



**HAL**  
open science

# Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya

Sophie Techer

► **To cite this version:**

Sophie Techer. Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Biologie végétale. Université de la Réunion, 2013. Français. NNT : 2013LARE0014 . tel-01199856

**HAL Id: tel-01199856**

**<https://theses.hal.science/tel-01199856>**

Submitted on 16 Sep 2015

**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.

**- UNIVERSITE DE LA REUNION -  
UFR DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

**THESE**

En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES**  
**Discipline : CHIMIE**

par

**Sophie TECHER**

**Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques  
ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules  
antivirales ciblant le virus du chikungunya**

présentée et soutenue publiquement le 26 avril 2013

**Composition du jury**

|                                |  |                        |
|--------------------------------|--|------------------------|
| Françoise GUERITTE             | Directeur de Recherche (ICSN-CNRS)                       | Présidente             |
| Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA  | Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon I          | Rapporteur             |
| Jean-Luc WOLFENDER             | Professeur à l'Université de Genève                      | Rapporteur             |
| Emmanuel BOURDON               | Professeur à l'Université de La Réunion                  | Examineur              |
| Marc LITAUDON                  | Ingénieur de Recherche (ICSN-CNRS)                       | Examineur              |
| Isabelle GRONDIN               | Maître de Conférences – HDR à l'Université de La Réunion | Directrice de thèse    |
| Emmanuelle GIRARD-VALENCIENNES | Maître de Conférences à l'Université de La Réunion       | Co-encadrante de thèse |
| Jacqueline SMADJA              | Professeur à l'Université de La Réunion                  | Membre invité          |

**L**a plupart des hommes ont, comme les plantes,

*des propriétés cachées que le hasard fait découvrir.*

***François de La Rochefoucauld***

*A* ma famille,

*et à Pierre*

*Ce travail a donné lieu à l'affiche (A) et aux deux communications orales (C) suivantes :*

## **2011**

- (A) Activités cytotoxique et antioxydante de quelques plantes endémiques ou indigènes de l'île de La Réunion.

S. TECHER, C. ROBERT-DA SILVA, E. GIRARD-VALENCIENNES, E. BOURDON, P. CLERC, J. SMADJA, I. GRONDIN, XXX<sup>èmes</sup> Journées Internationales Huiles essentielles et Extraits de Digne les Bains, Congrès International des Plantes Aromatiques et Médicinales 2011, France, 6-8 septembre 2011.

*Actes de colloque Association pour la promotion des Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales, septembre 2011.*

## **2012**

- (C) Activités biologiques de 17 plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya.

S. TECHER, E. GIRARD-VALENCIENNES, C. ROBERT-DA SILVA, E. BOURDON, P. LEYSSEN, L. LITAUDON, F. GUERITTE, J. SMADJA, I. GRONDIN, 7<sup>ème</sup> Colloque International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales (7<sup>ème</sup> CIPAM), La Réunion, 6-9 septembre 2012.

*Actes de colloques Aplamedom, 2013.*

- (C) Results of PHYTOCHIK project for LCSNSA (La Réunion) Biodiversity and emerging viruses in the Indian Ocean : Selection of natural drug candidates to fight the chikungunya virus.

S. TECHER, E. GIRARD-VALENCIENNES, P. CLERC, P. LEYSSEN, M. LITAUDON, F. GUÉRITTE, I. GRONDIN, J. SMADJA, Journées scientifiques sur les maladies infectieuses dans la région Sud-Ouest de l'Océan Indien : Programme Run-Emerge (REGPOT/ Programme Capacities/ 7<sup>ème</sup> Programme-Cadre de Recherche et Développement de l'Union Européenne), La Réunion, 25-26 octobre 2012.

# Remerciements

Ces remerciements s'adressent aux personnes qui m'ont accueillie, encadrée, évaluée, soutenue et supportée au cours de ces trois années de thèse.

Je remercie les Professeurs Bertrand Illien et Jacqueline Smadja de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA, Université de La Réunion). En me faisant confiance et en m'acceptant dans leur équipe, ils m'ont permis de réaliser un projet qui me tenait à cœur, valoriser les plantes endémiques de mon île. Que le Professeur Jacqueline Smadja soit particulièrement assurée de ma reconnaissance. Son soutien et ses encouragements m'ont permis de mener à bien ses travaux.

Mes remerciements s'adressent également à ma directrice de thèse, le Docteur-HDR Isabelle Grondin. Pendant ces trois dernières années, elle a été d'un soutien exceptionnel. Sa disponibilité, son écoute, sa gentillesse, sa compréhension et surtout son extrême tolérance m'ont permis d'évoluer sereinement au cours de cette longue aventure. Je la remercie pour ces discussions scientifiques, ces échanges personnels enrichissants et surtout de m'avoir aidée à éteindre cette énorme diode qu'est la thèse, et ce, toujours avec le sourire !

Je tiens également à remercier ma co-encadrante de thèse, le Docteur Emmanuelle Girard-Valenciennes. Je la remercie de m'avoir initiée à la phytochimie et de m'avoir fait confiance en m'associant, sans hésiter, à ce sujet de thèse. Son perfectionnisme, sa rigueur et ses nombreux conseils ont été précieux dans cet encadrement. Je la remercie sincèrement pour son aide et son soutien tout au long de cette thèse.

J'adresse mes remerciements aux rapporteurs de cette thèse, le Professeur Marie-Geneviève Dijoux-Franca et le Professeur Jean-Luc Wolfender. Je les remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Cette thèse a été possible grâce à différents financements. Je remercie la Région Réunion et l'Europe pour m'avoir concédé une bourse régionale, la structure Fédérative Environnement Biodiversité Santé (FedEBS) de l'Université de La Réunion pour son soutien financier, le Professeur Koussay Dellagi et le Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI) pour le financement du programme Phytochik.

Mes remerciements s'adressent également aux différents laboratoires dans lesquels j'ai eu la chance de travailler. Je remercie le Professeur Christian Lefebvre d'Hellencourt, directeur du Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO, Université de La Réunion), pour m'avoir permis de réaliser les tests d'activités biologiques au sein de son laboratoire. Je remercie le Professeur Emmanuel Bourdon pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils avisés sur les méthodologies à adopter et l'analyse des résultats. Je remercie également le Docteur Christine Robert Da-Silva pour m'avoir encadrée et accompagnée tout au long de ces tests.

Je tiens à remercier les Professeurs David Crich et Max Malacria, directeurs de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif-sur-Yvette) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), pour m'avoir accueillie à plusieurs reprises. Mes remerciements s'adressent particulièrement au Docteur Françoise Guéritte pour son accueil au sein du Pôle Substances Naturelles Plantes (PSN-P). Je la remercie pour sa disponibilité, ses conseils et sa grande générosité qui m'ont permis d'intégrer facilement son équipe. Je remercie également le Docteur Marc Litaudon, encadrant d'exception, aux conseils précieux et d'une grande disponibilité. J'ai beaucoup appris au sein de cette équipe et je ne peux être que reconnaissante à l'ensemble du PSN-P.

Plusieurs personnes ont contribué à ces travaux de doctorat. Je remercie le Docteur Pieter Leyssen et son équipe pour la réalisation du test antiviral sans qui le fractionnement bioguidé n'aurait pas été possible. Je remercie également Jean-Maurice Tamon, Eloi Boyer, Hermann Thomas ainsi que l'association des Naturalistes de Bourbon, plus particulièrement Yannis Robert, pour les excursions en forêt et la collecte des plantes.

Cette thèse a été un enrichissement professionnel mais aussi personnel. J'ai eu la chance de rencontrer des personnes sincères et généreuses que je tiens à remercier.

Dans un premier temps, je remercie mes collègues du LCSNSA, le Docteur Sabrina Elise pour cette entraide et cette complicité que nous avons eues au début de cette aventure, les Docteurs William Piong-Song, Marie Watson, Sébastien Piccino, les doctorants Clara Donadio, David Latchoumaya, Eric Grondin, Graziella Chuppa et particulièrement Emmanuelle Gros avec qui j'ai partagé de très bons moments lors de nos stages en métropole. Un grand MERCI également au Docteur Arnaud Marvilliers pour m'avoir écoutée, conseillée, soutenue, épaulée et aussi supportée au cours de ces trois dernières années.

Dans un second temps, je remercie l'ensemble des membres du GEICO. Ils ont accepté d'accueillir « une chimiste » dans leur équipe, et ont réussi « en partie » à la convertir à la biochimie. Je remercie tout particulièrement, le Docteur-HDR Marie-Paule Gonthier, le Docteur Phillipe Rondeau, les Docteurs Rana Awada et Sarah Athia et les doctorantes Méry Marimoutou, Axelle Septembre-Malaterre et Jennifer Baraka-Vidot pour m'avoir aidée lors de mes premiers pas en biocimie.

Enfin, j'exprime mes sincères remerciements à toute l'équipe 45 du PSN-P avec laquelle j'ai partagé de mémorables moments. Je remercie les ingénieurs Barbara Morleo et Cécile Appel qui m'ont accueillie le premier jour et qui ont partagé avec moi leurs connaissances techniques sur les différents appareils utilisés. Je remercie également mon amie Erell Leborgne, les Docteurs et doctorants Pierre-Marie Allard, Mehdi Beniddir, Louis-Félix Nothias mais aussi la généreuse Mélanie Bourjot, l'exceptionnelle Charlotte Geny et l'inoubliable Camille Remeur. Je n'oublie pas Estela Vallade, Aurélie Commere, Olga Gherbovet, Dominique Petit, Florent Olivon, Jérémy Dardenne, et le sympathique Sandy Desrat. J'exprime mes remerciements également aux autres équipes de l'institut (Guillou C., Al mourabit A., Ouazzani J.) et en particulier mon ami le Docteur Jonathan Sorres. Je tiens à remercier les différents services analytiques : le service de masse, le service de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN),

principalement le Docteur Marie-Thérèse Martin, remarquable spectroscopiste, pour la réalisation des spectres RMN et le service de cristallographie notamment le Docteur Pascal Retailleau pour les analyses aux rayons X.

Au cours de ces trois dernières années, j'ai également rencontré des passionnés de plantes, des amoureux de la nature. Parmi eux, je remercie chaleureusement Mr Raymond Lucas, président de l'Association des Amis des Plantes et de la Nature (APN) à laquelle j'ai adhéré dès ma première année de thèse. Je le remercie pour ces sorties pédagogiques, très enrichissantes, qui m'ont permis de me familiariser avec les plantes endémiques de La Réunion. Par ailleurs, j'adresse mes sincères remerciements au pharmacien Marc Rivière, personnalité remarquable qui a largement contribué à la valorisation de la flore réunionnaise. Je le remercie pour ces discussions passionnées qui n'ont fait que confirmer mon souhait de poursuivre dans ce domaine.

Il m'a été possible aussi de rencontrer, au cours de cette thèse, d'autres personnes qui m'ont encouragée et soutenue. Je remercie ici mes amis du GRI (Groupe de recherche sur l'immunopathologie et les maladies infectieuses) : Jessica Andries, les Docteurs Wildriss Viranaicken, Thomas Iwema et Audrey Martinez, le doctorant Vincent Thon-Hon. I would also like to thank my Indian friend Shiril Kumar. Je n'oublie pas Lydie Gence, Céline Frechina et David Fock-Chow-Tho. Merci à vous pour tous ces moments passés ensemble, pour tous ces encouragements et pour cette belle amitié.

Je remercie également deux femmes d'exception que j'ai rencontrées au cours de mes stages en Métropole, l'optimiste et pétillante Puri Relano pour qui « Il n'y a pas de problèmes, toujours des solutions » et Lina Gozard, une grande dame affectueuse, très importante pour moi. Merci de m'avoir si bien accueillie chez vous, merci pour ce réconfort et pour cette incroyable complicité !

Par ailleurs, il m'est difficile de ne pas remercier deux personnes exceptionnelles qui m'ont, par leur extrême générosité, permis de poursuivre ces longues études. Je tiens à les remercier pour ce geste inoubliable qu'ils ont fait pour moi. Merci Christian d'avoir cru en moi et merci Marie pour tout cet amour !

Mes derniers remerciements sont destinés aux personnes qui me sont le plus chères. Rien ne m'aurait été possible sans le soutien inconditionnel de ma famille. Je remercie mon père et ma mère, de m'avoir soutenue, accompagnée, aidée mais aussi préservée « malgré moi » des moments les plus durs. Je remercie également ma sœur chérie, la plus géniale des grandes sœurs, mon filleul Nathan, la joie de vivre de cette famille, et mon grand frère. Merci à cette famille soudée pour tout l'amour qu'elle m'a donné. Pour finir, il est des rencontres dans la vie auxquelles on ne s'attend pas. Je remercie ici la plus belle d'entre elles, Pierre, de m'avoir soutenue et surtout supportée pendant ces trois dernières années.



# Sommaire

|  |           |
|--|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>SOMMAIRE.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>   | <b>12</b> |
| <br>   |           |
| <b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>PREMIERE PARTIE : GENERALITES .....</b>   | <b>18</b> |
| <br>   |           |
| CHAPITRE I-1 : CONTEXTE DE L'ETUDE .....   | 19        |
| 1.1 Caractéristiques, utilisations et étude de la flore réunionnaise .....   | 19        |
| 1.1.1 Biodiversité végétale de l'île de La Réunion .....   | 19        |
| 1.1.2 Menaces et acteurs de la conservation .....  | 21        |
| 1.1.3 Pharmacopée locale .....   | 23        |
| 1.1.4 Travaux antérieurs sur la flore réunionnaise.....  | 24        |
| 1.2 Contexte de santé à La Réunion .....   | 25        |
| 1.2.1 Les maladies chroniques non transmissibles.....  | 25        |
| 1.2.2 Les maladies vectorielles et virus émergents ou réémergents.....   | 26        |
| <br>   |           |
| CHAPITRE I-2 STRESS OXYDATIF ET INFLAMMATION : IMPLICATIONS DANS LES MALADIES CHRONIQUES<br>NON TRANSMISSIBLES ..... | 28        |
| 2.1 Stress oxydatif.....   | 28        |
| 2.1.1 Définition .....   | 28        |
| 2.1.2 Les radicaux libres.....   | 28        |
| 2.1.3 Rôles bénéfiques et délétères des radicaux libres.....   | 29        |
| 2.1.4 Les antioxydants.....  | 32        |
| 2.2 L'inflammation .....   | 36        |
| 2.2.1 Définition .....   | 36        |
| 2.2.2 Les médiateurs de l'inflammation .....   | 37        |
| 2.2.3 Les anti-inflammatoires .....  | 38        |
| 2.3 Implication du stress oxydatif et de l'inflammation dans les maladies chroniques non<br>transmissibles .....     | 39        |
| <br>   |           |
| CHAPITRE I-3 LE VIRUS DU CHIKUNGUNYA, UN VIRUS REEMERGENT.....   | 41        |
| 3.1 Présentation générale .....  | 41        |
| 3.1.1 Epidémiologie.....   | 41        |
| 3.1.2 Caractéristiques du CHIKV.....   | 42        |
| 3.1.3 Transmission du virus .....  | 44        |
| 3.2 Stratégies de lutte contre le CHIKV .....  | 46        |
| 3.2.1 Lutte anti-vectorielle .....   | 46        |
| 3.2.2 Molécules antivirales ciblant le CHIKV.....  | 47        |
| 3.2.3 Le programme Phytochik.....  | 48        |
| 3.2.3.1 Présentation .....   | 49        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.2.3.2 Consortium .....  | 49         |
| 3.2.3.3 Le test antiviral (Rega Institute for Medical Research, Louvain, Belgique) .....  | 50         |
| 3.2.3.4 Les résultats obtenus.....  | 52         |
| <b>DEUXIEME PARTIE : CRIBLAGES D'ACTIVITES BIOLOGIQUES .....</b>  | <b>53</b>  |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>54</b>  |
| <b>CHAPITRE II-1 PLANTES ETUDIEES ET TESTS D'ACTIVITES REALISES.....</b>  | <b>56</b>  |
| 1.1 Sélection des plantes.....  | 56         |
| 1.2. Tests d'activités biologiques .....  | 60         |
| 1.2.1 Test de cytotoxicité .....  | 60         |
| 1.2.2 Tests antioxydants.....   | 62         |
| 1.2.2.1 Test d'hémolyse .....   | 62         |
| 1.2.2.2 Test de réduction du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> : test TEAC.....   | 64         |
| 1.2.2.3 Test de réduction du radical stable DPPH <sup>•</sup> : test DPPH.....  | 65         |
| 1.2.2.4 Test de réduction d'un complexe ferrique : test FRAP .....  | 65         |
| 1.2.2.5 Test de capture des radicaux peroxydes : test ORAC .....  | 66         |
| 1.2.2.6 Teneur en composés phénoliques : test FOLIN .....   | 67         |
| 1.2.3 Test anti-inflammatoire .....   | 67         |
| <b>CHAPITRE II-2 RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>  | <b>69</b>  |
| 2.1 Criblage d'activité cytotoxique sur cellules THP-1.....   | 69         |
| 2.1.1 Résultats du test d'activité cytotoxique .....  | 69         |
| 2.1.2 Discussion.....   | 72         |
| 2.2 Criblage d'activité antioxydante .....  | 79         |
| 2.2.1 Résultats du test d'hémolyse .....  | 79         |
| 2.2.2 Résultats des tests TEAC / FRAP/ DPPH/ORAC et du test FOLIN.....  | 84         |
| 2.2.3 Comparaison des résultats des tests chimiques et du test d'hémolyse .....   | 86         |
| 2.2.4 Discussion.....   | 90         |
| 2.3 Criblage d'activité anti-inflammatoire.....   | 96         |
| 2.3.1 Résultats du test anti-inflammatoire.....   | 96         |
| 2.3.2 Discussion.....   | 98         |
| <b>CONCLUSION .....</b>   | <b>104</b> |
| <b>TROISIEME PARTIE : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE <i>STILLINGIA LINEATA</i> - RECHERCHE D'INHIBITEURS DU CHIKV .....</b>                 | <b>109</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>110</b> |
| <b>CHAPITRE III-1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE <i>STILLINGIA LINEATA</i>.....</b>   | <b>111</b> |
| 1.1 La famille des Euphorbiaceae .....  | 111        |
| 1.1.1 Description.....  | 111        |
| 1.1.2 Utilisations des Euphorbiaceae.....   | 112        |
| 1.2 Le genre <i>Stillingia</i> Garden ex L. et l'espèce <i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll. Arg sous-espèce <i>lineata</i> ..... | 114        |
| 1.2.1 Répartition et description botanique.....   | 114        |

|   |            |
|---|------------|
| 1.2.2 Données ethnopharmacologiques .....   | 118        |
| 1.2.3 Activités biologiques et composition chimique pour le genre <i>Stillingia</i> ..... | 119        |
| 1.2.4 Molécules isolées.....  | 120        |
| 1.3 Les composés diterpéniques .....  | 124        |
| 1.3.1 Origine biosynthétique .....  | 124        |
| 1.3.2 Les diterpènes de type tonantzitlolone .....  | 126        |
| 1.3.3 Les pimaranes.....  | 128        |
| <b>CHAPITRE III-2 : ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DE <i>STILLINGIA LINEATA</i>.....</b>             | <b>130</b> |
| 2.1 Récolte et identification.....  | 130        |
| 2.2 Extraction.....   | 130        |
| 2.3 Vérification de l'activité antivirale de la plante .....                              | 131        |
| 2.4 Fractionnement bioguidé .....   | 132        |
| 2.4.1 Fractionnement de l'extrait brut.....   | 132        |
| 2.4.2 Purification des fractions actives .....  | 133        |
| 2.4.3 Présentation des composés isolés .....  | 138        |
| 2.5 Caractérisation des composés isolés .....   | 139        |
| 2.5.1 Tonantzitlolone.....  | 139        |
| 2.5.2 4'-Acétoxytonantzitlolone.....  | 147        |
| 2.5.3 4'-Hydroxytonantzitlolone.....  | 151        |
| 2.5.4 <i>ent</i> -12 $\alpha$ -Hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène.....                 | 155        |
| 2.6 Activités antivirales ciblant le CHIKV des composés isolés.....                       | 162        |
| 2.6.1 Résultats du test antiviral .....   | 162        |
| 2.6.2 Relations structure-activité des tonantzitlolones .....                             | 166        |
| <b>CONCLUSION .....</b>   | <b>167</b> |
| <b>CONCLUSION GENERALE .....</b>  | <b>170</b> |
| <b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>   | <b>176</b> |
| <b>1 : PROCEDURES GENERALES.....</b>  | <b>177</b> |
| 1.1 Matériel végétal.....   | 177        |
| 1.2 Extraction accélérée par solvant (ASE® 300) (LCSNSA, Université de La Réunion).....   | 178        |
| 1.2.1 Réalisation des extraits pour les criblages d'activités biologiques.....            | 178        |
| 1.2.2 Réalisation de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....       | 178        |
| 1.3 Fractionnement de <i>Stillingia lineata</i> .....                                     | 179        |
| <b>2 : TESTS BIOLOGIQUES .....</b>  | <b>182</b> |
| 2.1 Evaluation de la cytotoxicité (GEICO, Université de La Réunion) .....                 | 182        |
| 2.1.1 Préparation des extraits végétaux.....  | 182        |
| 2.1.2 Test au MTT .....   | 182        |
| 2.1.3 Culture cellulaire des cellules THP-1 .....   | 182        |
| 2.1.4 Numération cellulaire .....   | 183        |
| 2.2 Evaluation du pouvoir antioxydant (GEICO, Université de La Réunion).....              | 183        |
| 2.2.1 Préparation des extraits végétaux.....  | 183        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 2.2.1 Test d'hémolyse .....  | 183        |
| 2.3 Evaluation du pouvoir anti-inflammatoire (GEICO, Université de La Réunion) .....                                     | 184        |
| 2.3.1 Préparation des extraits et vérification de leur cytotoxicité sur cellules RAW-Blue™ .....                         | 184        |
| 2.3.2 Culture cellulaire .....   | 184        |
| 2.3.3 Test anti-inflammatoire .....  | 185        |
| 2.4 Exploitations des résultats .....  | 185        |
| 2.5 Evaluation de l'inhibition du CHIKV <i>in cellulo</i> (Rega Institute for Medical Research, Louvain, Belgique) ..... | 185        |
| 2.5.1 Préparation de la plaque .....   | 185        |
| 2.5.2 Test au MTS .....  | 186        |
| 2.5.3 Vérification de l'activité antivirale par microscopie .....  | 186        |
| 2.5.4 Culture cellulaire des cellules Vero .....   | 186        |
| <b>3 : FRACTIONNEMENTS ET PURIFICATIONS .....</b>  | <b>188</b> |
| 3.1 Techniques chromatographiques .....  | 188        |
| 3.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) .....   | 188        |
| 3.1.2 Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP) .....  | 188        |
| 3.1.3 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) .....   | 189        |
| 3.2 Analyses physiques et spectrales des composés .....  | 189        |
| 3.2.1 Pouvoir rotatoire .....  | 189        |
| 3.2.2 Spectroscopie UV-Visible .....   | 189        |
| 3.2.3 Spectroscopie InfraRouge (IR) .....  | 190        |
| 3.2.4 Spectrométrie de masse couplée à l'UPLC .....  | 190        |
| 3.2.5 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....  | 190        |
| <b>4. CARACTERISTIQUES PHYSIQUES ET SPECTRALES DES PRODUITS ISOLÉS .....</b>   | <b>191</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>196</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES .....</b>   | <b>219</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>  | <b>221</b> |
| <b>LEXIQUE .....</b>   | <b>222</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>   | <b>224</b> |

# Liste des abréviations

|                         |   |                  |  |
|-------------------------|---|------------------|--|
| <b>[α]<sub>D</sub></b>  | : Pouvoir rotatoire   | <b>IE</b>        | : Impact électronique  |
| <b>AAPH</b>             | : Hydrochlorure de 2,2'-azobis (2-amidinopropane)   | <b>IL</b>        | : Interleukines  |
| <b>ACN</b>              | : Acétonitrile  | <b>IR</b>        | : Infrarouge   |
| <b>AcOEt</b>            | : Acétate d'éthyle  | <b>J</b>         | : Constante de couplage  |
| <b><sup>13</sup>C</b>   | : Carbone 13  | <b>KB</b>        | : Lignée cellulaire provenant d'un carcinome oral humain                                       |
| <b>CC</b>               | : Chromatographie sur colonne   | <b>LPS</b>       | : Lipopolysaccharide   |
| <b>CC<sub>50</sub></b>  | : Concentration en µg/mL pour laquelle est obtenue 50 % de mortalité cellulaire   | <b>M</b>         | : Masse moléculaire (g.mol <sup>-1</sup> )   |
| <b>CI</b>               | : Concentration inhibitrice   | <b>MCR-5</b>     | : Lignée cellulaire saine de fibroblastes diploïdes de poumons de fœtus humain                 |
| <b>CCE</b>              | : Chromatographie sur couche épaisse  | <b>MeOH</b>      | : Méthanol   |
| <b>CDCl<sub>3</sub></b> | : Chloroforme deutéré   | <b>MTT</b>       | : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium                             |
| <b>CE<sub>50</sub></b>  | : Concentration en µg/mL pour laquelle est obtenue 50 % d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus du CHIKV | <b>ND</b>        | : Non déterminé  |
| <b>DCM</b>              | : Dichlorométhane   | <b>NF-κB</b>     | : (Nuclear Factor-κB) Facteur nucléaire kappa B  |
| <b>DO</b>               | : Densité optique   | <b>NOESY</b>     | : Nuclear overhauser effect spectroscopy   |
| <b>CHIKV</b>            | : Virus du chikungunya  | <b>ORAC</b>      | : (Oxygen radical absorbance capacity) Capacité d'absorption des radicaux oxygénés             |
| <b>CLHP</b>             | : Chromatographie liquide à haute performance   | <b>PDA</b>       | : (Photodiode array) Détecteur à barrettes de diodes   |
| <b>CL-SM</b>            | : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse   | <b>PNN</b>       | : Polynucléaires neutrophiles  |
| <b>COSY</b>             | : Correlation spectroscopy  | <b>RAW-Blue™</b> | : Lignée de macrophages de souris transfectée pour exprimer une phosphatase alcaline           |
| <b>COX</b>              | : Cylo-oxygénase  | <b>RMN</b>       | : Résonance magnétique nucléaire   |
| <b>CRVOI</b>            | : Centre de recherche et de veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien  | <b>RP-18</b>     | : (Reversed phase-18) Phase inverse composée de silice greffée par des groupements octadécyles |
| <b>DEDL</b>             | : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière   | <b>SEAP</b>      | : (Secreted alkaline phosphatase) Phosphatase alcaline sécrétée                                |
| <b>DEPT-135</b>         | : Distortionless enhanced polarization transfer 135°  | <b>SEM</b>       | : (Standart error of the mean) Erreur standard sur la moyenne                                  |
| <b>DPPH</b>             | : Radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle  | <b>SM</b>        | : Spectrométrie de masse   |
| <b>DMSO</b>             | : Diméthylsulfoxyde   | <b>TAH</b>       | : Transfert d'atome d'hydrogène  |
| <b>δ<sub>C</sub></b>    | : Déplacement chimique du carbone   | <b>TE</b>        | : Transfert d'électrons  |
| <b>δ<sub>H</sub></b>    | : Déplacement chimique du proton  | <b>TEAC</b>      | : (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) Capacité antioxydante exprimé en équivalent trolox  |
| <b>EDTA</b>             | : (Ethylenediaminetetraacetic acid) Acide éthylène diamine tétracétique   | <b>THP-1</b>     | : Lignée cellulaire de monocytes humains dérivés de leucémie monocytique aiguë                 |
| <b>ESI</b>              | : Ionisation electrospray   | <b>TNF-α</b>     | : (Tumor Necrosis Factor α) Facteur de nécrose tumorale alpha                                  |
| <b>FRAP</b>             | : (Ferric ion reducing antioxydant power) Pouvoir antioxydant de réduction des ions ferriques                             | <b>UV</b>        | : Ultra-Violet Visible   |
| <b>GR</b>               | : Globules rouges   | <b>Vero</b>      | : (Verda reno) Cellules rénales de singe vert africain ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )       |
| <b><sup>1</sup>H</b>    | : Proton  |                  |  |
| <b>Hb</b>               | : Hémoglobine   |                  |  |
| <b>HMBC</b>             | : Heteronuclear multiple bond correlation   |                  |  |
| <b>HR</b>               | : Haute résolution  |                  |  |
| <b>HSQC</b>             | : Heteronuclear single quantum coherence  |                  |  |
| <b>HT<sub>50</sub></b>  | : Temps nécessaire à la lyse de 50 % des cellules sanguines   |                  |  |
| <b>Hz</b>               | : Hertz   |                  |  |



## Introduction générale

*Agarista buxifolia* (Comm. ex Lam.) G. Don  
Ericaceae

# Introduction générale

## ***De la plante aux médicaments...***

Plusieurs centaines de milliers d'espèces différentes composent la flore mondiale. Environ 250 000 d'entre elles ont été décrites et répertoriées. Ces plantes, véritables usines chimiques, synthétisent des molécules appelées métabolites primaires qui leur sont vitales (sucres, acides aminés, protéines, acides nucléiques ...). Elles synthétisent également des molécules qui leur permettent de contrôler leur environnement, de survivre ou encore de se reproduire en éloignant les prédateurs ou en attirant des insectes pollinisateurs par exemple (composés phénoliques, terpènes, stéroïdes ...). Ces métabolites secondaires sont extrêmement nombreux. Du fait de leurs structures chimiques très diversifiées et parfois très complexes, certaines de ces molécules naturelles sont efficaces contre les maladies humaines.

L'isolement des principes actifs des plantes commença au début du XIX<sup>ème</sup> siècle. En 1785, une étude fut publiée sur l'utilisation de la digitaline pour son action diurétique\*<sup>1</sup> et son influence sur certaines faiblesses cardiaques. En 1809, des essais cliniques ont commencé avec des extraits de feuilles. Quelques années plus tard, le principe actif (la digitaline) fut isolé. Cette plante est aujourd'hui à la base de nombreuses spécialités pharmaceutiques destinées à soigner certaines insuffisances cardiaques [1].

Depuis, plusieurs principes actifs ont été isolés de plantes et leurs dérivés largement utilisés. Ainsi l'acide salicylique isolé de l'écorce de saule (*Salix alba*), efficace contre la fièvre, les douleurs et les rhumatismes articulaires, a été exploité sous la forme de son dérivé, l'acide acétylsalicylique ou Aspirin® (12 000 tonnes de ventes annuelles mondiales). Et d'autres principes actifs peuvent encore être cités : la morphine de l'opium du pavot (*Papaver somniferum*), la quinine de l'écorce du quinquina (*Cinchona officinalis*), la colchicine du colchique (*Colchicum autumnale*), l'atropine de la belladone

---

<sup>1</sup> Les mots suivis d'un astérisque sont définis dans le lexique page 222.

(*Atropa belladonna*), la vinblastine et la vincristine de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), le taxol de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*) ou encore la théobromine du cacao (*Theobroma cacao*)...

Aujourd'hui, près de la moitié des médicaments que nous utilisons a une composition d'origine végétale et le quart renferme des extraits de plantes ou des molécules actives provenant directement des plantes [2]. Si l'on s'intéresse aux sources végétales de molécules, il est à noter qu'à peine 2000 à 3000 plantes ont fait l'objet d'études scientifiques, chimiques ou pharmacologiques.

De plus, la plus grande diversité floristique se concentre dans les forêts tropicales et équatoriales représentant 7 % de la surface du globe [3]. Par conséquent, les plantes endémiques ou indigènes de La Réunion, île tropicale de l'Océan Indien, peuvent représenter de nouvelles sources de métabolites secondaires bioactifs pour répondre aux demandes en matière d'alternatives thérapeutiques.

Par ailleurs, à La Réunion, le contexte de santé rend indispensable la recherche de nouveaux candidats médicaments pouvant apporter des réponses partielles aux deux principaux types de problèmes de santé publique que sont les maladies chroniques non transmissibles (diabète, obésité...) et les maladies vectorielles\* virales réémergentes\* (chikungunya, dengue...).

Des thématiques de recherche de plusieurs laboratoires locaux, universitaires, privés et hospitaliers se sont développées autour de ces deux problématiques. Ainsi à l'Université de La Réunion, la Fédération Environnement, Biodiversité, Santé (FedEBS) promeut les initiatives collaboratives de recherche en matière de biodiversité et de santé. Elle regroupe entre autres le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) et le Groupe d'Etude sur l'Inflammation Chronique et l'Obésité (GEICO).

Depuis de nombreuses années, le LCSNSA a développé des compétences en matière d'études phytochimiques de la flore locale en travaillant en partenariat avec les botanistes et les associations locales de naturalistes amateurs. Parmi les programmes de recherche du laboratoire, on peut citer le programme Phytochik recherchant des molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya. Le GEICO s'intéresse à la



modulation de l'inflammation du tissu adipeux dans l'obésité et les pathologies associées en ciblant la recherche d'antioxydants, d'anti-inflammatoires et leurs mécanismes d'action.

La recherche de molécules bioactives issues de la biodiversité et ciblant les pathologies citées peut donc s'appuyer sur les compétences académiques locales et les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette voie de recherche collaborative.

**Dans la première partie** du manuscrit, le contexte spécifique de l'étude est présenté ainsi que les particularités de la flore réunionnaise et les différents aspects des pathologies ciblées.

La suite du manuscrit concerne le travail réalisé dans cette thèse. Les objectifs visés étaient de repérer dans un premier temps les plantes ayant des activités cytotoxique, anti-oxydante, anti-inflammatoire et antivirale contre le virus du chikungunya, puis, dans un second temps de caractériser, pour les plantes qui se démarquaient, leurs molécules bioactives. Pour cela, divers tests ciblant des activités en relation avec les dysfonctionnements métaboliques ou les maladies antivirales réémergentes ont été mis en œuvre.

**Dans la deuxième partie**, les résultats des activités cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire obtenus à partir du criblage d'extraits bruts de dix-huit plantes de l'île de La Réunion sont décrits. Le potentiel bioactif d'un certain nombre de plantes endémiques ou indigènes de l'île a été révélé par cette évaluation biologique préliminaire, réalisée au moyen de tests *in cellulo*. Ces espèces sont susceptibles d'être, par la suite, exploitées pour la recherche de nouvelles molécules bioactives.

**Dans la troisième partie** du travail, le fractionnement bioguidé d'extraits de plantes potentiellement intéressantes a été entrepris. Trois critères ont été à l'origine du choix de la ou des plantes :

- Les résultats des tests antioxydant et anti-inflammatoire obtenus dans la deuxième partie sur les dix-huit extraits de plantes,
- Les résultats du test antiviral ciblant le virus du chikungunya obtenus sur un certain nombre d'extraits de plantes dans le cadre du **Programme Phytochik**

mené au sein du LCSNSA sur 180 espèces de La Réunion,

- L'absence d'investigation chimique entreprise sur un bon nombre d'espèces de La Réunion.

Une espèce indigène *Stillingia lineata* a particulièrement retenu notre attention et a ainsi fait l'objet d'investigations phytochimiques approfondies afin d'aboutir à l'isolement de molécules actives à partir de l'extrait actif d'écorce. En raison du savoir-faire acquis au cours du Programme Phytochik dans la recherche d'inhibiteurs de la réplication du virus du chikungunya, c'est ce test qui a tout naturellement été sélectionné pour suivre les différentes étapes de fractionnement.



**Première partie :**  
**Généralités**

*Xylopiya richardii* Boivin ex. Baill.  
Annonaceae

## Chapitre I-1 : Contexte de l'étude

### 1.1 Caractéristiques, utilisations et étude de la flore réunionnaise

#### 1.1.1 Biodiversité végétale de l'île de La Réunion

L'île de La Réunion est un département français d'outre-mer appartenant à l'Archipel des Mascareignes. Elle est localisée dans l'Océan Indien à 700 km à l'Est de Madagascar. Elle s'étend sur 2512 km<sup>2</sup> et se caractérise par la présence de hauts reliefs accidentés d'où culminent le piton des Neiges (3071 mètres d'altitude) et le piton de la Fournaise (2632 mètres d'altitude). Elle dispose d'un climat tropical composé de deux saisons distinctes : l'hiver austral (de mai à novembre) où le climat est sec et frais, et l'été austral aussi appelé « saison des pluies » (de décembre à avril) correspondant à une période chaude et pluvieuse soumise au passage de dépressions tropicales.

Ce relief et ce climat ont fortement contribué à la mise en place de différents écosystèmes propices au développement d'une flore variée. Sur la côte Ouest dite « sous le vent », la végétation est peu dense, on y trouve les forêts hétérogènes de basse altitude et les savanes. Sur la côte opposée, dite « au vent », exposée aux vents d'alizés et plus souvent arrosée, les paysages sont verdoyants, on y trouve les forêts humides hétérogènes de basses altitudes. Dans les hauteurs de l'île, à partir de 2000 mètres d'altitude, les forêts humides de montagnes laissent place aux formations arbustives et prairies altimontaines [4].

A l'origine, les espèces végétales de l'île de La Réunion sont arrivées par voie maritime (courants marins), par voie éolienne (vents et cyclones) ou par voie animale (oiseaux) des zones continentales les plus proches, principalement de Madagascar et de l'Afrique de l'Est. La voie des mers représente approximativement 5 à 10 % des origines de la flore indigène et ne concerne pratiquement que la flore littorale (*Ipomoea pes-caprae* ssp. *brasiliensis*, Patate à Durand ; *Zoysia matrella*, Gazon bord de mer ; *Tournefortia argentea*, Veloutier ; *Pemphis acidula*, Bois matelot ...). La voie des airs qui représente 30 % des origines de la flore indigène aurait probablement assuré les premières végétalisations intérieures de l'île (*Eriotrix*, *Faujasia*, *Parafaujasia*, *Monarrhenus*). Enfin, la voie animale (oiseaux provenant majoritairement des terres

continentales les plus proches notamment Madagascar) concerne plus de 50 % des origines de la flore indigène de la Réunion [5].

C'est au cours de processus de spéciation que des espèces endémiques, propres à l'île, sont apparues [5]. Ces espèces indigènes et endémiques contribuent aujourd'hui à la biodiversité locale. La flore spontanée de La Réunion compte 1743 taxons répartis en 49 % d'espèces indigènes (855 espèces), 48 % d'espèces exotiques (834 espèces) et 3 % d'espèces cryptogènes\* (54 espèces). Parmi les espèces indigènes, 28 % sont strictement endémiques de La Réunion et 18 % sont endémiques de la région [6]. En raison de cette biodiversité, La Réunion fait partie, avec d'autres îles de la zone, de l'un des trente-quatre points chauds de la biodiversité mondiale [7].

### 1.1.2 Menaces et acteurs de la conservation

Depuis l'arrivée de l'Homme sur l'île (XVII<sup>ème</sup> siècle), certaines espèces végétales et leurs écosystèmes ont été entièrement détruits. Il ne resterait que 30 % des habitats d'origine à La Réunion [8]. Les espèces qui ont été préservées sont celles situées sur des zones difficiles d'accès, inappropriées aux activités agricoles et à l'urbanisation (Figure 1).

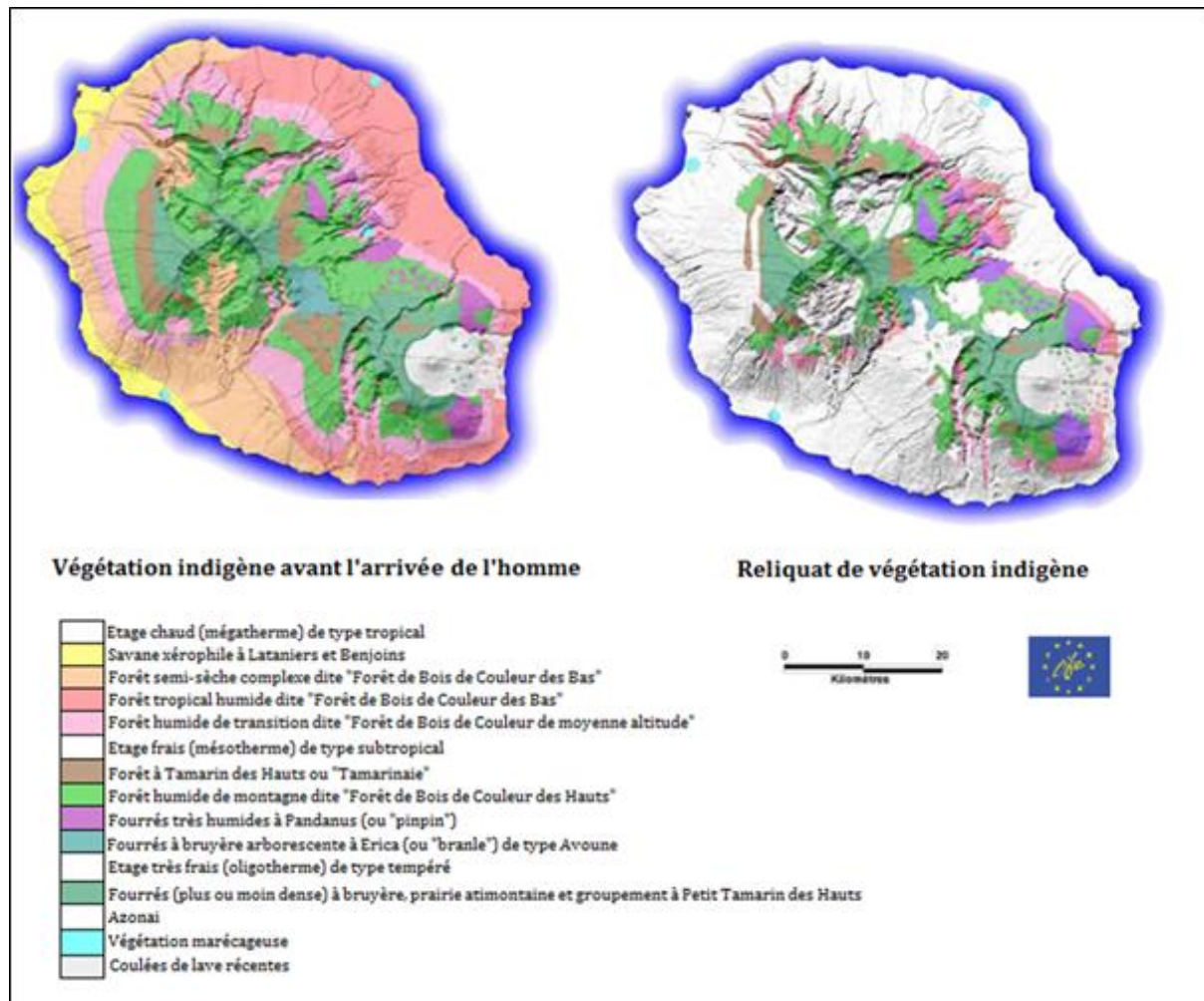


Figure 1 : Carte de la végétation indigène présente à La Réunion

(Source : d'après T. Cadet, J. Dupont, R. Robert, SREPEN, DIREN et PNR / Fond cartographique : Estompagne de la BDAN IGN / Réalisation : Parc national de La Réunion – Août 2009)

L'introduction d'animaux nuisibles (*Pycnonotus jacosus*, merle de Maurice ; rats...) et surtout de pestes végétales (*Psidium cattleianum*, Goyavier ; *Rubus alceifolius*, Raisin marron ; *Hedychium gardnerianum*, Longose de Gardner ; *Lantana camara*,

Galabert ; *Boehmeria penduliflora*, Bois chapelet ...) ont également largement contribué à perturber cette biodiversité [5].

Selon l'Index de la flore vasculaire de La Réunion, 49 espèces végétales ont disparu de l'île et 275 autres sont aujourd'hui menacées. Trois espèces sont considérées comme éteintes dans le monde : deux endémiques de La Réunion, *Fernelia pedunculata* et *Mucuna pallida*, et une endémique des Mascareignes, *Claoxylon grandifolium* [9]. Le Tableau I révèle le nombre d'espèces végétales menacées à La Réunion.

*Tableau I*  
*Menaces d'extinction de la flore indigène de la Réunion selon les critères UICN (2001, 2003)*  
(Source : d'après UICN France, MNHN, FCBN & CBNM (2010). *La liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Flore vasculaire de la Réunion*) [9]

| Taxon                           | Nombre d'espèces | Taux de menace (%) |
|---------------------------------|------------------|--------------------|
| Eteint au niveau mondial        | 3                | 0,33               |
| Eteint à l'état sauvage         | 2                | 0,22               |
| Eteint au niveau régional       | 44               | 4,86               |
| En danger critique d'extinction | 91               | 10,06              |
| En danger                       | 80               | 8,84               |
| Vulnérable                      | 104              | 11,49              |
| Quasi menacé                    | 36               | 3,98               |
| De préoccupation mineure        | 420              | 46,41              |
| Insuffisamment documenté        | 125              | 13,81              |

Depuis quelques années, plusieurs acteurs locaux œuvrent pour la préservation de la biodiversité végétale réunionnaise : le Conservatoire National Botanique de Mascarin (CNBM), le Parc National de La Réunion (PNR), l'Office National des Forêts (ONF), la Direction Régionale de l'Environnement (DIREN), la Société Réunionnaise pour l'Etude et la Protection de l'Environnement et de la Nature (SREPEN) et l'Association des Amis des Plantes et de la Nature (APN). En mai 2010, ces différents acteurs (DIREN, PNR, Conseil Régional, ONF...) ont lancé la « Stratégie de lutte contre les espèces invasives à la Réunion », lutte désignée par l'UNESCO comme prioritaire pour maintenir le Parc National de La Réunion au rang de patrimoine mondial. Différents arrêtés ont également été mis en place dans le but d'interdire la récolte d'espèces protégées ou encore le défrichage des bois et forêts (arrêté du 24 février 1995 - *JO 11 avril 1995, p. 5693*) (Code forestier, art. L. 363-10).

### 1.1.3 Pharmacopée locale

L'éloignement géographique et le nombre restreint de médecins sur l'île au début du peuplement ont contraint la population réunionnaise à puiser dans les phytoressources locales pour se soigner. Les connaissances des Malgaches, reconnaissant sur l'île des espèces communes à Madagascar, l'utilisation empirique de la flore par des esclaves marrons\* ou encore l'apport des différentes cultures, notamment indienne, ont contribué à l'émergence d'une pharmacopée locale originale [10]. Cette pharmacopée a longtemps été transmise oralement avant d'être retranscrite dans des ouvrages à la fin des années 1800 [11-14]. Elle a ensuite été réactualisée à la fin des années 1900 [15-20] et plus récemment par R. Lavergne et M. Rivière [21-24].

Aujourd'hui, bien que l'offre de soin soit performante à La Réunion, le recours thérapeutique aux plantes médicinales demeure important. D'après une étude de l'ODR (Observatoire du Développement pour la Réunion), neuf Réunionnais sur dix ont déjà utilisé des plantes pour se soigner ; 43 % d'entre eux continuent à en utiliser régulièrement [25]. D'autres chiffres font état de 85 % de la population réunionnaise qui consommerait des préparations à base de plantes [26]. La pharmacopée réunionnaise comprend pas moins de cent quarante-sept plantes différentes [25]. Les trois plantes les plus utilisées, selon une étude menée en 2006 sur 1000 familles réunionnaises, sont : la cannelle (*Cinamomum burmanii*) à 67 %, la citronnelle (*Cimbopogon citratus*) à 66,7 % et l'ayapana (*Eupatorium ayapana*) à 66,6 % (ODR, 2006). D'autres plantes indigènes sont également utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques : l'ambaville (*Hubertia ambavilla*), le bois de reinette (*Dodonaea viscosa*), le change écorce (*Aphloia theiformis*)... (Figure 2).









|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
|  | <p><b>Ayapana</b><br/> <i>Eupatorium ayapana</i><br/>                     Asteraceae<br/>                     Feuilles : Troubles digestifs</p>   |  | <p><b>Cannelle</b><br/> <i>Cinamomum burmanii</i><br/>                     Lauraceae<br/>                     Feuilles : Etat grippaux et troubles digestifs</p>   |
|  | <p><b>Ambaville</b><br/> <i>Hubertia ambavilla</i><br/>                     Asteraceae<br/>                     Feuilles : Gastrites et ulcères d'estomac (usage interne), érythèmes fessiers (usage externe)</p> |  | <p><b>Change écorce</b><br/> <i>Aphloia theiformis</i><br/>                     Aphloiaceae<br/>                     Feuilles : Rafrâchissante* et diurétique*</p> |
|  | <p><b>Bois de reinette (ou rainette)</b><br/> <i>Dodonaea viscosa</i><br/>                     Sapindaceae<br/>                     Feuilles : diurétique*, anti-inflammatoire, antirhumatismal</p>               |  | <p><b>Citronnelle</b><br/> <i>Cymbopogon citratus</i><br/>                     Poaceae<br/>                     Feuilles : Grippe, digestion, sommeil</p>          |

Figure 2 : Plantes de la pharmacopée réunionnaise  
 (Source : d'après Aplamedom, 2011 [27])

Vingt-et-une de ces plantes traditionnellement utilisées font actuellement l'objet d'une révision pour être inscrites à la pharmacopée française [28]. Cette inscription ainsi que la création d'une filière PAM (Plantes aromatiques et médicinales) sont suivies par l'Association pour les plantes aromatiques et médicinales de La Réunion (APLAMEDOM). Cette association créée en 1999, composée de scientifiques, de pharmaciens et de tisaneurs\*, a pour objectif la reconnaissance par validation scientifique des usages traditionnels des PAM. Depuis 2005, elle réalise un programme pédagogique ethnobotanique (concours « Zerbaz Péi ») permettant de recenser et d'actualiser les connaissances des familles réunionnaises en termes d'utilisation de plantes médicinales [27].

#### 1.1.4 Travaux antérieurs sur la flore réunionnaise

Les premières études menées sur les plantes réunionnaises ont été réalisées par le laboratoire de chimie de l'Université de La Réunion au début des années 90. Smadja *et al.* ont réalisé un vaste criblage chimique sur plus de trois cents plantes endémiques ou indigènes de la Réunion [29-31] complétant une étude ethnobotanique menée par R. Lavergne sur les plantes médicinales de l'île utilisées et prescrites par les tisaneurs [32].

Dans la continuité de ce criblage chimique préliminaire, en 1997, E. Valenciennes s'est plus particulièrement intéressée à l'étude de vingt-quatre espèces végétales, susceptibles de contenir des alcaloïdes [33]. Dans le cadre de ces travaux, diverses

activités biologiques ont été évaluées (anti-VIH, anticancéreux, antipaludéen...). La même année, Adersen *et al.* ont réalisé un criblage d'activité biologique sur quatre-vingt plantes réunionnaises à la recherche d'activités antihypertensive et diurétique [34]. Les résultats obtenus ont permis d'établir un lien entre les données ethnopharmacologiques et les propriétés réelles des plantes ; l'activité biologique de plantes non utilisées dans la pharmacopée traditionnelle a également été mise en évidence.

A partir des années 2000, des investigations purement phytochimiques ont été entreprises sur *Embelia angustifolia*, *Badula barthesia*, *Euodia borbonica*, *Psiadia dentata* et des espèces du genre *Melicope* conduisant à l'isolement de métabolites secondaires [35-42].

En 2002, Fortin *et al.* ont évalué l'activité antivirale de trente-six plantes réunionnaises contre le virus de l'herpès et le poliovirus [43]. En 2004, divers tests d'activités biologiques (activité anti-radicalaire et antioxydante, antifongique, inhibition de l'acétylcholinestérase, inhibition de la fusion virale entre le VIH et les cellules lymphocytaires) ont été réalisés sur une sélection de soixante-quinze espèces végétales par C. Poullain [44, 45]. Enfin, parmi les récents travaux réalisés sur la flore réunionnaise, M.C Jonville *et al.* ont évalué en 2008 les activités antipaludéenne et cytotoxique de neuf plantes de l'île [46] ainsi qu'en 2011, le potentiel antipaludéen, anti-inflammatoire et cytotoxique de dix-neuf plantes [47]. Une thèse consacrée à l'étude d'*Eupatorium ayapana* (Ayapana) a complété ces informations sur la flore réunionnaise en 2011 [48].

## **1.2 Contexte de santé à La Réunion**

### **1.2.1 Les maladies chroniques non transmissibles**

Depuis sa départementalisation en 1946, l'île de La Réunion connaît de profonds changements économiques et sociaux. Ces changements ont contribué à l'amélioration des conditions de vie (diminution de la mortalité infantile, amélioration des conditions sanitaires et éducatives) mais aussi à l'augmentation de la prévalence de certaines maladies comme l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires, les cancers ou encore les maladies neuro-dégénératives.

En 2007, le taux de prévalence du diabète traité à La Réunion a été évalué à 7,8 %, soit le taux le plus élevé de l'ensemble du territoire français, deux fois supérieur au taux métropolitain (3,9 %)[49-51]. Par ailleurs, la mortalité associée à cette maladie est trois fois plus importante à La Réunion qu'en Métropole [49]. Le diabète est le deuxième motif d'affection longue durée (ALD) à La Réunion avec 28 % d'ALD en 2006, nombre qui a augmenté de 30 % en six ans [49]. Les maladies cardiovasculaires sont les premiers motifs d'ALD (38 % d'ALD, augmentation de 50 % en 6 ans) [49]. Ces maladies sont d'ailleurs les premières causes de décès sur l'île représentant un décès sur trois [52]. Concernant l'obésité, la population réunionnaise adulte est de plus en plus concernée avec des prévalences de l'ordre de 35 % pour le surpoids et de 15 % pour l'obésité, contre respectivement 30 % et 11 % au niveau national (Obépi 2003). Chez les enfants, des enquêtes réalisées en 2002-2003 en milieu scolaire montrent que 26,5 % des écoliers scolarisés en classe de CM2 étaient obèses ou en surpoids contre 19,6 % pour la Métropole [53].

Le passage de l'île d'une société traditionnelle où l'approvisionnement alimentaire était difficile et où l'activité physique était quotidienne, à une société urbanisée, sédentaire bénéficiant d'une alimentation plus riche et moins équilibrée a induit l'augmentation de la prévalence de ces pathologies [50, 54, 55]. Ces maladies appelées maladies chroniques non transmissibles (MCNT) font aujourd'hui partie intégrante des enjeux et des problématiques de santé à La Réunion. Les institutions locales ont mis en place différents programmes dans le but d'informer la population de l'importance d'une alimentation saine et d'un mode de vie équilibré. Le Plan Régional de Santé Publique (PRSP), le Plan Départemental de Lutte contre l'Obésité (PDLO) et le Schéma Régional d'Organisation Sanitaire (SROS) en sont quelques exemples.

### **1.2.2 Les maladies vectorielles et virus émergents ou réémergents**

Parallèlement aux pathologies chroniques non transmissibles, La Réunion, située en zone afro-tropicale, est soumise à une exposition permanente aux maladies vectorielles et virus émergents\* ou réémergents. Plusieurs exemples permettent de mieux comprendre ces menaces.

L'île a longtemps été une zone de transmission du paludisme, initialement décrit pour la première fois en 1869, et en a été un foyer majeur jusqu'en 1949. L'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS) en a confirmé l'éradication en 1979. Cependant, de 1979 à 2004, 3350 cas ont été notifiés aux autorités sanitaires, la majorité d'entre eux étant importés principalement de Madagascar et des Comores. Chaque année, les cas importés (150 à 180) et la présence permanente du moustique vecteur (*Anopheles arabiensis*) sur le territoire confirment que La Réunion reste sous la menace d'une réintroduction potentielle du parasite et de transmission de la maladie.

Par ailleurs, une première épidémie de dengue a été décrite en 1977-1978, touchant un tiers de la population (170000 personnes). Une seconde épidémie a eu lieu de mars à juillet 2004 (228 cas) [56]. Enfin, très récemment, début 2012, vingt cas ont été identifiés (treize confirmés et sept considérés comme probables) [57]. Ces cas ont conduit à la mise en place de l'alerte 2B («Identification de plusieurs regroupements de cas autochtones distincts géographiquement») du dispositif Orsec<sup>2</sup> du plan de lutte contre la dengue et le chikungunya de l'ARS (Agence Régionale de Santé) [58, 59]. Au total pour cette année 2012, ce sont trente-et-un cas autochtones qui ont été identifiés (valeur estimée en septembre 2012) [60].

L'exemple le plus représentatif de virus réémergent reste celui du virus du chikungunya. En 2005, La Réunion a connu une crise sanitaire sans précédent surprenant les autorités sanitaires locales et nationales [61, 62]. Plus de 244000 personnes ont été contaminées, soit près de 38 % de la population avec un pic épidémique atteint en février 2006 estimé à 46000 cas en une semaine [63, 64]. L'épidémiologie de ce virus ainsi que ses caractéristiques seront détaillées au chapitre I-3. L'île reste actuellement menacée ; 112 cas ont été rapportés en 2010[65].

