acétylation des composés A et M

Afin de confirmer la position des groupements hydroxyles, les composés **A** et **L** ont subi une acétylation comme suite :

2 mg du composé à acétyler ont été dissous dans 2 ml de pyridine. Un excès d'anhydride acétique a été ajouté au mélange qui fut agité à température ambiante pendant 24 h. La réaction a été suivie par CCM sur silice, en utilisant les mélanges CH₂Cl₂ : MeOH (95 :5) pour le composé **A** et CHCl₃ : MeOH : H₂O (65 : 35 : 5) pour le composé **M**. Une extraction à l'AcOEt a suivi et la phase organique a été lavée avec une solution de CuSO₄ 2.5 % pour éliminer complètement la pyridine. La solution obtenue a été évaporée à sec. Ainsi, nous

avons pu obtenir 1.6 mg (58.2 %) du produit acétylé **A-a** et 1.2 mg (45.1 %) du produit acétylé **M-a**.

5.5.2. Hydrolyse acide des flavonoïdes O-glycosylés

Les aglycones ont été obtenus par hydrolyse acide comme suit :

1mg de composé ont été solubilisés dans 5ml de HCl 2N, puis maintenus à reflux pendant 2h. Les aglycones ont été ensuite extraits avec 3 x 20 ml d'AcOEt. Les phases organiques regroupées sont ensuite rincées avec 3 x 20ml d'eau, évaporées à sec et solubilisées dans une petite quantité de MeOH. Une CCM a été réalisée avec chacune des phases et les échantillons de référence à disposition afin d'identifier l'aglycone. La solution aqueuse est neutralisée avec du NaHCO₃ jusqu'à pH 6, puis évaporée à sec. Le résidu est repris dans 10ml de pyridine. Après filtration sur coton, la solution est évaporée à sec et le résidu repris dans 1ml de MeOH afin de déterminer par comparaison avec des témoins, l'identité des sucres par CCM. Le réactif (réactif à la diphenylamine) utilisé pour détecter ces sucres est le suivant : 0,5 g de diphenylamine sont dissous dans 25 ml de méthanol, 0,5 ml d'aniline et 2,5 ml d'acide *o*-phosphorique à 85 % sont ajoutés.

5.5.3. Test antioxydant

Dans notre laboratoire, le test chimique employé pour évaluer l'activité antioxydante sur CCM des extraits bruts et produits purs isolés, est basé sur la technique mise au point par Takao *et al.* (1994). La détection de cette activité est basée sur le principe de la capture des radicaux libres fournis par le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Lorsque le DPPH est réduit par un capteur de radicaux libres, sa couleur disparaît.

Au cours du screening général 100 µg des extraits ont été déposés sur plaque de silicagel 60 F₂₅₄ avec un support en aluminium. Le développement des plaques a été fait selon les conditions standard des extraits bruts décrites au chapitre 5.2.1. Les CCM ont été séchées puis révélées avec une solution méthanolique de DPPH à 2 mg/ml. En présence de composés

antioxydants, le DPPH est réduit en passant du pourpre au jaune ; le temps optimal de réaction est de 30 min (Cuendet *et al.*, 1997).

5.5.4. Test pour la détection d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme membranaire que l'on trouve dans les synapses est responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh). Les inhibiteurs de cette enzyme sont utilisés essentiellement dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, le traitement du glaucome et la myasthénie.

Cette activité a été testée selon la méthode mise au point par Marston *et al.* (2002), les extraits sont déposés à 2 concentrations, 10 et 15 µg et les produits purs à raison de 0.05, 0.5 et 5 µg sur une plaque de silicagel 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (Merck) et développés selon les conditions standards précédemment décrites. La plaque est ensuite giclée avec une solution d'acétylcholinestérase (Sigma) (1000 unités d'AChE dans 150 ml de tampon Tris-HCl 0.05 M à pH 7.8 contenant de l'albumine de sérum bovin pour stabiliser l'enzyme). Après un temps d'incubation de 20 min. à 37 °C dans une atmosphère humide, les plaques CCM sont pulvérisées avec un mélange (1:4) d'une solution éthanolique de naphtyl-1-acétate (2.5 mg/ml) et d'une solution aqueuse de sel Fast Blue B (2.5 mg/ml). Les composés actifs apparaissent sous forme de tâches claires sur un fond pourpre. La galanthamine (0.1 µg) est utilisée comme témoin positif.

5.6. Méthodes biologiques

5.6.1. Activité antifongique contre *Cladosporium cucumerinum*

Cladosporium cucumerinum est un champignon pathogène attaquant les plantes de la famille Cucurbitaceae. Le test bioautographique employé pour dépister l'activité antifongique contre

Cladosporium cucumerinum est basé sur la méthode mise au point par Homans et Fuchs (1970). 100 µg des extraits ont été déposés sur plaques de silicagel 60 F₂₅₄ avec un support en aluminium qui sont développées selon les conditions standards précédemment décrites. Les plaques sont ensuite giclées avec une suspension de conidies de *C. cucumerinum*, puis incubées 3 jours à température ambiante dans une atmosphère humide à l'abri de la lumière (Figure 5.1). Le champignon produisant des spores grises, aucun réactif n'est nécessaire pour la révélation de la plaque: les zones d'inhibition apparaissent blanches sur fonds gris. Le miconazole est déposé sur la plaque comme témoin positif (1 µg).

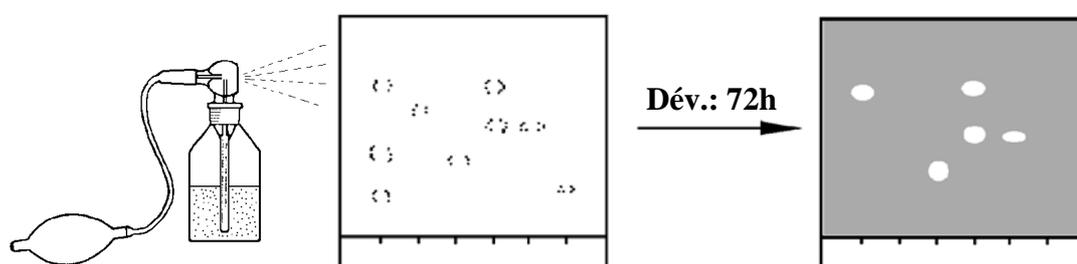


Figure 5.1- Principe de la bioautographie directe

Les produits purs antifongiques ont été testés en dilutions géométriques afin d'estimer la valeur de la quantité minimale inhibitrice sur plaque (en µg). Si nécessaire, des tests de dilution dans l'agar dans des plaques à 24 puits, selon la méthode mise au point par Rahalison (1994), ont été réalisés pour quantifier cette activité antifongique et déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), exprimée en µg/ml. Le miconazole a été utilisé comme substance de référence (1 µg).

5.6.2. Activité antifongique contre *Candida albicans*

Candida albicans, une levure saprophyte inoffensive chez l'homme sain peut devenir pathogène lors de déficiences du système immunitaire (HIV, chimiothérapies, transplantation d'organes). C'est un microorganisme opportuniste qui engendre alors une maladie du nom de candidose.

Ce test, basé sur les travaux de Rahalison (1991) est effectué sur des plaques de silicagel 60 F₂₅₄, avec un support en verre.

La souche de *Candida albicans* utilisée est fournie par le Dr Michel Monod du Service de Dermatologie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV). Après développement en boîte de Pétri sur gélose de Sabouraud (Biokar), une colonie de germe est prélevée et mise en culture dans 50 ml de Bouillon de Sabouraud (Biokar). Après agitation pendant 1 nuit à température ambiante, 1 ml de cette solution est prélevée afin d'inoculer 50 ml d'un second milieu de culture à base de Bouillon de Sabouraud (Biokar). Agiter à température ambiante pendant 6 heures, afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle du microorganisme. Par la suite, introduire 5 ml de cette solution dans chacune des fractions de 50 ml de milieu gélose à l'extrait de malt (Biokar), préparées et maintenues à l'état liquide à 45 °C. Nous obtenons alors des milieux contenant environ 10⁵ cellules/ml. 20 ml de cette suspension est suffisante pour couvrir une plaque CCM de 10 x 20 cm (Figure 5.2). Après incubation dans un milieu humide à 30 °C pendant une nuit, les plaques sont ensuite révélées à l'aide d'une solution aqueuse de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT) à 2.5 mg/ml. Ce produit est métabolisé par *Candida albicans* en un dérivé formazan violet, permettant ainsi de visualiser, après 4 heures d'incubation dans les mêmes conditions que précédemment, les zones d'inhibition incolores sur fond violet. Le miconazole est utilisé comme contrôle positif (0.1 µg), alors que le chloramphénicol est utilisé comme contrôle négatif (1 µg).

