



**HAL**  
open science

# Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae)

Sylvie Morel

► **To cite this version:**

Sylvie Morel. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Angers, 2011. Français. NNT: . tel-00671071

**HAL Id: tel-00671071**

**<https://theses.hal.science/tel-00671071>**

Submitted on 16 Feb 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université d'Angers

Année 2011

N° d'ordre 1031

# Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae)

**Thèse de doctorat**

spécialité : Chimie des Biomolécules : Synthèse, Structure et Réactivité  
Ecole doctorale VENAM

Présentée et soutenue publiquement le 9 juin 2011  
à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé  
d'ANGERS

par Sylvie MOREL

Devant le jury ci-dessous :

**Mme Angèle Lengo MAMBU**

Maître de conférences, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris

Rapporteur

**M. Marc LITAUDON**

Ingénieur de Recherche, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif/Yvette

Rapporteur

**M. François BAILLEUL**

Professeur, Université de Lille II

Examinateur

**M. Bruno LAPIED**

Professeur, Université d'Angers

Examinateur

**Directeur de thèse : M. Pascal RICHOMME**

Professeur, Université d'Angers

**Co-encadrante : Melle Anne LANDREAU**

Maître de conférences, Université d'Angers

**Laboratoire Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux**  
(SONAS, UPRES EA 921, IFR 149)

UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé  
16, boulevard Daviers-49100 ANGERS

# Sommaire

<b><u>TABLE DES FIGURES.....</u></b>	<b><u>10</u></b>
<b><u>TABLE DES TABLEAUX .....</u></b>	<b><u>14</u></b>
<b><u>ABRÉVIATIONS.....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>GLOSSAIRE .....</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b><u>INTRODUCTION.....</u></b>	<b><u>21</u></b>
<b><u>PARTIE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b>1. CLASSIFICATION ET DESCRIPTION DE <i>DERRIS FERRUGINEA</i> .....</b>	<b>24</b>
1.1. LA FAMILLE DES FABACEAE .....	25
1.1.1. Caractères botaniques de la famille .....	25
1.1.1.1. Appareil végétatif.....	26
1.1.1.2. Appareil reproducteur .....	26
1.1.2. Phylogénie .....	27
1.2. LA SOUS-FAMILLE DES PAPILIONOIDEAE.....	27
1.2.1. Caractères botaniques .....	27
1.2.2. Phylogénie .....	28
1.3. LA TRIBU DES MILLETIEAE .....	29
1.4. LE GENRE <i>DERRIS</i> .....	30
1.5. L'ESPÈCE <i>DERRIS FERRUGINEA</i> .....	32
1.5.1. Description.....	32
1.5.2. Étude microscopique des poudres des feuilles, des tiges et des fruits .....	35

1.5.3. Distribution .....	38
1.5.4. Utilisations .....	38
<b>2. GÉNÉRALITÉS SUR LES FLAVONOÏDES .....</b>	<b>39</b>
2.1. DISTRIBUTION ET BIOSYNTHÈSE .....	39
2.1.1. Les flavonoides <i>stricto sensu</i> .....	39
2.1.1.1. Distribution .....	39
2.1.1.2. Biosynthèse .....	40
2.1.1.3. Les flavanones .....	42
2.1.2. Les isoflavonoïdes .....	43
2.1.2.1. Distribution .....	43
2.1.2.2. Biosynthèse .....	44
2.1.2.3. Les roténoïdes .....	46
2.1.3. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés .....	47
2.1.3.1. Biosynthèse .....	50
2.1.3.2. Modifications de la chaîne prénylée .....	51
2.2. FONCTIONS DES FLAVONOÏDES POUR LES PLANTES .....	52
2.2.1. Rôle de protection contre le stress environnemental .....	52
2.2.2. Rôles comme composés de défense .....	53
2.2.2.1. Interactions plantes-microorganismes .....	53
2.2.2.2. Interactions plantes-plantes .....	55
2.2.2.3. Interactions plantes-pathogènes .....	55
2.2.2.4. Interactions plantes-insectes et animaux .....	55
2.2.3. Rôle dans la fertilité des plantes .....	56
2.3. ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES .....	56
2.3.1. Activités antimicrobiennes .....	57
2.3.1.1. Activité antibactérienne .....	57
2.3.1.2. Activité antifongique .....	59
2.3.1.3. Activité antivirale .....	59
2.3.2. Activités antiparasitaires .....	60
2.3.2.1. <i>Plasmodium</i> sp. ....	60
2.3.2.2. <i>Leishmania</i> sp. ....	61
2.3.2.3. <i>Trypanosoma</i> sp. ....	62
2.3.3. Activités estrogéniques et anti-estrogéniques .....	63
2.3.3.1. Les récepteurs aux estrogènes .....	63
2.3.3.2. Principales sources de phytoestrogènes .....	63
2.3.3.3. Activités des phytoestrogènes .....	64
2.3.4. Potentiel antioxydant .....	66
2.3.5. Activité antiproliférative et anticarcinogénique .....	68
2.3.5.1. Inhibition métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes .....	69
2.3.5.2. Agents supprimeurs de la carcinogénèse .....	70
2.3.5.3. Action sur la résistance des cellules tumorales .....	70
2.3.5.4. Action sur la vascularisation des tumeurs .....	71
2.3.6. Activité anti-inflammatoire .....	72
2.3.7. Activité sur les maladies neuro-dégénératives .....	73
2.3.8. Activité sur le système cardio-vasculaire .....	73
2.3.9. Activité insecticide .....	74
2.3.9.1. La roténone .....	74
2.3.9.2. Autres flavonoïdes insecticides .....	76
2.3.10. Les neurones du système nerveux central de la blatte <i>Periplaneta americana</i> : modèle d'étude de l'activité des composés insecticides .....	76
<b>3. ETUDES PHYTOCHIMIQUES DU GENRE <i>DERRIS</i> .....</b>	<b>82</b>
3.1. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES .....	82
3.1.1. Les acides phénols .....	83
3.1.2. Les stilbènes .....	83
3.1.3. Flavonoïdes <i>stricto sensu</i> .....	83

3.1.3.1.	Chalcones et dérivés .....	84
3.1.3.2.	Aurones et dérivés.....	85
3.1.3.3.	Flavones et flavonols .....	85
3.1.3.4.	Flavanones et flavanonols.....	87
3.1.3.5.	Flavanes .....	89
3.1.4.	Les isoflavonoïdes .....	89
3.1.4.1.	Les isoflavones .....	89
3.1.4.2.	Arylcoumarines.....	93
3.1.4.3.	Roténoïdes .....	94
3.1.4.4.	Ptérocarpanes.....	97
3.1.4.5.	Coumarochromones .....	98
3.2.	TERPÉNOÏDES.....	98
3.3.	COMPOSÉS AZOTÉS .....	99
3.4.	AUTRES COMPOSÉS .....	100

## **PARTIE II : RESULTATS ET DISCUSSION..... 112**

<b>I.</b>	<b>ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE <i>DERRIS FERRUGINEA</i>.....</b>	<b>113</b>
1.1.	OBTENTION DES EXTRAITS.....	113
1.2.	PURIFICATION DES COMPOSÉS .....	113
1.2.1.	Méthodologie générale des purifications .....	113
1.2.2.	Isolement des composés à partir des extraits de tiges.....	115
1.2.2.1.	Extrait cyclohexanique DfS1 .....	115
1.2.2.2.	Extrait dichlorométhanique DfS2 .....	116
1.2.2.3.	Extrait par l'acétate d'éthyle DfS3.....	117
1.2.2.4.	Extrait méthanolique DfS4 .....	118
1.2.3.	Isolement des composés à partir des extraits de feuilles.....	119
1.2.3.1.	Extrait cyclohexanique DfL1 .....	119
1.2.3.2.	Extrait dichlorométhanique DfL2.....	120
1.2.3.3.	Extrait par l'acétate d'éthyle DfL3 .....	121
1.2.3.4.	Extrait méthanolique DfL4 .....	121
1.3.	ANALYSE STRUCTURALE DES COMPOSÉS .....	122
1.3.1.	Eléments d'identification.....	122
1.3.1.1.	Les isoflavones .....	122
1.3.1.2.	Les flavanones .....	123
1.3.1.3.	Prénylations .....	124
1.3.2.	Analyse structurale des flavanones isolées .....	127
1.3.2.1.	Composé <b>DF1</b> .....	127
1.3.2.2.	Composé <b>DF2</b> .....	130
1.3.2.3.	Composé <b>DF3</b> .....	131
1.3.2.4.	Composé <b>DF4</b> .....	133
1.3.2.5.	Composé <b>DF5</b> .....	134
1.3.2.6.	Composé <b>DF6</b> .....	135
1.3.2.7.	Composé <b>DF7</b> .....	136
1.3.3.	Analyse structurale des isoflavonoïdes isolés.....	137
1.3.3.1.	Composé <b>DF8</b> .....	137
1.3.3.2.	Composé <b>DF9</b> .....	137
1.3.3.3.	Composé <b>DF10</b> .....	138
1.3.3.4.	Composé <b>DF11</b> .....	139
1.3.3.5.	Composé <b>DF12</b> .....	139
1.3.4.	Analyse structurale des autres composés isolés.....	140
1.3.4.1.	Composé <b>DF13</b> .....	140
1.3.4.2.	Composé <b>DF14</b> .....	141
1.3.4.3.	Composés <b>DF15 - DF16</b> et <b>DF17</b> .....	142

1.4.	ACTIVITÉS BIOLOGIQUES RÉPERTORIÉES DES COMPOSÉS ISOLÉS .....	142
1.5.	ALTERNATIVES D'OBTENTION DE DEUX COMPOSÉS D'INTÉRÊT .....	146
1.5.1.	Purification du composé DF1 par FCPC.....	146
1.5.2.	Synthèse du composé DF12.....	149
1.5.2.1.	Approche rétrosynthétique.....	149
1.5.2.2.	Synthèse de la lupiwightéone.....	150
1.5.2.3.	Réaction de photo-oxydation ou réaction de Shenk.....	154
1.5.2.4.	Obtention du composé DF12 .....	155
1.6.	BILAN DE L'ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE.....	156
<b>2.</b>	<b>EVALUATION BIOLOGIQUE DE <i>DERRIS FERRUGINEA</i>.....</b>	<b>159</b>
2.1.	EVALUATION BIOLOGIQUE DES EXTRAITS .....	159
2.1.1.	Activités antibactérienne et antifongique.....	160
2.1.2.	Activité antiparasitaire .....	161
2.1.2.1.	Activité antiplasmodiale .....	161
2.1.2.2.	Activité antileishmanienne.....	161
2.1.3.	Cytotoxicité sur cellules MRC-5 .....	161
2.1.4.	Toxicité sur <i>Artemia salina</i> .....	162
2.1.5.	Activité sur cellules microgliales.....	164
2.1.5.1.	Test de viabilité cellulaire par la méthode au MTT sur la lignée BV-2.....	165
2.1.5.2.	Stimulation et quantification de la production de NO par les cellules.....	166
2.1.5.3.	Activité sur l'expression de l'iNOS, de NF-κB et de cytokines pro-inflammatoires ....	167
2.1.5.4.	Activité sur la libération d'IL-6 par les cellules stimulées par LPS/IFN-γ.....	168
2.1.6.	Potentiel antioxydant .....	168
2.1.7.	Activité sur la formation des produits terminaux de glycation (AGEs).....	169
2.2.	EVALUATION BIOLOGIQUE DES COMPOSÉS ISOLÉS.....	169
2.2.1.	Activité antimicrobienne.....	170
2.2.2.	Activité antiparasitaire .....	171
2.2.3.	Cytotoxicité.....	171
2.2.4.	Activité sur cellules microgliales.....	171
2.2.4.1.	Viabilité sur la lignée de cellules microgliales BV-2.....	171
2.2.4.2.	Inhibition de la production de NO .....	172
2.2.4.3.	Activité sur l'expression d'iNOS, NF-KB et de cytokines proinflammatoires.....	174
2.2.4.4.	Activité sur la libération d'IL-6 par les cellules stimulées par LPS/IFN-γ.....	175
2.2.5.	Potentiel antioxydant .....	176
2.2.6.	Activité sur la formation des produits terminaux de glycation.....	176
2.2.7.	Activité de DF1 sur l'angiogénèse.....	178
2.2.8.	Etude préliminaire de l'effet du composé DF5 sur l'activité électrique du DUM neurone.....	178
2.3.	BILAN DE L'ÉVALUATION BIOLOGIQUE.....	182
<b>3.</b>	<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>187</b>

## **PARTIE III : PARTIE EXPERIMENTALE .....** **189**

<b>1.</b>	<b>MATÉRIEL VÉGÉTAL .....</b>	<b>190</b>
<b>2.</b>	<b>MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION .....</b>	<b>190</b>
2.1.	EXTRACTION .....	190
2.2.	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE MOYENNE PRESSION (CLMP).....	190
2.3.	CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE CENTRIFUGE (CPC).....	190
2.4.	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE SUR COLONNE OUVERTE (CO) .....	193
2.5.	CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE FLASH .....	193
2.6.	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE PRÉPARATIVE.....	194
<b>3.</b>	<b>PURIFICATION DES COMPOSÉS .....</b>	<b>194</b>
3.1.	ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT CYCLOHEXANIQUE DES TIGES DfS1 .....	194
3.1.1.	Purification de la fraction DfS1-6.....	194

3.1.2.	Purification de la fraction DfS1-9.....	195
3.1.3.	Purification de la fraction DfS1-11.....	195
3.2.	ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT DICHLOROMÉTHANIQUE DES TIGES DFS2.....	195
3.2.1.	Purification de la fraction DfS2-8.....	196
3.2.2.	Purification de la fraction DfS2-9.....	196
3.2.3.	Purification de la fraction DfS2-15.....	196
3.3.	ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT PAR L'ACÉTATE D'ÉTHYLE DES TIGES DFS3.....	196
3.3.1.	Purification de la fraction DfS3-4.....	196
3.3.2.	Purification de la fraction DfS3-5.....	197
3.3.3.	Purification de la fraction DfS3-11.....	197
3.4.	ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DES TIGES DFS4.....	197
3.4.1.	Purification de la fraction DfS4-2.....	197
3.5.	ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT CYCLOHEXANIQUE DES FEUILLES DfL1.....	198
3.5.1.	Purification de la fraction DfL1-5.....	198
3.5.2.	Purification de la fraction DfL1-6.....	199
3.5.3.	Purification de la fraction DfL1-7.....	199
3.6.	ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT DICHLOROMÉTHANIQUE DES FEUILLES DfL2.....	199
3.6.1.	Purification de la fraction DfL2-2.....	200
3.6.2.	Purification de la fraction DfL2-3.....	200
3.6.3.	Purification de la fraction DfL2-4.....	200
3.7.	ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'EXTRAIT PAR L'ACÉTATE D'ÉTHYLE DES FEUILLES DfL3.....	200
3.7.1.	Purification de la fraction DfL3-1.....	200
3.7.2.	Purification de la fraction DfL3-1-2.....	201
<b>4.</b>	<b>ALTERNATIVES D'OBTENTION DE DEUX COMPOSÉS D'INTÉRÊT.....</b>	<b>201</b>
4.1.	PURIFICATION DU COMPOSÉ DF1 PAR FCPC.....	201
4.1.1.	Sélection du système de solvants.....	201
4.1.2.	FCPC de l'extrait DfS1.....	202
4.2.	SYNTHÈSE DU COMPOSÉ DF12.....	202
<b>5.</b>	<b>MÉTHODES D'ANALYSE.....</b>	<b>206</b>
5.1.	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).....	206
5.2.	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ANALYTIQUE (CLHP).....	206
5.2.1.	Chaîne CLHP.....	206
5.2.2.	Colonnes et gradients utilisés.....	206
5.3.	SPECTROPHOTOMÉTRIE ULTRAVIOLET (UV).....	207
5.4.	POLARIMÉTRIE.....	207
5.5.	SPECTROMÉTRIE DE MASSE (SM).....	207
5.6.	SPECTROSCOPIE PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (RMN).....	207
<b>6.</b>	<b>EVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES.....</b>	<b>208</b>
6.1.	ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE.....	208
6.2.	ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE.....	209
6.2.1.	Souches bactériennes testées.....	209
6.2.2.	Préparation des extraits.....	210
6.2.3.	Préparation des inoculum bactériens.....	210
6.3.	ACTIVITÉ ANTIPLASMODIALE.....	210
6.4.	ACTIVITÉ ANTILEISHMANIENNE.....	211
6.4.1.	Culture des souches de Leishmanies.....	211
6.4.2.	Détermination de l'activité antileishmanie au stade promastigote.....	211
6.5.	EVALUATION DE LA CYTOTOXICITÉ.....	212
6.6.	EVALUATION DE LA TOXICITÉ AIGUE SUR <i>ARTEMIA SALINA</i> .....	212
6.7.	ACTIVITÉ SUR CELLULES MICROGLIALES.....	213
6.7.1.	Lignée microgliale BV-2.....	213
6.7.2.	Évaluation de la toxicité des molécules par la méthode au MTT.....	213
6.7.3.	Extraction et quantification des protéines totales par la méthode BCA.....	214
6.7.4.	Stimulation des cellules et quantification de la production de NO.....	215
6.7.5.	Étude de l'expression des gènes de l'iNOS et de cytokines proinflammatoires.....	216

6.7.6.	Étude de la libération IL-6 par la méthode ELISA .....	217
6.8.	POTENTIEL ANTIOXYDANT.....	218
6.8.1.	Test sur DPPH: activité anti-radicalaire.....	218
6.8.2.	Test ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity).....	218
6.9.	ACTIVITÉ SUR LA FORMATION DES PRODUITS TERMINAUX DE GLYCATION .....	219
6.9.1.	Principe .....	219
6.9.2.	Protocole .....	220
6.10.	ACTIVITÉ SUR L' ANGIOGÉNÈSE <i>EX VIVO</i> .....	220
6.11.	ACTIVITÉ INSECTICIDE .....	221
6.11.1.	Liquides physiologiques et réactifs utilisés .....	221
6.11.2.	Dissociation des DUM neurones efférents.....	222
6.11.3.	Patch-clamp .....	222

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....229**

**ANNEXES..... 246**

## Table des figures

Figure 1: Classification phylogénétique de <i>Derris ferruginea</i> .....	24
Figure 2 : Feuilles et fruits de <i>D. ferruginea</i> . Planche d'herbier.....	34
Figure 4 : Poudre des fruits de <i>D. ferruginea</i> .....	36
Figure 5 : Poudre des tiges de <i>D. ferruginea</i> .....	37
Figure 6 : Distribution de l'espèce <i>D. ferruginea</i> .....	38
Figure 7 : Structures de base des flavonoïdes <i>stricto sensu</i> .....	39
Figure 8 : Biosynthèse des dérivés cinnamiques .....	40
Figure 9 : Formation de chalcone à partir des acides cinnamiques .....	41
Figure 10 : Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes .....	42
Figure 11: Structures des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes .....	43
Figure 12 : Biosynthèse des isoflavonoïdes .....	45
Figure 13 : Quelques types de prénylations rencontrées dans le genre <i>Derris</i> .....	48
Figure 14: Formation des prénylations cycliques.....	49
Figure 15 : Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse.....	69
Figure 16 : Structure de l'ASA404.....	72
Figure 17 : Représentation schématique du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse de la blatte <i>P. americana</i> et microphotographie d'un corps cellulaire .....	78
Figure 18 : Modèle hypothétique de l'activité électrique de type pacemaker d'un DUM neurone .....	81
Figure 19 : Structure de la roténone .....	82
Figure 20 : Acides phénols répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	83
Figure 21 : Stilbène répertorié dans le genre <i>Derris</i> .....	83
Figure 22 : Chalcones et dérivés répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	85
Figure 23 : Aurones et dérivés répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	85
Figure 24 : Flavones et flavanols répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	87
Figure 25 : Flavanones et flavanonols répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	89
Figure 26 : Flavane répertoriée dans le genre <i>Derris</i> .....	89
Figure 27 : Isoflavones répertoriées dans le genre <i>Derris</i> .....	93
Figure 28 : 3-arylcoumarines répertoriées dans le genre <i>Derris</i> .....	94
Figure 29 : Roténoïdes répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	97
Figure 30 : Ptérocarpanes répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	97
Figure 31 : Coumaronochromones répertoriées dans le genre <i>Derris</i> .....	98
Figure 32 : Composés terpénoïdes répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	99
Figure 33 : Composés azotés répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	99

Figure 34 : Autres composés répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	100
Figure 35 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS1.....	115
Figure 36 : Chromatogramme de DfS1 à 254 nm .....	115
Figure 37 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS2.....	116
Figure 38 : Chromatogramme de l'extrait DfS2 à 254 nm.....	116
Figure 40 : Chromatogramme de DfS3 à 254 nm .....	117
Figure 41 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS4.....	118
Figure 42 : Chromatogramme de DfS4 à 254 nm .....	118
Figure 43 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfL1 .....	119
Figure 44 : Chromatogramme de DfL1 à 254 nm .....	119
Figure 45 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfL2 .....	120
Figure 46 : Chromatogramme de DfL2 à 254 nm .....	120
Figure 47 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfL3 .....	121
Figure 48 : Chromatogramme de DfL3 à 254 nm .....	121
Figure 49 : Squelettes des principaux composés isolés.....	122
Figure 50 : Différents types de prénylations rencontrées dans les composés isolés .....	122
Figure 51 : Exemple de spectre UV d'une isoflavone.....	123
Figure 52 : Signaux du système ABX correspondant aux protons en position 2 et 3 d'une flavanone .....	124
Figure 53 : Spectre UV de la naringénine .....	124
Figure 54 : Exemple de spectre UV d'une flavanone comprenant une prénylation de type pyrane .....	125
Figure 55 : Exemple de spectre UV d'une flavanone comprenant uniquement des prénylations de type 3,3-DMA .....	125
Figure 56 : Exemple de spectre UV d'une flavanone comprenant une prénylation de type furane .....	126
Figure 57 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF1</b> .....	128
Figure 58 : Spectre HMBC du composé <b>DF1</b> .....	129
Figure 59 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé <b>DF2</b> .....	131
Figure 60 : Principales corrélations HMBC et NOESY observées pour le composé <b>DF3</b> .....	132
Figure 61 : Corrélations HMBC du composé <b>DF4</b> .....	134
Figure 62 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé <b>DF5</b> .....	135
Figure 63 : Structures proposées du composé <b>DF6</b> .....	136
Figure 64 : Structures proposées du composé <b>DF7</b> .....	137
Figure 65 : Structure du composé <b>DF8</b> .....	137
Figure 66 : Structure du composé <b>DF9</b> .....	138
Figure 67 : Structure du composé <b>DF10</b> .....	139
Figure 68 : Structure du composé <b>DF11</b> .....	139
Figure 69 : Principales corrélations observées en HMBC pour le composé <b>DF12</b> .....	140
Figure 70 : Structure du composé <b>DF13</b> .....	141
Figure 71 : Structure du composé <b>DF14</b> .....	142
Figure 72 : Principales activités biologiques attribuées à la génistéine .....	144
Figure 73 : Chromatogrammes CLHP à 254 nm de l'extrait brut DfS1, de la phase supérieure et de la phase inférieure de l'extrait DfS1. ....	147
Figure 74 : Chromatogrammes CLHP à 254 nm, de DF1 obtenu par purification solide/liquide classique et par FCPC. ....	148
Figure 75 : Chromatogramme à 254 nm de la purification par FCPC .....	148
Figure 76 : Préparation de DF12 à partir de la génistéine : Approche rétrosynthétique ...	149
Figure 77 : Synthèse de la lupiwightéone <i>via</i> un <i>para</i> -réarrangement de Claisen-Cope ..	150
Figure 78 : Préparation du composé disilylé Df8a' .....	151

Figure 79 : Réarrangement de Claisen et réarrangement de Claisen-Cope.....	153
Figure 80 : Réarrangement sur le composé DF8b.....	153
Figure 81 : Séquence de photo-oxydation/réduction appliquée au composé DF8d.....	154
Figure 82 : Photo-oxydation d'un ortho-allylphénol.....	154
Figure 83 : Condensation intramoléculaire du composé DF8g.....	155
Figure 84: Toxicité des extrais vis-à-vis d' <i>Artemia salina</i> du même âge (24 h).....	162
Figure 85 : Toxicité des extraits de <i>D. ferruginea</i> sur le modèle BV-2.....	165
Figure 86: Production de nitrites par les cellules BV-2 après stimulation et traitement par les extraits de feuilles de <i>D. ferruginea</i> .....	166
Figure 87 : Expression des gènes de l'iNOS et du NF-κB, ainsi que des différentes cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) par RT-qPCR.....	167
Figure 89 : Toxicité des molécules sur le modèle BV-2.....	172
Figure 90 : Production de nitrites par les cellules BV-2 après stimulation et traitement par les molécules.....	173
Figure 91 : Expression des gènes de l'iNOS et du NF-κB, ainsi que des différentes cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) par RT-qPCR, après stimulation et traitement par les molécules de <i>D. ferruginea</i> .....	174
Figure 93 : Evaluation de DF1 sur l'angiogénèse.....	178
Figure 94: Enregistrement de l'activité électrique spontanée d'un DUM neurone isolé ..	179
Figure 95 : Effets du composé <b>DF5</b> sur l'activité électrique spontanée DUM neurones de <i>P. americana</i> .....	180
Figure 96 : Représentation de la gamme Arizona.....	191
Figure 97: RMN- <sup>1</sup> H du composé <b>DF12</b> isolé à partir de <i>D. ferruginea</i> et obtenu par synthèse.....	205
Figure 98: Réaction mise en jeu lors du test de viabilité cellulaire au MTT.....	213
Figure 99 : Schéma expérimental de stimulation et de traitement par les molécules ou les extraits à tester.....	215
Figure 100 : Différentes configurations possibles pouvant être utilisées dans la technique du patch-clamp.....	223
Figure 101 : Représentation de l'installation de patch-clamp.....	225
Figure 102 : Structure et spectre UV du composé <b>DF1</b> .....	247
Figure 103 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF1</b> .....	248
Figure 104 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF1</b> .....	248
Figure 105 : Structure et spectre UV du composé <b>DF2</b> .....	249
Figure 106 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF2</b> .....	250
Figure 107 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF2</b> .....	250
Figure 108 : Structure et spectre UV du composé <b>DF3</b> .....	251
Figure 109 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF3</b> .....	252
Figure 110 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF3</b> .....	252
Figure 111 : Structure et spectre UV du composé <b>DF4</b> .....	253
Figure 112 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF4</b> .....	254
Figure 113 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF4</b> .....	254
Figure 114 : Structure et spectre UV du composé <b>DF5</b> .....	255
Figure 115 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF5</b> .....	256
Figure 116 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF5</b> .....	256
Figure 117 : Spectre UV et structures proposées du composé <b>DF6</b> .....	257
Figure 118 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF6</b> .....	258
Figure 120 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF7</b> .....	259
Figure 121 : Structure et spectre UV du composé <b>DF8</b> .....	260
Figure 122 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF8</b> .....	260

Figure 123 : Structure et spectre UV du composé <b>DF9</b> .....	261
Figure 124 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF9</b> .....	262
Figure 125 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF9</b> .....	262
Figure 126 : Structure et spectre UV du composé <b>DF10</b> .....	263
Figure 127 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF10</b> .....	263
Figure 128 : Structure et spectre UV du composé <b>DF11</b> .....	264
Figure 129 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF11</b> .....	264
Figure 130 : Structure et spectre UV du composé <b>DF12</b> .....	265
Figure 131 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF12</b> .....	266
Figure 132 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF12</b> .....	266
Figure 133 : Structure et spectre UV du composé <b>DF13</b> .....	267
Figure 134 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF13</b> .....	268
Figure 135 : Spectre RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF13</b> .....	268
Figure 136 : Structure et spectre UV du composé <b>DF14</b> .....	269
Figure 137 : Spectre RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF14</b> .....	269

## Table des tableaux

Tableau 1 : Familles de plantes dans lesquelles ont été isolés des isoflavonoïdes.....	44
Tableau 2 : Composés répertoriés dans le genre <i>Derris</i> .....	101
Tableau 3 : Masses obtenues pour chaque extrait de tiges et de feuilles.....	113
Tableau 4 : Essais d'alkylation du composé disilylé DF8a' .....	152
Tableau 5 : Activités biologiques des extraits bruts de <i>D. ferruginea</i> .....	160
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des activités biologiques d'une série de flavanones prénylées.....	170
Tableau 7 : Potentiel antioxydant et activité sur la formation des AGEs des composés testés .....	177
Tableau 8 : Composition des systèmes de la gamme Arizona.....	191
Tableau 9 : Composition des solutions utilisées lors de la dissociation des DUM neurones .....	221
Tableau 10 : Composition de la solution intra-pipette utilisée lors des expériences de patch- clamp .....	221
Tableau 11 : RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C et RMN-bidimensionnelles de <b>DF1</b> .....	247
Tableau 12 : Déplacements chimiques en RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C du composé <b>DF2</b> .....	249
Tableau 13 : Déplacements chimiques en RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF3</b> .....	251
Tableau 14 : RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C et RMN-2D de <b>DF4</b> .....	253
Tableau 15: RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C et RMN-2D de <b>DF5</b> .....	255
Tableau 16 : RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C et RMN-2D de <b>DF6</b> .....	257
Tableau 17 : RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF7</b> .....	259
Tableau 19: RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF9</b> .....	261
Tableau 20: RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF10</b> .....	263
Tableau 21: RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF11</b> .....	264
Tableau 22: RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C et RMN-2D de <b>DF12</b> .....	265
Tableau 23: RMN- <sup>1</sup> H et RMN- <sup>13</sup> C de <b>DF13</b> .....	267
Tableau 24 : RMN- <sup>1</sup> H de <b>DF14</b> .....	269

# Abréviations

**2HIS** : 2-hydroxyisoflavanone synthase  
**2HID** : 2-hydroxyisoflavanone déhydratase  
**4CL** : 4-coumaroyl CoA ligase  
**AAPH** : 2,2'-azobis(2-méthylpropionamide) dihydrochloride  
**ABCG2** : ATP-binding cassette sous-famille G type 2  
**AcOEt** : acétate d'éthyle  
**ADNc** : acide désoxyribonucléique complémentaire  
**AGEs** : advanced glycation endproducts (produits terminaux de glycation)  
**APG** : Angiosperm Phylogeny Group  
**ARN** : acide ribonucléique  
**BCA** : acide bicinchonique  
**BHE** : barrière hémato-encéphalique  
**BV-2** : lignée de cellules microgliales murines  
**BSA** : bovine serum albumin  
**C4H** : cinnamate-4-hydroxylase  
**CCM** : chromatographie sur couche mince  
**CHI** : chalcone isomérase  
**CHS** : chalcone synthase  
**CHU** : centre hospitalo-universitaire  
**CI<sub>50</sub>** : concentration inhibitrice à 50%  
**CLHP** : chromatographie liquide haute performance  
**CLMP** : chromatographie liquide moyenne pression  
**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité  
**CMI<sub>90</sub>** : concentration minimale inhibitrice à 90%  
**CNRS** : centre national de la recherche scientifique  
**CO** : chromatographie sur colonne ouverte  
**COSY** : correlated spectroscopy  
**CYP** : cytochrome P450  
**CPC** : chromatographie de partage centrifuge  
**DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane  
**DEAD** : diéthylazodicarboxylate  
**DfS1** : extrait cyclohexanique des tiges  
**DfS2** : extrait dichlorométhanique des tiges  
**DfS3** : extrait par l'acétate d'éthyle des tiges

**DfS4** : extrait méthanolique des tiges  
**DfL1** : extrait cyclohexanique des feuilles  
**DfL2** : extrait dichlorométhanique des feuilles  
**DfL3** : extrait par l'acétate d'éthyle des feuilles  
**DfL4** : extrait méthanolique des feuilles  
**DIAD** : diisopropylazodicarboxylate  
**DMA** : diméthylallyl  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**DMF** : diméthylformamide  
**DMSO** : diméthylsulfoxyde  
**DO** : densité optique  
**DPPH** : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle  
**DUM** : dorsal unpaired median  
**EA** : équipe d'accueil  
**EDTA** : acide éthylène diamine tétra-acétique  
**EGTA** : acide éthylène glycol tétra-acétique  
**ELISA** : enzyme linked immunosorbent assay  
**ER** : récepteurs aux estrogènes  
**ESI** : electrospray ionisation  
**FCPC** : fast centrifugal partition chromatography  
**FHT** : flavanone-3-hydroxylase  
**FI** : facteur d'induction  
**FLS** : flavonol-synthase  
**FSI** et **FSII** : flavone synthases  
**G4DT** : glycinol-4- diméthylallyltransférase  
**GPP** : géranyl diphosphate  
**GST** : glutathion S-transférase  
**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique  
**HL-60** : lignée de cellules leucémique  
**HMBC** : heteronuclear multiple-bond correlation  
**HMQC** : heteronuclear multiple-quantum correlation  
**HRP** : peroxydase de raifort  
**HVA**: high voltage activation  
**IAG** : inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase  
**ICam** : courant calcique maintenu  
**ICat** : courant calcique transitoire  
**ICar** : courant calcique résiduel  
**ICl<sub>Ca</sub>** : courant Cl<sup>-</sup> sensible aux ions calcium, activé par hyperpolarisation  
**IFN $\gamma$**  : interféron  $\gamma$   
**IFR** : institut fédératif de recherche  
**IFS** : isoflavone synthase  
**IK<sub>Ca</sub>** : courant potassique activé par Ca<sup>2+</sup>  
**IK<sub>A</sub>** : courant potassique de type A  
**IK<sub>IR</sub>** : courant potassique activé par hyperpolarisation  
**IK<sub>DR</sub>** : courant potassique à rectification sortante retardée  
**IK<sub>Na</sub>** : courant potassique activé par Na<sup>2+</sup>  
**IKr** : courant potassique de repos  
**IL** : interleukine  
**INa** : courant sodique entrant  
**INa/Ca** : courant mixte calcico-sodique

**INar** : courant sodique résiduel  
**iNOS** : inductible nitric oxide synthase  
**INSERM** : institut national de la santé et de la recherche médicale  
**INRA** : institut national de la recherche agronomique  
**IFN** : interféron  
**IOMT** : isoflavone-*O*-méthyltransférase  
**IRLC** : inverted repeat lacking clade  
**K** : coefficient de partage  
**LDL** : low density lipoprotein  
**LOXs** : lipoxygénases  
**LPS** : lipopolysaccharide  
**LVA** : low voltage activation  
**matK** : gène chloroplastique (mégakaryocyte-associated tyrosine kinase)  
**MDR** : multi-drug resistance  
**MeOH**: méthanol  
**MH** : muller hinton  
**MRP** : multidrug resistance protein  
**M/LVA** : mid/low voltage activation  
**MPLC** : chromatographie liquide en moyenne pression  
**MRC-5** : cellules pulmonaires de fœtus humain  
**MS** : mass spectrometry  
**MTT** : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium)  
**NADH** : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH** : forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NF- $\kappa$ B** : nuclear factor  $\kappa$ B  
**N.D.** : non déterminé  
**NOESY** : Nuclear overhauser effect spectroscopy  
**N.S.** : non significatif  
**N8DT** : naringéine-8-diméthylallyltransférase  
**ORAC** : Oxygen Radical Antioxidant Capacity  
**PA** : potentiel d'action  
**PAL** : phenylalanine ammonia lyase  
**PBS** : Phosphate-Buffered Saline  
**PDE** : phosphodiesterase  
**PEP** : Phosphoénolpyruvate  
**P-gp** : glycoprotéine P  
**PLC $\gamma$ 1** : phosphatidylinositol phospholipase C, isoforme  $\gamma$   
**PPh3** : triphénylphosphine  
**PTK** : protéine kinase  
***rbcL***: gène chloroplastique codant pour la sous-unité de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase  
**RMN**: résonance magnétique nucléaire  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RT-qPCR** : real-time quantitative polymerase chain reaction  
**SAMR** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline  
**SEM** : erreur standard de la moyenne  
**SM** : spectométrie de masse  
**SVF** : sérum de veau fœtal  
**TA** : température ambiante  
**TBDMS** : *tert*-butyldiméthylsilyle

**TE** : Trolox équivalent  
**TEA** : triéthylamine  
**THS** : traitements hormonaux substitutifs  
**THF** : tétrahydrofurane  
**TMB** : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine  
**TMS** : Tétraméthylsilane  
**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor- $\alpha$   
**TOF** : time of flight  
**TPP** : *méso*-tétraphénylporphine  
***trnL-F*** : région chloroplastique du gène *trnL*  
**UV** : ultra-violet  
**UGT** : uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransférase  
**UMR** : unité mixte de recherche  
**UPRES** : Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur  
**UI** : unités internationales  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine

# Glossaire

**Acuminé** : qui se termine en pointe fine.

**Allélopathique** : qualifie un organisme, micro-organisme ou un végétal qui inhibe la croissance d'autre organisme par libération de composés dans l'environnement.

**Cal** : tissu végétal de cicatrisation qui se forme en réaction à une blessure.

**Carènes** : pétales inférieurs des fabacées (ou légumineuses) plus ou moins soudés entre eux en forme de carène de navire. Également saillie longitudinale à section triangulaire ou à angle marqué que présente le dos de certains organes (organe caréné).

**Diadelphie** (androcée): adjectif désignant une fleur dont les étamines sont assemblées en deux groupes.

**Dialypétales** : à pétales libres

**Dorsifixe** se dit d'une étamine lorsque le filet est fixé dans le dos de l'anthère.

**Exalbuminée** : qualifie une graine dont l'embryon a digéré tout l'abdomen au cours de sa maturation. Les réserves sont alors stockées dans les cotylédons.

**Funicule** : filament reliant l'ovule ou la graine à la paroi de l'ovaire.

**Hile** : cicatrice que porte une graine au point où elle était attachée à la plante.

**matK** : gène chloroplastique codant pour une tyrosine kinase

**Monophylétique** : se dit d'une groupe d'organismes dérivant, soit les uns des autres, soit d'un ancêtre commun, n'ayant donc jamais constitué qu'un seul phylum. En conséquence, le groupe possède en commun un ou plusieurs caractères (morphologiques, physiologiques, écologiques, éthologiques...). Par extension, se dit de deux ou plusieurs séquences d'ADN qui dérivent d'une seule séquence d'ADN ancestrale commune.

**Paralogues** : qualifie des gènes issus de plusieurs copies ayant évolué indépendamment, s'oppose à gènes orthologues.

**Préfloraison imbriquée** : se dit d'une préfloraison dans laquelle, au sein d'un même verticille, une seule pièce est recouvrante, les autres étant emboîtées les unes dans les autres.

**Préfloraison vexillaire (=descendante)** : se dit d'une préfloraison dans laquelle l'étendard recouvre les ailes, qui elles-mêmes recouvrent la carène.

**Pseudoracème** : inflorescence en forme de grappe avec des fleurs multiples à l'aisselle de chaque bractée.

**Pseudopanicule** : type d'inflorescence correspondant à une grappe composée de grappes, avec deux ou plusieurs fleurs sur chaque pédoncule. L'ensemble prend une forme pyramidale ou conique. Les fleurs s'épanouissent en partant de l'axe.

***rbcL*** : gène chloroplastique qui code pour la grande sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase (Rubisco). Cette enzyme clé de la photosynthèse, qui fixe le CO<sub>2</sub>, est de loin la protéine la plus abondante sur la Terre, représentant près de 50 % des protéines foliaires. Du fait de son taux d'évolution assez lent, le séquençage en particulier du gène *rbcL*, permet de retracer l'évolution des grandes familles de plantes, à l'aide de reconstructions phylogénétiques.

**Suborbiculaire (étendard)** : presque en forme de cercle.

**Supère** : qualifie un ovaire (ou le fruit qui en dérive) situé au dessus du niveau d'insertion des autres pièces florales. La fleur est dite, dans ce cas, hypogyne ou superovariée.

**Synapomorphies** : un caractère synapomorphique, ou synapomorphie est un caractère dérivé ou apomorphique partagé par deux ou plusieurs taxons.

**Thylle** (du grec *thulas*, sac) est une excroissance cellulaire ou sécrétion gommeuse, engendrée par un processus naturel, qui obstrue les vaisseaux de sève des arbres. La production de thylles par la plante peut lui permettre d'isoler un agent pathogène et ainsi de limiter une infection.

**Unisériel** : désigne un poil tecteur dont les cellules sont disposées sur une seule file

***trnL-F*** : région chloroplastique du gène *trnL*

**Zygomorphe** : se dit d'une fleur dont les différentes pièces de chaque verticille (sépalés, pétales, étamines) sont disposées symétriquement par rapport à un plan (plan axe/bractée).

# Introduction

Depuis toujours, les hommes ont utilisé leur environnement et en particulier les plantes pour se soigner. On estime que deux tiers des médicaments actuels ont une origine naturelle (Newmann *et al.*, 2007) : obtenus par héli-synthèse, à partir d'un pharmacophore ou par modification d'un produit naturel, composés issus des biotechnologies, vaccins, composés d'origine végétale, microbiologique ou animale. Seul un tiers des médicaments commercialisés possède donc une origine purement synthétique.

De plus, sur les 300 000 espèces végétales recensées, on estime que seules 15% d'entre elles ont été étudiées sur le plan phytochimique, dont 6% pour leurs activités biologiques (Verpoorte, 2002), ce qui fait des plantes un réservoir de molécules bioactives encore peu exploré. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, avec souvent des structures très originales dont une synthèse totale et rentable (complexité structurale, stéréospécificité...) est souvent impossible à réaliser.

Néanmoins, il faut noter que, d'une part, le nombre d'espèces végétales diminue et que d'autre part, le savoir des médecines traditionnelles tend lui aussi à disparaître progressivement. Il en résulte une urgence à connaître et protéger ces espèces et les savoirs qui leur sont associés. La recherche de molécules bioactives d'origine naturelle constitue d'ailleurs un des axes prioritaires identifiés par le TDR (Tropical Diseases Research, 2008).

La recherche de molécules bioactives à partir des plantes peut s'effectuer selon plusieurs stratégies : une approche ethnopharmacologique qui consiste à utiliser le savoir des médecines traditionnelles, une approche chimiotaxonomique qui s'intéresse à des taxons connus pour renfermer des métabolites secondaires particuliers, ou encore un

criblage systématique des espèces (criblage à haut-débit), ou toute combinaison des précédentes.

C'est dans ce sens que le laboratoire SONAS (Substances d'Origine Naturelle et Analogues Structuraux) a engagé depuis plusieurs années une recherche de composés bioactifs à partir de plantes originales, notamment fournies par l'ICSN (Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif/Yvette). De plus, le laboratoire participe activement, sous l'égide d'Angers Technopôle, à la structuration d'un axe de recherche « Végétal et Santé » dans le cadre du pôle de compétitivité Végépolys. Il fait partie de l'Institut Fédératif de Recherche (IFR) 149 constitué par le regroupement volontaire d'équipes rattachées à différents établissements autour d'une thématique commune : QUALité et Santé du Végétal (QUASAV).

Inscrit dans ce contexte général, ce travail de thèse avait pour objectif de caractériser chimiquement les tiges et les feuilles d'une Légumineuses (Fabaceae) : *Derris ferruginea* et d'en évaluer ses potentialités biologiques. Cet arbuste a été récolté au Vietnam dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif/Yvette) et de l'institut de chimie, département des ressources écologiques et biologiques d'Hanoï (Vietnam).

Alors que le genre est relativement bien référencé, une seule publication très ancienne concernait la caractérisation chimique de l'espèce (Subba Rao *et al.*, 1946). Les plantes de ce genre sont connues pour leur utilisation traditionnelle en tant que poison de pêche, insecticide ou encore dans la lutte contre les ectoparasites. Les molécules liées à cette activité sont principalement des roténoïdes, une classe particulière de flavonoïdes, famille métabolique principalement représentée dans le genre.

Après une présentation botanique de *D. ferruginea* et de sa place dans les classifications phylogéniques, une synthèse bibliographique permettra de décrire les métabolites secondaires principaux dans ce genre : les flavonoïdes. Puis, les principales études phytochimiques antérieures relatives aux espèces du même genre seront présentées afin d'introduire la partie principale de ce travail. Cette partie concerne en effet la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de l'étude phytochimique des tiges et des feuilles de *D. ferruginea*, mais aussi leur évaluation biologique. Le dernier volet est consacré à la présentation des techniques chromatographiques et d'analyse structurales utilisées, ainsi qu'aux différents protocoles employés pour les tests biologiques.

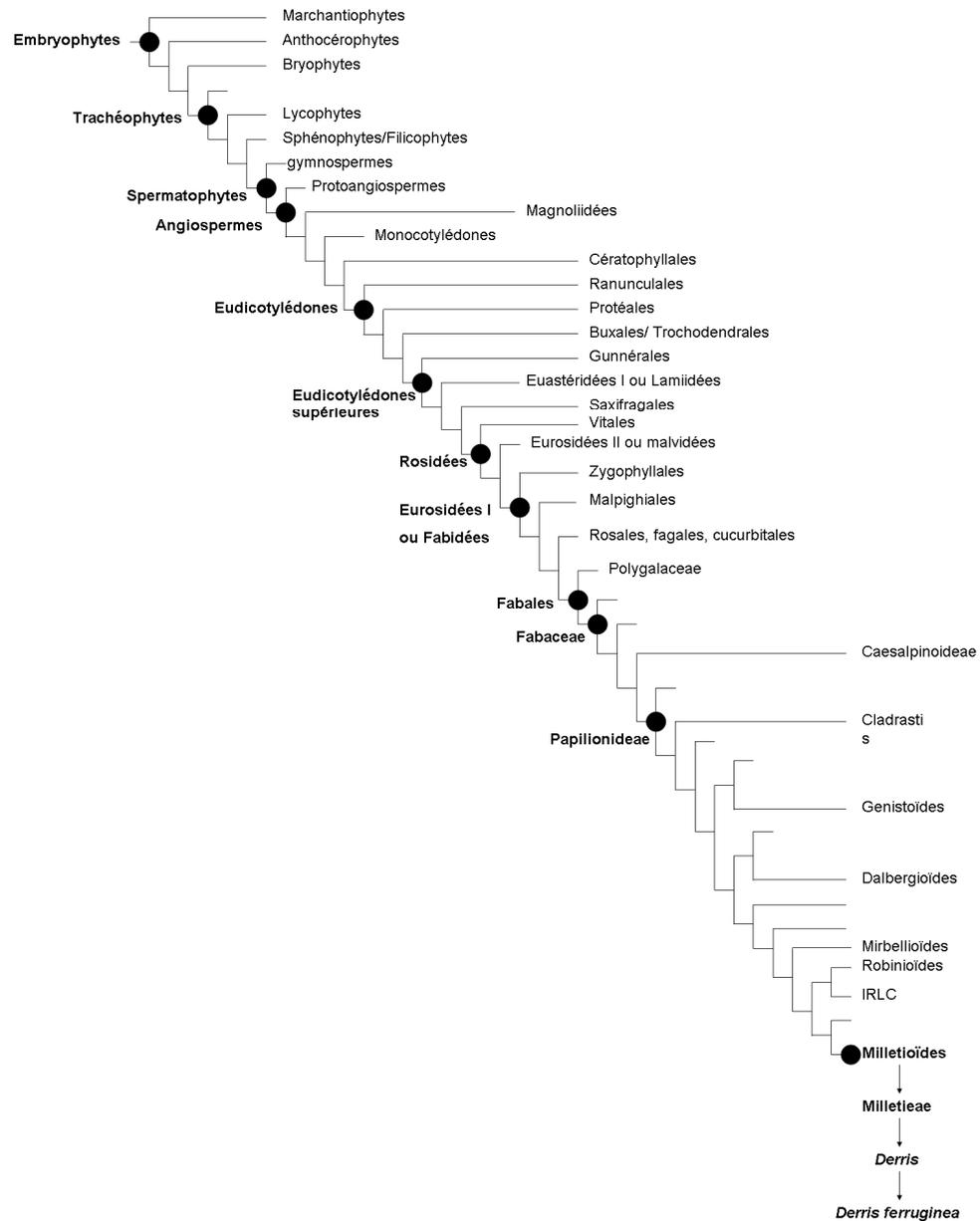
**PARTIE I :**

**DONNEES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

# 1. Classification et description de *Derris ferruginea*

La classification phylogénétique de *Derris ferruginea* est résumée dans la **figure 1** (APG, 2009 ; Wojciechowski *et al.*, 2004) :



**Figure 1:** Classification phylogénétique de *Derris ferruginea* modifiée d’après l’APG III (2009) et Wojciechowski *et al.* (2004).

Les clades, pour lesquels aucun nom n’est mentionné ici, correspondent à ceux d’espèces isolées et ne sont donc pas précisés ici dans un but de simplification.

## 1.1. La famille des Fabaceae

La grande famille des Fabaceae (de *faba*, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue.

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (Wojciechowski *et al.*, 2004). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Dupont *et al.*, 2007). Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote *via* la symbiose légumineuses-*rhizobium* permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (Wojciechowski *et al.*, 2004).

### 1.1.1. Caractères botaniques de la famille

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe<sup>1</sup>. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique.

---

<sup>1</sup> se dit d'une fleur dont les différentes pièces de chaque verticille (sépales, pétales, étamines) sont disposées symétriquement par rapport à un plan (plan axe/bractée).

### 1.1.1.1. Appareil végétatif

Les **racines** sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à *rhizobium* qui se forment si le sol est pauvre en azote (Dupont *et al.*, 2007).

Les **feuilles** sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des épines (robinier faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin).

### 1.1.1.2. Appareil reproducteur

Les **inflorescences** sont des grappes plus ou moins allongées.

Les Fabaceae les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Chez les plus évoluées, on observe une **réduction du nombre d'étamines** à 10 et **la fleur devient zygomorphe**. La préfloraison est imbriquée<sup>2</sup>, descendante ou vexillaire<sup>3</sup>.

Toutes les Fabaceae possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate.

Le **fruit**, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations. Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscence), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres.

Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une **graine** arquée, exalbuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja), des protéines (graines de soja).

---

<sup>2</sup> se dit d'une préfloraison dans laquelle, au sein d'un même verticille, une seule pièce est recouvrante, les autres étant emboîtées les unes dans les autres.

<sup>3</sup> se dit d'une préfloraison dans laquelle l'étendard recouvre les ailes, qui elles-mêmes recouvrent la carène.

### **1.1.2. Phylogénie**

L'étude phylogénétique de cette famille a été commencée avec le gène chloroplastique *rbcL*<sup>4</sup>, confirmant l'origine monophylétique de cette famille (Wojciechowski *et al.*, 2004). Les Fabaceae peuvent être réparties en 4 sous-familles selon l'APG III (2009):

- la sous-famille de Bauhinoïdes, avec les arbres à Orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*)
- la sous-famille des Mimosoideae
- la sous-famille des Caesalpinoideae
- la sous-famille des Papilionoideae ou Faboïdeae comprenant le genre *Derris*.

## **1.2. La sous-famille des Papilionoideae**

La sous-famille des Papilionoideae est certainement la sous-famille la plus étudiée, en particulier en raison du grand nombre de plantes appartenant à cette famille, 476 genres et 13 860 espèces (Wojciechowski *et al.*, 2004). On retrouve dans cette sous-famille des arbres, en général exotiques, des lianes, mais aussi beaucoup de plantes herbacées vivaces ou annuelles.

### **1.2.1. Caractères botaniques**

Il s'agit d'une sous-famille exceptionnellement homogène, très reconnaissable à l'aspect de ses feuilles alternes, stipulées et composées pennées, à celui de ses fleurs, à corolles dites « en papillon » et par ses fruits appelés gousses (Dupont *et al.*, 2007). Traditionnellement, les Papilionoideae ont été caractérisées par des traits qui sont considérés maintenant comme des synapomorphies<sup>5</sup> de la sous-famille (Wojciechowski *et al.*, 2004). Ces caractéristiques incluent la présence de bois avec un parenchyme prédominant axial paratrachéal qui est assez rare ; des vaisseaux avec des trous alternés et de simples perforations plates ; l'absence de feuilles bipennées (Wojciechowski *et al.*, 2004).

Les éléments les plus caractéristiques concernent la fleur des Papilionoideae :

---

<sup>4</sup> Gène chloroplastique codant pour la sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase.

<sup>5</sup> caractère dérivé ou apomorphique partagé par deux ou plusieurs taxons.

La préfloraison est descendante (vexillaire). Les **fleurs** sont cyclisées, hermaphrodites et fortement zygomorphes par la corolle.

La **corolle**, à symétrie bilatérale, présente une forme dite « papilionacée » c'est à dire qu'elle est constituée de cinq pétales disposés en forme de papillon. Le pétale dorsal (appelé aussi vexillum ou plus couramment étendard), recouvre les deux pétales latéraux ou ailes. Ces derniers recouvrent à leur tour, les deux pétales inférieurs, libres ou unis par leur bord interne sur une certaine longueur. Ces deux pièces inférieures constituent ensemble la carène<sup>6</sup> qui renferme l'androcée et le gynécée.

L'**androcée** compte dix étamines qui peuvent être libres ou soudées. Elles s'unissent le plus souvent par leurs filets, formant un tube autour du carpelle (genre *Sophora*). Elles peuvent aussi être soudées entre elles et l'androcée est alors monadelphie (genre *Cytisus*). L'androcée est diadelphie<sup>7</sup> quand neuf étamines sont unies en un tube ouvert en arrière et que l'étamine postérieure reste libre (genre *Vicia* et genre *Derris*).

### 1.2.2. *Phylogénie*

Du point de vue phylogénétique, la sous-famille des Papilionoideae a été étudiée à partir du locus *rbcL* et la région *trnL-F*, puis plus récemment à partir du gène *matK*<sup>8</sup> (Wojciechowski *et al.*, 2004), ce qui a confirmé l'origine monophylétique des Papilionoideae.

Les Papilionoideae peuvent être divisées en 7 clades selon les relations phylogénétiques établies à partir du gène plastidique *matK* (Wojciechowski *et al.*, 2004) (**Figure 1**):

- les Génistoïdes *lato sensu* dans lequel on retrouve des plantes contenant des alcaloïdes quinolizidiniques, composés de défense contre les herbivores, comme les genêts (*Genista*) et les lupins (*Lupinus*).
- les Dalbergioïdes *lato sensu* qui comprend principalement des bois tropicaux, mais aussi des plantes avec une grande importance en agriculture, comme l'arachide (*Arachis*) et les plantes fourragères du genre *Stylosanthes*.
- les Millettioïdes : ce clade comprend les tribus Millettieae, Abreae, Phaseoleae, Psoraleae et Desmodieae. Il comprend un large pourcentage d'arbres

---

<sup>6</sup> pétales inférieurs des Fabaceae soudés entre eux en forme de carène de navire

<sup>7</sup> avec les étamines assemblés en deux groupes

<sup>8</sup> gènes de l'ADN chloroplastique

et de bois grimpants (incluant les *Millettia*), il contient également certaines des Légumineuses les plus importantes en agriculture, comme le haricot commun (*Phaseolus*), le soja (*Glycine max*). Il comprend aussi les genres *Vigna*, *Dolichos* (dolique), des mauvaises herbes (comme les genres *Pueraria* et *Desmodium*), des sources de pesticides (comme le genre *Derris*), des plantes horticoles (comme le genre *Erythrina*).

- les Mirbelioïdes : ce clade représente une importance écologique en Australie avec 31 genres et 750 espèces. Il ne contient pas d'importantes espèces cultivées.

- les Robinoïdes comprennent des arbres des zones tempérées et tropicales, comme le robinier faux-acacia (*Robinia pseudoacacia*) et le genre *Gliricidia*.

- les IRLC (pour Inverted Repeat-Lacking Clade) : ce clade inclut le groupe économiquement important des *Vicia*, en particulier les vesces (*Vicia*), les lentilles (*Lens*), les pois (*Pisum*), les trèfles (*Trifolium*), la luzerne ou alfalfa (*Medicago sativa*), les pois chiches (*Cicer*). Les autres plantes des IRLC, mis à part ceux du groupe des *Vicia*, inclut quelques plantes boiseuses comme *Wisteria* et *Caragana*, et des plantes herbacées comme la réglisse (*Glycyrrhiza*) et les astragales (*Astragalus*).

- les *Cladrastis* : ce clade comprend des arbres à bois jaunes. Il s'agit d'un petit groupe reconnu récemment, qui a divergé assez tôt des autres Papilionoideae (Cronk *et al.*, 2006).

### 1.3. La tribu des Millettieae

La tribu des Millettieae regroupe plus de 40 genres et pratiquement 1 000 espèces (Hu *et al.*, 2000). Les délimitations de la tribu sont assez vagues, on peut noter comme caractéristiques par exemple, des bois tropicaux avec des fleurs dérivées caractéristiques (avec les carènes soudées), des bois avec un parenchyme en bandes et des graines contenant des amino-acides non-protéiques, mais il existe de nombreuses exceptions à ces caractéristiques (Hu *et al.*, 2000), (Wojciechowski *et al.*, 2004).

La tribu a été traditionnellement divisée en 3 sous-groupes, avec les genres *Tephrosia*, *Millettia* et *Derris* comme composants principaux. *Derris* et les genres proches ont été placés dans la tribu des Dalbergieae en raison de la présence de gousses indéhiscentes. Les genres *Millettia* et *Tephrosia*, avec des gousses déhiscentes ont été placés près de la tribu des Galegeae (Hu *et al.*, 2000). Plus récemment, l'analyse phylogénétique à partir des séquences chloroplastique *TRNK/MATK* propose de diviser la

tribu des Millettieae en plusieurs groupes dont le principal nommé « core Millettieae group », comprend environ 70% des espèces de la tribu des Millettieae (*sensu* Geesink, 1984) et inclut 4 genres principaux : *Tephrosia*, *Millettia*, *Lonchocarpus* et *Derris*. Ce groupe comprend des espèces qui ont le plus souvent une inflorescence de type pseudoracème ou pseudopanicule<sup>9</sup> (Lavin *et al.*, 1998). Il peut être sous-divisé en 3 : le sous-groupe des *Philenoptera*, le sous-groupe des *Tephrosia* et le sous-groupe des *Derris-Lonchocarpus* (Hu *et al.*, 2000). Les sous-groupes des *Derris-Lonchocarpus* et *Tephrosia* représentent 2 larges groupes monophylétiques et contiennent à eux deux la plupart des espèces de la tribu des Millettieae (Lavin *et al.*, 1998).

#### 1.4. Le genre *Derris*

Le genre *Derris* Lour. comprend une soixantaine d'espèces. On peut noter comme caractéristiques de ce genre, des gousses ailées le plus fréquemment le long de la suture placentaire, de minces valves ligneuses, des gousses indéhiscentes, des pétales le plus souvent sans callosités ni oreillettes, les carènes sont rectilignes, les graines réniformes n'accumulent pas de canavanine. Ce sont des lianes généralement boisées, avec une distribution principalement paléotropicale (Lavin *et al.*, 1998). L'identification des espèces est très compliquée et pose problème à nombre de taxonomistes (Hu *et al.*, 2000). Bentham (1860) a distingué 5 sections dans le genre : *Aganope*, *Euderris*, *Dipteroderris*, *Paraderris*, *Brachypterum*. Geesink (1984) place les *Ostryocarpus* dans la section *Aganope* et repartit les autres espèces dans trois sections (Hu *et al.*, 2000):

- *Derris sensu stricto* (inclut les sections *Euderris* et *Dipteroderris*) ;
- *Paraderris* (formellement *Derris* section *Paraderris*) ;
- *Brachypterum* (*Derris* section *Brachypterum*).

Ce sont des plantes grimpantes, moins souvent des arbres ou des arbustes érigés. Les feuilles sont imparipennées, quelquefois seulement pennées à 3 folioles. Les stipules sont en général petits et caduques ; les folioles sont opposées. Les fleurs sont disposées en panicule terminal et axillaires bien développées ou contractées en subracème, mais toujours avec des fleurs serrées sur des rameaux courts ou en cluster sur les nœuds, avec des petites bractées et des bractéoles. Le calice est en général cupulé et subtronqué ou avec des dents très courtes dont les supérieures sont pratiquement unies. La corolle est beaucoup plus longue que le calice, blanche, violette ou pourpre, en général glabre (**Figure 2**).

<sup>9</sup> racème (grappe) ou panicule avec des fleurs multiples à l'aisselle de chaque bractée

L'étendard est ovale à obovale ou suborbiculaire, parfois avec des oreillettes ou des callosités à la base de la lame, les ailes sont adhérentes aux carènes, généralement avec un pli bien visible ou une poche sur la partie basale de la lame, les carènes sont un peu incurvées, légèrement adhérentes sur la face inférieure. Les étamines sont réunies en un tube fermé, mais avec des ouvertures à la base de chaque côté de l'étamine vexillaire. Les anthères sont dorsifixes. Les ovaires sont souvent subsessiles, avec peu d'ovules ; le style est incurvé et effilé en un petit stigmate terminal, glabre ou la partie inférieure couverte de poils comme ceux de l'ovaire. Le fruit est aplati, indéhiscent, elliptique à linéaire-oblongue avec des ailes le long des deux bords supérieurs, en général subsessile, comme du papier ou plus coriace. Les graines sont en général oblongues-réniformes à réniformes, lisses ou ridées, avec un petit hile<sup>10</sup>, parfois avec le funicule<sup>11</sup> persistant (Abdel-Lateff *et al.*, 2002 ; Solereder, 1908).



**Figure 2** : Fleurs de *Derris elliptica* (<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp>)

---

<sup>10</sup> cicatrice au point où la graine était attachée à la plante (ici à la gousse)

<sup>11</sup> filament reliant la graine à la paroi de l'ovaire

On décrit selon les sources bibliographiques entre 50 et 150 espèces. La plus exhaustive est la suivante (<http://www.eol.org>) :

<i>D. acuminata</i> (Benth.)	<i>D. hedyosma</i> (Miq.)	<i>D. parviflora</i> (Benth.)
<i>D. albo-rubra</i> (Hem.)	<i>D. heyneana</i> (Wight & Arn.)	<i>D. philippinensis</i> (Merr.)
<i>D. alborubra</i> (Hemsl.)	<i>D. hylobia</i> (Harms)	<i>D. polyantha</i> (Perkins)
<i>D. amoena</i> (Benth.)	<i>D. involuta</i> (Sprague)	<i>D. polyphylla</i> (Koord.&Valetton)
<i>D. andamanica</i> (Prain)	<i>D. kanjilalii</i> (Sahni)	<i>D. pseudorobusta</i> (Thoth.)
<i>D. angulata</i> (Ducke)	<i>D. kingdonwardii</i> (Thoth.)	<i>D. pubipetala</i> (Miq.)
<i>D. balansae</i> (Gagnep.)	<i>D. koolgibberah</i> (Vanetten et	<i>D. reticulata</i> (Craib)
<i>D. benthamii</i> (Thwaites)	<i>D. laotica</i> (Gagnep.)	<i>D. robusta</i> (Benth.)
<i>D. brevipes</i> (Benth.)	<i>D. latifolia</i> (Kunth)	<i>D. rubrocalyx</i> (Verdc.)
<i>D. breviramosa</i> (How)	<i>D. laxiflora</i> (Benth.)	<i>D. rufescens</i> (Benth.)
<i>D. canarensis</i> (Dalzell)	<i>D. lianoides</i> (Elmer)	<i>D. scabri caulis</i> (Franch.)
<i>D. caudata</i> (Backer)	<i>D. lushaiensis</i> (Thoth.)	<i>D. scandens</i> (Roxb.)
<i>D. caudatilimba</i> (How)	<i>D. macrocarpa</i> (Thoth.)	<i>D. secunda</i> (Baker)
<i>D. cavaleriei</i> (Gagnep.)	<i>D. maingayana</i> (Baker)	<i>D. seorsa</i> (Macbr.)
<i>D. cebuensis</i> (Merr.)	<i>D. malaccensis</i> (Prain)	<i>D. steinbachii</i> (Harms)
<i>D. confertiflora</i> (Benth.)	<i>D. marginata</i> (Roxb.)	<i>D. submontana</i> (Verdc.)
<i>D. cuneifolia</i> (Benth.)	<i>D. mariannensis</i> (Hosok.)	<i>D. sylvestris</i> (Macbr.)
<i>D. danauensis</i> (Backer)	<i>D. microphylla</i> (Miq.)	<i>D. thorelii</i> (Craib)
<i>D. denudata</i> (Benth.)	<i>D. microptera</i> (Benth.)	<i>D. thothathrii</i> (Bennet)
<i>D. elegans</i> (Benth.)	<i>D. mindorensis</i> (Perkins)	<i>D. tinghuensis</i> (Chen)
<i>D. elliptica</i> (Wall.)	<i>D. montana</i> (Benth.)	<i>D. tonkinensis</i> (Gagnep.)
<i>D. eriocarpa</i> (How)	<i>D. monticola</i> (Kurz)	<i>D. trifoliata</i> (Lour.)
<i>D. fordii</i> (Oliv.)	<i>D. multiflora</i> (Benth.)	<i>D. truncata</i> (Craib)
<i>D. glauca</i> (Merr.& Chun)	<i>D. oblonga</i> (Benth.)	<i>D. utilis</i> (Ducke)
<i>D. hainanensis</i> (Hayata)	<i>D. oblongifolia</i> (Merr.)	<i>D. yappii</i> (Craib)
<i>D. hainesiana</i> (Thoth.)	<i>D. oligosperma</i> (Schum.)	<i>D. yunnanensis</i> (Chun & How)
<i>D. hancei</i> (Hemsl.)	<i>D. ovalifolia</i> (Wight & Arn.)	<i>D. zambalensis</i> (Elmer)
<i>D. harrowiana</i> (Diels)	<i>D. palmifolia</i> (Chun & How)	

## 1.5. L'espèce *Derris ferruginea*

### 1.5.1. Description

Dans la première description faite par Roxburgh, cette espèce apparaît sous le nom de *Robinia ferruginea* [*Fl. ind. ed.* 1832, 3:329]. Le nom de *Pongamia ferruginea* a été

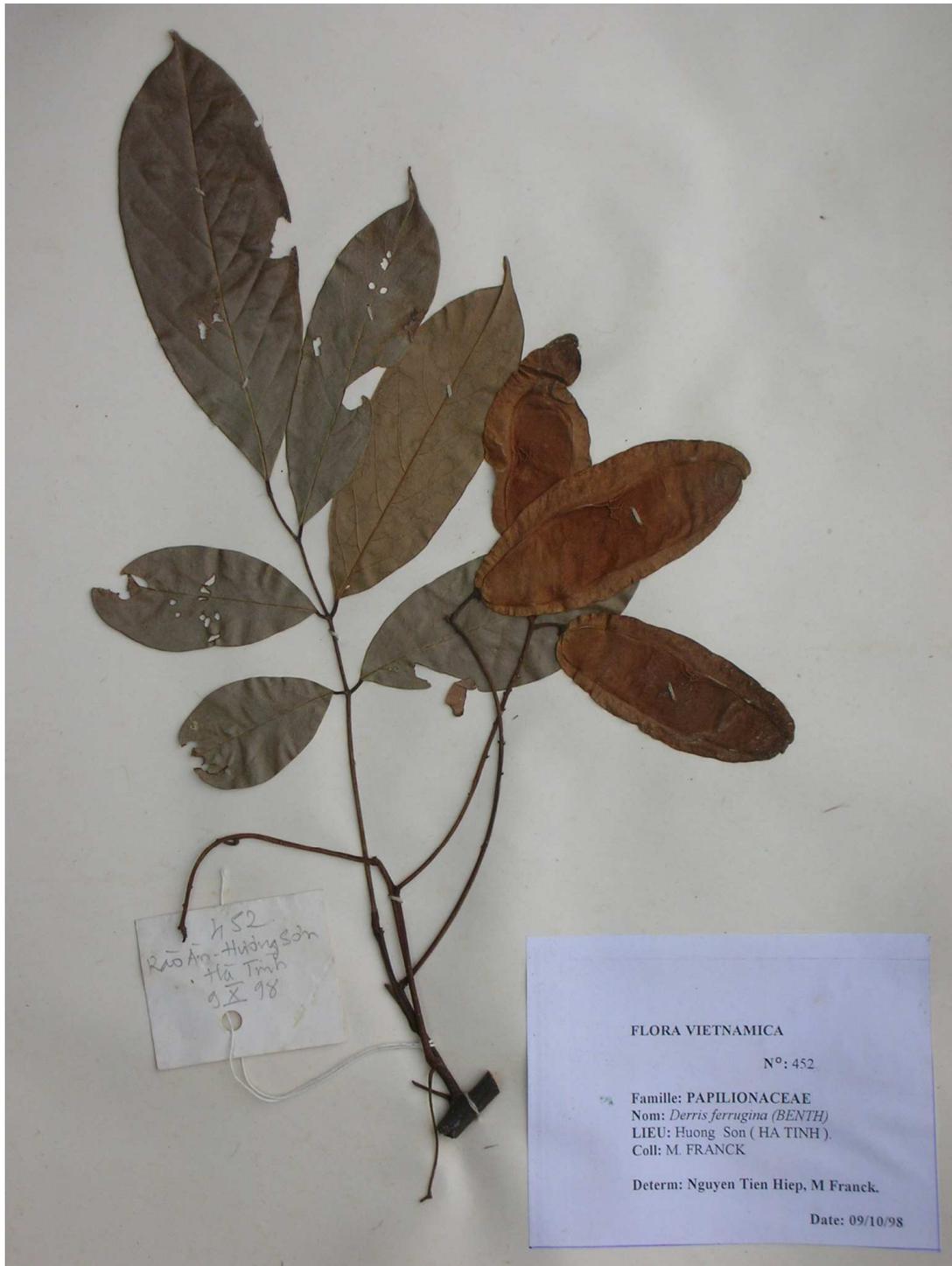
aussi attribué à cette espèce (Bentham, 1860). De plus, l'espèce a été longtemps confondue avec *Derris elliptica* (Krishnan *et al.*, 1938).

*Derris ferruginea* [Bentham in F. A. W. Miquel, *Pl. jungh.* 1:252. 1852] est plus ou moins un arbuste sarmenteux, aux branches pubescentes de couleur rouille. Les feuilles sont composées imparipennées et comprennent de 5 à 9 folioles elliptique-oblongues à obovale-oblongues subcoriaces courtement acuminées<sup>12</sup> (**Figure 4**). Elles possèdent une face supérieure pubescente et rousse et une face inférieure glabre et brillante. Les inflorescences sont regroupées en pseudopanicules de 15 à 30 cm de long, pubescents et de couleur rouille. Le pédoncule floral est d'environ 5 mm, le calice, de 3 mm environ, est doublement denté. La corolle est rouge claire à blanche et mesure entre 8 et 10 mm, proche de celle de *Derris elliptica* (**Figure 2**) L'ovaire est pubescent, suite à la fécondation il donne une gousse sessile et ailée coriace, de 5 à 8 cm de long, avec une densité de poils de couleur rouille très importante, ces derniers tomberont au cours de la maturation. La gousse porte une à deux graines.

La floraison a lieu d'avril à juillet et l'espèce *Derris ferruginea* donne des fruits de septembre à décembre (Dezhao *et al.*, 2010).

---

<sup>12</sup> qui se terminent en pointes fines



**Figure 2** : Feuilles et fruits de *D. ferruginea*. Planche d'herbier de l'Herbarium National d'Hanoï (déposé sous le numéro VN-0452)

### 1.5.2. Etude microscopique des poudres des feuilles, des tiges et des fruits

On remarque, dans la poudre des **feuilles** de *D. ferruginea*, la présence de nombreux poils, longs, pluricellulaires, unisériés, de couleur rouge, longiformes ou légèrement courbés (**A** et **B**). Les stomates sont constitués par des cellules de garde parallèles (stomates paracytiques) entourées par des cellules épidermiques polygonales (**C**). Le mésophylle apparaît pauvre en chlorophylle, riche en tannins (**D**). La présence de poches sécrétrices (**E**) est observée ainsi que des produits de sécrétion sous forme d'amas de couleur jaune (**F**).

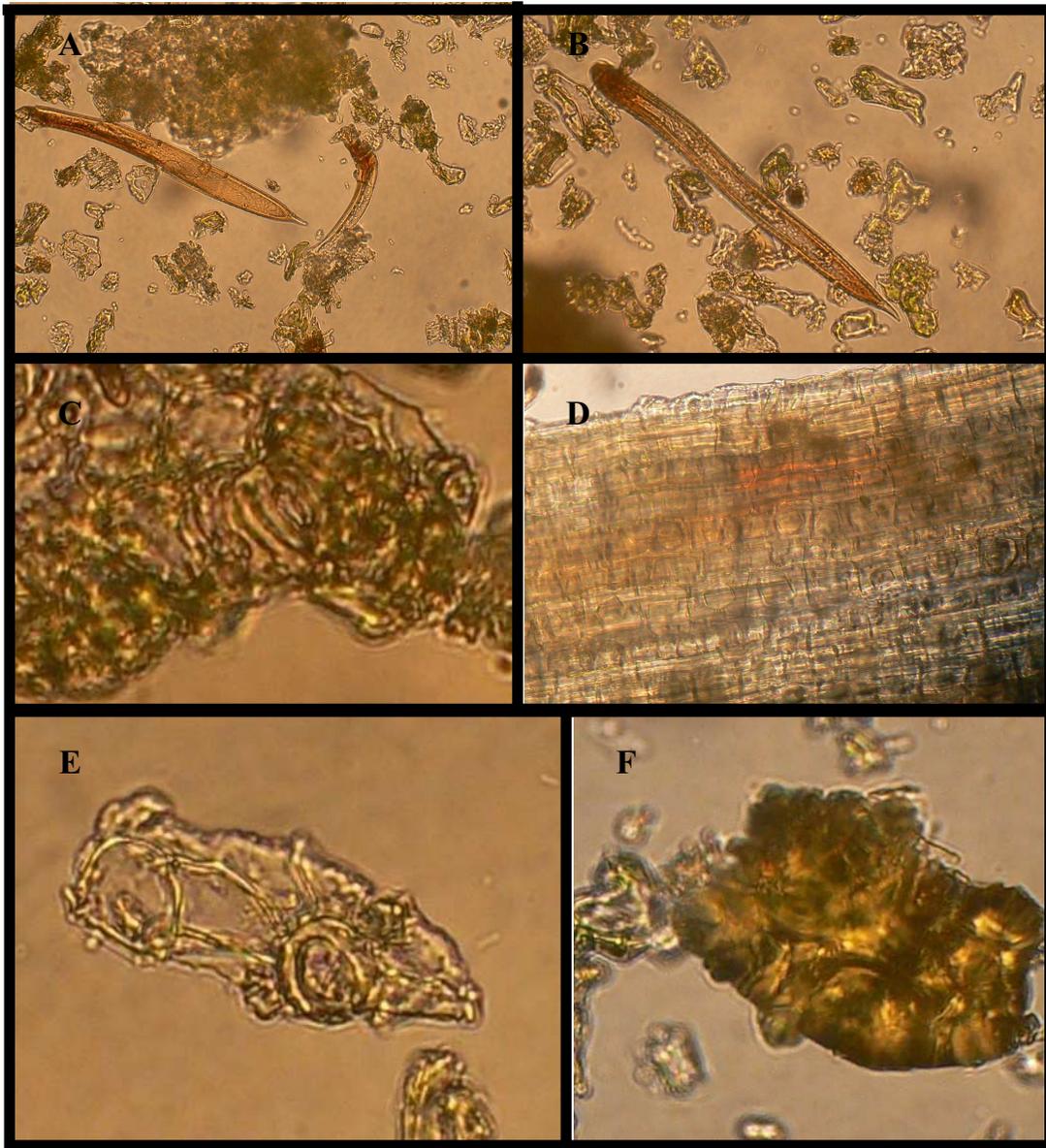
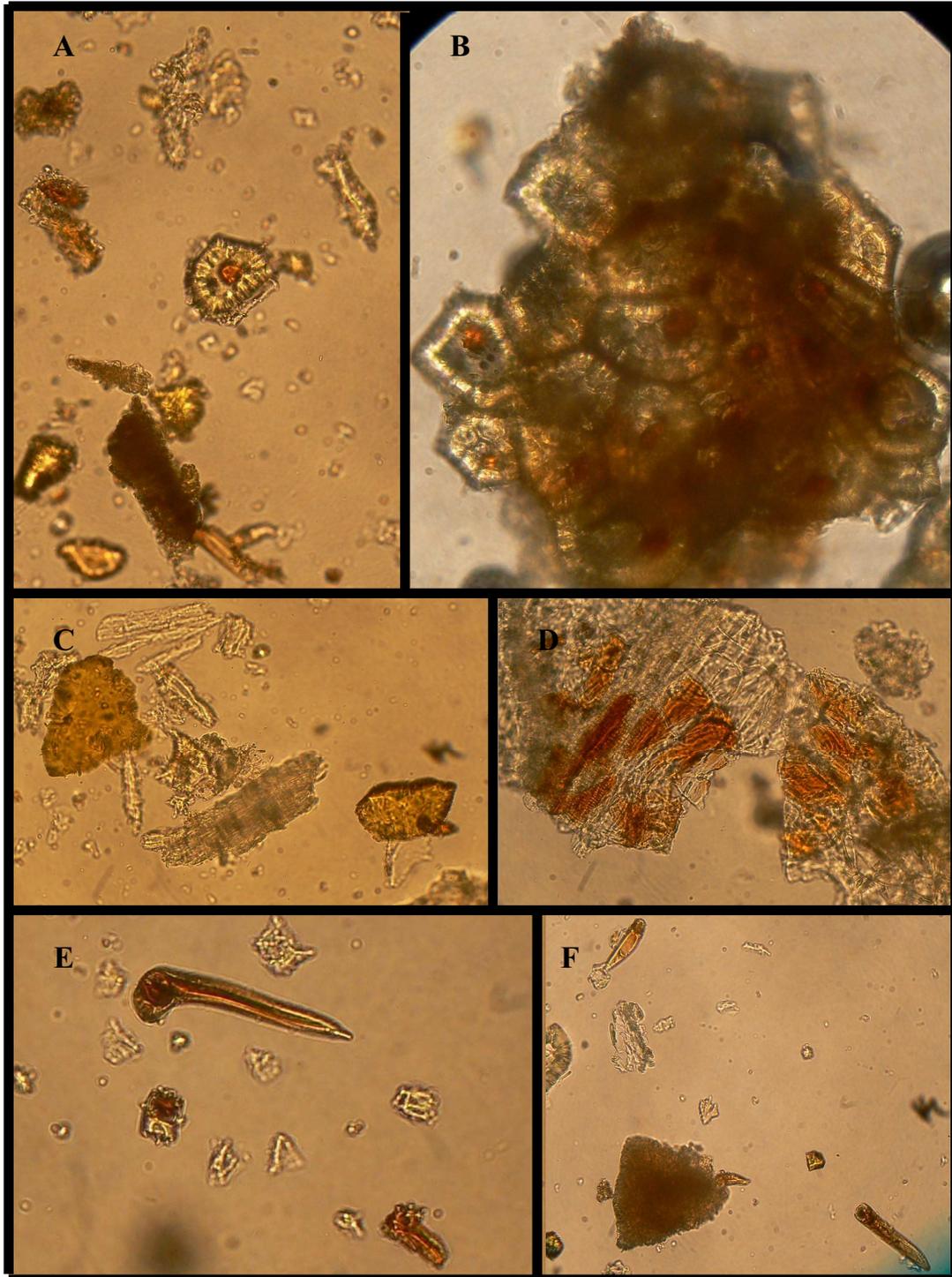


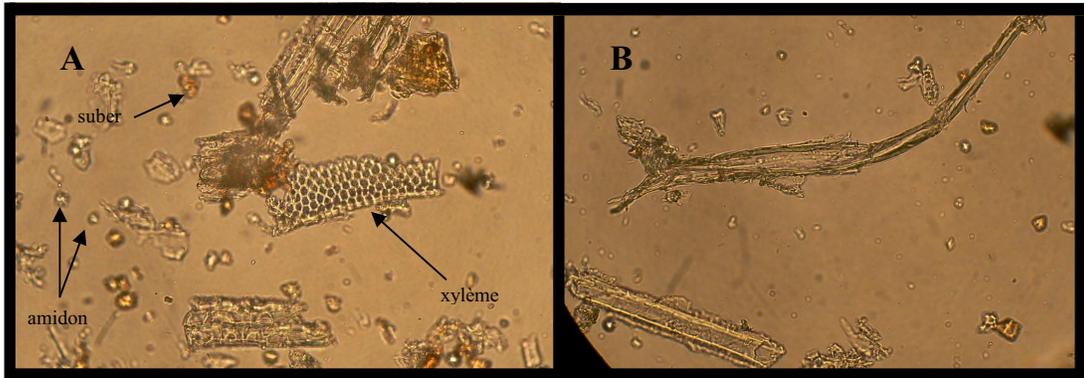
Figure 3 : Poudre des feuilles de *D. ferruginea* (grossissement X 400)

La poudre de **fruits** comporte de nombreuses glandes sécrétrices, isolées (**A**) ou groupées en amas (**B**), ainsi que des produits de sécrétion de couleur jaune (**C**). Les cellules épidermiques apparaissent riches en tannins (réaction à  $\text{FeCl}_3$ ) (**D**). De nombreux poils tecteurs sont présents. Ils sont unicellulaires courbés (**E**) ou assez courts et droits (**F**).



**Figure 4** : Poudre des fruits de *D. ferruginea* (grossissement X 400)

La poudre des **tiges** est essentiellement constituée par le cylindre central (peu d'écorces de tiges), elle comporte peu de fragments de suber. On note la présence de vaisseaux simples de xylème, de grains d'amidon (A), ainsi que des fibres libériennes (B).



**Figure 5** : Poudre des tiges de *D. ferruginea* (grossissement X 400)

### **1.5.3. Distribution**

Cette plante pousse dans les forêts clairsemées ainsi que dans les fourrés de montagnes de moyenne altitude d'Asie, entre 500 et 1 200 mètres. Elle est présente au Bangladesh, en Inde, au Laos, en Myanmar, en Thaïlande, au West Bangal, à Assam, Sikkim, en Chine, ainsi qu'au Vietnam (**Figure 6**) (Dezhao *et al.*, 2010 ; Krishnan *et al.*, 1938 ; N.V. Subba Rao *et al.*, 1946).



**Figure 6** : Distribution de l'espèce *Derris ferruginea*

### **1.5.4. Utilisations**

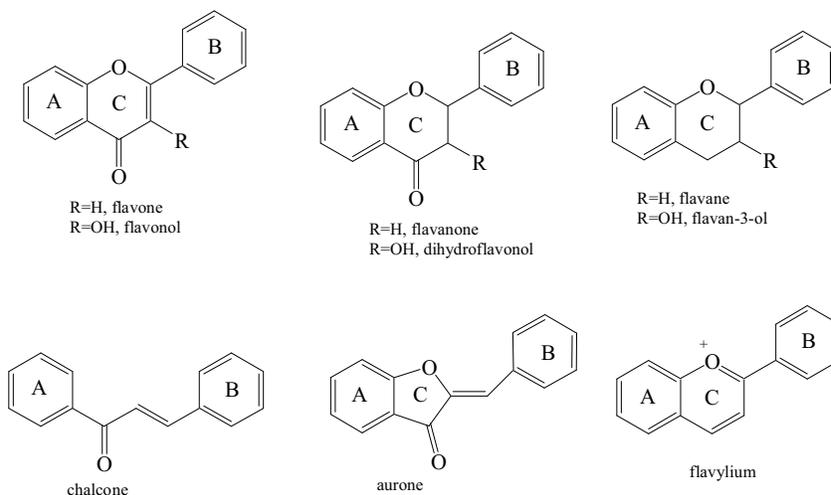
Les racines de *Derris ferruginea* sont utilisées comme insecticide, pesticide, ichthyotoxique (poison de pêche) et pour lutter contre les ectoparasites (Lamba, 1970). Les racines sont utilisées en décoction pour les troubles gastro-intestinaux (Zheng *et al.*, 2009).

## 2. Généralités sur les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont fréquemment décrits chez les Fabaceae. Ce sont des métabolites secondaires des plantes dont l'on aurait à l'heure actuelle caractérisé près de 6 500 représentants différents (Harborne *et al.*, 2000).

Contrairement aux flavonoïdes présents dans les fleurs, qui leur confèrent leurs couleurs, les flavonoïdes présents dans les feuilles, sont masqués par la présence de chlorophylle (Harborne *et al.*, 2000).

Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune. Ce groupe de composés est en effet défini par une structure générale en C<sub>15</sub>, caractérisée par un enchaînement Ar-C<sub>3</sub>-Ar. Les flavonoïdes "*lato sensu*", comprennent les flavonoïdes "*stricto sensu*" (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, auronnes) (**Figure 7**) et les isoflavonoïdes (**Figure 11**) (Bruneton, 2009).



**Figure 7** : Structures de base des flavonoïdes *stricto sensu*

### 2.1. Distribution et biosynthèse

#### 2.1.1. Les flavonoïdes *stricto sensu*

##### 2.1.1.1. Distribution

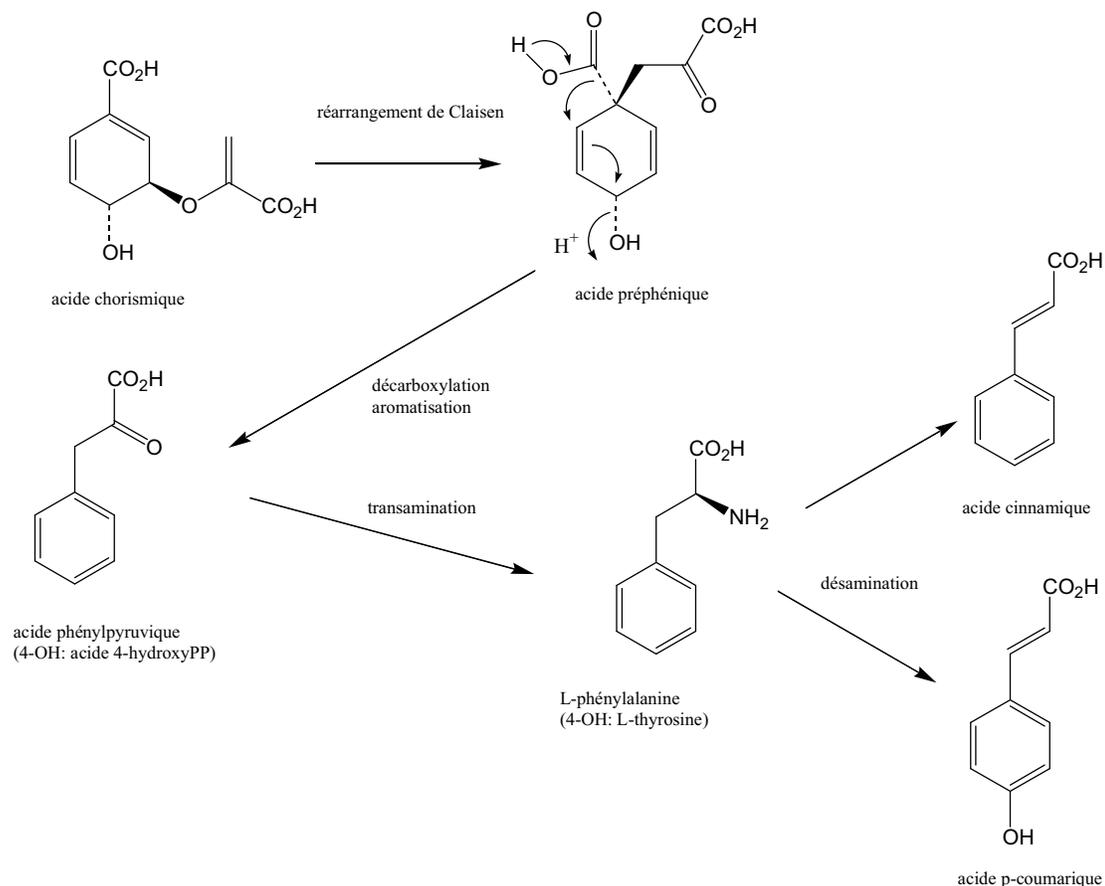
Dans la plupart des cas, les flavonoïdes sont présents sous forme glycosidique dans les vacuoles des fleurs, des feuilles, des tiges ou des racines. Les flavonoïdes aglycones,

notamment les flavonoïdes simples et polyméthylés, sont plutôt présents sous forme de cires dans les feuilles, les écorces, les bourgeons floraux (Iwashina, 2000).

### 2.1.1.2. Biosynthèse

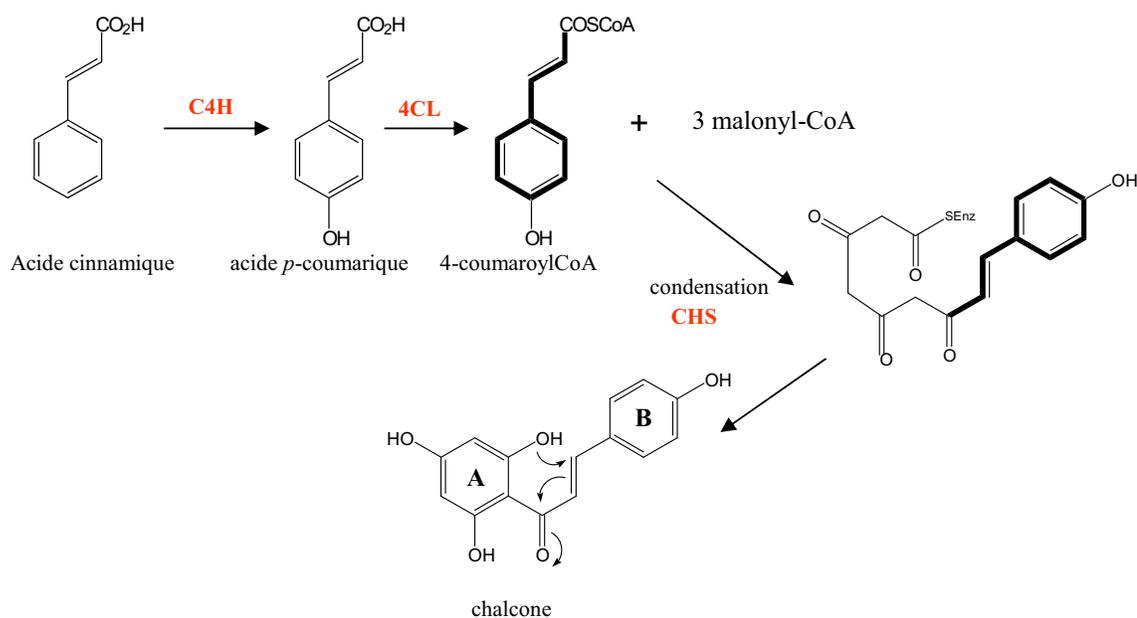
Les flavonoïdes "*stricto sensu*" dérivent d'une structure de type 1,3-diphénylpropane.

