

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribose Nucléique
(d)	: Doublet
(dd)	: Doublet de doublet
(m)	: Multiplet
(s)	: Singulet
°C	: Degré Celsius
¹³ C	: Carbone 13
1D	: Mono dimension
2D	: Bi dimension
¹ H	: Proton
Cl	: Chlore
D	: Deutérium
E	: Energie
eV	: électron volt
Fig	: figure
g	: gramme
H	: Hydrogène
mg	: milligramme
mL	: millilitre
N	: Azote
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	: partie par million
R-	: Alkyle
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
S.M.	: Spectroscopie de Masse
S	: Soufre
T	: Température
t	: triplet
X	: halogène
F.I.D	: Free Induction Decay
A, B, C	: Symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude
AcOEt	: Acetate d'éthyle
B.B	: Broad Band
CC	: Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CI	: Chemical ionisation
COSY	: Spectroscopie de corrélation
CPC	: Chromatographie de partage centrifuge
DCM	: Dichlorométhane
DEPT	: Distorsionless enhancement by polarisation transfer
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
EI	: Electronic impact
ESI	: Electronic spray ionisation
EtOH	: Ethanol
GGPP	: Géranyl-géranyl-pyrophosphate
HMBC	: Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	: Heteronuclear single. quantum correlation
MeOH	: Méthanol
k	: Constante de Boltzmann
IRM	: Imagerie par Résonance Magnétique

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Première Partie : GENERALITES	3
I.1 LES PLANTES MEDICINALES	3
I.1.1 Les familles des EBENACEAE	3
I.1.1.1 Historique de la famille	3
I.1.1.2 Description botanique de la famille	3
I.1.1.3 Les chimiotaxonomies	4
I.1.1.4. Morphologique	5
I.1.1.5. Caractères phytochimiques	5
I.1.1.6. Travaux antérieurs sur les genres de la famille <i>EBENACEAE</i>	5
I.1.2 Les critères des sélections des plantes médicinales	5
I.1.2.1 Approche chimiotaxonomique	5
I.1.2.2 Approche ethnopharmacologique	5
I.1.2.3 Approche pharmacologique d'orientation	6
I-2 LES MALADIES CANCEREUSES	6
I.2.1. Description du cancer	6
I.2.2. La division cellulaire	6
I.2.3. Traitement	8
I.2.3.1-Mécanisme d'activité antitumorale	8
I.2.4. Les histoires des découvertes des molécules anticancéreuses issues des plantes	9
I.2.4.1. <i>Ochrosia Elliptica</i>	9
I.2.4.2. Les alcaloïdes de la <i>Pervenche de Madagascar</i>	10
I.2.4.3. Les alcaloïdes de la <i>Taxus brevifolia Nutte</i>	11
I-3 LES SUBSTANCES NATURELLES	12
I.3.1. Définition	12
I.3.2. Les biogénèses des substances naturelles	12
I.3.3. Les composés phénoliques	13
I.3.3.1. Description des composés phénoliques	13
I.3.3.2. Quinones	13
I.3.3.2.1. Définition	13
I.3.3.2.2. Distributions des quinones	14
I.3.3.2.3. Biosynthèse	14
I.3.3.2.4. Propriétés biologiques	14
I.3.3.3. L'Isodiospyrine	15
I.3.3.4. Méthode d'extraction	16
I-4 DETERMINATION STRUCTURALES	17
I.4.1-Principe	17
I.4.2-R.M.N	17
I.4.2.1-Introduction	17
I.4.2.2-Principe de la R.M.N	17
I.4.2.3-Déplacement chimique	22
I.4.2.4- Couplage spin-spin	22
I.4.2.5-Application à la détermination structure	23
I.4.2.5.1-La R.M.N ¹ H, ¹³ C 1D	23
I.4.2.5.2-La R.M.N 2D	24

I.4.2.5.2.1. La corrélation homonucléaire (COSY ; NOESY)	25
I.4.2.5.2.2 La corrélation hétéronucléaire (HSQC ; HMBC)	26
I.4.3- La spectrométrie de masse	27
I.4.3.1- Généralité	27
I.4.3.2-Principe de la spectrométrie de masse	27
I.4.3.3-Caractéristique	27
I.4.3.4- Potentiel analytique de la spectrométrie de masse	28
I.4.3.5- Classification des spectres des masses	28
I.4.3.6-Fragmentation	29
Deuxième Partie : MATERIELS ET METHODES	32
II.1 MATERIELS	32
II.1.1. Matériel végétal	32
II.1.1.1 Récolte de la plante	33
II.1.1.2. Détermination botanique	33
II.1.1.3. Etude phytochimique auparavant	34
II.1.2. Matériels techniques	34
II.1.2.1 Obtentions de(s) produit(s) pur(s)	34
II.1.2.1.1 Extraction par macération	34
II.1.2.1.2 Séparation	34
II.1.2.1.2.1 Séparation par colonne grossière	34
II.1.2.1.2.2.Séparation par extraction par partage	35
II.1.2.1.3 Fractionnement par colonne chromatographique	35
II.1.2.1.3.1.Chromatographie d'adsorption	35
II.1.2.1.3.2. Chromatographie d'exclusion	35
II.1.2.1.3.3. Chromatographie par partage	35
II.1.2.1.3.4. Chromatographie de partage centrifuge	35
II.1.2.1.4 Matériels d'analyses chimiques	35
II.1.2.1.4.1Chromatographie sur couche mince et réactifs chimiques	35
II.1.2.1.4.1.1 Préparation de la CCM	36
II.1.2.1.4.1.2 Préparation des réactifs	36
a - Vanilline	36
b - Acide sulfurique de 10%	36
c - Réactif de Dragendorff	36
II.1.2.1.5 Matériels de la purification des produits	36
II.1.2.1.5.1Chromatographie sur couche preparative	36
II.1.2.1.5.2 L'analyse sur HPLC analytique	37
II.1.3. Matériel des déterminations des structures	37
II.1.3.1 L'appareillage de la RMN	37
II.1.3.2. L'appareillage de la SM	37
II.2. METHODES	38
II.2.1. Méthodes des récoltes	38
II.2.1.1. Enquête ethnobotanique	38
a - Modalité d'enquête	38
b - Résultats de l'enquête	38
II.2.2. Séchage, broyage et dégraissage	39

II.2.3. Test du criblage phytochimique	39
II.2.4. L'isolement de(s) principe(s) actif(s) par les technique(s) des fractionnements bio guidés	40
II.2.4.1. Définition	40
II.2.4.2. Extraction par macération	40
II.2.4.3. Séparation grossière à l'aide d'une colonne chromatographique	41
II.2.4.4. Extraction par partage liquide-liquide	41
II.2.4.5. Fractionnement de l'extrait chloroformique (Rup-01)	43
II.2.4.5.1. Principe	43
II.2.4.5.2. Analyse par CCM	43
II.2.4.5.3. Colonne chromatographique d'adsorption ouverte	43
II.2.4.5.4. Regroupement	43
II.2.4.5.5. Test pharmacologique	43
II.2.4.5.6. La purification des principes actifs dans les fractions Rup-014 et Rup-012	44
II.2.5. Protocole du test biologique	47
II.2.5.1. Test antipaludique sur la souche FC29	47
II.2.5.1.1. La culture in vitro	47
II.2.5.1.2. La synchronisation	47
Principe	47
Mode opératoire	47
II.2.5.1.3. Evaluation	48
Principe	48
Mode opératoire	48
Détermination de CI₅₀	48
II.2.5.2. Test de cytotoxique sur la cellule cancéreuse P388	48
II.2.5.2.1. Principe	48
II.2.5.2.2. Mode opératoire	49
II.2.5.3. Test de toxicité aigüe sur la souris swiss	49
II.2.6. Démarche pour les déterminations des structures	49
Troisième Partie : RESULTATS ET DISCUSSIONS	51
III.1 RESULTATS	51
III.1.1. Test des criblages phytochimiques	51
III.1.2. Résultats des fractionnements bio-guidés	51
III.1.2.1. Extraction	51
III.1.2.2. Séparation grossière	52
III.1.2.3. Extraction par partage	52
III.1.2.4. Fractionnement des Rup-01	52
III.1.2.4.1. Fraction Rup-014	52
III.1.2.4.1.1. Fraction Rup-0143	53
III.1.2.4.1.2. Résultat du test du Rup-001	53
III.1.2.4.2. Fraction Rup-012	53
III.1.2.4.2.1. Fraction Rup-0126	54
III.1.2.4.2.1.1 Résultat du test Rup-002	54
III.1.2.4.2.2. Fraction Rup-0122	54
III.1.2.4.2.2.1. Résultat du test Rup-003	54
III.1.2.5. Comparaison du test avec les produits purs et les molécules mise en essai clinique	55
III.1.3. Résultat du test de toxicité aigüe	56

III.1.4. Déterminations des structures	57
III.1.4.1 Interprétation et détermination de la configuration du produit Rup-001	57
III.1.4.1.1 Interprétations des spectres de la RMN	57
III.1.4.1.1.1 Spectre de la RMN 1D	57
a- RNM ¹ H	57
b- RMN du ¹³ C	59
b1 – Spectre DEPT	59
b2 – Spectre B.B	61
III.1.4.1.1.2. Spectres de la RMN 2D	62
a-Spectre COSY	62
b- Spectre HSQC	62
c – Spectre HMBC	65
III.1.4.1.1 .3. La configuration de la molécule Rup-001	72
III.1.4.2. Interprétation du spectre de masse du Rup-001	73
III.1.4.2 Interprétation et détermination de la configuration du produit Rup-002	75
III.1.4.2.1 Interprétations des spectres de la RMN	75
III.1.4.2.1.1 Spectre de la RMN 1D	75
a-RNM ¹ H	75
b-RMN du ¹³ C	80
b ₁ Spectre DEPT	80
b ₂ Spectre B.B	82
III.1.4.2.1.2. Spectres de la RMN 2D	84
a Spectre HSQC	84
b–Spectre HMBC	85
III.1.4.2.1 .3. La configuration de la molécule Rup-002	90
III.1.4.3 Interprétation et détermination de la configuration du produit Rup-003	92
III.1.4.3.1 Interprétations des spectres de la RMN	92
III.1.4.3.1.1 Spectre de la RMN 1D	92
a-RNM ¹ H	92
b-RMNdu ¹³ C	95
III.1.4.3.1.2. Spectres de la RMN 2D	96
a- Spectre COSY	96
b–Spectre HSQC	99
c–Spectre HMBC	103
III.1.4.3.1 .3. La configuration de la molécule Rup-003	107
III.2. DISCUSSIONS	109
III.2.1. Partie chimique	109
III.2.2.Partie biologique	115
III.2.3.Discussion générale	117
CONCLUSION	118
REFERENCES	120
ANNEX	128
ANNEX.I. FIGURES DES MATERIELS	
ANNEX.II. PREPARTATION DES REACTIF POUR FAIRE LES TESTS DES .CRIBLAGES PHYTOCHIMIQUES	
ANNEX.III PUBILCATION	

TABLEAUX

Tableau-I	: Résumé de la classification des spectrométries de masse	28
Tableau-II	: Les différents types du test de criblage phytochimique	39
Tableau-III	: Résultat du test de criblage	51
Tableau-IV	: Résultat d'extraction par macération	52
Tableau-V	: Résultat du test de séparation grossière	52
Tableau-VI	: Résultat d'extraction par partage liquide-liquide	52
Tableau-VII	: Résultat du test de la fraction chloroformique	52
Tableau-VIII	: Résultat du test des fractions Rup-014	53
Tableau-IX	: Résultat du test des fractions Rup-0143	53
Tableau-X	: Résultat du test des fractions Rup-012	53
Tableau-XI	: Résultat du test des fractions Rup-0126	54
Tableau-XII	: Résultat du test des fractions Rup-0122	54
Tableau-XIII	: Résultat du test de comparaison	55
Tableau-XIV	: Résultat du test de toxicité aigue	55
Tableau-XV	: Récapitulation des interprétations du spectre ^{13}C du produit Rup-001	61
Tableau-XVI	: Tableau des corrélations de H.S.Q.C du produit Rup-001	64
Tableau-XVII	: Tableau de récapitulation des déplacements chimiques du produit I	71
Tableau-XVIII	: Récapitulation des interprétations du spectre ^{13}C du produit Rup-002	82
Tableau-XIX	: Tableau des corrélations de H.S.Q.C du produit Rup-002	83
Tableau-XX	: Récapitulation des déplacements chimiques de la molécule Rup-002	90
Tableau-XXI	: Tableau des corrélations de H.S.Q.C du produit Rup-003	100
Tableau-XXII	: Récapitulation des déplacements chimiques de la molécule Rup-003	107

FIGURES

Figure 1 : Division cellulaire de tubuline en micro tubuline	7
Figure 2 : Coupures de l'ADN	7
Figure 3 : Structure de Chlorambucil	8
Figure 4 : Structure de Camptothine	8
Figure 5 : Structure de Methotrexate	9
Figure 6 : Structure de gironline	9
Figure 7 : Alcaloïdes isolés dans <i>Ochrosia elliptica</i>	9
Figure 8 : Alcaloïdes de la pervenche de Madagascar	10
Figure 9 : Taxol et Taxotère	11
Figure 10 : Biogénèse des produits naturels	12
Figure 11 : Mécanisme de la formation de l'isodiospyrine	15
Figure 12 : Levée de dégénérescence du niveau d'énergie des noyaux	18
Figure 13 : Transformation de Fourier	20
Figure 14 : Schéma du principe de la RMN impulsionnelle	21
Figure 15 : Spectre de proton obtenu à partir de son FID.	21
Figure 16 : Echelle de temps d'expériences de RMN 2D	24
Figure 17 : Séquence d'impulsion d'un spectre 2D	24
Figure 18 : Allure des spectres 2D	25
Figure 19 : Corrélation entre ^1H géminés et vicinaux	25
Figure 20 : Corrélation directe ^1H - ^{13}C	26
Figure 21 : Corrélations en HMBC en position α et β	26
Figure 22 : Localisation de l'électron et de la charge positive	29
Figure 23 : Coupure homolytique	30
Figure 24 : Coupure hétérolytique	30
Figure 25 : Clivage au niveau des atomes de carbone substitué des alkyles	31
Figure 26 : Coupure au niveau de la chaîne insaturée	31
Figure 27 : Cycles saturés : perdre des chaînes alkyles latérales.	31
Figure 28 : Mécanisme de la réaction de <i>Rétro-Diels-Alder</i>	31
Figure 29 : Clivage au niveau de liaison en β par rapport au cycle	32
Figure 30 : Clivage au niveau d'hétéroatome stabilisé par résonance	32
Figure 31 : Réarrangement de Mc Lafferty	32
Figure 32 : Extraction*	
Figure 33 : Filtration*	
Figure 34 : Evaporation*	
Figure 35 : Colonne chromatographique*	
Figure 36 : CCM pour rechercher le système de solvant d'élution*	
Figure 37 : CCP pour faire la purification*	
Figure 38 : HPLC Analytique.*	
Figure 39 : Développement de plaque dans une cuve chromatographique*	
Figure 40 : Lampe UV*	
Figure 41 : Analyse chromatographie sur couche mince*	
Figure 42 : Extraction de partage*	
Figure 43 : Séquence de corrélation due ^1H à 12.43ppm	67
Figure 44 : Corrélation ^1H à 7.27ppm	67
Figure 45 : Premières séquence du produit -I	68
Figure 46 : Séquence de corrélation ^1H à 12.00ppm	68
Figure 47 : Séquence de corrélation ^1H à 7.63ppm	69

Figure 48 : Deuxièmes Séquence du produit I	69
Figure 49 : Structure complète du produit -I	70
Figure 50 : Fragment de la molécule à m/z=68	72
Figure 51 : Fragment à m/z=54	72
Figure 52 : Perte de masse m/z=33	73
Figure 53 : Départ de molécule à m/z=122	73
Figure 54 : Fragment de molécule à m/z=222	73
Figure 55 : Représentation ^1H acide du produit Rup-002	78
Figure 56 : Représentation ^1H alcénique du produit Rup-002	78
Figure 57 : Représentation ^1H éthoxy	78
Figure 58 : Représentation ^1H méthyle lié avec le noyau benzénique	79
Figure 59 : Représentation ^1H méthyle lié avec éthoxy	79
Figure 60 : Groupement carbonyle	81
Figure 61 : Carbone éthoxy	82
Figure 62 : CH benzénique	82
Figure 63 : Séquence de corrélation ^1H 12.52ppm	85
Figure 64 : Séquence de corrélation ^1H à 11.85ppm	85
Figure 65 : Séquence de corrélation ^1H à 6.92ppm	86
Figure 66 : Séquence de corrélation ^1H à 6.98ppm	86
Figure 67 : Première séquence du produit Rup-002	86
Figure 68 : Séquence de corrélation ^1H méthyle à 2.21ppm	87
Figure 69 : Séquence de corrélation ^1H méthyle à 2.35ppm	87
Figure 70 : Séquence de corrélation ^1H à 7.59ppm	87
Figure 71 : Séquence de corrélation ^1H à 7.52ppm	88
Figure 72 : Deuxième séquence du produit Rup-002	88
Figure 73 : Structure complète du produit Rup-002	89
Figure 74 : Représentation ^1H alcénique du produit Rup-003	93
Figure 75 : Représentation ^1H méthyle lié avec le noyau benzénique	93
Figure 76 : Représentation ^1H qui sort à 1.56 jusqu'au 1.64	93
Figure 77 : Couplage ^1H - ^1H à 8.19ppm et 7.45ppm	97
Figure 78 : Couplage ^1H - ^1H à 8.16ppm et 7.53ppm	97
Figure 79 : Couplage ^1H - ^1H à 8.13ppm, 8.09ppm et 7.73ppm	97
Figure 80 : Couplage ^1H - ^1H à 6.40ppm et 5.43ppm	97
Figure 81 : Couplage ^1H - ^1H à 6.41ppm et 5.55ppm	98
Figure 82 : Séquence de corrélation ^1H sort à 8.19ppm	103
Figure 83 : Séquence de corrélation ^1H sort à 6.14ppm	104
Figure 84 : Séquence de corrélation ^1H sort à 8.16ppm	104
Figure 85 : Séquence de corrélation ^1H sort à 6.40ppm	104
Figure 86 : Corrélation ^1H méthyle sort à 2.03ppm	105
Figure 87 : Première séquence du produit Rup-003	105
Figure 88 : Deuxième séquence du produit Rup-003	106
Figure 89 : Structure complète du produit Rup-003	106
Figure 90 : Présentation de la liaison d'hydrogène dans le produit -I	109
Figure 91 : Mécanisme de réarrangement de produit -I	109
Figure 92 : Tautomérie du produit -I	109
Figure 93 : Stéréochimie du produit -I	110
Figure 94 : Isodiospyrine	110

Figure 95 : Comparaison de deux structures développées du Rup-001 et Rup-002	111
Figure 96 : Mécanismes de réarrangement du produit Rup-002	112
Figure 97 : Structure de produit	112
Figure 98 : Isomérisation du produit Rup-003	113
Figure 99 : Structure de trois molécules isolées	114
Figure 100 : Test d'inhibition de l'ADN topoisomerase-I de l'isodiospyrin et de diospyri	115

Remarque : * ANNEXE -I

SCHEMAS ET DIAGRAMMES

Schéma 1 : Spectre ^1H 1D du Rup-001	56
Schéma 2 : Agrandissement du spectre ^1H 1D du Rup-001 entre 0 et 2.2ppm	57
Schéma 3 : Agrandissement du spectre ^1H 1D du Rup-001 entre 6.5 et 7.65ppm	57
Schéma 4 : Spectre ^{13}C en mode DEPT du Rup-001	58
Schéma 5 : Spectre ^{13}C en mode DEPT couplé avec BB du Rup-001	59
Schéma 6 : Spectre ^{13}C en mode BB du Rup-001	60
Schéma 7 : Spectre HSQC du Rup-001	61
Schéma 8 : Agrandissement du spectre HSQC du Rup-001 entre 0 à 3ppm	62
Schéma 9 : Agrandissement du spectre HSQC du Rup-001 entre 6.5 et 7.7ppm	63
Schéma 10 : Spectre HMBC du Rup-001	64
Schéma 11 : Agrandissement spectre HMBC du Rup-001 entre 6.8 et 12.5ppm	65
Schéma 12 : Agrandissement spectre HMBC du Rup-001 entre 0 et 2.3ppm	66
Schéma 13 : Spectre ^1H 1D du Rup-002	74
Schéma 14 : Agrandissement du spectre ^1H 1D du Rup-002 entre 6.8 et 7.7ppm	75
Schéma 15 : Agrandissement du spectre ^1H 1D du Rup-002 entre 1.05 et 2.35ppm	76
Schéma 16 : Agrandissement du spectre ^1H 1D du Rup-002 entre 3.6 et 3.9ppm	77
Schéma 17 : Spectre ^{13}C en mode DEPT du Rup-002	80
Schéma 18 : Spectre ^{13}C en mode BB du Rup-002	81
Schéma 19 : Spectre HSQC du Rup-002	83
Schéma 20 : Spectre HMBC du Rup-002	84
Schéma 21 : Spectre ^1H 1D du Rup-003	91
Schéma 22 : Agrandissement spectre ^1H 1D du Rup-003 entre 7 et 8.2ppm	92
Schéma 23 : Spectre ^{13}C en mode BB du Rup-003	94
Schéma 24 : Agrandissement spectre ^{13}C en mode BB du Rup-003	95
Schéma 25 : Spectre COSY du Rup-003	96
Schéma 26 : Agrandissement spectre COSY du Rup-003	96
Schéma 27 : Agrandissement spectre HSQC du Rup-003	98
Schéma 28 : Agrandissement spectre HSQC du Rup-003	99
Schéma 29 : Agrandissement spectre HSQC du Rup-003	99
Schéma 30 : Agrandissement spectre HMBC du Rup-003	101
Schéma 31 : Agrandissement spectre HMBC du Rup-003	102
 Diagramme-1 : Protocole d'extraction par macération	 40
Diagramme-2 : Séparation grossière	41
Diagramme-3 : Extraction par partage liquide-liquide	42
Diagramme-4 : Fractionnement de Rup-014	44
Diagramme-5 : Protocole d'isolement du produit Rup-001	45
Diagramme-6 : Protocole d'isolement des produits Rup-002 et Rup-003	46

INTRODUCTION

Les plantes ont été depuis la nuit des temps, la source de nombreux médicaments et elles continueront dans l'avenir à fournir de nouvelles molécules aux propriétés thérapeutiques diverses [1].

Malgré les progrès spectaculaires de la recherche en biotechnologie, en biologie moléculaire, en génétique et en génomique, domaine à la mode en ce début du troisième millénaire, il ne faut pas oublier que 10% seulement des quelques 400.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans photochimiques et pharmacologique [2].

Sachant qu'une plante peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents, on peut se rendre compte du potentiel thérapeutique immense que représente le règne végétal. Ces dernières années, quelques molécules importantes isolées des plantes sont devenues d'efficaces médicaments. Citons l'exemple du Taxol issu de *Taxus brevifolia* Nutt pour sa propriété anticancéreuse [3], l'Artémisinine isolée dans *Artémisia annua* qui est antimalarique [4-7].

L'utilisation traditionnelle des plantes sous diverses formes, joue un rôle primordial dans le traitement de nombreuses affections, particulièrement chez la population proche de la nature, tels les guérisseurs ou/et les tradipraticiens. C'est auprès de ces détenteurs des savoirs ancestraux que tout chercheur se tourne pour connaître « les secrets des plantes qui guérissent » faisant un recueil des traditions et de l'utilisation empirique des plantes. Les pratiques et les organes utilisés sont indiqués par les guérisseurs qui acceptent de partager leur savoir avec les chercheurs qui entreprendront des recherches scientifiques plus approfondies afin d'affirmer ou d'infirmer [8-9].

Le type de préparation et d'utilisation empirique ne peut pas s'appliquer à des maladies graves comme le cancer, l'on ne peut seulement qu'avoir des renseignements sur les éventuelles activités cytotoxiques des plantes.

Le cancer est un problème public croissant dont on estime, la nouvelle incidence mondiale, à environ de 6 million de cas par an [10]. C'est la deuxième cause principale de décès après la maladie cardiovasculaire [11]. Il provient d'une altération cellulaire, il évolue et est lié avec la prolifération des cellules anormales qui ont échappé au mécanisme régulateur de l'organisme vivant. Ces cellules ont la capacité d'envahir les tissus voisins et peuvent migrer vers les territoires les plus éloignés pour qu'elles forment un cancer métastase. Ces migrations sont leurs moyens pour échapper au contrôle cellulaire de l'organisme.

Depuis les années 28, la recherche des molécules cytotoxiques antitumorales fait un progrès important grâce à la collaboration entre les deux médecines dont la médecine traditionnelle et la médecine moderne [12].

En effet, dans un pays comme Madagascar où les médicaments disponibles coûtent assez cher, alors les recours aux plantes jouent des rôles plus importants aux traitements des maladies et particulièrement dans les endroits reculés où il n'y a presque aucune structure de centre de santé.

Les renseignements donnés par les tradithérapeutes nous ont guidé à choisir et entreprendre l'étude approfondie de la plante « *Maba quercina* (Baillon H.Perr) » connue localement sous le nom vernaculaire **Remeloky ou Maintifototse**, appartenant à la famille des **EBENACEAE**.

La famille des **EBENACEAE** est classée comme la 165ème dans la flore de Madagascar et de Comores selon Perrier de la BATHIE; elle est constituée de quatre genres : *Tetracリス*, *Euclea*, *Maba* et *Diospyros*. Parmi ces quatre genres, le genre *Maba*, comprend 21 espèces, et toutes les espèces sont endémiques à Madagascar. L'espèce appelée *Maba quercina* Baillon H.Perr, a été récoltée dans le parc national Izombetse situé à 22km de l'Est du SAKARAHHA dans la région sud de Madagascar pendant la saison de pluie au mois du février 2006.

Par ailleurs, les résultats des tests préliminaires sur la cellule leucémique de souris P388 ont montré une activité inhibitrice de 99,85 % avec la concentration de 10µg/ml d'extrait brut.

Ceci nous a conduits à l'isolement des molécules responsables de l'activité cytotoxique antitumorale.

La présentation de notre travail de thèse se fera selon le plan ci-dessous.

La première partie sera consacrée aux généralités sur :

I-1 Les maladies cancéreuses

I-2 Les substances Naturelles

I-3 Les déterminations structurales

Dans la deuxième partie nous présenterons, les matériels et méthodes utilisés.

Enfin dans la troisième partie est dédiée aux résultats et discussions.

Nous terminerons la présentation par la conclusion suivie des références bibliographiques.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

I.1-LES MALADIES CANCEREUSES	4
I.2- LES SUBSTANCES NATURELLES	10
I.3- LES DETERMINATIONS STRUCTURALES	17

I.1. LES PLANTES MEDICINALES

I.1.1.Famille des Ebénacées [13 à 17]

I.1.1.Historique de la famille de l' *EBENACEAE*

La famille d'*EBENACEAE* a été découverte en 1952 par Perrier de la BATHIE et classée à la 165ème famille selon les classements botaniques des familles des plantes.

I.1.1.2.Description

La famille d'*EBENACEAE* est constituée environ de 500 espèces et est répandue principalement dans les zones tropicales et subtropicales, selon HEGNAUER [18]. Elle est composée de 7 genres notamment *Diospyros*, *Eucléa*, *Maba*, *Onothéca*, *Rhaphidanthe*, *Royena* et *Tetracリス*. Plus tard, les taxonomistes ont modifié la famille en 3 genres : *Diospyros*, *Eucléa* et *Lassiocarpa*. Les genres *Maba*, *Rhaphidanthe*, *Royena* et *Tetracリス* sont inclus dans le **Diospyros**.

Selon Mary Susan TAYLOR 1991[19] dans « Flora ethnobotany of Madagascar », la famille d'*EBENACEAE* comprend de nombreuses espèces, distribuées dans les régions chaudes des deux mondes et de l'Afrique Australe, en petit nombre en Asie et en Amérique tempérées.

Perrier de la BATHIE [20] dans « Flore de Madagascar et des Comores » a classé la famille d'*EBENACEAE* au 165^è rang pour l'ordre de classement botanique de la plante. Cette famille est composée de quatre genres :

Tetracリス (3 espèces), *Eucléa* (3 espèces), *Maba* (21 espèces) et *Diospyros* (72 espèces). Elle est représentée par une centaine d'espèces, presque toutes à Madagascar (1 aux Seychelles, 6 aux Mascareignes, 2 aux Comores et 97 à Madagascar).

Selon George SCHAT en 2001 dans « Flore Générique des arbres de Madagascar » [70] ; la famille d'*EBENACEAE* est constituée de 4 genres. Il a vérifié la description de Perrier de la BATHIE: *Tetracリス* (3 espèces), *Eucléa* (3 espèces), *Maba* (21 espèces) et *Diospyros* (72 espèces) et les espèces de *Maba* sont toutes endémiques à Madagascar.

Les espèces sont soit des arbres, soit des arbustes à bois dur, parfois noir (ébène) au centre.

Feuilles alternées, rarement opposées, subopposées ou verticillées par trois (3), simples très entières, sans stipules et des pétioles courts.

Fleurs axillaires ou latérales parfois sur l'écorce du tronc ou des rameaux (cauliflorie), solitaires, en cyme ou plus rarement en grappes de bractées le plus souvent dioïques rarement hermaphrodites ou polygames et dichlamydées de 3-7 mères.

Calice infère, gamosépale plus ou moins lobé, parfois entier, tronqué ou clos sur le bouton, persistant, plus ou moins accru sur le fruit.

Corolle gamopétale, lobée, hypogyne, caduque ; lobes préfloraison tordue, rarement valvaire-rédupliquée.

Les fleurs mâles sont à étamines parfois en même nombre que les lobes corollin, plus souvent en nombre double où en nombre indéfini, insérées sur le tube corollin ou à la base de la corolle, parfois en partie ou en totalité hypogynes ou subhypogynes et rangées autour d'un rudiment d'ovaire.

Les fleurs femelles sont souvent plus grandes que les mâles, avec ou sans staminodes ; disque nul ; ovaire supère, entier, sessile ou rarement un peu contracté à la base.

Les fruits sont bacciformes, coriaces ou charnus, indéhiscents.

I.1.1.3. Taxonomie de la famille d'*EBENACEAE*

La taxonomie de la famille *EBENACEAE* semble être embrouillant et subit des quelques modification. A l'origine, elle est composée de Cinq genres avec 456 espèces distribuées dans le plusieurs régions du monde.

Les genres *Royena*, *Maba* et *Tetraclis* ont été fusionnés avec le genre superbe *Diospyros* avec 400 espèces. À ce stade la famille se compose seulement de deux genres; *Diospyros* (444 espèces) et *Eucléa* (12 espèces), [21], quelques années plus, ils ont été modifiés en 3 genres : *Diospyros*, *Eucléa* et *Lassiocarpa*. Les genres *Maba*, *Rhaphidanthe*, *Royena* et *Tetraclis* sont inclus dans le *Diospyros*.

I.1.1.4. Morphologie de la famille *EBENACEAE* [71]

Les dispositifs morphologiques de la famille d'*EBENACEAE* sont employés pour faire classifié le genre et les espèces.

Ces dispositifs morphologiques sont toujours variées suivant des conditions environnementales, et ayant d'abouti faux des résultats.

Les utilisations des constituants chimiques caractéristiques de la famille ou du genre a un avantage par rapport aux dispositifs morphologiques, car ces sont génétiquement commande avec les structures exactes non susceptibles aux changements environnementaux maintenant dans l'esprit la caractéristique taxonomique variable, le cas échéant, ne veulent aucun doute soit une addition utile, particulièrement dans l'enferme en taxonomie de cette famille.

Avant qu'un tel marqueur puisse être identifié les caractéristiques phytochimiques doivent être recherchées de n'importe quelle tendance.

I.1.1.5. Caractéristiques phytochimiques

Les investigations phytochimiques ont pour mener à l'isolement d'un certain nombre de classes des composés. Le principal étant triterpénoïdes et naphthoquinones

II.1.1.6 Travaux antérieurs sur les genres de la famille EBENACEAE

A notre connaissance, aucune étude scientifique antérieure sur la plante *Maba quercina* n'a été signalée. Par contre, les espèces des deux genres *Diospyros* et *Euclea* ont fait l'objet des plusieurs investigations chimiques montrant une importante présence de composés terpéniques et de naphthoquinones [22 à 33].

I.1.2. Critères généraux de sélection des plantes médicinales

Actuellement, on estime que les méthodes de sélection des plantes médicinales suivent principalement les trois approches suivantes.

I.1.2.1. Approche chimiotaaxonomique

De l'arabe al-kimya venant du grec *αρχη*, principe de vie et du Grec *ταξΟν*, classification, cette méthode consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique. Si on a recherché des alcaloïdes, alors on travaille sur les familles des Apocynacées, les Rutacées et les Rubiacées car ces familles renferment souvent des alcaloïdes.

Très féconde, cette méthode a permis un inventaire systématique des plantes. Cependant, la mise en évidence d'activités biologiques est souvent révélée infructueuse.

I.1.2.2. Approche ethnopharmacologique

Elle consiste à recueillir auprès des populations des renseignements concernant l'utilisation empirique.

Le chercheur enquêtera sur les pratiques médicinales et récoltera la plante. L'extrait préparé passera des tests pharmacologiques pour vérification.

I.1.2.3. Approche pharmacologique d'orientation

Elle consiste à pratiquer sur terrain quelques essais biologiques simples permettant d'orienter la récolte ultérieure de nouvelles plantes. L'essai d'extrait de plantes récoltées sur des germes en culture *in vitro*, permet de mettre en évidence les substances actives.

I.1- LES MALADIES CANCEREUSES

I.1.1- Description du cancer

Le cancer naît de la transformation d'une cellule, puis d'un clone de cellules en cellules à reproduction indéfinie, non contrôlable. Sans détailler le mécanisme de la cancérisation, on peut dire qu'à l'état normal, la division cellulaire est contrôlée par un certain nombre de facteurs. Après s'être divisée en n cellules filles, celles-ci arrivent à confluence, c'est à dire au moment où les cellules se touchent, la division s'arrête grâce à l'intervention de facteurs spécifiques qui sont des inhibiteurs permanents (inhibiteurs de contact). Si ces facteurs sont absents, les divisions se poursuivent [34].

On estime que le corps humain est composé de 10^{13} cellules. Certaines, comme les cellules nerveuses semblent ne plus se diviser après avoir atteint un certain stade de développement, d'autres comme celles de l'épiderme et aussi les cellules hépatiques, elles ne se divisent que lors d'une réparation consécutive à un dommage subi par l'organe. Entre la fécondation de l'œuf et la mort, il se produit 10^{16} divisions cellulaires. Des facteurs de contrôle encore mal connus jusqu'à ce jour gouvernent ces divisions [35].

Alors, le cancer provient d'une altération cellulaire et est liée par la prolifération des cellules anormales qui ont échappé au mécanisme régulateur de l'organisme vivant pendant la division cellulaire. Ces cellules ont la capacité d'envahir les tissus voisins et peuvent migrer vers les territoires les plus éloignés pour qu'elles forment une métastase, et les mécanismes d'action des maladies cancéreuses ne sont pas détaillés parce qu'elles varient suivant les domaines et les facteurs qui bloquent les divisions cellulaires étaient mal connus.

I.1.2 - La division cellulaire

La division cellulaire se réalise, qui entre, voir sa chromatine ou filament d'ADN se diviser sous l'influence d'ADN polymérase [36], avant de se rassembler en chromosomes. Ces chromosomes vont se fixer sur le fuseau mitotique, né de l'assemblage de la tubuline en microtubulines, puis chaque chromosome fils va migrer le long des « rails du fuseau vers les pôles apicaux de la cellule, les centrosomes où les chromosomes reforment la chromatine.

La membrane nucléaire, puis la membrane cellulaire des cellules filles se reforment : deux cellules sont issues de la cellule d'origine (Figure.1). Des enzymes sont nécessaires à la formation de bases puriques et pyrimidiques indispensables à la formation de l'ADN,

d'autres enzymes comme le topo isomérase assurent le positionnement des brins d'ADN (Figure.2) formés lors de la division, permettant à des boucles de se défaire puis de se refaire. Suivant qu'elles agissent sur un seul ou sur les deux brins d'ADN, on est en présence de topo isomérase I ou II [37].

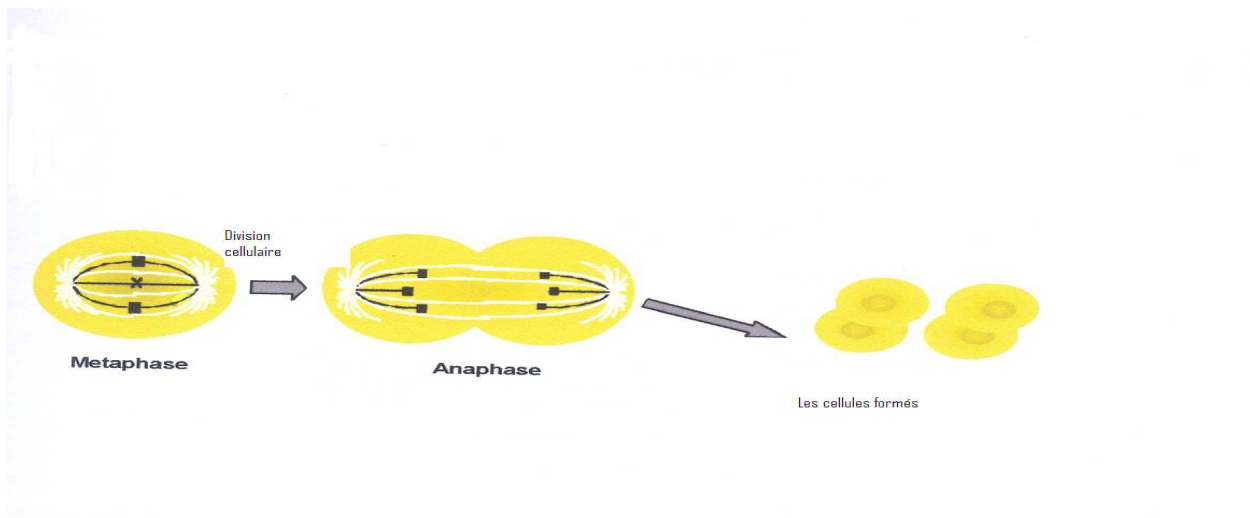


Figure.1 : Division cellulaire

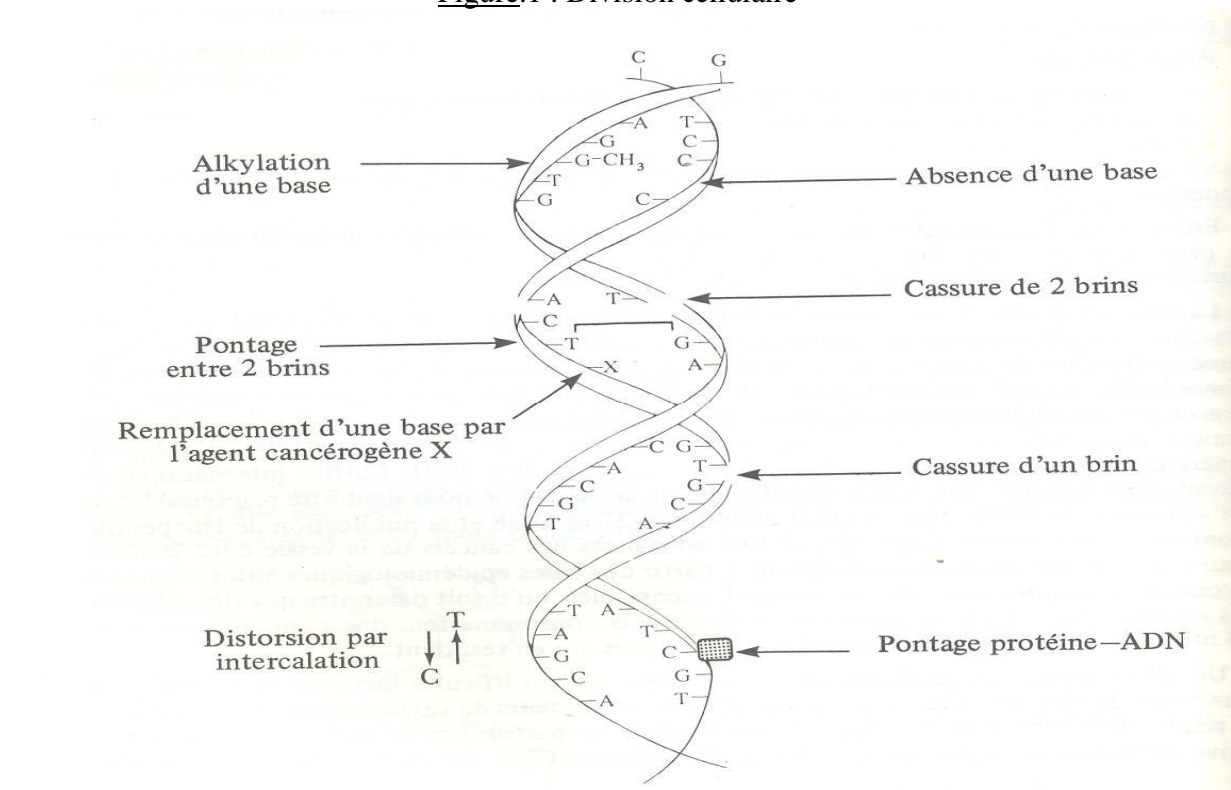


Figure.2 : Différentes formes d'anomalie sur les brins de l'ADN

I.1.3 – Traitement

Dans le traitement des cancers, la chimiothérapie tient une place importante, qu'elle soit utilisée seule dans le cas de la leucémie, ou en association avec d'autres thérapies telles que la chirurgie ou la radiothérapie comme dans le cas du cancer du sein. Ainsi est rendue sans cesse nécessaire la découverte de nouvelles substances originales possédant une activité plus intéressante que les anticancéreux utilisés à l'heure actuelle en clinique.

Mais où trouver ces nouveaux produits et sur quels critères d'activité les sélectionner ?

I.1.3.1 – Mécanisme d'activité antitumorale [38-39]

Jusqu'à présent, le mécanisme d'action de la molécule anticancéreuse n'est pas bien défini car les mécanismes d'action de la maladie varient suivant les cibles attaquées. C'est pour cela que les substances antitumorales sont classées suivant les types chimiques de la molécule active.

- Les substances alkylantes qui modifient chimiquement, entre autres les acides nucléiques tel le chlorambucil

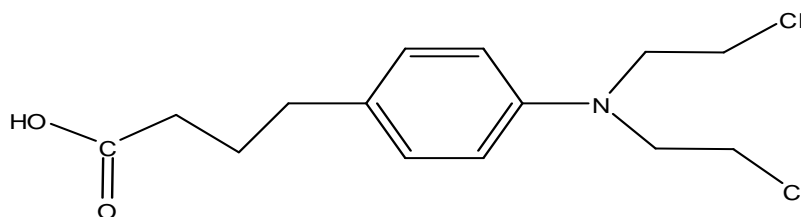


Figure.3 : Structure de Chlorambucil

- Les substances intercalantes dont la planéité structurale permettent à celles-ci de s'insérer entre les paires de base des acides nucléiques et d'empêcher leur réplication, tel est le cas de camptothécine [40].

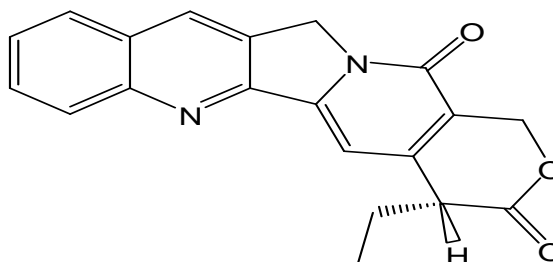


Figure. 4 : Structure de camptothécine

- Les substances antimétabolites ou encore analogues structuraux comme les inhibiteurs de la méthylation de l'acide folique E : par exemple le methotrexate ou MTX.

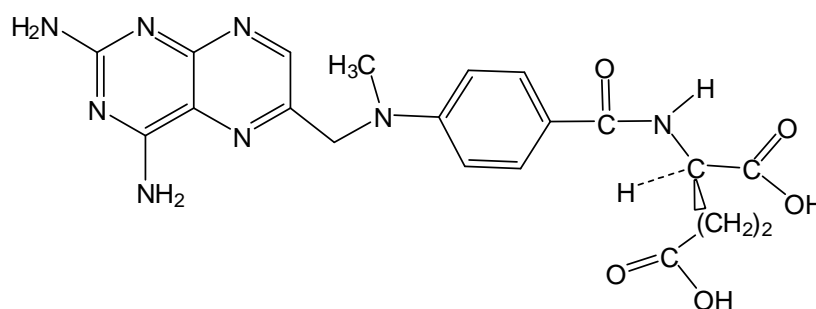


Figure.5 : Structure de Methotrexate

- Les inhibiteurs de la synthèse protéique au niveau des ribosomes ; c'est le cas de la puromycine et de la giroline (une molécule isolée d'une éponge d'un lagon Néocalédonien) [41]

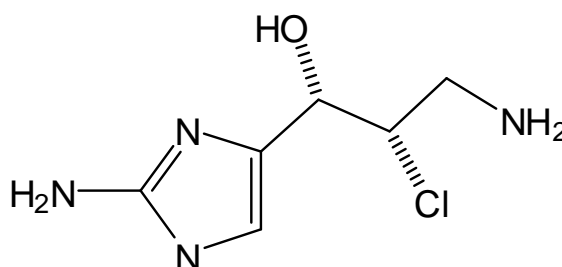


Figure.6 : Structure la Girroline

- Les poisons du fuseau : ils empêchent la formation du fuseau mitotique, comme la vinblastine, le taxol (voir page : 8-9)

I.1.4 - Les histoires des découvertes des molécules anticancéreuses issues des plantes

I.1.4 -1 – *Ochrosia elliptica*

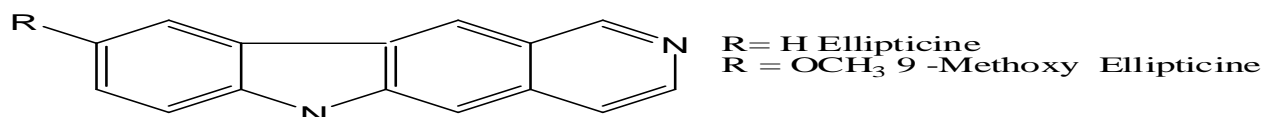


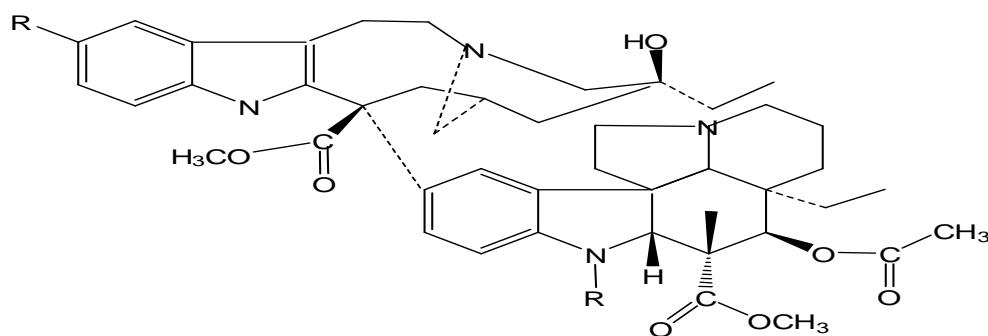
Figure.7 : Alcaloïdes isolés d'*Ochrosia elliptica*

En 1958, un Américain, S. Goodwin, a isolé un alcaloïde de couleur jaune d'*Ochrosia elliptica* de la famille des APOCYNACEAE, une plante récoltée en Floride (USA) introduite aux Petites Antilles.

A peu près à la même époque, Buzas a isolé le même alcaloïde de la plante *Ochrosia oppositifolia* de la Nouvelle Calédonie [42].

De façon tout à fait indépendante, dans le cadre d'un criblage général de plantes récoltées en Papouasie (Nouvelle Guinée) par une expédition anglo-australienne, les pharmacologues du National Cancer Institute des Etats Unis, ont mis en évidence l'activité antitumorale des extraits d'*Ochrosia coccinea* et d'*Ochrosia moorei*, plantes récoltées en Papouasie, mais également en Australie. La purification de ces extraits actifs par les chimistes australiens Dalton et Connors conduit à l'isolement de l'ellipticine, un alcaloïde que Goodwin avait isolé neuf ans auparavant [43]. L'ellipticine et son dérivé, la 9-Methoxy-ellipticine agissent sur des tumeurs expérimentales des animaux (sarcome 180, adénocarcinome 755, leucémie L 1210). Cependant, l'activité de ces alcaloïdes était variable et, de plus, lors de l'administration à l'animal, on observait des effets secondaires fâcheux (atteinte de cellules de Purkinje du cervelet). Ces faits conduisirent alors les Américains à se désintéresser du sujet.

I.1.4.2 – Les alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar [44-45]



R=CH₃: Vinblastine (Velbé)[®]

R=CHO : Vincristine (Oncovin)[®]

Figure-8 : Alcaloïdes isolés *Pervenche de Madagascar*

La pervenche de Madagascar, herbe tropicale à fleurs mauves, *Catharantus roseus* G. Don, est une plante herbacée utilisée depuis les temps anciens par les Malgaches pour ses propriétés anorexiantes. Des Canadiens de l'Université d'Ontario à London au Canada, spécialisés dans l'étude du diabète, s'intéressèrent en 1957 à ces usages empiriques. Ils préparèrent des extraits et les administrèrent à des rats rendus diabétiques par injection d'une substance hyperglycémiant, l'alloxane. Ils n'observèrent aucun abaissement du taux de sucre sanguin mais une leucopénie (baisse du nombre des globules blancs) importante qui se fait peut-être à chaque injection.