La réémergence du CHIKV dans la zone Océan Indien a mis en exergue la nécessité d'élaborer une stratégie régionale d'information, de surveillance, de prévention et de contrôle des infections liées aux arbovirus. Ces maladies vectorielles font partie des objectifs du 2<sup>ème</sup> Plan Régional Santé Environnement (PRSE-2), et du Plan Stratégique de Santé de La Réunion et de Mayotte, dont l'évaluation finale est prévue en 2015.

---

<sup>2</sup> Echelle comportant 10 niveaux de risque

## **Chapitre I-2 Stress oxydatif et inflammation : implications dans les maladies chroniques non transmissibles**

### **2.1 Stress oxydatif**

#### **2.1.1 Définition**

L'énergie nécessaire au fonctionnement d'une cellule est fournie lors de la respiration cellulaire où l'ATP (adénosine triphosphate), molécule à fort potentiel énergétique, est produite. Au cours de cette respiration cellulaire et plus précisément dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie, des réactions d'oxydo-réduction ont lieu ; des électrons sont transportés jusqu'à un accepteur final, l'oxygène, qui est réduit en molécule d'eau. Une partie de cet oxygène (1 à 3 %) n'est cependant pas réduite en molécule d'eau mais convertie en Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou radicaux libres (R<sup>•</sup>) [66]. Dans des conditions normales, ces radicaux libres sont physiologiquement en équilibre avec des composés antioxydants [67]. Dans certaines conditions, au cours d'une inflammation ou en réponse à certains facteurs environnementaux comme les irradiations (UV ou rayons X), les carences nutritionnelles (en vitamines et oligo-éléments), le tabac, la pollution ou les intoxications aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium), la production de ces radicaux libres augmente générant un déséquilibre en faveur des entités oxydantes appelé « stress oxydatif » [68].

#### **2.1.2 Les radicaux libres**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques instables, neutres ou chargées, qui possèdent un électron non apparié sur leur dernière couche électronique [69]. Pour retrouver un état plus stable, ils réagissent avec d'autres molécules, dont les substrats biologiques, dans le but de récupérer un électron. Ils peuvent être classés en deux catégories : les radicaux libres primaires et les radicaux libres secondaires. Les radicaux libres primaires sont formés directement à partir de l'oxygène ou de l'azote et sont appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou Espèces Réactives de l'azote (ERN). Ils comprennent l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, le radical hydroxyle •OH, le monoxyde d'azote NO<sup>•</sup> mais aussi le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le peroxyde d'azote ONOO<sup>-</sup>, qui ne sont pas des radicaux libres à proprement parler, mais de puissants oxydants. Les radicaux libres secondaires sont générés par action d'un radical primaire sur des composés cellulaires

tels que les acides nucléiques, les lipides membranaires ou les protéines. Ce sont par exemple les radicaux peroxydes  $\text{ROO}\cdot$ .

La formation des différents radicaux libres à partir de l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) est résumée en Figure 3. Le radical hydroxyle  $\cdot\text{OH}$ , le plus toxique des radicaux libres, est principalement responsable de la réactivité des ERO sur les molécules biologiques. Il est formé par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss [70, 71].

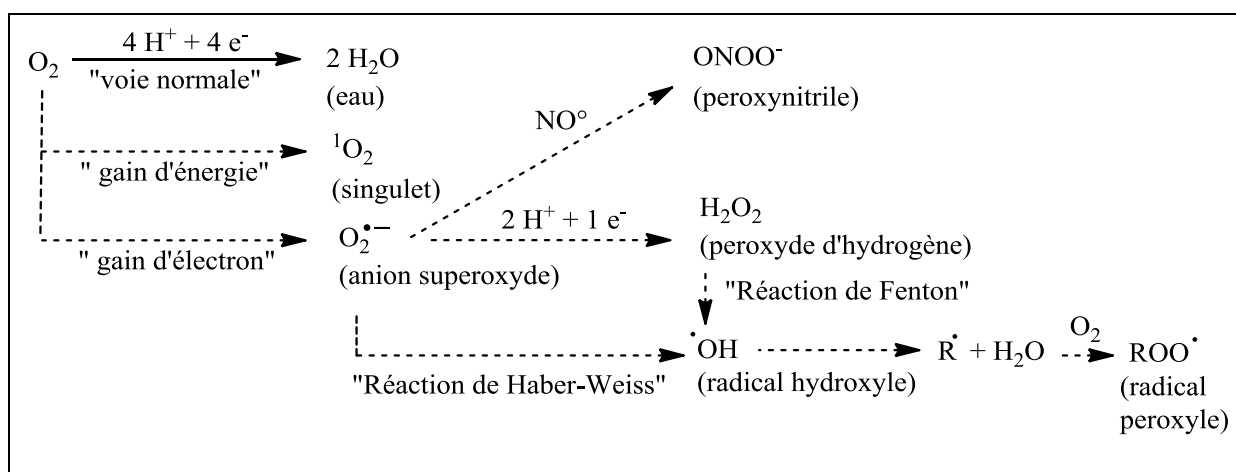
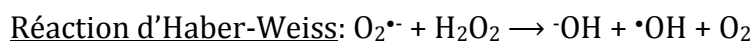
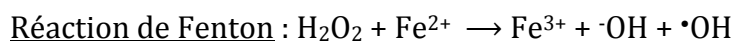


Figure 3 : Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène  
(Source : d'après Gardès-Albert *et al.*, 2003 [71])

### 2.1.3 Rôles bénéfiques et délétères des radicaux libres

Les radicaux libres sont des acteurs centraux dans la régulation physiologique de la fonction cellulaire. Ils permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme et sont considérés comme d'importants messagers secondaires. Ils interviennent également dans la réponse inflammatoire lors du « burst oxydatif » schématisé en Figure 4.

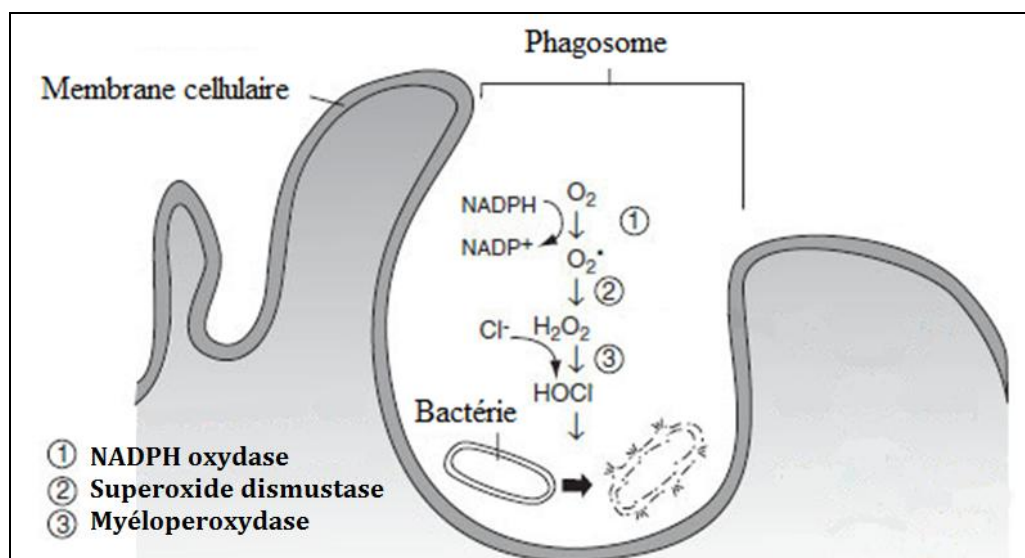


Figure 4 : Phénomène de « burst oxydatif »  
(Source : d'après Respiratory Burst [72])

Au cours d'une inflammation, les cellules phagocytaires produisent une grande quantité d'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), qui se dismutise quasi instantanément en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). La réaction de ce dernier avec le chlore contenu dans le phagosome, forme l'acide hypochlorique (HOCl) qui contribue à l'élimination des bactéries.

Par ailleurs, des cellules non phagocytaires (fibroblastes, cellules endothéliales...) sont connues pour produire des ERO dans le but de moduler les cascades de signalisation intracellulaire. Les radicaux libres permettent entre autre, l'activation de l'expression de facteurs de transcription nucléaire (NF- $\kappa$ B, AP-1) qui ont un rôle dans la réparation de l'ADN, l'apoptose et la prolifération cellulaire. Les ERO interviennent également dans la régulation du fonctionnement des cellules cardiaques et vasculaires mais aussi dans l'adhésion cellulaire, étape importante de la réponse inflammatoire [67, 68, 70].

Dans des conditions normales, les radicaux libres sont donc des composés très utiles pour l'organisme mais à fortes doses, paradoxalement, ils causent des dommages cellulaires importants. Leurs cibles principales sont les acides gras polyinsaturés, les acides nucléiques et les protéines.

#### ∞ Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés présents au sein des membranes cellulaires sont particulièrement sensibles au phénomène de dégradation oxydative. En raison de leurs

nombreuses doubles liaisons, ils peuvent être dégradés par un mécanisme en chaîne appelé peroxydation lipidique, qui comprend trois phases. La première est une phase d'initiation avec formation d'un radical lipidique par l'intermédiaire d'un radical hydroxyle. Puis au cours de la propagation, le radical lipidique réagit avec de l'oxygène pour former un radical peroxy, qui, à son tour, réagit avec un autre acide gras en formant un hydroperoxyde et un autre radical lipidique. Enfin, la terminaison achève le processus en formant une entité non radicalaire (Figure 4).

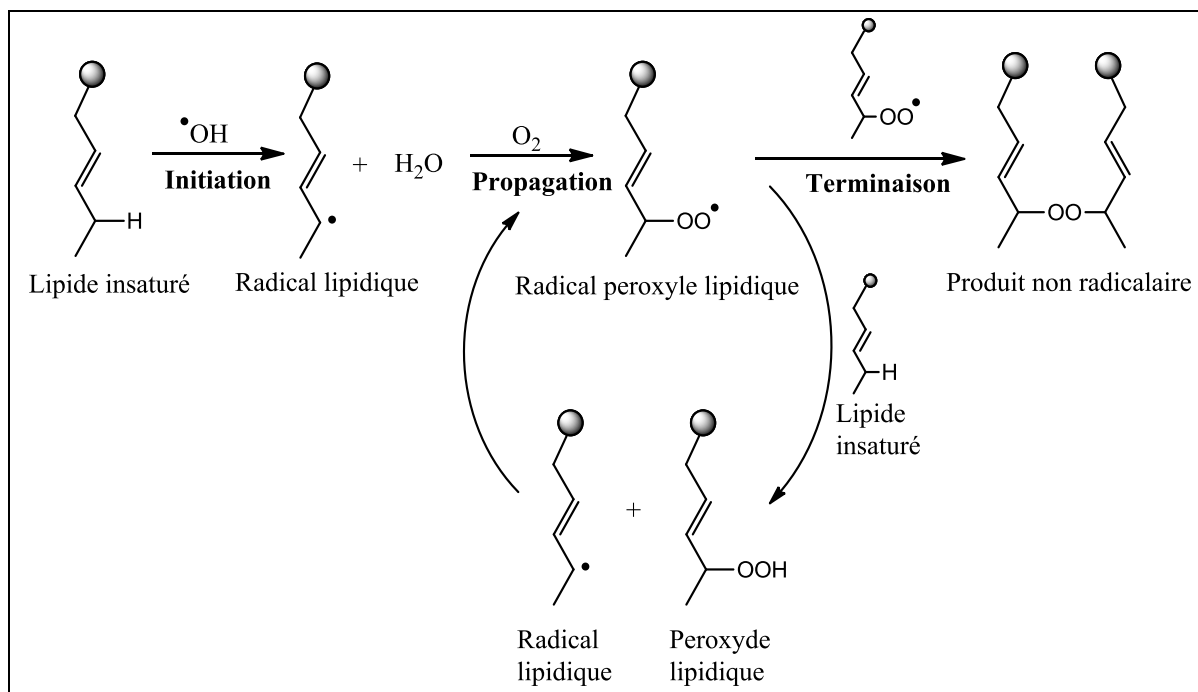


Figure 5 : Peroxydation lipidique  
(Source : d'après Lipid oxidation pathways [73])

Au sein des membranes, la peroxydation lipidique provoque une désorganisation de la structure, une diminution de la fluidité et une altération de leur fonctionnement. Elle peut aussi participer au dépôt de lipides oxydés dans les vaisseaux et les tissus âgés, et contribuer à la genèse de dérivés carcinogènes.

### ∞ L'ADN

Les radicaux libres peuvent intervenir de différentes façons sur l'ADN (Figure 6). Ils peuvent modifier les bases, provoquer des coupures de chaîne (simple ou double brin), favoriser la formation d'adduits avec des dérivés d'oxydation lipidique ou des protéines (pontage ADN-protéine). Ces altérations du matériel génétique, si elles ne sont réparées, peuvent engendrer la mutagenèse, la carcinogenèse ainsi que le vieillissement [68].



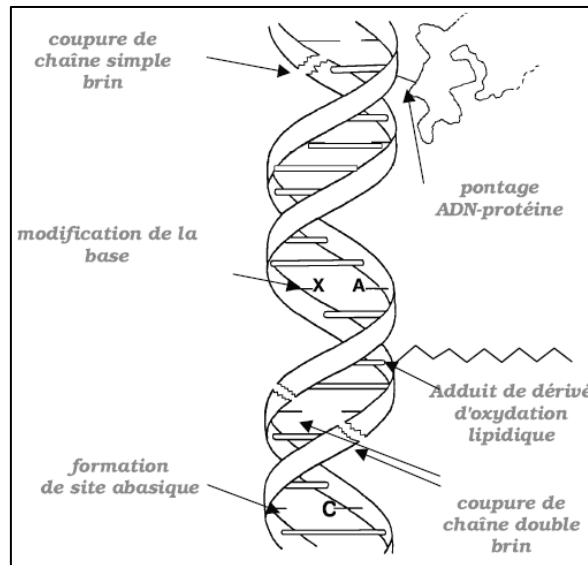


Figure 6 : Actions des radicaux libres sur l'ADN  
(Source : d'après Favier, 2003 [68])

### ∞ Les protéines

Les radicaux libres peuvent provoquer différents types de dégradation sur une protéine pouvant conduire à la perte de son activité : fragmentation au niveau des liaisons peptidiques, oxydation des chaînes latérales, formation de liaisons intra ou interprotéines. Les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) sont les plus sensibles. L'attaque des radicaux libres sur les fonctions thiols (SH) des cystéines conduit à la formation de ponts disulfures (S-S), ce qui modifie la protéine qui peut être éliminée par le protéasome. Par ailleurs, le radical  $\cdot\text{OH}$ , mais aussi l'anion superoxyde  $\text{O}_2\cdot^-$ , s'attaquent aux protéines des tissus de soutien comme le tissu conjonctif constitué de collagène [70].

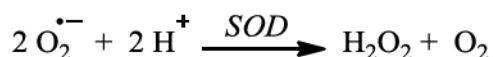
#### 2.1.4 Les antioxydants

Pour lutter contre les radicaux libres, l'organisme dispose de systèmes efficaces de protection : les antioxydants, définis comme des substances capables, à des concentrations relativement faibles, de retarder ou d'inhiber l'oxydation de substrats [69]. Les antioxydants peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques.

- **Les antioxydants enzymatiques**

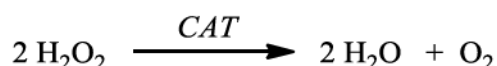
- ∞ Superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui existe sous trois formes : SOD1 (à cuivre et zinc), SOD2 (à manganèse et fer) et SOD3 (au nickel). Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  en espèces oxygénées moins réactives que sont le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et l'oxygène  $O_2$  [71].



- ∞ Catalase (CAT)

La catalase élimine en partie le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  en libérant de l'oxygène  $O_2$  et de l'eau  $H_2O$  [74].



- ∞ Glutathion peroxydase (GPx) et glutathion reductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) réduit le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools (ROH) et les espèces radicalaires ( $R^\bullet$ ) en espèces non radicalaires (RH). Ces réactions nécessitent deux molécules de glutathion (GSH) qui sont transformées en glutathion-disulfure (GSSG) [75]. La glutathion réductase (GR) permet de régénérer le GSH à partir du GSSG en utilisant un cofacteur, le NADPH. Ce cofacteur est oxydé en  $NADP^+$  puis réduit à son tour par une autre enzyme, le G6PD (glucose-6-phosphate-déshydrogénase) (Figure 7).

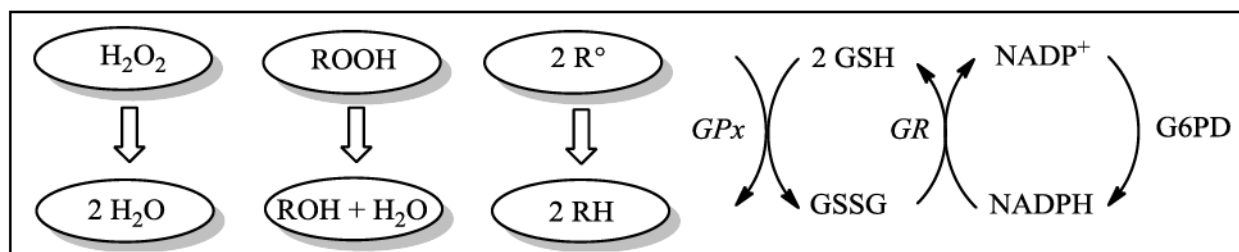


Figure 7 : Réaction de la glutathion peroxydase sur différents radicaux libres  
(Source : d'après Baker et Aitken, 2005)

### ∞ Les antioxydants non enzymatiques

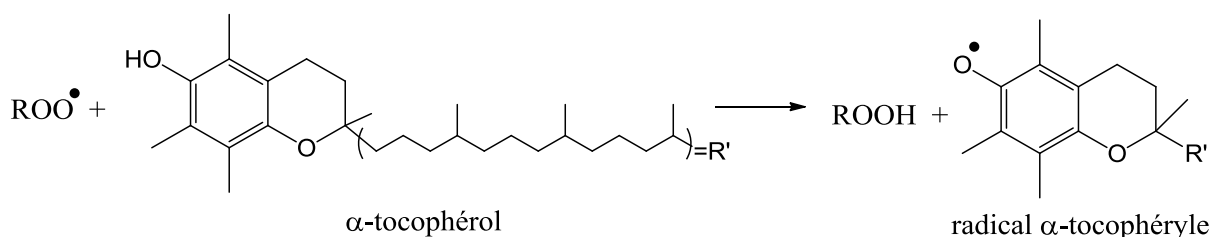
Les antioxydants non enzymatiques sont apportés par l'alimentation. Ils agissent en piégeant les radicaux libres ou en captant leurs électrons célibataires pour les transformer en molécules ou ions stables.

#### ∞ Les oligo-éléments

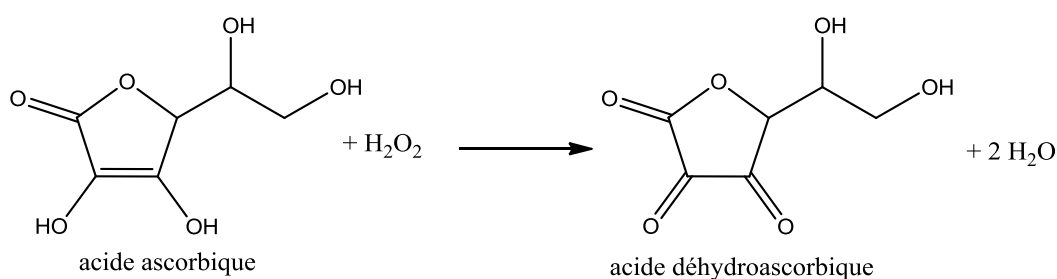
Les oligo-éléments sont des cofacteurs d'enzymes. Le sélénium (Se) est le cofacteur de la glutathion peroxydase (GPx), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) sont ceux de la superoxyde dismutase (SOD). Par ailleurs, le zinc protège les groupements thiols des protéines et inhibe partiellement la formation des radicaux libres induite par le fer et le cuivre.

#### ∞ Les vitamines

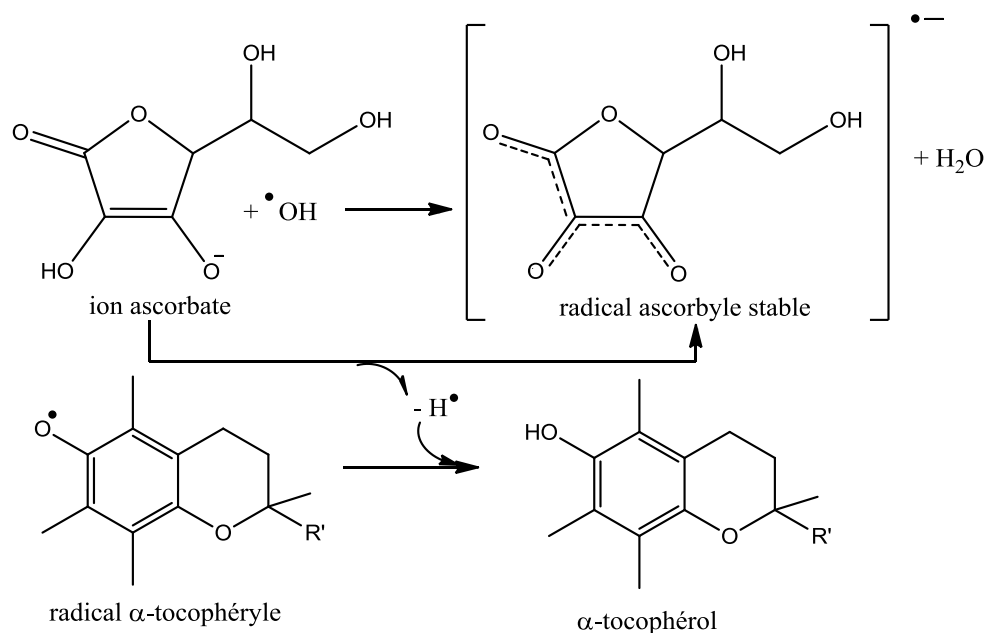
Les vitamines ne sont pas synthétisées par l'organisme, leur présence dans le corps est essentiellement due à l'apport des aliments végétaux. La vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol est capable d'inhiber la peroxydation lipidique en stoppant la propagation radicalaire.



La vitamine C ou acide ascorbique transforme le peroxyde d'hydrogène en eau.



Elle peut également piéger les radicaux libres comme  $O_2^{\bullet-}$  et  $\bullet OH$  et régénérer la vitamine E grâce à son radical ascorbyle stable.



### ∞ Les caroténoïdes

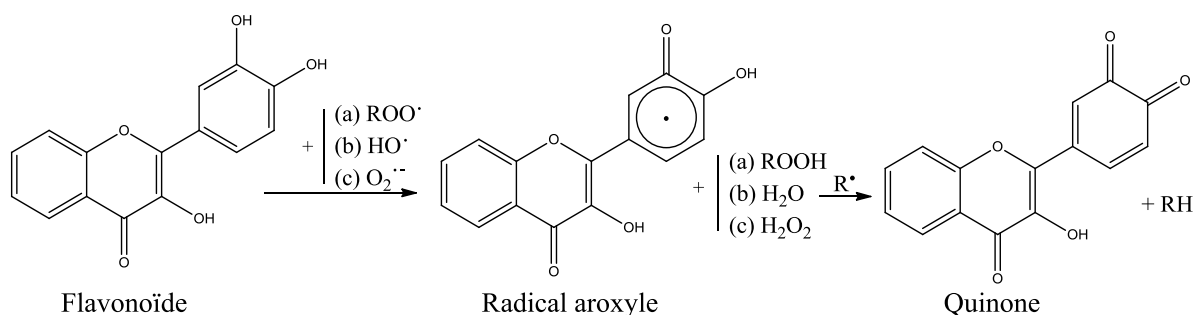
La capacité des caroténoïdes à capter l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), formé par les radiations solaires et à terminer les réactions en chaîne de peroxydation lipidique est bien établie [76, 77]. Un radical peroxyde lipidique ( $ROO^{\bullet}$ ) peut s'additionner sur la chaîne polyénique du caroténoïde (CAR) pour donner un autre radical ( $RO-CAR^{\bullet}$ ) stable par mésomérie [78].

### ∞ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques. Ils sont également capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices de l'anion superoxyde et d'autres ERO : xanthine oxydase (XO), protéine kinase C, cyclooxygénases (COX), lipooxygénases, monooxygénase microsomale et glutathion S-transférase [79, 80].

La structure chimique aromatique des flavonoïdes permet une délocalisation électronique importante, stabilisant les formes radicalaires. Les flavonoïdes sont capables de réduire l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical peroxyde ( $ROO^{\bullet}$ ), le radical

alkoxy radical ( $\text{RO}\cdot$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) par transfert d'hydrogène [81]. Le radical aroxy radical formé peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable.



### ∞ Les tanins

Les tanins sont capables de stopper la peroxydation lipidique en donnant des protons aux radicaux libres lipidiques et en formant des radicaux taniques stables. *In vitro* ce sont des piègeurs de radicaux et des inhibiteurs de la formation de l'ion superoxyde [82].

### ∞ Les coumarines

Les coumarines sont capables de capter les radicaux hydroxyles, l'anion superoxyde et les radicaux peroxydes et de prévenir la peroxydation des lipides membranaires [83].

## 2.2 L'inflammation

### **2.2.1 Définition**

L'inflammation est une réponse physiologique de défense face aux corps étrangers à l'organisme, qui comprend trois étapes.

Lors de la phase vasculaire, suite à la lésion des tissus et l'entrée de bactéries, des molécules, médiateurs de l'inflammation (cytokines, prostaglandines, leucotriènes, histamine...), stimulent des polynucléaires neutrophiles (PNN). Ces leucocytes sanguins activés se fixent à l'endothélium vasculaire et pénètrent dans le tissu conjonctif jusqu'au lieu de l'inflammation. Cette pénétration de PNN à l'intérieur des tissus est facilitée par la vasodilatation et l'élargissement des jonctions entre les cellules endothéliales.

Puis, lors de la phase cellulaire, les PNN et les macrophages phagocytent les bactéries et les débris cellulaires, sur le lieu de l'inflammation.

Enfin, lors de la phase de réparation, les cellules fibroblastiques et endothéliales forment un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation.

L'inflammation est donc habituellement un processus bénéfique. Néanmoins, sous certaines conditions, elle peut s'avérer néfaste. L'agressivité de l'agent pathogène, sa persistance, le siège de l'inflammation ou encore les régulations anormales du processus inflammatoire peuvent engendrer une évolution vers une inflammation chronique.

### **2.2.2 Les médiateurs de l'inflammation**

Les médiateurs de l'inflammation sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ils augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes sur le lieu de l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium, augmentent l'agrégation des plaquettes... Seuls les médiateurs lipidiques, les cytokines et les radicaux libres seront présentés ici [84].

#### *↻ Les eicosanoïdes*

Ces médiateurs lipidiques, dérivés des acides gras membranaires, sont les produits terminaux du métabolisme de l'acide arachidonique. Selon la voie enzymatique, différents eicosanoïdes sont formés. La voie des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) produit des prostanoides (prostaglandines, thromboxanes). La voie des lipoxygénases produit des leucotriènes. Le PAF (Facteur d'Activation Plaquettaire) fait également partie des eicosanoïdes.

#### *↻ Les cytokines*

Les principales cytokines intervenant dans le processus inflammatoire sont le TNF- $\alpha$  (Facteur de Nécrose Tumorale) et les interleukines (IL) en particulier IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8. Il existe également des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13).

∞ Les radicaux libres

Les radicaux libres sont également des médiateurs de l'inflammation. Ils augmentent la perméabilité vasculaire et l'adhérence des PNN sur les cellules endothéliales [85].

Par ailleurs, lors du burst oxydatif (§ 2.1.3 p.26), une partie des radicaux libres formés peut s'échapper du phagosome et induire des séquelles cellulaires, contribuant à l'entretien de l'inflammation.

### **2.2.3 Les anti-inflammatoires**

∞ Les anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes)

Les glucocorticoïdes sont, à l'origine, des molécules endogènes synthétisées par les glandes surrénales à partir du cholestérol. Les deux principaux glucocorticoïdes naturels sont la cortisone et le cortisol. Ces molécules peuvent traverser librement les membranes cellulaires, se fixer sur des récepteurs spécifiques du cytoplasme des cellules et migrer vers le noyau, pour agir directement sur l'ADN et réguler la transcription des gènes cibles.

Elles peuvent ainsi agir sur le métabolisme de l'acide arachidonique et inhiber la formation de prostaglandines et de leucotriènes, ou également inhiber l'action de certaines protéines nucléaires (NF- $\kappa$ B et AP-1) et donc réduire la production de cytokines inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ). Malgré leur efficacité, les traitements aux glucocorticoïdes ont de nombreux effets néfastes.

∞ Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS)

Les AINS, dont fait partie l'acide acétylsalicylique (Aspirine), agissent tous en inhibant la cyclo-oxygénase (COX). L'inhibition de cette enzyme induit une diminution de la production de prostaglandines et de thromboxane mais peut également conduire à des effets indésirables potentiels (ulcères gastro-duodénaux et augmentation du risque hémorragique). Des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 sont aujourd'hui privilégiés dans le but de réduire ces effets indésirables.

### **2.3 Implication du stress oxydatif et de l'inflammation dans les maladies chroniques non transmissibles**

Différents travaux ont démontré que le stress oxydatif est impliqué dans la pathogénèse de nombreuses maladies chroniques non transmissibles tels que le diabète [86], le cancer [70, 87], les maladies neuro-dégénératives [88] et les maladies cardiovasculaires [89].

Dans le diabète, les radicaux libres peuvent perturber et inhiber l'insulino-sécrétion. Ils sont également impliqués dans l'insulino-résistance, empêchant la transduction du signal de l'insuline sur les cellules où elle se fixe et inhibant ainsi l'entrée du glucose [90, 91].

Les radicaux libres sont des carcinogènes potentiels car ils facilitent la mutagénèse, la promotion tumorale et la propagation [67]. De ce fait, plusieurs essais cliniques ont été réalisés sur l'utilisation d'antioxydants comme agents de prévention du cancer [92].

Les radicaux libres interviennent également dans les maladies neuro-dégénératives. Le cerveau, en raison de son utilisation importante en oxygène, de sa forte teneur en acides gras polyinsaturés oxydables et de la présence de métaux (Cu, Fe), est particulièrement vulnérable aux dommages oxydatifs. De nombreux marqueurs du stress oxydatif ont été retrouvés dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer [93].

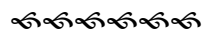
Une forte concentration en radicaux libres peut provoquer la dégénérescence des neurones et induire les symptômes de la maladie [94]. Les maladies cardiovasculaires sont également concernées par le stress oxydatif ; différents travaux ont permis de montrer ce lien [95-97].

D'autres travaux ont clairement établi le lien entre stress oxydatif, inflammation et maladies chroniques non transmissibles. Selon Bonnefont-Rousselot *et al.*, l'athérosclérose est une maladie multifactorielle dont les principales hypothèses mécanistiques reposent sur deux théories : une théorie oxydative et une théorie inflammatoire [98].



Par ailleurs, l'obésité est considérée comme un état inflammatoire caractérisé par une production anormale de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) et par une augmentation du stress oxydant systémique. Pour cette pathologie, en 2004, Furukawa *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et une diminution de la production d'adiponectine (hormone anti-inflammatoire régulant le métabolisme des lipides et du glucose) dans le tissu adipeux blanc de souris obèses [99].

Ces exemples ne sont qu'un aperçu des travaux menés relatifs au stress oxydatif et à l'inflammation. La diversité des pathologies chroniques non transmissibles, l'étendue des mécanismes d'action des radicaux libres et des réponses inflammatoires rendent difficile une synthèse globale de l'ensemble des travaux réalisés.



*En raison de l'implication du stress oxydatif et de l'inflammation dans les maladies chroniques non transmissibles, la recherche de nouvelles sources d'antioxydants et d'anti-inflammatoires semble largement justifiée. La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée aux travaux menés en ce sens, réalisés au cours de cette thèse. Les résultats d'un criblage d'activités biologiques (activités cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire) obtenus pour une sélection de dix-huit plantes endémiques ou indigènes de La Réunion y sont reportés.*

## Chapitre I-3 Le virus du chikungunya, un virus réémergent

### 3.1 Présentation générale

#### 3.1.1 Epidémiologie

Le virus du chikungunya est un virus réémergent. La première description de la maladie aurait été faite par David Bylon en 1779 lors d'une épidémie à Jakarta [100]. Les premiers cas de chikungunya ont ensuite été véritablement décrits en 1952, lors d'une épidémie qui s'est produite sur le plateau du Makonde (actuelle Tanzanie). L'apparition soudaine de cette maladie et la gravité des douleurs articulaires qu'elle provoque et qui la distingue de la dengue, lui a valu un nom local « chikungunya » qui signifie « homme qui se courbe » [101].

Plusieurs épidémies mineures ont suivi, en Afrique du Sud, au Congo, en Rhodésie, à Bangkok, en Thaïlande, au Cambodge et en Inde où le virus a été isolé pour la première fois en 1963 à Calcutta [102]. Au cours de la deuxième moitié de l'année 1964, plusieurs villes du sud de l'Inde ont été frappées. Des douleurs articulaires invalidantes et persistantes pendant plusieurs mois après la maladie ainsi qu'un décès ont été rapportés [102].

Les épidémies qui ont suivi furent mineures jusqu'en 2004 où la plus importante épidémie de chikungunya a été enregistrée (Figure 8). Elle a débuté au Kenya puis elle s'est répartie sur les îles de l'Océan Indien (Comores, Réunion, Seychelles, Maurice, Mayotte et Madagascar). Sur la Grande Comore, 215000 personnes ont été infectées lors de l'épidémie de 2005 [103]. A La Réunion, le virus a été identifié dès le mois de mai 2005 et, en avril 2006, 38 % de la population était contaminée et 203 décès ont été associés à cette maladie [63]. Les voyages à l'étranger ont importé des cas de chikungunya dans près de 40 pays dont les USA, le Japon et plusieurs pays européens [100]. En 2007, l'épidémie a touché près de 1,3 million de personnes en Inde [104]. Elle a atteint le Myanmar en 2010 [105]. La première infection autochtone (transmission endogène) en Europe s'est produite en Italie en 2007 (plus de 200 cas) [106] puis en France en 2010 [107]. En 2009, cinq nouveaux cas ont été identifiés à La Réunion et en 2010, 112 cas ont été diagnostiqués [65]. D'autres cas de chikungunya ont été signalés en 2011 au Yémen [108].

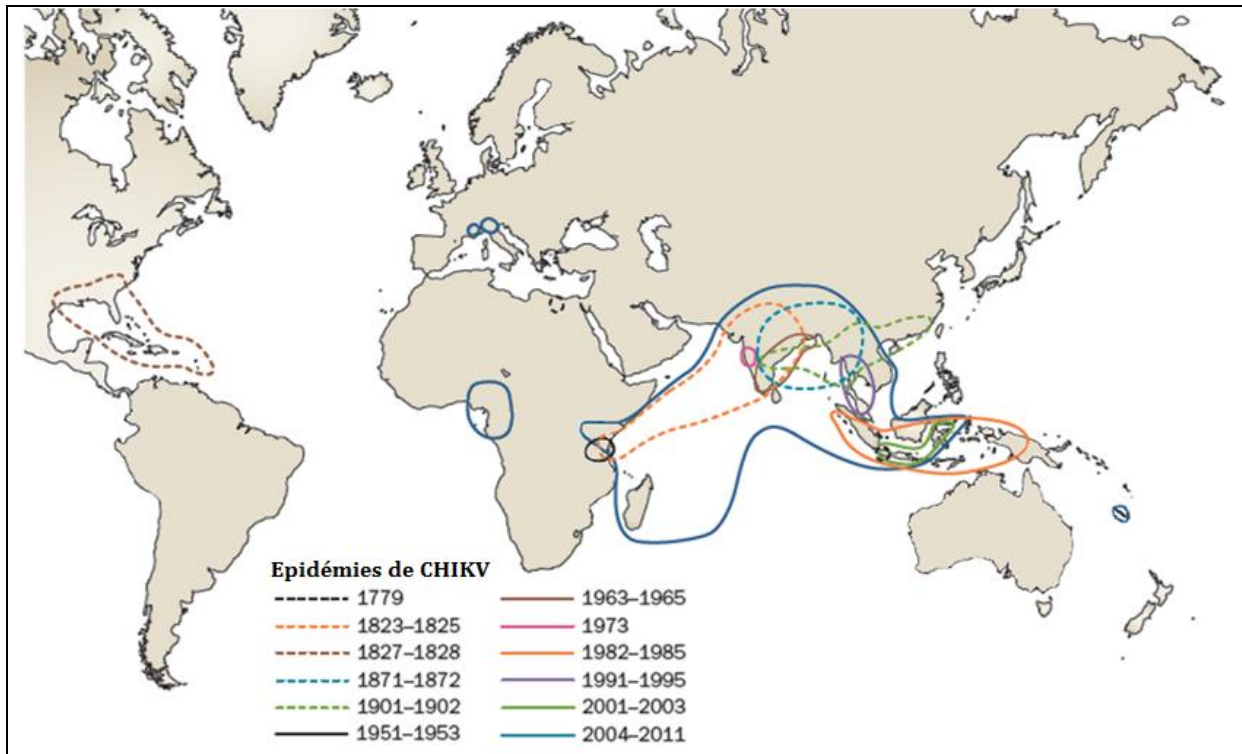


Figure 8 : Répartition des épidémies de CHIKV dans le monde  
(Source : d'après Suhrbier et al., 2012 [100])

### 3.1.2 Caractéristiques du CHIKV

Le virus du chikungunya est un arbovirus (arthropod-borne-virus). Il appartient au groupe IV des virus à ARN, à la famille des Togaviridae et au genre Alphavirus. Ce virus sphérique de diamètre 60-70 nm, possède une enveloppe glycoprotéique et une capsidie icosaédrique qui renferme une molécule unique d'ARN linéaire, à simple brin de polarité positive (Figure 9).

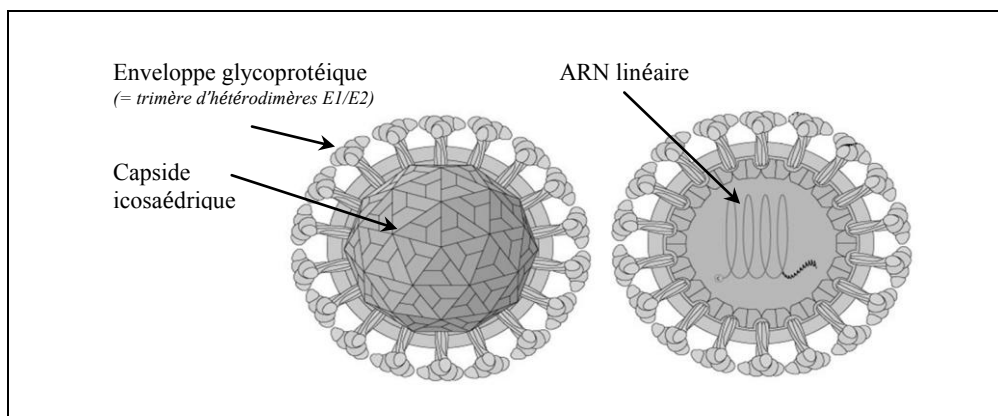


Figure 9 : Enveloppe lipoprotéique du CHIKV  
(Source : d'après © ViralZone 2010, Swizz Institute of Bioinformatics)

Cet ARN viral possède toutes les caractéristiques d'un ARN messager soit une coiffe en 5' et une queue poly A à l'extrémité 3'. Il se compose de 11805 nucléotides. Deux tiers des gènes codent pour les protéines non structurales du virus et un tiers code pour les protéines structurales.

∞ Expression et réplication du virus

L'expression de ces protéines et la réplication du génome viral se déroulent très rapidement (environ 4 h), dans le cytoplasme de la cellule hôte (Figure 10). Après fixation, le virion pénètre par endocytose et le génome viral est libéré dans la cellule par une étape de décapsidation. Dès lors, les protéines non structurales et structurales sont synthétisées. Dans un premier temps, l'ARN complémentaire (-) est répliqué, puis un ARN génomique (+) est synthétisé, ce qui conduit à la synthèse d'une polyprotéine qui sera clivée en protéines non structurales (nsP1 à nsP4). Dans un second temps, l'ARN complémentaire (-) permet également la synthèse d'un ARN subgénomique (+), qui est transcrit en polyprotéine, par la suite clivée en protéines structurales, qui formeront la capsidite et l'enveloppe des nouveaux virions. Le cycle se termine par l'assemblage des nucléocapsides et le bourgeonnement des virions.

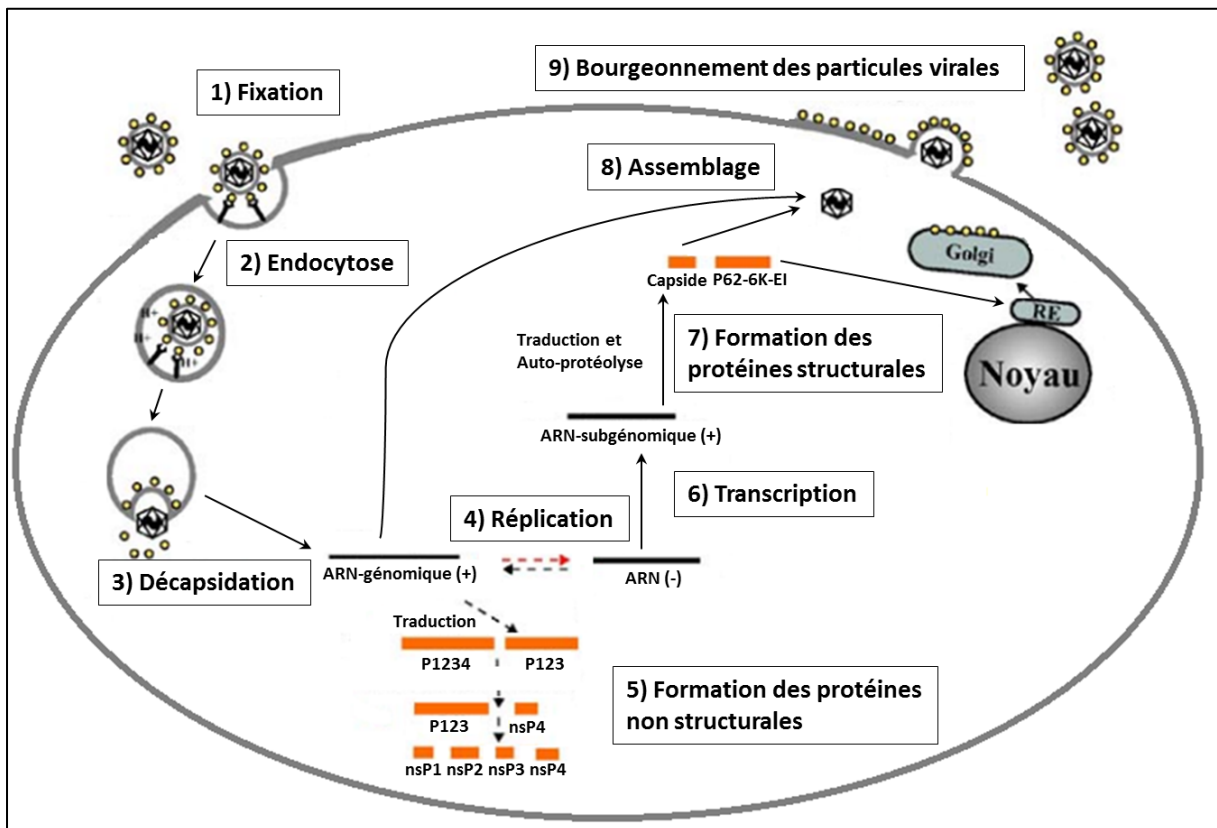


Figure 10 : Cycle de réplication du CHIKV (Source : [109])

### ∞ Autres caractéristiques

Le CHIKV est un agent pathogène classé au niveau 3 de biosécurité dans la plupart des pays. Il est listé par l'Institut National des Allergies et Maladies Infectieuses (NIAID - National Institute of Allergy and Infectious Diseases) comme un agent pathogène de priorité C. L'armée américaine reconnaît le CHIKV comme une arme biologique potentielle. Il est considéré comme agent possible de bioterrorisme en raison de son potentiel à infecter par aérosol.

Le CHIKV est stable à pH compris entre 7 et 8, mais est rapidement inactivé à pH acide. À 37 °C, sa demi-vie est d'environ 7 jours. Le virus est sensible à la dessiccation et inactivé par la chaleur sèche ou humide supérieure à 58 °C. Il est également inactivé par l'éthanol à 70 °C et sensible aux détergents.

### **3.1.3 Transmission du virus**

#### ∞ Vecteurs et cycles de transmission

Le CHIKV est véhiculé par des moustiques du genre *Aedes*. Selon des études phylogénétiques, ce virus serait originaire d'Afrique et aurait par la suite été introduit en Asie [110]. En Afrique, ce sont des *Aedes* « de forêt » (*A. africanus*, *A. frucifer-taylori* et *A. dalzieli*) qui assurent le cycle de transmission « sylvatique », où seuls les primates non-humains sont contaminés. En Asie, la contamination a lieu d'homme à homme dans un cycle « urbain », qui a longtemps été assuré par *A. aegypti*. Mais au cours de l'épidémie de 2006, suite à des mutations du virus, *A. albopictus* a été identifié comme nouveau vecteur [111]. L'expansion mondiale spectaculaire de ce moustique ces 30 dernières années permet d'expliquer l'étendue sans précédent de l'épidémie de 2006 [111, 112].

#### ∞ Infection par le CHIKV

Les femelles *Aedes* sont seules à être hématophages. Après piquûre d'une personne infectée, le virus passe du tube digestif aux glandes salivaires du moustique (cycle extrinsèque, 3 à 10 jours). L'homme est infecté par inoculation intradermique du virus, puisqu'un peu de salive anticoagulante du moustique est injectée dans le sang lors de la piquûre. Pendant la période d'incubation (3 à 7 jours), sans symptômes, le virus se réplique sur le site d'inoculation [113]. Au cours de la période de virémie (4 à 8 jours),

où l'homme devient infectant, apparaissent les symptômes : forte fièvre, éruptions maculo-papuleuses et douleurs articulaires. D'autres symptômes peuvent également survenir incluant des myalgies\*, des céphalées\*, un œdème des extrémités et des douleurs gastro-intestinales [62, 104].

Les chercheurs ont démontré que, *in vitro*, le CHIKV ne se multipliait pas dans les cellules sanguines circulantes (lymphocytes, monocytes), mais qu'il se répliquait dans les macrophages et qu'il infectait également la plupart des cellules dites « adhérentes » (cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes) [114]. Une autre équipe a montré que certaines cellules présentes dans le tissu musculaire étaient des cibles du virus du chikungunya [115]. Une étude ultérieure, *in vivo* sur des singes, a prouvé que les cellules concernées étaient les macrophages et les cellules dendritiques, impliquées dans les premières étapes des mécanismes de défense de l'organisme. Ces cellules peuvent héberger le virus plusieurs mois et infiltrer les articulations, muscles, organes lymphoïdes et le foie, ce qui peut expliquer les symptômes typiques de cette maladie, comme les douleurs musculaires et articulaires très invalidantes observées à long terme chez les patients [116] (Figure 11).

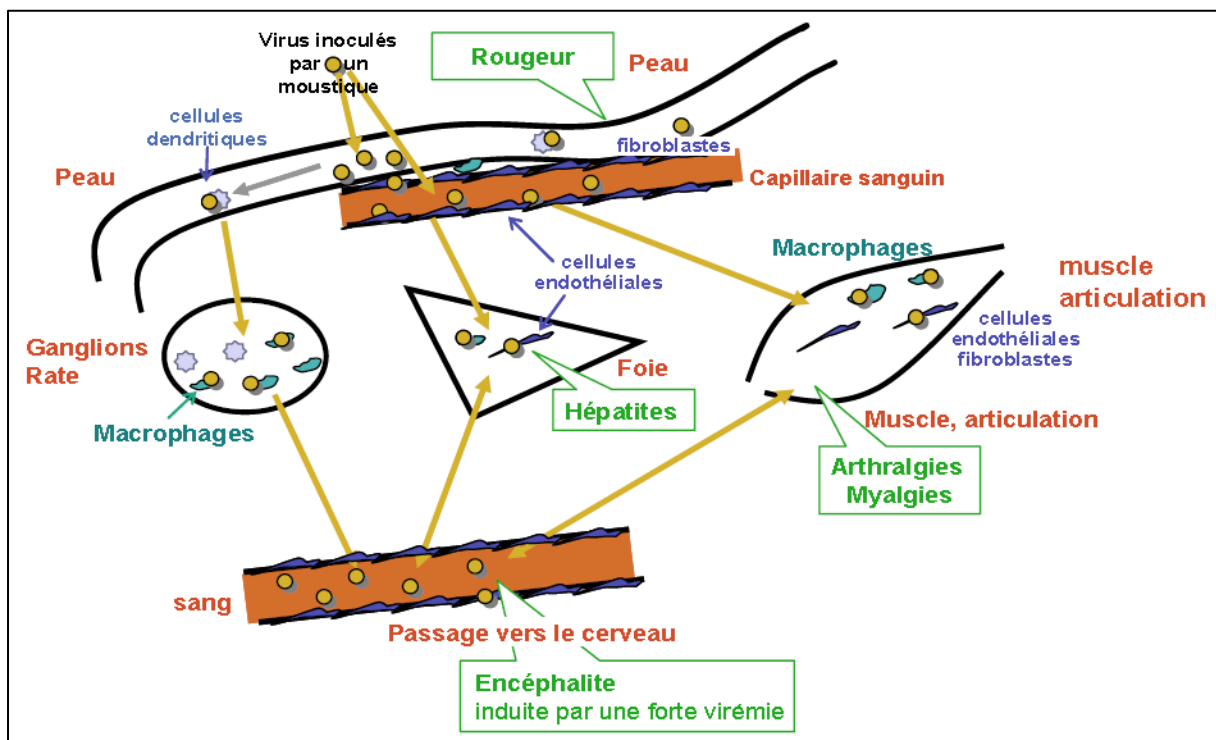


Figure 11 : Cellules cibles du CHIKV  
(Source : Labadie, 2010 [116])

## **3.2 Stratégies de lutte contre le CHIKV**

### **3.2.1 Lutte anti-vectorielle**

La stratégie de lutte anti-vectorielle consiste à lutter en amont contre les moustiques vecteurs de la maladie. Deux luttés anti-vectorielles peuvent être envisagées : la lutte mécanique et la lutte chimique et/ou biologique.

#### *↪ Lutte mécanique*

La lutte mécanique consiste à combattre dans un premier temps la reproduction et la prolifération des moustiques par élimination des gîtes larvaires d'eau stagnante. Dans un second temps, il est demandé de se protéger des piqûres en utilisant par exemple des lotions répulsives de durée d'efficacité limitée (4 à 8 heures selon les produits), qui doivent comporter du DEET (*N,N*-diéthyl-3-méthylbenzamide), de la picaridine, de l'IR3535 (3-[acétyl(butyl)amino]propanoate d'éthyle) ou du citriodol®, à des concentrations précises.

Enfin, en raison de la très forte virémie (jusqu'à  $10^{12}$  copies de virus par millilitre de sang chez le malade pendant la première semaine de la maladie), il est également demandé d'isoler les malades, afin de limiter la prolifération de la maladie. Par ailleurs, le chikungunya fait partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire en France métropolitaine, aux Antilles, dans le Pacifique français, et à La Réunion depuis le 19 décembre 2008 (Décret n° 2008-1355 du 19 décembre 2008).

#### *↪ Lutte chimique et/ou biologique*

La lutte chimique et/ou biologique est réalisée au niveau communautaire dans le cadre d'un traitement prophylactique, par épandage aérien d'insecticides. Des pyréthrinoïdes de synthèse comme la perméthrine ou la deltaméthrine peuvent être utilisés comme adulticides et le *Bacillus thuringiensis israelensis* (BTI) comme larvicide [117].

### 3.2.2 Molécules antivirales ciblant le CHIKV

A ce jour, aucun agent antiviral n'existe pour lutter efficacement contre le CHIKV. Le traitement reste donc purement symptomatique : contrôle de la fièvre et des douleurs au moyen de paracétamol, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, de glucocorticoïdes et, dans les cas les plus graves de rhumatismes chroniques post-chikungunya, en utilisant du méthotrexate [118, 119].

Depuis 2004, plusieurs études ont été menées pour identifier des molécules antivirales ciblant le CHIKV.

Briolant *et al.* (2004) ont testé quatre molécules et quatre polysaccharides sulfatés. La ribavirine, active sur d'autres Alphavirus, a été utilisée comme témoin positif. La cytotoxicité des composés a été testée sur des cellules de singes (Vero cells) infectées par le CHIKV. Les inhibiteurs les plus sélectifs ont été les interférons  $\alpha$  (2a et 2b) et le polysaccharide iota-carraghénane. La ribavirine et la 6-azauridine ont présenté des indices de sélectivité plus faibles en raison de leur effet cytostatique. L'association interféron  $\alpha$  et ribavirine a montré un effet synergique d'inhibition *in vitro* de la réplication du CHIKV, activité toutefois non démontrée *in vivo*. [120].

Khan *et al.* ont évalué les effets *in vitro* prophylactiques et thérapeutiques de la chloroquine sur la réplication du CHIKV dans des cellules Vero. La chloroquine diminue l'infection au CHIKV d'une manière dose-dépendante (concentrations efficaces de 5 à 20  $\mu\text{M}$ ), avec un effet inhibiteur maximum dans les 1-3 heures après l'infection. Une addition simultanée de la chloroquine avec le virus, ou un traitement des cellules avant l'infection réduit considérablement le nombre de copies du génome viral. Par ailleurs, la chloroquine est inefficace une fois que le virus passe les premières étapes de l'infection [121].

En 2011, le médicament antiviral Arbidol (ARB) utilisé en Russie pour la prophylaxie et le traitement des infections respiratoires aiguës, a été testé contre le CHIKV. ARB inhibe la prolifération cellulaire du virus dans les cellules Vero et MCR-5 ( $\text{CI}_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$  pour une  $\text{CC}_{50} \geq 200 \mu\text{g/mL}$ ) en bloquant les premières étapes du cycle de réplication (attachement du virus et/ou son entrée dans la cellule) en ciblant la membrane cellulaire [122].



Bassetto *et al.* ont réalisé des modélisations moléculaires dans le but de trouver des inhibiteurs possibles de la protéine structurale nsP2. 350000 composés ont été simulés, et un composé a été identifié comme capable d'empêcher la mort cellulaire induite par le CHIKV [123].

Enfin, Ahola *et al.* ont créé une lignée cellulaire réplicon du CHIKV, sur laquelle ont été testés différents composés qui présentaient déjà une activité contre le Semliki Forest Virus (SFV). Ce criblage a permis de mettre en évidence quatre flavonoïdes inhibiteurs de l'expression de ce réplicon : la chrysine, la naringénine, l'apigénine et la silybine. Cette lignée réplicon CHIKV a été validée pour le criblage de banques chimiques importantes dans un système entièrement automatisé de 384 puits [124].

### **3.2.3 Le programme Phytochik**

A La Réunion, la stratégie de lutte contre le CHIKV s'est traduite, en juin 2006, à la création par les autorités françaises du Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI).

Le premier objectif de ce centre de recherche est d'améliorer, en ce qui concerne les maladies infectieuses à risque épidémique, la connaissance, la détection, la prévision, la prévention, le contrôle et l'information. Un autre objectif est d'insérer les régions d'outre-mer exposées à ces risques, dans une dynamique scientifique de haut niveau, notamment en mettant en place des programmes de recherche interdisciplinaires sur les maladies infectieuses émergentes et en mobilisant, au travers d'appels à projets, des réseaux de chercheurs implantés dans la région, en collaboration avec des partenaires métropolitains et internationaux. Le programme de recherche PHYTOCHIK est un des exemples de collaboration interdisciplinaire, mis en place en 2009 suite à un appel à projet du CRVOI. L'ambition de ce programme, intitulé « Biodiversité et virus émergents dans l'Océan Indien : sélection de candidats médicaments ciblant le virus chikungunya », était de découvrir des médicaments potentiels issus de la biodiversité de la zone Océan Indien dans le traitement des maladies virales émergentes comme le CHIKV.

### **3.2.3.1 Présentation**

Dans ce programme, la flore qui a été étudiée est celle de la zone Océan Indien et plus précisément des îles Réunion, Maurice et Madagascar. Il s'agissait tout d'abord pour chacune des trois îles, d'établir une liste de plantes à étudier en fonction des utilisations ethnopharmacologiques. Ces plantes ont été choisies en fonction de leurs utilisations pharmacologiques (lutte contre les rhumatismes, les douleurs articulaires, la fièvre), en fonction de la littérature (espèces connues pour contenir des molécules antivirales) mais aussi en fonction de la disponibilité de la matière première. Après constitution de cette liste de plantes, des botanistes locaux ont réalisé la collecte des plantes sélectionnées. Chacune des plantes récoltées a été extraite à l'acétate d'éthyle. Les extraits ont été filtrés sur cartouche de polyamide, répertoriés dans une base de données, mis en plaque de 96 puits et testés sur des cellules saines de singe (Vero cells) et des cellules infectées par le CHIKV. Les résultats obtenus lors de ce programme ont permis d'établir une première liste de plantes présentant des extraits capables d'inhiber sélectivement la réplication virale du CHIKV. La suite de ce programme comprenait le fractionnement bioguidé des espèces actives dans le but de mettre en évidence les molécules responsables de l'activité antivirale, puis la réalisation d'un test enzymatique sur les molécules actives pures pour comprendre leur mécanisme d'action.