La première étape intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes est une étape commune à beaucoup d'autres métabolites, elle est désignée sous le nom générique de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (**figure 8**). Elle permet la synthèse d'acide *p*-coumarique et d'acide cinnamique. L'enzyme, permettant la désamination non-oxydative de la phénylalanine et donc la formation de l'acide cinnamique, est nommée PAL pour phénylalanine ammonia lyase (Vogt, 2009).



**Figure 8** : biosynthèse des dérivés cinnamiques

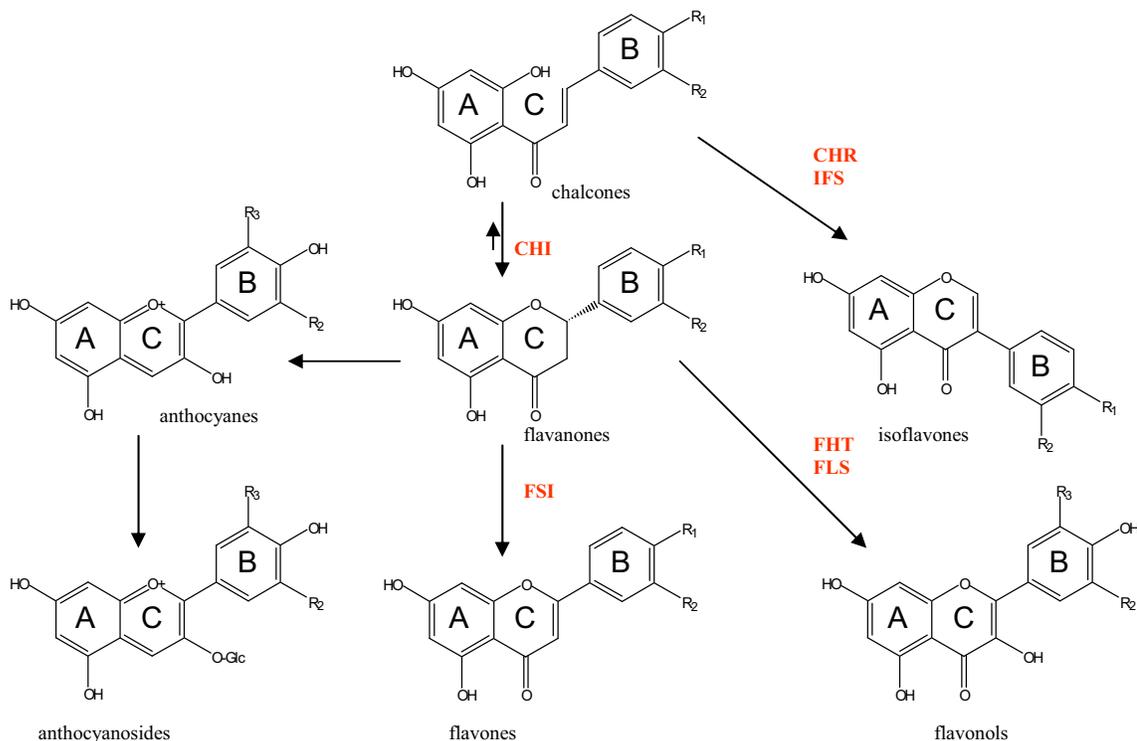
Le cytochrome P450 cinnamate-4-hydroxylase (C4H), permet d'ajouter une fonction hydroxyle en position 4 du noyau aromatique et d'obtenir l'acide *p*-coumarique (**Figure 9**). Le *p*-coumaroyl CoA est synthétisé *via* l'action de la 4-coumaroyl CoA ligase (4CL). Le *p*-coumaroyl CoA conduit à la synthèse de nombreux métabolites secondaires aromatiques. Une unité *p*-coumaroyl CoA va former le cycle B et la chaîne propanique, alors que le cycle A est formé par condensation de 3 unités C<sub>2</sub> (sous forme de 3 malonyl-CoA, formés à partir de l'acétate *via* une forme cytoplasmique de l'acétyl CoA carboxylase). Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), enzyme-clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (**Figure 9**). La CHS appartient à la famille des polyketides synthases des plantes, enzymes intervenant dans la synthèse de nombreux produits naturels (Dixon *et al.*, 1999). La plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la voie des phenylpropanoïdes et des flavonoïdes sont organisées en complexe enzymatique, associées à la membrane (Winkel-Shirley, 2001).



**Figure 9** : Formation de chalcone à partir des acides cinnamiques

Les différentes classes de flavonoïdes (*lato sensu*) sont biosynthétisées à partir d'une chalcone (**figure 10**). La chalcone néoformée donne une 2S-flavanone (la naringénine), par une transformation stéréospécifique catalysée par une chalcone-isomérase (CHI) (Fowler *et al.*, 2009). La naringénine est au centre de la synthèse de

différentes classes de flavonoïdes par l'action d'enzymes diverses (**Figure 9**). Les flavone-synthases (FSI) introduisent une double liaison en 2,3 pour donner une flavone. La flavanone-3-hydroxylase (FHT) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une 2S-flavanone pour donner un (2R,3R)-dihydroflavonol. Le dihydroflavonol peut ensuite être transformé en flavonol par la flavonol-synthase (FLS) (Winkel-Shirley, 2001).



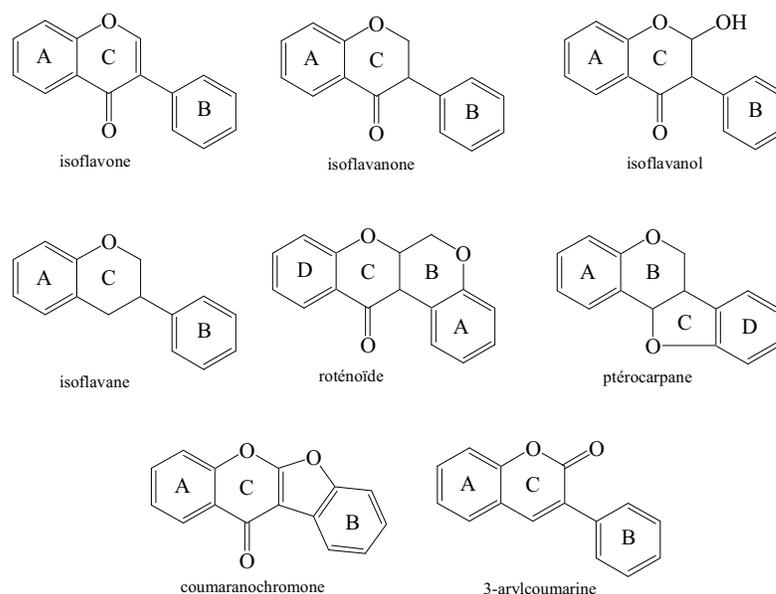
**Figure 10** : Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes

### 2.1.1.3. Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et la présence d'un centre chiral en position 2. Elles sont synthétisées à partir des chalcones, par une chalcone isomérase sous forme de 2S-flavanones, cette réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin. Il semblerait que seuls les stéréoisomères 2S sont biologiquement actifs (Fowler *et al.*, 2009). Environ 350 flavanones aglycones et une centaine de flavanones glycosylées sont décrites dans de nombreuses familles, en particulier les Asteraceae, les Leguminosae et les Rutaceae. Beaucoup de flavanones aglycones sont retrouvées à l'état libre dans les écorces, les racines, les écorces de racine, en particulier chez les Leguminosae. La majorité des flavanones glycosylés sont des O-glycosides (Iwashina, 2000).

## 2.1.2. Les isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui dans le cas des isoflavonoïdes est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane. Il existe de nombreuses sous-classes d'isoflavonoïdes (**Figure 11**), classés notamment en fonction du degré d'oxydation, l'existence ou non d'hétérocycles supplémentaires, les plus communs étant les isoflavones, alors que les isoflavanol et les coumaranochromones sont peu rencontrés (Iwashina, 2000). Les dérivés glycosylés sont très communs chez les isoflavones, alors qu'ils sont très rares dans les autres sous-classes d'isoflavonoïdes. Les C-glycosides sont essentiellement présents dans le genre *Dalbergia* (Leguminosae) (Iwashina, 2000).



**Figure 11:** Structures des différentes sous-classes d'isoflavonoïdes

### 2.1.2.1. Distribution

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce et les graines, quelquefois dans les feuilles et les fleurs (Iwashina, 2000).

Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont quasi-uniquement présents chez les Légumineuses, puisque 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille (Iwashina, 2000). Il apparaît néanmoins qu'au

moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes n'appartenant pas aux Légumineuses, mais à 59 autres familles (**tableau 1**) (Lapcik, 2007). Comme chez les Légumineuses, la majorité des isoflavonoïdes isolés sont des isoflavones. D'après une étude de Reynaud *et al* (Reynaud *et al.*, 2005), sur 164 isoflavonoïdes répertoriés, 124 sont des isoflavones, 17 des déshydroroténoïdes et 6 des 12a-hydroxyroténoïdes. On retrouve également des isoflavanones (2), des roténoïdes (3), des ptérocarpanes (4), des coumestanes (5), des coumarochromones (2) (Reynaud *et al.*, 2005).

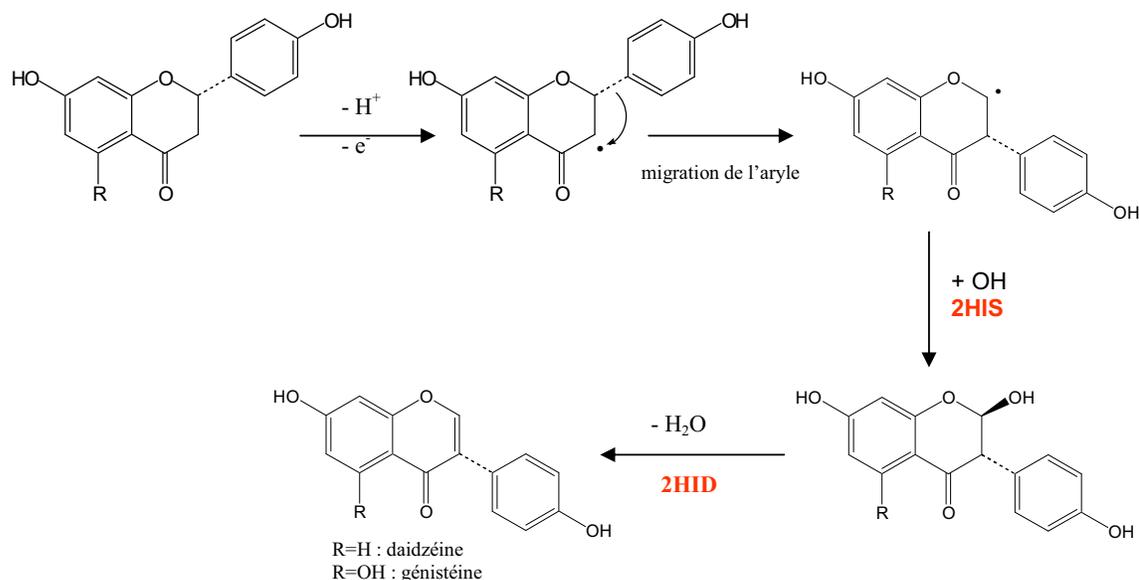
**Tableau 1** : Familles de plantes dans lesquelles ont été isolés des isoflavonoïdes, modifié d'après Lapcik *et al.* (2007)

DIVISION	CLASSE	SUBCLASSE	ORDRE	FAMILLE
BRYOPHYTA	BRYOPSIDA	BRYIDAE	BRYALES	BRYACEAE
CONIFEROPHYTA	PINOPSIDA		PINALES	ARAUCARIACEAE, CUPRESSACEAE, PODOCARPACEAE
MAGNOLIOPHYTA	LILIOPSIDA (MONOCOTS)	COMMELINIDAE	CYPERALES ERIOCAULALES JUNCALES	POACEAE, CYPERACEAE ERIOCAULACEAE JUNCACEAE
		LILIIDAE	LILIALES	ASPHODELACEAE, IRIDACEAE, LILIACEAE, STEMONACEAE,
	MAGNOLIOPSIDA (DICOTS)	ZINGIBERIDAE	ZINGIBERALES	ZINGIBERACEAE
		ASTERIDAE	ASTERALES GENTIANALES LAMIALES RUBIALES SCROPHULARIALES SOLANALES	ASTERACEAE APOCYNACEAE, ASCLEPIADACEAE VERBENACEAE RUBIACEAE SCROPHULARIACEAE SOLANACEAE, CONVULVULACEAE
		CARYOPHYLLIDAE	CARYOPHYLLALES	AMARANTHACEAE, CHENOPODIACEAE, NYCTAGINACEAE
		DILLENIIDAE	POLYGONALES CAPPARALES EBENALES MALVALES	POLYGONACEAE BRASSICACEAE SAPOTACEAE BOMBACACEAE, MALVACEAE, STERCULIACEAE
		HAMMAMELIDAE	THEALES VIOLALES	CLUSIACEAE, OCHNACEAE CUCURBITACEAE, VIOLACEAE
		MAGNOLIIDAE	MYRICALES URTICALES	MYRICACEAE CANNABACEAE, MORACEAE, URTICACEAE
		ROSIDAE	LAURALES MAGNOLIALES NYMPHEALES PAPAVERALES RANUNCULALES APIALES CELASTRALES EUPHORBIALES FABALES LINALES MYRTALES POLYGALES RHAMNALES ROSALES SAPINDALES	LAURACEAE MAGNOLIACEAE, MYRISTICACEAE NYMPHAEACEAE PAPAVERACEAE MENISPERMACEAE APIACEAE CELESTRACEAE EUPHORBIACEAE LEGUMINOSEAE ERYTHROXYLACEAE MELASTOMATAACEAE, MYRTACEAE POLYGALACEAE VITACEAE, RHAMNACEAE CONNARACEAE, CRASSULACEAE, ROSACEAE RUTACEAE, ZYGOPHYLLACEAE

### 2.1.2.2. Biosynthèse

La quasi-exclusivité de la présence d'isoflavonoïdes chez les Légumineuses peut s'expliquer. Il semblerait en effet, que l'on retrouve uniquement dans cette famille l'isoflavone synthase (IFS), enzyme clé dans la synthèse des isoflavonoïdes. Le terme IFS

est utilisé pour décrire la réaction de migration du groupement aryle (**Figure 12**), couplée à une 2-hydroxylation catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS), ainsi que la réaction de déshydratation qui est soit spontanée, soit catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone déshydratase (2HID) (Dixon *et al.*, 1999 ; Veitch, 2006). Néanmoins, le gène codant pour IFS a été également identifié chez la canne à sucre (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae) (Lapcik, 2007).



**Figure 12** : Biosynthèse des isoflavonoïdes

La 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) catalyse uniquement les réactions à partir des 2S-flavanones. La migration du groupement aryle commence par l'attraction de l'hydrogène en position 3, suivie de la migration du cycle B de C-2 à C-3 et de l'hydroxylation du radical en 2, qui aboutit à la formation d'une 2-hydroxyflavanone (Akashi *et al.*, 2005 ; Tian *et al.*, 2008). Les ADNc codant pour la 2HIS ont été clonés à partir de différentes légumineuses. Ces 2HIS appartiennent à la famille des cytochromes CYP93C, et sont dépendantes de NADPH et d' $O_2$  comme co-facteurs (Tian *et al.*, 2008).

Cette classe d'enzyme comprend aussi la flavone synthase II (FSII, CYP93B1) qui catalyse la 2-hydroxylation sans migration du groupement aryle, pour former après déshydratation une flavone à partir d'une flavanone (Dixon *et al.*, 1999).

Les précurseurs des isoflavonoïdes (flavanones) sont de simples flavanones comme la naringénine (5,7,4'-trihydroxyflavanone) ou la liquiritigénine (7,4'-

dihydroxyflavanone). Il semble que certaines 7-hydroxyflavanones sans groupement hydroxyle en position 4' puissent aussi être impliquées (Lapcik, 2007).

La fonction hydroxyle va ensuite être déshydratée en milieu acide par une 2-hydroxyisoflavanone déhydratase (2HID), qui est classée dans les carboxyestérases de la famille des hydrolases (Akashi *et al.*, 2005). Les 2HID peuvent être divisées en : 2HIDH dont le substrat est une simple 2-hydroxyisoflavanone et en 2HIDM dont le substrat est un dérivé méthoxylé (Akashi *et al.*, 2005).

Il semblerait que la réaction de déshydratation puisse également se faire spontanément c'est-à-dire sans intervention d'enzyme dans le cas de certaines 2-hydroxyflavanones instables, mais avec des cinétiques très lentes, ce qui représenterait pour le végétal une voie de biosynthèse alternative, notamment quand une production rapide d'isoflavones n'est pas nécessaire (Dixon *et al.*, 1999).

Comme pour les flavonoïdes, les enzymes de la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes sont organisées en complexe enzymatique (Winkel-Shirley, 2001).

Une modification importante des isoflavonoïdes concerne la 4'-*O*-méthylation du cycle B puisque celle-ci permet notamment l'élaboration des ptérocarpanes (phytoalexines). Cette réaction est catalysée par l'isoflavone *O*-méthyltransférase (IOMT). Il est intéressant de noter que la régiospécificité de cette enzyme est différente *in vivo* et *in vitro* (méthylation en position 7, sur le cycle A, *in vitro*) (Dixon *et al.*, 1999).

### 2.1.2.3. Les roténoïdes

Les roténoïdes (**Figure 11**) constituent une classe d'isoflavonoïdes possédant un cycle supplémentaire. Ils sont présents principalement chez les Fabaceae mais aussi de façon sporadique dans d'autres familles et notamment dans les genres : *Boerhaavia* et *Mirabilis* (Nyctaginaceae) (Santos *et al.*, 1998) ; (S.W. Yang *et al.*, 2001), *Iris* (Iridaceae) (Shaw *et al.*, 1988), *Macaranga* (Euphorbiaceae) (Jang *et al.*, 2004) et *Sarcolobus* (Asclepiadaceae) (Wangenstein *et al.*, 2005). Les roténoïdes sont connus essentiellement pour leur activité insecticide. Les plantes des genres *Derris*, *Lonchocarpus* et *Tephrosia*, connues pour contenir de la roténone, ont longtemps été utilisées comme insecticides. Cet aspect sera développé dans la partie I.2.3.9.

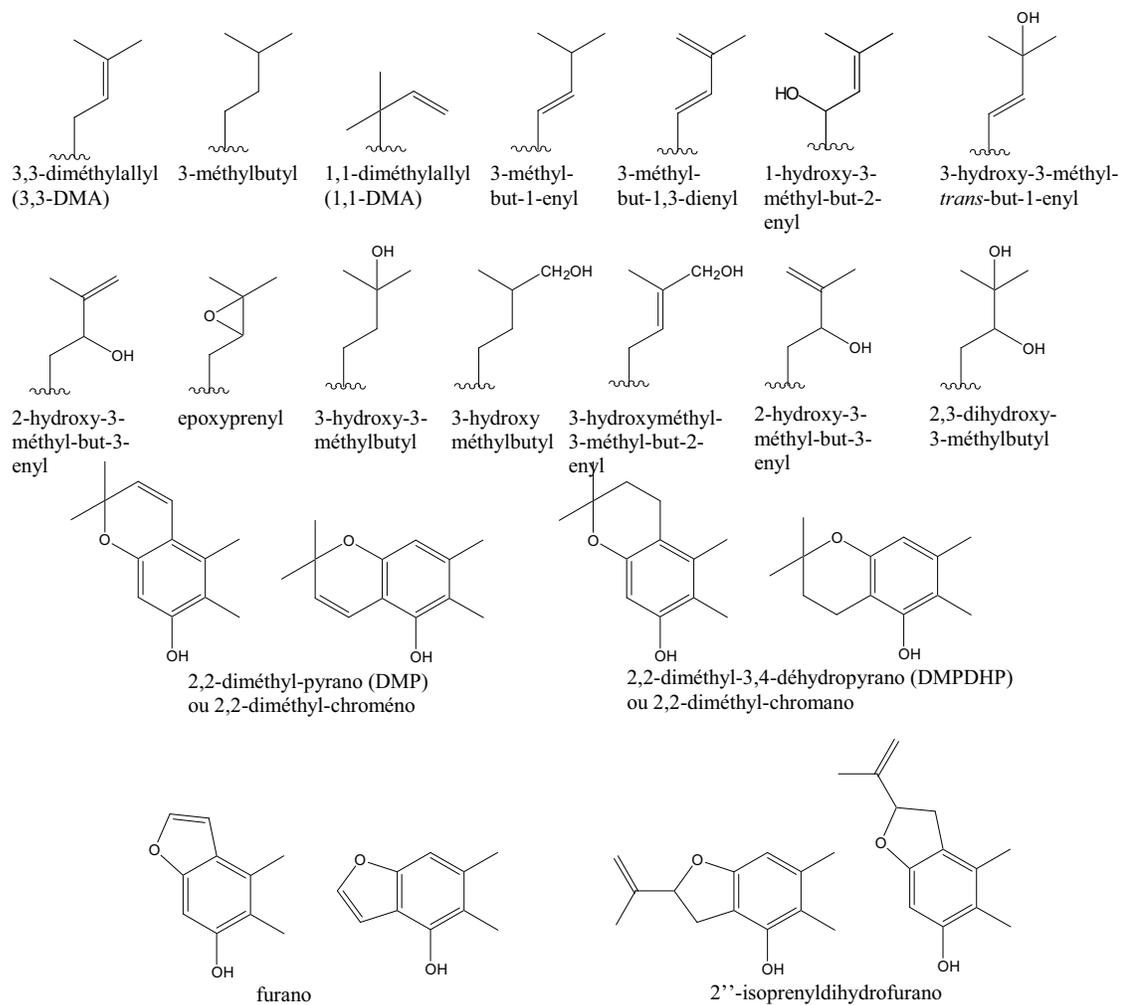
Les roténoïdes proviennent d'une cyclisation oxydative de la 2'-méthoxyisoflavone. Néanmoins, aucune enzyme n'a été mise en évidence pour cette étape (Crombie *et al.*, 1998).

### **2.1.3. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés**

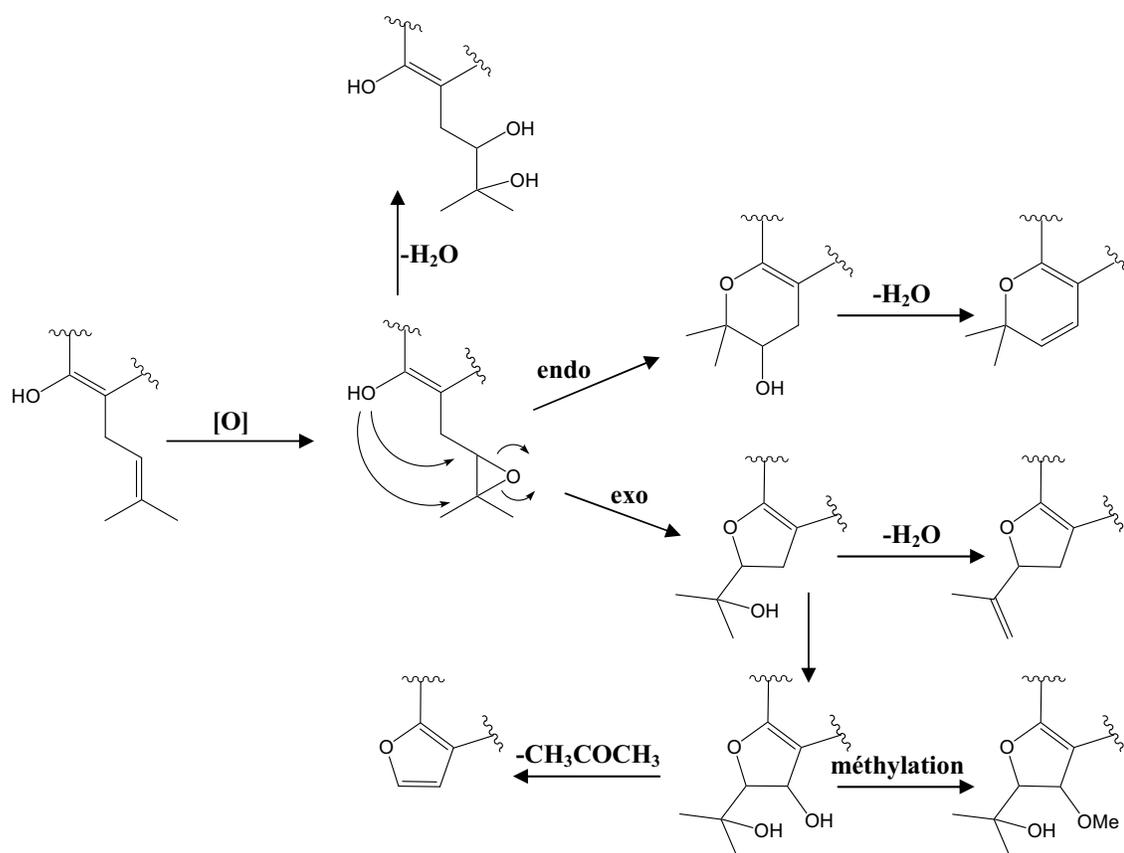
Les métabolites prénylés sont présents chez les plantes, les champignons et les bactéries. Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes prénylés jouent un rôle important dans les mécanismes de défense des plantes (Heide, 2009). Ils sont le plus fréquemment rencontrés dans les racines et les écorces, mais on en retrouve aussi dans les parties aériennes, les bourgeons floraux et les graines (Barron *et al.*, 1996). Même s'il existe une grande diversité de flavonoïdes prénylés, ces composés ont été isolés d'un nombre limité de familles, essentiellement chez les Leguminosae, Moraceae, Cannabaceae, Clusiaceae, Umbelliferae, Rutaceae, Euphorbiaceae et Asteraceae (Barron *et al.*, 1996 ; Yazaki *et al.*, 2009).

Environ 1 000 composés aromatiques prénylés ont été décrits (Sasaki *et al.*, 2008 ; Yazaki *et al.*, 2009), que ce soient des chalcones, des flavones, des flavanols ou encore des isoflavonoïdes (Barron *et al.*, 1996).

Le terme « prénylé » désigne les composés comportant une unité en C5, soit linéaire : diméthylallyle (DMA, également nommée isopentényle), époxyprényle, méthylbutyle, méthylbutényle, avec différentes hydroxylations, soit cyclique : de type furane ou pyrane, plus ou moins hydroxylé (**Figure 13**). Les prénylations cycliques proviennent de la cyclisation d'une unité isopentényle avec un hydroxyle vicinal (**Figure 14**).



**Figure 13** : Quelques types de prénylations rencontrées dans le genre *Derris*, modifié d'après Barron et Ibrahim (1996)



**Figure 14:** Formation des prénylations cycliques

Par extension, ce terme est très souvent utilisé pour définir les composés poly- ou multiprénylés, c'est-à-dire des composés soit avec plusieurs prénylations, soit avec une condensation (allongement de la chaîne) de plusieurs unités en C5. La condensation de 2 unités en C5 donnant un géranyle, un néryle ou un lavandulyle, de trois unités un farnésyle.

Généralement, les flavonoïdes sont C-prénylés, alors qu'une O-prénylation est plutôt rare (Epifano *et al.*, 2007). La C-prénylation se situe en général sur le cycle A en position 6/8 ou sur le cycle B en 3'/5' notamment pour les flavanones et les flavones. La prénylation la plus fréquente consiste en une chaîne 3,3-diméthylallyle (3,3-DMA), mais aussi 1,1-diméthylallyle (1,1-DMA), géranyle et farnésyle (Barron *et al.*, 1996).

Pour les plantes, les composés polyphénoliques prénylés ont un rôle protecteur vis-à-vis des microorganismes pathogènes et des herbivores, ils peuvent aussi agir contre le stress environnemental abiotique ayant en général un fort potentiel antioxydant (Yazaki *et al.*, 2009).

La prénylation du noyau des flavonoïdes permet d'augmenter leur lipophilie et donc leur perméabilité aux membranes, leur biodisponibilité, ce qui expliquerait l'activité

biologiques de ces molécules (Sasaki *et al.*, 2008). Les plantes biosynthétisant ces composés ont souvent été utilisées comme plantes médicinales dans de nombreux pays comme la réglisse utilisée, entre autres, comme anti-inflammatoire en médecine traditionnelle chinoise (Yazaki *et al.*, 2009). Un grand nombre d'activités biologiques leurs sont attribuées : anti-tumorale, anti-bactérienne, anti-virale, antioxydante, anti-tyrosine kinase, estrogénique, ou inhibition de la sulfotransférase, de la production de NO, de la phospholipase (Yazaki *et al.*, 2009).

### 2.1.3.1. Biosynthèse

Encore récemment, il existait peu de données concernant les enzymes impliquées dans les prénylations des composés aromatiques. Ces enzymes sont désignées sous le terme de prényltransférases aromatiques. Certaines sont impliquées dans le métabolisme primaire, comme celles concernant la biosynthèse de la lipoquinone. La première prényltransférase aromatique impliquée dans le métabolisme secondaire chez les plantes a été décrite par l'équipe de Yazaki, qui a cloné une 4HB géranyltransférase (4-hydroxybenzoate géranyltransférase). L'enzyme, dépendante de  $Mg^{2+}$ , semble spécifique du GPP comme substrat, et est localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Yazaki *et al.*, 2002).

Dans le cas précis des flavonoïdes, la première prényltransférase a été identifiée par la même équipe comme la naringénine 8-diméthylallyltransférase (N8DT) de *Sophora flavescens* (Sasaki *et al.*, 2008). La réaction enzymatique est strictement dépendante de  $Mg^{2+}$  et spécifique de DMA.

Il existe également deux paralogues<sup>13</sup> clonés de *Sophora flavescens*, nommés *SfN8DT-2* et *-3* codant pour une protéine très proche avec quasiment la même activité enzymatique.

Le gène codant pour une prényltransférase, spécifique des ptérocarpanes a récemment été identifié à partir du soja et est désigné sous le nom de *GmG4DT* pour glycinol 4-diméthylallyltransférase (G4DT), il possède 50% de similitude avec *SfN8DTs* (Heide, 2009 ; Yazaki *et al.*, 2009).

Dans la biosynthèse des flavonoïdes et des isoflavonoïdes prénylés, les prényltransférases sont localisées dans la membrane, au niveau plasmidique (Heide, 2009 ; Yazaki *et al.*, 2009), mais il existerait des prényltransférases solubles pour d'autres

---

<sup>13</sup> Gènes issus de plusieurs copies ayant évolués indépendamment

groupes de composés (prényltransférase du tétrahydrocannabinol et de l'humulone) (Yazaki *et al.*, 2009).

Pour certains auteurs, la prénylation apparaît comme une modification tardive dans la biosynthèse, la spécificité des prényltransférases semble le confirmer (Barron *et al.*, 1996). A l'inverse, l'équipe de Yazaki émet l'hypothèse que le substrat, notamment pour la N8DT-1, serait assez spécifique (la naringénine) et que le produit prénylé (8-diméthylallylnaringénine) serait ensuite converti en divers composés tels que des flavones ou des flavanols (Yazaki *et al.*, 2009). En effet, en introduisant le gène *SfN8DT-1* chez *Arabidopsis thaliana*, espèce ne produisant normalement pas de composés prénylés, l'organisme transgénique produit et accumule un dérivé 8-prénylé du kaempférol (des-*O*-méthylanthydroicaritine), alors même que ce composé n'est pas accepté comme un substrat par SfN8DT-1 *in vitro*. De plus, lorsque que l'*Arabidopsis* transgénique est alimenté en naringénine, on note un niveau non négligeable de 8-diméthylallylnaringénine, ainsi qu'un niveau similaire de dérivé 8-prénylé du kaempférol et la présence d'apigénine et de quercétine prénylés, alors que ces flavones ne sont pas prénylés *in vitro*. Ces expériences suggèrent donc que la naringénine est tout d'abord prénylée en 8-diméthylallylnaringénine, puis convertie en un certain nombre de dérivés prénylés (Yazaki *et al.*, 2009).

### 2.1.3.2. Modifications de la chaîne prénylée

Les modifications principales de la chaîne prénylée consistent en des oxydations et des réductions de la chaîne principale, des hydroxylations, hydratations et/ou cyclisations avec un hydroxyle vicinal (**Figure 13**). Les cyclisations de la chaîne isoprène semblent être catalysées par des prénylcyclases, de type ptérocarpanes cyclases ou prénylroténones cyclases (Barron *et al.*, 1996).

## 2.2. Fonctions des flavonoïdes pour les plantes

### 2.2.1. *Rôle de protection contre le stress environnemental*

Les plantes étant immobiles, elles ont du mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. La dureté au gel et la résistance à la sécheresse sont parfois attribuées aux flavonoïdes et autres composés phénoliques. Il semblerait notamment que les flavonoïdes antioxydants ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles. Les flavonoïdes sont de puissants piègeurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et préviennent ainsi la peroxydation des lipides (Treutter, 2005).

Les flavonoïdes ont des *maxima* d'absorption dans la gamme des UV-B, et sont retrouvés avec des niveaux élevés dans les couches épidermiques des tissus des feuilles et dans le pollen. De plus, la synthèse de flavonoïdes est rapidement et fortement induite par l'irradiation aux UV-B, une réponse qui est médiée, au moins pour une partie, par le niveau de transcription des gènes biosynthétiques des flavonoïdes (Shirley, 1996). Dans certains cas, ce phénomène est accompagné d'une réduction de la biomasse, une diminution de la germination du pollen et une réduction de l'activité photosynthétique (Harborne *et al.*, 2000). La phénylalanine ammonia lyase (PAL), ainsi que la chalcone synthase (CHS) sont des enzymes inductibles par les UV-B. D'autres enzymes entrant dans la biosynthèse des flavonoïdes sont également inductibles par les UV, en particulier la glucose-6-phosphatase déshydrogénase, la 3-déoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase et la S- adénosyl-homocystéine hydrolase (W.J. Zhang *et al.*, 2009). L'accumulation de certains isoflavonoïdes, existant de manière constitutive, est ainsi stimulée par les radiations UV-B. Il semblerait que la sensibilité des plantes aux radiations UV-B se fait à différents niveaux, notamment (W.J. Zhang *et al.*, 2009) :

- photogénération des ROS et une sensibilité des plantes à ceux-ci ;
- dégradation irréversible de l'ADN (par formation de dimères de nucléotides) ;
- absorption des radiations par des récepteurs UV-B spécifiques avec des *maxima* d'absorption vers 280-290 nm ;

- absorption des radiations par d'autres récepteurs UV-B spécifiques avec des *maxima* d'absorption vers 300-310 nm (W.J. Zhang *et al.*, 2009).

### **2.2.2. Rôles comme composés de défense**

Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés, et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, ou sont uniquement biosynthétisés après une agression et dans ce cas on parle de phytoalexines.

Vanetten *et al* définissent les phytoalexines « *stricto sensu* » comme les composés synthétisés en réponse à une attaque et les phytoanticipines comme les composés présents avant toute attaque (Vanetten *et al.*, 1994).

Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour la défense. Mais les preuves de la relation entre la localisation et les effets bénéfiques pour la plante sont difficiles à trouver. Par exemple, l'occurrence de flavanols dans le noyau de plusieurs espèces d'arbres est encore à débattre. Des études microscopiques mettent en évidence la présence de flavanols dans les anthères de *Camellia sinensis* pendant l'anaphase et la prophase, mais la fonction des flavanols à ce niveau est encore obscure (Treutter, 2005).

#### **2.2.2.1. Interactions plantes-microorganismes**

La plupart des plantes vivent en symbiose ou de manière commensale avec des microorganismes. Les racines de beaucoup de Légumineuses sont colonisées par des bactéries fixatrices d'azote. Beaucoup de flavonoïdes sont sécrétés par les racines des plantes et agissent comme des signaux d'induction de la transcription de gènes bactériens, nommés *nodD*, pour nodulation. Ceci représente une action significative des flavonoïdes dans la croissance et le maintien des plantes. Les flavonoïdes jouant le rôle de molécules de signalisation, sont variés : chalcones, flavones (lutéoline), dihydroxyflavones, flavanones (naringénine), isoflavonoïdes, flavonols, anthocyanidines (Shirley, 1996).

Les flavonoïdes, comme molécules de signalisation, interviennent à d'autres niveaux comme dans les interactions symbiotiques avec les champignons. La colonisation

des plantes par des champignons mycorrhiziens apparaît comme un phénomène universel, permettant de transférer les minéraux, en particulier le phosphore, aux plantes et de transférer les carbohydrates aux champignons (Shirley, 1996). La colonisation des racines de *Medicago truncatula* (alfalfa) par le champignon mycorrhizien *Glomus versiforme* entraîne des changements dans la composition en flavonoïdes et en isoflavonoïdes, ainsi qu'un changement de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces composés (par exemple, la synthèse des isoflavonoïdes agissant comme des phytoalexines est réprimée) (Shirley, 1996).

De nombreuses études mettent en évidence le rôle des isoflavonoïdes comme molécules de signalisation dans les interactions plante-microorganismes. Par exemple, les pterocarpanes, maackiaine et pisatine agissent comme des phytoalexines classiques dans l'interaction entre *Pisum sativum* et le pathogène fongique *Nectria haematococca*. De plus, les enzymes détoxifiant la maackiaine et la pisatine représentent des facteurs de virulence fongique. La pisatine induit la synthèse d'une protéine qui contrôle la transcription de l'enzyme de détoxification de cette dernière. En plus d'agir comme un signal pour la détoxification des phytoalexines, la pisatine et d'autres flavonoïdes, agiraient comme des stimulants de la germination des spores de *Nectria haematococca*. Les isoflavonoïdes des graines de soja, daidzéine et génistéine stimulent l'attraction chémotrope dans les hyphes de l'oomycète pathogène *Phytophthora sojae*, ceci suggère qu'ils pourraient assister les extrémités des hyphes des zoospores proches des racines dans la localisation de leur hôte (Dixon *et al.*, 1999). Ainsi, il semble que les isoflavonoïdes agissent comme de multiples signaux aussi bien pour les microorganismes bénéfiques pour la plante que certains pathogènes, leur rôle apparaît donc comme très complexe dans l'écologie des plantes.

Inversement, les flavonoïdes peuvent aussi être des attractants pour des microorganismes pathogènes, comme *Agrobacterium tumefaciens* ou *Pseudomonas syringae*, et des inducteurs de leur gènes de virulence. Des activités de stimulation de la phagocytose sont également attribuées à divers types de flavonoïdes (Treutter, 2005).

### 2.2.2.2. Interactions plantes-plantes

Des activités antimicrobiennes des flavonoïdes ont été décrites comme participant dans les interactions allélopathiques<sup>14</sup> plante-plante. Les rôles et les modes d'action ne sont pas encore élucidés complètement. Par exemple, la réduction de croissance de certaines graminées (maïs, riz...) peut être causée par la naringénine, entraînant une inhibition de la 4-coumarate CoA ligase et donc de la lignification. D'autre part, *Centaurea maculosa* sécrète au niveau de ses racines de la catéchine (flavanol) qui inhibe la croissance et la germination des graines de *Centaurea diffusa* et d'*Arabidopsis thaliana*. (Treutter, 2005).

### 2.2.2.3. Interactions plantes-pathogènes

Beaucoup de flavonoïdes possèdent des propriétés antifongiques : inhibition de cellulases microbiennes, de xylanases, pectinases, chélation de métaux nécessaires aux enzymes, formation d'une structure dure et cristalline agissant comme une barrière physique aux pathogènes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaire et ainsi promouvoir la formation de thylle<sup>15</sup> et de cal<sup>16</sup>, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs.

Les flavonoïdes jouent aussi un rôle important dans la résistance fongique, après la récolte, des fruits et des légumes. De fortes concentrations en flavonoïdes dans les fruits sont, en effet, très souvent corrélées avec une faible incidence de pathogènes. Cette constatation est d'ailleurs mise à profit pour mieux conserver les fruits. Par exemple, l'irradiation UV de *Citrus aurantium* entraîne une augmentation de la concentration en flavonoïdes et réduit la contamination par *Penicillium digitatum* (Treutter, 2005).

### 2.2.2.4. Interactions plantes-insectes et animaux

Le rôle des flavonoïdes dans les interactions plantes-insectes est très largement accepté. Certains insectes peuvent séquestrer des flavonoïdes synthétisés par les plantes dans leur cuticule pour s'en servir comme défense contre les prédateurs, ou dans leurs ailes pour attirer leurs congénères. Les flavonoïdes peuvent aussi avoir un effet négatif comme substances antiappétantes, comme réducteurs de la digestion et comme toxines.

---

<sup>14</sup> Lorsque un microorganisme ou un végétal inhibe la croissance d'autres organismes par libération de composés dans l'environnement

<sup>15</sup> Excroissance cellulaires ou sécrétion gommeuse qui obstrue les vaisseaux de sèves des arbres

<sup>16</sup> Tissu végétal de cicatrisation qui se forme en réaction à une blessure

De plus, les flavonoïdes possèderaient des effets sur les herbivores. Il semble que des exsudats de *Cistus ladanifer* contenant de l'apigénine et du 3,7-diméthylkaempférol, inhibe le réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), entraînant ainsi une relaxation du muscle squelettique de la bouche de l'herbivore (Treutter, 2005).

### **2.2.3. Rôle dans la fertilité des plantes**

On observe chez des mutants naturels du maïs, une déficience d'activité de la chalcone synthase du pollen, ainsi qu'une stérilité. De même, certaines études ont mis en évidence chez des pétunias transgéniques, dont l'activité de la chalcone synthase est perturbée, une baisse de la fertilité. Que ce soit pour le maïs ou les pétunias, les plantes déficientes en flavonoïdes produisent un pollen qui soit ne peut pas germer, soit éclate pendant la formation du tube pollinique. Une addition exogène de flavonols, au pollen déficient, restore la fertilité (Shirley, 1996). Le fait de retrouver ce rôle dans des espèces aussi éloignées que le maïs et le pétunia suggère un rôle universel des flavonoïdes dans la fertilité. Néanmoins, il a été mis en évidence que les flavonoïdes n'avaient aucun rôle dans la germination chez *Arabidopsis*, *Petroselinum crispum*, *Antirrhinum majus*. Ces résultats suggèrent que ce rôle a été perdu pendant l'évolution ou, au contraire, est apparu chez certaines plantes (Shirley, 1996).

### **2.3. Activités biologiques des flavonoïdes**

Comme il a été présenté précédemment, les flavonoïdes sont souvent des molécules de défense contre les organismes pathogènes, il n'est donc pas surprenant que certains de ces composés possèdent un potentiel en thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), contre les parasites et les insectes. Leur capacité antioxydante peut aussi expliquer un certain nombre de propriétés thérapeutiques. Les isoflavonoïdes, en tant que phytoestrogènes, possèdent de nombreuses activités biologiques.

Toutefois certaines considérations concernant le métabolisme et la biodisponibilité des flavonoïdes sont à prendre en compte. Les flavonoïdes sous leur forme glycosylée ( $\beta$ -glycosides) ne sont pas absorbables. Néanmoins, il existe des enzymes au niveau intestinal capables d'hydrolyser les hétérosides (Crozier *et al.*, 2009). De plus, certains microorganismes présents dans l'intestin sont capables d'hydrolyser les  $\beta$ -glycosides en

aglycones et ainsi leur permettre de franchir la barrière intestinale (Hodek *et al.*, 2002). On note également l'action de transporteurs de la famille ABC (Pgp et MRP) qui vont entraîner un efflux des métabolites au niveau intestinal (Crozier *et al.*, 2009). Des inactivations sont également possibles au niveau du métabolisme entéro-hépatique avec notamment l'intervention de cytochromes P450. Les flavonoïdes interagissent avec les cytochromes P450 à plusieurs niveaux : en induisant la biosynthèse de P450 ou en modulant leur activité enzymatique (inhibition ou stimulation). Les flavonoïdes sont aussi métabolisés par les P450, ce qui peut conduire soit à une augmentation de leur activité *in vivo* (métabolite plus actif) soit à une diminution (métabolisation en composés peu actifs) (Hodek *et al.*, 2002). Les flavanones et les flavanes sont peu influencées par les P450 en raison de leur structure non plane (Hodek *et al.*, 2002).

### **2.3.1. Activités antimicrobiennes**

#### **2.3.1.1. Activité antibactérienne**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antibactériennes (Cushnie *et al.*, 2005). Des synergies ont été mises en évidence pour certaines de ces molécules (Cushnie *et al.*, 2005). Des études *in vivo* sur animaux se sont révélées encourageantes (quercétrine chez le cochon d'inde infectés par *Shigella*, sophoraisoflavone en injection intrapéritoneale chez des souris infectées par *Salmonella thyphimurium*) (Cushnie *et al.*, 2005).

De nombreux ptérocarpanes sont connus comme bactéricides ou bactériostatiques, en particulier vis-à-vis des bactéries Gram + (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008). Pour ces composés, il semble que la présence de 2 groupements hydroxyles libres soit essentielle à l'activité (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Il a été démontré que les 5-hydroxyflavanones et les 5-hydroxyisoflavanones avec un, deux ou trois groupements hydroxyles en position 7, 2' et 4' inhiberaient la croissance de *Streptococcus* sp., l'hydroxylation la plus importante pour l'activité étant celle en position 2'. Par contre, les méthoxylations diminuent considérablement les effets antibactériens (Cushnie *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité (Cushnie *et al.*, 2005). Certains

pourraient inhiber la topoisomérase IV et ainsi perturber la décaténation et le clivage de l'ADN, provoquant un message SOS et une inhibition de la croissance bactérienne (Cushnie *et al.*, 2005). La sophoroflavanone G, certaines catéchines (flavan-3-ols), la 2,4,2'-trihydroxy-5'-methylchalcone, la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire. Les licochalcones interféreraient avec le métabolisme énergétique en inhibant la NADH-cytochrome c réductase (Cushnie *et al.*, 2005)

- anti SAMR (*Staphylococcus aureus* méticilline résistants)

Il est suggéré que les isoflavonoïdes agiraient en interférant avec l'incorporation de métabolites et de nutriments dans les cellules bactériennes ou en affectant les acides nucléiques des MRSA (Botta *et al.*, 2009). Il semble que la position des prénylations soit importante pour l'activité. En effet, on retrouve des meilleures activités avec des groupements isoprényles en position 3' (sur le cycle B) et en 6 (cycle A). De plus, une hydroxylation en position 5 augmenterait l'activité. La présence d'un groupement hydroxyle aliphatique sur l'isoprényle pourrait être mis en relation avec une action sur les souches de *S. aureus* méticilline résistantes (Botta *et al.*, 2009). De plus une dihydroxylation en méta, soit sur le cycle A soit sur le cycle B, augmente l'activité (Halbwirth, 2010).

Pour les flavanones, une étude indique qu'une 2',4' ou 2',6'-dihydroxylation sur le cycle B et une 5,7-dihydroxylation sur le cycle A sont importantes pour l'activité anti-SAMR. Une substitution en position 6 ou 8 avec une longue chaîne aliphatique (type géranyle ou lavandulyle) augmente l'activité (Cushnie *et al.*, 2005).

- action sur les bactéries impliquées dans la formation des caries dentaires

L'érichristagalline (isoflavonoïde prénylé) apparaît comme un agent intéressant pour la prévention des caries dentaires en inhibant la croissance bactérienne et en interférant avec l'incorporation du glucose, diminuant ainsi la synthèse d'acides organiques (Botta *et al.*, 2009).

- action sur *Helicobacter pylori*

Des roténoïdes prénylés ont montré une activité sur *H. pylori* par inhibition de l'oxydation de NADH de la chaîne respiratoire de la bactérie. La présence de carbones saturés en 6a et 12a semble indispensable à l'activité, de plus le cycle E doit être un cycle à 6 (Botta *et al.*, 2009 ; Takashima *et al.*, 2002). Des isoflavonoïdes de la réglisse ont également une action sur *H. pylori* (Botta *et al.*, 2009).

### 2.3.1.2. Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushnie *et al.*, 2005).

Le groupe des ptérocarpanes regroupe de nombreux antifongiques. Il semblerait que l'activité des ptérocarpanes soit due à la configuration particulière de ces molécules (structure plane), de plus, la présence de substituants oxygénés en position 3 et 9 apparaît comme essentielle à l'activité (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994). De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

### 2.3.1.3. Activité antivirale

La génistéine, ainsi que d'autres flavonoïdes (quercétine, kaempférol, 5,6,7-triméthoxyflavone, 3-méthylkaempférol) sont actifs *in vitro* sur plusieurs souches virales, que ce soit des virus non-enveloppés (poliovirus, adénovirus) ou des virus enveloppés (Retroviridae comme VIH, Flaviviridae, Herpes virus...). Le flavonoïde le plus étudié est de loin la génistéine, néanmoins les mécanismes d'action ne sont pas clairement élucidés (Andres *et al.*, 2009). La génistéine pourrait être active en inhibant la PTK (inhibition de l'entrée du virus), en inhibant la phosphorylation de la glycoprotéine E et d'autres polypeptides viraux (inhibition de l'assemblage du virus), en inhibant la sécrétion du facteur TNF- $\alpha$ , ou en inhibant l'expression de certains gènes viraux (inhibition de la réplication virale) (Andres *et al.*, 2009).

Des isoflavanones ainsi que des isoflavonoïdes prénylés ont une activité antivirale sur le VIH, des études suggèrent qu'une absence de groupement hydroxyle en position 4' et une absence de tout substituant en position 5 est nécessaire à l'activité (Botta *et al.*, 2009).

Des flavones (baicaléine, robustaflavone, hinokiflavone) sont décrites comme inhibant la reverse transcriptase du VIH-1, d'autres (gardénine A, 3,2'-dihydroxyflavone) inhibent la protéinase de VIH-1, l'intégrase de VIH-1 ou la transcription virale (Cushnie *et al.*, 2005). Dans une étude concernant 34 flavonoïdes naturels ou de synthèse, la chryisine apparaît comme la molécule présentant le meilleur index thérapeutique contre VIH-1 (Cushnie *et al.*, 2005).

Plusieurs mécanismes d'actions sont proposés, incluant une inhibition de la polymérase virale, un attachement à l'acide nucléique viral ou aux protéines de la capsid virale (Cushnie *et al.*, 2005).

### **2.3.2. Activités antiparasitaires**

De nombreux flavonoïdes possèdent des propriétés antiparasitaires. Les plantes contenant des roténoïdes, dont en particulier la roténone, ont longtemps été utilisées pour lutter contre les ecto et les endo-parasites. D'ailleurs des formulations vétérinaires existent. La roténone représente ainsi le principe actif (0,1 à 10%) de quelques formulations acaricides à usage externe pour les chats, les chiens, les ruminants et les porcs.

#### **2.3.2.1. *Plasmodium* sp.**

Le paludisme est certainement la parasitose la plus importante avec 300 à 600 millions de cas cliniques et près d'un million de morts par an dans le monde (Wright, 2010). Les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées (en particulier les personnes atteintes du VIH) sont les plus touchés. Les agents responsables sont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*, les formes les plus sévères étant imputées à *P. falciparum*.

La génistéine possède une activité contre *P. falciparum* (Botta *et al.*, 2009). Un certain nombre d'isoflavonoïdes prénylés dont des roténoïdes inhibent la croissance de différentes souches de *P. falciparum*. Il a été observé que les roténoïdes contenant une unité prényle ou 2,2-diméthylpyrano sont plus actifs que les roténoïdes non prénylés. De plus, la présence du carbonyle en 5 semble indispensable à l'activité (Botta *et al.*, 2009). L'artémétine et la casticine (flavanols polyméthoxylés) agissent sur *P. falciparum* en synergie avec l'artémisinine (Kayser *et al.*, 2003). Des biflavonoïdes sont également connus comme de bons antiplasmodiaux (Batista *et al.*, 2009). Des chalcones prénylées

(lichochalcone A et méthyllindératine) sont actives contre *Plasmodium* sp. *in vitro* et *in vivo* (Wright, 2010).

Le mode d'action des flavonoïdes n'est pas encore totalement élucidé mais il semblerait que certains inhibent l'influx de L-glutamine et de myoinositol dans les érythrocytes infectés (Magadula *et al.*, 2009), (Kaur *et al.*, 2009). Ils pourraient aussi agir sur la génération de ROS, ou inhiber certains transporteurs de type P-glycoprotéine (Kayser *et al.*, 2003).

### 2.3.2.2. *Leishmania* sp.

Les leishmanioses sont dues à une vingtaine d'espèces de *Leishmania*. Les formes cutanées et cutanéomuqueuses entraînent notamment des nécroses du nez et de la bouche. La forme la plus sévère, la leishmaniose viscérale, ou Kala-azar, présente comme tableau clinique : fièvre, toux, douleurs abdominales, diarrhée, épistaxis, splénomégalie, hépatomégalie, cachexie et cytopénie, elle est associée à une forte mortalité (41 000 morts/an). Cette forme est essentiellement due à *L. donovani* en Inde et l'Afrique de l'Est, *L. infantum* dans la région méditerranéenne et de *L. chagasi* en Amérique du Sud (Guerin *et al.*, 2002). Alors que pour *L. donovani*, l'homme représente le seul réservoir, pour *L. infantum* et *L. chagasi* le chien joue un rôle important dans la contamination (Romero *et al.*, 2010). On compte 500 000 nouveaux cas par an. L'arsenal thérapeutique est très limité pour cette infection (antimoniés, amphotéricine B, pentamidine, kétoconazole, itraconazole, allopurinol), avec notamment apparition de résistances, nombreux effets indésirables et des coûts élevés de traitement (Griensven *et al.*, 2010).

Dans une étude, menée par Tasdemir *et al.* (2006), sur une centaine de flavonoïdes testés pour leur activité contre *Leishmania donovani*, pratiquement toutes les flavones et les flavon-3-ols sous forme aglycone sont actifs. Pour les flavones, la présence de deux OH, en particulier en positions 5, 7 et 8 augmente l'activité, alors que des méthoxylations diminuent cet effet (Tasdemir *et al.*, 2006). Les composés avec la meilleure activité sont les flavon-3-ols, les méthoxylations diminuent l'activité. Les hydroxylations ont une influence sur l'activité, mais il est difficile d'établir des relations structures activités, néanmoins le flavan-3-ol le plus actif comporte 4 hydroxyles (fisétine). De plus, une glycosylation en position 3 et 5 diminue drastiquement l'activité. Même si les flavanones aglycones et les flavan-3-ols testées possèdent une activité, ces composés sont moins actifs que les flavones et flavon-3-ols correspondants, ce qui suggère l'importance de la double

liaison en 2,3 dans l'activité antileishmanienne. De plus, la fonction cétonique en position 4 est essentielle à l'activité (Tasdemir *et al.*, 2006).

Des isoflavonoïdes prénylés possèdent une activité antiparasitaire sur *Leishmania* sp. (Botta *et al.*, 2009). La place de la prénylation semble importante pour l'activité (Batista *et al.*, 2009).

### 2.3.2.3. *Trypanosoma* sp.

*Trypanosoma cruzi* est l'agent responsable de la trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas, parasitose endémique en Amérique latine avec 40 000 nouveaux cas et 12 500 morts par an. Le nombre de personnes infectées est de 16 à 18 millions (Lescure *et al.*, 2010). La maladie de Chagas présente deux phases : une phase aigue caractérisée par une inflammation souvent affectant le myocarde, et une phase chronique autoimmune avec destruction du muscle myocardique (Lescure *et al.*, 2010). Le nifurtimox (Lampit®) est utilisé en phase aigue alors que la chirurgie est préconisée dans la phase chronique.

*T. brucei rhodiense* et *T. brucei gambiense* sont responsables de la trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil qui touche 500 000 personnes /an en Afrique subsaharienne (Tasdemir *et al.*, 2006). Le mélarsopol, la pentamidine, la suramine et l'éflornithine constituent les traitements disponibles.

La génistéine est active *in vitro* sur *T. brucei brucei* (Botta *et al.*, 2009). Tasdemir *et al.* ont évalué l'activité d'une centaine de flavonoïdes contre *T. brucei rhodesiense*. Les composés glycosylés ont une activité inférieure à celles des aglycones correspondantes. La double liaison en 2,3 est importante pour l'activité, les flavanones et les flavan-3-ols étant moins actifs que les flavones et flavon-3-ols correspondant. La cétone en position 4 est nécessaire à l'activité. Les isoflavonoïdes non glycosylés testés possèdent une activité importante contre *T. brucei rhodesiense* (Tasdemir *et al.*, 2006). De plus, une méthylation sur le cycle B ou le cycle C tend à diminuer l'activité (Izumi *et al.*, 2011). Des isoflavonoïdes proches de la génistéine (apigénine, isokaempferide) présentent également une bonne activité contre *T. cruzi* (Uchiyama, 2009). De nombreuses flavanones prénylées sont actives contre *T. cruzi*, les dérivés portant un groupement lavandulyle apparaissent comme les plus actifs. Il semble que la prénylation joue un rôle dans l'activité, en effet la naringénine (composé non prénylé) ne possède aucune activité (Uchiyama, 2009).

Le mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, néanmoins il semblerait les flavonoïdes agiraient par modulation de protéines de phosphorylation sur la protéine kinase SPK89 chez les trypanosomes (Kayser *et al.*, 2003).

### **2.3.3. Activités estrogéniques et anti-estrogéniques**

Ces activités sont dues essentiellement aux isoflavonoïdes qui font partie des phytoestrogènes. Un phytoestrogène peut être défini comme toute substance issue de plante qui est capable d'induire ou de moduler une réponse estrogénique chez les vertébrés en se liant à des récepteurs estrogéniques. Les phytoestrogènes regroupent des flavanones, des lignanes, des coumestanes et beaucoup d'isoflavonoïdes (Chatenet, 2008).

#### **2.3.3.1. Les récepteurs aux estrogènes**

Les phytoestrogènes se lient aux récepteurs nucléaires aux estrogènes présents sous 2 isoformes : ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Ces récepteurs sont tous les deux impliqués dans le développement des follicules ovariens, dans la vascularisation endothéliale, dans le fonctionnement des cellules cardiaques par exemple. Les récepteurs ER $\alpha$  sont impliqués dans la maturation osseuse que ce soit chez les hommes ou chez les femmes, alors que l'isoforme ER $\beta$  intervient dans la construction osseuse uniquement chez la femme. De plus, ER $\alpha$  est impliqué dans la stimulation folliculaire et dans le maintien de la concentration en lutéine dans le sang, alors que ER $\beta$  est plutôt impliqué dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Cornwell *et al.*, 2004). Les phytoestrogènes se lieraient préférentiellement aux récepteurs ER $\beta$ , alors que les estrogènes endogènes se lient aussi bien aux 2 isoformes (Strauss *et al.*, 1998).

#### **2.3.3.2. Principales sources de phytoestrogènes**

Les principales isoflavones : biochanine A, daidzéine, formononétine, glycitéine, génistéine, sont présentes dans le soja, les trèfles, les pois chiches, l'orge, le seigle, les arachides. On retrouve dans la réglisse, la glabrène et la glabridine, isoflavanes estrogéniques. Le houblon est également une source de nombreuses flavanones estrogéniques : naringénine, 8- et 6-prénylnaringénine, iso- et xanthohumol (Virk-Baker *et al.*, 2010).

### 2.3.3.3. Activités des phytoestrogènes

Beaucoup d'études épidémiologiques ont montré que dans les pays asiatiques, la prévalence de certains cancers est plus faible (consommateurs d'aliments à base de soja) que dans les pays occidentaux. Il apparaît que la consommation d'isoflavones de soja réduit le risque de cancer du sein. Les phytoestrogènes posséderaient une action bénéfique sur plusieurs autres types de cancers : de l'endomètre, de la prostate (Morton *et al.*, 1998), du testicule, du colon, de la thyroïde, de la vessie (Cornwell *et al.*, 2004). Dans le même sens, les cellules impliquées dans le remodelage osseux étant étroitement régulées par de nombreux facteurs hormonaux, les phytoestrogènes pourraient donc avoir un effet contre l'ostéoporose (Marie *et al.*, 2008). Néanmoins, ces effets bénéfiques sont à confirmer par d'autres études.

Les phytoestrogènes peuvent également se lier aux récepteurs nucléaires stéroïdiens comme ceux des androgènes et de la progestérone, ou agir sur d'autres fonctions nucléaires notamment sur l'inhibition des topoisomérases II, ce qui expliquerait leurs effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques, et sur l'inhibition de la néo-angiogénèse (Chatenet, 2008). De plus, les phytoestrogènes peuvent agir sur le métabolisme des estrogènes, en bloquant par exemple certaines enzymes comme l'aromatase qui intervient dans la conversion des androgènes en estrogènes (Chatenet, 2008 ; Morton *et al.*, 1998). Ils peuvent également réduire la production d'hormones thyroïdiennes par inhibition de la peroxydase thyroïdienne (Chatenet, 2008).

Les estrogènes ont naturellement un rôle athéroprotecteur, ainsi les phytoestrogènes permettraient de diminuer la formation de la plaque athéroscléreuse et auraient ainsi un rôle dans la prévention des maladies coronaires cardiovasculaires (Tikkanen *et al.*, 2000). Néanmoins, le mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé.

Les récepteurs aux estrogènes étant largement présents dans le système nerveux central, il semble que les phytoestrogènes aient des effets sur les fonctions cognitives : un effet antidépresseur par inhibition de la recapture de la sérotonine, des perturbations de la fonction de reproduction en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (Cornwell *et al.*, 2004 ; Lephart *et al.*, 2002), une amélioration de la mémorisation et de la flexibilité mentale (Jamali *et al.*, 2010).

### **La génistéine et ses dérivés (isoflavonoïdes)**

La génistéine induit les mêmes effets que l'œstradiol au niveau mammaire, des ovaires, de l'endomètre, de la prostate, du système vasculaire et du tissu osseux (Cornwell *et al.*, 2004). Mais dans certains tissus, la génistéine agit comme un antagoniste de l'œstradiol (Cornwell *et al.*, 2004). De plus, la génistéine peut agir sans se lier aux récepteurs ER, on parle alors d'effets non-génomiques, comme par exemple l'inhibition de tyrosine kinase.

La prénylation et l'hydroxylation des isoflavonoïdes sont souvent liés à un effet anti-estrogénique. Il a été démontré que la génistéine prénylée possédait une activité anti-estrogénique similaire à celle du 4-hydroxytamoxifène (Y. Zhang *et al.*, 2008). La prénylation en position 6 et 8 sur le cycle A, une hydroxylation de la chaîne 6-prényl, une substitution de type catéchol sont associées à une activité anti-estrogénique (Botta *et al.*, 2009). Au contraire, la cyclisation de la chaîne prénylée sur le cycle A et l'hydroxylation de l'unité 8-prényl entraînent une diminution de l'activité anti-estrogénique (Botta *et al.*, 2009).

Au niveau de la remodelation osseuse, il semble que seule une prénylation en position 8 (sur le cycle A,) induise un effet bénéfique. En effet, la 8-prénylgénistéine et la 6,8-diprénylgénistéine peuvent stimuler la croissance des cellules ostéoblastiques, la différenciation des ostéoblastes et la déposition minérale de la matrice extracellulaire. A l'inverse une prénylation en 6 ne peut que supprimer la prolifération et la maturation des ostéoblastes, mais ne possède aucun effet sur les fonctions des cellules ostéoblastiques (différenciation cellulaire et minéralisation de la matrice extracellulaire) (Y. Zhang *et al.*, 2008).

### **La naringénine et ses dérivés (flavanones)**

La naringénine possède un effet anti-estrogénique par inhibition compétitive de la fixation aux récepteurs estrogéniques (Strauss *et al.*, 1998).

La 8-prenylnaringénine, extraite du houblon, apparait comme l'un des meilleurs phytoestrogènes (Milligan *et al.*, 2002). Ce composé est isolé du houblon dans des proportions équivalentes sous forme de (*R*) et (*S*)-8-prenylnaringénine, ce qui indique que ce composé n'est pas formé de manière enzymatique (Milligan *et al.*, 2002). Les 2 énantiomères montrent la même activité *in vitro* et se lient de la même façon aux

récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Milligan *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que certains de ces métabolites possèdent les mêmes activités (comme la 8-prenylapigénine), alors que d'autres ont des activités opposées (Nikolic *et al.*, 2004). Une prénylation de la naringénine en position 8 augmente l'effet estrogénique (Kretzschmar *et al.*, 2010). La plupart des dérivés de la naringénine prénylés en position 6 ne possèdent pas d'activité estrogénique, à l'exception de la 6-(1,1-diméthylallyl)-naringénine (Kretzschmar *et al.*, 2010 ; Kitaoka *et al.*, 1998).

Malgré de nombreuses études présentant les phytoestrogènes pour leurs potentiels thérapeutiques, les informations concernant la toxicité de ces molécules manquent. En effet, étant donné les résultats des études sur les traitements hormonaux substitutifs (sur-risque de cancer du sein chez les femmes utilisant un THS estroprogestatif, augmentation du risque coronarien...), on peut s'interroger sur les effets à long terme de ces composés. Des études complémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'efficacité et l'inocuité des phytoestrogènes, en raison de :

- la complexité des mécanismes mis en jeu ;
- la difficulté à comparer les études (doses administrées, voies d'administration, durée du traitement) ;
- la grande diversité de structures des phytoestrogènes ;
- leur fixation préférentiellement sur l'un ou l'autre des isoformes des récepteurs estrogéniques ;
- les effets parfois opposés en fonction des doses ;
- les nombreux effets non-génomiques.

### **2.3.4. Potentiel antioxydant**

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes est conditionnée par (Halbwirth, 2010 ; Kale *et al.*, 2008 ; Mladinka *et al.*, 2010 ; Rufer *et al.*, 2006):

- pour le cycle C : la présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4, et une hydroxylation en 3 ;
- pour le cycle A : une dihydroxylation en 5,7 ;
- pour le cycle B : une *ortho*-dihydroxylation.

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes (Halbwirth, 2010 ; Leopoldini *et al.*,

2010). Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule (Halbwirth, 2010). Les 3 sites de chélation principaux se situent (Mladinka *et al.*, 2010) :

- entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4 ;
- entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4 ;
- entre les deux hydroxyles en position 3' et 4' sur le cycle B.

Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber des lipoxygénases (LOXs), soit directement, soit indirectement par la chélation d'ions métalliques. Les lipoxygénases catalysent l'oxydation d'acide arachidonique en acides gras polyinsaturés (Mladinka *et al.*, 2010).

Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, il apparaît que la double liaison C2-C3 soit indispensable à cette activité. La NADPH oxydase peut aussi être inhibée par des flavonoïdes. Les composés dont la liaison C2-C3 est saturée sont les plus actifs, de plus, une hydroxylation placée en position *mé*ta d'une méthylation sur le cycle B augmente l'activité inhibitrice sur la NADPH oxydase (Mladinka *et al.*, 2010).

En ce qui concerne le cas particulier des isoflavonoïdes, il apparaît que le potentiel antioxydant dépend de plusieurs caractéristiques structurales (Rufer *et al.*, 2006):

- une dihydroxylation en 5,7 ;
- une *ortho*-dihydroxylation sur le cycle A ou le cycle B augmente l'activité ;
- l'importance de phénol libre, notamment la méthylation du groupe hydroxyle en 4' ou une sulfo ou une glucurono-conjugaison avec l'hydroxyle en 7 diminue la capacité antioxydante des isoflavonoïdes (Rufer *et al.*, 2006).

La génistéine peut inhiber l'oxydation dans des systèmes lipidiques simples (liposomes) mais aussi dans des systèmes plus complexes. Néanmoins, cette inhibition est indépendante du système oxydatif et arrive aussi bien dans des procédés dépendant des métaux que non dépendants (Patel *et al.*, 2001). Les isoflavonoïdes réagiraient, à l'instar de la vitamine E (tocophérol) avec des radicaux lipidiques peroxylés, formant l'hydroperoxyde correspondant et le radical polyphénol. Ensuite, ce radical réagirait avec un second radical lipidique peroxylé dans une réaction classique antioxydante, et régénérerait l'isoflavonoïde de départ (Patel *et al.*, 2001).

### **2.3.5.    *Activité antiproliférative et anticarcinogénique***

De nombreuses études épidémiologiques semblent indiquer que des régimes basés sur une importante consommation de fruits et légumes riches en flavonoïdes sont corrélés avec des incidences plus faibles de cancers.

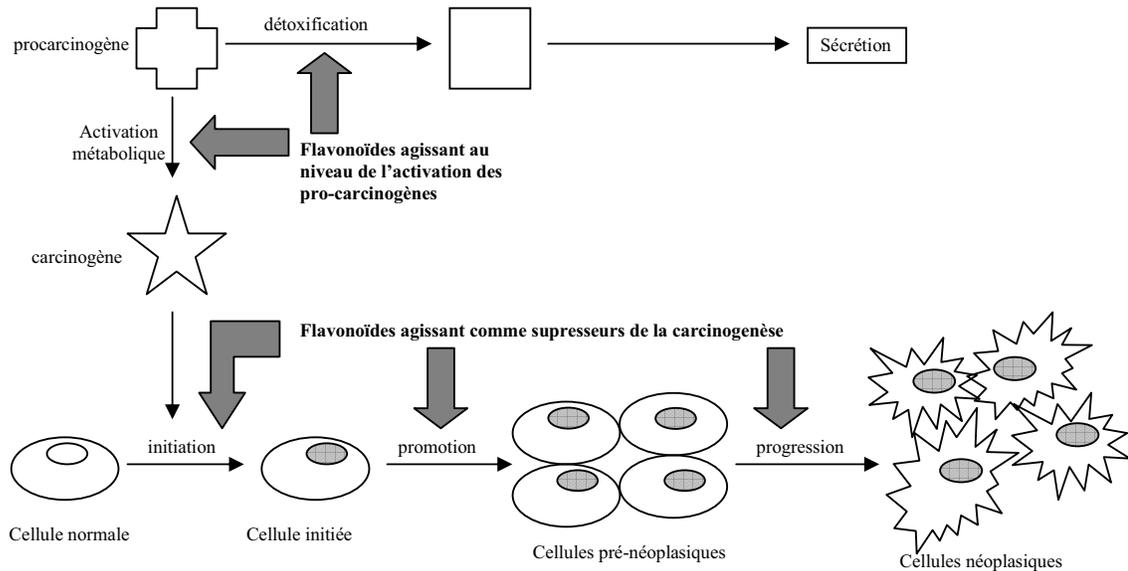
Dans une étude évaluant la cytotoxicité de plus de 100 polyphénols de bas poids moléculaire, sur des lignées cellulaires normales et tumorales, il apparaît que les composés sont plus actifs sur les souches cancéreuses que sur les lignées saines (Fukai *et al.*, 2000). Les composés les plus actifs possèdent un groupe hydrophile (hydroxylation) en position vicinale d'un groupe hydrophobe (prényle ou phényle) (Botta *et al.*, 2009 ; Fukai *et al.*, 2000). La cytotoxicité des flavones prénylées est supérieure à celle des mêmes composés sans substituant. Par contre, il semble que la prénylation ne change pas significativement la cytotoxicité des flavanones, des isoflavanes, des chalcones et des 5-hydroxy-3-phenoxychromen-4-ones, à l'exception de la prénylation de la génistéine (isoflavone) qui augmente de manière significative sa cytotoxicité (Fukai *et al.*, 2000).

Les isoflavonoïdes en particulier peuvent prévenir les cancers hormonaux-dépendants en agissant sur les récepteurs ER (Partie 1.2.3.4). Le soja est l'aliment le plus riche en isoflavones avec 1-3mg/g de poids sec, le composé majoritaire parmi ces isoflavonoïdes étant la génistéine. Il semble qu'un régime riche en génistéine inhibe la croissance des tumeurs de la prostate, en réduisant à la fois le nombre de tumeurs et la taille de ces tumeurs (Boersma *et al.*, 2001 ; Morton *et al.*, 1998). Néanmoins, les métabolites de la génistéine (composés halogénés) apparaissent prépondérants dans cette activité (Boersma *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes agissent à différents niveaux du processus de carcinogénèse.

### 2.3.5.1. Inhibition métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes

Les flavonoïdes peuvent agir comme des bloqueurs de l'activation métabolique des pro-carcinogènes en carcinogènes, dans ce cas ils permettent une détoxification et/ou une élimination des carcinogènes (Figure 15).



**Figure 15** : Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la carcinogenèse (modifié d'après Kale *et al.* (2008))

Les flavonoïdes réduisent l'activation de procarcinogènes en carcinogènes en interagissant avec des cytochromes P450, soit en induisant la synthèse de certains cytochromes (CYP1A1 et CYP1A2, CYP1B1), soit par ce qu'ils sont métabolisés par certains cytochromes, soit en modulant les activités enzymatiques de certains (stimulation ou inhibition). Les cytochromes CYP1A1 et CYP1B1 sont surexprimés dans les tissus tumoraux et métabolisent les procarcinogènes en carcinogènes (Androutsopoulos *et al.*, 2010). Par exemple, la quercétine stimule l'expression de CYP1A2, alors que les composés non hydroxylés comme la 7,8-benzoflavone inhibe ce cytochrome. Dans le même sens, certains flavonoïdes inhibent ou induisent le cytochrome CYP3A4 qui intervient dans la métabolisation d'environ 50% de principes actifs et dans l'activation de certains carcinogènes (Kale *et al.*, 2008 ; Alvarez *et al.*, 2010). Il semble important pour que les flavonoïdes puissent se lier au CYP1A2 que la molécule possède plusieurs groupements hydroxyles (de préférence en position 5 et 7, et en position 2 pour les flavanols). Néanmoins, la présence d'un trop grand nombre d'hydroxyles (quatre et plus) diminue l'affinité pour CYP1A1 et CYP1A2 (Androutsopoulos *et al.*, 2010). De plus une structure

plane de la molécule semble indispensable. Ce dernier point expliquerait pourquoi les flavanones et les flavanes (dont le cycle B est presque perpendiculaire au reste de la molécule) sont beaucoup moins actifs que les autres flavonoïdes. Une glycosylation entraîne une diminution de l'activité (Kale *et al.*, 2008). Une méthylation en 4' (cycle B) augmente l'affinité (Androutsopoulos *et al.*, 2010). Une cétone en position 4 est aussi essentielle à l'activité inhibitrice sur CYP1A2, le fait que les catéchines n'aient aucune activité semble le confirmer. Certains flavonoïdes interagissent aussi avec d'autres enzymes impliquées dans la détoxification. Par exemple, des flavanones et des flavones augmentent l'activité de la GST et de l'UGT (Kale *et al.*, 2008).

#### **2.3.5.2. Agents supprimeurs de la carcinogénèse**

Ils interviennent également comme des agents supprimeurs que ce soit au niveau de l'initiation, de la promotion ou de la progression tumorale (**Figure 14**).

En tant qu'agents supprimeurs de tumeurs, les flavonoïdes interviennent à différents niveaux. En outre, ils peuvent inhiber les topoisomérases I et II, différentes protéines kinases, ils peuvent également cibler l'apoptose et ainsi induire une mort des cellules tumorales. L'EGCG (gallate d'épigallocatechine) et la quercétine, en se liant au récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), peuvent supprimer la prolifération ou induire l'apoptose (Kale *et al.*, 2008).

Les isoflavonoïdes prénylés apparaissent comme de bons inhibiteurs de la PLC $\gamma$ I (phosphatidylinositol phospholipase C, isoforme  $\gamma$ ), enzyme intervenant dans la prolifération anormale des cellules. De nombreux roténoïdes possèdent des propriétés antiprolifératives et anti-carcinogéniques (Botta *et al.*, 2009).

La quercétine inhibe la  $\beta$ -caténine, protéine intracellulaire impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire des épithéliums gastriques et colorectaux (Pierini *et al.*, 2008).

#### **2.3.5.3. Action sur la résistance des cellules tumorales**

Certains inhibent la glycoprotéine P-gp et d'autres transporteurs d'efflux (Kale *et al.*, 2008 ; Alvarez *et al.*, 2010 ; Colabufo *et al.*, 2010). Ces transporteurs jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de résistances des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. En effet, ils interfèrent avec la biodisponibilité, la pharmacocinétique et la

pharmacodynamie des anticancéreux.. La présence d'un hydroxyle non substitué en position 5 est importante à l'activité contre P-gp (Kale *et al.*, 2008). Les composés prénylés auraient une meilleure affinité pour P-gp (Alvarez *et al.*, 2010).

Deux flavones (6-prénylchrysine et tectochrysine) apparaissent comme des inhibiteurs spécifiques de l'ABCG2 (transporteur impliqué dans les phénomènes MDR dans le cancer du sein). Il semble qu'une hydroxylation en position 5 (cycle A) augmente l'activité, alors qu'une hydroxylation en position 3 diminue l'activité. De plus, sur ce modèle, une prénylation en position 8 augmente plus l'activité qu'en position 6 (Ahmed-Belkacem *et al.*, 2005).

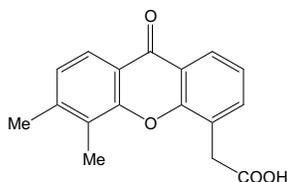
Certaines ptérocarpanes (4-hydroxymaackiaine, érybraéine C, bitucarpine A) possèdent la même activité que l'étoposide sur des cellules humaines d'adénocarcinome de colon ou induisent l'apoptose sur cellules HL-60 (leucémie humaine) (2,3,9-triméthoxyptérocarpane, homotérocarpane, medicarpine, vesticarpine) (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

#### 2.3.5.4. Action sur la vascularisation des tumeurs

Un effet antitumoral peut-être exercé en inhibant la néovascularisation des tumeurs (composés anti-angiogéniques), ou encore en détruisant la vascularisation déjà existante (agents perturbateurs de la vascularisation tumorale). Les seconds composés en détruisant la vascularisation tumorale préexistante, entraînent un arrêt du flux sanguin dans la tumeur et mènent à une nécrose de la tumeur.

Certains flavonoïdes possèdent cette propriété soit en induisant une apoptose sélective des cellules endothéliales tumorales, soit indirectement en augmentant les concentrations dans les tumeurs en TNF- $\alpha$  et d'autres cytokines (Mckeage *et al.*, 2010).

Le composé le plus prometteur est l'ASA404 : vadimézan ou l'acide 5,6-diméthylxanthénone-4-acétique/DMXAA (xanthone) (**Figure 16**) qui est entré en phase clinique de phase III chez des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC nonsmall cell lung cancer). Cette molécule induit une apoptose des cellules endothéliales de la vascularisation tumorale. De plus, l'ASA404 peut aussi agir en synergie avec d'autres anticancéreux (docétaxel, paclitaxel, carboplatine) et quand il est administré après une radiothérapie, l'efficacité est potentialisée dans les essais de phase II (Mckeage *et al.*, 2010). Néanmoins, l'essai clinique de phase III a été interrompu en mars 2010, pour cause d'inefficacité dans le traitement des cancers du poumon non à petites cellules.



**Figure 16** : Structure de l'ASA404

De nombreuses études épidémiologiques présentent les régimes riches en flavonoïdes comme liés à une diminution de l'incidence des cancers. De plus, dans de nombreuses études, les flavonoïdes apparaissent actifs contre des cellules tumorales. Toutefois, il est difficile de corréler ces deux constatations, les doses étant très différentes en général entre les études *in vitro* et dans les études épidémiologiques. De plus, étant donné la diversité des structures au sein des flavonoïdes et les différents mécanismes pouvant être mis en jeu, il est très difficile d'établir des relations de structure-activité.

### **2.3.6.    *Activité anti-inflammatoire***

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est impliqué dans la régulation de nombreux gènes, il joue un rôle important en particulier dans la réponse inflammatoire. En inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B, certains flavonoïdes s'avèrent posséder des propriétés anti-inflammatoires (Pierini *et al.*, 2008).

Certains flavonoïdes sont des inhibiteurs de l'enzyme COX-2<sup>17</sup> (Pierini *et al.*, 2008). De plus, certains sont suppresseurs de la transcription de COX-2, en activant PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptors). Parmi les flavonoïdes testés, les flavanones et les flavan-3-ols sont inactifs, suggérant que la double liaison C2C3 est essentielle à l'activation de PPAR- $\gamma$ . De plus, cette activation semble dépendante du nombre et de la position des hydroxyles : des hydroxylations en position 5 et 7 sur le cycle A, et en 4' sur le cycle B augmentent l'activité, alors qu'un hydroxyle en 3' diminue cette activité (Liang *et al.*, 2001).

Les flavonoïdes possèdent une activité comme piègeurs de NO, mais d'un côté, il semble que cette activité *in vitro* n'ait pas de signification au niveau physiologique, puisqu'elle reste très faible comparée à celles que peuvent avoir certaines molécules "physiologiques" comme l'hémoglobine. Il apparaît plutôt que les flavonoïdes diminueraient la production de NO par inhibition des protéines induisant la synthèse de

<sup>17</sup> enzyme qui produit les prostaglandines impliquées dans l'inflammation

iNOS (synthase inductible de NO) notamment par inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B (Mladinka *et al.*, 2010).

### **2.3.7.    *Activité sur les maladies neuro-dégénératives***

La roténone, mais aussi la déguéline sont connues pour induire des syndromes de type parkinsoniens chez le rat (Botta *et al.*, 2009).

Certains flavonoïdes protègent les neurones vis-à-vis de la toxicité du glutamate. Le glutamate est impliqué dans la mort neuronale, en menant à une accumulation de ROS et en augmentant l'influx calcique. Dans la protection contre le glutamate, il est indispensable que les flavonoïdes possèdent une hydroxylation en 3 et un cycle C insaturé (Zhao, 2009).

Il semblerait également que chez les femmes ménopausées, un manque en estrogènes augmenterait l'incidence de la maladie d'Alzheimer, les phytoestrogènes auraient ainsi un effet bénéfique (Lephart *et al.*, 2002). La génistéine montre également un effet neuroprotecteur à doses faibles (nanomolaire) par un mécanisme faisant intervenir les récepteurs ER, alors qu'à des concentrations plus élevées (micromolaires) le mécanisme intervenant est essentiellement une action antioxydante de la génistéine (Zhao, 2009).

Pour pouvoir exercer ce type d'activité, il faut que les flavonoïdes puissent traverser la barrière hémato-encéphalique. Il a été montré que certains flavonoïdes, en particulier des flavanones pouvaient traverser la BHE. Les flavonoïdes peuvent exercer des effets bénéfiques sur le SNC en protégeant les neurones contre le stress oxydatif et en supprimant l'activation de la microglie et les astrocytes qui sont impliquées dans la neuroinflammation, et de promouvoir la plasticité synaptique, la mémoire et la fonction cognitive. Les flavonoïdes agiraient en se liant aux ATP d'enzymes et de récepteurs, en modulant l'activité de kinases, en affectant la fonction de phosphatases, en préservant l'homéostasie de Ca<sup>2+</sup>, en modulant les cascades de signalisation aboutissant aux kinases comme par exemple l'activation de facteur de transcription et la liaison à des séquences de promoteur (Spencer, 2007).

### **2.3.8.    *Activité sur le système cardio-vasculaire***

Certains flavonoïdes auraient un effet positif dans l'athérosclérose et les formes stables de maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL par inhibition de LOX, une atténuation du stress oxydatif et une diminution de l'inflammation. Les

flavonoïdes auraient également un intérêt dans le traitement des arythmies et de l'hypertension artérielle, en particulier grâce à une diminution du stress oxydatif. Dans la prévention des infarctus myocardiques, les flavonoïdes agiraient par inhibition de l'agrégation plaquettaire et une diminution des ROS (Mladinka *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes inhiberaient l'agrégation plaquettaire par interaction avec les récepteurs aux thromboxanes et posséderaient une action vasodilatatrice, néanmoins, les mécanismes d'action qui interviennent sont encore flous (Mladinka *et al.*, 2010). Des pyranoisoflavones possèdent une activité vasorelaxante, et une activité sur la fonction érectile comparable à celle du sildénafil (Botta *et al.*, 2009).

### **2.3.9.    *Activité insecticide***

Les plantes ont développé une large variété de mécanismes de défense contre l'attaque d'insectes, les flavonoïdes étant souvent impliqués dans cette défense. Parmi ceux-ci, les roténoïdes, et en particulier la roténone ont largement été étudiés pour leur activité insecticide.

#### **2.3.9.1.    La roténone**

Les plantes contenant de la roténone *Derris* spp., *Lonchocarpus* spp., et *Tephrosia* spp., respectivement originaires du Sud-Est asiatique, de l'Amérique du Sud et de l'Afrique de l'Est ont longtemps été utilisées comme insecticides. Leurs usages pourraient dater de plus de 2 000 ans. Les racines de ces plantes sont mises à macérer dans l'eau, la suspension obtenue est ensuite pulvérisée sur les cultures à traiter (Wiwattanapatapee *et al.*, 2009). Au Moyen Âge, les européens importaient « l'herbe persane » d'Indonésie ou de Malaisie. Dès les années 1920, on en a fait une poudre insecticide (produite à raison de milliers de tonnes par an à partir de plantes cultivées), peu à peu abandonnée avec l'apparition des insecticides de synthèse (e.g., organochlorés et organophosphorés) pendant la seconde guerre mondiale. La roténone a connu un renouveau comme insecticide biologique et a bénéficié, en France, d'une autorisation de mise sur le marché pour le traitement d'un certain nombre de plantes. Les spécialités commerciales étaient des concentrés émulsionnables contenant 20 à 30 g/L de roténone en solution dans de l'huile de pin ou dans des hydrocarbures. Dans certaines formulations, la roténone était associée à du pyrèthre et pouvait également entrer dans la composition d'insecticides ménagers.

Le mode d'action de la roténone est bien connu (Corbett *et al.*, 1984). Elle agit au

niveau de la respiration cellulaire mitochondriale. Elle se lie à la NADH-déshydrogénase en bloquant le complexe 1 de la chaîne respiratoire. Les symptômes de toxicité aiguë chez les insectes sont la paralysie des pièces buccales, le ralentissement des mouvements respiratoires, une instabilité dans la locomotion, la réduction de la consommation d'oxygène qui conduit à une mort lente de l'insecte (Rattan, 2010). Il semble que des méthoxylations sur les cycles A et D augmentent l'inhibition de la NADH-déshydrogénase (Crombie *et al.*, 1992).

Pendant longtemps considérée comme inoffensive pour l'homme et plus généralement pour les mammifères, de nouvelles données ont remises en cause son innocuité. En effet, l'administration de roténone par injection chronique à de faibles doses répétées provoque chez les rats l'apparition de syndromes de type Parkinsonien (Betarbet *et al.*, 2000). Cette activité est mise à profit pour obtenir une meilleure compréhension sur l'origine physiopathologique de la maladie de Parkinson (Cicchetti *et al.*, 2009 ; Ravenstijn *et al.*, 2008 ; Uversky, 2004) . À la différence de la plupart des substances neurotoxiques, la roténone possède une toxicité sélective pour les neurones aminergiques du système nerveux central qui synthétisent de la dopamine. La toxicité neurologique de la roténone présente deux composantes : une inhibition du complexe I (génération de ROS) et une inhibition de la formation des microtubules (accumulation de monomères de tubuline toxiques) (Drechsel *et al.*, 2008 ; Ren *et al.*, 2007). Néanmoins, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale n'explique pas à elle seule la sélectivité de la roténone pour les neurones dopaminergiques. En effet, cette sélectivité peut être expliquée par l'effet toxique se traduisant par une dépolymérisation de la tubuline (Ren *et al.*, 2007).

Depuis lors, une controverse existe sur l'utilisation de la roténone et cette substance est interdite suite à la réglementation en vigueur dictée par l'annexe 1 de la directive 91/414/CEE concernant l'utilisation des produits phytosanitaires dans l'Union Européenne<sup>18</sup>. La décision de la Commission européenne n°2008/317/CE du 10 avril 2008 a demandé à tous les États membres i) de retirer les AMM des produits contenant de la roténone pour le 10 octobre 2008 et ii) d'interdire leurs utilisations pour le 10 octobre 2009. Par dérogation accordée par la Commission Européenne, la France bénéficie d'un délai supplémentaire pour des usages sur pommes, pêches, cerises, vigne et pommes de

---

<sup>18</sup> En effet, le dossier technique de chaque substance active qui est susceptible de rentrer dans une formulation donnée est confié à un État membre qui est chargé de diriger et de mener l'expertise en particulier toxicologique et écotoxicologique de cette substance active. Si les résultats sont conformes à la réglementation de la directive Européenne, la substance active est inscrite sur l'annexe I de cette directive.

terre, en réservant l'emploi de la roténone aux utilisateurs professionnels munis d'un équipement de protection individuel (EPI) approprié. Le délai s'applique à la commercialisation des produits jusqu'au 30 avril 2011 et à leurs utilisations jusqu'au 31 octobre 2011.

#### **2.3.9.2. Autres flavonoïdes insecticides**

La déguéline et la téphrosine (roténoïdes) apparaissent comme de bons larvicides contre *Aedes aegypti* (Yenesew *et al.*, 2009) et contre *Culex quinquefasciatus* (Yenesew *et al.*, 2005). D'autres classes de flavonoïdes comprennent des molécules insecticides. Ainsi, des isoflavonoïdes : l'osajine (composé prenylé), la sphaérobiosode (composé glycosylé), la génistéine, des 3-arylcoumarines (scandénine et scandénine A) et des chalcones possèdent des propriétés antiappétantes sur *Achaea janata* (Sreelatha *et al.*, 2009).