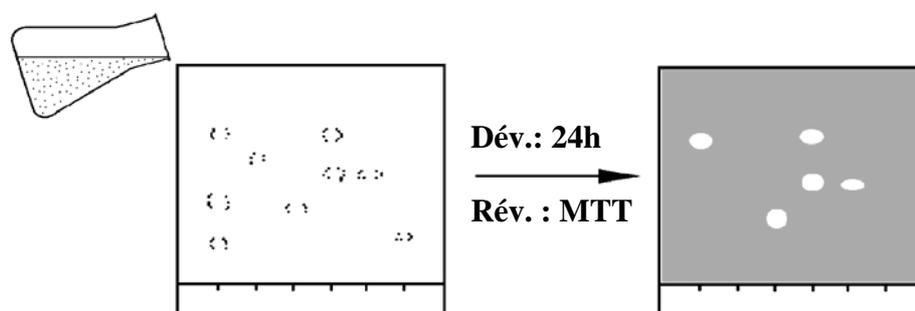


Figure 5.2- Principe de la bioautographie selon la technique 'agar overlay'

Comme pour *C. cucumerinum*, les produits purs antifongiques ont été testés en dilutions géométriques afin d'estimer la valeur de la quantité minimale inhibitrice sur plaque (en µg).

5.6.3. Activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*

L'activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis*, une bactérie aérobie à Gram positif, a été réalisée selon la méthode mise au point par Hamburger et Cordell (1987).

Le mode opératoire est similaire à celui utilisé pour le dépistage de l'activité antifongique contre *Candida albicans*, à savoir la bioautographie selon la technique 'agar overlay' (Cf.5.6.2).

Les plaques de silicagel 60 F₂₅₄, avec un support en verre sont développées de la même façon que pour le test avec *Candida albicans*.

La souche de *B. Subtilis* utilisée (ATCC 6633) est obtenue chez sigma. Après développement en boîte de Pétri sur gélose de Luria-Bertani (10 g/l tryptone + 5 g/l extrait autolytique de levure + 10 g/l NaCl + 15 g/l agar bactériologique type A ; Biokar), une colonie de germe est prélevée et mise en culture dans 50 ml de Bouillon de Luria-Bertani (gélose de Luria-Bertani sans l'agar). Agiter à température ambiante pendant 7 à 8 heures, afin d'atteindre la phase de croissance exponentielle du microorganisme. Par la suite, introduire 0.5 ml de cette solution dans chacune des fractions de 50 ml de gélose de Luria-Bertani, préparées et maintenues à l'état liquide à 45 °C. Nous obtenons alors des milieux contenant environ 10⁸ cellules/ml. 20 ml de cette suspension est suffisante pour couvrir une plaque CCM de 10 x 20 cm. Après incubation dans un milieu humide à 30°C pendant une nuit, les plaques sont ensuite révélées à l'aide d'une solution aqueuse de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT) à 2.5 mg/ml. Ce produit est presque instantanément métabolisé par *B. subtilis* en un dérivé formazan violet, permettant ainsi de visualiser les zones d'inhibition incolores sur fond violet, Le chloramphénicol est utilisé comme témoin positif (1 µg).

5.6.4. Activité antibactérienne contre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Streptococcus mutans ATCC 25175 est une bactérie gram positif, présente de façon prédominante dans la cavité buccale. C'est l'un des principaux microorganismes impliqués dans la genèse de la carie dentaire (Ferron, 1994).

Les extraits DCM et MeOH de *Zanthoxylum zanthoxyloides*, ainsi que les produits purs ont été testés en dilutions contre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 selon la méthode développée par le Prof. Celso Vataru Nakamura de la Fundação Universidade Estadual de Maringá, Brasil (Pessini *et al.*, 2003).

5.6.5. Activité larvicide contre *Aedes aegypti*

L'activité larvicide contre *Aedes aegypti*, un moustique vecteur de la fièvre jaune, a été réalisée selon la méthode mise au point par Cepleanu (1993).

Les oeufs d'*Aedes aegypti*, fournis par l'Institut Tropical Suisse de Bâle, sont préalablement incubés dans de l'eau de rivière à 27 °C pendant 24h. Les échantillons à tester sont préparés à raison de 5.5 mg d'extrait dans 110 µl de solvant (=50 mg/ml). Le DMSO sera utilisé pour les extraits lipophiles et l'eau pour les extraits très polaires. Une vingtaine de larves ayant atteint le deuxième stade larvaire sont ajoutés aux tubes à essai contenant l'extrait dissout qui seront ensuite disposés dans l'incubateur à 27 °C, puis observés après 30 min et 24h. Le test est considéré comme positif si aucune larve n'a survécu après 24 heures, la β-asarone (15 µg /ml) est utilisée comme témoin positif.

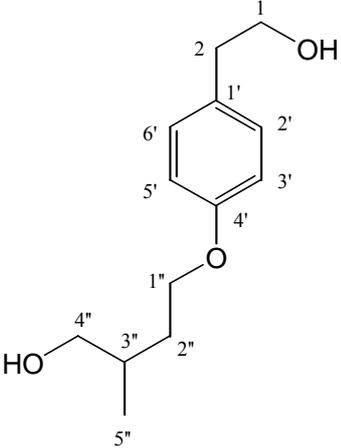
Afin de déterminer la concentration minimale létale à 100 % (LC₁₀₀) des produits purs isolés, une série de dilutions géométriques de la solution d'extrait est effectuée (500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 ppm) de la même manière que pour les extraits.

5.6.6. Activité molluscicide contre *Biomphalaria glabrata*

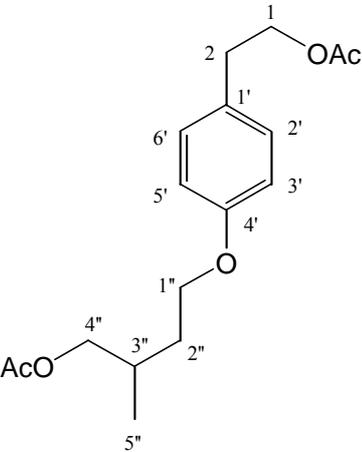
L'activité molluscicide contre l'escargot *Biomphalaria glabrata*, un escargot vecteur de la schistosomiase urinaire, a été déterminée selon la méthode décrite par Hostettmann *et al.* (1982). Deux escargots, dont le diamètre moyen de la coquille est de 9 mm, sont plongés dans une solution aqueuse à 400 ppm d'extrait à tester. La mortalité est déterminée après 24h à 24°C en observant sous la loupe binoculaire les battements cardiaques des mollusques.

5.7 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

Composé A

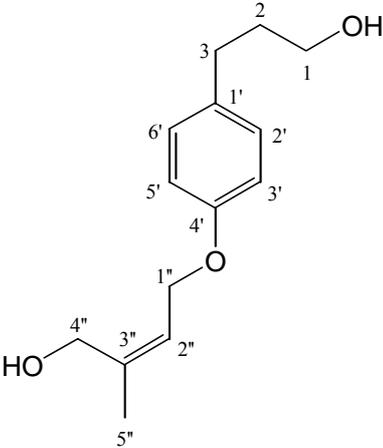
	<p>4'-O-(4''-hydroxy-3''-méthylbutyloxy)-2-phénylethanol</p> <p>Poudre blanche amorphe</p> <p>C₁₃H₂₀O₃, PM 224;</p> <p>Mp 232-235 °C ;</p> <p>$[\alpha]_D^{23} = -37^\circ$ (MeOH, <i>c</i> 0.1)</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 224 (2.35), 279 (2.44) ; • D/CI-MS <i>m/z</i> (int.rel.): 242 [M+NH₄]⁺ (100), 225 [M+H]⁺ (15) ; • EI-MS, 70 eV, <i>m/z</i> (int.rel.): 224 [M]⁺ (10), 137 (34), 108 (12), 107 (100) ; • hrESI-MS <i>m/z</i>: 247.13084 [M+Na]⁺ (calculé: <i>m/z</i> 247.13046); 		
Position	¹ H-NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	3.82 <i>m</i>	63.8
2	2.81 <i>m</i>	38.2
1'	-	130.1
2',6'	7.11 <i>d</i> (8.3)	129.9
3',5'	6.86 <i>d</i> (8.3)	114.6
4'	-	157.8
1''	4.02 <i>m</i>	66.1
2''	1.67 <i>m</i>	32.8
3''	1.91 <i>m</i>	33.3
4''	3.55 <i>d</i> (5.7)	67.9
5''	1.05 <i>m</i>	16.8