### **3.2.3.2 Consortium**

Ce projet a nécessité une collaboration entre laboratoires de domaines scientifiques distincts : la phytochimie et la virologie. Un consortium a été mis en place constitué de trois laboratoires régionaux, deux laboratoires métropolitains et un laboratoire belge. Ces institutions ont eu chacune un rôle bien défini lié à leur domaine de compétences.

L'équipe Pôle Substances Naturelles Plantes (PSN-P) de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), dirigée par Françoise Guéritte (DR CNRS) a coordonné l'ensemble des travaux effectués. Elle a été chargée de réceptionner, de référencer et de mettre en plaque de 96 puits tous les extraits de plantes provenant des trois îles concernées et elle a également contribué au fractionnement bioguidé de certains extraits végétaux ainsi qu'à la caractérisation des molécules actives.

Les trois institutions régionales ont été les spécialistes locaux de la flore de l'Océan Indien. Elles ont sélectionné les plantes à cribler, réalisé les extraits végétaux et participé à l'étude phytochimique de certaines d'entre elles. La Réunion a été représentée par le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) sous la coordination du Pr. Jacqueline Smadja, l'île Maurice par la Faculté des Sciences de l'Université de Maurice (Pr. Ameenah Gurib-Fakim), et Madagascar par l'Institut Malgache de Recherches Appliquées (IMRA) sous la coordination du Pr. Philippe Rasoanaivo.

Le test d'évaluation de l'activité antivirale d'inhibiteurs du CHIKV sur des cellules infectées de singes (Vero cells) a été réalisé par l'équipe du Dr. Pieter Leysen, au sein du groupe de recherche LVC-RIMR (Laboratoire de Virologie et de Chimiothérapie du Rega Institute for Medical Research, Louvain, Belgique) dirigé par le Pr. Johan Neyts.

Enfin, l'évaluation de l'effet inhibiteur des molécules antivirales isolées sur des cibles spécifiques a été réalisée par la plateforme de criblage Marseille - Luminy (PCML), dirigée par le Pr Jean Claude Guillemot (Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques (AFMB), Marseille). En particulier, la tâche du laboratoire AFMB, dirigé par Bruno Canard (DR CNRS), était d'apporter des outils pour la caractérisation des mécanismes de l'activité antivirale, sur le plan fonctionnel et structurel, en raison de son expertise dans la caractérisation structurale et fonctionnelle des protéines virales.

### **3.2.3.3 Le test antiviral (Rega Institute for Medical Research, Louvain, Belgique)**

Lors de ce criblage, la capacité des extraits à inhiber sélectivement la réplication cellulaire du CHIKV a été évaluée pour plusieurs concentrations (de 50 à 0,8 µg/mL). Pratiquement, deux tests ont été réalisés : un test anti-métabolique où la cytotoxicité de l'extrait a été évaluée sur des cellules saines et un test antiviral où le pouvoir antiviral de l'extrait a été évalué sur des cellules contaminées par le CHIKV. La viabilité cellulaire a été mesurée, pour ces deux tests, en utilisant le MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium), révélateur coloré permettant d'établir une relation de proportionnalité entre l'absorbance mesurée et le nombre de cellules vivantes. Les absorbances ont été mesurées à 498 nm, puis calculées en pourcentage d'inhibition en fonction du contrôle (cellules saines non traitées

correspondant à 100 % de viabilité cellulaire). Le test anti-métabolique a permis le calcul de la  $CC_{50}$  (concentration cytotoxique pour laquelle 50 % d'inhibition du métabolisme des cellules saines est observé) et le test antiviral a permis le calcul de la  $CE_{50}$  (concentration efficace pour laquelle 50 % d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules infectées est observé) (Figure 12).

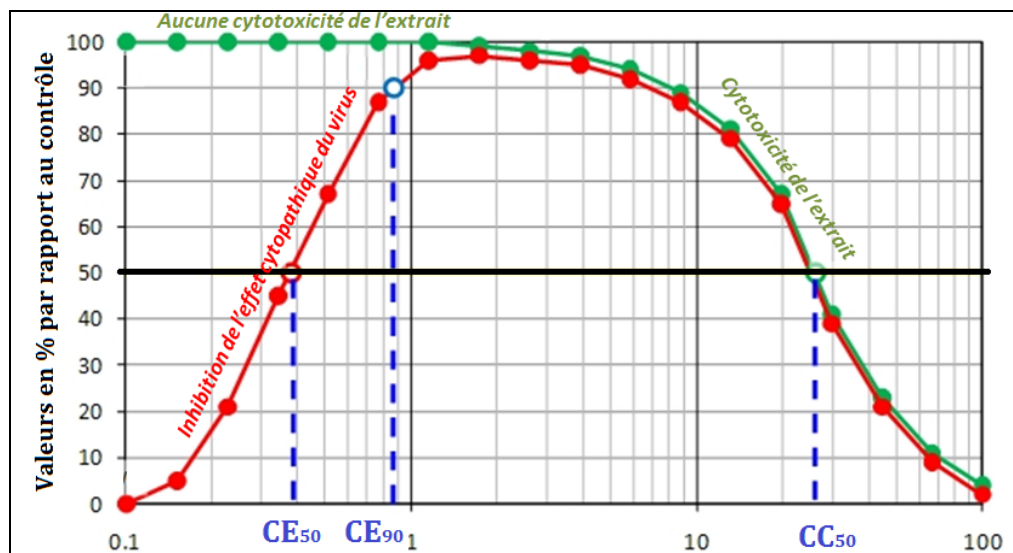


Figure 12 : Représentation schématique des  $CC_{50}$ ,  $CE_{50}$  et  $CE_{90}$  pour le test antiviral (CHIKV)

**Légende :**

Courbe verte : Courbe de cytotoxicité de l'extrait de plante sur cellules Vero non infectées

Courbe rouge : Courbe d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules infectées

$CC_{50}$  : Concentration Cytotoxique, pour laquelle 50 % d'inhibition du métabolisme des cellules saines est observé

$CE_{50/90}$  : Concentration Efficace, pour laquelle 50 % et 90 % d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules infectées est observé

Les extraits identifiés comme sélectifs vis-à-vis du CHIKV ont présenté :

- une  $CC_{50}$  élevée : extraits non toxiques pour les cellules Vero, ne causant pas d'effet cytostatique, n'altérant pas leur métabolisme.
- une  $CE_{50}$  faible : extraits inhibant l'effet cytopathique du virus sur les cellules Vero.

Pour ces extraits, une vérification au microscope a été réalisée pour exclure les faux positifs. La morphologie de la monocouche cellulaire (confluente, dispersée), la morphologie de la cellule (similaire aux cellules saines, effet toxique), et l'effet cytopathique induit par le virus (début, total) ont été évalués et notés de 0 (cellules saines) à 5 (cellules infectées). Un extrait a été jugé actif contre le CHIKV s'il présentait une  $CE_{50}$  intéressante et si, pour au moins une des concentrations testées, les deux notes obtenues pour les tests anti-métabolique et antiviral ont été proches de 0. Chaque test a été fait en duplicat pour vérifier la reproductibilité des résultats.

### 3.2.3.4 Les résultats obtenus


Au total, grâce à l'expertise des institutions et partenaires locaux, 972 plantes ont été sélectionnées. Ces plantes ont été choisies en fonction de leurs utilisations ethnopharmacologiques (lutte contre les rhumatismes et les douleurs articulaires), en fonction de la littérature (espèces connues pour contenir des molécules antivirales) mais aussi en fonction de la disponibilité de la matière première. Le test antiviral ciblant le CHIKV réalisé sur l'ensemble de ces 1554 extraits a permis d'établir une liste de plantes proposant des extraits actifs contre le virus du chikungunya. Respectivement quatorze, huit et six extraits de plantes de Madagascar, La Réunion et Maurice ont montré une activité antivirale ciblant le virus du chikungunya. Le bilan des résultats est présenté dans le Tableau II.

Tableau II  
Résultats du criblage antiviral ciblant le CHIKV des plantes sélectionnées

| Lieu de collecte | Nombre de plantes sélectionnées | Nombre d'extraits végétaux réalisés | Nombre de « Hits » confirmés |
|------------------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Madagascar       | 682                             | 1090                                | 14                           |
| La Réunion       | 171                             | 320                                 | 8                            |
| Maurice          | 119                             | 144                                 | 6                            |

Pour La Réunion, les huit plantes « candidats potentiels » sont :

- *Agarista buxifolia* G. Don, Ecorce, Ericaceae
- *Aphloia theiformis* (Vahl.) Benn., Feuilles, Aphloiaceae
- *Croton mauritanus* Lam., Feuilles, Euphorbiaceae
- *Doratoxylon apetalum* (Poir.) Radlk., Feuilles, Sapindaceae
- *Indigofera amoxylum* (DC.) Polhill, Ecorce, Fabaceae
- *Phyllanthus phillyreifolius* Poir., Feuilles, Phyllanthaceae
- *Securinega durissima* J.F. Gmell., Ecorce, Euphorbiaceae
- *Stillingia lineata* Lam. Müll. Arg, Ecorce, Euphorbiaceae



**Deuxième partie :**  
**Criblages d'activités biologiques**

*Indigofera amoxylum* (DC.) Polhill  
Fabaceae

## Introduction

Les criblages d'activités biologiques réalisés dans ces travaux ont pour but de mettre en évidence des extraits de plantes réunionnaises biologiquement intéressants vis-à-vis du stress oxydatif et de l'inflammation.

Dans cet objectif, dix-huit plantes ont été sélectionnées et trois activités biologiques ont été évaluées. Dans un premier temps, la **cytotoxicité** des extraits végétaux a été évaluée sur des monocytes humains indifférenciés (cellules THP-1). Dans un second temps, l'**activité antioxydante** des extraits a été évaluée *in cellulo* sur des globules rouges humains (test d'hémolyse). Quatre autres tests chimiques (TEAC, FRAP, ORAC, DPPH) ainsi qu'une évaluation de la teneur en composés phénoliques (FOLIN) ont également été réalisés. Enfin, un test d'**activité anti-inflammatoire** a été mené sur des macrophages murins (cellules RAW-Blue™).

Avant ces travaux, aucun criblage d'activité anti-inflammatoire n'a été réalisé sur les espèces végétales de La Réunion. Par ailleurs, aucun test *in cellulo* n'a été effectué pour évaluer la capacité antioxydante des extraits de ces plantes.

En 2004, Poullain *et al.* ont évalué l'activité antioxydante de 274 extraits MeOH et DCM provenant de 75 plantes endémiques ou indigènes de l'île. Ce large criblage a été effectué par des tests qualitatifs réalisés par chromatographie sur couche mince. Les propriétés de piégeage des radicaux libres (DPPH, radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) et antioxydantes ( $\beta$ -carotène) ont été évaluées. Un potentiel de piégeage des radicaux libres a été mis en évidence pour 73 % des plantes testées et 32 % ont présenté une activité antioxydante [45].

D'autres études ont été menées par des équipes mauriciennes sur des espèces communes aux deux îles. Elles ont été réalisées par des tests chimiques (TEAC/FRAP/piégeage de HOCl/ Cuivre-phénanthroline/ Peroxydation lipidique) et ont permis de mettre en évidence le potentiel antioxydant de plantes appartenant principalement aux familles des Rubiaceae et Myrtaceae [125, 126].

Les criblages d'activités antioxydante et anti-inflammatoire réalisés dans ces travaux sont donc les premiers à rendre compte du potentiel antioxydant *in cellulo* d'extraits végétaux réunionnais ainsi que de leur potentiel anti-inflammatoire.



## Chapitre II-1 Plantes étudiées et tests d'activités réalisés

### **1.1 Sélection des plantes**

Dix-huit plantes réunionnaises, peu ou pas étudiées, ont été sélectionnées en fonction de leurs utilisations traditionnelles pour des pathologies liées à l'inflammation (cystite\*, dysenterie\*, néphrite\*, bronchite, cicatrisation des plaies), aux maladies cardiovasculaires (propriété antihypertensive) ou encore au diabète et à l'obésité (allégations d'effets hypoglycémiant et amaigrissant). Ces plantes ont également été sélectionnées en fonction des données de la littérature.

Le Tableau III (*cf.* p. 57-59) présente les dix-huit espèces qui ont été sélectionnées. Les statuts d'indigénat ou d'endémicité, les parties testées, les utilisations traditionnelles et les espèces du genre présentant les activités biologiques recherchées ont été mentionnés. Ce tableau présente également les autres activités biologiques les plus souvent décrites pour le genre ainsi que les familles de molécules les plus souvent rencontrées, en précisant les espèces concernées.

Tableau III

Recherche bibliographique sur les dix-huit plantes réunionnaises sélectionnées pour les criblages d'activités cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire







| Familles               | Espèces   | Parties <sup>a</sup> | Statuts <sup>b</sup> | Utilisations traditionnelles  | Récents travaux sur des plantes appartenant au même genre   |   |  |  |
|------------------------|---|----------------------|----------------------|---|---|---|--|--|
|                        |   |                      |                      |   | Antioxydante/Antiradicalaire  | Anti-inflammatoire  | Autres activités biologiques   | Molécules isolées  |
| <b>Annonaceae</b>      | <i>Xylopia richardii</i><br>Boivin ex Baill.<br>   | E                    | Run/Mau              | Non connues   | - <i>X. championii</i> [127]<br>- <i>X. aethiopica</i> [128-130]  | - <i>X. frutescens</i> [131]  | - Antiappétant* : <i>X. aethiopica</i> [132, 133]<br>- Antimicrobien : <i>X. parviflora/X. aethiopica</i> [134-136], <i>X. aromatica/X. emarginata</i> [137, 138]<br>- Cytotoxique : <i>X. aromatica</i> [139, 140]<br>- Génotoxique/mutagène : <i>X. sericeae</i> [141]<br>- Antimalarial : <i>X. sp.</i> [142, 143], <i>X. aromatica</i> [144]<br>- Cardiovasculaire : <i>X. langsdorffiana</i> [145], <i>X. aethiopica</i> [146]<br>- Diurétique : <i>X. aethiopica</i> [146]<br>- Radioprotecteur contre rayons gamma : <i>X. aethiopica</i> [129]   | - Sesquiterpènes dimériques : <i>X. aromatica</i> [147], <i>X. vielana</i> [148, 149]<br>- Labdanes dimériques : <i>X. aromatica</i> [150]<br>- Stéroïdes : <i>X. aromatica</i> [150], <i>X. brasiliensis</i> [151]<br>- Flavonoïdes : <i>X. ferruginea</i> [152], <i>X. emarginata</i> [153]<br>- Sesquiterpènes : <i>X. brasiliensis</i> [151], <i>X. emarginata</i> [153]<br>- Stéroïdes : <i>X. emarginata</i> [153]<br>- Diterpènes : <i>X. cayennensis</i> [154], <i>X. emarginata</i> [155], <i>X. brasiliensis</i> [151], <i>Xylopia sp.</i> [156]<br>- Alcaloïdes : <i>X. brasiliensis</i> [151], <i>X. championii</i> [157], <i>X. parviflora</i> [158, 159], <i>X. emarginata</i> [153], <i>X. ferruginea</i> [152]   |
| <b>Apocynaceae</b>     | <i>Carissa spinarum</i> L.<br>   | E                    | In                   | Plaies, néphrite*, gastralgie*, tonique, stomacnique*, chancres*, ulcères, furoncles, dartres, gale, blennorragie*, calculs rénaux, goutte, anthelmintique*, anti-diabétique, fébrifuge* et expectorant* [23, 32] | - <i>C. spinarum</i> [45, 160, 161]<br>- <i>C. opaca</i> [162, 163]<br>- <i>C. carandas</i> [164]   | - <i>C. spinarum</i> [165]  | - Anticonvulsif : <i>C. edulis</i> [166], <i>C. spinarum</i> [167]<br>- Diurétique : <i>C. edulis</i> [168]<br>- Antimicrobien : <i>C. lanceolata</i> [169], <i>C. spinarum</i> [165]<br>- Antidiabétique : <i>C. carandas</i> [170, 171], <i>C. edulis</i> [172]<br>- Cytotoxique : <i>C. carandas</i> [173]<br>- Antiviral : <i>C. carandas</i> [174], <i>C. edulis</i> [175]<br>- Hépatoprotecteur : <i>C. spinarum</i> [176], <i>C. carandas</i> [177], <i>C. opaca</i> [163]<br>- Fébrifuge : <i>C. spinarum</i> [178]<br>- Anti-arthritique : <i>C. spinarum</i> [179]   | - Sesquiterpènes et lignanes : <i>C. edulis</i> [180, 181], <i>C. lanceolata</i> [169], <i>C. carandas</i> [164, 182], <i>C. spinarum</i> [161]<br>- Cardénolides : <i>C. carandas</i> [183]<br>- Saponines et composés phénoliques : <i>C. edulis</i> [184]<br>- Triterpènes : <i>C. spinarum</i> [160], <i>C. carandas</i> [173]   |
|                        | <i>Polyscias repanda</i><br>(DC.) Baker<br>  | F                    | Run                  | Non connues   | - <i>P. filicifolia</i> [185]<br>- <i>P. pinnata</i> [186]  | - <i>P. murrayi</i> [187]<br>- <i>P. filicifolia</i> [185]<br>- <i>P. fruticosa</i> [188]   | - Molluscide : <i>P. dichroostachya</i> [189]  | - Saponines : <i>P. fruticosa</i> [190], <i>P. fulva</i> [191], <i>P. dichroostachya</i><br>- Flavonoïdes : <i>P. pinnata</i> [186]  |
|                        | <i>Vernonia fimbriifera</i><br>(Cass.) Less.<br>   | F                    | Run                  | Non connues   | - <i>V. amygdalina</i> [192-194]  | - <i>V. scorpioides</i> [195, 196]<br>- <i>V. cinerea</i> [197-200]<br>- <i>V. amygdalina</i> [201]<br>- <i>V. triflosculosa</i> [202]<br>- <i>V. cumingiana</i> : [203, 204] | - Hépatoprotecteur : <i>V. amygdalina</i> [194]<br>- Vasodilatateur : <i>V. polyanthes</i> [205]<br>- Antiulcéreux : <i>V. kotschyana</i> [206], <i>V. polyanthes</i> [207]<br>- Antimicrobien : <i>V. amygdalina</i> [208, 209], <i>V. guineensis</i> [210, 211], <i>V. colorata</i> [212], <i>V. anthelmintica</i> [213], <i>V. cinerea</i> [214], <i>V. arborea</i> [215, 216], <i>V. staehilinoides</i> [217]<br>- Hypoglycémiant : <i>V. amygdalina</i> [218, 219], <i>V. anthelmintica</i> [220], <i>V. colorata</i> [221]<br>- Cytotoxique : <i>V. bockiana</i> [222], <i>V. scorpioides</i> [223], <i>V. staehilinoides</i> [217], <i>V. anthelmintica</i> [224]<br>- Anticancéreux : <i>V. amygdalina</i> [225], <i>V. guineensis</i> [226]<br>- Antidiabétique : <i>V. amygdalina</i> [227]<br>- Purgatif : <i>V. amygdalina</i> [228, 229]<br>- Antimalarial : <i>V. lasiopis</i> [230], <i>V. amygdalina</i> [231] | - Lactones sesquiterpéniques : <i>V. amygdalina</i> [208], <i>V. scorpioides</i> [223], <i>V. colorata</i> [212, 216], <i>V. cumingiana</i> [232], <i>V. cinerea</i> [197]<br>- Flavonoïdes : <i>V. scorpioides</i> [223], <i>V. fruticulosa</i> [233], <i>V. anthelmintica</i> [234], <i>V. galamensis</i> [235], <i>V. amygdalina</i> [236]<br>- Stéroïdes : <i>V. anthelmintica</i> [213, 237], <i>V. guineensis</i> [210, 238, 239], <i>V. cumingiana</i> [203, 204], <i>V. kotschyana</i> [240]<br>- Hirsutinolides : <i>V. staehilinoides</i> [217], <i>V. triflosculosa</i> [202]<br>- Diterpènes : <i>V. triflosculosa</i> [202]<br>- Cardinanolides : <i>V. fruticulosa</i> [233]<br>- Dimères d'élémanolides : <i>V. anthelmintica</i> [224]   |
| <b>Celastraceae</b>    | <i>Cassine orientalis</i><br>(Cav.) Harms<br>(syn. <i>Elaeodendron orientale</i> )<br>             | F                    | Mas                  | Vomitif, diarrhée infantile, blennorragie, émollientes, circulation sanguine, hypertension [31, 241]  | - <i>C. transvaalensis</i> [242, 243]<br>- <i>C. orientalis</i> [241]   | - <i>E. transvaalensis</i> [244]  | - Antimicrobien : <i>C. transvaalensis</i> [245], <i>E. schlechteranum</i> [246], <i>E. buchannanii</i> [247], <i>C. papillosa</i> [248]<br>- Cytotoxique : <i>E. transvaalensis</i> [243, 249], <i>E. alluaudianum</i> [250], <i>E. croceum</i> [251]<br>- Anti-VIH : <i>E. schlechheranum</i> [252], <i>C. xylocarpa</i> [253], <i>E. croceum</i> [254], <i>E. transvaalensis</i> [244]<br>- Hypoglycémiant : <i>E. transvaalensis</i> [249]<br>- Antiappétant : <i>E. buchannanii</i> [255]   | - Triterpènes : <i>C. transvaalensis</i> [256], <i>C. papillosa</i> [257], <i>C. xylocarpa</i> [253, 258], <i>C. balae</i> [259-262], <i>E. balae</i> [263]<br>- Triterpènes/Composés phénoliques : <i>E. schlechheranum</i> [252]<br>- Flavonoïdes : <i>C. papillosa</i> [257], <i>E. balae</i> [263]<br>- Glycosides cardiotoniques : <i>E. glaucum</i> [264]<br>- Sesquiterpènes : <i>E. buchannanii</i> [265]<br>- Cardénolides glucosidiques : <i>E. alluaudianum</i> [250]   |
| <b>Dryopteridaceae</b> | <i>Dryopteris wallichiana</i> (Spreng.) Hyl. ssp. <i>madagascariensis</i> (C. Chr.) J.P. Roux.<br> | P/R                  | Run/Mau              | Non connues   | - <i>D. crassirhizoma</i> [266]<br>- <i>D. erythrosora</i> [267] [268]<br>- <i>D. fragrans</i> [269, 270]<br>- <i>D. cochleata</i> [271]<br>- <i>D. sp.</i> [272] | - <i>D. chrysocoma</i> [273]<br>- <i>D. crassirhizoma</i> [274]   | - Piscicide : <i>D. fragrans</i> [275, 276]<br>- Anti-VIH : <i>D. crassirhizoma</i> [277, 278]<br>- Antimicrobien : <i>D. crassirhizoma</i> [279, 280], <i>D. sp.</i> [281], <i>D. wallichiana</i> [282]<br>- Anti-diabétique : <i>D. fragrans</i> [283]<br>- Cytotoxique / inhibition acétylcholinestérase : <i>D. erythrosora</i> [268]<br>- Anticancéreux : <i>D. crassirhizoma</i> [284], <i>D. fragrans</i> [275, 285], <i>D. sp.</i> [286]   | - Phloroglucinols : <i>D. wallichiana</i> [282], <i>D. bissetiana</i> [287], <i>D. dickinsii</i> [288], <i>D. sp.</i> [289, 290], <i>D. abbreviata</i> [291], <i>D. subimpresca</i> [292], <i>D. atrata</i> [293], <i>D. fragrans</i> [275, 276], <i>D. vilarii</i> et <i>D. arguta</i> [289], <i>D. crassirhizoma</i> [278, 294, 295], <i>D. parallelogramma</i> et <i>D. patula</i> [296], <i>D. fusco-atra</i> , <i>D. hawaiiensis</i> [297]<br>- Flavonoïdes : <i>D. sp.</i> [298], <i>D. crassirhizoma</i> [277, 278, 295], <i>D. erythrosora</i> [267], <i>D. sublaeta</i> [299]<br>- Triterpènes : <i>D. crassirhizoma</i> [278, 300, 301]<br>- Kauranes : <i>D. crassirhizoma</i> [278]<br>- Sesquiterpènes : <i>D. fragrans</i> [302]<br>- Margspidine : <i>D. bissetiana</i> , <i>D. pacifica</i> , <i>D. saxifrag</i> , <i>D. sacrosancta</i> [287]<br>- Stilbènes : <i>D. sublaeta</i> [303]<br>- Composés phénoliques : <i>D. crassirhizoma</i> [304]<br>- Acide carbamique : <i>D. wallichiana</i> [305] |

Tableau III (suite)













| Familles             | Espèces   | Parties <sup>a</sup> | Statuts <sup>b</sup> | Utilisations traditionnelles  | Récents travaux sur des plantes appartenant au même genre   |   |  |   |
|----------------------|---|----------------------|----------------------|---|---|---|--|---|
|                      |   |                      |                      |   | Antioxydante/Antiradicalaire  | Anti-inflammatoire  | Autres activités biologiques   | Molécules isolées   |
| <b>Ericaceae</b>     | <i>Agarista buxifolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don<br>               | E/F                  | In                   | Rhumatismes, hémorroïdes, gale, maladies vénériennes*, dermatologie [11-13, 32, 306]              | -   | -   | - Insecticide : <i>A. salicifolia</i> [307]<br>- Antifongique : <i>A. salicifolia</i> [247]<br>- Curarisant* : <i>A. salicifolia</i> [308-310]<br>- Toxique : <i>A. salicifolia</i> [311, 312]<br>- Antidiabétique : <i>A. mexicana</i> [313]<br>- Hypoglycémiant : <i>A. mexicana</i> [314]   | - Grayanotoxines : <i>A. polyphylla</i> [315]<br>- Flavonoïdes : <i>A. salicifolia</i> [316]<br>- Triterpènes : <i>A. salicifolia</i> [317], <i>A. mexicana</i> [318]   |
| <b>Euphorbiaceae</b> | <i>Acalypha integrifolia</i> Willd.<br>                            | E                    | In                   | Dépuratif*, astringent [31]   | - <i>A. integrifolia</i> [45]<br>- <i>A. indica</i> [319]<br>- <i>A. fruticosa</i> [320-322]<br>- <i>A. wilkesiana</i> [323]<br>- <i>A. hispida</i> [324, 325]<br>- <i>A. brachystachya</i> [326]<br>- <i>A. platyphilla</i> [327]  | - <i>A. wilkesiana</i> [328]<br>- <i>A. indica</i> [329, 330]<br>- <i>A. alopecuroidea</i> [331, 332]   | - Hypoglycémiant : <i>A. capitata</i> [333], <i>A. wilkesiana</i> [323]<br>- Cytotoxique : <i>A. wilkesiana</i> [334]<br>- Cicatrisant : <i>A. indica</i> [335, 336], <i>A. langiana</i> [337]<br>- Immunomodulant : <i>A. wilkesiana</i> [338]<br>- Analgésique : <i>A. wilkesiana</i> [339]<br>- Antimicrobien : <i>A. wilkesiana</i> [340, 341], <i>A. siamensis</i> [342], <i>A. ornate</i> [343]<br>- Antimalarial : <i>A. wilkesiana</i> [339]<br>- Anti-venin : <i>A. indica</i> [319]  | - Terpènes : <i>A. macrostachya</i> [344], <i>A. hispida</i> [324]<br>- Amides : <i>A. diversifolia</i> [344]<br>- Anthocyanes : <i>A. hispida</i> [345]<br>- Flavonoïdes : <i>A. indica</i> [346]<br>- Dérivés cyanopyridones : <i>A. indica</i> [347]<br>- Composés phénoliques : <i>A. australis</i> [348]   |
|                      | <i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll.Arg. ssp. <i>lineata</i><br> | E/F                  | Mas                  | Non connues   | -   | -   | - Siccatif : <i>S. sylvatica</i> [349]<br>- Irritant : <i>S. sylvatica</i> [350]<br>- Cytotoxique : <i>S. lineata</i> [351], <i>S. oppositifolia</i> [352]<br>- Protéolytique : <i>S. patagonica</i> [353]<br>- Antimicrobien : <i>S. oppositifolia</i> [352]  | - Triterpènes : <i>S. oppositifolia</i> [352]<br>- Alcaloïde : <i>S. sylvatica</i> [354]<br>- Tanins catéchiques : <i>S. lineata</i> [31]<br>- Diterpènes/Triterpènes : <i>S. sanguinolenta</i> [355], <i>S. sylvatica</i> [350]  |
| <b>Fabaceae</b>      | <i>Indigofera amoxylum</i> (DC.) Polhill<br>                     | E/F                  | Run                  | Hypoglycémiant, amaigrissant [23]   | - <i>I. amoxylum</i> [45]<br>- <i>I. tinctoria</i> [356-358]<br>- <i>I. aspalathoides</i> [359, 360]<br>- <i>I. oblongifolia</i> [361]<br>- <i>I. sp.</i> [362]<br>- <i>I. trita</i> [363]<br>- <i>I. cassioides</i> [364]<br>- <i>I. linnaei</i> [365]<br>- <i>I. caerulea</i> [366]         | - <i>I. aspalathoides</i> [359, 367]<br>- <i>I. hetrantha</i> [368, 369]<br>- <i>I. pulchra</i> [370]<br>- <i>I. suffruticosa</i> [371]   | - Antimicrobien : <i>I. dendroides</i> [372], <i>I. oblongifolia</i> [373, 374], <i>I. suffruticosa</i> [375], <i>I. daleoides</i> [376], <i>I. aspalathoides</i> [377], <i>I. tinctoria</i> [378], <i>I. pulchra</i> [379], <i>I. longeracemosa</i> [380], <i>I. emarginella</i> [381]<br>- Hépatoprotecteur : <i>I. tinctoria</i> [382-386], <i>I. oblongifolia</i> [361], <i>I. aspalathoides</i> [387], <i>I. trita</i> [363]<br>- Néphroprotecteur* : <i>I. barberi</i> [388]<br>- Neuroprotecteur : <i>I. tinctoria</i> [389]<br>- Antitumoral : <i>I. aspalathoides</i> [390-392], <i>I. suffruticosa</i> [393], <i>I. trita</i> [394], <i>I. tinctoria</i> [395], <i>I. cassioides</i> [364], <i>I. linnaei</i> [365]<br>- Chimio-prévention : <i>I. aspalathoides</i> [396, 397]<br>- Cytotoxique : <i>I. aspalathoides</i> [398], <i>I. cassioides</i> [364], <i>I. linnaei</i> [365]<br>- Toxique : <i>I. endecaphylla</i> [399-403], <i>I. hochstetteri</i> [404], <i>I. tinctoria</i> [405]<br>- Hépatotoxique : <i>I. spicata</i> [406]<br>- Embryotoxique : <i>I. suffruticosa</i> [407]<br>- Tératogène : <i>I. spicata</i> [406]<br>- Mutagène : <i>I. suffruticosa</i> / <i>I. truxillensis</i> [408]<br>- Antituberculose : <i>I. longeracemosa</i> [380]<br>- Antiulcéreux : <i>I. suffruticosa</i> [409], <i>I. longeracemosa</i> [410]<br>- Anti-dyslipidémique* : <i>I. tinctoria</i> [411]<br>- Antidiabétique/ antihyperglycémiant/ hypoglycémiant : <i>I. arrecta</i> [412-414], <i>I. mysorensis</i> [415], <i>I. aspalathoides</i> [377], <i>I. pulchra</i> [416, 417] | - Flavanoïdes : <i>I. hebetata</i> [418, 419], <i>I. linnaei</i> [420], <i>I. hetrantha</i> [368, 421], <i>I. tinctoria</i> [411], <i>I. aspalathoides</i> [398], <i>I. zollingeriana</i> [422], <i>I. suffruticosa</i> / <i>I. truxillensis</i> [408, 423]<br>- Roténoïdes : <i>I. tinctoria</i> [378, 424]<br>- Arylbenzofuranes : <i>I. microcarpa</i> [425]<br>- Coumarines : <i>I. oblongifolia</i> [426]<br>- Abiétanes : <i>I. longeracemosa</i> [427]<br>- Acylphloroglucinols et lignanes : <i>I. hetrantha</i> [369]<br>- Triterpènes : <i>I. oblongifolia</i> [428]<br>- Monoterpènes glucosidiques : <i>I. hetrantha</i> [429]<br>- Hydrocarbures sesquiterpéniques : HE de <i>I. microcarpa</i> [430]<br>- Indigocarpan et mucronulatol : <i>I. aspalathoides</i> [359]<br>- Acide trans-tétracos-15-énoïque : <i>I. tinctoria</i> [384]<br>- Aminoacide : <i>I. spicata</i> [431]<br>- Galactomannane : <i>I. spicata</i> [432], <i>I. tinctoria</i> [433]<br>- Acide hiptagénique/ acide β-nitropropionique : <i>I. endecaphylla</i> [399, 400, 434]<br>- Nitropropanylglucopyranoside : <i>I. suffruticosa</i> [435], <i>I. linnaei</i> [436], <i>I. carlesii</i> [437], <i>I. kirilowii</i> [438]<br>- 3-nitropropanoyl ester de glucose : <i>I. suffruticosa</i> [439], <i>I. kirilowii</i> [440, 441]<br>- Glucopyranosides acylés : <i>I. oblongifolia</i> [442]<br>- Xanthène : <i>I. longeracemosa</i> [443]<br>- Décahydroxyridopyrimidine : <i>I. longeracemosa</i> [427] |
| <b>Lamiaceae</b>     | <i>Clerodendrum heterophyllum</i> (Poir.) R.Br.<br>              | F                    | Mas                  | Fièvre, dysenterie, jaunisse, hépatite, maladies vénériennes, fièvre paludéenne [12, 13, 32, 444] | - <i>C. siphonathus</i> [445]<br>- <i>C. infortunatum</i> [446]<br>- <i>C. glandulosum</i> [447]<br>- <i>C. sp.</i> [448]<br>- <i>C. colebrookianum</i> [449]<br>- <i>C. heterophyllum</i> [45]<br>- <i>C. inerme</i> [450]<br>- <i>C. trichotomum</i> [451-453]<br>- <i>C. indicum</i> [454] | - <i>C. petasites</i> [455]<br>- <i>C. phlomidis</i> [456]<br>- <i>C. glandulosum</i> [447]<br>- <i>C. floribundum</i> [457]<br>- <i>C. cyrtophyllum</i> [458]<br>- <i>C. sp.</i> [459] | - Anti-diarrhéique : <i>C. phlomidis</i> [460]<br>- Bronchodilatateur : <i>C. petasites</i> [461]<br>- Antimutagène : <i>C. myricoides</i> [462, 463]<br>- Antimalarial : <i>C. myricoides</i> [230]<br>- Cytotoxique : <i>C. myricoides</i> [464], <i>C. inerme</i> [465]<br>- Hépatoprotecteur : <i>C. inerme</i> [466]<br>- Antihypertensif : <i>C. colebrookianum</i> [467]<br>- Hypoglycémiant et hypolipidémiant : <i>C. capitatum</i> [468]   | - Stéroïdes, cétones aliphatiques : <i>C. inerme</i> [469]<br>- Glycosides cyanogéniques : <i>C. grayi</i> [470]<br>- Diterpènes : <i>C. inerme</i> [471], <i>C. mandarinorum</i> [472]<br>- Mégastigmane et iridoïdes glucosidiques : <i>C. inerme</i> [473]<br>- Stéroïdes : <i>C. colebrookianum</i> [474]<br>- Clérostéroïdes : <i>C. quadriloculare</i> [475]<br>- Coumaramides glycosidés : <i>C. cyrtophyllum</i> [458]<br>- Quertecine : <i>C. infortunatum</i> [476]   |

Tableau III (suite)

| Familles       | Espèces   | Parties <sup>a</sup> | Statuts <sup>b</sup> | Utilisations traditionnelles  | Antioxydante/Antiradicalaire   | Anti-inflammatoire  | Récents travaux sur des plantes appartenant au même genre   | Molécules isolées  |
|----------------|---|----------------------|----------------------|---|--|---|---|--|
|                |   |                      |                      |   |  |   | Autres activités biologiques  |  |
| Meliaceae      | <i>Tourraea casimiriensis</i> Harms<br>                                      | E/F                  | Mas                  | Hypertension, rhumatismes, goutte, sudorifique, dépuratif, dysménorrhée*, gale, chylurie*, albuminurie* [23, 32]  | - <i>T. floribunda</i> [477]   | - <i>T. floribunda</i> [477]  | - Antimicrobien : <i>T. wakefieldii</i> [478], <i>T. floribunda</i> [479], <i>T. robusta</i> [480]<br>- Antihypertensif : <i>T. casimiriensis</i> [34]<br>- Antimalarial : <i>T. robusta</i> [480]  | - Limonoïdes : <i>T. wakefieldii</i> [478], <i>T. floribunda</i> [481-484], <i>T. holstii</i> [485], <i>T. obtusifolia</i> / <i>T. parvifolia</i> [486]<br>- Tétranortriterpénoïdes : <i>T. parvifolia</i> [487]<br>- Stéroïdes : <i>T. pubescens</i> [488]  |
| Myrtaceae      | <i>Eugenia buxifolia</i> Lam.<br>  | E                    | Run                  | Cystite, angine, dépuratif [31]   | - <i>E. jambolana</i> [489-491]<br>- <i>E. pollicina</i> [126]<br>- <i>E. carophyllata</i> [492]<br>- <i>E. sp.</i> [125, 126, 493]<br>- <i>E. uniflora</i> [494, 495]   | - <i>E. jambolana</i> [489]   | - Anticancéreux : <i>E. sandwicensis</i> [496]<br>- Antihyperglycémiant : <i>E. jambolana</i> [497-499], <i>E. uniflora</i> [500]<br>- Hypotensif : <i>E. uniflora</i> [501, 502]<br>- Antimicrobien : <i>E. uniflora</i> [495], <i>E. jambolana</i> [489, 503], <i>E. dysenterica</i> [504]<br>- Antidiabétique : <i>E. jambolana</i> [505]<br>- Gastroprotecteur/ hépatoprotecteur/ anti allergène/ anticancéreux/ cardioprotecteur/ antidiarrhéique/ antiviral : <i>E. jambolana</i> [489]<br>- Anti-dépresseur : <i>E. sp.</i> [506]  | - Acides alliphatiques/anthocyanes/phytostéroïdes/composés phénoliques/ flavonoïdes : <i>E. jambolana</i> [489]<br>- Composés phénoliques : <i>E. caryophyllata</i> [507]<br>- Caroténoïdes : <i>E. uniflora</i> [508]   |
|                | <i>Syzygium borbonicum</i> J.Gueho et A.J.Scott.<br>                         | F                    | Run                  | Non connue  | - <i>S. sp.</i> [125, 126, 493]<br>- <i>S. cumini</i> / <i>S. jambolanum</i> [509-512] [513]<br>- <i>S. polyanthum</i> [514]<br>- <i>S. aromaticum</i> [515]   | - <i>S. cumini</i> [516] [517, 518]<br>- <i>S. samarangense</i> [519]<br>- <i>S. aromaticum</i> [520, 521]<br>- <i>S. alternifolium</i> [522] | - Analgésique : <i>S. jambos</i> [523]<br>- Antihyperglycémiant/ hypoglycémiant : <i>S. aqueum</i> [524], <i>S. alternifolium</i> [525], <i>S. jambolanum</i> [513], <i>S. cumini</i> [526]<br>- Antidiabète : <i>S. cordatum</i> [527], <i>S. aqueum</i> [528], <i>S. alternifolium</i> [529], <i>S. samarangense</i> [530], <i>S. cumini</i> [531]<br>- Antimicrobien : <i>S. guineense</i> [532], <i>S. jambolanum</i> [533], <i>S. jambos</i> [534]<br>- Molluscide : <i>S. aromaticum</i> [535]<br>- Insecticide : <i>S. lineare</i> [536]<br>- Acaricide : <i>S. cumini</i> [537]<br>- Antitumoral : <i>S. cumini</i> [512]<br>- Anti-hypertensive : <i>S. aromaticum</i> [538]   | - Chalcones et quercétine glycosylé : <i>S. samarangense</i> [539]<br>- Flavonoïdes : <i>S. aqueum</i> [524], <i>S. samarangense</i> [540], <i>S. aromaticum</i> [541]<br>- Flavonoïdes/tanins hydrolysables/lignanes/phénols simples : <i>S. forrestii</i> [542], <i>S. aromaticum</i> [543]<br>- Triterpènes : <i>S. guineense</i> [532]<br>- Triterpènes/ chalcones / acide ursolique et arjunolique : <i>S. samarangense</i> [544]<br>- Terpènes/ stéroïdes/ dérivé bifuranes : <i>S. tetragonum</i> [545]<br>- Lignanes : <i>S. grijsii</i> [546]<br>- Triterpènes + glucosides phénoliques : <i>S. aromatica</i> [547]<br>- Lignanes : <i>P. urinaria</i> [554, 576], <i>P. niruri</i> [560], <i>P. oxyphyllus</i> [577], <i>P. polyphyllus</i> [578]<br>- Flavonoïdes : <i>P. amarus</i> [579], <i>P. niruri</i> [580], <i>P. urinari</i> [554]<br>- Tanins : <i>P. amarus</i> [579], <i>P. urinaria</i> [554, 566], <i>P. muellerianus</i> [581], <i>P. niruri</i> [582]<br>- Alcaloïdes : <i>P. amarus</i> [583], <i>P. nirunoides</i> [584]<br>- Terpènes : <i>P. polyanthus</i> [585], <i>P. amarus</i> [572], <i>P. oxyphyllus</i> [577]<br>- Stéroïdes : <i>P. emblica</i> [586]<br>- Lactones : <i>P. urinaria</i> [587] |
| Phyllanthaceae | <i>Phyllanthus casticum</i> Soy.-Will.<br>                                  | E                    | In                   | Dysenterie, angines, cicatrisation de plaies, hémorroïdes, ulcère gastrique, anti-diarrhéique, leucorrhées*, blennorragie, hémorragie intestinales, andropause*, aménorrhée* [23, 32] | - <i>P. amarus</i> [548, 549]<br>- <i>P. emblica</i> [550, 551]<br>- <i>P. simplex</i> [552]<br>- <i>P. wightianus</i> [553]<br>- <i>P. urinaria</i> [554]<br>- <i>P. sp.</i> [555, 556]<br>- <i>P. acidus</i> [557] | - <i>P. amarus</i> [558]<br>- <i>P. urinaria</i> [554]<br>- <i>P. acidus</i> [557]<br>- <i>P. reticulatus</i> [559]                           | - Anti-hyperuricémiant : <i>P. niruri</i> [560]<br>- Antimicrobien : <i>P. muellerianus</i> [561], <i>P. sp.</i> [556], <i>P. amarus</i> [562]<br>- Hépatoprotecteur : <i>P. amarus</i> [563], <i>P. acidus</i> [564], <i>P. maderaspatensis</i> [565]<br>- Lésions gastriques : <i>P. amarus</i> [558]<br>- Antiviral : <i>P. urinaria</i> [566], <i>P. sp.</i> [556]<br>- Antinociceptif* : <i>P. urinaria</i> , <i>P. niruri</i> [567]<br>- Analgésique : <i>P. acidus</i> [557]<br>- Antinéphrotoxique : <i>P. fraternus</i> [568], <i>P. amarus</i> [569]<br>- Antimutagène/anticarcinogène : <i>P. amarus</i> [570]<br>- Antidiabétique : <i>P. amarus</i> [571, 572], <i>P. sellowianus</i> [573]<br>- Diurétique : <i>P. sellowianus</i> [574]<br>- Antidiarrhéique/antispasmodique : <i>P. emblica</i> [575] | - Lignanes : <i>P. urinaria</i> [554, 576], <i>P. niruri</i> [560], <i>P. oxyphyllus</i> [577], <i>P. polyphyllus</i> [578]<br>- Flavonoïdes : <i>P. amarus</i> [579], <i>P. niruri</i> [580], <i>P. urinari</i> [554]<br>- Tanins : <i>P. amarus</i> [579], <i>P. urinaria</i> [554, 566], <i>P. muellerianus</i> [581], <i>P. niruri</i> [582]<br>- Alcaloïdes : <i>P. amarus</i> [583], <i>P. nirunoides</i> [584]<br>- Terpènes : <i>P. polyanthus</i> [585], <i>P. amarus</i> [572], <i>P. oxyphyllus</i> [577]<br>- Stéroïdes : <i>P. emblica</i> [586]<br>- Lactones : <i>P. urinaria</i> [587]   |
| Rubiaceae      | <i>Coptosperma borbonica</i> De Block (syn. <i>Tarenna borbonica</i> )<br> | F                    | Run                  | Fièvre, astringente, fièvre typhoïde [30]   | -  | -   | -   | - Elaeocarpidine : <i>T. vanprukii</i> [588]<br>- Iridoïdes/ chalcones/ lignanes : <i>T. attenuata</i> [589, 590]<br>- Cycloartanes glycosidiques : <i>T. gracilipes</i> [591, 592]<br>- Polyphénols et iridoïdes : <i>T. madagascariensis</i> [593]<br>- Sesquiterpènes : <i>T. madagascariensis</i> [594]  |
|                | <i>Myonima obovata</i> Lam.<br>  | E                    | Run/Mau              | Non connues   | - <i>M. sp.</i> [125]  | -   | -   | -  |
|                | <i>Pyrostria orbicularis</i> A.Rich. ex DC.<br>                            | F                    | Run                  | Non connues   | -  | -   | - Antiprotozoaire : <i>P. major</i> [595]   | - Diaryheptanoïdes glycosylés : <i>P. major</i> [595]  |

Légende :

(a) E, écorce ; F, feuilles ; P, pennes ; R, rachis + pétioles

(b) Run, endémique Réunion ; Mau, endémique Maurice ; Mas, endémique Mascareignes ; In, indigène

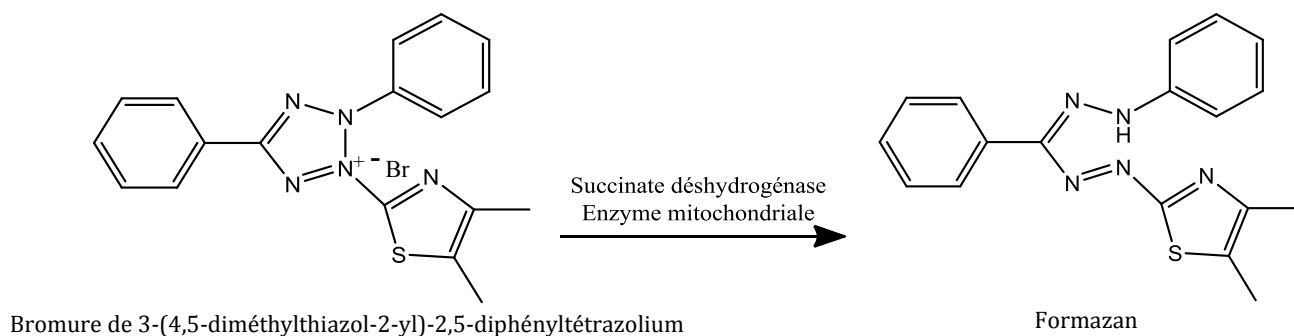
Parmi ces plantes, certains genres ont été très (*Eugenia, Syzygium*) ou très peu (*Pyrostria, Myonima*) étudiés. Par ailleurs, certaines de ces plantes sont utilisées dans la pharmacopée traditionnelle (*Phyllanthus casticum, Syzygium borbonicum*), d'autres ne le sont pas (*Myonima obovata, Pyrostria orbicularis*). L'étude de plantes très peu étudiées et non utilisées dans la pharmacopée locale est une des voies envisageables pour mettre en évidence de nouvelles sources de composés bioactifs.

Les extraits de ces plantes proviennent soit du programme Phytochik (quinze extraits AcOEt de plantes collectées de mai 2009 à mars 2011, conservés à 4°C) ou ont été réalisés après collecte. Les cinq plantes concernées ont été collectées de novembre 2009 à juillet 2010 (*Stillingia lineata, Agarista buxifolia, Indigofera amoxylum, Vernonia fimbriifera, Dryopteris wallichiana*). Ces plantes ont été séchées et broyées, puis une partie de la matière sèche pulvérisée a été extraite directement à l'acétate d'éthyle (AcOEt), l'autre a été extraite successivement au dichlorométhane (DCM) et au méthanol (MeOH). Toutes les extractions ont été réalisées au moyen d'un extracteur accéléré par solvant (ASE® 300, Accelerated Solvent Extractor, Dionex). Le criblage d'activités biologiques a ainsi été effectué sur trente-huit extraits végétaux.

## **1.2. Tests d'activités biologiques**

### **1.2.1 Test de cytotoxicité**

Le test de cytotoxicité utilisé est un test colorimétrique largement reconnu comme méthode fiable permettant d'évaluer la viabilité cellulaire [596]. Il consiste à observer la réduction d'un sel de tétrazolium (ici le MTT, bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) initialement jaune, en cristaux violets de formazan sous l'action d'une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Le nombre de cristaux formés est proportionnel à l'activité enzymatique des cellules ; une lecture de l'absorbance à 595 nm permet de quantifier le pourcentage de cellules vivantes.



Le test a été réalisé sur une lignée cellulaire humaine (THP-1, monocytes humains indifférenciés) pour cinq concentrations en extrait de 1 à 100 µg/mL. Les résultats ont été comparés au contrôle négatif (cellules non traitées) en utilisant le test *t* de Student pour échantillons non appariés. Ils ont été exprimés en pourcentage de cellules vivantes ± SEM (erreur standard sur la moyenne) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,005$  par rapport au contrôle négatif). Le docétaxel (Taxotère) a été utilisé comme contrôle positif. Il a présenté une  $CC_{50}$  (concentration pour laquelle on observe 50 % de viabilité cellulaire) inférieure à 100 µg/mL (Figure 13).

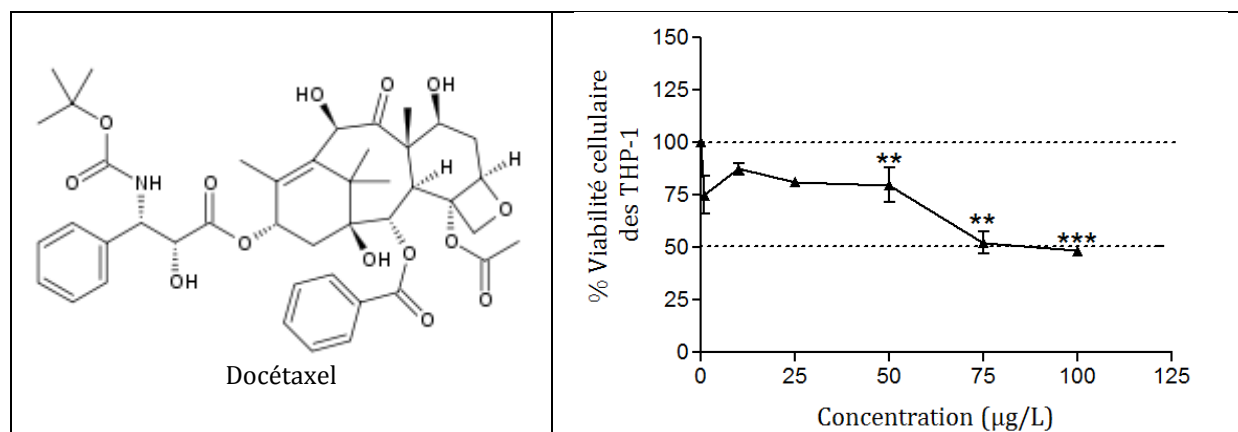


Figure 13 : Activité cytotoxique du Taxotère (contrôle positif) sur les cellules THP-1

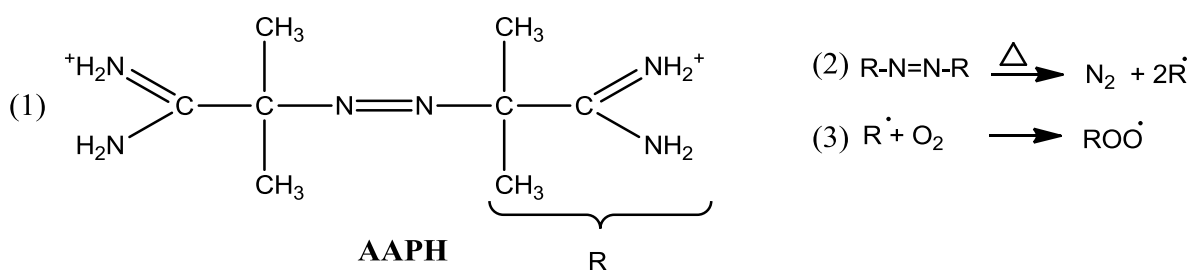
## 1.2.2 Tests antioxydants

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diverse des antioxydants, plusieurs tests ont été nécessaires pour évaluer le potentiel antioxydant des extraits. Cinq tests d'activités antioxydantes ont été réalisés : un test réalisé *in cellulo* sur des érythrocytes humains (test d'hémolyse) et quatre tests chimiques (ORAC / FRAP/ TEAC / DPPH). Une évaluation de la teneur en composés phénoliques a également été réalisée (FOLIN). Les tests chimiques (TEAC/FRAP/ORAC/DPPH/FOLIN) ont été réalisés par A. Septembre-Malaterre dans le cadre d'un stage de Master 2 sous la direction du Dr B. Payet (Janvier-Juin 2011).

### 1.2.2.1 Test d'hémolyse

Le test d'hémolyse ou KRL (Kit Radicaux Libres), réalisé *in cellulo* sur des érythrocytes humains, permet de refléter de façon globale le potentiel de défense d'un individu vis-à-vis d'une agression aux radicaux libres [597]. Il a été utilisé par différents laboratoires pour démontrer l'action antioxydante de polyphénols, de fruits, de substances synthétiques ou naturelles [598].

L'hémolyse est un état physiologique qui survient au terme d'une vie d'un globule rouge (GR). Cette lyse peut être provoquée *in vitro* par des radicaux libres générés de manière constante par décomposition thermique de l'AAPH (hydrochlorure de 2,2'-azobis(2-amidinopropane)).



Au contact de globules rouges, les radicaux peroxydes formés initient une peroxydation lipidique qui conduit à la lyse des érythrocytes, qui peut être suivie par lecture de l'absorbance à 450 nm (Figure 14a).

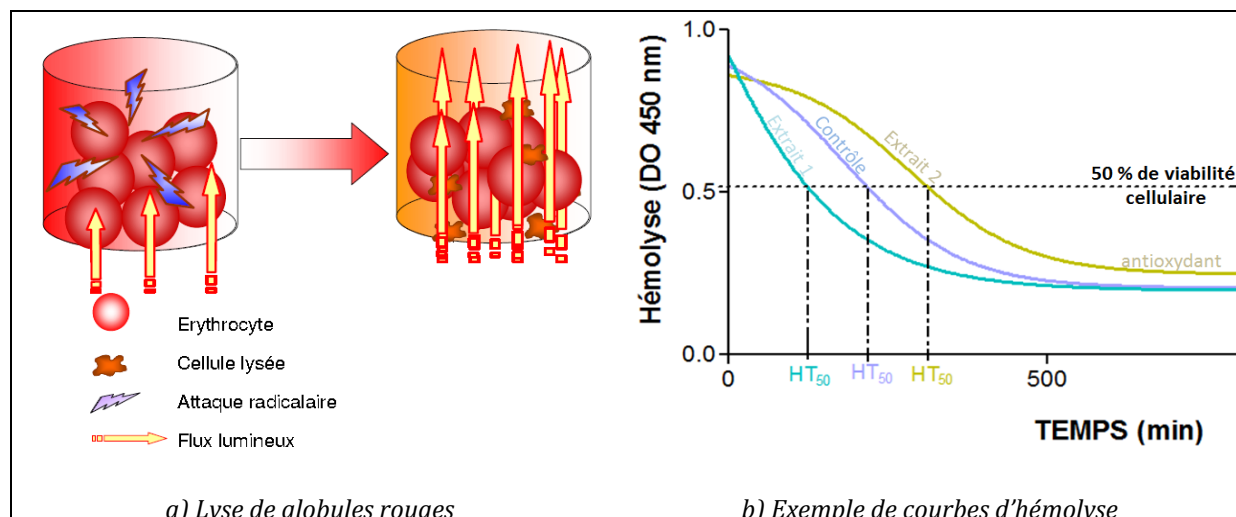


Figure 14 : Suivi de lyse de globules rouges  
(Source : [598])

L'activité antioxydante d'un extrait se mesure par la capacité des hématies à résister à l'attaque radicalaire. Elle s'exprime par le temps nécessaire à la lyse de 50 % des globules rouges ( $HT_{50}$ , temps de demi-hémolyse). Un extrait végétal est considéré antioxydant si, comparé au contrôle négatif (GR non traités), un retard significatif de la lyse membranaire est observé (soit  $HT_{50(\text{extrait})} > HT_{50(\text{contrôle})}$ ) (Figure 14b).