Enfin, certains ptérocarpans possèdent des propriétés insecticides contre *Anopheles gambiae* (néoduline, 4-méthoxynéoduline), les termites : *Reticulitermes speratus* (dérivés de la ptérocarpine) (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

### **2.3.10. Les neurones du système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana* : modèle d'étude de l'activité des composés insecticides**

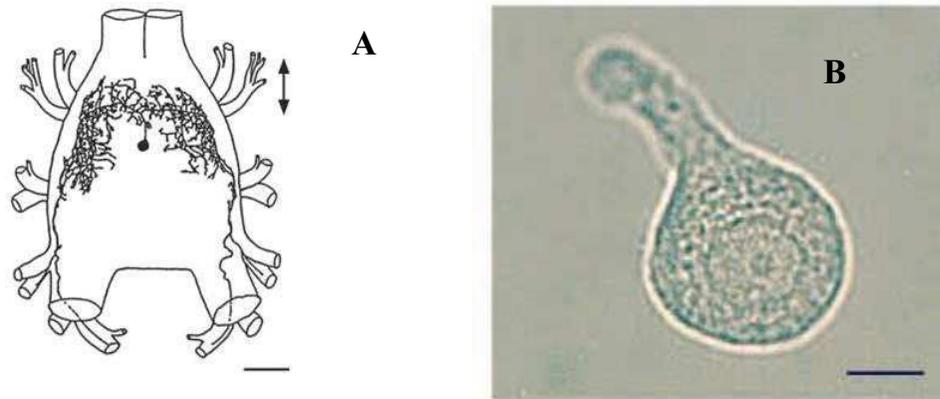
Nous avons vu que plusieurs classes de flavonoïdes peuvent être considérés comme des insecticides potentiels. Néanmoins, mis à part pour la roténone, les mécanismes d'actions de la plupart de ces composés ne sont pas élucidés. Il est, par conséquent, essentiel d'étudier leurs effets avant tout développement futur comme insecticides (Rattan, 2010).

Une des techniques utilisées pour étudier le mode d'action de composés insecticides est la technique électrophysiologique du patch-clamp. Cette technique permet d'étudier le mode d'action d'une substance à tester, en enregistrant, par exemple, l'activité électrique (e.g., potentiels d'action) de neurones d'insectes, avant et après application de la substance. Cette technique électrophysiologique est développée par le laboratoire RCIM (Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires-UPRES EA 2647-USC INRA 2023 à l'Université d'Angers).

Le modèle neuronal utilisé correspond à des cellules neurosecrétrices particulières du système nerveux central de la blatte *Periplaneta americana*, appelés DUM neurones (pour Dorsal Unpaired Median neurones). Ces cellules sont caractérisées par une activité

électrique spontanée et sont donc douées d'une activité pacemaker. Il est maintenant bien admis que la majorité des DUM neurones sont des cellules neuromodulatrices qui synthétisent et libèrent de l'octopamine (Grolleau *et al.*, 2000 ; Wicher *et al.*, 2001), une amine biogène considérée comme une neurohormone. Néanmoins, il a été montré que certaines de ces cellules neurosecrétrices pouvaient synthétiser et libérer aussi de la sérotonine, de la proctoline, de la corazonine, de la myomoduline, de la taurine (Grolleau *et al.*, 2000). Les rôles physiologiques des DUM neurones sont multiples en fonction de leurs localisations au sein du système nerveux central de l'insecte. Ils peuvent moduler les fonctions des lobes optiques, des glandes accessoires, des muscles squelettiques, abdominaux et viscéraux, des tubes cardiaques ou de certains types d'organes sensitifs proprioceptifs (Burrows, 1996 ; Grolleau *et al.*, 2000 ; Sinakevitch *et al.*, 1996).

Du point de vue localisation, les DUM neurones sont situés sur la face dorsale des ganglions suboesophagiens, métathoraciques et abdominaux de la blatte *P. americana*. Certains DUM neurones qui ont un diamètre de 40-60  $\mu\text{m}$ , sont considérées comme des DUM neurones efférents qui possèdent une morphologie en T avec un corps cellulaire pyriforme (Grolleau *et al.*, 2000). Du corps cellulaire émerge un neurite primaire qui se divise en deux neurites latéraux qui sortent du ganglion par des nerfs périphériques spécifiques. Chez la blatte mâle *P. americana*, le dernier ganglion abdominal (fusion des ganglions abdominaux 7-11) possède environ 60 DUM neurones, qui sont regroupés au niveau de la ligne médiane dorsale du ganglion en 3 îlots, antérieur (avec environ 17 cellules), médian (20 cellules) et postérieur (23 cellules) (Sinakevitch *et al.*, 1996).



**Figure 17 :** (A) Représentation schématique du dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse de la blatte *P. americana*, illustrant la morphologie d'un DUM neurone révélée par la technique de marquage antérograde au chlorure de cobalt. (B) Microphotographie d'un corps cellulaire de DUM neurone obtenu après digestion enzymatique et dissociation mécanique du dernier ganglion abdominal (la barre d'échelle représente 20  $\mu\text{m}$  ; d'après Grolleau *et al.* (2000))

### Propriétés électrophysiologiques des DUM neurones

Les DUM neurones possèdent un potentiel de membrane compris entre -45 et -60 mV. Ils ont la capacité de générer spontanément des potentiels d'action de grande amplitude (environ 100 mV), à une fréquence régulière, séparés par une phase lente de pré-dépolarisation qui i) permet d'atteindre le seuil de déclenchement des potentiels d'action et ii) détermine la fréquence de décharge des potentiels d'action. Cette activité électrique de type pacemaker est une propriété intrinsèque du corps cellulaire. Elle résulte de l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants et indépendants du potentiel (**Figure 18**). Ces canaux ioniques génèrent des courants ioniques spécifiques qui peuvent être classés en fonction de leur nature ionique :

#### - Courants sodium

##### - Courants sodium dépendants du potentiel (**INa 1** et **INa 2**)

Deux types de courants sodium dépendants du potentiel caractérisés par des propriétés biophysiques spécifiques sont impliqués dans la phase de dépolarisation du potentiel d'action (Lavialle-Defaix *et al.*, 2006).

- Courant sodium indépendant du potentiel (**INab**)

Ce courant sodium de base est uniquement opérationnel au potentiel de membrane. Il permet de maintenir ce potentiel de membrane à une valeur relativement positive (environ -50 mV) compatible avec le maintien de l'activité pacemaker. Il joue également un rôle important dans le mode de décharge des potentiels d'action (Lapied *et al.*, 1999).

- **Courants potassium dépendants du potentiel, des ions intracellulaires et du métabolisme cellulaire.**

- Courant potassium transitoire dépendant du sodium intracellulaire (**IK<sub>Na</sub>**).

Ce courant, activé par l'entrée d'ions sodium, initie et facilite la repolarisation rapide des potentiels d'action (Grolleau *et al.*, 1994).

- Courant potassium activé par le calcium intracellulaire (**IK<sub>Ca</sub>**)

Ce courant potassium est biphasique composé d'une phase transitoire suivie par le développement d'une composante maintenue. Il joue un rôle dans la phase de repolarisation des potentiels d'action et de post-hyperpolarisation. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui accompagne la dépolarisation entraîne l'activation de ces courants (Grolleau *et al.*, 1995).

- Courant potassium transitoire de type A (**IK<sub>A</sub>**)

Le courant potassium de type A s'active dans une gamme de potentiels négatifs atteinte grâce à la phase de post-hyperpolarisation. Ce courant permet de maintenir une fréquence basse de décharge des potentiels d'action (Grolleau *et al.*, 1995).

- Courant potassium sortant à rectification sortante retardée (**IK<sub>DR</sub>**)

Ce courant sortant est un courant maintenu qui est uniquement impliqué dans la phase de repolarisation des potentiels d'action. Il joue un rôle dans le contrôle de la durée du potentiel d'action (Grolleau *et al.*, 1995).

- Courant potassium de repos sensible à l'ATP intracellulaire (**IK<sub>ATP</sub>**)

Ce courant est activé par une diminution de la concentration en ATP intracellulaire. Il permet le maintien du potentiel de membrane nécessaire pour générer l'activité pacemaker (Dugravot *et al.*, 2003).

- **Courants calcium**

- Courant calcium à bas seuil d'activation de type LVA « Low Voltage-Activated » transitoire (**ICat**). Ce courant est purement dépendant du potentiel, il est activé par des potentiels négatifs (autour de -70 mV). Il est impliqué dans la phase initiale de la

pré-dépolarisation nécessaire pour atteindre le seuil de déclenchement du potentiel d'action. (Grolleau *et al.*, 1996).

- Courant calcium de type LVA maintenu (**ICam**)

Ce courant est maintenu et dépend de la concentration en calcium intracellulaire. Il intervient dans la phase terminale de la pré-dépolarisation. La régulation est complexe car en plus de la sensibilité au potentiel, toute augmentation ou diminution du calcium intracellulaire entraîne une inactivation de ce courant et par conséquent une réduction de la fréquence de décharge des potentiels d'action (Grolleau *et al.*, 2006).

- Courant entrant mixte à moyen seuil d'activation perméable à la fois au calcium et au sodium.

Ce courant atypique joue également un rôle dans la phase de pré-dépolarisation en modulant la fréquence de décharge des potentiels d'action (Defaix *et al.*, 2005).

- Courant calcium de base (**ICab**)

Ce courant résulte de l'activation du TRP $\gamma$ . Il joue un rôle dans le maintien du potentiel de membrane et le contrôle de la fréquence des potentiels d'action en maintenant l'homéostasie calcique (Wicher *et al.*, 2006).

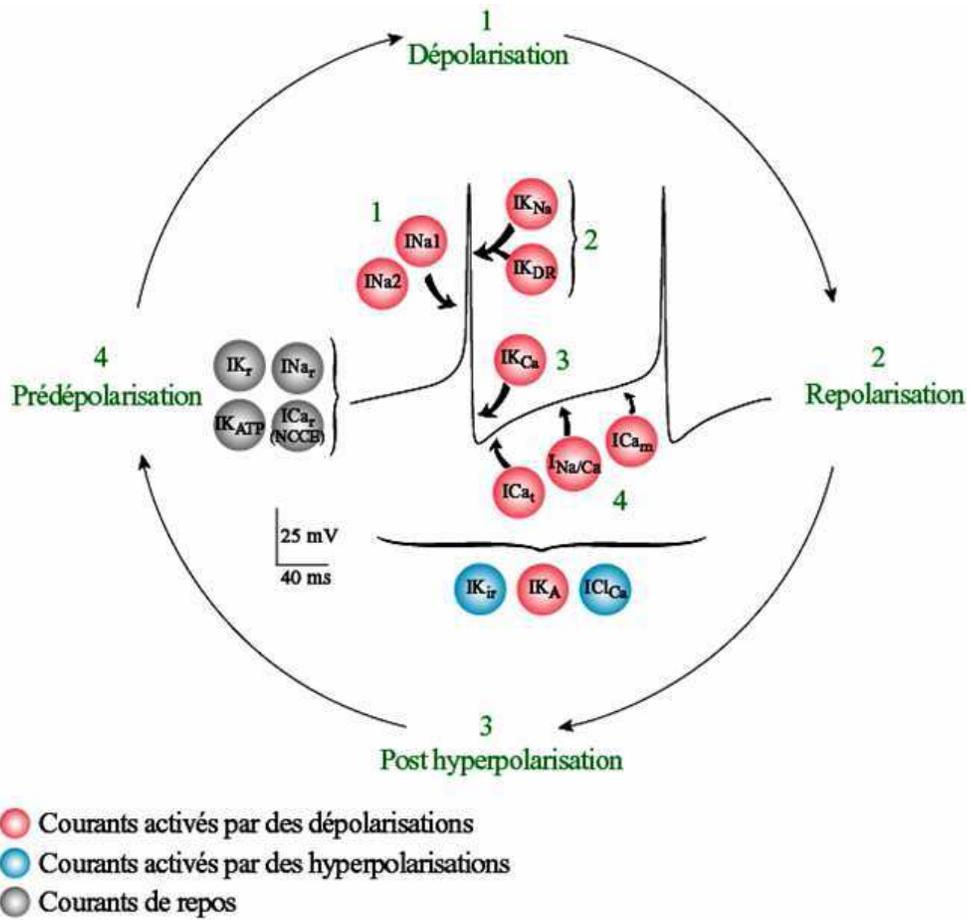
- **Courants ioniques activés par des hyperpolarisations**

- Courant potassium entrant à rectification entrante (**IKIr**)

Ce courant potassium entrant est activé par des hyperpolarisations. Il joue un rôle important dans le maintien du potentiel de membrane à une valeur suffisamment positive pour permettre aux DUM neurones d'être spontanément actif (Raymond *et al.*, 1999 ; Grolleau *et al.*, 2000 ; Wicher *et al.*, 2001).

- Courant entrant perméable aux ions chlorure sensible au calcium intracellulaire et activé par des hyperpolarisations (**ICl<sub>Ca</sub>**).

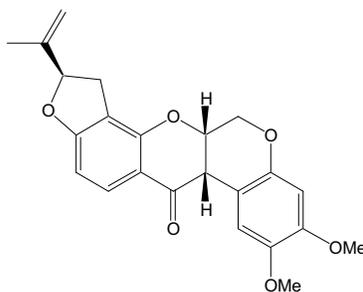
L'activation de ce courant entrant permet de s'opposer à de fortes hyperpolarisations provoquées par de l'acide  $\gamma$ -amino butyrique (GABA) ou du glutamate (Raymond *et al.*, 1999 ; Grolleau *et al.*, 2000 ; Wicher *et al.*, 2001).



**Figure 18 :** Modèle hypothétique de l'activité électrique de type pacemaker d'un DUM neurone représentant les différents canaux ioniques dépendants et indépendants du potentiel impliqués dans la génération de l'activité électrique spontanée.

### 3. Etudes phytochimiques du genre *Derris*

Une seule étude phytochimique concerne l'espèce *D. ferruginea* (N.V. Subba Rao *et al.*, 1946). Deux roténoïdes ont été isolés des racines : la roténone [1] et la déhydroroténone. Cette étude suggère qu'il existerait deux variétés de *D. ferruginea*, l'une contenant de la roténone tandis que l'autre en est dépourvue.



**Figure 19** : Structure de la roténone [1]

Si *Derris ferruginea* est peu décrite, les autres espèces ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques, présentées dans le **tableau 2** incluant les références bibliographiques, l'espèce et la partie de la plante étudiée, et éventuellement les activités biologiques évaluées.

247 composés ont été isolés dans le genre *Derris* et leurs structures sont présentées ci-dessous (**Figures 19 à 33**). Cette liste de composés a été réalisée en juin 2010 en utilisant comme moteur de recherche la base de données *Scopus*®, avec comme occurrence « *Derris* » dans le titre des documents. Cette liste n'est donc pas exhaustive, mais permet de dresser un aperçu représentatif des composés présents dans le genre.

Les composés isolés dans le genre *Derris* sont rattachés aux trois principales familles de métabolites secondaires : les composés phénoliques, les composés terpéniques et les composés azotés.

#### 3.1. Les composés phénoliques

Les composés isolés des plantes du genre *Derris* appartiennent pour la plupart à cette famille de composés. Ils peuvent être divisés en 3 groupes : les acides phénols, les stilbènes et les flavonoïdes *sensu lato*. Les flavonoïdes *sensu lato*, comprenant les

flavonoïdes *sensu stricto* et les isoflavonoïdes, sont les plus représentés dans le genre *Derris*.

### 3.1.1. Les acides phénols

Selon cette recherche bibliographique, trois acides phénols sont répertoriés dans le genre *Derris*. Les acides 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque [2] et 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque [3] ont été isolés des tiges de *D. scandens* et l'acide pipéronylique [4] des racines de *D. indica*.

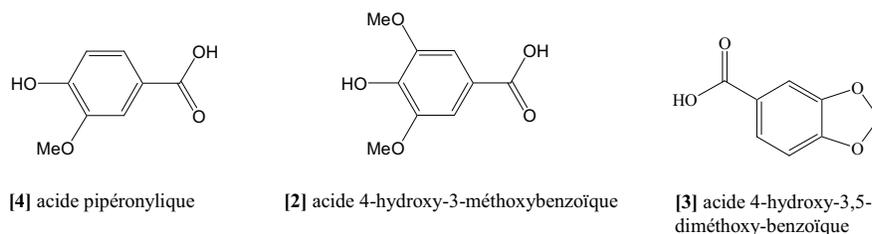


Figure 20 : Acides phénols répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.1.2. Les stilbènes

Seul un stilbène a été isolé dans le genre *Derris*, il s'agit du 2,4-diméthoxy-2'',2''-diméthylchromène(5'',6'',3',4')-stilbène [5] issu des racines de *D. spruceana*.

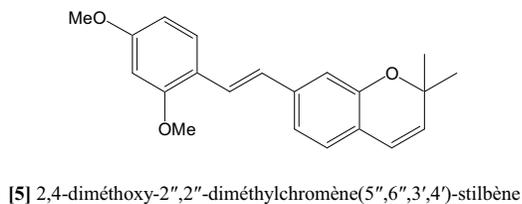


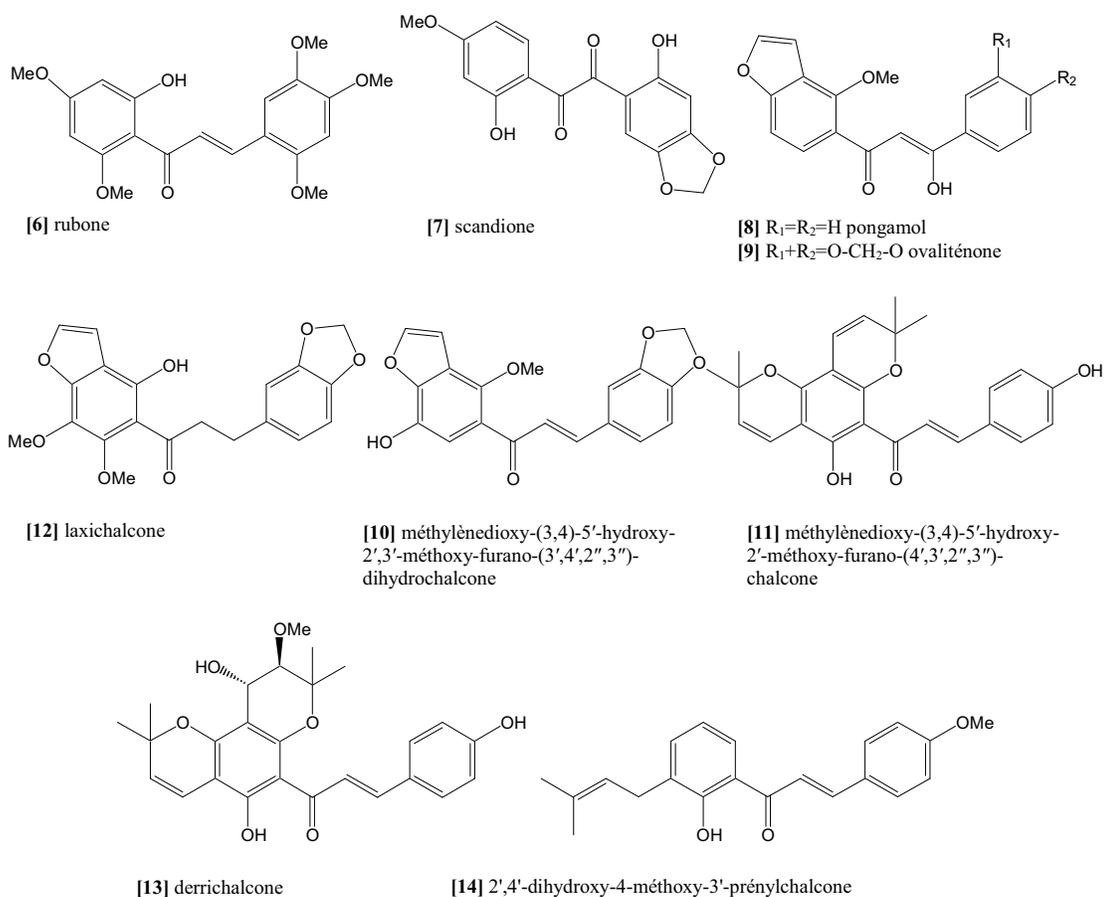
Figure 21 : Stilbène répertorié dans le genre *Derris*

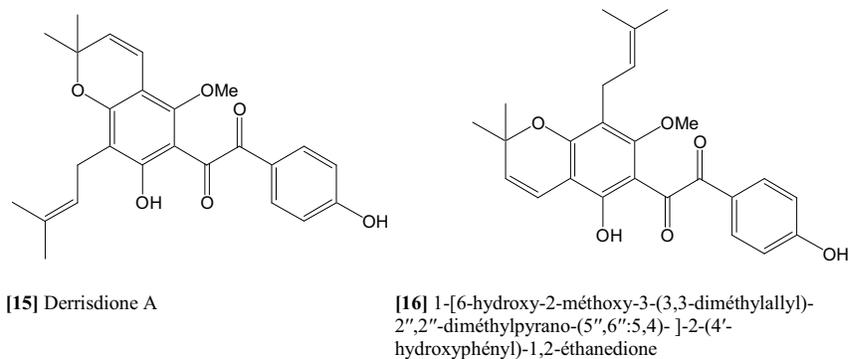
### 3.1.3. Flavonoïdes *sensu stricto*

Sont répertoriés dans ce groupe les chalcones, les aurones, les flavones, les flavanones et les flavanes.

## 3.1.3.1. Chalcones et dérivés

Dix chalcones et dérivés sont répertoriés dans le genre, isolées de sept espèces différentes. Mis à part la rubone [6] et la scandione [7], tous sont des composés prénylés. Pour la majorité, il s'agit d'une prénylation de type « furano » [8-11], mais on rencontre également des prénylations de type « pyrano » [12, 13, 15, 16]. Trois chalcones à prénylation linéaire sont répertoriées dans le genre [14, 16], et isolées de *D. malaccensis* et de *D. scandens*. Ces prénylations concernent aussi bien le cycle A que le cycle B. Les chalcones sont issues de différentes parties des plantes : racines, feuilles, graines, tiges. Le pongamol [8] et l'ovaliténone [9] sont décrits comme des inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase et comme antioxydants. Les composés [15] et [16] présentent des propriétés insecticides.

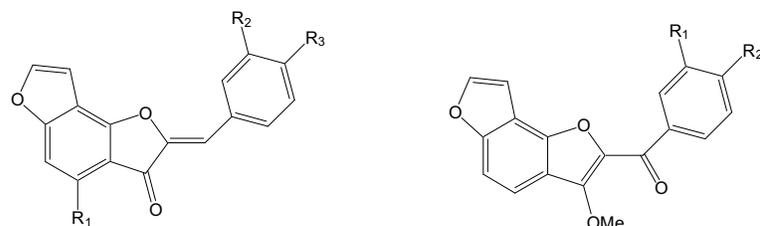




**Figure 22** : Chalcones et dérivés répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.1.3.2. Aurones et dérivés

Six aurones ont été isolées des écorces de racines de l'espèce *D. obtusa*. Il s'agit toujours de furanoaurones.



[17] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H, Furano-(6,7,2'',3'')-aurone

[18] R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H, 4-hydroxy- furano-(6,7,2'',3'')-aurone

[19] R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H, 4-méthoxy- furano-(6,7,2'',3'')-aurone

[20] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>+R<sub>3</sub>=O-CH<sub>2</sub>-O, Méthylènedioxy-(3',4')- furano-(6,7,2'',3'')-aurone

[21] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, Derriobtusone A

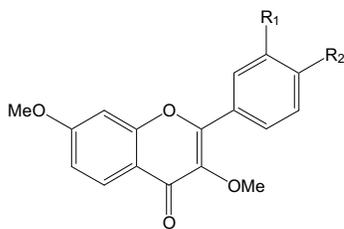
[22] R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>=O-CH<sub>2</sub>-O, Derriobtusone B

**Figure 23** : Aurones et dérivés répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.1.3.3. Flavones et flavonols

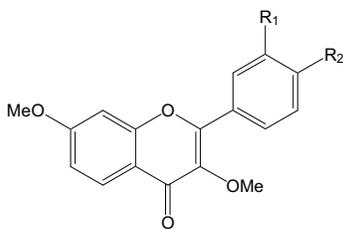
Dans le genre *Derris*, 36 flavones et flavonols ont été isolés. Parmi ceux-ci, 8 sont des composés glycosylés en position 3 [30-37] isolés de l'espèce *D. trifoliata* (O-glycosylation). Mais la plupart des flavones et flavanols décrits sont des composés prénylés (22 composés sur 36). Il s'agit de prénylations linéaires de type 3,3-DMA ou cyclisées de type « furano » ou « pyrano », elles concernent aussi bien le cycle A que le cycle B. Seuls deux flavanols [45, 46] sont répertoriés dans le genre *Derris*, alors que pratiquement la moitié des composés isolés possèdent un groupement méthoxy en position 3 (16 composés sur 36).

Les composés [26-29] et [45-51] sont décrits comme possédant une activité antioxydante et ils inhibent l' $\alpha$ -glucosidase. Les composés [50] et [52] sont actifs contre *Mycobacterium tuberculosis*. Le composé diprényle [57] présente une activité insecticide.

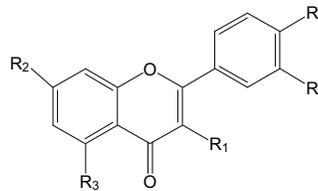


[23] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, 3,7-diméthoxyflavone

[24] R<sub>1</sub>+R<sub>2</sub>=O-CH<sub>2</sub>-O, Desméthoxy kanugine



[25] 4'-hydroxy-5,7,3',6'-tétraméthoxyflavone

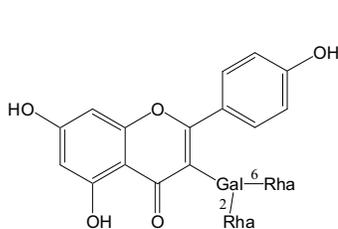


[26] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=OMe, R<sub>3</sub>=H, Fisetin tetraméthyl ether

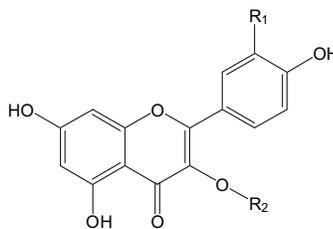
[27] R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=O-CH<sub>2</sub>-O, 3-méthoxy-7-hydroxy-3',4'-méthylènedioxyflavone

[28] R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>2</sub>=OMe, R<sub>3</sub>=OH, 7-O-méthylchryisine

[29] R<sub>1</sub>=R<sub>5</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=OMe, R<sub>3</sub>=H, 7,4'-diméthoxy-5-hydroxyflavone



[30] mauritanine



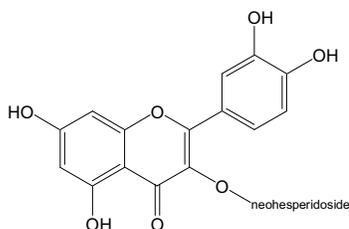
[31] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=  $\alpha$ -L-rha-(1-6)- $\beta$ -D-glc-(1-3)- $\beta$ -D-glc, kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside

[32] R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>= $\alpha$ -L-rha-(1-6)- $\beta$ -D-glc-(1-3)- $\beta$ -D-glc, quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside

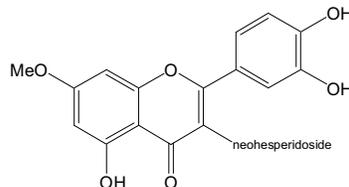
[33] R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>= $\alpha$ -L-rha-(1-6)- $\beta$ -D-glc-(1-2)- $\beta$ -D-glc, quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside

[34] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= $\alpha$ -L-rha-(1-6)- $\beta$ -D-glc, kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside

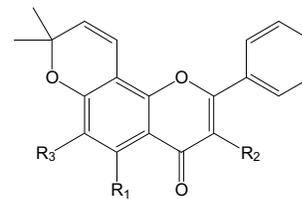
[35] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= $\alpha$ -L-rha-(1-6)- $\beta$ -D-glc-(1-2)- $\beta$ -D-glc, kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside



[36] rhamnétine 3-O- $\beta$ -néohespéridoside

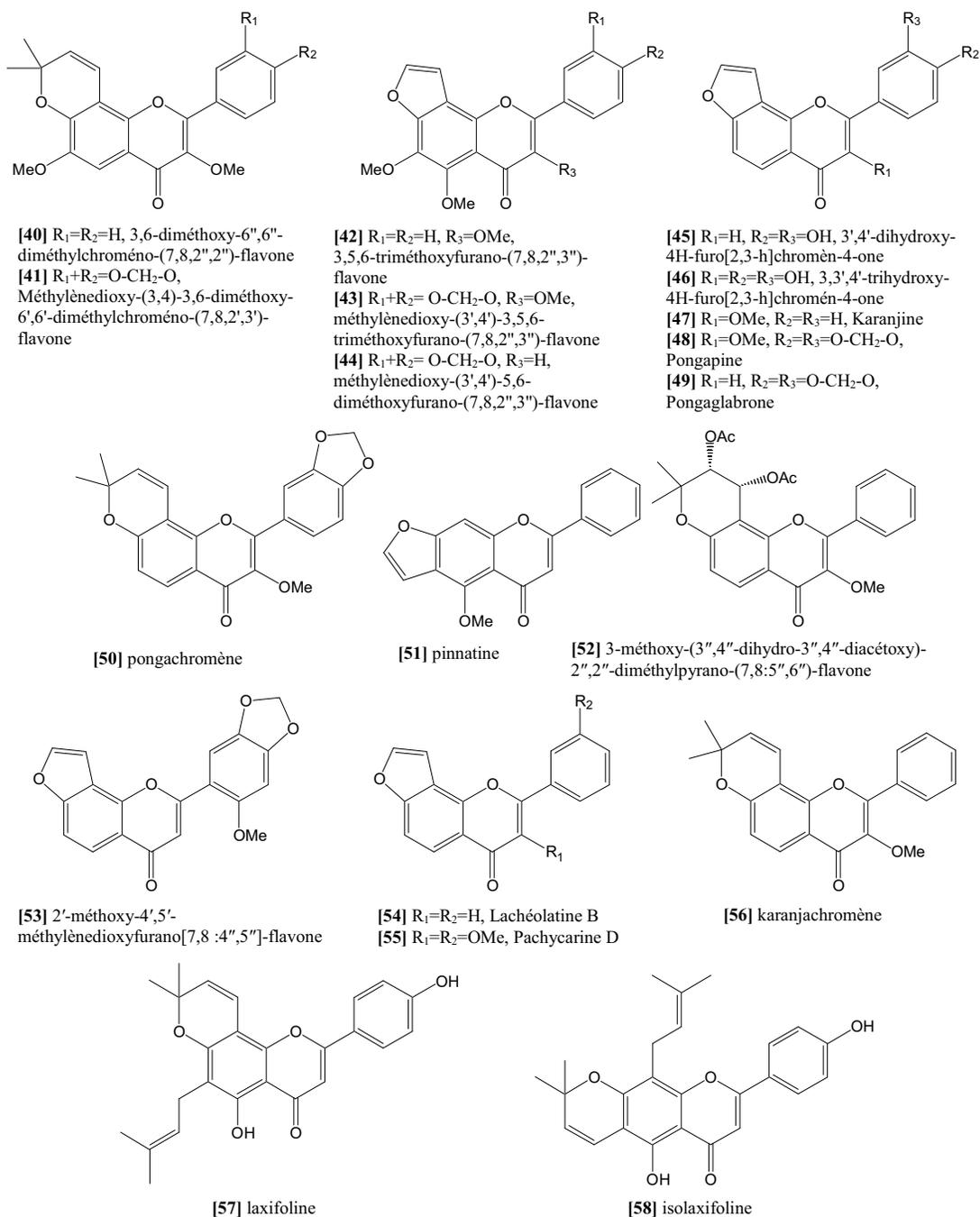


[37] quercétine 3-O- $\beta$ -néohespéridoside



[38] R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H, 5-hydroxy-6'',6''-diméthylchroméno-(7,8,2'',3'')-flavone

[39] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe, 3,6-diméthoxy-6'',6''-diméthylchroméno-(7,8,2'',3'')-flavone

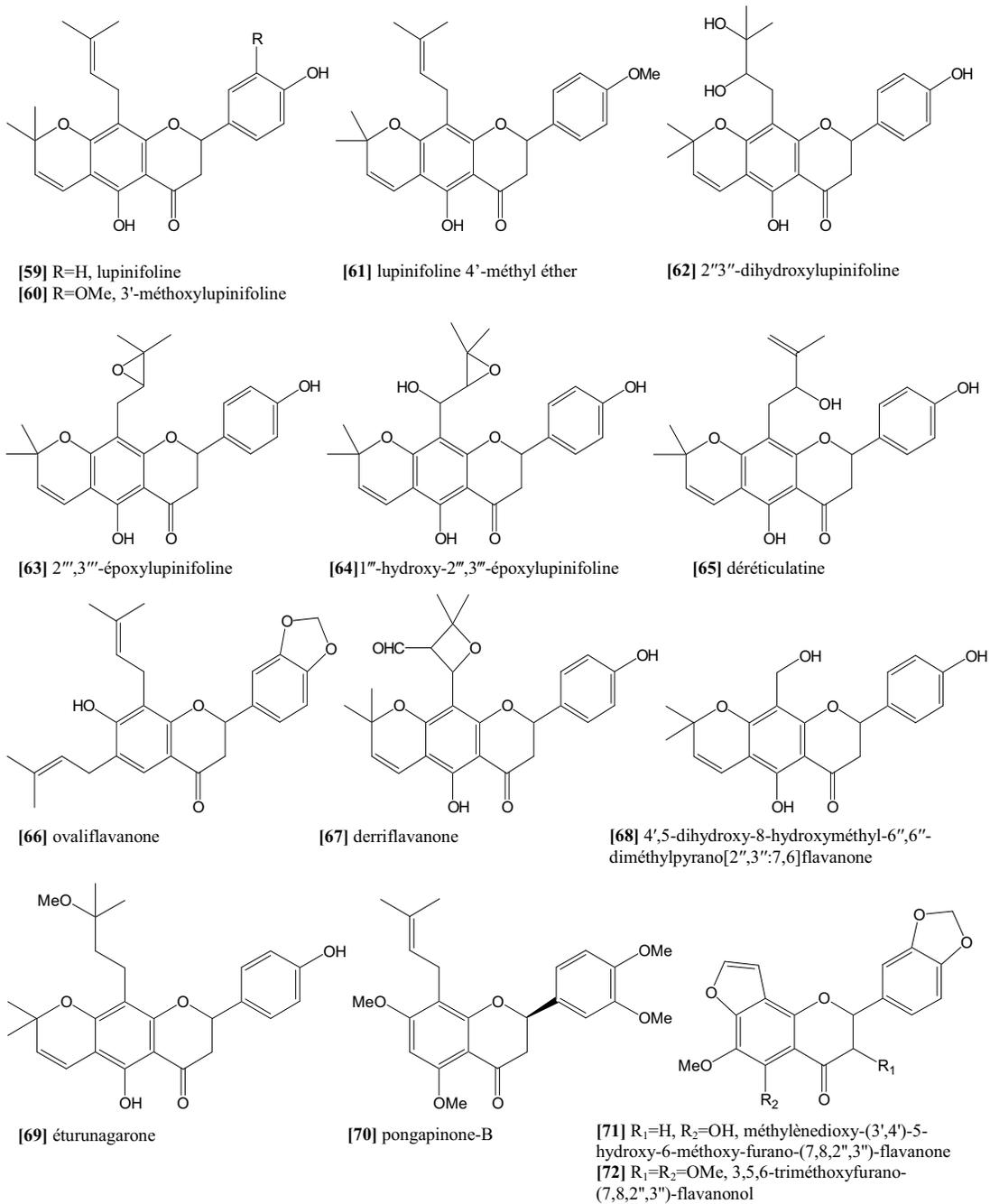


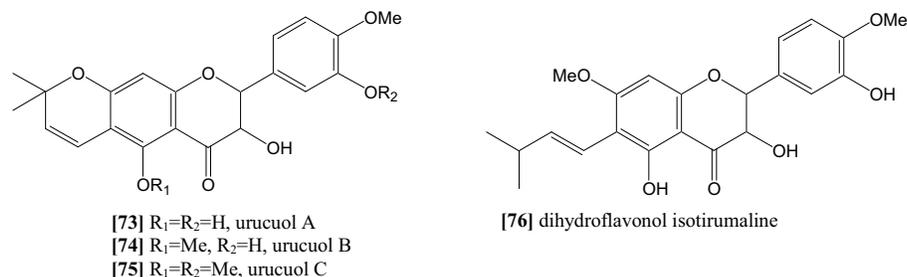
**Figure 24** : Flavones et flavanols répertoriés dans le genre *Derris*

#### 3.1.3.4. Flavanones et flavanonols

4 flavanonols et 14 flavanones sont décrits dans le genre *Derris* isolés dans 6 espèces différentes. Tous ces composés comportent des prénylations : de type DMA, furano, 1,3-dihydroxy-3-méthylbutyl, époxyprényl, sur le cycle A ou le cycle B. Certains

de ces composés sont cytotoxiques [62] et [68], anti-inflammatoires [66], anti-oxydants [70], inhibent l' $\alpha$ -glucosidase [70], ou sont actifs contre *Plasmodium falciparum* [59].

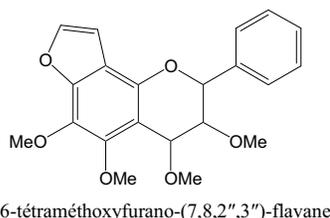




**Figure 25** : Flavanones et flavanonols répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.1.3.5. Flavanes

Seule une flavane est répertoriée dans le genre : la 3,4,5,6-tétraméthoxyfurano-(7,8,2'',3'')-flavane [77], isolée des écorces de racine de *D. araripensis*.



**Figure 26** : Flavane répertoriée dans le genre *Derris*

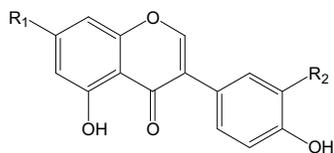
## 3.1.4. Les isoflavonoïdes

On retrouve dans ce groupe les isoflavones, les 3-arylcoumarines, les roténoïdes et les ptérocarpanes isolés dans le genre *Derris*. La majorité des composés isolés dans le genre appartient aux isoflavonoïdes (123 isoflavonoïdes sur 247 composés répertoriés).

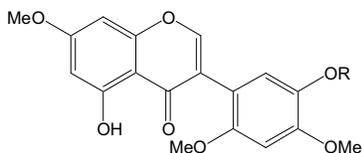
### 3.1.4.1. Les isoflavones

Ce groupe est représenté par 70 composés, dont 15 sont glycosylés [133]-[147] et dont 40 sont des composés prénylés [93-132]. Les prénylations concernent aussi bien le cycle A, que le cycle B. Il s'agit essentiellement de prénylations linéaires (de type 3,3-DMA) ou cycliques de type « furano » et « pyrano ». De nombreuses activités sont associées à ces composés : insecticide [78, 97, 98, 109, 111, 146], antioxydante [79, 95, 97, 98, 101, 105, 106, 110, 114], antibactérienne [79, 95, 98, 114], hypotensif [94, 140, 144], inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase [97, 109, 110], anti-dermatophyte [98, 118, 121], anti-inflammatoire [98, 147], cytotoxique [124], anti-mycobactérien [132].

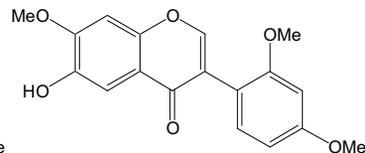
Données bibliographiques : études phytochimiques du genre *Derris*



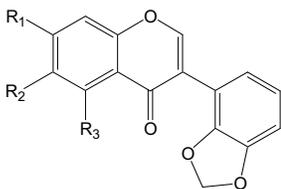
- [78]  $R_1=OH, R_2=H$ , génistéine  
 [79]  $R_1=OMe, R_2=OH$ , santal  
 [80]  $R_1=OH, R_2=OMe$ , 3'-méthylorobol



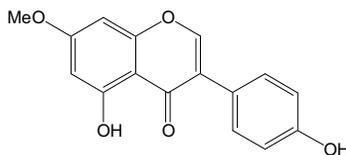
- [81]  $R=H$ , derrugénine  
 [82]  $R=Me$ , robustigénine



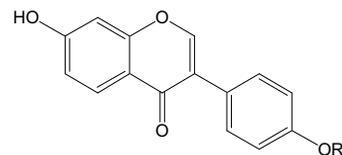
- [83] 6-hydroxy-7,2',4'-triméthoxyisoflavone



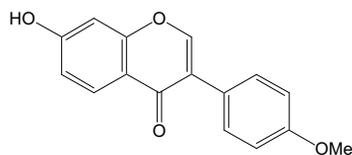
- [84]  $R_1=H, R_2=R_3=OMe$ , derrustone



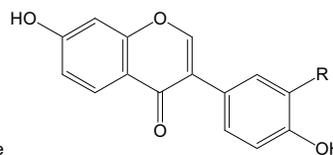
- [85] prunétine



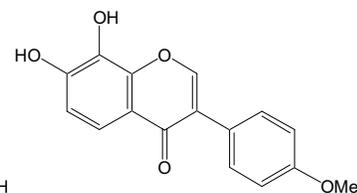
- [86]  $R=H$ , 7-hydroxy-3-(4-hydroxyphényl)-4H-1-benzopyran-4-one  
 [87]  $R=Me$ , 7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone



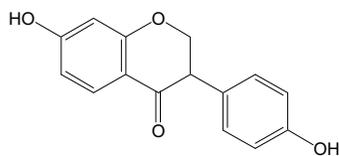
- [88] formononétine



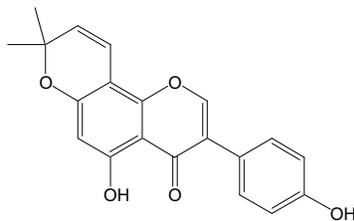
- [89]  $R=H$ , daidzéine  
 [90]  $R=OMe$ , 3'-méthoxydaidzéine



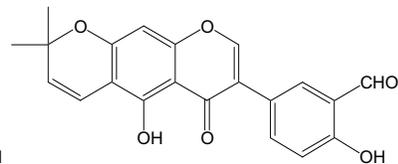
- [91] 7,8-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone



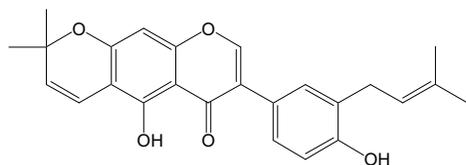
- [92] dihydrodaidzéine



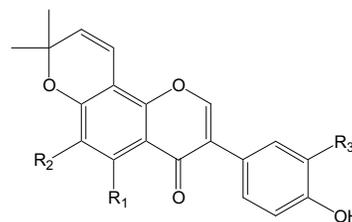
- [93] derrone



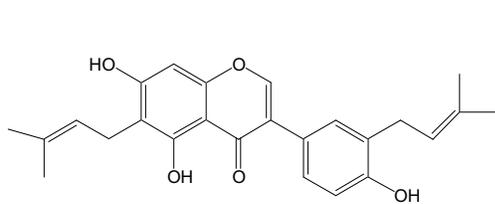
- [94] scandénal



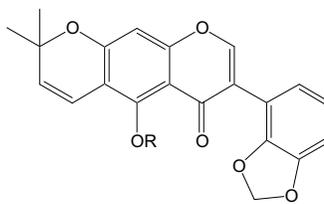
- [95] chandalone



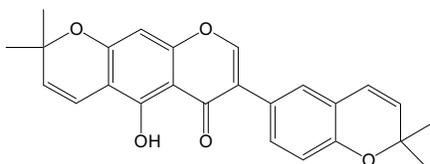
- [96]  $R_1=OH, R_2=H, R_3=prényl$ , scandérone  
 [97]  $R_1=OMe, R_2=prényl, R_3=H$ , scandinone



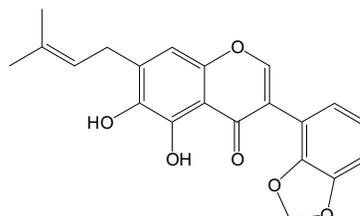
[98] lupalbigénine



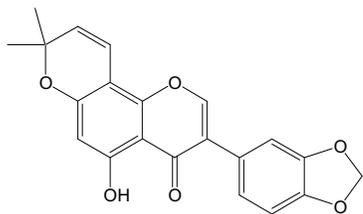
[99] R=H, robustone  
[100] R=Me, robustone méthyl éther



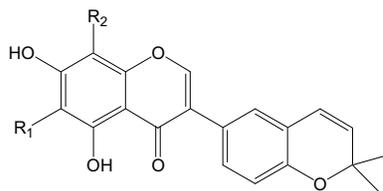
[101] isorobustone



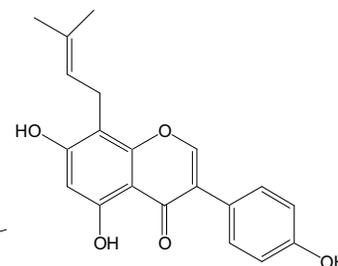
[102] derrubone



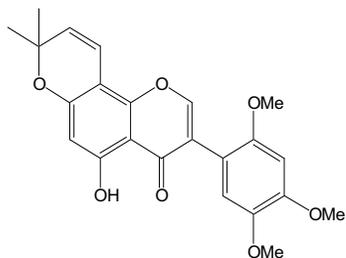
[103] 5-hydroxy-2'',2'''-diméthylchroméno-(6,7:5'',6''')-2''',2'''-diméthylchroméno-(3',4':5'',6''')isoflavone



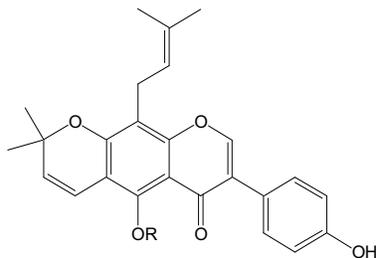
[104] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=prényl, ulexone A  
[105] R<sub>1</sub>=prényl, R<sub>2</sub>=H, isochandalone



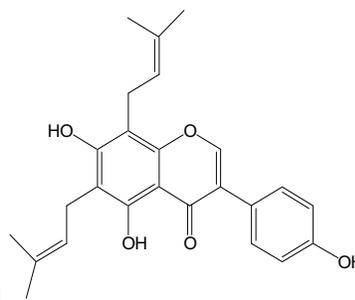
[106] lupiwightéone



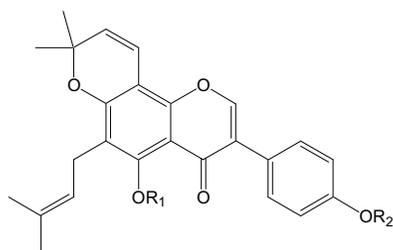
[107] 5-hydroxy-2',4',5'-triméthoxy-2'',2'''-diméthylpyrano<6'',5''-h>isoflavone



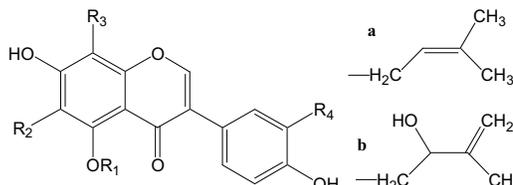
[108] R=H, isoscandinone  
[109] R=Me, scandénone



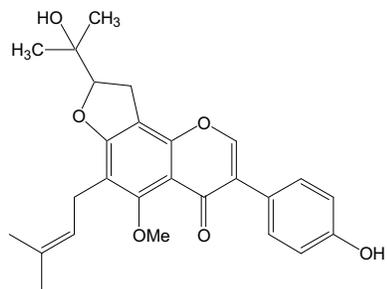
[110] 4',5',7-trihydroxybiprénylisoflavone



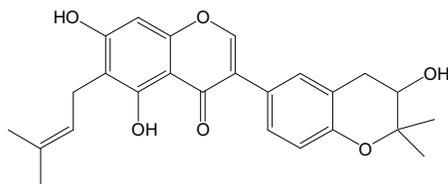
[111] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, osajine  
[112] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Me, 4'-O-méthylsajine  
[113] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Me, 4'-O-méthylscandinone



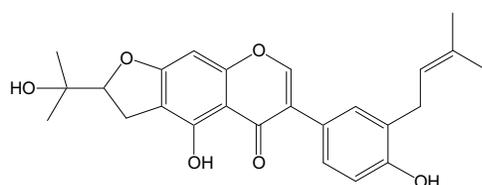
[114] R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=a, R<sub>4</sub>=H, derrisisoflavone A  
[115] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=a, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=b, derrisisoflavone B  
[116] R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=b, R<sub>3</sub>=a, R<sub>4</sub>=H, derrisisoflavone D  
[117] R<sub>1</sub>=Me, R<sub>2</sub>=a, R<sub>3</sub>=b, R<sub>4</sub>=H, derrisisoflavone E  
[118] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=a, R<sub>3</sub>=b, R<sub>4</sub>=H, 5,7,4'-trihydroxy-6,8-diprénylisoflavone  
[119] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=a, R<sub>3</sub>=b, R<sub>4</sub>=H, érysénégalséine  
[120] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=b, R<sub>3</sub>=H, R<sub>4</sub>=a, lupinisol A



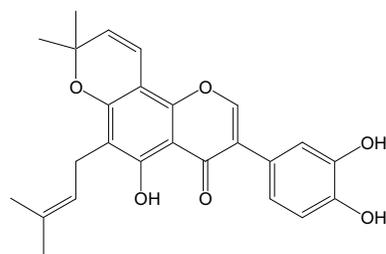
[121] derrisoflavone C



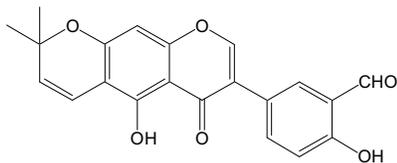
[122] derrisoflavone F



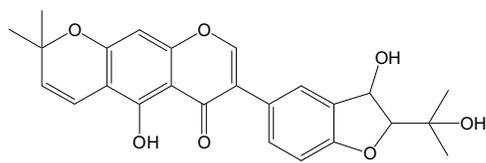
[124] pomiférine



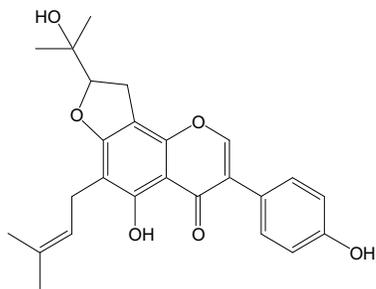
[123] lupiniso flavone G



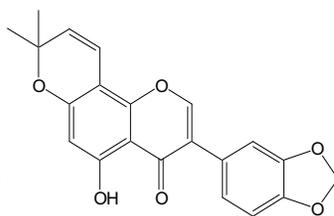
[125] 3'-formylalpinumisoflavone



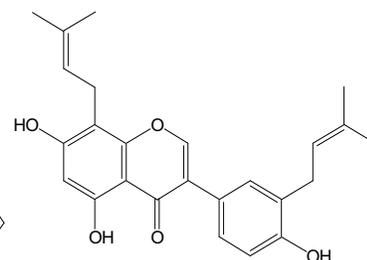
[126] 2-(1-hydroxy-1-méthyléthyl)-3-hydroxy-2,3-dihydrofuranoalpinumisoflavone



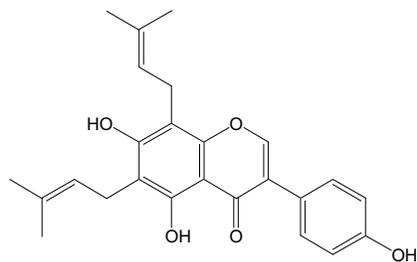
[127] sénégalensine



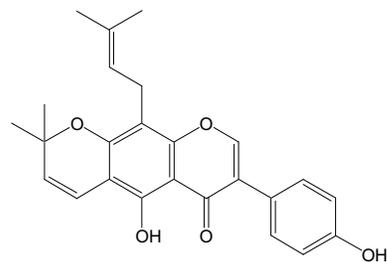
[128] 5-hydroxy-2'',2''-diméthylchroméno[6,7:5'',6'']-2''',2'''-diméthylchroméno[3',4':5''',6''']isoflavone



[129] 3'-γ,γ-diméthylallylwightéone



[130] 6,8-diisoprényl-5,7,4'-trihydroxyisoflavone



[131] 8-(3,3-diméthylallyl)-4'-hydroxy-2''',2'''-diméthylpyran[6,7-b]isoflavone

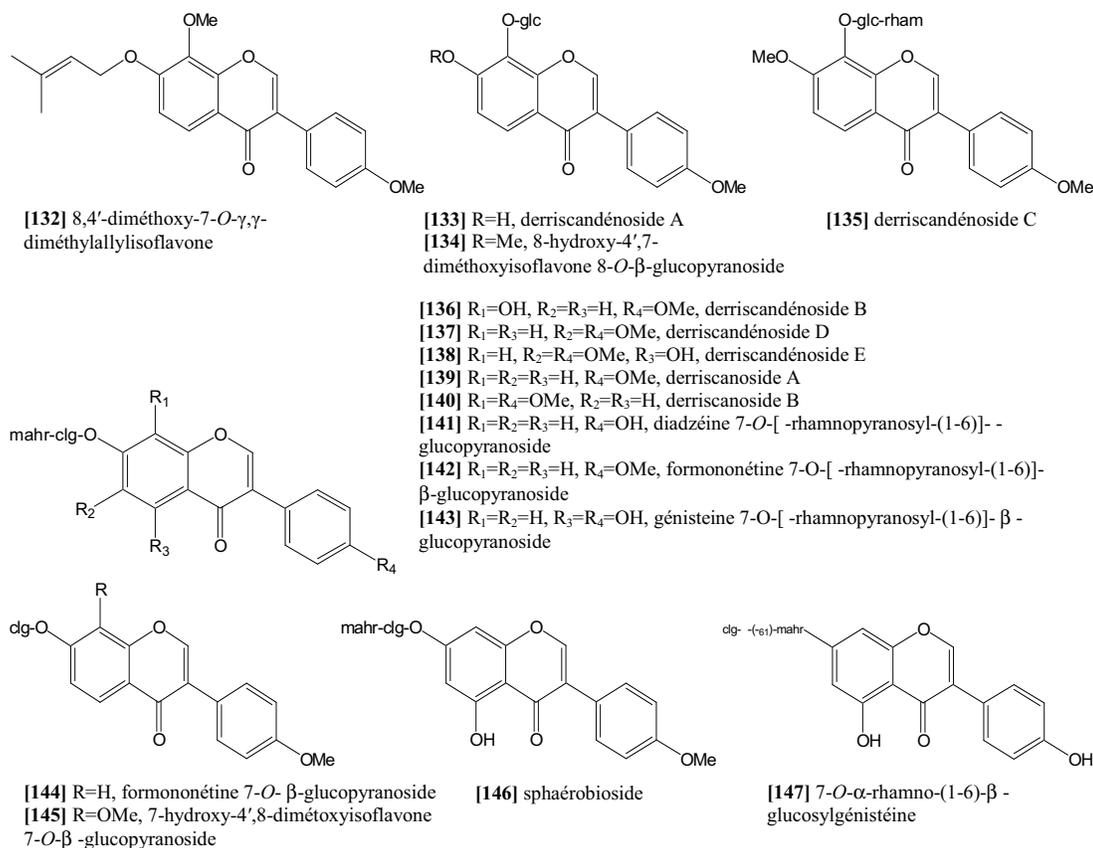
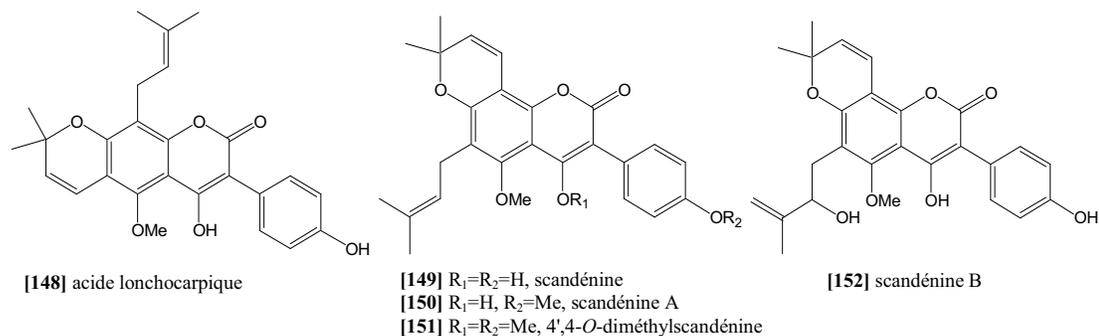
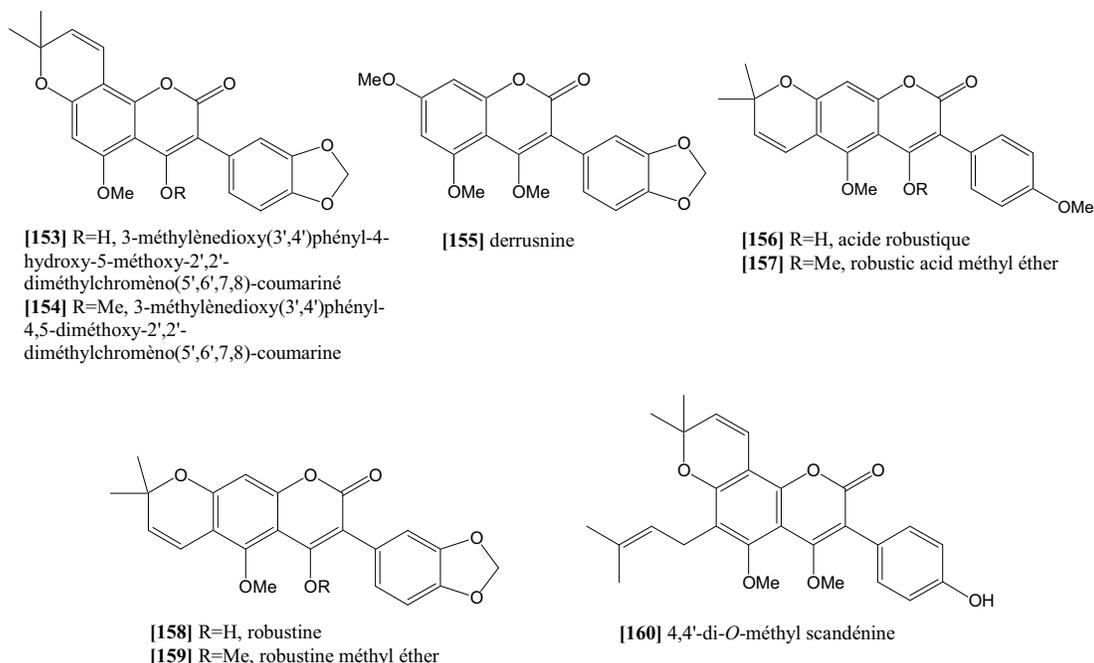


Figure 27 : Isoflavones répertoriées dans le genre *Derris*

### 3.1.4.2. Arylcoumarines

Dans le genre *Derris*, treize 3-arylcoumarines sont décrites, isolées de trois espèces différentes. Elles comportent au moins une prénylation. La scandénine [149] et la scandénine A [150], possèdent toutes les deux des propriétés insecticides. La scandénine [149] est également anti-inflammatoire. La scandénine A [150] inhibe l' $\alpha$ -glucosidase et possède comme la scandénine B [151], un effet antioxydant.



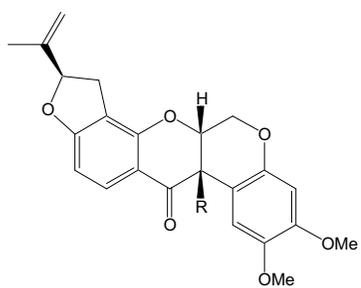


**Figure 28** : 3-arylcoumarines répertoriées dans le genre *Derris*

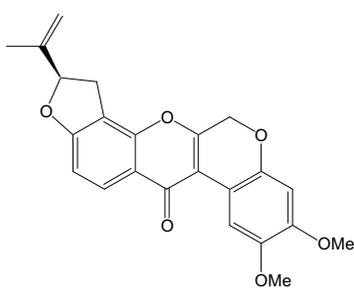
### 3.1.4.3. Roténoïdes

40 roténoïdes ont été isolés dans le genre *Derris*, essentiellement des racines, mais aussi des tiges et des graines. Tous possèdent 2 groupements méthoxy en position 2 et 3 sur le cycle A. Le cycle D est systématiquement porteur d'une prénylation cyclisée, qui forme un cycle supplémentaire (cycle E). On rencontre fréquemment une déhydrogénation en 6a-12a. Dans certains cas, il y a ouverture du cycle C introduisant une fonction acide aux composés [192-194]. Une fonction cétonique en position 6 (cycle B) est présente dans 5 composés isolés [172, 179, 186, 198, 199]. Le composé [199] est particulièrement intéressant, il s'agit en effet du seul roténoïde connu comportant un azote (en position 5, cycle B).

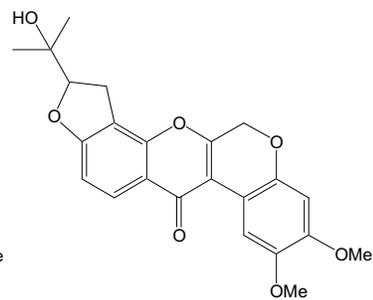
La roténone isolée de quatre espèces différentes, des tiges, des graines ou des racines, présente une activité larvicide, cytotoxique sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, inhibe la formation de NO, et inhibe la croissance de *Helicobacter pylori*. Les autres activités répertoriées pour les roténoïdes isolés de *Derris* sont : l'inhibition de NO [161, 162, 164, 165, 166, 167, 169, 170, 184], l'activité contre *Helicobacter pylori* [161, 162, 165, 166, 167, 170, 183], la cytotoxicité sur lignée cancéreuses [165, 166, 167, 181, 184, 187, 191], un effet larvicide [165-167].



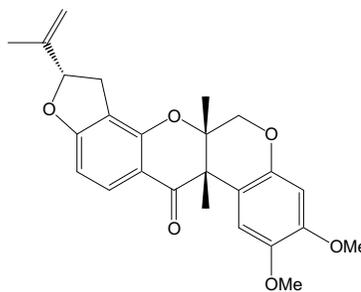
[1] R=H, rotenone  
[161] R=OH, 12a-hydroxyroténone



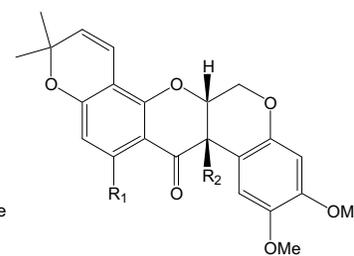
[162] 6a,12a-déhydroroténone



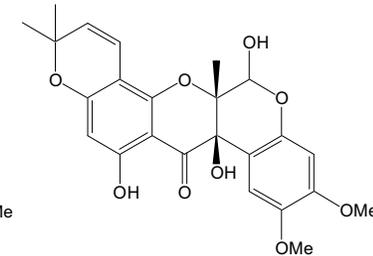
[163] 6'-hydroxy-6a,12a-déhydroroténone



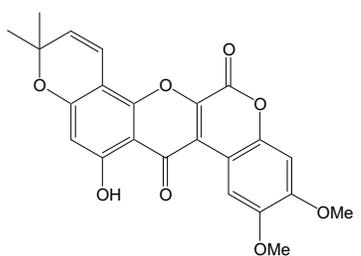
[164] 6αβ,12αβ,5'α-roténolone



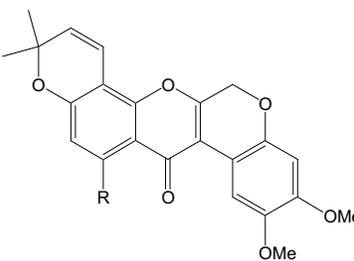
[165] R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=H, déguéline  
[166] R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, téphrosine  
[167] R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, α-toxicarol



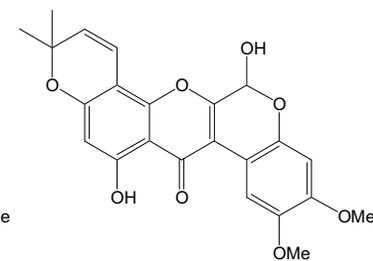
[168] 12a-hydroxy-α-toxicarol



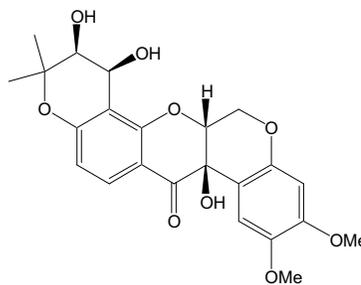
[169] R=OH, 6a,12a-déhydro-α-toxicarol  
[170] R=H, 6a,12a-déhydrodéguéline



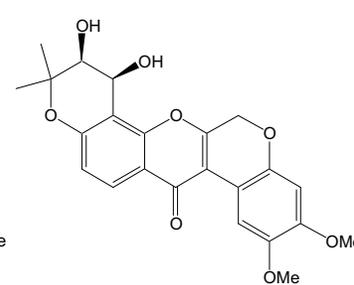
[171] 6-hydroxy-6a,12a-déhydro-α-toxicarol



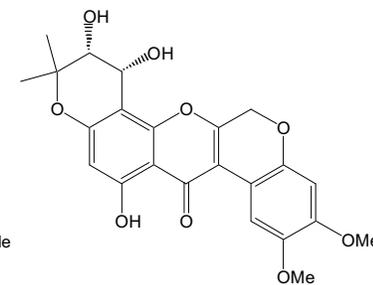
[172] 6-oxo-6a,12a-déhydro-α-toxicarol



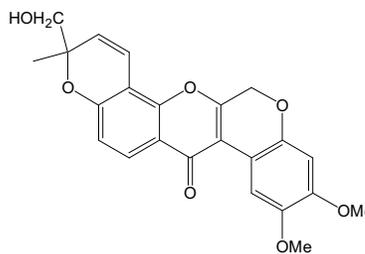
[173] 4',5'-dihydro-4',5'-dihydroxytéphrosine



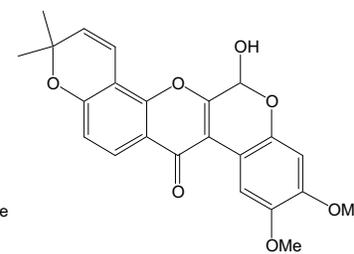
[174] 4',5'-dihydroxy-6a,12a-déhydrodéguéline



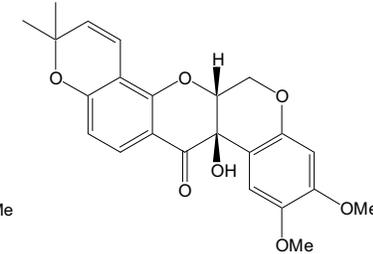
[175] 11,4',5'-trihydroxy-6a,12a-déhydrodéguéline



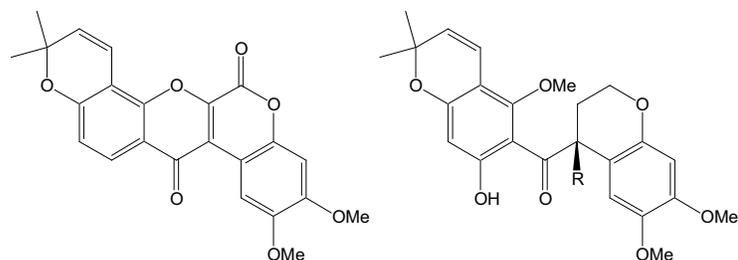
[176] 7'-hydroxy-6a,12a-déhydrodéguéline



[177] 6-hydroxy-6a,12a-déhydrodéguéline

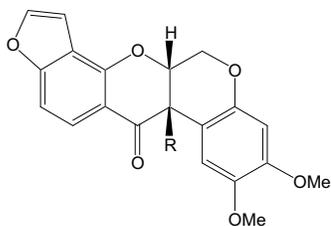


[178] 12aβ-hydroxydéguéline

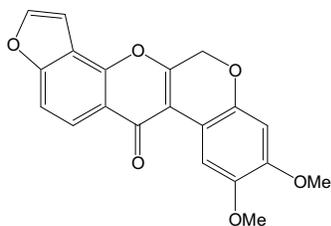


[179] 6-oxo-6a, 12a-déhydrodégueline

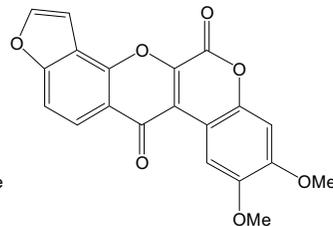
[181] R=H, 7a-O-méthyl-12a-hydroxydéguelol  
[182] R=OH, 7a-O-méthyl-12a-hydroxydéguelol



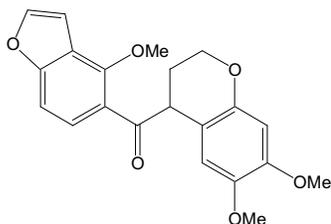
[183] R=H, elliptone  
[184] R=OH, 12a-hydroxyelliptone



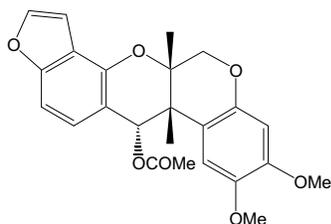
[185] déhydroelliptone



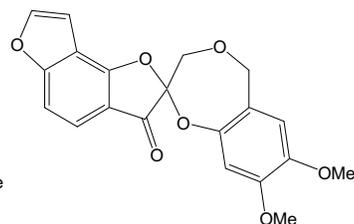
[186] 6-oxo-déhydroelliptone



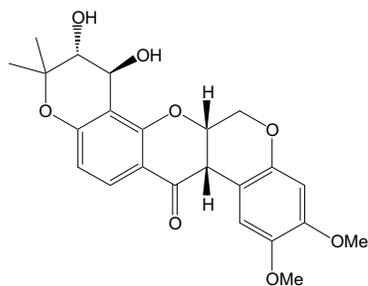
[187] 7a-O-méthylleiptonol



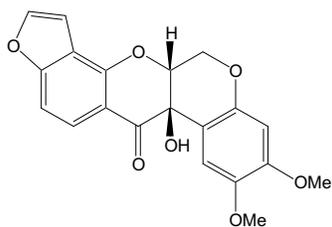
[188] 12-déoxo-12α-acétoxyelliptone



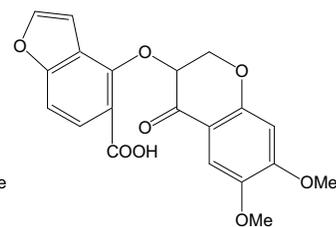
[189] spiro-13-homo-13-oxaelliptone



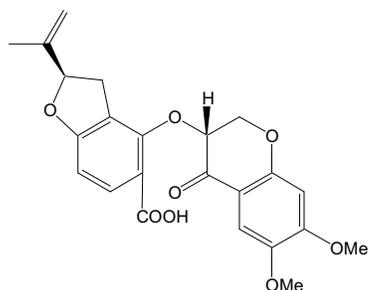
[190] derrisine



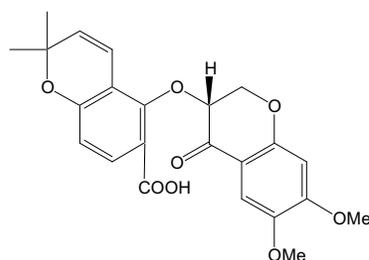
[191] 6α,12α-12a-hydroxyelliptone



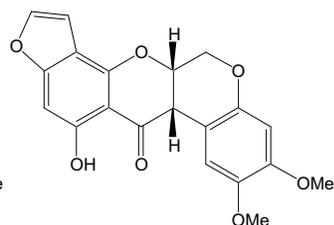
[192] acide elliptoïque



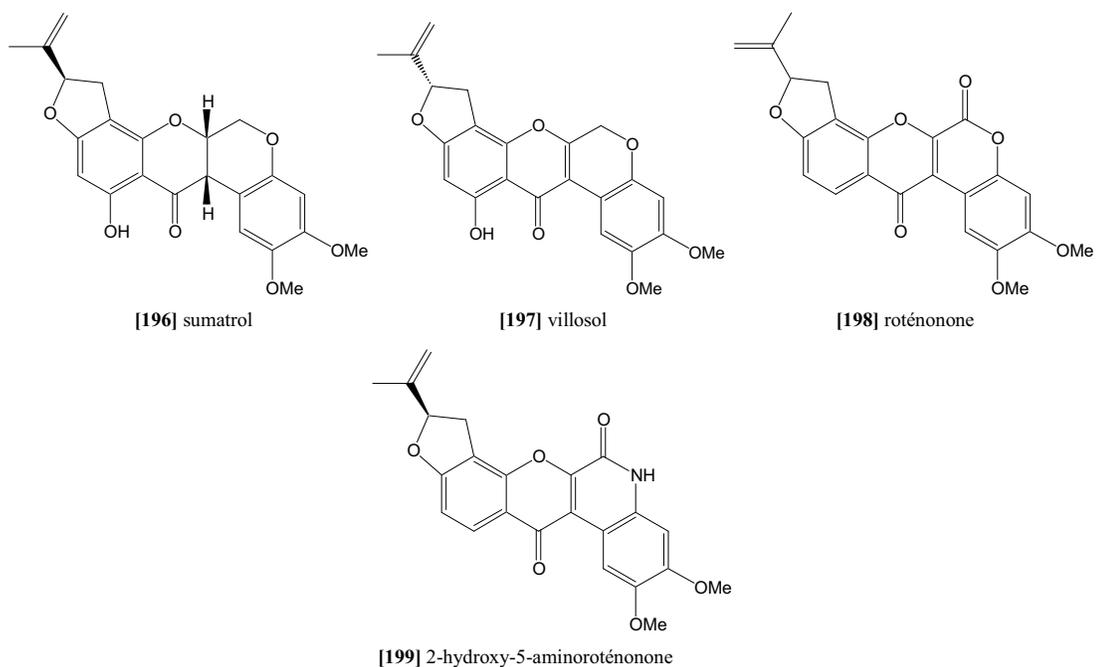
[193] acide rotoïque



[194] acide déguoïque



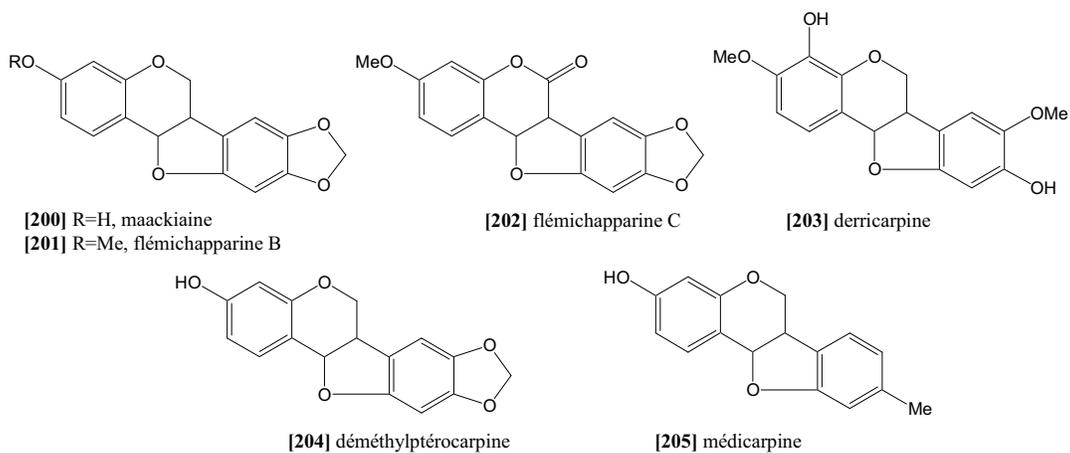
[195] malaccoïque



**Figure 29** : Roténoïdes répertoriés dans le genre *Derris*

#### 3.1.4.4. Ptérocarpanes

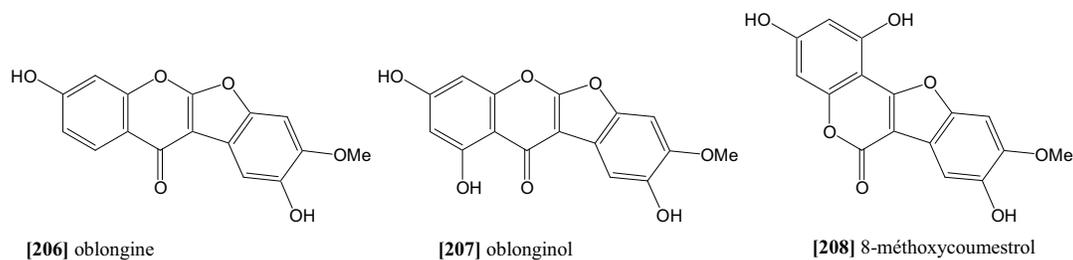
Six ptérocarpanes sont décrits dans le genre, isolés de quatre espèces différentes. Les activités associées sont essentiellement anti-oxydantes [202] ou hypotensives [200]-[201].



**Figure 30** : Ptérocarpanes répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.1.4.5. Coumarochromones

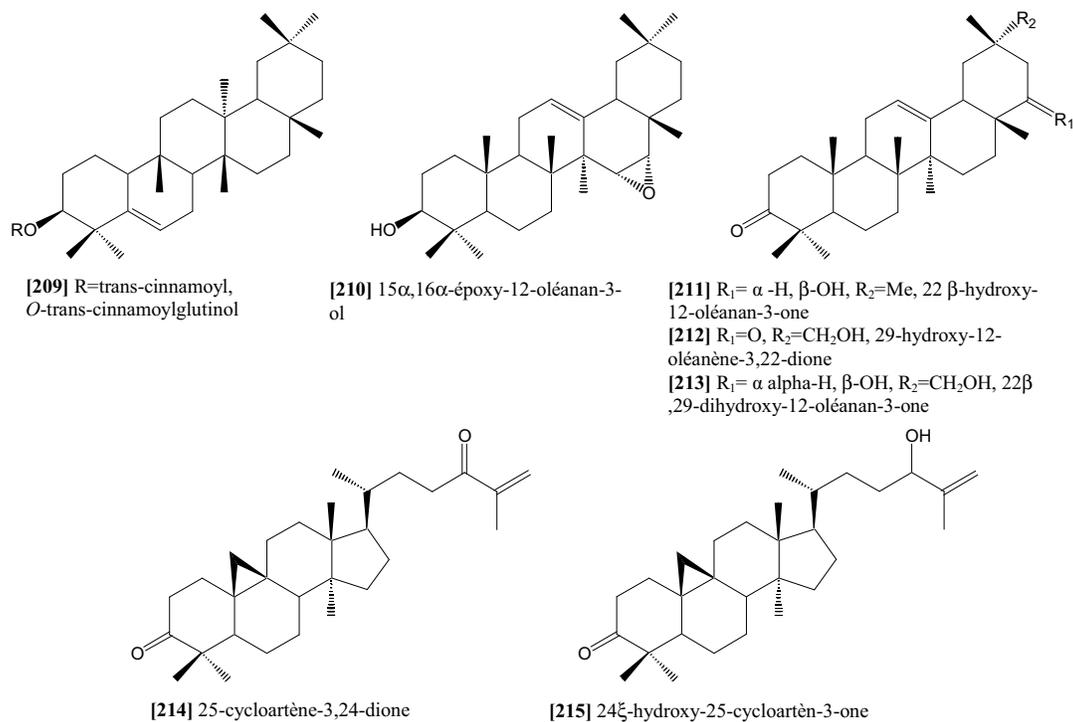
Seules trois coumarochromones sont répertoriées dans le genre et isolées de la même espèce : *Derris oblonga*.

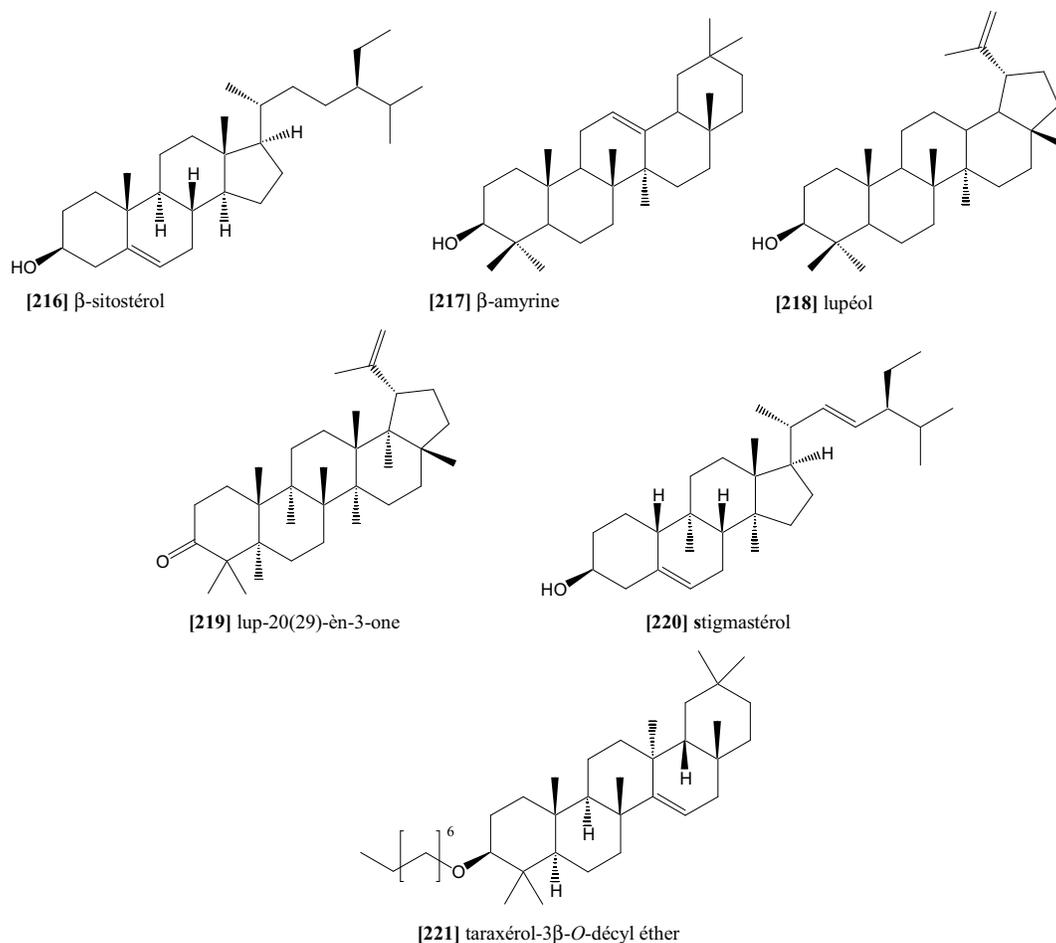


**Figure 31** : Coumarochromones répertoriées dans le genre *Derris*

## 3.2. Terpénoïdes

Treize composés terpénoïdes ont été isolés dans le genre *Derris*, ce sont des triterpènes pentacycliques : [209, 213, 217, 218, 221], ou tétracycliques : [214-216] ou des stéroïdes [220].

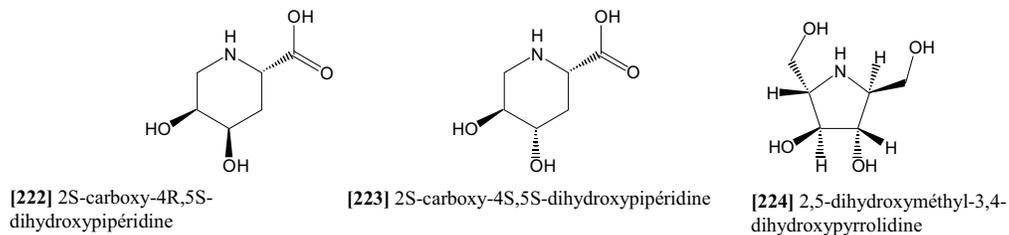




**Figure 32 :** Composés terpénoïdes répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.3. Composés azotés

Seuls trois composés azotés ont été isolés dans le genre, à partir des feuilles de *D. elliptica*, les deux formes énantiomériques d'un acide aminé : 2*S*-carboxy-4*R*,5*S*-dihydroxypipéridine [222] et 2*S*-carboxy-4*S*,5*S*-dihydroxypipéridine [223] et un alcaloïde polyhydroxylé : le 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine [224]. On remarque que ces composés sont très polaires et ne sont donc pas extraits par les techniques réservées aux alcaloïdes, mais par des mélanges hydro-alcooliques.



**Figure 33 :** Composés azotés répertoriés dans le genre *Derris*

### 3.4. Autres composés

Des composés phénoliques polyméthoxylés [225-227], des acides gras [228-230], ainsi que des dérivés glycosylés [233-246] ont également été isolés dans le genre *Derris*. Le composé [225] possède une activité larvicide.

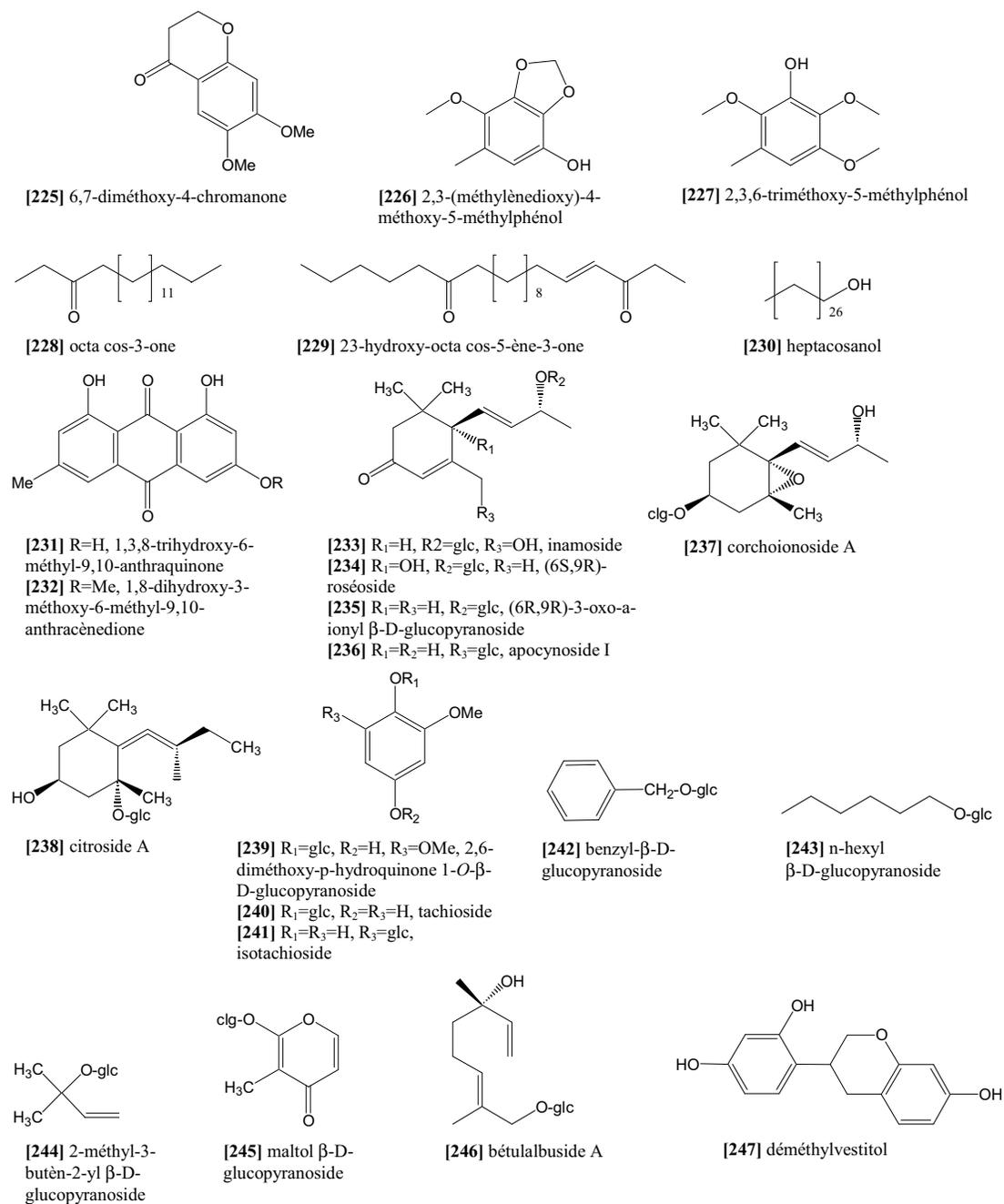


Figure 34 : Autres composés répertoriés dans le genre *Derris*

Dans ce tableau sont regroupés, par famille, les différents composés répertoriés dans le genre *Derris*. L'espèce, la partie de la plante dont ils sont issus, éventuellement les activités biologiques associées et les références bibliographiques sont indiqués pour chaque composé.