Composé A-a

	<p><i>1-acétyl-(4'-O-(4''-acétyl-3''-méthylbutyloxy)-2-phénylethanol</i></p> <p>Poudre blanche amorphe $C_{17}H_{24}O_5$, PM 308; Mp 241-243 °C ; $[\alpha]_D^{23} = -32^\circ$ (MeOH, c 0.1)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 226 (2.37), 264 (2.30) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 308 $[M]^+$ (30), 279 (25), 249 (12), 248 (60), 245 (15), 148 (25), 129 (80), 120 (100), 106 (45), 87 (12), 69 (100) ; 	
<p>Position</p>	<p>1H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$)</p>
<p>1 2 1' 2',6' 3',5' 4' 1'' 2'' 3'' 4'' 5'' Ac* (1) Ac* (4'')</p>	<p>4.22 <i>m</i> 2.03 <i>s</i> - 7.13 <i>d</i> (8.3) 6.86 <i>d</i> (8.3) - 4.02 <i>m</i> 1.70 - 1.85 <i>m</i> 1.93 <i>m</i> 4.01 <i>m</i> 1.02 <i>m</i> 2.05 <i>s</i> 2.07 <i>s</i></p>

* attributions interchangeables

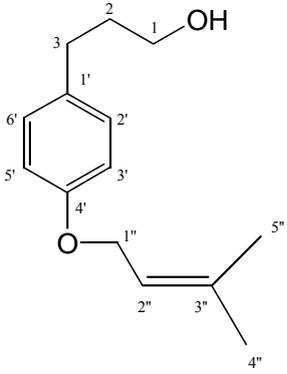
Composé B

	<p>4'-O-(4''-hydroxy-3''-méthylbut-2''-enyloxy)-3-phénylpropanol (Cuspidiol)</p> <p>Cristaux incolores C₁₄H₂₀O₃, PM 236; Mp 64-67 °C ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 224 (2.35), 278 (2.43) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 254 [M+NH₄]⁺ (100), 237 [M+H]⁺ (10) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 236 [M]⁺ (10), 152 (80), 134 (78), 108 (15) ; 		
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	3.67 <i>m</i>	62.2
2	1.87 <i>m</i>	34.3
3	2.66 <i>t</i> (7.8)	31.1
1'	-	133.9
2',6'	7.11 <i>d</i> (8.3)	129.2
3',5'	6.83 <i>d</i> (8.3)	114.5
4'	-	156.8
1''	4.57 <i>m</i>	64.2
2''	5.77 <i>m</i>	120.1
3''	-	139.8
4''	4.07 <i>d</i> (6.3)	67.8
5''	1.76 <i>s</i>	13.9

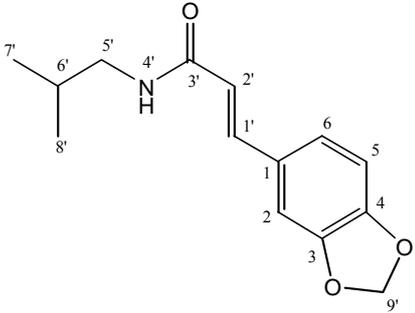
Composé C

	<p>(S)-4'-O-(4''-hydroxy-3''-méthylbutyloxy)-3-phénylpropanol (Dihydrocuspidiol)</p> <p>Cristaux incolores $C_{14}H_{22}O_3$, PM 238; Mp 52-53 °C ; $[\alpha]_D^{23} = -9.5^\circ$ (MeOH, c 0.1)</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 225 (2.36), 279 (2.44) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 256 $[M+NH_4]^+$ (100), 239 $[M+H]^+$ (40) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 238 $[M]^+$ (40), 153 (12), 151 (95), 134 (85), 133 (40), 121 (12), 108 (20), 106 (100) ; 		
<p>Position</p>	<p>1H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$)</p>	<p>^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$)</p>
<p>1</p>	<p>3.65 <i>m</i></p>	<p>62.2</p>
<p>2</p>	<p>1.88 <i>m</i></p>	<p>34.5</p>
<p>3</p>	<p>2.66 <i>t</i> (8.0)</p>	<p>31.1</p>
<p>1'</p>	<p>-</p>	<p>134.0</p>
<p>2',6'</p>	<p>7.09 <i>d</i> (8.0)</p>	<p>129.3</p>
<p>3',5'</p>	<p>6.83 <i>d</i> (8.0)</p>	<p>114.4</p>
<p>4'</p>	<p>-</p>	<p>157.1</p>
<p>1''</p>	<p>4.01 <i>m</i></p>	<p>66.2</p>
<p>2''</p>	<p>1.69 <i>m</i></p>	<p>32.9</p>
<p>3''</p>	<p>1.90 <i>m</i></p>	<p>33.3</p>
<p>4''</p>	<p>3.54 <i>d</i> (5.8)</p>	<p>67.9</p>
<p>5''</p>	<p>0.99 <i>m</i></p>	<p>16.9</p>

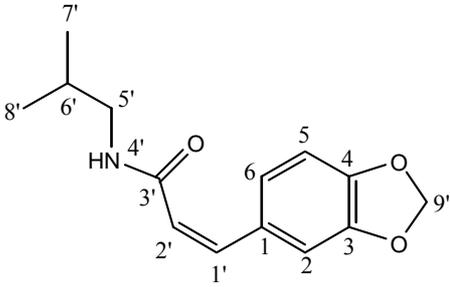
Composé D

	<p><i>4'-O-(3''-méthylbut-2''-ényloxy)-3-phénylpropanol</i></p> <p>Huile incolore C₁₄H₂₀O₂, PM 220;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 225 (2.36), 275 (2.40) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 238 [M+NH₄]⁺ (45), 221 [M+H]⁺ (5) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 220 [M]⁺ (51), 151 (50), 106 (50), 69 (48) ; 		
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	3.63 <i>m</i>	62.9
2	1.88 <i>m</i>	35.1
3	2.63 <i>t</i> (7.3)	31.8
1'	-	134.4
2',6'	7.15 <i>d</i> (8.7)	129.9
3',5'	6.87 <i>d</i> (8.7)	115.2
4'	-	157.7
1''	4.45 <i>m</i>	65.4
2''	5.55 <i>m</i>	120.5
3''	-	138.7
4''	1.83 <i>s</i>	26.5
5''	1.88 <i>s</i>	26.5

Composé E

	<p style="text-align: center;"><i>trans</i> -Fagaramide</p> <p style="text-align: center;">Poudre blanche amorphe C₁₄H₁₇NO₃, PM 247; Mp 118-120 °C ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 215 (2.25), 235 (2.46), 290 (3.04), 325 (3.41) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 265 [M+NH₄]⁺ (18), 248 [M+H]⁺ (100) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 247 [M]⁺ (50), 190 (80), 175(100), 146 (15), 145 (50), 117 (30) ; 		
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	-	129.2
2	6.94 <i>m</i>	106.2
3	-	148.0
4	-	148.7
5	6.75 <i>d</i> (15.6)	108.3
6	6.94 <i>d</i> (8.2)	123.5
1'	7.53 <i>d</i> (8.2)	140.2
2'	6.35 <i>d</i> (15.6)	119.0
3'	-	166.2
4'	-	-
5'	3.22	47.0
6'	1.87 <i>m</i>	28.5
7', 8'	0.95 <i>m</i>	20.1
9'	5.95 <i>m</i>	101.2

Composé F

	<p><i>cis-Fagaramide</i></p> <p>Poudre blanche amorphe</p> <p>C₁₄H₁₇NO₃, PM 247; Mp 118-120 °C ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 215 (2.25), 235 (2.46), 290 (3.04), 325 (3.41) ; • D/CI-MS <i>m/z</i> (int.rel.): 265 [M+NH₄]⁺ (18), 248 [M+H]⁺ (100) ; • EI-MS, 70 eV, <i>m/z</i> (int.rel.): 247 [M]⁺ (50), 190 (80), 175(100), 146 (15), 145 (50), 117 (30) ; 		
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	-	129.1
2	7.11 <i>m</i>	109.1
3	-	147.7
4	-	147.9
5	6.76	108.1
6	6.93	123.8
1'	6.63 <i>d</i> (12.3)	135.9
2'	5.88 <i>d</i> (12.3)	123.8
3'	-	167.1
4'	-	-
5'	3.10	46.8
6'	1.75 <i>m</i>	28.2
7', 8'	0.83 <i>m</i>	20.0
9'	5.98 <i>m</i>	101.2

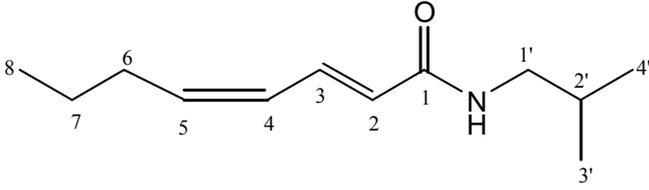
Composé G

	<p style="text-align: center;">(+)-Sésamine</p> <p style="text-align: center;">Cristaux jaunes $C_{20}H_{18}O_6$, PM 354 ; Mp 122-124°C ; $[\alpha]_D^{23}$: + 73° (CHCl₃, <i>c</i> 0.1) ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 245 (3.75), 286 (3.86) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 372 [M+NH₄]⁺ (100), 355 [M+H]⁺ (15) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 354 [M]⁺ (75), 323 (5), 202(20), 161 (40), 148 (100), 135 (45) ; 		
<p>Position</p>	<p>¹H -NMR (500 MHz, CDCl₃)</p>	<p>¹³C- NMR (125 MHz, CDCl₃)</p>
<p>8,8' 7,7' 9,9'ax. 9,9'éq. 2,2'; 5,5' 6,6' 2 -O-CH₂-O- 1,1' 3,3' 4,4'</p>	<p>3.04 (m) 4.71 (d, 3.9 Hz) 3.87 (dd, 2.93 Hz) 4.23 (dd, 2.93 Hz) 6.76 – 6.79 (m) 6.80 – 6.84 (m) 5.94 (s)</p>	<p>54.33 85.78 71.70 71.70 106.47 ; 108.16 119.32 101.04 134.93 147.97 147.10</p>