Six concentrations ont été testées pour chaque extrait (de 425  $\mu\text{g/mL}$  à 425  $\text{ng/mL}$ ). Après ajout d'AAPH, l'absorbance a été mesurée toutes les 10 minutes pendant 830 minutes. Les courbes d'hémolyse obtenues ont permis de calculer les  $HT_{50}$  et d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits. Les résultats ont été exprimés en moyenne  $HT_{50} \pm \text{SEM}$  (erreur standard sur la moyenne) de trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. Ils ont été comparés au contrôle négatif en utilisant le test  $t$  de Student pour échantillons non appariés (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,005$ ). L'acide gallique a été utilisé comme contrôle positif à la concentration de 42,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 15).

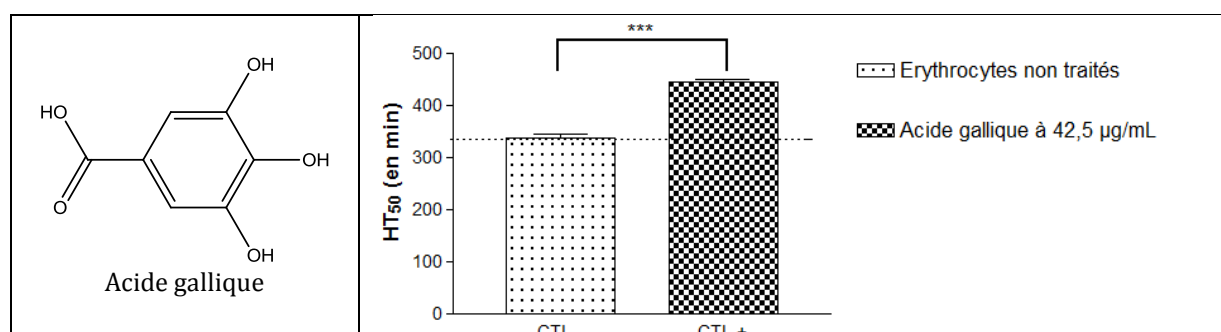


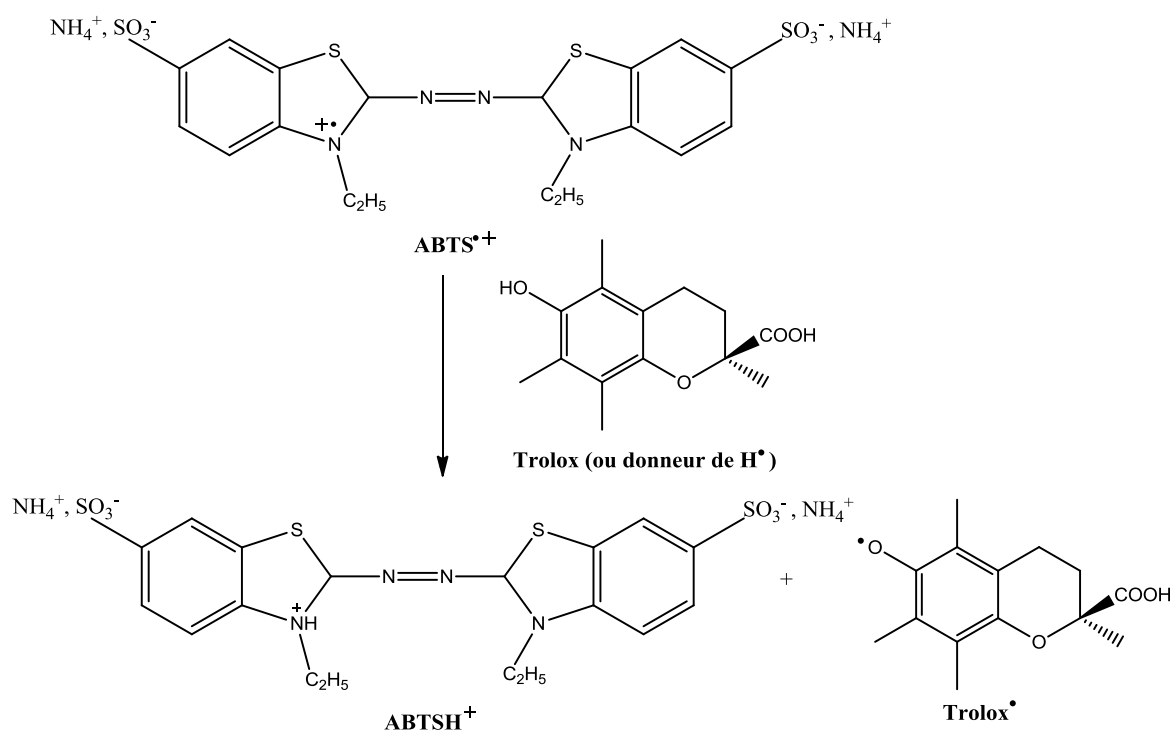
Figure 15 : Temps de demi-hémolyse obtenu pour l'acide gallique à 42,5  $\mu\text{g/mL}$  (contrôle positif)



A cette concentration, la lyse des GR est significativement retardée de 107 minutes (\*\*\*)  $p < 0,005$ ). Une utilisation de l'acide gallique comme contrôle positif pour le test d'hémolyse est mentionnée dans la littérature aux concentrations de 25  $\mu\text{g/mL}$  et 50  $\mu\text{g/mL}$  [599].

### 1.2.2.2 Test de réduction du radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ : test TEAC

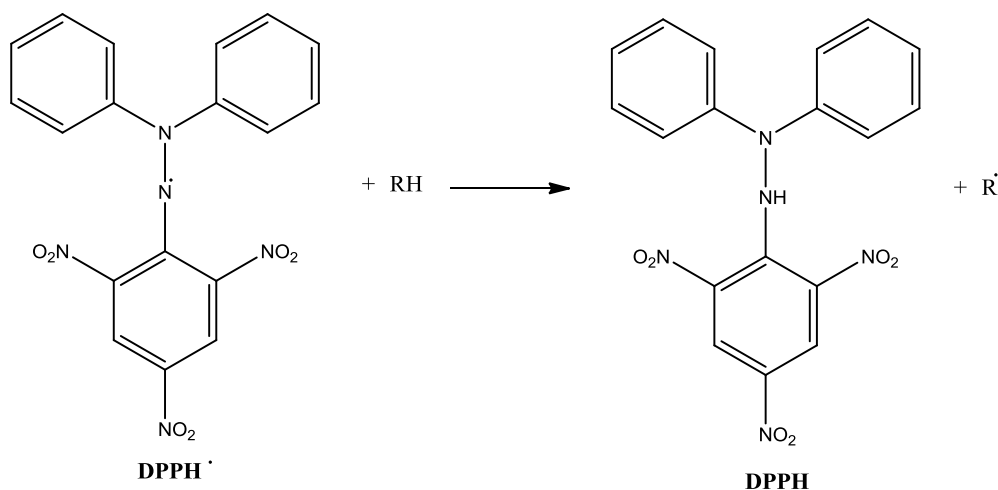
Dans la méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), l'activité antioxydante d'un extrait est déduite de sa capacité à inhiber un radical précis : le radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Cette capacité est comparée au Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) [600, 601]. Initialement, la formation du radical cation  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  résulte d'un arrachement d'un électron de l'un des atomes d'azote de la molécule ABTS par un oxydant (persulfate de potassium). En présence de Trolox ou d'antioxydants donneurs de  $\text{H}^{\bullet}$ , ce radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  de coloration bleu-vert est réduit en ion  $\text{ABTSH}^+$  incolore [602]. Le suivi de cette décoloration à 734 nm permet d'évaluer le potentiel anti-radicalaire de l'extrait.



Pour chaque extrait, une concentration a été testée (entre 1 et 10 mg/mL). L'absorbance obtenue a été exprimée en pourcentage d'inhibition ( $\% \text{ inhibition} = 100 - 100 (\text{DO}_{\text{extrait}} / \text{DO}_{\text{contrôle négatif}})$ ), puis en équivalent Trolox ( $\mu\text{M}$  pour 1 mg/mL d'extrait). La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox, correspond à la concentration ( $\mu\text{M}$ ) de Trolox ayant la même activité que 1 mg/mL de substance testée et nécessite la réalisation en amont d'une courbe d'étalonnage en Trolox.

### 1.2.2.3 Test de réduction du radical stable DPPH $\cdot$ : test DPPH

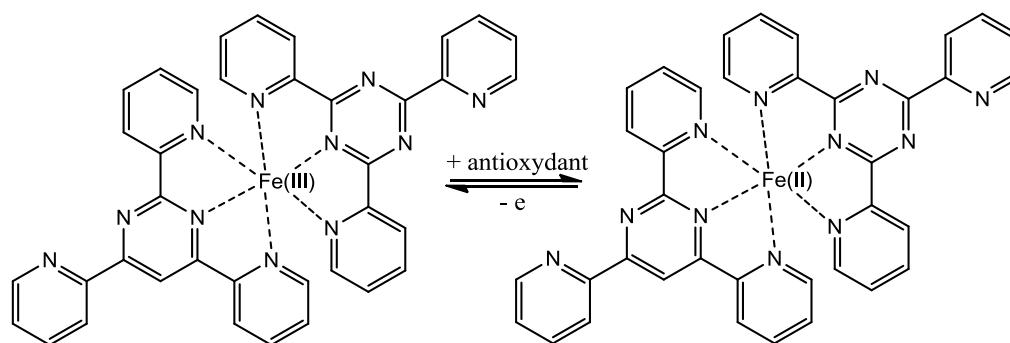
Au cours de ce test, l'évaluation de l'activité antioxydante est fondée sur la capacité d'un antioxydant à donner un électron singulet au radical synthétique DPPH $\cdot$  (radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle), de coloration violette, pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-vert [603].



Pour chaque extrait, une concentration a été testée (entre 1 et 10 mg/mL). L'absorbance à 517 nm a été exprimée en pourcentage d'inhibition, puis en équivalent Trolox ( $\mu\text{M}$  par mg/mL d'extrait).

### 1.2.2.4 Test de réduction d'un complexe ferrique : test FRAP

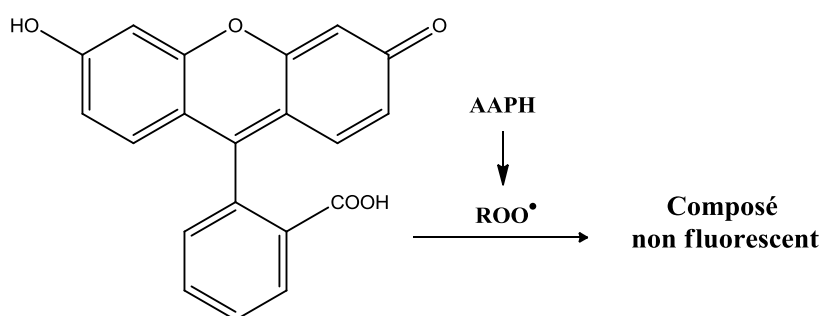
Le test FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power) mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le complexe tripyridyltriazine ferrique  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}]^{3+}$  en sel ferreux  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}]^{2+}$ .



En d'autres termes, il permet de définir la capacité d'un antioxydant à inhiber l'initiation des réactions radicalaires par les ions métalliques. Pour chaque extrait, une concentration a été testée (entre 1 et 10 mg/mL) et l'absorbance lue à 593 nm. Les résultats ont été exprimés en équivalent Trolox ( $\mu\text{M}$  par mg/mL d'extrait) [604-606].

#### 1.2.2.5 Test de capture des radicaux peroxydes : test ORAC

Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) évalue la capacité d'un antioxydant à réduire la vitesse d'oxydation de la fluorescéine par des radicaux peroxydes  $\text{ROO}^\bullet$  générés par l'AAPH [607, 608]. La mesure de la fluorescence a été réalisée à la longueur d'onde d'excitation de 485 nm et à la longueur d'onde d'émission de 530 nm.



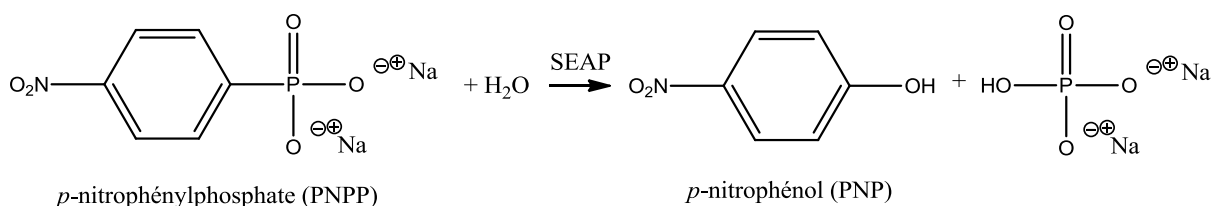
Trois oxydations ont été suivies simultanément : l'oxydation normale (correspondant au contrôle négatif), l'oxydation en présence de Trolox et l'oxydation en présence d'extrait. La capacité antioxydante de l'extrait a été donnée par l'aire sous la courbe ( $\text{AUC}_{\text{extrait}}$ ). Les résultats ont été exprimés en équivalent Trolox ( $\mu\text{M}$  par mg/mL d'extrait).

### 1.2.2.6 Teneur en composés phénoliques : test FOLIN

Le test FOLIN (Folin-Ciocalteu) permet de mesurer la teneur en composés phénoliques d'un extrait [601, 609]. En milieu basique, le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ )) initialement jaune, oxyde les groupements oxydables des composés polyphénoliques présents dans l'extrait végétal et est réduit en un mélange d'oxydes métalliques bleus ( $W_8O_{23}$  et  $Mo_8O_{23}$ ). Cette coloration est mesurée par lecture de l'absorbance à 765 nm. Elle est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé. La courbe d'étalonnage a été réalisée avec l'acide gallique. Les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique (mg/mL pour 1 mg/mL d'extrait).

### 1.2.3 Test anti-inflammatoire

Le test anti-inflammatoire a été réalisé sur cellules de souris (cellules RAW-Blue™) dérivées de macrophages RAW 264,7 transfectées de façon stable, pour lesquelles le gène codant pour la phosphatase alcaline est placé sous la dépendance de NF- $\kappa$ B. Le test consiste à provoquer une inflammation dans ces cellules en les stimulant par du lipopolysaccharide (LPS, composant de la paroi bactérienne des bactéries Gram-). Le LPS stimule l'activité transcriptionnelle des gènes qui dépendent de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor- $\kappa$ B). Cette stimulation a pour conséquence une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) induisant une réponse inflammatoire et la sécrétion de SEAP (SEcreted Alkaline Phosphatase). Le *p*-nitrophénylphosphate (PNPP), ajouté au surnageant, permet de doser par un test colorimétrique la quantité de SEAP produite. En présence de SEAP, ce PNPP se transforme en *p*-nitrophénol (PNP) de couleur jaune ; la coloration du milieu est évaluée à 460 nm.



Les extraits de plantes ont été mis en contact pendant 24 h avec les cellules RAW-Blue™ stimulées par du LPS (1 µg/mL). Ils ont été testés à 10 µg/mL, concentration pour laquelle aucune cytotoxicité n'a été observée sur la lignée cellulaire RAW-Blue™. Les résultats ont été comparés au contrôle négatif (cellules RAW-Blue™ + LPS) et exprimés en pourcentage par rapport au contrôle ± SEM (erreur standard sur la moyenne) de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat (\* p<0,05 , \*\* p<0,01 et \*\*\* p<0,005) en utilisant le test *t* de Student pour échantillons non appariés. Le contrôle positif utilisé est l'adiponectine, une adipocytokine ayant déjà présenté des capacités anti-inflammatoires pour ce test [610]. La Figure 16 présente les résultats obtenus pour l'adiponectine dans le cadre de ces travaux.

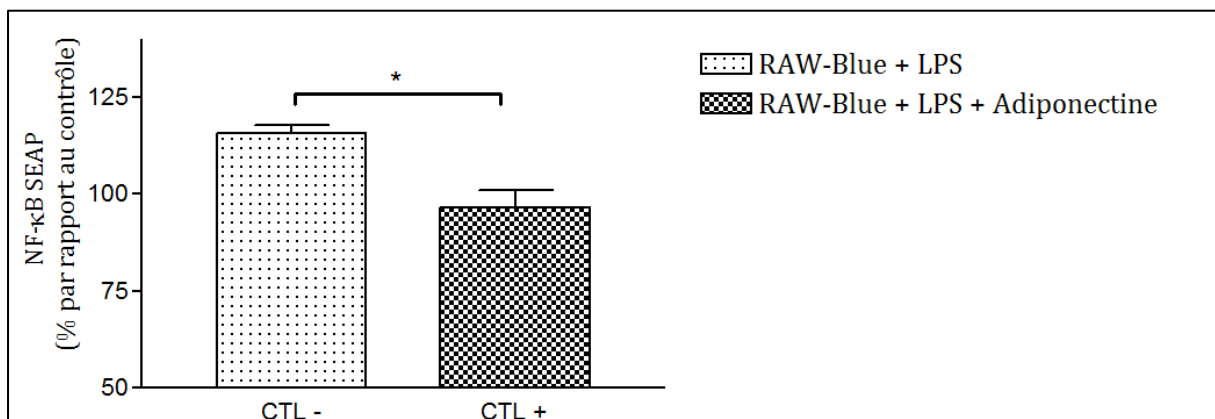


Figure 16 : Activité anti-inflammatoire de l'adiponectine (contrôle positif)

Comparé au contrôle négatif, une réduction significative (\* p<0,05) de la production de SEAP a été obtenue en présence d'adiponectine (contrôle positif).

## Chapitre II-2 Résultats et discussion

### 2.1 Criblage d'activité cytotoxique sur cellules THP-1

#### 2.1.1 Résultats du test d'activité cytotoxique

Trois types de courbes ont été obtenus lors de l'évaluation de l'activité cytotoxique des trente-huit extraits sur les cellules THP-1 (Figure 17).

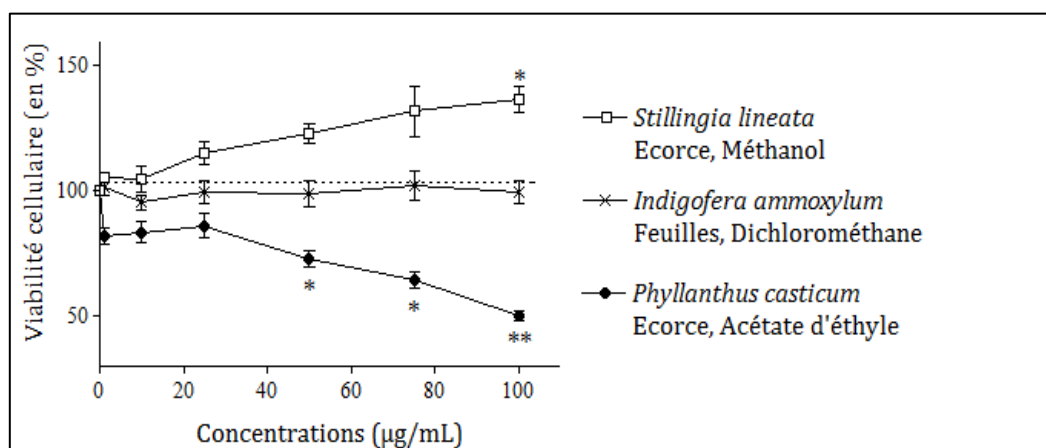


Figure 17 : Courbes de cytotoxicité obtenues pour trois extraits de plantes testés sur des cellules THP-1

Pour l'extrait AcOEt de l'écorce de *Phyllanthus casticum*, une diminution de la viabilité cellulaire des THP-1 a été obtenue de manière dose-dépendante avec une réduction significative aux concentrations de 50, 75 et 100 µg/mL (\*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,01$ ). L'extrait DCM des feuilles de *Indigofera amoxylum* n'a présenté aucune cytotoxicité, tandis que pour l'extrait méthanolique de l'écorce de *Stillingia lineata*, une viabilité cellulaire supérieure à 100 % a été observée de manière significative à 100 µg/mL (\*  $p < 0,05$ ). Ce dernier résultat peut s'expliquer par les réactions mises en jeu dans le test au MTT. En effet, ce test rend compte de l'activité mitochondriale des cellules : une absorbance supérieure au contrôle, perçue comme un pourcentage de cellules vivantes supérieur à 100 %, peut correspondre à une stimulation de l'activité enzymatique des cellules et en particulier, celle de la succinate déshydrogénase principalement impliquée dans ce test [596].

Le Tableau IV reporte les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus pour les trente-huit extraits pour les deux concentrations de 10 µg/mL et de 100 µg/mL.

**Tableau IV**  
**Résultats de l'activité cytotoxique des extraits végétaux sur cellules THP-1**

| Familles        | Espèces   | Parties  | Solvants | % viabilité THP-1 (± SEM) |                   |
|-----------------|---|----------|----------|---------------------------|-------------------|
|                 |   |          |          | 10 µg/mL                  | 100 µg/mL         |
| Annonaceae      | <i>Xylopi richardii</i> Boivin ex Baill.  | Ecorce   | AcOEt    | 102 ± 14                  | 98 ± 10           |
| Apocynaceae     | <i>Carissa spinarum</i> L.  | Ecorce   | AcOEt    | <b>53 ± 8 **</b>          | <b>30 ± 3 ***</b> |
|                 |   | Feuilles | AcOEt    | 67 ± 11                   | <b>40 ± 8 **</b>  |
| Araliaceae      | <i>Polyscias repanda</i> (DC.) Baker  | Feuilles | AcOEt    | 102 ± 1                   | <b>88 ± 2 *</b>   |
| Asteraceae      | <i>Vernonia fimbrillifera</i> (Cass.) Less.   | Feuilles | AcOEt    | 70 ± 5                    | <b>57 ± 5 *</b>   |
|                 |   |          | DCM      | <b>69 ± 2*</b>            | <b>53 ± 3**</b>   |
|                 |   |          | MeOH     | 106 ± 2                   | 117 ± 2           |
| Celastraceae    | <i>Cassine orientalis</i> (Cav.) Harms  | Feuilles | AcOEt    | <b>77 ± 1 ***</b>         | <b>60 ± 3 ***</b> |
| Dryopteridaceae | <i>Dryopteris wallichiana</i> (Spreng.) Hyl.<br>ssp. <i>madagascariensis</i> (C. Chr.) J.P. Roux.                   | Rachis   | MeOH     | 102 ± 4                   | 106 ± 3           |
|                 |   | Pennes   | MeOH     | 101 ± 0                   | 105 ± 0           |
| Ericaceae       | <i>Agarista buxifolia</i> G. Don  | Ecorce   | AcOEt    | 79 ± 6                    | 78 ± 7            |
|                 |   |          | DCM      | 95 ± 5                    | 70 ± 8            |
|                 |   |          | MeOH     | 106 ± 5                   | <b>132 ± 9 *</b>  |
|                 |   | Feuilles | AcOEt    | 101 ± 5                   | 72 ± 7            |
|                 |   |          | DCM      | 92 ± 15                   | <b>54 ± 6 *</b>   |
|                 |   |          | MeOH     | 98 ± 9                    | <b>136 ± 4 *</b>  |
| Euphorbiaceae   | <i>Acalypha integrifolia</i> Willd.<br><i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll. Arg. ssp. <i>lineata</i>              | Feuilles | AcOEt    | 94 ± 4                    | 85 ± 6            |
|                 |   |          | AcOEt    | 89 ± 5                    | <b>58 ± 3 *</b>   |
|                 |   | Ecorce   | DCM      | 101 ± 1                   | <b>68 ± 0,1 *</b> |
|                 |   |          | MeOH     | 104 ± 5                   | <b>136 ± 5 *</b>  |
|                 |   |          | AcOEt    | 96 ± 1                    | 100 ± 5           |
|                 |   |          | DCM      | 99 ± 1                    | 112 ± 2           |
| Fabaceae        | <i>Indigofera amoxylum</i> (DC.) Polhill  | Ecorce   | AcOEt    | 94 ± 8                    | 96 ± 6            |
|                 |   |          | DCM      | 100 ± 3                   | 92 ± 8            |
|                 |   |          | MeOH     | 100 ± 3                   | 118 ± 8           |
|                 |   | Feuilles | AcOEt    | 101 ± 4                   | 108 ± 6           |
|                 |   |          | DCM      | 95 ± 2                    | 99 ± 4            |
|                 |   |          | MeOH     | 107 ± 6                   | 112 ± 4           |
| Lamiaceae       | <i>Clerodendrum heterophyllum</i> (Poir.) R.Br.   | Feuilles | AcOEt    | 107 ± 2                   | <b>83 ± 3 *</b>   |
| Meliaceae       | <i>Turraea casimiriana</i> Harms  | Ecorce   | AcOEt    | 101 ± 9                   | 98 ± 8            |
|                 |   | Feuilles | AcOEt    | 107 ± 10                  | <b>54 ± 5 *</b>   |
| Myrtaceae       | <i>Eugenia buxifolia</i> Lam.<br><i>Syzygium borbonicum</i> J.Gueho et AJ.Scott.                                    | Ecorce   | AcOEt    | 98 ± 8                    | <b>77 ± 1 ***</b> |
|                 |   | Feuilles | AcOEt    | 100 ± 0                   | 118 ± 6           |
| Phyllanthaceae  | <i>Phyllanthus casticum</i> Soy.-Will.  | Ecorce   | AcOEt    | 83 ± 4                    | <b>50 ± 2 **</b>  |
| Rubiaceae       | <i>Coptosperma borbonica</i> De Block<br><i>Myonima obovata</i> Lam.<br><i>Pyrostria orbicularis</i> A.Rich. ex DC. | Feuille  | AcOEt    | 120 ± 11                  | 113 ± 15          |
|                 |   | Ecorce   | AcOEt    | 91 ± 4                    | <b>40 ± 3 **</b>  |
|                 |   | Feuille  | AcOEt    | 115 ± 7                   | 104 ± 12          |
| CONTRÔLE +      | Taxotère  | -        | -        | 87 ± 2                    | <b>48 ± 1***</b>  |

**Légende :** \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,005$  ; AcOEt, Acétate d'éthyle ; MeOH, Méthanol ; DCM, Dichlorométhane

Les valeurs ont été comparées au contrôle négatif (cellules non traitées) et exprimées en pourcentage de cellules vivantes  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,005$ ).

Tout d'abord, il est à noter que 53 % des extraits (19 extraits, 12 plantes) n'ont présenté aucun résultat significatif, soit aucun effet néfaste sur la viabilité cellulaire des THP-1 même à la plus forte concentration testée (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Ces extraits non cytotoxiques pour cette lignée cellulaire sont les extraits acétate d'éthyle de *Pyrostria orbicularis* (feuilles), *Coptosperma borbonica* (feuilles), *Syzygium borbonicum* (feuilles), *Acalypha integrifolia* (feuilles), *Agarista buxifolia* (feuilles et écorce), *Xylopia richardii* (écorce), *Turraea casimiriana* (écorce), tous les extraits (AcOEt, DCM et MeOH) de *Stillingia lineata* (feuilles) et de *Indigofera amoxylum* (feuilles et écorce) ainsi que l'extrait DCM de *Agarista buxifolia* (feuilles) et l'extrait méthanolique de *Vernonia fimbrillifera* (feuilles).

De plus, une viabilité cellulaire supérieure à 100 % a été observée de manière significative à 100  $\mu\text{g/mL}$  pour trois extraits végétaux méthanoliques : ceux des espèces *Agarista buxifolia* (feuilles et écorce) et *Stillingia lineata* (écorce).

Enfin, une diminution de la viabilité cellulaire des THP-1 a été obtenue de manière dose-dépendante pour 39 % des extraits (14 extraits, 11 plantes). Les espèces présentant ces extraits cytotoxiques aux fortes concentrations sont, par ordre décroissant de cytotoxicité : *Carissa spinarum* (feuilles et écorce, AcOEt) > *Myonima obovata* (écorce, AcOEt) > *Phyllanthus casticum* (écorce, AcOEt) > *Vernonia fimbrillifera* (feuilles, DCM) > *Turraea casimiriana* (feuilles, AcOEt) > *Agarista buxifolia* (feuilles, DCM) > *Vernonia fimbrillifera* (feuilles, AcOEt) > *Stillingia lineata* (écorce, AcOEt) > *Cassine orientalis* (feuilles, AcOEt) > *Stillingia lineata* (écorce, DCM) > *Eugenia buxifolia* (écorce, AcOEt) > *Clerodendrum heterophyllum* (feuilles, AcOEt) > *Polyscias repanda* (feuilles, AcOEt).

En considérant les quatorze extraits cytotoxiques, les  $CC_{50}$  obtenues ont été principalement de l'ordre de 100  $\mu\text{g/mL}$ , sauf pour l'extrait AcOEt de l'écorce de *Carissa spinarum* pour lequel la  $CC_{50}$  a été obtenue à 10  $\mu\text{g/mL}$ . La Figure 18 compare les pourcentages de viabilité cellulaire obtenus à 100  $\mu\text{g/mL}$  pour ces extraits cytotoxiques au contrôle négatif et au contrôle positif.



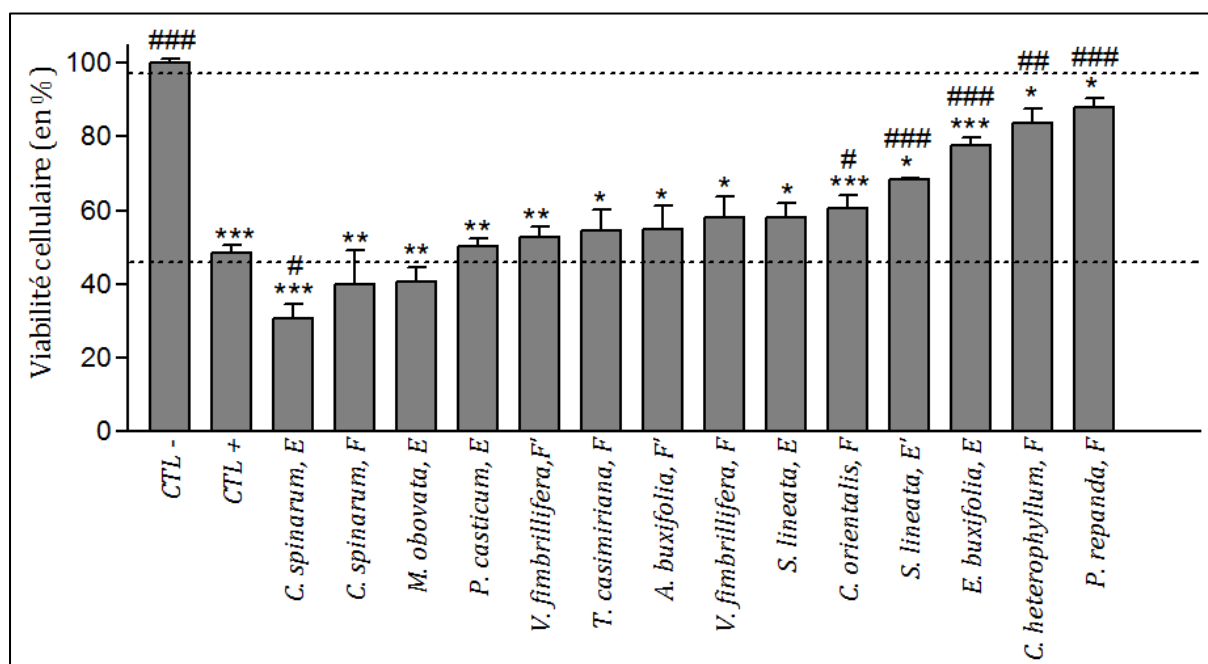


Figure 18 : Comparaison de l'activité cytotoxique de quatorze extraits végétaux par rapport au contrôle négatif et au contrôle positif (Taxotère) à 100 µg/mL

**Légende :** CTL, contrôle ; E, écorce AcOEt ; F, feuilles AcOEt ; E', écorce DCM ; F', feuilles DCM

\* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,005 par rapport au CTL -

# p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,005 par rapport au CTL +

Le test *t* de Student, réalisé sur les extraits cytotoxiques et le contrôle positif (Taxotère) à la concentration de 100 µg/mL, indique que seul l'extrait acétate d'éthyle de l'écorce de *Carissa spinarum* présente une cytotoxicité significativement plus importante que le contrôle positif. Huit extraits ont une activité cytotoxique proche du taxotère et cinq extraits ont une cytotoxicité significativement plus faible.

### 2.1.2 Discussion

L'activité cytotoxique de ces plantes peut être associée à la présence de métabolites secondaires présents dans la plante.

- Il est intéressant de noter que, parmi les onze plantes ayant présenté *in vitro* un potentiel cytotoxique contre les cellules humaines étudiées, quatre d'entre elles sont connues à La Réunion pour être toxiques.

↻ *Stillingia lineata*

*Stillingia lineata* est appelée « tanguin pays » à La Réunion. Elle fait partie des « bois de lait », c'est à dire des plantes à latex toxique [611]. Le test de cytotoxicité réalisé sur les cellules THP-1 dans nos travaux révèle un potentiel cytotoxique uniquement pour les extraits apolaires de son écorce (AcOEt et DCM) (Figure 19a).

Peu d'études de la composition chimique ont été menées sur les espèces du genre *Stillingia*. La toxicité de leur latex peut néanmoins être associée à la présence d'esters diterpéniques de structure complexe, de type tigliane ou daphnane. Ces esters de phorbol irritants (gnidilatidine et autres dérivés diterpéniques) ont été isolés de *S. sylvatica* par fractionnement bioguidé réalisé au moyen d'un test irritant sur souris [350]. Par ailleurs, différentes études ont été menées sur le potentiel cytotoxique des *Stillingia*. La cytotoxicité de l'extrait DCM des feuilles de *S. lineata* (un individu mauricien) a été mise en évidence sur des cellules Co115 (cancer du côlon) avec une valeur de  $CC_{50}$  de 0,55  $\mu\text{g/mL}$  [351]. Le potentiel cytotoxique de l'écorce de la plante n'a pas été évalué dans cette étude. Les extraits des feuilles et des tiges de *S. oppositifolia* ont présenté une activité cytotoxique dose-dépendante sur trois lignées leucémiques : UACC-62 (cancer mélanocytaire), MCF-7 (cancer du sein), TK-10 (cancer du rein) ( $CC_{50}$  de 50 à 100  $\mu\text{g/mL}$ ). La partition hexanique de l'extrait d'écorce a présenté la plus forte activité cytotoxique, avec pour ses principaux constituants (des triterpènes et l'acide palmitique) des  $CI_{50}$  supérieures à 88  $\mu\text{g/mL}$  [352]. Des travaux réalisés sur des diterpènes macrocycliques isolés de *S. sanguinolenta* ont révélé une forte activité et sélectivité contre les cellules cancéreuses du sein et du rein. Ces résultats n'ont cependant pas été publiés [612].

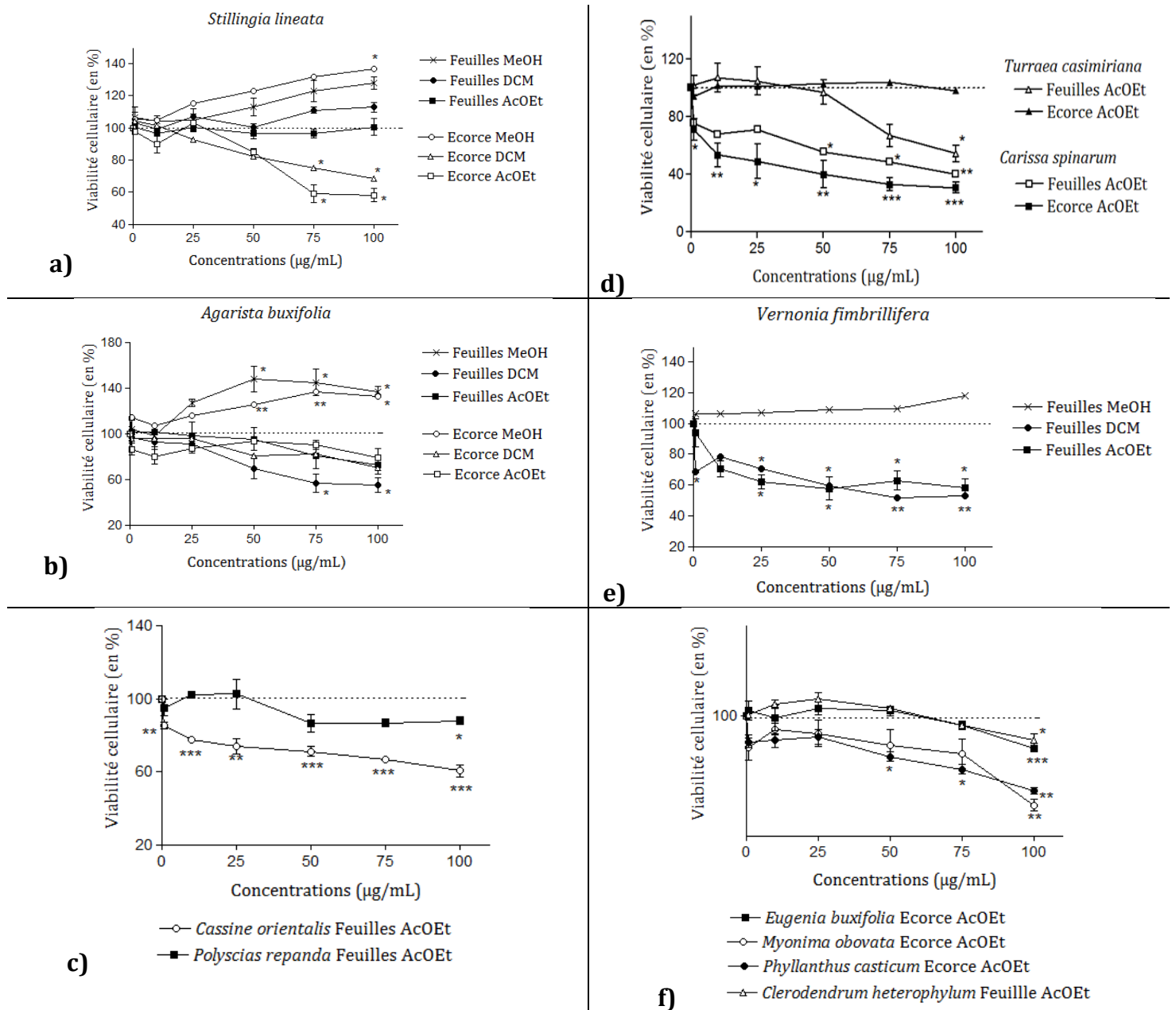


Figure 19 : Courbes de cytotoxicité sur THP-1 obtenues pour onze plantes réunionnaises

∞ *Agarista buxifolia*

Les feuilles de cette espèce pionnière de l'île de La Réunion, communément appelée « petit bois de rempart », sont connues pour être toxiques pour les animaux [611]. Vis-à-vis de la lignée cellulaire des THP-1, une activité cytotoxique significative a été obtenue pour l'extrait dichlorométhane des feuilles ( $CC_{50} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ ) (Figure 19b). Aucun résultat significatif n'a été obtenu pour les autres extraits de la plante à l'exception des extraits polaires des feuilles et d'écorce où des viabilités cellulaires supérieures à 100 % ont été obtenues.

A ce jour, aucune publication relative à la composition et/ou aux activités de cette espèce n'est mentionnée. La toxicité de la plante pourrait cependant être associée à la présence de composés diterpéniques appelés grayanotoxines, caractéristiques de la famille des Ericaceae et déjà isolés des feuilles de *A. pollyphyla* [315]. A La Réunion, une intoxication a été mentionnée, due à une ingestion accidentelle d'une tisane de feuilles de *A. salicifolia* [311, 613]. Il est à noter que les feuilles de *A. buxifolia* sont jugées plus toxiques que celle de *A. salicifolia* [611].

∞ *Cassine orientalis*

Ce « bois rouge », anciennement dénommé *Elaeodendron orientalis*, possède des feuilles émétiques\*, auxquelles ont été associés des intoxications et des accidents mortels [611]. Dans nos travaux, l'extrait AcOEt des feuilles de *C. orientalis* a présenté un potentiel cytotoxique significatif dès  $1 \mu\text{g/mL}$  (\*  $p < 0,05$ ) et une  $CC_{50}$  approchant  $100 \mu\text{g/mL}$  (Figure 19c).

Plusieurs molécules isolées des genres *Cassine* et *Elaeodendron* de type cardénolides glucosidiques et triterpènes quinoïdes ont montré un fort potentiel cytotoxique contre des cellules humaines ( $CC_{50}$  très faibles de l'ordre du nM) [250-252].

∞ *Polyscias repanda*

A La Réunion, l'espèce *Polyscias repanda* fait partie des plantes toxiques en raison de la présence de saponines [23]. Dans nos travaux, l'extrait AcOEt des feuilles de *Polyscias repanda* a révélé une cytotoxicité sur les THP-1 significative à  $100 \mu\text{g/mL}$  (\* $p < 0,05$ ) (Figure 19c).

La présence de saponosides est mentionnée pour plusieurs espèces du genre *Polyscias* : *P. fulva* [191], *P. dichroostachya* [189], *P. scutellaria* [614] et *P. fruticosa* [190]. De nombreux travaux font état de l'activité cytotoxique de saponosides sur des lignées cellulaires humaines [615]. En particulier, l' $\alpha$ -hédérine, un saponoside triterpénique isolé de *P. fulva*, a été testé sur 57 lignées cellulaires ( $CI_{50}$  moyen en  $\log_{10}$  = -4,862 M) [616]. L'activité cytotoxique de *P. repanda* pourrait cependant être due à d'autres composés, comme précisé par Marczewska *et al.*, après avoir testé les activités cytotoxiques de pousses de *P. filicifolia* sur des cellules L929 (test réalisé sur l'extrait brut puis sur la fraction enrichie en saponines) [617]. D'autres études révèlent la présence de quelques alcaloïdes pour certaines espèces du genre *Polyscias* [618, 619].

- Il est à noter que dans nos travaux, une activité cytotoxique a également été décelée pour d'autres espèces non répertoriées comme plantes toxiques à La Réunion.

#### ∞ *Carissa spinarum*

Dans nos travaux, l'extrait AcOEt de feuilles de *C. spinarum*, mais surtout celui d'écorce, présentent des activités cytotoxiques marquées sur la lignée cellulaire des THP-1 : les  $CC_{50}$  sont atteintes pour des concentrations inférieures à 100  $\mu\text{g/mL}$ . L'extrait d'écorce est d'ailleurs significativement plus cytotoxique que le Taxotère (Figure 19d).

Les racines de certaines espèces du genre *Carissa* sont connues pour être des poisons et contenir des cardénolides [169, 183, 620, 621]. Par ailleurs, la littérature indique que l'extrait aqueux des tiges de *C. spinarum* (origine Inde) et une fraction butanolique sont cytotoxiques pour les cellules leucémiques HL-60 [622] ; le carandinol, isohopane triterpénique isolé des feuilles de *C. carandas*, est cytotoxique vis-à-vis de différentes lignées cancéreuses (PC-3, 3T3 et surtout HeLa) [173] et l'extrait MeOH de *C. carandas* est cytotoxique pour les cellules Vero [174].

#### ∞ *Clerodendrum heterophyllum*

Pour cette espèce, l'extrait AcOEt des feuilles est cytotoxique sur les THP-1 à 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 19f).

Dans la littérature, la cytotoxicité d'autres espèces de *Clerodendrum* a été mise en évidence (*C. myricoides* [464], *C. inerme* [465]) et différents composés cytotoxiques ont été isolés : l'uncinatone et des glycosides de *C. bungei* [623, 624], des dérivés de phéophorbides de *C. calamitosum* et *C. cyrtophyllum* [625], ainsi que des diterpènes de *C. kaichianum* [626].

↻ *Eugenia buxifolia*

L'extrait AcOEt d'écorce de cette espèce a révélé une activité cytotoxique sur les THP-1 significative à 100 µg/mL (Figure 19f).

De nombreuses études ont été réalisées sur le genre *Eugenia* particulièrement sur *E. jambolana*<sup>3</sup> qui possède des propriétés anti-hyperglycémiantes et anti-diabétiques [497, 499, 505]. Des activités cytotoxiques ont été mentionnées pour les extraits de *E. uniflora* [627]. Deux tanins hydrolysables, cytotoxiques envers les cellules leucémiques humaines HL-60 (CI<sub>50</sub> de 10,8 et 12,5 µM), ont été isolés de *Eugenia jambos*<sup>4</sup>. Les auteurs ont montré que la cytotoxicité de ces composés était probablement due à l'induction de l'apoptose dans les cellules HL-60 [628].

↻ *Myonimia obovata*

Pour *Myonimia obovata*, un pourcentage de 40 % de viabilité cellulaire des THP-1 a été obtenu à la concentration de 100 µg/mL de l'extrait AcOEt d'écorce (Figure 19f).

Aucune hypothèse ne peut être faite concernant les molécules responsables de cette activité cytotoxique car aucune donnée n'est disponible sur la composition chimique de cette plante.

↻ *Phyllanthus casticum*

Des résultats significatifs ont été obtenus pour l'extrait AcOEt d'écorce de *Phyllanthus casticum* dès 50 µg/mL ; la CC<sub>50</sub> a été atteinte à 100 µg/mL pour cette lignée cellulaire (Figure 19f).

---

<sup>3</sup> Synonyme de *Syzygium jambolanum*, de *Eugenia cumini* et de *Syzygium cumini* (taxon officiel, plus communément appelé le jamblon)

<sup>4</sup> Synonyme de *Syzygium jambos* (taxon officiel, plus communément appelé le jamrosat)

Selon les données de la littérature, la cytotoxicité des plantes de ce genre est le plus souvent due aux extraits et composés apolaires. Lors de la mise en évidence de la cytotoxicité des extraits MeOH et DCM de *P. piscatorum*, après 72 h, vis-à-vis de plusieurs lignées cellulaires (cellules leucémiques Jurkat T, cellules HeLa et cellules PBMC), l'extrait DCM a montré la plus forte activité [629]. Des composés cytotoxiques ont été isolés des extraits DCM de *P. pucher*. L'oléate du stigmast-5-én-3-ol, le sitostérol-3-O-β-D-glucopyranoside, l'acide 3α-acétoxy-25-hydroxyoléan-12-én-28-oïque et le glochidonol ont été sélectifs contre les cellules MCF-7 (cancer du sein) ; de même, une nouvelle lactone diterpénique appelée phyllanthal A, s'est montrée sélective contre les cellules DU-145 (cancer de la prostate) [630]. Des lignanes de type arylnaphthalène ont été isolés de *P. oligospermus* ; la phyllanthusmine A s'est révélée cytotoxique contre les lignées cellulaires KB et P-388 avec des CI<sub>50</sub> de 2,24 and 0,13 µg/mL respectivement [631].

#### ∞ *Turraea casimiriana*

Les résultats du test d'activité cytotoxique sur les THP-1 réalisé sur les extraits AcOEt des feuilles et de l'écorce de *Turraea casimiriana* sont différents. L'extrait foliaire est significativement cytotoxique à 100 µg/mL tandis qu'aucune différence significative n'est décelée pour l'extrait d'écorce (Figure 19d).

Les travaux phytochimiques réalisés sur les espèces du genre *Turraea* mettent en évidence la présence de limonoïdes [478, 481-486], dont l'activité cytotoxique a été déjà mise en évidence : diverses lignées cellulaires humaines cancéreuses ont été utilisées telles que P388 (lignée leucémique), KB (carcinome oral humain) et MCF-7 (cancer du sein) [632-637].

#### ∞ *Vernonia fimbriifera*

Dans nos travaux, l'activité cytotoxique sur les THP-1 des extraits de feuilles de cette espèce est comparable à celle du Taxotère. Des résultats significatifs ont été obtenus dès 25 µg/mL pour les extraits apolaires (extraits DCM et AcOEt) contrairement à son extrait méthanolique qui n'a présenté aucun effet néfaste (Figure 19e).

Certaines espèces du genre *Vernonia* contiennent, entre autres, des lactones sesquiterpéniques. Ces dernières ont montré une cytotoxicité vis-à-vis de la lignée

cellulaire humaine leucémique HL-60 (lactones isolées de *V. bockiana* [222] et dimères d'élémanolides isolés des graines de *V. anthelmintica* [224]), des cellules HeLa (lactones isolées de *V. scorpioides* [223]) et des cellules animales (hirsutinolides isolés des feuilles de *V. staehilinoides* [217]).

## 2.2 Criblage d'activité antioxydante

### 2.2.1 Résultats du test d'hémolyse

Le test d'hémolyse a été réalisé pour une large gamme de concentrations (de 4,25 ng/mL à 425 µg/mL). La Figure 20a présente les courbes d'hémolyse obtenues pour trois concentrations de l'extrait acétate d'éthyle de l'écorce de *Carissa spinarum*.

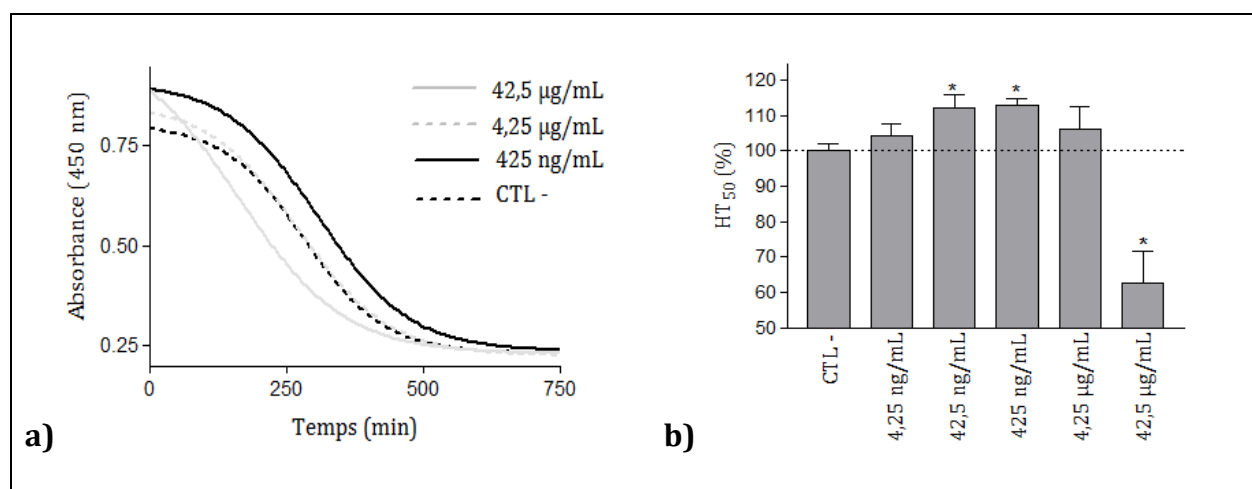


Figure 20 : Courbes d'hémolyse (a) et HT<sub>50</sub> calculés (b) pour l'extrait AcOEt de l'écorce de *Carissa spinarum*

Légende: \*,  $p < 0,05$ ; CTL - contrôle négatif

A la plus forte concentration (42,5 µg/mL), l'extrait a accéléré la lyse des globules rouges comparé au contrôle négatif (CTL-). Pour une concentration intermédiaire (4,25 µg/mL), la courbe d'hémolyse est proche de celle du contrôle. Pour une concentration plus faible (425 ng/mL), l'hémolyse des globules rouges a été retardée.

Les temps de demi-hémolyse obtenus pour cette plante sont indiqués en Figure 20b. Les résultats ont été comparés au contrôle négatif et ont permis d'établir une relation dose-dépendante : l'extrait AcOEt d'écorce de *Carissa spinarum* ne présente



aucune activité antioxydante pour les concentrations inférieures à 4,25 ng/mL (résultat non significatif), il est antioxydant aux concentrations de 42,5 et 425 ng/mL (\*  $p < 0,05$ ) et devient hémolytique de manière significative (\*  $p < 0,05$ ) aux plus fortes concentrations (42,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Les résultats obtenus pour les trente-huit extraits sont indiqués dans le Tableau V. Les termes « anti » et « hémo » ont été utilisés lorsque des résultats significatifs ont été obtenus, « ns » lorsqu'aucune activité notable n'a été détectée, et « ND » quand l'activité n'a pu être déterminée.

Tableau V  
Réponses au test d'activité antioxydante (test d'hémolyse) obtenues pour les trente-huit extraits végétaux étudiés

| Familles        | Espèces  | Parties  | Solvants | HT <sub>50</sub> (%) à |               |              |               |               |              |           |
|-----------------|--|----------|----------|------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-----------|
|                 |  |          |          | 4,25<br>ng/mL          | 42,5<br>ng/mL | 425<br>ng/mL | 4,25<br>µg/mL | 42,5<br>µg/mL | 425<br>µg/mL |           |
| Annonaceae      | <i>Xylopiya richardii</i> Boivin ex Baill.   | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (***)    | ND           |           |
| Apocynaceae     | <i>Carissa spinarum</i> L.   | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | anti (*)      | anti (*)     | ns            | hémo (*)      | ND           |           |
|                 |  | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (**)     | ND           |           |
| Araliaceae      | <i>Polyscias repanda</i> (DC.) Baker   | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | hémo (*)      | ns            | ns           |           |
| Asteraceae      | <i>Vernonia fimbrillifera</i> (Cass.) Less.  | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           |           |
|                 |  |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           |           |
|                 |  |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | anti (*)      | hémo (*)      | hémo (***)   |           |
| Celastraceae    | <i>Cassine orientalis</i> (Cav.) Harms   | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | anti (*)      | ns            | ND           |           |
| Dryopteridaceae | <i>Dryopteris wallichiana</i> (Spreng.) Hyl. ssp. <i>madagascariensis</i> (C. Chr.) J.P. Roux. | Rachis   | MeOH     | ns                     | anti (*)      | hémo (**)    | hémo (*)      | hémo (*)      | hémo (**)    |           |
|                 |  | Pennes   | MeOH     | anti (**)              | ns            | ns           | hémo (**)     | hémo (*)      | hémo (*)     |           |
| Ericaceae       | <i>Agarista buxifolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don   | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           |           |
|                 |  |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           |           |
|                 |  |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | ns            | anti (**)     | ND           |           |
|                 |  | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           | ns        |
|                 |  |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           | ns        |
|                 |  |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ns           | anti (**) |
| Euphorbiaceae   | <i>Acalypha integrifolia</i> Willd.  | Feuilles | AcOEt    | ND                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ND           |           |
| Euphorbiaceae   | <i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll.Arg. ssp. <i>lineata</i>                                 | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | hémo (*)      | ND            | ND           |           |
|                 |  |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (**)     | ND           |           |
|                 |  |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | ns            | anti (*)      | ns           |           |
|                 |  | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (**)     | hémo (**)    |           |
|                 |  |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | hémo (**)    |           |
|                 |  |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | ns            | anti (*)      | ND           |           |

Tableau V (suite)

| Familles       | Espèces   | Parties  | Solvants | HT <sub>50</sub> (%) à |               |              |               |               |              |
|----------------|---|----------|----------|------------------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
|                |   |          |          | 4,25<br>ng/mL          | 42,5<br>ng/mL | 425<br>ng/mL | 4,25<br>µg/mL | 42,5<br>µg/mL | 425<br>µg/mL |
| Fabaceae       | <i>Indigofera amoxylum</i> (DC.) Polhill        | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (*)      | hémo (***)   |
|                |   |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | hémo (*)     |
|                |   |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | ns            | anti (*)      | anti (*)     |
|                |   | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (*)      | hémo (***)   |
|                |   |          | DCM      | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (*)      | hémo (***)   |
|                |   |          | MeOH     | ns                     | ns            | ns           | ns            | anti (*)      | anti (**)    |
| Lamiaceae      | <i>Clerodendrum heterophyllum</i> (Poir.) R.Br. | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | anti (*)     | anti (*)      | hémo (*)      | ND           |
| Meliaceae      | <i>Turraea casimiriana</i> Harms                | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | hémo (***)    | ND           |
|                |   | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | hémo (*)      | ND            | ND           |
| Myrtaceae      | <i>Eugenia buxifolia</i> Lam.                   | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | anti (*)      | anti (*)     |
| Myrtaceae      | <i>Syzygium borbonicum</i> J.Gueho et AJ.Scott. | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ND           |
| Phyllanthaceae | <i>Phyllanthus casticum</i> Soy.-Will.          | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ND           |
| Rubiaceae      | <i>Coptosperma borbonica</i> De Block           | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | ns            | ns            | ND           |
| Rubiaceae      | <i>Myonima obovata</i> Lam.                     | Ecorce   | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | hémo (*)      | ND            | ND           |
| Rubiaceae      | <i>Pyrostria orbicularis</i> A.Rich. ex DC.     | Feuilles | AcOEt    | ns                     | ns            | ns           | anti (*)      | anti (**)     | ND           |
| Contrôle +     | Acide gallique                                  | -        | -        | ns                     | ns            | ns           | hémo (**)     | anti (**)     | ND           |

**Légende** : ns : non significatif ; hémo, hémolytique ; anti, antioxydant ; ND, non déterminée ; \*, p<0,05 ; \*\*, p<0,01 ; \*\*\*, p<0,005.