**Tableau 2** : Composés répertoriés dans le genre *Derris*

Composés	Espèce (partie étudiée <sup>19</sup> )	Activités biologiques	Références bibliographiques
<b>COMPOSES PHENOLIQUES</b>			
<b>ACIDES PHENOLS</b>			
[2] acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[3] acide 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[4] acide pipéronylique	<i>indica</i> (r)		(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
<b>STILBENES</b>			
[5] 2,4-diméthoxy-2'',2''-diméthylchromène(5'',6'',3',4')-stilbène	<i>spruceana</i> (r)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
<b>FLAVONOIDES SENSU LATO</b>			
<b>FLAVONOIDES SENSU STRICTO</b>			
<b>CHALCONES ET DERIVES</b>			
[6] rubone	<i>robusta</i> (g)		(Chibber <i>et al.</i> , 1979)
[7] scandione	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[8] pongamol	<i>indica</i> (r)	IAG <sup>20</sup> , antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[9] ovaliténone	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[10] méthylènedioxy-(3,4)-5'-hydroxy-2',3'-méthoxy-furano-(3',4',2'',3'')-dihydrochalcone	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[11] méthylènedioxy-(3,4)-5'-hydroxy-2'-méthoxy-furano-(4',3',2'',3'')-chalcone	<i>obtusata</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[12] laxichalcone	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1992)
[13] derrichalcone	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1992)
[14] 2',4'-dihydroxy-4-méthoxy-3'-prénylchalcone	<i>malaccensis</i> (f)		(Siripaisarnpipat <i>et al.</i> , 2007)
[15] derrisdione A	<i>scandens</i> (p.e.)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
[16] 1-[6-hydroxy-2-méthoxy-3-(3,3-diméthylallyl)-2'',2''-diméthylpyrano-(5'',6'':5,4)- ]-2-(4'-hydroxyphenyl)-1,2-ethanedione	<i>scandens</i> (p.e.)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
<b>AURONES, AURONOLS</b>			
[17] furano-(6,7,2'',3'')-aurone	<i>obtusata</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> ,

<sup>19</sup> (r) : racines, (gr) : graines, (t) : tiges, (f) : feuilles, (p.e) : plante entière, (e. r.) : écorces de racines, (p. a) : parties aériennes, (n. p) : non précisé

<sup>20</sup> IAG: inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase

			1976)
[18] 4-hydroxy- furano-(6,7,2'',3'')-aurone	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[19] 4-méthoxy- furano-(6,7,2'',3'')-aurone	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[20] méthylènedioxy-(3',4')- furano-(6,7,2'',3'')-aurone	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[21] derriobtusone A	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[22] derriobtusone B	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
<b>FLAVONES, FLAVANOLS</b>			
[23] 3,7-diméthoxyflavone	<i>indica</i> (t+ r)		(Koysomboon <i>et al.</i> , 2006)
[24] desméthoxykanugine	<i>indica</i> (t+ r)		(Koysomboon <i>et al.</i> , 2006)
[25] 4'-hydroxy-5,7,3',6'-tétraméthoxyflavone	<i>robusta</i> (gr)		(Gupta <i>et al.</i> , 1998)
[26] éther tétraméthylé de fisétine	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[27] 3-méthoxy-7-hydroxy-3',4'-méthylènedioxyflavone	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[28] 7- <i>O</i> -méthylchryisine	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[29] 7,4'-diméthoxy-5-hydroxyflavone	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[30] mauritanine	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[31] kaempférol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2009)
[32] quercétine-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2009)
[33] quercétine-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2009)
[34] kaempférol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2009)
[35] kaempférol-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2009)
[36] rhamnétine 3- <i>O</i> - $\beta$ -néohespéridoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Ramachandran-Nair <i>et al.</i> , 1986)
[37] quercétine 3- <i>O</i> - $\beta$ -néohespéridoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Ramachandran-Nair <i>et al.</i> , 1986)
[38] 5-hydroxy-6'',6''-diméthylchromèno-(7,8,2'',3'')-flavone	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[39] 3,6-diméthoxy-6'',6''-diméthylchromèno-(7,8,2'',3'')-flavone	<i>obtusa</i> (e. r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[40] 3,6-diméthoxy-6'',6''-diméthylchromèno-(7,8,2'',2'')-flavone	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[41] méthylènedioxy-(3,4)-3,6-diméthoxy-6'',6''-diméthylchromèno-(7,8,2'',3'')-flavone	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[42] 3,5,6-triméthoxyfurano-(7,8,2'',3'')-flavone	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[43] méthylènedioxy-(3',4')-3,5,6-triméthoxyfurano-(7,8,2'',3'')-flavone	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[44] méthylènedioxy-(3',4')-5,6-diméthoxyfurano-(7,8,2'',3'')-flavone	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)

[45] 3',4'-dihydroxy-4H-furo[2,3-h]chromèn-4-one	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[46] 3,3',4'-trihydroxy-4H-furo[2,3-h]chromèn-4-one	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[47] karanjine	<i>indica</i> (t+r)		(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[48] pongapine	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[49] pongaglabrone	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[50] pongachromène	<i>indica</i> (t+r)	anti-mycobactérien	(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[51] pinnatine	<i>indica</i> (t et r)		(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
	<i>indica</i> (r)	IAG, antioxydant	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> , 2009)
[52] 3-méthoxy-(3'',4''-dihydro-3'',4''-diacétoxy)-2'',2''-diméthylpyrano-(7,8:5'',6'')-flavone	<i>indica</i> (t + r)	anti-mycobactérien	(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
[53] 2'-méthoxy-4',5'-méthylènedioxyfurano[7,8 :4'',5'']-flavone	<i>indica</i> (t + r)		(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
[54] lachéolatine B	<i>indica</i> (t+ r)		(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
[55] pachycarine D	<i>indica</i> (t+ r)		(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
[56] karanjachromène	<i>indica</i> (t+ r)		(Koysoomboon <i>et al.</i> , 2006)
[57] laxifoline	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
[58] isolaxifoline	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
<b>FLAVANONES, FLAVANONOLS</b>			
[59] lupinifoline	<i>reticulata</i> (t)		(Mahidol <i>et al.</i> , 1997)
	<i>trifoliata</i> (g)	antiplasmodial	(Yenesew <i>et al.</i> , 2009)
	<i>scandens</i> (f+r)		(Ganapaty <i>et al.</i> , 2006)
	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
	<i>laxiflora</i> (f)		(Kim <i>et al.</i> , 1995)
[60] 3'-méthoxylupinifoline	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
[61] lupinifoline 4'-méthyl éther	<i>trifoliata</i> (g)		(Yenesew <i>et al.</i> , 2009)
[62] 2''3''-dihydroxylupinifoline	<i>reticulata</i> (t)	cytotoxique	(Mahidol <i>et al.</i> , 2002)
[63] 2'',3''-époxy-lupinifoline	<i>reticulata</i> (t)		(Mahidol <i>et al.</i> , 1997)
[64] 1''-hydroxy-2'',3''-époxy-lupinifoline	<i>reticulata</i> (t)		
[65] déréticulatine	<i>reticulata</i> (t)		(Mahidol <i>et al.</i> , 1997)
[66] ovaliflavanone	<i>scandens</i> (f+r)	anti-inflammatoire	(Ganapaty <i>et al.</i> , 2006)
[67] derriflavanone	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1992)
[68] 4',5-dihydroxy-8-hydroxyméthyl-6'',6''-diméthylpyrano[2'',3'' :7,6]flavanone	<i>reticulata</i> (t)	cytotoxique	(Mahidol <i>et al.</i> , 2002)
[69] éturunagarone	<i>scandens</i> (t)		(M.N. Rao <i>et al.</i> , 1994)
[70] pongapinone-B	<i>indica</i> (r)	IAG,	(R. Ranga Rao <i>et al.</i> ,

		antioxydant	2009)
[71] méthylènedioxy-(3',4')-5-hydroxy-6-méthoxy-furano-(7,8,2'',3'')-flavanone	<i>araripensis</i> (er)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[72] 3,5,6-triméthoxyfurano-(7,8,2'',3'')-flavanonol	<i>araripensis</i> (er)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
[73] urucuol A	<i>urucu</i> (f)		(Lobo <i>et al.</i> , 2009)
[74] urucuol B	<i>urucu</i> (f)		(Lobo <i>et al.</i> , 2009)
[75] urucuol C	<i>urucu</i> (f)		(Lobo <i>et al.</i> , 2009)
[76] dihydroflavonol isotirumaline	<i>urucu</i> (f)		(Lobo <i>et al.</i> , 2009)
<b>FLAVANES</b>			
[77] 3,4,5,6-tétraméthoxyfurano-(7,8,2'',3'')-flavane	<i>araripensis</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1981)
<b>ISOFLAVONOIDES</b>			
<b>ISOFLAVONES</b>			
[78] génistéine	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
	<i>elliptica</i> (r)		
[79] santal	<i>scandens</i> (t)	antioxydant, antibactérien	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[80] 3'-méthylorobol	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[81] derrugénine	<i>robusta</i> (g)		(Chibber <i>et al.</i> , 1979)
[82] robustigénine	<i>robusta</i> (g)		(Chibber <i>et al.</i> , 1979)
[83] 6-hydroxy-7,2',4'-triméthoxyisoflavone	<i>robusta</i> (gr)		(Gupta <i>et al.</i> , 1998)
[84] derrustone	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[85] prunétine	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[86] 7-hydroxy-3-(4-hydroxyphényl)-4H-1-benzopyran-4-one	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[87] 7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[88] formononétine	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[89] daidzéine	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[90] 3'-méthoxydaidzéine	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[91] 7,8-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[92] dihydrodaidzéine	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[93] derrone	<i>robusta</i> (g)		(Chibber <i>et al.</i> , 1980)
[94] scandénal	<i>scandens</i> (t)	hypotensif	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[95] chandalone	<i>scandens</i> (t)	antioxydant, antibactérien	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[96] scandérone	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[97] scandinone	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
	<i>scandens</i> (t)	antioxydant	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>scandens</i> (p.e)	antioxydant, IAG	(Rao <i>et al.</i> , 2007)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
	<i>scandens</i> (t)		(Rao <i>et al.</i> , 1994)
[98] lupalbigénine	<i>scandens</i> (t)	antioxydant,	(Mahabusarakam <i>et</i>

		antibactérien	<i>al.</i> , 2004)
	<i>scandens</i> (t)	anti dermatophyte	(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2009)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
	<i>scandens</i> (t)	anti-inflammatoire	(Laupattarakasem <i>et al.</i> , 2004)
[99] robustone	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[100] robustone méthyl éther	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[101] isorobustone	<i>scandens</i> (t)	antioxydant	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[102] derrubone	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[103] 5-hydroxy-2'',2''-diméthylchroméno-(6,7:5'',6''')-2''',2''''-diméthylchroméno(3',4':5''',6''')isoflavone	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>spruceana</i> (r)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
[104] ulexone A	<i>scandens</i> (t)		(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[105] isochandalone	<i>scandens</i> (t)	antioxydant	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[106] lupiwightéone	<i>scandens</i> (t)	antioxydant	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[107] 5-hydroxy-2',4',5'-triméthoxy-2'',2''-diméthylpyrano<6'',5''-h>isoflavone	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[108] isoscandinone	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2007)
[109] scandénone	<i>scandens</i> (p.e)	inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase	(Rao <i>et al.</i> , 2007)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
[110] 4',5',7-trihydroxybiprénylisoflavone	<i>scandens</i> (p.e)	antioxydant, inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase	(Rao <i>et al.</i> , 2007)
[111] osajiine	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2007)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
[112] 4'-O-méthylsajine	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2007)
[113] 4'-O-méthylscandinone	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2007)
[114] derrisisoflavone A	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
	<i>scandens</i> (t)	antioxydant, antibactérien	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2009)
[115] derrisisoflavone B	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[116] derrisisoflavone D	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[117] derrisisoflavone E	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[118] 5,7,4'-trihydroxy-6,8-diprénylisoflavone	<i>scandens</i> (t)	anti dermatophyte	(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[119] erysénégalenséine E	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[120] lupinisol A	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[121] derrisisoflavone C	<i>scandens</i> (t)	anti dermatophyte	(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2009)
[122] derrisisoflavone F	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[123] lupinisoflavone G	<i>scandens</i> (t)		(Sekine <i>et al.</i> , 1999)
[124] pomiférine	<i>malaccensis</i>	cytotoxique	(Svasti <i>et al.</i> , 2005)
[125] 3'-formylalpinumisoflavone	<i>scandens</i> (t)		(Chuankammerdkarn

			<i>et al.</i> , 2002)
[126] 2-(1-hydroxy-1-méthyléthyl)-3-hydroxy-2,3-dihydrofuranoalpinumisoflavone	<i>scandens</i> (t)		(Chuankammerdkarn <i>et al.</i> , 2002)
[127] sénégalensine	<i>scandens</i> (t)		(Chuankammerdkarn <i>et al.</i> , 2002)
[128] 5-hydroxy-2'',2''-dimethylchromèno[6,7:5'',6'']-2''',2'''-dimethylchromèno[3',4':5''',6''']isoflavone	<i>spruceana</i> (r.)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
[129] 3'- $\gamma,\gamma$ -diméthylallylwightéone	<i>scandens</i> (t)		(Rao <i>et al.</i> , 1994)
[130] 6,8-diisoprényl5,7,4'-trihydroxyisoflavone	<i>scandens</i> (t)		(Rao <i>et al.</i> , 1994)
[131] 8-(3,3-diméthylallyl)-4'-hydroxy-2''',2'''-diméthylpyran[6,7-b]isoflavone	<i>scandens</i> (t)		(Rao <i>et al.</i> , 1994)
[132] 8,4'-diméthoxy-7-O- $\gamma,\gamma$ -diméthylallylisoflavone	<i>indica</i> (t et r)	anti-mycobactérien	(Koysomboon <i>et al.</i> , 2006)
[133] derriscandénoside A	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[134] 8-hydroxy-4',7-diméthoxyisoflavone 8-O- $\beta$ -glucopyranoside	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[135] derriscandénoside C	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[136] derriscandénoside B	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[137] derriscandénoside D	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[138] derriscandénoside E	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[139] derriscanoside A	<i>scandens</i> (f+t)		(Li <i>et al.</i> , 1999)
	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[140] derriscanoside B	<i>scandens</i> (f+t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
	<i>scandens</i> (t)	hypotensif <i>in vivo</i>	(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[141] diadzéine 7-O-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopyranoside	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[142] formononétine 7-O-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopyranoside	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[143] génistéine 7-O-[ $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- $\beta$ -glucopyranoside	<i>scandens</i> (t)	hypotensif <i>In vivo</i>	(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[144] formononétine 7-O- $\beta$ -glucopyranoside	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[145] 7-hydroxy-4',8-diméthoxyisoflavone 7-O- $\beta$ -glucopyranoside	<i>scandens</i> (t)		(Rukachaisirikul <i>et al.</i> , 2002)
[146] sphaérobioside	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
[147] 7-O- $\alpha$ -rhamno-(1-6)- $\beta$ -glucosylgénistéine	<i>scandens</i> (t)	anti-inflammatoire	
<b>3-ARYLCOUMARINES</b>			
[148] acide lonchocarpique	<i>scandens</i> (r)		(Johnson <i>et al.</i> , 1966)
[149] scandénine	<i>scandens</i> (r)		(Johnson <i>et al.</i> , 1966)
	<i>scandens</i> (r)		(Clark <i>et al.</i> , 1943)
	<i>spruceana</i> (r)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2009)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
	<i>scandens</i> (t)	anti-	(Laupattarakasem <i>et</i>

		inflammatoire	<i>al.</i> , 2004)
[150] scandénine A	<i>scandens</i> (p.e)	antioxydant, IAG	(Rao <i>et al.</i> , 2007)
	<i>scandens</i> (p.e)	insecticide	(Sreelatha <i>et al.</i> , 2009)
[151] 4',4- <i>O</i> -diméthylscandénine	<i>scandens</i> (p.e)		(Rao <i>et al.</i> , 2009)
[152] scandénine B	<i>scandens</i> (p.e)	antioxydant	(Rao <i>et al.</i> , 2009)
[153] 3-méthylènedioxy(3',4')phényl-4-hydroxy-5-méthoxy-2'',2''-diméthylchromèno(5'',6'',7,8)-coumarine	<i>spruceana</i> (r)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
[154] 3-méthylènedioxy(3',4')phényl-4,5-diméthoxy-2'',2''-diméthylchromèno(5'',6'',7,8)-coumarine	<i>spruceana</i> (r)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
[155] derrusnine	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[156] acide robuste	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
	<i>scandens</i> (t)		(Rao <i>et al.</i> , 1994)
[157] robuste acid methyl ether	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[158] robuste	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[159] robuste méthyl éther	<i>scandens</i> (r)		(Falshaw <i>et al.</i> , 1969)
	<i>robusta</i> (r)		(East <i>et al.</i> , 1969)
[160] 4,4'- <i>O</i> -méthylscandénine	<i>scandens</i> (t)		(Rao <i>et al.</i> , 1994)
<b>ROTENOIDES</b>			
[1] roténone	<i>malaccensis</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1940)
	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>elliptica</i> (r)		(D'Andrea <i>et al.</i> , 2007)
	<i>trifoliata</i> (r)	larvicide	(Yenesew <i>et al.</i> , 2005)
	<i>trifoliata</i> (gr)	larvicide	(Yenesew <i>et al.</i> , 2005)
	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>malaccensis</i> (t,r)		(Sae-Yun <i>et al.</i> , 2006)
	<i>elliptica</i> (t, r)		(Sae-Yun <i>et al.</i> , 2006)
	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (n.p)	cytotoxique	(Xu <i>et al.</i> , 2007)
<i>trifoliata</i> (t)		(Ito <i>et al.</i> , 2004)	
[161] 12a-hydroxyroténone = rotenolone	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (t)		(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2007)
[162] 6a,12a-déhydroroténone	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (t)		(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)

	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2007)
[163] 6'-hydroxy-6a, 12a-déhydroroténone	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[164] 6 $\alpha$ $\beta$ , 12 $\alpha$ $\beta$ , 5' $\alpha$ -roténolone	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[165] déguéline	<i>malaccensis</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1940)
	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (r)	larvicide	(Yenesew <i>et al.</i> , 2005)
	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (t)	contre cancer	(Fang <i>et al.</i> , 2009)
[166] téphrosine	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (gr)	larvicide	(Yenesew <i>et al.</i> , 2006)
	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (n.p)	cytotoxique	(Fang <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (pa)		(Xu <i>et al.</i> , 2007)
[167] $\alpha$ -toxicarol	<i>malaccensis</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1939)
	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (r)	larvicide	(Yenesew <i>et al.</i> , 2005)
	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (t)	contre cancer	(Ito <i>et al.</i> , 2004)
[168] 12a-hydroxy- $\alpha$ -toxicarol	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[169] 6a, 12a-déhydro- $\alpha$ -toxicarol	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (t)		(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1993)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
	<i>heyneana</i>		(Ganapaty <i>et al.</i> , 2008)
[170] 6a, 12a-déhydrodéguéline	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (t)		(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (gr)		(Yenesew <i>et al.</i> , 2006)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
	<i>heyneana</i>		(Ganapaty <i>et al.</i> ,

			2008)
	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2007)
[171] 6-hydroxy-6a,12a-déhydro- $\alpha$ -toxicarol	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[172] 6-oxo-6a, 12a-déhydro- $\alpha$ -toxicarol	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[173] 4',5', dihydro-4',5'-dihydroxytéphrosine	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[174] 4',5'-dihydroxy-6a,12a-déhydrodégueline	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[175] 11,4',5'-trihydroxy-6a,12a-déhydrodégueline	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)
[176] 7'-hydroxy-6a, 12a-déhydrodégueline	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[177] 6-hydroxy-6a, 12a-déhydrodégueline	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[178] 12a $\beta$ -hydroxydégueline	<i>trifoliata</i> (t)		(Ito <i>et al.</i> , 2004)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[179] 6-oxo-6a, 12a-déhydrodégueline	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[180] 13-homo-13-oxa-6a,12a-déhydrodégueline	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
[181] 7a-O-méthyl-déguelol	<i>trifoliata</i> (r)		(Yenesew <i>et al.</i> , 2005)
	<i>trifoliata</i> (gr)		(Yenesew <i>et al.</i> , 2006)
[182] 7a-O-méthyl-12a-hydroxydéguelol	<i>elliptica</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1939)
	<i>elliptica</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1940)
	<i>malaccensis</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1940)
	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
	<i>malaccensis</i> (r)	contre <i>H. pylori</i>	(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
	<i>trifoliata</i> (t)		(Ito <i>et al.</i> , 2004)
[183] elliptone	<i>malaccensis</i> (t)		(Thasana <i>et al.</i> , 2001)
	<i>trifoliata</i> (t)	inhibition NO	(Tewtrakul <i>et al.</i> , 2009)
	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
	<i>trifoliata</i> (gr)		(Yenesew <i>et al.</i> , 2006)
	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
[184] 12a-hydroxyelliptone	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
[185] déhydroelliptone	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
[186] 6-oxo-déhydroelliptone	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
[187] 7a-O-méthylelliptonol	<i>trifoliata</i> (t)	cytotoxique	(Cheenpracha <i>et al.</i> , 2007)
[188] 12-déoxo-12 $\alpha$ -acétoxyelliptone	<i>malaccensis</i> (r)		(Wangteeraprasert <i>et al.</i> , 2008)
	<i>heyneana</i>		(Ganapaty <i>et al.</i> , 2008)
	<i>malaccensis</i> (t)		(Thasana <i>et al.</i> , 2001)
	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[189] spiro-13-homo-13-oxaelliptone	<i>trifoliata</i> (gr)		(Yenesew <i>et al.</i> , 2006)
[190] derrisine	<i>malaccensis</i> (r)		(Takashima <i>et al.</i> , 2002)
[191] 6 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -12a-hydroxyelliptone	<i>trifoliata</i> (t)	prévention EBV	(Ito <i>et al.</i> , 2004)

[192] acide elliptoïque	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[193] acide rotoïque	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[194] acide déguoïque	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[195] malaccol	<i>malaccensis</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1940)
[196] sumatrol	<i>malaccensis</i> (r)		(Harper <i>et al.</i> , 1940)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[197] villosol	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[198] roténonone	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
[199] 2-hydroxy-5-aminoroténonone	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2009)
<b>PTEROCARPANES</b>			
[200] maackiaïne	<i>scandens</i> (t)	hypotensif	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>indica</i> (t+r)		(Koysomboon <i>et al.</i> , 2006)
[201] flémichapparine B	<i>scandens</i> (t)	hypotensif	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
[202] flémichapparine C	<i>scandens</i> (t)	antioxydant	(Mahabusarakam <i>et al.</i> , 2004)
[203] derricarpine	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1993)
[204] deméthylptérocarpine	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[205] médicarpine	<i>indica</i> (t+r)		(Koysomboon <i>et al.</i> , 2006)
<b>COUMARONOCROMONES</b>			
[206] oblongine	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1993)
[207] oblonginol	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1993)
[208] 8-méthoxycouméstrol	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
<b>COMPOSES TERPENOÏDES</b>			
[209] <i>O</i> -trans-cinnamoylglutanol	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[210] 15 $\alpha$ ,16 $\alpha$ -époxy-12-oléanan-3-ol	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[211] 22 $\beta$ -hydroxy-12-oléanan-3-one	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[212] 29-hydroxy-12-oléanène-3,22-dione	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[213] 22 $\beta$ ,29-dihydroxy-12-oléanan-3-one	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[214] 25-cycloartène-3,24-dione	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[215] 24 $\xi$ -hydroxy-25-cycloartèn-3-one	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[216] $\beta$ -sitostérol	<i>obtusata</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
	<i>spruceana</i> (r)		(Garcia <i>et al.</i> , 1986)
[217] $\beta$ -amyrine	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[218] lupéol	<i>laxiflora</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1991)
	<i>heyneana</i>		(Ganapaty <i>et al.</i> , 2008)
[219] lup-20(29)-èn-3-one	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[220] stigmastérol	<i>heyneana</i>		(Ganapaty <i>et al.</i> , 2008)
[221] taraxérol-3 $\beta$ -O-décyl éther	<i>trifoliata</i> (p.a)		(Xu <i>et al.</i> , 2004)
<b>COMPOSES AZOTES</b>			
<b>ACIDES AMINES</b>			
[222] 2S-carboxy-4R,5S-dihydroxypipéridine	<i>elliptica</i> (f)		(Marlier <i>et al.</i> , 1976)
[223] 2S-carboxy-4S,5S-dihydroxypipéridine	<i>elliptica</i> (f)		(Marlier <i>et al.</i> , 1976)
<b>IMINO-ALCOOLS</b>			
[224] 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrolidine	<i>elliptica</i> (f)		(Welter <i>et al.</i> , 1976)
<b>AUTRES COMPOSES</b>			

[225] 6,7-diméthoxy-4-chromanone	<i>trifoliata</i> (gr)	larvicide	(Yenesew <i>et al.</i> , 2006)
[226] 2,3-(méthylènedioxy)-4-méthoxy-5-méthylphénol	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[227] 2,3,6-triméthoxy-5-méthylphénol	<i>laxiflora</i> (p.e.)		(Chiu <i>et al.</i> , 2008)
[228] octa cos-3-one	<i>robusta</i> (gr)		(Gupta <i>et al.</i> , 1999)
[229] 23-hydroxy-octa cos-5-ène-3-one	<i>robusta</i> (gr)		(Gupta <i>et al.</i> , 1999)
[230] heptacosanol	<i>obtusata</i> (e.r)		(Nascimento <i>et al.</i> , 1976)
[231] 1,3,8-trihydroxy-6-méthyl-9,10-anthraquinone	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[232] 1,8-dihydroxy-3-méthoxy-6-méthyl-9,10-anthracènedione	<i>oblonga</i> (r)		(Lin <i>et al.</i> , 1995)
[233] inamoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[234] (6S,9R)-roséoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[235] (6R,9R)-3-oxo- $\alpha$ -ionyl $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[236] apocynoside I	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[237] corchoionoside A	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[238] citroside A	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[239] 2,6-diméthoxy- <i>p</i> -hydroquinone 1- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[240] tachioside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[241] isotachioside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[242] benzyl- $\beta$ -Dglucopyranoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[243] n-hexyl $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[244] 2-méthyl-3-butèn-2-yl $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[245] maltol $\beta$ -D-glucopyranoside	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[246] bétulalbuside A	<i>trifoliata</i> (f)		(Takeda <i>et al.</i> , 2008)
[247] déméthylvestitol	<i>elliptica</i> (r)		(Lu <i>et al.</i> , 2008)

## **PARTIE II :**

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

# 1. Etude phytochimique de *Derris ferruginea*

## 1.1. Obtention des extraits

1 200 g de tiges de *Derris ferruginea* ont été séchés à l'air, broyés, puis extraits successivement par des solvants de polarité croissante : cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol (8 litres, 72 heures) dans des appareils de type Soxhlet. Quatre extraits ont donc été obtenus, nommés DfS1 (extrait cyclohexanique de *Derris ferruginea* Stems), DfS2 (extrait dichlorométhanique), DfS3 (extrait par l'acétate d'éthyle) et DfS4 (extrait méthanolique).

Par la même méthode, quatre extraits bruts ont été obtenus à partir de 800 g de feuilles séchées : DfL1 (extrait cyclohexanique de *Derris ferruginea* Leaves), DfL2, DfL3 et DfL4.

Les masses obtenues des différents extraits sont regroupées dans le **tableau 3**.

**Tableau 3** : Masses obtenues pour chaque extrait de tiges et de feuilles

Extrait	Tiges				Feuilles			
	DfS1	DfS2	DfS3	DfS4	DfL1	DfL2	DfL3	DfL4
Solvant	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	MeOH	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	MeOH
Masse	12 g	3 g	20 g	70 g	30 g	9 g	38 g	74 g

## 1.2. Purification des composés

### 1.2.1. Méthodologie générale des purifications

Les différents extraits obtenus ont été analysés par CCM et par CLHP analytique. Un préfractionnement a ensuite été réalisé, soit par MPLC, soit par FCPC, en fonction des profils obtenus, de la polarité, de la masse de l'extrait. Pour certains extraits (DfS4, DfL3 et DfL4), une partition liquide/liquide a été réalisée au préalable. Les conditions pour réaliser ces préfractionnements ont été optimisées en choisissant comme éléments importants la présence de flavonoïdes (utilisation du réactif de Neu en CCM et spectres UV en CLHP), les polarités et les masses suffisantes des extraits bruts.

Pour la purification des sous-fractions obtenues, plusieurs étapes de séparation ont en général été nécessaires, en utilisant différentes techniques chromatographiques (colonnes ouvertes sur gel de silice ou gel de Séphadex LH-20, CLHP préparative, CCM

préparative, Flash colonne). A la fin de chaque étape de séparation, les fractions obtenues sont analysées par CCM et CLHP, éventuellement par RMN-<sup>1</sup>H, pour permettre de réunir les fractions qui présentent le même profil et déterminer un nouveau support chromatographique ainsi qu'un nouveau système de solvant susceptible de mieux séparer les composés.

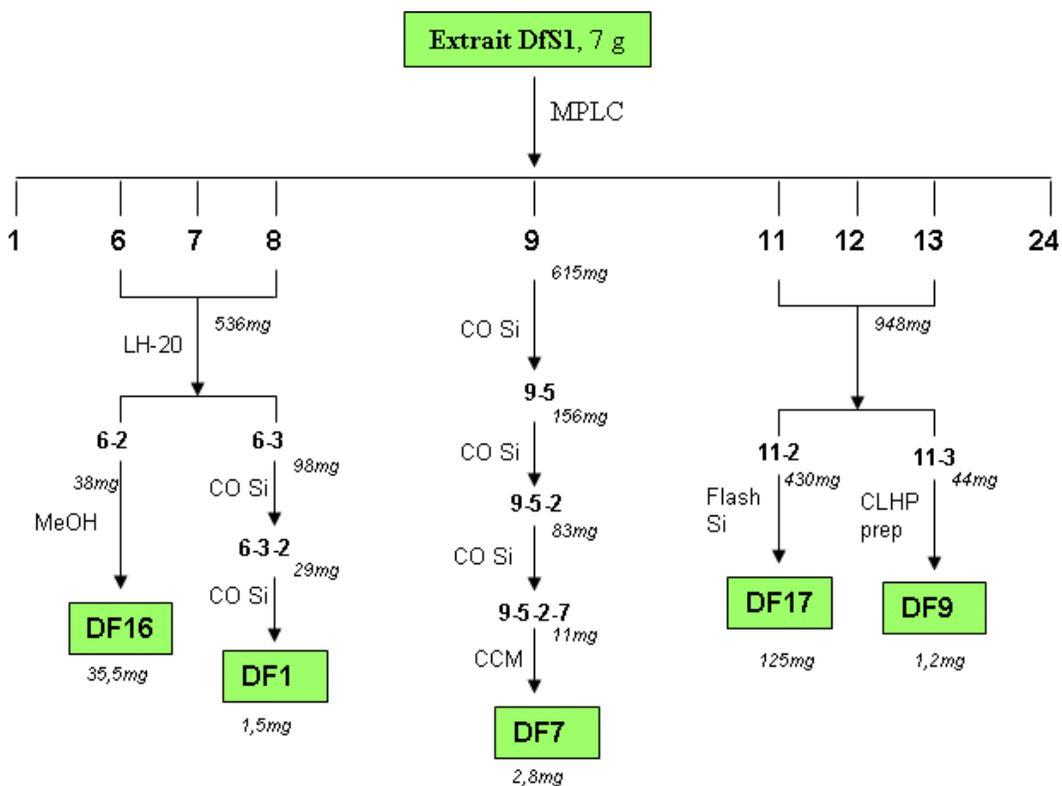
Pour chaque extrait un schéma de la purification, ainsi que le chromatogramme obtenu en CLHP à 254 nm, sont donnés ci-après. On peut noter néanmoins, que beaucoup de composés présents dans les extraits n'absorbent pas à cette longueur d'onde (chlorophylles, composés terpéniques, composés azotés), les composés isolés apparaissent donc souvent comme sur-représentés dans les chromatogrammes CLHP.

Les purifications des composés sont détaillées dans la partie expérimentale de ce manuscrit. Les composés isolés sont identifiés par un code du type **DFX** (pour *Derris ferruginea*) où X ne correspond pas à l'ordre de purification, mais à l'ordre d'apparition du composé dans la partie analyse structurale des composés (II.1.3.2.).

## 1.2.2. Isolement des composés à partir des extraits de tiges

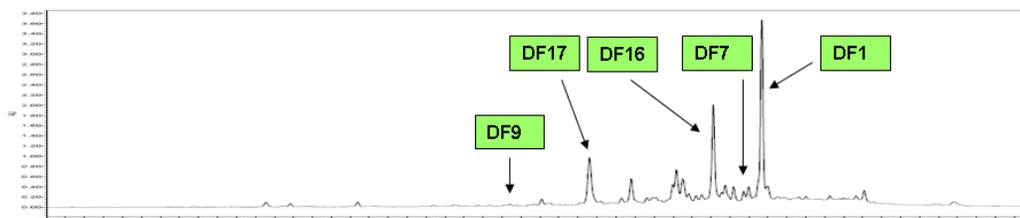
### 1.2.2.1. Extrait cyclohexanique DfS1

Le fractionnement et la purification (**Figure 35**) de 7 g de l'extrait DfS1 ont permis d'obtenir les composés : **DF1** (1,5 mg), **DF7** (2,8 mg) et **DF9** (1,2 mg). **DF1** apparaît comme le composé majoritaire de cet extrait à 254 nm (**Figure 36**). De plus, on peut noter la présence en quantités non négligeables, des composés **DF16** (35,5 mg) et **DF17** (125 mg).



**Figure 35** : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS1

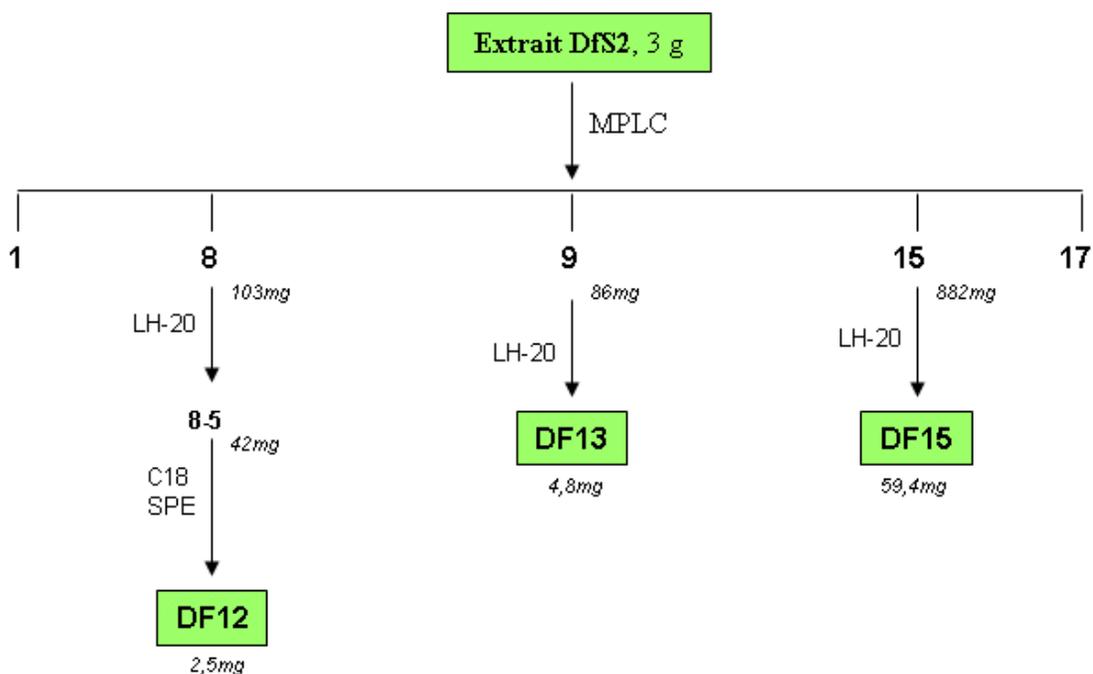
CO Si : séparation sur colonne ouverte sur gel de silice



**Figure 36** : Chromatogramme de DfS1 à 254 nm (gradient MeOH/H<sub>2</sub>O de 5/95 à 100/0 en 40 min)

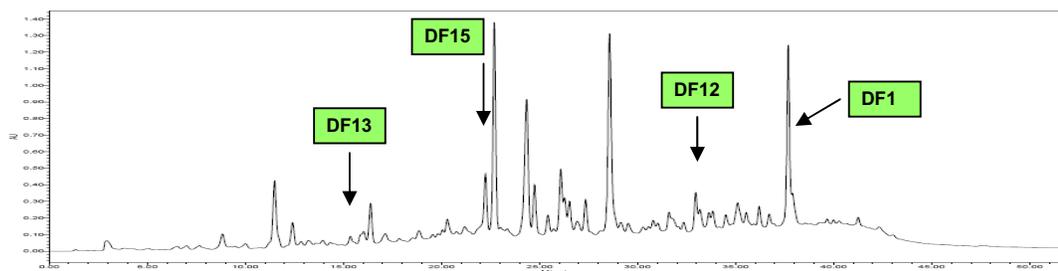
### 1.2.2.2. Extrait dichlorométhanique DfS2

De cet extrait (3 g) seules trois molécules ont pu être isolées : **DF12**, **DF13** et **DF15** (**Figure 37**). On peut noter que ces composés apparaissent minoritaires dans l'extrait à cette longueur d'onde (**Figure 38**). Le chromatogramme CLHP (**Figure 38**) montre la complexité de cet extrait et explique en partie, avec la masse faible de cet extrait, la grande difficulté à étudier ses fractions. On remarque dans cet extrait la présence en quantité non négligeable du composé **DF1**, qui n'a pas été isolé ici car déjà obtenu dans l'extrait DfS1.



**Figure 37** : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS2

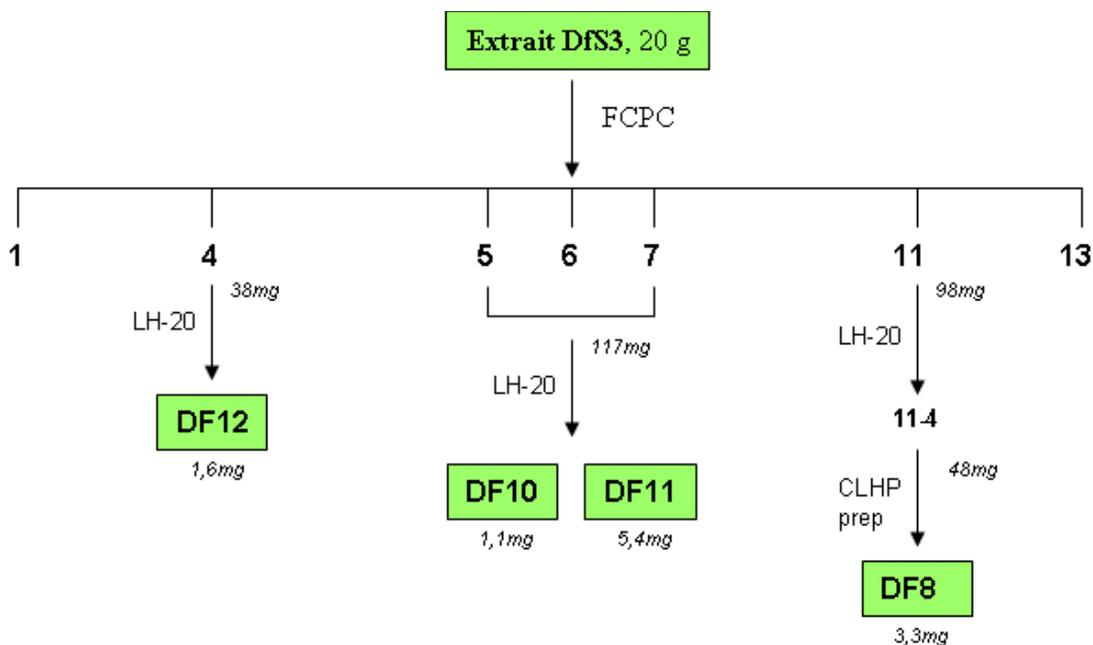
C18 SPE : chromatographie sur colonne SPE en phase inverse



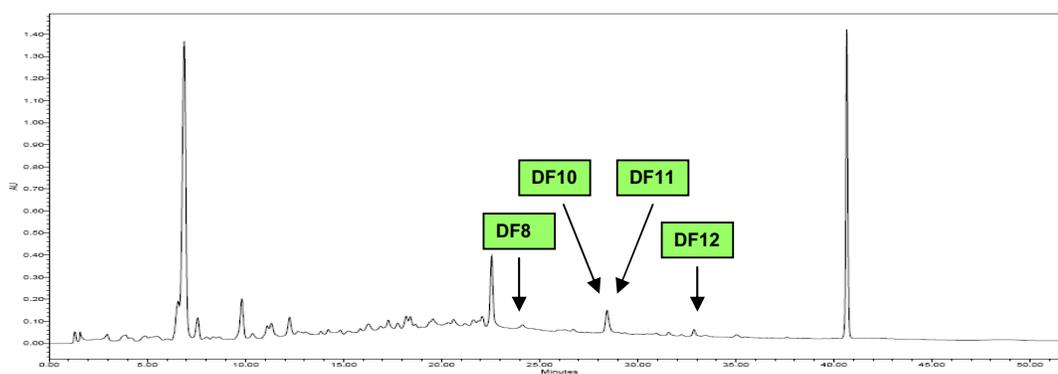
**Figure 38** : Chromatogramme de l'extrait DfS2 à 254 nm (gradient MeOH/H<sub>2</sub>O de 5/95 à 100/0 en 40 min)

### 1.2.2.3. Extrait par l'acétate d'éthyle DfS3

DfS3 (20 g) a permis d'obtenir 4 composés : **DF8**, **DF10**, **DF11**, **DF12** (**Figure 39**), dont l'un (**DF12**) a déjà été isolé de l'extrait DfS2. On remarque sur le chromatogramme CLHP à 254 nm (**Figure 40**), la présence d'un composé majoritaire relativement polaire, qui n'a pas été isolé (certainement un tanin).



**Figure 39** : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS3



**Figure 40** : Chromatogramme de DfS3 à 254 nm (gradient MeOH/H<sub>2</sub>O de 5/95 à 100/0 en 40 min)

#### 1.2.2.4. Extrait méthanolique DfS4

Malgré leur présence en faibles quantités, cette étude a permis d'isoler 2 isoflavonoïdes : **DF10** et **DF12**, déjà obtenus à partir de l'extrait DfS2. Les autres composés présents dans l'extrait ont été caractérisés ( $\text{FeCl}_3$ ) comme étant des tanins essentiellement.

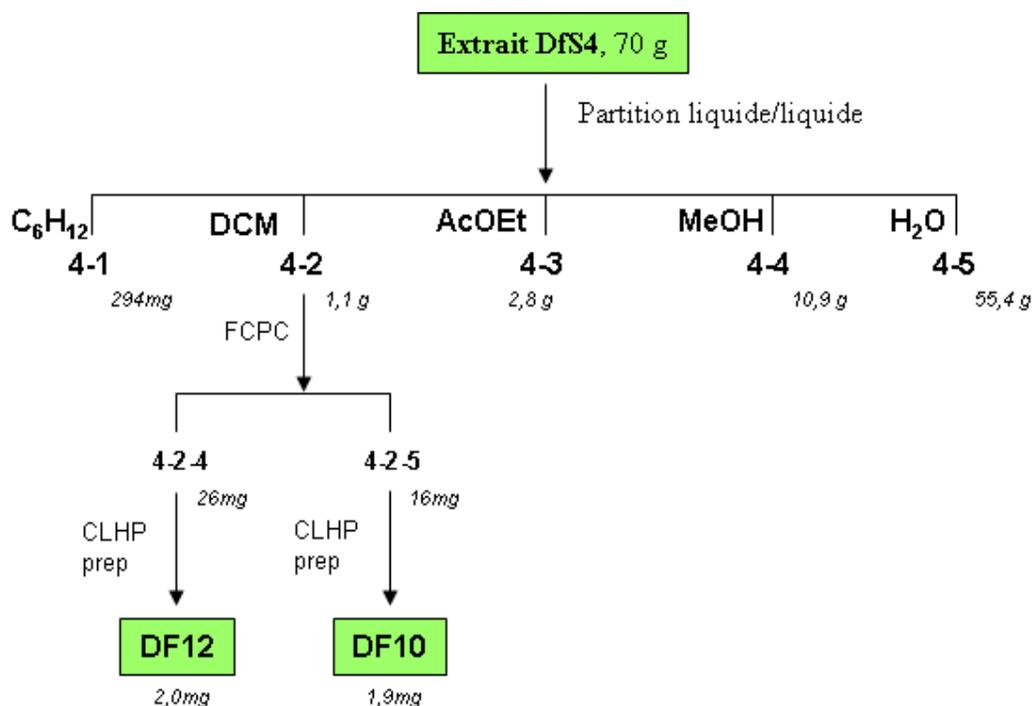


Figure 41 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfS4

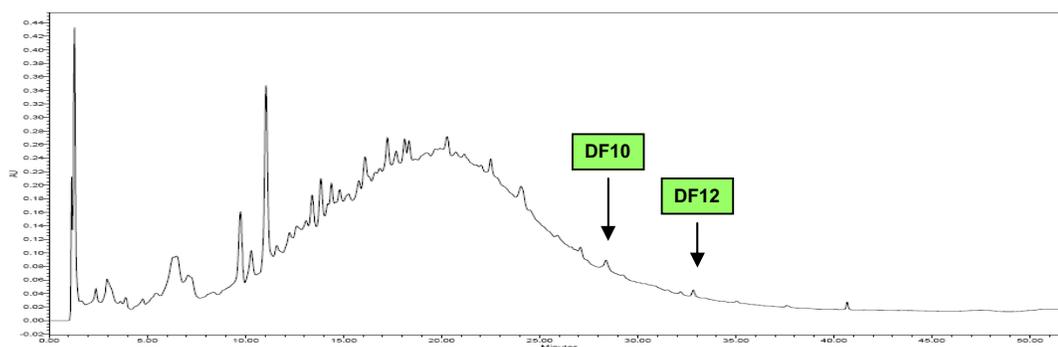


Figure 42 : Chromatogramme de DfS4 à 254 nm (gradient MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  de 5/95 à 100/0 en 40 min)

### 1.2.3. Isolement des composés à partir des extraits de feuilles

#### 1.2.3.1. Extrait cyclohexanique DfL1

L'étude phytochimique de l'extrait DfL1 a permis d'isoler 5 composés : **DF2**, **DF3**, **DF4**, **DF5** et **DF6** (Figure 43), dont l'un en grande quantité (**DF5**, 674,8 mg) (Figure 44). Ces composés sont tous des flavanones prénylées de structures très proches (*cf.* Analyse structurale des composés II.1.3.2.) et constituent les composés majoritaires dans l'extrait DfL1 (Figure 44).

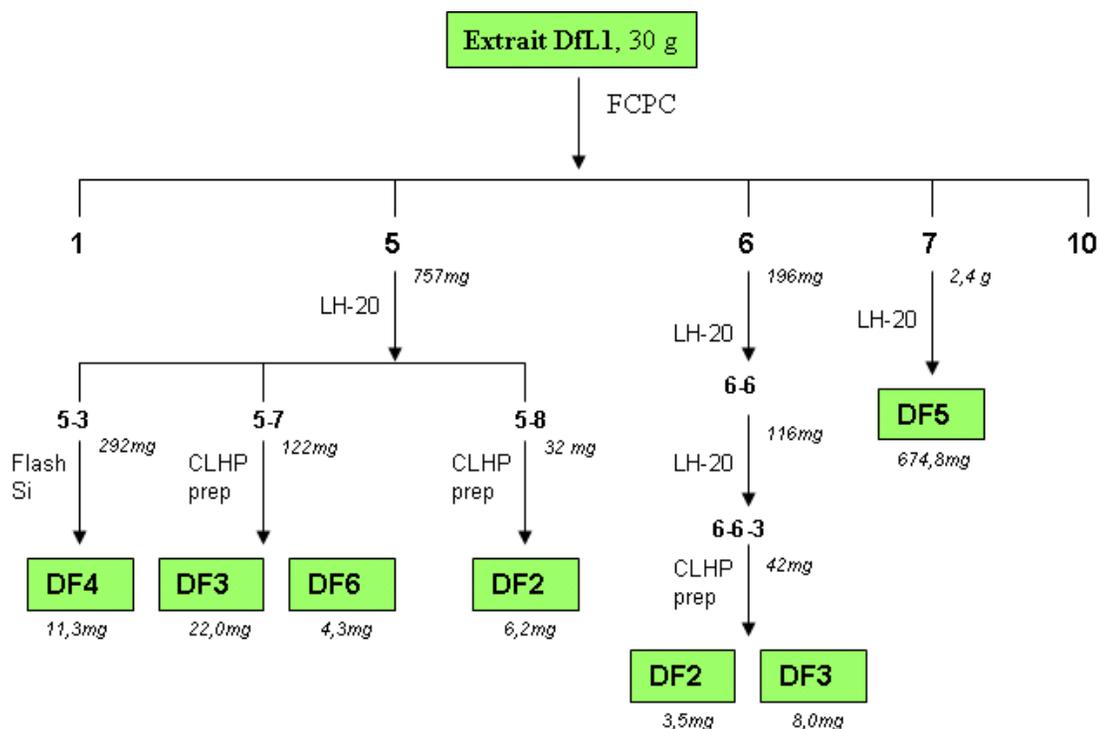


Figure 43 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfL1

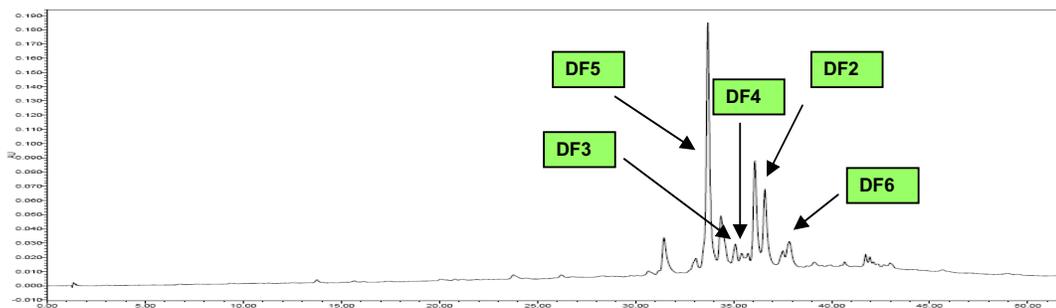


Figure 44 : Chromatogramme de DfL1 à 254 nm (gradient MeOH/H<sub>2</sub>O de 5/95 à 100/0 en 40 min)

### 1.2.3.2. Extrait dichlorométhanique DfL2

L'étude de cet extrait a permis d'isoler deux composés **DF10** (1,1 mg), **DF15** (33,8 mg) (Figure 45), déjà identifiés dans les extraits de tiges. On remarque également la présence, en quantité non négligeable, du composé **DF5**, isolé de DfL1 (Figure 46).

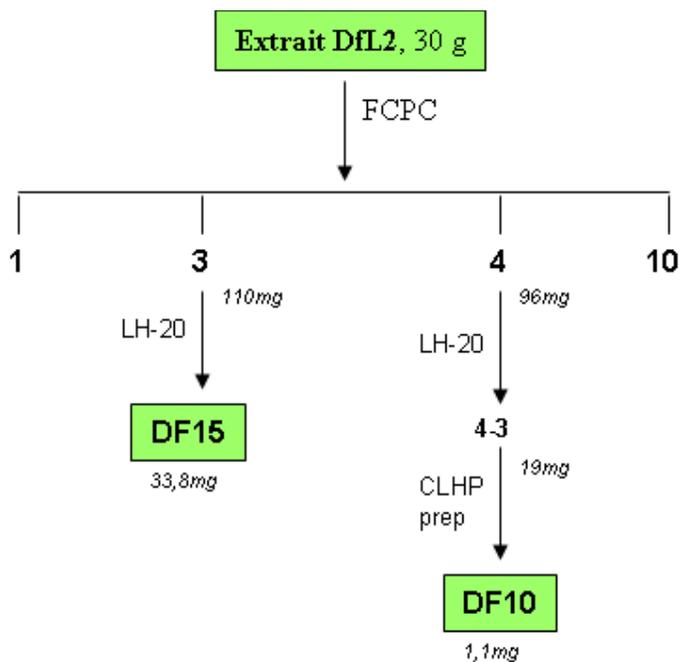


Figure 45 : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfL2

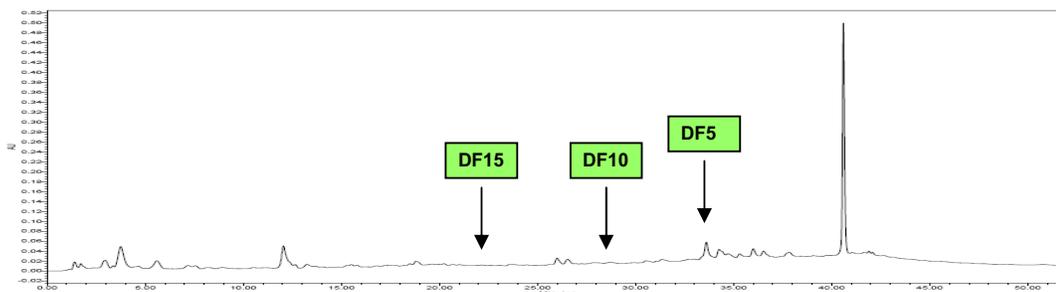
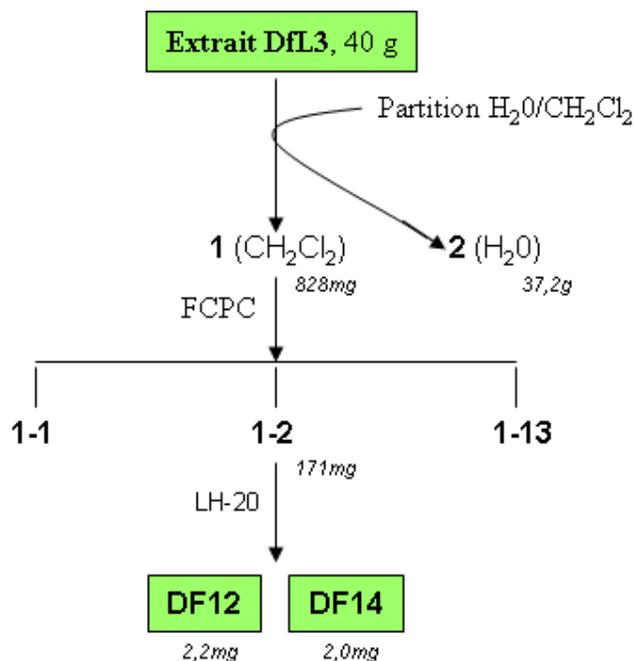


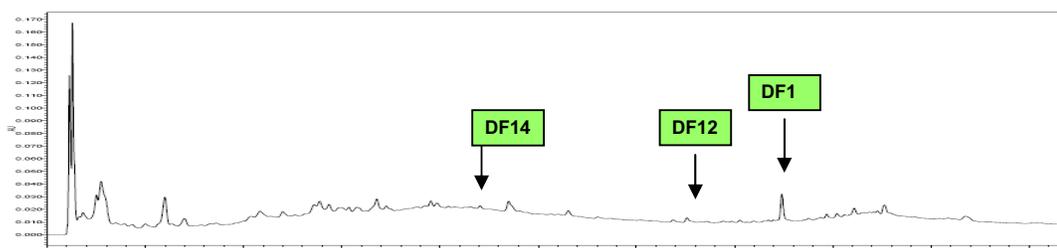
Figure 46 : Chromatogramme de DfL2 à 254 nm (gradient MeOH/H<sub>2</sub>O de 5/95 à 100/0 en 40 min)

### 1.2.3.3. Extrait par l'acétate d'éthyle DfL3

L'extrait DfL3 apparaît comme très pauvre en flavonoïdes. Néanmoins, deux composés ont pu en être isolés : **DF12 (2,2 mg)**, déjà identifié dans les tiges et **DF14** (**Figure 47**). On note également la présence de **DF1** dans cet extrait.



**Figure 47** : Schéma récapitulatif du fractionnement de l'extrait DfL3



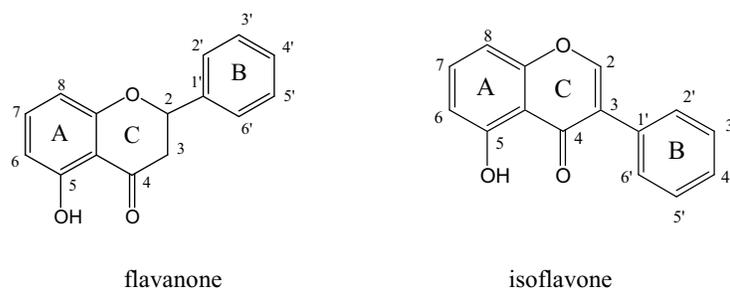
**Figure 48** : Chromatogramme de DfL3 à 254 nm (gradient MeOH/H<sub>2</sub>O de 5/95 à 100/0 en 40 min)

### 1.2.3.4. Extrait méthanolique DfL4

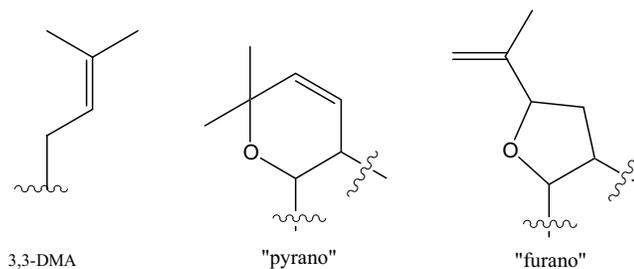
Cet extrait pratiquement dépourvu de flavonoïdes n'a pas été étudié.

### 1.3. Analyse structurale des composés

Il apparait, après analyse structurale que les composés isolés appartiennent pour la majorité à deux classes de molécules : les isoflavones et les flavanones (**Figure 49**). De plus, la plupart des composés sont prénylés, avec essentiellement des prénylations linéaires de type 3,3-diméthylallyl (3,3-DMA) et/ou cycliques de type « furane » et « pyrane » (**Figure 50**).



**Figure 49** : Squelettes des principaux composés isolés



**Figure 50** : Différents types de prénylations rencontrés dans les composés isolés

#### 1.3.1. *Eléments d'identification*

##### 1.3.1.1. Les isoflavones

En RMN-<sup>1</sup>H, le proton en position 2 des isoflavones<sup>21</sup> apparait sous forme d'un singulet intégrant pour 1H avec un déplacement caractéristique vers 8 ppm, du à sa proximité de l'oxygène en position 1.

Les isoflavones isolées sont toujours oxygénées en 5, 7 et 4'.

<sup>21</sup> Chez les flavones le proton en position 3 apparait sous forme d'un singulet aux alentours de 7 ppm.

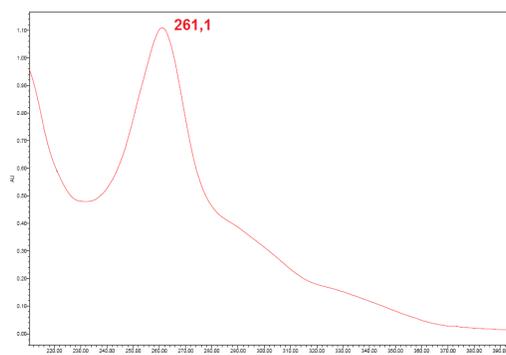
- en position 5 : un proton phénolique chélaté avec un  $\delta_H$  spécifique aux alentours de 12 ppm ;

- en position 7 : un hydroxyle ou un oxygène engagé dans un cycle de type furane ;

- en position 4' : un hydroxyle ou un groupement méthoxyle.

Les positions 3' et 5' peuvent également être porteuses de groupements hydroxyles ou méthoxyles.

D'autre part, le spectre UV des isoflavones présente un *maximum* caractéristique vers 260 nm (**Figure 51**) (Mabry *et al.*, 1970).

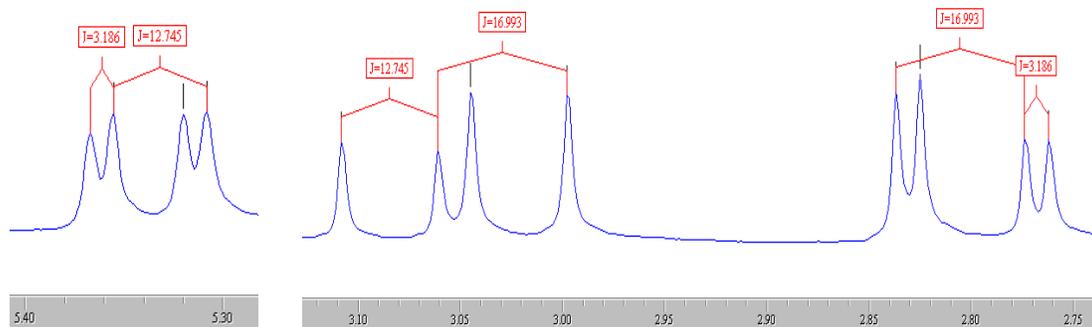


**Figure 51** : Exemple de spectre UV (MeOH) d'une isoflavone (génistéine)

### 1.3.1.2. Les flavanones

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison en C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>. Les protons en positions 2 et 3 apparaissent en RMN du proton sous la forme d'un système ABX avec un doublet de doublets autour de 5 ppm intégrant pour 1H pour le proton en position 2, et sous forme de deux doublets de doublets intégrant chacun pour 1H avec des déplacements chimiques autour de 3 ppm pour les deux protons en position 3 (**Figure 52**).

Les carbones correspondant sont situés à environ  $\delta_C$  78 ppm (C<sub>2</sub>) et 43 ppm (C<sub>3</sub>).

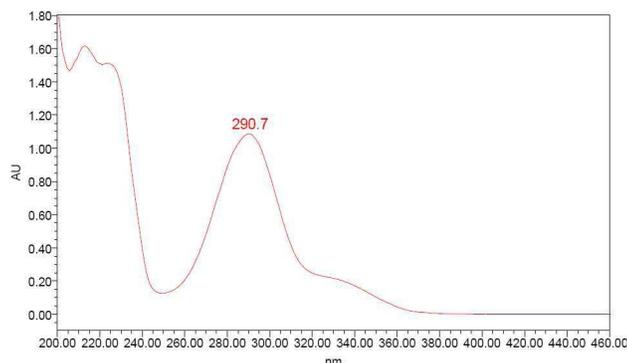


**Figure 52** : Signaux du système ABX correspondant aux protons en position 2 et 3 d'une flavanone en RMN-<sup>1</sup>H (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm, *J* en Hz)

Les flavanones isolées sont toujours oxygénées en position 5,7 et 4'. On observe :

- en position 5 : un proton phénolique chélaté (δ<sub>H</sub> ± 12 ppm ;
- en position 7 : présence d'un hydroxyle ou d'un oxygène engagé dans deux types de cycles : furane ou pyrane ;
- en position 4' : la présence d'un hydroxyle.

Les spectres UV des flavanones comportent un *maximum* caractéristique autour de 270- 295 nm (Mabry *et al.*, 1970 ; Slade *et al.*, 2005) (**Figure 53**).



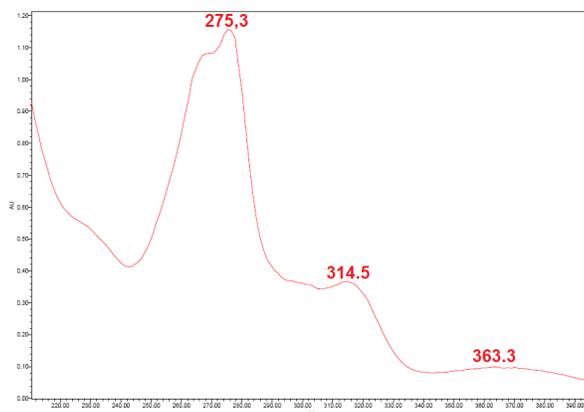
**Figure 53** : Spectre UV (MeOH) de la naringénine

Les modulations structurales entre les différentes flavanones ne concernent alors que d'éventuelles prénylations en position 6 et/ou 8, accompagnées ou non d'une oxygénation supplémentaire en position 5'.

### 1.3.1.3. Prénylations

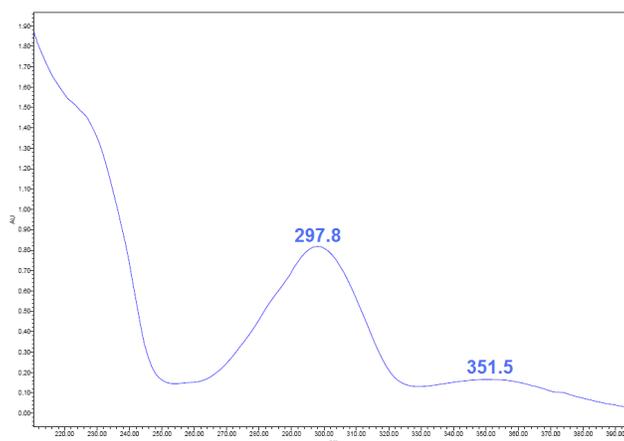
La plupart des composés isolés au cours de cette étude présentent des prénylations, ce caractère pouvant être déduit de l'étude de leurs spectres UV. En effet, dans le cas des flavanones non prénylées, les spectres UV présentent un *maximum* à environ 280 nm (Mabry *et al.*, 1970 ; Slade *et al.*, 2005). Pour les flavanones prénylées, on distingue trois groupes qui ne présentent pas les mêmes comportements en UV.

Les composés présentant à la fois une prénylation linéaire de type 3,3-DMA et une prénylation cyclique de type pyrane montrent ainsi un spectre UV caractérisé par des *maxima* autour de 225 ; 265 ; 275 et 315 nm, avec un épaulement typique entre 265 et 275 nm (**Figure 54**).



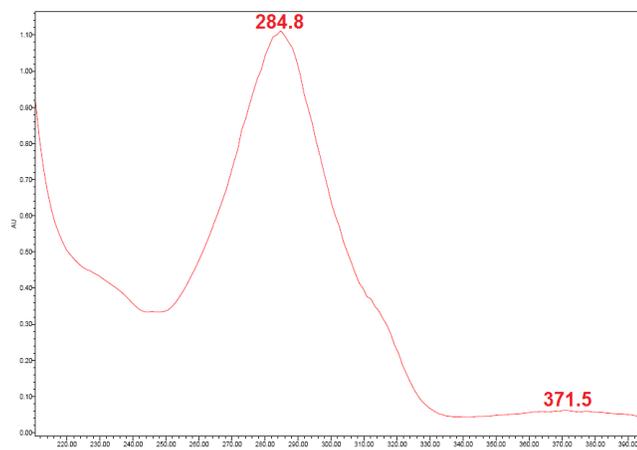
**Figure 54** : Exemple de spectre UV (MeOH) d'une flavanone comprenant une prénylation de type pyrane

Les composés présentant deux prénylations linéaires, constituent un second groupe où les spectres UV, très différents, apparaissent avec des *maxima* autour de 295 et 351 nm, sans épaulement (**Figure 55**).



**Figure 55** : Exemple de spectre UV (MeOH) d'une flavanone comprenant uniquement des prénylations de type 3,3-DMA

Seuls deux composés isolés présentent des prénylations de type furane (**DF6** et **DF12**), leurs spectres UV sont très proches de ceux des composés non prénylés, on peut ainsi supposer que la prénylation de type furane n'entraîne pas de conjugaison supplémentaire et n'influence que très peu le spectre UV des composés (*maximum* à 285 nm).



**Figure 56** : Exemple de spectre UV (MeOH) d'une flavanone comprenant une prénylation de type furane

### Prénylations de type 3,3-DMA

Pour les prénylations de type 3,3-DMA, on observe en RMN plusieurs signaux caractéristiques :

- deux singulets intégrant chacun pour 3H autour de 1,5 ppm correspondant aux méthyles portés par des carbones apparaissant à des  $\delta_C$  situés entre 15 et 30 ppm ;
- un signal apparaissant sous forme d'un doublet de doublets ou d'un triplet intégrant pour 2H ( $\delta_H$  autour de 3,5 ppm), qui correspond au  $CH_2$  de la prénylation, et qui est porté par un carbone à environ 20 ppm ;
- un triplet intégrant pour 1H autour de 5 ppm correspondant au proton éthylénique ; qui couple avec les deux protons adjacents ( $J=7$  Hz). Le carbone correspondant apparaît à  $\delta_C$  125 ppm.

### Prénylations de type pyrane

Ce type de prénylation est caractérisé en RMN par la présence de :

- deux signaux (deux doublets) dans la région des protons aromatiques (vers 5,5 et 6,5 ppm) couplant entre eux avec une constante de couplage  $J=9-10$  Hz, caractéristique d'une double liaison *cis*-éthylénique ;
- deux groupements méthyles (H-5' et H-6', autour de 1,5 ppm) qui deviennent isochrones lorsque la molécule est plane.

## Prénylations de type furane

Pour les composés présentant ce type de prénylation, on observe en RMN :

- deux doublets de doublets autour de 3 ppm liés entre eux par une constante de couplage  $J=15$  Hz, identifiables aux protons situés en 3 sur le cycle C;
- un triplet à environ 5 ppm qui corrèle avec les doublets de doublets autour de 3 ppm ( $J=9$  Hz) correspondant au proton (en position 2) du cycle furane ;
- deux singulets, autour de 5 ppm, portés par un carbone unique à environ 110 ppm, correspondant aux protons éthyléniques du propényle ;
- un singulet à 1,5-2 ppm intégrant pour 3H, traduisant la présence d'un groupement méthyle.

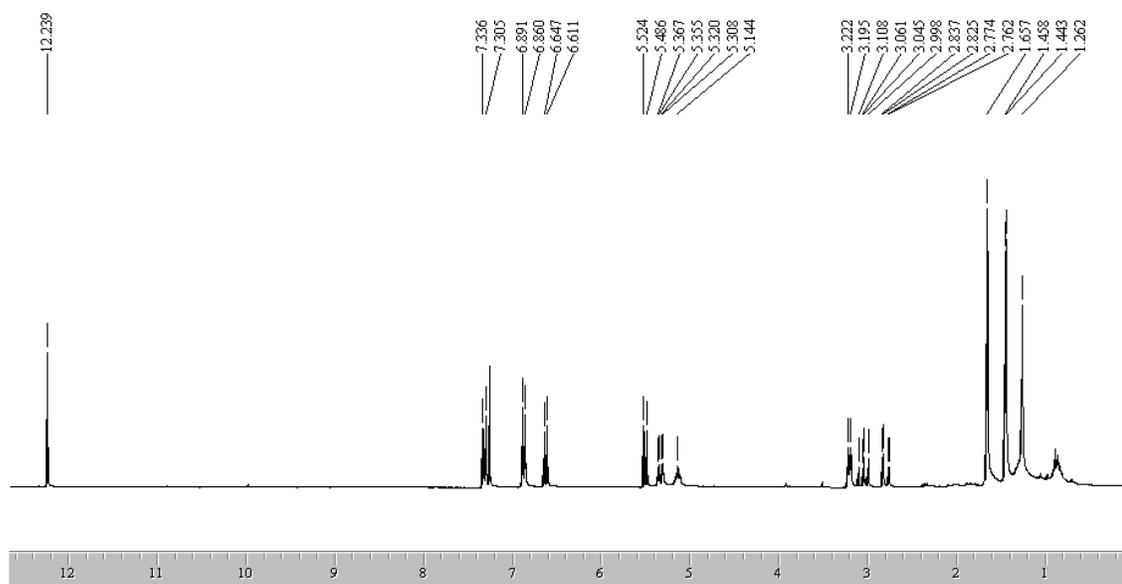
Comme dans le cas précédent, il semble que ce type de prénylation n'ait aucune influence sur le spectre UV des différents groupes de composés.

### 1.3.2. Analyse structurale des flavanones isolées

#### 1.3.2.1. Composé DF1

Le composé **DF1** a été isolé à partir de l'extrait cyclohexanique des tiges (DfS1), sous forme d'une poudre de couleur jaune. Il est également présent dans les extraits DfS2 et DfL3) Son spectre UV présente des *maxima* à 229 ; 265 ; 275 ; 315 et 364 nm, caractéristiques d'une flavanone comprenant une prénylation cyclique de type pyrane. Ce composé est optiquement inactif avec  $[\alpha]_D^{20} = 0$  (c 0,10 ; MeOH). Le spectre de masse, réalisé en ESI-Q-TOF en mode négatif, présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z$  404,95  $[M-H]^-$ , ce qui correspond à une formule brute s'établissant en  $C_{25}H_{26}O_6$ . L'analyse du spectre RMN- $^1H$ , réalisé dans  $CDCl_3$  (**Figure 57** et Annexe 1) indique la présence de signaux à 5,34 (dd ;  $J=12,7$  et 3,2 Hz) et 2,79 (dd ;  $J=3,2$  et 17,3 Hz) et 3,04 (dd ;  $J=12,7$  et 17,3 Hz) correspondant respectivement aux protons en position 2 et 3 d'une flavanone. Deux doublets à 6,62 et 5,50 ppm (2x1H), couplés entre eux avec une constante de couplage  $J=9,9$  Hz, ainsi que deux groupements méthyles apparaissant isochrones ( $\delta_H$  à 1,45 ppm, 6H) indiquent la présence d'une prénylation de type pyrane. Le reste des signaux montre la présence d'une prénylation de type 3,3-DMA :  $\delta_H$  à 5,14 ppm (t ;  $J=7,4$  Hz), 3,20 (d ;  $J=7,4$  Hz) et 1,65 ppm (6H). Enfin, dans la région des protons aromatiques, deux doublets à 6,87 et 7,33 ppm intégrant chacun pour 2H et couplés entre eux ( $J=8,3$  Hz)

correspondent à un système  $A_2B_2$  qui ne peut être positionné que sur le cycle B de la flavanone. On note également la présence d'un singulet à  $\delta_H$  12,25 ppm caractéristique d'un groupement OH chélaté (5-OH). On remarque sur le spectre HMBC que les protons à 3,20 ppm de la prénylation linéaire de type 3,3-DMA corrélient avec le C7, alors que le proton à 6,62 ppm corréle avec le C8a (**Figure 58**). Ces corrélations permettent de positionner les prénylations et d'identifier ce composé comme la 6-prényl-7,8-(2'',2''-diméthylpyrano)-5,4'-dihydroxyflavanone ou cajaflavanone (également nommée érythrisénégalone et qui correspond à l'énantiomère 2*S* au pouvoir rotatoire (-)), isolée pour la première fois de *Cajanus cajan* (Bhanumati *et al.*, 1978).



**Figure 57** : Spectre RMN- $^1H$  de **DF1** (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta_{TMS}=0$  ppm)

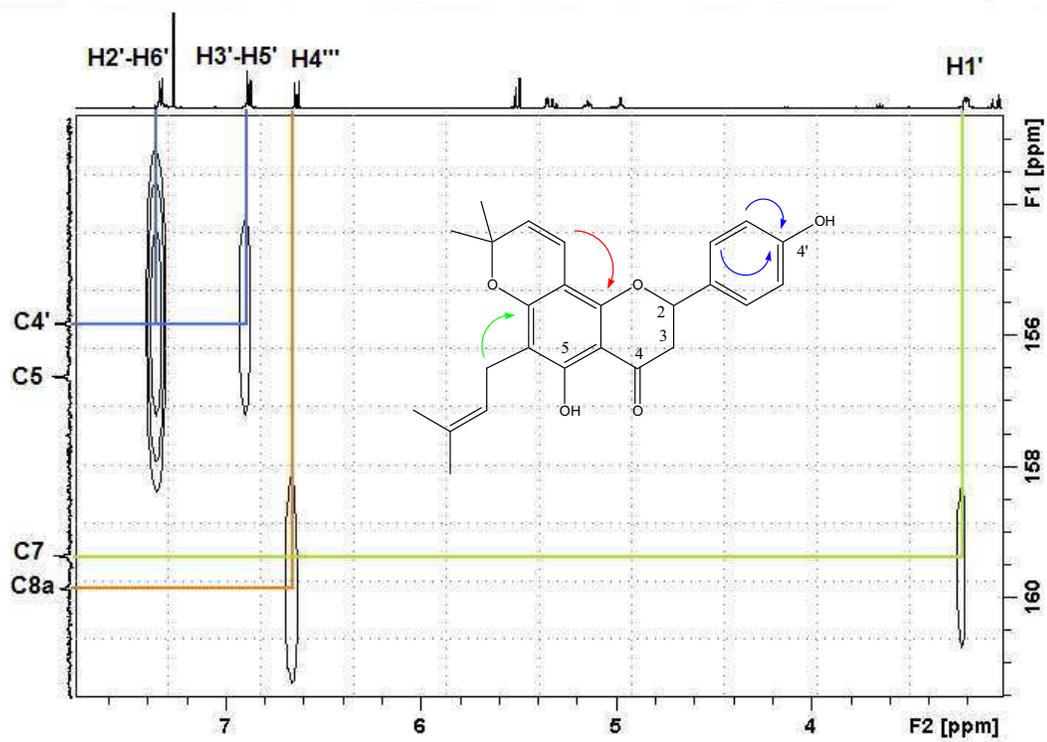
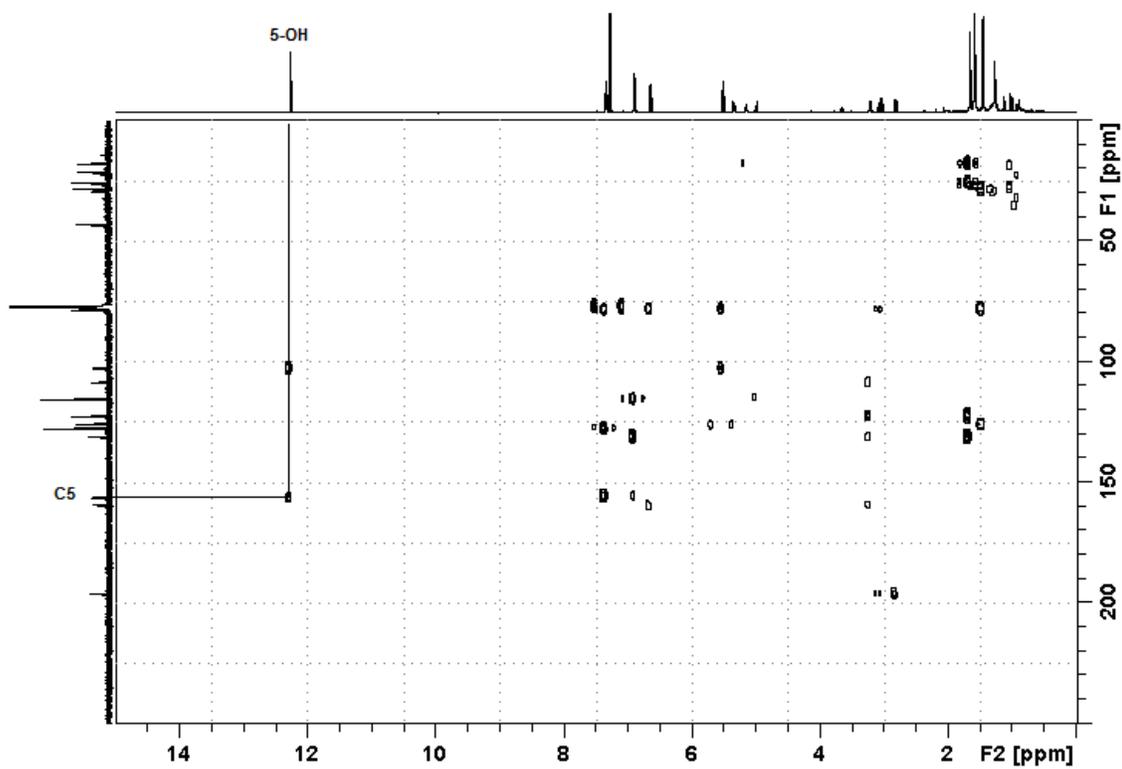
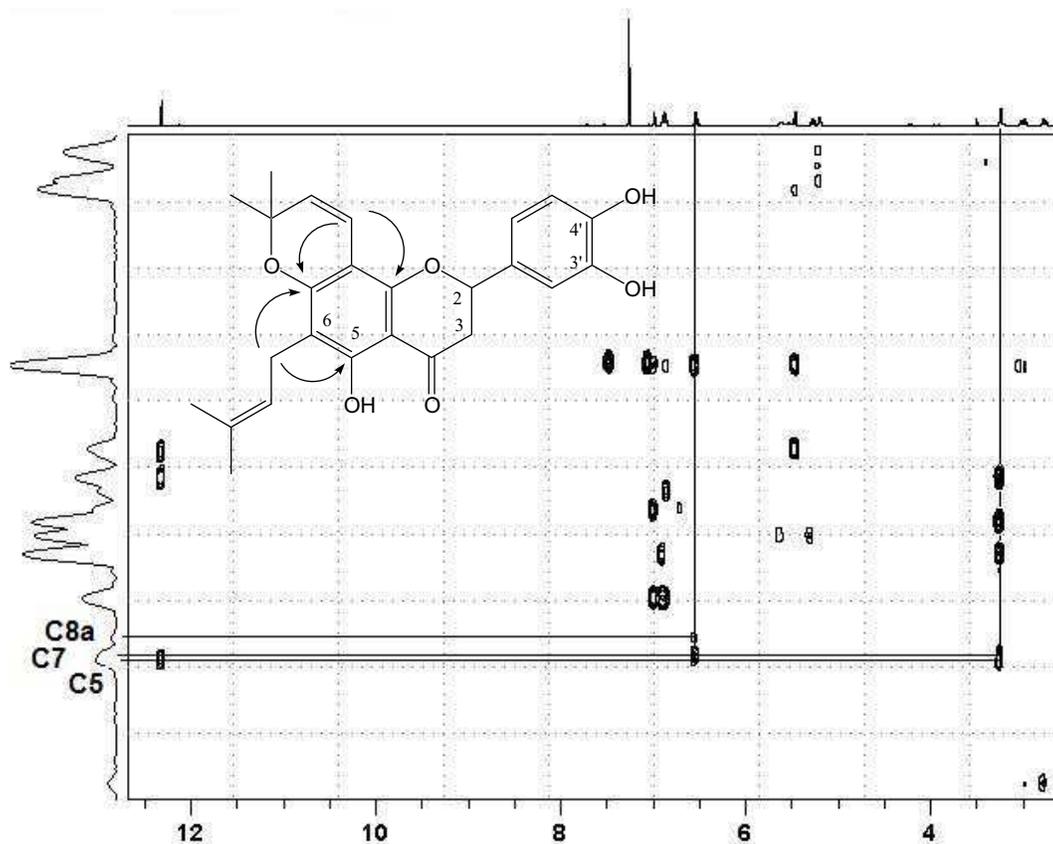


Figure 58 : Spectre HMBC du composé DF1

### 1.3.2.2. Composé DF2

Le composé **DF2** se présente sous la forme d'une poudre jaune-orangée, il a été isolé de l'extrait cyclohexanique des feuilles (DfL1). Son spectre UV comporte des *maxima* à 225, 265, 274 et 315 nm. On remarque un épaulement entre 265 et 274 nm. Ce composé est également optiquement inactif. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode négatif, présente un pic pseudomoléculaire présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M-H]^- = 421,1647$ , ce qui correspond à une formule brute s'établissant en  $C_{25}H_{26}O_6$  pour une masse calculée de 422,1729. Sur le spectre RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , **Annexe 2**), on observe un singulet à  $\delta_H$  12,32 ppm correspondant à un hydroxyle en position 5, chélaté avec la cétone en position 4. Des signaux caractéristiques d'une flavanone sont également observés :  $\delta_H$  2,76 (1H, dd,  $J=2,6$  et 17,3 Hz), 3,00 (1H, dd,  $J=12,8$  et 17,3 Hz) et 5,27 (1H, dd,  $J=2,6$  et 12,8 Hz). Trois signaux dans la région des protons aromatiques qui apparaissent à  $\delta_H$  6,99 (1H, s), 6,86 (1H, d,  $J=8,3$  Hz) et 6,90 ppm (1H, d,  $J=8,3$  Hz) peuvent être assignés aux protons du cycle B, avec en position 3' et 4' la présence de deux hydroxyles. Le reste des signaux peut être attribué à deux prénylations : l'une de type 3,3-DMA avec un doublet à 3,24 ppm (2H) couplant ( $J=7,1$  Hz) avec un triplet à 5,20 ppm (1H) et associé à deux méthyles à 1,78 et 1,67 ppm, ainsi qu'une prénylation de type pyrane avec deux doublets à 5,46 et 6,54 ppm intégrant chacun pour 1H et couplés entre eux ( $J=10,3$  Hz), associés à deux méthyles à 1,45 et 1,42 ppm. Les données du spectre de RMN- $^{13}C$  confirment ces sous-structures. Les corrélations HMBC permettent de localiser ces prénylations sur le squelette flavanonique. En effet, on observe, d'une part, des corrélations entre le  $CH_2$  à 3,24 ppm et le carbone porteur de l'hydroxyle chélaté (C5) ainsi qu'avec le carbone à 160,1 ppm (C7) et d'autre part des corrélations entre le proton à 6,54 ppm et les carbones à 160,1 ppm (C7) et 155,1 ppm (C8a). La prénylation de type 3,3-DMA est donc située à proximité du carbone C5, alors que la prénylation de type pyrane est positionnée en 7,8 comme le présente la (**Figure 60**). Ceci permet d'identifier le composé **DF2** comme étant la 6-prényl-7,8-(2'',2''-diméthylpyrano)-5,3',4'-trihydroxyflavanone (**Figure 59 et annexe 2**), précédemment isolée de *Flemingia macrophylla* (Fabaceae) (Shiao *et al.*, 2005).

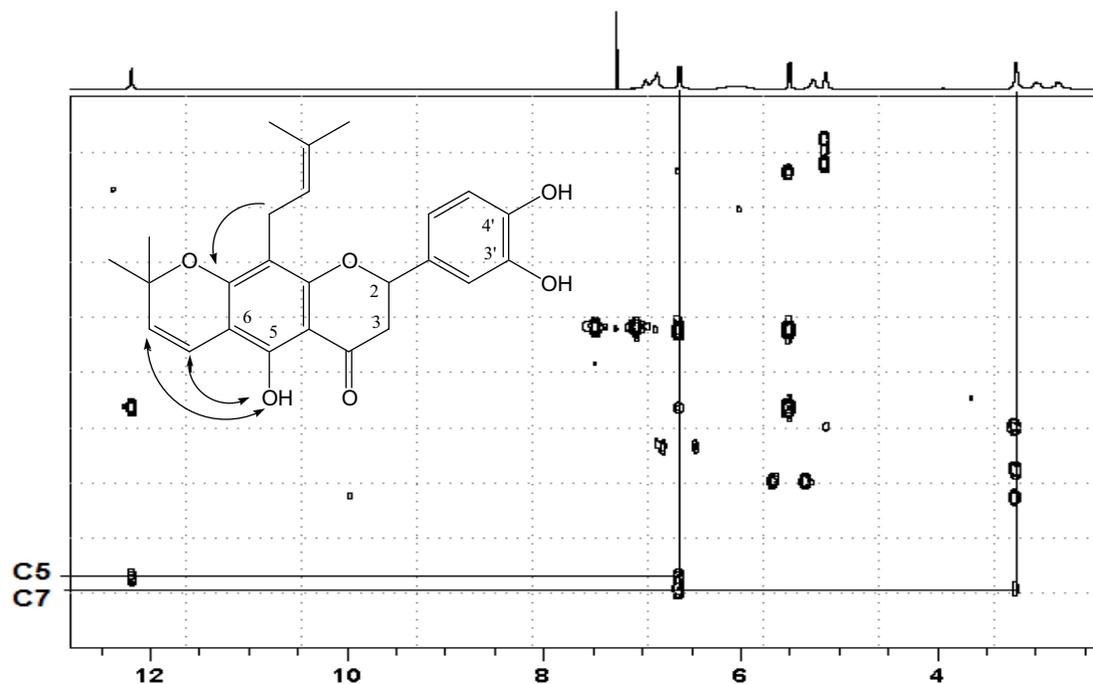


**Figure 59** : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **DF2**

### 1.3.2.3. Composé DF3

Le composé **DF3** a été isolé sous forme d'une poudre jaune de l'extrait cyclohexanique des feuilles (DfL1). Son spectre UV présente des *maxima* à 225, 265, 275 et 315 nm, avec un épaulement entre 265 et 274 nm caractéristiques d'une flavanone possédant une prénylation de type pyrane. Ce composé est optiquement inactif. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode négatif, présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M-H]^- = 421,1657$  associé à la formule brute  $C_{25}H_{26}O_6$  (masse monoisotopique théorique 421,1651). Le spectre de RMN- $^1H$ , réalisé dans  $C_6D_6$  (**Annexe 3**), présente les signaux caractéristiques des protons en position 2 :  $\delta_H$  5,26 ppm (dd, 1H,  $J=12,7$  et 2,5 Hz) et en position 3 d'une flavanone : ( $\delta_H$  3,00 ppm (dd, 1H,  $J=12,7$  et 17,0 Hz) et  $\delta_H$  2,77 ppm (dd, 1H,  $J=17,0$  et 2,5 Hz). On remarque également la présence d'un OH chélaté en position 5 (singulet à 12,19 ppm). Deux singulets à 6,96 (s, 1H) et 6,85 ppm (brs, 2H) correspondent à des protons aromatiques organisés en système ABX. Les déplacements chimiques des carbones du cycle porteurs des groupements OH sont

d'environ 144 ppm, il s'agit donc de carbones vicinaux. L'analyse du reste du spectre de RMN<sup>1</sup>H, permet de mettre en évidence la présence de 2 prénylations : une prénylation de type 3,3-DMA avec deux méthyles à 1,65 et 1,66 ppm, un CH<sub>2</sub> à 3,20 ppm (d, 2H,  $J = 7,4$  Hz) et un proton éthylénique à 5,14 ppm (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz) et une prénylation de type pyrane avec deux doublets à 6,62 et 5,51 ppm intégrant chacun pour 1H et couplés entre eux ( $J = 10,3$  Hz), associés à deux méthyles (1,43 et 1,45 ppm). L'analyse en RMN bidimensionnelle permet de situer le cycle pyrane en position 6-7 (corrélation HMBC entre H-4'' ( $\delta_H$  6,62) et C5) et la prénylation 3,3-DMA en position 8 (corrélation HMBC entre H-1''' ( $\delta_H$  3,20) et C7) (**Figure 60**). Enfin, par comparaison avec les données de la littérature **DF3** est identifié comme étant la 8-prényl-6,7-(2'',2''-diméthylpyrano)-5,3',4'-trihydroxyflavanone dont l'énantiomère 2*S* est nommé dorsmanine I (Ngadjui *et al.*, 2000).



**Figure 60** : Principales corrélations HMBC et NOESY observées pour le composé **DF3**

#### 1.3.2.4. Composé DF4

Le composé **DF4** a été isolé de l'extrait cyclohexanique des feuilles (DfL1) sous forme d'une poudre jaune. Son spectre UV présente plusieurs *maxima* à 220, 298 et 352 nm. Il est optiquement inactif. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode négatif, présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M-H]^- = 407,1864$ , correspondant à la formule brute  $C_{25}H_{28}O_5$  (masse théorique calculée : 407,1858). L'analyse par RMN- $^1H$ , réalisée dans  $C_6D_6$  (**Annexe 4**), permet de mettre en évidence la présence d'un groupement OH chélaté à  $\delta_H$  13,19 ppm. De plus, les signaux à 2,36 et 2,56 ppm, sous forme de doublet de doublets intégrant chacun pour 1H et couplant avec un signal à 4,73 ppm, sont caractéristiques d'une flavanone. Dans la région des protons aromatiques, on observe deux doublets, intégrant chacun pour 2H, et couplés entre eux ( $J= 8,5$  Hz). Ces signaux caractéristiques d'un système  $A_2B_2$  correspondent donc aux protons aromatiques du cycle B (**Figure 61**). Les autres signaux correspondent à ceux de deux prénylations linéaires de type 3,3-DMA : quatre méthyles apparaissant sous forme de quatre singulets à  $\delta_H$  1,59, 1,70, 1,63 et 1,65 ppm), un  $CH_2$  sous forme d'un doublet de doublets ou de triplet intégrant pour 2H (3,44 - 3,58 ppm) ; un CH éthylénique sous forme d'un quadruplet intégrant pour 1H (5,38 ppm). L'interprétation des spectres bidimensionnels permet de situer les prénylations sur le cycle A. En effet, le proton à  $\delta_H$  3,58 ppm corrèle avec le carbone à  $\delta_C$  160,2 ppm (C5), lui-même porteur du OH chélaté avec la fonction cétonique en C4 ; de plus, il corrèle également avec un carbone à 162,5 ppm qui correspond à un carbone porteur d'un groupement OH (C7) (**Figure 61**). L'attribution des différentes résonances  $^1H$  et  $^{13}C$  est résumée en **Annexe 4**. Elle permet d'identifier le composé **DF4** comme étant la 6,8-di-isopenténylnaringénine dont l'énantiomère 2*S* correspond au lonchocarpol A (Roussis *et al.*, 1987), nommé également sénégalsine (Fomum *et al.*, 1987).