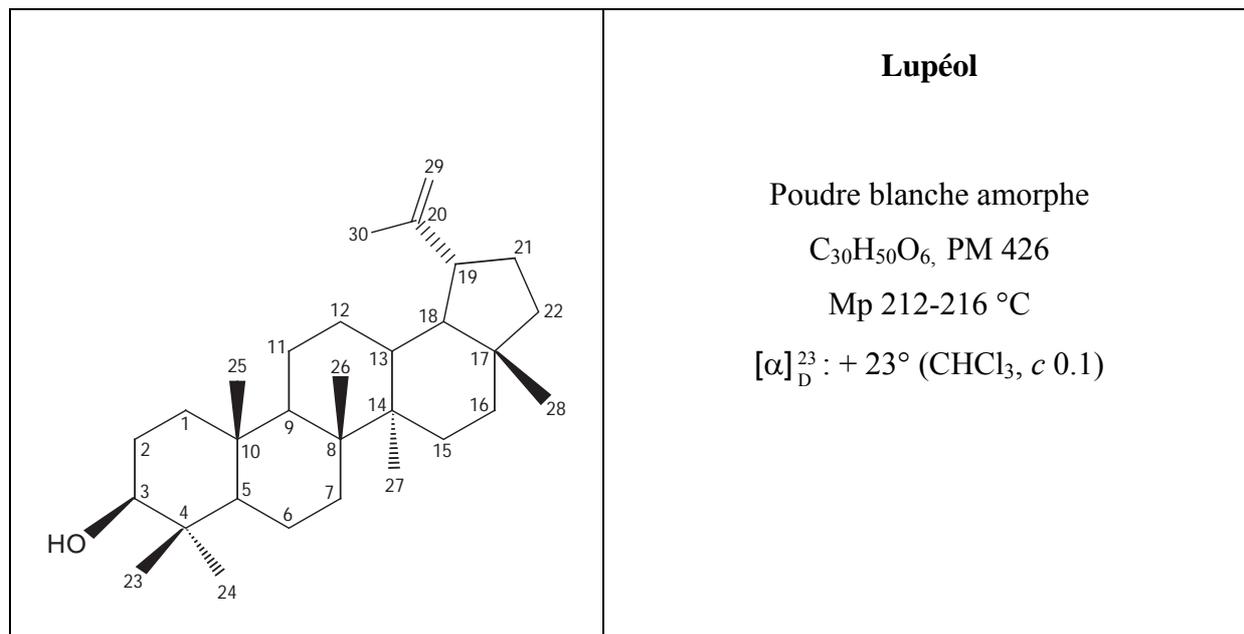
Composé I

		<p><i>N-isobutyl-(2E,4E)-déca-2,4-diènamide</i> (Pellitorine)</p> <p>Cristaux incolores C₁₄H₂₅NO, PM 223; Mp 86-88 °C ;</p>
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 258 (2.71) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 241 [M+NH₄]⁺ (18), 224 [M+H]⁺ (100) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 223 [M]⁺ (45), 208 (15), 166(10), 151 (50), 113 (15), 80 (43) ; 		
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	-	166.6
2	5.83 <i>d</i> (15.6)	122.3
3	7.15 <i>dd</i> (15.6 et 11.8)	140.1
4	6.10 <i>t</i> (15.6 et 11.8)	128.5
5	6.05 <i>t</i> (15.6 et 10.1)	141.9
6	2.05 <i>m</i>	32.5
7	1.95 <i>m</i>	28.1
8	1.35 <i>m</i>	22.1
9	1.40 <i>m</i>	31.0
10	0.95 <i>m</i>	13.6
1'	3.13 <i>t</i> (14.5 et 6.8)	46.1
2'	1.90 <i>m</i>	32.5
3', 4'	0.96 <i>m</i>	19.8

Composé J

	<p><i>N-isobutyl-(2E,4Z)-octa-2,4-diènamide</i></p> <p>Cristaux incolores $C_{12}H_{21}NO$, PM 195; Mp 73-75 °C ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 230 (2.41), 278 (2.91) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 213 $[M+NH_4]^+$ (18), 196 $[M+H]^+$ (100) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 195 $[M]^+$ (30), 180 (10), 152 (15), 123 (100), 110 (10) ; 		
Position	1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$)	^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$)
1	-	166.0
2	5.76 <i>d</i> (15.6)	121.7
3	7.19 <i>t</i> (15.6 et 10.3)	141.2
4	6.10 <i>t</i> (12.7 et 10.3)	128.3
5	6.09 <i>t</i> (12.7 et 10.1)	142.9
6	2.17 <i>m</i>	34.9
7	1.46 <i>m</i>	22.0
8	0.96 <i>m</i>	13.7
1'	3.16 <i>t</i> (13.1 et 6.8)	46.9
2'	1.79 <i>m</i>	28.6
3', 4'	0.97 <i>m</i>	20.1

Composé K :

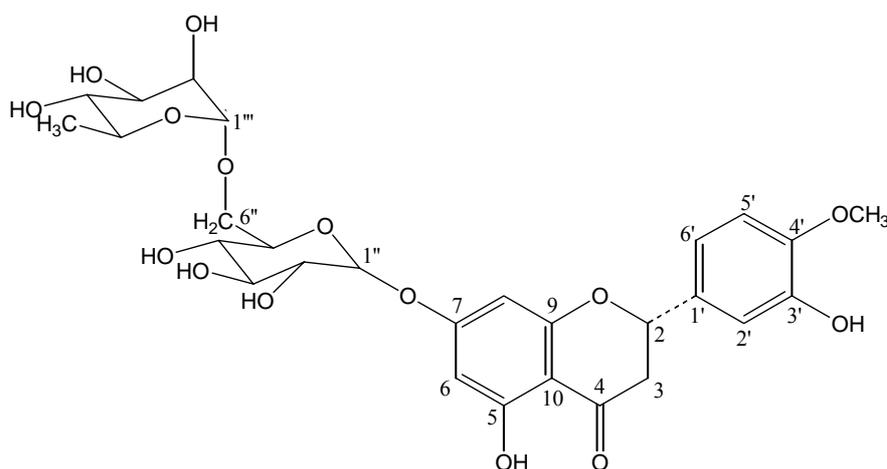


- D/CI-MS m/z (int.rel.): 444 $[M+NH_4]^+$ (10), 427 $[M+H]^+$ (100) ;
- EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 426 $[M]^+$ (55), 218 (30), 189 (30), 149 (40), 109 (35), 95 (43) ;

Position	1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$)	^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$)	Position	1H -NMR (Hz)	^{13}C -NMR
1	1.24 <i>m</i>	33.8	16	1.89 <i>m</i>	35.5
2	1.53 <i>m</i>	25.7	17	-	42.8
3	3.38 <i>d</i> (3.5)	78.9	18	1.72 <i>m</i>	50.4
4	-	33.9	19	3.0 <i>dd</i> (4.6, 10.6)	48.2
5	1.26 <i>m</i>	49.6	20	-	47.9
6	1.38 <i>m</i>	18.5	21	1.36 - 1.90	150.9
7	1.42 <i>m</i>	39.3	22	1.42 - 1.93	29.8
8	-	42.8	23	0.82 <i>s</i>	40.8
9	1.43 <i>m</i>	55.2	24	0.94 <i>s</i>	27.9
10	-	38.0	25	0.94 <i>s</i>	15.9
11	1.28 <i>m</i>	20.9	26	1.03 <i>s</i>	16.1
12	1.72 <i>m</i>	25.1	27	1.01 <i>s</i>	14.5
13	2.31 <i>d</i> (13.7)	38.8	28	0.96 <i>s</i>	17.9
14	-	42.9	29	4.72 <i>d</i> (1.6)	109.3
15	1.50 <i>m</i>	27.4	30	1.67 <i>s</i>	19.2

Composé L:

7-O-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -glucopyranosyl]-3',5, 7-trihydroxy-4'-méthoxy-4'-méthoxyflavanone