Sur les dix-huit plantes testées, dix ont présenté au moins une concentration pour laquelle une activité antioxydante significative a été détectée. Il s'agit de *Cassine orientalis* (feuilles, AcOEt), *Eugenia buxifolia* (écorce, AcOEt), *Pyrostria orbicularis* (feuilles, AcOEt), *Carissa spinarum* (écorce, AcOEt), *Clerodendrum heterophyllum* (feuilles, AcOEt), *Stillingia lineata* (feuilles et écorce, MeOH), *Indigofera amnoxylum* (feuilles et écorce, MeOH), *Agarista buxifolia* (feuilles et écorce, MeOH), *Vernonia fimbrillifera* (feuilles, DCM) et *Dryopteris wallichiana* (pennes et rachis, MeOH).

La Figure 21 reprend les temps de demi-hémolyse (en %) obtenus pour les concentrations actives de ces extraits.

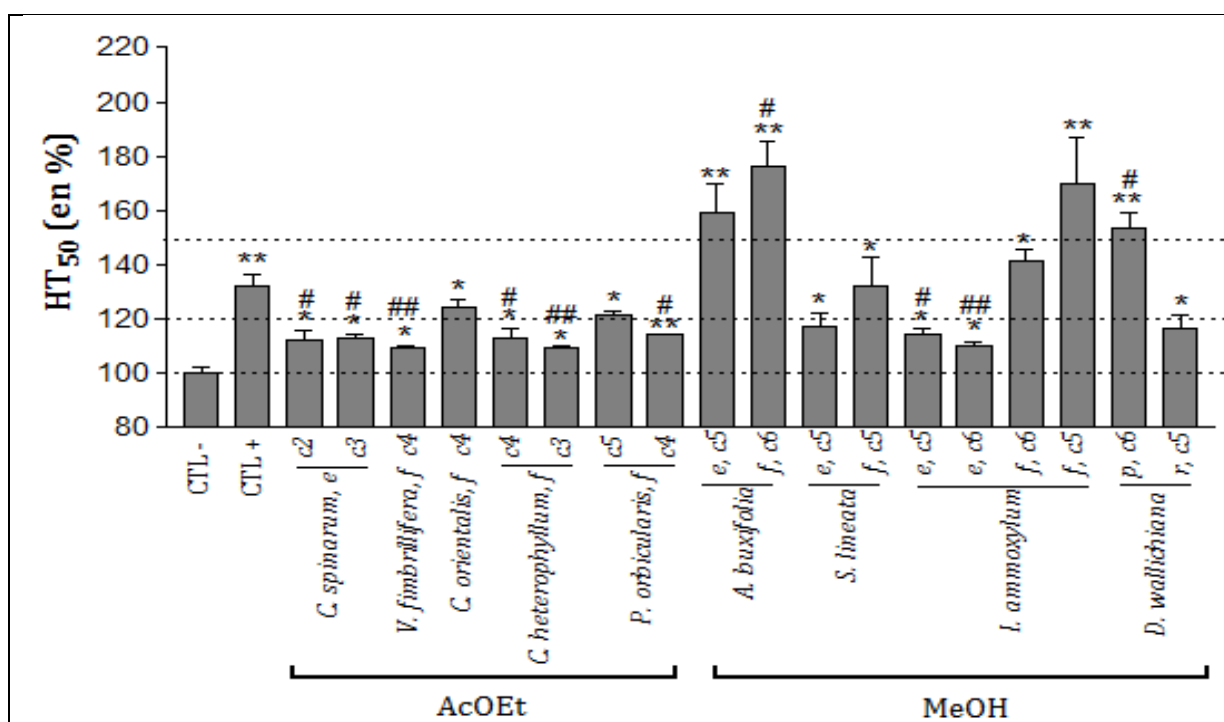


Figure 21 : Valeurs des HT<sub>50</sub> obtenus pour les extraits végétaux antioxydants

**Légende :**

f, feuilles ; e, écorce ; p, pennes ; r, rachis

c1, 4,25 ng/mL ; c2, 42,5 ng/mL ; c3, 425 ng/mL ; c4, 4,25 µg/mL ; c5, 42,5 µg/mL ; c6, 425 µg/mL

\* p<0,05 ; \*\* p<0,01 par rapport au CTL -

# p<0,05 ; ## p<0,01 par rapport au CTL + (acide gallique)

Des augmentations des temps de demi-hémolyse de 10 à 20 % (30 à 50 min) ont été observées par rapport au contrôle négatif, dépassant 50 % (150 min) pour les extraits les plus antioxydants. Le test t de Student réalisé deux à deux entre extrait et contrôle positif (acide gallique à 42,5 µg/mL) a montré des résultats significatifs pour les extraits méthanoliques des rachis de *Dryopteris wallichiana* et de feuilles de *Agarista buxifolia*.

### 2.2.2 Résultats des tests TEAC / FRAP/ DPPH/ORAC et du test FOLIN

Les résultats des cinq tests chimiques obtenus pour les trente-huit extraits sont présentés en Figure 22. Les résultats ont été exprimés en équivalent Trolox pour les tests TEAC/ FRAP/ DPPH / ORAC et en équivalent acide gallique pour le test FOLIN. Les résultats du test ORAC ont été divisés par 100 sur le graphe.

Les tests TEAC/FRAP/DPPH ont mis en évidence des activités antioxydantes marquées pour les mêmes extraits végétaux (principalement les extraits méthanoliques puis des extraits AcOEt) ; une corrélation avec le test de FOLIN a pu être envisagée. Le test ORAC a permis de distinguer d'autres espèces à extraits antioxydants telles que *Vernonia fimbrillifera* (feuilles, AcOEt) et *Clerodendrum heterophyllum* (feuilles, AcOEt).

Des analyses en composantes principales (ACP) ont permis de démontrer que les tests TEAC/FRAP/DPPH et FOLIN étaient bien corrélés entre eux de manière significative et non corrélés au test ORAC. Une forte teneur en composés phénoliques induit donc une réponse plus importante aux tests TEAC/FRAP/DPPH. Ces regroupements de tests (TEAC/FRAP/DPPH  $\neq$  ORAC) sont justifiés par les mécanismes qui sont mis en jeu. Pour les tests TEAC/FRAP/DPPH, l'activité antiradicalaire serait principalement liée à des transferts d'électrons (TE). Pour le test ORAC, il s'agirait de transferts d'atome d'hydrogène (TAH).

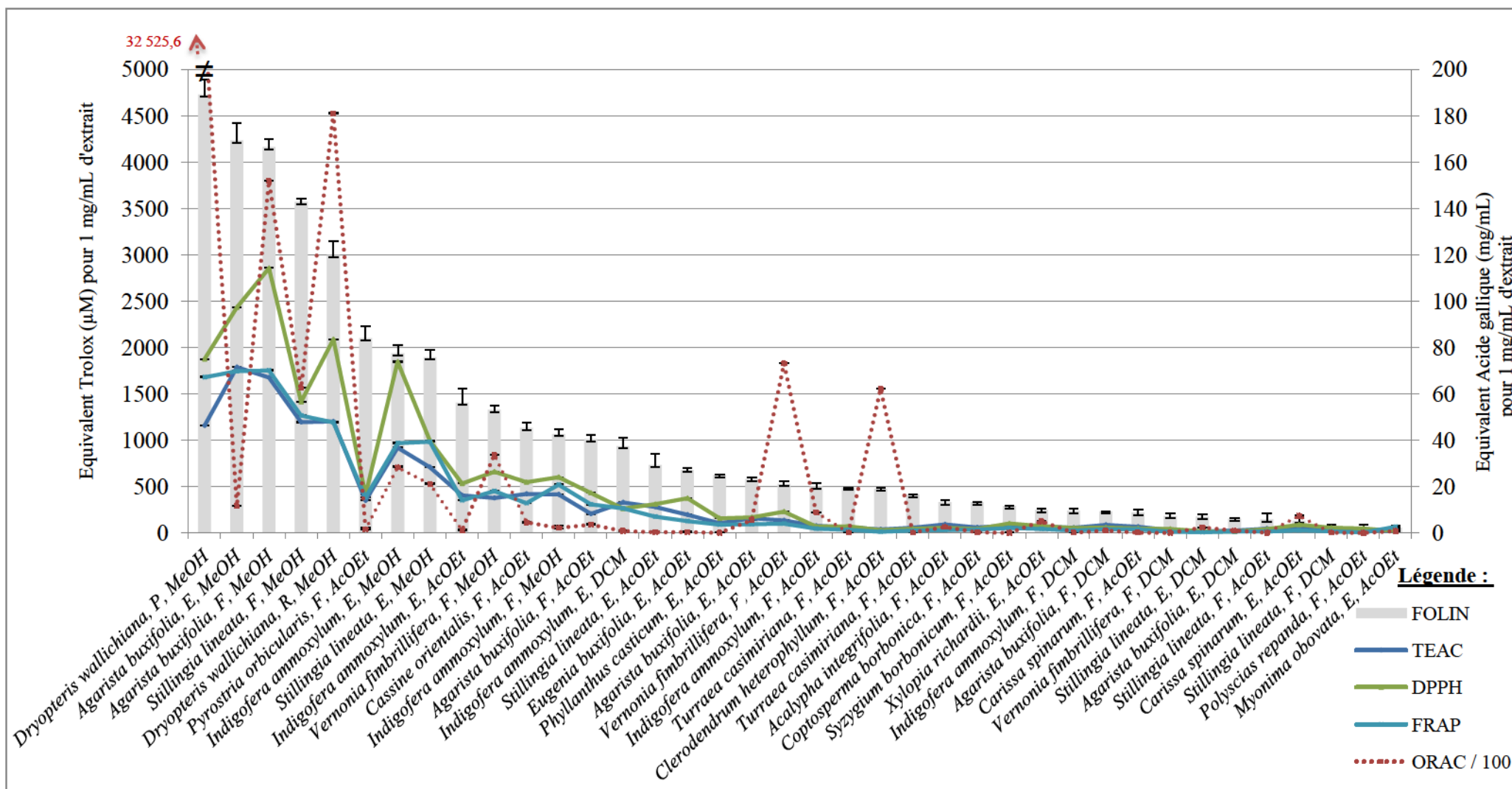


Figure 22 : Résultats des tests TEAC/ DPPH/ FRAP/ FOLIN / ORAC pour les trente-huit extraits végétaux

**Légende :** E, écorce ; F, feuilles ; P, pennes ; R, rachis + pétioles

Une comparaison des résultats obtenus pour les différents extraits est proposée ci-après. Nous ne parlerons pas ici d'extraits actifs ou non actifs car l'analyse des résultats se fait, pour les tests chimiques, de manière relative. Certains extraits seront donc plus antioxydants que d'autres.

Parmi les trente-huit extraits testés et en considérant les tests TE (TEAC, DPPH et FRAP), les neuf extraits MeOH ont présenté les plus fortes activités antioxydantes. Les extraits de feuilles et d'écorce de *Agarista buxifolia* sont les plus antioxydants, et les plus riches en composés phénoliques, après l'extrait MeOH des penes de *Dryopteris wallichiana*. Certains extraits AcOEt ont présenté de fortes activités antioxydantes proches de celles des extraits MeOH. Il s'agit des extraits de *Pyrostria orbicularis* (feuilles), de *Indigofera amnoxylum* (écorce), de *Cassine orientalis* (feuilles), de *Agarista buxifolia* (feuilles), de *Stillingia lineata* (écorce) et de *Eugenia buxifolia* (écorce). Les extraits les moins antioxydants sont inversement les extraits DCM à l'exception de l'extrait DCM de l'écorce de *Indigofera amnoxylum* qui possède une teneur notable en composés phénoliques et donne une réponse avoisinant celle des derniers extraits méthanoliques.

Pour le test relatif aux transferts d'atome d'hydrogène (test ORAC), des résultats différents de ceux précédemment présentés ont été obtenus. Parmi les trente-huit extraits testés, un extrait s'est remarquablement démarqué : l'extrait MeOH des penes de *Dryopteris wallichiana* avec une valeur en équivalent acide gallique 7 à 20 fois supérieure aux autres extraits les plus antioxydants. Les extraits les plus antioxydants pour ce test ORAC sont par ordre décroissant : *Dryopteris wallichiana* (pennes, MeOH) >>> *Dryopteris wallichiana* (rachis, MeOH) > *Agarista buxifolia* (feuilles, MeOH) >> *Vernonia fimbrillifera* (feuilles, AcOEt) > *Stillingia lineata* (feuilles, MeOH) > *Clerodendrum heterophyllum* (feuilles, AcOEt).

### **2.2.3 Comparaison des résultats des tests chimiques et du test d'hémolyse**

Pour permettre une comparaison avec les résultats du test d'hémolyse, des seuils d'activité ont été fixés de manière arbitraire pour les tests chimiques. L'activité antioxydante d'un extrait a été jugée intéressante si, pour les tests mettant en jeu des transferts d'électrons (TEAC, DPPH, FRAP), plus de 300 équivalents Trolox ont été obtenus, et, pour le test mettant en jeu le transfert d'atome d'hydrogène (ORAC), plus de

50000 équivalents Trolox. Pour le test FOLIN, un extrait a été considéré riche en polyphénols si plus de 40 équivalents acide gallique ont été obtenus. Le Tableau VI reprend les valeurs obtenues (en équivalent Trolox ou en équivalent acide gallique) pour tous les extraits et pour tous les tests. Un rappel des résultats du test d'hémolyse a été donné. Le terme « anti » a été utilisé lorsque l'extrait a présenté une capacité à retarder la lyse des globules rouges, et a donc présenté un potentiel antioxydant significatif pour au moins une concentration testée.



Tableau VI  
Résultats des tests FRAP/FOLIN/TEAC/DPPH/ORAC pour les trente-huit extraits testés

| Espèces                       | Parties | Solvants | Transfert d'électrons (TE)                                   |               |  |               |  |               |   |               | Transfert d'atome d'hydrogène (TAH)                          |               | Rappel des résultats du test d'hémolyse |
|-------------------------------|---------|----------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|---|---------------|--|---------------|---|
|                               |         |          | TEAC   |               | DPPH   |               | FRAP   |               | FOLIN   |               | ORAC   |               |   |
|                               |         |          | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq ac gallique<br>( $\mu\text{g/L}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type |   |
| <i>Xylopiya richardii</i>     | E       | AcOEt    | 69,87  | 0,03          | 74,72  | 0,07          | 44,35  | 0,83          | 9,94  | 0,45          | 12 434,14  | 0,19          | -                                       |
| <i>Carissa spinarum</i>       | E       | AcOEt    | 52,29  | 0,03          | 88,68  | 0,12          | 27,3   | 2,49          | 5,17  | 1,05          | 18 493,1   | 0,05          | Anti                                    |
|                               | F       | AcOEt    | 67,14  | 0,03          | 49,61  | 0,02          | 37,77  | 0,50          | 8,76  | 1,09          | 298,19   | 8,86          | -                                       |
| <i>Polyscias repanda</i>      | F       | AcOEt    | 35,58  | 0,02          | 48,96  | 0,02          | 6,48   | 1,64          | 2,59  | 0,75          | 94,89  | 3,06          | -                                       |
| <i>Vernonia fimbrillifera</i> | F       | AcOEt    | 135,91   | 0,02          | 230,68   | 0,05          | 100,99   | 0,61          | 21,09   | 1,10          | <b>182 749,46</b>  | <b>8,61</b>   | -                                       |
|                               |         | DCM      | 31,8   | 0,01          | 43,9   | 0,05          | 14,1   | 4,86          | 7,3   | 0,97          | 160,7  | 0,73          | -                                       |
|                               |         | MeOH     | <b>377,5</b>   | <b>0,15</b>   | <b>660,9</b>   | <b>0,73</b>   | <b>451,9</b>   | <b>3,9</b>    | <b>53,2</b>   | <b>1,64</b>   | <b>84 460,87</b>   | <b>0,23</b>   | Anti                                    |
| <i>Cassine orientalis</i>     | F       | AcOEt    | <b>421,54</b>  | <b>0,17</b>   | <b>547,14</b>  | <b>0,38</b>   | <b>321,52</b>  | <b>2,42</b>   | <b>45,42</b>  | <b>2,00</b>   | 11 429,32  | 0,13          | Anti                                    |
| <i>Dryopteris wallichiana</i> | R       | MeOH     | <b>1202,78</b>   | <b>0,01</b>   | <b>1876,22</b>   | <b>0,98</b>   | <b>1193,01</b>   | <b>10,42</b>  | <b>120</b>  | <b>5,80</b>   | <b>452582,80</b>   | <b>3,81</b>   | Anti                                    |
|                               | P       | MeOH     | <b>1157,45</b>   | <b>0,37</b>   | <b>2089,72</b>   | <b>0,18</b>   | <b>1680,64</b>   | <b>3,07</b>   | <b>189,19</b>   | <b>6,56</b>   | <b>3252566,7</b>   | <b>2,28</b>   | Anti                                    |
| <i>Agarista buxifolia</i>     | E       | AcOEt    | 157,9  | 0,10          | 169,83   | 0,17          | 94,46  | 0,56          | 23,27   | 0,64          | 13 845,11  | 4,11          | -                                       |
|                               |         | DCM      | 25,50  | 0,01          | 15,91  | 0,03          | 14,96  | 0,94          | 6,09  | 0,29          | 2 501,03   | 5,60          | -                                       |
|                               |         | MeOH     | <b>1 789,18</b>  | <b>1,34</b>   | <b>2 432,96</b>  | <b>0,28</b>   | <b>1 745,01</b>  | <b>2,05</b>   | <b>169,37</b>   | <b>7,58</b>   | 28 922,72  | 0,19          | Anti                                    |
|                               | F       | AcOEt    | 205,96   | 0,14          | <b>431,81</b>  | <b>0,23</b>   | <b>307,49</b>  | <b>1,67</b>   | <b>40,59</b>  | <b>1,49</b>   | 8 898,99   | 7,13          | -                                       |
|                               |         | DCM      | 87,47  | 0,02          | 58,57  | 0,01          | 41,05  | 3,26          | 9,25  | 0,07          | 2 543,66   | 3,74          | -                                       |
|                               |         | MeOH     | <b>1 676,95</b>  | <b>0,47</b>   | <b>2 857,40</b>  | <b>0,44</b>   | <b>1 753,54</b>  | <b>10,18</b>  | <b>166,59</b>   | <b>3,26</b>   | <b>379 641,19</b>  | <b>7,69</b>   | Anti                                    |
| <i>Acalypha integrifolia</i>  | F       | AcOEt    | 91,52  | 0,02          | 56,32  | 0,06          | 31,83  | 0,59          | 13,28   | 0,80          | 6 381,45   | 6,73          | -                                       |
| <i>Stillingia lineata</i>     | E       | AcOEt    | 281,97   | 0,20          | <b>310,29</b>  | <b>0,33</b>   | 177,17   | 2,64          | 29,39   | 4,75          | 867,18   | 11,24         | -                                       |
|                               |         | DCM      | 14,67  | 0,01          | 17,70  | 0,03          | 7,57   | 2,33          | 7,10  | 1,08          | 5 918,99   | 0,13          | -                                       |
|                               |         | MeOH     | <b>709,37</b>  | <b>0,52</b>   | <b>993,24</b>  | <b>0,14</b>   | <b>983,23</b>  | <b>6,37</b>   | <b>75,88</b>  | <b>3,28</b>   | <b>52 852,48</b>   | <b>7,01</b>   | Anti                                    |
|                               | F       | AcOEt    | 47,1   | 0,01          | 41,94  | 0,01          | 16,52  | 2,79          | 5,84  | 2,68          | 195,21   | 6,05          | -                                       |
|                               |         | DCM      | 49,63  | 0,02          | 56,78  | 0,21          | 17,70  | 0,22          | 3,04  | 0,41          | 379,20   | 4,28          | -                                       |
|                               |         | MeOH     | <b>1195,05</b>   | <b>0,21</b>   | <b>1414,17</b>   | <b>1,10</b>   | <b>1267,33</b>   | <b>0,22</b>   | <b>142,86</b>   | <b>1,39</b>   | <b>156 290,86</b>  | <b>5,28</b>   | Anti                                    |

Tableau VII (suite)

| Espèces                           | Parties | Solvants | Transfert d'électrons (TE)                                   |               |  |               |  |               | Transfert d'atome d'hydrogène (TAH)                                 |               |  |               | Rappel des résultats du test d'hémolyse |
|-----------------------------------|---------|----------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|---|---------------|--|---------------|---|
|                                   |         |          | TEAC   |               | DPPH   |               | FRAP   |               | FOLIN   |               | ORAC   |               |   |
|                                   |         |          | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq ac gallique<br>( $\mu\text{g/L}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type | C eq trolox<br>( $\mu\text{M}$ ) pour<br>1mg/mL<br>d'extrait | Ecart<br>type |   |
| <i>Indigofera amoxylum</i>        | E       | AcOEt    | <b>404,85</b>  | <b>0,25</b>   | <b>533,36</b>  | <b>0,17</b>   | <b>351,77</b>  | <b>2,29</b>   | <b>56,31</b>  | <b>5,81</b>   | 2 841,33   | 5,77          | -                                       |
|                                   |         | DCM      | <b>330,26</b>  | <b>0,18</b>   | 261,83   | 0,13          | 265,41   | 4,16          | 37,52   | 3,49          | 2 181,09   | 6,64          | -                                       |
|                                   |         | MeOH     | <b>919,64</b>  | <b>0,66</b>   | <b>1 847,69</b>  | <b>0,36</b>   | <b>969,73</b>  | <b>6,13</b>   | <b>77,58</b>  | <b>3,23</b>   | <b>70 647,06</b>   | <b>8,58</b>   | <b>Anti</b>                             |
|                                   | F       | AcOEt    | 77,31  | 0,05          | 69,51  | 0,07          | 46,69  | 2,26          | 20,07   | 1,53          | 22 196,01  | 0,23          | -                                       |
|                                   |         | DCM      | 56,01  | 0,03          | 53,37  | 0,06          | 26,80  | 3,60          | 9,59  | 0,84          | 335,4  | 3,63          | -                                       |
|                                   |         | MeOH     | <b>416,15</b>  | <b>0,28</b>   | <b>602,11</b>  | <b>0,27</b>   | <b>521,12</b>  | <b>6,69</b>   | <b>42,70</b>  | <b>2,21</b>   | 5297,66  | 26,21         | <b>Anti</b>                             |
| <i>Clerodendrum heterophyllum</i> | F       | AcOEt    | 38,89  | 0,01          | 31,11  | 0,02          | 13,95  | 0,59          | 19,12   | 0,30          | <b>155 581,57</b>  | <b>2,46</b>   | <b>Anti</b>                             |
| <i>Turraea casimiriana</i>        | E       | AcOEt    | 60,47  | 0,02          | 71,00  | 0,04          | 32,89  | 9,87          | 19,44   | 0,11          | 356,47   | 7,3           | -                                       |
|                                   | F       | AcOEt    | 56,14  | 0,03          | 46,92  | 0,02          | 24,64  | 4,48          | 16,5  | 0,13          | 444,68   | 8,91          | -                                       |
| <i>Eugenia buxifolia</i>          | E       | AcOEt    | 197,7  | 0,10          | <b>374,68</b>  | <b>0,07</b>   | 128,41   | 5,41          | 27,19   | 0,71          | 1 041,47   | 2,82          | <b>Anti</b>                             |
| <i>Syzygium borbonicum</i>        | F       | AcOEt    | 81,16  | 0,02          | 101,49   | 0,02          | 54,22  | 0,30          | 11,62   | 0,23          | 119,5  | 4,79          | -                                       |
| <i>Phyllanthus casticum</i>       | E       | AcOEt    | 105,09   | 0,01          | 157,75   | 0,01          | 89,08  | 4,81          | 25,08   | 0,09          | 39,78  | 4,13          | -                                       |
| <i>Coptosperma borbonica</i>      | F       | AcOEt    | 58,67  | 0,04          | 42,85  | 0,02          | 35,37  | 1,56          | 13,25   | 0,03          | 808,43   | 3,95          | -                                       |
| <i>Myonima obovata</i>            | E       | AcOEt    | 17,27  | 0,01          | 21,35  | 0,03          | 66,59  | 6,98          | 2,29  | 0,06          | 2 128,33   | 18,88         | -                                       |
| <i>Pyrostria orbicularis</i>      | F       | AcOEt    | <b>349,79</b>  | <b>0,06</b>   | <b>411,07</b>  | <b>0,44</b>   | <b>382,97</b>  | <b>0,51</b>   | <b>84,05</b>  | <b>5,08</b>   | 3 873,28   | 17,73         | <b>Anti</b>                             |

**Légende :** E, écorce ; F, feuilles ; T, tiges ; P, pennes ; R, rachis + pétioles ; AcOEt, acétate d'éthyle ; MeOH, méthanol ; DCM, dichlorométhane ; Anti, activité antioxydante significative détectée pour au moins une concentration testée pour le test d'hémolyse.

**Remarque :** Les résultats en gras sont ceux répondant aux critères fixés révélant une activité intéressante : > 300 équivalent Trolox pour les tests relatifs au transfert d'électrons ; > 40 mg/mL équivalent acide gallique pour le test FOLIN ; > 50000 équivalent Trolox pour le test relatif au transfert d'atome d'hydrogène

Les résultats des tests chimiques sont en corrélation avec les résultats du test d'hémolyse. Sur les quatorze extraits ayant présenté une capacité à retarder la lyse des globules rouges, douze ont présenté de fortes activités antioxydantes, soit aux tests mettant en jeu les transferts d'électrons (TE), soit au test relatif aux transferts d'atome d'hydrogène (TAH), soit aux deux.

Les extraits MeOH de *Agarista buxifolia* (feuilles), de *Stillingia lineata* (feuilles et écorce), de *Indigofera amnoxylum* (écorce), de *Vernonia fimbrillifera* (feuilles) et de *Dryopteris wallichiana* (pennes et rachis) ont montré un important potentiel antioxydant à la fois pour les tests TEAC/DPPH/FRAP et pour le test ORAC avec de fortes teneurs en composés phénoliques.

Les extraits AcOEt de *Cassine orientalis* (feuilles), de *Pyrostria orbicularis* (feuilles), de *Indigofera amnoxylum* (écorce) et les extraits MeOH de *Agarista buxifolia* (écorce) et de *I. amnoxylum* (feuilles) ont montré une forte activité antioxydante pour les tests relatifs au transfert d'électrons TE (TEAC, DPPH, FRAP) avec une teneur relativement importante en composés phénoliques.

L'extrait AcOEt de *Clerodendrum heterophyllum* (feuilles) a montré une forte activité antioxydante pour le test ORAC uniquement, avec une faible teneur en composés phénoliques.

Enfin, les activités antioxydantes de *Carissa spinarum* (écorce, AcOEt) et de *Eugenia buxifolia* (écorce, AcOEt), décelées lors du test d'hémolyse, n'ont pas été mises en évidence par ces tests chimiques. Seul le résultat du test DPPH est relativement élevé (375  $\mu$ M Trolox pour 1 mg/mL d'extrait) pour *Eugenia buxifolia* (écorce, AcOEt).

#### **2.2.4 Discussion**

Les résultats du test d'hémolyse et des tests chimiques ont permis de mettre en évidence le potentiel antioxydant de quatorze extraits provenant de dix plantes. Il est à souligner que, pour certaines d'entre elles, l'activité antioxydante a été mise en évidence pour la première fois dans ces travaux. Une discussion est proposée ci-après sur les composés potentiellement responsables de ces activités.

∞ *Agarista buxifolia*

L'extrait MeOH des feuilles de *Agarista buxifolia* a révélé une activité antioxydante significativement plus importante que le contrôle positif au test d'hémolyse. Son extrait MeOH d'écorce a également présenté des résultats significatifs comparés au contrôle négatif. Ces deux extraits ainsi que ceux de *Dryopteris wallichiana* (rachis, MeOH) ont donné les meilleurs résultats aux tests TE avec la plus forte teneur en composés phénoliques.

*Agarista buxifolia* était anciennement appelé *Agauria buxifolia*. Dans la littérature, aucune étude n'est mentionnée sur le potentiel antioxydant des espèces appartenant à ces genres. Des activités hypoglycémiantes [314, 318], curarisante [308-310], antifongique [247] et insecticide [307] ont été mentionnées. Les molécules les plus rencontrées dans les genres *Agarista* ou *Agauria* sont des flavonoïdes, des stéroïdes, des diterpènes de type grayanotoxines et des triterpènes [307, 314-318].

∞ *Carissa spinarum*

Une activité antioxydante a été décelée grâce au test d'hémolyse pour l'extrait AcOEt de *C. spinarum* (écorce) pour les plus faibles concentrations (42,5 et 4,25 ng/mL). Pour les tests chimiques, des activités antioxydantes moins élevées que celles observées pour les autres plantes ont été obtenues aussi bien pour les tests TE que TAH. La teneur en composés phénoliques est relativement faible.

Lors des analyses qualitatives faites en 2004 par Poullain *et al.* au LCSNSA, les extraits polaires et apolaires des tiges de *Carissa spinarum* (origine Réunion) ont révélé des capacités antioxydantes [45]. D'autres études ont confirmé par la suite le potentiel antioxydant de cette espèce (origine Inde) [177]. Certains auteurs ont associé cette activité à la présence de lignanes [161], composés qui ont également été isolés chez *C. edulis* [181] et *C. carandas* [182]. L'activité antioxydante du genre a été mise en évidence pour *C. carandas* [164] et *C. opaca* [638].

∞ *Cassine orientalis*

Dans nos travaux, l'extrait AcOEt des feuilles de *Cassine orientalis* a présenté un potentiel antioxydant significatif à 42,5 µg/mL pour le test d'hémolyse. Cette capacité à

interagir avec des radicaux libres a été retrouvée dans les tests chimiques avec des activités antioxydantes plus élevées pour tous les tests relatifs au transfert d'électrons (tests TEAC, DPPH, FRAP). Par ailleurs, dans la gamme de concentrations testées pour le test d'hémolyse, aucun effet hémolytique n'a été observé (aucune accélération de la lyse des globules rouges). Cette observation indique que l'extrait n'est pas pro-oxydant. Enfin, les corrélations établies entre les tests TE et le test FOLIN indiquent que la teneur en composés phénoliques de *Cassine orientalis* est responsable de son action antioxydante.

Dans la littérature, l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de *C. orientalis* (individu mauricien) a été évaluée. Les auteurs ont montré que cet extrait possède une capacité à piéger les radicaux HO•, activité cependant non corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Ils ont montré également qu'à 10 g de matière fraîche/L, l'extrait aqueux des feuilles de *C. orientalis* est pro-oxydant [241].

Concernant les autres espèces du genre *Cassine*, un fractionnement bioguidé utilisant le test DPPH a été réalisé sur l'extrait aqueux des racines de *C. transvaalensis*. La 4'-O-méthyl-épigallocatechine a été isolée et a montré un potentiel de piégeage des radicaux DPPH• comparable à celui de l'acide ascorbique [242]. Dans une autre mesure, l'activité antioxydante de *E. transvaalensis* n'a été mise en évidence que par le test FRAP [243].

#### ↻ *Clerodendrum heterophyllum*

L'extrait AcOEt des feuilles de *Clerodendrum heterophyllum* est antioxydant. Des résultats significatifs ont été obtenus pour le test d'hémolyse et une valeur élevée en équivalent Trolox a été obtenue pour le test ORAC. Par ailleurs, la faible teneur en composés phénoliques pour cet extrait indique que son activité antioxydante est probablement due à d'autres types de composés.

Concernant cette espèce, le potentiel antioxydant de ses extraits MeOH a été mis en évidence par Poullain *et al.* lors du criblage d'activités anti-radicalaire et antioxydante réalisé qualitativement sur CCM au sein du LCSNSA [45].

Concernant les autres espèces appartenant au genre, des propriétés antioxydantes ont été retrouvées pour : *C. inerme* [450], *C. colebrookianum* (inhibition de

la peroxydation lipidique *in vitro* et *in vivo* chez le rat) [449], *C. siphonathus* (piégeage de peroxyde lipidique et des radicaux DPPH•) [445], *C. infortunatum* (extraits de feuilles antioxydants *in vitro* et *in vivo* sur souris) [446]. Enfin, trois composés isolés de *C. trichotomum* (isoactéoside, trichotomoside et jionoside D) ont démontré une importante activité antioxydante (piégeage des DPPH•, inhibition de la peroxydation lipidique, stimulation des enzymes antioxydantes...) [451-453].

∞ *Dryopteris wallichiana*

Les extraits MeOH de rachis et de penes de *D. wallichiana* ont présenté une capacité à retarder la lyse des globules rouges. Ce retard est significativement plus important que le contrôle positif pour l'extrait MeOH de rachis. Par ailleurs, ces extraits ont présenté une forte teneur en composés phénoliques et des résultats remarquables pour les tests chimiques ont été obtenus, notamment pour le test ORAC.

L'espèce *Dryopteris wallichiana* ssp. *madagascariensis*, étudiée dans nos travaux est une fougère rare présente uniquement à La Réunion et à Madagascar. Elle n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique, ni de criblages d'activités biologiques. D'autres sous-espèces de *D. wallichiana*, notamment *D. wallichiana* ssp. *wallichiana*, ont été étudiées. Des composés tels qu'un dérivé de l'acide carbamique mais surtout des dérivés phloroglucinols, caractéristiques des *Dryopteris*, ont été isolés [282, 305]. Ces dérivés phloroglucinols ont été en effet isolés de *D. bissetiana* [287], *D. dickinsii* [288], *D. sp.* [289, 290], *D. abbreviata* [291], *D. subimpressa* [292], *D. atrata* [293], *D. fragrans* [275, 276], *D. vilarii* et *D. arguta* [289], *D. crassirhizoma* [278, 294, 295], *D. parallelogramma* et *D. patula* [296], *D. fusco-atra* et *D. hawaiiensis* [297]. Des activités antioxydantes ont été associées à ces composés, notamment pour *D. crassirhizoma* où ils ont montré une activité plus forte au test LPO (peroxydation lipidique des tissus cérébraux de souris) qu'aux tests de piégeage des radicaux DPPH et O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> [266]. L'activité antioxydante des *Dryopteris* peut également être la conséquence de la présence de flavonoïdes [267, 268]. De même, l'huile essentielle de *D. fragrans* [269, 270] et différents extraits des feuilles de *D. cochleata* ont révélé des propriétés antioxydantes [271].

↻ *Eugenia buxifolia*

L'extrait AcOEt de l'écorce de *Eugenia buxifolia* réduit significativement la lyse de globules rouges. Parmi les tests chimiques, seul le test DPPH a révélé une activité antioxydante modérée.

Différents travaux ont permis de mettre en évidence le potentiel antioxydant d'espèces appartenant au genre *Eugenia* : *E. jambolana* [489-491], *E. pollicina* [126], *E. carophyllata* [492], *E. sp.* [125, 126, 493], *E. uniflora* [494, 495]. Les auteurs associent le plus souvent cette activité antioxydante à la présence de composés phénoliques. Par ailleurs, ce genre est très proche de celui de *Syzygium* lui-même mentionné comme possédant des propriétés antioxydantes.

↻ *Indigofera amoxylum*

Les extraits polaires de feuilles et d'écorce de *Indigofera amoxylum* ont montré une activité antioxydante lors du test d'hémolyse, également mise en évidence par les tests chimiques.

Dans la littérature, une activité antioxydante a été mise en évidence par Poullain *et al.* pour un individu réunionnais [45]. Par ailleurs, la capacité des espèces du genre *Indigofera* à augmenter la quantité d'enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GR) et à diminuer la peroxydation lipidique (LPO) a été mise en évidence dans plusieurs études (*I. tinctoria* [357, 358], *I. oblongifolia* [361], *I. trita* [363], *I. cassioides* [364], *I. linnaei* [365]). La teneur en composés phénoliques et la capacité à piéger les radicaux DPPH•, ABTS•, NO• et HO• des extraits éthanolique et chloroformique des feuilles de *I. aspalathoides* ont été évaluées [360]. L'extrait chloroformique de cette espèce a présenté une teneur en composés phénoliques plus faible que l'extrait éthanolique mais un potentiel de piégeage de radicaux libres plus important. La structure des composés phénoliques présents dans cet extrait apolaire a été discutée. L'extrait MeOH de *I. caeruela* a présenté une teneur en composés phénoliques et un potentiel antioxydant plus important que les extraits éther de pétrole et AcOEt [366]. Cinq espèces du genre *Indigofera* ont été criblées par les tests DPPH, FRAP, ABTS ; quatre d'entre elles ont présenté un fort potentiel antioxydant [362]. L'extrait éthanolique de *I. trita* possède une activité antioxydante démontrée par les tests DPPH et ABTS principalement [363].

∞ *Pyrostria orbicularis*

L'extrait AcOEt de feuilles de *Pyrostria orbicularis* a révélé un potentiel antioxydant significatif pour le test d'hémolyse avec une augmentation du HT<sub>50</sub> de 21 % à 42,5 µg/mL. Une activité antioxydante plus élevée a été obtenue pour tous les tests associés au transfert d'électrons TE (tests TEAC, DPPH, FRAP). Par ailleurs, cet extrait est le plus riche en composés phénoliques des extraits AcOEt et sa teneur en composés phénoliques est également supérieure à certains extraits MeOH.

Ces travaux sont les premiers rapportés pour l'activité antioxydante d'une espèce du genre *Pyrostria*, pour lequel très peu d'informations sont disponibles. De plus, aucun criblage d'activité biologique et aucune étude phytochimique n'ont jusque-là été réalisés sur *Pyrostria orbicularis*. En ce qui concerne les composés mentionnés pour ce genre, la littérature indique la présence de β-sitostérol et de huit diarylheptanoïdes glycosylés pour *P. major* [595].

∞ *Stillingia lineata*

L'Euphorbiaceae *Stillingia lineata* a révélé, pour ses extraits méthanoliques de feuilles et d'écorce, une capacité à lutter contre la lyse des globules rouges induite par des radicaux libres. Des résultats notables ont également été mis en évidence pour tous les tests chimiques. Son activité est corrélée à la présence de composés phénoliques.

Il est à noter que l'activité antioxydante d'espèces du genre *Stillingia* n'est pas répertoriée dans la littérature. Un criblage phytochimique réalisé au LCSNSA sur 200 plantes réunionnaises a montré la présence de tanins catéchiques pour *S. lineata* [29].

∞ *Vernonia fimbrillifera*

Seul l'extrait MeOH des feuilles de *Vernonia fimbrillifera* présente une activité antioxydante significative lors du test d'hémolyse, activité confirmée lors des tests chimiques. Par ailleurs, une activité antioxydante relativement importante a été obtenue pour l'extrait AcOEt lors du test ORAC.

Différentes études ont montré les propriétés antioxydantes des feuilles de *V. amygdalina*. L'extrait méthanolique s'est révélé particulièrement actif lors des tests ABTS et DPPH [193]. Dans une autre étude, plusieurs solvants plus ou moins polaires



ont été utilisés pour extraire les polyphénols. La fraction enrichie en chlorophylles de l'extrait le plus riche en polyphénols piège le mieux les radicaux DPPH• et la fraction pauvre en chlorophylles de ce même extrait polyphénolique piège le mieux les radicaux •OH. Par ailleurs, les deux fractions inhibent l'oxydation de l'acide linoléique [192]. Récemment, il a été montré que l'extrait méthanolique des feuilles de cette espèce réduisait de 57 % la peroxydation lipidique induite par le tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) chez des rats, indiquant ainsi un potentiel hépatoprotecteur (stimulation des enzymes antioxydantes CAT, SOD, GST) [194]. Les mêmes observations sur la stimulation de l'activité de ces enzymes avaient été faites par Ong *et al.* [218].

## **2.3 Criblage d'activité anti-inflammatoire**

### **2.3.1 Résultats du test anti-inflammatoire**

Les extraits de plantes ont été testés à 10 µg/mL, concentration pour laquelle aucune cytotoxicité n'a été observée sur la lignée cellulaire RAW-Blue™. Ces cellules (10<sup>4</sup> cellules par puits) ont été mises en contact pendant 24 h avec ou sans LPS et traitées avec les extraits végétaux. Le test sans LPS a permis de confirmer que les extraits n'induisaient pas d'eux même une inflammation. Le test avec LPS a permis d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire des extraits.

Les résultats obtenus pour les dix-huit plantes testées sont présentés en Figure 23. Un extrait anti-inflammatoire inhibe l'activité du LPS. Cette inhibition se traduit par une quantité plus faible de SEAP formée conduisant à une absorbance plus faible comparativement au contrôle négatif (RAW-Blue™ + LPS).

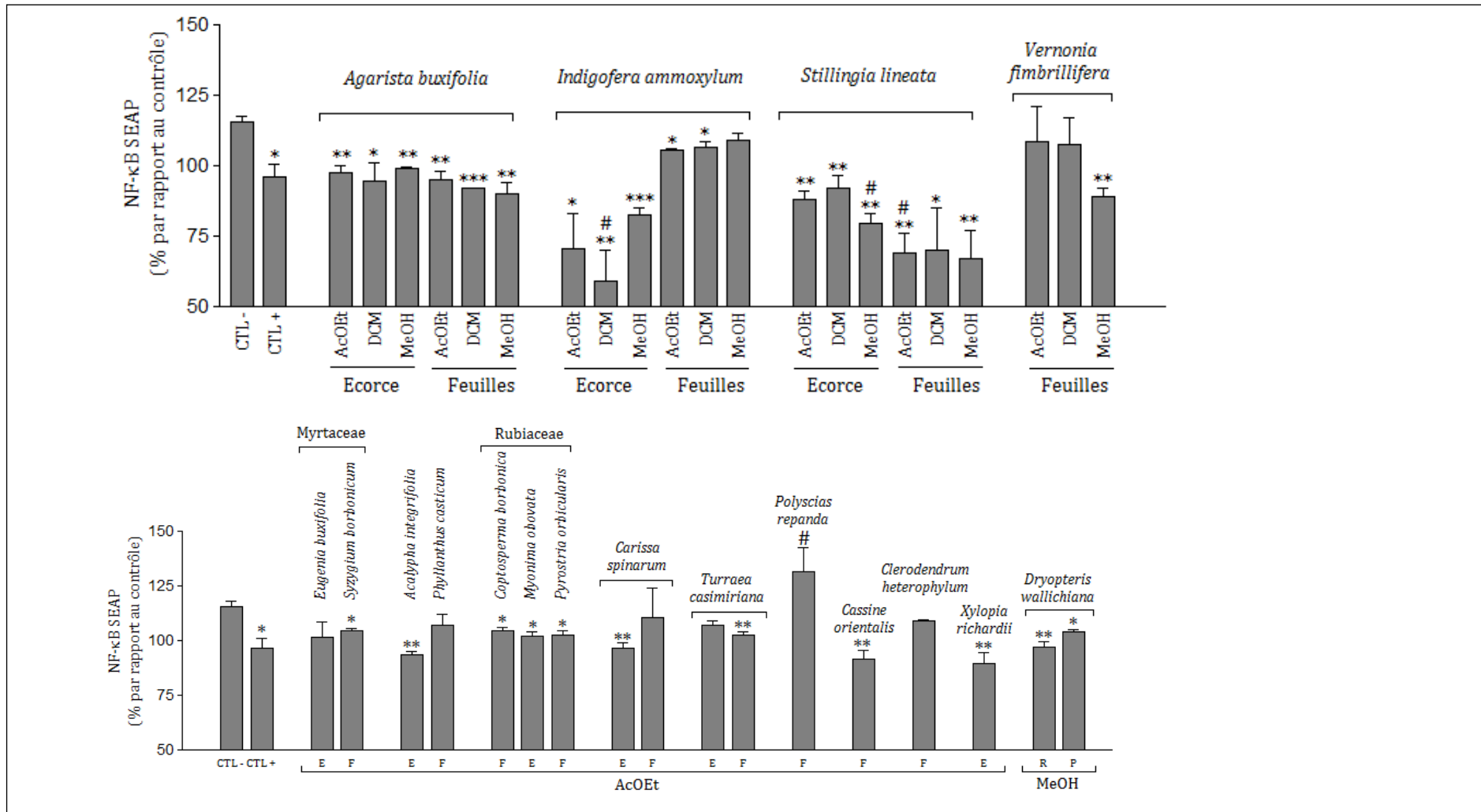


Figure 23 : Résultats du test anti-inflammatoire pour les trente-huit extraits testés à 10 µg/mL

**Légende :** CTL, contrôle ; E, écorce ; F, feuilles ; R, rachis + pétioles ; P, pennes ; \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,005 par rapport au CTL - ; # p<0,05 par rapport au CTL + (adiponectine)

Sur les dix-huit plantes testées, quatorze ont présenté un potentiel anti-inflammatoire significatif. Il s'agit dans l'ordre décroissant d'activité : *Indigofera amnoxylum* (écorce) > *Stillingia lineata* (feuilles puis écorce) > *Vernonia fimbrillifera* (feuilles MeOH) > *Xylopi richardii* (écorce) > *Cassine orientalis* (feuilles) > *Agarista buxifolia* (feuilles puis écorce) > *Acalypha integrifolia* (écorce) > *Carissa spinarum* (écorce) > *Dryopteris wallichiana* (rachis) > *Myonima obovata* (écorce) > *Turraea casimiriana* (feuilles) > *Pyrostria orbicularis* (feuilles) > *Dryopteris wallichiana* (pennes) > *Coptosperma borbonica* (feuilles) > *Syzygium borbonicum* (feuilles) > *Indigofera amnoxylum* (feuilles) > *Turraea casimiriana* (écorce).

Parmi les plantes significativement anti-inflammatoires, deux espèces ont montré une activité particulièrement élevée avec des résultats significatifs comparés au contrôle positif (# p<0,05). Il s'agit de *Indigofera amnoxylum* (écorce, DCM) et de *Stillingia lineata* (feuilles AcOEt et écorce MeOH).

Enfin, quatre plantes n'ont présenté aucune activité : *Eugenia buxifolia* (écorce), *Phyllanthus casticum* (feuilles), *Clerodendrum heterophyllum* (feuilles) et *Polyscias repanda* (feuilles).

### 2.3.2 Discussion

Le test d'activité anti-inflammatoire réalisé sur cellules de souris (RAW-Blue™) a permis de mettre en évidence quatorze plantes aux extraits anti-inflammatoires.

#### ↻ *Acalypha integrifolia*

*Acalypha integrifolia* a présenté une activité uniquement au test anti-inflammatoire. L'extrait éthanolique des feuilles de *A. wilkesiana* et l'extrait MeOH de *A. indica* ont montré un potentiel *in vivo* anti-inflammatoire (test au carraghénane induisant un œdème) [328, 329]. L'activité anti-inflammatoire de *A. alopecuroidea* a été mise en évidence pour son extrait aqueux qui a présenté un potentiel anti-inflammatoire *in vivo* dans les deux phases aiguë et chronique de l'inflammation [332], mais également par l'inhibition de l'expression de l'E-sélectine (CD62E), normalement régulée par TNF- $\alpha$  et NF $\kappa$ B, tandis qu'aucune inhibition de l'activité enzymatique de COX-2 n'a été mise en évidence [331].

↻ *Agarista buxifolia*

Tous les extraits de feuilles et d'écorce de *Agarista buxifolia* sont potentiellement anti-inflammatoires. Aucune information n'est rapportée dans la littérature pour ce type d'activité pour les espèces des genres *Agarista* et *Agauria*. La composition chimique de ces espèces, précédemment mentionnée pour le test antioxydant (§ 2.2.4, *Agarista buxifolia*) ne permet pas d'émettre des hypothèses sur la responsabilité d'une famille de molécules pour cette activité anti-inflammatoire.

↻ *Coptosperma borbonica*

Aucune donnée n'est disponible pour le genre *Coptosperma*. Ce genre était associé initialement au genre *Tarenna* avant révision taxonomique [639, 640]. Ainsi, *Coptosperma borbonica* était dénommé *Tarenna borbonica* [6]. L'étude bibliographique du genre *Tarenna* révèle la présence de chalcones [589], d'iridoïdes [593], de lignanes/néolignanes [589, 590], de cycloartanes glucosidiques [591, 592] et d'alcaloïdes [588]. Certains iridoïdes ont prouvé leur potentiel anti-inflammatoire, en particulier l'aucubigénine qui inhibe la production de TNF- $\alpha$  par des cellules de cultures stimulées par du LPS. L'inhibition sélective de ces composés (TNF- $\alpha$ , thromboxane synthase) par les iridoïdes pourrait constituer le mécanisme principal par lequel ils exercent leur action anti-inflammatoire [82].

Par ailleurs, les lignanes sont connus pour posséder plusieurs activités biologiques notamment des activités anti-inflammatoires. Les lignanes isolés de *Taxus baccata* [641] peuvent être pris en exemple. Ces composés, isolés des rhizomes de *Coptis japonica* et de *Pterocarpus santalinus*, inhibent *in vitro* la production de TNF- $\alpha$  dans les cellules RAW-Blue™ [642, 643].

↻ *Carissa spinarum*

Des propriétés anti-arthritiques ont été démontrées pour *Carissa spinarum* justifiant l'utilisation traditionnelle de la plante contre l'inflammation [179]. Par ailleurs, l'écorce de *C. spinarum* possède une importante capacité de cicatrisation des plaies [165]. Cette plante possède des composés tels que l'acide caféique [644], l'acide ursolique et la naringine [645], des cardénolides [646], un sesquiterpène germacrane et des lignanes [161] ainsi que d'autres composés comme le stigmastérol, le lupéol, le

campestérol, le 17-hydroxy-11-oxo-nor- $\beta$ -amyrone et l'acide urs-12- $\text{en-}3\beta,22\beta$ -diol-17-carboxylique [160]. Les lignanes (*cf. C. borbonica*, p99), ainsi que le lupéol [647] et l'acide ursolique [648] possèdent des propriétés anti-inflammatoires.

∞ *Cassine orientalis*

L'extrait AcOEt des feuilles de *Cassine orientalis* a montré un potentiel anti-inflammatoire significatif à 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Dans la littérature, l'extrait AcOEt de l'écorce de *Elaeodendron transvaalensis* inhibe l'activité de NF $\kappa$ B (76 % d'inhibition) à 15 mg/mL et l'extrait, à cette concentration, n'est pas cytotoxique sur les cellules étudiées (MT2) [244]. Inversement, une fraction d'un extrait AcOEt de l'écorce de *E. crocreum* (active contre le VIH) n'inhibe pas l'activité de NF $\kappa$ B [649].

∞ *Dryopteris wallichiana*

Des activités anti-inflammatoires ont été reportées pour l'extrait éthanolique de *D. crassirhizoma*. Cet extrait diminue la production de NO et de prostaglandines lors de la stimulation de cellules RAW 264.7 par du LPS. Il diminue également l'expression de gènes pro-inflammatoires (iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ ) en inhibant l'activation des protéines AP-1 et IRF3 [274]. Des études réalisées *in vivo* sur pattes de souris et de rats (injection de formaldéhyde et de carraghénane) ont révélé une activité anti-inflammatoire plus importante pour les racines de *D. chrysocoma* que pour ses feuilles ou ses tiges [273]. L'activité de ces *Dryopteris* peut s'expliquer par la présence de dérivés phloroglucinols, composés qui ont déjà démontré des activités anti-inflammatoires [650-657].

∞ *Indigofera amnoxylum*

Différentes études sur le potentiel anti-inflammatoire d'espèces du genre *Indigofera* ont été réalisées. Certaines ont été réalisées sur des extraits bruts. L'extrait MeOH des parties aériennes d'*I. pulchra* a révélé des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* [370]. Il a été noté également que *I. suffruticosa* (extraits aqueux et éthanolique) diminuait significativement la production d'oxyde nitrique (NO) induite par le LPS, diminuait l'expression de médiateurs pro-inflammatoires tels que iNOS, TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , inhibait l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et induisait l'expression de HO-1 dans les

macrophages [371]. D'autres études ont été réalisées sur deux composés (igocarpan et mucronulatol) isolés d'*I. aspalathoides*. L'igocarpan a révélé une inhibition significative de la COX-1 (CI<sub>50</sub> 30,5 µM) et son activité anti-inflammatoire *in vivo* (test au carraghénane induisant un œdème sur pattes de souris) a été comparable à celle de l'ibuprofène (51 % d'inhibition). Le potentiel antioxydant a également été évalué ; l'igocarpan possède une meilleure capacité à piéger les radicaux DPPH que le mucronulatol [359]. Des flavonoïdes ainsi qu'un lignane et deux acylphloroglucinols, isolés de *I. hetrantha*, ont révélé des capacités à inhiber l'activité de la lipoxigénase [368, 369].

#### ∞ *Myonimia obovata*

La mise en évidence du potentiel anti-inflammatoire de *Myonimia obovata* a été réalisée pour la première fois au cours de nos travaux.

#### ∞ *Pyrostria orbicularis*

L'activité anti-inflammatoire décelée lors de nos travaux pour *Pyrostria orbicularis* est d'autant plus intéressante que les données de la littérature révèlent peu d'information sur le genre *Pyrostria*. De plus, l'extrait testé présente un potentiel antioxydant, anti-inflammatoire et aucune cytotoxicité sur les cellules humaines étudiées.

#### ∞ *Stillingia lineata*

Les extraits de feuilles et d'écorce de *S. lineata* ont présenté un potentiel anti-inflammatoire très intéressant avec des résultats significatifs comparés au contrôle positif. Aucun criblage d'activité anti-inflammatoire n'a été mené sur des espèces de ce genre. Les composés responsables de cette activité pourraient être des diterpènes de type kaurane ou pimarane isolés de *S. sanguinolenta* [355]. Différents travaux ont mis en évidence le potentiel anti-inflammatoire de ces composés [658-667]. Il est à noter que des triterpènes pentacycliques ont également été isolés du genre *Stillingia* (3-épi-β-amyrine, β-amyrone et l'acide 3-acétate aleuritologique). L'α- et la β-amyrine, l'acétate de β-amyrine ainsi que d'autres triterpènes pentacycliques ont démontré un potentiel anti-inflammatoire [668-670].

∞ *Syzygium borbonicum*

Le genre *Syzygium* a été très étudié. Plusieurs activités biologiques ont été démontrées, principalement anti-diabétique [513, 524-529, 531, 671], molluscicide [535], antibactérienne/antifongique [532-534], insecticide [536], anti-hypertensive [538], acaricide [537], antitumorale [512] et analgésique [523].

En ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, des tests réalisés *in vitro* ou *in vivo* sur souris ont montré le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique d'écorce de *S. cumini* [516] et des extraits AcOEt, MeOH et aqueux de ses graines [517, 518]. Les bourgeons floraux de *S. aromaticum*, espèce contenant de l'eugénol considéré comme anti-inflammatoire [521], inhibent la sécrétion d'IL-8 [520]. Des tests *in vitro* et *in vivo* réalisés sur les extraits chloroformique et MeOH des écorces de *S. alternifolium* ont révélé une activité plus prononcée pour l'extrait apolaire [522]. Enfin, une chalcone isolée de *S. samarangense*, l'aurentiacine, inhibe l'inflammation induite par le LPS dans des macrophages de souris. Cette molécule inhibe significativement la formation d'oxyde nitrique (NO) induit par le LPS dans les cellules RAW264.7, supprime l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et réduit les niveaux d'ARNm des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6. Ceci suggère que l'aurentiacine possède une activité anti-inflammatoire liée à l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B [519].

∞ *Turraea casimiriana*

L'extrait AcOEt des feuilles de *Turraea casimiriana* a présenté un potentiel anti-inflammatoire, tandis qu'aucune activité n'a été retrouvée pour son extrait d'écorce.

Dans la littérature, des activités anti-inflammatoires ciblant les enzymes cyclooxygénase-1 et -2 (COX-1 et COX-2) ont été décelées pour l'extrait méthanolique des feuilles de *T. floribunda*, l'activité étant plus marquée sur COX-2 que sur COX-1 [477].

∞ *Vernonia fimbriifera*

L'activité anti-inflammatoire des espèces du genre *Vernonia* a été démontrée dans plusieurs travaux.

Plusieurs études ont été réalisées sur *V. cinerea*. L'extrait MeOH de la plante entière est anti-inflammatoire *in vivo* sur des rats [198] ; son extrait foliaire inhibe la formation d'œdème [199] ; l'extrait de fleurs est anti-inflammatoire [200]. Les lactones sesquiterpéniques isolées de cette espèce inhibent la production de TNF- $\alpha$  [197].

L'activité anti-inflammatoire se retrouve également pour les extraits d'autres espèces du genre *Vernonia*. L'extrait MeOH de feuilles et fleurs de *V. scorpioides* réduit la formation d'œdème et favorise la migration des neutrophiles [195]. L'extrait éthanolique favorise la cicatrisation des plaies [196]. *Vernonia amygdalina* réduit de 69 % la réponse inflammatoire après application d'huile de croton sur souris [201].