Cela les conduisit à penser que la plante recelait peut-être des substances leucopéniantes, donc capables d'être utilisées dans les leucoses ou les leucémies, maladies tumorales, dans lesquelles le nombre de globules blancs s'élève de façon importante.

Au même moment, aux Etats-Unis, les chercheurs de la firme pharmaceutique Eli Lilly évaluaient un grand nombre d'extraits végétaux et mettaient conjointement en évidence l'activité antitumorale des extraits de pervenche de Madagascar.

Après l'isolement des alcaloïdes indoliques dimères par des chercheurs canadiens et américains, la vinblastine ou vincaleucoblastine et la vincristine ou leucocristine sont commercialisées sous les noms respectifs de Velbé[®] et d'Oncovin[®], ces deux substances allaient devenir des atouts majeurs de la chimiothérapie anticancéreuse.

I.1.4.3 – Les alcaloïdes de la *Taxus brevifolia* Nutt [46 à 51]

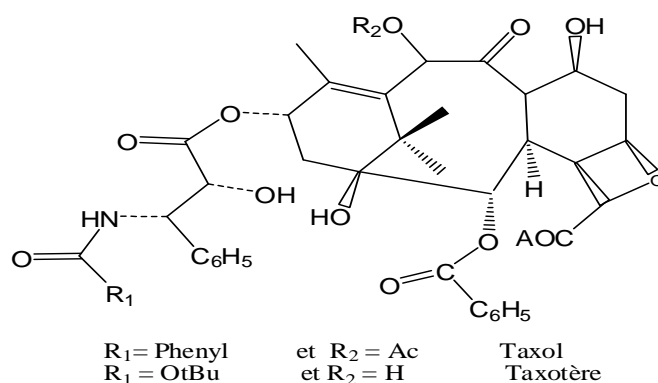


Figure-9 : Structure de Taxol et Taxotère

Vers les années soixante, les Américains décidèrent de déployer des moyens importants pour avoir des nouvelles sources naturelles de substances anticancéreuses. Et c'est au cours de ces grandes campagnes de criblage d'extraits de plante sur des tumeurs expérimentales d'animaux qu'ils décelèrent, de manière tout à fait fortuite, dans les années soixante-dix, la puissante activité de l'extrait d'écorces de tronc de *Taxus brevifolia* Nutt. (If, de la côte ouest des Etats-Unis : Océan Pacifique). Le chimiste Wani Wall et Taylor du « Research Triangle Institute », Caroline du Nord, isolèrent le composé responsable de cette activité « le Taxol » établi grâce à la diffraction des rayons X et publié en 1971.

Malgré l'importance de la découverte, peu de travaux furent publiés jusqu'en 1979, date à laquelle une biologiste américaine Susan Horwitz de l'Albert Einstein College of Medicine de New York publia dans la revue Nature, le mode d'action original du Taxol : Cette substance est capable de se fixer aux microtubules du fuseau mitotique et d'empêcher leur assemblage.

I.2-LES SUBSTANCES NATURELLES

I.2.1-Définition

Les substances naturelles sont des produits provenant du métabolisme secondaire des végétaux ou/et des animaux

I.2.2 –La biogenèse des substances naturelles [52-53]

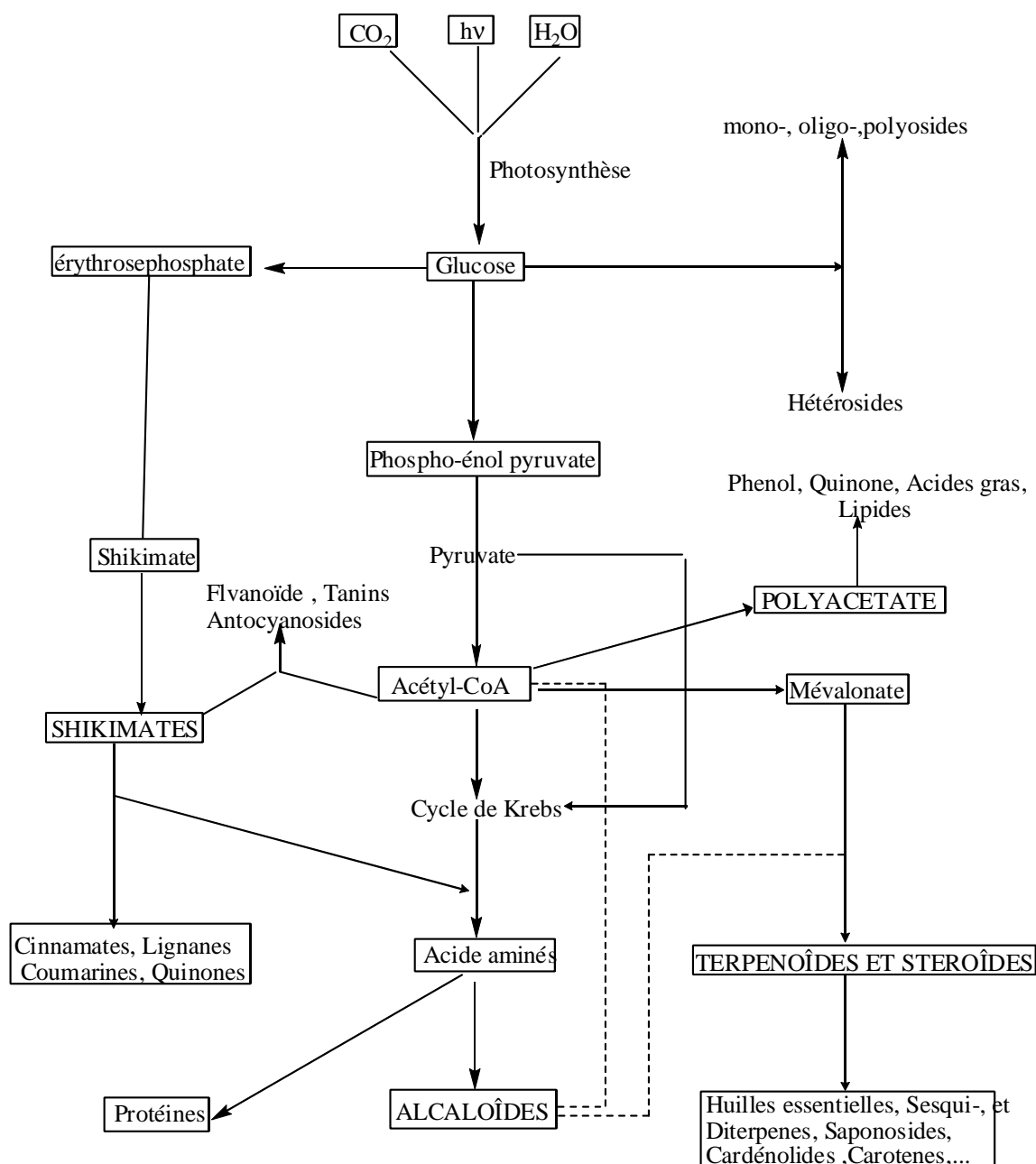


Figure.10 : Biogenèse des produits naturels

I.2.3-Les composés phénoliques

I.2.3-1 Description des composés phénoliques [54 à 56]

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble des substances qui sont difficiles à définir de façon simple. L'élément structural fondamental qui le caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction.

Une définition purement chimique des phénols est toutefois insuffisante pour caractériser les composés phénoliques végétaux. Elle inclurait des métabolites secondaires possédant ces éléments structuraux.

Dans la nature, les végétaux avec l'aide des micro-organismes synthétisent les noyaux aromatiques. Les organismes animaux sont presque toujours tributaires, soit de leur alimentation, soit d'une symbiose pour élaborer les métabolismes qui leur sont indispensables et qui comportent cet élément structural.

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- la voie la plus courante est celle via shikimate (l'acide shikimique).
- l'autre voie via acétate conduisant à des poly- β cétoesters, suivi de cyclisation.

La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente, d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte.

La participation d'un troisième synthon élémentaire « *malonates* » est également possible, bien que moins fréquente et produit des dérivés mixtes de l'acide shikimique et du mévalonate comme certaines quinones.

I.2.3.2- Quinones [57 à 60]

I.2.3.2.1-Définition

Les quinones sont des dicétones cycliques portées par les noyaux semblables aux aromatiques dont les noms en dérivent par exemple : *o,p*-benzoquinones, 1,4-naphtoquinones, 9,10-anthraquinones.

Les quinones étant issus de l'oxydation de phénols, on peut aussi s'attendre à trouver le motif quinonique dans différentes classes de métabolites secondaires. Les vitamines K, antihémorragiques sont des naphtoquinones.

I.2.3.2.2- Distribution

Plus de 1200 quinones ont été décrites, principalement dans le règne végétal, chez les angiospermes, les gymnospermes, les champignons, les lichens et très rarement chez les fougères.

I.2.3.2.3- Biosynthèse

La biosynthèse des quinones est caractérisée par la diversité des voies métaboliques qui permettent aux différents organismes de les élaborer à partir d'un nombre assez limité de précurseurs acétate/malonates, mévalonate.

I.2.3.2.3.a-Voie de l'acétate/malonate

Dans très nombreux cas, la structure même de la quinone révèle qu'elle est issue de la cyclisation d'un poly- β cétoester. C'est le cas du Chrysophénol et, plus généralement, de 1,8-dihydroxyantraquinone, c'est aussi celui de l'aloésanarine-I, composé apparente certainement naphthoquinone.

I.2.3.2.3.b-Voie de l'acide shikimique.

Une autre voie qui est d'ailleurs la plus fréquente chez les végétaux supérieurs est celle de l'acide 0-succinyl benzoïque (OSB= acide 4-(carboxyphényl)-4-oxobutanoïque). Cet acide provient de la réaction de l'acide *iso*-chorismique et de l'acide α -cétoglutarique en présence de pyrophosphate de thiamine. Il est ensuite acylé par le coenzyme A et cyclise en acide 1,4 dihydroxy-2-naphtoïque (DHNA) précurseur immédiat de naphthoquinone.

I.2.3.2.4- Propriétés biologiques

Les quinones ont des propriétés antinéoplastiques ou antibiotiques, elles peuvent agir avec l'ADN, forment des entités réactives de l'oxygène et inhibent les topoisomérases.

Certaines anthraquinones sont utilisées comme laxatifs, purgatifs destinés à provoquer l'accélération du transit intestinal et l'évaluation de selles.

Les laxatifs et les purgatifs diffèrent par l'intensité d'action. Ils sont impliqués le spasmodique est un cas de constipation spasmodique. Si la constipation est due à l'atonie du tube digestif, on utilisera des médicaments qui favorisent le péristaltisme intestinal.

Ils sont irritants une prise régulière pendant une durée assez longue, peut entraîner une colopathie grave surtout, si le médicament est constitué de phénolphthaléine exemple Purganol, Fructines de Vichy.

On utilise surtout les principes actifs de drogues commercialisées sous les noms suivants :
Pour le séné : Tamarine, Senokot, Pursennide

Pour l'aloès : Aloïne

Les benzoquinones naturelles *stricto sensu* ne donnent lieu à aucune application thérapeutique. Il faut toutefois remarquer que la forme réduite de la 1,4-benzoquinone (hydroquinone) existe à l'état d'hétéroside et que celui-ci tel l'arbutoside est doué d'un pouvoir antiseptique urinaire.

Beaucoup de quinones sont antibactériennes, fongicides et antitumorales.

I.2.3.3- Biogénèse de l'isodiospyrine [61-69]

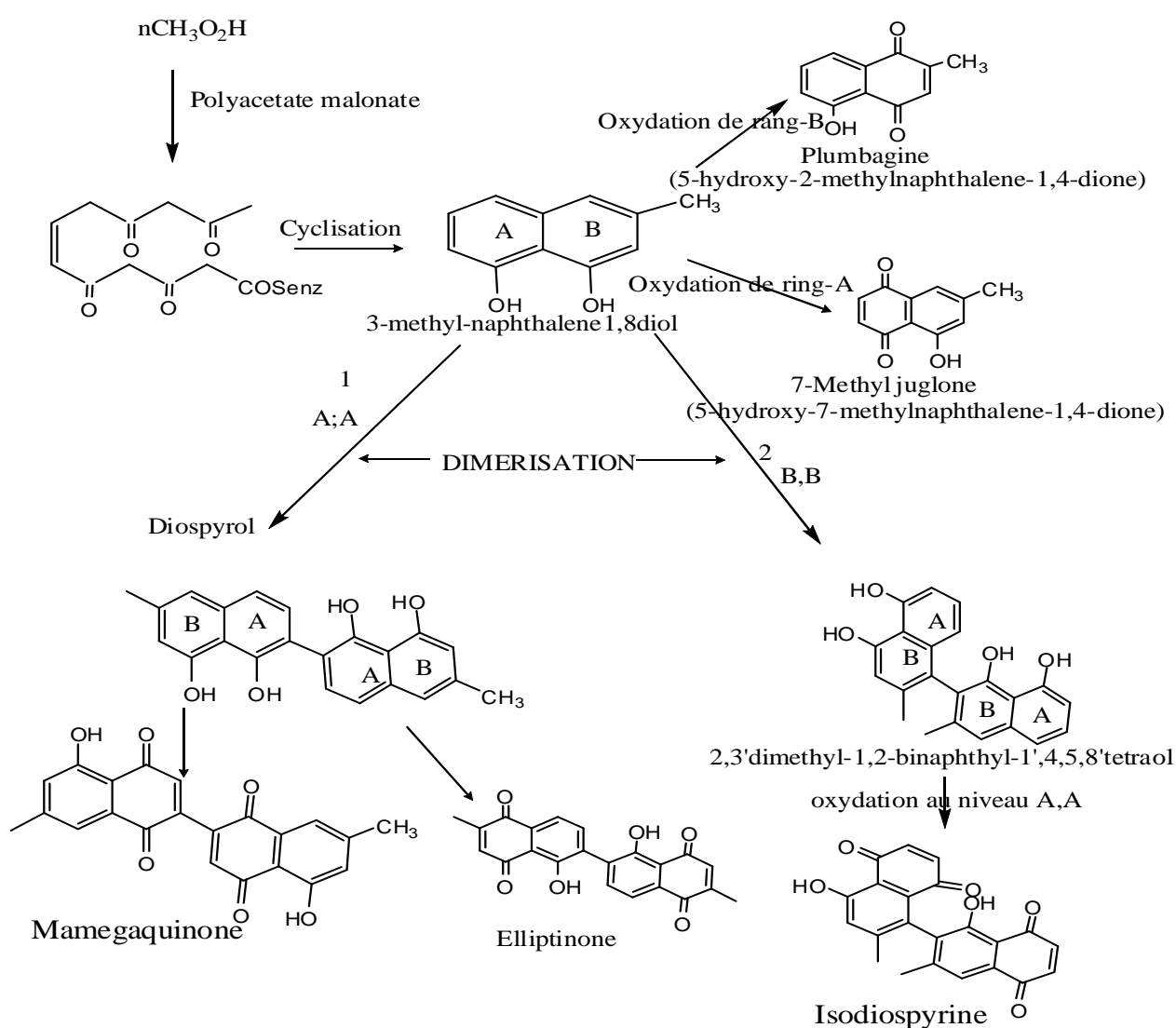
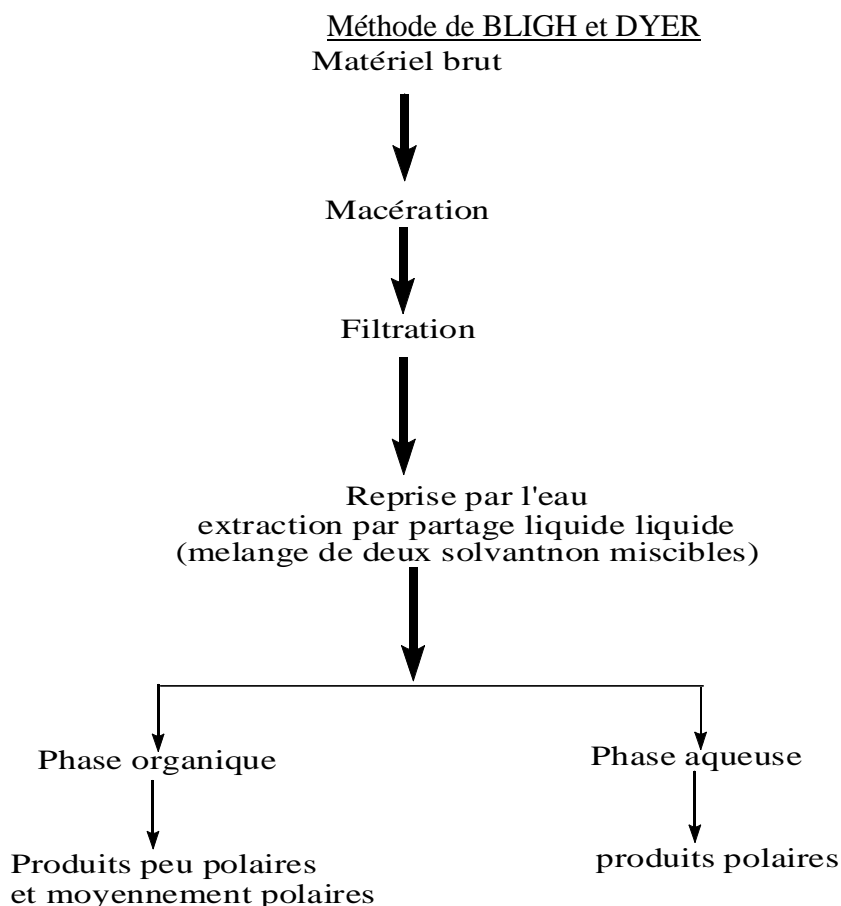


Figure .11 : Mécanisme de la formation de l'Isodiospyrine

I.2.6- Méthode d'extraction

Il n'existe que très peu de méthodes générales d'extraction de substances naturelles. Chaque équipe de chercheurs utilise sa propre technique pour isoler tel ou tel produit naturel ; néanmoins, on peut choisir deux schémas principaux.

I.2.6.1- Méthode d'extraction par gradient de polarité de solvant :



L'isolement et la purification de divers produits s'avèrent longs et difficiles car tous les produits autres que les produits peu polaires se trouvent dans une seule phase. On utilise généralement cette technique pour les substances d'origine marine et pour les plantes ne contenant pas de chlorophylle.

I.2.6-2 Méthode extraction par solvant spécifique

La recherche concernant les familles chimiques des alcaloïdes ; consiste en une extraction spécifique, en ce sens que l'extrait obtenu ne contient plus que des alcaloïdes bruts et cela facilite la purification des produits.

I.3-LES DETERMINATIONS STRUCTURALES

I.3.1-Principe

La détermination de la structure chimique est basée sur l'interprétation des spectres de R.M.N et de spectres de masse du produit isolé.

I.3.2- Résonances Magnétique Nucléaires R.M.N

I.3.2-1 Introduction [70]

C'est en 1946 que deux groupes de physiciens, les équipes du Professeur BLOCH à Stanford et l'équipe du Professeur PURCELL à Harvard, en cherchant à mettre en évidence des transitions entre les états de spins nucléaires, concept purement théorique à cette époque, ont obtenu pour la première fois des signaux de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Après le succès de cette démarche relevant de la recherche fondamentale, la RMN est née et a explosé vers des multiples applications touchant :

- la chimie avec l'élaboration des structures chimiques et la dynamique moléculaire,
- le domaine médical avec l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

I.3.2.2- Principe de la RMN[71]

La résonance magnétique nucléaire est une technique de spectroscopie appliquée aux particules ou ensemble des particules atomiques ayant des noyaux caractérisés par un spin nucléaire non nul I et un moment magnétique nucléaire μ qui sont tous deux quantifiés : ils sont équivalents à de petits aimants tel que :

$$\mu = \gamma \times I \quad \{1\}$$

I : spin

μ : moment magnétique nucléaire

γ : rapport gyromagnétique

Les valeurs de I peuvent être prévues empiriquement à partir du nombre p de protons et du nombre n de neutrons constituant le noyau :

si p et n pairs : $I = 0$ (exemple : ^{12}C , ^{16}O)

si p et n impairs : I est un entier (exemple : ^2H , ^{14}N pour lesquels $I = 1$)

si $(p + n)$ est impair : I est un demi-entier (exemple : ^1H , ^{13}C , ^{31}P)

Nous développerons uniquement les noyaux ayant $I = \frac{1}{2}$ (proton et carbone 13 qui ont un $\gamma > 0$) puisque ce sont eux essentiellement qui sont utilisés en chimie organique pour l'élucidation structurale.

En présence d'un champ magnétique extérieur B_0 , les noyaux de spin $\neq 0$ se répartissent de façon inégale suivant deux niveaux d'énergie E_1 et E_2 avec N_1 le nombre de noyaux dans l'état d'énergie le plus faible E_1 et N_2 le nombre de noyaux dans l'état d'énergie excité E_2 .

Le rapport des populations à l'équilibre N_1/N_2 est donné par l'équation de Boltzmann :

$$N_1/N_2 = \exp(-\Delta E/kT) \quad \{2\}$$

k : constante de Boltzmann

T : température absolue [K]

Si $I = 1/2$, l'excès de noyaux ΔN ($N_1 - N_2$) orientés suivant B_0 est donnée par la formule :

$$\Delta N/N = 2 \mu B_0 / kT \quad \{3\}$$

K : constante de Boltzmann

T : température absolue [K]

B_0 [gauss]

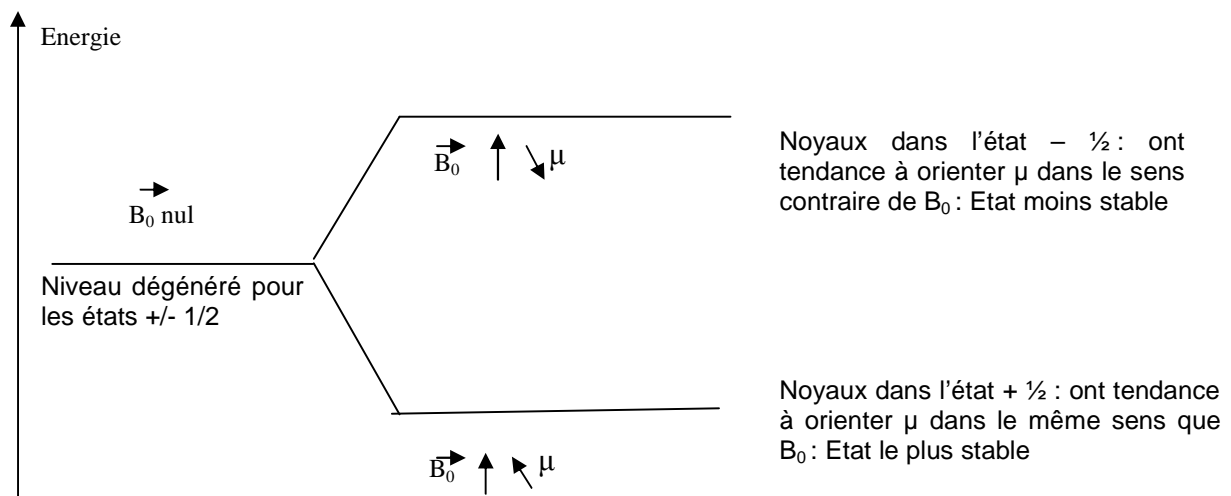


Figure.12 : Levée de dégénérescence du niveau d'énergie des noyaux

La RMN consiste à faire passer le moment magnétique nucléaire du niveau de plus basse énergie à celui de plus grande énergie en appliquant une énergie électromagnétique extérieure $\delta E = E_2 - E_1 = h\nu$. Le passage des noyaux du niveau d'énergie E_1 au niveau d'énergie E_2 se traduit par l'apparition d'un signal de résonance.

La relation mathématique existant entre le champ magnétique imposé de norme B_0 et la fréquence de résonance ν_0 est :

$$\nu_0 = \gamma \times \frac{B_0}{2\pi} \quad \{4\}$$

Où γ est le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau étudié.

En fait, la différence de populations entre l'état le plus stable et l'état excité est très faible. Pour donner un exemple concret, pour les protons des molécules de chloroforme à température ambiante et dans un champ magnétique B_0 de 1 Tesla, les deux populations N_1 et N_2 ne diffèrent que d'environ 10 unités sur un million. Comme la force du signal de résonance dépend de la différence de population, la RMN s'est heurtée au début à un problème technique de détection. Si on se réfère à la formule {4}, on peut augmenter δN de deux façons :

- (i) augmenter N , c'est-à-dire utiliser des quantités importantes de produit,
- (ii) augmenter le champ B_0 .

Dans le premier cas, il est difficile d'isoler sur le plan pratique des quantités importantes de produit naturel. De plus, une concentration trop élevée entraîne inévitablement des phénomènes de viscosité. C'est pour cela que la technologie de la RMN a évolué vers la fabrication des aimants superpuissants. Au départ, l'aimantation par bobine classique des appareils de RMN qui fonctionnaient à 60 MHz entraînait un échauffement rapide et élevé de la bobine ; l'introduction des aimants supraconducteurs ou cryo-aimants refroidis à basse température à l'Hélium liquide a permis de fabriquer actuellement des appareils à 800 MHz ou plus qu'on appelle la RMN à haut champ.

La RMN à onde continue ou RMN à balayage de champ [40]

D'après l'équation {2}, on peut obtenir une résonance de deux façons : (i) faire varier ν_0 ou (ii) faire varier B_0 . Les premiers appareils de RMN de 60 à 100 MHz fonctionnaient par onde continue. Cette technique consiste à soumettre l'échantillon à analyser à une radiation électromagnétique de fréquence ν_0 très stable, et à faire varier le champ magnétique appliqué B_0 . Le choix de cette technique vient du fait que, sur le plan pratique, il est difficile de maintenir B_0 très stable.

La R.M.N impulsionnelle

Le progrès de l'électronique et de l'informatique a permis l'avènement d'une autre méthode qu'on appelle la *R.M.N impulsionnelle*. Dans cette technique, on fait passer la fréquence ν_0 à travers une bobine. L'émetteur d'onde électromagnétique envoie alors des impulsions très brèves telles que l'onde est *polychromatique*, c'est-à-dire contient une large intervalle de fréquence autour de ν_0 . Les noyaux de fréquence d'absorption ν_e vont interagir fortement avec l'onde de fréquence ν_e : il y a alors une forte absorption d'énergie qu'on détecte par un signal de fréquence ν_e . Quand l'impulsion cesse, l'aimantation se met à osciller pour tendre à reprendre sa position d'équilibre, alignée sur B_0 . L'oscillation induit aux bornes de la bobine détectrice un signal de relaxation décroissant de fréquence correspondant à ν_e .

Ce signal est appelé en anglais « Free Induction Decay » (FID). La F.I.D contient toutes les informations de la résonance, mais elle n'est pas exploitable en tant que tel en analyse structurale. C'est pour cette raison qu'on a introduit la transformation de Fourier (FT) de ce F.I.D afin de générer un signal classique qu'on rencontre en RMN à onde continue. Ceci est schématisé par la figure 14

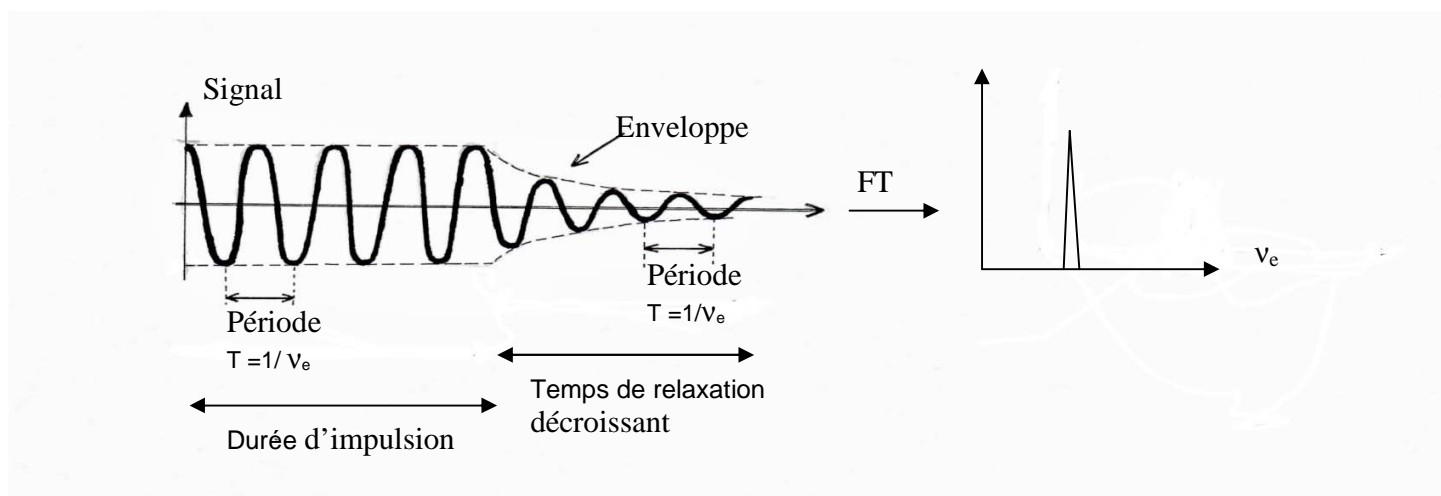


Figure.13 : Transformation de Fourier : à gauche un FID et à droite le signal correspondant après transformée de Fourier.

Une impulsion correspond à un spectre complet. On peut donc enregistrer plusieurs fois le même spectre en envoyant plusieurs impulsions, autant qu'on veut dans la limite de la disponibilité de l'appareil. C'est la technique de l'accumulation qui permet de résoudre le problème des petites quantités. La F.I.D obtenue est la somme de tous les spectres.

Grâce au progrès de l'informatique et de la technologie de l'information et de la communication (TIC), la F.I.D peut être numérisée et envoyée aux utilisateurs *via* Internet par *File Transfer Program* (F.T.P). Le traitement des données numériques ainsi obtenues est effectué à l'aide des logiciels appropriés, pour citer le TOPSPIN de la firme Bruker. L'IMRA dispose de ce logiciel. Nous donnons la F.I.D du spectre protonique du produit qui fait l'objet de cette thèse et le spectre de RMN correspondant.

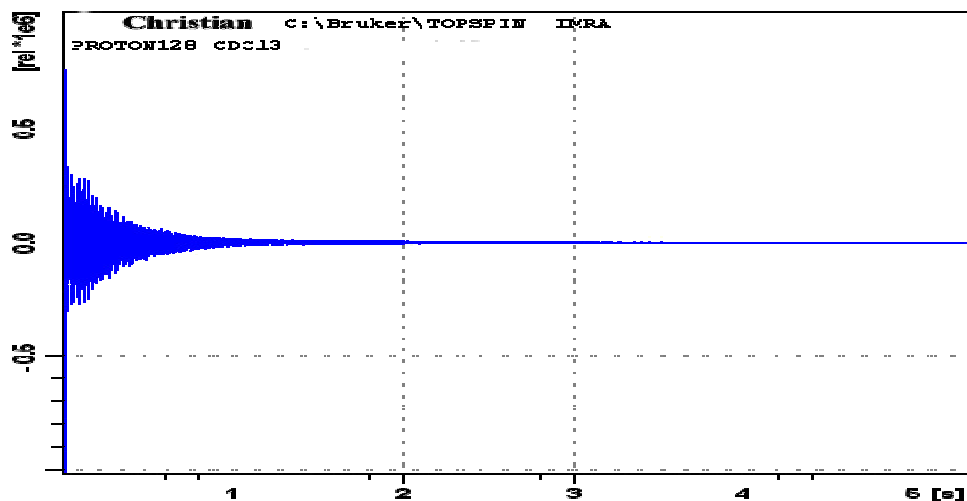


Figure.14 : F.I.D

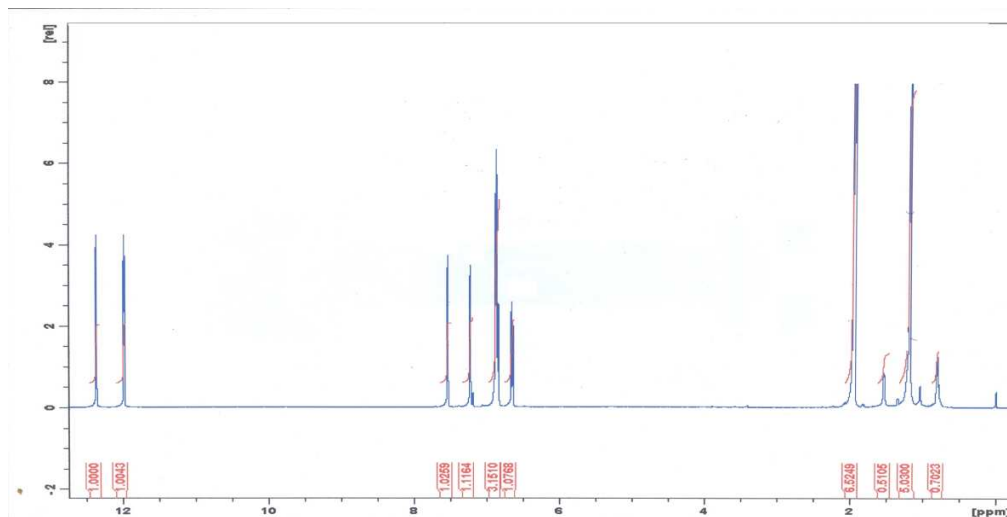


Figure.15 : Spectre de ^1H obtenu après traitement de son FID.

I.3.2.3- Déplacement chimique

En pratique, les noyaux sont toujours dans un environnement ou cortège électronique qui constitue un écran magnétique par rapport au champ extérieur appliqués. Cet effet d'écran caractérisé par une constante qu'on appelle constante d'écran σ dépend essentiellement de la place du noyau dans la molécule et dans l'état où elle se trouve (en solution dans un solvant donné). Le champ effectif B_{effectif} de fréquence ν_{effectif} ressenti par le noyau sera alors plus faible que le champ appliqué (de fréquence ν_0) :

$$B_{\text{effectif}} = B_0 (1 - \sigma) \quad \{5\}$$

On aura donc un petit écart qui va permettre de caractériser l'environnement du noyau. Ainsi, on aura autant de fréquences absorbées qu'il y a de noyaux ayant un environnement différent. Pour quantifier ce petit écart entre les noyaux d'environnement différent, on a introduit la notion de fréquence de référence qui est celle du tétraméthylsilane (TMS), et on a défini le déplacement chimique comme suit :

$$\delta = (\nu_e - \nu_{\text{TMS}}) / \nu_0 \quad \{6\}$$

L'intérêt de définir ce déplacement chimique qui est un rapport de fréquences réside dans le fait qu'il est indépendant de B_0 . Ses valeurs ne dépendront donc pas de l'appareil utilisé. Par convention, le déplacement chimique du TMS est égal à 0, et les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au TMS.

Il existe des tables qui donnent les déplacements chimiques des noyaux (comme le proton ou le carbone 13) suivant leurs environnements électroniques. Ils sont très précieux pour l'analyse structurale.

I.3.2.4- Couplage spin-spin

On obtient une seule raie de résonance (singulet) lorsqu'un noyau d'hydrogène subit une transition nucléaire d'un état de spin donné à un autre niveau plus élevé. Mais les atomes d'hydrogène voisins, géminés et vicinaux, de par le niveau d'énergie de leurs états de spin, peuvent entraîner une nouvelle perturbation des niveaux d'énergie du noyau en résonance. Ainsi, les protons ne donnent pas tous des singulets mais pour certains, on observe des multiplets (doublet, triplet, quadruplet, etc.). L'interaction entre les moments magnétiques des noyaux à travers les liaisons chimiques est appelée *couplage spin-spin*. Ce dernier est responsable de cette multiplicité.

La distance commune entre deux raies d'un multiplet, appelée constante de couplage est désignée par la lettre J et est exprimée en Hertz (Hz). Ces constantes de couplage sont désignées par les symboles nJ , n indique le nombre de liaisons séparant les noyaux couplés. Si $n = 1$, seule la nature des noyaux est précisée (exemple $J_{\text{H}-^{13}\text{C}}$). Les constantes de couplage 2J entre protons géminés et 3J entre protons dits vicinaux ont généralement des valeurs importantes. Par contre, les couplages associés à $n > 3$ sont généralement faibles. Cependant on connaît des couplages à longue portée appelés également couplage à longue distance. Parmi eux, on distingue le couplage allylique et le couplage du système MW.

La valeur des constantes de couplage entre deux protons vicinaux varie avec l'angle dièdre θ . Cette variation est décrite par l'équation de KARPLUS et CONROY:

$$^3J = A + B \cos \theta + C \cos 2\theta \quad \{7\}$$

Avec les constantes $A = 4.22$, $B = -0.5$, $C = 4.5$

Les expériences de double irradiation suppriment le couplage entre deux protons, et permettent ainsi de connaître si les deux protons en question sont couplés ou non entre eux.

I.3.2.5-Application à la détermination structurale

I.3.2.5.1- La RMN 1D du ^1H et du ^{13}C [72]

La RMN du ^1H permet d'attribuer à chaque signal le déplacement chimique des sites protonés. Elle donne une idée sur la nature de ces sites en fonction de la zone d'apparition de leurs déplacements chimiques ($0,5 < \delta < 13$ ppm).

La RMN du ^{13}C découplé ^1H (BB : Broad Band decoupling) consiste à appliquer à l'acquisition du spectre, une fréquence centrée sur la zone de résonance du ^1H provoquant l'irradiation de ce dernier. On obtient alors un spectre ne comportant que des singulets sous forme de pics très fins correspondant chacun à un carbone de la molécule. Ainsi, le nombre total des pics équivaut au nombre total de carbones constituant le composé à condition qu'il n'y ait pas de superposition de pics.

Le spectre $^{13}\text{C} - J$ modulé (DEPT : Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfert) enregistré dans deux phases inverses, met dans deux côtés opposés par rapport à la ligne de base, les carbones à nombre pair de proton (méthylènes d'une part) et ceux à nombre impair de proton (méthynes et méthyles d'autre part). Les signaux des carbones quaternaires ne comportant pas de proton n'apparaissent pas sur le spectre DEPT.

I.3.2.5.2- La RMN 2D [73-75]

L'expérience de RMN à deux dimensions appartient à la spectroscopie à impulsions et repose sur une succession de trois intervalles de temps : préparation, évolution et détection. Dans un certain nombre d'expériences s'y ajoute encore une autre période appelée temps de mixage avant la détection.

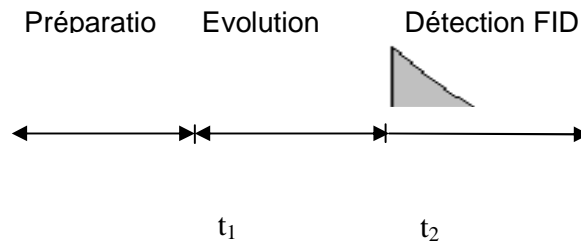


Figure.16: Echelle de temps d'expériences de RMN 2D

On parvient à obtenir le spectre 2D grâce à la séquence d'impulsions que nous représentons à la figure 17, et qui s'effectue lors du temps d'évolution.

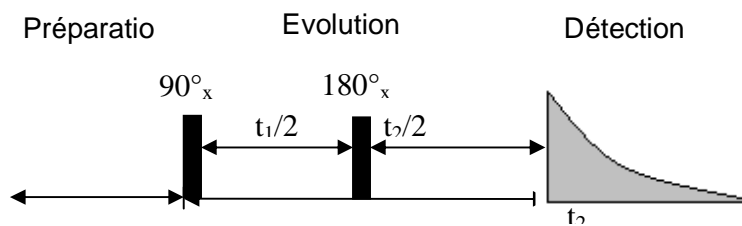


Figure.17 : Séquence d'impulsions d'un spectre 2D

L'exploitation d'un tel spectre est difficile dans un espace à trois dimensions (Figure 18-a). Aussi, on effectue une « coupe transversale » à un niveau suffisant donnant une ou des taches dite(s) taches de corrélation (figure 18- b).

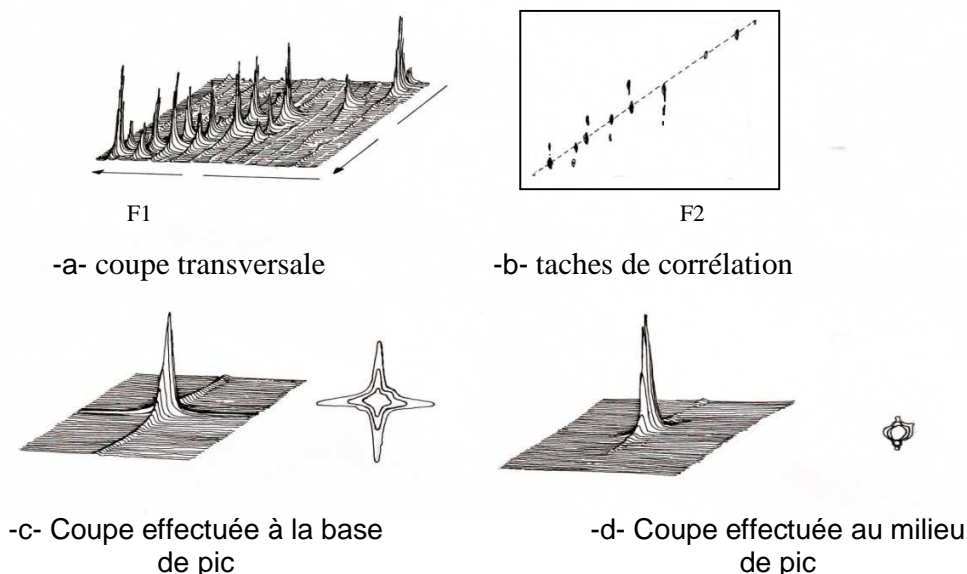


Figure.18 : Allure des spectres 2D

Les spectres 2D sont représentés dans un plan avec deux axes de coordonnées portant des valeurs de déplacements chimiques exprimés en partie par million (ppm). On distingue deux types de spectres 2D : homonucléaire (^1H - ^1H) et hétéronucléaire (^1H - ^{13}C). Les corrélations entre les noyaux concernés se traduisent par des taches sur les spectres.

I.3.2.5.2.1- La corrélation homonucléaire

a- CO SY : COrrrelation SpectroscopY

C'est un spectre de corrélation ^1H - ^1H . En abscisses et en ordonnées sont portés les δ (ppm) des ^1H . Le spectre a la forme d'un carré. Les taches le long de la diagonale correspondent à celles du spectre ^1H -1D et celles en dehors de la diagonale sont les taches de corrélations.

Les couplages détectables sur la carte symétrique ne s'étendent qu'à travers deux liaisons (protons géminés) et trois liaisons (protons vicinaux). Par conséquent, les sites protonés voisins sont facilement repérés



Figure. 19: Corrélation entre ^1H géminés et vicinaux

b- NOESY: Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY

Ces spectres ^1H -2D ressemblant fortement aux COSY permettent d'obtenir des informations sur des ^1H proches dans l'espace, couplés ou non à travers des liaisons. Il s'agit de couplage dipolaire. Ainsi les spectres NOESY sont utilisés pour établir la structure tridimensionnelle d'une molécule, donc sa configuration et sa conformation. Un spectre NOESY s'exploite comme un COSY.

I.3.2.5.2.2- La corrélation hétéronucléaire

Ce type de corrélation exploite l'existence du couplage scalaire hétéronucléaire permettant un transfert d'aimantation du noyau le plus sensible ^1H vers le noyau le moins sensible du carbone ^{13}C .

a- HMQC : (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**orrelation) ou

HSQC: (**H**eteronuclear **S**ingle-**Q**uantum **C**orrelation)

Il donne la corrélation entre le(s) proton(s) et le carbone qui le(s) porte (nt). Les tâches indiquent donc la connexion entre C et H. Elles permettent de déduire le nombre de carbones protonés et d'attribuer les protons correspondant à chaque carbone. Ainsi, les protons géminés non équivalents sont mis en évidence très facilement (Deux protons pour une seule valeur de carbone).

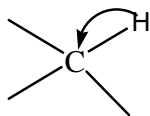


Figure.20: Corrélation directe ^1H - ^{13}C

b- HMBC: **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation

Il permet l'observation des corrélations proton-carbone à longue distance, généralement en α et β .

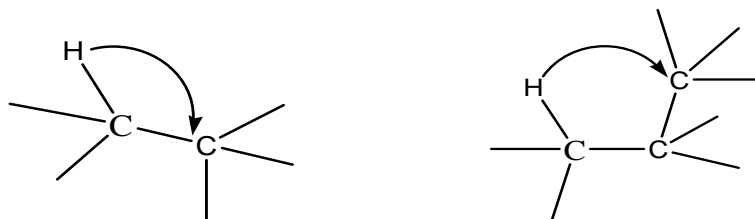


Figure. 21 : Corrélations en HMBC en position α et β

Le nombre de liaisons qui séparent un proton présentant une corrélation avec un carbone, varie avec l'ensemble des paramètres favorisant la transmission du couplage : géométrie de la molécule, électronégativité des substituants. Dans le cas de systèmes insaturés, des corrélations entre ^1H et ^{13}C distants de 4 à 5 liaisons peuvent être mises en évidence. Des corrélations de type $^1\text{J } ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ peuvent apparaître sur le spectre sous forme de taches symétriques par rapport au δ du ^1H .

I.3.3-La spectrométrie de masse [76à 83]

I.3.3.1- Généralité

La spectrométrie de masse donne des indications sur la masse moléculaire et la structure lorsqu'on étudie la fragmentation de l'ion moléculaire ou elle permet de faire la vérification de la structure d'un produit isolé dans une plante ou d'un produit isolé à partir de la synthèse organique.

I.3.3.2- Principe de la spectrométrie de masse

La base de la spectrométrie de masse est de provoquer l'ionisation de la molécule. La quantité ionisée possède une énergie interne qui lui permet de se fragmenter pour donner le fragment :

$$\text{M} \xrightarrow{\text{ionisation}} \text{M}^i \longrightarrow \text{Fragments}$$

Cette décomposition est liée à la structure de la molécule étudiée. Qui est la caractéristique de la molécule. Le spectre courant sert à détecter les ions positifs ou négatifs, il résulte de la décomposition M^+ .

I.3.3.2-Caractéristiques

La S.M est une technique qui opère en phase gazeuse et il faut vaporiser préalablement les systèmes à étudier. Cette technique est une méthode destructive, c'est-à-dire l'échantillon à étudier n'est plus récupérable après l'analyse.

C'est une technique de grande sensibilité d'un échantillon de l'ordre de 1ng peut être détecté par l'appareil, elle opér. à très basse pression de l'ordre de 10^{-6}mmHg par rapport à la pression atmosphérique de 760mmHg. Cette raison qu'on veut réduire la minimum interaction moléculaire pour avoir d'un bon spectre.

I.3.3-4 Potentiel analytique de la spectrométrie de masse

La première information donnée par cette technique est l'indication de la masse moléculaire d'un composé inconnue. La deuxième information peut donner des renseignements sur les groupements fonctionnels qui produisent des fragments caractéristiques.



I.3.3-5 Classifications des spectrométries des masses

Les spectrométries de masse pour la détermination de structure peuvent être classées selon les techniques et les modes de production des ions du produit à analyser

Ces classifications sont résumées dans le tableau-I

Tableau-I : Résumé des classifications des spectrométries de masse

TECHNIQUES	MODE DE PRODUCTION DES IONS	ANALYSEUR DE MASSE	NATURE DE L'ECHATILLON DANS LA SOURCE
I.E : Impact Electronique	Impact d'électrons de 70eV1, 13.10^{-2} Pa	Quadripôle (Q) où Secteur magnétique (B) où	Gaz
IC : Ionisation chimique	Plasma d'ion réactant $1,13.10^1$ à $1,13.10^2$ Pa		Gaz
ES Electrospray	Gradient de champ électrique et énergie thermique création de microgouttelettes pression atmosphérique		Gaz
L.S.I.M Spectrométrie de Masse à Ions Secondaire avec cible Liquide	Impact d'ions de faible énergie (q.q KeV)	Résonance cyclotronique où	Solide
F.A.B Bombardement par Atomes Rapides	Impact d'atomes neutres (KeV)	Trappe ionique	Liquide (glycérol)
M.A.L.D.I : Désorption Laser Assistée par Matrice	Impact de photons émis par un laser	Analyseur à temps de vol (T.O.F)	Solide
P.D.MS Désorption de Plasma	Impact d'ions forte énergie (100MeV)		Solide

Un spectre de masse est une représentation du rapport de la masse à la charge, des fragments chargés avec leurs concentrations relatives. On attribue une valeur de 100% au pic le plus intense dans le spectre, le **pic de base** et les intensités des autres pics, incluant celle de l'ion moléculaire sont rapportés en pourcentage du pic de base.

I.3.3.6- Fragmentation

A première vue, la fragmentation d'une molécule avec un large excès d'énergie semble être une approche assez brutale pour déterminer la structure moléculaire.

Cependant les justifications utilisées pour faire correspondre le type de spectre avec la structure pour faire correspondre le type de spectre avec la structure ne peut être qu'élégante, bien que parfois arbitraire.

Les recherches dues à *Mac Lafferty*, *Beynon*, *Stenhagen* ont conduit à un certain nombre de mécanismes réactionnels de fragmentation.

Bieman, *Djerassi* et *Budzikiewicz*, les ont repris et travaillées de main maître. Généralement, la tendance est de représenter l'ion moléculaire avec une charge délocalisée.

L'approche de Djerassi est de localiser la charge positive soit sur une liaison π (sauf dans le système conjugué), soit sur un hétéro atome.

Exemple :

Les structures A et B représentent l'ion moléculaire du cyclohexadiène.

Le composé A est une structure délocalisée avec un électron de moins que le diène original non chargé. Les électrons et la charge positive sont délocalisés sur le système π . Comme électron enlevé pour former l'ion moléculaire est un $e^- \pi$. D'autres structures comme B et C (structure de valence) peuvent être utilisées. Des structures comme B et C localisent l'électron et la charge positive et sont de ce fait utilisées pour décrire les processus de fragmentation.