Hespéridine

Poudre jaune
C₂₈H₃₄O₁₅, PM 610
Mp 257-263 °C

- UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ): 288 nm (3.01), 335 nm (ép., 3.45) ;
- HPLC-APCI-MS m/z (int.rel.): 611 [M+H]⁺ (20), 465 [M+H-146]⁺ (35), 303 [M+H-308]⁺ (100) ;
- D/CI-MS m/z (int.rel.): 611 [M+H]⁺ (20), 326 (25), 303 (100);
- EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 610 [M]⁺ (100), 464 (15), 303 (10);

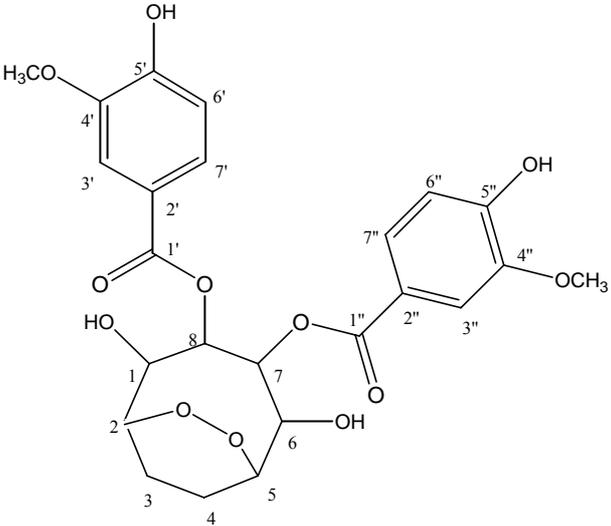
Tableau 5.1 – Données ^1H -NMR (500 MHz) et ^{13}C - NMR (125 MHz) de l'hespéridine mesurées dans le $\text{DMSO-}d_6$ (δ en ppm et J en Hz).

Position	^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	^{13}C - NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
2	5.51 <i>dd</i> (12.2 et 2.9 Hz)	78.5
3	2.76 <i>dd</i> (17.1 et 2.9 Hz) 3.28 <i>m</i>	42.2
4	-	198.2
5	-	162.6
6	6.12 <i>d</i> (2.1 Hz)	95.5
7	-	165.2
8	6.14 <i>d</i> (2.3 Hz)	96.5
9	-	163.5
10	-	103.4
1'	-	131.0
2'	6.94 <i>m</i>	114.2
3'	-	146.5
4'	-	148.1
5'	6.95 <i>d</i> (8.3 Hz)	112.2
6'	6.91 <i>d</i> (8.3 Hz)	118.0
-OMe	3.80 <i>s</i>	55.8
Glc		
1''	4.97 <i>d</i> (7.3 Hz)	99.6
2''	3.27 <i>m</i>	76.4
3''	3.22 <i>m</i>	73.1
4''	3.12 <i>t</i> (9.3 Hz)	69.7
5''	3.53 <i>m</i>	75.5
6''	3.42 <i>m</i> 3.80 <i>m</i>	66.1
Rham		
1'''	4.52 <i>s</i>	100.7
2'''	3.64 <i>m</i>	70.4
3'''	3.43 <i>m</i>	70.8
4'''	3.14 <i>t</i> (9.3 Hz)	72.2
5'''	3.40 <i>m</i>	68.4
6'''	1.09 <i>d</i> (6.3 Hz)	17.9

Composé M :

	<p><i>7,8-di-O-(3-méthoxy-4-hydroxybenzoyl)-2,5-dihydroxycyclooctane-1,6-endoperoxyde.</i></p> <p>Poudre jaune amorphe $C_{24}H_{26}O_{12}$, PM 506 ; Mp 136-139 °C ; $[\alpha]_D^{23}$: - 66° (MeOH, <i>c</i> 0.1) ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 208 (2.18), 220 (ép., 2.30), 270 (2.83), 287 (ép., 3.01) ; • HPLC-APCI-MS m/z (int.rel.): 507 $[M+H]^+$ (15), 490 $[M-H_2O+H]^+$ (10) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 506 $[M]^+$ (80), 492 (35), 474 (15), 446 (10) ; 		
<p>Position</p>	<p>1H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6)</p>	<p>^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6)</p>
<p>1, 6 2, 5 3 4 7, 8 1', 1'' 2', 2'' 3', 3'' 4', 4'' 5', 5'' 6', 6'' 7', 7'' -OMe</p>	<p>5.12 <i>m</i> 4.28 <i>m</i> 1.95 – 2.38 <i>m</i> 1.90 – 2.35 <i>m</i> 5.50 <i>m</i> - - 7.43 <i>m</i> - - 6.85 <i>m</i> 7.36 <i>m</i> 3.76 <i>s</i></p>	<p>74.5 66.7 23.8 23.5 68.9 165.7 121.1 113.2 147.9 152.3 115.8 124.2 56.2</p>

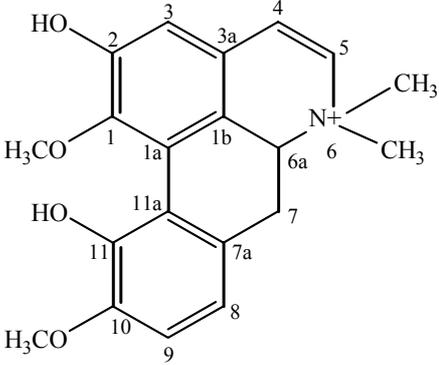
Ou Composé M :

	<p><i>7,8-di-O-(3-méthoxy-4-hydroxybenzoyl)-1,6-dihydroxycyclooctane-2,5-endoperoxyde.</i></p> <p>Poudre jaune amorphe $C_{24}H_{26}O_{12}$, PM 506 ; Mp 136-139 °C ; $[\alpha]_D^{23}$: - 66° (MeOH, <i>c</i> 0.1) ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 208 (2.18), 220 (ép., 2.30), 270 (2.83), 287 (ép., 3.01) ; • HPLC-APCI-MS m/z (int.rel.): 507 $[M+H]^+$ (15), 490 $[M-H_2O+H]^+$ (10) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 506 $[M]^+$ (80), 492 (35), 474 (15), 446 (10) ; 		
<p>Position</p>	<p>1H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6)</p>	<p>^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6)</p>
<p>1, 6 2, 5 3 4 7, 8 1', 1'' 2', 2'' 3', 3'' 4', 4'' 5', 5'' 6', 6'' 7', 7'' -OMe</p>	<p>5.12 <i>m</i> 4.28 <i>m</i> 1.95 – 2.38 <i>m</i> 1.90 – 2.35 <i>m</i> 5.50 <i>m</i> - - 7.43 <i>m</i> - - 6.85 <i>m</i> 7.36 <i>m</i> 3.76 <i>s</i></p>	<p>74.5 66.7 23.8 23.5 68.9 165.7 121.1 113.2 147.9 152.3 115.8 124.2 56.2</p>

Composé N :

			<p>Dihydrochélérythrine</p> <p>Cristaux blancs</p> <p>C₂₁H₁₉NO₄, PM 349;</p> <p>Mp 190-193 °C ;</p> <p>[α]_D²³ = - 11° (CHCl₃, c 0.1) ;</p>		
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 225 (2.36), 245 (2.57), 285 (2.99), 325 (ép., 3.41), 350 (3.67) ; • D/CI-MS <i>m/z</i> (int.rel.): 367 [M+NH₄]⁺ (18), 350 [M+H]⁺ (100) ; • EI-MS, 70 eV, <i>m/z</i> (int.rel.): 349 [M]⁺ (100), 348 (80), 334 (20), 333 (14), 290 (20), 174 (10) ; 					
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)	Position	¹ H -NMR (Hz)	¹³ C- NMR
1	7.56 <i>s</i>	105.9	10	8.66 <i>d</i> (8.6)	118.1
2	-	149.8	10a	-	128.4
3	-	149.8	10b	-	126.2
4	8.19 <i>s</i>	103.9	11	8.26 <i>d</i> (9.1)	118.4
4a	-	120.5	12	8.20 <i>d</i> (9.1)	131.2
4b	-	130.2	12a	-	131.7
- N-CH ₃ (5)	3.49 <i>s</i>	51.6	(2)-OCH ₂ O-(3)	6.26 <i>s</i>	102.0
6	4.99 <i>d</i> (9.5)	54.8			
6a	-	128.2			
7	-	146.9			
CH ₃ -O-(7)*	4.28 <i>s</i>	61.5			
8	-	151.1			
CH ₃ -O-(8)*	4.13 <i>s</i>	56.3			
9	8.21 <i>d</i> (8.6)	126.4			

Composé O :