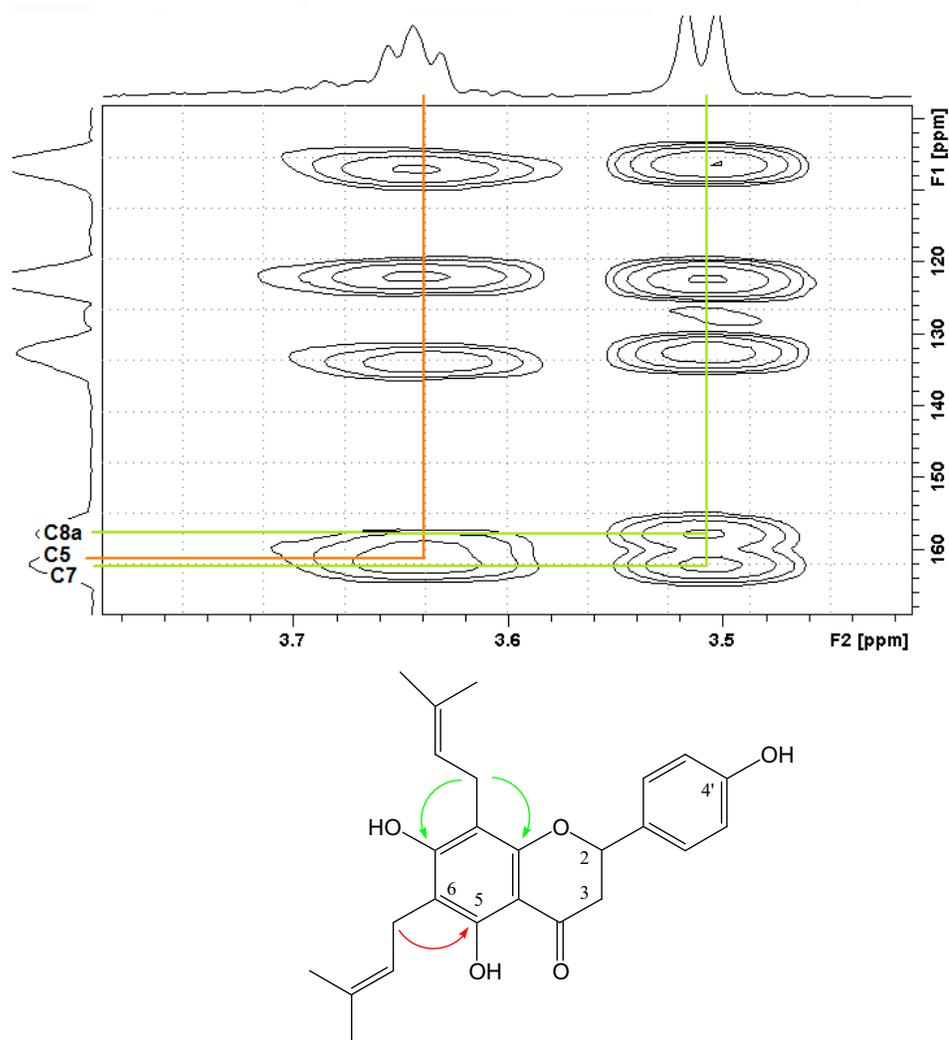
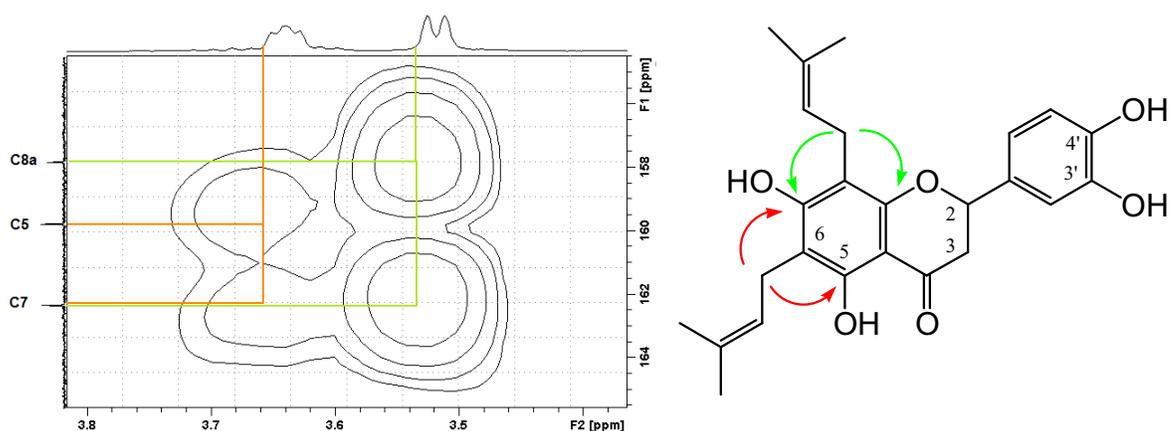


Figure 61 : corrélations HMBC du composé DF4

### 1.3.2.5. Composé DF5

Le composé **DF5** a été isolé sous forme d'une poudre cristalline de couleur jaun-vert, très hygroscopique, à partir de l'extrait cyclohexanique des feuilles (DfL1). Il est optiquement inactif. Son spectre UV présente plusieurs *maxima* : 230, 297 et 362 nm. Son spectre de masse haute résolution (ESI-Q-TOF), en mode négatif, présente un pic pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M-H]^- = 423,1813$  (masse calculée 423,1808), correspondant à la formule brute  $C_{25}H_{28}O_6$ . Sur le spectre de RMN- $^1H$  réalisé dans le benzène deutéré (**Annexe 5**), un signal à  $\delta_H$  13,13 ppm indique la présence d'un OH chélaté. Tandis que dans la région des protons aromatiques, on dénombre trois singulets à  $\delta_H$  6,68, 6,56 et 6,37 ppm. Le singulet à 6,37 ppm ne corrélant avec aucun carbone en HMQC, appartient à un

groupement OH. Le singulet à 6,68 ppm intègre pour 1H. Le signal à 6,56 ppm intégrant pour 2H apparaît ici comme un singulet, mais sous la forme d'un doublet de doublets dans  $\text{CDCl}_3$  avec  $J=8,5$  Hz, il s'agit donc d'un système ABX. L'analyse du spectre de RMN- $^{13}\text{C}$  permet de placer les deux groupements OH en *ortho* (carbones à environ 144 ppm). Les autres signaux en RMN- $^1\text{H}$  appartiennent à deux prénylations linéaires de type 3,3-DMA. L'analyse des spectres de RMN bidimensionnelle permet de situer ces prénylations sur le cycle A, comme présenté dans la **Figure 62**. Les déplacements chimiques et les corrélations en RMN bidimensionnelle sont présentés en **Annexe 5**. Cette molécule, la 6,8-diprényl-5,3',4'-trihydroxyflavanone ou 6,8-diprénylériodictyol (énantiomère 2*S*), a été isolée de différentes espèces des genres *Dorstenia* (Ngadjui *et al.*, 1998 ; Ngadjui *et al.*, 2000 ; Omisore *et al.*, 2005), *Vellozia* (Harborne *et al.*, 1993) et *Monotes* (Seo *et al.*, 1997).

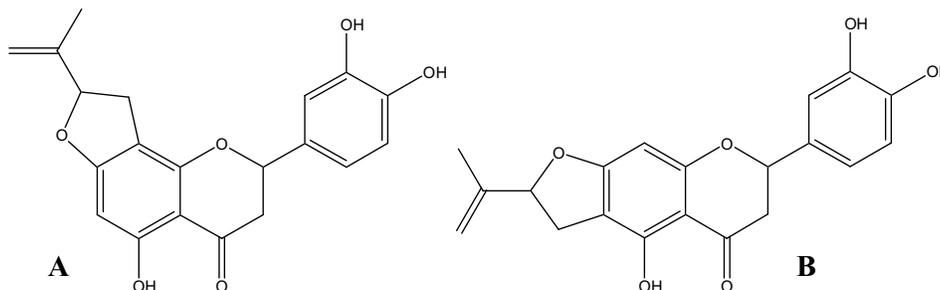


**Figure 62** : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **DF5**

### 1.3.2.6. Composé DF6

Le composé **DF6** a été isolé sous forme d'une poudre jaune-orangée. Son spectre UV présente uniquement un *maximum* à 285 nm. En RMN- $^1\text{H}$ - réalisé dans le benzène deutéré, on observe les signaux caractéristiques d'une flavanone à  $\delta_{\text{H}}$  5,35 ppm (1H, dd,  $J=3,0$  et 12,4 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  2,88 ppm (1H, dd,  $J=3,0$  et 17,1 Hz) et 3,09 ppm, (1H, dd,  $J=12,4$  et 17,1 Hz). Les signaux à  $\delta_{\text{H}}$  7,03 ppm (s, 1H) et 6,90 ppm (s, 2H) correspondent aux protons aromatiques du cycle B, organisés en système ABX. Les signaux à  $\delta_{\text{H}}$  5,14 ppm (s, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  5,70 (s, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  5,33 ppm (t, 1H),  $\delta_{\text{H}}$  3,45 ppm (2H, m) et  $\delta_{\text{H}}$  2,09 (s, 3H) appartiennent à une prénylation de type furane. Enfin, le singulet à  $\delta_{\text{H}}$  6,72 ppm correspond au proton du cycle A en position 6 ou 8. L'analyse des corrélations HMBC et NOESY ne permettent pas de déterminer la position de la prénylation (en 6-8 ou 7-8), en raison d'une

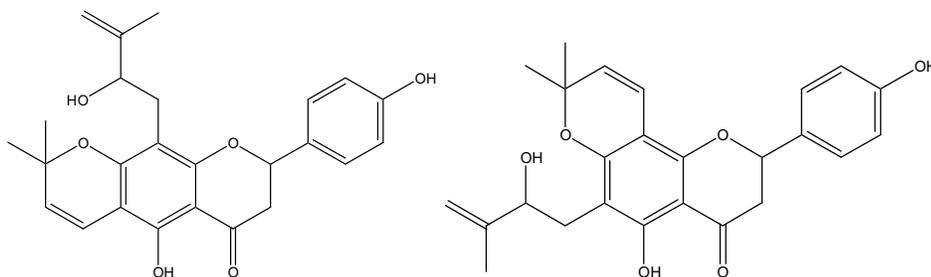
trop faible sensibilité. Une analyse en utilisant une micro-sonde capillaire est envisagée. De plus, la synthèse de ce composé pourrait être effectuée pour établir et confirmer sa structure. Toutefois, d'après les données dont disposons, deux structures sont possibles (**Figure 63**), une structure originale (**A**) ou le velloériodictyol (**B**) isolé précédemment de *Vellozia glabra* (Harborne *et al.*, 1993).



**Figure 63** : Structures proposées du composé **DF6**

#### 1.3.2.7. Composé **DF7**

Le composé **DF7** se présente sous la forme d'une poudre de couleur jaune. Son spectre RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) présente dans la région des protons aromatiques deux doublets à  $\delta_H$  7,30 et 6,86 ppm ( $J=8,5$  Hz) qui mettent en évidence la présence d'un système A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> sur le cycle B. De plus, les signaux à 2,8 (multiplet) et 3,07 dd ( $J=12,7$  et 17,0 Hz) ppm, sous forme de doublet de doublets intégrant chacun pour 1H ainsi qu'un signal à 5,32 ppm (dd ;  $J=12,7$  et 2,8 Hz), sont caractéristiques d'une flavanone. Un singulet  $\delta_H$  12,29 ppm indique la présence d'un phénol chélaté en position 5. Le reste des signaux peut être attribué à deux prénylations : l'une de type pyrane avec deux doublets à 5,51 et 6,64 ppm intégrant chacun pour 1H et couplés entre eux ( $J=9,9$  Hz), associés à deux méthyles. L'autre de type 2-hydroxy-3-méthyl-but-3-ényl présente deux singulets à  $\delta_H$  4,91 et 4,86 ppm ; un singulet large à 4,79 ppm correspondant à un proton porté par un carbone oxygéné, ainsi qu'un multiplet à 2,8 ppm. Etant donné la faible quantité de composé, les spectres de RMN-<sup>13</sup>C et RMN-2D sont peu résolus et n'apportent pas d'informations supplémentaires. Les données de RMN-<sup>1</sup>H permettent de proposer deux structures possibles (**Figure 64**), qui devront être confirmées par RMN-bidimensionnelle. Une analyse RMN en utilisant micro-sonde capillaire est pour l'instant en cours (envoyé à Genève). Ces deux structures ne sont à ce jour pas décrites.

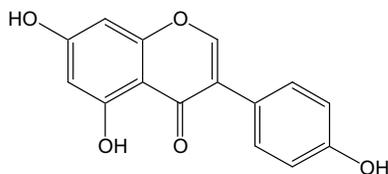


**Figure 64** : Structures proposées du composé **DF7**

### 1.3.3. Analyse structurale des isoflavonoïdes isolés

#### 1.3.3.1. Composé **DF8**

Le composé **DF8** a été isolé sous forme d'une poudre de couleur blanche à partir de l'extrait par l'acétate d'éthyle des tiges (DfS3). Son spectre UV présente un *maximum* à 261 nm. Le spectre RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, **Annexe 8**) présente uniquement six signaux, dont cinq dans la région des protons aromatiques et un singulet à  $\delta_H$  13,00 ppm associé à un OH chélaté avec une fonction cétonique (en position 4). Un singulet à  $\delta_H$  8,15 ppm intégrant pour 1H caractérise le proton en position 2 d'un isoflavonoïde. Deux doublets à  $\delta_H$  7,45 et 6,90 ppm intégrant chacun pour 2H et couplés entre eux ( $J=8,5$  Hz) représentent les 4 protons aromatiques du cycle B. Deux doublets à 6,41 et 6,28 ppm, intégrant chacun pour 1H, sont liés par une constante de couplage ( $J=2,1$  Hz), indiquant qu'ils sont positionnés en *meta* l'un par rapport à l'autre. Ainsi, l'analyse du spectre RMN-<sup>1</sup>H permet d'identifier sans ambiguïté le composé **DF8** comme la 4',5,7-trihydroxyisoflavone ou génistéine, ce que confirment les données de la littérature (Wang *et al.*, 2007). La génistéine a été isolée pour la première fois de *Genista tinctoria* en 1899 par Perkin and Newbury.

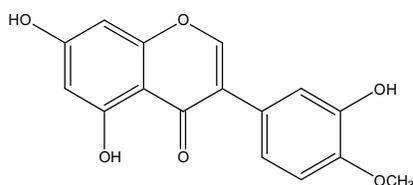


**Figure 65** : Structure du composé **DF8**

#### 1.3.3.2. Composé **DF9**

Le composé **DF9** se présente sous forme d'une poudre jaune clair. Il a été isolé de l'extrait cyclohexanique des tiges (DfS1). Son spectre UV est caractéristique de celui d'un

isoflavonoïde avec *un maximum* à 262 ppm. Le spectre de masse en ESI<sup>+</sup> présente un ion pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M+H]^+=301,2607$ , en accord avec une formule brute  $C_{16}H_{12}O_6$  et une masse moléculaire de  $300 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Son spectre de RMN-<sup>1</sup>H (acétone-*d*<sub>6</sub>) présente le signal caractéristique du proton en position 2 des isoflavonoïdes à  $\delta_H$  8,19 ppm. Un signal à  $\delta_H$  13,01 ppm correspond à un OH chélaté avec la fonction cétonique en position 4. Un doublet de doublets à  $\delta_H$  7,03 ppm (1H,  $J=7,9$  et 1,8 Hz) couple avec un doublet à  $\delta_H$  7,24 ppm (1H,  $J=1,8$  Hz) et un doublet à  $\delta_H$  6,87 ppm (1H,  $J=7,9$  Hz), il s'agit donc d'un système ABX positionné sur le cycle B. Deux singulets élargis, respectivement à  $\delta_H$  6,40 et 6,27 ppm, correspondent à deux protons aromatiques situés sur le cycle A. Enfin, un singulet à  $\delta_H$  3,88 ppm intégrant pour 3H correspond à un groupement méthoxyle positionné sur le cycle B. Ces données, qui correspondent à celles de la littérature, permettent d'identifier le composé **DF9** comme la 5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyisoflavone ou pratenséine (Wong, 1963 ; Almeida *et al.*, 2008).

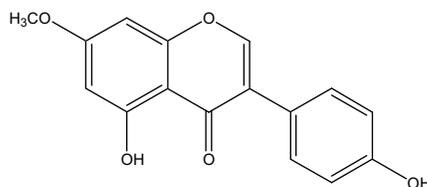


**Figure 66** : Structure du composé **DF9**

### 1.3.3.3. Composé DF10

Cette molécule se présente sous la forme d'une poudre jaune claire avec un *maximum* à 261 nm sur son spectre UV. Elle a été isolée de plusieurs extraits des tiges et des feuilles (DfS3, DfS4 et DfL2). Le spectre de masse établi en ESI<sup>+</sup> présente un ion pseudomoléculaire à  $m/z$   $[M+H]^+=285,1$ , en accord avec une formule brute  $C_{16}H_{12}O_5$  et une masse moléculaire de  $284 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Le spectre de RMN-<sup>1</sup>H, réalisé dans l'acétone-*d*<sub>6</sub>, indique la présence d'un groupement OH chélaté en position 5 (singulet à  $\delta_H$  12,97 ppm) ainsi que cinq signaux dans la région propre aux protons aromatiques. Le singulet présent à  $\delta_H$  8,20 ppm intégrant pour 1H est caractéristique du proton en position 2 des isoflavonoïdes. On remarque deux doublets à  $\delta_H$  6,90 et 7,45 ppm, chacun intégrant pour 2H, avec une constante de couplage  $J=8,5$  Hz, caractéristiques de la présence d'un système  $A_2B_2$ , qui ne peut être positionné que sur le cycle B. Deux doublets à  $\delta_H$  6,54 et 6,35 ppm ( $J=2,2$  Hz) sont associés à deux protons aromatiques en *mé*ta sur le cycle A. On note la présence d'un groupement méthoxyle ( $\delta_H$  3,92 ppm), dont l'analyse des septres de RMN

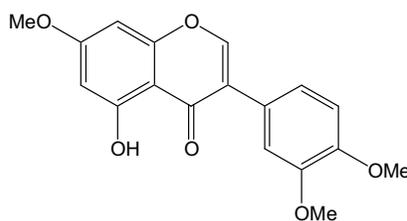
bidimensionnelle permet de situer en position 7 (cycle A). La structure ainsi élucidée correspond à la 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone ou prunétine, déjà isolée de *Derris elliptica* (Lu *et al.*, 2008).



**Figure 67** : Structure du composé **DF10**

#### 1.3.3.4. Composé **DF11**

Le composé **DF11** (5,4 mg), isolé de l'extrait des tiges par l'acétate d'éthyle (DfS3), se présente sous forme d'une poudre jaune-verte. Son spectre UV est caractéristique de celui d'un isoflavonoïde avec un *maximum* à 262 nm. En RMN-<sup>1</sup>H, réalisée dans CDCl<sub>3</sub>, on note la présence d'un singulet intégrant pour 1H à  $\delta_H$  7,87 ppm, caractéristique du proton en position 2 d'un isoflavonoïde, et un signal à  $\delta_H$  12,86 ppm correspondant à un OH en position 5. Un doublet à  $\delta_H$  7,14 ppm (1H, d,  $J=1,5$  Hz) couple avec un doublet de doublets à  $\delta_H$  6,96 ppm. Deux doublets à  $\delta_H$  6,41 et  $\delta_H$  6,39 ppm liés entre eux par une constante de couplage  $J=1,9$  Hz correspondent à deux protons en *méta* sur le cycle A. Ces résultats et les données de la littérature permettent d'identifier le composé **DF11** comme la 5-hydroxy-7, 3', 4'-triméthoxyisoflavone (Veitch *et al.*, 2003).

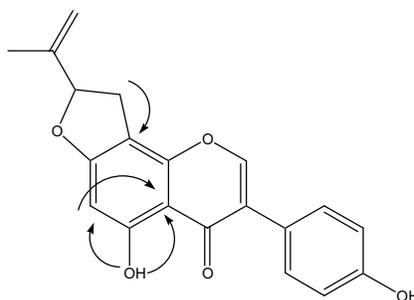


**Figure 68** : Structure du composé **DF11**

#### 1.3.3.5. Composé **DF12**

Le composé **DF12** se présente sous la forme d'une poudre de couleur jaune. Il a été isolé de plusieurs des extraits obtenus à partir des tiges (DfS2, DfS3 et DfS4). Son spectre UV présente un *maximum* à 266 nm avec l'allure typique de celui d'un isoflavonoïde. Ce

composé est optiquement inactif avec  $[\alpha]_D^{20} = 0$  (c 0,10 ; MeOH). Son spectre de masse en HR-ESI-Q-TOF présente un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  359,08890  $[M+Na]^+$  (masse calculée 336,09978, soit une formule brute  $C_{20}H_{16}O_5$ ). Le spectre de RMN- $^1H$  réalisé dans  $CDCl_3$  (**Annexe 12**), présente dans la région des protons aromatiques, un singulet à  $\delta_H$  7,82 ppm, caractéristique du proton en position 2 des isoflavonoïdes. Dans la même région, on note la présence de deux doublets à  $\delta_H$  7,41 et 6,91 ppm intégrant chacun pour 2H et couplant entre eux ( $J=8,5$  Hz), correspondant à un système  $A_2B_2$  situé sur le cycle B. Un singulet à  $\delta_H$  6,35 ppm (1H) correspond à un proton aromatique également situé sur le cycle A. Les autres signaux sont caractéristiques d'une prénylation de type furane. En effet, on remarque la présence de deux doublets de doublets à  $\delta_H$  3,08 et 3,42 ppm intégrant chacun pour 1H, corrélés avec un doublet de doublets à  $\delta_H$  5,36 ppm ( $J=7,3$  et 9,8 Hz) ; deux singulets à  $\delta_H$  4,97 et 5,11 ppm typiques de protons éthyléniques et un singulet à  $\delta_H$  1,78 ppm (3H) correspondant à un méthyle. L'analyse des spectres bidimensionnels permet de positionner le cycle furane en position 7-8 (**Figure 69**). En effet, on observe une corrélation en HMBC entre le groupement OH en position 5 et le carbone porteur du singulet à  $\delta_H$  6,35 ppm (C6), alors qu'il y a absence de corrélations entre les protons à  $\delta_H$  3,08 et 3,42 ppm et le carbone porteur du OH chélaté (C5). Ces données de RMN permettent d'identifier ce composé comme un produit original, que nous proposons de nommer derrisisoflavone G.



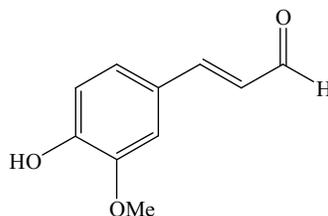
**Figure 69** : principales corrélations observées en HMBC pour le composé **DF12**

### 1.3.4. Analyse structurale des autres composés isolés

#### 1.3.4.1. Composé **DF13**

Le composé **DF13** a été isolé sous forme d'une poudre de couleur jaune de l'extrait dichlorométhanique des tiges (DfS2). Son spectre UV présente des *maxima* à 240 et 341

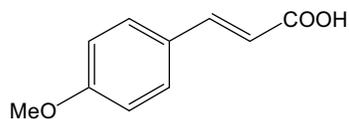
nm. Son spectre de RMN-<sup>1</sup>H, dans CDCl<sub>3</sub> (**Annexe 13**), présente un doublet à δ<sub>H</sub> 9,66 ppm (1H, *J*=7,6 Hz), apparaissant comme le proton d'un aldéhyde. Ce proton corrèle avec un doublet de doublets situé à δ<sub>H</sub> 6,60 ppm (1H, *J*=7,6 et 15,9 Hz), qui corrèle lui-même avec un doublet à δ<sub>H</sub> 7,41 ppm (1H, *J*= 15,9 Hz). Ces 3 signaux peuvent donc être attribués à ceux d'un enchainement CH=CH-CHO. Trois autres signaux à δ<sub>H</sub> 7,12 (1H, dd, *J*= 8,5 et 1,8 Hz), 7,07 ppm (1H, d, *J*=1,8 Hz) et 6,96 ppm (1H, d, *J*= 8,5 Hz) correspondent à trois protons aromatiques. Enfin, un singulet à δ<sub>H</sub> 3,88 ppm (3H), caractéristique d'un groupement méthoxyle, permet d'identifier le composé **DF13** comme étant l'aldéhyde coniférylique, ce que confirment les données de la littérature (Luo *et al.*, 2007 ; Miyazawa *et al.*, 2003).



**Figure 70** : Structure du composé **DF13**

#### 1.3.4.2. Composé **DF14**

Le composé **DF14** (2 mg) se présente sous forme d'une poudre de couleur jaune. Il a été isolé de l'extrait AcOEt des feuilles (DfL3). Son spectre UV comporte des *maxima* à 228 et 312 nm. Son spectre de masse ESI<sup>+</sup> présente un ion pseudomoléculaire [M+Na]<sup>+</sup> à *m/z* 201,06, en accord avec une masse moléculaire de 178 g/mol et une formule brute en C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>. Son spectre de RMN-<sup>1</sup>H, réalisé dans CDCl<sub>3</sub>, comporte un signal à δ<sub>H</sub> 3,79 ppm (3H) caractéristique d'un groupement méthoxyle. Deux doublets à δ<sub>H</sub> 7,43 et 6,84 ppm, intégrant chacun pour 2H et liés entre eux par une constante de couplage de 8,3 Hz, correspondent à quatre protons aromatiques positionnés symétriquement. Deux doublets à δ<sub>H</sub> 7,63 et 6,30 ppm intégrant chacun pour 1H apparaissent couplés entre eux (*J*=15,9 Hz) et appartiennent à ceux d'une double liaison. L'analyse des spectres RMN bidimensionnels (en particulier corrélation HMBC entre carbone porteur du proton à δ<sub>H</sub> 6,30 ppm et le proton à δ<sub>H</sub> 6,84 ppm) et la comparaison avec les données de la littérature (Rahman *et al.*, 2007) permettent d'identifier ce composé comme étant l'acide 4-méthoxy-cinnamique ou acide 3-(4-méthoxyphényl)-2-propénoïque (**Figure 71**).



**Figure 71** : Structure du composé **DF14**

#### 1.3.4.3. Composés **DF15- DF16 et DF17**

Les structures de ces trois composés ne sont pas totalement élucidées. Néanmoins l'analyse de leurs spectres RMN permet de caractériser respectivement **DF15** comme un stilbène, **DF16** un triterpène et **DF17** un polyol, isolés en quantité importante, ils pourraient contribuer aux activités biologiques des extraits bruts.

### 1.4. Activités biologiques répertoriées des composés isolés

Certains des composés isolés ont fait l'objet d'études concernant leurs activités biologiques, très variées pour certains comme la génistéine. Comme cela a été décrit dans la partie bibliographique, les flavonoïdes au sens large possèdent de nombreuses activités dues en particulier à leur potentiel antioxydant, à leurs éventuelles propriétés estrogéniques, ainsi qu'à leur rôle de phytoalexines chez les plantes. Ces études présentées ici reflètent assez bien cette diversité et permettent de dresser un bilan des activités déjà connues des composés isolés, avant de poursuivre sur l'évaluation biologique de ceux-ci effectuée lors de ce travail de thèse (**Partie II.2.**).

La cajanflavanone (**DF1**) inhibe modérément la synthèse de la mélanine (Mori-Hongo *et al.*, 2009). Elle possède une activité inhibitrice sur l'activation tumorale provoquée par le virus d'Epstein-Barr (Itoigawa *et al.*, 2002) et pourrait donc jouer un rôle chimioprotecteur. Elle présente une activité antiplasmodiale très modérée sur lignée multi-résistante K1 (Khaomek *et al.*, 2008). La cajanflavanone est décrite également pour son activité contre les dermatophytes (Ribeiro *et al.*, 2008).

Le lonchocarpol A (**DF4**) présente une activité antiplasmodiale modérée sur la lignée multi-résistante K1 (Innok *et al.*, 2009). Sa cytotoxicité est également modérée sur différentes lignées cellulaires : KB (carcinome épithélial humain), BC (cancer du sein), NCI-HI 87 (cancer pulmonaire à petites cellules) (Innok *et al.*, 2009), Daoy, Hep2 (cellules

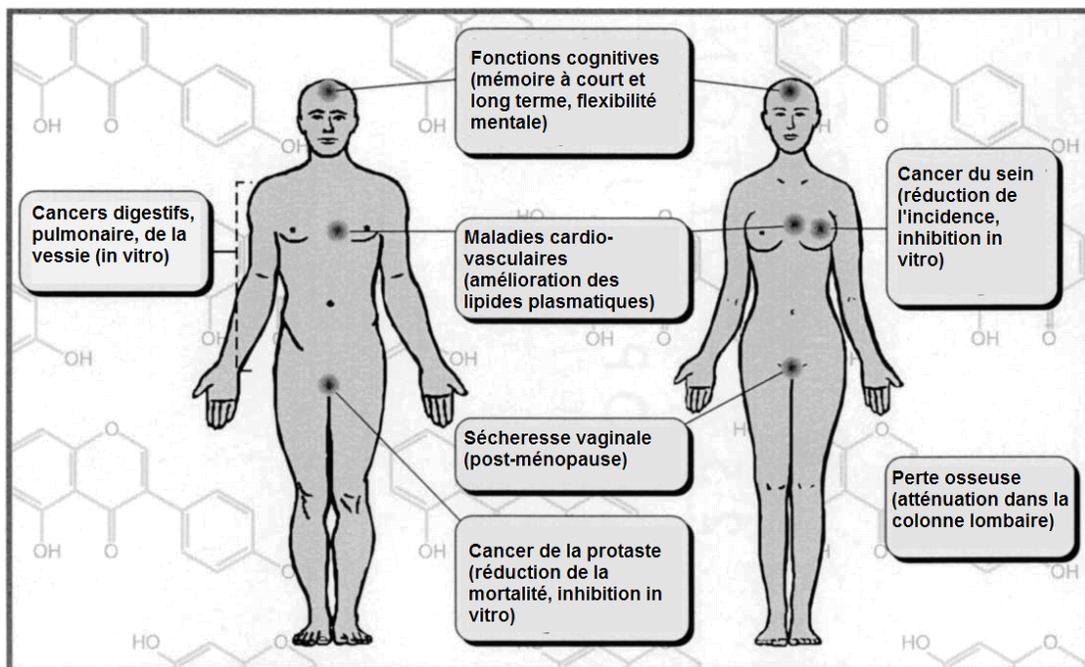
tumorales de carcinome laryngé humain), MCF-7 (cellules tumorales mammaires) et HeLa (cancer du col de l'utérus) (Chan *et al.*, 2009). Ce composé est également décrit pour diminuer la production de NO, sans inhiber l'activité de NOX et sans potentiel antioxydant sur le DPPH (Chan *et al.*, 2010). Ce composé inhibe de manière significative à la fois COX-1 et COX-2 et prévient les lésions prénéoplasiques mammaires induites par le 7,12-diméthylbenz( $\alpha$ )anthracène (DMBA) (Jang *et al.*, 2002). Il possède une action antivirale contre VIH-1 (Meragelman *et al.*, 2001). Le lonchocarpol A est capable d'inhiber la synthèse macromoléculaire de *Bacillus megaterium* (Salvatore *et al.*, 1998), par contre il n'a aucune activité contre *Candida albicans* (Garo *et al.*, 1998).

Le 6,8-diprenylériodictyol (**DF5**) possède un potentiel antioxydant (Dufall *et al.*, 2003 ; Omisore *et al.*, 2005). Ce composé exerce une activité antiparasitaire vis-à-vis de *Trichomonas gallinarum* (Omisore *et al.*, 2005). Il s'avère cytotoxique sur plusieurs lignées de cellules cancéreuses (Seo *et al.*, 1997).

La génistéine (**DF8**) a fait l'objet de nombreuses évaluations biologiques, sur des cibles très diverses. Un certain nombre de ses activités biologiques ont déjà été mentionnées (partie I.2.3.) et les principales sont présentées dans la **Figure 72**. On peut rappeler que la génistéine, en tant que phytoestrogène se lie aux récepteurs aux estrogènes et possède un effet estrogénique ou anti-estrogénique en fonction des tissus. Ainsi, elle aurait un intérêt dans la prévention de certains cancers, dans les maladies cardiovasculaires, dans les troubles liés à la ménopause (Dixon *et al.*, 2002). Elle exerce une activité inhibitrice sur un certain nombre d'enzymes : MRP1 (multidrug resistance-associated protein, ABCC1) (Xania-Pietrzak *et al.*, 2005), PDE1-2-3 et 5 (inhibition non sélective sur les phosphodiesterases isozymes 1, 2, 3 et 5<sup>22</sup> (Ko *et al.*, 2004), l'ADN topoisomérase, la tyrosine protéine kinase et à forte dose l'histidine protéine kinase (Dixon *et al.*, 2002). Elle possède une activité antiplasmodiale aussi bien sur lignée chloroquino-sensible que sur lignée chloroquino-résistante (Kraft *et al.*, 2000) et est active contre *Mycobacterium tuberculosis* (L.W. Chen *et al.*, 2010).

---

<sup>22</sup> PDE1 : dépendante de calcium/calmoduline, PDE2 : stimulée par GMPc, PDE3 : inhibée par GMPc, PDE5 : spécifique de GMPc



**Figure 72** : Principales activités biologiques attribuées à la génistéine, modifié d'après Dixon *et al.*(2002)

La pratenséine (**DF9**) est connue pour améliorer significativement l'absorption du glucose par les hépatocytes HepG2 (Q.C. Chen *et al.*, 2010) et ainsi réduire la glycémie. Ce composé augmente également l'expression d'ABCA1 (ATP-Binding Cassette transporter 1) dans les cellules HepG2, favorisant ainsi la formation des particules d'HDL et ayant un rôle dans le développement de l'athérosclérose (Etzion *et al.*, 2009 ; Y. Yang *et al.*, 2009). De plus, ce composé protège les neurones dopaminergiques d'une neuro-dégénération induite par LPS et inhibe la production de TNF- $\alpha$ , NO et superoxyde au niveau des neurones mésencéphaliques (Chen *et al.*, 2008). Il inhibe la contraction d'un certain nombre de muscles lisses (Brandli *et al.*, 2010).

En dépit d'un caractère polyphénolique marqué, la prunétine (**DF10**) possède une activité antioxydante modérée (Rufer *et al.*, 2006 ; Paulo *et al.*, 2006). Elle est par contre capable d'inhiber la production de ROS induite par le couple xanthine/xanthine oxydase (Wei *et al.*, 1995). Cette molécule est capable d'inhiber la contraction d'un certain nombre de muscles lisses (Brandli *et al.*, 2010). Elle exerce une activité inhibitrice sur la BCRP (breast cancer resistance protein) (Tamaki *et al.*, 2010) mais non sur MRP1, autre protéine de résistance (multidrug resistance-associated protein, ABCC1) (Xania-Pietrzak *et al.*, 2005). Cette molécule possède une affinité pour les récepteurs androgéniques (Nishizaki *et al.*,

2009). Elle exerce une inhibition sélective pour PDE4<sup>23</sup> (Ko *et al.*, 2004) et inhibe la rmALDH (recombinant rat liver mitochondrial aldéhyde déshydrogénase) (Shen *et al.*, 2001). Elle possède une activité antiplasmodiale très modérée, contrairement à la génistéine (Kraft *et al.*, 2000), mais est active contre *Mycobacterium tuberculosis* (L.W. Chen *et al.*, 2010).

L'aldéhyde coniférylique (**DF13**) pourrait être utilisé comme agent protecteur contre les UV en cosmétologie (L.W. Zhang *et al.*, 2010). Il possède une activité antiradicalaire modérée (Dizhbite *et al.*, 2004) et un effet anti-mutagène (Miyazawa *et al.*, 2003).

L'acide 4-méthoxy-cinnamique (**DF14**) apparaît comme non toxique vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires : L-6 (Tasdemir *et al.*, 2006), A549 (carcinome pulmonaire humain), SK-Mel-2 (mélanome humain), B16F1 (mélanome murin) (Rahman *et al.*, 2007), par contre il est toxique pour la crevette *Artemia salina* (Rahman *et al.*, 2007). Ce composé présente une activité antimicrobienne modérée contre des parasites : *Leishmania donovani*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma cruzi* (Tasdemir *et al.*, 2006), et contre des bactéries : *M. luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus enteritidis* (Nakazono *et al.*, 2006), *Bacillus subtilis*, *Shigella sonnei* (Rahman *et al.*, 2007), il est par contre inactif contre les souches fongiques *Candida* sp. et *T. mentagrophytes* (Rahman *et al.*, 2007). Il possède un potentiel antioxydant (Nakazono *et al.*, 2006). L'acide 4-méthoxy-cinnamique (**DF14**) montre un potentiel larvicide contre trois espèces de moustiques : *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus togoi* (N.J. Kim *et al.*, 2008). Il inhibe l' $\alpha$ -glucosidase (Adisakwattana *et al.*, 2005), la glucose-6-phosphatase et augmente l'activité d'enzymes impliquées dans la glycolyse (hexokinase, glucokinase, phosphofructokinase) (Yibchok-Anun *et al.*, 2008). Cette molécule est également capable de réduire la glycémie chez des rats diabétiques<sup>24</sup> par augmentation de la glycolyse et par inhibition de la néoglucogénèse au niveau du foie (Adisakwattana *et al.*, 2005) et stimulation de la sécrétion d'insuline (Yibchok-Anun *et al.*, 2008). Il inhibe de manière réversible l'activité diphénolase d'une tyrosinase fongique, avec un intérêt potentiel en agroalimentaire (Shi *et al.*, 2005).

A notre connaissance, les composés **DF2** et **DF11** n'ont fait l'objet d'aucune évaluation biologique.

---

<sup>23</sup> phosphodiesterase isoenzyme 4, spécifique de l'AMPc

<sup>24</sup> diabète de type 2, induit par la streptozotocine en détruisant les cellules  $\beta$  du pancréas

## 1.5. Alternatives d'obtention de deux composés d'intérêt

Deux techniques différentes ont été utilisées pour obtenir en quantité suffisante les composés **DF1** et **DF12** afin de permettre une évaluation biologique étendue de ces derniers.

L'analyse par CLHP de DfS1 mettait en évidence la présence en quantité importante du composé **DF1** dans l'extrait. Une optimisation de la procédure de purification de ce dérivé était donc possible. Nous avons choisi d'utiliser la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC), technique qui présente de nombreux avantages : aucune perte d'extrait par adsorption sur support solide, utilisation d'un volume plus faible de solvants, rapidité (Marston *et al.*, 2006).

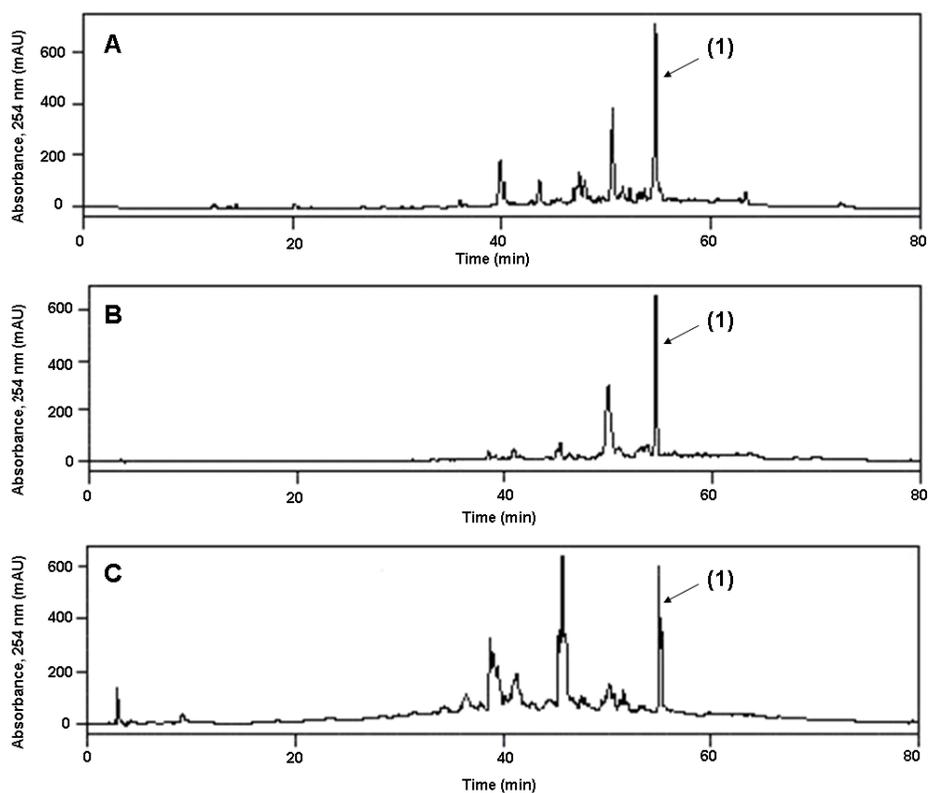
Au contraire, pour le composé original **DF12**, l'analyse par CLHP des extraits dont il est issu suggérait de faibles concentrations. L'optimisation de sa purification apparaissait donc peu intéressante et nous avons choisi d'en entreprendre la synthèse à partir de la génistéine.

### 1.5.1. Purification du composé DF1 par FCPC

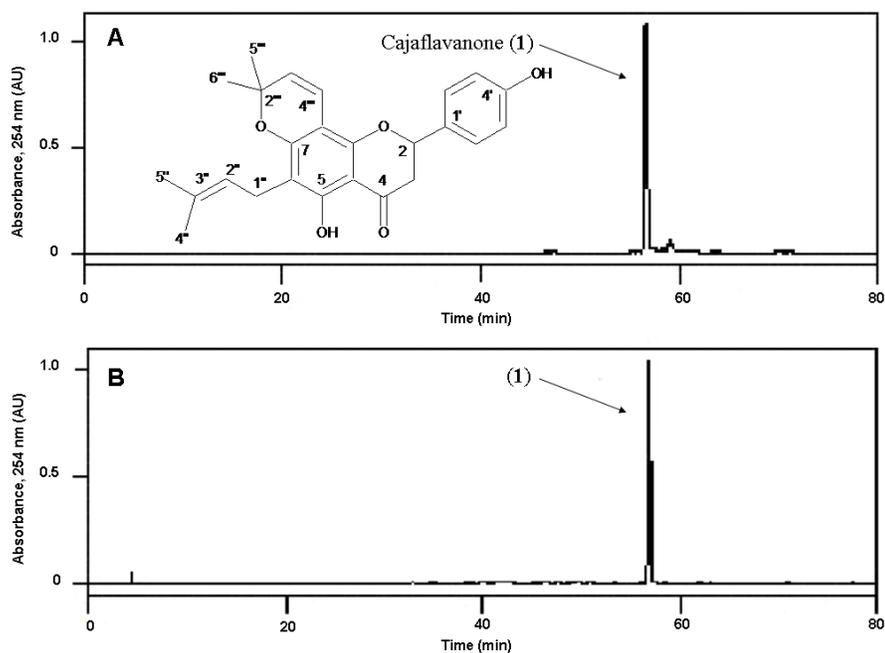
1,5 mg de **DF1** (cajaflavanone) ont été obtenus après fractionnement de 7 g de l'extrait DfS1 par chromatographie liquide moyenne pression (CLMP), puis purification sur gel de Séphadex LH-20 suivie d'une chromatographie sur colonne ouverte de silice comme détaillé en partie III.3. La pureté de la cajaflavanone évaluée par CLHP, à 254 nm, est de 86,8%. La consommation de solvants pour cette purification est d'environ 5L/ g d'extrait brut, pour un rendement d'extraction très faible (0,0002%). De plus, une partie importante de l'extrait a été adsorbé de manière irréversible sur le gel de silice (>20% de l'extrait) pendant la première étape de fractionnement (CLMP).

Pour améliorer le rendement d'extraction ainsi que le nombre d'étapes de purification, nous avons choisi d'utiliser la FCPC. Cette méthode, développée par Ito et Bowman dans les années 1970, a souvent été utilisée pour la purification de flavonoïdes (Marston *et al.*, 2006 ; Pauli *et al.*, 2008), en particulier pour celle de flavanones prénylées (Maver *et al.*, 2005). Le choix du système de solvants a tout d'abord été réalisé par CCM (*cf.* Partie III.4.1.) (Hostettmann *et al.*, 1998) dans la gamme de systèmes de solvants

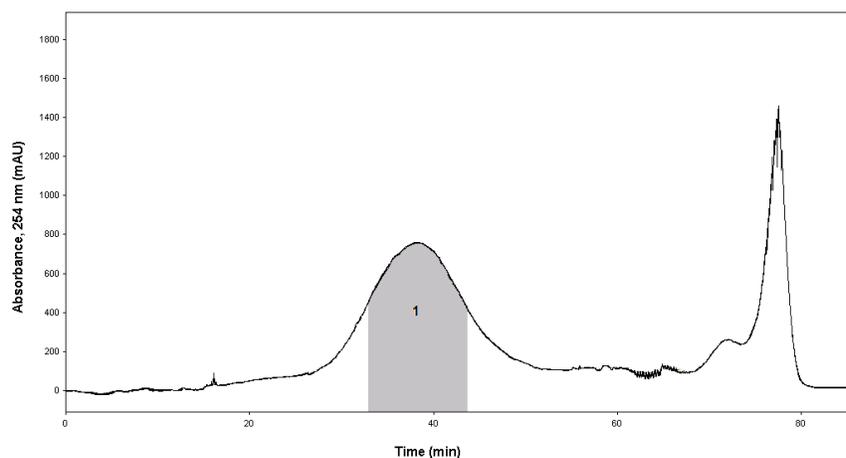
Arizona, c'est-à-dire, heptane, acétate d'éthyle, méthanol et eau, en accord avec la littérature (Maver *et al.*, 2005 ; Berthod *et al.*, 2005). Puis, une confirmation avec détermination du rapport  $K$  a été réalisée par CLHP ( $K=0,91$ , **Figure 73**). La séparation de 5 g de l'extrait DfS1 par FCPC (**Figure 74**) en utilisant le système Arizona U (heptane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O : 4/1/4/1) a permis d'obtenir **DF1** (11,7 mg) en une seule étape, avec une pureté équivalente à celle obtenue par la procédure utilisant uniquement des phases stationnaires solides (pureté à 254 nm : 86,9%, **Figure 74**). Par FCPC, la consommation en solvants est nettement plus faible (140 mL/ g d'extrait, soit 50 fois plus faible). De plus, grâce à cette technique, aucune perte d'extrait n'est observée, ce qui permet d'obtenir une nette augmentation du rendement d'extraction (0,002%).



**Figure 73:** Chromatogrammes CLHP à 254 nm de l'extrait brut DfS1 (**A**), de la phase supérieure (**B**) et de la phase inférieure (**C**) de l'extrait DfS1 partitionné avec le système Arizona U (acétonitrile/H<sub>2</sub>O 10/90 à 95/5, en 60 min, débit 1 mL/min).



**Figure 74:** Chromatogrammes CLHP à 254 nm, de **DF1** obtenu par purification solide/liquide classique (A) et par FCPC (B) (acétonitrile/H<sub>2</sub>O 10/90 à 95/5, en 60 min, débit 1 mL/min).



**Figure 75:** Chromatogramme à 254 nm de la purification par FCPC. La zone grisée correspond au composé **DF1**

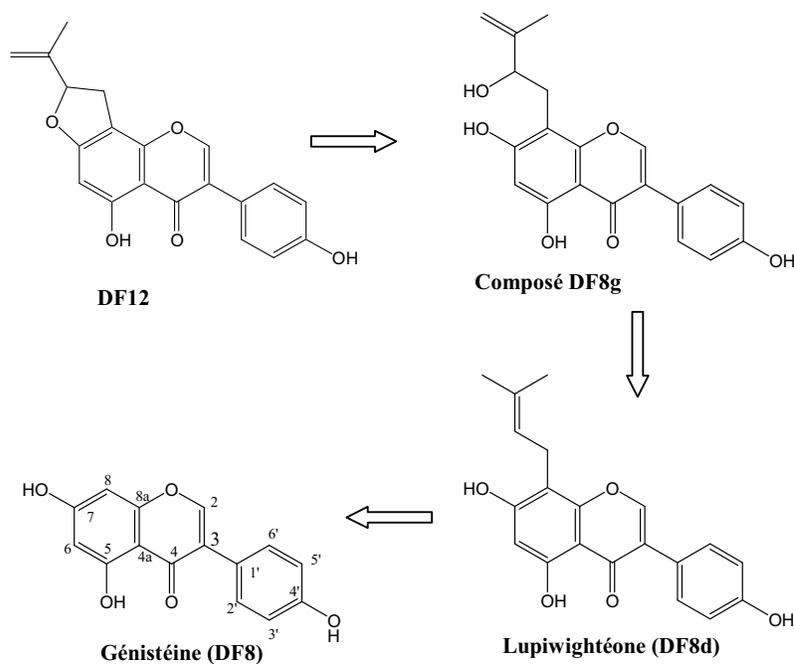
Cette technique nous a permis d'obtenir **DF1** rapidement, en une seule étape, avec une pureté élevée et en utilisant peu de solvants. Néanmoins, il faut prendre en considération le fait que l'efficacité de la FCPC dépend très largement du choix du système de solvants utilisé, celui-ci est d'autant plus facile lorsqu'on s'intéresse uniquement à une seule molécule précédemment isolée par une autre technique et dont on connaît déjà les paramètres d'isolement.

### 1.5.2. Synthèse du composé DF12

Le composé **DF12** a été isolé en faible quantité ce qui limitait son évaluation biologique. Sa synthèse a été entreprise afin d'obtenir une quantité suffisante pour effectuer une évaluation biologique étendue et également confirmer sa structure.

#### 1.5.2.1. Approche rétrosynthétique

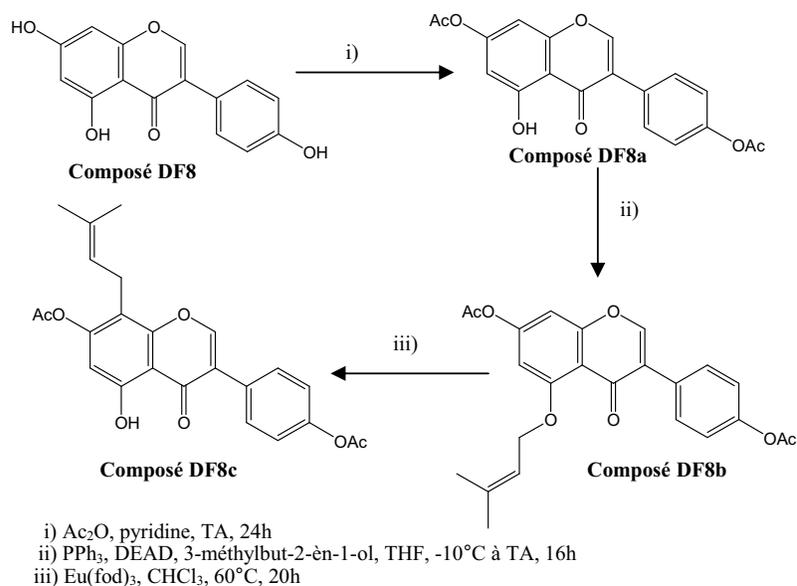
Selon l'approche rétrosynthétique envisagée, la lupiwightéone (**DF8d**) constitue un intermédiaire clé. Sa synthèse a déjà été décrite (Al-Maharik *et al.*, 2003) (**Figure 76**). Une oxydation biomimétique de la chaîne prényle fournirait un alcool allylique secondaire, qui par cyclisation intramoléculaire conduirait au composé cible **DF12**. Cette transformation d'un motif orthoprénylphénol a déjà été développée au sein de notre laboratoire et appliquée en série coumarine et xanthone notamment (Helesbeux *et al.*, 2003).



**Figure 76** : Préparation de **DF12** à partir de la génistéine (**DF8**) : Approche rétrosynthétique

### 1.5.2.2. Synthèse de la lupiwightéone

L'accès à la lupiwightéone consiste en l'introduction d'un prényle en position 8 sur le squelette génistéine (**Figure 77**) (Al-Maharik *et al.*, 2003). Après protection des groupements phénols les plus réactifs (4' et 7), le groupement phénol libre, en position 5, est soumis à une condensation de Mitsunobu pour former l'éther (**DF8b**). Celui-ci est ensuite engagé dans un *para*-réarrangement de Claisen-Cope, conduisant à la génistéine diacétylée et prénylée en position 8 (**DF8c**).



**Figure 77** : Synthèse de la lupiwightéone via un *para*-réarrangement de Claisen-Cope (Al-Maharik *et al.*, 2003)

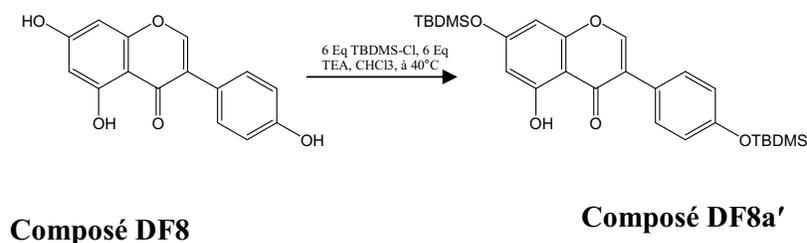
La première étape consiste en une diacétylation, en milieu pyridine et en présence d'anhydride acétique avec un rendement rapporté de 92% (Ac<sub>2</sub>O, pyridine, 24 h, TA) (Al-Maharik *et al.*, 2003). Afin de limiter l'emploi de pyridine, nous avons tenté de modifier ces conditions opératoires. Cependant, travailler en solution chloroformique avec 2 équivalents de triéthylamine (TEA), a conduit au produit attendu **DF8a**, avec seulement 39% de rendement. On peut s'interroger sur d'éventuels problèmes de stabilité de ce composé lors de sa purification sur colonne de silice.

Placé dans les conditions de la réaction de Mitsunobu, notre dérivé diacétylé s'est avéré peu réactif. De plus, le seul produit obtenu est issu d'une déprotection d'un groupement acétate suivie de la prénylation du phénol correspondant (soit en position 7,

soit en position 4'). En effet, le spectre RMN-<sup>1</sup>H présente toujours un signal à  $\delta_H$  12 ppm caractéristique du proton phénolique en position 5. La position de l'éther prénylé n'a pas été déterminée.

Compte tenu de ce résultat, diverses modifications des conditions expérimentales ont été envisagées.

A partir du dérivé diacétylé **DF8a** et en présence de carbonate de potassium et de bromure d'isoprène, dans le DMF (Pisco *et al.*, 2006) nous observons également la formation du même produit monoprénylé avec un groupement phénol en position 5 (en RMN-<sup>1</sup>H, signal à  $\delta_H$  12 ppm). Par conséquent, nous avons modifié la nature du groupement protecteur. Le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) a été utilisé pour sa meilleure stabilité en milieu basique. Après mise au point des conditions expérimentales (6 éq. TBDMS-Cl, 6 éq. TEA, CHCl<sub>3</sub>, à 40°C), le composé disilylé **DF8a'** a été obtenu avec un rendement de 77% (**Figure 78**).



**Figure 78** : Préparation du composé disilylé **Df8a'**

L'alkylation du phénol en position 5 a été envisagée par le bromure d'isoprène en présence d'une base (J. Kim *et al.*, 2008), en faisant varier ce dernier paramètre ainsi que la nature du solvant et la température réactionnelle. Malgré différentes tentatives, le produit attendu n'a pas été obtenu. A nouveau, une séquence de déprotection et d'alkylation a été observée (**Tableau 4**, entrée 1-4). Un dernier essai en milieu hétérogène avec un agent de transfert de phase (Daskiewicz *et al.*, 2002) s'est également avéré négatif (**Tableau 4**, entrée 6). Après cette constatation, une condensation de Mitsunobu (**Tableau 4**, entrées 7 et 8) en utilisant soit le diéthylazodicarboxylate (DEAD), soit le diisopropylazodicarboxylate (DIAD, plus réactif) a été entreprise à partir du composé disilylé **DF8a'** et a permis d'obtenir le composé correspondant alkylé en position 5 mais avec un rendement très faible (<5%).

**Tableau 4** : Essais d'alkylation du composé disilylé **DF8a'**

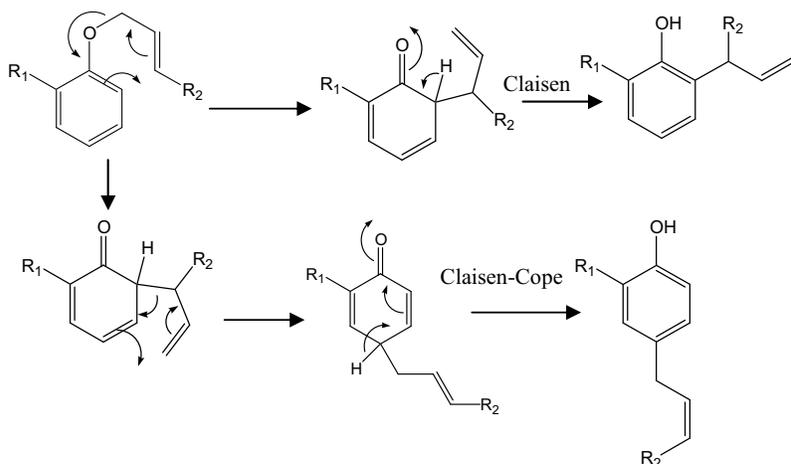
Conditions	Observations
1 NaOH (1,2 éq.) BrCH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 éq.), acétone, micro-onde	Pas de prénylation observée (composé de départ disilylé)
2 K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (4 éq.) BrCH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 éq.), acétone, micro-onde	Déprotection-alkylation (signal à $\delta_H$ 12 ppm en RMN- <sup>1</sup> H). Obtention du dérivé prénylé en position 7. Il reste du produit de départ
3 K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (4 éq.) BrCH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1,5 éq.), acétone, reflux	Déprotection-alkylation (signal à $\delta_H$ 12 ppm en RMN- <sup>1</sup> H). Obtention du dérivé prénylé en position 4' ou 7. Il reste du produit de départ
4 NaH (2 éq.) BrCH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 eq) DMF, 40°C	Déprotection-alkylation (signal à $\delta_H$ 12 ppm en RMN- <sup>1</sup> H). Obtention du dérivé prénylé en position 4' ou 7. Il reste du produit de départ
5 NaH (2 éq.) BrCH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2 éq.) DMF, température ambiante	Déprotection-alkylation (signal à $\delta_H$ 12 ppm en RMN- <sup>1</sup> H-). Obtention du dérivé prénylé en position 4' ou 7. Pas de produit de départ.
6 hydroxyde de tétrabutylammonium (1 éq.) BrCH <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3 éq.) Bu <sub>4</sub> N <sup>+</sup> OH <sup>-</sup> (2 éq.)	Déprotection-alkylation (signal à $\delta_H$ 12 ppm en RMN- <sup>1</sup> H). Obtention du dérivé prénylé en position 4' ou 7. Pas de produit de départ.
7 DIAD (2 éq.) PPh <sub>3</sub> (1,5 éq.) 3-méthyl-2-butèn-1-ol (1,7 éq.) dans THF	Obtention du composé prénylé en position 5, mais avec un rendement faible. Il reste du produit de départ.
8 DEAD (1,6 éq.) PPh <sub>3</sub> (1,3 éq.) méthyl-2-butèn-1-ol (1,5 éq.)	Déprotection-alkylation (signal à $\delta_H$ 12 ppm en RMN- <sup>1</sup> H-). Obtention du dérivé prénylé en position 4' ou 7. Il reste du produit de départ.

Compte tenu de ces différents résultats, les essais de prénylation du composé **DF8a** dans les conditions de Mitsunobu ont été renouvelés. Il s'est avéré que la cristallisation du produit de départ était indispensable afin que celui-ci réagisse. Ainsi, l'éther prénylé a été obtenu, mais le composé diacétylé était toujours présent en fin de réaction, signe d'un taux de conversion plus faible que celui rapporté précédemment (Al-Maharik *et al.*, 2003).

La modification des conditions opératoires mises en place lors de cette étape (quantités de réactifs doublées par rapport à celles décrites (Al-Maharik *et al.*, 2003)) a conduit à la consommation totale du produit de départ, ainsi qu'à la formation d'un composé diprénylé (54 % de rendement). Une quantité suffisante du composé diacétylé, prénylé en position 5 (composé **DF8b**) a ainsi été obtenue et engagée dans l'étape suivante.

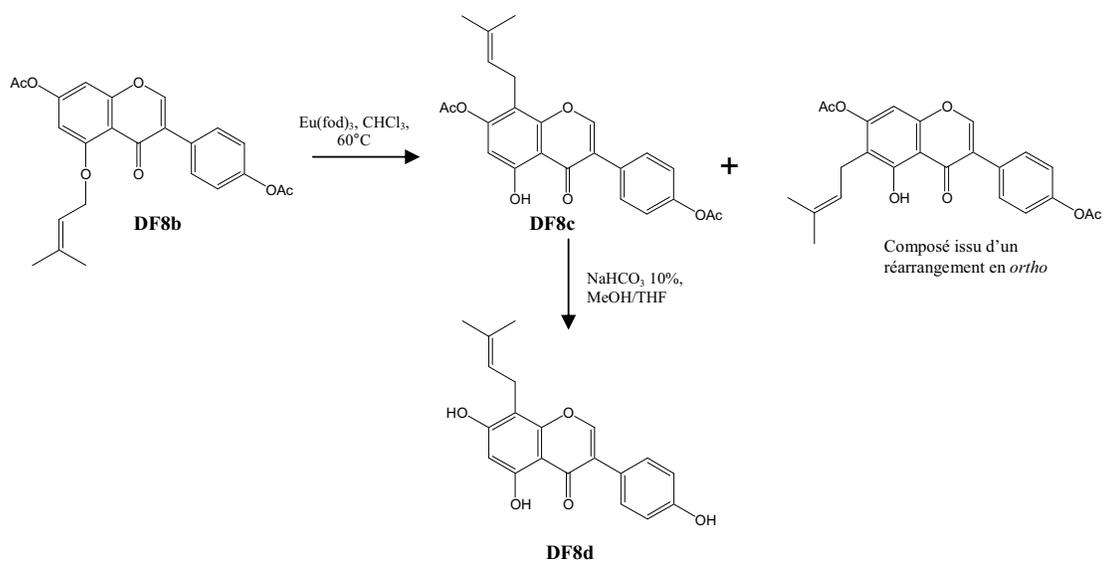
Le réarrangement de Claisen sur des composés aromatiques, décrit ci-dessous (**Figure 79**), se fait préférentiellement en *ortho*. Néanmoins, si le carbone en *ortho* est

porteur d'un substituant encombrant, le réarrangement se fait alors en *para*. Un second réarrangement en *para* peut aussi être observé, même s'il n'existe pas de substituant en *ortho* du phénol (Lutz, 1984), on parle alors de réarrangement de Claisen-Cope (**Figure 79**). Cette réaction se fait à haute température (entre 100°C et 350°C) ou en utilisant des catalyseurs de type acide (BCl<sub>3</sub>, TFA) ou métalliques (palladium).



**Figure 79** : Réarrangement de Claisen (en *ortho*) et réarrangement de Claisen-Cope (en *para*), modifié, d'après Lutz (1984).

Le réarrangement est ici catalysé par un sel d'euprium : Eu(fod)<sub>3</sub>, et permet d'obtenir préférentiellement le dérivé *para*, tout en faisant appel à des conditions de température très douces (Gester *et al.*, 2001 ; Al-Maharik *et al.*, 2003).

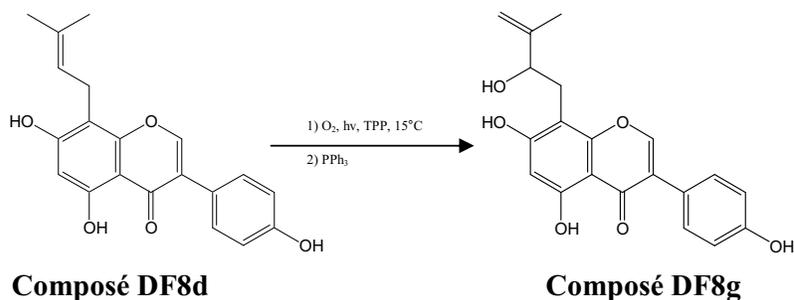


**Figure 80** : Réarrangement sur le composé DF8b

Cette étape nous a permis d'obtenir le composé **DF8c** (68 % de rendement). A nouveau, la cristallisation du produit de départ constitue un paramètre clé pour la réussite de cette réaction. Dans le cas contraire, un mélange de deux produits issus d'un réarrangement en *ortho* et en *para* a en effet été obtenu.

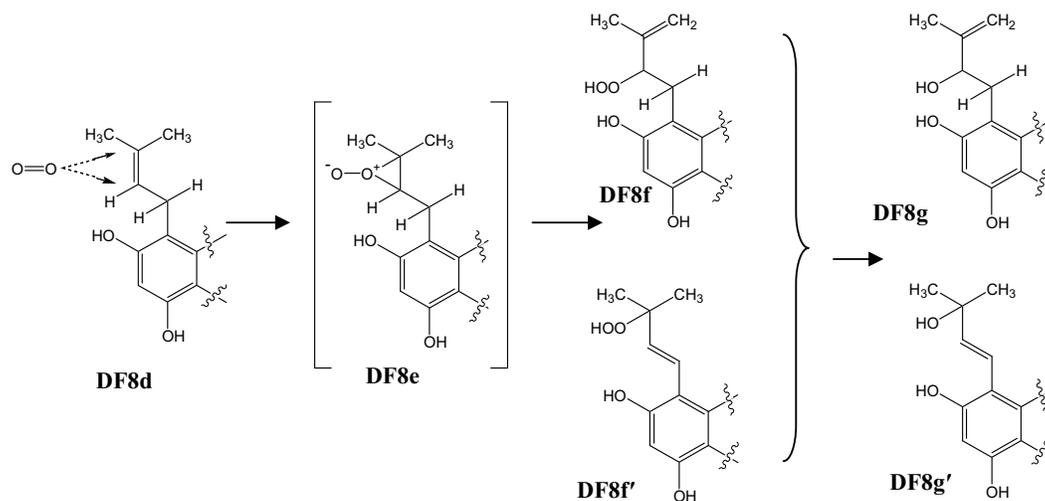
La déprotection du composé **DF8c**, réalisée en milieu basique (NaHCO<sub>3</sub> 10%) dans un mélange MeOH/THF, conduit à la lupiwightéone (**DF8d**) avec un rendement de 65 % après purification.

### 1.5.2.3. Réaction de photo-oxydation ou réaction de Shenk



**Figure 81** : Séquence de photo-oxydation/réduction appliquée au composé **DF8d**

L'étape de photo-oxydation ou photo-oxygénation est réalisée en solution dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, en présence de lumière et d'air, ainsi que d'un photosensibilisateur : la méso-tétraphénylporphyrine (TPP) (Helesbeux *et al.*, 2000).

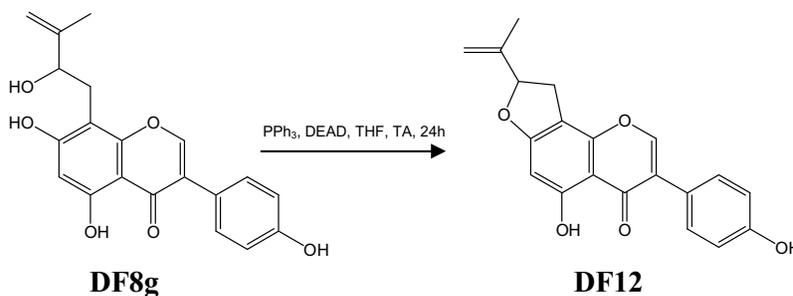


**Figure 82** : Photo-oxydation d'un *ortho*-allylphénol

Lors de cette réaction, deux hydroperoxydes, l'un tertiaire, l'autre secondaire, peuvent être théoriquement formés. Or en série coumarines et xanthones, l'instabilité de l'hydroperoxyde tertiaire a été mise en évidence à 15°C (Helesbeux *et al.*, 2000). Nous nous sommes donc placés dans des conditions opératoires identiques pour obtenir préférentiellement l'alcool secondaire à partir de **DF8d** et nous pouvons conclure que la réactivité du motif *o*-prénylphénol en série isoflavone est identique à celle observée dans les autres séries.

#### 1.5.2.4. Obtention du composé DF12

Cette étape consiste en une condensation intramoléculaire entre la fonction phénol et la fonction alcool secondaire. Elle a été réalisée dans les conditions de la réaction de Mitsunobu.



**Figure 83** : condensation intramoléculaire du composé **DF8g**

Le spectre RMN-<sup>1</sup>H du composé obtenu est identique à celui du produit isolé de *D. ferruginea* (*cf.* analyse spectrale). Lors de cette dernière étape, l'alcool secondaire semble avoir été entièrement consommé. En effet, en RMN-<sup>1</sup>H, on n'observe aucun signal à 4,30 ppm correspondant au CH<sub>2</sub> de l'alcool secondaire, le CH<sub>2</sub> du produit cyclisé apparaissant plutôt autour de 5,30 ppm. Mais, malgré l'obtention du composé attendu, sa purification n'a pas été concluante, du fait d'une co-élution avec l'oxyde de phosphine (Ph<sub>3</sub>PO). Aucun test biologique n'a donc été effectué sur ce composé à ce jour. Pour contourner ce problème, une autre méthode de purification pourrait être envisagée, par exemple par CLHP préparative, ou en utilisant une phosphine supportée par une résine (Pelletier *et al.*, 2000). De plus, afin d'obtenir le composé en quantité suffisante pour effectuer une évaluation biologique, les conditions opératoires de certaines étapes devront être optimisées.

## 1.6. Bilan de l'étude phytochimique

L'étude phytochimique a été menée sur quatre extraits de tiges et trois extraits de feuilles, en privilégiant la purification de flavonoïdes, composés les plus représentés dans le genre. Le fait de privilégier la purification des flavonoïdes ne permet pas à cette étude de caractériser chimiquement cette plante d'une manière exhaustive. Néanmoins, elle permet de distinguer cette plante des autres espèces de genre par son abondance en flavanones prénylées. En effet, la majorité des composés isolés appartiennent à deux groupes de flavonoïdes *sensu lato* : les flavanones (**DF1-DF7**) et les isoflavonoïdes (**DF8-DF12**).

On peut noter que relativement peu de flavanones ont été précédemment décrites dans le genre (14 flavanones sur 247 composés isolés dans le genre). Les flavanones isolées durant ce travail présentent toutes des prénylations « classiques » (de type 3,3-DMA, pyrane et furane) mais sont pour la première fois isolées du genre *Derris*. Le composé **DF6** est décrit pour la première fois.

Quatre isoflavonoïdes ont pu être isolés de *Derris ferruginea*. On peut remarquer qu'ils sont présents en très faible quantité et qu'à l'exception de **DF12**, aucun n'est prénylé. Les isoflavonoïdes **DF8-DF10** sont des composés très répandus dans la famille des Légumineuses. Le composé **DF11** n'est pas décrit dans le genre *Derris* mais il a été isolé auparavant d'une autre Fabaceae : *Ateleia herbert-smithii* (Veitch *et al.*, 2003). Le composé **DF12** est quant à lui un composé original. Par ailleurs, un stilbène, un dérivé terpénique et un polyol ont été purifiés en quantités significatives, mais leurs structures n'ont pour l'instant pas été complètement élucidées.

La présence de flavanones en relative abondance peut s'expliquer par le fait que ces dérivés représentent un carrefour métabolique dans la synthèse des flavonoïdes.

On peut s'interroger sur la séquence des prénylations et conversions des flavanones en isoflavonoïdes. Une étude de Ngadjui suggère que le 6,8-diprényléridictyol (**DF5**) pourrait être un précurseur d'autres métabolites chez *Dorstenia mannii* (Ngadjui *et al.*, 2000), en raison de sa présence en très grande quantité dans cette espèce (2,5 g à partir de 4,2 kg des parties aériennes soit 0,06 %). On peut ainsi penser que cette molécule est aussi à l'origine des autres flavanones prénylées caractérisées lors de cette étude.

Toutes les flavanones isolées au cours de ce travail apparaissent comme optiquement inactives, ce qui suggère leur présence sous forme d'un mélange racémique. Ceci a été confirmé par l'analyse CLHP sur colonne chirale pour un des composés

(résultats non présentés dans le manuscrit). Or, il apparaît que les flavanones naturelles sont pour la majorité de configuration (2S) (Slade *et al.*, 2005 ; Harborne *et al.*, 2001). Néanmoins, il a été montré que lors de la maturation des fruits, on observait une diminution de la proportion de (2S) naringine (hétéroside de la naringénine) dans plusieurs espèces de *Citrus*, due à une inhibition ou une dégradation de la chalcone flavanone isomérase (CHI) couplée à une racémisation non enzymatique passant par une ouverture du cycle C (Caccamese *et al.*, 2007 ; Caccamese *et al.*, 2010 ; Asztemborska *et al.*, 2006 ; Caccamese *et al.*, 2003 ; Krause *et al.*, 1991) Il semblerait également qu'une racémisation puisse intervenir lors d'une solubilisation dans différents solvants (Caccamese *et al.*, 2007 ; Yanez *et al.*, 2007). Une séparation sur colonne chirale pourrait être envisagée pour évaluer les activités biologiques des énantiomères. En effet, ceux-ci ne présentent pas forcément les mêmes activités biologiques, le même métabolisme et la même biodisponibilité (Donavan *et al.*, 2006 ; Brand *et al.*, 2010 ; Setchell *et al.*, 2005). Cependant, ce type d'évaluation est délicate à réaliser en raison notamment de la racémisation qui peut avoir lieu lors des tests biologiques (Yanez *et al.*, 2007).

Un des points délicats dans l'identification des composés est le positionnement des prénylations sur les cycles A et/ou B. L'analyse des spectres de masse n'a pas permis de situer ces prénylations. En effet, l'ionisation des composés a été réalisée en mode négatif, qui est plus sensible pour l'analyse des flavonoïdes. Par contre, les fragmentations en mode négatif sont plus difficiles à obtenir et, en outre, le clivage des groupements prénylés n'est pas observable (Cuyckens *et al.*, 2004 ; Simons *et al.*, 2009). Pour cette raison, les fragmentations MS<sup>n</sup> ne sont pas présentées dans ce manuscrit. Seule l'analyse des spectres de RMN bidimensionnelle a permis de positionner les prénylations.

Deux composés nous sont apparus plus particulièrement intéressants : la cajaflavanone (**DF1**) et le composé original **DF12**, tout deux isolés en faibles quantités. Pour effectuer une évaluation biologique étendue de ces deux produits, deux techniques différentes ont été utilisées afin de les obtenir en quantité plus importante. Le composé **DF1**, apparaît comme l'un des composés majoritaires de l'extrait cyclohexanique des tiges (CLHP-UV à 254 nm). L'optimisation de sa purification en FCPC était donc envisageable et a été réalisée. Cette méthodologie a permis d'obtenir **DF1** en une seule étape, en augmentant le rendement de purification et en utilisant moins de solvants. Ce travail a fait l'objet d'une publication (Morel *et al.*, 2011)

Le composé **DF12** est présent en faible quantité dans la plante (2,5 mg); il n'était donc pas possible d'utiliser la même stratégie que pour **DF1**. Sa synthèse a donc été

entreprise. Cependant, celle-ci n'a pas permis d'obtenir **DF12** en quantité suffisante pour une évaluation biologique large. Des améliorations sont à apporter pour augmenter le rendement global. Cette synthèse a toutefois permis de valider la structure de **DF12**.

Enfin, contrairement à nos attentes, aucun roténoïde n'a été isolé de *Derris ferruginea* pendant ce travail. Or la seule publication concernant la phytochimie de cette espèce indiquait la présence de roténoïdes dans les racines (Subba Rao *et al.*, 1946) Nous n'avons pas pu étudier la composition chimique des racines durant ce travail, étant donné la difficulté d'obtenir celles-ci (protection de l'espèce, inondation de la zone de récolte). Cependant, on peut penser que leurs compositions chimiques sont proches et donc que s'il y a des roténoïdes dans les racines, une faible quantité serait également présente dans les tiges. L'utilisation en début de ce travail de réactif d'identification des roténoïdes<sup>25</sup>, ainsi que l'examen des spectres UV des pics majoritaires comparé à celui de la roténone, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de roténoïdes dans les tiges. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats :

- les roténoïdes sont présents en trop faible quantité pour être décelables par les moyens utilisés ;

- il s'agit de roténoïdes qui ne réagissent pas aux réactifs utilisés ;

- ou, l'hypothèse la plus probable, compte tenu de l'étude réalisée à *posteriori* sur les fruits : la plante étudiée ne contient pas de roténoïdes. Or, un point dans la publication de Subba Rao pourrait soutenir cette hypothèse. En effet, cet auteur suggère qu'il existerait deux variétés de *D. ferruginea*, en fonction de la composition en roténoïdes, c'est-à-dire une variété contenant des roténoïdes et une seconde variété quasiment dépourvue de ces derniers. On peut ainsi supposer que le matériel végétal étudié ici correspond à une variété pauvre en roténoïdes. Néanmoins pour confirmer cette hypothèse, il aurait été utile de pouvoir disposer d'une petite quantité de racines récoltées au même endroit afin de réaliser une étude de sa composition, par exemple en LC-MS<sup>n</sup>.

---

<sup>25</sup> Test de Durham : acide nitrique, puis ammoniac, donne une coloration bleue-violette en présence de roténoïdes Jones H.A. Colorimetric evaluation of Derris and Cube roots. *Industrial and Engineering Chemistry* **1939**; 11: 429-431.

## 2. Evaluation biologique de *Derris ferruginea*

Dans un premier temps, une évaluation biologique des huit extraits bruts de *Derris ferruginea* (quatre extraits de tiges et quatre de feuilles, nommés DfS1-4 et DfL1-4) a été réalisée sur différents modèles. Dans un second temps, la majorité des molécules isolées ont également été testées, en fonction des quantités disponibles et des effets observés à partir des extraits dont elles étaient issues.

### 2.1. Evaluation biologique des extraits

Pour rappel, quatre extraits respectivement des tiges et des feuilles de *D. ferruginea* ont été obtenus à partir de solvants de polarité croissante, et nommés.

Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressé à la purification de flavonoïdes. Ceux-ci sont connus pour être des phytoalexines, molécules de défense pour les plantes, il nous a donc paru intéressant d'évaluer les propriétés antimicrobiennes et antiparasitaires de ces extraits issus des tiges et des feuilles. De plus, les flavonoïdes sont connus pour être de bons composés antioxydants, en ce sens, le potentiel antioxydant des extraits a été estimé par le test au DPPH. L'effet des extraits sur la formation des produits terminaux de glycation a aussi été évalué, ainsi que sur des cellules microgliales activées. En parallèle, une évaluation de la cytotoxicité sur cellules saines (MRC-5) a été réalisée pour tous les extraits, ainsi que sur un modèle disponible au laboratoire : *Artemia salina*. Les principaux résultats obtenus pour les extraits sont regroupés dans le **tableau 5**.

**Tableau 5** : Activités biologiques des extraits bruts de *D. ferruginea*

Activités	Extraits des tiges				Extraits des feuilles				Témoins
	DfS1	DfS2	DfS3	DfS4	DfL1	DfL2	DfL3	DfL4	
<b>Antifongique</b> /Diamètre d'inhibition (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	Amphotéricine B (30mm)
<b>Antibactérienne</b> CMI <sub>90</sub> (µg/mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	-
<b>Antiplasmodiale</b> ( <i>P. falciparum</i> ) % d'inhibition à 10µg/mL	43,6	40,2	13,4	9,8	<b>79,3</b>	<b>74,3</b>	11,4	6,1	chloroquine >80
<b>Antileishmanie</b> ( <i>L. major</i> ) CI <sub>50</sub> (µg/mL±SD)	>100	>100	40±2	>100	<b>26±6</b>	32±5	>100	>100	pentamidine 2,8±1
<b>Cytotoxicité</b> sur MRC5 à 10 µg/mL (et 1 µg/mL)	0	0	0	0	82 (0)	0	0	0	
<b>Toxicité sur <i>A. salina</i></b>	-	++	-	-	+	-	-	-	Berbérine ++
<b>Antioxydante</b> (DPPH) µmole TE/g	240	610	300 ±36	1700	621± 21	542 ± 37	1606 ± 17	450 ± 14	Acide chlorogénique 3056 ± 157
<b>AGEs</b> CI <sub>50</sub> (mg/mL)	0,30	<b>0,063</b>	0,24	0,47	0,28	<b>0,055</b>	<b>0,034</b>	0,20	Aminoguanidine 1,0

### 2.1.1. Activités antibactérienne et antifongique

Les extraits ont été évalués sur trois souches fongiques et sur vingt et une souches bactériennes, pour certaines isolées de patients, par des méthodes qualitatives de routine (Partie III.7.).

Les tests ont été réalisés au GEIHP (UPRES EA 3142, Angers) - Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasite pour l'activité antifongique, et au Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière du CHU d'Angers, pour les tests antibactériens.

Aucun des extraits bruts ne présente d'activité antimicrobienne significative, que ce soit sur souches fongiques ou sur souches bactériennes (**Tableau 5**). Etant donné l'absence de résultats, l'analyse quantitative par une méthode en milieu liquide n'a pas été engagée. De plus, les extraits ne présentant pas d'activité pour ces cibles, par la suite, seules certaines molécules, disponibles en quantités suffisantes, ont été testées sur ces modèles.

## **2.1.2.    *Activité antiparasitaire***

L'activité antiparasitaire des extraits a été évaluée sur deux souches parasitaires différentes : *Plasmodium falciparum*, protozoaire responsable du paludisme et sur *Leishmania major*, un agent de la leishmaniose cutanée (Partie III.7.).

Ces bioessais ont été effectués au Muséum National d'Histoire Naturelle pour *P. falciparum* et au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale de Nantes pour *L. major*.

### **2.1.2.1.    *Activité antiplasmodiale***

La souche utilisée est une souche chloroquino-résistante (FcB1 /Columbia). Tous les extraits présentent une activité antiplasmodiale significative sur *P. falciparum*, en particulier les extraits les moins polaires (DfS1, DfS2, DfL1 et DfL2). Parmi ceux-ci, les extraits de feuilles sont les plus actifs, avec pratiquement 80% d'inhibition de la croissance des parasites à 10 µg/mL.

### **2.1.2.2.    *Activité antileishmanienne***

Seuls trois extraits bruts présentent une activité significative sur *L. major* : les extraits DfS3, DfL1 et DfL2. Il est à noter que les extraits DfL1 et DfL2, les plus actifs sur *L. major*, correspondent aussi aux extraits les plus actifs sur *P. falciparum*.

## **2.1.3.    *Cytotoxicité sur cellules MRC-5***

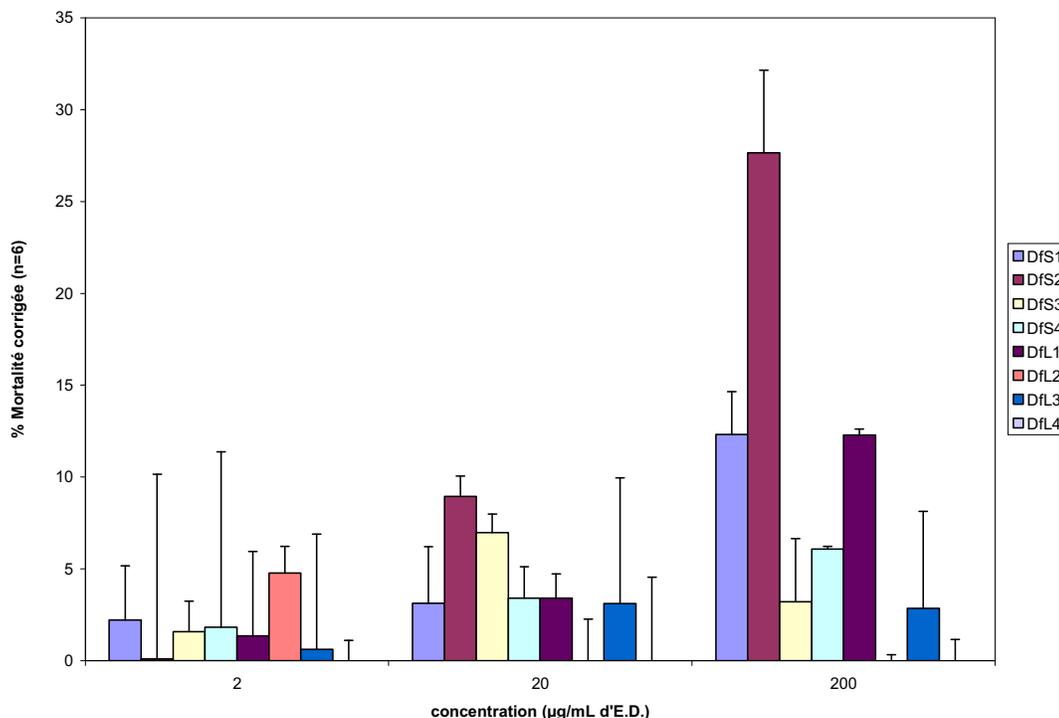
La cytotoxicité a été évaluée au Muséum National d'Histoire Naturelle, sur une lignée de cellules saines, nommées MRC-5. Cette lignée correspond à des fibroblastes diploïdes issus de poumons fœtaux humains. Les extraits sont évalués à 10 µg/mL et à 1 µg/mL (Partie III.7.5.).

L'extrait DfL1 possède une cytotoxicité à la plus forte concentration (10 µg/mL), néanmoins, cette cytotoxicité est nulle à 1 µg/mL, on peut donc considérer que la cytotoxicité est faible pour cet extrait. En effet, beaucoup de composés présents dans l'extrait peuvent être responsables de cette cytotoxicité, en particulier des terpènes. De plus, étant donné les activités associées à cet extrait, notamment antiparasitaire, il nous a

paru intéressant de le sélectionner pour l'étudier et tester les molécules isolées de cet extrait.

### 2.1.4. Toxicité sur *Artemia salina*

Ce test a été réalisé au SONAS. Le modèle *Artemia salina* a été choisi en particulier pour sa mise en œuvre relativement rapide et peu coûteuse.



**Figure 84:** toxicité des extrais vis à vis d'*Artemia salina* du même âge (24 h)

Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après une exposition de 24 heures aux échantillons testés, rapportée à la mortalité normale à trois concentrations : 2, 20 et 200 µg/mL, à raison de 6 réplicats par concentration

Le pourcentage maximum acceptable de DMSO sans observer de mortalité de larves est de 4% au final (**Annexe 15**), ce qui limitait la solubilisation des extraits et donc la concentration maximale testée (200 µg/mL). A cette concentration aucun des extraits ne présentait 50% de mortalité, sans effet-dose observable, donc  $LC_{50} > 200$  µg/mL. Lors d'une évaluation toxicologique d'extraits de plantes par ce test de toxicité, une valeur de  $LC_{50} < 1000$  µg/mL est considérée comme bioactive (Meyer *et al.*, 1982).

Au vu des résultats, il apparaît que l'extrait le plus toxique vis-à-vis d'*Artemia salina* est l'extrait des tiges DfS2, alors que DfL4 est totalement inactif quelles que soient les concentrations testées. On peut remarquer que l'extrait DfL1, extrait le plus toxique sur cellules MRC-5 est ici modérément toxique. Cependant, des valeurs de LC<sub>50</sub> bien au dessus de 200 µg/mL démontrent la toxicité très relative de ces extraits sur ce modèle. Seuls les extraits DFS2 et Df11 montrent un pourcentage de mortalité qui double pour une concentration de 200 µg/mL. Pour ces derniers, en extrapolant sur une droite de régression (résultats non présentés), il semble que la LC<sub>50</sub> soit >1000 µg/mL. Ces extraits sont considérés comme non toxiques.

Pour certains auteurs, il n'existerait pas de corrélation entre ce test et les effets toxicologiques sur un animal entier (Sanchez *et al.*, 1993). Néanmoins, pour 20 extraits de plantes testées en utilisant des méthodes *in vivo* (sur souris) et *in vitro* (Lagarto-Parra *et al.*, 2001) les résultats ont montré une bonne corrélation ( $r= 0,85$  ;  $p<0,05$ ), suggérant que le test sur *Artemia* est un modèle de toxicité alternatif relativement utile.

Le point crucial pour discuter de la pertinence des valeurs de LC<sub>50</sub> obtenues par le biais du test sur larves de crevettes est de savoir si les données de mortalité peuvent être reliées à une activité plus spécifique. Une corrélation générale de ce test avec des types spéciaux de bioactivités ne semble pas admise. Néanmoins, dans de nombreux cas cela s'est avéré possible (Hartl *et al.*, 2000). Mc Laughlin *et al.*, dans une étude sur l'utilité de ce test comme un préscreening antitumoral des extraits de plantes, a été capable de déterminer une corrélation positive entre la mortalité des larves d'*Artemia* et la cytotoxicité contre les cellules KB. Il a permis la découverte d'acétogénines d'Annonaceae comme une nouvelle classe de pesticides naturels et d'agents antitumoraux actifs (Laughlin *et al.*, 1998). De la même façon, Solis *et al.* ont trouvé ce test prédictif de la toxicité sur cellules KB excepté pour les composés demandant une activation métabolique, les larves d'*Artemia* ne possédant pas les enzymes nécessaires au cytochrome P450 (Solis *et al.*, 1993). Richardson et Hamilton considèrent ce test adapté pour prédire la toxicité des trichothécènes (mycotoxines) dans les poulets grillés (Richardson *et al.*, 1990). De même, Hlywka *et al.*, ayant testé la toxicité de la fumonisine B1 sur de embryons de poulets, a pu trouver une bonne corrélation entre les deux tests (Hlywka *et al.*, 1997).