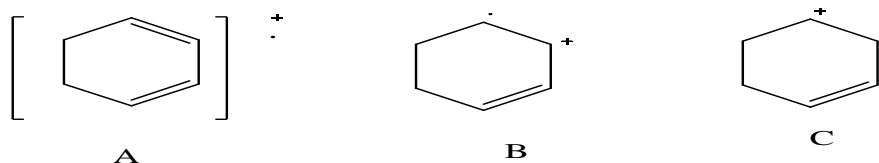


Figure.22 : Localisation de l'électron et de la charge positive

La fragmentation a été initiée par l'impact électronique, ce n'est qu'une faible partie de la force motrice de fragmentation qui est de l'énergie de transfert comme résultat de l'impact. La majeure partie de cette force est le radical cation qui impose la structure.

La fragmentation d'ion moléculaire à nombre impair d'électron (radical cation M^+) peut se faire par le clivage homo ou hétérolytique d'une liaison simple.

a-Cas homolytique

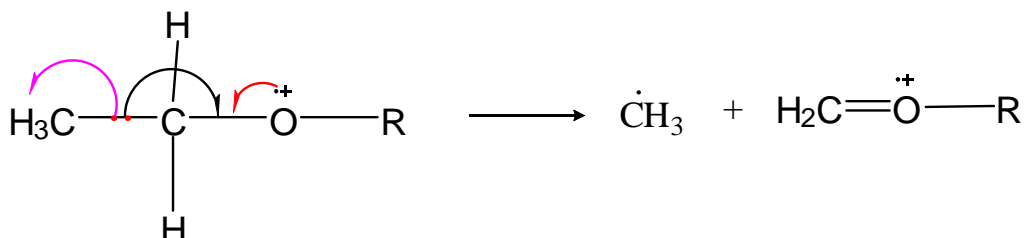


Figure.23 : Coupure homolytique

b- Cas hétérolytique

C'est une paire d'électron qui bouge ensemble vers le site de charge comme indiqué par la flèche.

Les fragments ont été à nouveau un cation à nombre pair d'électron et un radical mais ici la charge finale se trouve sur le produit alkyle.

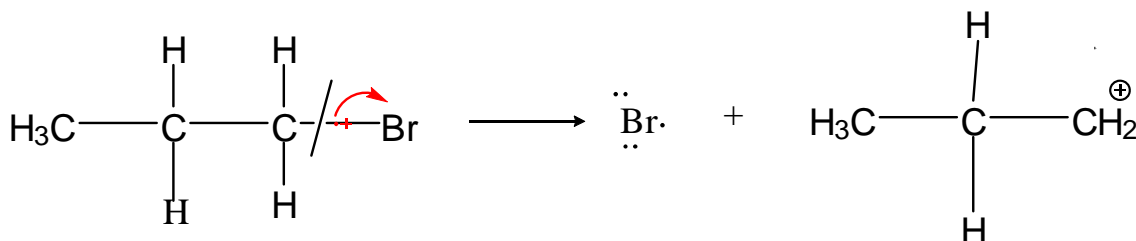


Figure.24 : Coupure hétérolytique

Il y a certaines règles générales pour pouvoir identifier les pics majeurs dans le spectre EI et CI peuvent être écrites et rationalisées en utilisant le concept standard de la chimie physique.

-La hauteur relative des pics des ions moléculaires en général, décroît quand les poids augmentent dans la série homologue.

-La hauteur relative du pic de l'ion moléculaire est la plus élevée pour un composé à chaîne linéaire et décroît à mesure que le degré de ramification augmente.

-Le clivage est favorisé au niveau des atomes de carbone substitué par des alkyles. Plus il est substitué plus le clivage est probable.

C'est une conséquence de la stabilité croissante de carbocation.

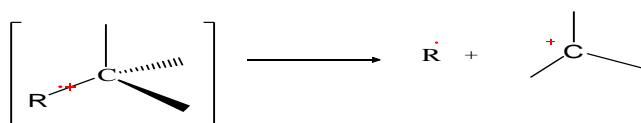


Figure.25 : Clivage au niveau des atomes de carbone substitué par les alkyles

-Les liaisons doubles favorisent le clivage allylique et donnent le carbocation allylique stabilisé par la résonance.

Notons que cette règle n'est pas valable pour les alcènes simples à cause de la migration de la liaison double mais elle est valable pour les cycloalcènes.

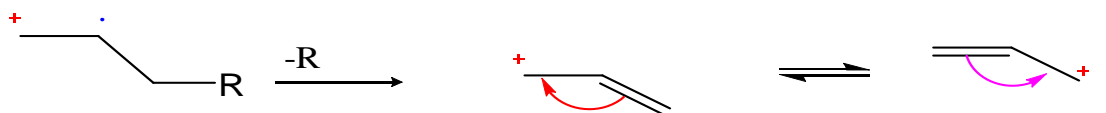


Figure.26 : La coupure au niveau de la chaîne insaturée

-Les cycles saturés tendent à perdre les chaînes alkyles latérales au niveau de la liaison α . C'est purement un cas spécial de ramification, la charge positive tend à rester sur le fragment cyclique.

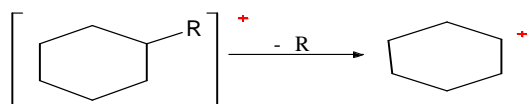


Figure.27 : Perdre d'alkyle latérale sur cycle saturé

-Les cycles insaturés peuvent subir une réaction de *Rétro-Diels-Alder*

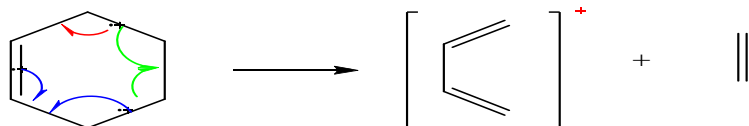


Figure.28 : Mécanisme de réaction de *Rétro-Diels-Alder*

-Dans les composés aromatiques substitués par les alkyles, le clivage est plus probable au niveau de liaison en β par rapport au cycle donnant un ion benzyne stabilisé par résonance, ou plus probablement l'ion tropyllium.

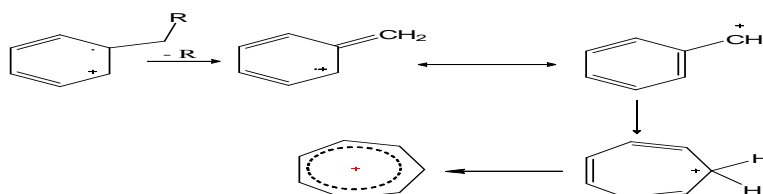


Figure.29 : Clivage au niveau de liaison β par rapport au cycle

Les liaisons $C-C$ contenant l'hétéro atome dont les électrons non liants produisent une stabilisation par résonance.

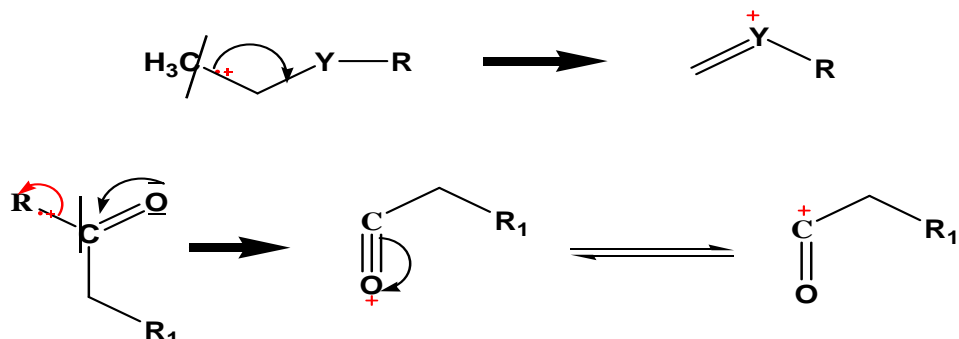


Figure.30 : Clivage au niveau de l'hétéroatome stabilisé par résonance

Les ions ayant subi un réarrangement sont des fragments dont l'origine ne peut être décrite par simple clivage, des liaisons dans les ions moléculaires. Ils sont formés par un réarrangement atomique intramoléculaire pendant la fragmentation. Le réarrangement impliquant la migration d'atome d'hydrogène dans les molécules qui contiennent un hétéro atome est très courant. Un exemple important est le réarrangement de Mc Lafferty : [45]

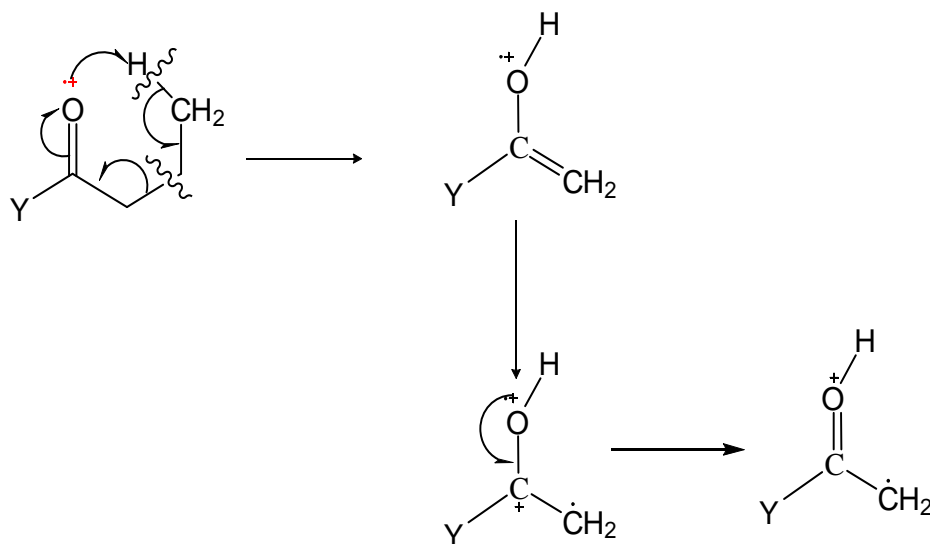


Figure.31 : Réarrangement de Mc Lafferty

DEUXIEME PARTIE

MATERIELS ET METHODES

II.1-MATERIELS	35
II.2-METHODES	43

II.1. MATERIELS

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1. Récolte de la plante

La récolte de *Remeloky ou Maintifototse* a été faite sur deux lieux différents.

La première récolte a été faite à Ampasy dans la commune d'ANKILIABO/MANJA avec collaboration d'un guérisseur nommé MAHAZONTA au mois d'Octobre 2005 DANS LE R2GION Sud Ouest de Madagascar. La deuxième récolte à été faite dans le Parc National d'Izombitse à SAKARAHHA dans la région Sud Madagascar pendant la saison de pluie au mois du Février 2006.

II.1.1.2. Description botanique

Nom scientifique : *Maba quercina* Baillon H. Perr

Genre : *Maba*

Espèce : *quercina*

Sous espèce : Baillon H.Perr

Famille : EBENACEAE

C'est un genre monotypique endémique de Madagascar. Il contient de 21 espèces, c'est un arbre ou/et arbuste toujours verts. Elle est distribuée dans le région chaude de Madagascar dont : 2 espèces dans la région Sud, 2 espèces dans le Nord ; 4 espèces dans le Nord-est ; 2 espèces dans le Sud-ouest 2 espèces dans le Sud-est et 9 espèces dans le Nord-Ouest.

Ces genres peuvent être divisés en deux groupes suivant la forme de calice.

-groupe-1 : à calice collé sur le bouton, plus ou moins cylindrique, déchirant ensuite irrégulièrement.

-groupe-2 : à un calice manifestement denté ou lobé, les dents ou lobes réguliers, distinct sur le bouton très jeune.

L'espèce du *Maba quercina* a été classée dans le premier groupe.

C'est un arbuste de 3 à 5m de hauteur ; les feuilles sont distiques ou/et caduques, entièrement glabres même sur les écailles des bourgeons et les bractées, peu distantes, luisantes et sombre en dessus, peu coriaces, ondulées sur le bord et souvent pliées bord sur bord.

- Les pétioles (2.3mm) ridé en travers et largement canaculé en dessus.
- Les nervures latérales sont de (5-6paires) et un peu saillant formant réseau peu distinct sur la partie supérieure et réseau lâche au contraire, bien visible en dessous.

- L'inflorescence mâle : inconnue.
- L'inflorescence femelle : avant la chute des écailles, bourgeons à fleurs axillaires, sessile, conique de (3-4.-x 2-2.5) ; axe court (1-2mm) portant de 6-7 écailles imbriquées, coriaces glabres, embrassantes, arrondies, olivâtre, et cicatrices bien visible après la chute.
- Fleurs solitaire, sessile sur l'articulation qui termine l'axe.
- Calice entier, clos sur le bouton, s'ouvrant circulairement au sommet épais, haut de 4mm à l'anthèse, large 3mm au sommet et 1.5mm à la base.
- Corolle de 4mm de longueur à tube cylindrique de 2mm de largeur égalant à la longueur des lobes.
- Ovaire glabre, 6 loges à 1 ovulée, styles soudés en colonne trifide au sommet.
- Fruit ovale-aiguë de (10x4mm) un peu contracté à la base.

II.1.1.3. Etudes scientifiques effectuées sur le *Maba quercina* Baillon H.Perr

D'après les recherches bibliographiques sur internet, aucune étude scientifique antérieure sur la plante *Remeloky* n'a été signalée.

II.1.2. Matériels techniques

II.1.2.1. Matériels pour l'obtention de(s) produit(s) pur(s)

II.1.2.1.1. L'extraction

Plusieurs matériels pour faire l'extraction des plantes médicinales sont disponibles pour les chercheurs phytochimistes.

Dans notre travail, nous avons utilisé les matériels d'extraction par macération à l'aide du solvant organique et composés de :

- Erlen, agitateur magnétique (figure-35 Annexe-I)
- Papier filtre marque Joseph, entonnoir, pompe à vide (figure-36 Annexe-I)
- Rotavapor (figure-37 Annexe-I)

II.1.2.1.2. Séparation grossière

Pour la séparation grossière on utilise les deux types matériels qui diffèrent suivant les techniques applications.

II.1.2.1.2.1. Séparation à l'aide d'une chromatographie sur colonne(figure-38 Annexe-I)

Dans cette technique on utilise la colonne en verre de hauteur de 50cm et de diamètre 15 cm constituées deux phases :

- la phase stationnaire : gel de silice 60mesh
- la phase mobile : solvant organique (hexane, chloroforme, Acétate d'éthyle, acétone)

II.1.2.1.2.2. Séparation à l'aide d'une extraction par partage liquide-liquide

Dans cette technique on utilise l'ampoule à décanté muni d'un robinet sur la partie inférieur (figure-39 Annexe-I), et constituée de deux solvants non miscible.

II.1.2.1.3. Fractionnement

Pour faire les fractionnements des produits on utilise la colonne chromatographique

II.1.2.1.3.1. Colonne chromatographique d'adsorption (figure-40 Annexe –I)

Dans la technique de chromatographique d'adsorption, on utilise la colonne en verre et toujours constituée de deux phases (la phase mobile et la phase stationnaire).

- Les choix de taille de la colonne, la granulométrie de gel de silice ont été adaptés à la quantité et la nature des échantillons à fractionnés.
- Le choix de la phase mobile et la condition d'élution dépend de l'analyse par CCM

II.1.2.1.3.2. Colonne chromatographique d'exclusion

On utilise toujours de la colonne en verre de hauteur de 2.5m et diamètre de 1.5cm. Elle constituée de deux phases :

- La phase stationnaire : gel de sephadex® (LH-20)
- La phase mobile : solvant (méthanol/ chloroforme : 5/5)

II.1.2.1.3.3. Colonne chromatographique par partage

C'est un système de séparation pour éliminer le pigment. Elle constituée de la colonne ; la phase stationnaire est composé de Lichroprep® (RP-18) réalisée selon la principe de la VLC (chromatographie liquide sous vide). Elles ont été effectuées dans :

- entonnoirs Büchner avec verre fritté
- sous léger vide fourni par une pompe à eau

La phase mobile composée de l'acétonitrile/ eau

II.1.2.1.3.3. Colonne chromatographique de partage centrifugé(CPC)

Elles ont été réalisées sur un appareil ITO (Multi-Layer-Coil-Separator extractor Model) et la vitesse de rotation 800/rpm. La phase mobile délivre par pompe waters600A, et le débit 2-3ml/min. Les phases mobile et stationnaire ont été choisies selon les systèmes biphasique quaternaires : n heptane/ Acétate d'éthyle/Méthanol/ Eau [CAMACH-FRIAS 1996]

II.1.2.1.4. Matériels d'analyses

Les matériels utilisés pour faire l'analyse chimique du produit sont ceux de CCM. Elles sont effectuées sur de plaque de silica gel 60F_{254-365nm} toutes prêtes. Après le développement dans le cuve chromatographique (figure-42 Annexe –I), la plaque a été observée en lumière à UV 254 et 365nm (figure-43 Annexe –I).

Selon les cas, elles ont ensuite été révélées par des réactifs de détection relativement polyvalente, soit vanilline sulfurique ; Acide sulfurique de 10%, réactif de Dragendorff et finalement chauffé dans l'étuve de 120°C ou à l'aide d'un sèche cheveux jusqu'à l'apparition des taches de diverses couleurs sur fond jaune (figure-44 Annexe –I)

II.1.2.1.4.2.1. Préparation des plaques de gel de silice pour CCM

35g de gel de silice sont dissous dans l'eau de volume égal à 90ml, agités pendant cinq minutes pour avoir une solution bien homogène, la suspension de gel de silice a été étalée à l'aide de l'étaleur sur plaques de verre 20/20. On les laisse évaporer à l'air libre à la température du laboratoire pendant trois (3) jours. Après, les plaques ont été chauffées à l'étuve à 60°C pendant une (1) heure, puis chauffées pendant trois (3) heures toujours dans l'étuve à la température de 120°C

II.1.2.1.4.2.2. Préparation des réactifs

II.1.2.1.4.2.1. Vanilline Sulfurique

1g de poudre de vanilline a été dissous dans 100ml de méthanol à 90°, après quelques minutes, on lui ajoute 10ml d'acide sulfurique. Le mélange est conservé à 0°C pour éviter toute réaction d'oxydation.

II.1.2.1.4.2.2. Acide sulfurique de 10%

A la solution 10 ml d'acide sulfurique sont ajoutés à l'eau (90ml) pour former une solution à 10%.

II.1.2.1.4.2.3. Réactif de Dragendorff

1.7g de sous nitrate de bismuth, 20g d'acide tartrique sont dissous dans 30ml d'eau (solution notée A) ; puis 16g d'iodure de potassium sont dissous dans 40ml d'eau (solution notée

B). Au moment de l'emploi comme révélation, mélanger 2.5ml de A et 2.5ml de B ; ajouter 10g d'acide tartrique dissous dans 50ml d'eau.

II.1.2.1.5. Matériels des purifications de(s) produit(s) pur(s)

II.1.2.1.5.1. La chromatographie sur couche préparative(CCP)

Si les produits sont difficiles à séparer à l'aide de la technique de la chromatographie sur colonne, on utilise la technique CCP (figure-45 Annexe –I). C'est une plaque chromatographique de gel de silice d'épaisseur 2mm et le recouvrement sur verre.

II.1.2.1.5.2. L'HPLC analytique

D'après l'utilisation de CCP, les produits donnant une mono tache sur la CCM (figure-46 Annexe –I) ne signifie pas obligatoirement que ce produit est pur, mais la chance de l'avoir pur est très probable. Pour s'assurer de la pureté du produit, une analyse de ce produit à l'aide d'une HPLC analytique est réalisée (figure-47 Annexe –I)

II.1.2.2. Matériels des déterminations des structures

II.1.2.2.1. L'appareillage de la RMN

Les spectres RMN 1D du proton, du carbone 13 et RMN 2D (COSY ; HSQC ; HMBC) ont été enregistrés sur des spectromètres BRUCKER 600MHz (figure-48 Annexe –I). Les données brutes ont été traitées à l'aide d'un traitement informatique en utilisant le logiciel TOP SPIN 1-3 (figure-49 Annexe –I) pour avoir des spectres interprétables et les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) utilisé comme référence interne.

II.1.2.2.2. L'appareillage de masse

Les spectres de masse ont été obtenus sur l'appareil TOF analyseur à temps de vol 70eV (figure-50 Annexe –I), représente le pic moléculaire et les pics de masse après fragmentation.

II.2. METHODES

II.2.1- Récolte des plantes

Il existe deux méthodes systématiques pour la récolte des plantes :

- La méthode dite européenne qui consiste à faire une récolte de la plante au hasard c'est-à-dire qu'on va récolter les plantes qui se trouvent dans le lieu de récolte.
- La méthode américaine : qui c'est une récolte de la plante à partir l'enquête ethnobotanique auprès des populations locales pour savoir l'usage traditionnel des plantes.

Nous avons adopté pour notre part la méthode américaine.

II.2.1.1 Enquête ethnobotanique

a- Modalité d'enquête

Les vertus thérapeutiques des cératines plantes sont connues des malgaches. Depuis fort longtemps ils utilisaient ces plantes pour guérir et soigner les maladies.

L'utilisation des plantes était basée uniquement sur les expériences et transmise à chaque génération. Alors cette enquête qualifiée d'exhaustive concerne tous les individus d'une population proche de la nature : tradipraticiens, guérisseur, personnes bien pratiquées, de connaître le nom et l'utilisation des plantes.

Les enquêtes se déroulent comme suit : avant de parler des plantes médicinales, nous faisons un exposé en peu détaillé concernant les maladies et à la fin de cet exposé, nous posons des questions concernant les plantes utilisés par les populations pour combattre ces maladies, puis les parties utilisées pour faire les traitements.

Et enfin, nous essayons de leur demander leurs les différents noms vernaculaires pour faciliter les récoltes et bien comprendre leurs usages afin des faciliter les tests du criblage biologique.

b- Résultats des enquêtes

Dans la zone la plus aride de Madagascar « SAKARAHHA », *Maba quercina* Baillon. H. Perr est utilisée par la population locale pour soigner le «Tazo », qui est un mot malgache englobant plusieurs maladies parasitaires engendrant la fièvre.

D'après les enquêtes ethnobotaniques menées dans cette région, les parties aériennes de cette plante sont utilisées comme antipaludique.

Ce renseignement a été confirmé par deux tradithérapeutes, JONARY à Sakaraha et BARADA à Toliara. On fait bouillir les parties aériennes de la plante, puis on pratique une inhalation de la vapeur.

Un autre guérisseur nommé MAHANZOTA à (Ampasy/MANJA) a mentionné que les racines de cette plante peuvent être utilisées pour soigner les plaies ; Grattées, on en badigeonne le pourtour de la plaie.

II.2.2.Séchage, Broyage et Dégraissage

L'écorce de racine a été prélevée et puis ensuite séchée dans un local non humide à l'abri du rayonnement solaire, et broyée.

La poudre de la plante a été extraite par de l'éther du pétrole pour éliminer les graisses végétales.

II.2.3. Tests du criblage photochimiques

50g de poudre de la plante dégraissée ont été utilisés pour les tests de criblage photochimiques (selon les méthodes de FONG), pour avoir les familles chimiques des composés qui sont majoritaires ou/et existent dans cette plante.

Tableau-II : Les types des tests des criblages phytochimiques

Familles chimiques	Tests	Réactifs	Observation	Indication
Alcaloïdes	DRAGENDORFF WAGNER MAYER	(NO ₂) ₃ Bi/KI HgCl ₂ /KI I ₂ /K	Précipitation	Alcaloïdes
Flavonoïdes	WIL STATER BATE SMITH	0.5mL HCl concentré Mg métallique	Rouge Rouge pourpre Rouge violacé	Flavone Flavonol Flavonone
Tannins et polyphénols	BRONSTRAEGER LIEBERMENN BURCHARD KELLER-KILLIANI	4à5gouttes de gélatine à 1% 4à5gouttes de gélatine+NaCl 4à5gouttesFeCl ₃ 10% de MeOH	Précipité Bleu vert Noir bleuâtre	Polyphénols Tannin Catéchique Tannins galliques
Anthraquinones		5mL de l'ammoniaque	Rouge	Anthraquinones
Saponines		Eau distillée	Présence de mousse	Saponines
Polysaccharides		Méthanol	Précipité	Polysaccharides
Triterpenes et Stéroïdes		3à4 gouttes d'anhydride acétique + 3à 4 gouttes H ₂ SO ₄ concentré Quelques gouttes de FeCl ₃ + 1mL d'acide acétique glacial	Pourpre violet Bleu vert Rouge pourpre	Triterpenes Stéroïdes Terpenoïdes

II.2.4. L'isolement de(s) principe(s) actif(s) par les techniques des fractionnements **bioguidés**

II.2.4. 1.Extraction par macération

Parmi les méthodes d'extraction proposée par le chercheur chimiste organicien dans la littérature ; on applique dans notre étude la méthode d'extraction par macération de solvant organique.

Une quantité égale à 782g de poudre d'écorce de racine de *Maba quercina* Baillon *H.Perr* a été macérée dans l'acétone deux fois reprise à la température ambiante de laboratoire une durée de quatre heures à chaque macération.

Après les différentes étapes des filtrations, les solutions acétoniques obtenues ont été évaporées à sec ; l'extrait brut acétonique obtenu noté : Rup

10mg de Rup ont été passés aux différents tests du criblage biologique pour savoir l'activité de la plante. D'après les résultats des tests, le Rup possède une activité antiplasmodiale sur la souche FC29 et une activité cytotoxique sur la cellule cancéreuse P388

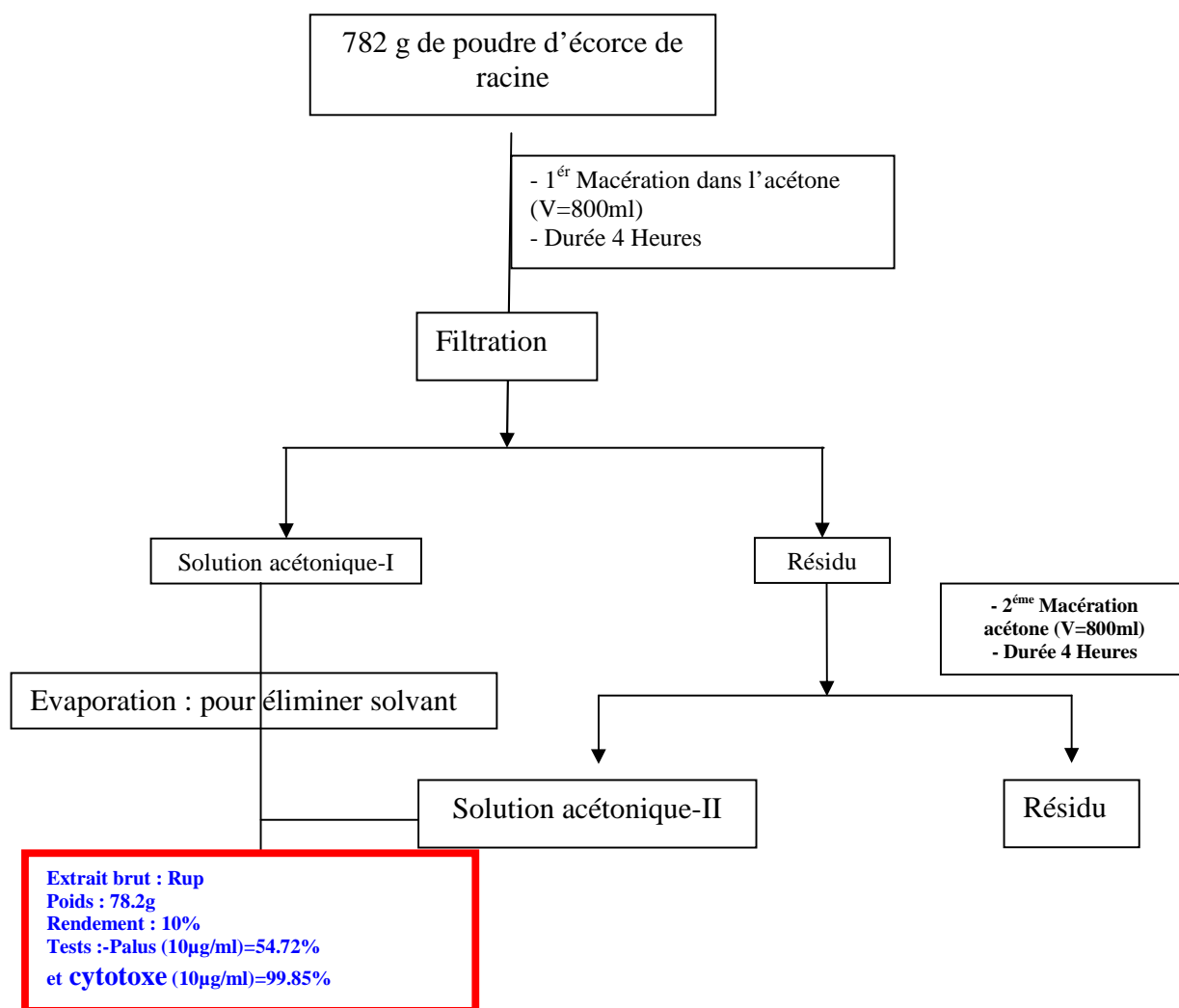


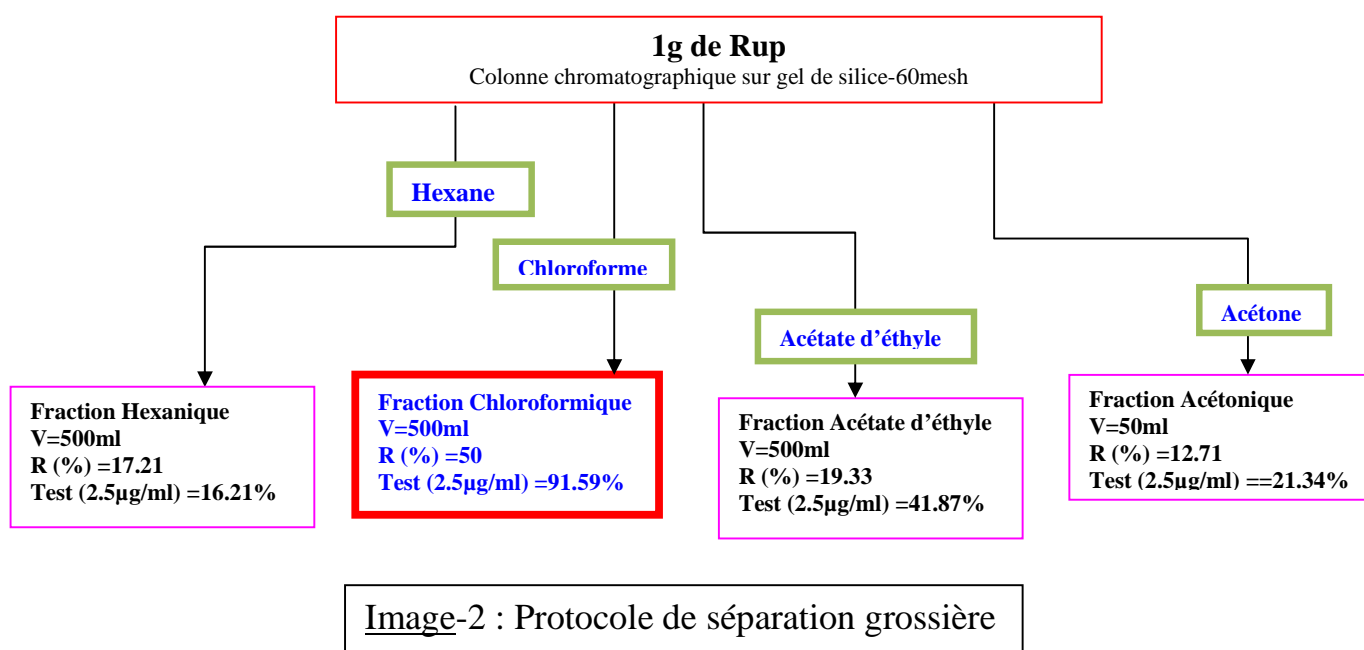
Image-1 : Protocole d'extraction

De ces deux activités de l'extrait brut de *Maba quercina Baillon H.Perr*, l'activité cytotoxique s'avérait plus intéressante par rapport à l'activité antiplasmodiale. De ce fait l'étude de cette plante a été orientée vers le test de cytotoxicité sur les cellules cancéreuses P 388.

II.2.4.2. Séparation grossière

1g de Rup a subi une première séparation grossière à l'aide d'une colonne chromatographique sur gel de silice de granulométrie 60 mesh comme phase stationnaire et des solvants de polarité croissante (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et acétone) comme phase mobile. Quatre fractions ont été ainsi obtenues.

Parmi ces quatre fractions, la fraction Chloroformique notée Rup-001 a montré la plus forte activité cytotoxique avec une inhibition de 95,47% pour une concentration de 5µg/ml.



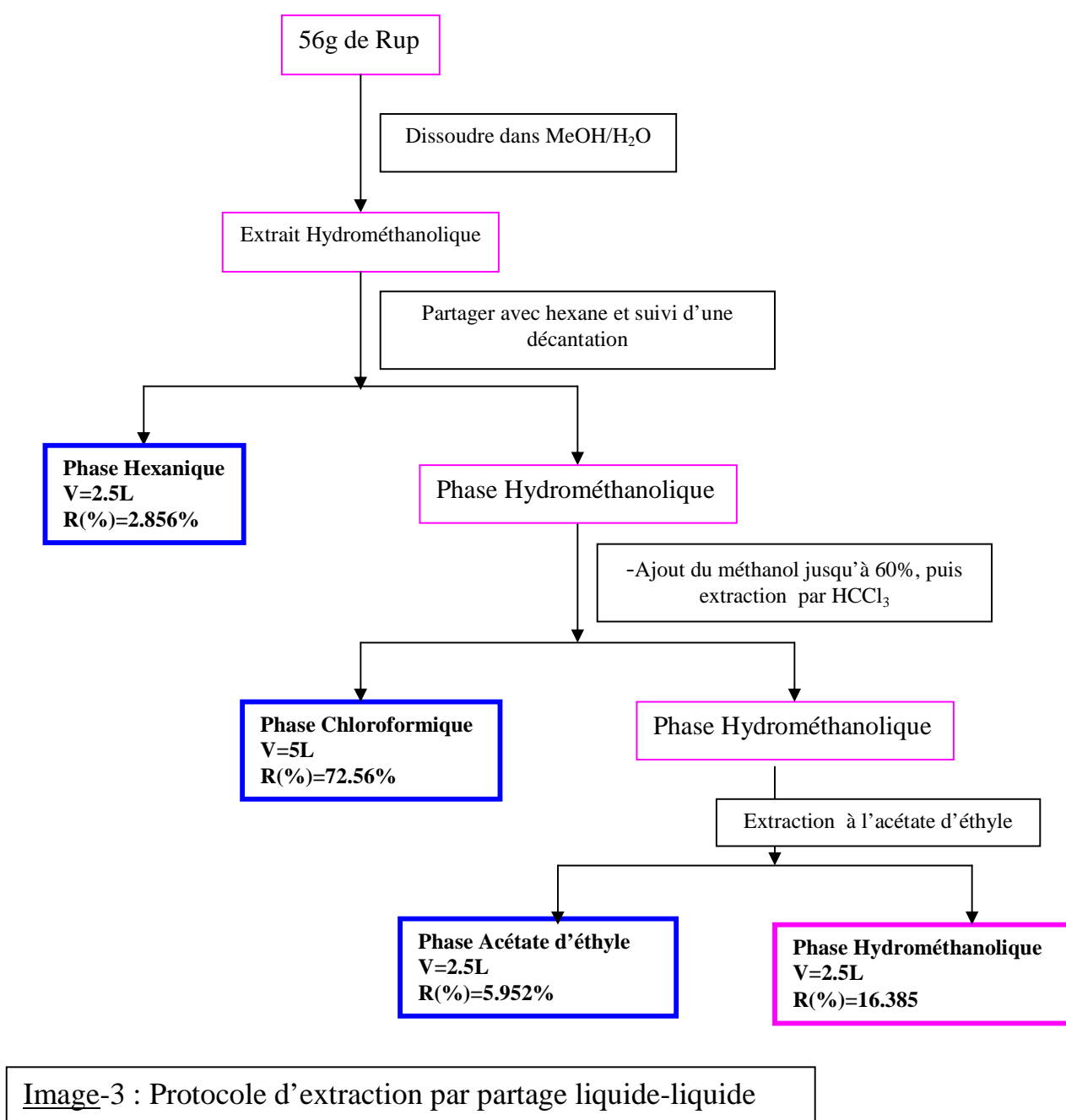
Les quantités qui ont été séparés par cette technique sont très faibles aussi, on a refait une séparation mais avec une autre méthode : extraction par partage liquide- liquide.

II.2.4. 3. Extraction par partage liquide

56g de Rup ont été séparés par un partage liquide -liquide selon une procédure proposée par GUNATILAKA(1998). Ces extraits ont été dans un premier temps dissous dans un mélange de méthanol /eau de proportion (80/20) et ensuite extraites par une phase apolaire hexane.

Après cette opération, à la phase polaire (Hydrométhanolique) a été ajouté du méthanol pour obtenir une phase polaire à 60% de méthanol, qui ensuite extraite par du Chloroforme. Après décantation de la phase Chloroformique ; la phase méthanolique aqueuse a été extraite par l'acétate d'éthyle.

Après évaporation des solvants, ce partage a donc permis d'obtenir quatre fractions des polarités croissantes.



II.2.4.4. Fractionnement bio-guidé de Rup-01(phase Chloroformique)

II.2.4.4.1. Principe

Il a été effectué sur une colonne chromatographique ouverte de gel de silice 35 à 60 mesh. Les choix des conditions d'élution, la séparation et les rassemblements finaux des fractions ont été basés sur les analyses en CCM.

II.2.4.4.2. Analyse par CCM du Rup-01

Des plaques en aluminium [ALUGRAM® SILG.60/UV₂₅₄] pour CCM avec une couche de silice d'épaisseur 0.2mm ont été utilisées. Elles ont été découpées en petit rectangle de 10cm de longueur et de 5cm de largeur. Les dépôts des produits ont été faits à 1.5cm du bord inférieur et la migration a été réalisée jusqu'à 1cm du bord supérieur de la plaque.

L'échantillon, l'extrait Rup-01 a été dissous dans un solvant volatile afin qu'il sèche rapidement, a été déposé sur la ligne de spot à l'aide de micropipette. Plusieurs systèmes des solvants ont été essayés pour faire migrer le produit, à la fin de la migration, les taches de produit ont été révélés par examen de la lumière sous la lampe UV (254nm ou/et 365nm) suivi d'une pulvérisation avec la vanilline sulfurique.

Après les essais des systèmes d'éluant (Fig.) le mélange Hexane/Acétate d'éthyle de proportion (8/2) a permis une bonne séparation des taches des produits.

II.2.4.4.3. Colonne chromatographique ouverte

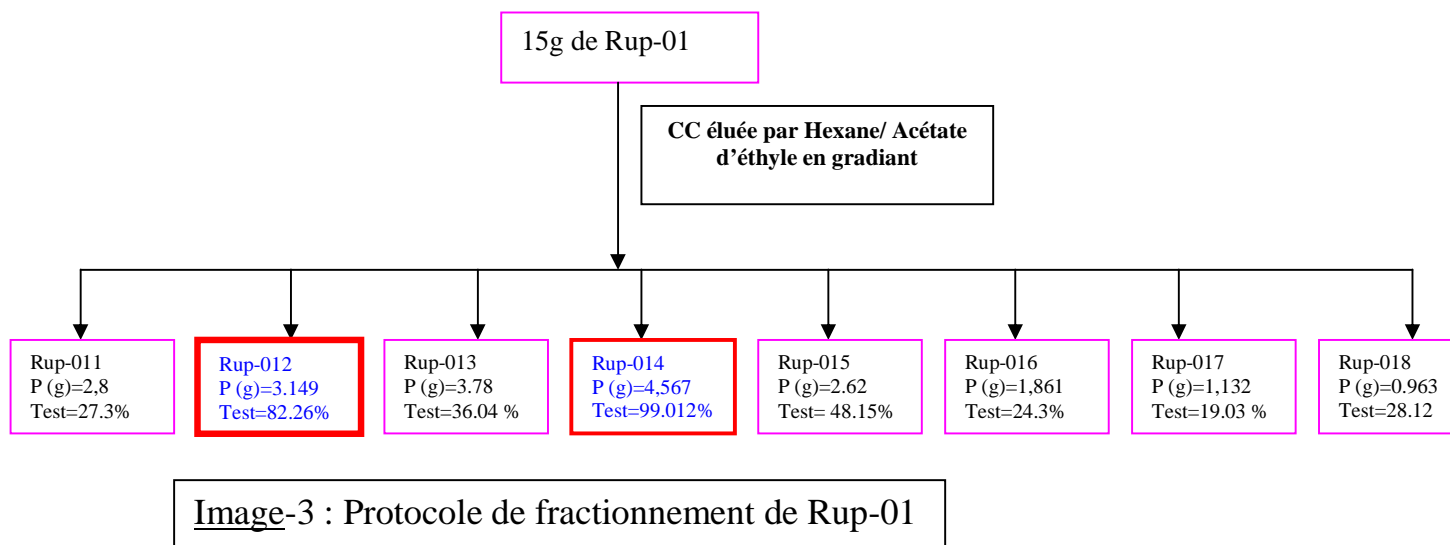
15g de Rup-01 ont été séparés sur une colonne chromatographique ouverte de gel de silice 40mesh [45cm de hauteur et 4.5 de diamètre], selon le principe de chromatographie d'adsorption en utilisant un gradient d'éluant hexane/acétate d'éthyle. 4L de solvants ont été utilisés pour épuiser l'extrait. Les fractions ont été récoltées par tranches de 10ml dans des tubes à essai.

II.2.4.4.4. Regroupement des fractions

Une analyse sur CCM a été effectuée pour chaque fraction avec comme système d'éluant Hexane/ Acétate d'éthyle, suivi par une pulvérisation avec l'acide sulfurique de 10% ; ce qui nous a permis d'obtenir de regrouper les fractions en huit fractions.

II.2.4.4.5. Test biologique

Le test biologique utilisé sur ces 8 fractions montre que la 2^{ème} (Rup-012) et la 4^{ème} (Rup-014) fractions qui présentent une activité cytotoxique intéressante sur la cellule cancéreuse P388 avec des concentrations d'inhibition respectives 82.26% et 99.012% à 0.5µg/mL.



II.2.4.4.6. Isolement des principes actifs

La vérification systématique par la CCM est une méthode très simple mais efficace pour poursuivre l'isolement des principes actifs à l'état pur. Une mono-tache sur la CCM indiquerait que la pureté du produit a été probable. L'analyse CCM effectuée sur la quatrième fraction a montré que cette fraction est un mélange des produits. Pour cela, une nouvelle série de chromatographie d'adsorption sur gel de silice a été effectuée sur la fraction Rup-014, en utilisant successivement les systèmes des solvants Hexane/Dichlorométhane puis l'Ether du Pétrole/Acétate d'éthyle comme les phases mobiles.

Une fraction nommée Rup-01433 a été obtenue à l'issue de cette série de la colonne chromatographique. Elle est la fraction la plus active.

II.2.4.4.7. Purification des principes actifs dans les fractions Rup-014 et Rup-012

La fraction Rup-01433 ne présente pas encore une seule tache sur la CCM, c'est un mélange de deux produits très proches en R_f , difficiles à séparer sur une colonne chromatographique. Ce qui nous a amené à procéder à la méthode de chromatographie sur couche préparative.

Pour cela une forte concentration de Rup-01433 est dissoute dans du Dichlorométhane et a été déposée sous une bande sur la ligne de spot dans une plaque en verre recouverte de gel de silice 60F₂₅₄ (Merk).

Les produits ont été élués avec un mélange de solvants Ether du pétrole/ Chloroforme/ Méthanol (1.45/8.54/0.01). Après la migration, la plaque a été enlevée de la cuve chromatographique puis séchée dans une étuve de 35°C. Une analyse sous la lampe UV^{254/365nm} à permis de repéré le produit isoler et de tracer à l'aide du crayon sa référence frontale.

La partie tracée a été ensuite grattée puis éluee dans une petite colonne de hauteur de 15cm. On a obtenu un produit pur (Rup-001).

Les même méthodes ont été utilisés pour l'isolement des produits Rup-002 et Rup-003 dans la fraction Rup-012

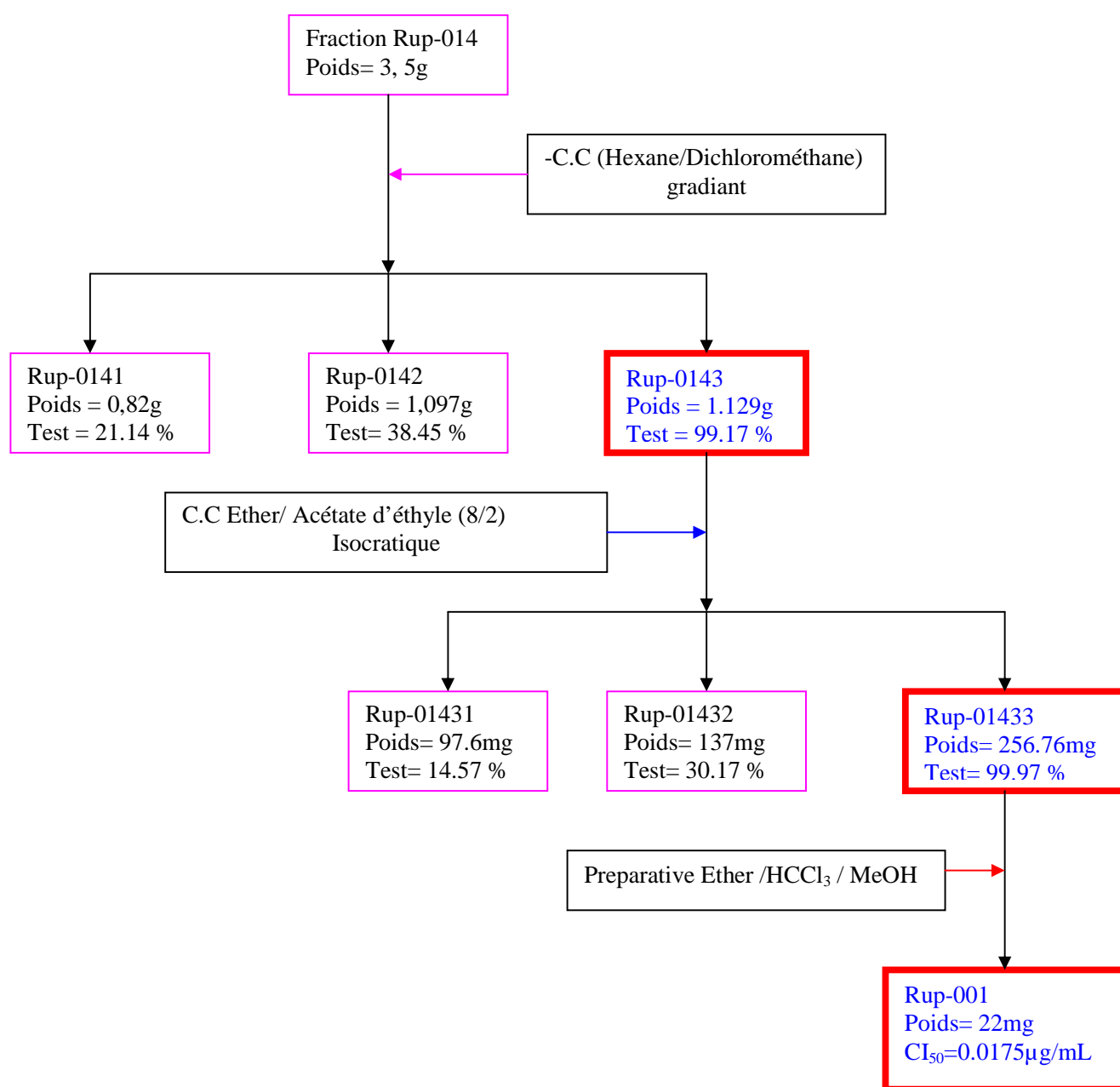


Image-4 : Protocole d'isolement du produit Rup-001

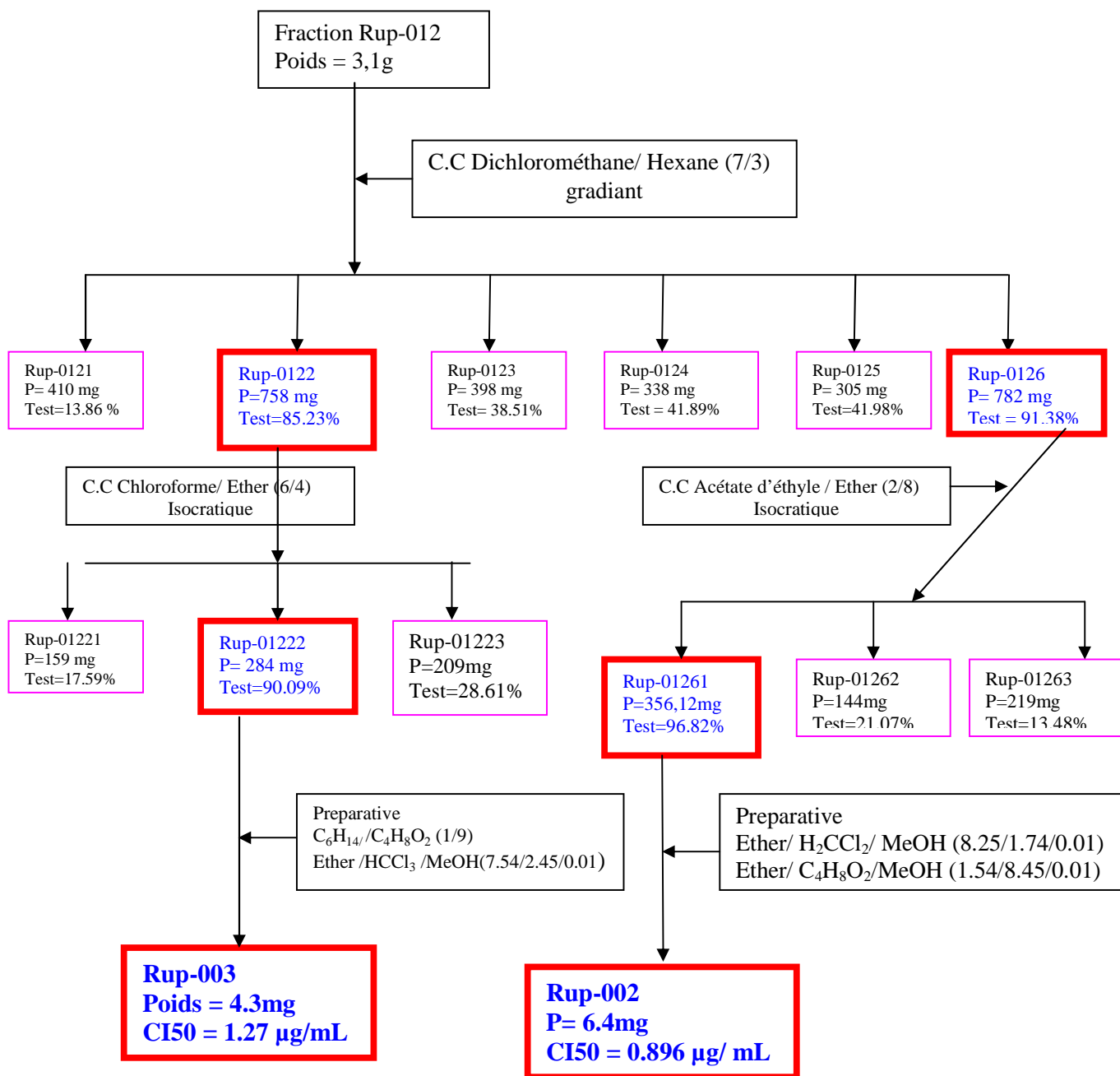


Image-5 : Protocole d'isolement des produits Rup-002 et Rup-003

II.2.5.- Test biologique

II.2.5.1.- Tests réalisés sur *P. falciparum*

II.2.5.1.1.- La culture *in vitro*

La première culture de *P. falciparum* fut réalisée par Trager et Jensen en 1976, ce qui permit un développement considérable de l'étude du parasite et des drogues anti-paludiques.