	<p style="text-align: center;">N,N- diméthyllindarpine</p> <p style="text-align: center;">Poudre jaune amorphe $C_{20}H_{24}NO_4^{(+)}$, PM 342; Mp 245-249 °C ; $[\alpha]_D^{23} = + 197^\circ$ (CHCl₃, c 0.1) ;</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 214 (2.24), 287 (3.01), 2.35 (ép., 2.46) ; • D/CI-MS m/z (int.rel.): 360 [M+NH₄]⁺ (18), 343 [M+H]⁺ (60) ; • EI-MS, 70 eV, m/z (int.rel.): 342 [M]⁺ (100), 328 (20), 312 (15), 296 (25), 256 (20), 192 (80) ; 		
Position	¹ H -NMR (500 MHz, CDCl ₃)	¹³ C- NMR (125 MHz, CDCl ₃)
1	-	149.6
CH ₃ -O-(1)*	3.81 <i>s</i>	60.2
1a	-	120.2
1b	-	120.4
2	-	142.1
3	6.92 <i>s</i>	120.0
3a	-	121.1
4	2.39 <i>s</i>	23.4
5	3.75 <i>s</i>	43.1
- N-CH ₃ (6)	2.93 <i>s</i>	53
- N'-CH ₃ (6)	3.37 <i>s</i>	55
6a	4.45 <i>d</i> (7.9)	68.3
7	3.65 <i>s</i>	30.1
7a	-	126.1
8	6.98 <i>d</i> (8.0)	119.5
9	7.00 <i>d</i> (8.0)	111.5
10	-	149.1
CH ₃ -O-(10)*	3.84 <i>s</i>	56.1
11	-	142.9

6. REFERENCES

Abe, F., Yahara, S., Kubo, K., Nonaka, G., Okabe, H., Nishioka, I. (1974). Studies on *Xanthoxylum* spp. II. Constituents of the bark of *Xanthoxylum piperitum* DC. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **22**, 2650-2655.

Adesina, S.K. (1986). Further novel constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* root and pericarp. *Journal of Natural Products* **49**, 715-716.

Adesina, S.K. (1988). Arnottianamide and other constituents of *Zanthoxylum gillettii* root. *Journal of Natural Products* **51**, 601-602.

Agrawal, P.K., Thakur, R.S. (1985). ¹³C NMR spectroscopy of lignan and neolignan derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry* **23**, 389-418.

Agrawal, P.K., Jain, D.C., Gupta, R.K., Thakur, R.S. (1985). ¹³C NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry* **24**, 2479-2496.

Andersson, C.M., Hallberg, A., Högberg, T. (1996). Advances in the development of pharmaceutical antioxidants. *Advances in Drug Research* **28**, 65-180.

Angiosperm Phylogeny Group (APG) (1998). An Ordinal Classification for the Families of Flowering Plants. *Annals of Missouri Botanical Garden* **85**, 531-553.

Ayres, D.C., Loike, J.D. (1990). *Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bacon, J.D., Mabry, T.J. (1976). UV spectral procedures for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonols. *Revista Latinoamericana de Quimica* **7**, 83-86.

Basa, S.C., Das, D.P., Tripathy, R.N., Elango, V., Shamma, M. (1984). Bhubaneswin: A new bicoumarine. *Heterocycles* **22**, 333-337.

Basa, S.C. (1988). Natural bicoumarins – A review. *Phytochemistry* **27**, 1933-1941.

Bauer, R., Remiger, P., Wagner, H. (1989). Alkamides from the roots of *Echinacea angustifolia*. *Phytochemistry* **28**, 505-508.

Béani, J.C. (1991). *Traitement du psoriasis par photothérapie UVB et PUVA*. *La Revue du Praticien* (Paris). **41**, 2177-2179.

Bhatt, S.K., Saxena, W.K., Nigam, S.S. (1981). A new saponin from seeds of *Amoora rohituka*. *Phytochemistry* **20**, 1749-1750.

Bowen, J.M., Cole, R.J., Bedell, D., Schabdach, D. (1996). Neuromuscular effects of toxins isolated from Southern Prickly Ash (*Zanthoxylum clava-herculis*) Bark. *American Journal of Veterinary Research* **57**, 1239-1244.

Brizicky, G.K. (1962). Taxonomic and nomenclatural notes on *Zanthoxylum* and *Glycosmis* (Rutaceae). *Journal of the Arnold Arboretum* **43**, 80-93.

Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, Lavoisier Technique & Documentation, Paris, France.

Bruneton, J. (2001). *Plantes toxiques: Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*, Lavoisier Technique & Documentation, Paris, France, pp. 461-466.

Carmalm, B. (1956). Constitution of resin phenols and their biogenetic relations. XX. The identity of pseudocubebin and *d*-sesamin. *Acta Chimica Scandinavica* **10**, 134-135.

Cepleanu, F. (1993). *Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, pp. 102-109.

Chaaib, F., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., Diallo, D., Hostettmann, K. (2003). Antifungal and antioxidant compounds from the root bark of *Fagara zanthoxyloides*. *Planta Medica* **69**, 316-320.

Chen, I.S., Wu, S.J., Tsai, I.L. (1994). Chemical and bioactive constituents from *Zanthoxylum simulans*. *Journal of Natural Products* **57**, 1206-1211.

Chihiro, I., Mizuno, T., Matsuoka, M., Kimura, Y., Sato, K., Kajiura, I., Omura, M., Ju-Ichi, M., Furukawa, H. (1988). A new flavonoid and other new components from *Citrus* plants. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **36**, 3292-3295.

Chou, F., Hostettmann, K., Kubo, I., Nakanishi, K. (1977). Isolation of an insect antifeedant *N*-methylflindersine and several benz[*c*]phenanthridine alkaloids from East African plants; A comment on chelerythrine. *Heterocycles* **7**, 967-977.

Coffman, K., Boyce, W.T., Hansen, R.C. (1985). Phytophotodermatitis simulating child abuse. *American Journal of Diseases of Children* **139**, 239-240.

Cronquist, A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. The New York Botanical Garden, New York, éd. 2.

Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* **80**, 1144-1151.

Das Graças-Da Silva, M.F., Gottlieb, Otto R., Ehrendorfer F. (1988). Chemosystematics of the Rutaceae: Suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Plant Systematics and Evolution* **161**, 97-134.

Decaudain, N., Kunesch, N., Poisson, J. (1974). Alcaloïdes de *Zanthoxylum tsihanimposa*. *Phytochemistry* **13**, 505-507.

Dunstan, W.R, Garnett, H. (1895). Note on the active constituent of the pellitory of medicine. *Chemical Society* **67**, 100-102.

Elliot, M., Farnham, A.W., Janes, N.F., Johnson, D.M., Pulman, D.A. (1987). Synthesis and insecticidal activity of lipophilic amides. Part 3: Influence of chain length and terminal group in *N*-(2-methylpropyl)-2,4-dienamides. *Pesticide Science* **18**, 211-221.

Elpern, D.J., Mitchell, J.C. (1984). Phytophotodermatitis from Mohikana fruits (*Pelea anisata* H. Mann, fam. Rutaceae) in Hawaiian Lei. *Contact Dermatitis* **10**, 224-226.

Ena, P., Camarda, I. (1990). Phytophotodermatitis from *Ruta Corsica*. *Contact Dermatitis* **22**, 63.

Engler, A. (1931). Rutaceae In: *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, 2nd ed. Engelmann, Leipzig, **19a**, 187-359, 458-459.

Ferron, A. (1994). *Bacteriologie Médicale*, Editions C. et R., Paris, France, pp. 125-135.

Fish, F., Waterman, P.G. (1973). Chemosystematics in the Rutaceae II. The Chemosystematics of the *Zanthoxylum* / *Fagara* complex. *Taxon* **22**, 177-203.

Folléa, L. (1995). *L'Europe veut interdire les produits bronzants contenant du psoralène*. *Le Monde*, 6 mai.

Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K. (2001). Chemistry and pharmacology of the *Citrus* biflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research* **15**, 655-669.

Godin, P. (1954). A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses. *Nature* **174**, 134.

Gonzaga, W.A., Weber, A.D., Giacomelli, S.R., Simionatto, E., Dalcol, I.I., Machado Desso, E.C., Morel, A.F. (2003). Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Medica* **69**, 773-775.

Gray, A.I. (1983). Structural diversity and distribution of coumarins and chromones in the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 97-146.

Greger, H., Hofer, O. (1987). Highly unsaturated isopentyl amides from *Achillea wilhelmsii*. *Journal of Natural Products*. **50**, 1100-1107.

Guinaudeau, H., Leboeuf, M, Cave, A. (1975). Aporphine alkaloids. *Lloydia* **38**, 275-338.

Gutierrez-Perez, R.M., Vargas-Solis, R., Diaz-Gutierrez, G., Martinez-Martinez, F.J. (2002). Identification of benzophenanthridine alkaloids from *Bocconia arborea* by gas chromatography - mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **13**, 177-180.

Halberkann, J. (1916). Ueber Pseudocubebin. Vorkommen in *Ocotea usambarensis* Engl. *Archiv der Pharmazie* **254**, 246-255.

Hamburger, M.O., Cordell, G.A. (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*. **50**, 19-22.

Hamburger, M., Hostettmann, K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864-3874.

Harborne, J.B. (1983). The flavonoids of the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 147-174.