Deux hirsutinolides isolés de *V. triflosculosa* inhibent la voie de NF- $\kappa$ B et la production d'IL-8 [202]. Pour *V. cumingiana*, un glycoside stéroïdien de type stigmastane (vernocuminoside B) est potentiellement anti-inflammatoire [204], ainsi que des lactones sesquiterpéniques [203].

#### ∞ *Xylopi*a *richardii*

Les espèces du genre *Xylopi*a contiennent divers composés : acétogénines [139], alcaloïdes [151-153, 158, 159, 672], flavonoïdes [152, 153] et composés terpéniques [147-151, 153-156].

Plusieurs activités sont répertoriées pour les espèces de ce genre : antimicrobienne/antifongique/antibactérienne [134-136], anti-plasmodiale/anti-protozoaire [137, 138, 142-144], cytotoxique [139-141], cardiovasculaire/diurétique [145, 146], génotoxique/mutagène [141], anti-appétante [132, 133]. Une seule étude a été réalisée pour l'activité anti-inflammatoire, ciblant l'asthme allergique, conséquence des processus inflammatoires. L'activité anti-asthmatique de dix-neuf plantes brésiliennes a été évaluée en testant l'inhibition *in vitro* de la 5-lipoxygénase et parmi les trois plantes actives, *Xylopi*a *frutescens* a montré 85 % d'inhibition [131].



## Conclusion

L'objectif de ce **criblage préliminaire** était de mettre en évidence des extraits de **dix-huit plantes** de l'île de La Réunion biologiquement intéressants vis-à-vis du stress oxydatif et de l'inflammation. Pour cela, cinq tests d'activité antioxydante, un test anti-inflammatoire et un test d'activité cytotoxique sur lignée cellulaire humaine ont été réalisés sur une sélection de plantes endémiques ou indigènes de l'île.

**Le potentiel cytotoxique de onze plantes** a été décelé sur une lignée cellulaire humaine (cellules THP-1). Pour ces plantes, des réponses doses dépendantes ont été obtenues avec des résultats significatifs à la concentration de 100 µg/mL. L'extrait AcOEt de l'écorce de *Carissa spinarum* a été identifié comme le seul à être significativement plus cytotoxique que le contrôle positif (Taxotère).

Pour certaines de ces plantes, les résultats obtenus au niveau cellulaire ont été en corrélation avec la toxicité globale de la plante. Par exemple, *Stillingia lineata*, plante à latex toxique, a présenté un potentiel cytotoxique uniquement pour ses extraits d'écorce.

Une comparaison avec les données de la littérature a permis d'émettre des hypothèses sur les composés responsables de ces activités cytotoxiques (par exemple, des molécules de type grayanotoxines pour *Agarista buxifolia*). Néanmoins, pour certaines plantes, aucune hypothèse n'a pu être proposée en raison du manque d'information sur la composition chimique du genre (*Myonima obovata*).

De plus, il est intéressant de noter qu'aucune activité cytotoxique n'a été retrouvée pour toutes les parties d'*Indigofera ammoxylum* et pour toutes les concentrations testées. Cette plante est utilisée à La Réunion en tisane hypoglycémiante.

**Une activité antioxydante** retardant la lyse membranaire d'érythrocytes humains générée par radicaux libres a été observée sur **dix plantes**. Les extraits de ces plantes ont retardé considérablement l'hémolyse de globules rouges (test KRL). Pour huit d'entre elles, ces capacités à interagir avec des radicaux libres ont été confirmées par le test ORAC, par les tests associés au transfert d'électrons (tests TEAC/ DPPH/ FRAP) ou par les deux types de tests.

Le plus souvent, l'activité antioxydante de ces plantes a été corrélée à la forte teneur en composés phénoliques (test FOLIN), mais pour certaines (*Clerodendrum heterophyllum*),

il s'agirait d'autres composés. Deux plantes se sont principalement démarquées : ***Agarista buxifolia*** et ***Dryopteris wallichiana***. Elles ont montré des résultats significatifs comparés au contrôle positif du test d'hémolyse et présenté des réponses nettement supérieures à la moyenne pour les tests chimiques.

**Des propriétés anti-inflammatoires** ont également été mises en évidence pour **quatorze plantes** qui ont été capables de réduire à la concentration de 10 µg/mL la réponse inflammatoire dans les macrophages de souris (cellules RAW-Blue™) après stimulation par du lipopolysaccharide. Deux d'entre elles se sont démarquées : ***Stillingia lineata*** et ***Indigofera amnoxylum***. Les extraits d'écorce d'*Indigofera amnoxylum* et ceux de feuilles et d'écorce de *Stillingia lineata* ont en effet présenté des résultats significatifs par rapport au contrôle positif.

**Pour résumer** ces travaux de criblages d'activités biologiques, les résultats des trois tests ont été récapitulés dans le Tableau VII.

Tableau VII  
Tableau récapitulatif des activités biologiques obtenues pour les dix-huit plantes criblées

| Familles        | Espèces  | Parties | Solvants  | ANTIOXYDANT                                      |        |       |     | CYTOTOXICITE | ANTI-INFLAMMATOIRE |   |
|-----------------|--|---------|-----------|--|--------|-------|-----|--------------|--------------------|---|
|                 |  |         |           | Hémolyse   | TE     | FOLIN | TAH |              |                    |   |
| Annonaceae      | <i>Xylophia richardii</i> Boivin ex Baill.       | Ecorce  | AcOEt     | -  | -      | -     | -   | -            | +                  |   |
| Apocynaceae     | <i>Carissa spinarum</i> L.                       | Ecorce  | AcOEt     | +  | -      | -     | -   | +++          | +                  |   |
|                 |  | Feuille | AcOEt     | -  | -      | -     | -   | +            | -                  |   |
| Araliaceae      | <i>Polyscias repanda</i> (DC.) Baker             | Feuille | AcOEt     | -  | -      | -     | -   | +            | -                  |   |
| Asteraceae      | <i>Vernonia fimbriifera</i> (Cass.) Less.        | Feuille | AcOEt     | -  | -      | -     | +   | +            | +                  |   |
|                 |  |         | DCM       | -  | -      | -     | -   | +            | -                  |   |
|                 |  |         | MeOH      | +  | +      | +     | +   | -            | -                  |   |
| Celastraceae    | <i>Cassine orientalis</i> (Cav.) Harms           | Feuille | AcOEt     | +  | +      | +     | -   | +            | +                  |   |
| Dryopteridaceae | <i>Dryopteris wallichiana</i>                    | Rachis  | MeOH      | +++  | +      | +     | +   | -            | +                  |   |
|                 |  |         | Pennes    | MeOH   | +      | +     | +   | +            | -                  | + |
|                 |  |         | Ericaceae | <i>Agarista buxifolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don | Ecorce | AcOEt | -   | -            | -                  | - |
| DCM             | -  | -       |           |  |        | -     | -   | -            | +                  |   |
| MeOH            | +++  | +       |           |  |        | +     | +   | -            | +                  |   |
| Ericaceae       | <i>Agarista buxifolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don | Feuille | AcOEt     | -  | +      | +     | -   | -            | +                  |   |
|                 |  |         | DCM       | -  | -      | -     | -   | +            | +                  |   |
|                 |  |         | MeOH      | +  | +      | +     | +   | -            | +                  |   |
| Euphorbiaceae   | <i>Acalypha integrifolia</i> Willd.              | Feuille | AcOEt     | -  | -      | -     | -   | -            | +                  |   |
| Euphorbiaceae   | <i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll.Arg.       | Ecorce  | AcOEt     | -  | +      | -     | -   | +            | +                  |   |
|                 |  |         | DCM       | -  | -      | -     | -   | +            | +                  |   |
|                 |  |         | MeOH      | +  | +      | +     | +   | -            | +++                |   |
|                 |  | Feuille | AcOEt     | -  | -      | -     | -   | -            | +++                |   |
|                 |  |         | DCM       | -  | -      | -     | -   | -            | +                  |   |
| MeOH            | +  | +       | +         | +  | -      | +     |     |              |                    |   |

Tableau VII (suite)

| Familles       | Espèces   | Parties | Solvants | ANTIOXYDANT |    |       |     | CYTOTOXICITE | ANTI-INFLAMMATOIRE |
|----------------|---|---------|----------|-------------|----|-------|-----|--------------|--------------------|
|                |   |         |          | Hémolyse    | TE | FOLIN | TAH |              |                    |
| Fabaceae       | <i>Indigofera amoxylum</i> (DC.) Polhill                    | Ecorce  | AcOEt    | -           | +  | +     | -   | -            | +                  |
|                |   |         | DCM      | -           | -  | -     | -   | -            | +++                |
|                |   |         | MeOH     | +           | +  | +     | +   | -            | +                  |
|                |   | Feuille | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | -            | +                  |
|                |   |         | DCM      | -           | -  | -     | -   | -            | +                  |
|                |   |         | MeOH     | +           | +  | +     | +   | -            | -                  |
| Lamiaceae      | <i>Clerodendrum heterophyllum</i> (Poir.) R.Br.             | Feuille | AcOEt    | +           | -  | -     | +   | +            |                    |
| Meliaceae      | <i>Turraea casimiriana</i> Harms                            | Ecorce  | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | -            | -                  |
|                |   | Feuille | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | +            | +                  |
| Myrtaceae      | <i>Eugenia buxifolia</i> Lam.                               | Ecorce  | AcOEt    | +           | +  | -     | -   | +            | -                  |
| Myrtaceae      | <i>Syzygium borbonicum</i> J.Gueho et A.J.Scott.            | Feuille | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | -            | +                  |
| Phyllanthaceae | <i>Phyllanthus casticum</i> Soy.-Will.                      | Ecorce  | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | +            | -                  |
| Rubiaceae      | <i>Coptosperma borbonica</i> (Hend. et A.A. Hend.) De Block | Feuille | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | -            | +                  |
| Rubiaceae      | <i>Myonima obovata</i> Lam.                                 | Ecorce  | AcOEt    | -           | -  | -     | -   | +            | +                  |
| Rubiaceae      | <i>Pyrostria orbicularis</i> A.Rich. ex DC.                 | Feuille | AcOEt    | +           | +  | +     | -   | -            | +                  |

**Légende :** TE, transfert d'électrons (tests TEAC/FRAP/DPPH) ; TAH, transfert d'atome d'hydrogène (test ORAC)

- Parmi les trente-huit extraits testés, un seul ne présente aucune des trois activités recherchées. Il s'agit de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Turraea casimiriana*.
- Quatre extraits sont uniquement cytotoxiques. Ce sont les extraits AcOEt de *Carissa spinarum* (feuilles), de *Polyscias repanda* (feuilles) et de *Phyllanthus casticum* (écorce) et l'extrait DCM de *Vernonia fimbrillifera* (feuilles).
- Dix-neuf sont uniquement anti-inflammatoires dont treize dépourvus de cytotoxicité. Quatre sont uniquement antioxydants dont deux dépourvus de cytotoxicité (extraits MeOH des feuilles de *V. fimbrillifera* et de *I. ammoxylum*).
- Enfin, dix extraits sont à la fois antioxydants et anti-inflammatoires, et huit d'entre eux sont dépourvus de cytotoxicité. Ces extraits antioxydants/anti-inflammatoires/non cytotoxiques proviennent de quatre plantes : ***Agarista buxifolia*** (feuilles et écorce), ***Stillingia lineata*** (feuilles et écorce), ***Indigofera ammoxylum*** (écorce) et ***Pyrostria orbicularis*** (feuilles).

Les résultats obtenus dans cette deuxième partie ont mis en évidence, parfois pour la première fois, le potentiel cytotoxique, antioxydant et anti-inflammatoire de plantes réunionnaises. De nouvelles sources d'antioxydants et d'anti-inflammatoires capables de lutter contre le stress oxydatif et contre l'inflammation sont donc potentiellement envisageables.



**Troisième partie :**  
**Etude phytochimique de *Stillingia***  
***lineata***  
**Recherche d'inhibiteurs du CHIKV**

*Stillingia lineata* (Lam.) Müll.Arg. ssp. *lineata*  
Euphorbiaceae

## Introduction

Dans la troisième partie de ce travail, le fractionnement d'extraits de l'écorce d'une espèce indigène *Stillingia lineata* a été entrepris. Plusieurs critères ont justifié le choix de cette espèce :

- **L'absence de données bibliographiques** relatives à des investigations chimiques sur l'espèce *S. lineata* et la sous-espèce *S. lineata ssp. lineata*.
- **Les activités antioxydante et anti-inflammatoire** mises en évidence lors des travaux décrits en deuxième partie de ce manuscrit :
  - *Stillingia lineata* fait partie des quatre plantes ayant présenté des extraits à la fois antioxydants, anti-inflammatoires et non cytotoxiques.
  - Une activité anti-inflammatoire significative a été obtenue pour tous les extraits de cette espèce (concentration 10 µg/mL).
- **L'activité antivirale** mise en évidence dans le cadre du Programme Phytochik. En effet, une inhibition de 90 % de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules Vero a été observée pour une concentration inférieure à 0,8 µg/mL (CE<sub>90</sub>).

En raison de cette activité antivirale remarquable et du savoir-faire acquis au cours de ce programme, dans la recherche d'inhibiteurs de la réplication du virus du chikungunya, c'est le test utilisé pour ce criblage biologique qui a été sélectionné pour suivre les différentes étapes de fractionnement.

Les travaux réalisés dans cette partie, à partir de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*, ont de ce fait permis d'identifier des métabolites secondaires capables d'inhiber sélectivement la réplication virale du CHIKV.

Pratiquement, l'activité antivirale de l'extrait AcOEt de l'écorce de *S. lineata* a tout d'abord été vérifiée. Puis, les extraits (DCM, MeOH) d'écorce et de feuilles ont été testés. Enfin, le fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt de l'écorce a été réalisé dans le but d'isoler et de caractériser les molécules responsables de cette activité.

## Chapitre III-1 : Etude bibliographique de *Stillingia lineata*

### **1.1 La famille des Euphorbiaceae**

#### **1.1.1 Description**

La famille des Euphorbiaceae a été créée par A. L. de Jussieu en 1789. Une première classification détaillée en sous-familles, tribus et sous-tribus a été proposée par J. Mueller en 1866. Cette classification a été revue par Webster en 1975. Les Euphorbiaceae ont été classées en cinq sous-familles : les Phyllanthoïdeae, les Oldfieldioïdeae, les Acalyphoïdeae, les Crotonoïdeae et les Euphorbioïdeae. Les deux premières sous-familles sont caractérisées par la présence de deux ovules par loge (bi-ovulation) et les trois dernières par la présence d'un seul ovule par loge (uni-ovulation) [673]. En 2003 et 2009, l'APG II et III (Angiosperm Phylogeny Group) ont redéfini les Euphorbiaceae *sensu stricto* uniquement par les trois sous-familles : Euphorbioïdeae, Acalyphoïdeae et Crotonoïdeae.

La famille des Euphorbiaceae est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs. On dénombre près de 8000 espèces réparties en 300 genres. Les principaux genres sont les *Euphorbia* (2000 espèces), les *Croton* (750 espèces), les *Acalypha* (400 espèces), les *Antidesma*, les *Jatropha* et les *Manihot* (150 espèces chacun).

Ce sont des Dicotylédones d'aspect très variable (arbres, buissons, lianes, plantes herbacées...), qui se caractérisent par l'unisexualité de leurs fleurs monoïques ou dioïques. Elles ont une morphologie florale diverse, allant de fleurs classiques (sous-famille des Crotonoïdeae) à des fleurs simplifiées et réduites (sous-famille des Euphorbioïdeae). Les feuilles sont généralement alternes et simples, souvent très réduites chez les succulentes. Elles peuvent également être opposées et/ou palmées (*Ricinus communis*, ricin). Les stipules\* sont souvent réduites à des soies, glandes ou épines. La grande majorité des espèces possède un fruit à trois loges contenant chacune une seule graine. Les graines sont pourvues d'une caroncule, petite expansion charnue appréciée des insectes et autres animaux et favorisant la dissémination des graines [674, 675].



### 1.1.2 Utilisations des Euphorbiaceae

Les Euphorbiaceae sont exploitées dans plusieurs domaines.

#### ∞ *Exploitation industrielle*

L'hévéa ou arbre à caoutchouc (*Hevea brasiliensis*) est la source principale de caoutchouc naturel. Le noyer des Moluques (*Aleurites moluccana*) et l'aleurite (*Aleurites fordii*) fournissent l'huile de tung et d'autres huiles utilisées dans l'industrie des peintures et des vernis. L'arbre à suif (*Triadica sebifera*) est utilisé pour fabriquer des bougies et des chandelles et constitue également un bon candidat pour la production de biodiesel. Les espèces du genre *Euphorbia* fournissent des hydrocarbures semblables à ceux du pétrole. L'huile de ricin (*Ricinus communis*) est utilisée dans la fabrication du nylon et pour la lubrification des moteurs d'avion [674].

#### ∞ *Plantes ornementales*

Les espèces ornementales les plus fréquemment rencontrées, exotiques à La Réunion, sont par exemple le poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*), le croton (*Codiaeum variegatum*) des haies, la queue de chat (*Acalypha hispida*) aux fleurs en forme de chatons rouges, la plante-crayon (*Euphorbia tirucalli*), l'épine du christ (*Euphorbia milii*) [676].

#### ∞ *Source alimentaire*

Le manioc (*Manihot esculenta*) est la cinquième plante alimentaire mondiale, après le maïs, le riz, le blé et la pomme de terre. Ses racines tubéreuses sont une source importante d'amidon dans les régions tropicales. D'autres Euphorbiaceae alimentaires sont utilisées comme légumes : les fruits d'*Antidesma bunius* et les feuilles de *Cnidocolus chayamansa* [82, 675].

∞ *Plantes médicinales*

Les Euphorbiaceae, du fait de leur large répartition, sont confrontées à toutes sortes d'habitats. Leur adaptation dans ces différents milieux a induit une grande variété de métabolites secondaires, utilisés par la plante pour la survie ou la défense. Ces métabolites sont responsables des nombreux usages médicaux rapportés pour les Euphorbiaceae. Les *Jatropha* sont utilisés en médecine traditionnelle par 80 % de la population en Afrique, en Asie et en Amérique latine, pour guérir diverses pathologies telles que les maux d'estomac, l'inflammation, le diabète, le sida, les cancers, les ulcères, le paludisme, les maladies de peau, l'asthme... Des propriétés cytotoxique, antitumorale, antimicrobienne, anti-protozoaire, anticoagulante, immunomodulatrice, anti-inflammatoire, antioxydante, insecticide, molluscicide ont été démontrées. Les composés isolés sont le plus souvent des diterpènes, des peptides cycliques, et d'autres composés tels que des flavonoïdes, des lignanes, des triterpènes... [677]. Le genre *Euphorbia* est également très utilisé en médecine traditionnelle. Les diterpènes polycycliques de type tiglane, ingénane, jatropane et lathyrane, fréquemment retrouvés, sont biologiquement actifs (activités anti-proliférative, cytotoxique, antivirale, anti-diarrhéique, molluscicide, anti-appétante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique, anti-cancéreuse, promoteurs tumoraux, ...) [678, 679].

## **1.2 Le genre *Stillingia* Garden ex L. et l'espèce *Stillingia lineata* (Lam.) Müll. Arg sous-espèce *lineata***

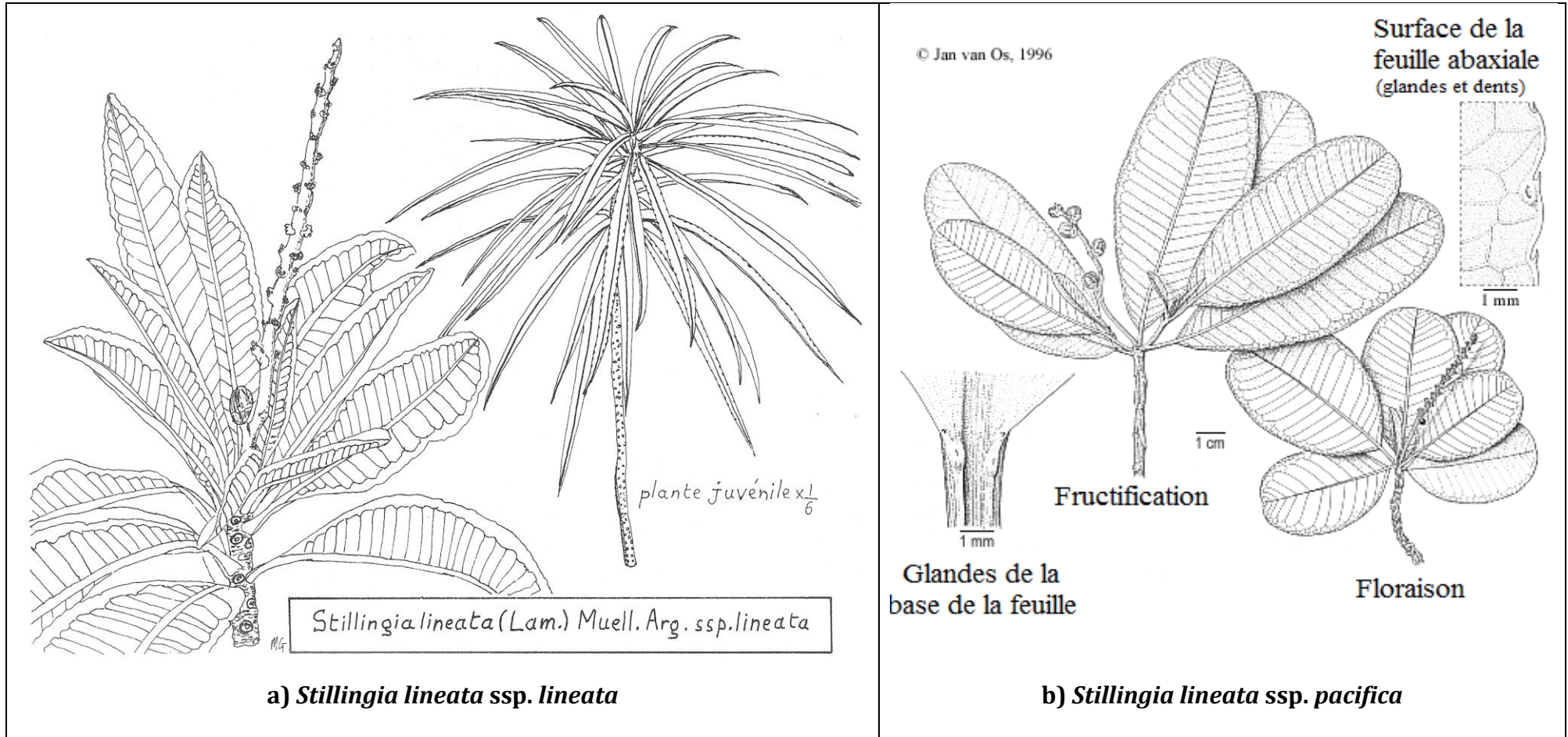
### **1.2.1 Répartition et description botanique**

Le nom *Stillingia* a été donné par Alexander Garden en l'honneur du botaniste anglais Benjamin Stillingfleet (1702-1771). Le genre a été classé dans un premier temps dans la famille des Euphorbiaceae et dans la tribu des Euphorbieae par Endlicher. Par la suite, il a été reclassé dans la tribu des Hippomaneae par Klotzsch [680].

Actuellement, le genre *Stillingia* comprend trente espèces. Vingt-sept espèces sont strictement néotropicales dans une zone qui s'étend de l'Argentine au Kansas, trois sont présentes dans les îles Fidji, dans certaines îles de Malaisie et de l'Océan Indien. L'espèce *Stillingia lineata* (Lam.) Müll. Arg est présente dans les îles de l'Océan Indien et en Malaisie. Elle se subdivise en 2 sous-espèces [681] :

- *Stillingia lineata* (Lam.) Müll. Arg. ssp. *lineata* (*SL-lineata*), typique des îles Maurice et La Réunion (Figure 24a). Cette plante possède des feuilles à nervures peu visibles et sans glandes marginales.

- *Stillingia lineata* (Lam.) Müll. Arg. ssp. *pacifica* (*SL-pacifica*), plante malaisienne (Figure 24b). Cette plante se distingue par des feuilles minces à dentelure, nervation et glandes évidentes.



a) *Stillingia lineata* ssp. *lineata*

b) *Stillingia lineata* ssp. *pacifica*

Figure 24 : Planches botaniques des deux sous-espèces de *Stillingia lineata* (Lam.) Müll. Arg  
(Source : d'après Dupont *et al.*, 1989 [682], et Esser, 1999 [683])

A La Réunion et à Maurice, *SL-lineata* est présente dans les secteurs secs, sur les escarpements ensoleillés. C'est un arbrisseau pouvant atteindre 12 m de hauteur généralement peu branchu. Ses feuilles sont simples, alternes, insérées en hélice et groupées au sommet des ramilles (cf. photographies ci-après et Figure 25). Son limbe\* est de forme très variable. Il peut être elliptique ou obovale, arrondi ou aigu au sommet. Il se rétrécit sur une base étroite, arrondie ou cunéiforme. Les stipules se présentent sous forme de pointes minuscules ou de groupes de poils glanduleux, caduques. Les fleurs mâles sont minuscules, caduques. Les fleurs femelles sont à ovaire trilobé. Les fruits sont des capsules trilobées avec des valves se détachant au-dessus du carpophore\*. Les graines sont grises et oblongues [684].



Photographies de *Stillingia lineata* (Lam.) Müll.Arg. ssp. *lineata*  
(Source : S. TECHER/E. GIRARD-VALENCIENNES)

Cette espèce *SL-lineata* est communément appelée « tanguin pays » à La Réunion et « fangame » à l'île Maurice [681].

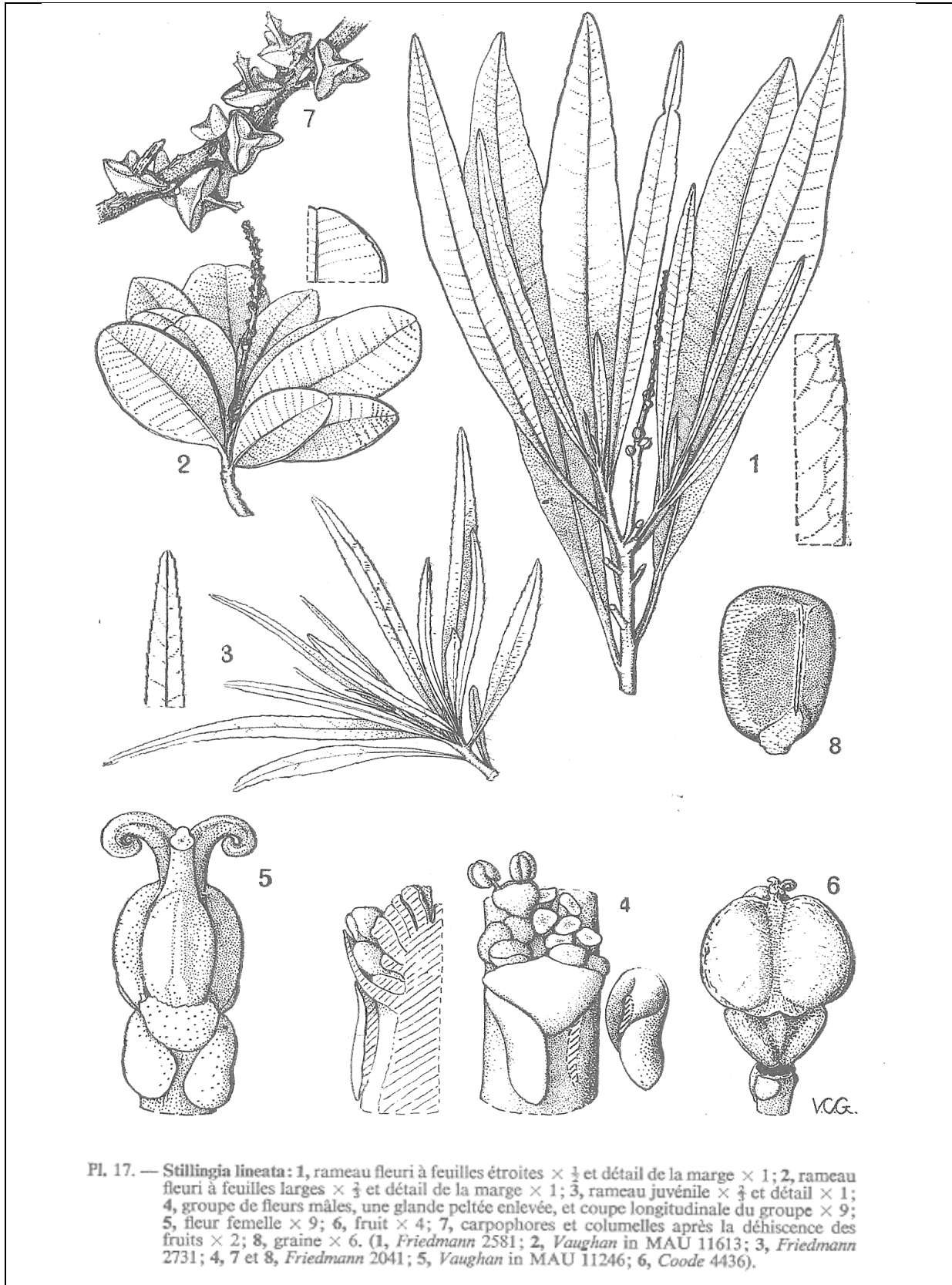


Figure 25 : Planche botanique de l'espèce *Stillingia lineata*  
(Source : [685])

### 1.2.2 Données ethnopharmacologiques

*SL-lineata* a été utilisée par les premiers habitants de l'île de La Réunion en tant que poison [16]. A Maurice, des bains à base de plante entière sont recommandés pour soigner l'eczéma. Les feuilles sont toxiques et stupéfiantes [681].

Cette toxicité est également connue pour l'espèce *Stillingia texana* (Texas Queen's delight), qui est listée parmi les plantes qui ont été le plus fréquemment associées à un empoisonnement au cyanure chez les animaux [686].

Sur l'ensemble des espèces du genre *Stillingia*, deux sont particulièrement utilisées : *S. sylvatica* et *S. sebiferum*.

Connue sous le nom de Queen's delight, la racine de *S. sylvatica* est inscrite à la Pharmacopée officielle des États-Unis. Cette plante a été très utilisée pendant plus d'un siècle par les premiers habitants du Sud. Certaines tribus l'utilisaient contre la perte de virilité, mais aussi après les accouchements. Néanmoins, la plante était le plus souvent utilisée pour ses propriétés émétique et cathartique [687, 688]. Cette plante a également été considérée aux États-Unis comme un antisiphilique [689]. Aujourd'hui, elle est utilisée pour ses propriétés diurétique, stimulante, tonique, antisiphilitique, expectorante, scrofuleuse et contre les affections hépatites, la leucorrhée et les éruptions cutanées [690, 691]. Cette plante fait également partie de la composition de la formule Hoxsey<sup>5</sup> [692].

*Stillingia sebifera* est une autre espèce à être exploitée commercialement. Elle est aujourd'hui un synonyme de *Sapium sebifera* et de *Triadica sebifera* (taxon officiel). Son fruit contient deux types de matières grasses qui ont été très étudiées. L'une provient du tégument et est appelé commercialement « suif végétal chinois », l'autre provient de l'amande et est connue sous le nom de « huile de stillingia ». Le suif végétal chinois est utilisé dans l'alimentation en remplacement du suif animal. Il est également utilisé pour l'éclairage et en savonnerie. L'huile de stillingia est utilisée en peinture et en éclairage, mais aussi en carburant et en engrais. Ces deux dernières propriétés lui ont valu un

---

<sup>5</sup> Traitement anticancéreux très controversé, à base de différentes herbes, utilisé au Mexique.

regain d'intérêt dans les années 1980. En médecine traditionnelle, l'écorce est utilisée en diurétique ainsi que pour le traitement de la schistosomiase\* et les feuilles contre le zona [693].

### 1.2.3 Activités biologiques et composition chimique pour le genre *Stillingia*

Les travaux réalisés sur le genre *Stillingia* pour la détermination d'éventuelles activités biologiques ne sont pas nombreux. Quelques criblages ont été effectués pour les activités cytotoxique, irritante, protéolytique, antimycobactérienne et antifongique.

La première étude, réalisée en 1885, sur une espèce du genre *Stillingia*, a consisté à évaluer la teneur en eau et en cendres de l'écorce et de certains extraits (benzénique, alcoolique, aqueux) de *S. sylvatica*. Un alcaloïde, la stillingine, a été isolé de l'extrait alcoolique [354].

Il a fallu attendre un siècle plus tard pour que les investigations sur le genre *Stillingia* reprennent, avec l'étude de l'huile de stillingia et du suif végétal chinois de *S. sebifera*, dont la composition a été établie [349, 694-699]. Actuellement *S. sebifera* n'appartient plus au genre *Stillingia*.

L'huile des graines de *S. sylvatica* possède des propriétés siccatives et peut être exploitée pour les peintures et les vernis [349]. Par ailleurs, huit composés particulièrement irritants, de types daphnane et tigliane ont été isolés (*cf.* § 1.2.4 p121) à partir des racines de *S. sylvatica*, à la suite d'un fractionnement bioguidé par un test d'irritation réalisé *in vivo* sur oreilles de souris [350]. Dans une autre étude, l'extrait MeOH des racines de *S. sylvatica* n'a révélé aucune activité contre les mycobactéries *M. aurum* et *M. smegmatis* [700].

Lors d'un criblage d'activité cytotoxique *in vitro* sur des cellules tumorales humaines Co-115 (cancer du côlon), réalisé sur 75 plantes provenant d'Afrique, de Panama et de Maurice, *S. lineata* originaire de l'île Maurice a été testé. Les extraits éther de pétrole et DCM des feuilles de cette espèce sont fortement cytotoxiques [351]. Le criblage phytochimique préliminaire réalisé au LCSNSA sur 200 plantes réunionnaises a montré la présence de tanins catéchiques pour *S. lineata* originaire de La Réunion [31].



Le latex de *S. patagonica* présente une forte activité protéolytique. La présence de cystéine-protéases a été décelée [353].

Les extraits DCM:MeOH (1:1) des feuilles et des tiges de *S. oppositifolia* présentent une activité cytotoxique dose-dépendante sur trois lignées leucémiques : UACC-62 (cancer mélanocytaire), MCF-7 (cancer du sein), TK-10 (cancer du rein) (CC<sub>50</sub> de 50 à 100 µg/mL). En revanche, ils ne sont pas toxiques à 20 µg/mL vis-à-vis des cellules sanguines mononucléaires périphériques (PBMC). Par ailleurs, l'évaluation de leurs activités antifongique et anti-levures sur différentes souches (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* et *Paracoccidioides brasiliensis*) a montré que les extraits organiques des feuilles et des tiges inhibent la croissance de *C. krusei*, *C. tropicalis* (CMI<sup>6</sup> = 250 µg/mL) et *P. brasiliensis* (CMI = 63 µg/mL). Différentes partitions ont été réalisées (hexane, DCM, H<sub>2</sub>O) et la partition hexanique de l'extrait d'écorce a présenté les plus fortes activités antifongique et cytotoxique. Cette fraction contient trois triterpènes (cf. §1.2.4 p123), du sitostérol et de l'acide palmitique, qui ne présentent aucune activité antifongique, aucune toxicité sur PBMC et des CI<sub>50</sub> supérieures à 88 µg/mL pour les lignées UACC-62, MCF-7 et TK-10 [352].

#### 1.2.4 Molécules isolées

La première étude phytochimique d'une espèce du genre *Stillingia* a été réalisée en 1980 sur *S. sylvatica*. Un fractionnement bioguidé par un test d'irritation a été entrepris sur ses racines. Huit molécules diterpéniques irritantes (DI<sub>50</sub><sup>7</sup> de 0,16 à 0,06 nM) de types daphnane (**1-6**) et tigliane (**7-8**) ont été isolées. Ce sont des esters de phorbol porteurs d'acides gras saturés, polyinsaturés ou hydroxylés, présentés en Figure 26 [350].

---

<sup>6</sup> Concentration minimale inhibitrice

<sup>7</sup> Dose pour laquelle est observée une irritation chez 50 % des souris testées

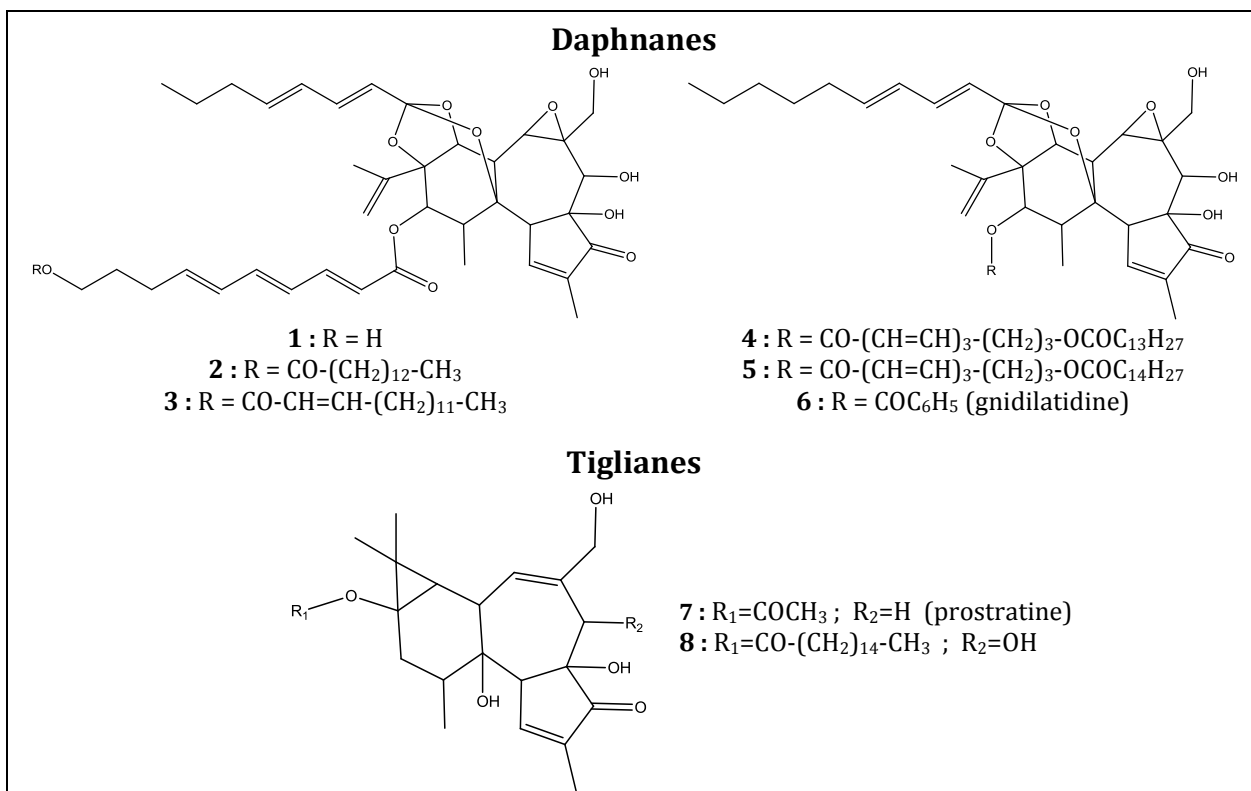


Figure 26 : Molécules isolées de *Stillingia sylvatica*  
 (Source : d'après Adolf *et al.*, 1980 [350])

Plusieurs diterpènes ont été isolés des racines de *S. sanguinolenta* [355]. L'acide acétylaleuritolique ainsi qu'un sanguinolane pentacyclique (**9**), un trachylobane (**10**), des pimaranes (**11-12**), des kauranes (**13-19**), des atisanes (**20-22**), le cembrène (**23**) et deux diterpènes de squelette rare appelés tonantzitlolone et 4'-acéoxytonantzitlolone (**24-25**) ont été identifiés (Figure 27).

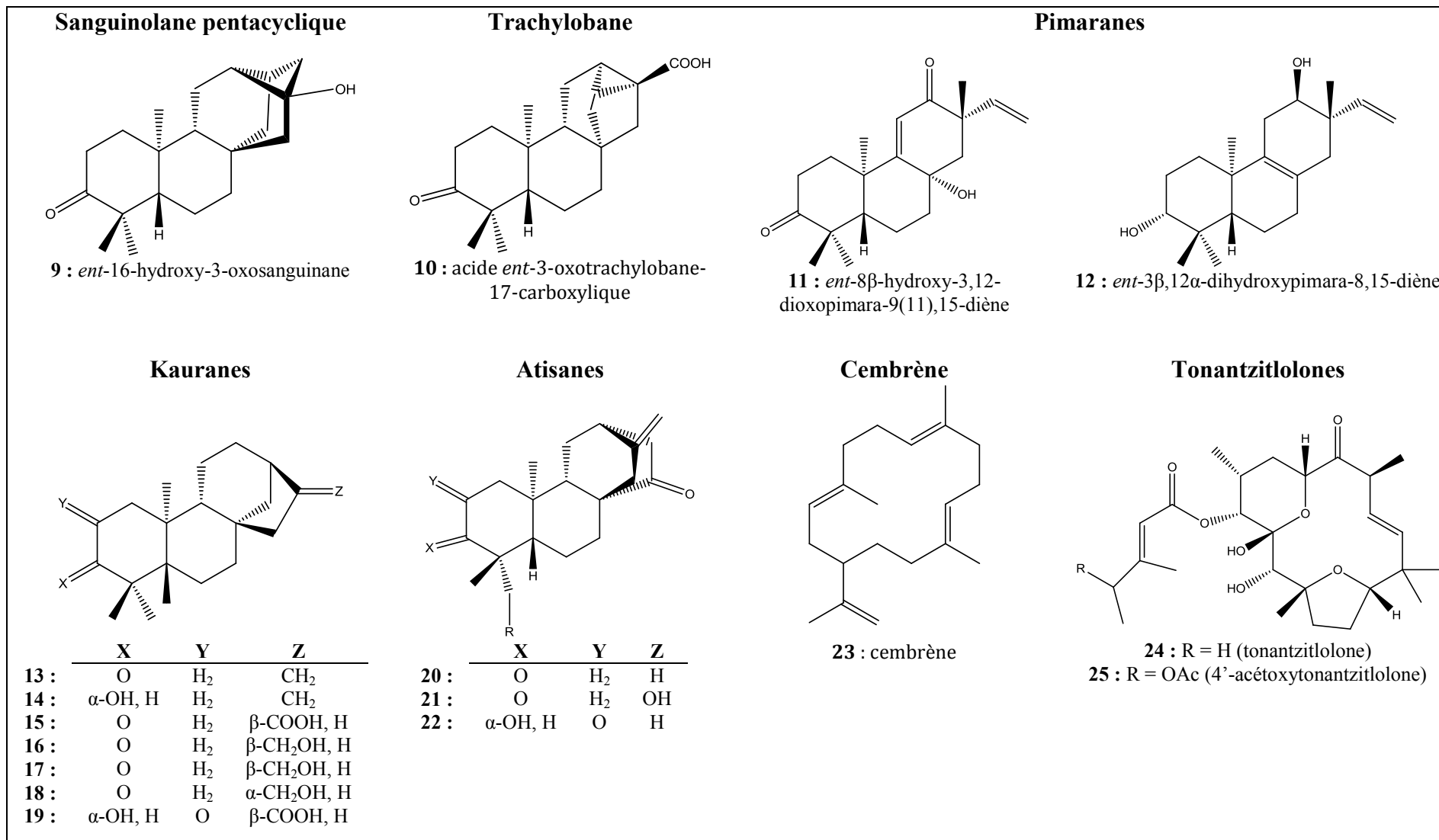


Figure 27 : Molécules isolées de *Stillingia sanguinolenta*  
 (Source : d'après Dräger *et al.*, 2007 [355])

Pour *S. oppositifolia*, cinq composés ont été isolés de la fraction hexanique de l'extrait organique des tiges : 3-épi- $\beta$ -amyrine (**26**),  $\beta$ -amyrone (**27**), acide 3-acétate aleuritologique (**28**),  $\beta$ -sistostérol (**29**) et acide palmitique. L'étude des composés volatils par CG-SM a permis également de mettre en évidence la présence de décahydro-2,6-diméthylnaphtalène, de tétradécane, de décahydro-1,1,7-triméthyl-4-méthylène-1H-cycloprop[e]azulène, et de quatre esters méthyliques d'acides gras (acides laurique, palmitique, stéarique et 9-dodécénoïque) [352].

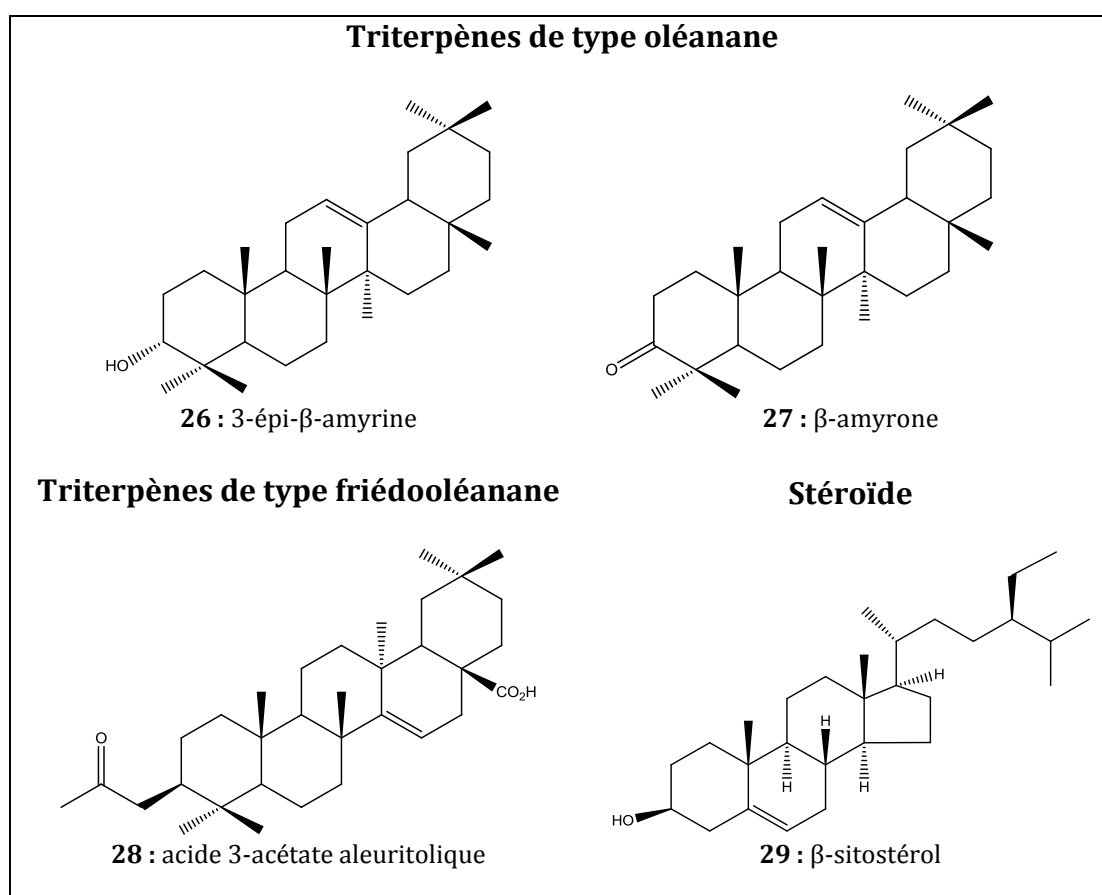


Figure 28 : Molécules isolées de *Stillingia oppositifolia*  
(Source : d'après Cota *et al.*, 2011 [352])

Le genre *Stillingia* contient donc, comme beaucoup d'espèces de la famille des Euphorbiaceae, majoritairement des composés terpéniques.

## 1.3 Les composés diterpéniques

### 1.3.1 Origine biosynthétique

Les diterpènes sont des molécules en C<sub>20</sub> issues de l'assemblage de quatre unités isopréniques (C<sub>5</sub>). Ils possèdent des structures très variables, étroitement liées à leur biogénèse. Il s'agit le plus souvent de composés cycliques. Il existe cependant des diterpènes acycliques qui peuvent être linéaires ou comporter un cycle lactonique ou éther.

Le précurseur des diterpènes est le 2*E*,6*E*,10*E*-géranylgeranylpyrophosphate (GGPP). Ce dernier peut subir deux types de cyclisation conduisant à des familles de diterpènes bien distinctes comme présenté en Figure 29. Le premier mode de cyclisation est induit par le départ du groupe diphosphate du GGPP. L'intermédiaire obtenu est un carbocation macrocyclique polyinsaturé très réactif. Ce macrocycle à 14 carbones peut se stabiliser en formant des composés de type cembranoïdes. Le cembrène isolé de *S. sanguinolenta* est issu de cette voie de biosynthèse [355].

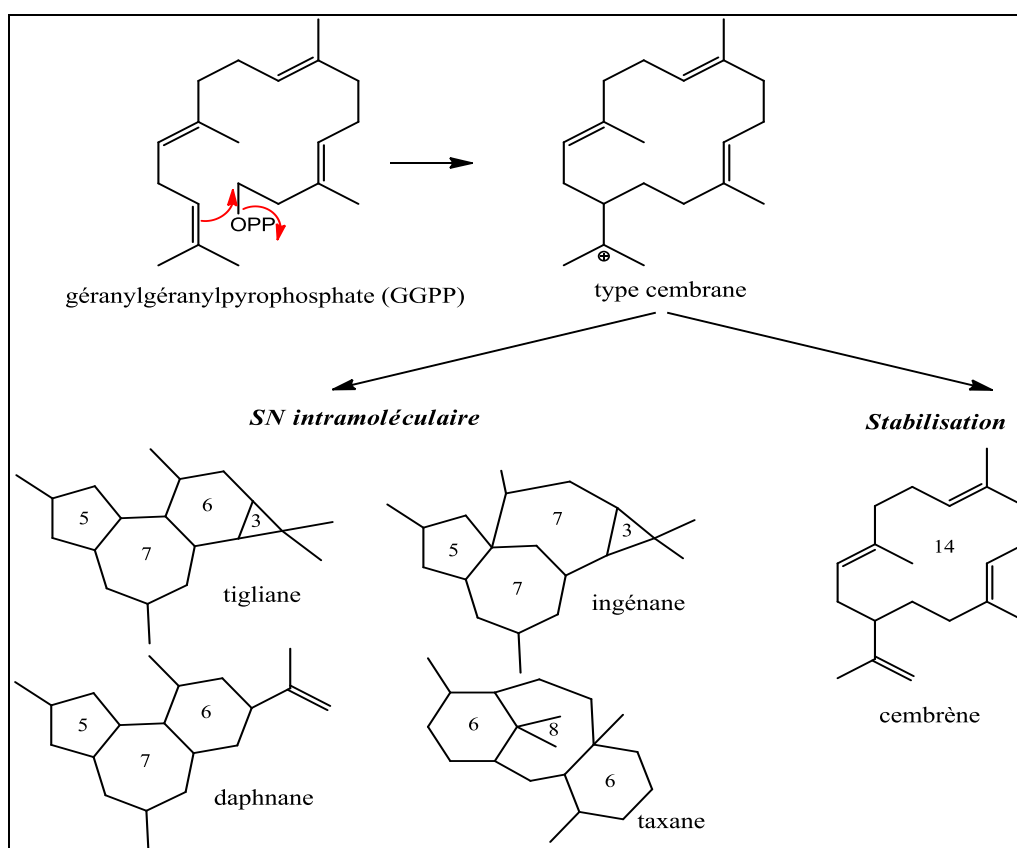


Figure 29 : Premier mode de cyclisation du GGPP  
 (Source : d'après Bruneton, 2009 [82])

Ce carbocation intermédiaire peut également, cas le plus fréquent, conduire à des structures polycycliques. Selon les substitutions nucléophiles intramoléculaires qui ont lieu, le diterpène sera de type taxane, tiglane, daphnane ou ingénane. Les daphnanes et tiglanes retrouvés chez *S. sylvatica* résultent de cette voie de biogénèse [350] (Figure 29).

Le deuxième mode de cyclisation est une cyclisation acido-catalysée. Elle conduit, dans un premier temps, à la formation de diterpènes bicycliques (décahydronaphtalènes substitués). Cette cyclisation résulte de la protonation de la double liaison C-14-C-15 du GGPP suivie de l'attaque de C-10 sur C-15 et de C-6 sur C-11 (Figure 30). Selon la conformation initiale du précurseur GGPP, deux séries énantiomères peuvent être obtenues. Ces séries diffèrent par les configurations opposées des carbones C-5, C-9 et C-10. La série « normale » correspond à un méthyle en C-10 en position  $\beta$ . La série « ent » (enantio) correspond à un méthyle en C-10 en position  $\alpha$ . La Figure 30 présente les deux énantiomères pouvant être obtenus à partir d'une configuration chaise-chaise.

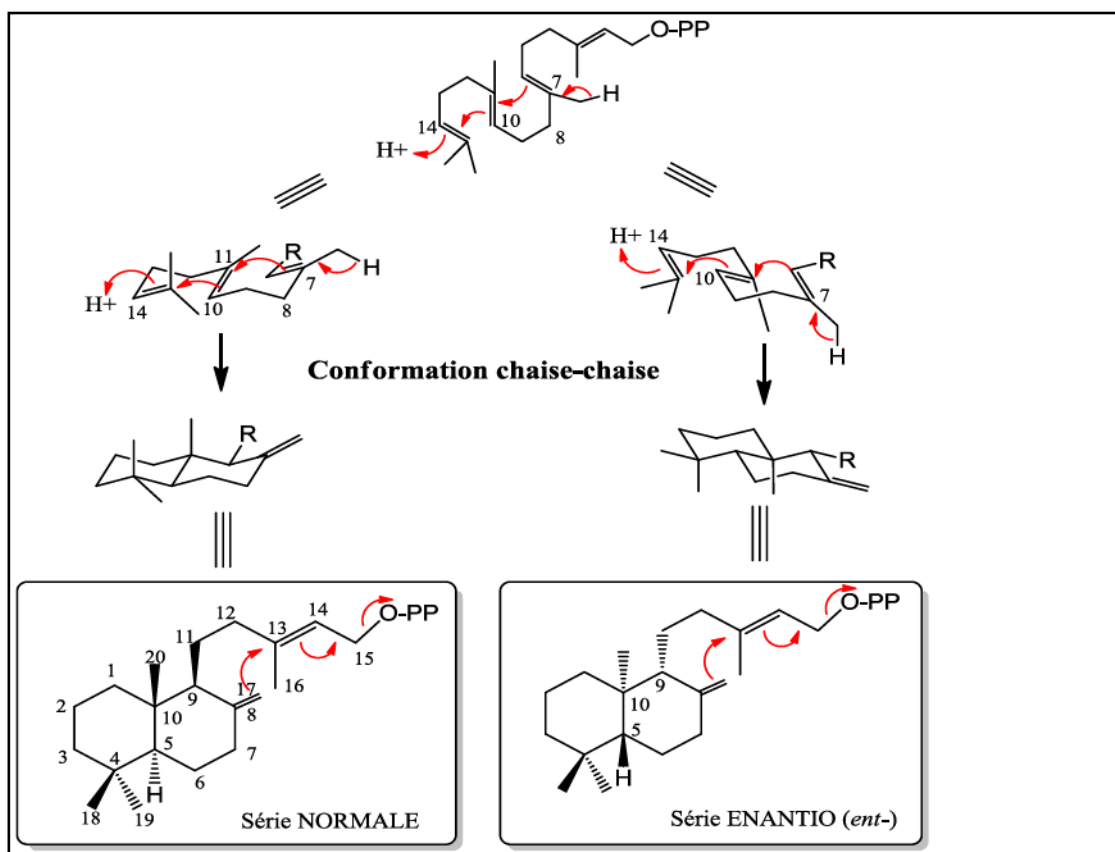


Figure 30 : Second mode de cyclisation du GGPP, formation des diterpènes bicycliques (Source : d'après Bruneton, 2009 [82])

La Figure 31 résume la formation des diterpènes tri- et tétracycliques. Les diterpènes tricycliques de type pimarane, isopimarane et abiétane sont formés à partir du diphosphate de labdadiényle selon différentes cyclisations. Les diterpènes tétracycliques (kauranes, atisanes...) sont formellement issus de la cyclisation du cation *ent*-pimarényl. Ces composés tri- et tétracycliques (pimaranes, kauranes, atisanes) ont été isolés de *S. sanguinolenta* [355].