Les tests *in vitro* sur *Plasmodium* nécessitent l'accessibilité permanente à une souche cultivée qui fournit les parasites. Le milieu nutritif est composé de RPMI 1640 (Lonza) enrichi de 10% de sérum humain AB+ (Etablissement Français du Sang) et de L-glutamine (2 mM) (acide aminé essentiel) (Lonza). Ce milieu est changé tous les jours afin de renouveler les nutriments et de rehausser le pH (autour de 7,2), les parasites libérant dans le milieu l'acide lactique issu du métabolisme du glucose. Pour une bonne compatibilité sérique, les globules rouges sont de groupe O et de Rhésus positif. La culture, placée dans un incubateur, est maintenue à 37 °C à saturation de vapeur d'eau et CO₂ (5 %).

La parasitémie est maintenue à 2% par dilution quotidienne permettant ainsi le développement du parasite dans des conditions optimales. La parasitémie est estimée par comptage visuel au microscope (x 1000) à partir d'un frottis sanguin, coloré au Giemsa. Lorsque la parasitémie est supérieure à 2 %, elle est abaissée par division du culot globulaire centrifugé (avec ajout de globules rouges sains).

II.2.5.1.2.- La synchronisation [Lambros et Vanderberg, 1979]

Principe

Les tests biologiques sont réalisés sur une population de parasites de même génération. La synchronisation de la souche repose sur la lyse simultanée de tous les globules rouges parasités par des schizontes. En effet, afin de garantir l'accès aux métabolites plasmatiques, le parasite perméabilise la membrane érythrocytaire mais la rend aussi sensible aux chocs osmotiques. A un stade avancé du parasite, l'ajout de sorbitol dans le milieu lyse les érythrocytes parasités par les schizontes mûrs alors que les autres globules résistent à ce choc.

Il ne reste alors que des globules rouges sains ou des globules parasités par des mérozoïtes et des jeunes trophozoïtes (stade anneaux).

Mode opératoire

La culture est centrifugée (à 500 g pendant 5 min.), le surnageant est remplacé par neuf volumes de solution de D-sorbitol (5 % dans de l'eau distillée).

Une fois homogénéisée, la culture est placée à 37°C pendant 10 minutes puis centrifugée (à 500 g pendant 5 min.), ce qui permet d'isoler le culot de globules rouges parasités par des formes anneaux, alors que les lysats cellulaires sont en suspension.

II.2.5.1.3.- Evaluation de l'activité antiplasmodiale

Principe

P. falciparum est incapable de synthétiser ex novo les bases puriques (adénine, guanine) contrairement aux bases pyrimidiques (uracile, thymine, cytosine). Il a donc besoin d'utiliser les purines exogènes pour la synthèse de ses nucléotides puriques.

L'hypoxanthine est le précurseur principal utilisé par le parasite pour la synthèse des nucléotides puriques. L'introduction d'hypoxanthine tritiée dans le milieu permet (par suivi de la radioactivité) de quantifier l'incorporation de ce précurseur dans le parasite et ainsi d'évaluer le développement du parasite.

L'incorporation étant plus grande dans les schizontes que dans les anneaux, l'hypoxanthine radio-marquée est introduite un jour après la préparation des plaques.

La souche de *P. falciparum* utilisée est : la souche FC₂₉ résistante à la chloroquine.

Mode opératoire

Les tests sont réalisés sur des plaques à 96 puits remplis d'un volume fixe d'hématies parasitées (parasitémie de 1 % et hématocrite de 1,5 %). Les fractions à tester (à différentes concentrations) sont alors additionnées en triplicat dans les puits. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 µCi/puits (Perkin Elmer à 1 mCi/ml, France), et les plaques sont remises dans l'incubateur pendant 24 heures.

A la fin du cycle, les plaques sont congelées à -20°C pour provoquer l'hémolyse des érythrocytes. Après décongélation, les acides nucléiques sont collectés sur un filtre à l'aide d'un collecteur de cellules automatique (Perkin Elmer, France). La radioactivité déposée sur le filtre (séché au micro-onde et enveloppé dans un plastique dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide de scintillation (Betaplate Scint, Perkin Elmer) est alors mesurée par un compteur □ (Microbeta Trilux, Perkin Elmer).

Détermination de la CI50

La CI50 (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite) est déterminée par interpolation linéaire. Sur des courbes donnant l'inhibition en pourcentage en fonction de la concentration testée.

II.2.5.2.- Tests de cytotoxicité réalisés sur des cellules P388

Principe

Comme dans les évaluations antiplasmodiales, les cellules sont capables d'incorporer de l'hypoxanthine tritiée qui est un précurseur de la synthèse des nucléotides puriques. L'introduction d'hypoxanthine tritiée dans le milieu permet (par suivi de la radioactivité) d'évaluer le développement cellulaire.

Mode opératoire

Les cellules sont dénombrées sur une cellule de Malassez. La culture estensemencée dans une plaque 96 puits à raison de 30 000 cellules par puits dans 200 µL de milieu.

Les plaques sont mises dans l'incubateur (24 h à 37 °C, à saturation de vapeur d'eau, 5% CO₂). Le 2ème jour, les échantillons sont ajoutés au milieu (DMEM enrichi de 10% de sérum de veau foetal) à différentes concentrations (0,1 ; 1 ; 10 et 100 µg.mL⁻¹), puis les plaques sont mises à incuber pendant 24 heures. Au 3ème jour, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée à raison de 0,25 µCi/puits (Perkin Elmer à 1 mCi/mL, France), et les plaques sont remises dans l'incubateur pendant 24 heures de plus. A la fin du cycle, les plaques sont congelées à -20°C pour provoquer la lyse cellulaire. Après décongélation les acides nucléiques sont collectés sur filtres à l'aide d'un collecteur de cellules automatique (Perkin Elmer, France). La radioactivité déposée sur le filtre (séché à la micro-onde et enveloppé dans un plastique dans lequel sont ajoutés 4 mL de liquide de scintillation (Betaplate Scint, Perkin Elmer) est alors mesurée par un compteur (Microbeta Trilux, Perkin Elmer). La CI50 est déterminée comme précédemment pour *P. falciparum*

II.2.5.3- Test de toxicité aigue

Il est très important d'étudier la toxicité du produit pur de Rup – 001 car cette plante est utilisée par la population comme médicament.

Les tests consistent en la détermination de la dose maximale tolérée chez la souris swiss selon la méthode de LOISEAU.

L'extrait a été dissous dans l'eau stérilisée ; des doses 100mg/kg jusqu'au 1500mg/kg sont administrées chez des souris de 20à25g par gavage, chaque lot comprend 4 souris.

Les animaux sont observés pendant les 5 premières heures suivant l'administration du produit. Les survivants sont gardés pendant 15 jours.

II.2.6. Démarche à suivre pour l'interprétation des spectres

Cette démarche est une méthode qu'on a suivie pour l'interprétation des spectres en vue de la détermination des structures des produits isolés.

-Déterminer le nombre d'insaturation(s) et ou de cycle à partir de la formule brute $C_xH_yN_z$ en appliquant la formule suivante : $X - Y/2 + Z/2 + 1$ {8}

- Travailler un spectre le ^{13}C

- Prendre le spectre corrélé proton-carbone HMQC ou HSQC et reporter sur la dimension carbone les δ de ces derniers, ensuite faire correspondre les protons avec les carbones qui les portent.

- Sur le spectre proton marquer en dessous de chaque signal la fréquence du carbone qui les porte et mettre en évidence les protons géminés non équivalents ;

- Prendre le spectre COSY et relever les enchaînements protoniques. Regarder s'il y a des motifs qui peuvent déjà être déterminés : cycle aromatique para-disubstitué, cycle aromatique 1, 2,4-trisubstitué, double liaison, etc. ;

- Travailler sur le spectre HMBC et reporter sur la dimension carbone, les déplacements chimiques de ces derniers, ensuite reporter dans la dimension proton les déplacements chimiques de carbone qui les portent ;

- Confirmer les enchaînements déjà trouvés en COSY à l'aide du spectre HMBC ;

- En partant de la partie identifiée de la molécule reconstituer son squelette ;

- Certaines parties de la molécule peuvent être plus explicites que d'autres : les aromatiques permettent de déterminer la position des substituant, les protons d'un méthoxy ne corréleront qu'avec le carbone adjacent, les protons d'un méthyle corréleront avec les carbones en α et en β (2J et 3J) ;

- Prendre le spectre NOESY et relever les différentes sortes de tache NOE équilibre conformationel, échange COSY. Noter l'intensité des corrélations entre protons géminés et commencer par l'interprétation des taches les plus intenses.

TROISIEME PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1- RESULTATS

53

III.2-DISCUSSIONS

104

III.1.RESULTATS

III.1.1. Test du criblage phytochimique

Tableau-II : Résultat du criblage phytochimique de la plante

TESTS	RESULTATS
Alcaloïde	±
Tanin	-
Quinones	++
Terpenoïdes	±
Stéroïde	-
Flavonoïde	++
Polyphénole	+
Saponine	-

Remarque

- : Absence

± : Trace

++ : La présence notable

III.1.2. Résultats des fractionnements bio-guidés

III.1.2.1. Extraction

- Tableau-III : Résultat d'extraction de la poudre de la plante

	Poudre de racine	Solvant de macération : Acétone		Extrait brut : Rup	
		1 ^{er} macération	2 ^{ème} macération		
Poids[g]	782	-	-	78.2	
Volume [mL]	-	800 mL	800mL	-	
Rendement [%]	-	-	-	10	
Tests (10µg/ml) CI [%]		-	-	FC 29	P388
				54.72	99.52
Durée[h]	-	4	4	72	72

III.1.2.2. Séparation grossière : à l'aide d'une colonne chromatographique sur gel de silice

-Rup : Poids = 1g

Gel de silice : 20g

Tableau-IV : Résultat de la séparation grossière de Rup

Fractions	Hexanique	Chloroformique	Acétate 'éthyle	Acétonique
Poids[g]	0.1721	0.5	0.1833	0.1271
Rendement [%]	17.21	50	18.33	12.71
Volume de solvant [mL]	500	500	500	500
Test (5µg/mL) CI [%]	16.21	91.59	41.78	21.34

III.1.2.3. Extraction par partage liquide-liquide : Rup = 56g

Tableau-V Résultat d'extraction par partage de l'extrait Rup

Phases	Hexanique	Chloroformique	Acétate d'éthyle	Hydrométhanolique
Poids [g]	1.606	41.9	3.318	9.175
Volume utile [L]	2.5	5	2.5	2.5
Rendement [%]	2.86	74.82	5.95	16.38

III.1.2.4. Colonne chromatographique Fraction Rup-01

-Poids = 15g

-Solvant d'élution : Hexane/ Acétate d'éthyle

-Mode d'élution : en gradient

-Volume total du solvant : 4L

Tableau-VI : Résultat de fractionnement du Rup-01

Fractions	Rup-011	Rup-012	Rup-013	Rup-014	Rup-015	Rup-016	Rup-017	Rup-018
Poids [g]	2.8	3.14	3.78	4.56	2.62	1.86	1.13	0.963
Rendement [%]	18.66	20.99	25.2	30.44	17.46	12.46	7.54	6.42
Test (0.5µg/mL) CI [%]	27.8	82.26	36.04	99.01	48.15	24.31	19.03	28.12

III.1.2.4.1. Fraction Rup-014 : - Poids = 3.5g

-Solvant d'élution : Hexane / Dichlorométhane (1.5/8.5)

-Mode d'élution : en isocratique

-Volume totale utile : 500 mL

Tableau-VII : Résultat de la fraction Rup-014

Fractions	Rup-0141	Rup-0142	Rup-0143
Poids [g]	0.82	1.09	1.13
Rendement [%]	23.42	31.34	32.25
Test (0.25µg/mL) CI [%]	21.14	38.45	99.17

III.1.2.4.1.1. Fraction Rup-0143: - Poids = 850mg

-Solvant d'élution : Acétate d'éthyle/ Ether de pétrole (2/8)

-Mode d'élution : en isocratique

-Volume totale utile : 652mL

Tableau-VIII: Résultat de la fraction Rup-00143

Fractions	Rup-01431	Rup-01432	Rup-01433
Poids [mg]	97.6	137	256.76
Rendement [%]	11.48	16.12	30.20
Test (0.125µg/mL) CI [%]	14.57	30.17	99.97

III.1.2.4.1.2. Produit pur Rup-001 : Poids = 22 mg

CI₅₀ = 0.0175µg/mL

Rendement : 0.0393 %

III.1.2.4.2. Fraction Rup-012 :-Poids = 3.12g

-Solvant d'élution : Hexane/ Dichlorométhane (3/7)

-Mode d'élution : en gradient

-Volume total du solvant : 1.52L

Tableau-IX : Résultat de la fraction Rup-012

Fractions	Rup-0121	Rup-0122	Rup-0123	Rup-0124	Rup-0125	Rup-0126
Poids [mg]	410	758	398	338	305	782
Rendement [%]	13.22	24.45	12.84	10.903	9.83	25.23
Test (0.25µg/mL) CI [%]	13.86	85.23	38.51	41.89	41.98	91.38

III.1.2.4.2.1. Fraction Rup-0126 : -Poids= 770 mg

-Solvant d'élution : Chloroforme/ Ether de pétrole (6/4)

-Mode d'élution : en isocratique

-Volume totale utile : 585 Ml

Tableau-X : Résultat de la fraction Rup-00126

Fractions	Rup-01261	Rup-01262	Rup-01263
Poids [mg]	356.21	144	219
Rendement [%]	46.26	18.70	28.44
Test (0.125µg/mL) [%]	96.82	21.07	13.48

III.1.2.4.2.1. 1.Produit pur Rup-002 : Poids = 6.4mg

CI₅₀ = 0.896 µg/mL

Rendement =0.0114%

III.1.2.4.2.2. Fraction Rup-0122 : -Poids = 700mg

-Solvant d'élution : Acétate d'éthyle/ Ether de pétrole (1/9)

-Mode d'élution : en isocratique

-Volume totale utile : 750 mL

Tableau-XI : Résultat de la fraction Rup-0122

Fractions	Rup-01221	Rup-01222	Rup-01223
Poids [mg]	159	284	209
Rendement [%]	22.71	40.57	29.85
Test (0.125µg/mL) CI [%]	17.59	90.09	28.61

III.1.2.4.2.2. 1. Produit pur Rup-003 : Poids = 4.3 mg

$$CI_{50} = 1.127\mu\text{g/mL}$$

$$\text{Rendement} = 0.0076\%$$

III.1.2.5. Résultat du test de comparaison

Tableau-XII : Comparaison des résultats du test des produits isolés avec les molécules mis en essai clinique

Fraction à Testé	CI50 (µg/mL)
Bruceantine	0.00008
Vincristine	0.006
Antonomicine	0.006
Camptothecine	0.006
Vinblastine	0.007
Taxole	0.00004
Ellipticine	0.13
Podophylotoxine	0.013
Rup-001	0.0127
Ruo-002	0.896
Rup-003	1.127

III.1.3. Toxicité aigue

Témoin : DMSO de 5%

Jo : 00Heure

Tableau-XIII : Résultat du test in vivo

Temps d'observation	Sommeil	Activité Motrice	Mortalité
5 heures	R.S	N	R
12heures	R.S	N	R
24heures	R.S	N	R
72heures	R.S	N	R
5jours	R.S	N	R
10jours	R.S	N	R

Remarque :

R.S= Rien à signaler

N= Normale

R= Rien.

Les volumes de gavage par souris sont inférieurs à 0.5ml

III.1.4.Déterminations des structures

L'utilisation de la technique de spectroscopie de la RMN à 1D, 2D et l'interprétation des spectres ainsi obtenus en utilisant un logiciel approprié appelé TOPSPIN 1-3 pour transformer les données brutes en spectres interprétables ont permis l'élucidation de leurs structures chimiques.

III.1.4.1. Interprétation et détermination de la configuration produit Rup-001

III.1.4.1.1 Interprétations des spectres de la R.M.N

III.1.4.1.1.1 Spectre de la RMN 1D

a- R.M.N du ^1H :

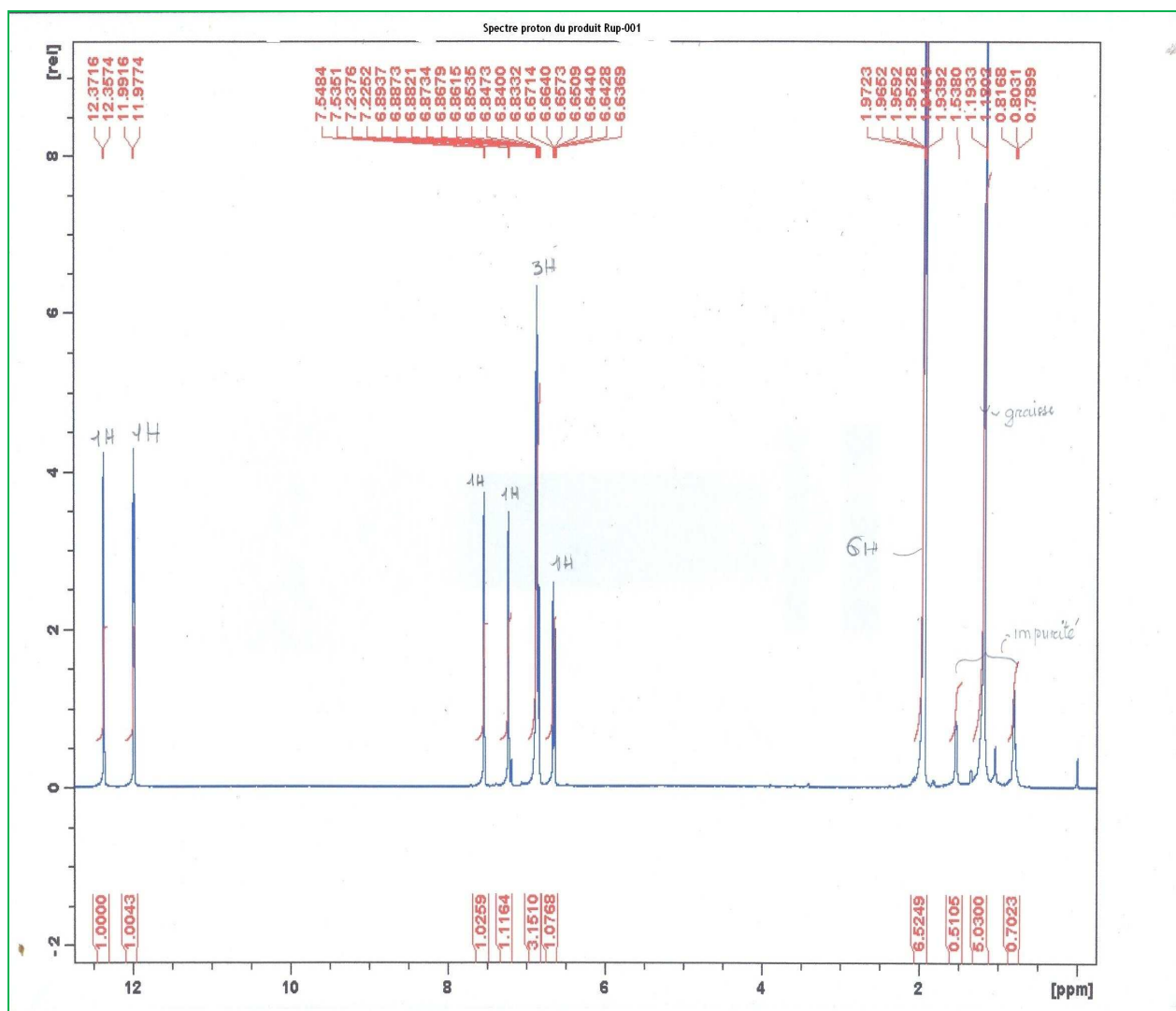


Schéma-1 : Spectre proton 1D du produit-I

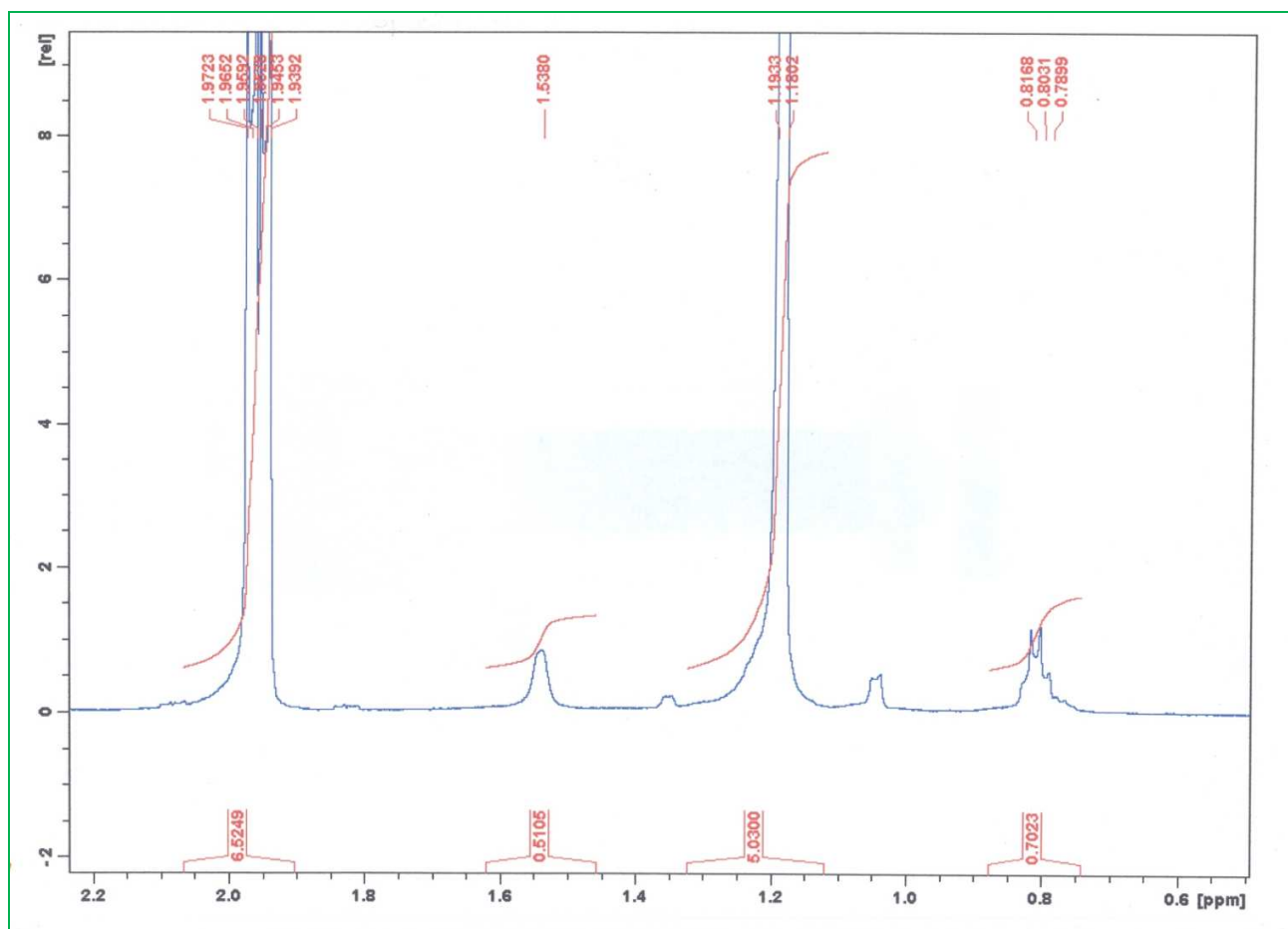


Schéma -2 : Spectre proton 1D du produit-I agrandi entre 0 à 2.2ppm

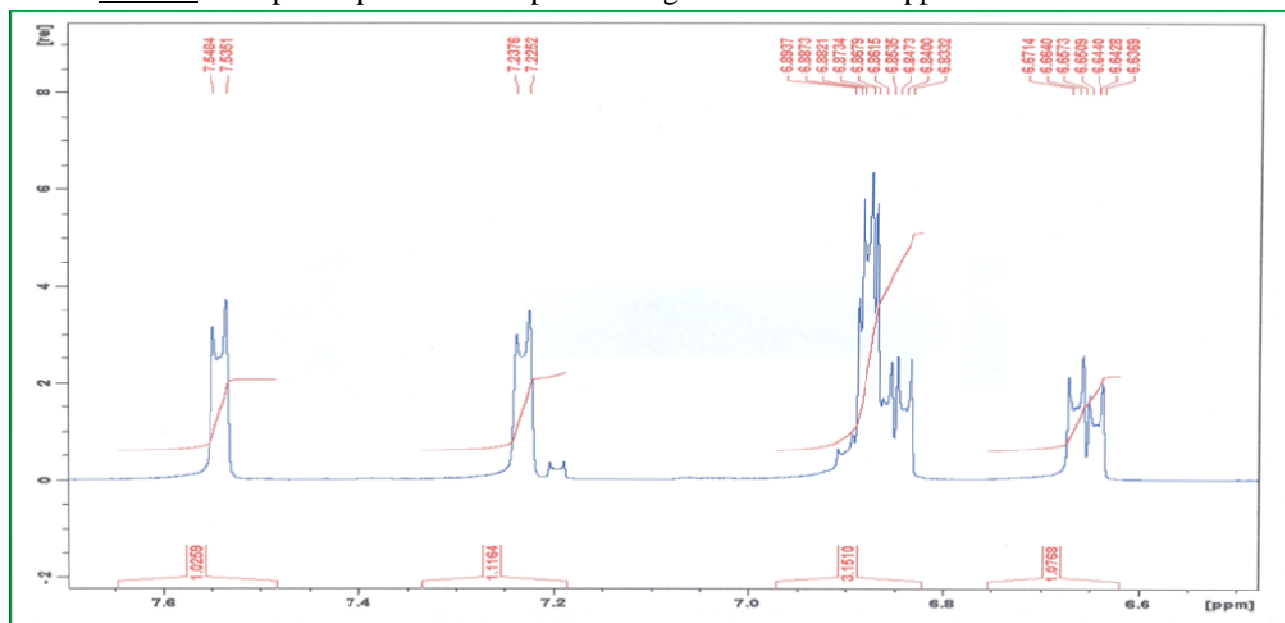


Schéma- 3 : Spectre proton 1D du produit-I agrandi entre 6.5 à 7.65ppm

L'aspect général du spectre de proton monodimensionnel permet d'avoir une idée sur les protons portés par les carbones de groupements fonctionnels. En effet, les déplacements chimiques des protons portés par des groupements fonctionnels les acides, les aromatiques, les aldéhydes, les phénols qui sont caractéristiques ce qui permet de les identifier.

Ainsi que les signaux des protons pouvant être attribués sans ambiguïté sont :

- Les signaux des protons qui sortent respectivement à 12.43ppm et 12.00ppm sous forme des singulets, ils sont attribués aux protons (OH) de phénol.
- Les signaux qui sortent à 7,61ppm (s) ; 7,25ppm (s) ; 6,75ppm (d) ; 6,89ppm (d) ; 6,92ppm (d) et à 6,92ppm (d) ils sont tous attribués aux protons des noyaux aromatiques.
- Les signaux singulets de deux méthyles résonnant respectivement à 1,99ppm et à 2,00ppm.

b- R.M.N du ^{13}C

La RMN de ^{13}C a le même principe que la RMN de ^1H mais la différence réside surtout sur l'abondance naturelle. Les signaux apparaissent sous forme de traits verticaux.

b.1. Spectre DEPT

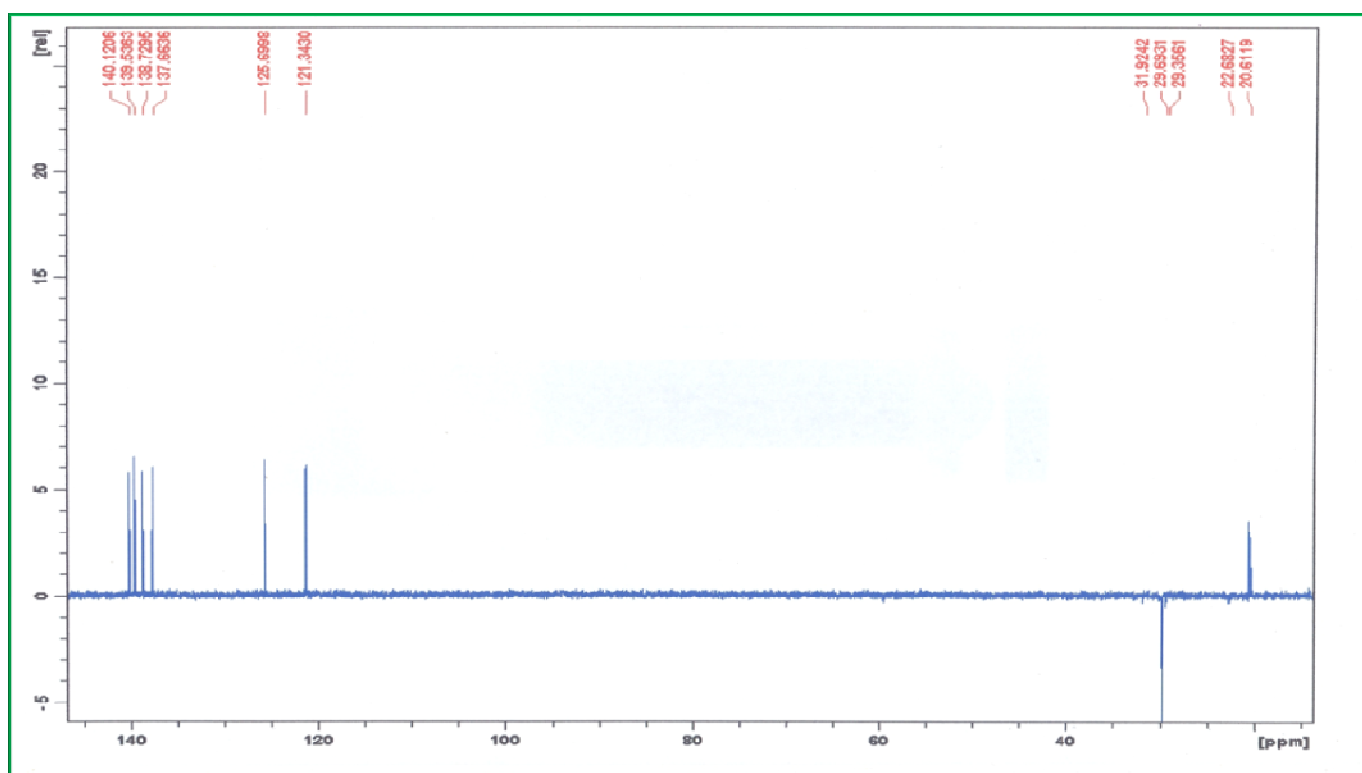


Schéma- 4 : Spectre carbone 13 en mode DEPT du produit-I

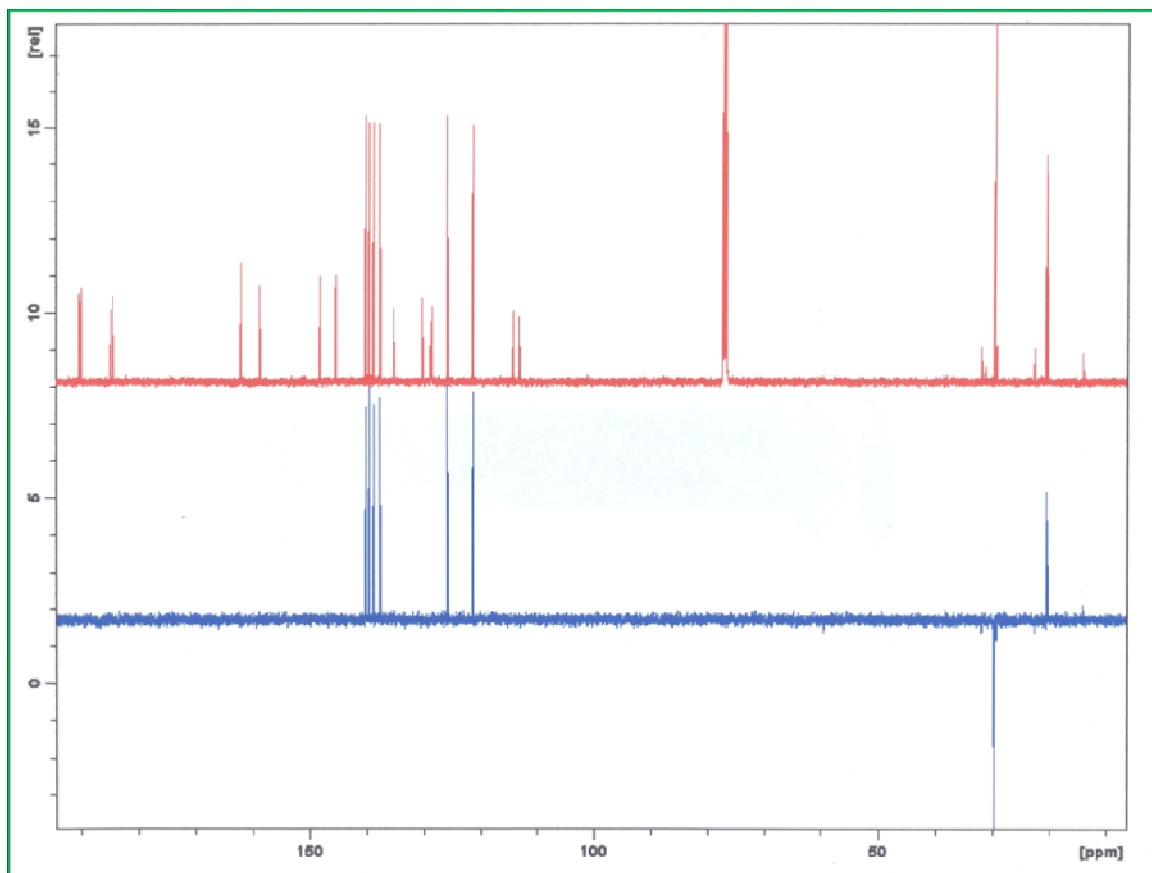


Schéma. 5 : Spectre carbone 13 en mode DEPT couplé avec le spectre en mode BB du produit-I

Le mode DEPT 135° a été utilisé pour le produit Rup-001. Ainsi, on peut déterminer les alkyles (CH_3), les méthylènes (CH_2), les methines (CH) suivant les deux sens du plan horizontal du carbone. CH_3 , CH se trouvent dans le sens positif et CH_2 dans l'autre sens.

Pour le produit Rup-001, l'interprétation du spectre DEPT 135° a montré : six CH éthyléniques et deux CH_3 qui ont été dans le sens positif du spectre. Aucun CH_2 n'a été trouvé. De ce spectre DEPT ce qui conforme la présence de noyaux aromatiques.

b.2. Spectre B.B

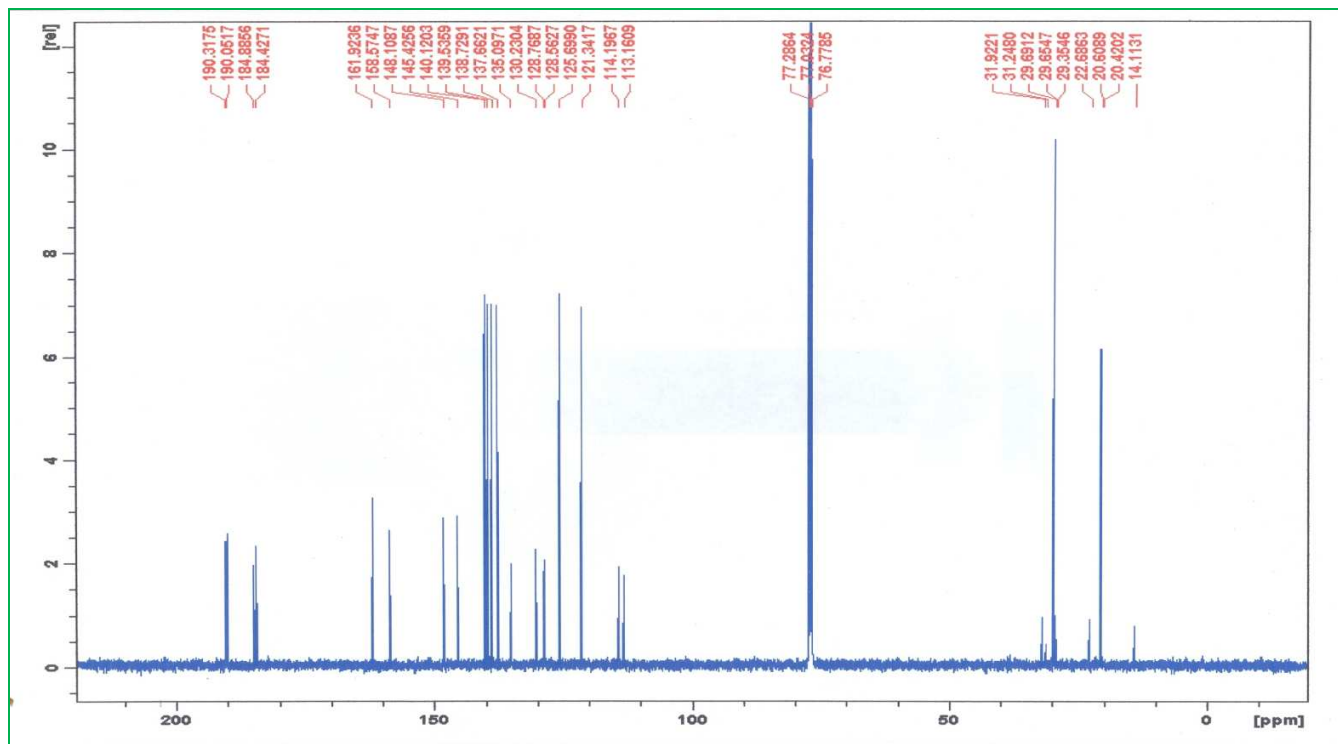


Schéma- 6 : Spectre carbone 13 en mode BB

Pour le produit Rup-001, le spectre B.B a montré vingt-deux pics.

Quatorze pics moins intenses ont été attribués aux carbones quaternaires.

Les signaux à 190,3ppm; 190,051ppm ; 184,886ppm ; 184 ,428ppm ont été attribuées aux groupements carbonyles.

Les pics qui sortent à δ 161, 92 ; 158,57 ; 148,10 ; 145,42 ; 135,09 ; 130,25 ; 128,56 ; 114,19 ; 113,16 ont été attribués aux carbones quaternaires éthyléniques des noyaux benzéniques. Six pics ont été attribués aux carbones méthyniques (CH). Ces attributions ont été vérifiées par le spectre DEPT. En effet, les signaux qui sortent à δ 121,34 ; 125,69 ; 137,665 ; 138,72 ; 139,51 et 140,12 ont été attribués aux carbones primaires (CH) des noyaux benzéniques. Ils corroborent les déplacements chimiques des protons

- Deux pics de CH₃ qui sortent à 20,6ppm et 20,4ppm ont été attribués aux groupements méthyles portés par des noyaux benzéniques (Φ - CH₃).

Les signaux à 77.28ppm ; 77.03ppm et 76.77ppm sont des signaux du solvant qui est le chloroforme deutérié.

Les signaux à 22.68ppm jusqu'au 31.92ppm sont des pics d'impureté.

Tableau- VIII : Récapitulation des interprétations de ^{13}C

Déplacements des carbones	Spectre DEPT	Spectre B.B avec des remarques
190.31ppm à 184.42ppm		Carbonyles (CO)
161.9ppm à 145.42ppm		Carbone quaternaire éthylénique (Cq)
140.12ppm à 137.66ppm	+	Carbones methynes (CH)
135.09ppm à 128.56ppm et 114.19ppm à 113.16ppm		Carbone quaternaire éthylénique (Cq)
126.69ppm à 121.34ppm	+	Carbones methynes (CH)
77.28ppm à 76.77ppm		Solvant Chloroforme deutérié
31.92ppm à 22.68ppm		impureté
20.6ppm et 20.4ppm	-	méthyles des noyaux benzéniques

III.1.4.1.2. Interprétation des spectres de la R.M.N 2D

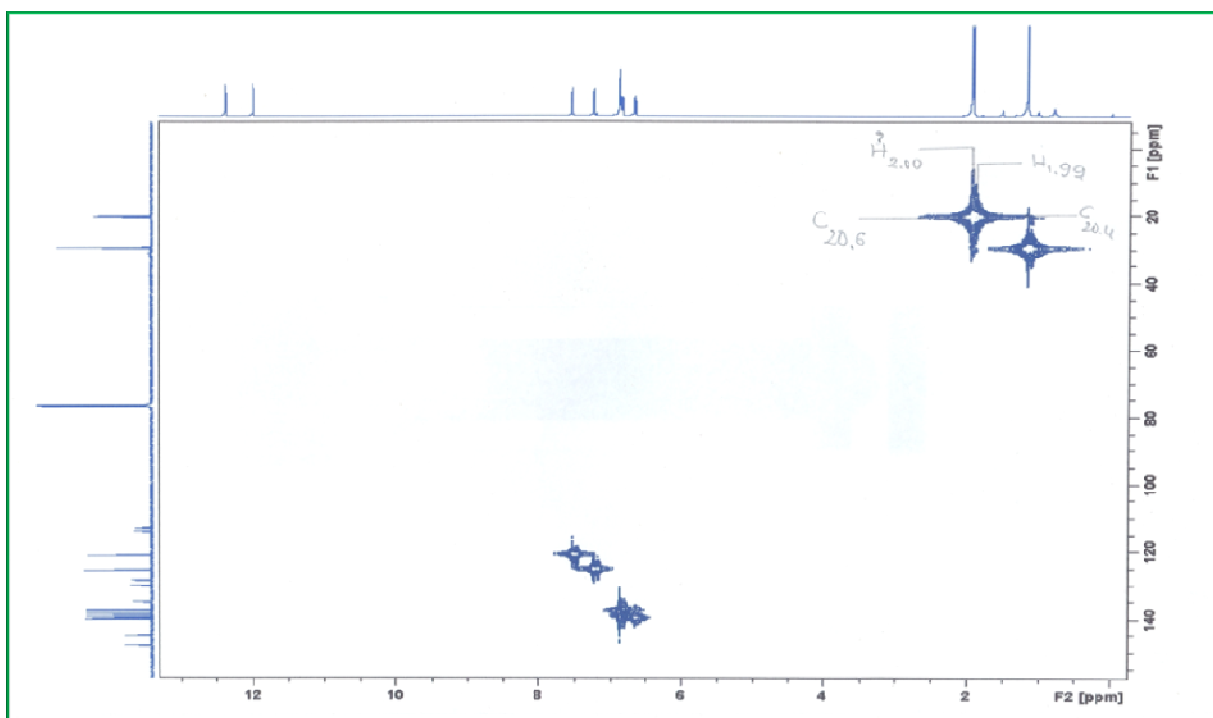
a- Spectre COSY

Il permet d'identifier les protons reliés par des couplages scalaires. Il s'agit du spectre de corrélation proton proton qui s'inscrit dans un carré.

Le proton qui sort à 6.89ppm est corrélé avec le proton sortant à 6.75ppm

Le signal de proton à 6.925ppm corrélé avec le proton sortant à 6.926ppm.

b - Spectre HSQC



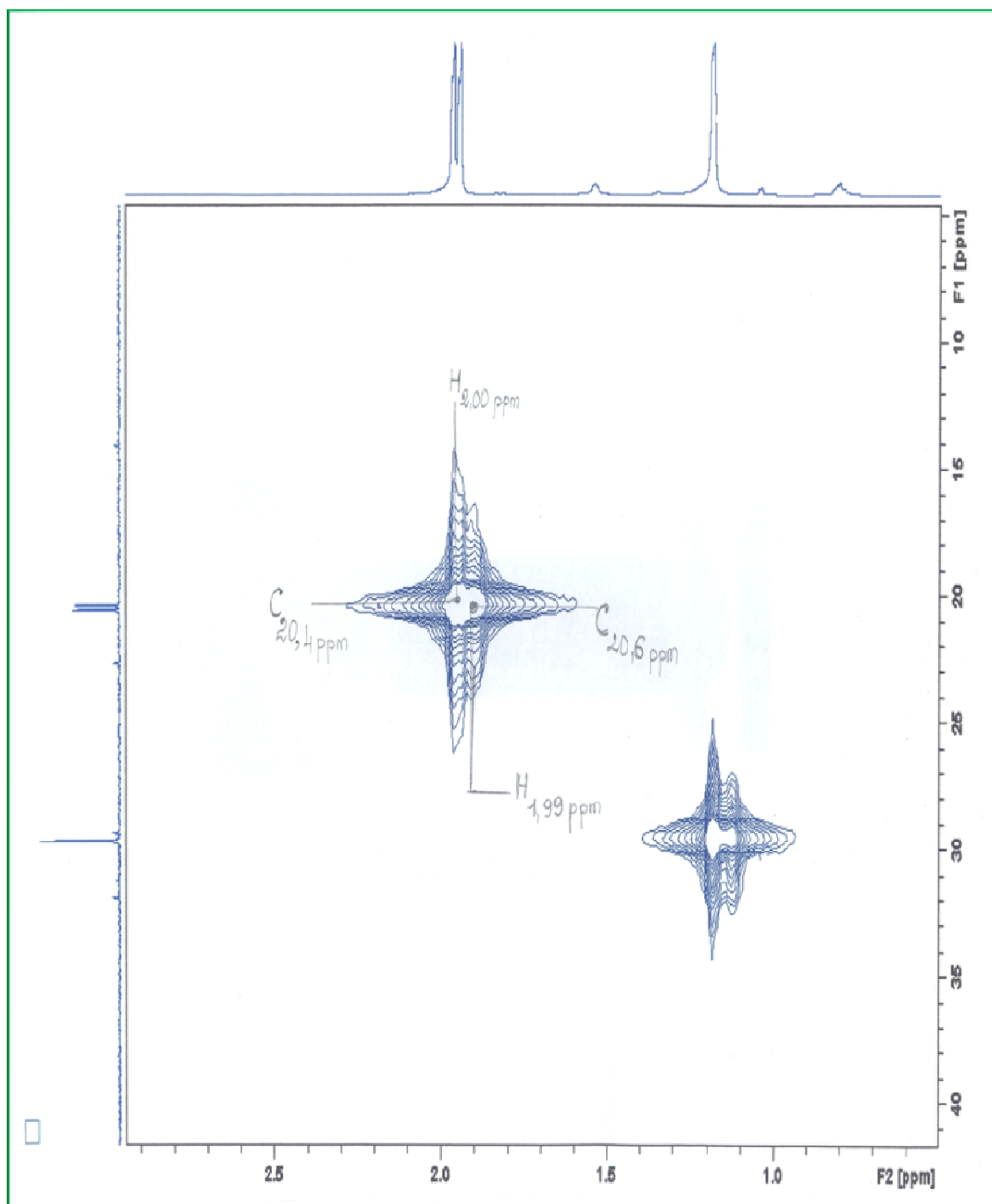


Schéma -9 : Spectre HSQC agrandi du produit-I entre 0 à 3ppm

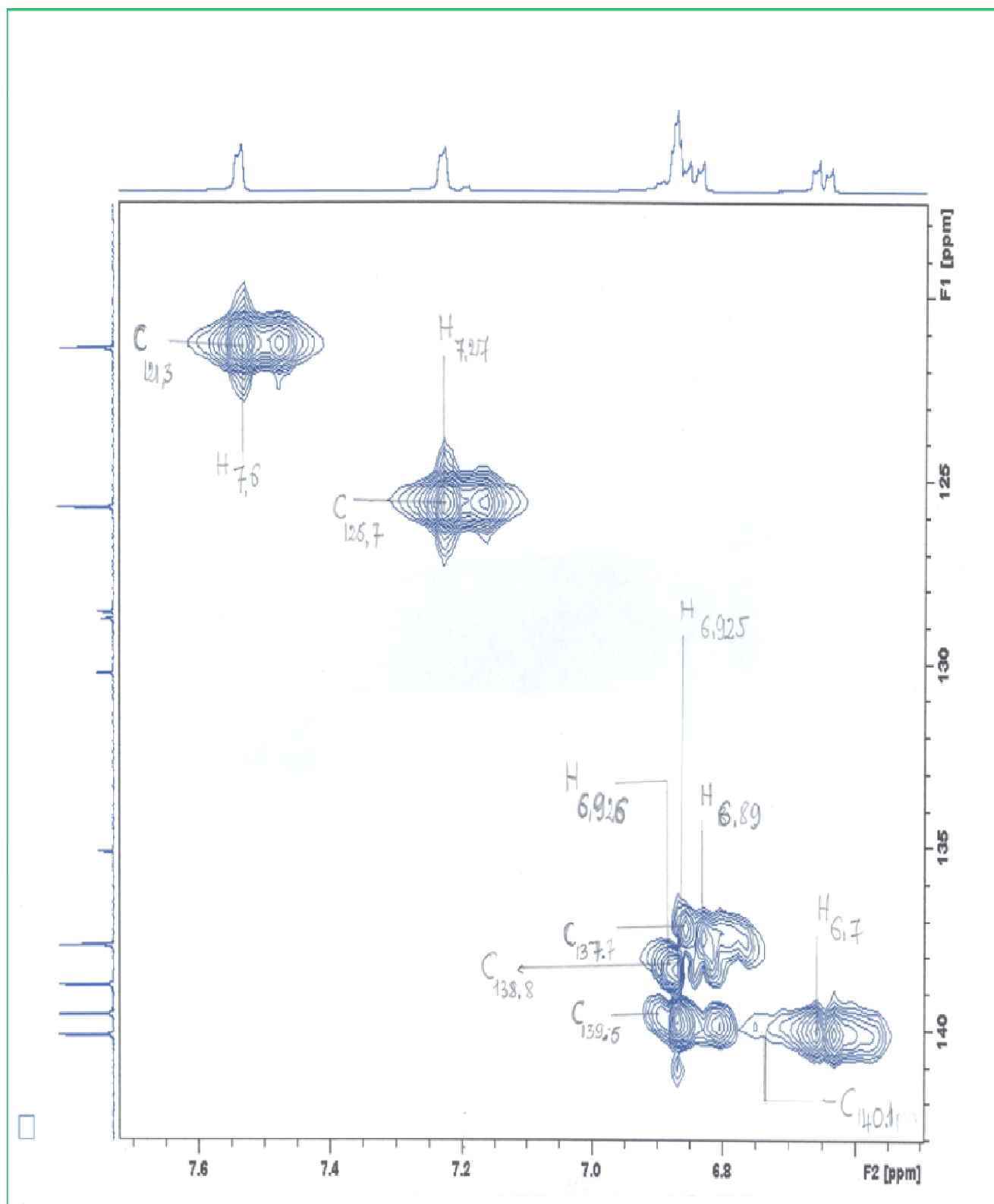


Schéma -10 : Spectre HSQC agrandi du produit-I entre 6.5 à 7.7ppm

Sur son spectre de H.S.Q.C, on a relevé les corrélations entre les carbones et les protons qui sont résumées dans le tableau-3 ci-dessous.