Harborne, J.B., Williams, C. A. (2000). Advances in Flavonoid Research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481 –504.

Hartley, T.G. (1969). A revision of the genus *Flindersia* (Rutaceae). *Journal of the Arnold Arboretum* **50**, 481-526.

He, W., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Verbruggen, L., Anthonissen, K., Van der Flaas, M., Bosselaers, J., Mathenge, S.G., Mudida, F.P. (2002). Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarensis*. *Phytotherapy Research* **16**, 66-70.

Hegnauer, R. (1969). *Chemotaxonomie der Pflanzen - Band V*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 107-128.

Hegnauer, R. (1973). *Chemotaxonomie der Pflanzen - Band VI*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 174-239.

Hegnauer, R. (1983). Chemical characters and the Classification of the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 401-439.

Hegnauer, R. (1990). *Chemotaxonomie der Pflanzen - Band IX*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 437-465.

Hesse, M. (2002). *Alkaloids : Nature's Curse or Blessing*. Wiley-VCH, New York.

Heywood, V.H. (1996). *Les plantes à fleurs*. Editions Nathan, Paris, pp. 202.

Homans, A.L., Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **51**, 327–329.

Hostettmann, K., Kizu, H., Timori, T. (1982). Molluscidal properties of various saponins. *Planta Medica* **44**, 34 – 35.

Hostettmann, K., Marston, A. (1995). *Saponins*. Cambridge University Press, Cambridge.

Hostettmann, K., Marston, A. (2002). Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews* **1**: 275-285.

Hsiao, J.J., Chiang, H.C. (1995). Phenylpropanoids from *Aralia bipinnata*. *Phytochemistry* **39**, 825-827.

Ishii, H., Ishikawa, T., Tohojoh, T., Murakami, K., Kawanabe, E., Lu, S.T., Chen, I.S. (1982). Studies on the chemical constituents of Rutaceous plants. Part 45. Novel phenyl propanoids: cuspidiol, boninenal and methyl boninenalate. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I*, 2051-2058.

Kerharo, J., Adam, J.G. (1974). *La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques*. Editions Vigot Frères, Paris, pp. 713-715.

Kutney, J.P., Inaba, T., Dreyer, D.L. (1968). The structure of thamnosin. A novel dimeric coumarin system. *Journal of the American Chemical Society* **90**, 813-814.

Kutney, J.P., Inaba, T., Dreyer, D.L. (1970). Further studies on constituents of *Thamnosma montana* torr. and Frem.: The structure of thamnosin, a novel dimeric coumarin system. *Tetrahedron* **26**, 3171-3184.

Lewis, J.R. (1983). Biological activity of some Rutaceous compounds. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp.301-318.

Lewis, W.H., Elvin-Lewis, P.F. (1977). *Medical Botany: Plants Affecting Man's Health*. John Wiley & Sons, New York, pp.226-270.

Lindelöf, B., Sigurgeirsson, B., Tegner, E., Larkö, O., Johannesson, A., Berne, B., Christensen, O.B., Andersson, T., Törngren, M., Molin, L., Nylander-Lundqvist, E., Emtestam, L. (1991). PUVA and Cancer: a large-scale epidemiological study. *Lancet* **338**, 91-93.

MacGregor, A.B. (1963). Increasing caries incidence and changing diet in Ghana. *International Journal of Dental Hygiene* **13**, 516-522.

Maier, V.P. (1983). Chemistry and significance of selected *Citrus* limonoids and flavonoids. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 319-342.

Malgras, D. (1992). *Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes*. Edits. Karthala, Paris. pp. 315-316.

Mallavadhani, U.V., Panda, A.K., Rao, Y.R. (1998). Pharmacology and Chemotaxonomy of Diospyros. *Phytochemistry* **49**, 901-951.

Martínez- Martínez, F.J, Padilla- Martínez, I.I, Hernández-Carlos, B., Pérez-Gutiérrez, R.M., Garcia-Báez, E.V. (2002). X-ray diffraction and total ^1H and ^{13}C NMR assignment of (*RS*)-5,6-dihydro-7,8-dimethoxy-5-methyl-6-(2-oxopropyl)-(2,3-methylenedioxyphenyl)-[c]-phenanthridine-((*RS*)-6-acetonyldihydrochelerythrine). *Journal of Chemical Crystallography* **32**, 63-68.

Monroe, E.W., Wani, M.C., Taylor, H. (1987). Plant antitumor agents, 27. Isolation, structure, and structure activity relationships of alkaloids from *Fagara macrophylla*. *Journal of Natural Products* **50**, 1095-1099.

Markham, K.R. (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.

Marston, A., Maillard, M., Hostettmann, K. (1993). Search for antifungal, molluscicidal and larvicidal compounds from African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **38**, 215– 223.

Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K. (2002). A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analysis* **13**, 51 – 54.

Mendoza, C.E., Shields, J.B. (1973). Determination of some carbamates by enzyme inhibition techniques using thin layer chromatography and colorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **21**, 178-184.

Mester, I. (1983). Structural diversity and distribution of alkaloids in the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 31-96.

Moore, J.A. (1936). Floral anatomy and phylogeny in the Rutaceae. *New Phytologist* **35**, 318-322.

Neuwinger, H.D. (1996). *African Ethnobotany. Poisons and Drugs: Chemistry, Pharmacology, Toxicology*. Chapman & Hall, London.

Ngassoum, M.B., Essia-Ngang, J.J., Tatsadjieu, L.N., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Adjoudji, O. (2003). Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia* **74**, 284-287.

Odebiyi, O.O., Sofowora, E.A. (1979), Antimicrobial alkaloids from a Nigerian chewing stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Medica* **36**, 204-207.

Oechslin, S.M., König, G.M, Oechslin-Merkel, K., Wright, A.D., Kinghorn, A.D., Sticher, O. (1991). An NMR study of four benzophenanthridine alkaloids. *Journal of Natural Products* **54**, 519-524.

Okogun, J.I., Essien, E.M. (1976). Effect of the root extract of *Fagara zanthoxyloides* on blood coagulation. *Thrombos Haemostas* **36**, 525-531.

Okorie, D.A. (1976). A new phthalide and xanthenes from *Anthocleista djalonensis* and *Anthocleista vogelli*. *Phytochemistry* **15**, 1799 – 1780.

Oriowo, Mabayoje.A. (1982). Anti-inflammatory activity of piperonyl-4-acrylic isobutyl amide, an extractive from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. *Planta Medica* **44**, 54-56.

O'Sullivan, J. (1983). Structural diversity and distribution of lignans in the Rutales. In: Waterman, P.G., Grundon, M.F (eds.), *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press, London, UK, pp. 267-279.

Ouattara, B., Angenot, L., Guissou, P., Fondu, P., Dubois, J., Frédérick, M., Jansen, O., Van Heugen, J.C., Wauters, J.N., Tits, M. (2004). LC/MS/NMR analysis of isomeric divanilloylquinic acids from the root bark of *Fagara zanthoxyloides* Lam. *Phytochemistry* **65**, 1145-1151.

Paris, R., Moyse-Mignon, H. (1951). Recherche sur les fagaras africaines.3. Etude du *Fagara macrophylla* Engler. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **9**, 479-493.

Perrett, S., Whitfield, P.J. (1995). Atanine (3-dimethylallyl-4-methoxy-2-quinolone), an alkaloid with anthelmintic activity from the Chinese medicinal plant, *Evodia rutaecarpa*. *Planta Medica* **61**, 276-278.

Pessini, G.L., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., Garcia Cortez, D.A. (2003). Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnelli* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C.DC.) Yunk. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**, 1115-1120.

Pousset, J.L. (1989). *Plantes médicinales africaines: Utilisations pratiques*. Editions Ellipses, Paris, pp. 81-83.

Potterat, O. (1997). Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry* **1**, 415–440.

Pousset, J.L. (2002). Nouveaux médicaments: Savoir discerner le véritable progrès thérapeutique. *Réseau Médicaments et Développement* **26**, pp. 11-13.

Principe, P.P. (1989). The economic significance of plants and their constituents as drugs. In: Wagner, H., Hikino, H., Farnsworth N.R. (eds.), *Economic and Medicinal Plant Research, Volume 3*. Academic Press, London.

Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, M., Monod, K., Frenk, E. (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* **2**, 199–203.

Rahalison, L. (1994). *Mise au point et applications d'une méthode de dépistage d'activité antifongique (Candida albicans) dans les extraits végétaux*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences, Université de Lausanne, Suisse.

Randrianariveojosia, M., Rasidimanana, V. T., Rabarison, H., Cheplogoi, P.K, Ratsimbason, M., Mulholland, D.A., Mauclère, P. (2003). Plants traditionally prescribed to treat tazo (malaria) in the eastern region of Madagascar. *Malaria Journal* **24**, 25-34.

Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urverg, S., Rafatro, H., Ramanitrahasimbola, D., Palazzino, G., Galeffi, C., Nicoletti, M. (1998). Alkaloids of *Hernandia voyronii*: Chloroquine-potentiating activity and structure elucidation of herveline D. *Planta Medica* **64**, 58-62.

Reisch, J., Wickramasinghe, A., Kumar, V. (1989). Two phenylpropanoids from *Flindersia australis* stem wood. *Phytochemistry* **28**, 3242-3243.

Rotimi, V.O., Laughon, B.E., Bartlett, J.G., Mosadomi, H.A. (1988). Activities of Nigerian chewing stick extracts against *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides melaninogenicus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**, 598-600.

Schatz, G.E. (2001). *Generic Tree Flora of Madagascar*. Royal Botanic Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden, London, pp. 345-351.

Schaufelberger, D., Hostettmann, K. (1982). On the molluscicidal activity of tannin containing plants. *Planta Medica* **48**, 105-107.

Schempp, C.M., Sonntag, M., Schöpf, E., Simon, J.C. (1996). Dermatitis Bullosa Striata Pratensis Durch *Dictamnus albus* L. (Brennender Busch), *Hautarzt* **47**, 708-710.

Sofowora, E.A., Isaacs-Sodeye, W.A., Ogunkoya, L.O. (1975). Isolation and characterization of an antisickling agent from *Fagara xanthoxyloides* root. *Lloydia* **38**, 169.

Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M. (2000). *Botanique Systématique des Plantes à Fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 5-20.

Su-Helen C.F., Horvat R. (1981). Isolation, identification and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **29**, 115-118.

Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K. (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **58**, 1780-1783.

Taveira, F.S.N., Andrade, E. H. A., Lima, W.N., Maia, J.G.S. (2003). Seasonal variation in the essential oil of *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **75** (1), 27-31.

Tringali, C., Spatafora, C., Cali, V., Simmonds, M.S.J. (2001). Antifeedant constituents from *Fagara macrophylla*. *Fitoterapia* **72**, 538-543.

Ulrichova, J., Walterova, D., Preininger, V., Slavik, J., Lenfeld, J., Cushman, M., Simanek, V. (1983). Inhibition of acetylcholinesterase activity by some isoquinoline alkaloids. *Planta Medica* **48**, 111-115.

Vaquette, J., Pousset, J.L., Cave, A., Delaveau, P., Paris, R.R. (1973). Etude des constituants des écorces de tiges de *Zanthoxylum decaryi* H. Perrier (Rutacées). I.- Constituants non-alcaloïdiques. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **31**, 49-55.

Vaquette, J. (1974). *Contribution à la chimiotaxonomie des Rutacées: étude de Zanthoxylum decaryi H.Perr. étude de Teclea boiviniana (Baillon) H.Perr. et de Teclea unifoliolata Baillon*. Thèse de doctorat, Unité d'Enseignement et de Recherche de Chimie Thérapeutique, Université Paris-Sud, France.

Vollhardt, K.P.C. (1990). *Traité de Chimie Organique*. De Boeck-Wesmael, Bruxelles.

Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. 2nd edition, Springer, Berlin.

Waterman, P.G., Grundon, M.F. (1983). *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Academic Press INC, London, UK.

Weins, C., Jork, H. (1996). Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high- performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **750**, 403-407.

Wolfender, J.-L., Hostettmann, K. (1996). Importance of LC/MS in plant analysis. *Journal of Mass Spectrometry* **8**, 7-12.

Zepernick, B., Timler, F.K. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick & Timler comb. nova (Rutaceae). (1981). *Willdenowia* **11**, 361-362.

7. RESUME

Dans le but de rechercher de nouveaux composés naturels à intérêt thérapeutique, les extraits dichlorométhanique et méthanolique de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae), une brosse à dents africaine ont été soumis à un criblage chimique et biologique. Un dépistage des activités: antifongiques contre le champignon phytopathogène *Cladosporium cucumerinum* et la levure commensale responsable de mycoses chez l'homme *Candida albicans*, antibactérienne contre la bactérie opportuniste *Bacillus subtilis*, larvicide contre le moustique vecteur de la fièvre jaune *Aedes aegypti* et molluscicide contre *Biomphalaria glabrata*, un escargot impliqué dans la transmission de la schistosomiase urinaire a été réalisé. Les propriétés antiradicalaires et inhibitrices de l'acétylcholinestérase de ces extraits ont aussi été dépistées. Sur la base des résultats obtenus lors de ce screening, l'investigation phytochimique de ces extraits a été entreprise. Elle a abouti à l'isolement de 14 composés, actifs pour la majorité contre *Cladosporium cucumerinum* et *Bacillus subtilis*, dont la structure a été établie au moyen de méthodes spectroscopiques (UV, MS, IR, ¹H- et ¹³C-NMR). Des méthodes chimiques (hydrolyse, acétylation) ont été requises pour la confirmation de structures.

L'extrait dichlorométhanique a fourni un nouveau composé, un dérivé du phényléthane, ainsi que dix composés connus, dont trois dérivés du phénylpropane, un lignane, un alcaloïde de la famille des benzophénanthridines, un triterpène, deux amides phénoliques et deux amides oléfiniques.

L'extrait méthanolique a fourni un nouveau composé avec une fonction endoperoxyde, qui avait montré une activité inhibitrice modérée de l'acétylcholinestérase, ainsi que l'hespéridine et un dérivé de la chélérythrine. Par ailleurs, l'analyse LC/UV/APCI-MS de cet extrait a permis de détecter *on-line* sept produits connus. Parmi ces composés, se trouvent l'acide divanilloylquinique, la chélérythrine et quatre de ses dérivés: norchélérythrine, 6-(2-oxybutyl) dihydrochélérythrine, 6-hydroxy-dihydrochélérythrine et avicine, ainsi qu'une amide phénolique, l'arnottianamide. La présence de ces dérivés de la chélérythrine a été mise en évidence dans deux autres espèces du même genre lors d'une étude LC/UV/APCI-MS comparative.

Les activités fongicides contre *Cladosporium cucumerinum* et *Candida albicans* et bactéricides contre *Bacillus subtilis* et *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mises en évidence

sur plaque CCM et par les tests de dilution dans l'agar de ces composés, permettent de justifier l'utilisation de *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler comme brosse à dents africaine.

Les techniques couplées de pointe utilisées dans cette étude ont montré leur apport inestimable dans le domaine de la recherche phytochimique et les applications futures dans le domaine de déréplication d'extraits bruts.

8. ABSTRACT

With the aim of discovering new natural therapeutics, the dichloromethane and méthanol extracts of the African toothbrush tree *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. *Fagara zanthoxyloides* L.) (Rutaceae), were submitted to biological and chemical assays. The former included: the antifungal activities of the extracts against the phytopathogenic fungus *Cladosporium cucumerinum*, the commensal yeast which causes human mycoses *Candida albicans*, the bactericidal activity against the opportunistic bacteria *Bacillus subtilis*, the larvicidal activity against the yellow fever-transmitting mosquito *Aedes aegypti* and the molluscicidal effect on the snail *Biomphalaria glabrata* involved in the transmission of urinary schistosomiasis. The antiradical and acetylcholinesterase-inhibiting properties of these extracts were also investigated. On the basis of these results, a phytochemical investigation of the dichloromethane and méthanol extracts of *Zanthoxylum zanthoxyloides* was undertaken. Their fractionation led to the isolation of 14 compounds, the majority of which were active against *Cladosporium cucumerinum* and *Bacillus subtilis*, whose structures were elucidated by spectroscopic techniques (UV, MS, IR, ¹H- and ¹³C-NMR). Chemical methods (hydrolysis, acetylation) were performed to confirm the structures.

The dichloromethane extract yielded a new phenylethane derivative, together with ten known compounds: three phenylpropane derivatives, a lignan, a benzophenanthridine alkaloid, a triterpene and four phenolic and olefinic amides.

The methanol extract yielded a new compound with an endoperoxide moiety, which showed moderate acetylcholinesterase-inhibiting activity, together with hesperidin and a chelerythrine derivative. Seven more compounds were detected *on-line* by LC/UV/APCI-MS. Among the compounds detected were divanilloylquinic acid, chelerythrine and four chelerythrine derivatives: norchelerythrine, 6-(2-oxybutyl)-dihydrochelerythrine, 6-hydroxy dihydrochelerythrine and avicine, together with the phenolic amide arnottianamide. Most of the chelerythrine derivatives were also found in two other *Zanthoxylum* species following LC/UV/APCI-MS analysis.

The antifungal activities against *Cladosporium cucumerinum* and *Candida albicans* and antibacterial activities against *Bacillus subtilis* and *Streptococcus mutans* ATCC 25175, may explain the utilization in traditional medicine of the roots of this plant as a toothbrush.

The advanced hyphenated techniques used in this study showed their inestimable contribution to the field of phytochemical research and applications in the field of dereplication of crude extracts.