### **2.1.5.    *Activité sur cellules microgliales***

Cette évaluation a été réalisée au sein de l'équipe 15 INSERM U892 (CHU Angers). Cette équipe « Immunité Innée et Immunothérapie » s'intéresse à l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires de l'immunité innée et à leur application dans les domaines de la cancérologie et de l'auto-immunité.

Dans le système nerveux sain, les cellules microgliales sont maintenues dans un état quiescent qui se traduit notamment par une faible activité d'endocytose et de phagocytose, une faible expression des différents récepteurs et ligands impliqués dans les fonctions immunologiques.

Les cellules microgliales sont activées lorsque des lésions surviennent dans le SNC (présence de pathogènes, dommages cellulaires, dépôt de peptides A $\beta$ ...). Elles deviennent alors des cellules présentatrices d'antigènes et expriment à leur surface les CMHI et CMHII. Elles secrètent en outre des cytokines proinflammatoires (comme IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), des protéines, des radicaux libres (anion super oxyde) qui peuvent aggraver les lésions (Farber *et al.*, 2005). En découle une cascade de réactions. En outre, la fixation de TNF- $\alpha$  sur ses récepteurs va entraîner l'activation de facteurs nucléaires tels que NF- $\kappa$ B. Celui-ci peut se fixer sur les régions promotrices de gènes cibles, dont les gènes de la NO synthase inductible (iNOS) ou des cytokines pro-inflammatoires. Dans certaines circonstances (cas des maladies neurodégénératives notamment), cet état inflammatoire est maintenu chronique.

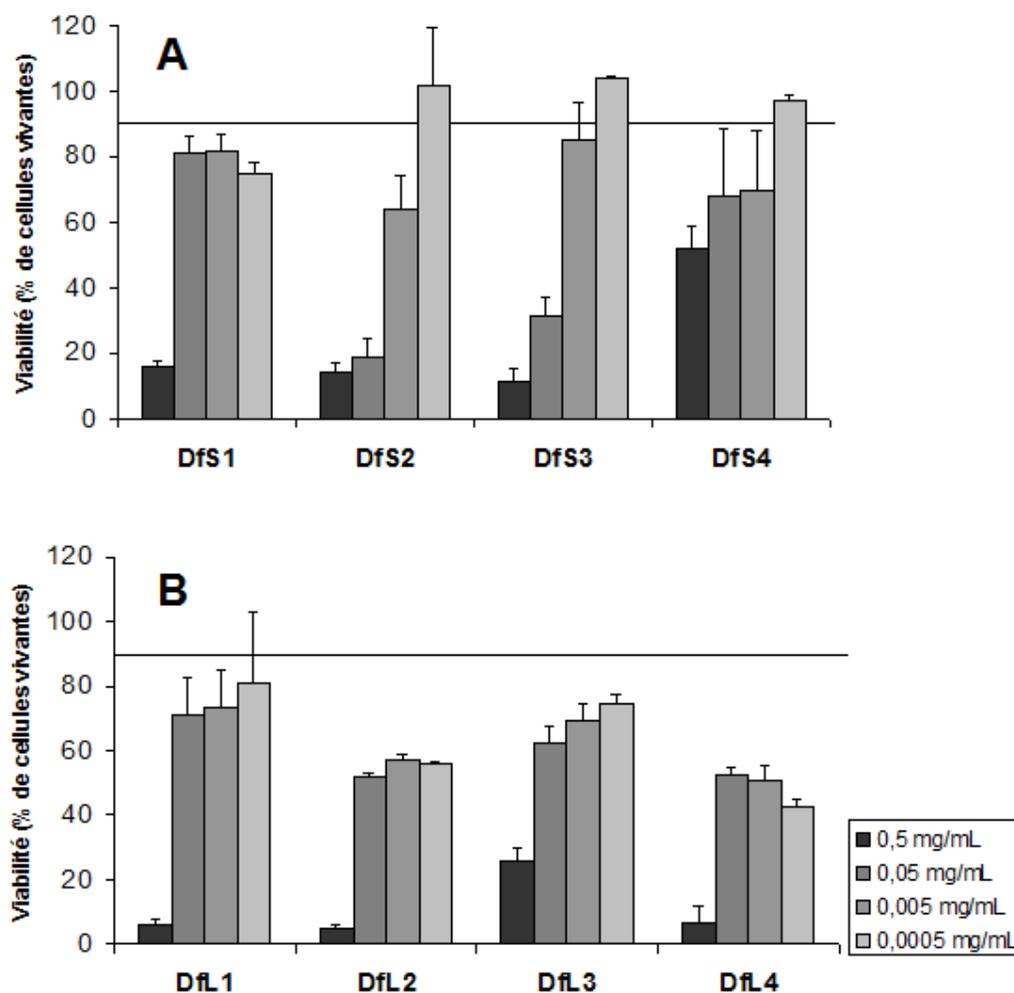
Néanmoins, la microglie peut aussi s'engager dans un état « alternatif » d'activation. Cet état se traduit en outre par une sécrétion de cytokines « anti-inflammatoires » (IL-4, IL-10, IL-13), une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, la réduction de l'expression de iNOS, l'acquisition d'une capacité de phagocytose (Cameron, 2010).

Dans la plupart des modèles de culture cellulaire, l'activation de la microglie est simulée par le LPS (lipopolysaccharide), composant membranaire des bactéries Gram négative (simulation d'une infection bactérienne).

L'étude présentée ici concerne l'effet des extraits et des molécules isolées sur différents facteurs de la réponse inflammatoire microgliale.

### 2.1.5.1. Test de viabilité cellulaire par la méthode au MTT sur la lignée de cellules microgliales BV-2

Ce test permet de sélectionner les extraits et les molécules qui n'entraînent pas de cytotoxicité sur la lignée cellulaire étudiée. Les extraits et les molécules considérées pour lesquels le pourcentage de viabilité cellulaire est supérieur à 90% sur ce modèle sont retenus pour une investigation sur un modèle neuro-inflammatoire. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité, à quatre concentrations ( $5.10^{-1}$ ,  $5.10^{-2}$ ,  $5.10^{-3}$  et  $5.10^{-4}$  mg/mL).



**Figure 85** : Toxicité des extraits de *D. ferruginea* sur le modèle BV-2. **A**, extraits de tiges et **B**, extraits de feuilles. Les BV-2 sontensemencées à  $10^4$  cellules par puit avec les extraits aux concentrations indiquées pendant 24 h. La ligne horizontale représente 90 % de viabilité. (n = 2-3).

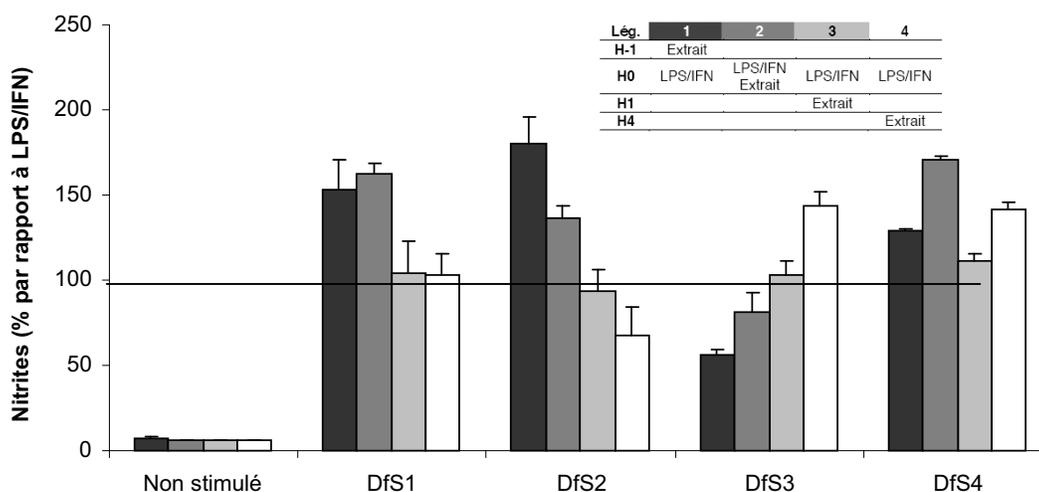
Les extraits de feuilles (DfL2, DfL3 et DfL4), sont cytotoxiques à toutes les concentrations testées, alors que les extraits de tiges (DfS2, DfS3 et DfS4) présentent des pourcentages de viabilité supérieurs à 90% à la plus faible concentration ( $5.10^{-4}$  mg/mL).

Seuls les extraits de tiges, à des concentrations de  $5.10^{-4}$  mg/mL, sont donc retenus pour une étude plus poussée sur ce modèle cellulaire.

On peut noter cependant que ces résultats ne sont pas forcément corrélés avec ceux obtenus sur des modèles différents (cellules MRC-5).

### 2.1.5.2. Stimulation et quantification de la production de NO par les cellules

La production de NO par les cellules BV-2 est évaluée par mesure des nitrites avec une stimulation réalisée avec du LPS ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) et  $\text{IFN}\gamma$  ( $50 \text{ UI/mL}$ ). Les cellules sont exposées aux extraits de tiges ( $5.10^{-4}$  mg/mL) soit une heure avant stimulation, soit en même temps, soit après stimulation (1h et 4h).



**Figure 86:** Production de nitrites par les cellules BV-2 après stimulation et traitement par les extraits de feuilles de *D. ferruginea*. Les BV-2 sontensemencées à  $1,5.10^5$  cellules par puit ; elles sont stimulées par LPS ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) et  $\text{IFN}\gamma$  ( $50 \text{ UI/mL}$ ) et les extraits sont déposés à la concentration de  $5.10^{-4}$  mg/mL selon le schéma expérimental (**Figure 99**). Les résultats sont exprimés en pourcentage de nitrites dans le surnageant (en  $\mu\text{mol/mg}$  de protéines), normalisé par rapport à la valeur la plus faible des puits stimulés et la valeur la plus forte des puits non stimulés.

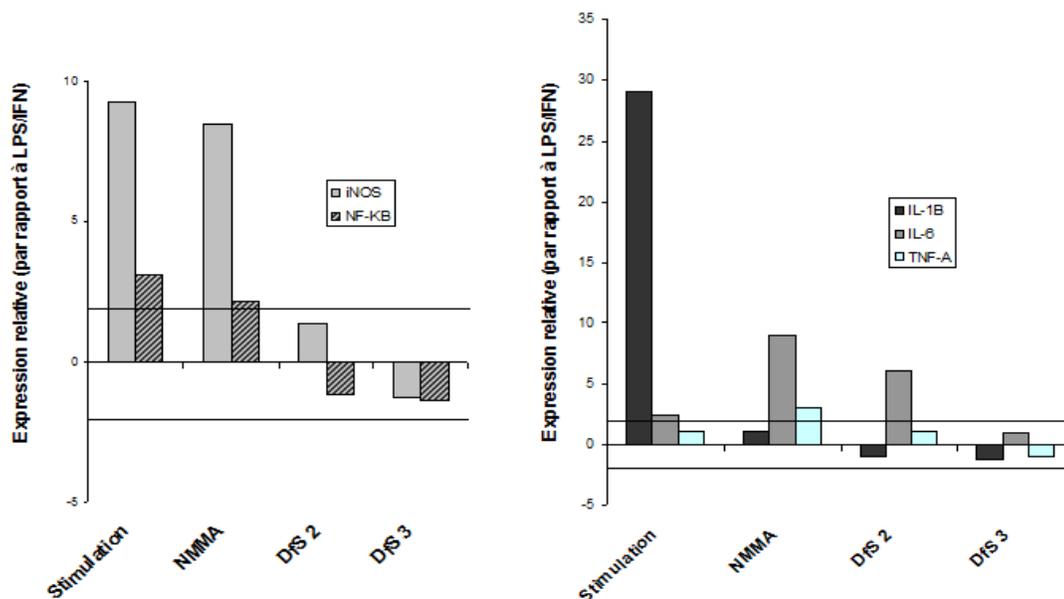
Les extraits de tiges DfS1 et DfS4 montrent une faible activité inhibitrice sur la production de NO, quelque soit le délai entre la stimulation et le dépôt des extraits. Pour

l'extrait Dfs2, plus ce délai est grand (4 h), moins la quantité de nitrites mesurée dans le surnageant est importante ( $32,3 \pm 16,6\%$  d'inhibition), alors que l'inhibition est faible quand les cellules sont exposées à Dfs2 avant stimulation. Ce phénomène est inversé pour l'extrait Dfs3, en effet, pour celui-ci, l'inhibition est maximale quand les cellules sont exposées avant stimulation (prétraitement) ( $43,3 \pm 2,5\%$ ).

### 2.1.5.3. Activité sur l'expression de l'iNOS, de NF-κB et de cytokines pro-inflammatoires

Afin d'aborder de plus près l'aspect « mécanisme d'action » des extraits, l'expression d'iNOS, de NF-κB et des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α a été étudiée par RT-qPCR.

Les extraits de tiges (Dfs2 et Dfs3) sont introduits dans les conditions les plus adaptées pour chaque extrait (4h après stimulation pour Dfs2 et 1h avant stimulation pour Dfs3). Ces extraits inhibent l'expression des cytokines, en particulier d'IL-1β et IL-6, mais n'ont aucune activité sur l'expression d'iNOS et de NF-κB.



**Figure 87 :** Expression des gènes de l'iNOS et du NF-κB, ainsi que des différentes cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) par RT-qPCR, après stimulation et traitement les extraits de *D. ferruginea*. Les BV-2 sont ensemencées à  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puits ; elles sont stimulées par LPS ( $5 \mu\text{g/mL}$ ) et IFN $\gamma$  ( $50 \text{ UI/mL}$ ), les extraits sont déposés à la concentration de  $5 \cdot 10^{-4} \text{ mg/mL}$  dans le délai qui correspond au maximum d'activité antiproduction de NO. Les résultats sont exprimés en facteur de modulation par rapport aux puits non stimulés (milieu seul= contrôle positif). Toutes les modulations d'un facteur supérieur à 2 ou inférieur à -2 sont considérées comme significatives.

#### 2.1.5.4. Activité sur la libération d'IL-6 par les cellules stimulées par LPS/IFN- $\gamma$

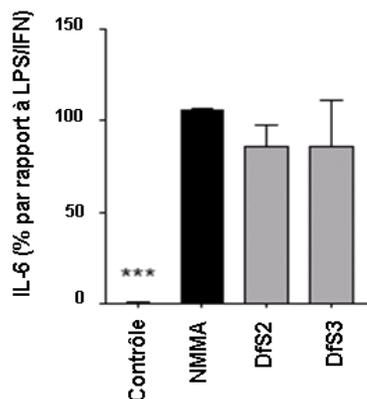


Figure 88 : Production d'IL-6 par les cellules BV-2 après stimulation et traitement par les extraits de *D. ferruginea*. Les BV-2 sontensemencées à  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puit ; elles sont stimulées par LPS 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et IFN $\gamma$  50 UI/mL, les extraits sont déposées à la concentration de  $5 \cdot 10^{-4}$  mg/mL dans le délai qui correspond au maximum d'activité anti-production de NO. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'IL-6 dans le surnageant (en pg/mL), par rapport au puit stimulé. \*\*\* représente  $P < 0,001$  par rapport au puit LPS/IFN $\gamma$  ( $n = 3$ ).

Le traitement des cellules par le couple LPS/IFN- $\gamma$  entraîne une production accrue d'IL-6 dans le milieu ( $701,66 \pm 119,26$  pg/mL), qui correspond ici à la production basale d'IL-6 (100%). On peut noter que la NMMA, inhibiteur de la iNOS, n'a aucun effet sur la quantité d'IL-6 libérée.

Les extraits Dfs2 et Dfs3 semblent inhiber la libération d'IL-6, néanmoins ces résultats n'apparaissent pas significatifs.

#### 2.1.6. Potentiel antioxydant

L'activité antioxydante a été évaluée au sein de notre laboratoire, en utilisant le test au DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{moles}$  d'Equivalent Trolox par gramme d'extrait ( $\mu\text{mol TE/g}$ ), ce qui correspond à une activité relative à celle observée avec le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, analogue hydrosoluble de la vitamine E). Le composé de référence utilisé lors de ces évaluations est l'acide chlorogénique (Partie 7.8.).

Aucun des extraits ne présente de capacité anti-radicalaire (Tableau 5). Ces résultats sont toutefois à modérer, le test DPPH n'étant pas le test le plus sensible pour décrire une activité antioxydante. Cette activité n'a donc pas été systématiquement évaluée pour les molécules isolées.

### **2.1.7.    *Activité sur la formation des produits terminaux de glycation (AGEs)***

L'accumulation des produits terminaux de glycation (AGEs pour Advanced Glycation Endproducts), est connue pour jouer un rôle important dans certaines complications du diabète, comme des rétinopathies et des néphropathies, et ces produits sont impliqués dans le vieillissement cellulaire (Matsuda *et al.*, 2003 ; Robert *et al.*, 2007).

Ce test a été développé et réalisé au SONAS (Derbre *et al.*, 2009) en plaque 96 puits (Partie III.7.9.). Il repose sur la réaction de Maillard, observée entre une fonction amine protéique et un sucre réducteur. Les premières étapes de cette réaction sont réversibles, alors que les dernières étapes (oxydations) sont irréversibles. Les produits formés étant pour la plupart fluorescents, le test va consister à détecter une éventuelle diminution de la fluorescence correspondant à une moindre concentration en AGEs.

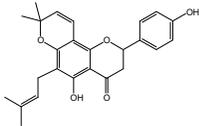
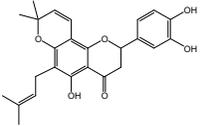
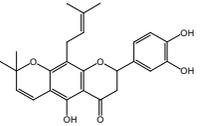
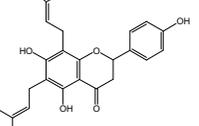
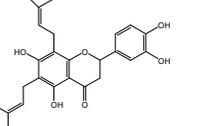
Comme il apparaît dans le **Tableau 5**, tous les extraits inhibent la formation des AGEs en particulier ; DfS2 et les extraits des feuilles DfL2 et DfL3, avec des IC<sub>50</sub> de respectivement : 0,063 ; 0,055 et 0,034 mg/mL. Les molécules isolées en quantité suffisante ont donc été testées sur ce modèle.

## **2.2.    Evaluation biologique des composés isolés**

Toutes les molécules isolées n'ont pas pu faire l'objet d'une évaluation biologique complète, notamment en raison des quantités obtenues. Le choix de l'activité biologique à privilégier s'est fait en fonction des activités de l'extrait dont sont issues les molécules, des données déjà décrites sur les composés ou sur la famille à laquelle elles appartiennent. Les résultats obtenus sont détaillés par activité évaluée et sont regroupés dans un tableau comparatif (**Tableau 6**) pour une série de flavanones diprénylées.

**Tableau 6** : tableau récapitulatif des activités biologiques d'une série de flavanones prénylées.

ND : non déterminé

	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5
<b>Activités</b>					
<i>P. falciparum</i> inhibition à 10µg/mL Chloroquine >80%	55,4%	60,6%	<b>85,55%</b>	<b>88,65%</b>	<b>98,25%</b>
<i>L. major</i> CI <sub>50</sub> (µg/mL±SD) Pentamidine 2,8	40 ± 2	<b>3,3 ± 0,1</b>	<b>5,1 ± 0,5</b>	<b>1,7 ± 0,3</b>	<b>3,7 ± 0,2</b>
Cytotoxicité sur cellules MRC-5 à 10 µg/mL	<b>0%</b>	88,0%	99,5%	95,7%	96,7%
Cytotoxicité sur cellules MRC-5 CI <sub>50</sub> (µg/mL)	N.D.	5,4 ± 2,6	2,6 ± 0,6	9,7 ± 0,0	3,4 ± 0,0
Cytotoxicité sur cellules KB à 10 µg/mL	N.D.	<b>90,0%</b>	<b>99,5%</b>	<b>96,6%</b>	<b>95,1%</b>
Cytotoxicité sur cellules KB CI <sub>50</sub> (µg/mL)	N.D.	5,6 ± 3,1	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,2
DPPH en µmol TE/µmol Acide chlorogénique 1.04	0	0,36	0,91	0,04	0,99
ORAC en µmol TE/µmol Acide chlorogénique 4.07	0	0,58	1,25	1,77	1,12
AGEs (CI <sub>50</sub> ) mM Aminoguanidine 5 ± 3 mM	<b>0,54</b>	> 1	1,9	1,3	1,4

### 2.2.1. Activité antimicrobienne

Seule **DF1** a été testée pour cette activité. Elle n'a montrée aucune propriété antibactérienne ou antifongique.

### **2.2.2.    *Activité antiparasitaire***

Toutes les molécules testées (**DF1-DF5**) possèdent une activité contre *P. falciparum* et contre *L. major*. Cette activité est très modérée pour la cajaflavanone (**DF1**), seule molécule testée issue de DfS1 (55,4 % d'inhibition de la croissance de *P. falciparum* à 10 µg/mL et CI<sub>50</sub> sur *L. major* de 40 µg/mL, soit 98,5 µM) (**Tableau 6**). Par contre, les autres composés testés issus de DfL1, extrait pour lequel l'activité antiparasitaire était maximale, possèdent des activités antiparasitaires assez intéressantes. Le composé **DF5** apparaît comme le plus actif contre *P. falciparum* avec 98,25 % d'inhibition à 10 µg/mL. Sur *L. major* les CI<sub>50</sub> se situent entre 1,7 et 5 µg/mL pour les composés **DF2**, **DF3**, **DF4** et **DF5**. On peut noter que le composé **DF2** possède une activité contre *P. falciparum* moins marquée que contre *Leishmania major*.

Par ailleurs, l'isoflavonoïde **DF12** et le stilbène **DF15** ne possèdent pas d'activité contre *L. major* (respectivement CI<sub>50</sub>=33 ± 1 et >100 µg/mL).

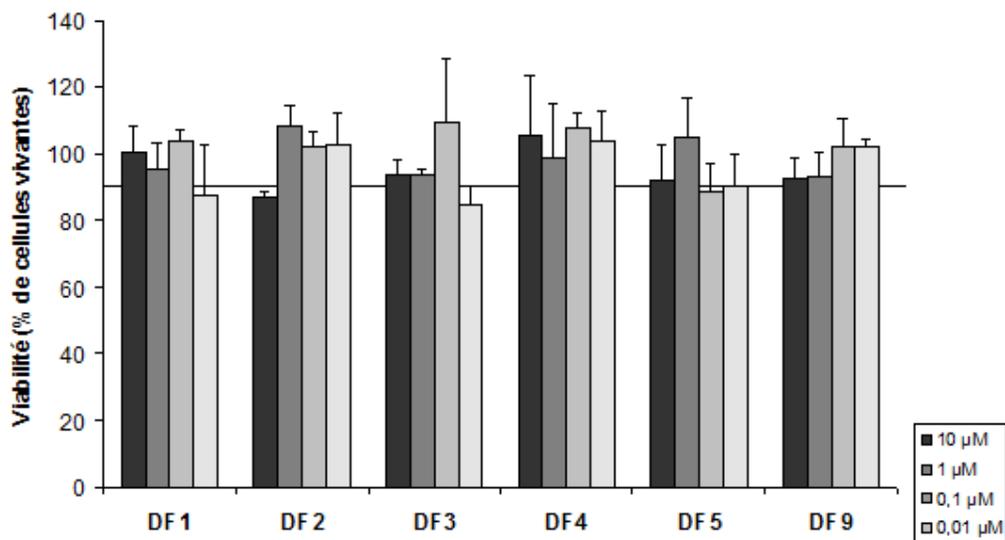
### **2.2.3.    *Cytotoxicité***

Mis à part la cajaflavanone (**DF1**), toutes les molécules testées (**DF2-DF5**) sont toxiques sur les lignées MRC-5 (cellules saines) et KB (cellules cancéreuses) avec des CI<sub>50</sub> entre 2,6 et 9,7 µg/mL pour MRC-R et 3,5 et 5,6 µg/mL pour KB (**Tableau 6**),

### **2.2.4.    *Activité sur cellules microgliales***

#### **2.2.4.1.    Viabilité sur la lignée de cellules microgliales BV-2**

Ce test a été réalisé dans le but de sélectionner les composés pour une investigation sur cellules microgliales inflammatoires. La majorité des composés testés est issue de DfL1 et sont des flavanones prénylées (**DF1-DF5**). Un isoflavonoïde isolé de DfS1 a également été testé (**DF9**). En effet, il a montré que ce composé, la pratenséine, protège les neurones dopaminergiques d'une neuro-dégénération induite par LPS et inhibe la production de TNF-α, NO et superoxyde au niveau des neurones mésencéphaliques (Chen *et al.*, 2008).

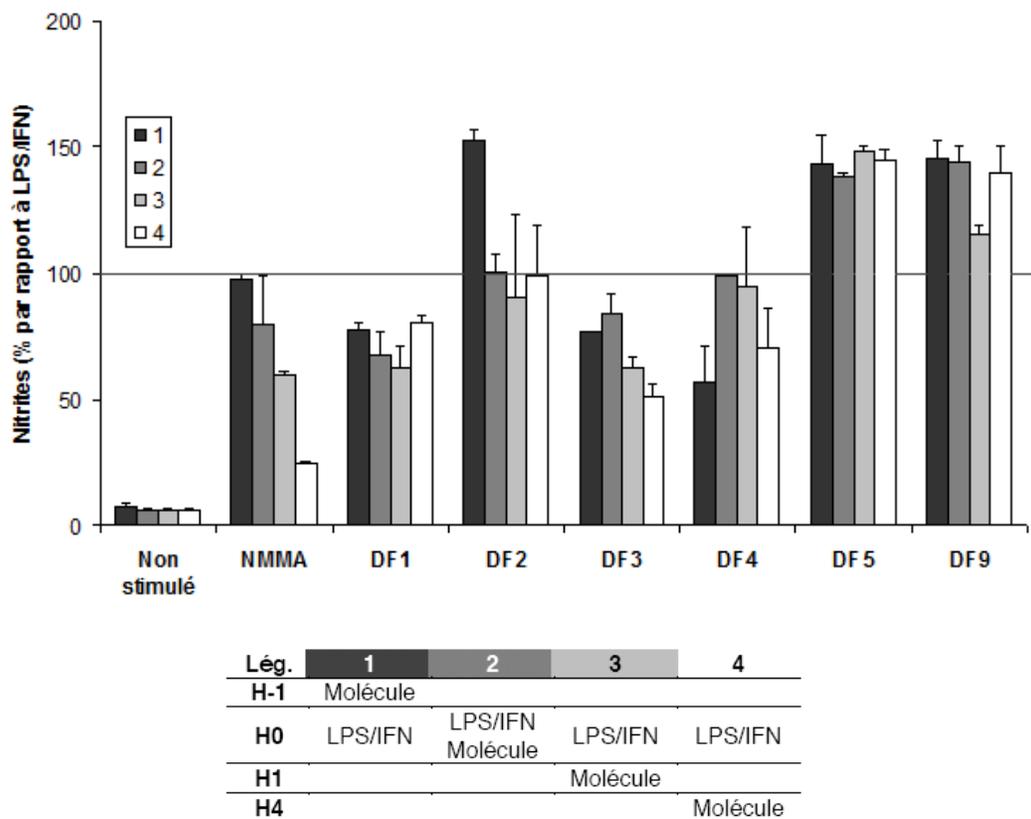


**Figure 89** : Toxicité des molécules sur le modèle BV-2. Les BV-2 sont ensemencées à  $10^4$  cellules par puit avec les molécules aux concentrations indiquées pendant 24 h. La ligne horizontale représente 90 % de viabilité (n = 2-3).

Sur ce modèle de cellules microgliales saines, les composés testés, toxiques sur MRC-5, entraînent une viabilité cellulaire supérieure ou égale à 90% à la plus forte concentration testée (10  $\mu$ M, soit environ 4,3  $\mu$ g/mL) et sont donc considérés comme non toxiques sur ce modèle cellulaire.

#### 2.2.4.2. Inhibition de la production de NO

Les composés ont été testés à 1  $\mu$ M, concentration pour laquelle toutes les molécules induisent une viabilité des cellules supérieure à 90% sur lignée BV-2.

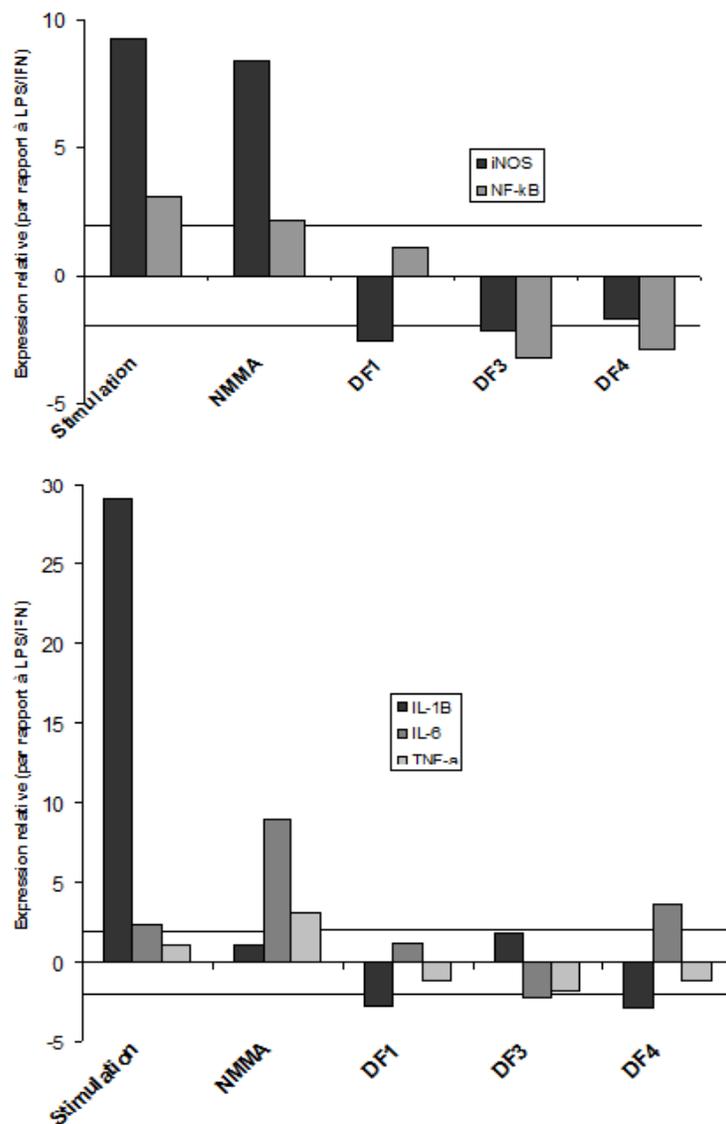


**Figure 90** : Production de nitrites par les cellules BV-2 après stimulation et traitement par les molécules. Les BV-2 sontensemencées à  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puit ; elles sont stimulées par LPS 5 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) et  $\text{IFN}\gamma$  (50 UI/mL) et les molécules sont déposées à la concentration de 1  $\mu\text{M}$  selon le schéma expérimental. Les résultats sont exprimés en pourcentage de nitrites dans le surnageant (en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines), par rapport au puit stimulé (100%) (n=2-3).

Comme pour les extraits, la production de nitrites est évaluée avec des délais différents entre l'introduction de la molécule et la stimulation par LPS/ $\text{IFN}\gamma$ . Cette influence du délai apparait moins marquée pour les molécules que pour les extraits. Elle est cependant observable pour **DF3** et dans une moindre mesure pour **DF4** et **DF1** : l'introduction de la molécule à H4 après stimulation augmente la capacité inhibitrice. Ce sont par ailleurs ces trois seules molécules qui inhibent le plus nettement la production de NO (**DF3**:  $50,9 \pm 4,9$  % de nitrites pour la condition 4, **DF4** :  $70,4 \pm 15,8$  % et **DF1** :  $80,3 \pm 2,8$  % mais  $62,4 \pm 2,4$  pour la condition 3) et qui ont fait l'objet de tests complémentaires. **DF5** et **DF9** pourraient présenter l'effet inverse et stimuler la production de NO. Il semblerait ainsi que **DF9** n'exerce pas le même effet en fonction du type

cellulaire, en effet sur neurones mésencéphaliques **DF9** entraîne une inhibition de la production de NO (Chen *et al.*, 2008).

### 2.2.4.3. Activité sur l'expression d'iNOS, NF-κB et de cytokines proinflammatoires (IL-1β, IL-6, TNF-α)

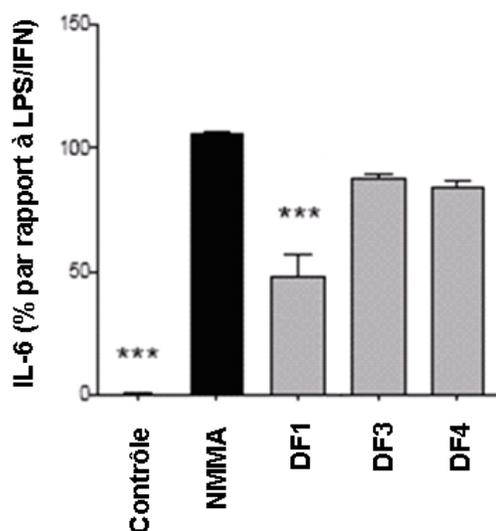


**Figure 91** : Expression des gènes de l'iNOS et du NF-κB, ainsi que des différentes cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) par RT-qPCR, après stimulation et traitement par les molécules de *D. ferruginea*. Les BV-2 sontensemencées à  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puit ; elles sont stimulées par LPS ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) et IFN $\gamma$  ( $50 \text{ UI}/\text{mL}$ ), les molécules sont déposées à la concentration de  $1 \mu\text{M}$  dans le délai qui correspond au maximum d'activité antiproduction de NO. Les résultats sont exprimés en facteur de modulation par rapport aux puits stimulés. Toutes les modulations d'un facteur supérieur à 2 ou inférieur à -2 (lignes horizontales) sont considérées comme significatives.

Les trois molécules retenues pour être testées sur ce modèle (**DF1**, **DF3** et **DF4**) entraînent une diminution de l'expression d'iNOS, nettement significative pour **DF1** et **DF3**. Les composés **DF3** et **DF4** inhibent l'expression de NF- $\kappa$ B de manière significative, alors que l'exposition à **DF1** n'entraîne qu'un effet modéré sur NF- $\kappa$ B.

Les composés **DF1**, **DF3** et **DF4** semblent présenter des influences différentes sur l'expression du profil cytokinique. On peut noter que **DF1** et **DF4** inhibent l'expression d'IL-1 $\beta$  (résultats significatifs) et de TFN- $\alpha$  (significatif pour **DF4**) et augmentent celle d'IL-6 (significatif pour **DF4**). Alors que **DF3** augmente l'expression d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 en diminuant celle de TFN- $\alpha$  (résultat significatif).

#### 2.2.4.4. Activité sur la libération d'IL-6 par les cellules stimulées par LPS/IFN- $\gamma$



**Figure 92** : Production d'IL-6 par les cellules BV-2 après stimulation et traitement par des molécules de *D. ferruginea*. Les BV-2 sontensemencées à  $1,5 \cdot 10^5$  cellules par puit ; elles sont stimulées par LPS 5  $\mu$ g/mL et IFN $\gamma$  50 UI/mL, les molécules sont déposées à la concentration de 1  $\mu$ M dans le délai qui correspond au maximum d'activité anti-production de NO. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'IL-6 dans le surnageant (en pg/mL), par rapport au puit stimulé. \*\*\* représente  $P < 0,001$  par rapport au puit LPS/IFN $\gamma$  (n = 3).

Les composés testés (**DF1**, **DF3** et **DF4**) semblent inhiber la libération d'IL-6 par les cellules stimulées, mais seule pour **DF1** cette diminution est significative ( $44,3 \pm 9,1\%$  d'inhibition).

### 2.2.5. *Potentiel antioxydant*

Le potentiel antioxydant a uniquement été évalué sur les flavanones prénylées **DF1-DF5** et sur l'isoflavonoïde prénylé **DF12**.

Pour les flavanones **DF1-DF5**, l'activité anti-radicalaire évaluée sur le test au DPPH est modérée pour les composés comportant plusieurs hydroxyles sur le cycle B (**DF2**, **DF3** et **DF5**) avec un potentiel antioxydant proche de celui de l'acide chlorogénique. Par contre, pour les composés comportant un seul hydroxyle sur le cycle B (**DF1** et **DF4**) le potentiel antioxydant est nul. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de la littérature à savoir que l'activité antiradicalaire est conditionnée par la présence d'une ortho-dihydroxylation sur le cycle B (Kale *et al.*, 2008 ; Rufer *et al.*, 2006). On peut noter que cette activité est également nulle pour la naringénine, flavanone non prénylée portant un seul hydroxyle sur le cycle B (**Tableau 7**). Il semble ainsi que la prénylation n'ait aucune influence sur le potentiel antioxydant.

Les composés présentant un potentiel antioxydant ont également été évalués sur le test ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) pour confirmation. Tous les composés sont modérément actifs sur ce modèle (moins actifs que l'acide chlorogénique).

Le composé **DF12** ne possède aucune propriété antiradicalaire sur le test au DPPH et possède un potentiel antioxydant (modèle ORAC) très modéré 0,52  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$  (référence acide chlorogénique : 4,03  $\mu\text{mol TE}/\mu\text{mol}$ ), la génistéine présente le même comportement sur les 2 tests utilisés. Il semble donc que dans ce cas également, une prénylation de type furane n'influe pas sur le potentiel antioxydant.

### 2.2.6. *Activité sur la formation des produits terminaux de glycation*

Les composés testés sont des flavanones prénylées (**DF1**, **DF2**, **DF3**, **DF4**, **DF5** et **DF6**), des isoflavonoïdes (**DF11** et **DF8**), un dérivé de l'acide cinnamique (**DF14**), un stilbène (**DF15**), un triterpène (**DF16**).

Les flavanones prénylées testées inhibent toutes de manière significative la formation des produits terminaux de glycation (Advanced Glycation Endproducts=AGEs), en particulier **DF1** avec une  $\text{CI}_{50}=0,54$  mM (aminoguanidine,  $\text{CI}_{50}=10$  mM). Ces résultats, comparés à ceux obtenus vis-à-vis du potentiel antioxydant laisse entrevoir un mécanisme d'action des composés indépendant de ce dernier, qu'il serait intéressant de mettre en

évidence. De plus, **DF1**, molécule ne présentant pas de toxicité vis-à-vis des cellules saines MRC-5 a fait l'objet d'une évaluation préliminaire sur un modèle d'angiogénèse.

L'activité de **DF12** sur la formation des AGEs n'a pu être clairement déterminée en raison d'un phénomène de quenching.

Les autres molécules inhibent également de manière significative la formation des AGEs (**Tableau 7**), en particulier une autre flavanone prénylée **DF6**, néanmoins ces molécules en faible quantité n'ont pas toutes été testées pour leur activité antioxydante. On note pour le composé **DF12** un phénomène de quenching, qui rend difficilement interprétable le résultat obtenu.

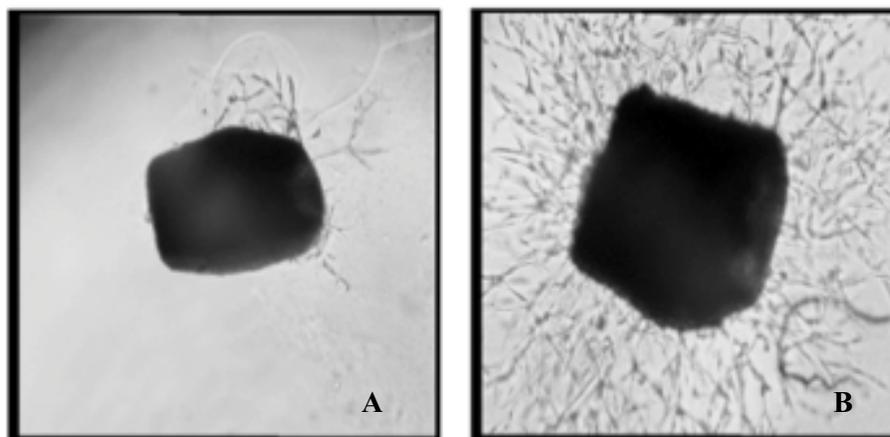
**Tableau 7** : Potentiel antioxydant et activité sur la formation des AGEs des composés testés

<b>Composés</b>	<b>DPPH en <math>\mu\text{mol}</math> TE/<math>\mu\text{mol}</math> (acide chlorogénique 1,04)</b>	<b>ORAC en <math>\mu\text{mol}</math> TE/<math>\mu\text{mol}</math> (acide chlorogénique 4,07)</b>	<b>AGEs en mM (aminoguanidine 5<math>\pm</math>3)</b>
<b>DF1</b>	0	0	<b>0,54</b>
<b>DF2</b>	0,36	0,58	1,0
<b>DF3</b>	0,91	1,25	1,9
<b>DF4</b>	0,04	1,77	1,3
<b>DF5</b>	0,99	1,12	1,4
<b>DF6</b>	N.D.	N.D.	<b>0,68</b>
<b>DF11</b>	N.D.	N.D.	1, 0
<b>DF12</b>	0	0,52	<b>0,37</b>
<b>DF14</b>	N.D.	N.D.	2,2.
<b>DF15</b>	N.D.	N.D.	2,1
<b>DF16</b>	N.D.	N.D.	2,2
<b>Naringénine</b> *	0	N.D.	2,0
<b>Génistéine</b> *	0,05	N.D.	3.0

\* molécules commerciales testées précédemment par le laboratoire (Derbre *et al.*, 2009). N.D. : Non déterminé

### 2.2.7. *Activité de DF1 sur l'angiogénèse*

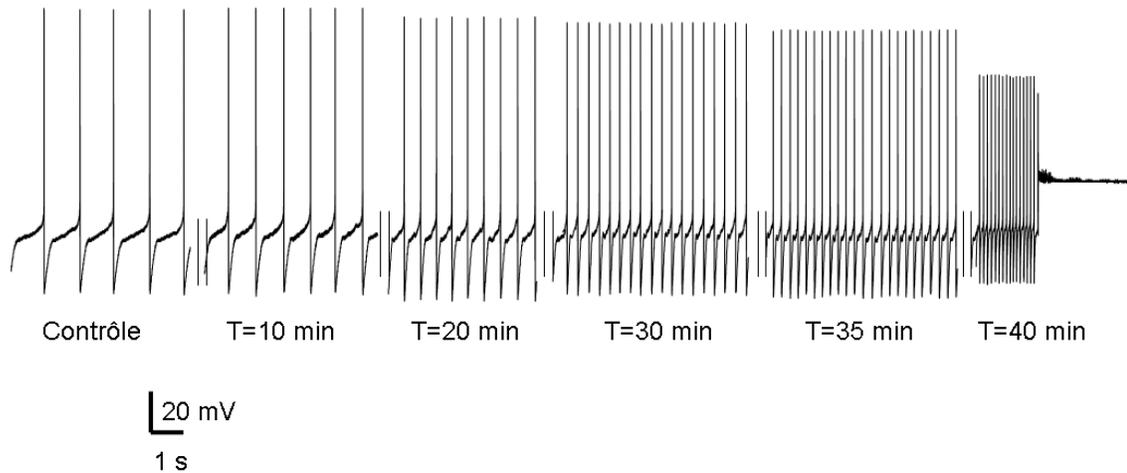
Cette évaluation *ex vivo* a été réalisée au laboratoire de biologie neuro-vasculaire intégrée (UMR-CNRS 6214 INSERM U771, Angers). Seule la cajanflavanone (**DF1**) a été évaluée sur ce modèle. Comme indiqué sur la **figure 93**, la cajanflavanone stimule la néo-angiogénèse autour de l'anneau aortique (valeur attribuée : 2,5), ce composé présente donc un potentiel vasoprotecteur intéressant, qui demanderait une évaluation plus poussée de son mécanisme d'action.



**Figure 93** : Evaluation de **DF1** sur l'angiogénèse (sur anneau aortique de souris). **A** : témoin, Solvant + SVF 10%, **B** : **DF1**  $10^{-6}$  M + SVF 10%.

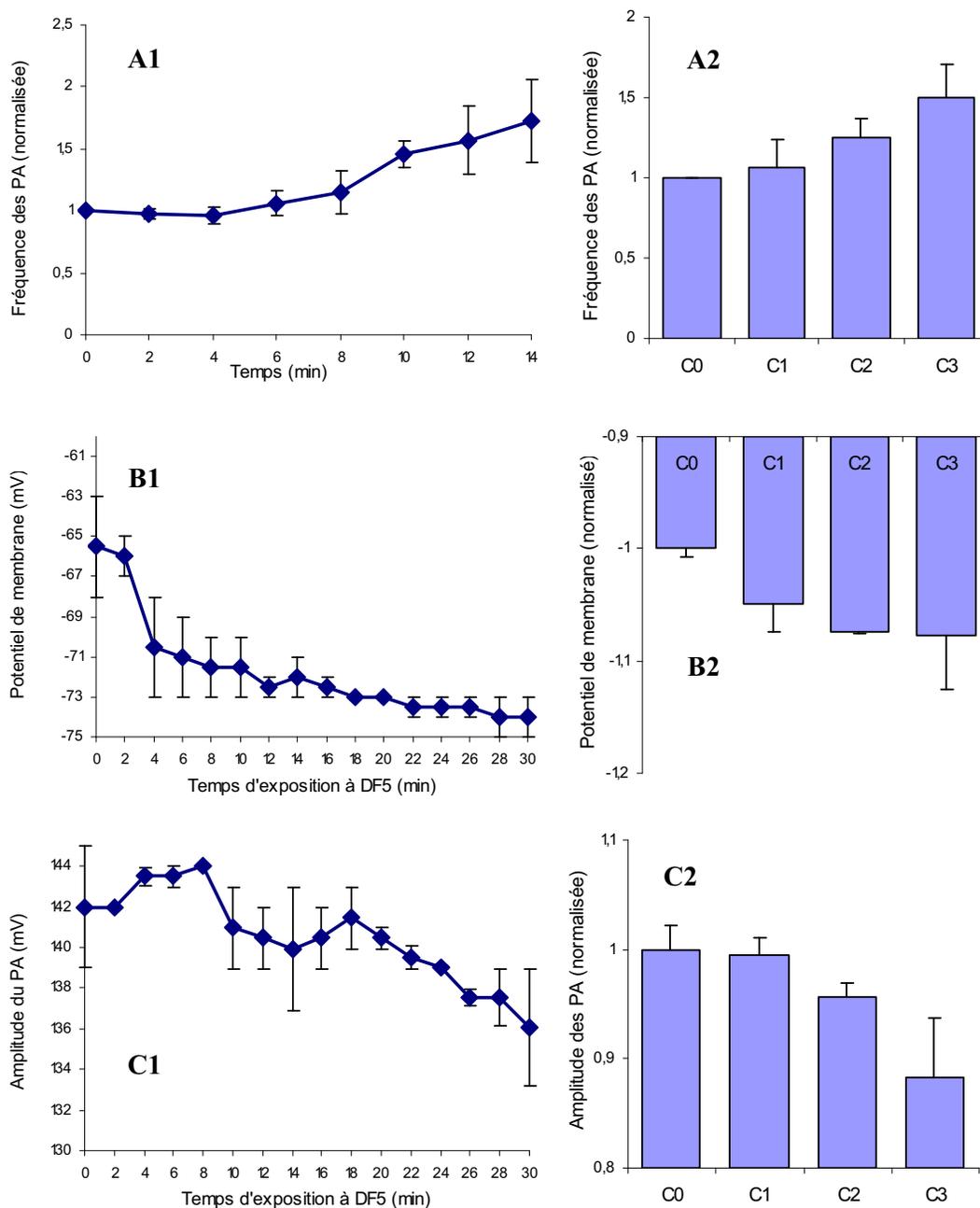
### 2.2.8. *Etude préliminaire de l'effet du composé DF5 sur l'activité électrique du DUM neurone*

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire RCIM (Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647 USC INRA 2023 de l'Université d'Angers). Seule une molécule (**DF5**) obtenue en quantité importante et suffisante a fait l'objet d'une étude sur ce modèle biologique. Cette molécule présente, de plus, une activité antiparasitaire significative corrélée à une toxicité générale, qui laisse envisager la possibilité d'une activité insecticide. La superfusion du composé **DF5** sur un corps cellulaire de DUM neurone à une concentration de  $10^{-6}$  M augmente la fréquence de décharge des potentiels d'action avec un léger effet sur l'amplitude du potentiel d'action. L'enregistrement a été réalisé jusqu'à obtenir la disparition totale des potentiels d'action par dépolarisation (**Figure 94**).



**Figure 94:** Enregistrement de l'activité électrique spontanée d'un DUM neurone isolé à  $t=0$  min (contrôle) et après application par le bain de  $10^{-6}$  mol/L du composé **DF5**, jusqu'à la mort neuronale.

L'application du composé **DF5** provoque une augmentation dose-dépendante de la fréquence de décharge des potentiels d'action. Cette augmentation est assez rapide et se produit de façon continue, en présence du composé **DF5** (**Figure 95**, A1 et A2). De plus, le composé **DF5** induit une hyperpolarisation du potentiel de membrane (de 10 mV en 30 min), ainsi qu'une diminution de l'amplitude du potentiel d'action des DUM neurones (**Figure 95**, B1 et C1). Les effets observés sur la diminution de l'amplitude des potentiels d'action et l'hyperpolarisation du potentiel de membrane sont également dépendants de la concentration testée du composé **DF5** (**Figure 95**, B2 et C2). Il est à noter que les fréquences de décharge des potentiels d'action ainsi que les amplitudes des potentiels d'action et des potentiels de membrane enregistrés en condition contrôle ou en présence de composé varient d'une cellule à l'autre, ce qui justifie la normalisation des valeurs obtenues pour faciliter l'analyse comparative.



**Figure 95** : effets du composé **DF5** sur l'activité électrique spontanée DUM neurones de *P. americana*

**A** : Représentation graphique illustrant la fréquence de décharge des potentiels d'action en fonction du temps d'application du composé **DF5** ( $10^6$  M). Les valeurs sont normalisées par rapport à la moyenne de la fréquence à  $t=0$  min ( $n=3$ ). **B** : Représentation graphique de la fréquence de décharge des potentiels d'action en fonction de différentes concentrations du composé **DF5** appliquées ( $C1=10^6$ ,  $C2=10^5$ ,  $C3=10^4$  mol/L). Les valeurs sont données à un temps d'exposition du composé de 10 min. La fréquence de décharge des potentiels d'action de base ( $t=0$ ) est normalisée ( $n=2$ ). **C** : Evolution du potentiel de membrane (PM) en fonction du temps d'exposition du composé **DF5** ( $10^6$  M). Les valeurs sont normalisées par rapport à la moyenne du PM à  $t=0$  min ( $n=3$ ). **D** : Représentation graphique de l'évolution du PM en fonction de la concentration de **DF5** superfusée. Les valeurs sont données à un temps d'exposition du composé de 10 min et sont normalisées par rapport à la moyenne du PM à  $t=0$  ( $n=2$ ). **E** : Evolution de l'amplitude des potentiels d'action en fonction du temps d'application du composé **DF5** ( $10^6$  M). Les valeurs sont normalisées par rapport à l'amplitude contrôle mesurée à  $t=0$  min, ( $n=3$ ). **F** : Représentation graphique de l'amplitude des potentiels d'action en fonction de différentes concentrations de composé **DF5**. Les valeurs sont données à un temps d'exposition du composé de 10 min. L'amplitude contrôle des potentiels d'action ( $t=0$ ) est normalisée ( $n=2$ ).

Compte tenu des résultats obtenus, il est possible d'envisager que le composé **DF5** présente un effet neurotoxique par une action sur différentes cibles. A ce stade de l'étude, il est difficile de préciser les cibles affectées par le composé **DF5**. Néanmoins, l'augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action associés à une hyperpolarisation membranaire et une réduction de l'amplitude des potentiels d'action laisse envisager un effet sur la concentration en calcium intracellulaire et sur les canaux sodium de base connus pour constituer des cibles atypiques de certaines toxines d'arthropodes et des insecticides appartenant à la famille des oxadiazines (Lapied *et al.*, 1999 ; Lapied *et al.*, 2001). Il serait donc intéressant de poursuivre cette étude préliminaire dans des conditions de potentiel imposé sur les différents canaux ioniques impliqués dans les effets observés puisqu'il a été montré que certains flavonoïdes comme une flavanone, la pinostrobine sont connus pour inhiber les canaux sodiques sur synaptoneurosomes du rat (Scholz *et al.*, 2010 ; Nicholson *et al.*, 2010).

A partir des informations données par la littérature, il serait intéressant de comparer les effets observés dans le cadre de cette étude préliminaire à ceux obtenus par la roténone. Bien qu'aucune étude n'ait été réalisée sur les effets de la roténone sur les DUM neurones de *P. americana*, un nombre important d'études sur les effets de la roténone a été sur d'autres modèles neuronaux, en particulier murins. La roténone en agissant au niveau mitochondrial entraîne indirectement l'ouverture de canaux potassium dépendants de l'ATP intracellulaire ( $K_{ATP}$ ) des cellules pyramidales de type CA1, sur interneurones de l'hippocampe de rats et sur neurones mésencéphaliques (Gao *et al.*, 2008 ; Zawar *et al.*, 2000), provoquant une hyperpolarisation et une perte de l'activité électrique. La roténone entraîne également une diminution dose-dépendante et irréversible de l'amplitude du potentiel corticostriatal avec dépolarisation membranaire chez le rat (Costa *et al.*, 2008). On peut également rappeler que le diméthylsulfide (DMDS) agit comme insecticide par inhibition du complexe IV mitochondrial ce qui engendre une diminution de l'ATP intracellulaire qui permet l'activation des canaux  $K_{ATP}$  qui se manifeste au niveau électrophysiologique par une hyperpolarisation membranaire et une diminution de l'activité neuronale (Dugravot *et al.*, 2003). La roténone en agissant également sur la chaîne mitochondriale (complexe I) possède certainement les mêmes effets que le DMDS sur DUM neurones de *P. americana* c'est-à-dire une hyperpolarisation membranaire et une perte de l'activité pacemaker. L'effet de **DF5** sur le potentiel de membrane pourrait être également à relier à une perturbation du courant résiduel  $IK_{ATP}$  consécutive à une

inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, aujourd'hui toutes ces hypothèses demandent à être vérifiées

### 2.3. Bilan de l'évaluation biologique

Une évaluation biologique étendue a été réalisée, d'une part, sur les extraits des tiges et des feuilles de *Derris ferruginea* et d'autre part, sur un certain nombre de composés isolés.

En ce qui concerne l'activité antiparasitaire, deux extraits de feuilles (DfL1 et DfL2) sont particulièrement actifs que ce soit sur *Plasmodium falciparum* ou sur *Leishmania major*. Les flavanones prénylées issues de DfL1 présentent toutes une activité antiparasitaire, en particulier le 6,8-diprénylériodictyol (**DF5**), composé majoritaire (98,25 % d'inhibition de croissance de *P. falciparum* et  $CI_{50}$  sur *L. major* de 3,7  $\mu\text{g/mL}$ ). La présence de ce composé explique en grande partie l'activité des extraits DfL1 et DfL2. Il semble que la présence de groupes phénols en 3' et 4' (cycle B) soit favorable à l'activité antiparasitaire. En effet, on remarque que le composé **DF2** (6-prényl-7,8-(2''',2'''-diméthylpyrano)-5,3',4'-trihydroxyflavanone) est plus actif que la cajanflavanone **DF1**, néanmoins aucune différence d'activité n'est observée entre les composés **DF4** (lonchocarpol A) et **DF5**. On peut ainsi supposer que la position et le type de prénylation sont importants pour cette activité puisqu'il semblerait en effet qu'une prénylation de type pyrane en position 6,7 diminue l'activité par rapport à une prénylation de type 3,3-DMA (**DF1** et **DF2** sont moins actives que les autres composés). Pour confirmer cette hypothèse, l'analyse d'un nombre plus important de dérivés de cette série, notamment de dérivés monoprénylés, serait nécessaire. Les composés **DF12** et **DF15** ne possèdent aucune activité sur les deux souches testées.

Les extraits se sont montrés peu toxiques vis-à-vis de la lignée de cellules saines MRC-5, à l'exception de DfL1 qui entraîne une forte inhibition de la croissance cellulaire. Les flavanones prénylées pour la plupart issues de cet extrait (**DF2-DF5**) sont d'ailleurs toutes considérées comme toxiques sur ce modèle. Ces résultats sont en accord avec ce qui a déjà été observé en série isoflavonoïde *i. e.* une prénylation augmente l'activité cytotoxique (sur cellules de mélanome B16) celle-ci étant fonction du nombre de prénylations (Arung *et al.*, 2010). Cependant il ne s'agissait dans l'étude citée que de prénylations linéaires de type 3,3-DMA.

On peut également noter que **DF1** (issu de DfL1) n'entraîne aucune toxicité sur MRC-5. Ceci laisse supposer que le nombre de phénols ainsi que la position et le type de prénylations conditionnent cette différence d'activité comme il a été suggéré pour l'activité antiparasitaire. En effet, il semble qu'une prénylation cyclique en position 7,8 (cas de **DF1** et **DF2**) entraîne une cytotoxicité moins importante qu'en position 6,7 (**DF3**, dorsmanine I). De plus, il apparaît que les composés comportant deux groupements phénols sur le cycle B (en 3' et 4') sont plus toxiques que leurs équivalents monohydroxylés (**DF2** apparaît plus toxique que **DF1** et **DF5** eux-mêmes plus actifs que **DF4**). Ce seraient donc les mêmes éléments structuraux qui influent à la fois sur l'activité antiparasitaire et sur la cytotoxicité. Corrélativement, l'activité antiparasitaire observée s'expliquerait par une toxicité peu sélective de ces molécules. Des modifications structurales pourraient être suggérées pour améliorer la sélectivité de ces molécules vis à vis des parasites tels que *P. falciparum* et *L. major*.

La toxicité évaluée sur d'autres modèles (*Artemia salina*, cellules microgliales) n'est pas totalement corrélée à celle observée sur MRC-5. Ceci confirme qu'une toxicité observée ne l'est que relativement au modèle utilisé.

L'évaluation des extraits et de différents composés sur cellules microgliales permet de dégager un certain nombre d'observations. Les extraits DFS2 et DFS3 entraînent une inhibition de la production de NO, en inhibant l'expression des cytokines proinflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-6. Ces deux extraits présentent toutefois un comportement différent. En effet, l'action de Dfs2 est maximale quand l'extrait est administré après stimulation (effet « curatif »), alors que celle de Dfs3 est maximale quand l'extrait est introduit avant stimulation des cellules (effet « préventif »). Les flavanones prénylées testées (**DF1-DF5**) présentent des différences d'activités qu'il est difficile de relier avec des éléments structuraux. Il est important de noter que les composés ont été testés à des concentrations faibles (1 $\mu$ M), en raison de leur toxicité sur le modèle utilisé. Ainsi certaines activités n'ont peut-être pas été mises en évidence. Toutefois, les composés **DF1**, **DF3** et **DF4** inhibent la production de NO, avec un délai d'activité entre la stimulation par LPS/IFN $\gamma$  et l'introduction de la molécule testée variable selon la molécule. Ces trois composés présentent également des comportements différents sur l'expression des cytokines puisque s'ils semblent inhiber la libération d'IL-6 par les cellules, cette inhibition est uniquement significative pour **DF1**. La encore, des études complémentaires avec un nombre plus important de flavanones (non-prénylées comme la naringénine,

mono-prénylées ou bi-prénylées) seraient nécessaires pour définir des relations structures-activités.

Pour ce qui est de l'activité antioxydante, conformément à ce qui était déjà décrit, les flavanones sont peu actives. De plus, le nombre d'hydroxyles est l'élément structural qui détermine la capacité des composés à piéger le radical DPPH, comme cela est classiquement observé pour un certain nombre de composés (Halbwirth, 2010 ; Kale *et al.*, 2008 ; Mladinka *et al.*, 2010 ; Rufer *et al.*, 2006). En effet, parmi les flavanones testées, celles qui ne sont porteuses que d'un seul hydroxyle sont aussi les moins actives. Dans le cas de la capacité antioxydante évaluée sur le modèle ORAC, il est nettement plus délicat de mettre en évidence des relations de structure activité. La prénylation influe peu sur le potentiel antioxydant, en effet aucune variation d'activité n'est observée entre les composés prénylés et leur analogue non prénylé (naringénine), ce qui a déjà été observé sur d'autres modèles (Stevens, *et al.*, 2000).

Tous les extraits inhibent la glycation des protéines (AGEs), cependant la purification des extraits les plus actifs n'a pas permis d'obtenir des composés possédant une activité comparable, ce qui laisse supposer que des molécules non isolées possèdent certainement une forte activité sur AGEs ou bien que les composés agissent en synergie dans les extraits. Les extraits les plus actifs sont DfS2 et DfL2 (respectivement  $CI_{50}=0,068$  mg/mL et 0,055 mg/mL), la seule molécule testée issue à la fois de ces deux extraits est **DF15** (stilbène) qui possède une activité modérée sur la formation des AGEs ( $CI_{50}=2,1.10^{-3}$  M soit 0,54 mg/mL). Le composé **DF5** est également présent en grande quantité dans l'extrait DfL2 et pourrait expliquer une partie de l'activité de l'extrait ( $CI_{50}=1,4$  mM soit 0,30 mg/mL). Néanmoins, l'activité marquée des extraits ne peut être attribuée à la présence de ce seul composé, d'autres molécules non isolées (ou non testées) doivent être responsable des valeurs d'activité importante de ces deux extraits. Il serait intéressant d'effectuer une séparation bioguidée de ces extraits pour mettre en évidence les composés responsables de cette activité. En ce qui concerne les flavanones prénylées testées, étant donné leurs valeurs de  $CI_{50}$  relativement proches, il est très délicat d'en déduire des éléments de relations structure-activité. Toutefois, il semble que ni le type ni la position ne semble perturber l'activité mesurée. En effet, aucune différence n'est observée entre les flavanones prénylées et la naringénine (flavanone non prénylée). D'après Matsuda *et al.*, (2003), la présence de phénols en 3', 4', 5 et 7 augmente l'activité anti-AGEs mais les résultats obtenus ici ne permettent pas de confirmer ces observations. On peut uniquement noter que **DF1** et **DF6** sont les composés les plus actifs.

Ainsi, la cajanflavanone (**DF1**) se distingue particulièrement des autres composés, par son absence de toxicité sur différents modèles et par des activités biologiques significatives. Ce composé présente une intéressante activité inhibitrice de la formation des AGEs ( $CI_{50}=0,54$  mM, aminoguanidine :  $5\pm 3$  mM), malgré une absence d'effet antioxydant. De plus, la cajanflavanone entraîne une inhibition nette de la production de NO par les cellules microgliales (diminution de  $80,3 \pm 2,8$  % de nitrites dans le milieu). Cette molécule inhibe également l'expression d'iNOS, NF- $\kappa$ B et des cytokines proinflammatoires (en particulier IL-1 $\beta$  et l'IL-6). Par ailleurs, elle inhibe de manière significative la libération de l'IL-6 par les cellules stimulées par LPS/IFN ( $44,3 \pm 9,1$  % d'inhibition). Enfin, la cajanflavanone possède une activité pro-angiogénique *ex vivo*.

D'autre part, une des flavanones, **DF5**, isolée en grande quantité et malgré sa toxicité sur MRC-5, va faire l'objet de tests *in vitro* et *in vivo* complémentaires en vue d'évaluer son potentiel rôle bénéfique sur la fonction endothéliale. En effet, l'activité des flavonoïdes sur la formation des AGEs est généralement reliée à leur potentiel antioxydant (Matsuda *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005), tandis que les résultats présentés ici laissent supposer un type différent d'action qu'il sera intéressant de mettre en évidence. Plusieurs mécanismes peuvent en effet être impliqués dans l'inhibition de la formation des AGEs qu'il s'agisse de la chélation des ions métalliques divalents (Jomova *et al.*, 2010), d'une liaison aux composés (di-) carbonylés (Pashikanti *et al.*, 2010) ou bien encore d'une réaction avec les groupements aminés.

En ce qui concerne le composé majoritaire des feuilles, **DF5**, une étude préliminaire de son effet insecticide potentiel a été entreprise. Ce composé est toxique sur cellules MRC5, antiparasitaire et, de plus, l'utilisation répertoriée des feuilles et des racines de *D. ferruginea* comme insecticide, poison de pêche et contre les ectoparasites (Lamba, 1970), laisse supposer une activité dans ce sens de cette molécule. L'étude correspondante a été réalisée sur un modèle électrophysiologique : les DUM neurones de *Periplaneta Americana*. Cette analyse a permis d'obtenir des résultats préliminaires intéressants. En effet, **DF5** augmente la fréquence de décharge des PA, en entraînant une hyperpolarisation du potentiel de membrane et une diminution de l'amplitude des PA. Ces observations permettent d'émettre l'hypothèse d'une interaction de la molécule avec différents canaux ioniques. Une étude en potentiel imposé sur canaux ioniques (en particulier sur canaux sodiques) permettrait alors de confirmer cette hypothèse. Peu d'études concernent le mécanisme d'action des composés insecticides isolés des plantes, en général les flavonoïdes décrits comme insecticides sont directement évalués sur animaux, sans étude

de leur mécanisme d'action. L'avantage de cette technique électrophysiologique est qu'elle permet d'entrevoir le mécanisme d'action impliqué, même si cette technique n'est pas facilement abordable et longue donc difficilement transposable dans le cadre d'un criblage biologique. Il serait également utile de tester l'extrait dichlorométhanique des feuilles (dont est issu le composé **DF5**), ou un extrait moins spécifique (éthanolique). En effet, des extraits alcooliques de roténone ont longtemps été utilisés comme insecticides ou contre les ectoparasites. On pourrait envisager une utilisation d'un extrait de feuilles de *D. ferruginea* riche en composé **DF5**, qui aurait l'avantage d'être plus accessible qu'un extrait obtenu à base des racines. Evidemment une étude plus précise de son mécanisme d'action et de sa toxicité sera également nécessaire.

### 3. Conclusion générale

Ce travail avait pour but de caractériser chimiquement l'espèce *Derris ferruginea* et d'évaluer l'activité biologique de ces extraits et des composés isolés.

Du point de vue botanique, cette espèce apparaît très proche de *D. elliptica*, elle a d'ailleurs été très longtemps confondue avec celle-ci (Krishnan *et al.*, 1938). Même si souvent la description macroscopique permet d'identifier sans problème une espèce, il nous est apparu intéressant d'étudier les poudres des feuilles, des fruits et des tiges de cette espèce du point de vue microscopique, afin d'apporter des éléments complémentaires d'identification de l'espèce *D. ferruginea*.

A la suite de l'étude phytochimique d'extraits de tiges et de feuilles, sur dix-sept composés isolés, quatorze composés ont été isolés. Il s'agit de flavanones prénylées décrites pour la première fois dans le genre (dont une jamais répertoriée) et d'isoflavonoïdes dont une isoflavone prénylée de structure originale.

Trois molécules isolées apparaissent de plus intéressantes d'un point de vue pharmacologique. En premier lieu la cajaflavanone **DF1** a été purifiée à partir de l'extrait cyclohexanique des tiges par FCPC, ce qui a permis d'obtenir ce composé en une seule étape, et en quantité suffisante pour mener une évaluation biologique étendue. Ce composé se distingue des autres flavanones prénylées par son absence de toxicité sur les cellules MRC5. Il montre une activité intéressante sur un modèle neuro-inflammatoire et inhibe la formation des AGEs par un mécanisme non antioxydatif. Enfin, la cajaflavanone possède un effet proangiogénique *ex vivo*.

L'hémisynthèse du composé original **DF12**, présent en faible quantité dans les extraits de tiges de *D. ferruginea*, a par ailleurs été entreprise à partir de la génistéine. Ces travaux ont permis de valider la structure proposée mais malheureusement sans obtenir **DF12** en quantité et en pureté suffisante pour une évaluation biologique élargie. Néanmoins, ce composé s'est avéré non toxique sur cellule KB. Il ne possède pas d'activité antiparasitaire vis-à-vis de *L. major*. Par contre son éventuelle activité anti-AGEs n'a pu être clairement déterminée. En raison d'une nette extinction de la fluorescence (quenching) mesurée qui rend très difficile l'interprétation des résultats obtenus.

Le composé majoritaire des feuilles de *Derris ferruginea*, **DF5** (6,8-diprénylériodictyol) a fait l'objet d'une étude préliminaire sur un modèle électrophysiologique de l'activité insecticide. Ce travail suggère que ce composé agirait sur

certaines canaux ioniques. Le potentiel bénéfique de cette molécule vis-à-vis de la fonction endothéliale sera par ailleurs évalué ultérieurement.

En conclusion, il apparaît au vu de ce travail, que la plupart des activités des molécules évaluées ici semblent être influencées par la présence de prénylations et d'hydroxyles. Le type et la position des prénylations sont déterminants dans l'observation ou non des effets escomptés, tout comme le nombre d'hydroxyles. Il serait donc intéressant d'obtenir un nombre plus important de flavanones prénylées de structures variées, en particulier de flavanones de type furane. La synthèse de certaines d'entre elles pourrait être possible en utilisant la stratégie développée lors de la synthèse du composé **DF12**, avec par exemple la naringénine ou le composé **DF5** (en quantité importante) comme composé de départ.

Les flavanones ont été isolées sous forme d'un mélange racémique, il pourrait être utile d'étudier s'il existe des différences d'activités entre les différents isomères.

Aucun roténoïde n'a été isolé durant ce travail, ce qui soulève un problème difficile à appréhender. En effet, on peut s'interroger sur la présence ou non de deux variétés de cette espèce, comme le suggérait déjà Subba Rao en 1946 (Subba Rao *et al.*, 1946) en fonction de la composition en roténoïdes. Pour répondre à cette question, il aurait été utile d'étudier les racines de cette plante récoltée au même endroit.

Enfin, une étude concernant la purification de composés azotés a été entreprise sur les feuilles de *D. ferruginea* au laboratoire. En effet ce type de composés décrits dans certaines espèces de *Derris* nous apparaît intéressant pour leurs activités biologiques potentielles, notamment en raison de leur analogie structurale avec certains acides aminés. Par ailleurs, les fruits de *D. ferruginea* font actuellement l'objet d'un travail au laboratoire qui permettra de compléter la caractérisation chimique et biologique de cette espèce.

## **PARTIE III :**

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## 1. Matériel végétal

*Derris ferruginea*. (Roxburg) Bentham a été récoltée à Ha Tinh (Huong Son) au Viêt-nam, et a été identifiée par le Dr NGUYEN TIEN HIEP du « Hanoï National Herbarium » à Hanoï, département des ressources écologiques et biologiques le 09/10/1998. Nous disposons de 1 200 g de tiges et de 1 600 g de feuilles sèches et broyées. Un spécimen est déposé à l'Herbarium National d'Hanoï, sous le numéro de lot VN-0452 (Figure 2).

## 2. Méthodes de fractionnement et de purification

### 2.1. Extraction

Les tiges et les feuilles séchées ont été broyées, puis extraites en utilisant successivement des solvants de polarité croissante : cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol, dans un Soxhlet (8L, 72 h). Les extraits obtenus ont été évaporés à sec par évaporateur rotatif.

### 2.2. Chromatographie Liquide Moyenne Pression (CLMP)

Les CLMP sont réalisées sur une colonne de taille : 7 x 45 cm, remplie avec 550 g de gel de silice (Silicagel Ultrapure, 40-60  $\mu\text{m}$ , 60 Å, Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France).

L'appareillage est composé d'un réservoir de phase mobile et d'une pompe Büchi 688 (pression max 40 bars).

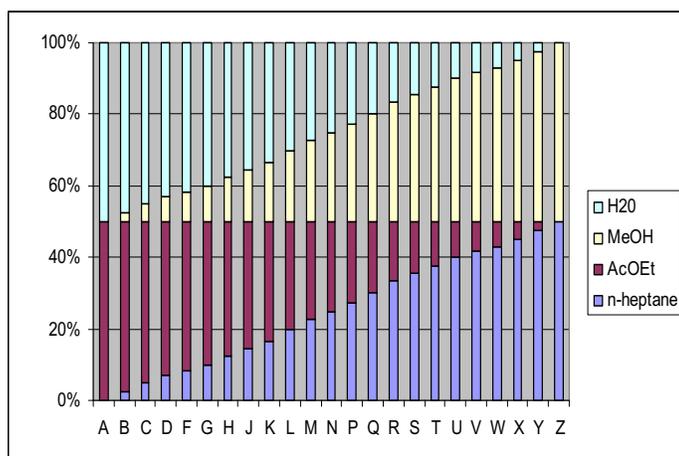
### 2.3. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

La chromatographie de partage centrifuge repose sur la partition d'un échantillon entre deux phases liquides non miscibles. L'une des deux phases constitue la phase stationnaire et la seconde la phase mobile. La phase stationnaire est maintenue dans un

rotor grâce à la force centrifuge. La phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire, soit en mode ascendant, si la phase mobile a une densité plus faible que la phase stationnaire, soit en mode descendant si la phase mobile est plus dense que la phase stationnaire. Les systèmes biphasiques utilisés sont constitués de mélanges binaire, ternaire ou quaternaire de solvants. Ces systèmes peuvent être choisis dans la gamme dite Arizona (Tableau II), heptane/AcOEt/MeOH/eau (H/E/M/W) (Berthod *et al.*, 2005), ou en fonction du meilleur solvant de solubilisation de l'extrait de l'échantillon (Foucault, 1994).

**Tableau 8** : Composition des systèmes de la gamme Arizona, d'après Berthod *et al.*(2005)

Système	H	E	M	W
A	0	1	0	1
B	1	19	1	19
C	1	9	1	9
D	1	6	1	6
F	1	5	1	5
G	1	4	1	4
H	1	3	1	3
J	2	5	2	5
K	1	2	1	2
L	2	3	2	3
M	5	6	5	6
N	1	1	1	1
P	6	5	6	5
Q	3	2	3	2
R	2	1	2	1
S	5	2	5	2
T	3	1	3	1
U	4	1	4	1
V	5	1	5	1
W	6	1	6	1
X	9	1	9	1
Y	19	1	19	1
Z	1	0	1	0



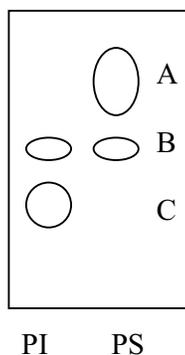
**Figure 96** : représentation de la gamme Arizona, d'après (Berthod *et al.*, 2005)

Le choix du système de solvants est primordial pour obtenir une bonne séparation. Pour qu'un système de solvants permette une bonne séparation, il faut que le(s) composé(s) à isoler possède(nt) la même affinité pour l'une et l'autre des 2 phases, c'est-à-dire que le coefficient de partage, noté  $K$ , soit proche de 1 (entre 0,8 et 1,2).  $K$  correspond au rapport des concentrations du (des) composé(s)  $x$  dans les deux phases constituant le système :

$$K = \frac{[x] \text{ phase sup}}{[x] \text{ phase inf}}$$

Le coefficient de partage peut être évalué par CCM. Pour cela, une quantité de l'échantillon à séparer est solubilisé dans un mélange 1/1 (v/v) de phase supérieure et de phase inférieure. Un même volume de chacune des phases est déposé sur plaque CCM et

chromatographié. Le système correspond aux critères si chaque molécule est retrouvée avec la même densité dans les 2 phases (Hostettmann *et al.*, 1998).



Pour A,  $K < 1$ , la molécule se trouve uniquement dans la phase supérieure (PS), ce système n'est donc pas adapté pour ce produit  
 Pour C,  $K > 1$ , le système n'est pas adapté, C uniquement dans la phase inférieure (PI).  
 Pour B,  $K = 1$ , la molécule se partage entre les 2 phases.

L'optimisation du système de solvant par CCM est rapide et peu chère. Néanmoins, pour une détermination précise de  $K$ , une analyse des 2 phases par CLHP après solubilisation de l'échantillon peut-être réalisée.  $K$  est déterminé par le rapport des aires sous courbes (A) du composé d'intérêt dans les 2 phases du système à une certaine longueur d'onde :  $K = A_{\text{phase sup}} / A_{\text{phase inf}}$ .

La phase stationnaire choisie est pompée dans le rotor jusqu'à remplissage de celui-ci, puis la phase mobile est à son tour pompée jusqu'à équilibration du système, c'est-à-dire jusqu'à ce que seule la phase mobile sorte du rotor. Le pourcentage de rétention de la phase stationnaire dans le rotor est calculé et représente un facteur important pour la qualité de la séparation (ce facteur dépend du système de solvant et doit se rapprocher de 100%). Cette technique présente de nombreux avantages : pas d'adsorption de l'échantillon sur la phase stationnaire, récupération de la totalité de l'échantillon, risque très faible de décomposition de l'échantillon, consommation faible en solvants (Marston, 2007).

Ce type de chromatographie a été utilisé pour préfractionner certains extraits ou en purification. Les séparations ont été réalisées sur une FCPC 200 (Figure X) (pour Fast Centrifugal Partition Chromatography, Kromaton, Angers, France) avec un rotor soit de 275 mL, soit 1L. Une valve permet de travailler en mode ascendant ou descendant. Le système est équipé d'une



pompe à gradient, un détecteur UV/visible, un injecteur muni d'une boucle de 10 mL, et un collecteur (Kromaton). Sur le rotor de 1L, les injections ont été faites directement sur la voie du solvant.

## **2.4. Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CO)**

Les colonnes ouvertes utilisées sont de différentes tailles et permettent des séparations soit par adsorption : gel de silice (Silicagel Ultrapure, 40-60  $\mu\text{m}$ , 60 Å, Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France), soit par phénomène d'exclusion stérique : gel de Séphadex LH-20 (Lipophilic Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France).

## **2.5. Chromatographie sur colonne Flash**

Cette technique est réalisée sur un système de chromatographie Flash Varian IntelliFlash-310 (Varian S.A. Varian Analytical Instruments, 7, avenue des Tropiques Z.A. Courtaboeuf, B.P. 12-91941 LES ULIS Cedex) composé :

- d'une pompe gradient binaire,
- d'une station colonne munie d'un système d'introduction DASi
- d'un détecteur UV multi-longueurs d'onde
- d'un collecteur de fraction

L'ensemble est piloté par le logiciel IntelliFlash.

Le module DASi est composé d'un pousse-seringue et, soit d'une seringue remplie manuellement avec de la silice pour les échantillons sous forme solide, soit d'une seringue pré-remplie de phase stationnaire pour l'introduction d'échantillon sous forme liquide, soit d'une seringue vide avec fritté pour les échantillons liquides visqueux. Les phases stationnaires dont nous disposons sont prépackées en colonnes de différentes tailles, il s'agit soit de colonne de silice ou de phase inverse C18.

Deux types de colonnes ont été utilisées lors de ce travail : Colonne SuperFlash SF-10-4g, Si 50  $\mu\text{m}$  (Analogix) et SuperFlash SF25-40g, Si 35  $\mu\text{m}$  (Analogix).

## 2.6. Chromatographie Liquide Haute Performance Préparative (CLHP préparative)

Les dernières étapes de purification sont souvent réalisées à l'aide d'une CLHP préparative. Il s'agit d'une chaîne Varian (Varian S.A. Varian Analytical Instruments, 7, avenue des Tropiques Z.A. Courtaboeuf, B.P. 12-91941 LES ULIS Cedex) équipée :

- d'un détecteur UV visible ProStar 325
- d'une pompe binaire PrepStar 218 (injection manuelle, vanne et boucle de 10 mL Rhéodyne)
- d'un collecteur de fractions ProStar 701

L'ensemble est piloté par le logiciel ProStar/Dynamax (Varian). La colonne utilisée est une OmniSpher C18, 10  $\mu$ m, 250 x 21,4 mm.

## 3. Purification des composés

Les noms de code des composés isolés sont du type **DFX**, où X ne correspond pas à l'ordre de purification mais à celui de l'ordre d'apparition dans la partie concernant l'analyse structurale.

### 3.1. Etude phytochimique de l'extrait cyclohexanique des tiges DfS1

Cet extrait a été l'un des premiers étudiés. 7 g de l'extrait DfS1 ont été fractionnés sur colonne moyenne pression (de C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>/AcOEt 90/10 à CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90/10) en utilisant la silice comme phase stationnaire permettant d'obtenir 24 fractions notées DfS1-1 à DfS1-24.

#### 3.1.1. *Purification de la fraction DfS1-6*

La fraction notée DfS1-6 (535,9 mg) correspond en fait au regroupement des fractions 6,7 et 8 issues de DfS1. Elle a été purifiée sur gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%) pour donner 7 sous-fractions. La seconde sous-fraction DfS1-6-2, après précipitation dans le MeOH et filtration a permis d'obtenir le composé **DF16** (35,5

mg). La sous-fraction DfS1-6-3, après 2 séparations chromatographiques successives sur colonne ouverte de silice, nous a permis d'obtenir le composé **DF1**.

### **3.1.2. Purification de la fraction DfS1-9**

La fraction DfS1-9 (615 mg) a été séparée sur colonne ouverte de silice ( $C_6H_{12}/AcOEt$  90/10 à  $CH_2Cl_2/MeOH$  80/20) pour obtenir treize sous-fractions. La sous-fraction DfS1-9-5 (155,7 mg) a été purifiée sur colonne ouverte de silice, puis CCM préparative ( $C_6H_{12}/AcOEt/CH_3COCH_3$  6/3/1) pour donner le composé le composé **DF7** (2,8 mg).

### **3.1.3. Purification de la fraction DfS1-11**

La fraction DfS1-11 (948,3 mg) correspond au regroupement des fractions 11, 12 et 13 issues du préfractionnement de DfS1. Cette fraction a été séparée sur gel de Séphadex LH-20 pour obtenir 9 sous-fractions. Une colonne Flash a été réalisée sur la fraction DfS1-11-2 et a permis d'obtenir le composé **DF17** (125 mg). La sous-fraction DfS1-11-3 (44,3 mg) a ensuite été purifiée en CLHP préparative en utilisant un système isocratique  $MeOH/H_2O$  60/40. Deux injections de 5 mL ont été nécessaires pour purifier l'ensemble de la sous-fraction DfS1-11-3 et isoler le composé **DF9** (1,2 mg).

## **3.2. Etude phytochimique de l'extrait dichlorométhanique des tiges DfS2**

L'extrait dichlorométhanique des tiges, noté DfS2 (3g), a été préfractionné sur colonne de silice ( $C_6H_{12}/AcOEt$  90/10 à  $CH_2Cl_3/MeOH$  70/30). Après analyse CCM, 17 fractions ont été obtenues, nommées DfS2-1 à DfS2-17.

### **3.2.1. Purification de la fraction DfS2-8**

La fraction DfS2-8 (102,5mg) a été séparée sur gel Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 40/60). Une purification de la sous-fraction DfS2-8-5 sur colonne SPE C18 a été réalisée (H<sub>2</sub>O/MeOH 96/4 à 0/100) et a permis d'isoler le composé **DF12** (2,5 mg).

### **3.2.2. Purification de la fraction DfS2-9**

La fraction DfS2-9 (86,0 mg) a été purifiée sur gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%), permettant d'isoler le composé **DF13** (4,8 mg).

### **3.2.3. Purification de la fraction DfS2-15**

Une séparation sur LH-20 a été réalisée sur la fraction DfS2-15 (881,8 mg) (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%) et a permis d'isoler le composé **DF15** (59,4 mg).

## **3.3. Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des tiges DfS3**

L'extrait DfS3 (20,5 g) a été préfractionné par FCPC, après optimisation du système de solvant par CCM. Le système de solvants choisi est le système Arizona : heptane/acétate d'éthyle/méthanol/ eau : 10/8/10/6.

La totalité de l'extrait a été injecté en quatre fois (1,5 g dans 10 mL + 3 g dans 10 mL + 2 x 8 g dans 15 mL) dans un rotor de 275 mL. La pression était en moyenne de 37 bars pendant la chromatographie avec une vitesse de rotation de 900 tr/min (rétention 60%). La phase d'élution est suivie par une étape d'extrusion qui consiste à passer de la phase stationnaire (toujours en mode ascendant) afin de récupérer la totalité de l'extrait. (vitesse de rotation descendue à 200 tr/min).

Treize fractions ont été obtenues après analyse par CCM.

### **3.3.1. Purification de la fraction DfS3-4**

La fraction DfS3-4 (38 mg) a été purifiée sur gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50/50) pour obtenir le composé **DF12** (1,6 mg).

### **3.3.2. Purification de la fraction DfS3-5**

La fraction DfS3-5 (116,9 mg) correspond au regroupement des fractions 5, 6 et 7 issues de la FCPC. Une séparation sur gel de Séphadex LH-20 de cette fraction (116,9 mg) (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%) a permis d'isoler les composés **DF10** (1,1 mg) et **DF11** (5,4 mg).

### **3.3.3. Purification de la fraction DfS3-11**

Une séparation sur gel de Séphadex LH-20 de la fraction DfS3-11 (97,8 mg) a été réalisée (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%). La sous-fraction DfS3-11-4 (47,8 mg) a ensuite été purifiée par CLHP préparative (système isocratique 60/40 MeOH/H<sub>2</sub>O), en 2 injections, permettant d'obtenir le composé **DF8** (3,3 mg).

## **3.4. Etude phytochimique de l'extrait méthanolique des tiges DfS4**

L'étude de cet extrait a été confiée à Sarah Cardinal, lors de son stage de M2 du Master Biologie Végétale intégrative : Gène Plante, Agrosystème (BioVIGPA) de janvier à juin 2008.

Une partition liquide/liquide a été entreprise sur l'extrait méthanolique entre l'eau et des solvants organiques de polarité croissante : cyclohexane (extrait DfS4-1), dichlorométhane (DfS4-2), acétate d'éthyle (DfS4-3) et butan-1-ol (DfS4-4).

### **3.4.1. Purification de la fraction DfS4-2**

L'extrait DfS4-2 (1,1 g) a été chromatographié par FCPC. Le système éluant a été choisi par CCM dans la gamme Arizona : système Q (Heptane/Acétate d'éthyle/MeOH/Eau 3/2/3/2), en utilisant la phase aqueuse comme phase stationnaire, la phase organique comme phase mobile. Après remplissage et équilibrage du rotor (275 mL, rétention 65%), 1,1 g de l'extrait ont été injectés dans le rotor et élués par la phase mobile en mode ascendant (33 bars, 900 tr/min), une phase d'extrusion est ensuite réalisée (200 tr/min). Après suivi par CCM 14 fractions ont été obtenues.

La fraction DfS4-2-4 (26,1 mg) a été purifiée par CLHP préparative en mode isocratique (MeOH 70%) et a permis d'isoler le composé **DF12** (2mg).

Une CLHP préparative sur la fraction DfS4-2-5 (15,9 mg) en mode isocratique (MeOH 75%) a permis d'isoler le composé **DF10** (1,9 mg).

### **3.5. Eude phytochimique de l'extrait cyclohexanique des feuilles DfL1**

L'extrait cyclohexanique des feuilles de *Derris ferruginea* (DfL1, 30 g) a été fractionné par FCPC, en utilisant comme système de solvant, le système Arizona R (Heptane/ EtOAc/ MeOH/ H<sub>2</sub>O 2/1/2/1). La phase aqueuse constitue la phase mobile, alors que la phase organique compose la phase stationnaire. La capacité du rotor utilisé est de 1L. La phase stationnaire est tout d'abord pompée avec un débit de 30 mL/min avec une vitesse de 500 tr/min, puis la phase mobile est pompée en mode ascendant avec un débit de 10 mL/min à 1200 tr/min. L'équilibre est atteint avec une rétention de 79,2%. 15 g de l'extrait sont solubilisés dans un mélange phase supérieure/phase inférieure 50/50 puis injectés dans le rotor. Après passage de 2L de phase mobile, une phase d'exclusion est réalisée en diminuant la vitesse de rotation. La même opération a été réalisée, dans les mêmes conditions, une seconde fois (sur 15 g) pour fractionner la totalité de l'extrait.

Après analyse des fractions par CCM, les deux expériences apparaissent comme identiques, un regroupement est donc réalisable. Dix fractions ont été obtenues et analysées par CLHP et éventuellement par RMN.

#### **3.5.1. Purification de la fraction DfL1-5**

La fraction DfL1-5 (756,8 mg) a tout d'abord été séparée sur gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%). 11 fractions ont été obtenues et analysées par CLHP et éventuellement RMN.

La fraction DfL1-5-3 (61,5 mg) a été purifiée sur colonne Flash de silice (cartouche Si 4g, 50µm, Analogix, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt 80/20 à CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 50/50) pour donner 7 fractions, dont la deuxième est composée d'un seul produit : **DF4** (11,3 mg).

Une purification par CLHP préparative a été réalisée sur DfL1-5-7 (122,0 mg), en mode isocratique (MeOH 85%), en 4 injections et a permis d'obtenir les composés **DF3** (22 mg) et **DF6** (4,3mg).

La fraction DfL1-5-8 (31,9 mg) a été purifiée par CLHP préparative en 2 injections, en mode isocratique (85% de MeOH) et a permis d'obtenir le composé **DF2** (6,2 mg).

### **3.5.2. Purification de la fraction DfL1-6**

La fraction DfL1-6 (195,8 mg) a été séparée sur gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%) pour obtenir 8 sous-fractions.

Une purification de la sous-fraction DfL16-6 par gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%) et CLHP préparative (85% de MeOH) a permis d'isoler les composés **DF2** (3,5 mg) et **DF3** (8,0 mg).

### **3.5.3. Purification de la fraction DfL1-7**

Une séparation de la fraction DfL1-7 (2,4 g) sur gel de Séphadex LH-20 avec comme éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100% a permis de purifier le composé majoritaire **DF5** (674,8 mg).