Tableau-IX : Corrélations H.S.Q.C du produit Rup-001

Déplacements chimiques des protons (ppm)	Déplacements chimiques des carbones (ppm)
1.99	20.65
2.00	20.45
6.926	138.8
6.926	139.5
6.75	140.1
6.89	137.7
7.27	125.7
7.65	121.3

c- Spectre HMBC

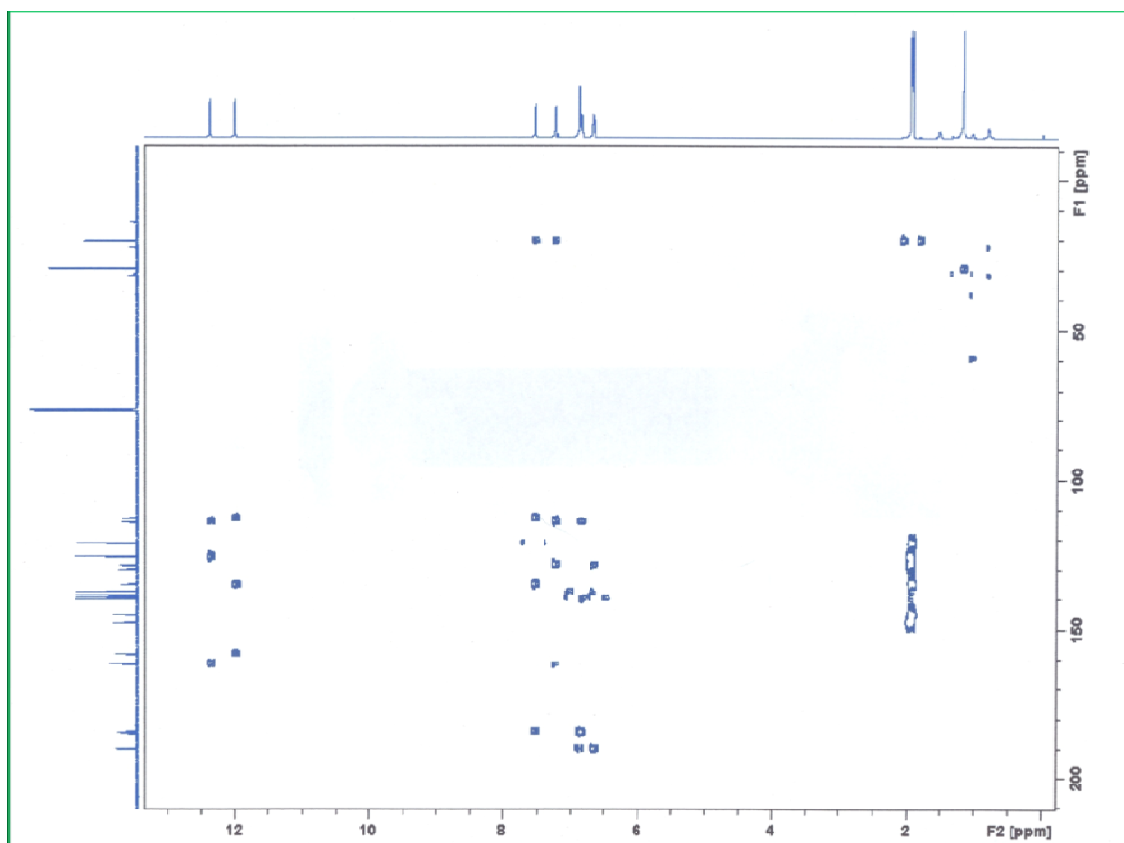


Schéma -11 : Spectre HMBC du produit-I

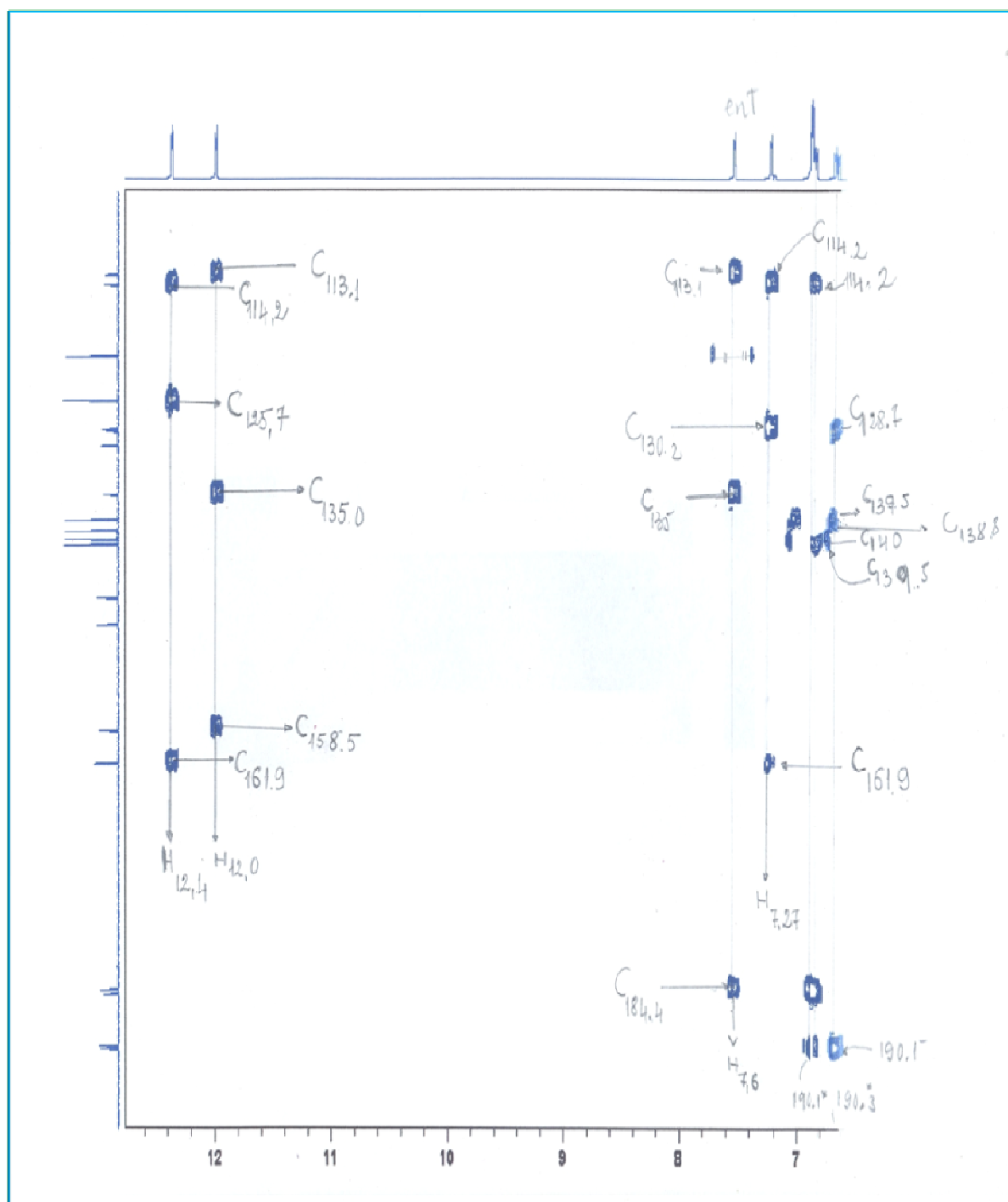


Schéma -12 : Spectre HMBC du produit-I agrandi entre 7 à 12.5ppm

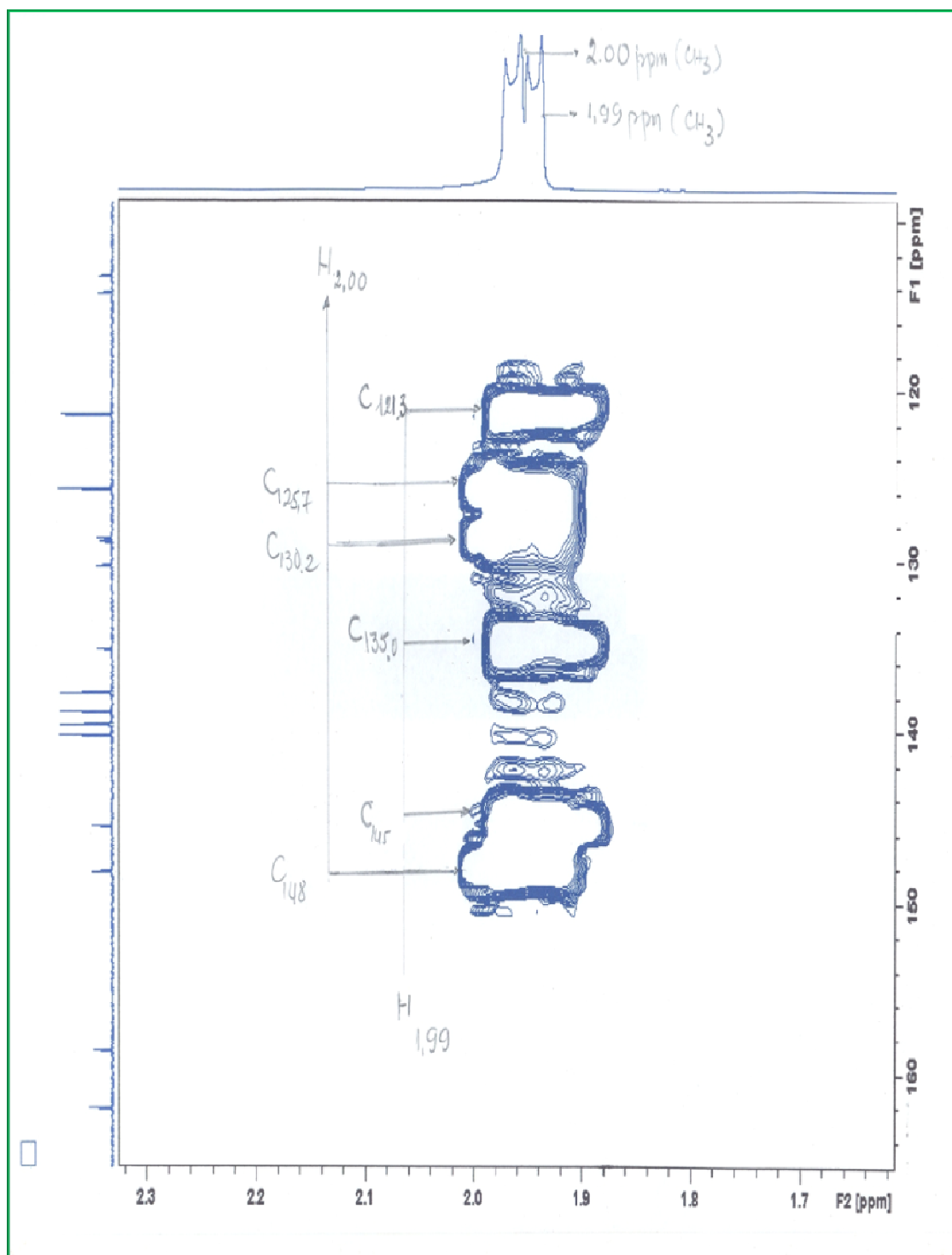


Schéma -13 : Spectre HMBC agrandi du produit-I entre 0 à 2.3ppm

Sur le spectre H.M.B.C du produit Rup-001, les corrélations ci-dessous ont été repérées :

Le proton hydroxylé qui sort à $\delta 12.43$ sous forme de singulet qui est le plus déblindé, présente une tache de corrélation avec les carbones quaternaires qui sortent respectivement à 114.2ppm et 125.7ppm. Alors la séquence de corrélation proton qui sort à 12.43ppm porté par le carbone 161.9ppm est la suivante :

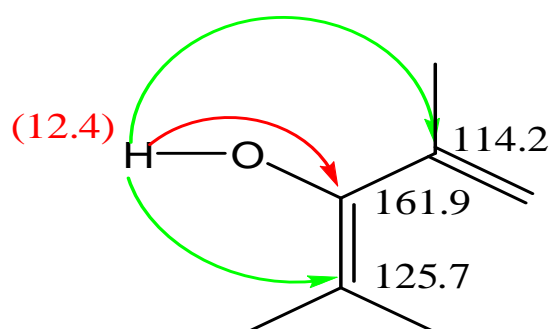


Figure-43 : Séquence de corrélation due au proton à 12.43ppm

Cette séquence confirme la position du OH (12.43ppm) qui est porté par le carbone à 161.9ppm

Le proton à $\delta 7.27$ est corrélé avec les carbones qui sortent respectivement à 20.4ppm ; 130.2ppm et à 114.2ppm. Or ce proton à 7.27ppm est un proton benzénique. Alors la corrélation le plus favorable est toujours en méta. D'où la séquence est représentée dans la figure 44 ci-dessous:

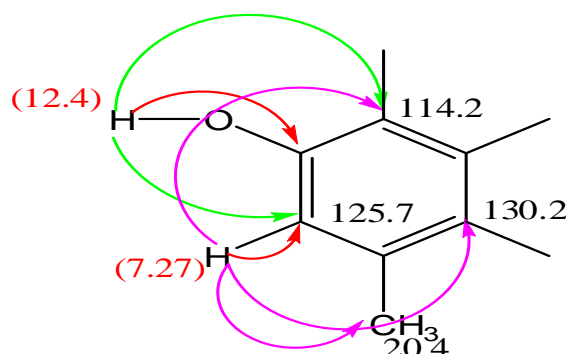


Figure-44 : Corrélation proton à 7.27ppm

Le proton sortant à 6.72ppm corrèle avec les carbones sortant à 190.1ppm ; 128.6ppm ; 137.7ppm.

Le signal à $\delta 6.89$ est corrélé avec les carbones qui sortent respectivement à 190.3ppm ; 140.1ppm et 114.2ppm.

Le spectre de COSY, confirme aussi les positions de ces deux protons qui présentent un couplage scalaire.

Les carbones qui sortent à 190.1ppm et 190.3ppm sont des carbonyles. La première hypothèse de fragmentation de la molécule est représentée sur la figure 45:

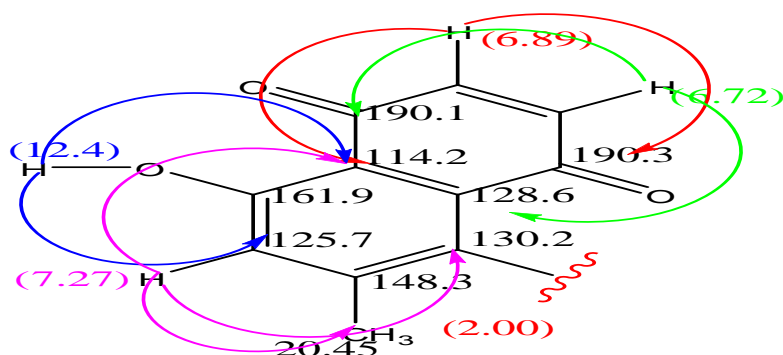


Figure-45 : Première fragmentation du produit I

Le signal proton à 12.00ppm (singlet) est un proton hydroxylé corrélé avec les carbones sortant respectivement à 158.5ppm, 135.0ppm et 113.1ppm. D'où la séquence ci-dessous :

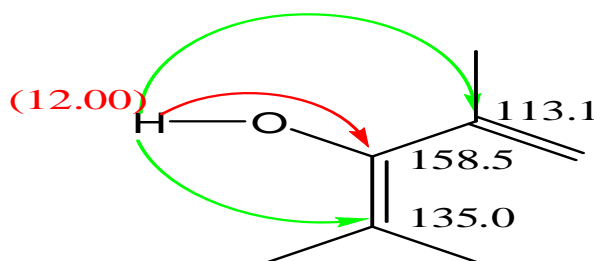


Figure-46 : Séquence de corrélation du proton à 12.00ppm

Le proton qui sort à 7.6ppm toujours sous forme de singlet corrèle avec les carbones qui sortent respectivement à 135.0ppm, 113.1ppm et au groupement méthyle à 20.6ppm en fin avec de carbonyle à 184.4ppm.

Le proton à $\delta 7.6$ attribué au proton du noyau benzénique, ne corrèle pas avec le carbone qui sort à 158.5 qui est porteur proton hydroxylé à $\delta 12.00$; or les corrélations les plus favorables concernant les protons du noyau benzénique sont en méta ce qui laisse prévoir que le proton qui sort à 7.6ppm serait en position para par rapport au proton hydroxylé porté par le carbone à 158.5ppm. La séquence de corrélation correspond à la figure-47 :

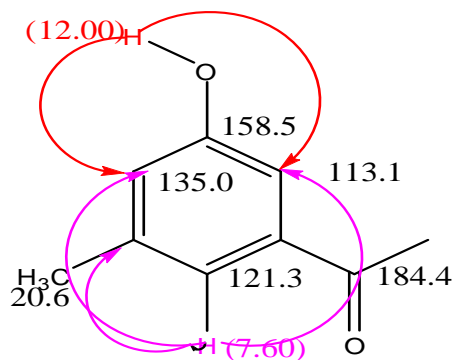


Figure-47 : Séquence de la corrélation du proton à 7.63ppm

Le signal de proton à 6.926ppm présente de corrélations avec les carbones qui sortent respectivement à 184.4ppm et 113.1ppm.

De même pour le signal proton à δ 6.925 présente des corrélations avec les carbones qui sortent respectivement à 184.6 et 128.7ppm. Les deux protons sont des protons vicinaux alcéniques. La deuxième fragmentation de la molécule est montrée sur la figure- 48 :

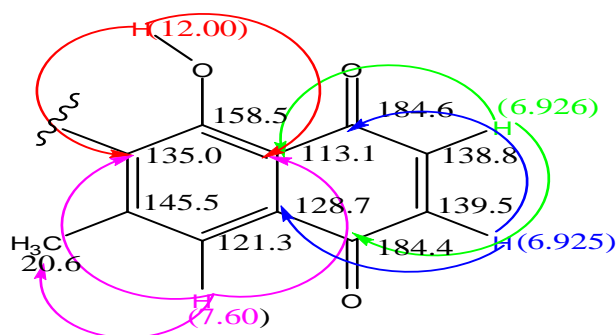


Figure-48 : Deuxième fragmentation du produit I

Si on rassemble les deux fragmentations de la molécule, on aboutit à la structure complète de la molécule du produit Rup-001 :

III.4.1.1.2. La configuration de la molécule de produit Rup-001

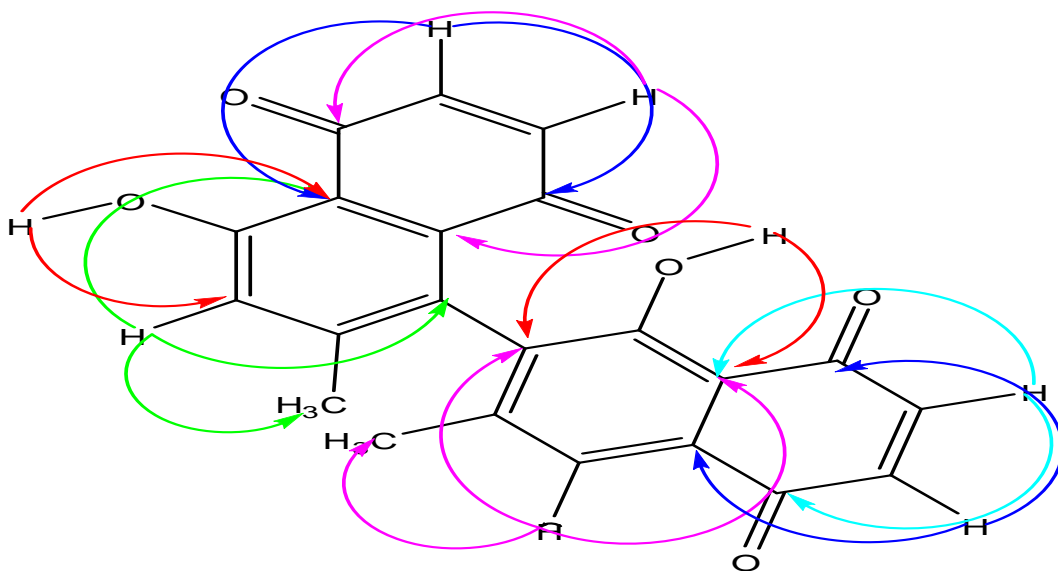


Figure-49 Structure complète du produit Rup-001

Masse de la molécule : 375

Formule brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{O}_6$

Tableau- X : Récapitulation des déplacements chimiques de la molécule

Positions	δ C (ppm)	δ H (ppm)	HMBC
1'	190.3		
2'	140.1	6.75 (d)	128.6 ; 190.1
3'	137.7	6.89 (d)	114.2 ; 190.3
4'	190.1		
1'b	114.2		
5'	161.5	12.4(s)	114.2 ; 125.7
6'	125.7	7.27 (s)	114.2 ; 130.2 ; 20.4
7'	148.3		
8'	130.2		
6'b	128.6		
1	184.4		
2	139.5	6.926 (d)	184.9 ; 128.7
3	138.8	6.925 (d)	184.4 ; 113.1
4	184.9		
1a	113.1		
5	158.5	12.0 (s)	113.1 ; 135.0
6	135.0		
7	145.5		
8	121.3	7.60 (s)	113.1 ; 135.0 ; 20.6
6a	128.7		
CH ₃	20.4	2.00 (s)	130.2 ; 125.7 ; 148.3
CH ₃	20.6	1.99 (s)	145.5 ; 135.0 ; 121.3

4.1.1.3. Interprétation des spectres de masse du produit Rup-001

Pour le produit Rup-001, le mode d'enregistrement du spectre de masse est le mode TOFMS ES+. Dans le mode TOFMS ES, il y a deux systèmes d'enregistrement de spectre de masse :

Soit $[M+1]^+$, c'est-à-dire que le produit a gagné un proton H^+

Soit $[M-1]^-$, il y a déshydrogénation (perte d'un proton H^+)

Dans le spectre de masse du produit Rup-001, est obtenu avec le mode $[M+1]^+$ et permis de déduire une masse donné une masse 375. La masse exacte de la molécule est alors 374.

Si le produit subit de la fragmentation, la masse du produit s'écrit :

$$[M+1]^+ = A^+ + B^\cdot \quad A^+ \text{ est la masse parent et } B^\cdot \text{ est la partie fragmentée}$$

La masse de la partie $B^\cdot = [M+1]^+ - A^+$.

Pour le produit Rup-001, on a obtenu les fragmentations suivantes :

$$M^+ = 375$$

$$- 375 - 368 = 7$$

Cette masse n'a pas de signification dans la littérature.

$$- 375 - 357 = 18$$

Cette perte correspond à l'eau H_2O .

$$- 368 - 303 = 68$$

C'est la perte du groupement présenté sur la figure 50.

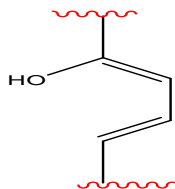


Figure-50 : Le fragment de la molécule $m/z=68$

$$- 357 - 303 = 54$$

Cette perte correspond au départ du fragment décrit dans la figure-51 suivante.

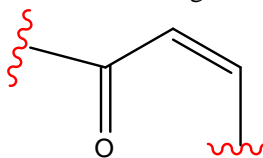


Figure-51 : La séquence $m/z=54$

$$- 375 - 235 = 140$$

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature la signification de cette masse, car ce n'est une fragmentation caractéristique

$$- 368 - 235 = 133$$

Cette perte correspond au fragment :

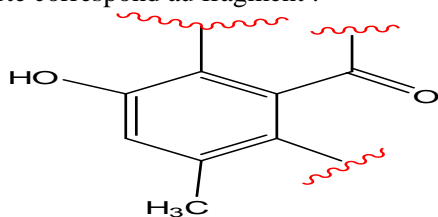


Figure-52 : La perte de la masse $m/z=133$

$$357-235=122$$

Il y a départ de :

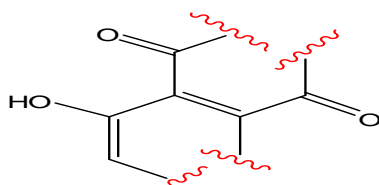


Figure-53 : le départ de la molécule $m/z=122$

$$375-153=222$$

Cette masse correspond au :

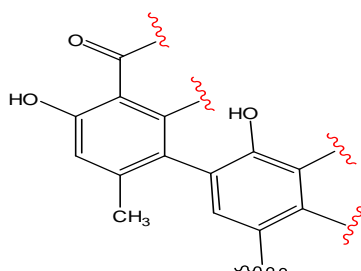


Figure-54 : Fragmentation $m/z=222$

$$-368-153=215$$

Cette perte ne correspond pas à une de fragmentation de la structure ; il se peut qu'il ait fragmentation suivie d'un réarrangement

III.1.4.2. Interprétation des spectres du produit Rup-002

III.1.4.2.1. Interprétation des spectres de la RMN

III.1.4.2.1.1. Spectre de la RMN 1D

a- RMN ^1H

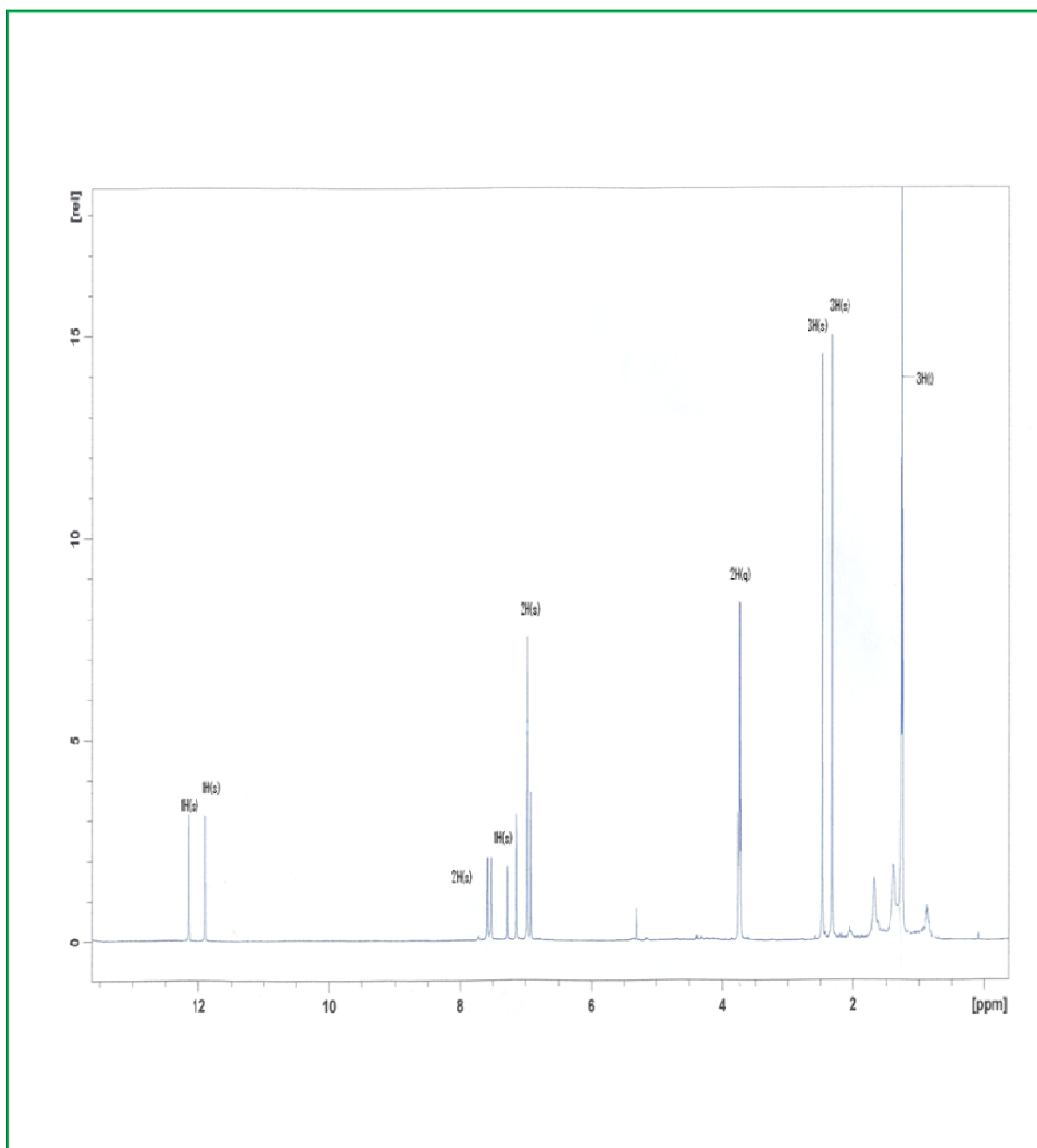


Schéma -14 : Spectre ^1H 1D du produit-II

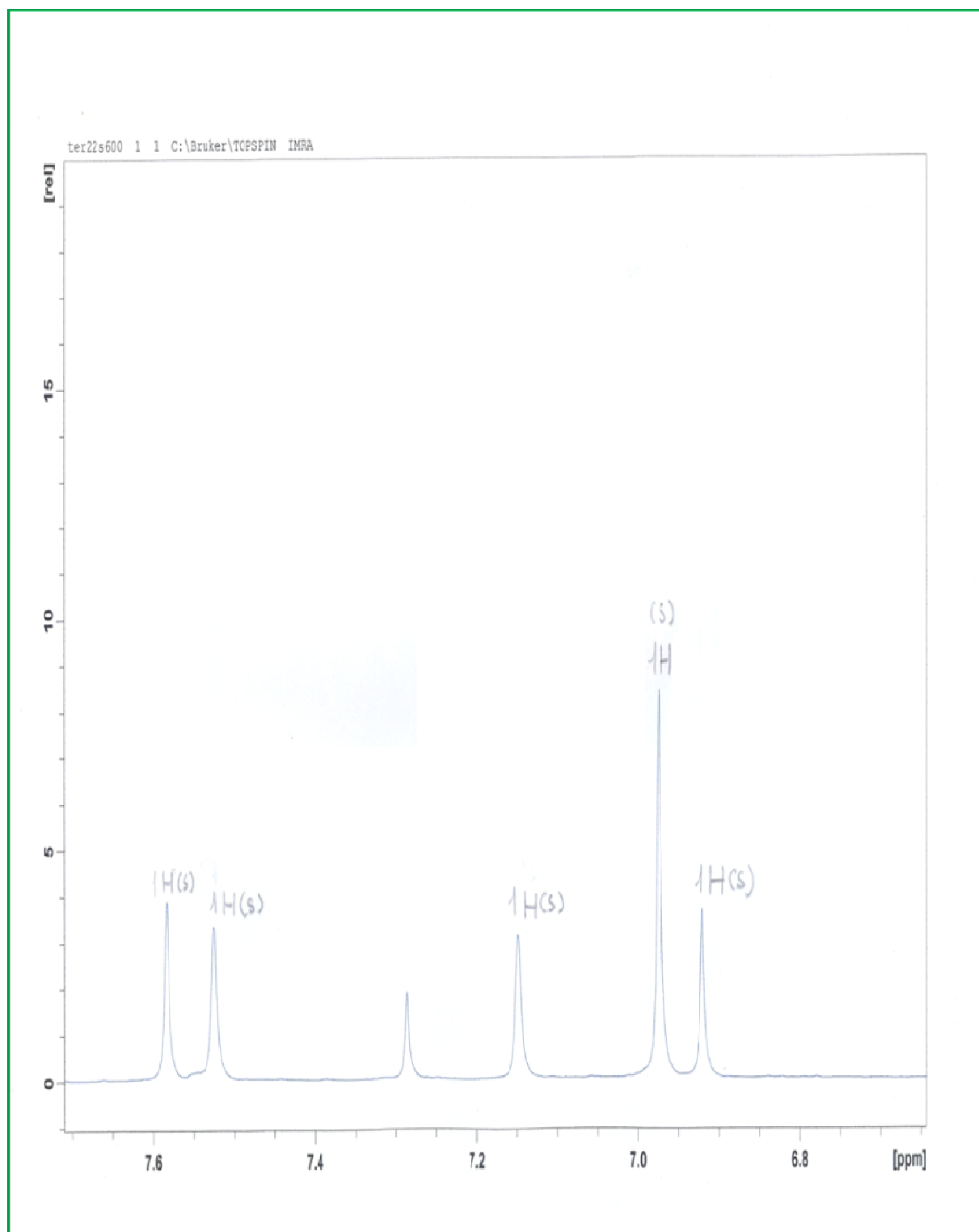


Schéma -15 : Spectre ^1H 1D agrandi du produit-II entre 6.8 à 7.7ppm

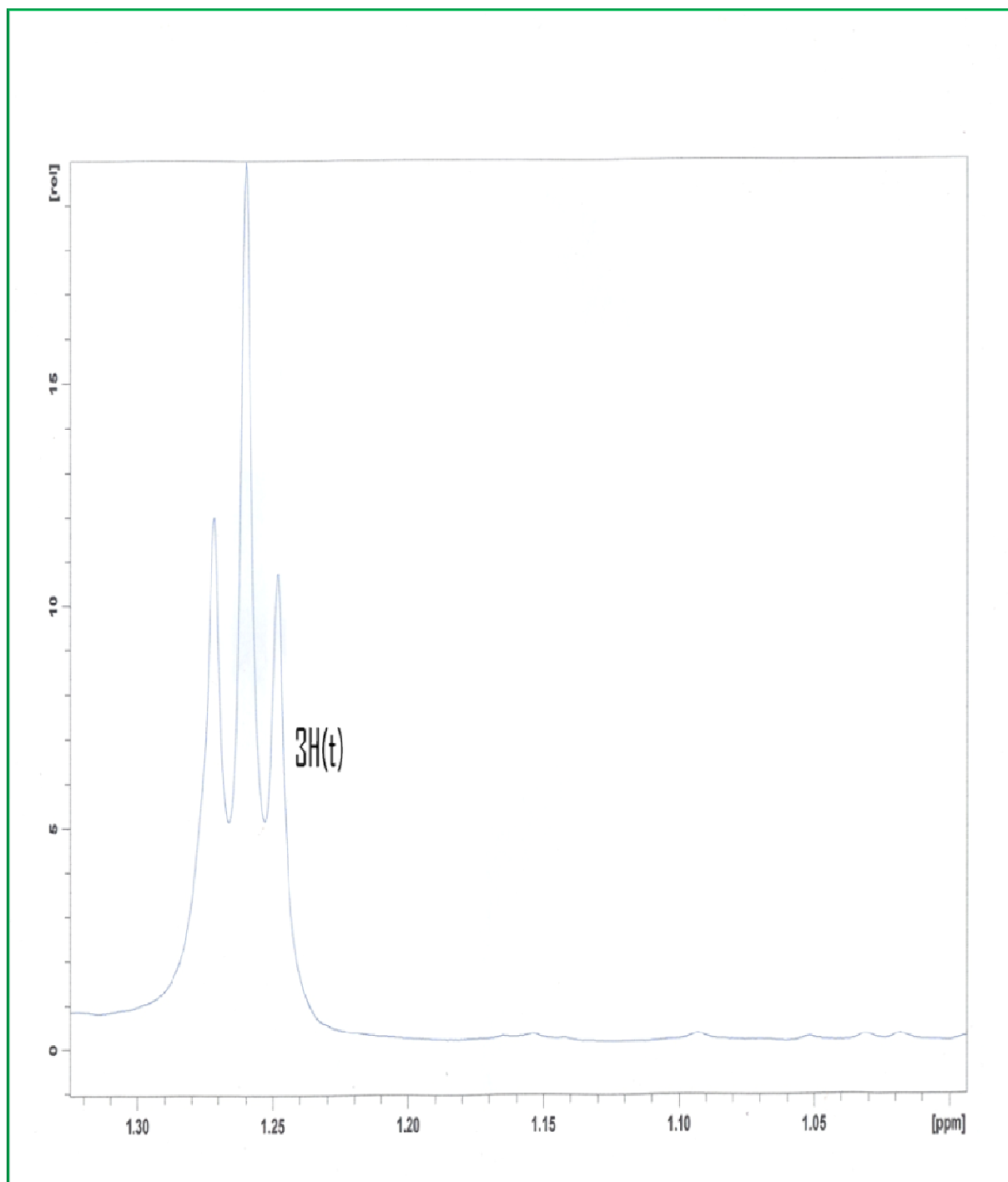


Schéma -16 : Spectre ^1H 1D agrandi du produit-II 1.05 à 2.35ppm

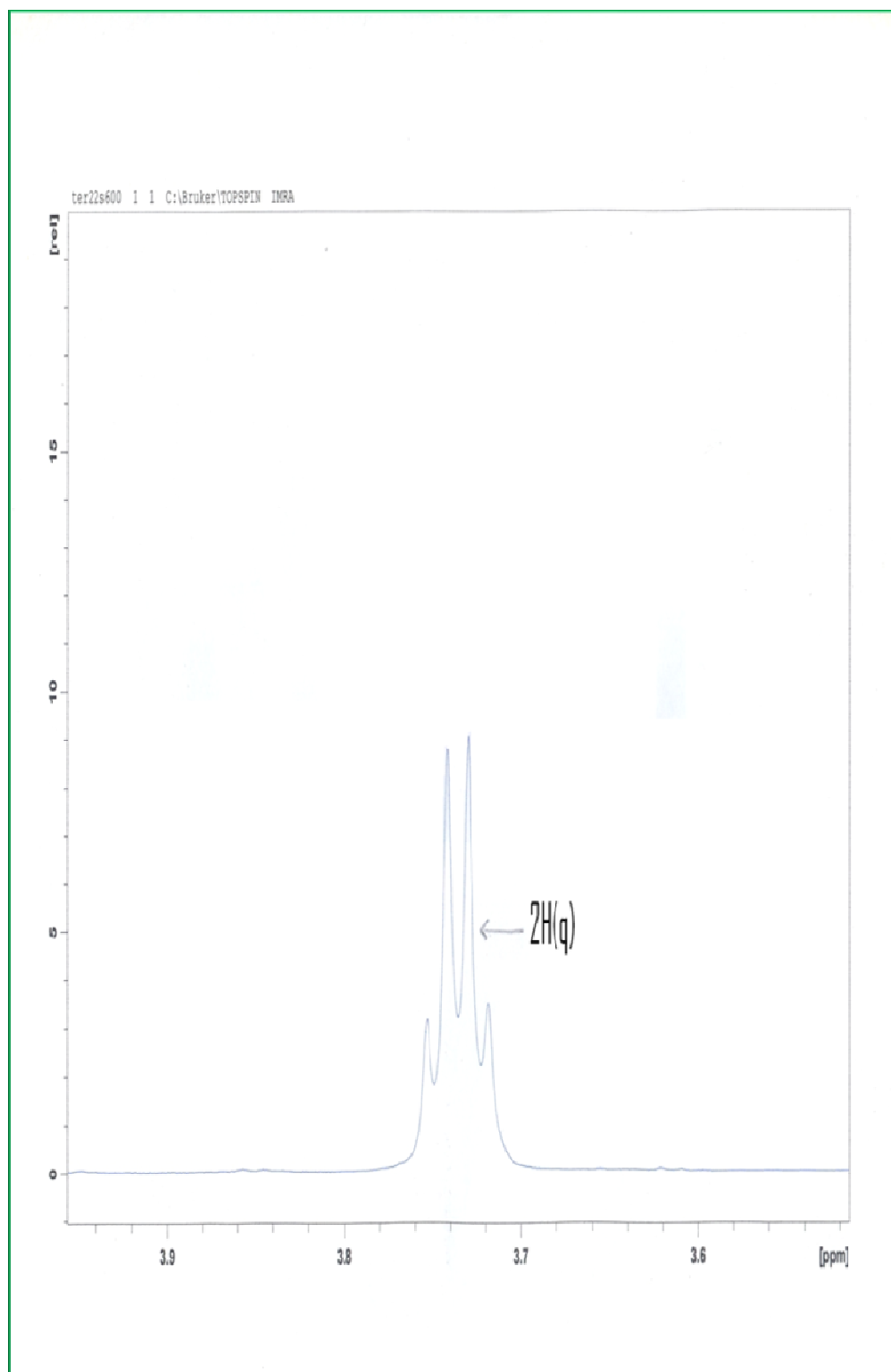


Schéma -17 : Spectre ¹H 1D agrandi du produit-II entre 3.6 à 3.9ppm

Dans le spectre proton 1D du produit Rup-002, on a identifié onze (11) signaux de protons se trouvant entre 0 à 12.5ppm.

Les signaux qui sortent à 12.52ppm (singulet) et 11.86ppm (singulet) ont été attribués aux protons de propriété acide : proton phénolique ou/ et proton acide (figure-55)

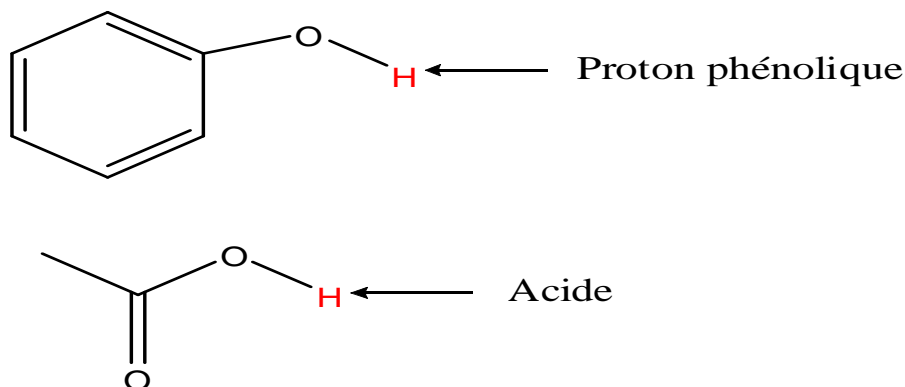


Figure-55 : Représentation le proton acide

Les signaux qui sortent à 7.59ppm (s), 7.52ppm (s), 7.16ppm (s), 6.98ppm (s), 6.92ppm (s) sont attribués aux protons alcéniques :

Ce sont les protons du noyau benzénique ou les protons des alcènes (figure-56)

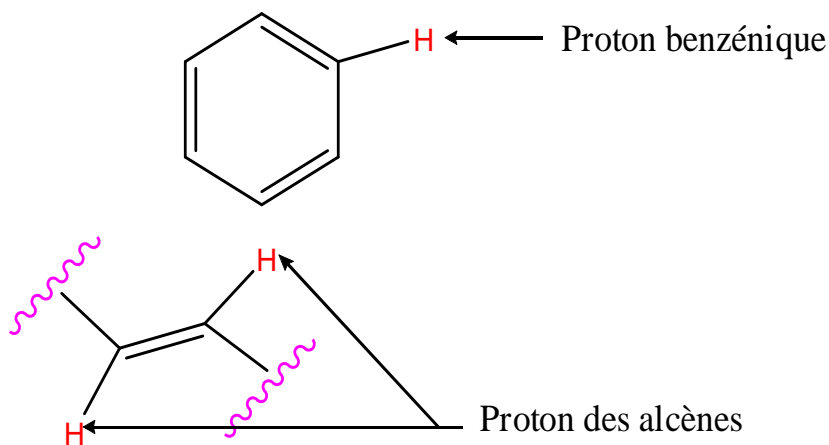


Figure-56: Représentation les protons alcéniques

Le pic proton qui sort à 3.85ppm sous forme de quadruplet est attribué au proton O-CH₂ à côté de CH₃. Ce proton est représenté dans la figure-57

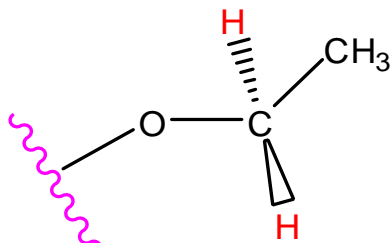


Figure-57 : Représentation les protons ethoxy

Les signaux qui sortent à 2.25ppm singulet et à 2.38ppm singulet sont attribués aux protons des méthyles qui sont liés au noyau benzénique (figure-58).

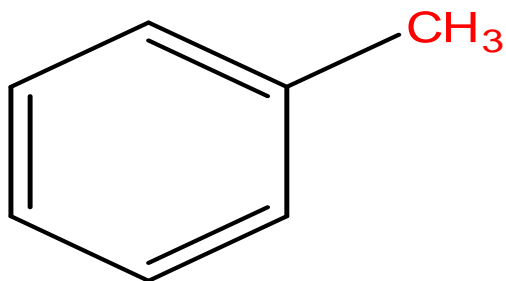


Figure-58: Représentation proton méthyle lié avec de noyau benzénique

Le signal qui sort à 1.15ppm sous forme de triplet est attribué au groupement méthyle (-CH₃) à côté de CH₂ (figure-59).