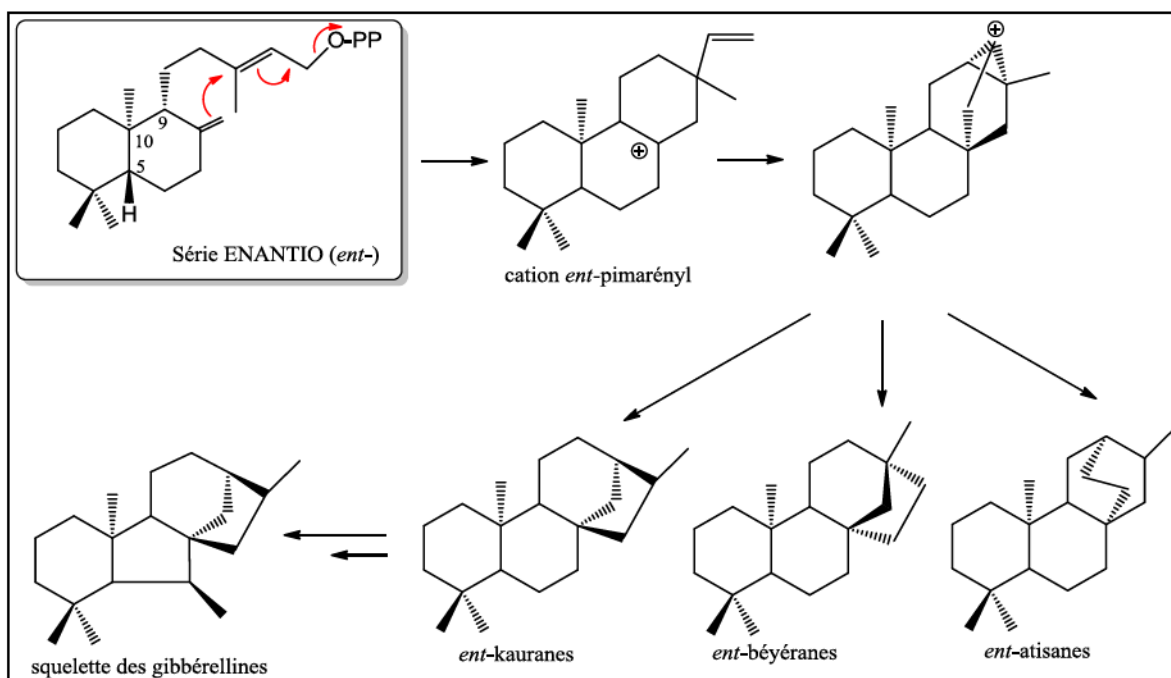


Figure 31 : Second mode de cyclisation du GGPP, formation des diterpènes tri- et tétracycliques (Source : d'après Bruneton, 2009 [82])

Le genre *Stillingia* englobe ainsi la plupart des diterpènes synthétisés à partir du GGPP selon tous les modes de cyclisation (cembrène, daphnanes, tiglianes, kauranes, atisanes, pimaranes).

### 1.3.2 Les diterpènes de type tonantzitlone

Les diterpènes de type tonantzitlone sont des macrocycles à 15 carbones. Ils sont composés de deux chaîons internes, un  $\delta$ -lactol et un tétrahydrofurane (Figure 32). Il existe de fortes liaisons hydrogènes entre le groupe hydroxyle en C-10 et les atomes d'oxygène de l'ester de la chaîne latérale, ainsi qu'entre le groupe hydroxyle en C-9 et l'atome d'oxygène du furane. Ces interactions confèrent à la molécule une structure très rigide presque sphérique. Cette compacité est renforcée par la présence

de substituants méthyles sur le macrocycle en C-3, C-7, C-11 et par la présence d'un *gem*-diméthyle en C-15.

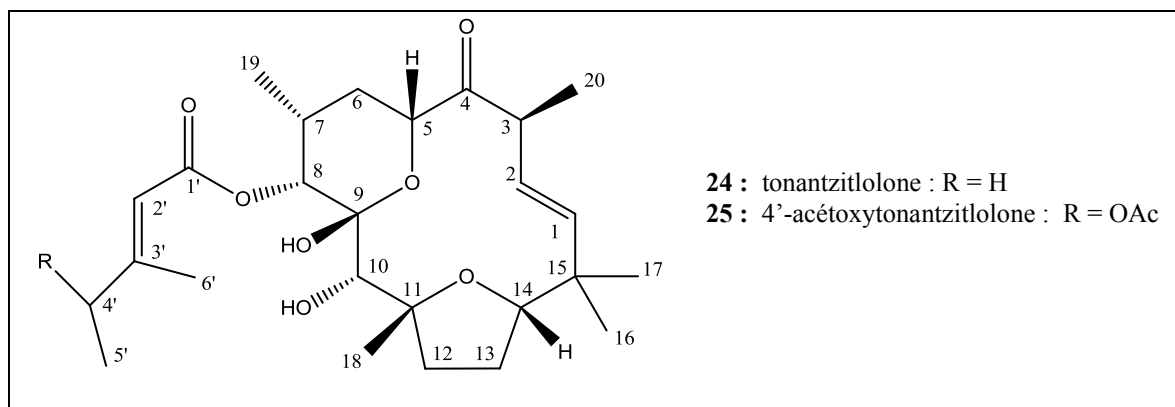


Figure 32 : Structure des diterpènes de type tonantzitlolone

Habituellement, les diterpènes macrocycliques sont formés de 14 carbones. Ils proviennent de composés cembranoïdes comme présenté en Figure 29 (*cf.* p124). Les macrocycles à 15 carbones sont extrêmement rares. En réalité, les diterpènes de type tonantzitlolone sont les seuls composés d'origine végétale à disposer d'un cycle à 15 carbones. Une seule autre molécule, le flexibilène, isolée du corail mou *Sinularia flexibilis* présente cette particularité [701, 702]

Le nom tonantzitlolone a été donné en référence à la divinité Tonantzin, « mère déesse » de la mythologie aztèque. La tonantzitlolone (**24**) et la 4'-acétoxytonantzitlolone (**25**) sont les deux seuls composés répertoriés dans la littérature. La tonantzitlolone a été isolée pour la première fois de *Stillingia sanguinolenta*, une espèce endémique du Mexique, par Dräger *et al.* [355], puis isolée de l'extrait hexanique des racines de *Sebastiania macrocarpa* [703]. La tonantzitlolone n'est donc pas un marqueur chimiotaxonomique du genre *Stillingia*.

La 4'-acétoxytonantzitlolone (**25**) a été isolée chez *Stillingia sanguinolenta* [355] et n'a pas encore été identifiée dans d'autres plantes.

Aucune étude n'est disponible sur l'activité biologique potentielle de ces molécules. La tonantzitlolone présenterait une importante activité et sélectivité sur deux lignées cellulaires cancéreuses humaines (cancer du sein et du rein) mais les résultats de ces tests n'ont pas été explicités [612].



### 1.3.3 Les pimaranes

Les pimaranes sont des diterpènes tricycliques caractérisés par la présence de deux groupements méthyles en C-10 et C-13, un *gem*-diméthyle en C-4 et un groupement vinylique en C-13 (Figure 33).

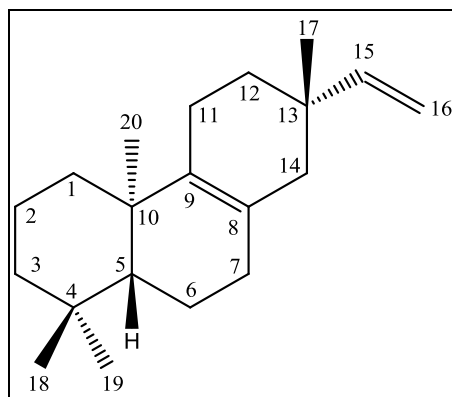


Figure 33 : Structure des diterpènes de type *ent*-pimarane

Comme indiqué précédemment (*cf.* p125), selon la conformation initiale du précurseur GGPP, deux séries énantiomères peuvent être obtenues selon la configuration des carbones C-5, C-9 et C-10. La série « normale » correspond à un méthyle en C-10 en position  $\beta$ . La série « *ent* » (énantio) correspond à un méthyle en C-10 en position  $\alpha$ .

Deux pimaranes ont été déjà été isolés de *S. sanguinolenta* : l'*ent*-8 $\beta$ -hydroxy-3,12-dioxopimara-9(11),15-diène (**11**) et l'*ent*-3 $\beta$ ,12 $\alpha$ -dihydroxypimara-8,15-diène (**12**), appartenant à la série énantio [355].

Contrairement aux tonantzitlolones, les pimaranes ont été isolés de différents genres et de différentes familles (*Viguiera arenaria* (Asteraceae) [704], *Strychnos vanprukii* (Loganiaceae) [705], *Croton* sp. (Euphorbiaceae) [706, 707], *Dysoxylum hainanense* (Meliaceae) [708], *Vernonanthura amplexicaulis* (Asteraceae) [709], *Calceolaria* sp. (Scrophulariaceae) ([710-712]), *Thuja occidentalis* (Cupressaceae), *Jungermannia truncata* (Jungermanniaceae) [713], *Gnaphalium gaudichaudianum* (Asteraceae)[714], *Orthosiphon aristatus* (Lamiaceae), *Phlomis amanica* (Lamiaceae)[715]...). Ils ont également été isolés de champignons et de mousses [716-718].

Les pimaranes ont démontré des propriétés antimicrobienne [719], antifongique [720], phytotoxique\* [716, 717, 721], anti-inflammatoire [664-667], antihypertensive [722], antituberculeuse [723], inhibitrice de l'activité du promoteur tumoral TPA (acétate de tétradécanoyl-phorbol) et cytotoxique suggérant un potentiel intéressant de chimio-prévention du cancer [707, 724, 725].

## Chapitre III-2 : Etude phytochimique de *Stillingia lineata*

### **2.1 Récolte et identification**

Deux collectes de *Stillingia lineata* ont été réalisées à Vincendo, au sud de l'île de La Réunion. La première a été faite le 07 juillet 2010. Les feuilles et l'écorce ont été collectées (lot 1). Ce matériel végétal a permis la réalisation des extraits DCM et MeOH. La deuxième collecte a été réalisée le 18 mars 2011 (lot 2). Cette matière végétale (écorce) a été collectée dans le but de réaliser le fractionnement bioguidé de l'extrait AcOEt de l'écorce. Le protocole d'extraction a été réalisé en accord avec le programme Phytochik<sup>8</sup>.

*Stillingia lineata* ssp. *lineata* a été botaniquement identifiée par le Pr. D. Strasberg de l'UMR PVBMT (Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical) de l'Université de La Réunion. Les récoltes ont été faites dans le respect de la préservation de l'espèce, en prélevant uniquement des branches secondaires. Un échantillon provenant du lot 2 a été déposé à l'Herbier Universitaire de La Réunion (REU09532).

### **2.2 Extraction**

Les matières végétales ont été séchées à l'étuve à une température inférieure à 40°C. Elles ont ensuite été broyées.

Les poudres végétales obtenues des feuilles et de l'écorce du lot 1 (respectivement 43,8 g et 545 g) ont été extraites successivement par le DCM et le MeOH au moyen de l'ASE<sup>®</sup> 300. Des rendements de 2,7 % et 17,3 % ont été obtenus pour les extraits DCM et MeOH des feuilles. Ces rendements ont été de 5 % et 16,9 % pour les extraits DCM et MeOH de l'écorce. La Figure 34 résume les différentes extractions qui ont été réalisées.

---

<sup>8</sup> Extraction directe à l'AcOEt, pas de délipidation préalable.

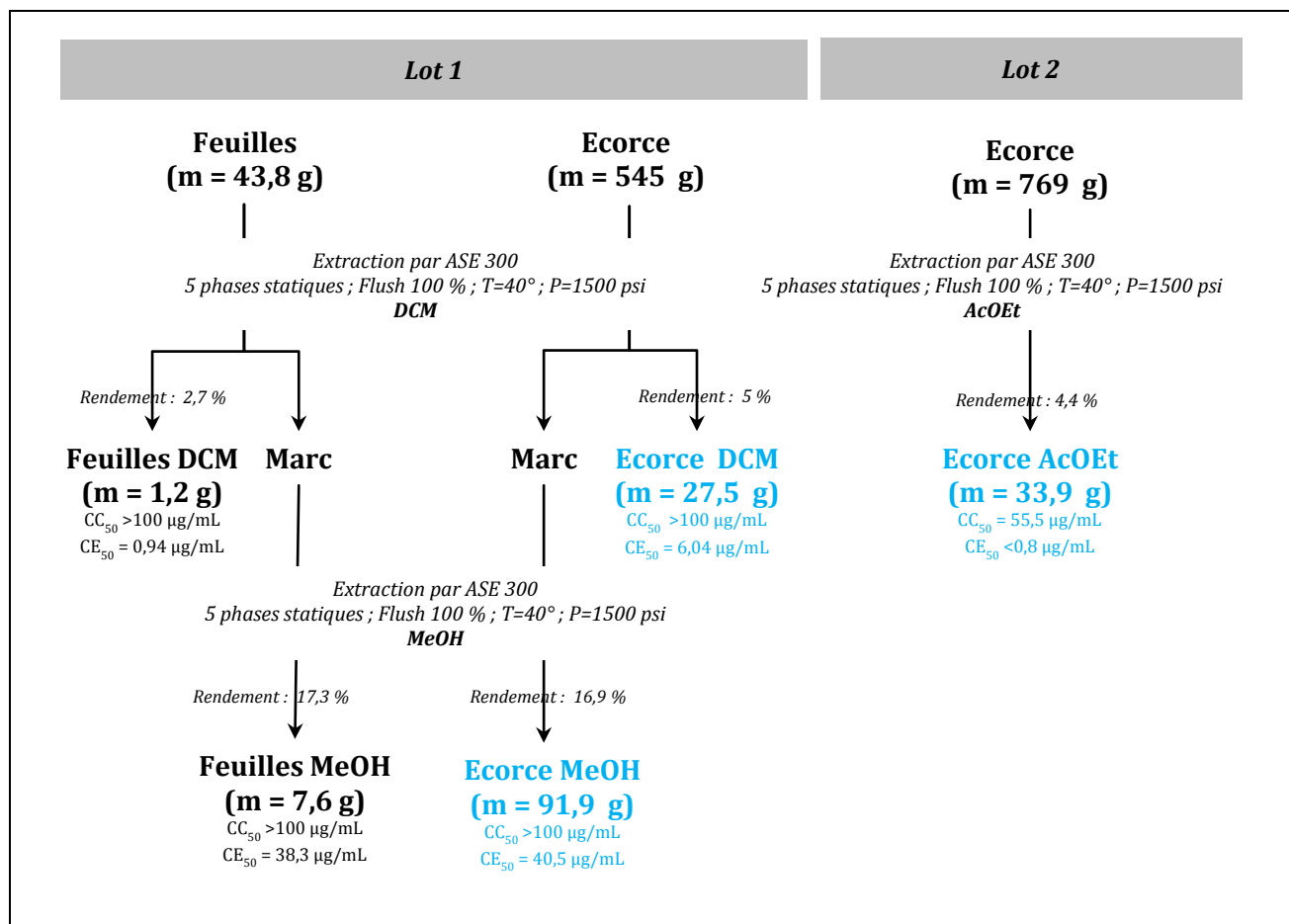


Figure 34 : Extractions des feuilles et des écorces de *Stillingia lineata*

**Légende :** Lot 1, collecté le 7 juillet 2010 ; Lot 2, collecté le 18 mars 2011

CC<sub>50</sub>, concentration cytotoxique pour laquelle 50 % d'inhibition du métabolisme des cellules saines est observé

CE<sub>50</sub>, concentration efficace pour laquelle 50 % d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules infectées est observé

En bleu sont indiqués les extraits dont l'activité antivirale a été validée après contrôle de la viabilité cellulaire par microscopie

L'écorce du lot 2 pulvérisée (769 g) a été extraite par l'AcOEt au moyen de l'ASE® 300. Un rendement de 4,4 % a été obtenu, soit 33,9 grammes d'extrait AcOEt (Figure 34).

### 2.3 Vérification de l'activité antivirale de la plante

Dans un premier temps, le test d'inhibition de la réplication virale du CHIKV a été réalisé sur l'extrait AcOEt de l'écorce de *S. lineata*. Les résultats ont été comparés à ceux préalablement obtenus du programme Phytochik. Dans un second temps, l'activité

antivirale des extraits apolaires et polaires (DCM et MeOH) des feuilles et de l'écorce a également été évaluée sur le CHIKV. L'ensemble des résultats ( $CC_{50}$  et  $CE_{50}$ ) est récapitulé en Figure 34 (cf. p131). Il est à noter que les extraits MeOH et AcOEt ont préalablement été filtrés sur cartouche de polyamide, comme ce fut le cas pour tous les extraits testés dans le cadre du programme Phytochik, afin d'éliminer les molécules trop polaires de type tanin, souvent responsables de faux positifs.

Les résultats du programme Phytochik ont révélé une  $CC_{50}$  égale à 60,9  $\mu\text{g/mL}$  et une  $CE_{50}$  inférieure à 0,8  $\mu\text{g/mL}$  pour l'extrait AcOEt de l'écorce de *S. lineata*. Dans nos travaux, des résultats identiques ont été obtenus ( $CC_{50} = 55,5 \mu\text{g/mL}$  et  $CE_{50} < 0,8 \mu\text{g/mL}$ ). Par ailleurs, le potentiel antiviral de l'écorce est plus marqué pour l'extrait DCM ( $CE_{50} = 6,04 \mu\text{g/mL}$ ) que pour l'extrait MeOH ( $CE_{50} = 40,5 \mu\text{g/mL}$  pour). L'extrait AcOEt demeure l'extrait le plus actif.

L'extrait DCM des feuilles ( $CE_{50}$  de 0,94  $\mu\text{g/mL}$ ) a présenté une activité plus importante que l'extrait MeOH ( $CE_{50} = 38,3 \mu\text{g/mL}$ ). Néanmoins le contrôle de viabilité cellulaire par microscopie a exclu ces deux extraits des candidats potentiels contre le CHIKV.

Les différents extraits de l'écorce de *S. lineata* ont tous inhibé la réplication du CHIKV (résultat confirmé par microscopie). L'extrait AcOEt, extrait le plus actif, a fait l'objet d'un fractionnement bioguidé. Les résultats de ce fractionnement, l'isolement et la caractérisation des molécules responsables de l'activité antivirale, sont détaillés ci-après.

## **2.4 Fractionnement bioguidé**

### **2.4.1 Fractionnement de l'extrait brut**

La totalité de l'extrait AcOEt de l'écorce de *S. lineata* (33,9 g) a été fractionnée par chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP) en phase normale. Un gradient Isohexane:AcOEt:MeOH de polarité croissante a été utilisé. Six fractions ont été obtenues.

Le test d'inhibition de la réplication virale du CHIKV a été réalisé sur ces six fractions par l'équipe de P. Leyssen au sein du Laboratoire de Virologie et de Chimiothérapie du Rega Institut for Medicinal Research à Louvain en Belgique. Les résultats de ces tests sont présentés dans le Tableau VIII.

*Tableau VIII*  
*Résultats du test antiviral pour les six fractions obtenues lors du fractionnement de l'extrait AcOEt de l'écorce de Stillingia lineata*

|               | <b>Masse (g)</b> | <b>CC<sub>50</sub> (µg/mL)</b> | <b>CE<sub>50</sub> (µg/mL)</b> | <b>% max d'inhibition</b> | <b>Contrôle par microscopie<sup>a</sup></b> |
|---------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---|
| Fraction SL-1 | 0,1              | > 100                          | 8,69                           | 87,9 à 19,5 µg/mL         | +   |
| Fraction SL-2 | 2,0              | > 100                          | > 100                          | 0,391 à 4 µg/mL           | -   |
| Fraction SL-3 | 8,3              | ND                             | 7,23                           | 87,4 à 25 µg/mL           | +   |
| Fraction SL-4 | 4,7              | ND                             | 2,91                           | 101 à 50 µg/mL            | +   |
| Fraction SL-5 | 3,5              | 63,1                           | 2,05                           | 121 à 20 µg/mL            | +   |
| Fraction SL-6 | 4,3              | 9,18                           | 1,78                           | 92,7 à 4 µg/mL            | -   |

**Légende :** (a) Contrôle par microscopie, Contrôle de la viabilité cellulaire par microscopie ; +, activité antivirale confirmée par microscopie ; -, activité antivirale non confirmée par microscopie

Sur les six fractions testées, quatre ont présenté un potentiel antiviral vis-à-vis du CHIKV. Il s'agit des fractions SL-1, SL-3, SL-4 et SL-5 avec respectivement des CE<sub>50</sub> de 8,69 µg/mL, 7,23 µg/mL, 2,91 µg/mL et 2,05 µg/mL. La fraction 2 n'a présenté aucune activité contre le CHIKV (CE<sub>50</sub> > 100 µg/mL). Son pourcentage maximal d'inhibition est proche d'une valeur nulle. Par ailleurs, l'activité antivirale de la fraction 6 (CE<sub>50</sub> = 1,78 µg/mL) n'a pas été validée du fait de sa cytotoxicité sur les cellules Vero saines (CC<sub>50</sub> = 9,18 µg/mL et contrôle par microscopie négatif).

Les fractionnements et purifications ont porté sur les trois fractions actives SL-3 (8,3 g), SL-4 (4,7 g) et SL-5 (3,5 g). Leurs composés majoritaires ont été isolés et leur potentiel antiviral a été évalué sur le CHIKV.

#### **2.4.2 Purification des fractions actives**

Les fractionnements et les purifications qui ont été réalisés sur les fractions actives sont présentés en Figure 35.

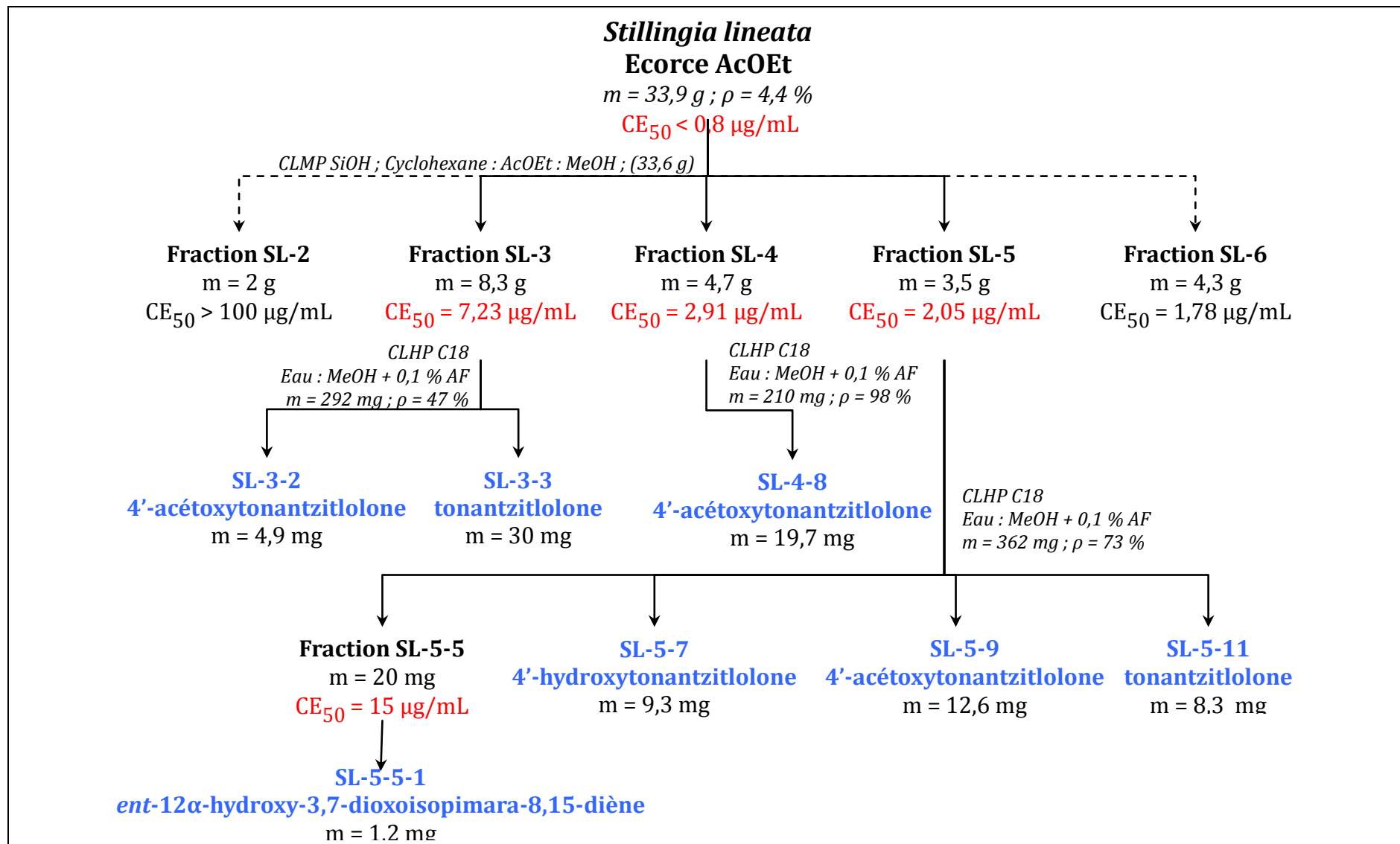


Figure 35 : Fractionnement bioguidé (test antiviral CHIKV) de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*

### ∞ Purification de la fraction SL-3

La fraction SL-3 ( $CE_{50} = 7,23 \mu\text{g/mL}$ ) a été purifiée par chromatographie liquide à haute performance préparative (CLHP). Un gradient MeOH/H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique a été utilisé (80:20 à 100:00 en 20 min, puis 100:00 en isocratique en 10 min, à 21 mL/min). La détection des pics s'est faite par un Détecteur Evaporatif par Diffusion de Lumière (DEDL) et par un détecteur UV-Visible à barrettes de diodes (PDA ou DAD). Le chromatogramme obtenu (DEDL) est présenté en Figure 36.

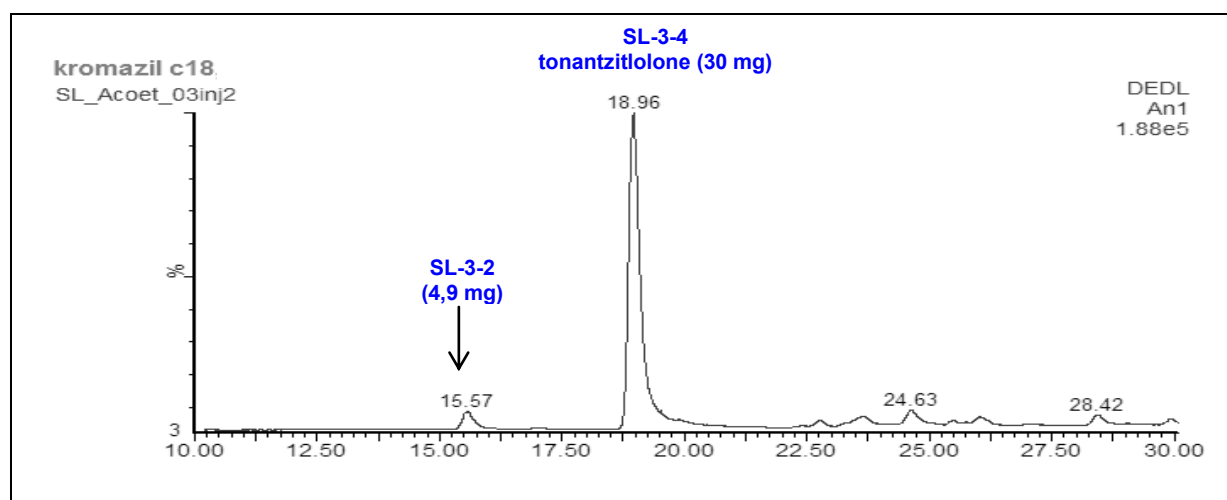


Figure 36 : CLHP de la fraction SL-3 de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*

Deux produits purs ont été obtenus. 30 mg du produit majoritaire SL-3-4, éluant à 18,9 min, ont été récupérés. Son élucidation structurale a été réalisée (cf. § 2.5.1 p139). La formule brute de ce composé, obtenue par SM-HR (Spectrométrie de Masse à Haute Résolution), ainsi que l'analyse des spectres RMN 1D et 2D ont permis d'identifier la tonantzitlone (**24**). L'évaluation biologique de cette molécule a été réalisée (cf. § 2.6.1 p162).

Un produit minoritaire (SL-3-2) a été collecté manuellement à 15,5 min. Ce composé sera présenté au paragraphe suivant (cf. composé SL-4-8 p136).



## ∞ Purification de la fraction SL-4

La fraction 4 ( $CE_{50} = 2,91 \mu\text{g/mL}$ ) a été purifiée par CLHP semi-préparative. Un gradient MeOH/H<sub>2</sub>O acidifié (+ 0,1 % d'acide formique) a été utilisé. Le chromatogramme obtenu (DEDL) est présenté en Figure 37.

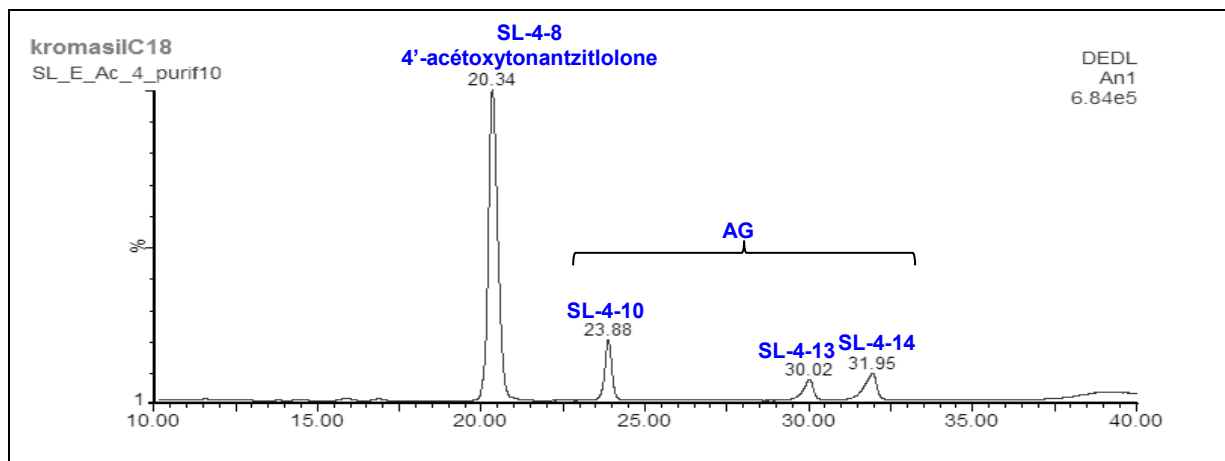


Figure 37 : CLHP de la fraction SL-4 de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*

Quatre produits ont été isolés. Le produit majoritaire (SL-4-8), éluant à 20,3 min est identique à SL-3-2. Son élucidation structurale a été réalisée (cf. § 2.5.2 p147). Le spectre RMN <sup>1</sup>H obtenu présente des signaux dans la région de 3 à 6 ppm, proches de ceux de la tonantzitlone (**24**). Sa formule brute obtenue par SM-HR et l'analyse des spectres RMN (1D et 2D) ont permis de l'identifier comme étant la 4'-acétoxytonantzitlone (**25**), le seul autre macrocycle à 15 membres, d'origine végétale, connu de la littérature [355].

Trois autres produits minoritaires (éluant à 23,8 min, 30,0 min et 31,9 min) ont été récupérés. Ils correspondent à des acides gras saturés ou insaturés (AG). Leurs spectres RMN <sup>1</sup>H révèlent la présence de signaux à 2,34 ppm (t), 1,63 ppm (m), 1,25 ppm (s) et 0,88 ppm (t) ainsi qu'à 5,33 ppm et 2,00 ppm pour les acides gras insaturés. Leur élucidation structurale n'a pas été réalisée.

∞ Purification de la fraction SL-5

La fraction 5 ( $CE_{50} = 2,05 \mu\text{g/mL}$ ) a été purifiée par CLHP préparative après optimisation du gradient d'éluion (MeOH/H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique). Le chromatogramme obtenu (DEDL) est présenté en Figure 38.

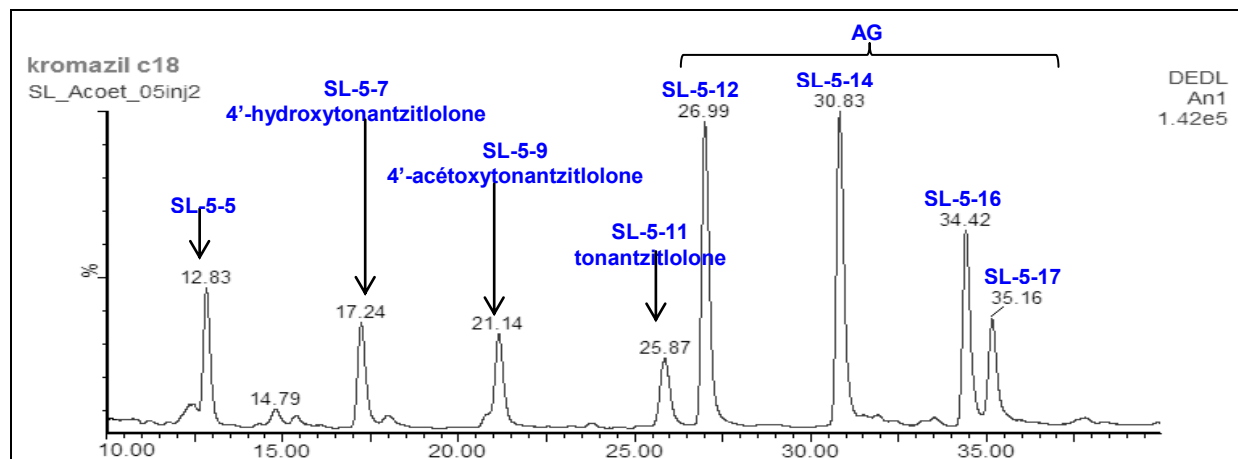


Figure 38 : CLHP de la fraction SL-5 de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*

Trois molécules pures, éluant à 17,2 min, 21,1 min et 25,8 min, ont été isolées. Les spectres RMN <sup>1</sup>H ont permis d'identifier une nouvelle fois la tonantzitlolone (SL-5-11) et la 4'-acétoxytonantzitlolone (SL-5-9). Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé SL-5-7 (9,2 mg) a révélé des similitudes avec ces deux dernières molécules. Son élucidation structurale (*cf.* § 2.5.3 p151) a permis d'identifier un nouveau macrocycle à 15 carbones, nommé 4'-hydroxytonantzitlolone.

Les quatre derniers pics majoritaires du chromatogramme (SL-5-12, SL-5-14, SL-5-16 et SL-5-17) correspondent à des acides gras en mélange.

∞ Purification de la fraction SL-5-5

La fraction SL-5-5 a été purifiée de nouveau par CLHP semi-préparative. Le nouveau pimarane *ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène a été isolé et identifié (*cf.* § 2.5.4 p155).

### 2.4.3 Présentation des composés isolés

Quatre molécules ont été isolées des fractions actives de l'extrait AcOEt de l'écorce de *S. lineata*. Les structures de ces quatre molécules sont présentées en Figure 39.

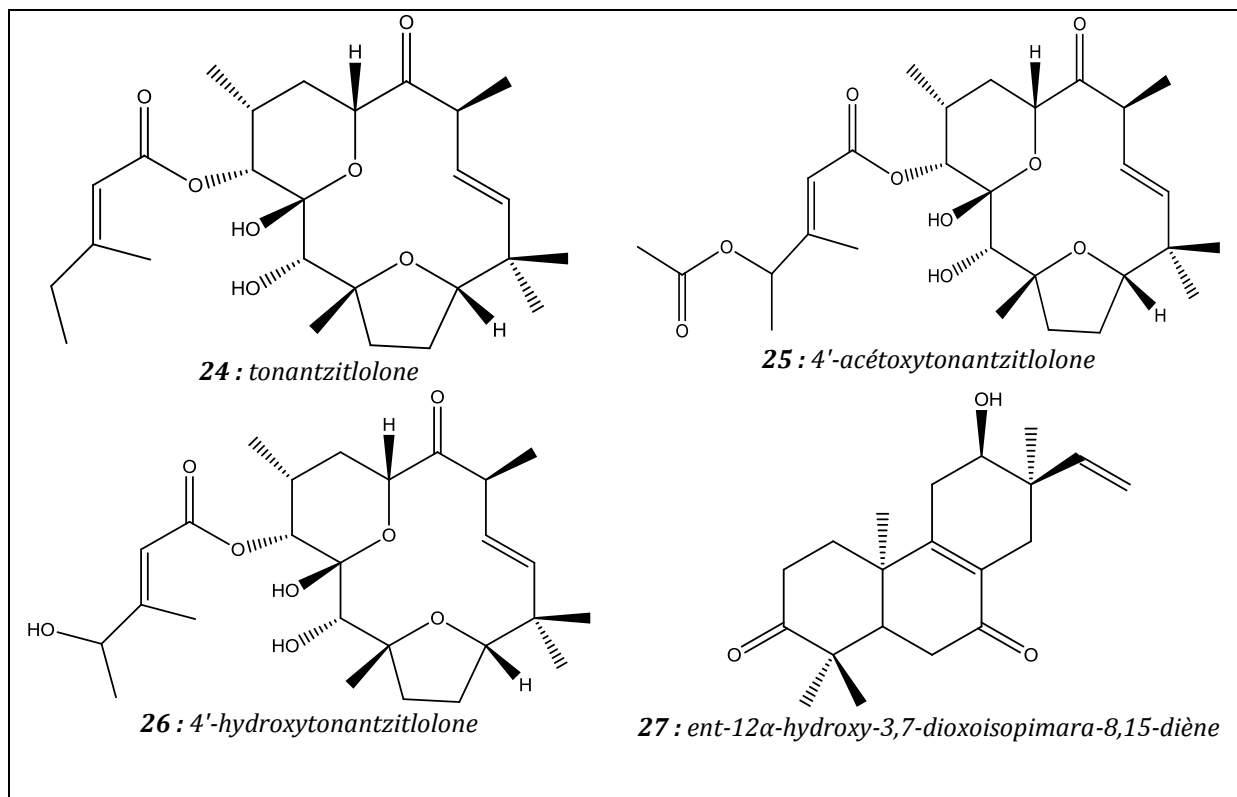


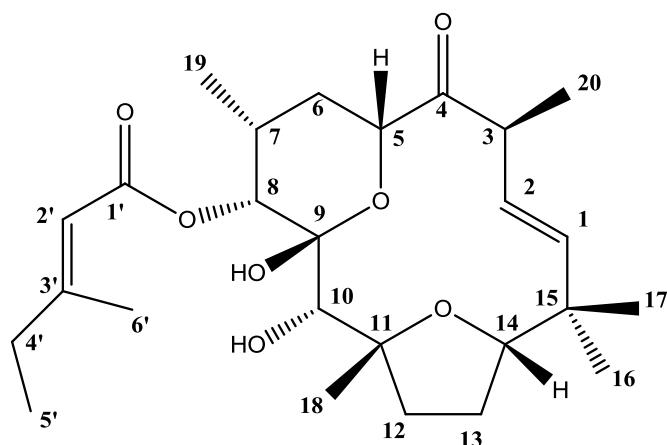
Figure 39 : Molécules isolées de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*

La tonantzitlolone et la 4'-acétoxytonantzitlolone représentent les composés majoritaires de l'extrait. Elles ont été isolées à plusieurs reprises. La 4'-hydroxytonantzitlolone et l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène sont des molécules nouvelles. La 4'-hydroxytonantzitlolone est le quatrième diterpène à 15 membres isolé de plantes ou de produits marins, connu jusqu'à présent.

## 2.5 Caractérisation des composés isolés

Trois diterpènes macrocycliques (tonantzitlolone, 4'-acétoxytonantzitlolone et 4'-hydroxytonantzitlolone) et un pimarane (*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène) ont été isolés de *S. lineata*. Leurs structures ont été déterminées par analyse des données spectroscopiques et spectrométriques (IR, UV, SM, RMN...). Ces élucidations structurales sont détaillées ci-après.

### 2.5.1 Tonantzitlolone



Le spectre de masse à haute résolution de la tonantzitlolone, obtenu par ionisation électrospray SMHRES en mode positif, révèle la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaire  $[M+Na]^+$   $m/z$  487,2688 correspondant à la formule brute  $C_{26}H_{40}O_7$  (masse calculée pour  $C_{26}H_{40}O_7Na$  487,2672). La molécule présente sept degrés d'insaturations.

En accord avec la formule brute, vingt carbones sont identifiés sur le spectre RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz). Le spectre DEPT-135 et les déplacements chimiques  $\delta_C$  révèlent la présence de six carbones quaternaires (un carbonyle de cétone, un carbonyle d'ester, un oléfinique, deux oxygénés et un quaternaire non fonctionnalisé) et de quatre méthylènes. Les corrélations  $^1J_{C-H}$  sur le spectre HSQC, les intégrations des protons et les déplacements chimiques  $\delta_H$  permettent d'identifier les carbones restants (sept méthyles et neuf méthines dont trois oléfiniques et quatre oxygénés). Les corrélations HSQC sont listées dans le Tableau IX.

Tableau IX  
 RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de la tonantzitlolone ( $\text{CDCl}_3$ , 75/300 MHz)

| Numéro Carbone | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ (multiplicité, intégration, Constante J en Hz) |
|----------------|---------------------|--|
| 1              | 140,1               | 5,85 (d, 1H, 15.5)   |
| 2              | 126,8               | 5,23 (dd, 1H, 15.5, 9.5)   |
| 3              | 49,5                | 3,33 (dq, 1H, 9.5, 7.0)  |
| 4              | 211,3               | -  |
| 5              | 74,1                | 4,62 (dd, 1H, 12.0, 3.0)   |
| 6 $\alpha$     | 28,8                | 1,84 (dt, 1H, 13.5, 3.5)   |
| 6 $\beta$      |                     | 1,40 (ddd, 1H, 13.5, 12.5, 3.0)                                    |
| 7              | 29,0                | 2,33 (dddq, 1H, 12.5, 7.0, 4.0, 2.5)                               |
| 8              | 73,2                | 4,89 (d, 1H, 2.5)  |
| 9              | 97,1                | -  |
| 10             | 78,2                | 3,43 (d, 1H, 6.0)  |
| 11             | 87,6                | -  |
| 12 $\alpha$    | 37,3                | 1,53 (ddd, 1H, 12.5, 12.5, 7.5)                                    |
| 12 $\beta$     |                     | 2,44 (dd, 1H, 12.5, 7.5)   |
| 13 $\alpha$    | 28,0                | 1,76 (ddd, 1H, 12.5, 7.5, 5.0)                                     |
| 13 $\beta$     |                     | 2,04 (dddd, 1H, 12.5, 12.5, 12.5, 7.5)                             |
| 14             | 88,9                | 3,76 (dd, 1H, 11.5, 5.0)   |
| 15             | 38,7                | -  |
| 16             | 25,4                | 0,91 (s, 3H)   |
| 17             | 25,1                | 1,14 (s, 3H)   |
| 18             | 28,1                | 1,37 (s, 3H)   |
| 19             | 17,0                | 0,84 (d, 3H, 7.0)  |
| 20             | 16,0                | 1,11 (d, 3H, 7.0)  |
| OH-9           | -                   | 5,65 (s, 1H)   |
| OH-10          | -                   | 3,10 (d, 1H, 6.0)  |
| 1'             | 166,6               | -  |
| 2'             | 113,9               | 5,69 (q, 1H, 1.5)  |
| 3'             | 163,0               | -  |
| 4'             | 33,9                | 2,17 (q, 2H, 7.0)  |
| 5'             | 11,8                | 1,07 (t, 3H, 7.5)  |
| 6'             | 19,0                | 2,15 (d, 3H, 1.5)  |

Deux hydroxyles OH-9 ( $\delta_{\text{H}}$  5,65 ppm) et OH-10 ( $\delta_{\text{H}}$  3,10 ppm) sont mis en évidence par l'absence de corrélations  $^1\text{J}_{\text{C-H}}$  sur le spectre HSQC. Les corrélations  $^1\text{J}_{\text{H-H}}$  du spectre COSY permettent la formation de sept motifs (Figure 40).

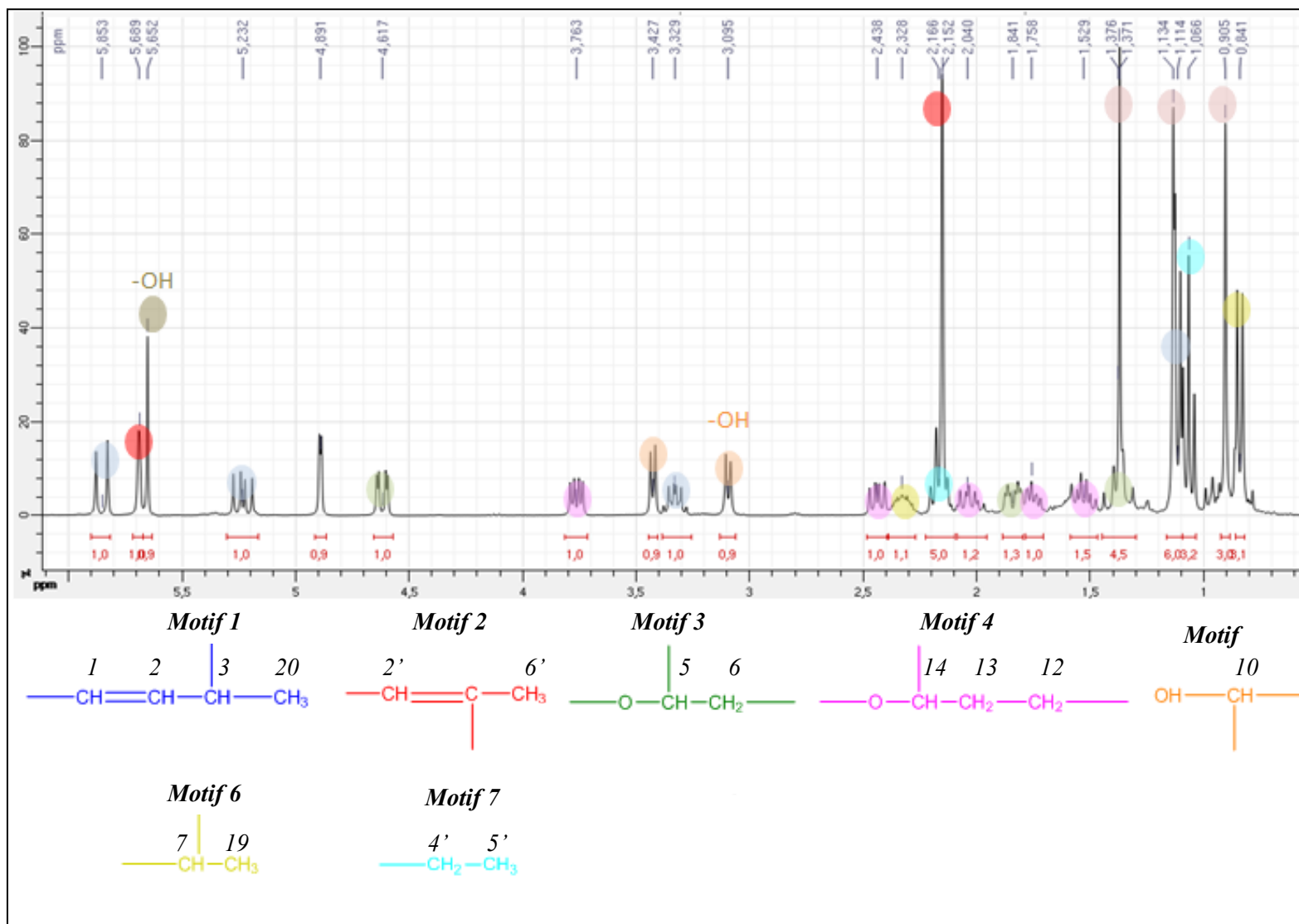


Figure 40 : Spectre  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de la tonantzitlone et motifs établis en fonction des corrélations COSY

Pour le motif 2, le méthyle terminal H-6' ( $\delta_H$  2,15 ppm) est corrélé en COSY au méthine H-2' ( $\delta_H$  5,69 ppm). La constante de couplage très faible (1,5 Hz) laisse sous-entendre la présence d'une double liaison entre ces deux protons.

Les corrélations  $^3J_{C-H}$  des méthyles terminaux ont été les points clés de cette élucidation structurale.

Le méthyle H-20 du motif 1 ( $\delta_H$  1,11 ppm) est corrélé en HMBC à la cétone C-4 ( $\delta_C$  211,4 ppm). Cette corrélation permet de définir une liaison entre cette cétone C-4 et le méthine C-3 ( $\delta_C$  49,5 ppm) du motif 1 (Figure 41). Cette cétone C-4 ( $\delta_C$  211,4 ppm) présente également des corrélations HMBC avec l'ensemble des protons du motif 1 et du motif 3. Les déplacements chimiques des protons du méthylène H-6 du motif 3 ( $\delta_H$  1,84 et 1,40 ppm) ne permettent pas d'envisager une liaison avec un carbonyle. Les motifs 1 et 3 sont donc reliés entre eux par l'intermédiaire de la cétone C-4 ( $\delta_C$  211,4 ppm) rattachée au méthine C-5 du motif 3 ( $\delta_C$  74,1 ppm).

Le méthyle H-19 du motif 6 ( $\delta_H$  0,84 ppm) est corrélé en HMBC au méthylène C-6 du motif 3 ( $\delta_C$  28,8 ppm) et au méthine oxygéné C-8 ( $\delta_C$  73,2 ppm.) Les corrélations  $^3J_{C-H}$  du méthine oxygéné H-8 ( $\delta_H$  4,89 ppm) avec le méthylène C-6 ( $\delta_C$  28,8 ppm) et du méthine oxygéné H-5 ( $\delta_H$  4,62 ppm) avec le méthylène C-7 ( $\delta_C$  29,0 ppm) permettent de confirmer une liaison entre les motifs 6 et 3 (Figure 41).

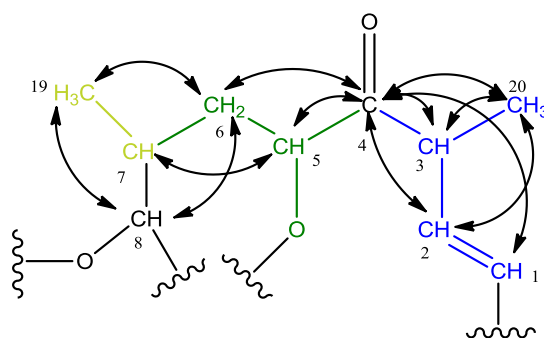


Figure 41 : Corrélations HMBC établissant les liaisons entre les motifs 1, 3 et 6 de la tonantzitlolone

Les deux méthyles C-16 ( $\delta_H$  0,91 ppm ;  $\delta_C$  25,4 ppm) et C-17 ( $\delta_H$  1,14 ppm ;  $\delta_C$  25,1 ppm) sont corrélés entre eux et voient de la même manière le proton H-1 ( $\delta_H$  5,85 ppm) du motif 1 et le proton H-14 ( $\delta_H$  3,76 ppm) du méthine oxygéné du motif 4. Ces méthyles C-16 et C-17 représentés par des singulets sont portés par un carbone quaternaire. Une corrélation entre H-16 ( $\delta_H$  0,91 ppm) et le carbone quaternaire C-15 ( $\delta_C$  38,7 ppm) se voit en HMBC. Ce carbone quaternaire C-15 ( $\delta_C$  38,7 ppm) voit également les protons H-

1 ( $\delta_H$  5,85 ppm) et H-2 ( $\delta_H$  5,23 ppm) du motif 1 (Figure 42). Les motifs 1 et 4 sont reliés entre eux par le carbone quaternaire C-15 ( $\delta_C$  38,7 ppm) portant les deux méthyles H-16 ( $\delta_H$  0,91 ppm) et H-17 ( $\delta_H$  1,14 ppm) ; il est rattaché au motif 4 par le méthine oxygéné C-14 ( $\delta_C$  88,9 ppm).

Le méthyle H-18 ( $\delta_H$  1,37 ppm), de signal singulet, est également porté par un carbone quaternaire. Pour ce méthyle H-18 ( $\delta_H$  1,37 ppm), des corrélations HMBC se voient avec le méthylène C-12 ( $\delta_C$  37,3 ppm) du motif 4, avec le méthine hydroxylé C-10 ( $\delta_C$  78,2 ppm) du motif 5 et avec le carbone quaternaire C-11 ( $\delta_C$  87,6 ppm) lui-même corrélé aux deux groupements précédemment cités (H-10 et H-12). Une corrélation  $^3J_{C-H}$  entre H-13 $\alpha$  ( $\delta_H$  1,76 ppm) et C-11 ( $\delta_C$  87,6 ppm) se voit également. Les motifs 4 et 5 sont reliés entre eux par l'intermédiaire du carbone quaternaire oxygéné C-11 ( $\delta_C$  87,6 ppm) porteur du méthyle H-18 ( $\delta_H$  1,37 ppm) (Figure 42).

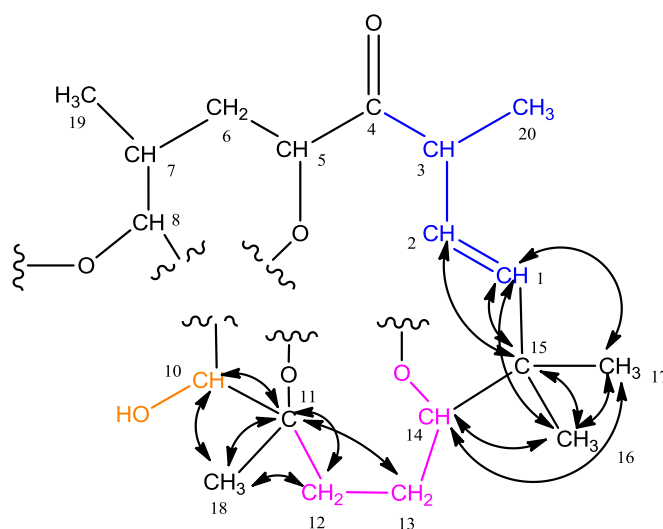


Figure 42 : Corrélations HMBC établissant les liaisons entre les motifs 1, 4 et 5 de la tonantzitlolone

Les deux derniers méthyles H-5' ( $\delta_H$  1,07 ppm) et H-6' ( $\delta_H$  2,15 ppm) sont corrélés avec le carbone quaternaire C-3' ( $\delta_C$  163,0 ppm) du motif 2 et le méthylène C-4' ( $\delta_C$  33,9 ppm) du motif 7. Ces corrélations sous-entendent une liaison entre les motifs 2 et 7 par l'intermédiaire du carbone quaternaire oléfinique C-3' ( $\delta_C$  163,0 ppm). Cette liaison est confirmée par la corrélation  $^3J_{C-H}$  entre le méthine C-2' ( $\delta_C$  113,9 ppm) du motif 2 et le méthylène C-4' ( $\delta_C$  33,9 ppm) du motif 7. Le méthyle H-6' ( $\delta_H$  2,15 ppm) du motif 2 est également corrélé au carbonyle d'ester C-1' ( $\delta_C$  166,6 ppm), lui-même corrélé au proton H-8 ( $\delta_H$  4,89 ppm). Ces corrélations permettent la formation de la chaîne latérale de la molécule.



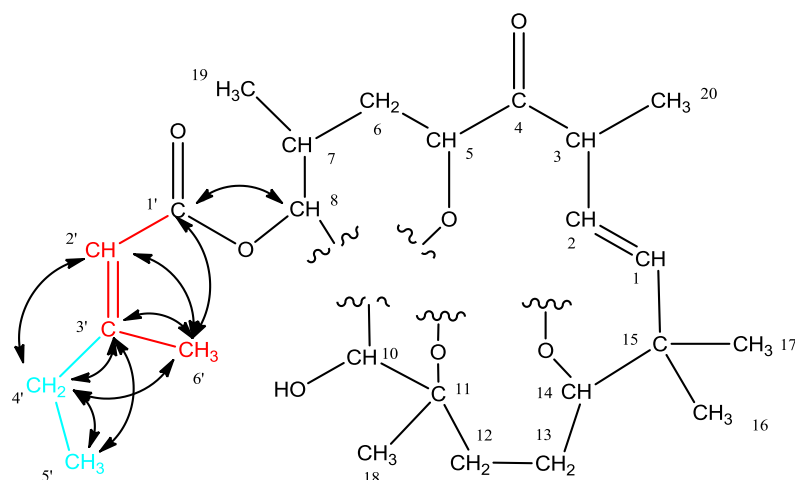


Figure 43 : Corrélations HMBC établissant les liaisons entre les motifs 2 et 7 de la tonantzilolone

Les corrélations HMBC des groupements méthyles ont permis de positionner vingt-cinq carbones sur les vingt-six que compte la molécule et trente-neuf protons sur quarante.