## **3.6. Etude phytochimique de l'extrait dichlorométhanique des feuilles DfL2**

L'extrait DfL2 (9 g) a été fractionné par FCPC, en utilisant un rotor de 1L. Le système de solvant a été choisi par CCM, il s'agit du système Arizona Q (heptane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O : 3/2/3/2). La phase stationnaire, constituée de la phase aqueuse, est pompée dans le rotor à un débit de 30 mL/min, avec une vitesse de rotation de 400 tr/min, puis la phase mobile (phase organique) est pompée, en utilisant le mode ascendant, à un débit de 10 mL/min, à 700 tr/min, jusqu'à équilibration du système. Le pourcentage de rétention est de 75%. Puis l'extrait (9 g) est injecté dans 40 mL d'un mélange phase stationnaire/phase mobile 50/50, et élué par environ 1500 mL de phase mobile en gardant le même débit et la même vitesse de rotation que pendant la phase d'équilibration. Une phase d'extrusion est ensuite réalisée en pompant la phase stationnaire avec un débit de 30 mL/min, à 400 puis 200 tr/min, afin de récupérer le reste de l'extrait.

Après analyse par CCM, dix fractions ont été obtenues (DfL2-1 à DfL2-10), analysées par CLHP et éventuellement par RMN.

### **3.6.1. Purification de la fraction DfL2-2**

Une chromatographie sur LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 90/10) a permis de récupérer le composé **DF5** (182,1 mg), les autres composés, trop faibles en proportion n'ont pas pu être isolés.

### **3.6.2. Purification de la fraction DfL2-3**

Une séparation par gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%). a été réalisée sur la fraction DfL2-3 (109,9 mg). Cinq fractions ont été obtenues dont l'une est constituée du composé pur **DF15** (33,8 mg).

### **3.6.3. Purification de la fraction DfL2-4**

Une séparation sur gel de Séphadex a été réalisée sur la fraction DfL2-4 (95,5 mg). L'une des sous-fractions obtenues, la fraction DfL2-4-3 a été purifiée par CLHP préparative (mode isocratique, 65% de MeOH) pour obtenir le composé **DF10** (1,1 mg).

## **3.7. Etude phytochimique de l'extrait par l'acétate d'éthyle des feuilles DfL3**

L'extrait acétate d'éthyle DfL3 a tout d'abord été partitionné entre l'eau et le dichlorométhane pour enrichir la fraction dichlorométhanique en flavonoïdes. Les fractions dichlorométhanique (DfL3-1, 828 mg) et aqueuse (DfL3-2, 37,2 g) ont été analysées par CCM et CLHP. Seule la fraction DfL3-1 semble contenir des flavonoïdes, la fraction aqueuse n'a donc pas été étudiée.

### **3.7.1. Purification de la fraction DfL3-1**

Une FCPC a été réalisée sur cette fraction (828 mg) en utilisant comme solvants, le système Arizona J : heptane/AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O : 5/2/5/2. La phase stationnaire, composée de la phase aqueuse, est pompée dans le rotor de 275 mL, avec un débit de 40 mL/min à 200 tr/min. Puis la phase mobile (phase organique) est pompée à 10 mL/min, avec une vitesse

de rotation de 800 tr/min, jusqu'à équilibration. Le pourcentage de rétention est de 60%. DfL3-1 (828 mg) est solubilisé dans une mélange phase stationnaire/phase aqueuse 50/50, puis éluée avec la phase mobile (10 mL/min, 800 tr/min). Une phase d'extrusion permet de récupérer tout l'échantillon injecté. Après analyse par CCM, 13 fractions ont été obtenues et analysées en CLHP.

### **3.7.2. Purification de la fraction DfL3-1-2**

La fraction DfL3-1-2 (170,7 mg) a été purifiée sur gel de Séphadex LH-20 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 100% à MeOH 100%) pour obtenir les composé et **DF12** (2,2 mg) et **DF14** (2,0 mg). On note la présence de **DF1** dans cet extrait, cependant aucune purification n'a été entreprise pour l'isoler à nouveau.

### **3.7.3. Fraction DfL3-2**

Les profils CCM et CLHP de la fraction DfL3-2 mettent en évidence la complexité de cette fraction et il apparait que cette fraction est très pauvre en flavonoïdes. Elle n'a donc pas été traitée.

## **4. Alternatives d'obtention de deux composés d'intérêt**

### **4.1. Purification du composé DF1 par FCPC**

Une FCPC a été réalisée sur 5 g de l'extrait brut cyclohexanique en vue d'obtenir en quantité plus importante le composé **DF1**.

#### **4.1.1. Sélection du système de solvants**

Le système de solvant a été tout d'abord sélectionné dans la gamme Arizona par CCM. C'est-à-dire qu'une petite quantité de l'extrait est solubilisée dans un mélange de 1 mL de phase supérieure et de 1 mL de phase inférieure. Après agitation, un même volume de chaque phase est déposé sur CCM puis chromatographié (Hostettmann *et al.*, 1998). Après examen à 254 m et 365 nm, le système [heptane/acétate d'éthyle/méthanol/eau (4:1:4:1, v/v)] est celui qui présente le meilleur partage de la molécule d'intérêt entre les

deux phases. Une confirmation par évaluation du coefficient de partage  $K$  par CLHP a été réalisée en utilisant ce système ( $K=0,91$  à 254 nm). Le système U de la gamme Arizona a donc été choisi pour réaliser la FCPC, la phase stationnaire étant constituée par la phase aqueuse et la phase mobile par la phase organique.

#### **4.1.2. FCPC de l'extrait DfS1**

L'extrait (5 g) a été solubilisé dans un volume de 10 mL composé de 50/50 (v/v) phase stationnaire/phase mobile. Le rotor utilisé possède une capacité de 275 mL, la vitesse de rotation pendant l'expérience a été fixée à 900 tr/min, la pression étant en moyenne de 30 bars. L'élution a été réalisée en mode ascendant (10 mL/min, 550 mL), ainsi que la phase d'extrusion (12 mL/min, 360 mL, 300 tr/min). Le volume des fractions est de 10 mL. Après analyse des fractions par CCM et CLHP, il s'avère que les fractions 25 à 27 sont composées de la cajaflavanone purifiée (11,7 mg, pureté : 86,9% à 254 nm).

### **4.2. Synthèse du composé DF12**

#### **7-acétoxy-3-(4-acétoxyphényl)-5-hydroxy-4H-chromèn-4-one (DF8a)**

La génistéine (50 mg=0,185 mmol) est introduite dans un ballon sous  $N_2$  avec la triéthylamine (TEA) (3 éq.), dans  $CHCl_3$  distillé (5 mL), sous agitation pendant 5-10 min, puis l'anhydride acétique ( $Ac_2O$ ) (2 éq.) est introduit. Après 18 h d'agitation, la réaction est arrêtée. Une chromatographie sur plaque préparative de silice CCM ( $C_6H_{12}/AcOEt$  80/20) permet de récupérer le composé diacétylé **2** avec un rendement de 39%.

A 500 mg de génistéine (1,85 mmol), dans un ballon sous atmosphère d'azote, sont ajoutés 10 mL de pyridine. L'ensemble est placé sous vive agitation et 0,35 mL d' $Ac_2O$  (2 éq.), sont ajoutés goutte à goutte. Après 20 h de réaction, le milieu réactionnel est placé sur de la glace et filtré après retour à température ambiante. Le précipité jaunâtre est recristallisé dans EtOH, acétone et  $CHCl_3$ , puis filtré et séché. Le rendement est de 84%.

$^1H$ -RMN (270 MHz,  $CDCl_3$ ) : 2,30 (s, 3H,  $CH_3COO$ ), 2,34 (s, 3H,  $CH_3COO$ ), 6,60 (d, 1H,  $J=2,1$  Hz, H-8), 6,77 (d, 1H,  $J=2,1$  Hz, H-6), 7,19 (d, 2H,  $J=8,7$  Hz, H-3' et H-5'), 7,55 (d, 2H,  $J=8,7$  Hz, H-2' et H-6'), 7,97 (s, 1H, H-2), 12,84 (s, 1H, 5-OH).

### **7-tertbutyldiméthylsilyloxy-3-(4-tertbutyldiméthylsilyloxyphényl)-5-hydroxy-4H-chromèn-4-one (DF8a')**

La génistéine (50 mg=1 éq.) est mise en présence de TEA (5 éq.) dans CHCl<sub>3</sub> distillé, sous agitation et sous N<sub>2</sub> pendant 5-10 min. TBDMS-Cl (5 éq.) est ensuite introduit et le mélange est laissé sous agitation pendant 18 h. Après évaporation du solvant, le mélange brut est purifié par plaque préparative de silice (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/AcOEt 90/10) et permet de récupérer le composé disilylé **DF8a'**. Le rendement est de 69%.

<sup>1</sup>H-RMN (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 0,23 (s, 6H), 0,23 (s, 6H), 1,00 (s, 9H), 1,05 (s, 9H), 6,35 (d, 1H, *J*=2,5 Hz, H-8), 6,48 (d, 1H, *J*=2,5 Hz, H-6), 6,86 (d, 2H, *J*=8,5 Hz, H-3' et H-5'), 7,37 (d, 2H, *J*=2,5 Hz, H-2' et H-6'), 7,70 (s, 1H, H-2), 12,88 (s, 5-OH)

### **7,4'-diacétoxy-5-(3-méthylbut-2-enyloxy)-3-phénylchromèn-4-one (DF8b)**

Une solution THF (12,5 mL), contenant le composé **DF8a** (420 mg, 1,185 mmol), 405 mg de triphénylphosphine (PPH<sub>3</sub>) (1,3 éq.) et 178 µL de 3-méthyl-2-butèn-1-ol (1,5 éq.), placée sous azote, est refroidie à -7°C à l'aide d'un bain de glace/sel/acétone. Puis, 307 µL de DEAD dans 1 mL de THF sont ajoutés goutte à goutte pendant 30 min. Après 15 h d'agitation, il reste du produit de départ, la même quantité de réactifs est donc ajoutée et la solution est laissée sous agitation pendant 2 h supplémentaires. Une huile de couleur jaune est obtenue, puis purifiée sur gel de silice (AcOEt/ éther de pétrole 1/2). Un précipité est observé dans un certain nombre de fractions, qui sont filtrées et permettent d'obtenir 81 mg du composé pur **DF8b**. Le rendement global de cette réaction est de 16%.

<sup>1</sup>H-RMN (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 1,73 (s, 3H, H-4''), 1,77 (s, 3H, H-5''), 2,31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO), 2,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO), 4,65 (d, 2H, *J*=6,6 Hz, H-1''), 5,57 (dd, 1H, *J*=1,5, 6,6 Hz, H-2''), 6,58 (d, 1H, *J*=2,4 Hz, H-8), 6,84 (d, 1H, *J*=2,4 Hz, H-6), 7,13 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H-3' et H-5'), 7,54 (d, 2H, *J*=8,7, H-2' et H-6'), 7,81 (s, 1H, H-2).

### **7, 4'-diacétoxy-5-hydroxy-8-prényl-3-phénylchromèn-4-one (DF8c)**

Dans un tube scellé sont placés le composé **DF8b** (50 mg, 1 éq.), 12,3 mg de Eu(fod)<sub>3</sub> (0,1 éq.) et 3,5 mL de CHCl<sub>3</sub> distillé préalablement sur CaH<sub>2</sub>. Le mélange sous agitation est chauffé à 60°C. Après 20 h, il reste du produit de départ, la réaction est alors

poursuivie pendant 3 jours. Le composé **DF8c** est purifié sur CCM préparative (AcOEt/éther de pétrole 1/2), le rendement étant de 68% (34 mg).

<sup>1</sup>H-RMN (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 1,69 (s, 3H, H-4''), 1,78 (s, 3H, H-5''), 2,33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO), 2,34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>COO), 3,38 (d, 2H, *J*=7,2 Hz), 5,23 (m, 1H, *J*=1,5 et 7,2 Hz), 6,59 (d, 1H, H-6), 7,19 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H-3' et H-5'), 7,56 (d, 2H, *J*=8,7, H-2' et H-6'), 8,03 (s, 1H, H-2), 12,63 (s, 1H, 5-OH).

**5,7,4'-trihydroxy-8—(3-méthylbut-2-èn-1-yl)-3-phénylchromèn-4-one (lupiwightéone, DF8d)**

Le composé **DF8c** est introduit dans un ballon avec 0,25 mL de MeOH et 0,25 mL de THF, puis 1 mL d'une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> à 10% est ajoutée. Le mélange est maintenu sous agitation et chauffé à 60°C pendant 17 h. Le milieu réactionnel est ensuite traité par HCl 1N jusqu'à pH=6. Un précipité blanc se forme. La suspension est extraite 3 fois par 10 mL d'AcOEt. Le résidu brut est filtré après séchage sur NaSO<sub>4</sub> puis purifié sur CCM préparative (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 2/98). 15 mg du composé **DF8d** ont été obtenus (55%).

<sup>1</sup>H-RMN (270 MHz, acétone d<sub>6</sub>) 1,66 (s, 3H, H-4''), 1,81 (s, 3H, H-5''), 3,45 (d, 2H, *J*=7,2 Hz), 5,23 (m, 1H, *J*=1,5 et 7,2 Hz), 6,37 (d, 1H, H-6), 6,90 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H-3' et H-5'), 7,47 (d, 2H, *J*=8,7 Hz, H-2' et H-6'), 8,25 (s, 1H, H-2), 8,7 (4'-OH), 8,60 (7-OH), 12,97 (5-OH).

**5,7-dihydroxy-3-(4-hydroxyphényl)-8-(2-hydroxy-3-méthyl-but-3-ène)-4H-chromèn-4-one (DF8g)**

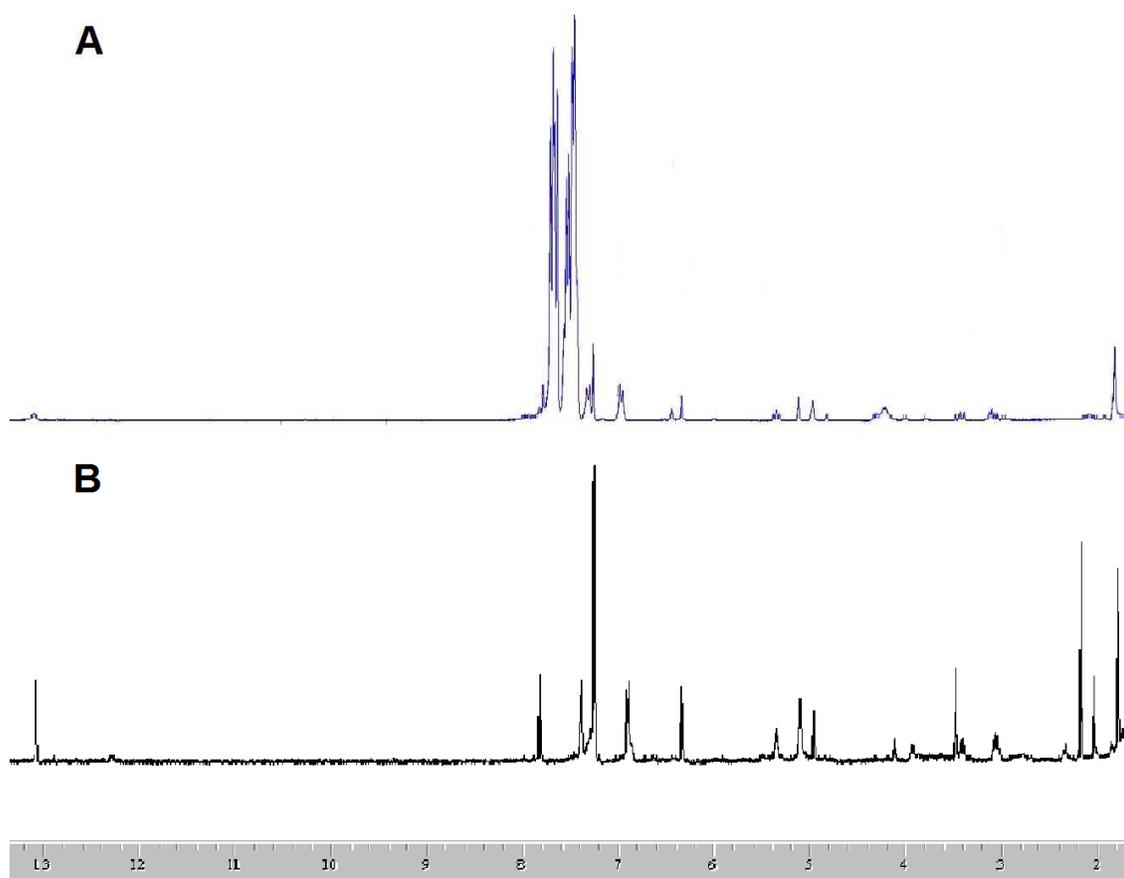
Le composé **DF8d** (15 mg) est placé dans un tube équipé d'un réfrigérant, en solution dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acétone et en présence de méso-tétraphénylporphine. Un bullage d'air est mis en place. Le milieu réactionnel est éclairé par une lampe halogène 500 W et maintenu à 15°C par une circulation d'eau froide. Après consommation totale du produit de départ, 16 mg de PPH<sub>3</sub> (1,5 éq.) sont ajoutés. En fin de réaction (16 h), le solvant est évaporé et le résidu brut est purifié sur plaque préparative de silice pour fournir 10 mg de l'alcool allylique secondaire **DF8g** (64 % de rendement).

$^1\text{H}$ -RMN (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) 1,81 (s, 3H, H-5''), 2,92 (dd, 1H,  $J=8,1$  et  $14,9$  Hz), 3,11 (dd, 1H,  $J=2,5$  et  $14,9$  Hz), 4,30 (m, 1H,  $J=1,5$  et  $7,2$  Hz), 6,37 (d, 1H, H-6), 6,90 (d, 2H,  $J=8,7$  Hz, H-3' et H-5'), 7,47 (d, 2H,  $J=8,7$ , H-2' et H-6'), 8,25 (s, 1H, H-2), 8,7 (4'-OH), 8,60 (7-OH), 12,97 (5-OH).

### Composé DF12

A une solution THF (3 mL) contenant le composé **DF8g** (10 mg) sont ajoutés 10,85  $\mu\text{L}$  de DEAD (2,5 éq.) et  $\text{PPH}_3$  (2,5 éq.). Le mélange est maintenu sous agitation pendant 24 h. Le milieu réactionnel est séché par évaporation et purifié par CCM préparative ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  93/7). L'analyse du spectre  $^1\text{H}$ -RMN met en évidence la présence du composé attendu (**DF12**), mais également celle de l'oxyde de phosphine (**Figure 97**).

$^1\text{H}$ -RMN : voir **Annexe 12**.



**Figure 97:** RMN- $^1\text{H}$  du composé **DF12** isolé à partir de *D. ferruginea* (A) et obtenu par synthèse (B) (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}=0$  ppm).

## 5. Méthodes d'analyse

L'analyse de la composition des extraits bruts, celle des différentes fractions et sous-fractions est réalisée par les techniques chromatographiques usuelles (CCM, CLHP, RMN éventuellement). De la même façon, l'identification structurale des composés isolés s'appuie pour l'essentiel sur les techniques spectroscopiques suivantes: UV, RMN, SM.

### 5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont réalisées sur plaque de Silice 60 F<sub>254</sub> Merck, 0,1 mm sur support d'aluminium (20 x 20 cm). La lecture est faite sous lampe UV à 254 nm et 360 nm. Le réactif de Neu est utilisé comme révélateur des flavonoïdes : Diphénylborate d'aminoéthanol 1% m/v MeOH puis 5% m/v PEG 400 dans MeOH (Brasseur *et al.*, 1986).

### 5.2. Chromatographie liquide haute performance analytique (CLHP)

La CLHP a permis de réaliser des analyses à différents niveaux : en suivi des différentes étapes de séparation, en contrôle de la pureté des composés isolés. Elle a aussi été utilisée pour mettre au point des conditions de séparation en CLHP préparative.

#### 5.2.1. *Chaîne CLHP*

- Module de séparation Waters 2695®
- Détecteur Photodiode Array Detector Waters® 2996
- Logiciel: Empower®

#### 5.2.2. *Colonnes et gradients utilisés*

- **pour l'analyse des extraits bruts, des fractions et des composés isolés** : Lichrospher ® 100 RP18 (150 x 4.6mm, 5µm, Agilent Technologies), avec un gradient de 5% de MeOH à 100% en 40 min, débit 1mL/min.

- **pour la mise au point des conditions** pour séparation en CLHP préparative : Varian OmniSpher C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm

La transposition est très simple, en effet, la colonne analytique présente la même longueur que la colonne préparative :

$$t_{\text{prep}} = t_{\text{anal}} \times L_{\text{prep}} \times (D_{\text{prep}})^2 \times F_{\text{anal}} / (L_{\text{anal}} \times (D_{\text{anal}})^2 \times F_{\text{prep}})$$

avec  $L_{\text{prep}}=L_{\text{anal}}=250$  mm,  $D_{\text{anal}}=4,4$  mm,  $D_{\text{prep}}=21,4$ ,  $F_{\text{anal}}=1$  mL/min

On obtient:  $t_{\text{prep}}=t_{\text{anal}} \times 21,64 / F_{\text{prep}}$

Avec  $t$ = temps de rétention,  $D$  = diamètre,  $F$  = débit,  $L$ = longueur de la colonne

Donc, si on souhaite que  $t_{\text{prep}}=t_{\text{anal}}$ , il suffit de fixer un débit de 20 mL/min (21,64mL/min) pour la préparative. Il faut noter néanmoins, que cette transposition est simplifiée et ne tient pas compte de la différence de qualité de la phase stationnaire (5  $\mu\text{m}$  pour la colonne analytique et 10  $\mu\text{m}$  pour la colonne préparative).

- pour vérifier la présence des flavanones sous la forme d'un **mélange racémique** : Cyclobond I 2000 ® HP-RSP,  $\beta$ -cyclodextrin, 250 x 4,6 mm (Advanced Separation Technologies Inc.).

### 5.3. Spectrophotométrie ultraviolet (UV)

Les spectres UV des composés sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Cary 50 Bio UV Visible Spectrophotometer (Varian S.A. Varian Analytical Instruments, 7, avenue des Tropiques Z.A. Courtaboeuf, B.P. 12-91941 LES ULIS Cedex).

### 5.4. Polarimétrie

L'appareil utilisé est un Polartronic D (Eloptron®).

### 5.5. Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masses sont réalisés sur un Esquire 3000 PLUS (Bruker) et sont traités par le logiciel DataAnalysis.

### 5.6. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN monodimensionnelle ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) sont réalisés soit sur un appareil Bruker Avance DRX 500 MHz (Bruker France, Wissembourg, France) soit sur un Jeol GSX 270 MHz (Jeol Europe, Croissy-sur-Seine, France). Les spectres RMN bidimensionnelle (COSY, HMQC, HMBC, NOESY) sont réalisés sur un appareil Bruker Avance DRX 500 MHz (Bruker France, Wissembourg, France). Les déplacements chimiques en ppm des solvants deutériés utilisés pour les analyses sont exprimés par rapport au TMS.

## 6. Evaluation des activités biologiques

Les activités biologiques des extraits, ainsi que celles d'un certain nombre de composés, lorsque les quantités le permettaient et après analyse bibliographique, ont été évaluées sur différents modèles.

### 6.1. Activité antifongique

L'activité antifongique est évaluée en partenariat avec le *Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Parasites (GEIPH, UPRES EA 3142) au laboratoire de parasitologie, mycologie du CHU d'Angers*. Un screening a été réalisé selon une méthode de diffusion sur disque de papier (Morel *et al.*, 2001) sur 3 espèces fongiques : *Candida albicans* (ATCC 66-390), *Candida glabrata* (LMA 9061085) et *Aspergillus fumigatus* (CBS 113-26). Les souches sont cultivées sur gélose YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar), pendant 48 heures (*Candida*) ou 72 heures (*Aspergillus*) à 37°C. Les suspensions de *Candida* sont obtenues, par incorporation d'une colonie de 2 mm dans 10 mL d'eau distillée stérile (CFU *C.albicans*  $3.10^6$ , CFU *C.glabrata*  $5.10^6$ ). La suspension de spores d'*Aspergillus* a été préparée par potterisation de la culture dans 10 mL d'eau distillée stérile conformément à la méthode M38-P recommandée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). La suspension finale obtenue est spectrophotométriquement ajustée à une valeur de  $\text{DO}_{450}$  de 0.6.

Les extraits ou les composés testés sont solubilisés dans du DMSO de façon à obtenir une concentration de 10 mg/mL. 25  $\mu\text{L}$  de chaque composé ou extrait sont déposés sur des disques en papier de 12 mm de diamètre (rf 06234304, Prolabo 33173 Gradigan). Après évaporation du solvant, les disques sont placés au centre de boîtes de Pétri de diamètre de 90 mm et contenant un milieu Agar casitone, préalablement inoculées avec 10

mL de suspension de spores. L'amphotéricine B est utilisée comme contrôle positif et le DMSO sans composé est pris comme contrôle négatif. Après une incubation de 48 heures pour les levures et 72 heures pour *A. fumigatus*, l'activité est évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de croissance (mm) autour des disques en papier.

## 6.2. Activité antibactérienne

### 6.2.1. Souches bactériennes testées

L'activité antibactérienne des extraits et des fractions a été évaluée sur vingt et une souches bactériennes obtenues au laboratoire de bactériologie du CHU d'Angers. Parmi ces vingt et une souches, certaines sont des souches de référence et d'autres des souches isolées chez des patients présentant une infection bactérienne

- sept souches d'*Acinetobacter baumannii* présentant différents profils de résistance aux antibiotiques (souche RCH, SAN008, 12, AYE, CIP7034, CIP107292, CIP5377);

- cinq souches de *Staphylococcus aureus* (souche de référence ATCC25923 et 4 souches cliniques isolées au laboratoire de bactériologie dont 2 souches résistantes à la méticilline et 2 souches sensibles à la méticilline),

- deux souches d'*Escherichia coli* (souche de référence ATCC25922 et une souche clinique isolée au laboratoire de bactériologie),

- trois souches de *Pseudomonas aeruginosa* (souche de référence ATCC27853 et deux souches cliniques isolées au laboratoire de bactériologie),

- une souche d'*Enterobacter cloacae* (souche clinique isolée au laboratoire de bactériologie)

- une souche d'*Enterobacter aerogenes* (souche clinique isolée au laboratoire de bactériologie)

- une souche de *Klebsiella oxytoca* (souche clinique isolée au laboratoire de bactériologie)

- une souche de *Salmonella enteritidis* (souche de référence)

### **6.2.2. Préparation des extraits**

2,5 mg de chaque extrait sont solubilisés dans 125 µL de DMSO. De cette solution 100 µL sont ajoutés à 19,9 mL de milieu gélosé Muller Hinton (MH) en surfusion, afin d'obtenir une concentration finale de l'extrait à 100 µg/mL. Les 25 µL restants sont ajoutés à 225 µL de bouillon Brain Heart (Bouillon-Cœur -Cervelle, Biomérieux) et 100 µL de ce mélange sont dilués dans 19,9 mL de milieu gélosé MH en surfusion pour obtenir une concentration finale d'extrait de 10 µg/mL.

Les milieux gélosés MH en surfusion contenant chaque concentration d'extrait de plante sont coulés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre puis solidifiés à température ambiante. Ces étapes sont réalisées dans une enceinte stérile.

### **6.2.3. Préparation des inocula bactériens**

Pour chaque souche bactérienne, une suspension à 0,5 MF est réalisée dans du sérum physiologique, à l'aide d'un densitomètre. Cette suspension correspond à une concentration d'environ  $10^8$  bactéries/ml. Puis, une dilution au  $100^{\text{ème}}$  est réalisée dans du sérum physiologique, et 4 µl de cette nouvelle suspension sont inoculés à l'aide d'un inoculateur automatique (multipoint inoculator AQS), sur les boîtes de Pétri contenant la gélose MH avec les différentes concentrations d'extrait à tester. La croissance des bactéries est évaluée après 24h d'incubation à 37°C. La concentration minimale inhibitrice<sup>26</sup> (CMI) des différents extraits vis-à-vis de chaque souche bactérienne est déterminée. L'expérience est réalisée en triplicate.

## **6.3. Activité antiplasmodiale**

L'évaluation de l'activité antiplasmodiale a été réalisée au *Laboratoire de parasitologie du Muséum National d'Histoire Naturelle, FRE 3206 CNRS, (61 rue Buffon à Paris)*. La souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* (FcB1 /Columbia) est maintenue en culture continue dans des érythrocytes humains dans un milieu RPMI de sérum humain inactivé à la chaleur sous une atmosphère de 3% CO<sub>2</sub>, 6% O<sub>2</sub>, 91% N<sub>2</sub>, à 37°C, comme décrit par Trager et Jensen (Trager *et al.*, 1976). L'essai est effectué par une technique de microdilution semi-automatique modifiée à partir de la méthode de

---

<sup>26</sup> concentration minimale de produit qui inhibe totalement la croissance bactérienne

Desjardins *et al.* (1979) basée sur l'incorporation de [G-<sup>3</sup>H] hypoxanthine comme indicateur de la croissance du parasite. Les composés ou les extraits à tester sont dilués avec 100 µL de milieu de culture dans des plaques 96 puits. Chaque échantillon est évalué en duplicate à 10 µg/mL. La chloroquine est utilisée comme contrôle positif, le contrôle négatif étant le DMSO seul. L'inhibition de la croissance est déterminée par comparaison de l'incorporation de la radioactivité dans les puits contenant les échantillons de celle du contrôle négatif de la même plaque.

## **6.4. Activité antileishmanienne**

L'activité antileishmanienne a été évaluée au *Laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale, UPRES EA 1155, de la Faculté de Pharmacie de Nantes.*

### **6.4.1. Culture des souches de *Leishmanies***

La souche de *L. major Leishmania major* (MHOM/II/81/BNI) a été cultivée à 26°C dans un milieu Schneider's insect auquel sont ajoutés 15% de Sérum de veau foetal (SVF), de la pénicilline (100 UI/mL) et de la streptomycine (50 µg/mL). Les cellules en phase de croissance sont maintenues à 26°C.

### **6.4.2. Détermination de l'activité antileishmanie au stade promastigote**

L'activité antileishmanie sur le stade promastigote<sup>27</sup> a été évaluée par la méthode Uptiblué<sup>®</sup> (Lepape *et al.*, 2003). 100 µL d'une suspension ajustée à une concentration de 10<sup>6</sup> promastigote/mL sont déposés dans une plaque de 96 puits (Nunc<sup>®</sup>). L'expérience est réalisée en triplicate. Les cultures sont incubées à 26°C pendant 96 h en présence des composés à la concentration de 100, 10 et 1 µg/mL. 10 µL de colorant Uptiblué<sup>®</sup> sont ensuite ajoutés dans chaque puit 4 h avant la mesure. La fluorescence est mesurée à une longueur d'onde d'absorption de 590 nm avec une excitation à 550 nm.

---

<sup>27</sup> Les *Leishmania* se présentent à leur hôte sous 2 stades successifs :  
-promastigotes : parasites extracellulaires vivant dans le tube digestif de diptères hématophages (25 µm).  
-amastigotes : situés à l'intérieur de macrophages de mammifères dans des vacuoles parasitophores (1 µm).

## 6.5. Evaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité est évaluée sur cellules MRC-5 dans le DMSO à 10 et 1 µg/mL selon une méthode basée sur celle décrite par Moret *et al.*, (2009).

## 6.6. Evaluation de la toxicité aigue sur *Artemia salina*

Récemment, se sont développés de nombreux tests de toxicité pour lesquels la réponse a été mesurée chez les invertébrés. Ces tests sont souvent peu coûteux, reproductibles, de mise en œuvre facile (pas de conditions d'aseptie) et révélatifs pour l'environnement. (Calow, 1993). De plus, du fait de sa disponibilité commerciale, *Artemia salina* est largement utilisée dans les applications toxicologiques ou en recherche.

Il faut savoir que les invertébrés sont déjà utilisés dans des tests requis par les autorités pour l'estimation du risque environnemental de pesticides, médicaments et polluants (Favilla *et al.*, 2006). Le test sur *Artemia salina* est surtout utilisé dans les pays en voie de développement, où 85% de la population utilise des plantes médicinales en médecine traditionnelle (Lagarto-Parra *et al.*, 2001) Bien qu'inadapté pour la détermination du mécanisme d'action, ce test est très utile pour établir la toxicité ou non toxicité des extraits de plantes et a été largement employé dans ce sens (Sam, 1993).

Ce test a été mis au point par Julien Detoc dans le cadre de son stage de BTS (Lycée Jean Moulin, Bioanalyses et Contrôles) La méthode utilisée est modifiée par rapport à celle décrite par Lagarto-Parra (Lagarto-Parra *et al.*, 2001). 15 g d'œufs de crevettes sont obtenus grâce à un kit d'incubation d'*Artemia* (set incubateur Artemia, Europrix). Après une période d'éclosion de 24 heures à 26 ±1°C et à lumière constante, les larves sont récupérées et comptées en utilisant un microscope inversé (Leica DMIL stéréomicroscope). Le test est réalisé en plaque 96 puits. Chaque puits contient 10-20 larves dans 200 µL d'EDS. Les extraits sont solubilisés dans du DMSO à 8%. 100 µL de chaque solution ou extrait sont transférés dans les puits pour obtenir les concentrations suivantes : 2, 20 et 200 µg/mL à raison de 6 réplicats par concentration. La mortalité est définie lorsque chaque larve ne présente plus de mouvements pendant au moins 10 secondes et le nombre total de larves par puits est évalué au final après addition de 100 µl de MeOH. Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après une exposition aux échantillons testés, de 24 heures ou de 48 h, rapportée à la mortalité normale (N) selon le calcul suivant (X = moyenne des larves mortes par concentration) :

$$\% \text{ de mortalité} = (100 \times (X-N) / (100-N))$$

## 6.7. Activité sur cellules microgliales

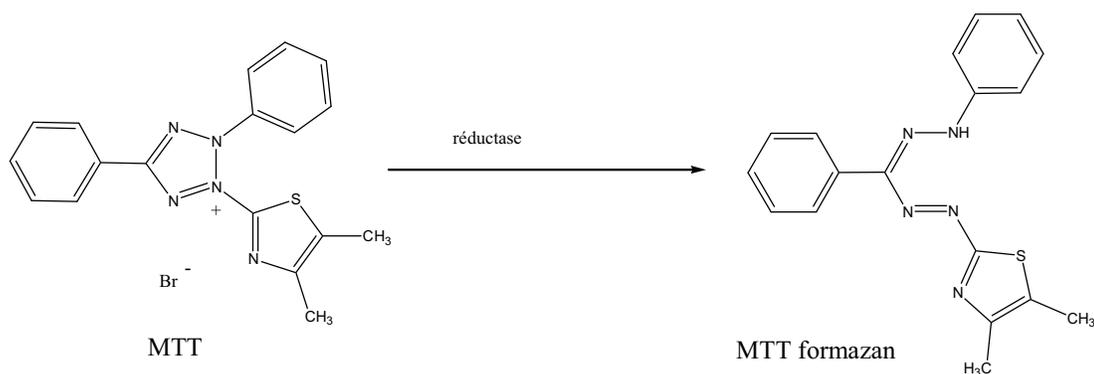
Cette activité a été évaluée par Gaël Le Roux lors de son stage de Master 2 (Biosignalisation cellulaire et moléculaire), et Anaïs Bigey, stagiaire en licence professionnelle BAEMOVA, de l'IUT Angers-Cholet dans le cadre d'une collaboration entre le SONAS et l'Equipe 15 INSERM U892 (Angers), de janvier à juin 2010.

### 6.7.1. Lignée microgliale BV-2

La lignée BV-2 est issue de cellules microgliales murines (souris C57Bl/6J) immortalisées par un rétrovirus recombinant (v-raf/v-myc) (Bocchini *et al.*, 1992), fournie par l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette). Les cellules BV-2 sont cultivées en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté. Lorsqu'elles sont à 80 % de confluence, elles sont reprises pour utilisation.

### 6.7.2. Évaluation de la toxicité des molécules par la méthode au MTT

Afin d'évaluer la toxicité des molécules, un test de viabilité des cellules est réalisé. Ce test explore la capacité des mitochondries à transformer un sel de tétrazolium, le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), en un produit chromogénique, le formazan, grâce à une activité réductase (Mosmann, 1983) (**Figure 98**).



**Figure 98:** Réaction mise en jeu lors du test de viabilité cellulaire au MTT. Le sel de tétrazolium est réduit par les réductases mitochondriales en formazan, cristal coloré, resolubilisé puis dosé par spectrophotométrie.

Les cellules BV-2 et les cellules microgliales néonatales sontensemencées en plaque 96 puits à une densité nécessaire pour atteindre 80 % de confluence, après une nuit d'incubation. Le lendemain, les molécules ou les extraits sont déposés pour un premier *screening* respectivement à 10 µM, 1 µM, 0,1 µM et 0,01 µM pour les molécules, et 0,5 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,005 mg/mL et 0,0005 mg/mL pour les extraits. Après 24 h, les surnageants de tous les puits sont retirés et remplacés par 100 µL de DMEM et 10 µL de MTT (Invitrogen, Eugène, Oregon, É.-U., 5 mg/mL en PBS) ; après 4 h d'incubation (37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>), 90 µL de milieu sont retirés et remplacés par 100 µL d'isopropanol contenant 0,04 M d'HCl, pour lyser les cellules et solubiliser les cristaux de formazan ; après 2 h sous agitation, la plaque est lue au lecteur de microplaques (Multiskan Ascent, Thermofisher Scientific), à 550 nm. Un témoin négatif est réalisé en plaçant les cellules dans 100 % DMSO (DONégatif) ; la mortalité est dans ce cas considérée comme totale. Le témoin positif est réalisé en laissant incuber les cellules dans le DMEM seul (DOpositif) ; la mortalité est considérée comme nulle. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité (%V) selon la formule suivante :

$$\%V = 100 \times (\text{DO} - \text{DO}_{\text{négatif}}) / (\text{DO}_{\text{positif}} - \text{DO}_{\text{négatif}})$$

Les résultats sont exprimés en moyenne du pourcentage de cellules vivantes ± erreur standard de la moyenne (SEM), et une analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA) a été réalisée, suivie d'un ajustement par la méthode de Bonferroni lorsque cela a été nécessaire. Un test *t* de Student a été réalisé afin d'évaluer les différences par rapport à la limite de 90 % de viabilité fixée.

### ***6.7.3. Extraction et quantification des protéines totales par la méthode BCA***

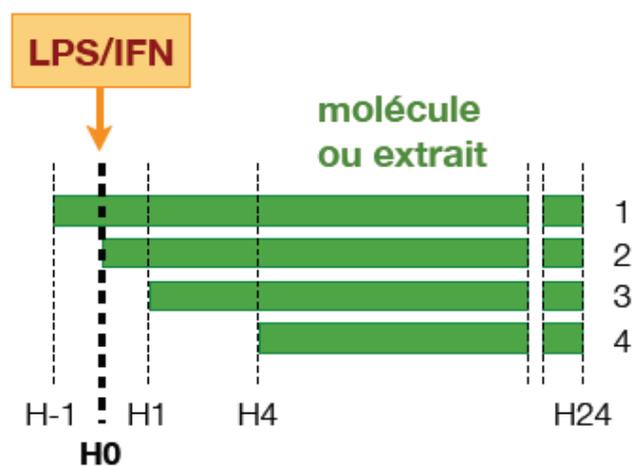
Les cellules traitées comme précédemment sont lavées deux fois au Phosphate-Buffered Saline (PBS), puis lysées dans 100 µL de tampon de lyse (25 mM de Tris, 10 mM de NaCl, 0,1 mM d'EDTA, 0,5 % de Triton) auquel sont ajoutés 50 mM de NaF, 1 mM de PMSF, 1 % de NP40 et un mélange d'inhibiteurs de protéases. La lyse complète est réalisée en plongeant à deux reprises les cellules dans l'azote liquide. Après 1 h sous agitation à 4 °C puis centrifugation (20 000 × g, 5 min à 4 °C), les surnageants sont récupérés et leur contenu en protéines est déterminé par la méthode à l'acide bicinchonique (BCA). Le BCA forme un complexe pourpre ( $\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$ ) avec les ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ) issus de la réduction des ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) par les protéines en milieu alcalin. La quantité de protéines est proportionnelle à l'absorbance mesurée à 540 nm. Un kit de

dosage a été utilisé (BCA protein assay kit, Thermo Fischer Scientific) sur 100  $\mu\text{L}$  de solution de protéines diluée au dixième. Une gamme d'étalonnage est réalisée avec l'albumine sérique bovine (BSA, 0-50  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### 6.7.4. *Stimulation des cellules et quantification de la production de NO par la méthode de Griess*

La production de NO par les cellules est estimée par une mesure des nitrites, produits d'oxydation stables du NO, par la méthode colorimétrique de Griess : les nitrites réagissent avec une arylamine (sulfanilamide) en milieu acide, pour former un sel de diazonium. Cet intermédiaire réagit ensuite avec un agent de couplage, la naphthyléthylènediamine (NED) et forme un composé azoïque stable.

Les cellules sont incubées pendant la nuit en plaque 96 puits dans du DMEM sans rouge de phénol (Lonza, Braine-l'Alleud, Belgium) pendant une nuit (la présence du rouge de phénol entraîne une interférence lors de la lecture spectrophotométrique,  $\lambda_{\text{max}}$  entre 540 et 550 nm). Les cellules sont stimulées, et mises en présence des molécules ou des extraits selon le schéma expérimental (**Figure 99**).



**Figure 99** : Schéma expérimental de stimulation et de traitement par les molécules ou les extraits à tester.

Condition 1 : les molécules sont déposées 1 h avant la stimulation

Conditions 2, 3 et 4 : la stimulation a lieu 0 à 4 h avant le dépôt des molécules

100  $\mu\text{L}$  de surnageant de culture sont mélangés à un volume égal de réactif de Griess (Sigma-Aldrich) en plaque de 96 puits. Après 15 min d'incubation à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation, l'absorbance est déterminée à 550 nm, grâce à un

lecteur de microplaque (*Multiskan Ascent*, Thermofisher Scientific). Une gamme d'étalonnage est réalisée avec du nitrite de sodium  $\text{NaNO}_2$  (de 0 à 100  $\mu\text{M}$ ). Les quantités de nitrites mesurées sont rapportées à la quantité de protéines mesurée par la méthode BCA. Pour les résultats de mesure du taux de NO, la moyenne de l'ensemble des réplicats est normalisée en nmol/mg de protéines totales  $\pm$  SEM.

### **6.7.5. Étude de l'expression des gènes de l'iNOS et de cytokines proinflammatoires par RT-PCR quantitative**

Afin d'étudier l'expression des ARNm de l'iNOS, du NF- $\kappa$ B, un de ses principaux facteurs de transcription, et des cytokines proinflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ), une analyse par RT-PCR quantitative est réalisée. Les cellules sont déposées en plaques de 12 puits à raison de  $5 \cdot 10^5$  cellules par puits stimulées par un mélange de LPS 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et IFN- $\gamma$  50 U/mL et mises en présence des molécules selon le schéma expérimental (**Figure 99**). L'ARN est tout d'abord extrait par la méthode au Trizol (Invitrogen), consistant en une lyse cellulaire par le phénol et l'isothiocyanate de guanidine (1 mL pour 1 million de cellules), suivie d'une extraction par le chloroforme et précipitation des ARN par l'isopropanol. L'ARN extrait est ensuite dosé par spectrophotométrie à 260/280 nm (système NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Afin de réduire une éventuelle contamination par de l'ADN, chaque résidu d'extraction subit une digestion par la DNase I (Sigma-Aldrich) ; la réaction est arrêtée par addition d'une solution tamponnée d'EDTA à 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et chauffage (70 °C, 5 min). Ensuite, 0,5  $\mu\text{g}$  d'ARN sont utilisés pour mener la transcription inverse par une forme modifiée de la Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (Super Script II, Invitrogen) en présence d'hexamères aléatoires (pdN6, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) sous un volume de 50  $\mu\text{L}$ , après dénaturation à 70 °C. L'étape de rétrotranscription se déroule pendant 50 min à 42 °C ; le milieu réactionnel comprend la transcriptase inverse (12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), les déoxynucléotides triphosphate (0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). 5  $\mu\text{L}$  d'ADNc obtenus dilués au 1/10e sont amplifiés par PCR dans une solution de Mix qPCR (SYBR Green, Taq polymérase et dNTP, iQ SYBR Green Supermix, BioRad, Marne-la-Coquette, France) en présence des amorces VI (Eurofins MWG Operon, Anzinger, Allemagne).

Les conditions d'amplification sont les suivantes, dans le thermocycleur PTC-200 (BioRad) piloté par le logiciel Opticon 3 Monitor : une dénaturation générale pendant 3 min à 95 °C, suivie de 39 cycles d'amplification comprenant chacun 10 s de dénaturation à

95 °C, 15 s d'hybridation à 55 °C, et 15 s d'élongation à 72 °C, suivi d'une lecture de fluorescence. En fin de PCR est réalisée une courbe de fusion afin de vérifier, par la détermination de température de fusion ( $T_m$ ), la spécificité de la PCR et l'absence de formation de dimères d'amorces. Les taux relatifs d'expression des ARN d'intérêts sont calculés en utilisant la méthode de comparaison des  $C_t$  (*Threshold cycle*). Le niveau d'expression des gènes est normalisé avec le gène de ménage (gène m) et le facteur d'induction  $FI$  est déterminé par :  $FI=2^{-\Delta\Delta C_t}$ ,

avec  $\Delta\Delta=[C_{t(\text{gène } x)} - C_{t(\text{gène } m)}]_{\text{condition test}} - [C_{t(\text{gène } x)} - C_{t(\text{gène } m)}]_{\text{condition contrôle}}$

Les résultats sont alors interprétés :

- si  $0 \leq FI < 1$ , le gène  $x$  est sous-exprimé, et le facteur de modulation =  $-1/FI$  ;
- si  $FI = 1$ , le gène  $x$  est isoexprimé ;
- si  $FI > 1$ , le gène  $x$  est surexprimé.

### 6.7.6. Étude de la libération IL-6 par la méthode ELISA

La libération d'IL-6 par les cellules microgliales BV-2 est mesurée par ELISA sandwich dans le surnageant de culture. Les cellules sont stimulées par un mélange de LPS 5  $\mu\text{g/mL}$  et IFN- $\gamma$  50 U/mL et mises en présence des molécules selon le schéma expérimental (Figure X). La méthode ELISA est réalisée dans les plaques MaxiSorp de Nunc (France), grâce au kit OptEIA ELISA de BD Biosciences. Après *coating* des puits avec 100  $\mu\text{L}$  d'anticorps de capture dilués au 1/250<sup>e</sup> (4°C, incubation durant la nuit) et saturation par PBS/SVF 10 % (pour éviter les fixations non spécifiques), 100  $\mu\text{L}$  de surnageant sont déposés (incubation de 2 h, température ambiante). L'anticorps secondaire est biotinylé et reconnu par le complexe streptavidine couplée à la peroxydase de raifort (HRP). L'anticorps secondaire dilué au 1/250<sup>e</sup> et HRP sont déposés en même temps sous un volume de 100  $\mu\text{L}$  dans chaque puits, pendant 1 h à température ambiante. Le substrat chromogénique de la peroxydase est la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), distribuée dans chaque puits (100  $\mu\text{L}$ ) sous la forme d'une « solution substrat » (acide citrique monohydraté 55 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  115 mM, TMB 23  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 %). Au bout de 30 min la réaction est arrêtée par 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4 N ; la lecture se fait à 450 nm sur un lecteur de microplaques (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific).

## 6.8. Potentiel antioxydant

L'activité antioxydante a été évaluée au SONAS, selon la technique du DDPH et pour certaines molécules une confirmation a été réalisée en utilisant le test ORAC.

### 6.8.1. Test sur DPPH: activité anti-radicalaire

L'activité antiradicalaire a été évaluée en utilisant le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) en suivant la méthode décrite par Abdel-Lateff *et al.* (Abdel-Lateff *et al.*, 2002) avec quelques modifications.

Dans sa forme radicalaire, le DPPH<sup>•</sup> possède une bande d'absorption à 517 nm, qui disparaît après réduction par un composé antiradicalaire.

Les composés testés et les produits de référence sont solubilisés dans l'éthanol absolu et dilués à différentes concentrations à partir de solutions mères à 1 mg/mL dans le DMSO. Des aliquots de 100 µL de ces solutions sont placés dans des plaques à 96 puits en triplicate pour chaque concentration testée. La réaction est initiée en ajoutant 25 µL d'une solution de DPPH préparée extemporanément (1 mM) et 75 µL d'éthanol absolu, en utilisant un lecteur-injecteur de micro-plaques (Infinite<sup>®</sup> 200, Tecan, France) pour obtenir un volume final de 200 µL. Après 30 min dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'éthanol est utilisé comme blanc, et des dilutions de Trolox (analogue hydrophile de l' $\alpha$ -tocophérol) à 10, 25, 50 et 75 µM sont utilisées pour calibrer les solutions. L'acide chlorogénique (0,02 mg/mL) est utilisé comme témoin positif. L'activité antiradicalaire des échantillons est comparée à la courbe obtenue avec les différentes dilutions de Trolox. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents Trolox (µM d'équivalents Trolox par gramme d'échantillon ou µM TE/µmol pour les composés purs).

### 6.8.2. Test ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity)

Le test est réalisé selon la méthode décrite par Huan *et al.* (2002) (Huang *et al.*, 2002) avec quelques modifications. Ce test mesure la capacité des composés antioxydants à inhiber la diminution de la fluorescence de la fluorescéine qui est induite par un générateur de radical peroxyé : le 2,2'-azobis(2-méthylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH). Cet essai est réalisé en plaques 96 puits. Le mélange réactionnel contient 100 µL

d'un tampon phosphate à 75 mM (pH 7,4), 100  $\mu$ L d'une solution préparée extemporanément de fluorescéine (0,1  $\mu$ M dans un tampon phosphate) et 20  $\mu$ L d'échantillon par puit. Les échantillons sont analysés en triplicate et dilués à différentes concentrations (25  $\mu$ g/mL, 12,5  $\mu$ g/mL, 6,25  $\mu$ g/mL et 3,12  $\mu$ g/mL) à partir de solutions mères à 1 mg/mL dans le DMSO. La fluorescéine, le tampon phosphate et les échantillons sont préincubés à 37°C pendant 10 min. La réaction est initiée par l'addition d'AAPH en utilisant le lecteur-injecteur de micro-plaques (Infinite<sup>®</sup> 200, Tecan, France). La fluorescence est ensuite mesurée et enregistrée pendant 40 min à 520 nm avec une longueur d'excitation de 485 nm. Le tampon phosphate est utilisé comme blanc, et des dilutions de 12,5 ; 25 ; 50 et 75  $\mu$ M de Trolox sont employées comme solutions de calibration. Un échantillon d'acide chlorogénique (8,8  $\mu$ M) est utilisé comme témoin positif. La valeur ORAC est calculée en utilisant une équation de régression entre la concentration en Trolox et l'aire sous la courbe de la fluorescéine et est exprimée en  $\mu$ moles d'équivalents Trolox par g d'échantillon (ou  $\mu$ M TE/ $\mu$ mol pour les composés purs).

. L'aire sous la courbe est calculée en utilisant le logiciel d'analyse Magellan<sup>™</sup> (Tecan, France).

## **6.9. Activité sur la formation des produits terminaux de glycation**

### **6.9.1. Principe**

La méthode retenue pour cribler l'activité des produits inhibiteurs ou destructeurs des produits terminaux de glycation (AGEs pour Advanced Glycation Endproducts) (AGEIB) correspond à la méthode de Vinson *et al.* (Vinson *et al.*, 1996) à laquelle des améliorations sont apportées. Certains AGEs sont fluorescents ; leur formation à partir de l'albumine et de sucres réducteurs peut donc être quantifiée par spectrofluorimétrie.

La méthode de criblage des AGEIB (AGEs Inhibitors or Breakers) se fait en solution, en plaque 96 puits. Une série d'expériences a permis de définir les conditions du test de criblage (Derbre *et al.*, 2009). Elles permettent notamment d'obtenir une quantité maximale d'AGEs en un temps le plus court possible. Ces paramètres sont les suivants :

- Détection des AGEs : fluorescence  $\lambda_{exc}$  370 nm ;  $\lambda_{em}$  440 nm ;
- Nature et concentration de la protéine : Albumine sérique bovine 10 mg/mL ;

- Sucre réducteur : ribose 0,5 M ;
- Conditions physiologiques : 37 °C / tampon phosphate 50 mM pH 7,4 ;
- Durée de l'incubation : 24 h .

### **6.9.2. Protocole**

100 µL de solution constituée par du sérum de veau fœtal : SVF (10 mg/mL), du D-ribose (0,5 M) et les composés (de  $3 \cdot 10^{-6}$  à  $3 \cdot 10^{-3}$  M) ou les extraits à tester (de  $10^{-6}$  à 1 mg/mL) dans un tampon phosphate (50 mM, pH 7,4, NaN<sub>3</sub> 0,02%) sont déposées avec le lecteur-injecteur de micro-plaques (Infinite<sup>®</sup> 200, Tecan, Lyon, France) dans des plaques 96 puits et incubés à 37°C pendant 24 h dans un système fermé avant la mesure de la fluorescence. Pour éviter les problèmes de quenching, la fluorescence résultant de l'incubation avec les mêmes conditions en SVF (10 mg/mL) et les composés testés (de  $3 \cdot 10^{-6}$  à  $3 \cdot 10^{-3}$  M) est soustraite à chaque mesure. Un contrôle négatif (100% d'inhibition) est constitué par des puits contenant uniquement du SVF, alors qu'un contrôle positif est constitué par des puits contenant le SVF (10 mg/mL) et le D-ribose (0,5 m M). La fluorescence (excitation à 370 nm, émission à 440 nm) est mesurée en utilisant le lecteur-injecteur de micro-plaques (Infinite<sup>®</sup> 200, Tecan, Lyon, France), piloté par le logiciel Magellan (Tecan). La CI<sub>50</sub> est ensuite calculée et comparée à celle obtenue avec un composé de référence : l'aminoguanidine ( $5 \pm 3$  mM).

### **6.10. Activité sur l'angiogénèse *ex vivo***

Cette activité a été évaluée au laboratoire de biologie neuro-vasculaire intégrée (UMR-CNRS 6214 INSERM U771, Angers).

L'aorte abdominale est isolée chez des souris Swiss. Des sections transversales de 1 mm d'épaisseur, sont ensuite lavées dans du milieu MCDB131 et transférées dans une plaque 96 puits contenant BDMatrigel<sup>®</sup> (BD Biosciences, San Jose, CA). Les anneaux sont ensuite mis à incuber à 37 °C en milieu pour cellules endothéliales complété par du SVF à 10% pendant 5 jours. Chaque anneau est observé par trois observateurs indépendants et noté sur une échelle de 0 à 5, en fonction du degré de croissace. Une valeur de 0 correspond à une croissance nulle alors que 5 représente une croissance abondante (Li *et al.*, 2004 ; Reed *et al.*, 2007).

## 6.11. Activité insecticide

L'évaluation de l'activité insecticide des composés a été réalisée au sein du laboratoire RCIM (Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires, UPRES EA 2647-USC INRA 2023, Angers). Le modèle biologique utilisé correspond aux cellules neurosecrétices identifiées comme étant les DUM ("Dorsal Unpaired Median") neurones dont les caractéristiques électrophysiologiques ont été clairement identifiées (Partie I.2.3.9.3.). Le protocole expérimental peut se diviser en deux étapes :

- préparation des neurones isolés et maintenus en culture à court-terme obtenus après la dissociation du dernier ganglion abdominal
- étude électrophysiologique à l'aide de la technique de patch-clamp adaptée sur les DUM neurones isolés.

### 6.11.1. Liquides physiologiques et réactifs utilisés

**Tableau 9** : Composition des solutions utilisées lors de la dissociation des DUM neurones

Composition	LP1	LP2	LP3
NaCl (mM)	200		
KCl (mM)	3,1		
MgCl <sub>2</sub> (mM)	5		
CaCl <sub>2</sub> (mM)	4		
HEPES (mM)	10		
Saccharose (mM)	50		
Pénicilline (UI/mL)	100	100	50
Streptomycine (µg/mL)	100	100	50
Collagénase IA (UI/mL)		150	
Sérum de veau fœtal (v/v)			5%
pH (ajusté avec NaOH)	7,4		

**Tableau 10** : composition de la solution intra-pipette utilisée lors des expériences de patch-clamp

Composition	Concentration (mM)
Potassium aspartate	160
KF	10
NaCl	10
MgCl <sub>2</sub>	1
CaCl <sub>2</sub>	0,5
EGTA	10
HEPES	10
ATP-Mg	1
pH (ajusté avec KOH)	7,4

### **6.11.2. Dissociation des DUM neurones efférents**

Les blattes américaines (*Periplaneta americana*) sont des insectes cosmopolites appartenant à l'ordre des blattoptères. Les blattes utilisées dans cette étude proviennent d'un élevage n'ayant jamais été soumis à des traitements insecticides. Les blattes sont élevées à 29°C, en atmosphère humide avec une photopériode 12-h éclaircissement/12-h obscurité.

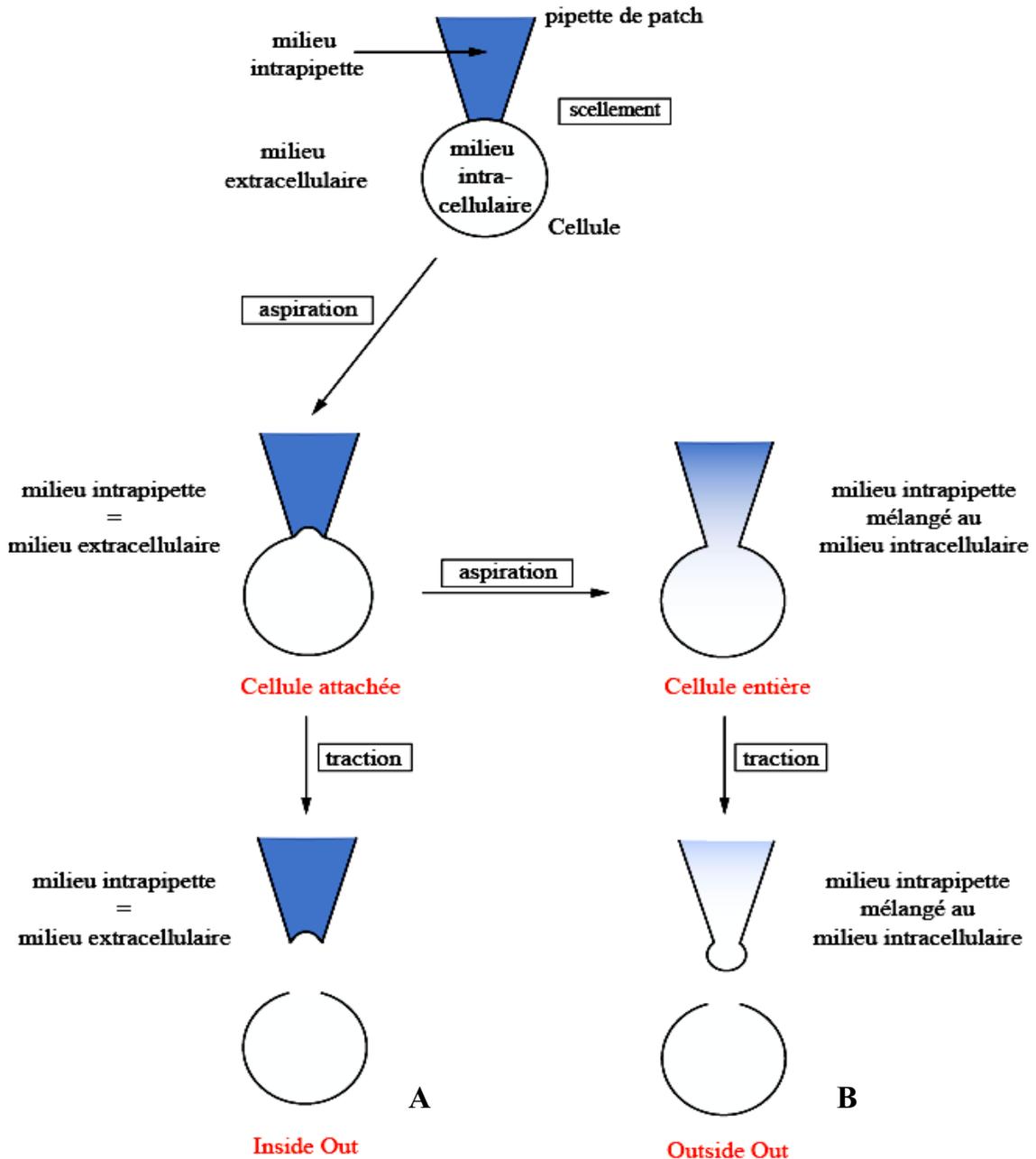
Six blattes mâles sont utilisées et placées en *decubitus* dorsal sur une plaque de polystyrène désinfectée à l'alcool. La cuticule abdominale ventrale est prélevée ainsi que les glandes accessoires du système reproducteur, pour permettre l'accès au dernier ganglion abdominal de la chaîne nerveuse. Les nerfs cercaux X et XI et le connectif du dernier ganglion abdominal sont coupés pour prélever le ganglion. Six derniers ganglions abdominaux sont ainsi isolés et placés dans du liquide physiologique de dissociation (LP1, **tableau 9**). Les ganglions sont ensuite soigneusement nettoyés (des trachées, des nerfs périphériques et des connectifs) à l'aide d'aiguilles montées.

Les 6 ganglions sont ensuite transférés dans un liquide physiologique contenant de la collagénase (LP2, **tableau 9**), et mis à incuber pendant 35 min à 29°C (atmosphère humide). Après 2 rinçages de 5 minutes chacun, les ganglions sont transférés dans un tube à hémolyse contenant le liquide physiologique ou milieu de survie contenant du SVF comme source de nutriments (LP3, **tableau 9**). À l'aide de plusieurs pipettes Pasteur dont les diamètres de pointe ont été réduits à la flamme, les ganglions sont dissociés mécaniquement. Les corps cellulaires ainsi isolés sont déposés dans une boîte de Pétri stérile (35 mm, Falcon, Becton Dickinson Labware, US), dont le fond a été préalablement recouvert de poly-D-lysine (100 µg/mL, Sigma, France) pour faciliter leurs adhérences. Les neurones sont maintenus à 29°C en atmosphère humide pendant 24 h.

### **6.11.3. Patch-clamp**

L'activité spontanée des DUM neurones est enregistrée grâce à la technique de patch-clamp. Cette technique permet d'étudier des courants ioniques à l'échelle de la cellule entière ou d'un canal unique, en isolant électriquement une portion de membrane. Une légère pression négative permet de créer un scellement hermétique entre la pipette de patch et la cellule, avec une résistance électrique de plusieurs méga-ohms. Afin de

travailler sur tous les canaux ioniques et/ou récepteurs d'une cellule, la configuration cellule-entière est employée. Dans ce cas, une pression négative supplémentaire est appliquée, de manière à rompre le fragment de membrane se trouvant sous la pipette. L'intérieur de la pipette est alors en continuité avec le cytoplasme cellulaire (**figure 100**).



**Figure 100** : Différentes configurations possibles pouvant être utilisées dans la technique du patch-clamp. En configuration cellule attachée, inside out (A) ou outside out, une partie de la membrane est isolée électriquement et permet l'étude d'un canal unique. En configuration cellule entière (B), l'ensemble des courants ioniques est exploré.

Le courant macroscopique dépend de plusieurs facteurs, de telle sorte que :

$$I = N \cdot P_{o(t,v)} \cdot i$$

(avec I = courant macroscopique, N = nombre de canaux,  $P_o$  = probabilité d'ouverture à un instant t et un potentiel V donnés et i = courant élémentaire (unitaire))

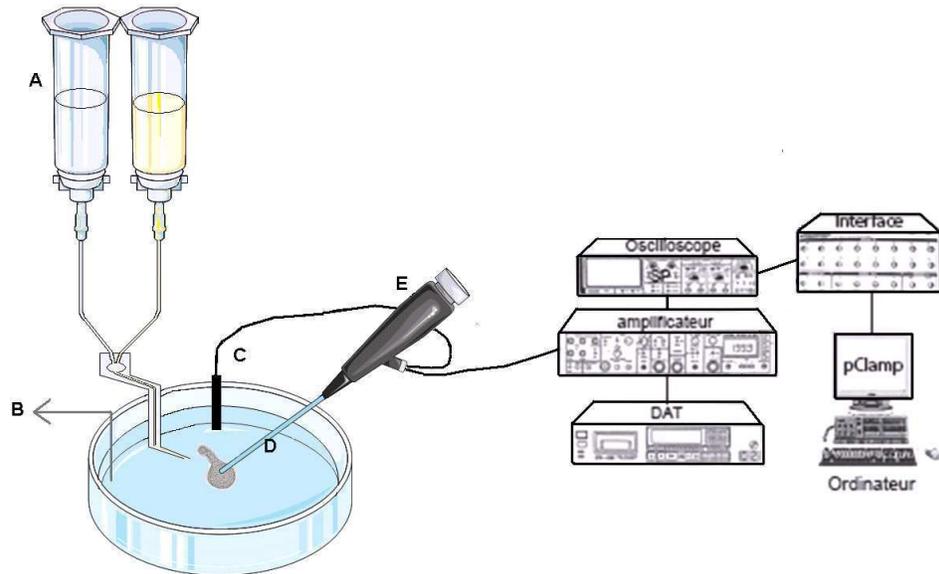
Dans ces conditions, il est possible d'étudier l'évolution du potentiel de membrane en mode courant-imposé ("current-clamp") ou d'étudier l'évolution du courant selon le potentiel imposé ("voltage-clamp"), tout en contrôlant les milieux intracellulaire et extracellulaire. Ici, nous avons uniquement travaillé en mode courant-imposé.

Après 24 heures d'incubation, les neurones DUM efférents en culture dans LP3 sont placés sur la platine d'un microscope inversé (Olympus CK2, Olympus, France) posé sur une table anti-vibratoire se trouvant à l'intérieur d'une cage de Faraday. Les cellules étudiées, c'est-à-dire les neurones DUM octopaminergiques, se distinguent des autres cellules par deux critères :

- morphologique : ces neurones sont piriformes, et de grande taille (diamètre compris entre 30 et 60  $\mu\text{m}$ ),
- électrophysiologique : les neurones DUM présentent une activité électrique spontanée (Grolleau *et al.*, 2000), qu'il est aisé de confirmer en mode courant-imposé.

Un système de perfusion gravimétrique multicanal (**Figure 101, A**) permet d'irriguer les neurones de manière continue avec du liquide extracellulaire (LP3, **Tableau 9**), à un débit constant. Un système d'aspiration (**Figure 101, B**) permet de maintenir constant le volume du liquide extracellulaire. Les solutions à tester sont également appliquées par le système de perfusion. Les pipettes de patch-clamp (**Figure 101, D**) sont étirées à partir de capillaires en verre borosilicaté (GC 150T-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) à l'aide d'une étireuse P-97 (Sutter instrument, Novato, US), puis remplies avec du liquide intra-pipette (**Tableau 10**) et fixées à la partie mobile de l'amplificateur opérationnel ou "tête d'amplificateur" (**Figure 101, E**). Leurs résistances sont de l'ordre de 2 M $\Omega$ . L'ensemble est porté par un micromanipulateur piézo-électrique (Burleigh TS-5000-150, Burleigh instruments, New- York, USA). Les courants totaux sont enregistrés grâce à un amplificateur (Axopatch 200B, Axon instruments, Foster City, USA), avec filtre à 5kHz. L'amplificateur est connecté à un oscilloscope (Nicolet 310, Nicolet instruments, Madison, USA), un stimulateur (SMP-310, Biologic, Claix, France) et un ordinateur par l'intermédiaire d'une interface (Digidata 1322 interface, Axon

instruments, Foster City, US). L'activité électrique spontanée (PA) des neurones est enregistrée à l'aide du logiciel pClamp8 (8.0.2., Axon Instruments, Foster City, USA).



**Figure 101** : Représentation de l'installation de patch-clamp : le liquide extra-cellulaire, ainsi que les solutions à tester, sont perfusés de manière continue à l'aide d'un système de perfusion gravimétrique multicanal (A). Un système d'aspiration (B) permet de maintenir un volume constant dans la boîte de culture. La pipette de patch-clamp (D) est fixée à la partie mobile de la tête d'amplificateur (E). L'amplificateur mesure les différences de potentiel entre la pipette de patch-clamp (D) et l'électrode de référence (C).

## Références bibliographiques

Abdel-Lateff A., Konig G.M., Fisch K.M., Holler U., Jones P.G. and Wright. A.D. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products* **2002**; 65: 1605-1611.

Adisakwattana S., Roengsamran S., Hsu W.H. and Yibchok-Anun S. Mechanisms of antihyperglycemic effect of *p*-methoxycinnamic acid in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences* **2005**; 78: 406-412.

Ahmed-Belkacem A., Pozza A., Munoz-Martinez F., Bates S.E., Castanys S., Gamarro F., Petro A.D. and Perez-Victoria J.M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Research* **2005**; 65: 4852-4860.

Akashi T., Aoki T. and Ayabe S.I. Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydrase. Involvement of carboxyesterase-like proteins in Leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiology* **2005**; 137: 882-891.

Al-Maharik N. and Botting N.P. Synthesis of lupiwightone *via* a para-Claisen–Cope rearrangement. *Tetrahedron* **2003**; 59: 4177–4181.

Almeida J.G.L., Silveira E.R. and Pessoa O.D.L. NMR spectral assignments of a new [C-O-C] isoflavone dimer from *Andira surinamensis*. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2008**; 46: 103-106.

Alvarez A., Real R., Perez M., Mendoza G., Prieto J.G. and Merino G. Modulation of the activity of ABC Transporters (P-Glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**; 99: 598-617.

Andres A., Donovan S.M. and Kuhlenschmidt M.S. Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2009**; 20: 563-569.

Androutsopoulos V.P., Papakyriakou A., Vourloumis D., Tsatsakis A.M. and Spandidos D.A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics* **2010**; 126: 9-20.

APG. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2009**; 161: 105-121.

Arung E.T., Yoshikawa K., Shimizu K. and Kondo R. Isoprenoid-substituted flavonoids from wood of *Artocarpus heterophyllus* on B16 melanoma cells: cytotoxicity and structural criteria. *Fitoterapia* **2010**; 81: 120-123.

Asztemborska M. and Zukowski J. Determination of diastereomerization barrier of some flavanones by high-performance liquid chromatography methods. *Journal of Chromatography A* **2006**; 1134: 95-100.

Barron D. and Ibrahim R.K. Isoprenylated flavonoids-a survey. *Phytochemistry* **1996**; 43: 921-982.

Batista R., Junior A.D.J.S. and Oliveira A.B.D. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicine. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* **2009**; 14: 3038-3072.

Bentham G. A synopsis of the Dalbergieae, a tribe of the Leguminosae. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society* **1860**; 4: 1-134.

Berthod A., Hassoun M. and Ruiz-Angel M.J. Alkane effect in the Arizona liquid systems used in countercurrent chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**; 383: 327-340.

Betarbet R., Sherer Y.B., Mackenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V. and Greenamyre J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Natural Neuroscience* **2000**; 3: 1301-1306.

Bhanumati S., Chhabra S.C., Gupta S.R. and Krishnamoorthy V. Cajaflavanone : a new flavanone from *Cajanus cajan*. *Phytochemistry* **1978**; 17: 2045.

Bocchini V., Barluzzi R., Blasi E., Sick P. and Kettenmann H. An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *Journal of Neuroscience Research* **1992**; 31: 616-621.

Boersma B.J., Barnes S., Kirk M., Wang C.C., Smith M., Kim H., Xu J., Patel R. and Darley-Usmar V.M. Soy isoflavonoids and cancer-metabolism at the target site. *Mutation Research* **2001**; 480: 121-127.

Botta B., Menendez P., Zappia G., Lima R.A.D., Torge R. and Monache G.D. Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry* **2009**; 16: 3414-3468.

Brand W., Shao J., Hil E.F.H.-V.D., Elk K.N.V., Spenkelink B., Haan L.H.J.D., Rein M.J., Dionisi F., Williamson G., Bladeren P.J.V. and Rietjens I.M.C.M. Stereoselective conjugation, transport and bioactivity of S- and R-hesperetin enantiomers *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**; 58: 6119-6125.

- Brandli A., Simpson J.S. and Ventura S. Isoflavones isolated from red clover (*Trifolium pratense*) inhibit smooth muscle contraction of the isolated rat prostate gland. *Phytomedicine* **2010**; 17: 895-901.
- Brasseur T. and Angenot L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG : un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *Journal of Chromatography* **1986**; 351: 351-355.
- Bruneton J. Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. (2009). Paris: Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales; 1292 p.
- Burrows M. The Neurobiology of an Insect Brain. Oxford. *University Press, Oxford, UK* **1996**; 682.
- Caccamese S., Manna L. and Scivoli G. Chiral HPLC Separation and CD Spectra of the C-2 diastereomers of naringin in grapefruit during maturation. *Chirality* **2003**; 15: 661-667.
- Caccamese S., Bianca S. and Santo D. Racemization at C-2 of naringin in sour oranges with increasing maturity determined by chiral high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**; 55: 3816-3822.
- Caccamese S. and Chillemi R. Racemization at C-2 of naringin in pummelo (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2010**; 1217: 1089-1093.
- Calow P. Handbook of ecotoxicology (1993). Oxford: Blackwell Science,  
 Chan Y.Y., Wu T.S. and Ku Y.H. Chemical constituents and cytotoxicity from the stem bark of *Citrus medica*. *Heterocycles* **2009**; 78: 1309-1316.
- Chan Y.Y., Li C.H., Shen Y.C. and Wu T.S. Anti-inflammatory principles from the stem and root barks of *Citrus medica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2010**; 58: 61-65.
- Chatenet C. Les phytoestrogènes. *Actualités pharmaceutiques* **2008**; 473: 10-23.
- Chen H.Q., Wang X.J., Jin Z.Y., Xu X.M., Zhao J.W. and Xie Z.J. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons. *Neuroscience Research* **2008**; 62: 123-130.
- Chen L.W., Cheng M.J., Peng C.F. and Chen I.S. Secondary metabolites and antimycobacterial activities from the roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry and Biodiversity* **2010**; 7: 1814-1821.
- Chen Q.C., Zhang W.Y., Jin W., Lee I.S., Min B.S., Jung H.J., Na M., Lee S. and Bae K. Flavonoids and isoflavonoids from Sophorae flos improve glucose uptake *in vitro*. *Planta Med* **2010**; 76: 79-81.
- Chibber S.S. and Sharma R.P. Robustigenin, a new isoflavone from *Derris robusta* seed shells. *Phytochemistry* **1979**; 18: 1082.

Chibber S.S., Sharma R.P. and Dutt S.K. Rubone, a new chalcone from *Derris robusta* seed shells. *Phytochemistry* **1979**; 18: 2056.

Cicchetti F., Drouin-Ouellet J. and Gross R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends in Pharmacological Sciences* **2009**; 30: 475-483.

Colabufo N.A., Berardi F., Cantore M., Contino M., Inglese C., Niso M. and Perrone R. Perspectives of P-Glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**; 53: 1883-1897.

Corbett J.R., Wright K. and Baillie A. Herbicide interfering with photosynthesis Herbicide interfering with photosynthesis. In *The Biochemical Mode of Action of Pesticides* (1984). Cornwell T., Cohick W. and Raskin I. Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* **2004**; 65: 995-1016.

Costa C., Belcastro V., Tozzi A., Filippo M.D., Tantucci M., Siliquini S., Autuori A., Picconi B., Spillantini M.G., Fedele E., Pittaluga A., Raiteri M. and Calabresi P. Electrophysiology and pharmacology of striatal neuronal dysfunction induced by mitochondrial complex I inhibition. *The Journal of Neuroscience* **2008**; 28: 8040-8052.

Crombie L., Josephs J.L., Cayley J., Larkin J. and Weston J.B. The rotenoid core structure: modifications to define the requirements of the toxophore. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1992**; 2: 13-16.

Crombie L. and Whiting D.A. Biosynthesis in the rotenoid group of natural products: applications of isotope methodology. *Phytochemistry* **1998**; 49: 1479-1507.

Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology* **2006**; 9: 99-103.

Crozier A., Jaganath I.B. and Clifford M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* **2009**; 26: 965-1096.

Cushnie T.P.T. and Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2005**; 26: 343-356.

Cuyckens F. and Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**; 39: 1-15.

Daskiewicz J.B., Bayet C. and Barron D. Regioselective syntheses of 6-(1,1-dimethylallyl)- and 8-(3,3-dimethylallyl) chrysin. *Tetrahedron* **2002**; 58: 3589-3595.

Defaix A. and Lapied B. Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invertebrate Neuroscience* **2005**; 5: 135-146.

Derbre S., Gatto J., Pelleray A., Coulon L., Seraphin D. and Richomme P. Automating a 96-well microtiter plate assay for identification of AGEs inhibitors or inducers: application

to the screening of a small natural compounds library. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**; 398: 1747-1758.

Desjardins R.E., Canfield C.J., Haynes J.D. and Chulay J.D. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**; 710-718.

Dezhao C. and Pedley L. *Derris. Flora of China* **2010**; 10: 166-170.

Dixon R.A. and Steele C.L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **1999**; 4: 394-400.

Dixon R.A. and Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry* **2002**; 60: 205-211.

Dizhbite T., Telysheva G., Jurkane V. and Viesturs U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants. *Bioresource Technology* **2004**; 95: 309-317.

Donavan J.L., Crespy V., Oliveira M., Gibson K.A. and Williamson. G. (β)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Radical Research* **2006**; 40: 1029-1034.

Drechsel D.A. and Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine* **2008**; 44: 1873-1886.

Dufall K.G., Ngadjui B.T., Simeon K.F., Abegaz B.M. and Croft K.D. Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia mannii*. *Journal of Ethnopharmacology* **2003**; 87: 67-72.

Dugravot S., Grolleau F., Macherel D., Rochetaing A., Hue B., Stankiewicz M., Huignard J. and Lapied B. Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect KATP channels. *Journal of Neurophysiology* **2003**; 90: 259-270.

Dupont F. and Guignard J.L. *Abrégé de Botanique* 14ème édition (**2007**). Editions Masson, Paris; 285 p.

Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M. Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* **2007**; 68: 939-953.

Etzion Y. and Muslin A.J. The application of phenotypic high-throughput screening techniques to cardiovascular research. *Trends in Cardiovascular Medicine* **2009**; 19: 207-212.

Falshaw C.P., Harmer R.A., Ollis W.D. and Wheeler R.E. Natural occurrence of 3-aryl-4-hydroxycoumarins. Part II. Phytochemical examination of *Derris scandens* (Roxb.) Benth. *Journal of the Chemical Society* **1969**; 374-382.

- Farber K. and H.Kettenmann. Physiology of microglial cells. *Brain Research Reviews* **2005**; 48: 133-143.
- Favilla M., Macchia L., Gallo A. and Altomare C. Toxicity assessment of metabolites of fungal biocontrol agents using two different (*Artemia salina* and *Daphnia magna*) invertebrate bioassays. *Food and Chemical Toxicology* **2006**; 44: 1922-1931.
- Fomum Z. T., Ayafor J. F., Wandji J. Senegalensein, a novel prenylated flavanone from *Erythrina senegalensis*. *Journal of Natural Products* **1987**; 50: 921-922.
- Foucault A.P. Centrifugal Partition Chromatography: Chromatographic Science Series (1994). Marcel Dekker Inc, New York: 432 p.
- Fowler Z.L. and Koffas M.A.G. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**; 83: 799-808.
- Fukai T., Sakagami H., Toguchi M., Takayama F., Iwakura I., Atsumi T., Ueha T., Nakashima H. and Nomura T. Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. *Anticancer Research* **2000**; 20: 2525-2536.
- Ganapaty S., Josaphine J.S. and Thomas P.S. Anti-inflammatory activity of *Derris scandens*. *Journal of Natural Remedies* **2006**; 6: 73-76.
- Gao X.F., Wei W. and Cheng H. Rotenone inhibits delayed rectifier K<sup>+</sup> current via a protein kinase A-dependent mechanism. *Neuroreport* **2008**; 19: 1401-1405.
- Garcia M., Kano M.H.C., Vieira D.M., Nascimento M.C.D. and Mors W.B. Isoflavonoids from *Derris spruceana*. *Phytochemistry* **1986**; 25: 2425-2427.
- Garo E., Wolfender J.L., Hiller W., Antus S., Mavi S. and Hostettmann K. Prenylated flavanones from *Monotes engleri*: on-line structure elucidation by LC/UV/NMR. *Helvetica Chimica Acta* **1998**; 81: 754-763.
- Gester S., Metz P., Zieraub O. and Vollmer G. An efficient synthesis of the potent phytoestrogens 8-prenylnaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin by europium(III)-catalyzed Claisen rearrangement. *Tetrahedron* **2001**; 57: 1015-1018.
- Grayer R.J. and Harborne J.B. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* **1994**; 37: 19-42.
- Griensven J., Balasegaram M., Meheus F., Alvar J., Lynen L. and Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *The Lancet Infectious disease* **2010**; 10: 184-194.
- Grolleau F. and Lapied B. Transient Na<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in beating pacemaker-isolated adult insect neurosecretory cells (DUM neurones). *Neuroscience Letters* **1994**; 167: 46-50.

- Grolleau F. and Lapied B. Separation and identification of multiple potassium currents regulating the pacemaker activity of insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Journal of Neurophysiology* **1995**; 73: 160-171.
- Grolleau F. and Lapied B. Two distinct low-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents contribute to the pacemaker mechanism in cockroach dorsal unpaired median neurons. *Journal of Neurophysiology* **1996**; 76: 963-976.
- Grolleau F. and Lapied B. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *The Journal of Experimental Biology* **2000**; 203: 1633-1648.
- Grolleau F., Stankiewicz M., Kielbasiewicz E., Martin-Eauclaire M.F., Lavialle C., Vente J.D. and Lapied B. Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry is the final step involved in the neurotoxic effect of *Tityus serrulatus* scorpion b-toxin. *European Journal of Neuroscience* **2006**; 23: 1465-1478.
- Guerin P.J., Oliario P., Sundar S., Boelaert M., Simon S.L., Desjeux P., Wasunna M.K. and Bryceson A.D.M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious disease* **2002**; 2: 494-501.
- Gupta A., Siddiqui I.R., Singh J. and Sharma J.P. Flavone and isoflavone derivative from the seeds of *Derris robusta* with pods. *Indian Journal of Chemistry* **1998**; 37: 419-421.
- Halbwirth H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences* **2010**; 11: 595-621.
- Harborne J.B., Greenham J., Williams C.A., Eagles J. and Markham K.R. Ten isoprenylated and C-methylated flavonoids from the leaves of three *Vellozia* species. *Phytochemistry* **1993**; 34: 219-226.
- Harborne J.B. and Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**; 55: 481-504.
- Harborne J.B. and Williams C.A. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* **2001**; 18: 310-333.
- Hartl M. and Humpf H.U. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology* **2000**; 38: 1097-1102.
- Heide L. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**; 13: 171-179.
- Helesbeux J.J., Guilet D., Seraphin D., Duval O., Richomme P. and Bruneton J. Orthoprenylphenol photooxygenation as a straightforward access to ortho-(2-hydroxy-3-methylbut-3-enyl)phenols. *Tetrahedron Letters* **2000**; 41: 4559-4562.
- Helesbeux J.J., Duval O., Seraphin D., Roussakis C. and Richomme P. Synthesis and Cytotoxic Activity Against a Non-small-cell Bronchopulmonary Carcinoma Line

(NSCLC-N6) of Benzofuran Enantiomeric Derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2003**; 18: 159-165.

Hlywka J.J., Beck M.M. and Bullerman L.B. The use of the chicken embryo screening test and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays to assess the toxicity of fumonisin B1 mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* **1997**; 35: 991-999.

Hodek P., Trefil P. and Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* **2002**; 139: 1-21.

Hostettmann K., Marston A. and Hostettmann M. Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation 2<sup>nd</sup> edition (**1998**). Springer, Berlin.

Hu J.M., Lavin M., Wojciechowski M.F. and Sanderson M.J. Phylogenetic systematics of the tribe Millettiae (Leguminosae) based on chloroplast *TRNK/MATK* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilinoideae. *American Journal of Botany* **2000**; 87: 418-430.

Huang D., Ou B., Hampsch-Woodil M., Flanagan J.A. and Prior R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**; 50: 4437-4444.

Innok P., Rukachaisirikul T. and Suksamrarn A. Flavonoids and Pterocarpan from the Bark of *Erythrina fusca*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2009**; 57: 993-996.

Itoigawa M., Ito C., Ju-Ichi M., Nobukuni T., Ichiishi E., Tokuda H., Nishino H. and Furukawa H. Cancer chemopreventive activity of flavanones on Epstein-Barr virus activation and two-stage mouse carcinogenesis. *Cancer Letters* **2002**; 176: 25-29.

Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* **2000**; 113: 287-299.

Izumi E., Ueda-Nakamura T., Filho B.P.D., Junior V.F.V. and Nakamura C.V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Products Reports* **2011**; 28: 809-823.

Jamali K., Shinkaruk S., Lamothe V., Potier M. and Enneta-Pelissero C. Phyto-estrogènes et le déclin mnésique hippocampo-dépendant lié à l'âge. *Médecine et Longévité* **2010**; 2: 12-21.

Jang D.S., Cuendet M., Hawthorne M.E., Kardono L.B.S., Kawanishi K., Fong H.H.S. and Mehta R.G. Prenylated flavonoids of the leaves of *Macaranga conifera* with inhibitory activity against cyclooxygenase-2. *Phytochemistry* **2002**; 61: 867-872.

Jang D.S., Cuendet M., Pawlus A.D., Kardono L.B.S., Kawanishi K., Farnsworth N.R., Fong H.H.S., Pezzuto J.M. and Kinghorn A.D. Potential cancer chemopreventive constituents of the leaves of *Macaranga triloba*. *Phytochemistry* **2004**; 65: 345-350.

Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. and Rodriguez-Garcia I. Pterocarpan : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews* **2008**; 7: 125-154.

Jones H.A. Colorimetric evaluation of *Derris* and Cube roots. *Industrial and Engineering Chemistry* **1939**; 11: 429-431.

Kale A., Gawande S. and Kotwal S. Cancer phytotherapeutics : role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research* **2008**; 22: 567-577.

Kaur K., Jain M., Kaur T. and Jain R. Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**; 17: 3229-3256.

Kayser O., Kiderlen A.F. and Croft S.L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research* **2003**; 90: S55-S62.

Khaomek P., Ichino C., Ishiyama A., Sekiguchi H., Namatame M., Ruangrunsi N., Saifah E., Kiyohara H., Otaguro K., Omura S. and Yamada H. *In vitro* antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *Journal of the Natural Medicine* **2008**; 62: 217-220.

Kim J., Lee H.S., Park K.S. and Chong Y. Unexpected desilylative-alkylation of 3-*O*-*tert*-butyl-dimethylsilyl galangin. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2008**; 29: 1667-1668.

Kim N.J., Byun S.G., Cho J.E., Chung K. and Ahn Y.J. Larvicidal activity of *Kaempferia galanga* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. *Pest Management Science* **2008**; 64: 857-862.

Kim Y.H., Lee E.S., Koonchanok N.M., Geahlen R.L., C.L.Ashendel and Chang C.J. Prenylated flavanones from *Derris laxiflora*. *Natural Product Letters* **1995**; 6: 223-231.

Kitaoka M., Kadokawa H., Sugano M., Ichikawa K., Taki M., Takaishi S., Lijima Y., Tsutsumi S., Boriboon M. and Akiyama T. Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringin and initial study on its structure-activity relationship. *Planta Medica* **1998**; 64: 511-515.

Ko W.C., Shib C.M., Lai Y.H., Chen J.H. and Huang H.L. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* **2004**; 68: 2087-2094.

Koysomboon S., Altena I.V., Kato S. and Chantrapromma K. Antimycobacterial flavonoids from *Derris indica*. *Phytochemistry* **2006**; 67: 1034-1040.

Kraft C., Jenett-Siems K., Siems K., Gupta M.P., Bienzle U. and Eich E. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**; 73: 131-135.

- Krause M. and Galensa R. High-performance liquid chromatography of diastereomeric flavanone glycosides in *Citrus* on a  $\beta$ -cyclodextrin-bonded stationary phase (Cyclobond I). *Journal of Chromatography A* **1991**; 588: 41-45.
- Kretzschmar G., Zierau O., Wober J., Tischer S., Metz P. and Vollmer G. Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2010**; 118: 1-6.
- Krishnan S. and Ghose T.P. *Derris ferruginea* Benth from Assam. *Current Science* **1938**; 6: 22.
- Lagarto-Parra A., Yhebra R.S., Sardinias I.G. and Buella L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* **2001**; 8: 395-400.
- Lamba S.S. Indian piscicidal plants. *Economic Botany* **1970**; 24: 134-136.
- Lapcik O. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? *Phytochemistry* **2007**; 68: 2909-2916.
- Lapied B., Stankiewicz M., Grolleau F., Rochat H., Zlotkin E. and Pelhate M. Biophysical properties of scorpion alpha-toxin sensitive background sodium channel contributing to the pacemaker activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *European Journal of Neuroscience* **1999**; 11: 1449-1460.
- Lapied B., Grolleau F. and Sattelle D.B. Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels. *British Journal of Pharmacology* **2001**; 132: 587-595.
- Laughlin J.L.M., Rogers L.L. and Anderson J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* **1998**; 32: 513-524.
- Lavialle-Defaix C., Gautier H., Defaix A., Lapied B. and Grolleau F. Differential regulation of two distinct voltage dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J Neurophysiol* **2006**; 96: 2437-2450.
- Lavin M., Eshbaugh E., Hu J.M., Mathews S. and Sharrock R.A. Monophyletic subgroups of the tribe Millettieae (Leguminosae) as revealed by phytochrome nucleotide sequence data. *American Journal of Botany* **1998**; 85: 412-433.
- Leopoldini M., Russo N. and Toscano M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* **2010**; 125: 288-306.
- Lepape P., Pagniez F. and Abdala H. A new fluorometric method for anti-Leishmania drug screening on axenic amastigotes. *Acta Parasitologica* **2003**; 4: 301-305.
- Lephart E.D., West T.W., Weber K.S., Rhees R.W., Setchell K.D.R., Adlercreutz H. and Lund T.D. Neurobehavioral effects of dietary soy phytoestrogens. *Neurotoxicology and Teratology* **2002**; 24: 5-16.

Lescure F.X., Loup G.L., Freilij H., Develoux M., Paris L., Brutus L. and Pialoux G. Chagas disease: changes in knowledge and management. *The Lancet Infectious disease* **2010**; 10: 556-570.