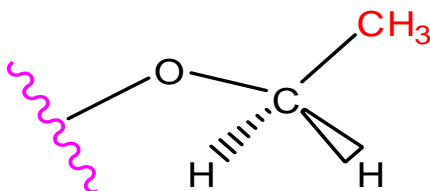


Figure-59 : Représentation de proton méthyle lié avec le groupe ethoxy

b- RMN du ¹³C

Pour le produit Rup-002, on observe deux (2) types de spectre de carbone :
Le DEPT 135° et le spectre B.B

b.1- Spectre DEPT :

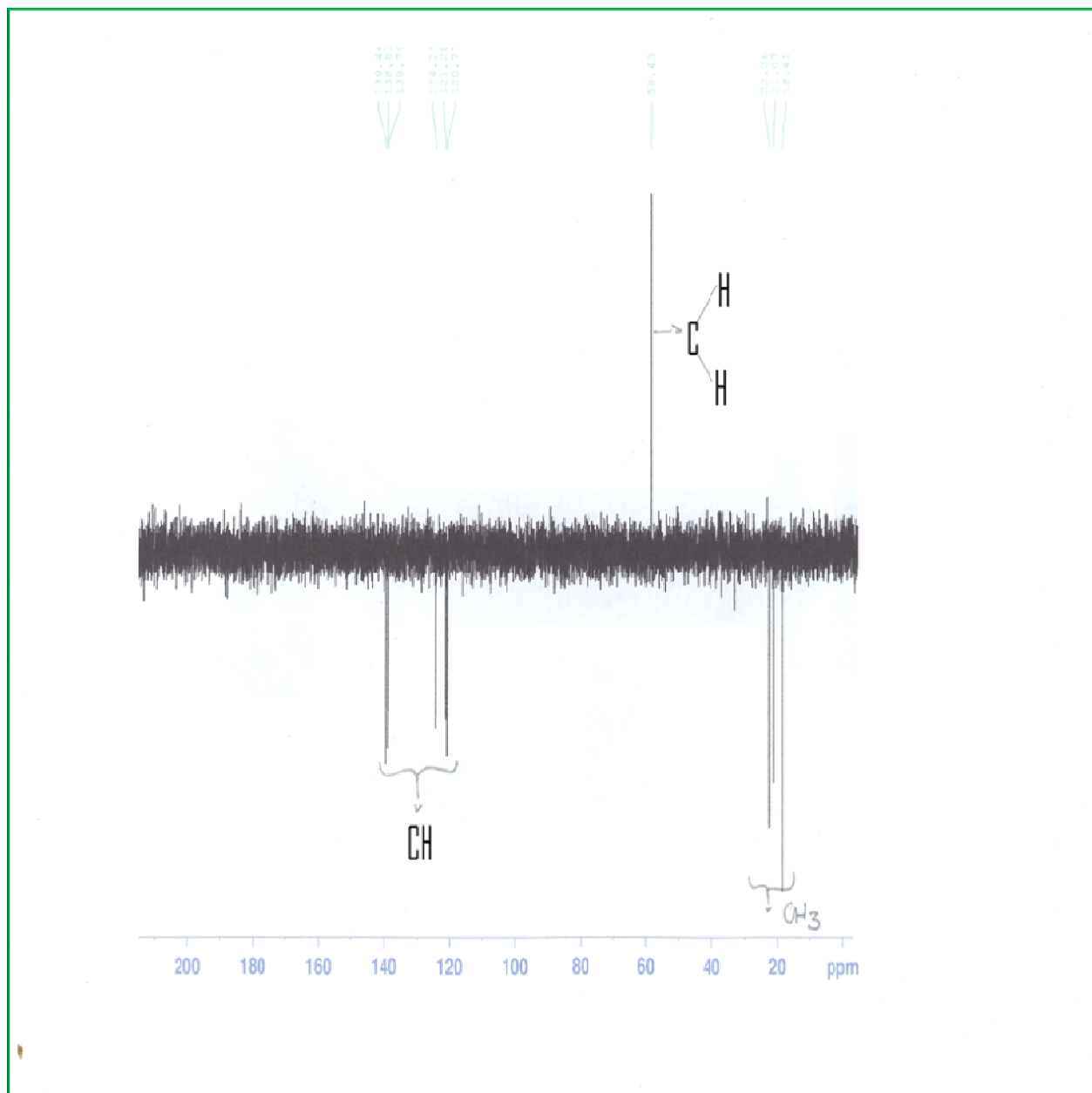


Schéma -18 : Spectre ^{13}C en mode DEPT du produit-II

Pour le produit Rup-002, l'interprétation de spectre DEPT 135° conduit à la présence de : Trois groupement méthyles (CH_3), cinq methynes (CH) qui se trouvent dans le sens positif et un méthylène (CH_2) dans l'autre sens.

b.2.-Spectre B.B :

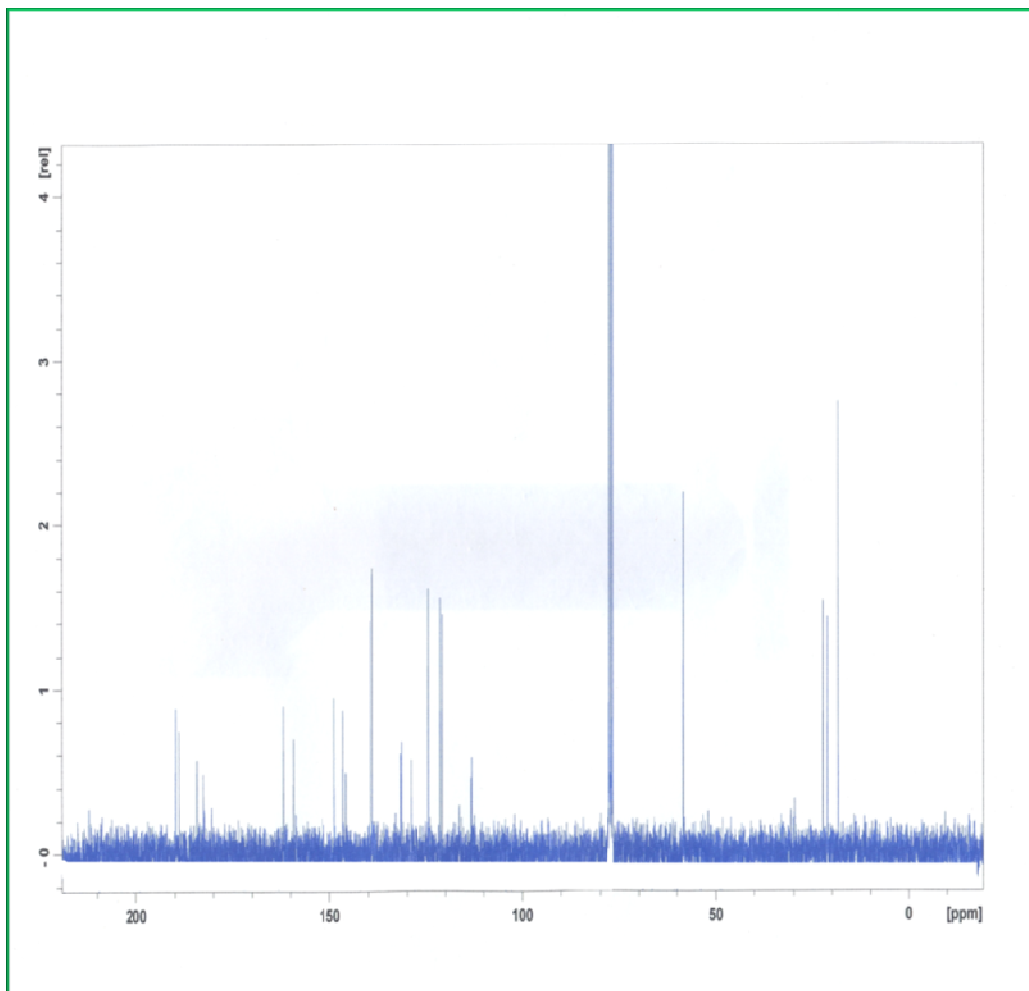


Schéma -19 : Spectre ^{13}C en mode BB du produit-II

Le spectre B.B du produit Rup-002, présente vingt-quatre pics de carbone.

-Les pics à 182.5ppm, 184.05ppm, 188.92ppm, et 190.03ppm sont attribuables aux groupements carbonyles.

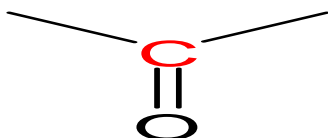


Figure-60 : Groupement carbonyle

Les signaux qui sortent à 22.26ppm, 21.07ppm et 18.41ppm sont attribués aux carbones de groupement méthyle (-CH₃).

Le pic qui sort à 58.43ppm a été attribué au carbone d'OCH₂.

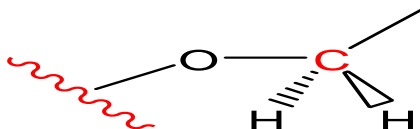


Figure-61 : Carbone ethoxy

Les signaux qui sortent à 120.72ppm, 121.28ppm, 124.21ppm, 138.81ppm et 139.42ppm sont les signaux des CH des noyaux aromatiques.

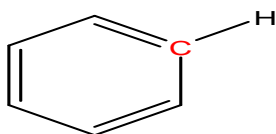


Figure-62 : CH benzénique

Les onze signaux qui sortent à 112.15ppm, 113.45ppm, 117.24ppm, 128.7ppm, 131.5ppm, 132.10ppm, 145.01ppm, 146.17ppm, 148.7ppm, 158.2ppm, 162.18ppm sont les signaux des carbones quaternaires alcéniques.

Tableau- XI : **Récapitulation des interprétations du spectre de carbone 13**

Déplacement chimique de C	DEPT	B.B
182.5ppm à 190.05ppm		Carbonyles
112.15ppm à 162.18ppm		Carbone quaternaire éthylénique (Cq)
120.71ppm à 139.4ppm	+	Carbones methynes (CH)
58.41ppm	-	Carbone méthylène (CH ₂)
18.41ppm à 22.26ppm	+	Carbone méthyle

III.1.4.2.1.2. Spectre de la RMN 2D

a- Spectre HSQC

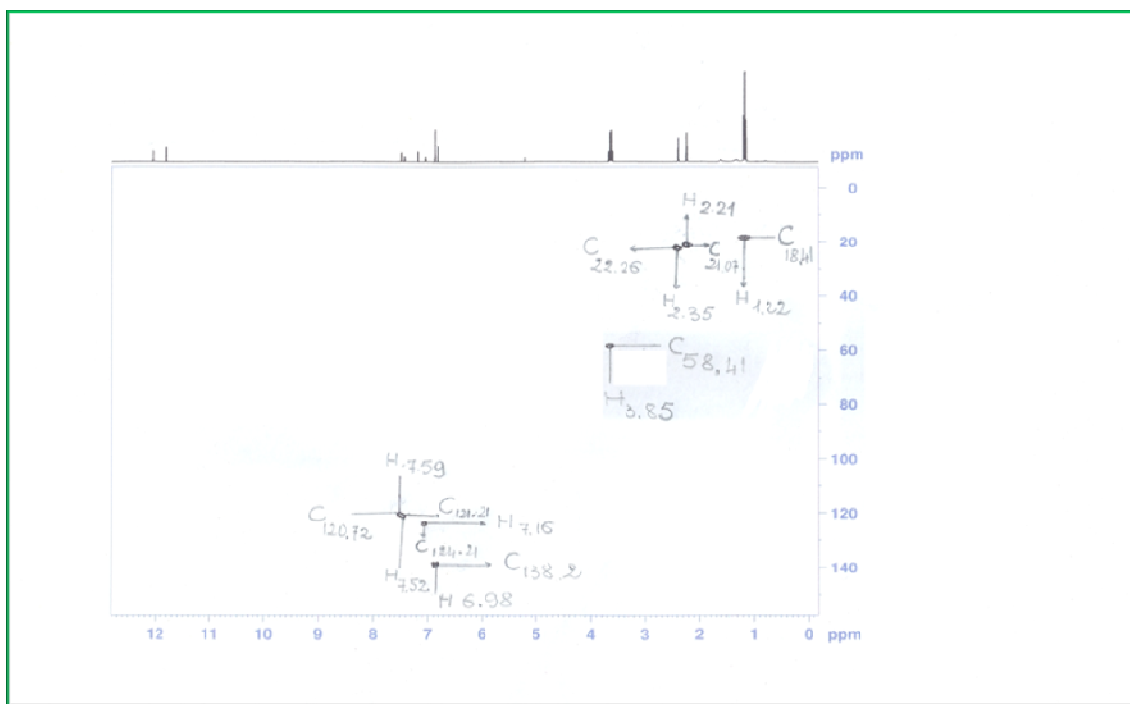


Schéma -20 : Spectre HSQC du produit-II

Sur le spectre de H.S.Q.C ci-dessus, on a relevé les corrélations entre les carbones et les protons qui sont résumées dans le tableau-XII ci-dessous.

Tableau- XII : Les corrélations entre les carbones et les protons du produit Rup-002

Déplacements chimiques des protons (ppm)	Déplacements chimiques des carbones (ppm)
1.22	18.41
2.21	21.07
2.35	22.26
3.85	58.41
6.92	139.95
6.98	138.82
7.16	124.21
7.52	121.21
7.59	120.71

b- Spectre H.M.B.C :

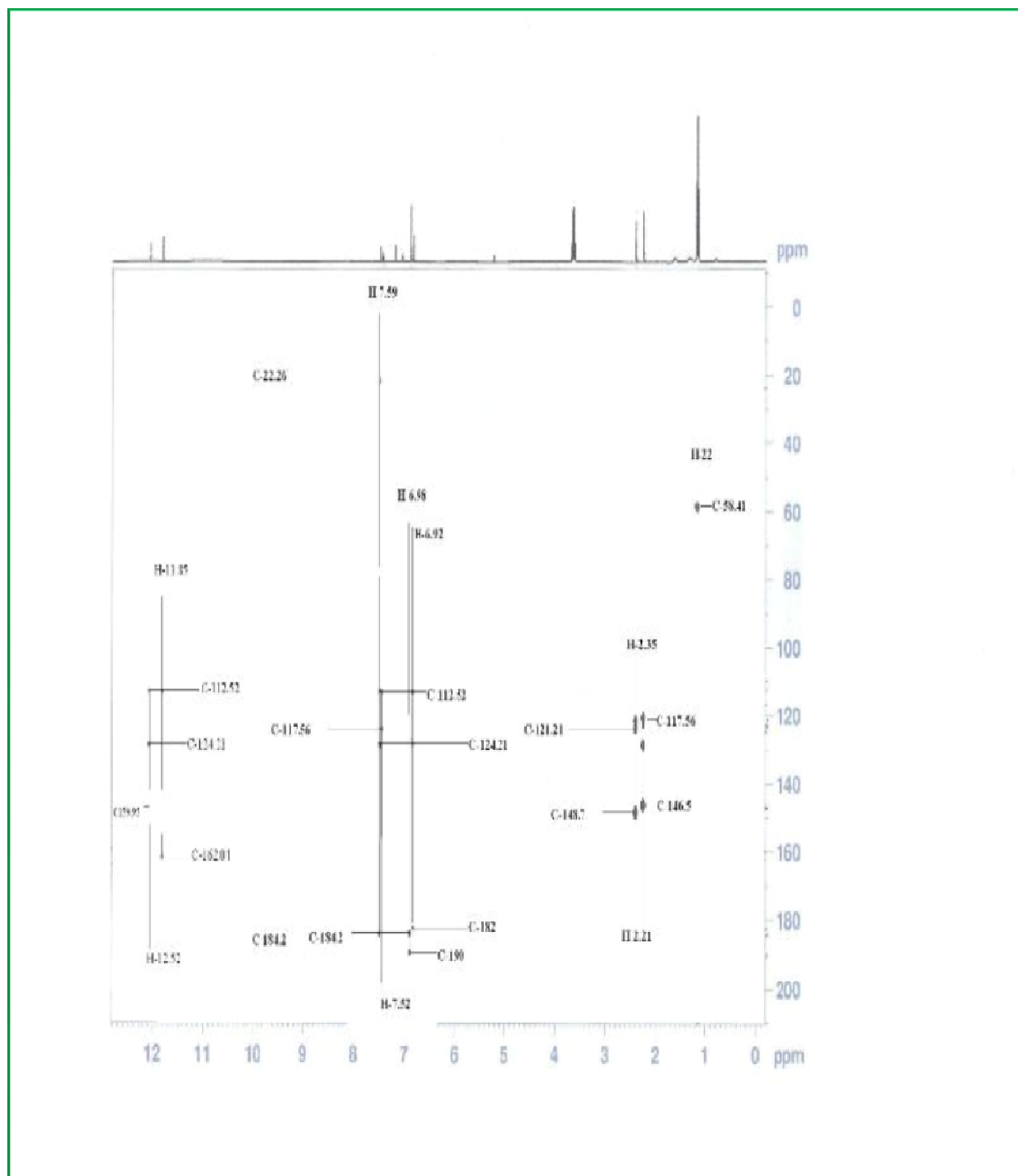


Schéma -21 : Spectre HMBC du produit-II

Sur le spectre H.M.B.C du produit Rup-002 ; on a repéré les corrélations ci-dessous :

Le proton de groupement hydroxyle (-OH) qui sort à $\delta 12.52$, le plus déblindé, présente une tache de corrélation avec les carbones quaternaires qui sortent respectivement à 112.52ppm et 124.41ppm. Alors la séquence correspondant à ces corrélations au proton dont le signal se situe à 12.52ppm est donc porté par le carbone 159.95ppm est représenté sur la figure-63 dans la page suivante.

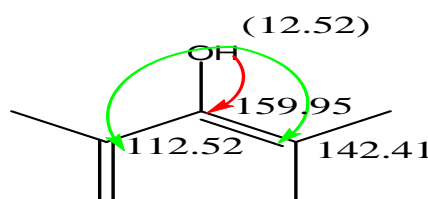


Figure-63 : Séquence de corrélation proton à 12.52ppm

Le signal qui sort à 11.85ppm, sous forme de singulet est celui d'un proton de (-OH) ayant une propriété acide, qui présente des corrélations avec les carbones qui sortent respectivement à 112.52ppm et à 139.41ppm. Alors la séquence de corrélation relative au proton à 11.85ppm porté par le carbone 162.04ppm se présente comme suit (figure-64) :

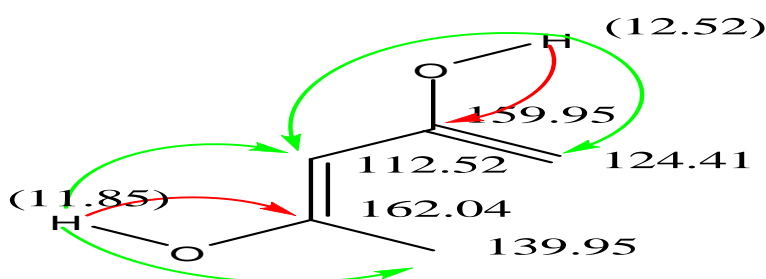


Figure-64 : Séquence de corrélation du proton à 11.85ppm

Le proton à $\delta 6.92$ porté par le carbone à 139.95ppm corréle avec les carbones qui sortent respectivement à 184.2ppm; 124.41ppm et à 112.52ppm mais il ne corréle pas avec le carbone qui sort à 159.95ppm qui est le porteur de (-OH) à 12.52ppm.

Alors le proton à 6.92ppm est en position para par rapport au proton (-OH) à 12.52ppm porté par le carbone à 159.95ppm. La séquence des corrélations concernant le proton 6.92ppm est représenté dans la figure 65.

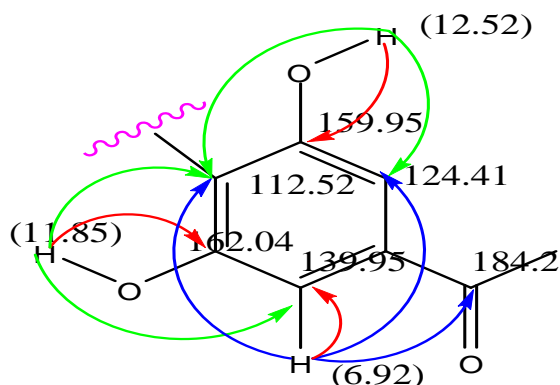


Figure-65: Séquence de corrélation du proton à 6.92ppm

Le proton sortant à 6.98ppm corréle avec les carbones sortant à 190.1ppm ; 124.41ppm ; 184.2ppm. Alors la séquence de la corrélation est donnée ci-dessous (figure-66):

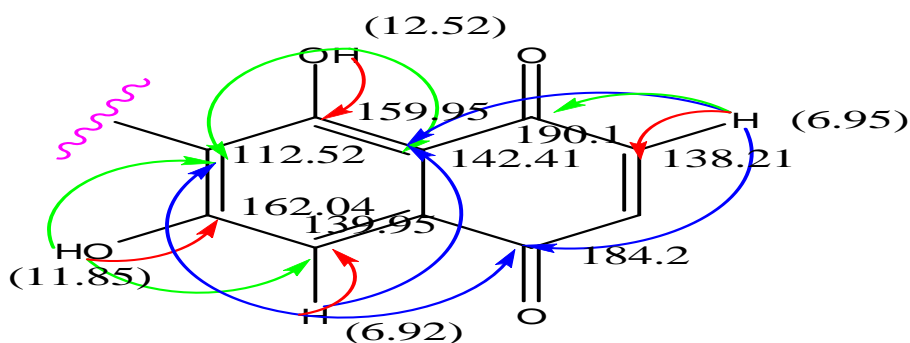


Figure-66: Séquence de corrélation proton à 6.98ppm

Le signal proton à 1.22ppm sous forme de triplet est attribué au proton de groupement méthyle qui corréle avec le carbone sortant à 58.41ppm qui est un carbone du groupement ethoxy (-OCH₂) et le proton qui sort à 3.85ppm porté par le carbone 58.41ppm corréle avec le carbone a 117.8ppm. D'où la première fragmentation de la molécule présentée sur la figure-67 :

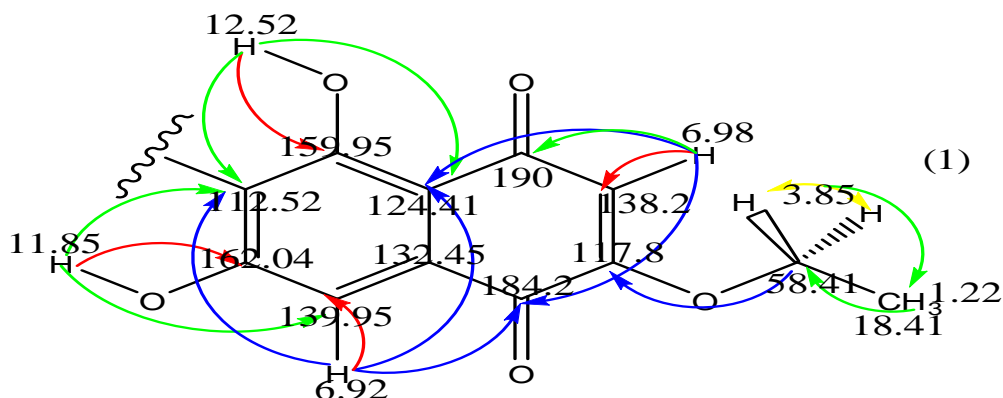


Figure-67 : Première séquence du produit Rup-002

Le proton de groupement méthyle qui sort à $\delta 2.21$, présente des taches de corrélation avec les carbones qui sortent respectivement à 120.72ppm, 124.21ppm et 146.17ppm.

Ainsi l'on peut écrire la séquence figure-68.

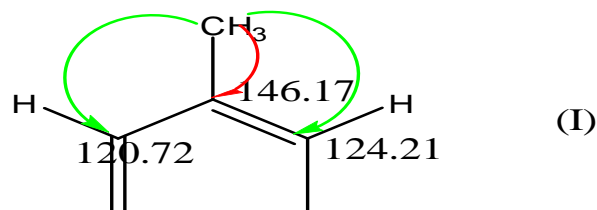


Figure-68: Séquence de corrélation du proton méthyle à 2.21ppm

Pour le proton de méthyle à $\delta 2.35$ (singlet), présente des taches de corrélation avec les carbones qui sortent respectivement à 120.72ppm, 121.21ppm et 148.7ppm.

Alors la séquence de corrélation pour proton qui sort à 2.35ppm porté par le carbone 22.26 ppm est représentée sur la figure-69.

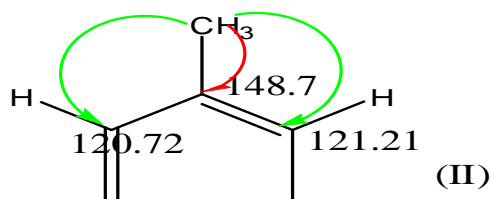


Figure-69: Séquence de corrélation du proton méthyle à 2.35ppm

Le proton qui sort à 7.59ppm toujours sous forme de singlet corréle avec les carbones qui sortent respectivement à 124.21ppm, 113.5ppm et au groupement méthyle à 22.26ppm en fin avec le carbonyle à 184.4ppm. Alors la séquence est représentée sur la figure-70:

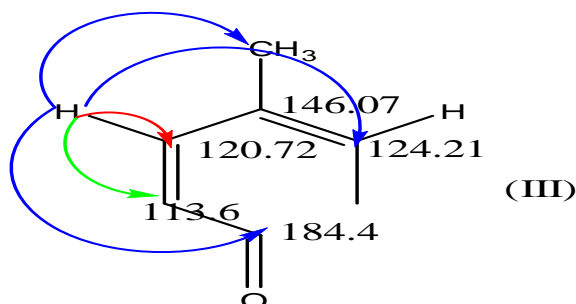


Figure-70: Séquence de corrélation du proton à 7.59ppm

Le signal proton à 7.52ppm présente de corrélations avec les carbones qui sortent respectivement à 188.13ppm, 112.76ppm, 117.58ppm et le méthyle à 21.07ppm. Donc la séquence est la suivante (figure-71).

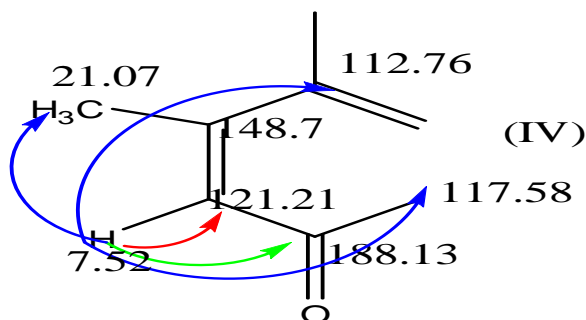


Figure-71 : Séquence de corrélation du proton à 7.52ppm

En réunissant les quatre séquences des figures 71 à 74, on a la deuxième fragmentation de la molécule qui est représentée dans la figure 72 :

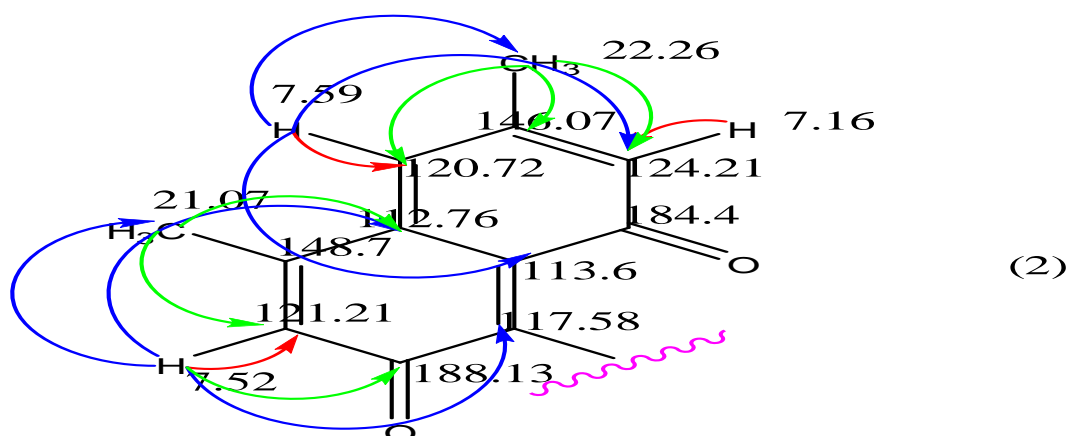


Figure-72 : Deuxième séquence du produit Rup-002

*Le flèche de couleur :-rouge indique la corrélation directe, bleu corrélation en méta et vert corrélation en ortho

Si on rassemble les deux fragmentations [(1) + (2)] de la molécule, on aboutit à la structure complète de la molécule du produit Rup-002 Figure -73 :

III.1.4.2.1.3. La configuration de la molécule Rup-002

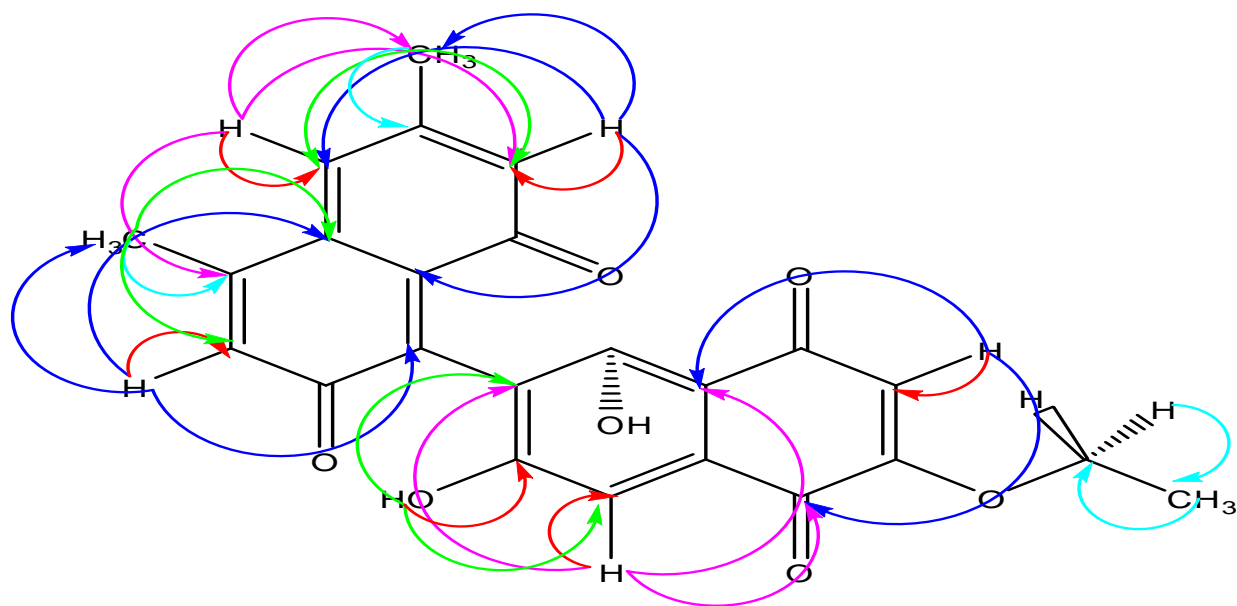


Figure-73 : Structure complet du produit Rup-002

Masse Moléculaire : 418

Formule brute : $C_{24}H_{18}O_7$

Nomenclature scientifique: 6'-ethoxy-1',3-dihydroxy-4,6-dimethyl-1,2'-binaphthyl-2,5', 8,8'-tetraone

Tableau - XIII : Récapitulation des déplacements chimiques de la molécule Rup-002

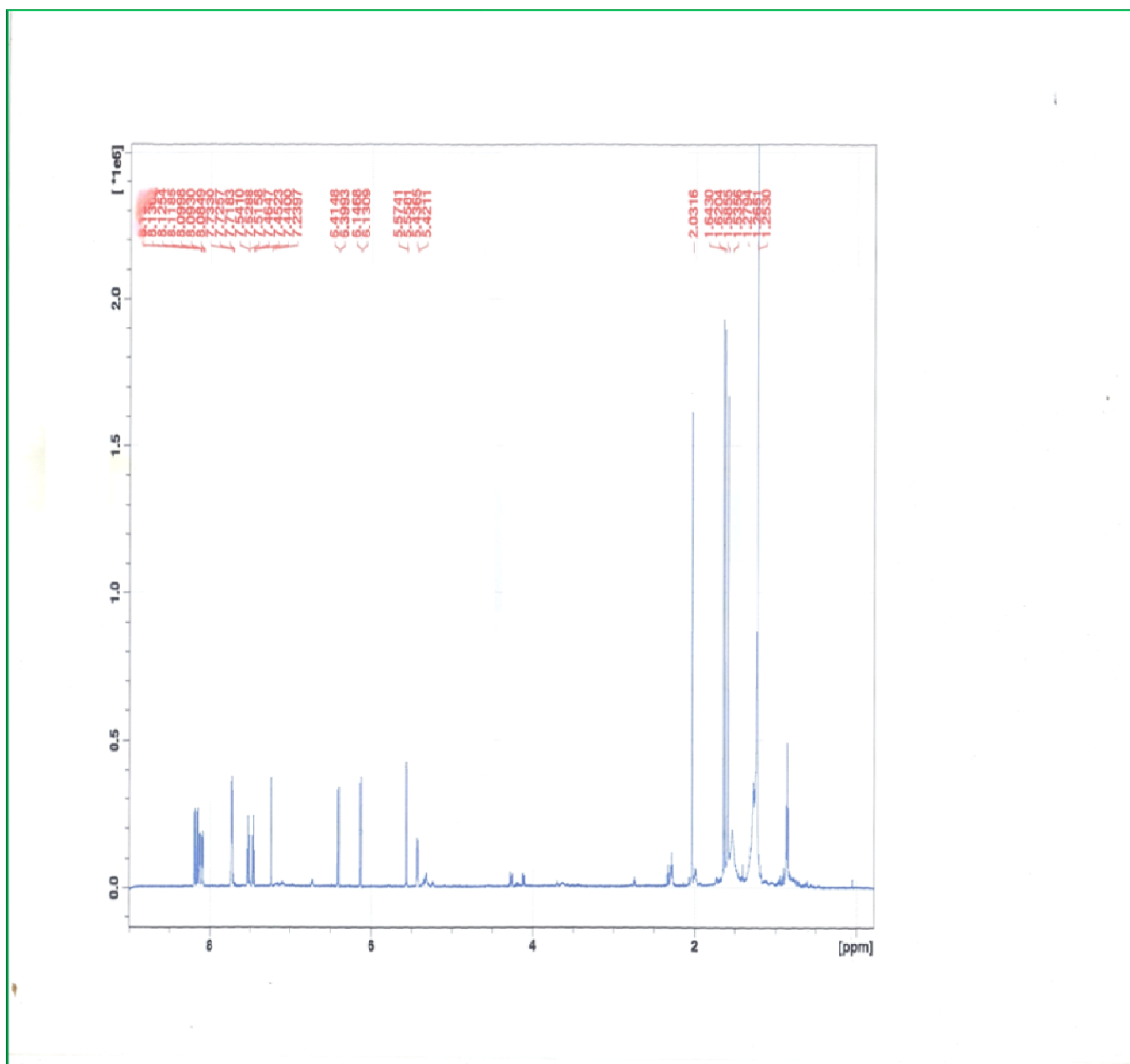
Positions	δ C (ppm)	δ H (ppm)	HMBC
1	117.58		
2	188.13		
3	121.21	7.52	188.13 ; 142.76 ; 21.07
4	148.7		
4b	142.76		
5	120.72	7.59	113.6 ; 124.21 ; 22.26
6	146.6		
7	124.21	7-16	113.6 ; 120.72 ; 22.26
8	184.4		
8b	113.6		
1'	159.95	12.52	124.41 ; 112.51
2'	112.51		
3'	162.04	11.85	139.95 ; 112.51
4'	139.95	6.92	112.51 ; 142.41 ; 184.2
4'a	132.45		
5'	184.2		
6'	117.8		
7'	138.2	6.98	190.0 ; 184.2 ; 124.41
8'	190		
8'a	124.41		
CH ₃	21.07	2.21	120.72 ; 146.17 ; 124.41
CH ₃	22.26	2.35	120.72 ; 148.7 ; 121.21
O-CH ₂	58.41	3.85	18.41 ; 117.8
CH ₃	18.41	1.22	58.41

III.1.4.3. Interprétation et détermination de la configuration du produit Rup-003

III.1.4.3.1. Interprétation des spectres de la RMN

III.1.4.3.1. Spectres de la RMN 1D

a- RMN du ^1H



1H NMR spectrum of 2,4,6-trichlorobenzaldehyde in CDCl₃. The spectrum shows peaks at 8.20 (doublet), 8.13 (triplet), 8.09 (triplet), 7.73 (quartet), 7.53 (triplet), and 7.45 (triplet). Integration values are shown above the peaks: 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00, 1.00. The x-axis is labeled [ppm] and ranges from 8.2 to 7.4. The y-axis is labeled [1e6] and ranges from 0.0 to 2.0. The date 2005/06/02 is noted in the top right corner.

L'interprétation de spectre proton 1D du produit Rup-003 ; on a repéré les déplacements chimiques protons qui se trouvent dans la bande large entre 1 à 8.5ppm ainsi :

Les signaux qui sortent à 8.19ppm (d) , 8.16ppm (d), 8.13ppm (t), 8.09ppm (t), 7.73ppm (d-d), 7.53ppm (t), 7.45ppm (t), peuvent être attribués aux protons de noyau benzénique ou /et les protons alcéniques.

Les pics qui sortent à 6.40ppm (d) , 6.14ppm (d), 5.57ppm (d) et 5.43ppm (d) peuvent être attribués aux protons de :

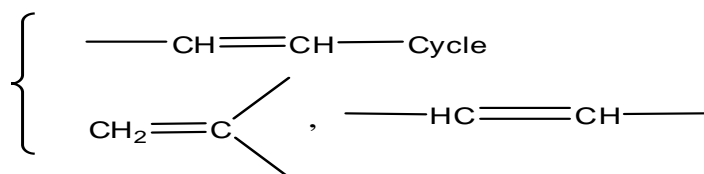


Figure-74 : Représentation les protons alcénique du produit Rup-003

Le proton qui sort à $\delta 2.03$ sous forme de singulet peut être attribué au proton de :

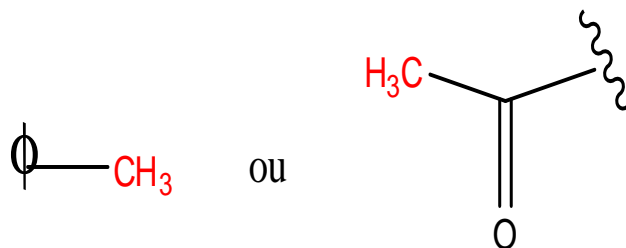


Figure-75 : Représentation le proton méthyle

Les spectres de protons qui sortent à 1.64ppm(s), 1.62ppm(s), 1.52ppm(s) et 1.30ppm(s) peuvent être attribués aux protons de :

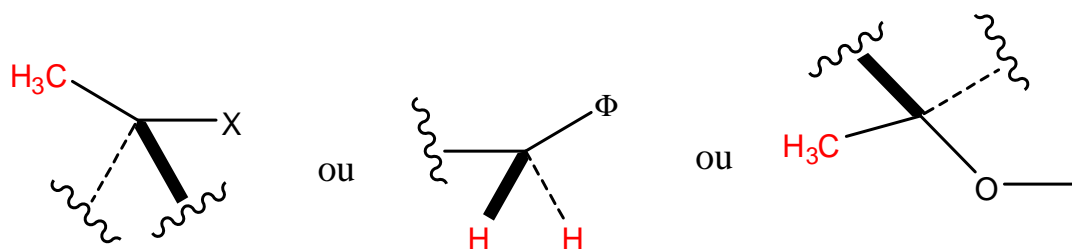


Figure-76 : Représentation les protons qui sortent à 1.56ppm jusqu'à 1.64ppm

b- RMN du ^{13}C

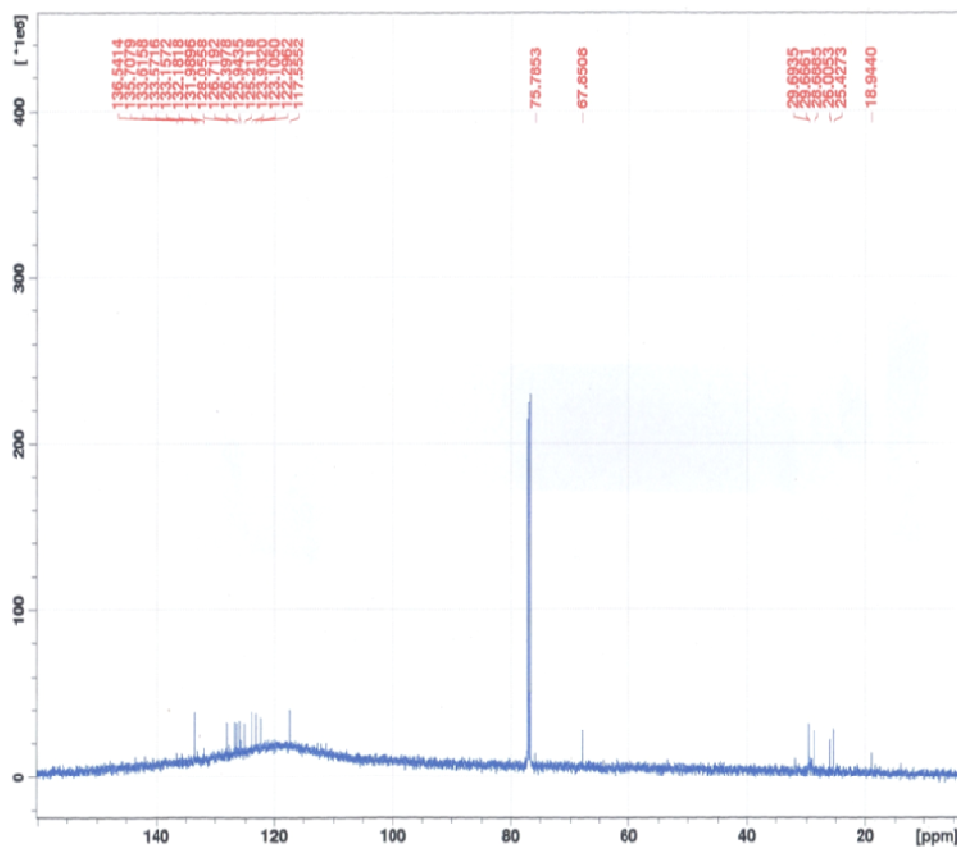


Schéma -28 : Spectre ^{13}C en mode BB du produit-III

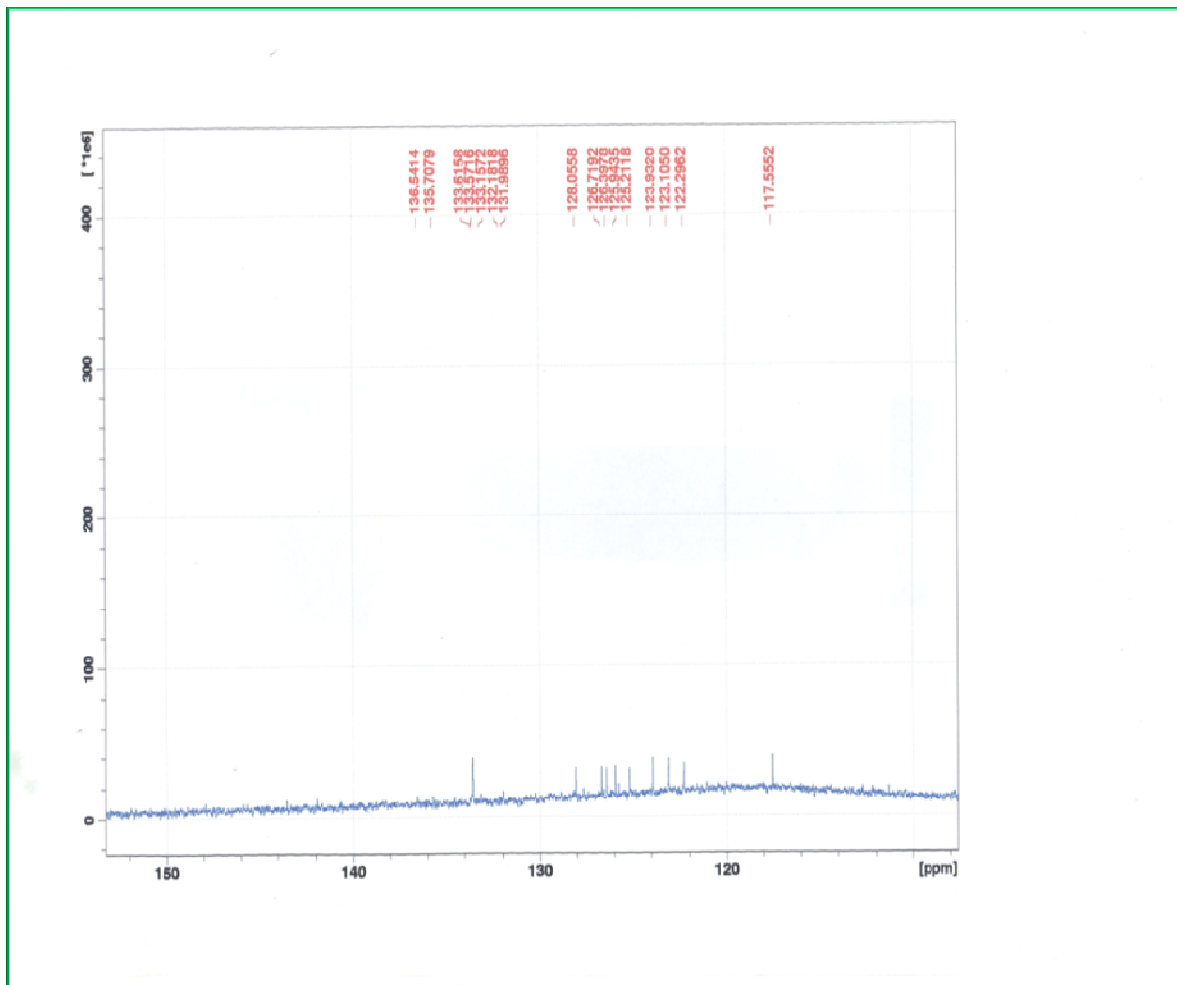


Schéma -28 : Spectre ^{13}C en mode BB du produit-III agrandi

Sur le spectre carbone 13 du produit Rup-003 ; on a repéré les déplacements chimiques des carbones qui se trouvent dans la bande large comprise entre 18.94ppm à 148.00ppm:

Les carbones qui sortent entre 18.94ppm à 29.45ppm sont attribués aux carbones des groupements méthyles ou/et des carbones secondaires.

Le signal qui sort à 67.85ppm a été attribué au carbone qui lié avec un hétéroatome.[O,N,S]

Les pics qui sortent à 117.5ppm jusqu'au 133.5ppm ont été attribués aux carbone des alcènes ou des carbones de noyau benzénique.

Les signaux à 135.5ppm ; 136.5ppm ; 148.00ppm ont été attribués aux carbones quaternaires de noyau benzénique.

III.1.4.3.1.2. Spectres de la RMN 2D

a- Spectre COSY

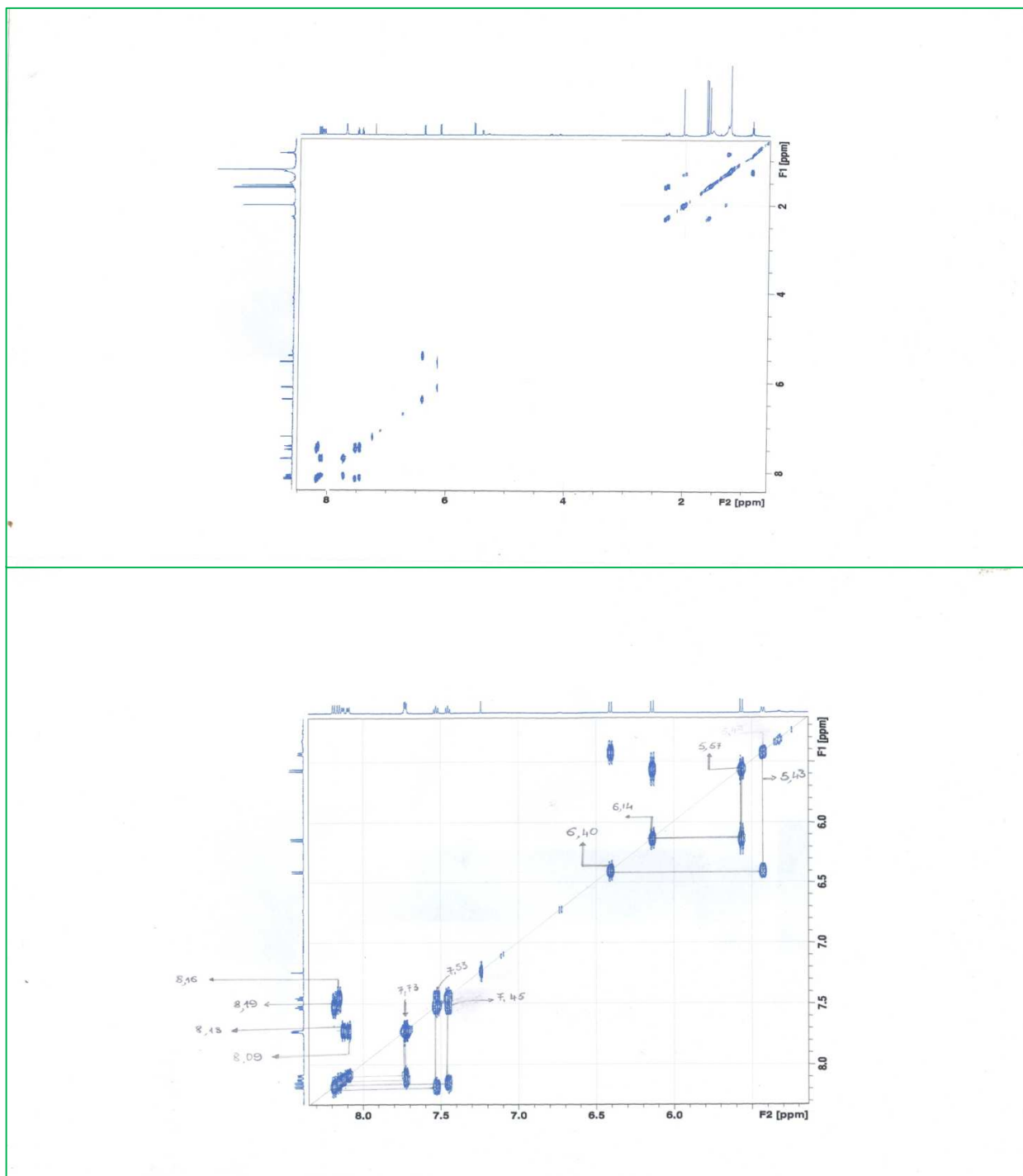


Schéma -27 : Spectre COSY du produit-III

L'interprétation de spectre COSY du produit Rup-003 a montré que le proton $\delta 8.19$ (d) porté par le carbone à 122.29 est couplé avec le proton à 7.45ppm sous forme de triplet porté par le carbone à 126.39ppm, alors le signal proton à 8.19ppm est attribué au CH_2 à côté de CH. D'où ce couplage est représenté par la figure 77

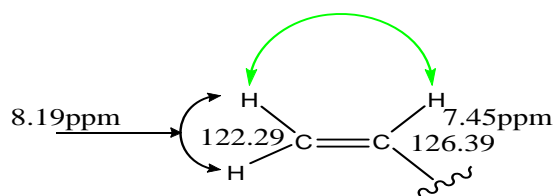


Figure-77 : Couplage du proton à 8.19ppm et le proton à 7.45ppm

De même le proton à 8.16ppm sous forme de doublet est couplé avec le proton 7.53ppm sous forme de triplet. (Voir figure 78)

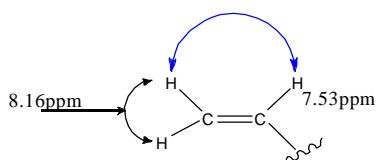


Figure-78: Couplage du proton à 8.16ppm et le 7.53ppm

Les protons à 8.13ppm et 8.09ppm sont sous forme de triplet sont couplés avec le proton 7.73ppm qui sort en doublet de doublet ou faux quadruplet (figure-79).

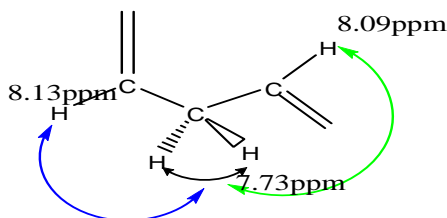


Figure-79: Couplage du proton à 8.09ppm, 8.13ppm et le proton à 7.73ppm

Le proton à $\delta 6.40$ sous forme de doublet est couplé avec le proton à 5.43ppm qui sort sous forme de doublet (figure – 80).

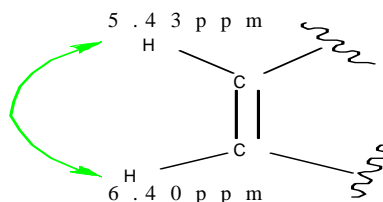


Figure-80: Couplage du proton à 6.40ppm et le proton à 5.43ppm

Le proton à δ 6.14 sous forme de doublet est couplé avec le proton à 5.57ppm qui sort sous forme de doublet (figure- 81).

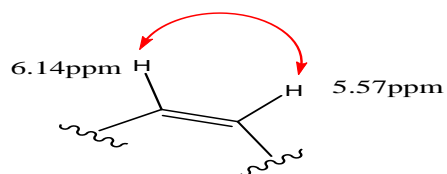


Figure-81 : Couplage du proton à 6.41ppm et le proton à 5.55ppm

b- Spectre HSQC :

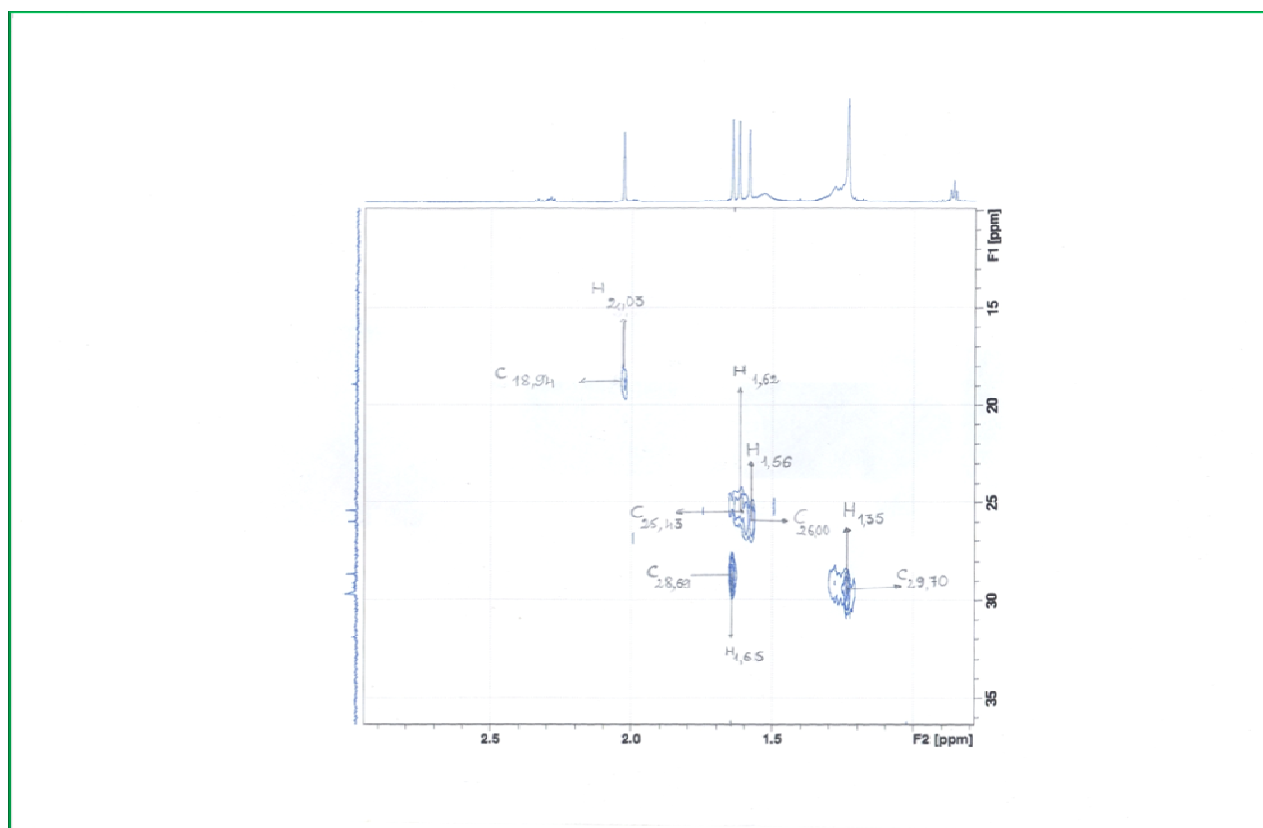


Schéma -24 : Spectre HSQC agrandi du produit-III entre 1 à 2.5ppm

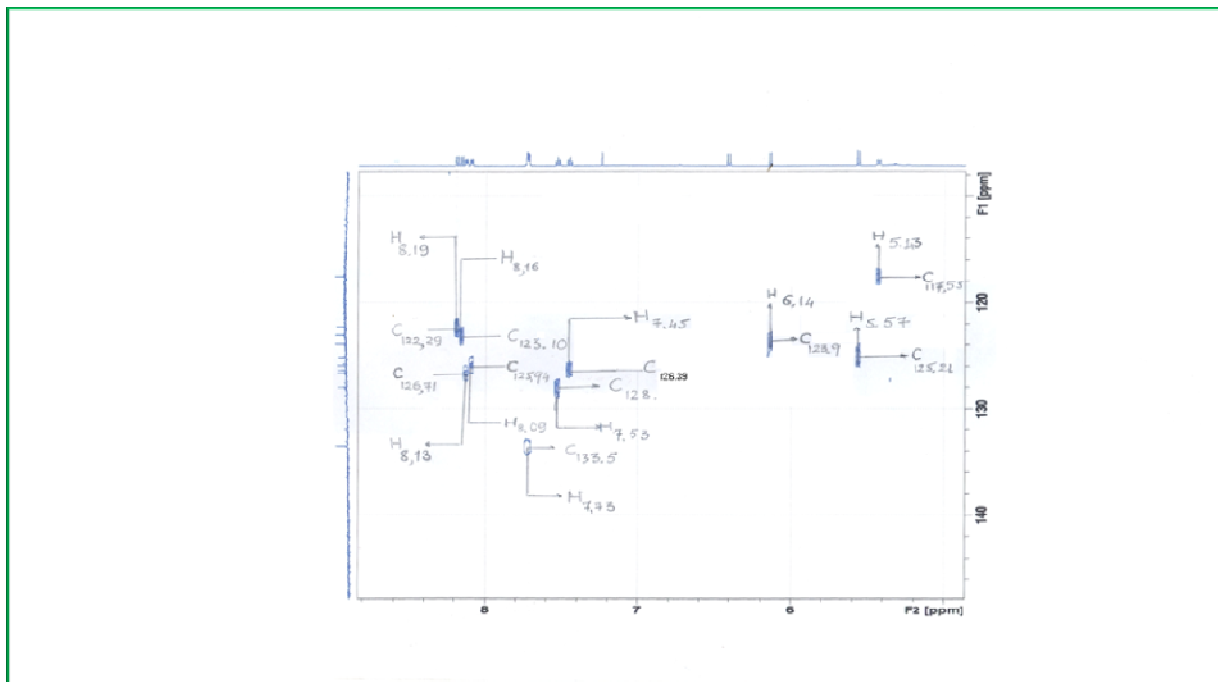


Schéma -25 : Spectre HSQC agrandi du produit-III entre 6 à 9ppm

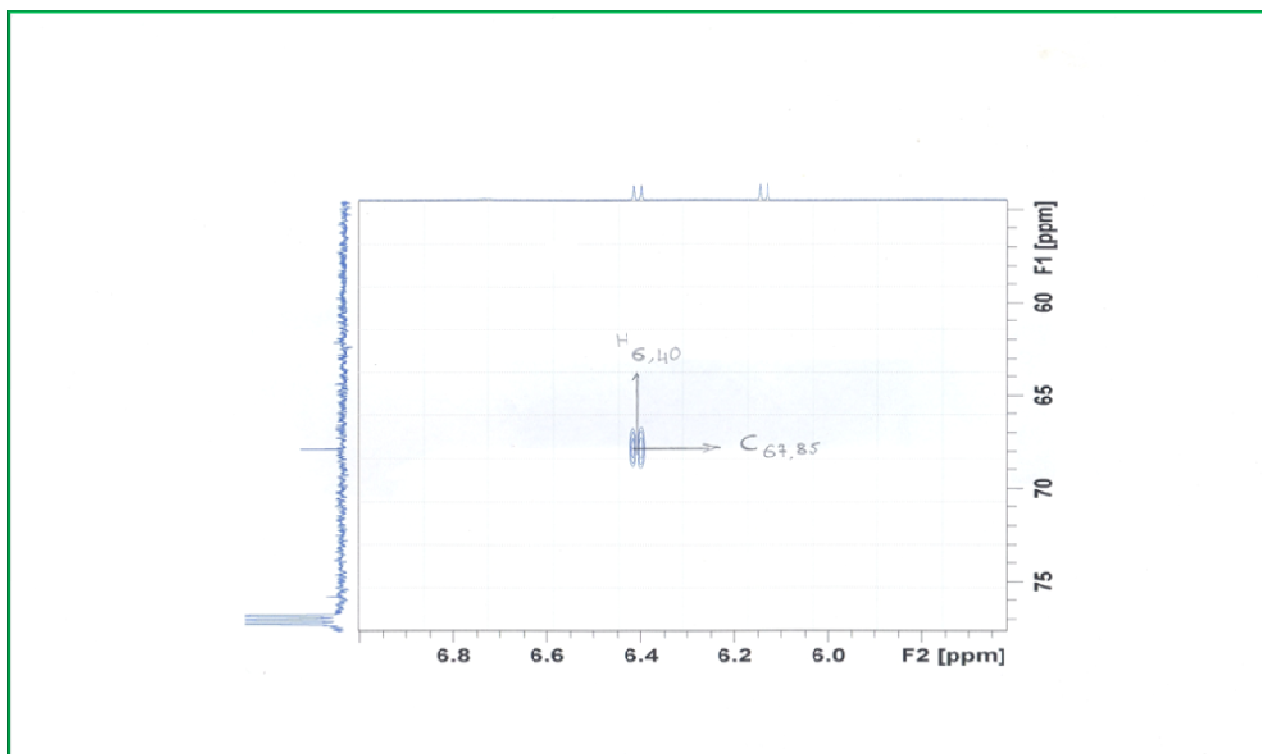


Schéma -26 : Spectre HSQC agrandi du produit-III entre 5.5 à 6.8ppm

Sur le spectre de H.S.Q.C ci-dessus, on a relevé les corrélations entre les carbones et les protons qui sont résumées dans le tableau- XIV.

Tableau- XIV Corrélations entre les carbones et les protons du produit Rup-003

Déplacements chimiques des protons (ppm)	Déplacements chimiques des carbones (ppm)
1.56	26.00
1.62	25.43
1.64	22.26
2.03	18.94
5.43	117.55
5.57	125.21
6.14	123.93
6.40	67.85
7.45	126.39
7.53	128.05
7.73	133.5
8.09	125.94
8.13	126.71
8.16	123.10
8.19	122.29

b- Spectre HMBC du Rup-003

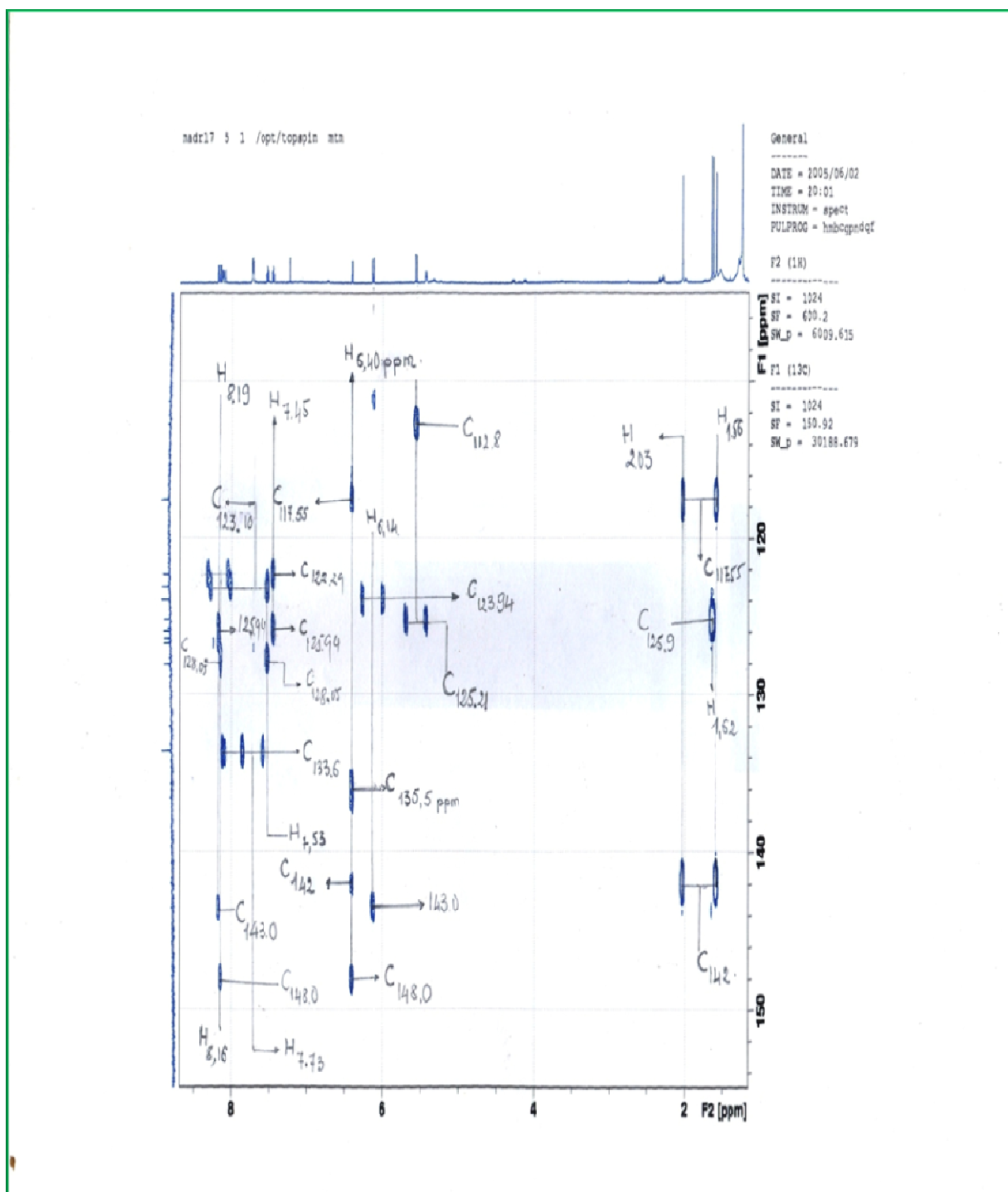


Schéma -29 : Spectre HMBC du produit-III agrandi entre de 0 à 8ppm

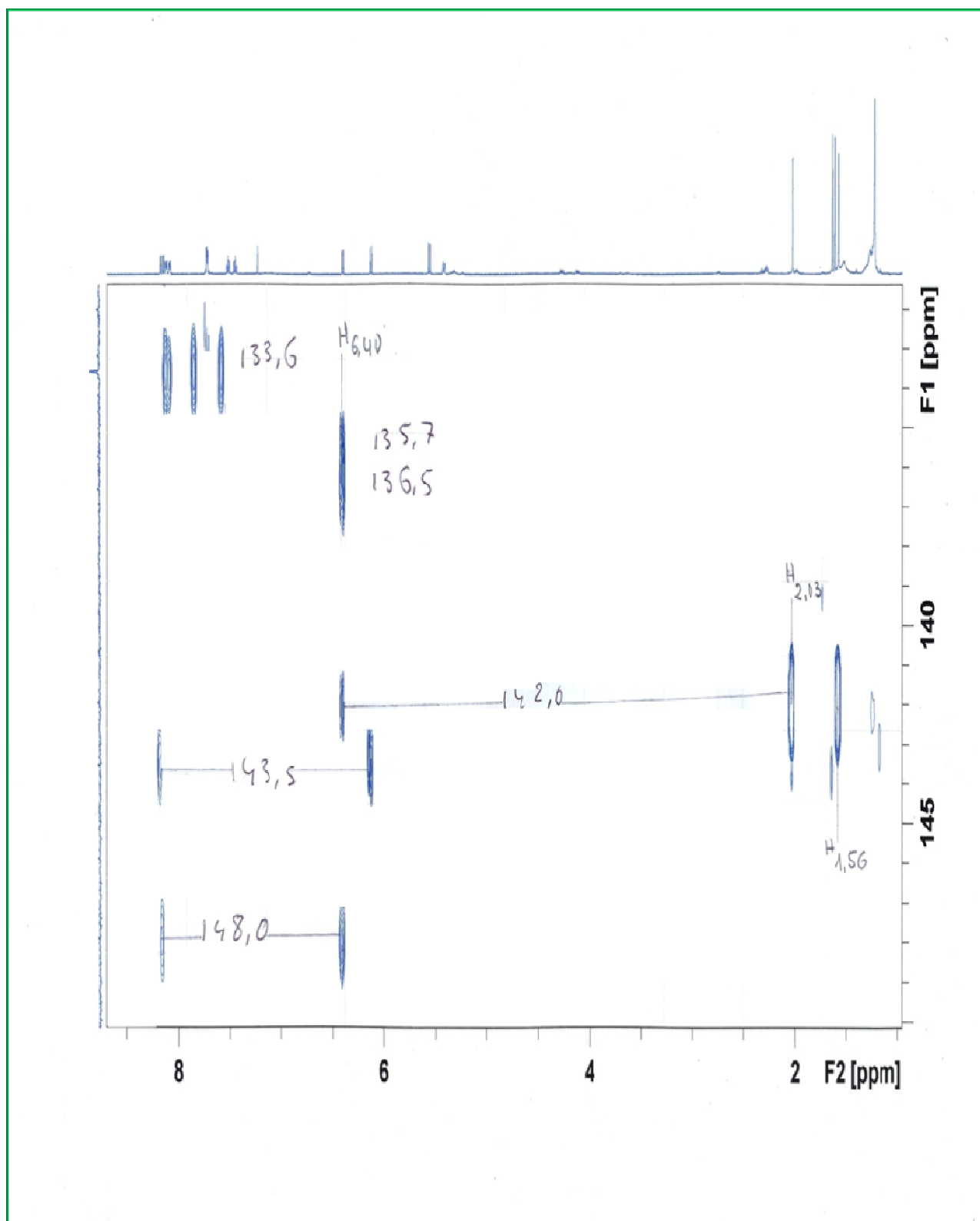


Schéma -30 : Spectre HMBC du produit-III agrandi

Dans le spectre H.M.B .C du produit Rup-003, on a relevé les corrélations entre les carbones et les protons le suivant.

Le signal proton à 8.19ppm (doublet) et porté par le carbone à 122.29ppm présente des taches des corrélations avec les carbones qui sortent à 125.94ppm et 143.00ppm.

Or ce proton est couplé avec le proton à 7.45ppm porté par le carbone à 126.39ppm ; et le proton à 7.45ppm est corrélé aussi avec les carbones à 122.29ppm et à 125.94ppm. Alors la séquence de la corrélation est représentée sur la figure-82 dans suivante.

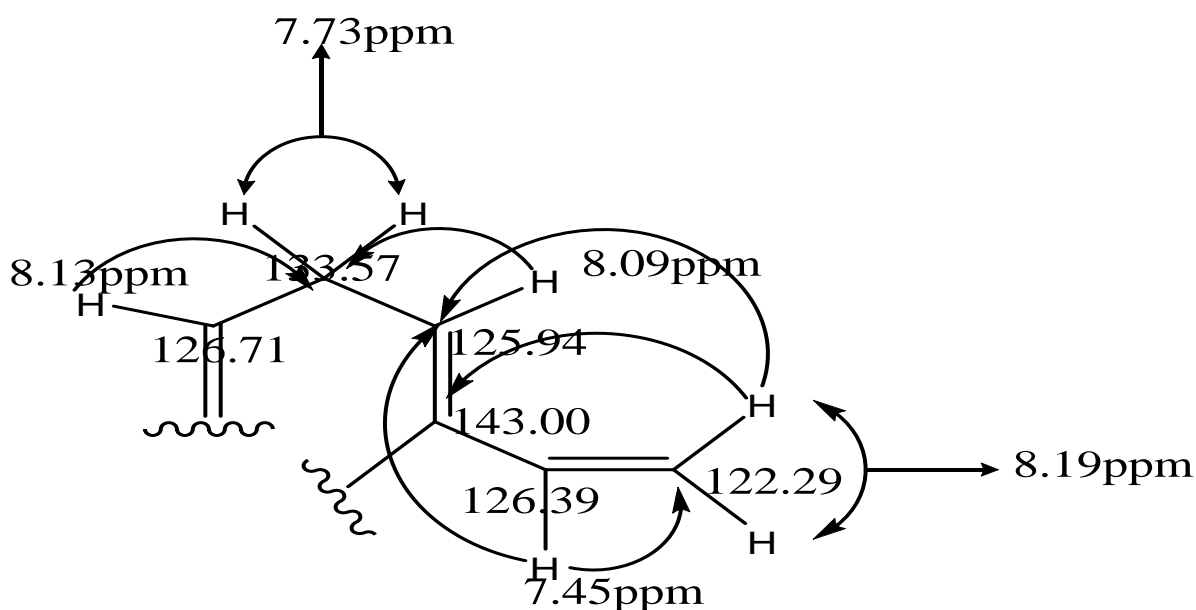


Figure-82 : Séquence de corrélation du proton à 8.19ppm

Le signal proton à 6.14ppm sous forme de doublet porté par le carbone à 123.94 est présenté une tache de corrélation avec le carbone à 112.8ppm et une faible corrélation avec le carbone à 143.00ppm ; or ce proton est couplé avec le proton à 5.55ppm porté par le carbone 125.21ppm.

Le proton à 5.55ppm sous forme de doublet est corrélé avec les carbones à 112.8ppm et à 143.00ppm. La séquence de la corrélation est représentée dans la figure-83 ci-dessous.

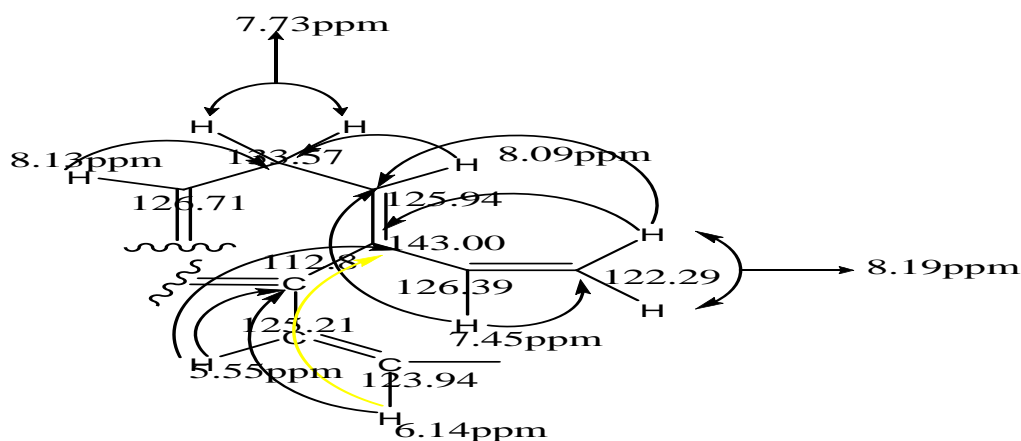


Figure-83 : Séquence de corrélation du proton à 6.14ppm

La flèche en couleur jaune : indique la faible corrélation

Le proton qui sort à 8.16ppm (doublet) porté par le carbone à 123.10 est corrélé avec les carbones qui sortent à 128.05ppm et 148.00ppm. Or ce proton est couplé avec le proton à 7.53ppm porté par le carbone à 128.05ppm (figure-84).

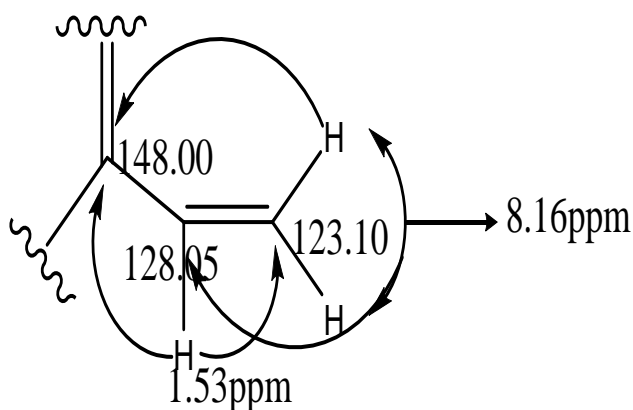


Figure-84 : Séquence de corrélation du proton à 8.16ppm

Le proton qui sort à 6.40ppm doublet porté par le carbone à 67.85ppm est présenté une tache de corrélation avec les carbones à 117.5ppm ; 135.75ppm ; 142.00ppm ; 148.00ppm. Or ce proton est couplé avec le proton qui sort à 5.44ppm (doublet) porté par le carbone à 117.5ppm et en plus le carbone porteur du proton 6.40ppm est un carbone qui est lié avec un hétéroatome. La séquence de corrélation est représentée sur la figure-85 suivante.

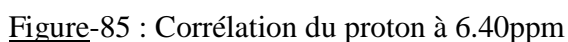


Figure-86 : Corrélation du proton méthyle à 2.03ppm

Dans le tableau périodique de MENDELIEW il y a des halogénés de l'azote et du soufre qui peut posséder une tétravalence ; cependant l'hologenèse et le soufre n'acquièrent cette tétravalence que lorsqu'ils sont avec des oxygènes quant à l'azote à l'état excité sous forme de sel d'acide (ammonium).

L'hétéroatome qui est lié avec le carbone à 67.85ppm ne pourra être que l'azote. La première hypothèse de fragmentation de la molécule est représentée dans la figure-87 suivante.

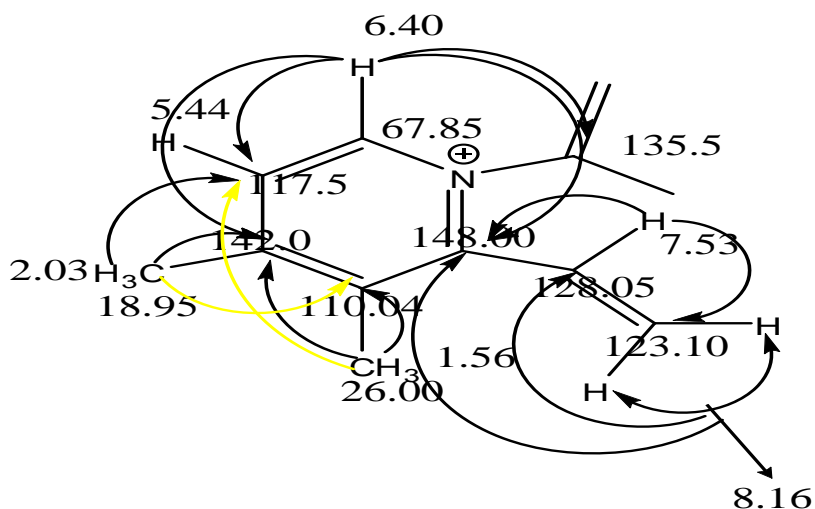


Figure-87 : Première séquence du produit Rup-003

Le méthyle qui sort à 1.62ppm porté par le carbone à 25.43ppm présente des taches des corrélations avec les carbones à 125.21ppm, 112.8ppm de même pour le méthyle à 1.64ppm porté par le carbone à 22.26ppm est corrèle avec les carbones à 125.21ppm, 112.8ppm.

La deuxième hypothèse de séquence de la molécule est représentée par la figure-88 ci-dessous :

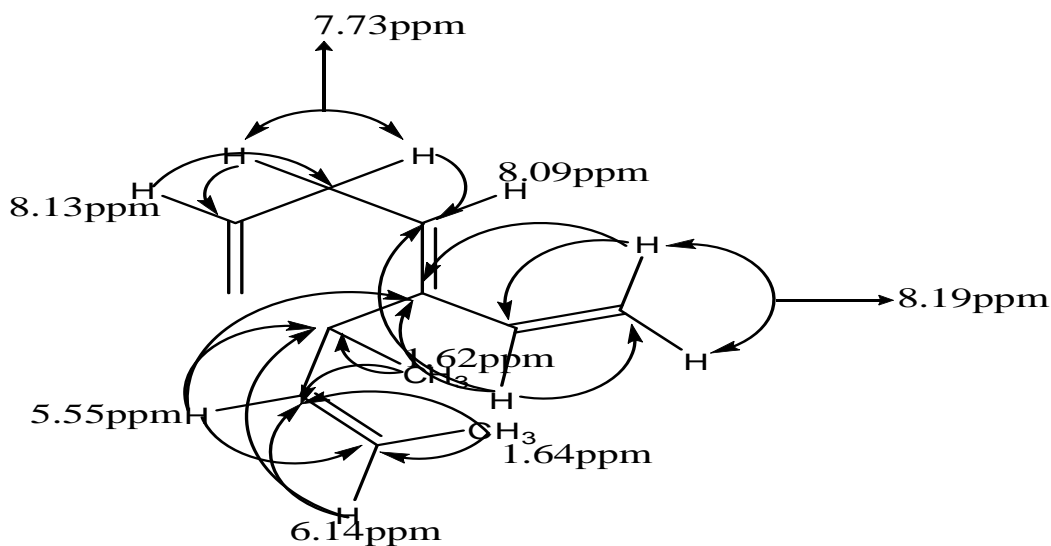


Figure-88 : Deuxième séquence du produit Rup-003

Si on ensemble les deux fragmentations, on obtient la structure finale du produit Rup-003 figure- 89

III.1.4.3.1.3. La configuration de la molécule Rup-003

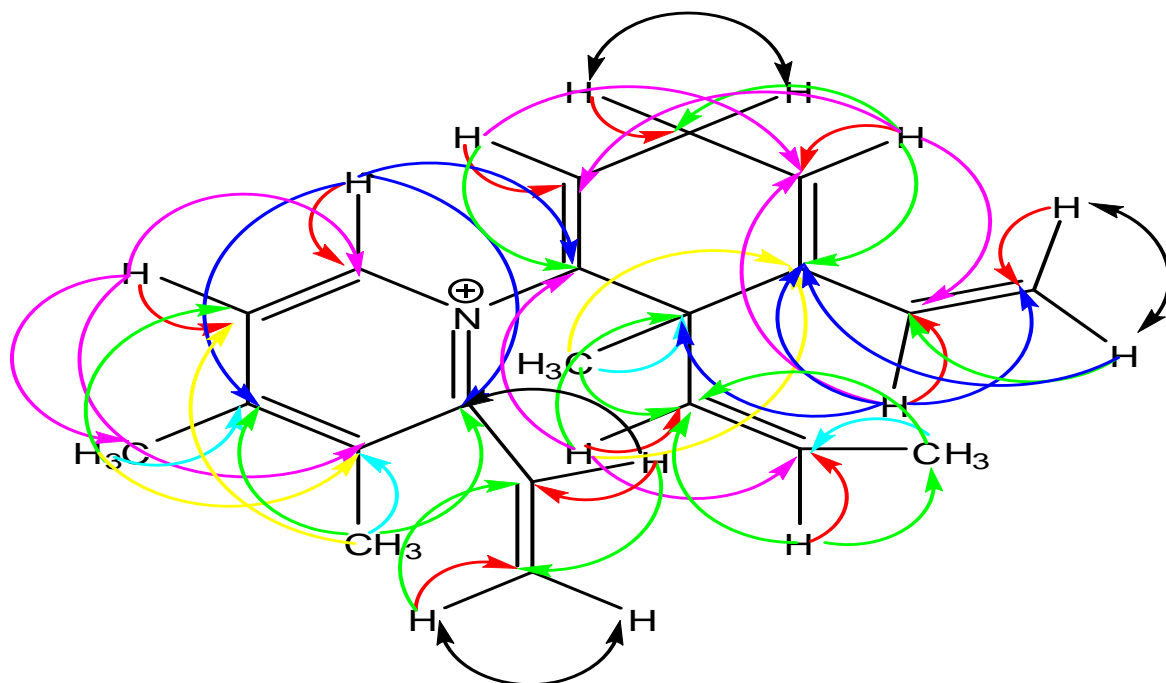


Figure-89 : Structure complète du produit Rup-003

Formule brute : **C₂₁H₂₆N⁺**

Tableau- XV Récapitulation des déplacements chimiques de la molécule Rup-003

Positions	δ C (ppm)	δ H (ppm)	HMBC
1'	135.5		
2'	112.8		
3'	143.00		
4'	125.94	8.09	133.5 ; 143.00
5'	133.5	7.73	126.71 ; 125.94
6'	126.71	8.13	133.5 ; 135.5
2' α	125.21	5.55	143.0 ; 123.93 ; 112.8
2' β	123.93	6.14	125.21 ; 112.8
3' α	126.39	7.45	143.0 ; 125.94
3' β	122.29	8.19	125.94 ; 143 ; 126.39
2	148.00		
3	110.04		
4	142.0		
5	117.5	5.45	67.85 ; 110.04 ; 142.0
6	67.85	6.40	117.5 ; 142.0 ; 148.0 ; 135.5
2 α	128.05	7.53	123.10 ; 148.00
2 β	123.10	8.16	148.00 ; 128.05
CH ₃	26.00	2.21	117.5 ; 142.0 ; 110.04
CH ₃	22.26	2.35	125.21 ; 123.93
CH ₃	25.43	1.62	125.21 ; 112.8
CH ₃	18.95	2.03	117.5 ; 142.0 ; 110.04

III.2-DISCUSSIONS

III.2.1 -Partie chimie

Du point de vue systématique chimique, aucune étude antérieure n'a été réalisée sur le genre de *Maba* appartenant à la famille des Ebénacées. Cette famille est réputée riche en composés à base de quinones (Schart-en 2001).

Les tests du screening phytochimique, pour les détections de la présence des composés existant dans cette plante que nous avons effectuée corroborent à l'hypothèse de Perrier de la Bathie, c'est-à-dire la présence des composés phénoliques.

Les différentes méthodes d'extractions dans la littérature ne présentent que de variante de ce principe en fonction de ce qu'on veut extraire dans la plante.

Les produits isolés sont des molécules organiques qui sont solubles dans le solvant organique de polarité moyenne alors les molécules sont donc moyennement polaire.

Le produit Rup-001 isolé est un quinone il s'agit de l'Isodiospyrine. Cette molécule semble être un dimère de méthyle juglone type Isodiospyrine (Page-14), il s'agit de (5,7) bis (8Hydroxy-6-méthyles) naphthoquinone1-4. Ce produit confère à la biosynthèse des naphthoquinones, c'est à dire qu'elle provient de la voie acétate /malonate.

Les naphthoquinones sont des composés qui comportent deux groupements carbonyl en position *Para* ou en *ortho* cependant, le spectre de RMN ^1H , ^{13}C et de corrélation HMBC, observées lors de la détermination des structures de Rup-0001 et Rup-002 sont en faveur de *para* naphthoquinone. Alors, en général, tout composés qui présente de groupement cétonique ayant des propriétés basiques, par l'existence de deux doublets de l'oxygène (base de Lewis) et la présence du centre nucléophile.

Les quinones sont classées dans la famille des composés phénoliques. Alors tous les composés phénoliques ont souvent des propriétés acides, grâce à leur proton H mobile.

Si l'on regarde leur structure, les protons des groupements (-OH) sont à coté des groupements attracteurs, les carbonyles. Ces conditions favorisent la formation des liaisons hydrogènes

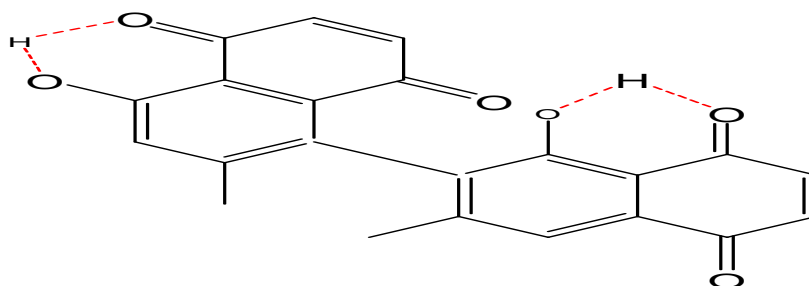


Figure-90: Présentation de liaison d'hydrogène dans le produit I

Comme il est conjugué au double liaison, ce proton peut migrer vers l'un ou l'autre des oxygènes.

Mécanisme de réarrangement :

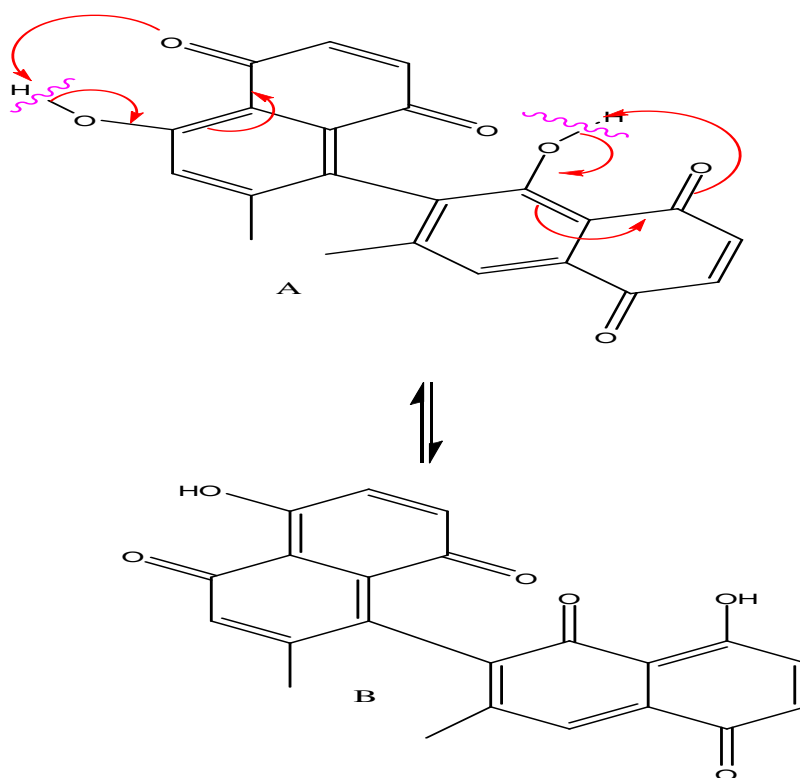


Figure-91 : Mécanisme de réarrangement du produit I

A partir du produit B, il y a toujours des liaisons hydrogènes d'où à l'équilibre c'est la tautométrie :

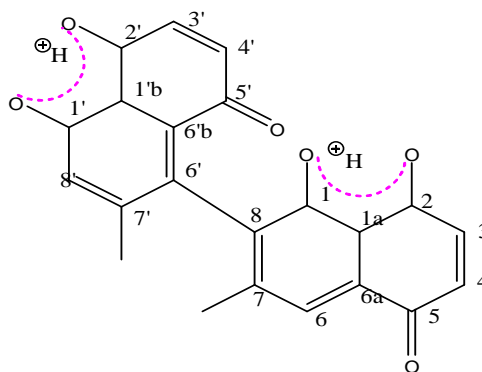


Figure-92 : Tautomérie du produit-I

Il y a aussi la présence d'une liaison σ entre les carbones en positions 8 et 6'. Elle permet une rotation permanente d'où la conformation, donc ce produit présente de trois stéréoisomères.

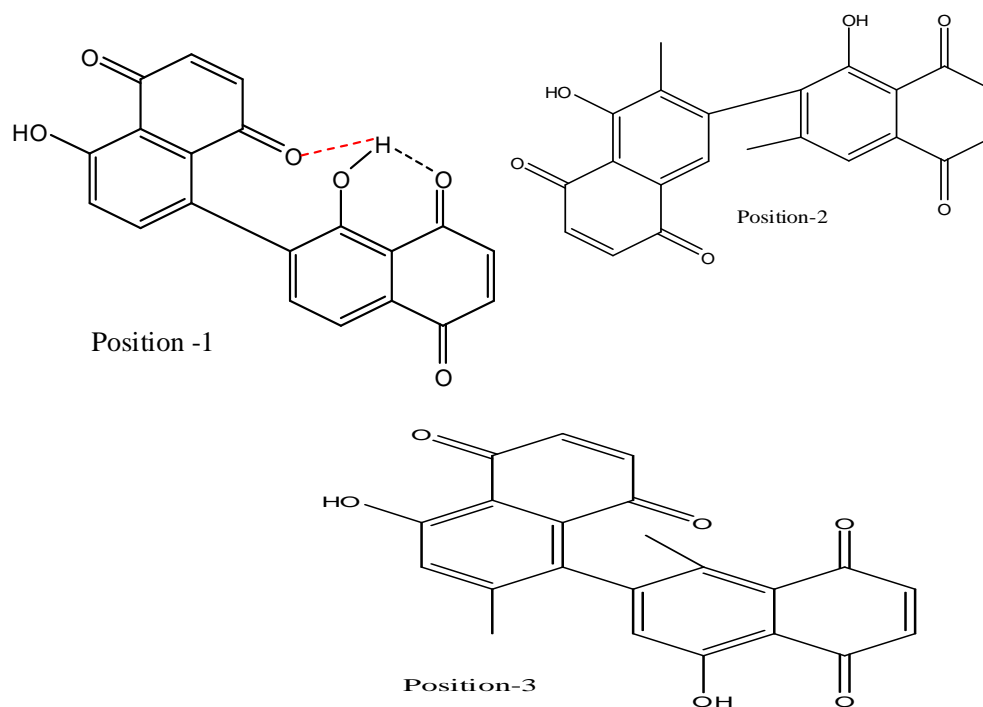


Figure-93 : Stéréochimie produit-I

Ce sont la liaison d'hydrogène qui stabilise cette forme mésomère

Entre ces trois stéréo-isomères c'est la première position qui est la plus stable, car tous les carbones dans cette molécule ont un type d'hybridation sp^2 . Donc tous les carbones sp^2 possèdent une géométrie plane et un angle des liaisons de 120° .

D'où la configuration exacte de la molécule du produit Rup-001.

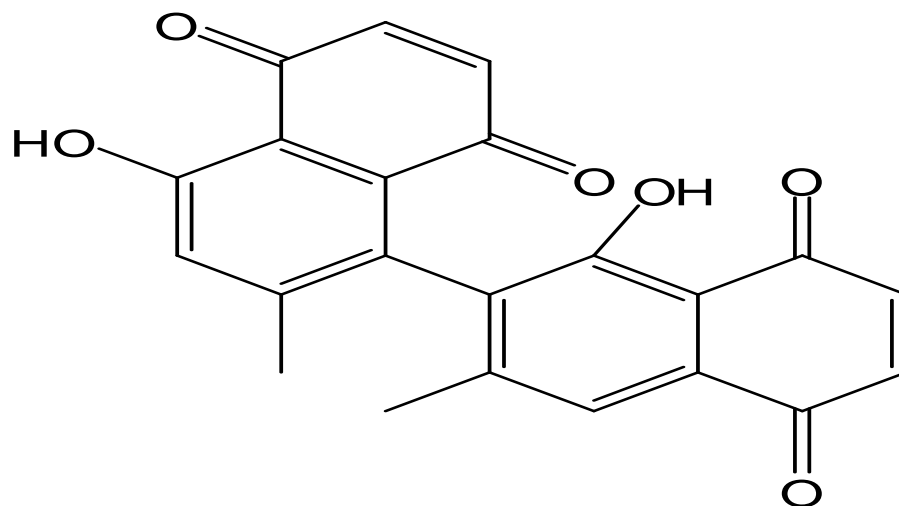


Figure-94 : Structure d'Isodiospyrine

Formule brute. **$C_{22}H_{14}O_6$**

Masse moléculaire 374

Nom systématique : Isodiospyrine

Nomenclature scientifique : 5.5 dihydroxy, 7.7'-dimethyl-binaphthy-Tetraone

Elle a été isolée pour la première fois dans le *Maba quercina* (Baillon.H.Per)

La deuxième molécule qu'on a isolée appartient également à la famille des quinones, cette molécule a été de la même propriété chimique que la première molécule isolée notée Rup - 001 (voir p-68). La deuxième molécule (**$C_{24}H_{18}O_7$**) est une molécule n'étant pas encore décrite, à notre connaissance, c'est un produit nouveau.

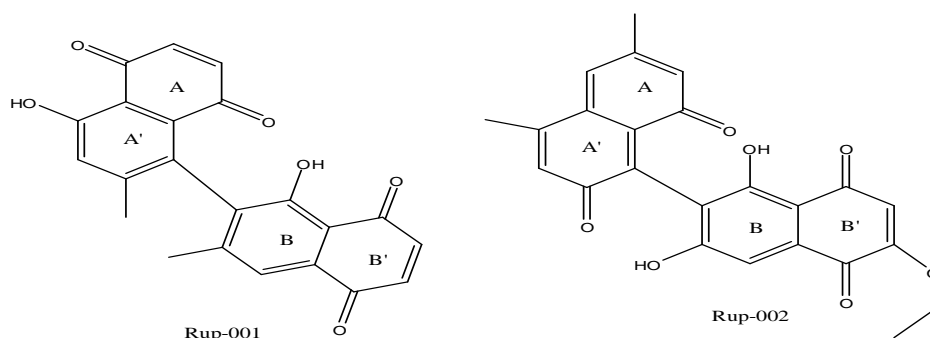


Figure-95 : La comparaison de la structure de Rup-001 et Rup-002

Les deux molécules sont de naphthoquinones, elles diffèrent entre elles par les positions des substituants et sur la structure elle-même :

Le produit Rup-001 ; les groupements carbonyles se trouvent dans le noyau A, B' et toujours en position *Para* c'est-à-dire en position 1, 4 par rapport à la règle de numérotation qui justifie la règle plus petit indice.

Les groupements (OH) sont portés sur les A', B et en position β par rapport aux groupements carbonyles.

Mais pour le produit Rup-002 les groupements carbonyles se trouvent dans le noyau A, A' et B'. Ils sont en position 1,7 pour le noyau AA' et en position *Para* pour le noyau B. L'hydroxyle est fixé sur le noyau B ; il y a des groupements éthoxy (O-CH₂-CH₃) qui se fixe sur le carbone n°6 dans le produit Rup-002.

En regardant la structure de Rup - 002 ci-dessus, on a trouvé que les deux groupements méthyles sont en position β par rapport aux groupements carbonyles.

Si l'on envisage le mécanisme de réarrangement alors le produit Rup-002 passe à l'état intermédiaire pour arriver à une structure stable (voir la figure-96 ci-dessous).

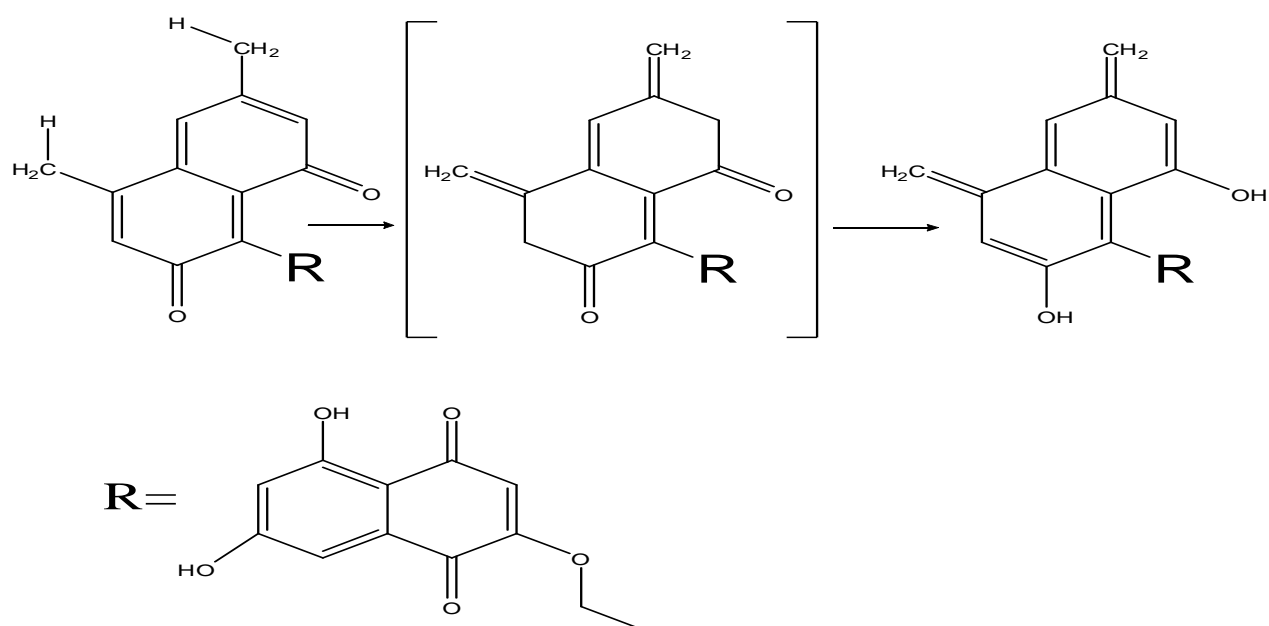


Figure-96 : Le mécanisme de réarrangement de Rup-002

La comparaison structurale entre le produit Rup-001 et Rup-002 a montré que ; le Rup-002 pourrait être un dérivé de la Rup-001. Les recherches bibliographiques concernant les dérivés de l'Isodiospyrine ont montré que la plupart de ceux qui portent des groupements éthoxyle, possèdent une activité antituberculeuse et antibactérienne. Or, Rup-002 a une structure semblable il possède une activité cytotoxique : $CI_{50} = 0.896 \mu\text{g/ml}$. A notre connaissance nous pensons Rup-002 est un produit nouveau non encore décrit dans la littérature

Les trois composés isolés de *Maba quercina Baillon H.Perr* ; sont très différents du point de vue de leurs structures :

Les deux premières molécules appartiennent à la classe des composés phénoliques de type naphthoquinones (Plumbaginées ou/et 7-méthyljuglone) substitué ; la troisième molécule appartient à la famille des alcaloïdes (voir la figure-97).