Li Q. and Olsen B.R. Increased angiogenic response in aortic explants of collagen XVIII/endostatin-null mice. *Am J Pathol* **2004**; 165: 415-424.

Liang Y.C., Tsai S.H., Tsai D.C., Lin-Shiau S.Y. and Lin J.K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-Q by favonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters* **2001**; 496: 12-18.

Lin Y.L., Chen Y.L. and Kuo Y.H. Three new flavonoids, 3'-methoxylupinifolin, laxifolin, and isolaxifolin from the roots of *Derris laxiflora* Benth. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1991**; 39: 3132-3135.

Lin Y.L., Chen Y.L. and Kuo Y.H. Two new flavanones and two new chalcones from the root of *Derris laxiflora* BENTH. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **1992**; 40: 2295-2299.

Lobo L.T., Silva G.A.D., Ferreira M., Silva M.N.D., Santos A.S., Arruda A.C., Guilhon G.M.S.P., L.S.Santos, Borges R.D.S. and Arruda M.S.P. Dihydroflavonols from the leaves of *Derris urucu* (Leguminosae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**; 20: 1082-1088.

Lu H.Y., Liang J.Y., Yu P. and Qu W. Isoflavones and Their Derivatives from the Root of *Derris elliptica* (Roxb.) Benth. *Chinese Journal of Natural Medicines* **2008**; 6: 265-267.

Luo J.R., Jiang H.E., Zhao Y.X., Zhou J. and Qian J.F. Components of the heartwood of *Populus euphratica* from an ancient tomb. *Chemistry of Natural Compounds* **2007**; 44: 6-9.

Lutz R.P. Catalysis of the Cope and Claisen rearrangements. *Chemical Reviews* **1984**; 84: 205-247.

Mabry T.J., Markham K.R. and Thomas M.B. The systematic identification of flavonoids (1970). Berlin-Heidelberg-New York: 354 p.

Magadula J.J. and Erasto P. Bioactive natural products derived from the East African flora. *Natural Products Reports* **2009**; 26: 1535-1554.

Mahabusarakam W., Deachathai S., Phongpaichit S., Jansakul C. and Taylor W.C. A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens* Benth. *Phytochemistry* **2004**; 65: 1185-1191.

Mahidol C., Prawat H., Ruchirawat S., Lihkitwitayawuid K., Lin L.-Z. and Cordell G.A. Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. *Phytochemistry* **1997**; 45: 825-829.

Mahidol C., Prawat H., Kawetripob W. and Ruchirawat S. Two New Pyranoflavanones from the Stems *Derris reticulata*. *Heterocycles* **2002**; 57: 1287-1292.

- Marie P. and Halbout P. OPG/RANKL Implication et cible thérapeutique dans l'ostéoporose. *Médecine/Sciences* **2008**; 24: 105-109.
- Marston A. and Hostettmann K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A* **2006**; 1112: 181-194.
- Marston A. Role of advances chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* **2007**; 68: 2785-2797.
- Matsuda H., Wang T., Managi H. and Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**; 11: 5317-5323.
- Maver M., Queiroz E.F., Wolfender J.L. and Hostettmann K. Flavonoids from the stem of *Eriophorum scheuchzeri*. *Journal of Natural Products* **2005**; 68: 1094-1098.
- Mckeage M.J. and Baguley B.C. Disrupting established tumor blood vessels: an emerging therapeutic strategy for cancer. *Cancer* **2010**; 116: 1859-71.
- Meragelman K.M., Mckee T.C. and Boyd M.R. Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. *Journal of Natural Products* **2001**; 64: 546-548.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E. and Mclaughlin J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **1982**; 45: 31-34.
- Milligan S., Kalita J., Pocock V., Heyerick A., Cooman L.D., Rong H. and Keukeleire D.D. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction* **2002**; 123: 235-242.
- Miyazawa M. and Hisama M. Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**; 51: 6413-6422.
- Mladinka P., Zatloukalova L., Filipsky T. and Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* **2010**; 49: 963-975.
- Morel C., Seraphin D., Teyrouz A., Larcher G., Bouchara J.P., Litaudon M. and Richomme P. New and antifungal xanthenes from *Calophyllum caledonicum*. *Planta Medica* **2001**; 67: 1-4.
- Morel S., Landreau A., Nguyen V.H., Débré S., Grellier P., Le Pape P., Pagniez F., Litaudon M., Richomme P. Preparative isolation, Fast Centrifugal Partition Chromatography purification and biological activity of cajanflavanone from *Derris ferruginea* stems. *Phytochemical analysis*. Accepted le 14/04/2011.
- Moret V., Laras Y., Cresteil T., Aubert G., Ping D.Q., Di C., Barthelemy-Requin M., Beclin C., Peyrot V., Allegro D., Rolland A., Angelis F.D., Gatti E., Pierre P., Pasquini L., Petrucci E., Testa U. and Kraus J.L. Discovery of a new family of bis-8-hydroxyquinoline

substituted benzylamines with pro-apoptotic activity in cancer cells: synthesis, structure-activity relationship, and action mechanism studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**; 44: 558-567.

Moretti C. and Grenand P. Plants poisonous for fish in French Guyana. *Journal of Ethnopharmacology* **1982**; 6: 139-160.

Mori-Hongo M., Takimoto H., Katagiri T., Kimura M., Ikeda Y. and Miyase T. Melanin synthesis inhibitors from *Lespedeza floribunda*. *Journal of Natural Products* **2009**; 72: 194-203.

Morton M.S., Turkes A., Denis L. and Griffiths K. Can dietary factors influence prostatic disease. *British Journal of Urology International* **1998**; 84: 549-554.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**; 65: 55-63.

Nakazono Y., Watanabe Y., Hashinaga F. and Tadera K. Studies on antimicrobial and antioxydative substance of Yuzu (*Citrus junos* hort. ex Tanaka) seed. *Journal of Biological Sciences* **2006**; 6: 135-139.

Nascimento M.C.D., Diaz R.L.D.V. and Mors W.B. Flavonoids of *Derris obtusa*: aurones and auronols. *Phytochemistry* **1976**; 15: 1553-1558.

Nascimento M.C.D. and Mors W.B. Flavonoids of *Derris araripensis*. *Phytochemistry* **1981**; 20: 147-152.

Newmann D. and Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **2007**; 70: 461-477.

Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Dongo E., Tamboue H. and Fogue K. Germanylated and prenylated flavonoids from the twigs of *Dorstenia mannii*. *Phytochemistry* **1998**; 48: 349-354.

Ngadjui B.T., Kouam S.F., Dongo E., Kapche G.W.F. and Abegaz B.M. Prenylated flavonoids from the aerial parts of *Dorstenia mannii*. *Phytochemistry* **2000**; 55: 915-919.

Nicholson R.A., David L.S., Pan R.L. and Liu X.M. Pinostrobin from *Cajanus cajan* (L.) Millsp. inhibits sodium channel-activated depolarization of mouse brain synaptoneuroosomes. *Fitoterapia* **2010**; 81: 826-829.

Nikolic D., Li Y., Chadwick L.R., Grubjesic S., Schwab P., Metz P. and Breemen R.B.V. Metabolism of prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **2004**; 32: 272-279.

Nishizaki Y. and Ishimoto Y. Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on *in vitro* reporter gene assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**; 19: 4706-4710.

Omisore N.O.A., Adewunmi C.O., Iwalewa E.O., Ngadjui B.T., Adenowo T.K., Abegaz B.M., Ojewole J.A. and Watchueng J. Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2005**; 38: 1087-1094.

Patel R.P., Boersma B.J., Crawford J.H., Hogg N., Kirk M., Kalyanaraman B., Parks D.A., Barnes S. and Darley-Usmar V. Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**; 31: 1570-1581.

Pauli G.F., Pro S.M. and Friesen B. Countercurrent separation of natural products. *Journal of Natural Products* **2008**; 71: 1489-1508.

Paulo A. and Mota-Filipe H. Effects of some natural 5-hydroxy-isoflavones on cultured human endothelial cells in presence and absence of hydrogen peroxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2006**; 58: 101-105.

Pelletier J.C. and Kincaid S. Mitsunobu reaction modifications allowing product isolation without chromatography: application to a small parallel library. *Tetrahedron Letters* **2000**; 41: 797-800.

Pierini R., Gee J.M., Belshaw N.J. and Johnson I.T. Flavonoids and intestinal cancers. *British Journal of Nutrition* **2008**; 99: 53-59.

Pisco L., Kordian M., Peseke K., Feist H., Michalik D., Estrada E., Carvalho J., Hamilton G., Rando D. and Quincoces J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2006**; 41: 401-407.

Rahman A.A. and Moon S.S. Antimicrobial phenolic derivatives from *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum* Kitamura (Asteraceae). *Arch. Pharm Res* **2007**; 30: 1374-1379.

Ramachandran-Nair A.G. and Seetharaman T.R. Rhamnetin-3-*O*-neohesperidoside, a new flavonoid from the leaves of *Derris trifoliata*. *Journal of Natural Products* **1986**; 49: 710-711.

Rao M.N., Krupadanam G.L.D. and Srimannarayana G. Four isoflavones and two 3-aryl coumarins from stems of *Derris scandens*. *Phytochemistry* **1994**; 37: 267-269.

Rao N.V.S. and Seshadri T.R. Chemical examination of plant insecticides. Part I. Chemical components of *Derris ferruginea*. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **1946**; 24: 344-348.

Rao R.R., Tiwari A.K., Reddy P.P., Babu K.S., Ali A.Z., Madhusudana K. and Rao J.M. New furanoflavonoids, intestinal alpha-glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2009**; 17: 5170-5175.

Rattan R.S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection* **2010**; 29: 913-920.

- Ravenstijn P.G.M., Merlini M., Hameetman M., Murray T.K., Ward M.A., Lewis H., Ball G., Mottart C., Goyet C.D.V.D., Lemarchand T., Belle K.V., O'Neill M.J., Danhof M. and Lange E.C.M.D. The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2008**; 57: 114-130.
- Raymond V. and Lapied B. Hyperpolarization-activated inward potassium and calcium-sensitive chloride currents in beating pacemaker insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Neuroscience* **1999**; 93: 1207-1218.
- Reed M.J., Karres N., Eyman D. and Vernon R.B. Culture of murine aortic explants in 3-dimensional extracellular matrix: a novel, miniaturized assay of angiogenesis *in vitro*. *Microvascular Research* **2007**; 73: 248-252.
- Ren Y. and Feng J. Rotenone selectively kills serotonergic neurons through a microtubule-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry* **2007**; 103: 303-311.
- Reynaud J., Guilet D., Terreux R., M.Lussignol and Walchshofer N. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Natural Products Reports* **2005**; 22: 504-515.
- Ribeiro A.B., Abdelnur P.V., Garcia C.F., Belini A., Severino V.G.P., Silva M.F.D.G.F.D., Fernandes J.B., Vieira P.C., Carvalho S.A.D., Souza A.A.D. and Machado M.A. Chemical characterization of *Citrus sinensis* grafted on *C. limonia* and the effect of some isolated compounds on the growth of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**; 56: 7815-7822.
- Richardson K.E. and Hamilton P.B. Comparative toxicity of scirpentriol and its acetylated derivatives. *Poultry Science* **1990**; 69: 397-402.
- Robert L. and Robert A.M. La réaction de Maillard. Rôle physiopathologique et approche pharmacologique. *Société de Biologie de Paris* **2007**; 201: 167-174.
- Romero G.A.S. and Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America-A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2010**; 4: 1-17.
- Roussis V., Ampofo S.A., Wiemer D.F. Flavanones from *Lonchocarpus minimiflorus*. *Phytochemistry* **1987** ; 26 : 2371-2375.
- Rufer C.E. and Kulling S.E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**; 54: 2926-2931.
- Rukachaisirikul V., Sukpondma Y., Jansakul C. and Taylor W.C. Isoflavone glycosides from *Derris scandens*. *Phytochemistry* **2002**; 60: 827-834.
- Salvatore M.J., King A.B., Graham A.C., Onishi H.R., Bartizal K.F., Abruzzo G.K., Gill C.J., Ramjit H.G., Pitzenberger S.M. and Witherup K.M. Antibacterial activity of Lonchocarpol A. *Journal of Natural Products* **1998**; 61: 640-642.

- Sam T.W. Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina*.  
 Sanchez C., Gupta M. and Vasquez M. Bioassay with brine shrimp *Artemia* to predict antibacterial and pharmacologic activity. *Revista Medica de Panama* **1993**; 18: 62-69.
- Santos A.S., Caetano L.C. and Sant'ana A.E.G. A 12a-hydroxyrotenoid from the roots of *Boerhaavia coccinea*. *Phytochemistry* **1998**; 49: 255-258.
- Sasaki K., Mito K., Ohara K., Yamamoto H. and Yazaki K. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiology* **2008**; 146: 1075-1084.
- Scholz E.P., Zitron E., Katus H.A. and Karle C.A. Cardiovascular ion channels as a molecular target of flavonoids. *Cardiovascular Therapeutics* **2010**; 28: 46-52.
- Seo E.K., Silva G.L., Chai H.B., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Pezzuto J.M. and Kinghorn A.D. Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. *Phytochemistry* **1997**; 45: 509-515.
- Setchell K.D.R., Clerici C., Lephart E.D., Cole S.J., Heenan C., Castellani D., Wolfe B.E., Nechemias-Zimmer L., Brown N.M., Lund T.D., Handa R.J. and Heubi J.E. S-Equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**; 81: 1072-1079.
- Shawl A.S., Mengi N., Misra L.N. and Vishwapaul. Irispurinol, a 12a-hydroxyrotenoid from *Iris spuria*. *Phytochemistry* **1988**; 27: 3331-3332.
- Shen M.L. and Benson L.M. Effect of enzyme inhibitors on protein quaternary structure determined by on-line size exclusion chromatography-microelectrospray ionization mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2001**; 12: 97-104.
- Shi Y., Chen Q.X., Wang Q., K.K.Song and Qiu L. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chemistry* **2005**; 92: 707-712.
- Shiao Y.J., Wang C.N., Wang W.Y. and Lin Y.L. Neuroprotective flavonoids from *Flemingia macrophylla*. *Planta Medica* **2005**; 71: 835-840.
- Shirley B.W. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science* **1996**; 1: 377-382.
- Simons R., Vincken J.P., Bakx E.J., Verbruggen M.A. and Gruppen H. A rapid screening method for prenylated flavonoids with ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry in licorice root extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**; 23: 3083-3093.
- Sinakevitch I.G., Geffard M., Pelhate M. and Lapied B. Anatomy and targets of dorsal median neurones in the terminal abdominal ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *The Journal of Comparative Neurology* **1996**; 367: 147-163.

Siripaisarnpipat S., Kongjinda V. and Techasakul S. Crystal Structure of New Prenylated Chalcone from *Derris Malaccensis*. *Analytical Sciences* **2007**; 28: 33-34.

Slade D., Ferreira D. and Marais J.P.J. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* **2005**; 66: 2177-2215.

Solereeder H. Systematic anatomy of the dicotyledons (**1908**). The Carendon Press, Oxford: 662p.

Solis P.N., Wright C.W. and Anderson M.M. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* **1993**; 59: 250-252.

Spencer J.P.E. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes and Nutrition* **2007**; 2: 257-273.

Sreelatha T., Hymavathi A., Rao V.R.S., Devanand P., Rani P.U., Rao J.M. and Babu K.S. A new benzil derivative from *Derris scandens*: structure-insecticidal activity study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**; 20: 549-553.

Strauss L., Santti R., Saarinen N., Streng T., Joshi S. and Makela S. Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependant disease. *Toxicology Letters* **1998**; 102-103: 349-354.

Takashima J., Chiba N., Yoneda K. and Ohsaki A. Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plain and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents. *Journal of Natural Products* **2002**; 65: 611-613.

Takeda Y., Yano K., Ayabe H., Masuda T., Otsuka H., Sueyoshi E., Shinzato T. and Aramoto M. Glycosidic constituents of the leaves of an Okinawan Leguminosae plant, *Derris trifoliata* Lour. *Journal of Natural Medicine* **2008**; 62: 476-478.

Tamaki H., Satoh H., Hori S., Ohtani H. and Sawada Y. Inhibitory effects of herbal extracts on Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) and structure-inhibitory potency relationship of isoflavonoids. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2010**; 25: 170-179.

Tasdemir D., Kaiser M., Brun R., Yardley V., Schmidt T.J., Tosun F. and Ruedi P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**; 50: 1352-1364.

Plant d'activité du TDR (Tropical Diseases Research) 2008-2013  
TDR/GEN/07.1/FR/Rév.1, 2007.

Tian L., Pang Y. and Dixon R.A. Biosynthesis and genetic engineering of proanthocyanidins and (iso)flavonoids. *Phytochemistry Reviews* **2008**; 7: 445-465.

Tikkanen M.J. and Adlercreutz H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens-Could they have un role in coronary heart disease prevention? *Biochemical Pharmacology* **2000**; 60: 1-5.

Trager W. and Jensen J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **1976**; 193: 673-677.

Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology* **2005**; 7: 581-591.

Uchiyama N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Health Science* **2009**; 55: 31-39.

Uversky V.N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Research* **2004**; 318: 225-241.

Vanetten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A. and Farmer E.E. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* **1994**; 6: 1191-1192.

Veitch N.C., Sutton P.S.E., Kite G.C. and Ireland H.E. Six isoflavones and a 5-deoxyflavonol glycoside from the leaves of *Ateleia herbert-smithii*. *Journal of Natural Products* **2003**; 66: 2003.

Veitch N.C. Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports* **2006**; 24: 417-464.

Verpoorte R. La pharmacognosie du nouveau millénaire : pistes et biotechnologies. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 4<sup>o</sup> congrès européen d'ethnopharmacologie. **2002**. IRD Edition, Paris, 274 p.

Vinson J.A. and Iii T.B.H. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *Nutritional Biochemistry* **1996**; 7: 659-663.

Virk-Baker M.K., Nagy T.R. and Barnes S. Role of phytoestrogens in cancer therapy. *Planta Medica* **2010**; 76: 1132-1142.

Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* **2009**; 3: 2-20.

Wang F., Jiang K. and Li Z. Purification and identification of genistein in *Ginkgo biloba* leaf extract. *Chinese Journal of Chromatography* **2007**; 25: 509-513.

Wangenstein H., Alamgir M., Rajia S., Samuelsen A.B. and Malterud K.E. Rotenoids and isoflavones from *Sarcolobus globosus*. *Planta Medica* **2005**; 71: 754-758.

Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S. and Wang Y. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1995**; 208: 124-130.

Wicher D., Walther C. and Wicher C. Non-synaptic ion channels in insects — basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Progress in Neurobiology* **2001**; 64: 431-525.

Wicher D., Agricola H.J., Schonherr R., Heinemann S.H. and Derst C. TRP-gamma channels are inhibited by cAMP and contribute to pacemaking in neurosecretory insect neurons. *The Journal of Biological Chemistry* **2006**; 281: 3227-3236.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **2001**; 126: 485-493.

Wiwattanapatapee R., Sae-Yun A., Petcharat J., Ovatlarnporn C. and Itharat A. Development and evaluation of granule and emusifiable concentrate formulations containing *Derris elliptica* extract for crop pest control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**; 57: 11234-11241.

Wojciechowski M.F., Lavin M. and Sanderson M.J. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* **2004**; 11: 1846-2004.

Wong E. Pratensein. 5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyisoflavone. *The Journal of Organic Chemistry* **1963**; 28 ; 2336–2339.

Wright C.W. Recent developments in research on terrestrial plants used for treatment of malaria. *Natural Product Reports* **2010**; 27: 961-968.

Xania-Pietrzak B., Michalak K., Hendrich A.B., Mosiadz T.D., Motohashi N. and Shirataki Y. Modulation of MRP1 protein transport by plant, and synthetically modified flavonoids. *Life Science* **2005**; 77: 1879–1891.

Xu L.R., Zhou P., Zhi Y.E., Wu J. and Zhang S. Three new flavanol triglycosides from *Derris trifoliata*. *Journal of Asian Natural Products Research* **2009**; 11: 79-84.

Yanez J.A., Andrews P.K. and Davies N.M. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. *Journal of Chromatography B* **2007**; 848: 159-181.

Yang S.W., Ubillas R., Mcalpine J., Stafford A., Ecker D.M., Talbot M.K. and Rogers B. Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. *Journal of Natural Products* **2001**; 64: 313-317.

Yang Y., Jiang W., Wang L., Zhang Z.B., Si S.Y. and Hong B. Characterization of the isoflavone pratensein as a novel transcriptional up-regulator of scavenger receptor class B type I in HepG2 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2009**; 32: 1289—1294.

Yazaki K., Kuniyama M., Fujisaki T. and Sato F. Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2002**; 277: 6240-6246.

Yazaki K., Sasaki K. and Tsurumaru Y. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* **2009**; 70: 1739-1745.

Yenesew A., Mushibe E.K., Induli M., Derese S., Midiwo J.O., Kabaru J.M., Heydenreich M., Koch A. and Peter M.G. 7a-0-methyldeguelol, a modified rotenoid with an open ring-C, from the roots of *Derris trifoliata*. *Phytochemistry* **2005**; 66: 653-657.

Yenesew A., Twinomuhwezi H., Kabaru J.M., Akala H.M., Kiremire B.T., Heydenreich M., Peter M.G., Eyase F.L., Waters N.C. and Walsh D.S. Antiplasmodial and larvicidal flavonoids from *Derris trifoliata*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* **2009**; 23: 409-414.

Yibchok-Anun S., Adisakwattana S., Moonsan P. and Hsu W.H. Insulin-secretagogue activity of p-methoxycinnamic acid in rats, perfused rat pancreas and pancreatic beta-cell line. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **2008**; 102: 476-482.

Zawar C. and Neumcke B. Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Eur J Physiol* **2000**; 439: 256-262.

Zhang L.W., Al-Suwayeh S.A., Hsieh P.W. and Fang J.Y. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**; 399: 44-51.

Zhang W.J. and Bjorn L.O. The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia* **2009**; 80: 207-218.

Zhang Y., Li X.L., Yao X.S. and Wong M.S. Osteogenic activities of genistein derivatives were influenced by the presence of prenyl group at ring A. *Archives of Pharmaceutical Research* **2008**; 31: 1534-1539.

Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochemical Research* **2009**; 34: 630-638.

Zheng X.L. and Wing F.W. Ethnobotanical study on medicinal plants around Mt. Yingeling, Hainan Island, China. *Journal of Ethnopharmacology* **2009**; 124: 197-210.

# **Annexes**

## Annexe 1

Composé **DF1** : 6-prényl-7,8-(2''',2'''-diméthylpyrano)-5,4'-dihydroxyflavanone ou cajaflavanone

- poudre de  
couleur jaune  
- C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>  
- 406 g.mol<sup>-1</sup>

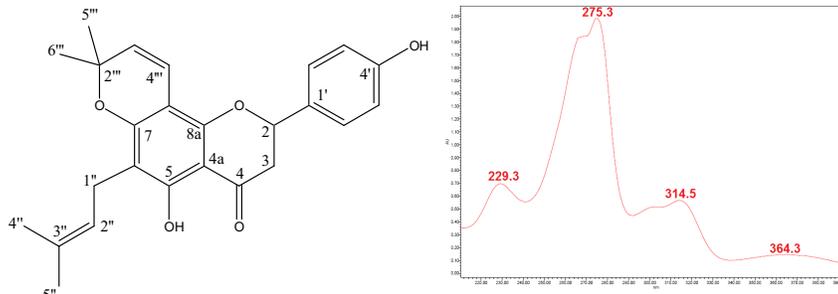


Figure 102 : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF1**

Tableau 11 : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) et RMN-bidimensionnelles de **DF1** (CDCl<sub>3</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC
2	77,6	5,34 dd ( <i>J</i> =12,7-3,2)	3,04	
3	43,3	2,79 dd ( <i>J</i> =3,2-17,3) 3,04 dd ( <i>J</i> =12,7-17,3)	3,04 5,34-2,79	196,4 196,4
4	196,4			
4a	102,7			
5-OH	156,6	12,25 s		156,6-102,7
6	108,6			
7	159,3			
8	102,9			
8a	159,9			
1'	131,2			
2'	127,8	7,33 d ( <i>J</i> =8,3)	6,87	77,6-127,8-155,8
3'	115,7	6,87 d ( <i>J</i> =8,3)	7,33	115,7-131,2-155,8
4'	155,8			
5'	115,7	6,87 d ( <i>J</i> =8,3)	7,33	115,7-131,2-155,8
6'	127,8	7,33 d ( <i>J</i> =8,3)	6,87	77,6-127,8-155,8
1''	21,5	3,20 d ( <i>J</i> =7,4)	5,14	108,6-122,5-131,1-159,3
2''	122,5	5,14 t ( <i>J</i> =7,4)	3,20	17,9-25,9
3''	131,1			
4''	17,9	1,65 s		17,9-25,9-131,1
5''	25,9	1,65 s		17,9-25,9-131,1
2'''	78,5			
3'''	126,0	5,50 d ( <i>J</i> =9,9)	6,62	78,5-102,9-28,3
4'''	115,7	6,62 d ( <i>J</i> =9,9)	5,50	78,5-159,9
5'''	28,3	1,45 s		78,5
6'''	28,3	1,45 s		78,5-126,0

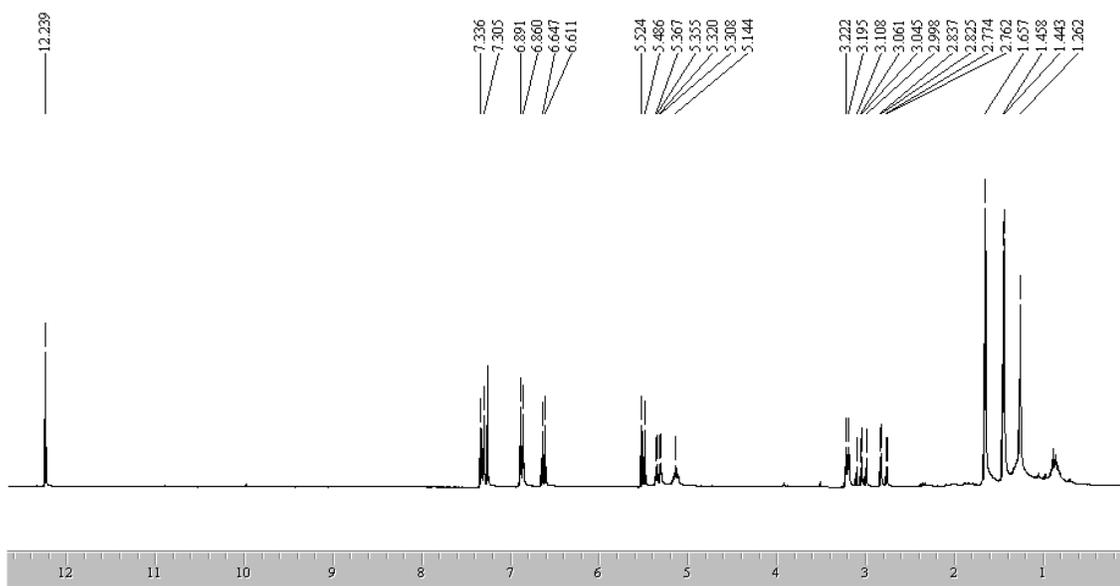


Figure 103 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de DF1 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

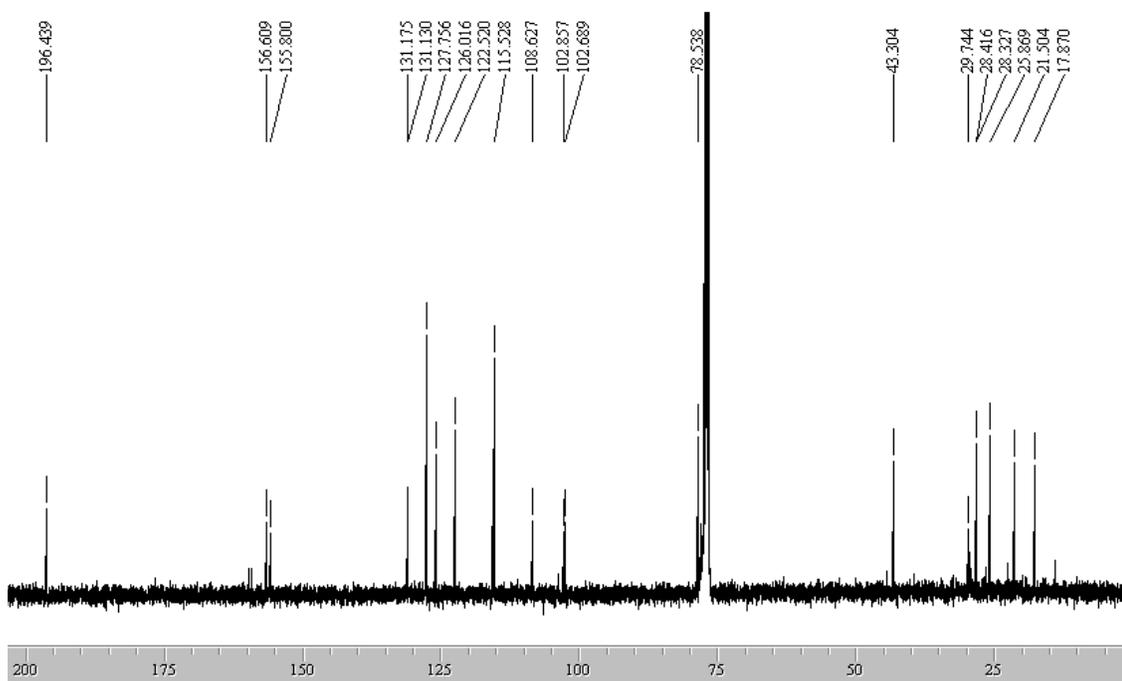
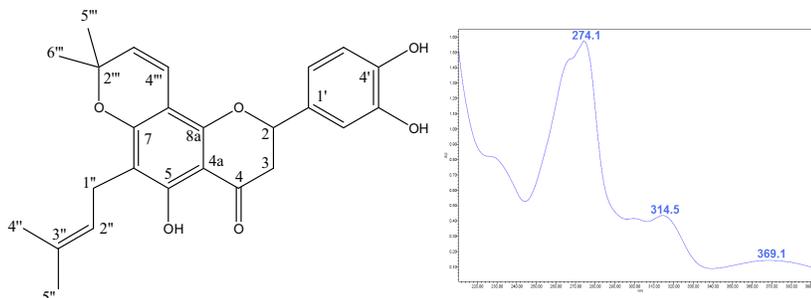


Figure 104 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de DF1 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 2

Composé **DF2** : 6-prényl-7,8-(2''',2'''-diméthylpyrano)-5,3',4'-trihydroxyflavanone

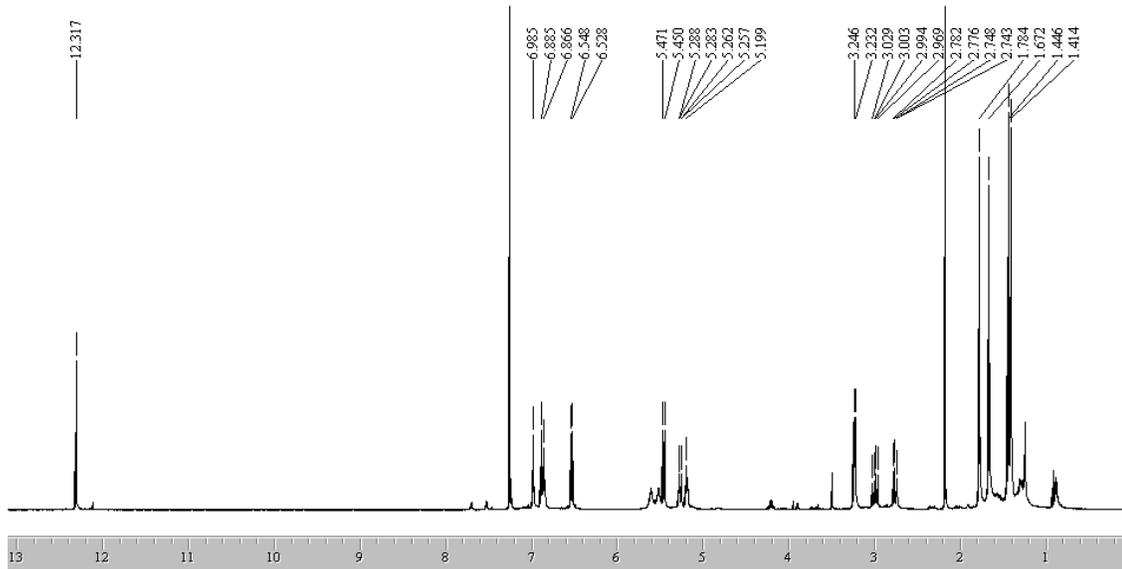
- poudre de couleur  
jaune orangée  
- C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>  
- 422 g.mol<sup>-1</sup>



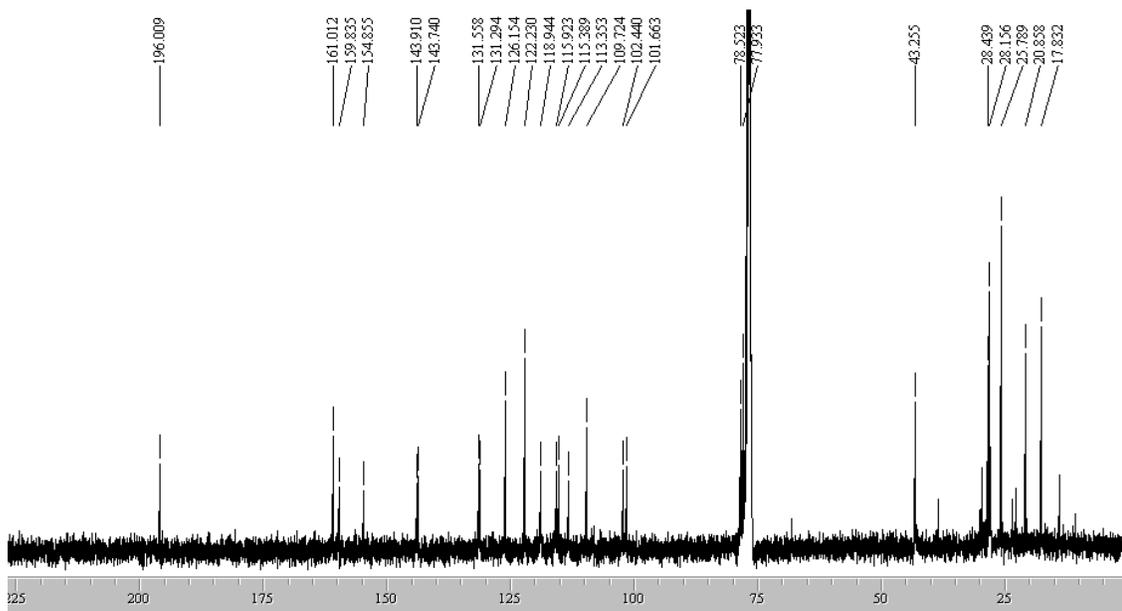
**Figure 105** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF2**

**Tableau 12** : déplacements chimiques en RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **DF2** (CDCl<sub>3</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC
2	78,6	5,27 dd ( <i>J</i> =2,6-12,8)	3,00	
3	43,5	3,00 dd ( <i>J</i> =12,8-17,3) 2,76 dd ( <i>J</i> =2,6-17,3)	5,27	78,6
4	196,3			
4a	102,7			
5-OH	161,2	12,32 s		102,7-109,9
6	109,9			
7	160,1			
8	101,9			
8a	155,1			
1'	131,9			
2'	113,6	6,99 s (1H)		119,2-143,8
3'	143,9			
4'	143,8			
5'	119,2	6,86 d ( <i>J</i> =8,3)		78,6-113,6
6'	115,6	6,90 d ( <i>J</i> =8,3)		131,9-143,9
1''	20,6	3,24 d (2H, <i>J</i> =7,1)	5,20-1,78-1,67	161,2-160,1- 109,9-122,5- 131,5
2''	122,5	5,20 t ( <i>J</i> =7,1)	3,24-1,78-1,67	
3''	131,5			
4''	18,1	1,78 s (3H)	6,54-3,24-5,20	26,0-122,5
5''	26,0	1,67 s (3H)	3,24-5,20	18,1-122,5-131,5
2'''	77,9			
3'''	126,4	5,46 d ( <i>J</i> =10,3)	6,54	77,9-101,9-(28,4)
4'''	116,2	6,54 ( <i>J</i> =10,3)	5,46	155,1-160,1-77,9
5'''	28,4	1,45 s (3H)		77,9-126,4
6'''	28,4	1,42 s (3H)		77,9-126,4



**Figure 106** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de **DF2** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

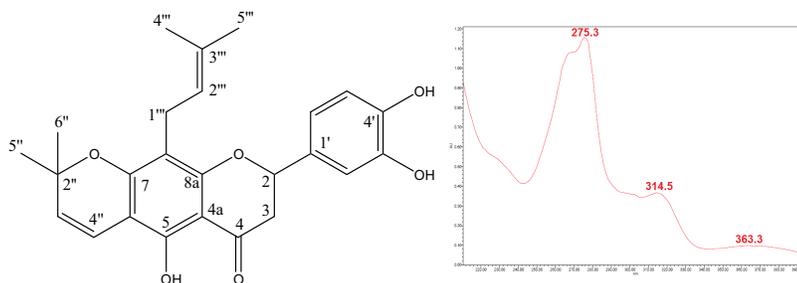


**Figure 107** : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de **DF2** (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 3

Composé **DF3** : 8-prényl-6,7-(2'',2''-diméthylpyrano)-5,3',4'-trihydroxyflavanone  
ou dorsmanine I

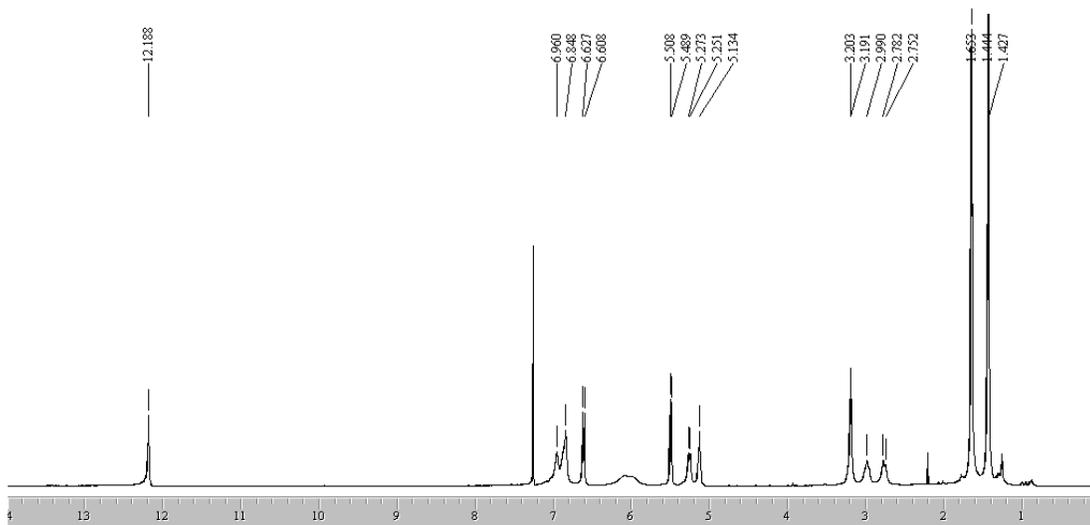
- poudre de couleur  
jaune
- C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub>
- 422 g.mol<sup>-1</sup>



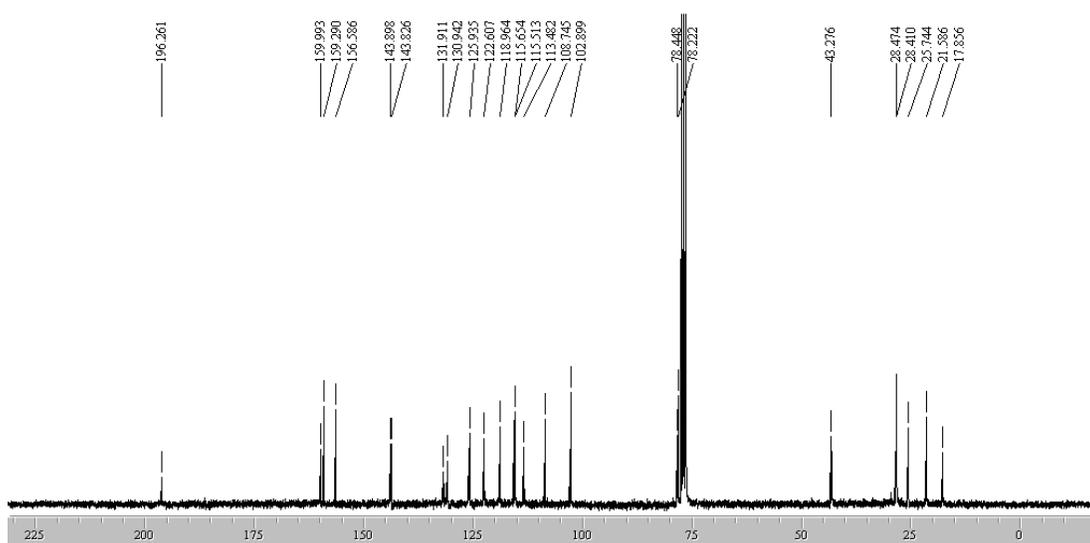
**Figure 108** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF3**

**Tableau 13** : Déplacements chimiques en RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) de **DF3** (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC	NOESY
2	78,2	5,26 dd ( <i>J</i> =12,7-2,5)	3,00		
3	43,3	2,77 dd ( <i>J</i> =17,0-2,5) 3,00 dd ( <i>J</i> =12,7-17,0)	5,26		
4	196,3				
4a	102,9				
5-OH	156,6	12,19 s		102,9-143,8	
6	102,9				
7	160,0				
8	108,7				
8a	159,3				
1'	131,9				
2'	113,5	6,96 s			
3'	143,8				
4'	143,9				
5'	119,0	6,85 s (2H)			
6'	119,0	6,85 s (2H)			
2''	78,4				
3''	125,9	5,51 d ( <i>J</i> =10,3)	6,62	78,4-102,9- 160,0-156,6	1,43-1,45- 12,2
4''	115,7	6,62 d ( <i>J</i> =10,3)	5,51	28,4-28,5- 78,4-102,9	1,43-1,45- 5,51-12,2
5''	28,4	1,43 s		130,9	
6''	28,5	1,45 s		130,9	
1'''	21,6	3,20 d (2H, <i>J</i> =7,4)	5,14	108,7-122,6- 130,9-160,0	5,51
2'''	122,6	5,14 t (1H, <i>J</i> =7,4)	3,20	17,9-21,6- 25,7-108,7	1,65-1,66- 5,51-3,20
3'''	130,9				
4'''	17,9	1,65	3,20 – 5,14	122,6-130,9	
5'''	25,7	1,66	3,20 – 5,14	122,6-130,9	



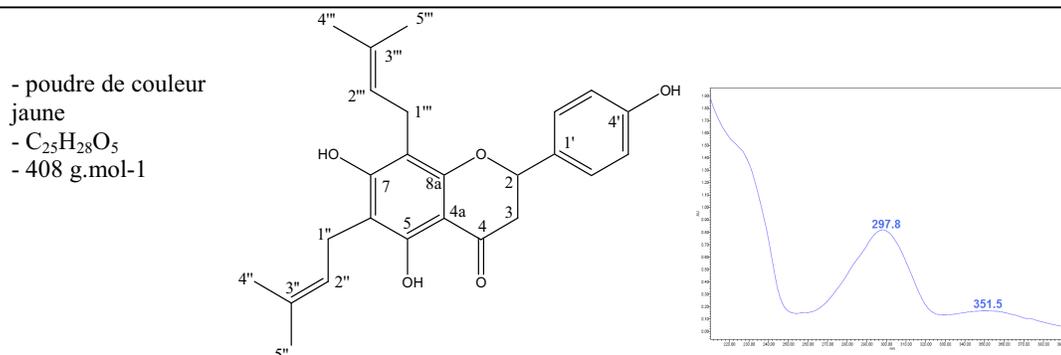
**Figure 109** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de DF3 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)



**Figure 110** : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de DF3 (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

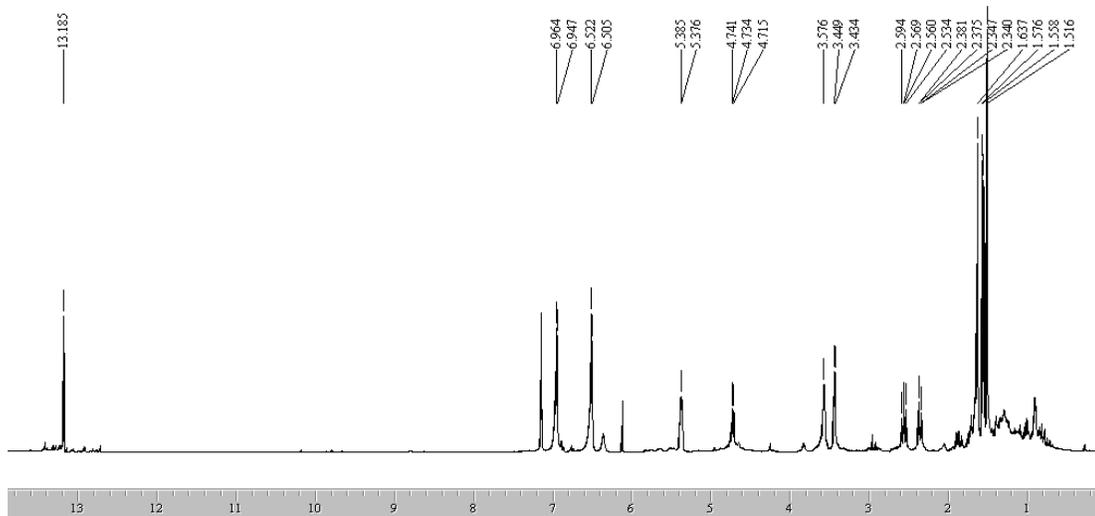
## Annexe 4

Composé **DF4** : 6,8-di-isopenténylnaringénine ou lonchocarpol A

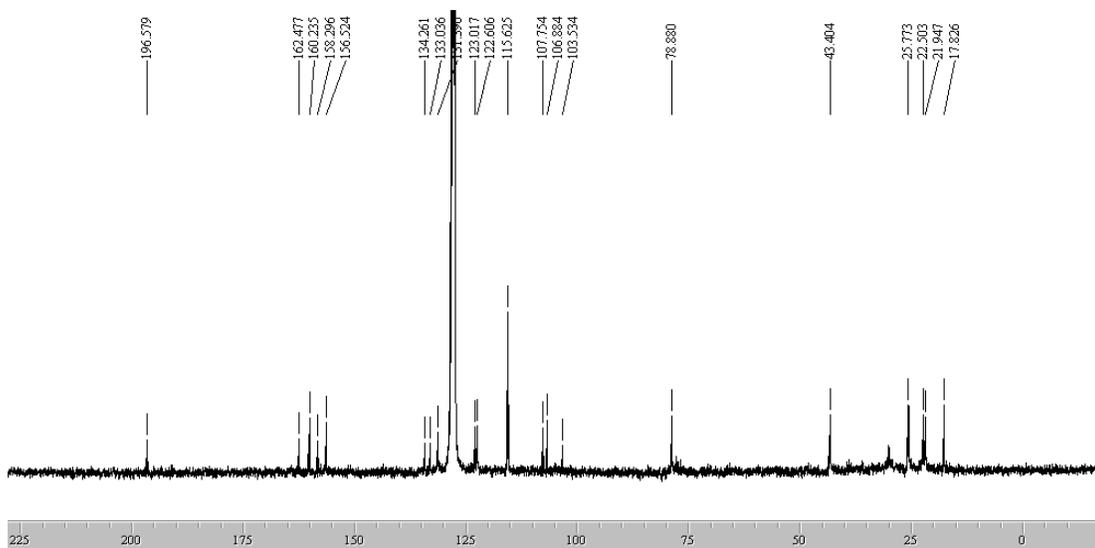


**Tableau 14** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) et RMN-2D de **DF4** (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC
2	78,9	4,73 dd (12,8-3,1)	2,36-2,56-	
3	43,4	2,36 dd ( <i>J</i> =17,1-3,1) 2,56 dd ( <i>J</i> =12,8-7,1)	4,73	78,9-196,6
4	196,6			
4a	103,5			
5-OH	160,2	13,19 s		103,5-106,9-160,2
6	106,9			
7	162,5			
8	107,8			
8a	158,3			
1'	127 (sous C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> )			
2'	131,4	6,96 d ( <i>J</i> =8,5)	6,51	78,9-127-156,5
3'	115,6	6,51 d ( <i>J</i> =8,5)	6,96	131,4-156,5
4'	156,5			
5'	115,6	6,51 d ( <i>J</i> =8,5)	6,96	131,4-156,5
6'	131,4	6,96 d ( <i>J</i> =8,5)	6,51	78,9-127-156,5
1''	21,9	3,58 t ( <i>J</i> =6,1)	5,38-1,59-1,70	106,9-122,6-134,3-160,2
2''	122,6	5,38 q ( <i>J</i> =6,1)	3,44-3,58	21,9
3''	134,3			
4''	17,8i	1,70 s (3H)	3,58-5,38	122,6-134,3
5''	25,8i	1,59 s (3H)	3,58-5,38	122,6-134,3
1'''	22,5	3,44 d ( <i>J</i> =7,3)	5,38-1,63-1,65	107,8-123,0-133,0-158,3-162,5
2'''	123,0	5,38 q ( <i>J</i> =6,1)	3,44-3,58	22,5
3'''	133,0			
4'''	25,8i	1,63 s (3H)	3,44-5,38	123,0-133,0
5'''	17,8i	1,65 s (3H)	3,44-5,38	123,0-133,0



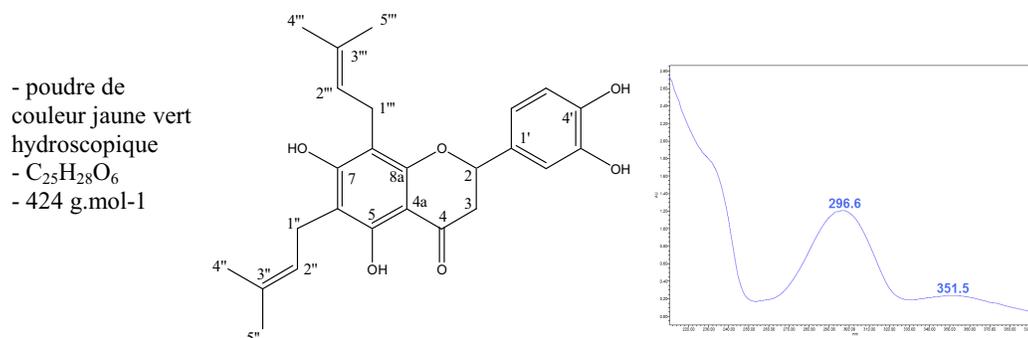
**Figure 112** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de DF4 (500 MHz, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)



**Figure 113** : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de DF4 (125 MHz, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 5

Composé **DF5** : 6,8-diprényl-5,3',4'-trihydroxyflavanone ou 6,8-diprénylériodictyol



**Figure 114** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF5**

**Tableau 15**: RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) et RMN-2D de **DF5** (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC
2	78,9	4,71 dd ( <i>J</i> =12,8-17,1)	2,38-2,58	
3	43,5	2,38 dd ( <i>J</i> =2,8-17,1) 2,58 dd ( <i>J</i> =12,8-17,1)	4,71	78,9-197,1
4	197,1			
4a	103,6			
5-OH	160,4	13,13 s		103,6-107,8
6	107,8			
7	162,9			
8	107,0			
8a	158,4			
1'	132,2			
2'	115,2 i	6,56 s (1H)		
3'	144 i			78,9-119,3-115,2-144
4'	144 i			
5'	113,9	6,68 s (1H)		78,9-113,9-132,2-144
6'	119,3 i	6,56 s (1H)		78,9-113,9-132,2-144
1''	22,5	3,45 d ( <i>J</i> =6,7)	5,38 - 1,64-1,59	107,0-123,0-133,6-158,4-162,9
2''	123,0	5,38 m	1,64- 1,59- 3,45	22,5-17,9
3''	133,6			
4''	17,9	1,64 s (3H)	3,45 - 5,38	133,6-123,0
5''	17,9	1,59 s (3H)	3,45 - 5,38	133,6-123,0
1'''	22,0	3,58 d ( <i>J</i> =6,7)	1,56-1,51-5,38	107,8-122,7-134,6-160,4-162,9
2'''	122,7	5,38 m	1,56-1,51-3,58	22,0-26,0
3'''	134,6			
4'''	26,0	1,56 s (3H)	3,58-5,38	134,6-122,7
5'''	26,0	1,51 s (3H)	3,58-5,38	134,6-122,7

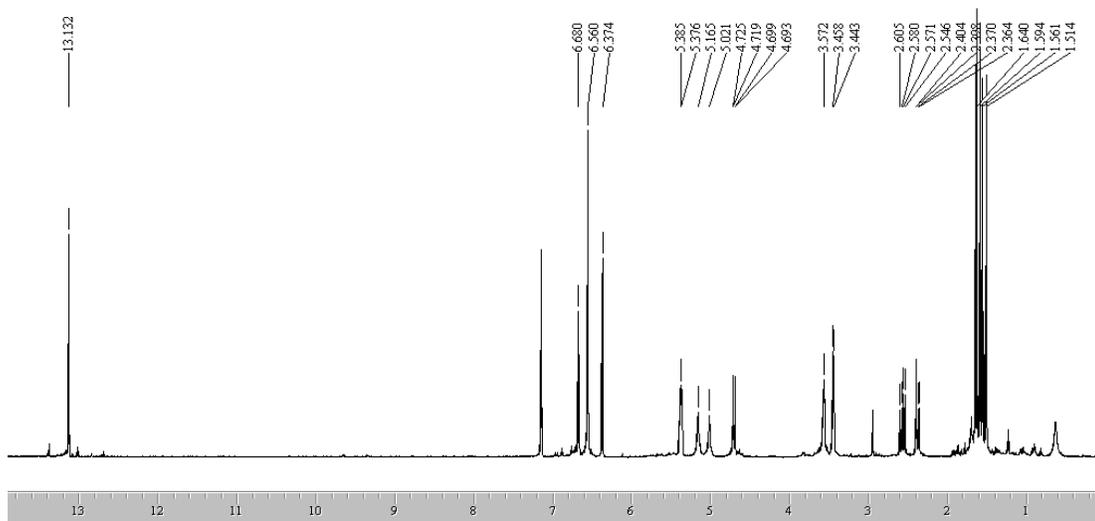


Figure 115 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de DF5 (500 MHz, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

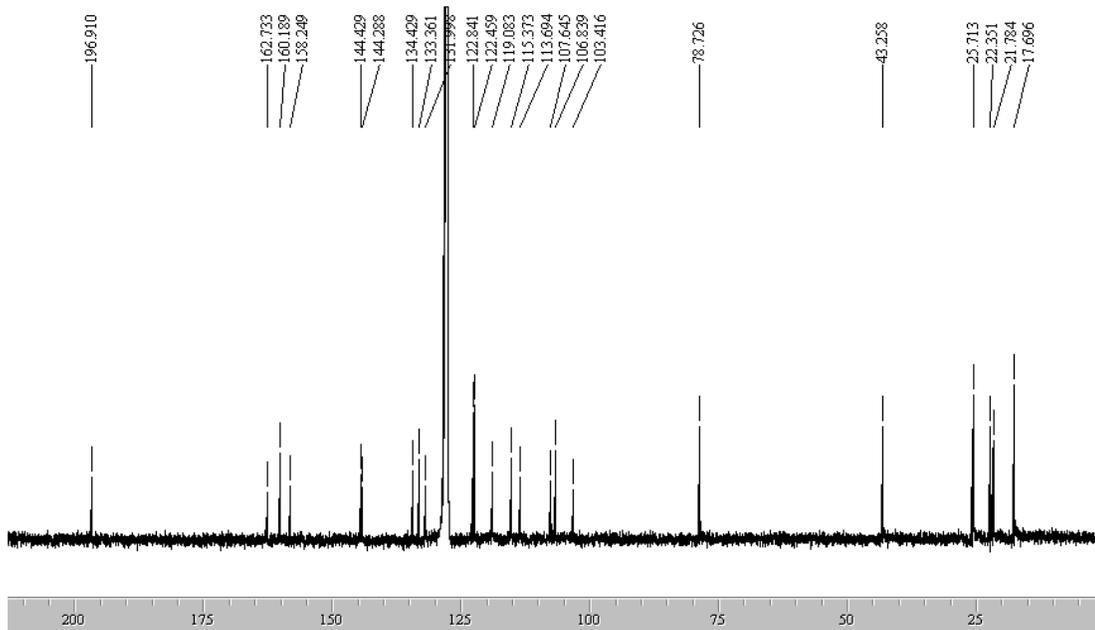
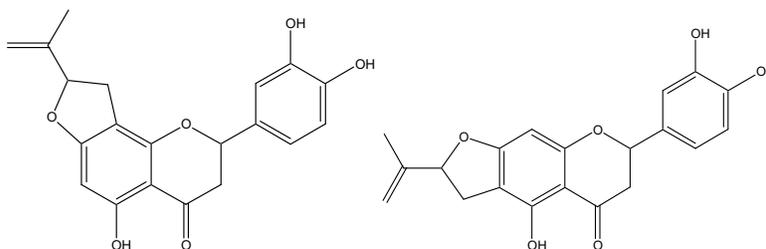
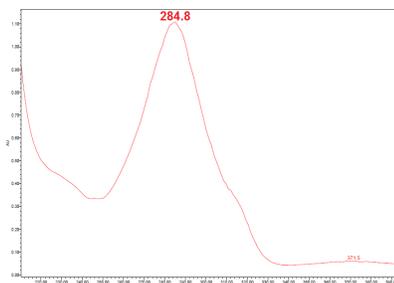


Figure 116 : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de DF5 (125 MHz, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 6

### Composé DF6

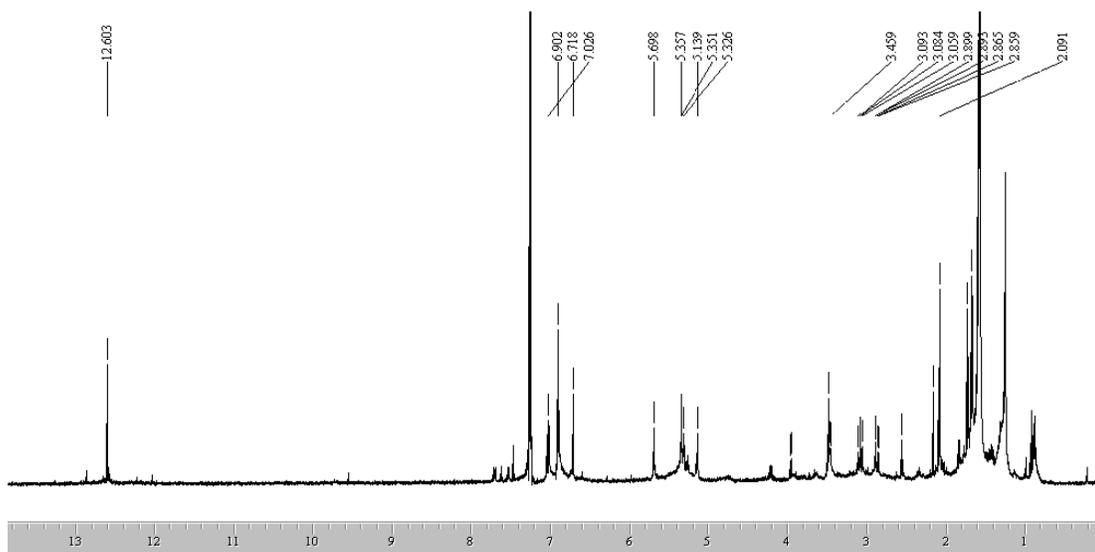
- poudre de couleur  
jaune-orange  
- C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>  
- 354 g.mol<sup>-1</sup>



**Figure 117** : Spectre UV (MeOH) et structures proposées du composé DF6

**Tableau 16** : RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) et RMN-2D de DF6 (CDCl<sub>3</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC
2	78,9	5,35 dd ( <i>J</i> =12,4-3,0)		112,1-131,6
3	43,5	2,88 dd ( <i>J</i> =3,0-17,1) 3,09 dd ( <i>J</i> =12,4-17,1)	3,09 2,88	
4				
4a				
5-OH		12,60 s		
6 ou 8	100,5	6,72 s		
7				
8a				
1'	131,6			
2'	115,1 i	6,90 s (2H)		131,6
3'	113,5	7,09 s		143,6
4'	143,6 i			
5'	143,5 i			
6'	118,4 i	6,90 s (2H)		
2''	79,2	5,33 t	3,45	
3''		3,45 m	5,33	
4''				
5''	112,1	5,14 s 5,70 s	2,09	112,1-131,6-155,8
6''	18,9	2,09 s (3H)	5,14	



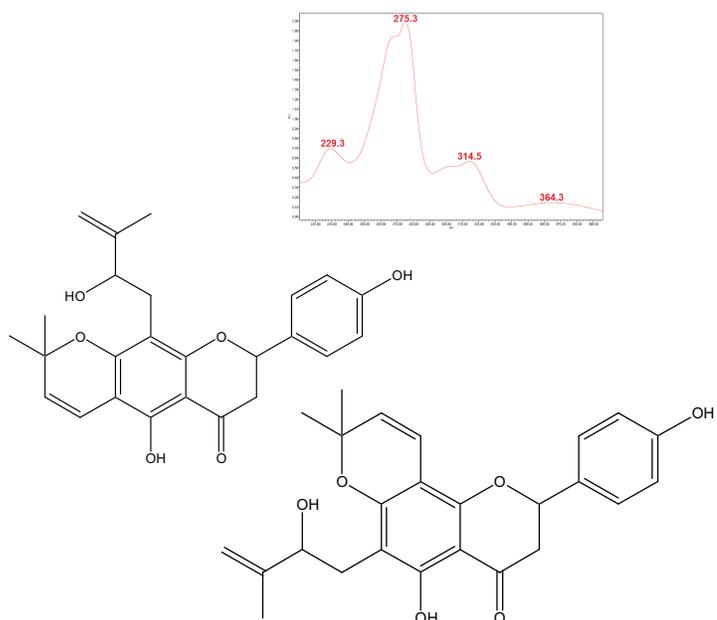
**Figure 118** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de DF6 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 7

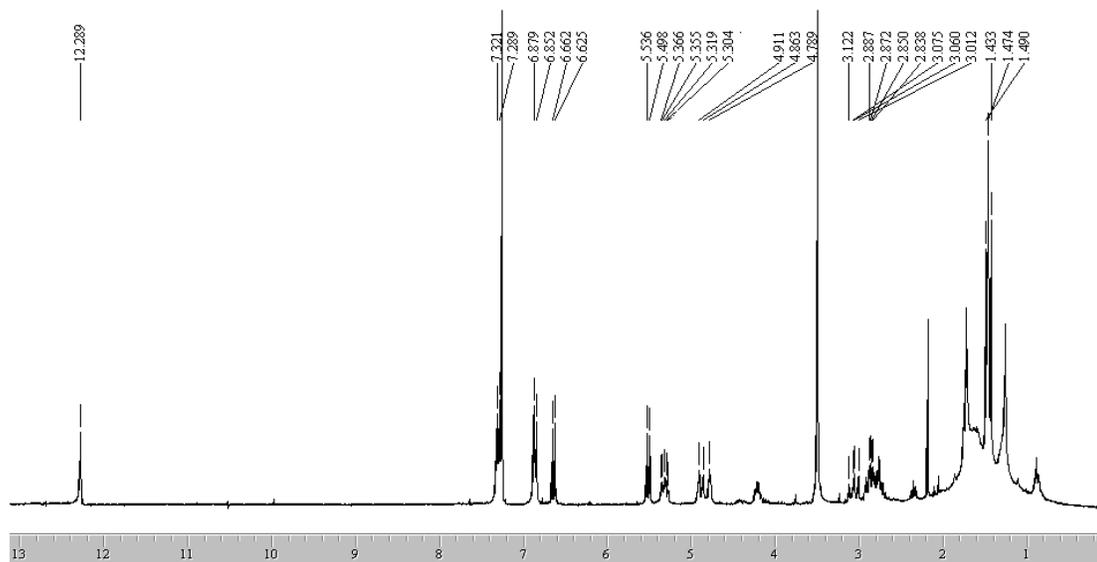
Composé **DF7**

**Tableau 17** : RMN-<sup>1</sup>H (270 MHz) de **DF7** (CDCl<sub>3</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>1</sup> H
2	5,32 dd ( <i>J</i> =12,7-2,8)
3	2,8 m
	3,07 dd ( <i>J</i> =12,7-17,0)
4a	
5-OH	12,29 s
2'	7,30 d ( <i>J</i> =8,5)
3'	6,86 d ( <i>J</i> =8,5)
4'	
5'	6,86 d ( <i>J</i> =8,5)
6'	7,30 d ( <i>J</i> =8,5)
2''	
3''	5,51 d ( <i>J</i> =9,9)
4''	6,64 d ( <i>J</i> =9,9)
5''	1,47 i
6''	1,43 i
1'''	2,8 m
2'''	4,79 br s
3'''	
4'''	4,91 s et 4,86 s
5'''	1,49 s
6'''	



**Figure 119** : Spectre UV (MeOH) et structures proposées du composé **DF7**

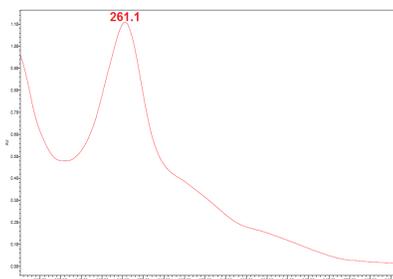
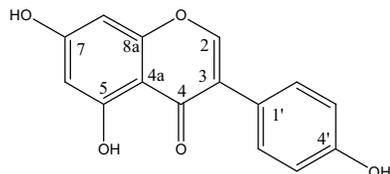


**Figure 120** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de **DF7** (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 8

Composé **DF8** : 4',5,7-trihydroxyisoflavone ou génistéine

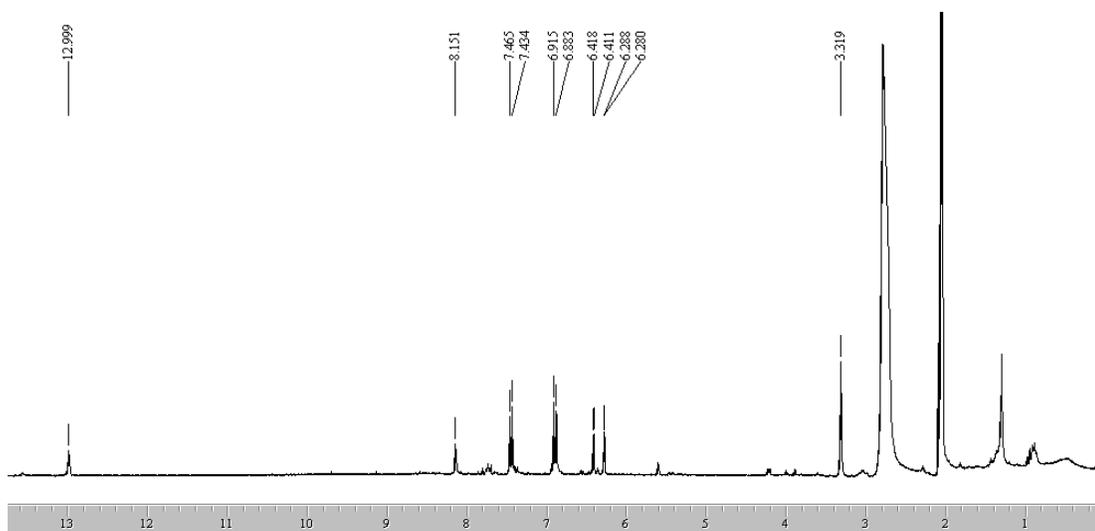
- poudre de couleur blanche
- $C_{15}H_{10}O_5$
- 270 g.mol<sup>-1</sup>



**Figure 121** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF8**

position	<sup>1</sup> H
2	8,15 s
3	
4	
4a	
5-OH	13,00 s
6	6,41 d ( <i>J</i> =2,1)
7	
8	6,28 d ( <i>J</i> =2,1)
8a	
1'	
2'	6,90 d ( <i>J</i> =8,5)
3'	7,45 d ( <i>J</i> =8,5)
4'	
5'	6,90 d ( <i>J</i> =8,5 Hz)
6'	7,45 d ( <i>J</i> =8,5 Hz)

**Tableau 18**: RMN-<sup>1</sup>H (270 MHz) de **DF8**  
(CDCl<sub>3</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

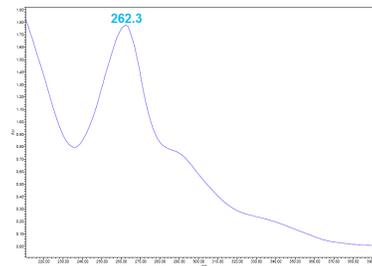
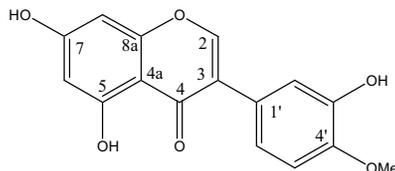


**Figure 122** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de **DF8** (270 MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 9

**DF9** : 5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyisoflavone ou pratenséine

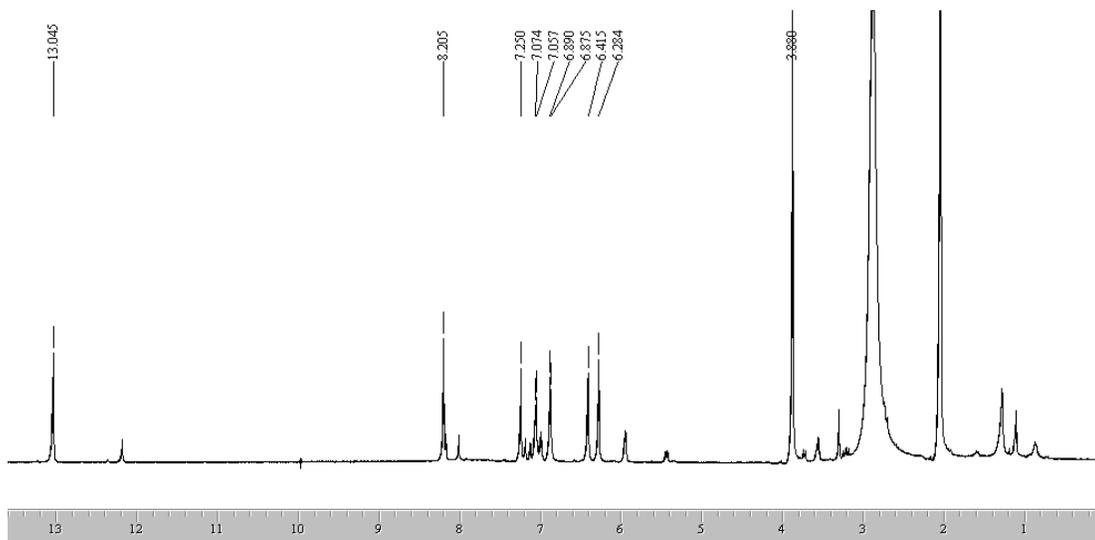
- poudre de  
couleur jaune  
- C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>  
- 300 g.mol<sup>-1</sup>



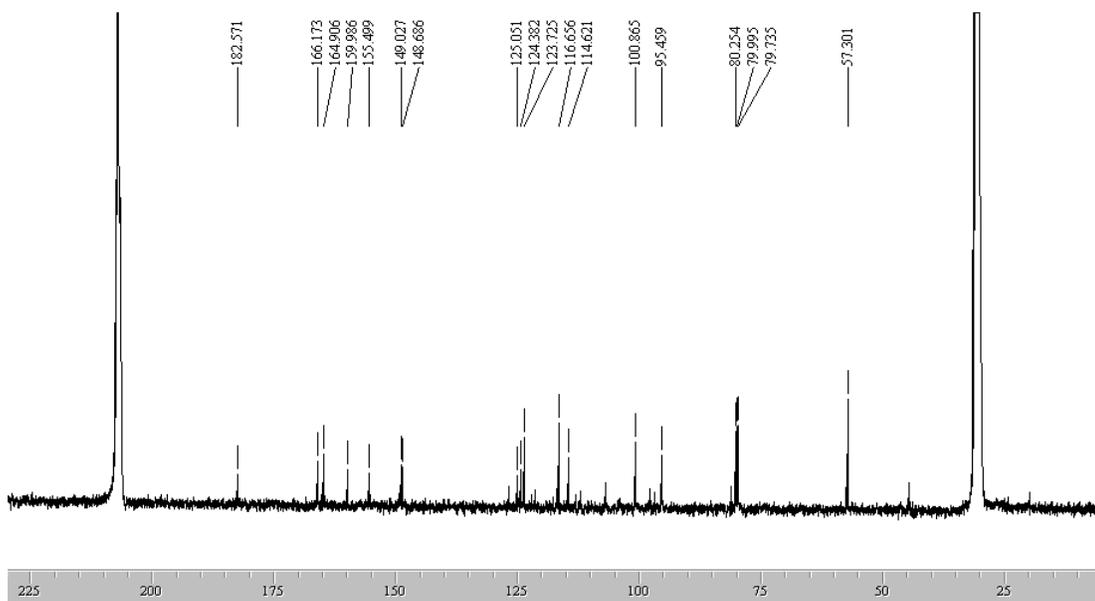
**Figure 123** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF9**

**Tableau 19**: RMN-<sup>1</sup>H (270 MHz) et RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz) de **DF9** (acétone-*d*<sub>6</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (en ppm)
2	155,5	8,19 s
3	125,1	
4	182,6	
4a	106,7	
5-OH	164,9	13,01 s
6	100,9	6,42 s
7	166,2	
8	95,5	6,28 s
8a	160,0	
1'	124,4	
2'	116,7	7,25 d (1H, <i>J</i> =1,8)
3'	148,7	
4'	149,0	
5'	114,6	6,88 d (1H, <i>J</i> =7,9)
6'	123,7	7,07 dd (1H, <i>J</i> =7,9-1,8)
OCH <sub>3</sub>	57,3	3,88 s (3H)



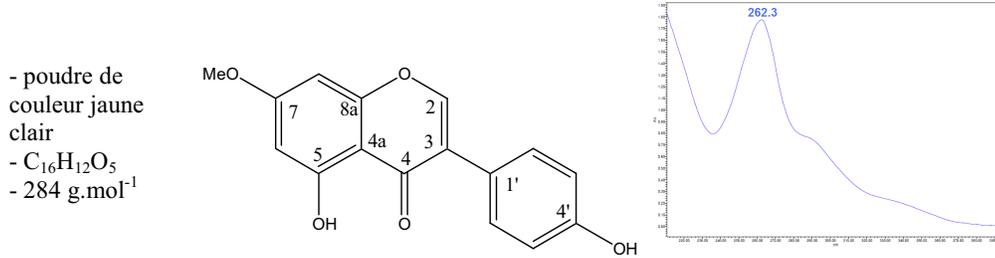
**Figure 124** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de **DF9** (270 MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)



**Figure 125** : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de **DF9** (75 MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 10

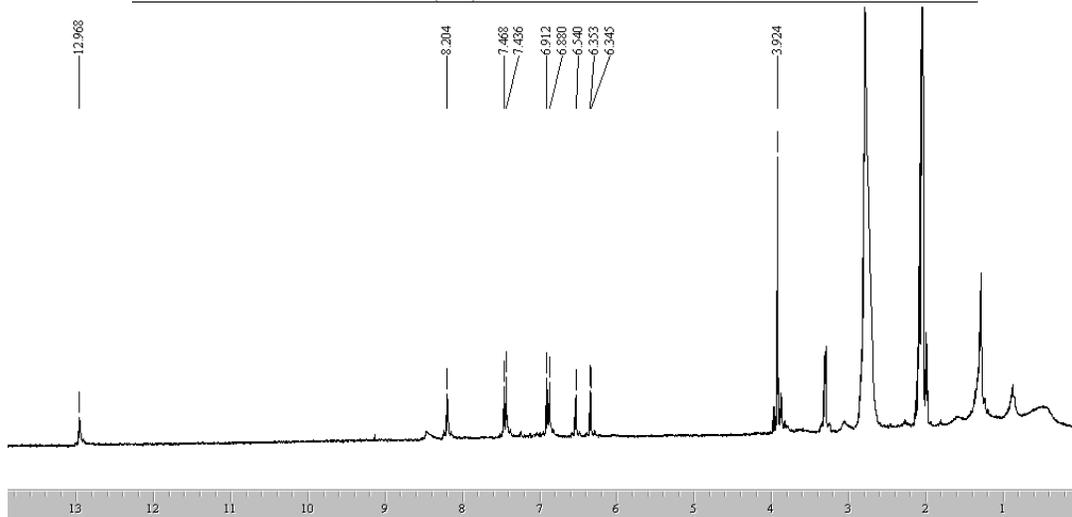
Copomisé **DF10** : 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone ou prunétine



**Figure 126** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF10**

**Tableau 20**: RMN (500 MHz) de **DF10** (acétone-*d*<sub>6</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC
2	154,4	8,20 s (1H)		124,4-181,1-159,1
3	124,4			
4	181,1			
4a	106,4			
5	149,5			
6	91,8	6,54 (1H, <i>J</i> =2,1)		149,5-166,7-159,1-106,4
7	166,7			
8	98,8	6,35 d (1H, <i>J</i> =2,1)		91,8-166,7-106,4
8a	159,1			
1'	122,5			
2'	130,0	7,45 d (2H, <i>J</i> =8,5)	6,90	124,4-122,5-158,4
3'	115,8	6,90 d (2H, <i>J</i> =8,5)	7,45	124,4-122,5-158,4
4'	158,4			
5'	115,8	6,90 d (2H, <i>J</i> =8,5)	7,45	124,4-122,5-158,4
6'	130,0	7,45 d (2H, <i>J</i> =8,5)	6,90	124,4-122,5-158,4
OMe	56,3	3,92 s (3H)		149,5-166,7

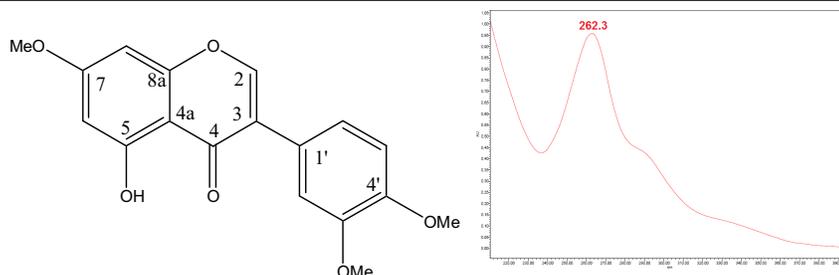


**Figure 127** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de **DF10** (270 MHz, acétone-*d*<sub>6</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 11

Composé **DF11** : 5-hydroxy-7, 3',4'-triméthoxyisoflavone

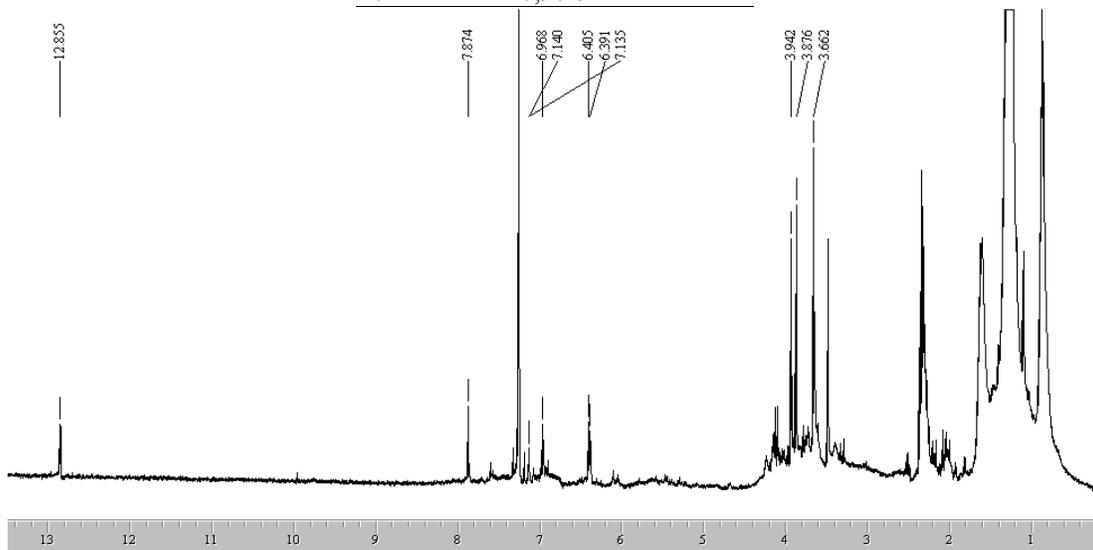
- poudre de  
couleur jaune-  
verte  
-  $C_{18}H_{16}O_6$   
-  $328 \text{ g.mol}^{-1}$



**Figure 128** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF11**

**Tableau 21**: RMN- $^1\text{H}$  (270 MHz) de **DF11** ( $\text{CDCl}_3$ ,  $J$  (Hz),  $\delta_{\text{TMS}}=0$ )

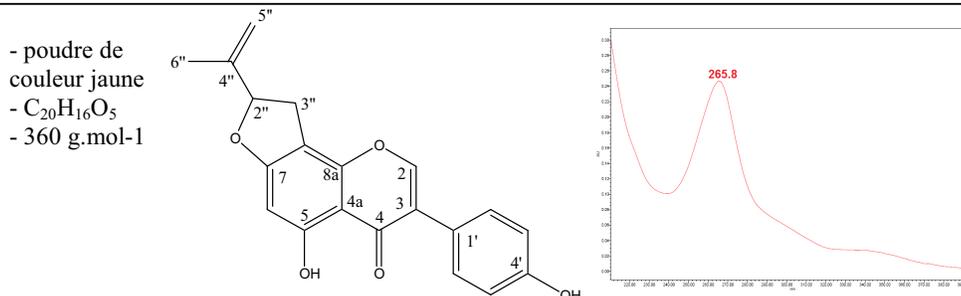
position	$^1\text{H}$
2	7,87 s
3	
4	
4a	
5-OH	12,86 s
6	6,39 d ( $J=2,2$ )
7-OCH <sub>3</sub>	3,66 s (3H)
8	6,41 d ( $J=2,2$ )
8a	
1'	
2'	7,14 d ( $J=1,8$ )
3'-OCH <sub>3</sub>	3,94 s (3H)
4'-OCH <sub>3</sub>	3,93 s (3H)
5'	6,95 s
6'	6,97 s



**Figure 129** : Spectre RMN- $^1\text{H}$  de **DF11** (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{TMS}}=0$  ppm)

## Annexe 12

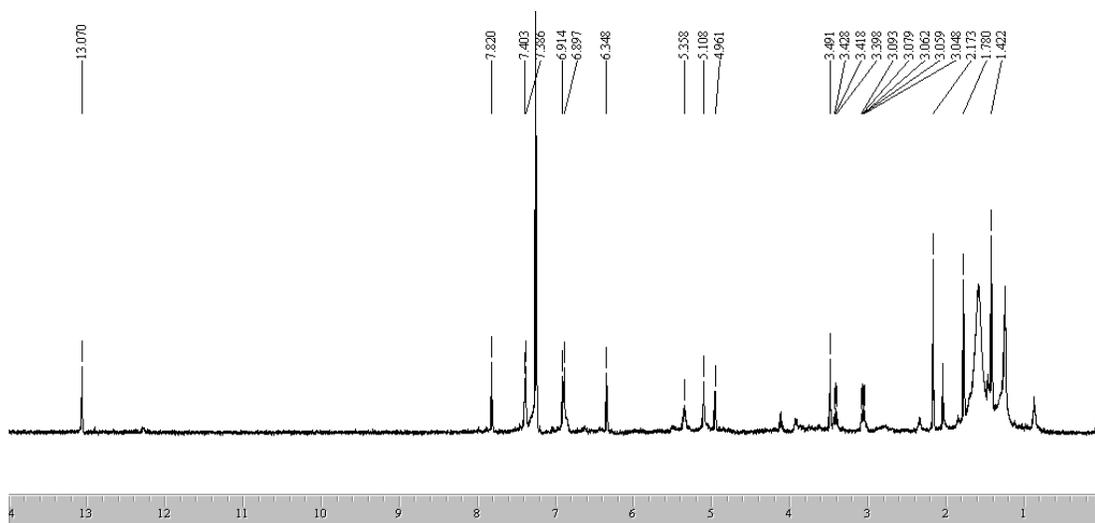
Composé **DF12** : derrisoflavone G



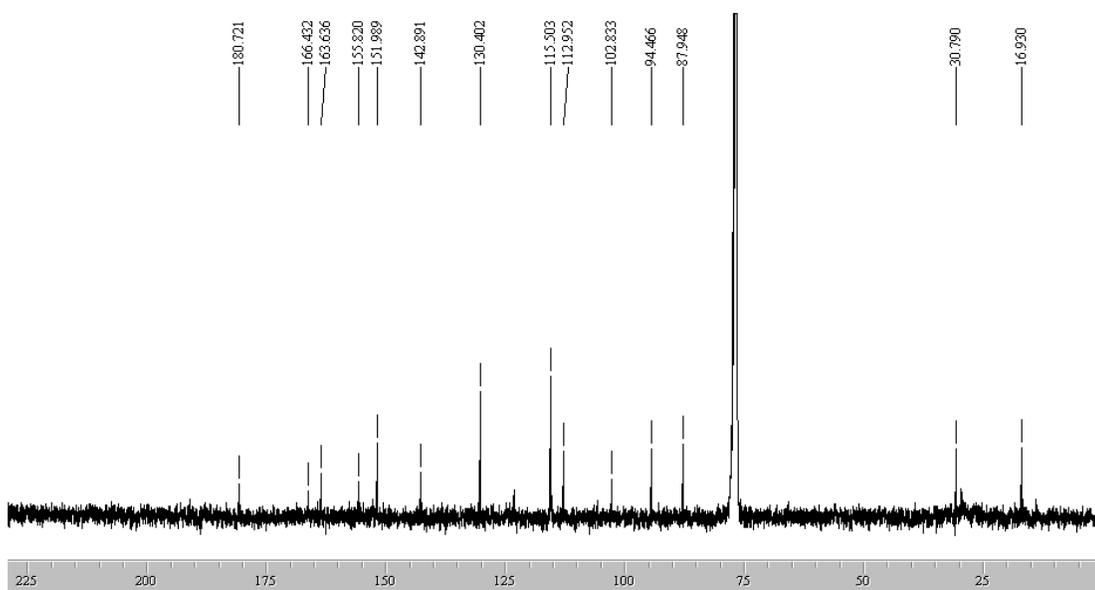
**Figure 130** : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF12**

**Tableau 22**: RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz) et RMN-2D de **DF12** (CDCl<sub>3</sub>, *J* (Hz), δ<sub>TMS</sub>=0)

position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	COSY	HMBC	NOESY
2	152,0	7,82 s		123,5-152,0-180,7	7,40
3	123,5				
4	180,7				
4a	105,9				
5-OH	163,6	13,08 s		94,4-105,9-(163,6)	4,97-5,11-1,78
6	94,4	6,35 s		102,8-105,9	
7	166,4				
8	102,8				
8a	163,6				
1'	123,1				
2'	130,4	7,40 ( <i>J</i> =8,5)	6,91	(123,5)-130,4-155,8	7,82-6,91
3'	115,5	6,91 ( <i>J</i> =8,5)	7,40	115,5-123,1-(155,8)	7,40
4'	155,8				
5'	115,5	6,91 ( <i>J</i> =8,5)		115,5-123,1-(155,8)	
6'	130,4	7,40 ( <i>J</i> =8,5)		(123,5)-130,4-155,8	
2''	87,9	5,36 dd ( <i>J</i> =7,3-9,8)	3,08-3,43	16,9-112,9	3,08-3,43
3''	30,8	3,08 dd ( <i>J</i> =7,3-14,6)	5,36	87,9-102,8-142,9-(163,6)	5,36
		3,43 dd ( <i>J</i> =9,8-14,6)	5,36	102,8-142,9	
4''	142,9				
5''	112,9	4,97 s 5,11 s	1,78	16,9-87,9	1,78-13,08
6''	16,9	1,78 s (3H)	4,97-5,11	87,9-112,9-142,9	4,97-5,11



**Figure 131** : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de DF12 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)



**Figure 132** : Spectre RMN-<sup>13</sup>C de DF12 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>TMS</sub>=0 ppm)

## Annexe 13

Composé **DF13** : aldéhyde coniférylique

- poudre de  
couleur jaune  
-  $C_{10}H_{10}O_3$   
-  $178 \text{ g.mol}^{-1}$

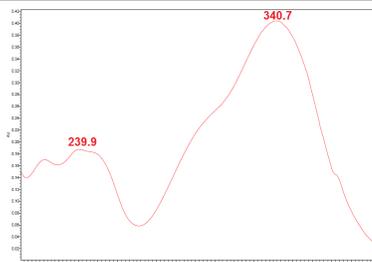
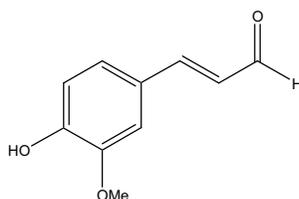


Figure 133 : Structure et spectre UV (MeOH) du composé **DF13**

Tableau 23: RMN- $^1\text{H}$  (270 MHz) et RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de **DF13** ( $\text{CDCl}_3$ ,  $J$  (Hz),  $\delta_{\text{TMS}}=0$ )

position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	193,4	9,65 d ( $J=7,9$ )
2	126,5	6,60 dd ( $J=15,7-7,9$ )
3	152,9	7,41 d ( $J=15,7$ )
1'	126,4	
2'	109,2	7,13 d ( $J=1,8$ )
3'	146,7	
4'	148,7	
5'	114,6	6,60 dd ( $J=8,2-1,8$ )
6'	123,9	6,96 d ( $J=8,2$ )
$\text{OCH}_3$	55,8	3,95 s (3H)