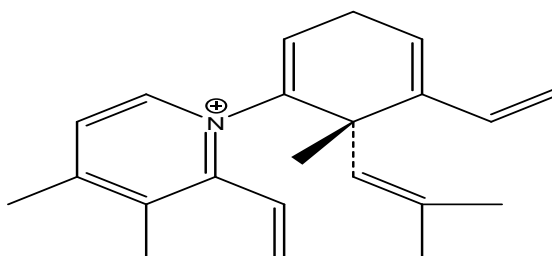


Figure-97 : Structure de produit Rup-003

Les tests screening phytochimique de *Maba quercina Baillon H.Perr* et les données bibliographique concernant la famille d'EBENACEE montrent que cette famille ne contient pas d'Alcaloïdes. C'est la première fois dans la famille et dans le genre qu'un alcaloïde a été isolé.

Dans cette structure il y a toujours une liaison σ qui se trouve entre la position 1 et 1', alors cette molécule possède de trois stéréoisomère.

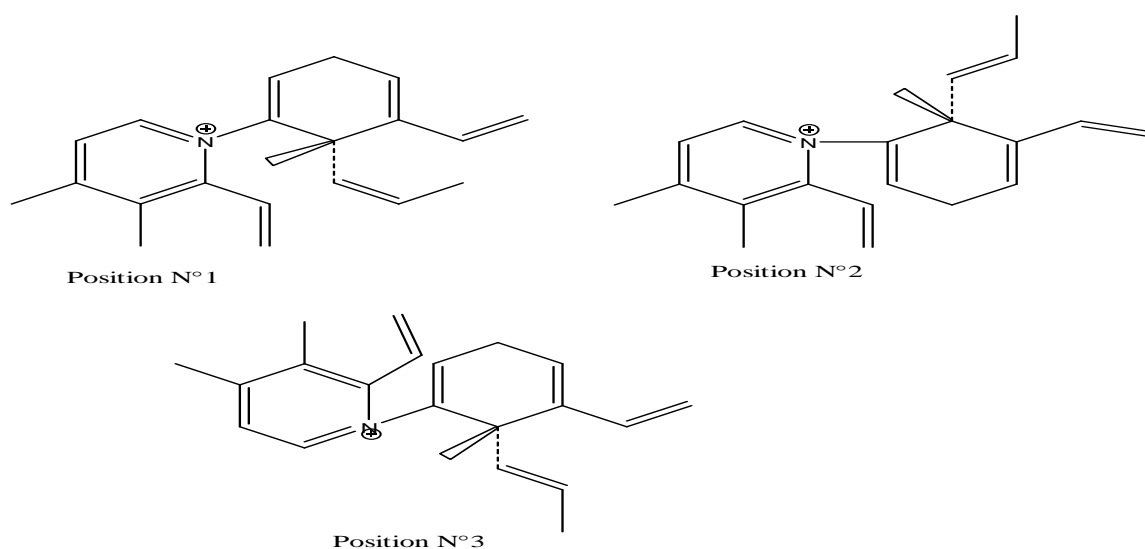


Figure-98 : Isomérisation de produit N°3

Si l'on regarde ce trois isomères du produit Rup-003 ; c'est la première position qui est la plus stable parce que le charge positif de sel d'ammonium est stabilisée par le fait que les des encombrements stériques deux groupements éthén-yl sont minimales par rapport aux autres encombrements stérique provoqué par les autres groupements des les positions 2et3

Les structures de trois molécules isolées dans la plante *Maba quercina Baillon H.Perr* sont représentées dans la figure-99 le suivant :

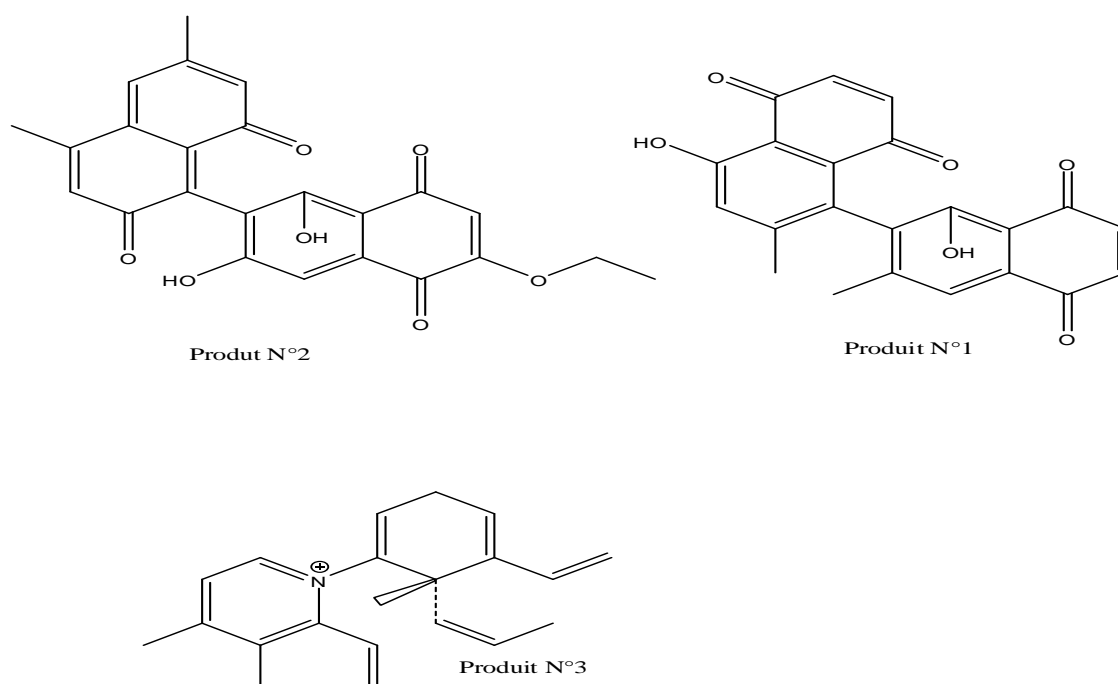


Figure-99 : Les trois molécules isolées

- Le premier produit : Isodiospyrine isolé première fois dans le Maba quercina Baillon H.Perr [93]
- Le deuxième produit : 6'éthoxy-1',3' dihydroxy-4,6, 6diméthyl-2-binaphthyl-2,5', 8,8'tetraone est probablement un nouveau produit.
- La troisième produit isolé 3, 4,4'triméthyl-2,3'diéthèn-yl-4propèn-yl, cyclohexadièn-yl, Pyridinium c'est le premier alcaloïde isolé dans la famille des Ebénacées

III.2.2- Partie Pharmacologique [94 à 96]

D'après les recherches bibliographiques sur Internet faites concernant de la molécule Isodiospyrine et ses dérivés appartenant à la famille des composés phénolique ; elles ont été des plusieurs importances sur sont cible de criblage biologique qui a été orienté suivant des tests préliminaire.

III.2.2-1- Sur le test d'inhibiteur de l'ADN topoisomerase-I

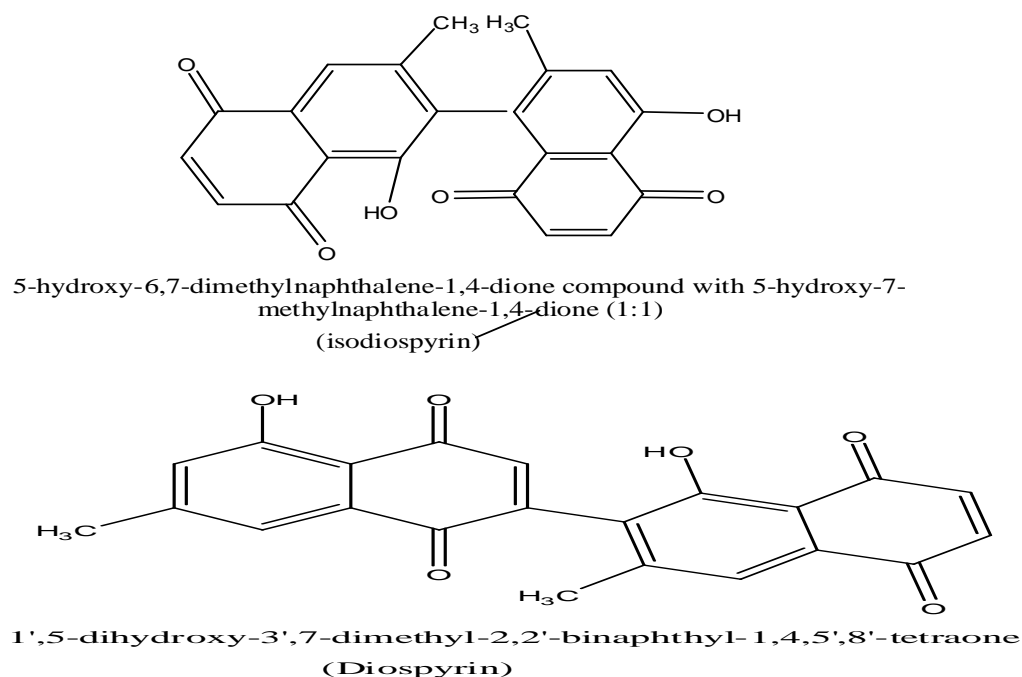


Figure-100 :L'Isodiospyrine et le Diospyrine isolé dans le *Dioscures de morrisiana*

Isodiospyrine et diospyrine sont des produits naturels isolés dans la plante *Dioscures de morrisiana*. L'activité cytotoxique d'objets exposés la différence du topoisomerase humain prototype I (camptothecine de poison de topo I), Isodiospyrine n'induit pas les complexes covalents du topo I-ADN. Cependant, l'Isodiospyrine contrarie la camptothecine induite, fendage d'ADN.

L'analyse obligatoire a indiqué que l'Isodiospyrine lie le topo I mais pas l'ADN. Ces résultats suggèrent que l'Isodiospyrine empêche le topo I par l'attache directe au topo I, qui limite l'accès du topo I au substrat d'ADN.

En outre, l'Isodiospyrine montre un effet inhibiteur fort sur l'activité de kinase du topo I vers le facteur d'épissage du facteur 2/alternat en l'absence d'ADN. Ces résultats ont des implications importantes sur le mode d'action cellulaire de naphthoquinone et de ses dérivés, c'est-à-dire ces inhibiteurs du topoisomerase I d'ADN de roman peuvent empêcher la relaxation d'ADN et les activités de kinase du topo I.

III.2.2.2- Sur le test antibactérien

Deux naphthazoles dimères, diospyrine et Isodiospyrine isolés à partir de la racine du *Diospyros de piscatoria* (Gurke), un ingrédient commun dans plusieurs médecines folkloriques, ont été montrés un large spectre d'activité antibactérienne.

La concentration inhibitrice minimum (MICs) du diospyrine contre *Streptococcus pyogenes* 12344 et streptocoque les pneumonies atcc 33400 se sont échelonnées de 1,56 à 50 mg/mL. Tandis que ceux contre des choleraesuis de salmonelles classent par sérotype des typhus (typhus de S.), atcc 6539 et les chelonae atcc 19977 de mycobactérie étaient entre 25 et 100 mg/mL. Isodiospyrine était plus en activité que son diospyrine racémique d'isomère.

III.2.2.3- Sur le test des antiprotozoaires

Les six dérivés de naphthalène, deux 2-naphthaldehydes, à savoir 4-hydroxy-3,5-dimethoxy-2-naphthaldehyde 1, 4-hydroxy-5-methoxy-2-naphthaldehyde 2, son isomère relatif des naphthoquinones généralement d'occurrence de 5-hydroxy-4-methoxy-2-naphthaldehyde 3 et trois, diospyrine 4, 80-hydroxyisodiospyrine 5 et le monomère simple, le plumbaginée 6. isolés dans les racines des *Diospyros de assimilis*, a été subi des activités antiprotozoaire dont les dérivés de naphthalène 1-5 ont été évalués pour leur activité antiprotozoaire in vitro contre les parasites protozoaires appartenant aux genres Trypanosome, Leishmania et Plasmodium. Parmi les composés examinés, le naphthaldéhyde 1 a montré l'inhibition modérée de la croissance des parasites, brucei de T., le cruzi de T., donovani de L. avec les valeurs IC₅₀ de 19,82, 12,28 et 38,78 IM et a montré la cytotoxicité vers les myoblastes squelettiques de rat (cellules L-6) avec IC₅₀ de 1M 174,94, alors que 2 et 3 s'avéraient comparativement moins en activité à 1. Les quinones dimères 4 et 5 ont montré la bonne activité contre le brucei de T et donovani de L. avec IC₅₀ 1,12 et 8,82 IM, de 12,94 et 16,66 IM respectivement.

III.2.3- Discussion générale

Dans un pays comme Madagascar où les médicaments distribués sont en grande partie importés et coûtent donc très chers, le recours aux plantes médicinales devient de plus en plus fréquent surtout pour les gens éloignés des centres sanitaires. Les vertus thérapeutiques des plantes sont connues de Malgaches depuis fort longtemps et transmises entre les générations. Jadis, ils utilisaient déjà ces plantes pour soigner les maladies.

L'utilisation des plantes est basée uniquement sur l'expérience. Autrefois la plupart des maladies étaient considérées comme des punitions divines pour des infractions aux interdits religieux, à des fautes envers la morale, à la négligence du culte des ancêtres et non en relation avec des causes naturelles.

Il n'y a pas de doses précis concernant les plantes utilisées par les tradipraticiens alors elles peuvent occasionner des effets secondaires ou et des toxicités.

Par conséquent, l'administration du remède était donc, soit précédé d'un rituel, soit suivi d'un interdit «fady». Alors les études phytochimiques (étude chimique et biologique) des plantes tiennent donc une place importante au niveau de la population locale pour éviter ces effets secondaires

D'après les études chimiques qui ont été faites sur la plante *Maba quercinia Baillon H.Perr* (Remeloky) utilisée par les populations de la région sud-ouest de Madagascar, les constituants majoritaires de cette plante sont des composés phénoliques à base de quinone.

Les tests biologiques in vitro sur la cellule P388 réalisés ont montré que les produits majoritaires sont responsables de l'activité. Toutefois, le test de toxicité aigue des différents extraits a été négatif. Ces résultats des études phytochimiques corroborent aux enquêtes ethnobotaniques réalisées au niveau des populations locales et ressemble au résultat des tests biologiques de topoisomerase-I et II effectués auparavant sur l'Isodiospyrine et son dimère.

CONCLUSION

L'étude chimique et biologique de trois molécules isolées de *Maba quercina* Baillon H.Perr a été entreprise au Laboratoire de Chimie Marine(IMRA) et au laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Chimie Organique Biologique à l'Université d'Antananarivo en collaboration avec ICSN/CNRS.

732g de la poudre d'écorce de racine de *Maba quercina* Baillon H.Perr ont été extraits par l'éther de pétrole pour éliminer la graisse végétale. La poudre dégraissée a été ensuite extraite par macération dans l'acétone. Après la filtration et évaporation à siccité : On a eu un extrait brut acétonique.

L'extrait brut est soumis aux différents tests des criblages biologiques et phytochimique pour savoir leurs activités et pour connaître les familles chimiques de leurs constituants.

Le criblage biologique de l'extrait brut a montré que le *Maba quercina* Baillon H.Perr a une activité antiplasmodiale sur le souche FC29 et une activité cytotoxique sur la cellule cancéreuse P388 avec des pourcentages d'inhibition respectivement 54.72% et 98.47% à la concentration 10µg/ml. Au vu de ces résultats préliminaire, l'activité cytotoxique semble meilleure par rapport à l'activité antiplasmodiale, ainsi la suite de l'étude de cette plante a été focalisée vers cette activité cytotoxique.

L'extrait brut est repris par une extraction par partage avec des solvants de polarité croissante (Hexane ; Chloroforme ; Acétate d'éthyle et acétone). Les différents extraits obtenus ont été testés sur la cellule cancéreuse P388.

L'extrait chloroformique a retenu notre attention pourcentage d'inhibition (95.47% à 5µg/ml)

Le fractionnement bioguidé de cet extrait, effectué sur une colonne chromatographique de gel de silice a donné six fractions. Les résultats de test montrent que la deuxième (Rup-0012) et la quatrième (Rup-0014) fractions s'avèrent les plus actives avec des pourcentage d'inhibition respectifs 82.26% et 95.76% à 0.5µg/ml.

La purification de la fraction Rup-0014 par des séries de chromatographie sur colonne de gel de silice et de chromatographie sur couche préparative ; a permis d'isoler un produit pur noté Rup-001. La même opération a été effectuée pour la deuxième fraction et a conduit aux produits purs notés : Rup-002 et Rup-003.

Tous les trois produits purs Rup-001, Rup-002 et Rup-003 ont été testés sur cellule cancéreuse P388 et les CI₅₀ ont été déterminées : CI₅₀**Rup-001**=0.0175 µg/ml ;

CI₅₀**Rup-002**= 0.896µg/ml et CI₅₀**Rup-003**=1.27µg/ml.

Les interprétations concertées des spectres de la RMN ¹H, ¹³C 1D 2D (COSY, HSQC, HMBC), avec des résolutions par logiciel TOPSPIN 3-10 et l'analyse par spectrométrie de masse mode TOFMS ES+. ont permis de déterminer et d'identifier les structures exactes de ces trois(3) produits isolés de *Maba quercina Baillon H.Perr* :

Le Rup-001 donne une formule brute C₂₂H₁₄O₆ avec de masse M=374, et il s'agit de l'Isodiospyrine c'est la 1^{ère} fois isolé dans le *Maba quercina Baillon H.Perr*.

Le Rup-002 correspond à C₂₄H₁₈O₇ avec de masse M=418 il s'agit d'un dérivé de l'Isodiospyrine est probablement d'un nouveau produit.

Le Rup-003 est constitué de la formule brut C₂₁H₂₆N⁺ avec de masse M=292 il s'agit d'un alcaloïde c'est la première fois de l'alcaloïde isolé de la famille des EBENACEE.

Par ailleurs, le test de criblage phytochimique a permis de déceler la présence de quinones et de flavonoïdes dans l'extrait brut de *Maba quercina Baillon H.Perr*. Le résultat de criblage phytochimique et les structures chimiques des produits isolés dans cette plante corrobore la description botanique de TAYLOR.M.S et la chimiotaxonomie de la famille des EBENACEES

Les résultats des tests biologiques de l'extrait de l'écorce de racine de *Maba quercina Baillon H.Perr* sont analogues aux résultats des tests concernant des propriétés biologique de la molécule a base de quinone.

Les résultats de nos recherches s'ajoutent à la liste des molécules anticancéreuses particulièrement des plantes de la région Sud Madagascar En concordance avec la signature de la nature, la structure naphtoquinonique de Rup-001et Rup-002 et la structure alcaloïdique de Rup-003 ayant des activités cytotoxiques seraient des grandes valeurs thérapeutiques, nous poursuivront nos recherches enfin de vérifier cette hypothèse.

REFERENCES

1-POTTIER.P : **1986**

« A la recherche des quelques nouvelles substances d'intérêt thérapeutique »
Actualité de la chimie p : 1-28

2-HOSTETTMAN.K : **2002**

« Tout savoir sur les pouvoirs des plantes, sources des médicaments »
Edition Favre S.A Lausanne.

3-GUERNARD.D ; GUERITTE-VOENGELEIN.F : **1990**

« A la recherche de nouvelle substance anticancéreuse »
La Recherche n° 26(7) p : 1927-1930

4-BRYSKIER.A ; LABRO.M.T : **1988**

Paludisme et Médicament. Arnette

5-KLAYMAN .D.L : **1985**

« Qinghaose (Artemisinin): an antimalarial drug from China »
Science vol 228 p: 1049-1055

6-ROTH.R.J; ACTON.N: **1989**

« A simple conversion of artemisinic acid into artemisinin »
Journal of Natural Product vol 55(5) p: 1183-1185

7-ANKHILA.A; THAKOR.R.S; POLPIS.P: **1987**

« Biosynthesis of Artemisinin »
Phytochemistry n° 26(7) p: 1927-1930

8-DRUMMOND.A.H; HUGHES.P.J: **1987**

« The interaction of natural product with cellular signalling mechanism »
Phytotherapy Research vol 1 p: 1-16

9-ENJALBERT.A: **1988**

« Recepteur membranaire et mécanisme transduction »
Médecine-Science numéro-spécial p : 40-48

10-VANDANA.S ; ARVIND.S.N ; KUMARJ.K ; GUPTA.M.M : **2005**

« Plant-based anticancer molecules »
Bioorganic and Medicinal Chemistry n° 13 p: 5892-5908

11-MANNJ: **1999**

Magic and medicine 2nd Ed. Oxford University –Press p: 2-18

12-POTIER .P ; SEVENET.T : **1991**

« A la recherche de nouveau médicament utilisable en chimiothérapie antitumorale »
Cahier de Cancérologie n°2(9) p : 423-489

- 13-WATT.J.M; BREYER .B : **1932**
« Medicinal and poisonous plants of South Africa »
Livingstone 2nd Ed
- 14-JAINS.K.K: **1952**
« Dictionary of the economic product of India »
Cosmo Publication, New Delhi, India vol III p : 136
- 15-GEORGE.W: **1991**
« Dictionary of India folk medicine and ethnobotany »
Deep Publication, New Delhi, India p: 76
- 16-CHHABRA.S.C; MAHUNNAH.R.L.A; MSHIUM.E.N : **1989**
« Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania-II Angiosperms »
(Capparidaceae to *Ebenaceae*)
Journal of Ethnopharmacology vol 25 p : 339-359
- 17- HEGNAUER.R :**1996**
« Chemotaxonomie der pflanzen vol-4 Birkhauser, Basel p-45»
- 18- WALLIS.J.C:**1973**
« Dictionary of the flowering plants and ferns, 8th ed»
Cambridge University p-397
- 19- TAYLOR.M. S: **1991**
« Flora ethnobotany, of Madagascar»
- 20- BÂTHIE .P
« Flore de Madagascar et de Comores»
- 21- SCHAT. G : **2001**
« Flore Générale des arbres de Madagascar »
- 22-COX.P.A ; BALICK.M : **1994**
« Médecine traditionnelle et Médicaments nouveaux »
Science n° 201 p : 42-48
- 23- CARRAZ.G ; CALOPE.J : **1988**
« Médicaments Anti-infectieux, Anti-cancéreux et Cancérogènes »
In Pharmacodynamie spéciale tome-4 p : 189-228

24-LANDRY.Y ; GIES.J.P :**1990**

« Pharmacology molecular »

Mesdi/McGraw HiLL 2nd Ed

25-DYMOCK.W ; WARDEN.C.J ; HOOPER.D :**1998**

« Pharmacographia India vol-II p : 368

26-WALL-MEN; WANI.M.C: 1991

« Antitumor and Topoisomerase-I »

Economic and Médical plant Recherche vol 5 p : 31-34

27-JACQUE.M ; SABLON.A : **1990**

« Mécanisme d'action des agent antitumoraux »

In Pharmacology molecular Mesdi/McGraw HiLL 3ndEd p : 295-322

28-SLICHENMYER.W.J ; VONHOFF.D.D :**1990**

« New natural product in cancer chemotherapy »

Journal of Clinical Pharmacology vol 30 p : 770-788

29-EYTHAGRTY.S.T ; MAUER.T.U ; MIY.A.T ; MOTO.D.T :**2000**

« Dissecting cellular processus using small molecule identification of camptochine »

Chemical Biological n° 7 p : 275-286

30- AHONDA.A.A ; BEDOY .A ; ZURITA.A : **1987**

« La girolline nouvelle substance antitumorale extraite de l'éponge »

Pseudaxinyssa Cantherella

C.R Acad. /Sci ; Paris 307(II) p : 145-148

31- SEVENET.T ; TTORTORA.C : **1994**

« Plantes, Molécules et Médicaments »

Dossiers documentaires ICNS/CNRS p : 28

32-SEVENET.T ; POTIER.P : **1986**

« Plantes tropicales, molécules d'intérêt biologique, Ellipticine et dérivés »

Courrier CNRS ; Image de la chimie Suppl. 56 p : 14-17

33-GUERITTE.F ; POULHE.A : **1983**

« Composés antitumoraux du groupe de vinblastine, dérivé de la nor-5 anhydrovinblastine »

Europeen Journal of Medical Chemistry therapeutique n°18(5) p : 419-424

34-OGWWA.T ; MIMURA.Y ; ISOWA.K : **1999**

« An antimicrotubule agent TZT-1027 does not induce neuropathologic which are detected »
after administration of vristine or pactitaxel in animal models

- 35-GELMONOK.A ; TOLCHER.A ; DIAB.A.R : **1999**
« Phase study of liposome vincristine »
Journal Clin-Onocol n° 17 p : 697-705
- 36-SARRIS.A.H ; HANGAEMEISTER.F ; ROMAGUERA.J : **2000**
« Liposomal vincristine in relapsed non hodgkin's lymphomas early results of an ongoing »
Trial. Ann Onocol n° 11 p : 171-174
- 37-WANI.M.C; TAYLOR.M.L : **1971**
« Plant antitumor agent-I, the isolation and structure of taxol novel antitumor agent and »
antitumor agent from taxus brevifolia
Journal of American Chemical Society n°93 p: 2325-2327
- 38-JORDAN.M.A; TOSO.R.J; THOWE.D: **1993**
« Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low »
concentration
Natural Product Acad/Sci n° 90 p 9552-9556
- 39-DERRY.W.B; WILSON .L; JORDAN.M.A: **1995**
« Substoichiometric binding of taxol suppress microtubule dynamic »
Biochemistry n°34 p: 2203-2211
- 40 -HARBONE. JB 1988
«Phytochemical: A guide to Modern technical of plant analysis»
- 41- RASTOGI.R.P; MEHRRTA.B.N:1990-**1992**
«In compendium of India medicinal plant C.D.R.I.L Publication and Information»
Dir-New-Delhi vol-1 p165, vol-2 p275, vol-3 p.253
- 42- BRUNETON. J : **1993**
«Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales 2 édition»
- 43- RAVN.H; NISHIBE.S; SASAHARA.M:**1990**
«Phenolic compounds»
Phytochemistry n°29 p 3627-3631
- 44-SENDELBACH. L.E: **1989**
«Review of the toxicity and carcinogenicity of anthraquinone derivative»
Toxicology n°56 p 227-240
- 45-WESTENDORF.J. **1990**
Mutation Rés-n°240 p 1-12

- 46- BINDER R.G; BENSON M.E; FLATH R.A:**1989**
«Eight -1-4 naphtoquinone»
Phytochemistry n°28 p 2799-280
- 47- CHARK.AM; JURGENS T.M; HUFFORD C.D: **1990**
«Antimicrobial activity of Jyglone»
Phytotherapy n°4 p11-14
- 48- GUPTA.M.B; NATH.R; BHARGAVA G.: **1981**
Indian Journal of Medical Research, n° 73 p 649.
- 49- MAITI.B.C; MUSGRAVE .O.C; SKOYLES.D: **1976**
Journal of the Chemical Society, Communications, 244.
- 50- GUPTA.R.K; MAHADEVAN.V: **1967**
Indian Journal of Pharmacology n°29 p289.
- 51- BROWA.G; THOMSON R.H:**1967**
Journal of the Chemical Society, p 4292
- 52- CHE.C.C; YU.H.Y; HUANG Y.L; ZHONGHUA Y.Z:**1992**
«Chemical Society n° 13(3) p172»
- 53- SIMONSEN.J.K:1962-1986
«The terpene» Cambridge University.
- 54- MARCY. J; BALUNAS A; DOUGLAS .K :**2005**
«Drug discovery from medicinal plants»
Minireview Life Sciences n° 78 p 431 – 441
- 55- TOMIRS.O : **2006**
«Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer Minireview Edited by Horst Feldmann (FEBS) Letters n° 580 p2903–2909.
- 56- AYAD, S. N: **2001**
«A new cytotoxic stigmastane steroid from *Pistia stratiotes*.
Pharmazie n°56 p 212-214.
- 57-DEROME oxford : **1987**
«A Modern N.M.R Chemistry Research:
- 58- SANDER.J.K.M; HUNTER. B.K **1987**
«Modern N.M.R spectrometry» Oxford University Press:
- 59- CHANDRAKUMAR; SUBRAMANIA.N.S. : **1987**
«Modern Technique in high Resolution F.T-N.M.R New-York Springer-Verlag».

- 60- KESSLER; GHRKE.H; MET GRISINGER C
«Two-Dimensional N.M.R spectroscopy »
Angew-Chem (Int-Ed, Engl) 27, 490-536
- 61- HOFFMANN.E; CHARRETTE.J; STROOBANT.V:**1999**
«Spectrométrie de Masse »: cours et exercices corrigés. Dunod.2^{ème} édition
- 62- CONSTANTIN.E ; TRALDI.P ; FAVRETTO.D ; SCHNELL.A :**1996**.
«Spectrométrie de Masse» : Principes et Applications, Technique et Documentation
Lavoisier.2^{ème} édition,
- 63- COLE.R.B: **1997**
«Electrospray ionization mass spectrometry: »
Fundamentals, instrumentation and application John Wiley and Sons
- 64- MARCH.R.E; TODDJ.F.J:**1995**
«Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry C.R.C»
- 65- HARRISON.G; ALEX.H:**1992**
«Chemical Ionization-Mass Spectrometry 2^{ème} edition»
- 66- Mc.LAFFERTY; TURECEK.F:1993
«Interpretation of Mass spectra».
University Science Books, 4^{ème} édition
- 67- CAPRIOLI.R.M **1990**
«Continuous-Flow Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. Wiley»
- 68- Mc LAFFERTY F.W:**1980** 3^{ème} Ed.
«Interpretation of mass spectra, Mill Valley»,
C.A University Scientific Books (1980)
- 69- BUDZIKIEVIZ.H; DJERASSI.C; WILLIAMS.D.H:**1967**
Mass spectrometry of organic compounds San Francisco Holden Day
- 70- BUDZIKIEVIZ.H; DJERASSI.C; WILLIAMS.D.H:**1964**
«Structure Elucidation of natural Products »
Mass spectrometry San Francisco Holden Day Vol. I et II
- 71-LALL.N ; WEIGANAND.O ; HUSSEIN.A.A ; MEYER.J.J.M : **2006**
« Antifungal activity of naphthoquinones and triterpene»
Isolated from the bark of *Euclea natalensis*
South African Journal of Botany

- 72- UPPULURI.V.M; ANITA.K.P; RAO.R.Y:1998
« Triterpene acids from *Diospyros melanoxylon* »
Biochemical Systematic ecology vol 26 p 941-942
- 73- YUEH.H.K; CHI-I CHANG; YAO.H.K:1997
« Triterpene from *Diospyros maritima*»
Phytochemistry, vol 46 p 1135-1137
- 74- PAUL.P.M; GEOFFREY.A; JOHN.M; PEZZUTO: 1998
« Pentacyclic triterpene and naphthoquinones from *Euclea divinorum*»
Phytochemistry, vol 47 p 311-313
- 75- TANGMONOU.J.G; MELI.A.L; KOMGUEM.J 2006
Crassiflorone, a new naphthoquinones from *Diospyros crassiflora*»
Tetrahedron letters vol 47 p 3067-3070
- 76- GANAPATY.S; THOMAS.P.S; MALLIKA.B.N; BALAJI.S 2005
« Dimeric naphthoquinones from *Diospyros discolour*»
Biochemical Systematic and ecology, Vol 33 p 313-315
- 77- RAFIULLAH.M; KHAN; EMIL.R 1999
« 6'', 8'-Bisdiosquinone from *Diospyros mafiensis*
Phytochemistry, vol 50 p 143-146
- 78- RAFIULLAH.M; KHAN; EMIL.R 1998
« A binaphthoquinone from *Diospyros greeniwayi* »
Phytochemistry, n° 49 p 2501-2503
- 79- PARICHAT.N; WOLFGANG.K; UWE.B:2006
« Novel 24-nor-2, 3-seco-, and 3, 24-dinor-2,4-seco-ursanetriterpene »
From Diospyros decanra: evidence for ring A biosynthetic transformation
Tetrahedron, vol 62 p: 5519-5526
- 80-ABRAHAM.A.W; BERNHARD.S; SIMON.G; KALEAB.A:2005
« In vitro 12(S)-HETE inhibitory activity of naphthoquinones isolated from the root bark of »
Euclea racemosa ssp. schimperi
Journal of Ethnopharmacology, vol 102 p: 191-196
- 81-ARZU.O ; AHMET.C ; BARBAROS.D ; SAADETTIN.G :2004
« A diphenolase from persimmon fruits *Diospyros kaki L.* »
Food Chemistry vol 85 p : 431-437
- 82-YEUEH.H.K; SHOU.L.H; CHLI.C: 1998
« A phenolic and an aliphatic lactone from *Diospyros maritima* »
Phytochemistry, Vol 49 p: 2505-2507

- 83-FRANK.G; CHARLES.J; JEROME.D; HOSTETTMAN.K:**1987**
« Cytotoxic naphthoquinones, molluscicidal saponins and flavonols from *Diospyros zombensis* »
Phytochemistry vol 26(9) p: 2501-2503
- 84-PARDHASARADHI.M; RAO.B.N:**1990**
« A naphthoquinone carboxylate from fungal infected *Diospyros montana* »
Phytochemistry vol 29(7) p: 2355-2356
- 85-AKELLA.V.B; SANKARAM; VANDDU.V; REDDY.N:**1984**
« Structure of ebenone, a possible biogenetic precursor of elliptinone »
From *Diospyros ebenum*
Phytochemistry vol 23(3) p : 2039-2042
- 86-JEFFREYS.J.A.D; MUHAMADB.Z; WATERMAN.P.G:**1983**
« 3'-methoxydiospyrin, a 7-methyljuglone dimer from *Diospyros mannii* »
Phytochemistry vol 23(8) p: 1832-1833
- 87- JEFFREYS.J.A.D; MUHAMADB.Z; WATERMAN.P.G; SHOU.M.Z:**1982**
« A new class of natural product: homologues of juglone bearing »
4-hydroxy-5-methyl-coumarin-3-ylunits from *Diospyros species*
Tetrahedron Letters vol 24(10) p 1085-1088
- 88- JEFFREYS.J.A.D; MUHAMADB.Z; WATERMAN.P.G; SHOU.M.Z:**1984**
« Naphthoquinones and triterpene from african *Diospyros species* »
Phytochemistry vol 23(5) p : 1481-1484
- 89-CHAUHAN .J.S; KUMARI.G:**1980**
« Nonadecan-7-ol-2-one an aliphatic ketol from *Diospyros peregrina* »
Phytochemistry vol 19(12) p: 2637-2638
- 90- PARDHASARADHI.M; KRISHNAKUMARI.L:**1979**
« Tetrahydrodiospyrin: a reduced binaphthoquinone from the bark of *Diospyros montana* »
Phytochemistry vol 18(4) p : 684-685
- 91-AUREA.C.C.M; LOPES.H.M; ISABEL.M.P; MARGARIDA: **1977**
« Naphthoquinone dimers and trimers from *Euclea natalensis* »
Phytochemistry vol 16(1) p: 117-120
- 92- AUREA.C.C.M; LOPES.H.M; ISABEL.M.P; MARGARIDA: **1976**
« Naphthoquinone dimers and trimers from *Euclea divinorum* »
Phytochemistry vol 15(5) p: 829
- 93-FATIANY.P.R; RABOZIJANA.B; RAHARISOLOLALAO.A; RAFATRO.H;
RATSIMAMANGA.U.S: **2007**
« Isodiospyrine isolé dans le Maba sp. Plante endémique Sud Madagascar »
GreenHealth n°10

- 94- CHUN.Y.T, CHIA .T.H, HSIANG.T.H, JIN-S.S, TZONG.Y.C, **2003**
« Isodiospyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor»
Biochemical Pharmacology n° 66 p 1981–1991
- 95- ADENIYIL B.A; FONG H.H.S; PEZZUTO J.M; LUYENGI. L; ODELOLA.H. A.**2000**
« Antibacterial Activity of Diospyrin, Isodiospyrin and Bisidiospyrin»
from the root of *Diospyros piscatoria*.
Phytother. Res.n° 14 p 112–117
- 96- GANAPATY.S; STEVE T.P; GLORIA.K; PETER.G; WASTERMAN; RETO.B **2006**
« Antiprotozoal and cytotoxic naphthalene derivatives from *Diospyros assimilis*»
Phytochemistry n° 67 p 1950

ANNEX. I. FIGURE DES MATERIELS



Figure-32 : Extraction



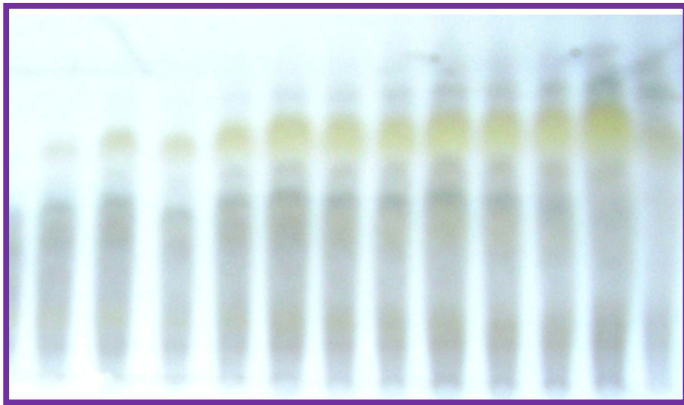
Figure-33: Filtration



Figure-34 : Evaporation



Figure-35 : colonne chromatographie



**Figure-41 : Analyse chromatographie
sur couche mince**



Figure- 37 : CCP pour faire la purification



Figure-40 : Lampe UV_{254/365}

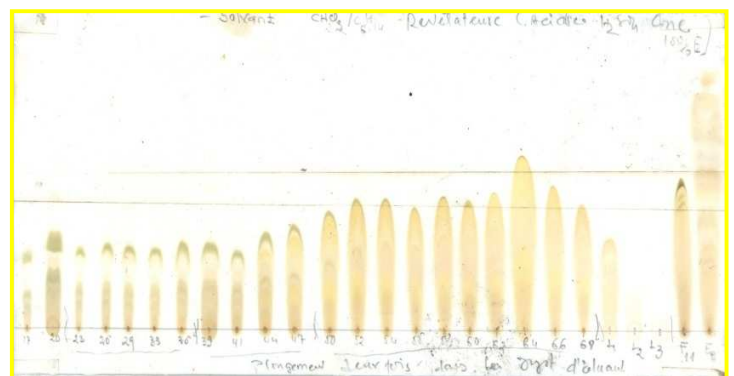


Figure-36 : CCM pour rechercher le système du solvant d'élution



Figure-38 : HLPC analytique



Figure-42 Extraction par partage
liquide- liquide



Spectrométrie de masse à temps de vol(TOF)



Appareil de la R.M.N à 600MHZ



ANNEXE - II : PREPATION DES REACTIF POUR FAIRE DES TESTS DES SCREENING PHYTOCHIMIQUES

Test des triterpénoïdes et des stéroïdes

Les réactifs communs de ces deux terpènes sont :

- le réactif de **Liebermann Burchard** test de coloration
- la solution saturée de chloroformique
de chlorure d'Antimoine test de fluorescence

On prélève quelque milligramme d'extrait brut

On additionne 10 ml de dichloromethane, puis on agite pendant 10 mn. La solution obtenue est séchée sur Na₂SO₄, ensuite filtrée. Le filtrat est réparti dans 6 tubes à essais propres et secs.

Tube n°1	Témoin
Tube n°2	<p>Test de Liebermann Burchard</p> <p>Additionner 3 à 4 gouttes de d'anhydride acétique 3 à 4 gouttes de H₂SO₄ cc</p> <p>Si la coloration est :</p> <p>Pourpre Présence de triterpènes Violette ou bleue vert Présence de stéroïdes</p>
Tube n°3	<p>Test de Salkowski</p> <p>Incliner le tube de 45°</p> <p>Ajouter 1 ml H₂SO₄ cc</p> <p>Si l'anneau de séparation est :</p> <p>Rouge Présence de stéroïdes insaturés</p>
Tube n°4	<p>Test de Badjet Kedde</p> <p>Additionner Quelques graines d'acide picrique</p> <p>Si la coloration est :</p> <p>Rouge Présence de stéroïdes lactoniques</p>
Tube n°5	<p>Test de Keller-Killiani</p> <p>Additionner Quelques gouttes de FeCl₃ 10% Quelques gouttes d'acide acétique glacial</p> <p>Incliner le tube de 45°</p> <p>Si l'anneau de séparation</p> <p>Rouge pourpre Présence de desoxy-2-sucre</p>
Tube n°6	<p>Additionner un peu de solution chloroformique saturée de chlorure d'antimoine SbCl₃</p> <p>S'il y a apparition d'une fluorescence</p> <p>Bleue Présence de triterpènes Jaune Présence de stéroïdes</p>

Test des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

L'extrait sec est dissous dans l'éthanol 80%, puis filtré. Le filtrat est partagé dans 5 tubes à essais propres et secs :

Tube n°1	Témoin						
Tube n°2	<p>Test de Wilstater</p> <p>Additionner 0,5 ml de HCl cc Quelques tournures de Mg</p> <p>Si la coloration est :</p> <table><tr><td>Rouge</td><td>Présence de flavones</td></tr><tr><td>Rouge à pourpre</td><td>Présence de flavonols</td></tr><tr><td>Rouge violacé</td><td>Présence de flavanones et flavanols</td></tr></table>	Rouge	Présence de flavones	Rouge à pourpre	Présence de flavonols	Rouge violacé	Présence de flavanones et flavanols
Rouge	Présence de flavones						
Rouge à pourpre	Présence de flavonols						
Rouge violacé	Présence de flavanones et flavanols						
Tube n°3	<p>Test de Wilstater modifié</p> <p>Additionner 0,5 ml de HCl cc Quelques tournures de Mg</p> <p>Après dissolution de Mg 1 ml d'eau et 1 ml d'alcool isoamylique</p> <p>Si la coloration est : de la phase supérieur est</p> <table><tr><td>Rouge</td><td>Présence de flavones</td></tr><tr><td>Pourpre</td><td>Présence de flavonols</td></tr></table>	Rouge	Présence de flavones	Pourpre	Présence de flavonols		
Rouge	Présence de flavones						
Pourpre	Présence de flavonols						
Tube n°4	<p>Test de Bate-Smith</p> <p>Additionner 0,5 ml de HCl cc Chauffer pendant 30 mn au bain marie Laisser refroidir</p> <p>Si la coloration est</p> <table><tr><td>Rouge violacé</td><td>Présence de Leucoanthocyanes</td></tr></table>	Rouge violacé	Présence de Leucoanthocyanes				
Rouge violacé	Présence de Leucoanthocyanes						
Tube n°5	<p>Additionner 0,5 ml de HCl cc froid</p> <p>Si la coloration est</p> <table><tr><td>Rouge</td><td>Présence d'anthocyanes</td></tr></table>	Rouge	Présence d'anthocyanes				
Rouge	Présence d'anthocyanes						

Test des alcaloïdes

Dissoudre l'extrait brut dans 10 ml HCl 2%

Filtrer la solution et le filtrat est divisé dans quatre tubes à essais

Tube n°1	Témoin	
Tube n°2	Ajouter Si la précipitation est Blanc jaunâtre	5 gouttes de réactif de Mayer Présence d'alcaloïdes
Tube n°3	Ajouter Si la précipitation est Orange	5 gouttes de réactif de Dragendorff Présence d'alcaloïdes
Tube n°4	Ajouter Si la précipitation est Rouge orangé	5 gouttes de réactif de Wagner Présence d'alcaloïdes

Test des coumarines

On dissout le résidu brut avec de l'eau chaude. On filtre la solution aqueuse et le filtrat est réparti dans deux tubes à essais :

Tube n°1	Témoin	
Tube n°2	Additionner Observer à la lumière U.V ($\lambda=254$ nm ou 365 nm) S'il y a fluorescence Bleu	0,5 ml NH_4OH 10% Présence de coumarine

Test des quinones

L'extrait brut est dissout 15 ml dans l'eau distillée puis filtré.

Extraire le filtrat avec un mélange d'éther-chloroforme 3/1 (v/v) dans une ampoule à décanner.

Ajouter 3 ml NH_4OH au $\frac{1}{2}$ ensuite agiter.

Observer le changement de la coloration de la phase alcaline (inférieur) à l'œil nu

Si la coloration est :

Rouge

Présence de quinone

Test des tanins

On peut caractériser les tanins par le test de coloration et la précipitation.

On dilue l'extrait sec dans 10 ml d'eau distillée. On filtre sur coton et le filtrat ainsi obtenu est divisé dans 4 tubes à essais

Tube n°1 Témoin

Tube n°2

Ajouter 4 à 5 gouttes de gélatine 1%

S'il y a apparition de

Précipitation

Présence de polyphénol

Tube n°3

Ajouter 4 à 5 gouttes de gélatine 1%

4 à 5 gouttes de NaCl 10%

S'il y a apparition de

Précipitation

Présence de tanins

Tube n°4

Ajouter 4 à 5 gouttes de gélatine 1%

4 à 5 gouttes de NaCl 10%

4 à 5 gouttes de FeCl₃ 10% dans MeOH

Si la coloration est

Bleuâtre

Présence de tanins galliques

Verdâtre

Présence de tanins catéchiques

Test des saponines

Les saponines sont détectées par l'indice de mousse et par le test d'hémolytique.

Dissoudre quelques milligrammes d'extrait brut avec de l'eau distillée dans un tube à essai et agiter vigoureusement pendant 30 secondes

Placer le tube verticalement pendant 30 mn.

Mesurer la hauteur de mousse persistante aux temps t=0 mn et t=30 mn

Si la hauteur est supérieur à

3 cm

Présence de saponines

Nom : **FATIANY**

Prénoms : Pierre Ruphin

Directeur de Thèse de Doctorat : P.r Amélie RAHARISOLOLALAO **Professeur Titulaire** à la Faculté des Sciences à l'Université d'Antananarivo **Email**: amelie_raharisololalao@yahoo.fr ,

« ETUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE TROIS MOLECULES CYTOTOXIQUES »

DE *Maba quercina* BAILLON H PERR (EBENACEE)

Nombre des figures : **100**

Nombre des schémas : **30**

Nombre des tableaux : **23**

Références : **96**

Laboratoire de rattachement : Laboratoire de **CHIMIE MARINE** dirigé par Madame le Docteur

Voahangy RAMANANDRAIBE à l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA).

Contact: Tél. **+261 325 205 568** Email: fpierreruphin@yahoo.fr

ABSTRACT: In a country as Madagascar where the distributed drugs cost rather expensive in its majority, one has recourse to the plants i.e. traditional medicine, and this is more frequent in the moved back places where there is almost no structure of center, care and health. It is starting from the information given by the tradithérapeutes that we chose to study plants whose *Maba*. The result of the preliminary tests on the cell P 388 was shown one activated inhibiting of 99,85 % for a concentration at 10mg/ml of extract.

The bio-guided fractionation method was applied to identify and isolate the bioactive compound. Various techniques of chromatography (TLC, column and preparative chromatography) were used starting from the acétonic extract of the **stem bark** of *Maba quercina*. And to the isolation of Isodiospyrin and both compounds.

Their chemical structures were determined by NMR 1D, 2D and mass spectrometry. Compounds 1-3 exhibited in vitro cytotoxic activity again the cell P388 with IC50 values ranging from 0.017 to 1.27µg/ml, and the test of acute toxicity carried out *in vivo* on mice of stock swiss showed an absence of toxicity

Keywords: *Phenolic compound, N.M. R (1D and 2D), COSY, HSQC, HMBC, TOFSM-ES, Maba quercina (Baillon H.Perr), EBENACEE, cytotoxic*

RESUME : Le *Maba quercina* Baillon H.Perr connu sous le vernaculaire Remeloky (Antandroy, Mahafaly, Tagnalagna) ou Maintifototse (Sakalava) est utilisé en médecine traditionnelle Malgache pour soigner de la plaie ou/et paludisme.

L'extrait brut de *Maba quercina* Baillon H.Perr, a montré une activité cytotoxique sur la cellule P388 de l'ordre de 98.47% d'inhibition et sur une souche de plasmodium falciparum FC29 de l'ordre de 54.92% d'inhibition de concentration à 10µg/ml.

Les produits purs qu'ont été isolés de *Maba quercina* H.Perr a montré une activité cytotoxique significative avec une CI₅₀ qui est comprise entre de 0.017 à 1.867 µg/ml sur les cellules cancéreuses P388. et le test de toxicité aigue effectué *in vivo* sur des souris de souche swiss a montré une absence de toxicité

Le fractionnement bioguidé a permis d'isoler notamment une molécule majoritaire qui est responsable de l'activité cytotoxique et deux autres molécules.

L'interprétation concertée des spectres de la R.M.N 1D du proton et des spectres (2D) à savoir COSY, HSQC, HMBC a permis d'élucider les structures des produits isolés appartenant à la famille des composés phénoliques. Les séquences des molécules ont été vérifiées par la spectrométrie de masse de mode TOFSM-ES

Mots clés : *Maba quercina (Baillon H.Perr), EBENACEE, cytotoxique, composés phénoliques, R.M.N (1D et 2D), COSY, HSQC, HMBC, TOFSM-ES*