Le dernier proton correspond à l'hydroxyle OH-9 ( $\delta_H$  5,65 ppm) et le dernier carbone correspond au carbone quaternaire C-9 ( $\delta_C$  97,1 ppm). Sur les sept degrés d'insaturations attendus, quatre ont été placés (deux liaisons doubles et deux fonctions cétones). Les trois derniers degrés d'insaturations correspondent à la fermeture de la molécule et formation de trois cycles. Ces fermetures ont été possibles grâce aux corrélations HMBC déterminantes du carbone quaternaire C-9 restant ( $\delta_C$  97,1 ppm). Ce carbone est corrélé en HMBC aux protons H-5 ( $\delta_H$  4,62 ppm) du motif 3, H-10 ( $\delta_H$  3,43 ppm) et OH-10 (3,10 ppm) du motif 5 et H-8 ( $\delta_H$  4,89 ppm) qui est relié au motif 6 ; il se situe donc à l'interface de ces trois motifs (Figure 44). Il porte l'hydroxyle OH-9 ( $\delta_H$  5,65 ppm) (corrélations  $^2J_{H-C}$  visible en HMBC).

Le dernier degré d'insaturation est apporté par la fermeture du cycle à cinq du motif 4. Le nombre d'atomes d'oxygènes étant de huit au lieu de sept, cette liaison est confortée.

La structure finale est ainsi élucidée, la molécule isolée correspond à la tonantzilolone.

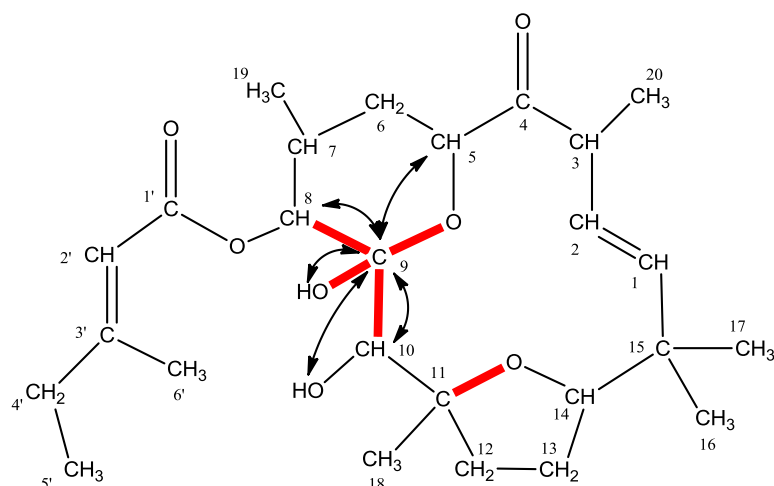


Figure 44 : Corrélations HMBC du C-9 et structure finale de la tonantzitlolone

### ∞ Structure tridimensionnelle

La tonantzitlolone présente huit centres asymétriques et deux doubles liaisons. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée à partir des corrélations observées sur le spectre NOESY et la modélisation tridimensionnelle sur le logiciel Chem3D Pro. Les principales corrélations NOESY sont présentées en Figure 45.

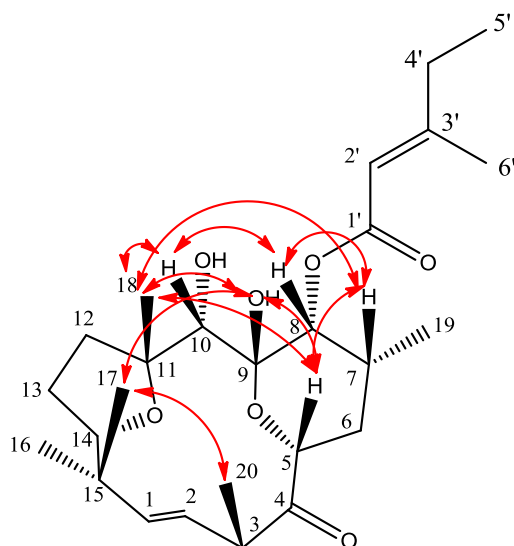


Figure 45 : Principales corrélations NOESY de la tonantzitlolone

Ainsi, les corrélations observées entre H-5/H-7, H-7/H-8, H-8/H-10, H-10/H-18, H-18/H-9, H-9/H-17, H-17/H-20 permettent de positionner ces protons du même côté de la molécule.

Par ailleurs, la tonantzitlolone a cristallisé dans du  $\text{CDCl}_3$ . L'analyse aux rayons X a permis de déterminer les configurations absolues de la molécule (Figure 46). Les données de l'analyse aux rayons X sont reportées en annexe 1.

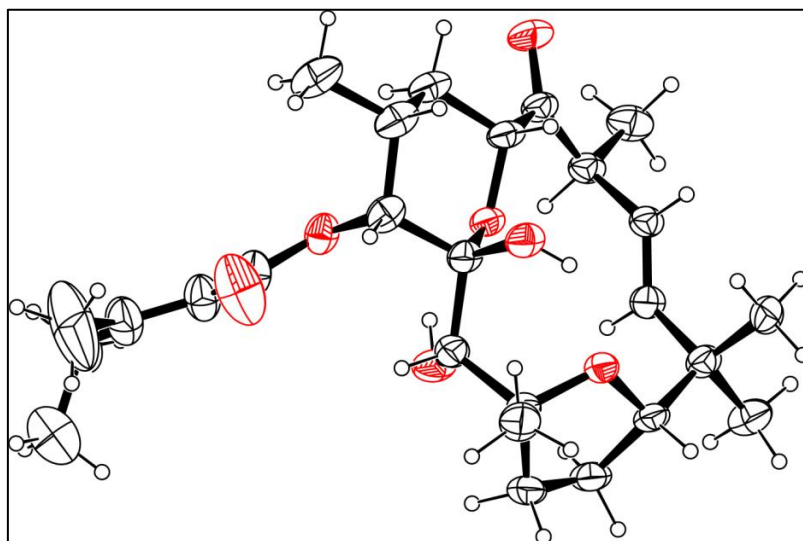
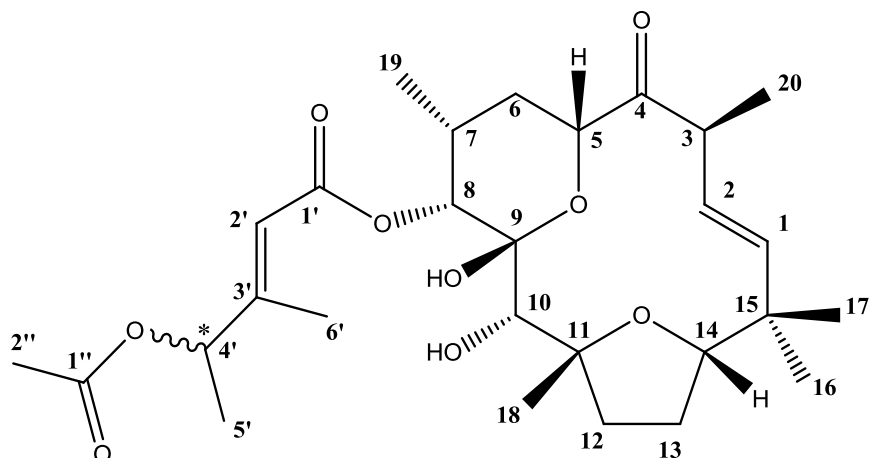


Figure 46 : Représentation ORTEP de la tonantzitlolone

Les configurations absolues de la tonantzitlolone ont été définies comme suit :  $(3S,5R,7R,8R,9R,10S,11R,14S)$ -tonantzitlolone et des configurations  $(E)$  pour les doubles liaisons C-1/C-2 et C-2'/C-3'.

### 2.5.2 4'-Acétoxytonantzitlone



Le spectre de masse haute résolution SMHRES en mode positif révèle un pic pseudomoléculaire  $[M+Na]^+$   $m/z = 545,2717$  correspondant à la formule brute  $C_{28}H_{42}O_9$  (masse moléculaire calculée pour  $C_{28}H_{42}O_9Na = 545,2727$ ). La molécule présente huit degrés d'insaturations. Le spectre  $^{13}C$  met en évidence la présence de vingt-sept carbones ; un carbone quaternaire supplémentaire C-1'' ( $\delta_C$  170,1 ppm) est décelé grâce à sa corrélation HMBC avec H-2'' ( $\delta_H$  2,08 ppm). Ces vingt-huit carbones peuvent être classés en huit méthyles, trois méthylènes, dix méthines (dont six oxygénés et trois oléfiniques) et sept carbones quaternaires (un carbonyle de cétone, deux carbonyles d'ester, deux oxygénés, un oléfinique et un quaternaire non fonctionnalisé) grâce aux déplacements chimiques  $\delta_C$ , au spectre DEPT-135 et aux couplages  $^1J_{C-H}$  observés sur le spectre HMQC. Ces couplages hétéronucléaires  $^1J_{C-H}$  permettent d'attribuer les protons aux carbones qui les portent (Tableau X).

Tableau X  
 RMN <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H de la 4'-acétoxytonantzitlolone (CDCl<sub>3</sub>, 75/300 MHz)

| Numéro Carbone | δ <sub>C</sub> | δ <sub>H</sub> (multiplicité, intégration, Constante J en Hz) |
|----------------|----------------|---|
| 1              | 140,1          | 5,85 (d, 1H, 15.0)  |
| 2              | 126,8          | 5,24 (dd, 1H, 15.5, 9.5)                                      |
| 3              | 49,5           | 3,32 (dq, 1H, 9.5, 7.0)                                       |
| 4              | 211,2          | -   |
| 5              | 74,1           | 4,62 (dd, 1H, 12.0, 3.0)                                      |
| 6α             | 28,7           | 1,84 (dt, 1H, 13.5, 3.5)                                      |
| 6β             | -              | 1,40 (ddd, 1H, 13.5, 12.5, 3.0)                               |
| 7              | 29,0           | 2,32 (dddq, 1H, 12.5, 7.0, 4.0, 2.5)                          |
| 8              | 73,7           | 4,90 (d, 1H, 2.5)   |
| 9              | 97,1           | -   |
| 10             | 78,1           | 3,40 (br.d, 1H, 6.0)  |
| 11             | 87,7           | -   |
| 12α            | 37,3           | 1,53 (ddd, 3H, 12.5, 12.5, 7.5)                               |
| 12β            | -              | 2,43 (dd, 1H, 12.5, 7.5)                                      |
| 13α            | 28,0           | 1,76 (ddd, 1H, 12.5, 7.5, 5.0)                                |
| 13β            | -              | 2,03 (dddd, 1H, 13.0, 13.0, 11.5, 7.5)                        |
| 14             | 88,9           | 3,76 (dd, 1H, 11.5, 5.0)                                      |
| 15             | 38,7           | -   |
| 16             | 25,4           | 0,91 (s, 3H)  |
| 17             | 25,1           | 1,13 (s, 3H)  |
| 18             | 28,1           | 1,37 (s, 3H)  |
| 19             | 17,0           | 0,84 (d, 3H, 7.0)   |
| 20             | 16,0           | 1,12 (d, 3H, 7.0)   |
| OH-9           | -              | 5,70 (s, 1H)  |
| OH-10          | -              | 3,05 (br.d, 1H, 6.5)  |
| 1'             | 166,3          | -   |
| 2'             | 115,2          | 5,90 (q, 1H, 1.2)   |
| 3'             | 157,6          | -   |
| 4'             | 73,8           | 5,27 (q, 1H, 6.5)   |
| 5'             | 19,1           | 1,35 (d, 3H, 7.0)   |
| 6'             | 15,2           | 2,13 (d, 3H, 1.5)   |
| 1''            | 170,1          | -   |
| 2''            | 21,2           | 2,09 (s, 3H)  |

Pour les carbones C-13 (δ<sub>C</sub> 28,0 ppm), C-18 (δ<sub>C</sub> 28,1 ppm), C-6 (δ<sub>C</sub> 28,7 ppm) et C-7 (δ<sub>C</sub> 29,0 ppm) les corrélations HMQC ne sont pas clairement détectées. Leurs attributions à des protons ont été faites au cours de l'élucidation structurale par

déduction et en comparaison avec la structure de la tonantzitlolone. Les corrélations COSY  $J_{H-H}$  et HMBC  ${}^3J_{C-H}$  permettent d'établir, en utilisant le même raisonnement que pour la tonantzitlolone, une partie de la structure (Figure 47). Quatre motifs similaires à ceux formés pour la tonantzitlolone ont été réalisés. Les corrélations COSY  $J_{H-H}$  entre les protons situés à H-8 ( $\delta_H$  4,90 ppm), H-7 ( $\delta_H$  2,32 ppm), H-6 $\alpha$  ( $\delta_H$  1,84 ppm) et H-6 $\beta$  ( $\delta_H$  1,40 ppm) permettent plus facilement d'établir la structure du motif vert correspondant au motif 3/6 de la tonantzitlolone en Figure 47.

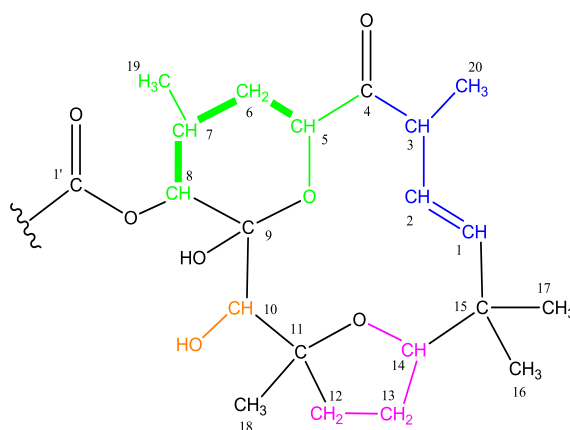


Figure 47 : Macrocycle de la 4'-acétoxytonantzitlolone

Les différences avec les spectres RMN de la tonantzitlolone concernent les signaux correspondant à la chaîne latérale de la molécule. Trois nouveaux motifs sont créés à partir des corrélations COSY  $J_{H-H}$ , deux proches de ceux de la tonantzitlolone (déplacements chimiques légèrement différents) et un carbonyle d'ester supplémentaire portant un méthyle. Ce carbonyle représente l'insaturation supplémentaire de la 4'-acétoxytonantzitlolone.

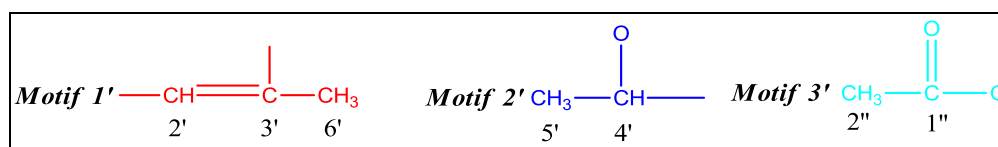


Figure 48 : Motifs de la chaîne latérale de la 4'-acétoxytonantzitlolone établis en fonction des corrélations COSY

Les corrélations HMBC permettent de relier les motifs 1' et 2' entre eux (Figure 49). Aucune corrélation HMBC ne permet de relier le carbonyle d'ester C-1'' ( $\delta_C$  170,1 ppm) du motif 3' au reste de la molécule. Sa position a été déduite grâce aux informations données par la formule brute (huit oxygènes au total soit un oxygène commun entre les carbones C-1'' ( $\delta_C$  170,1 ppm) et C-4' ( $\delta_C$  73,8 ppm) (Figure 49).

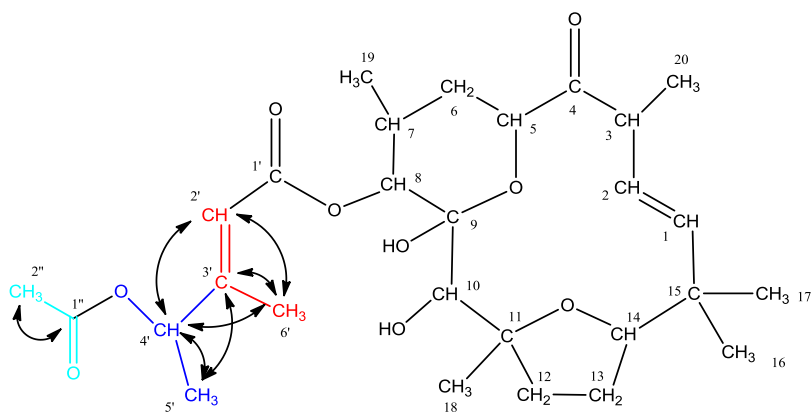


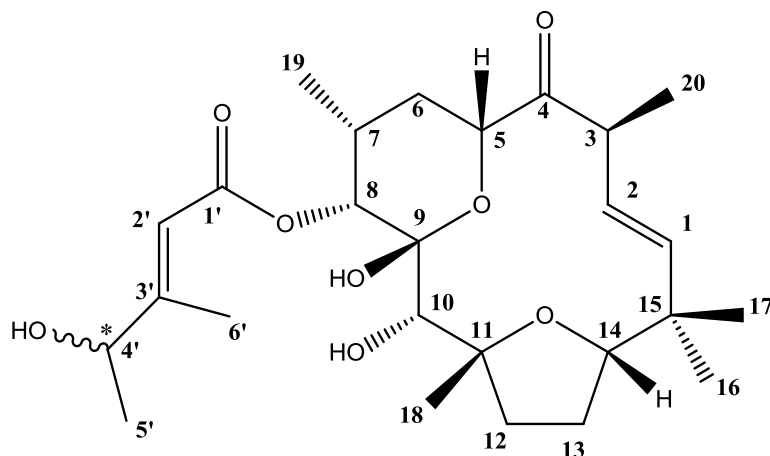
Figure 49 : Corrélations HMBC de la chaîne latérale de la 4'-acétoxytonantzitlone

### ∞ Structure tridimensionnelle

La structure tridimensionnelle de la 4'-acétoxytonantzitlone ne diffère pas de celle de la tonantzitlone. La configuration relative du nouveau centre asymétrique correspondant au C-4' ( $\delta_c$  73,8 ppm) ne peut être déterminée par les corrélations du spectre NOESY.

Sa configuration absolue est néanmoins connue grâce aux travaux de Busch *et al.* où la configuration *R* a été mise en évidence [726].

### 2.5.3 4'-Hydroxytonantzitlolone



La 4'-hydroxytonantzitlolone a pour formule brute  $C_{26}H_{40}O_8$ . Le spectre de masse à haute résolution, obtenu par ionisation électrospray SMHRES en mode négatif, révèle la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaire  $[M+Cl]^-$   $m/z$  515,2410 correspondant à la formule brute  $C_{26}H_{40}O_8$  (masse calculée pour  $C_{26}H_{40}O_8Cl$  515,2412). La molécule présente sept degrés d'insaturations.

En accord avec le spectre de masse, le spectre RMN  $^{13}C$  affiche vingt-six atomes de carbone. Les déplacements chimiques  $\delta_c$  et le spectre DEPT-135 permettent de mettre en évidence la présence de six carbones quaternaires (un carbonyle de cétone, un carbonyle d'ester, un oléfinique, deux oxygénés et un quaternaire non fonctionnalisé), trois méthylènes, sept méthyles et de dix méthines (dont trois oléfiniques et cinq oxygénés).

Le spectre RMN  $^1H$  affiche des signaux similaires à ceux retrouvés pour la tonantzitlolone et la 4'-acétoxytonantzitlolone (Figure 50).



~ 152 ~



Figure 50 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  de la 4'-hydroxytonantzitlone ( $\text{CDCl}_3$  - 300 MHz) et comparaison avec les spectres RMN  $^1\text{H}$  de la tonantzitlone et de la 4'-acétoxytonantzitlone

Le spectre  $^{13}\text{C}$  présente des signaux dont les déplacements chimiques sont identiques à ceux des carbones de la tonantzitlolone, à l'exception des carbones C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  72,4 ppm), C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  21,5 ppm) et C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  15,3 ppm). La chaîne latérale est donc modifiée. Les corrélations HSQC sont décrites dans le Tableau XI.

Tableau XI  
Données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de la 4'-hydroxytonantzitlolone ( $\text{CDCl}_3$ , 75/300 MHz)

| Position    | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ , mult., (J en Hz) |
|-------------|---------------------|--|
| 1           | 140,0               | 5,85 (d, 1H, 15.5)                     |
| 2           | 126,8               | 5,23 (dd, 1H, 15.5, 9.5)               |
| 3           | 49,5                | 3,34 (dq, 1H, 9.5, 7.0)                |
| 4           | 211,2               | -                                      |
| 5           | 74,1                | 4,62 (dd, 1H, 12.0, 3.0)               |
| 6 $\alpha$  | 28,8                | 1,85 (ddd, 1H, 13.0, 3.0, 2.5)         |
| 6 $\beta$   | -                   | 1,39 (ddd, 1H, 13.5, 12.5, 3.0)        |
| 7           | 29,0                | 2,33 (dddq, 1H, 11.5, 7.0, 4.0, 2.5)   |
| 8           | 73,5                | 4,90 (d, 1H, 2.5)                      |
| 9           | 97,0                | -                                      |
| 10          | 78,2                | 3,41 (br.d, 1H, 2.5)                   |
| 11          | 87,6                | -                                      |
| 12 $\alpha$ | 37,3                | 1,53 (ddd, 1H, 12.5, 12.5, 7.5)        |
| 12 $\beta$  | -                   | 2,41 (dd, 1H, 12.5, 7.5)               |
| 13 $\alpha$ | 28,0                | 1,76 (ddd, 1H, 12.5, 7.5, 5.0)         |
| 13 $\beta$  | -                   | 2,03 (dddd, 1H, 11.5, 11.5, 11.5, 7.5) |
| 14          | 88,9                | 3,76 (dd, 1H, 11.5, 5.0)               |
| 15          | 38,7                | -                                      |
| 16          | 25,4                | 0,91 (s, 3H)                           |
| 17          | 25,1                | 1,14 (s, 3H)                           |
| 18          | 28,1                | 1,37 (s, 3H)                           |
| 19          | 17,0                | 0,85 (d, 3H, 7.0)                      |
| 20          | 16,0                | 1,12 (d, 3H, 7.0)                      |
| OH-9        | -                   | 5,63 (s, 1H)                           |
| OH-10       | -                   | 3,15 (d, 1H, 5.5)                      |
| 1'          | 166,5               | -                                      |
| 2'          | 113,3               | 6,00 (s, 1H)                           |
| 3'          | 162,8               | -                                      |
| 4'          | 72,4                | 4,62 (dq, 1H, 6.5, 2.5)                |
| 5'          | 21,5                | 1,32 (d, 1H, 6.5)                      |
| 6'          | 15,3                | 2,12 (s, 1H)                           |
| OH-4'       | -                   | non résolu                             |

Un nouveau signal en position  $\delta_{\text{H}}$  4,26 ppm (*cf.* Figure 50), d'intégration correspondant à un proton, et couplé en HSQC au carbone C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  72,4 ppm) suggère la présence d'un carbone tertiaire portant un atome d'oxygène. Le signal de ce proton étant de type quadruplet, ce carbone est encadré par un carbone quaternaire et un carbone primaire ( $J = 6,5$  Hz). Les corrélations hétéronucléaires HMBC permettent d'identifier C-

5' ( $\delta_c$  21,5 ppm) comme étant le carbone primaire voisin (porteur de trois hydrogènes situés à 1,32 ppm de constante  $J = 6,5$  Hz et de type doublet) et C-3' ( $\delta_c$  162,8 ppm) comme correspondant au carbone quaternaire. Le reste de la structure est formé par les mêmes corrélations vues pour la tonantzitlolone (Figure 51).

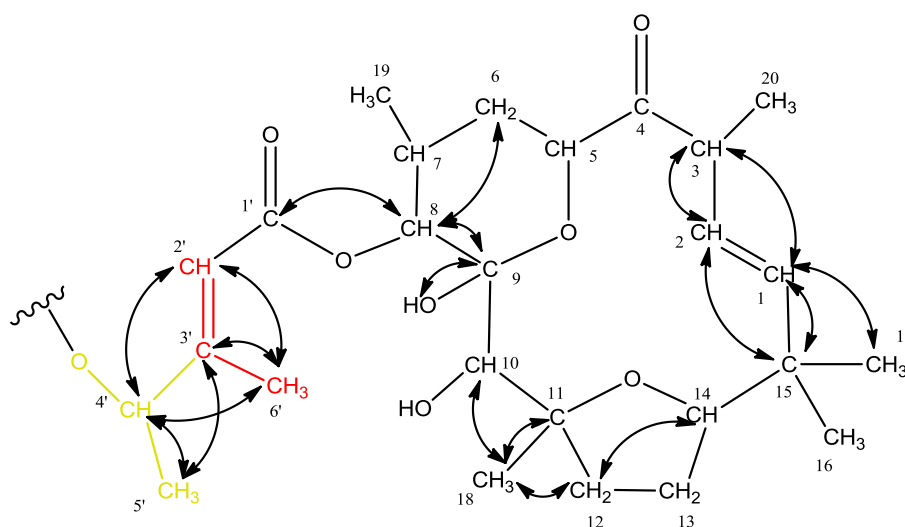


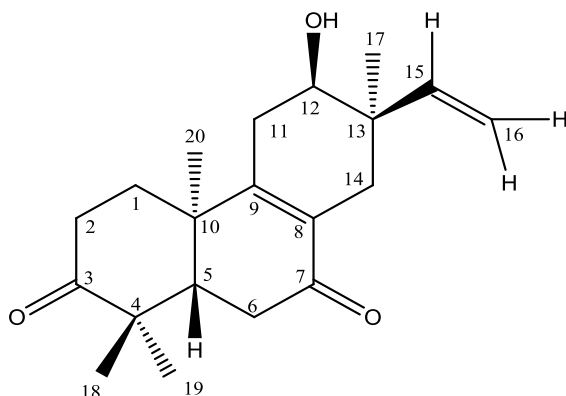
Figure 51 : Corrélations HMBC de la chaîne latérale de la 4'-hydroxytonantzitlolone

Les sept degrés d'insaturations sont retrouvés. Les vingt-six carbones et les huit oxygènes ont été positionnés. Un proton manque pour compléter la structure. Le carbone C-4' ( $\delta_c$  72,4 ppm) porte donc un hydroxyle.

### ∞ Structure tridimensionnelle

Les corrélations NOESY ne permettent pas de définir la configuration relative du carbone C-4'. La stéréochimie de ce centre stéréogène reste inconnue.

### 2.5.4 *ent*-12 $\alpha$ -Hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène



Le spectre de masse à haute résolution obtenu par ionisation électrospray SMHRES en mode positif, révèle la présence d'un pic d'ion quasi-moléculaire  $[M+H]^+$   $m/z = 317,2131$  correspondant à la formule brute  $C_{20}H_{28}O_3$  (masse calculée pour  $C_{20}H_{29}O_3 = 317,2117$ ). La molécule présente sept degrés d'insaturations.

Les corrélations HSQC sont listées dans le Tableau XII.

Tableau XII

Données RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de l'ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène ( $\text{CDCl}_3$ , 75/500 MHz)

| Position    | $\delta_{\text{C}}$ | $\delta_{\text{H}}$ , mult., (J en Hz) |
|-------------|---------------------|--|
| 1 $\alpha$  | 34,5                | 2,17 (ddd, 1H, 13.0, 6.5, 3.0)         |
| 1 $\beta$   | -                   | 1,78 (ddd, 1H, 13.5, 12.5, 6.5)        |
| 2 $\alpha$  | 34,6                | 2,74 (ddd, 1H, 16.0, 12.5, 6.5)        |
| 2 $\beta$   | -                   | 2,48 (ddd, 1H, 16.0, 6.5, 3.0)         |
| 3           | 218,8               | -                                      |
| 4           | 46,5                | -                                      |
| 5           | 49,8                | 2,20 (dd, 1H, 13.5, 4.0)               |
| 6 $\alpha$  | 35,4                | 2,46 (m, 1H)                           |
| 6 $\beta$   | -                   | 2,54 (dd, 1H, 13.5, 3.5)               |
| 7           | 204,8               | -                                      |
| 8           | 133,0               | -                                      |
| 9           | 160,8               | -                                      |
| 10          | 38,8                | -                                      |
| 11 $\alpha$ | 30,3                | 2,22 (dd, 1H, 17.5, 7.0)               |
| 11 $\beta$  | -                   | 2,58 (dd, 1H, 15.5, 5.5)               |
| 12          | 71,0                | 3,61 (dd, 1H, 9.5, 5.5)                |
| 13          | 40,0                | -                                      |
| 14 $\alpha$ | 34,2                | 2,35 (d, 1H, 17.0)                     |
| 14 $\beta$  | -                   | 2,23 (d, 1H, 17.0)                     |
| 15          | 144,7               | 5,74 (dd, 1H, 17.5, 11.0)              |
| 16 $cis$    | 115,5               | 5,22 (dd, 1H, 11.0, 1.0)               |
| 16 $trans$  | -                   | 5,18 (dd, 1H, 17.5, 1.0)               |
| 17          | 15,0                | 0,93 (s, 3H)                           |
| 18          | 21,4                | 1,11 (s, 3H)                           |
| 19          | 25,2                | 1,14 (s, 3H)                           |
| 20          | 17,3                | 1,30 (s, 3H)                           |
| OH          | -                   | 2,24 (br.s, 1H)                        |

Le spectre DEPT-135 et les déplacements chimiques  $\delta_{\text{C}}$  ont permis d'identifier treize carbones (quatre méthyles, trois méthines et six méthylènes). Cinq carbones quaternaires ont été mis en évidence grâce aux corrélations HMBC (un carbonyle de cétone, trois carbones quaternaires non fonctionnalisés et un oléfinique). Aucune corrélation n'a permis de déceler la présence des carbones quaternaires C-7 et C-8, leur présence a été déduite de la formule brute, des déplacements chimiques des carbones avoisinants ainsi que des déplacements chimiques obtenus pour le spectre  $^{13}\text{C}$  de la fraction mère SL-5-5 pour laquelle deux carbones quaternaires sont visibles aux déplacements chimiques 204,8 ppm et 133,0 ppm.

Une corrélation COSY est mise en évidence entre le méthine oléfinique H-15 ( $\delta_{\text{H}}$  5,74 ppm) et les deux protons H-16 $trans$  ( $\delta_{\text{H}}$  5,18 ppm) et H-16 $cis$  ( $\delta_{\text{H}}$  5,22 ppm) qui sont portés par C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  115,5 ppm). Les déplacements chimiques  $\delta_{\text{C}}$  et  $\delta_{\text{H}}$  suggèrent que

ces protons sont reliés entre eux par une double liaison. Par ailleurs, les constantes de couplages ont permis leurs positionnements en *trans* ou *cis*. Un premier groupement vinylique est ainsi constitué. Des corrélations HMBC sont mises en évidence entre H-18 ( $\delta_H$  1,14 ppm), intégrant pour trois protons, et C-19 ( $\delta_C$  25,2 ppm) correspondant à un méthyle. Ces méthyles sont portés par un même carbone et constituent ainsi un motif *gem*-diméthyle. Ce motif *gem*-diméthyle ainsi que la présence du groupement vinylique et de deux autres méthyles sont caractéristiques des composés de type pimaranes (cf. § 1.3.3 p.128).

Dans un premier temps, trois carbones sont corrélés en HMBC avec les protons des méthyles du *gem*-diméthyle. Il s'agit de la cétone C-3 ( $\delta_C$  218,8 ppm), du méthine C-5 ( $\delta_C$  49,8 ppm) et du carbone quaternaire non fonctionalisé C-4 ( $\delta_C$  46,5 ppm). La seule possibilité d'avoir ces corrélations est présentée à la Figure 52a. Le carbone quaternaire non fonctionalisé C-4 ( $\delta_C$  46,5 ppm) porte les deux méthyles C-18 et C-19. Il est lié à la cétone C-3 ( $\delta_C$  218,8 ppm) et au méthine C-5 ( $\delta_C$  49,8 ppm).

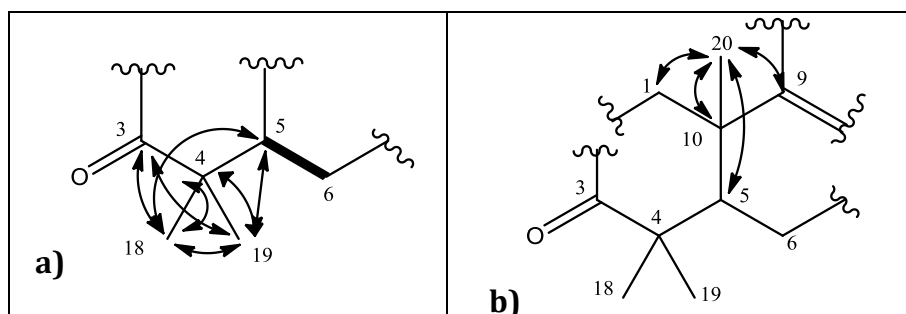


Figure 52 : Corrélation HMBC du *gem*-diméthyle de l'ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène

Le signal de H-20 ( $\delta_H$  1,30 ppm) intègre pour trois protons. Ces protons sont corrélés en HMBC au méthine C-5 ( $\delta_C$  49,8 ppm) ainsi qu'aux carbones quaternaires oléfinique C-9 ( $\delta_C$  160,8 ppm), non fonctionnalisé C-10 ( $\delta_C$  38,8 ppm) et le méthylène C-1 ( $\delta_C$  34,5 ppm). Ils ne présentent aucune corrélation en COSY, et sont donc à proximité du carbone quaternaire C-10 ( $\delta_C$  38,8 ppm). La Figure 52b présente les corrélations mises en évidence par ce méthyle C-20.

Dans un second temps, les corrélations COSY et HMBC ont confirmé l'existence d'un groupement vinyle impliquant les carbones C-15 ( $\delta_C$  144,7 ppm) et C-16 ( $\delta_C$  115,5 ppm). Une corrélation HMBC a été mise en évidence entre le carbone C-15 ( $\delta_C$  144,7 ppm) et les protons H-17 ( $\delta_H$  0,93 ppm, 3H). Ces protons H-17 ( $\delta_H$  0,93 ppm) sont

portés par le carbone C-17 ( $\delta_c$  15,0 ppm). Les différentes corrélations HMBC ont permis de définir leur environnement (Figure 53).

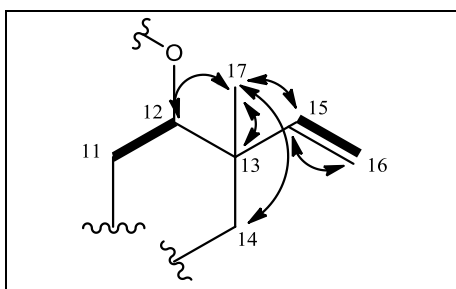


Figure 53 : Corrélations HMBC du groupement vinylique de l'ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène

Ces protons H-17 ( $\delta_H$  0,93 ppm, 3H) présentent des corrélations HMBC avec le carbone quaternaire C-13 ( $\delta_c$  40,0 ppm), le méthine oxygéné C-12 ( $\delta_c$  71,0 ppm) et le méthylène C-14 ( $\delta_c$  34,2 ppm). Ils ne sont corrélés avec aucun proton en COSY et sont donc à proximité du carbone quaternaire C-13 ( $\delta_c$  40,0 ppm). Par ailleurs, le méthine oxygéné C-12 ( $\delta_c$  71,0 ppm) est corrélé en COSY avec les protons H-11 ( $\delta_H$  2,58 ppm et 2,22 ppm). Ces derniers sont portés par le carbone C-11 ( $\delta_c$  30,3 ppm).

Dix-sept carbones sont ainsi positionnés grâce aux corrélations COSY et HMBC. La formation des trois cycles hexaniques, comme présentée en Figure 54, ramène à six le nombre de degrés d'insaturations.

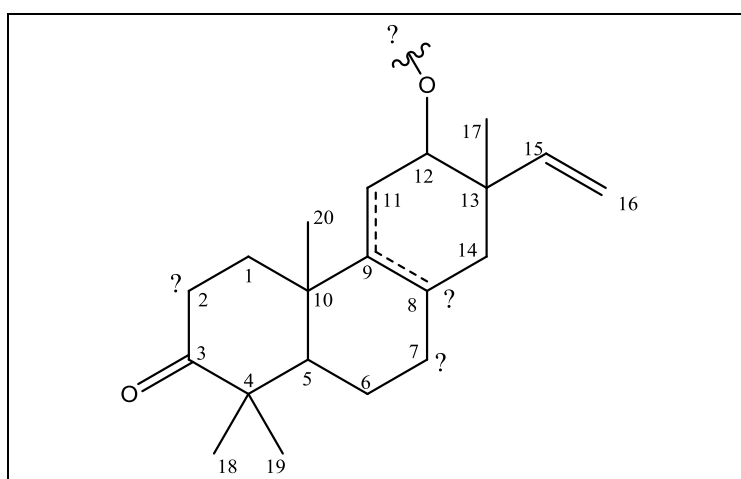


Figure 54 : Fermeture des trois cycles hexaniques de l'ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène

Le carbone C-9 ( $\delta_c$  160,8 ppm) ne peut être engagé dans une double liaison avec le carbone C-11 ( $\delta_c$  30,3 ppm) en raison de l'absence d'un proton à  $\delta_H \sim 5$  ppm en C-11, mais aussi en raison de la nature de ce dernier (méthylène). La double liaison s'effectue

donc avec C-8 ( $\delta_C$  133,0 ppm) indiquant ainsi la présence d'un carbone quaternaire oléfinique. Cette position de la double liaison est d'autant plus justifiée que les protons du C-14 ( $\delta_C$  34,2 ppm) ont un  $\delta_H$  de 2,35 et 2,23 ppm.

La formule brute ( $C_{20}H_{28}O_3$ ) indique la présence de sept degrés d'insaturations et de trois oxygènes. Il reste donc à positionner une insaturation et un oxygène. Par ailleurs, un méthylène n'a pas encore été positionné C-2 ( $\delta_C$  34,6 ppm). A ce stade, la présence d'une cétone est pressentie.

Des informations cruciales ont été données par les spectres IR et UV. Ces données ont permis de terminer la structure du pimarane en confirmant la présence d'une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée en position C-7.

Le spectre IR, présenté à la Figure 55, révèle deux bandes d'absorption à 1706,92 et à 1663,59  $cm^{-1}$ . Ces bandes mettent en évidence la présence de deux fonctions cétones. Par ailleurs, ce spectre présente une large bande d'absorption à  $\sim 3300$   $cm^{-1}$  caractéristique d'une élongation de liaison OH de fonction alcool.

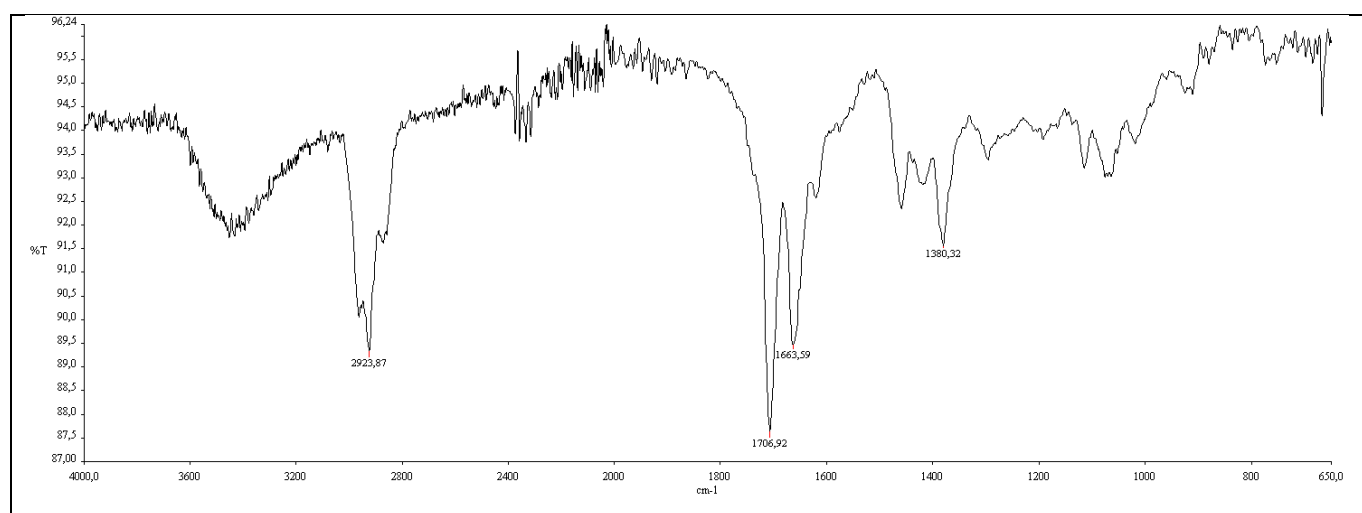


Figure 55 : Spectre IR de l'ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène

La première fonction cétone a été positionnée en C-3 ( $\delta_C$  218,8 ppm) grâce aux corrélations HMBC. Le positionnement de la deuxième fonction a été possible grâce aux informations du spectre UV, qui révèle une absorption à 243 nm caractéristique d'une cétone  $\alpha,\beta$ -insaturée, ce qui la situe en C-7 ( $\delta_C$  204,8 ppm) (Figure 56).



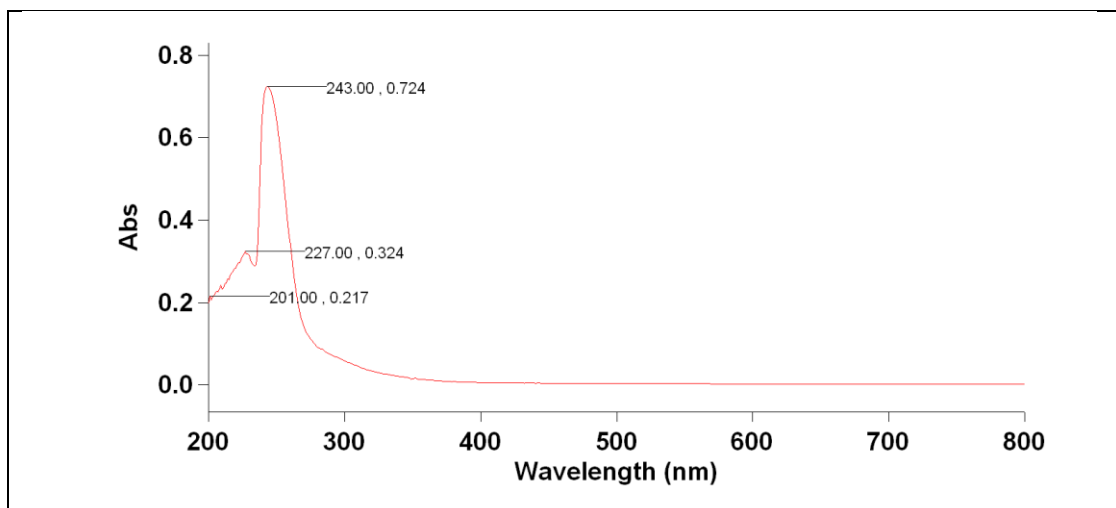


Figure 56 : Spectre UV-Visible de l'ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène

La structure plane du pimarane est ainsi élucidée. Il s'agit du 12-hydroxy-3,7-dioxopimara-8,15-diène. Elle est présentée à la Figure 57.

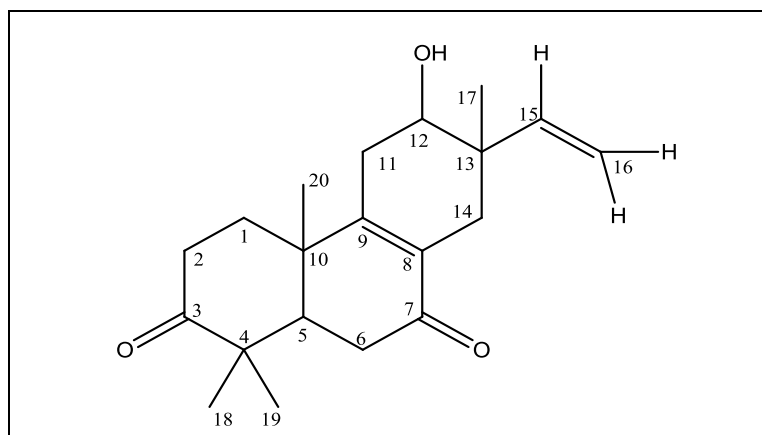


Figure 57 : Structure plane du 12-hydroxy-3,7-dioxopimara-8,15-diène

L'attribution des protons pour les carbones C-1 ( $\delta_C$  34,5 ppm/  $\delta_H$  1,78 ppm et 2,17 ppm) et C-2 ( $\delta_C$  34,6 ppm /  $\delta_H$  2,74 ppm et 2,48 ppm) a été faite par comparaison avec la littérature (C-1 et C-2 de l'ent-8 $\beta$ -hydroxy-3,12-dioxopimara-9(11),15-diène isolé par Dräger *el al.* [355]) et grâce aux corrélations COSY observées entre les protons H-2 ( $\delta_H$  2,74 ppm et 1,78 ppm) et H-1 ( $\delta_H$  2,17 ppm et 2,48 ppm).

∞ Stéréochimie du composé isolé :

Plusieurs possibilités sont à envisager pour cette molécule. Il peut s'agir d'un pimarane (le groupe éthylène est en *syn* du méthyle en C-10) ou d'un isopimarane (les deux groupes sont en *anti* l'un de l'autre). Par ailleurs pour ces composés, une classification existe selon l'orientation du méthyle en C-10 et des protons H-5 et H-9. La série *ent* présente un méthyle en C-10 en position  $\alpha$ . Les corrélations NOESY, les valeurs des constantes de couplages et la modélisation tridimensionnelle sur le logiciel Chem3D Pro ont permis de définir la stéréochimie relative de cette molécule.

Au vue des constantes de couplages, les protons H-2 $\beta$  ( $\delta_H$  2,48 ppm) et H-1 $\alpha$  ( $\delta_H$  2,17 ppm) doivent être positionnés en équatorial-équatorial, les protons H-5 ( $\delta_H$  2,20 ppm) et H-6 $\beta$  ( $\delta_H$  2,54 ppm) doivent être positionnés en axial-équatorial, et les protons H-11 $\beta$  ( $\delta_H$  2,58 ppm) et H-11 $\alpha$  ( $\delta_H$  2,22 ppm) respectivement en équatorial et en axial.

Les corrélations NOESY importantes sont représentées en Figure 58. Principalement on note une corrélation entre les protons H-20 ( $\delta_H$  1,30 ppm) et H-2 $\alpha$  ( $\delta_H$  2,74 ppm), qui positionne H-20 en  $\alpha$  et confirme une structure de type *ent*. Par ailleurs H-15 ( $\delta_H$  5,74 ppm) est corrélé à H-12 ( $\delta_H$  3,61 ppm) et à H-14 $\beta$  ( $\delta_H$  2,23 ppm) et H-17 ( $\delta_H$  0,93 ppm) est corrélé à H-16 $trans$  ( $\delta_H$  5,18 ppm), non corrélé à H-16 $cis$  ( $\delta_H$  2,23 ppm) et corrélé à H-14 $\alpha$  ( $\delta_H$  2,35 ppm) et H-11 $\alpha$  ( $\delta_H$  2,22 ppm). Ces corrélations permettent de confirmer qu'il s'agit d'un isopimarane et de proposer la structure finale de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène.

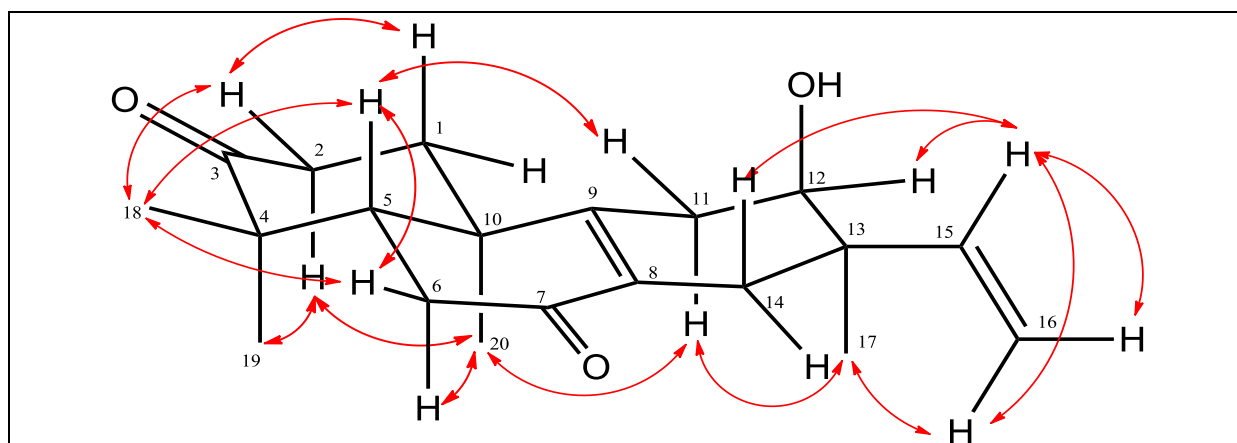


Figure 58 : Corrélations NOESY de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène

La valeur négative de  $[\alpha]_D$  obtenue pour ce composé ( $-225^\circ$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,20 \text{ mg/mL}$ ) conforte une structure de type énanti.

## **2.6 Activités antivirales ciblant le CHIKV des composés isolés**

### **2.6.1 Résultats du test antiviral**

L'activité antivirale des molécules isolées de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata* (Lam.) Müll. Arg. a été évaluée sur le CHIKV. Le Tableau XIII présente les valeurs de CE<sub>50</sub> et de CC<sub>50</sub> qui ont été obtenues. Les valeurs ont été exprimées en µg/mL.

Le rapport entre la CC<sub>50</sub> et la CE<sub>50</sub> donne l'indice de sélectivité (IS). Plus cet indice est élevé, plus le composé inhibe sélectivement la réplication virale du CHIKV. La vérification de la viabilité cellulaire effectuée par microscopie permet de confirmer l'activité antivirale de la molécule.

*Tableau XIII*  
*Evaluation biologique des molécules isolées de Stillingia lineata sur le CHIKV (en µg/mL)*

| <b>Composé</b>  | <b>Code</b> | <b>CC<sub>50</sub></b> | <b>CE<sub>50</sub></b> | <b>IS</b> | <b>Contrôle par microscopie<sup>a</sup></b> |
|---|-------------|------------------------|------------------------|-----------|---|
| tonantzitlolone <b>(24)</b>   | SL-3-4      | >100                   | 66,3                   | >1,5      | -   |
| 4'-acétoxytonantzitlolone <b>(25)</b>   | SL-5-9      | 36,1                   | 4,10                   | 8,8       | +   |
| 4'-hydroxytonantzitlolone <b>(26)</b>   | SL-5-7      | 53,0                   | 16,3                   | 3,24      | -   |
| fraction SL-5-5 contenant<br>l'ent-12α-hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène<br><b>(27)</b> | SL-5-5      | 67,7                   | 15,0                   | 4,5       | +   |

**Légende :** (a) Contrôle de la viabilité cellulaire par microscopie ;

+, activité antivirale confirmée par microscopie ; -, activité antivirale non confirmée par microscopie

Parmi les diterpènes de type tonantzitlolone, la 4'-acétoxytonantzitlolone a présenté une capacité à inhiber sélectivement la réplication virale du CHIKV. Sa CE<sub>50</sub> a été obtenue à 4,10 µg/mL et son indice de sélectivité est de 8,8.

La tonantzitlolone est la moins active des trois composés de cette série (CE<sub>50</sub> = 66,3 µg/mL) et n'a pas été retenue comme candidat potentiel contre le CHIKV. Par ailleurs, la 4'-hydroxytonantzitlolone n'a pas été validée en tant que candidat potentiel contre le CHIKV, bien que sa valeur de CE<sub>50</sub> soit relativement faible (16,3 µg/mL).

Le composé *ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène n'a pu être testé contre le CHIKV en raison de la faible masse récupérée. Néanmoins, il est intéressant de noter que la fraction SL-5-5 a présenté une CE<sub>50</sub> de 15  $\mu$ g/mL et a répondu positivement au test antiviral.

∞ Les diterpènes de type tonantzitlolone actifs contre le CHIKV ?

Comme indiqué en Figure 35 (cf. p.134), la tonantzitlolone et la 4'-acétoxytonantzitlolone ont été isolées à plusieurs reprises. Toutes les molécules ont été testées contre le CHIKV.

Nous avons remarqué que les valeurs de CE<sub>50</sub> variaient d'une évaluation à une autre. A chaque test, la tonantzitlolone a présenté une activité négative contre le CHIKV. Les valeurs de CE<sub>50</sub> variaient de 66,3  $\mu$ g/mL pour SL-3-4 à > 100  $\mu$ g/mL pour SL-5-11.

Pour la 4'-acétoxytonantzitlolone isolée en SL-3-2, SL-4-8 et SL-5-9, les valeurs de CE<sub>50</sub> ont été respectivement de 17,9  $\mu$ g/mL, 18,1  $\mu$ g/mL et de 4,1  $\mu$ g/mL. Les observations de la viabilité cellulaire par microscopie ont validé l'activité antivirale de la 4'-acétoxytonantzitlolone pour SL-4-8 et SL-5-9. Pour le composé SL-5-9, qui a présenté le potentiel antiviral le plus élevé, la pureté a été vérifiée par CLHP. Le chromatogramme obtenu est présenté en Figure 59.

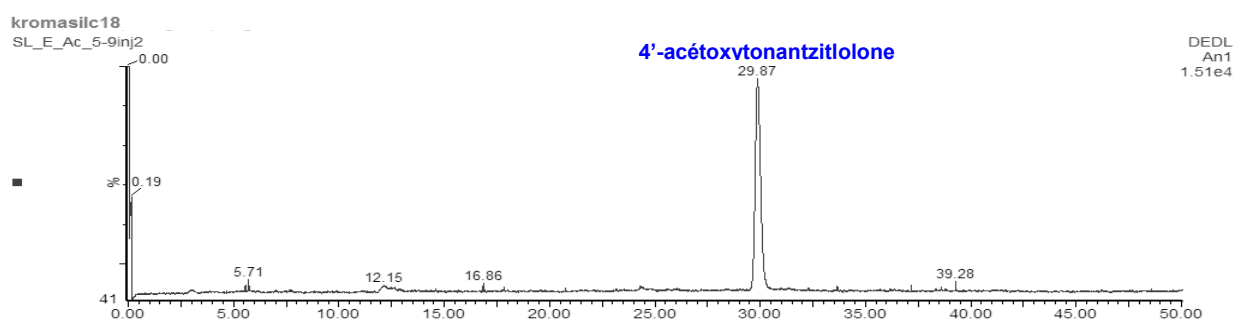


Figure 59 : Vérification de la pureté de la 4'-acétoxytonantzitlolone (composé SL-5-9) par CLHP-DEDL

Il est intéressant de remarquer que la 4'-acétoxytonantzitlolone a été isolée de toutes les fractions présentant une capacité à inhiber la réplication virale du CHIKV (SL-3, SL-4 et SL-5). Aussi, pour la fraction SL-4, la CCM récapitulative obtenue après fractionnement par CHLP montre sans ambiguïté que l'activité réside là où il y a présence de 4'-acétoxytonantzitlolone (Figure 60).

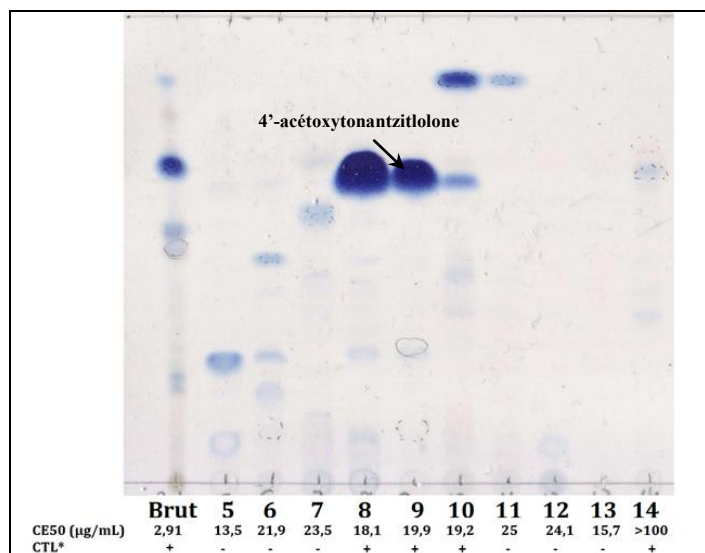


Figure 60 : CCM récapitulative du fractionnement de la fraction SL-4 de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*  
**Légende :** CTL, contrôle de la viabilité cellulaire par microscopie

Les fractions SL-4-8, SL-4-9, SL-4-10 et SL-4-14 contiennent la 4'-acétoxytonantzitlone. Elles ont toutes montré un potentiel antiviral contre le CHIKV.

La 4'-acétoxytonantzitlone est donc bien responsable de l'activité anti-CHIKV de la plante. Il est néanmoins important de noter, qu'au cours des différents fractionnements, l'activité antivirale a été retrouvée dans des fractions ne contenant pas de 4'-acétoxytonantzitlone telle que la fraction SL-5-5. Par ailleurs, l'activité antivirale de l'extrait brut AcOEt de l'écorce de *S. lineata* ( $CE_{50} < 0,8 \mu\text{g/mL}$ ) est plus importante que celle du composé isolé, 4'-acétoxytonantzitlone ( $CE_{50} = 4,1 \mu\text{g/mL}$ ). Ces indications suggèrent la présence d'autres composés minoritaires contribuant à l'activité antivirale de la plante.

Dans le cadre du programme Phytochik, d'autres équipes ont travaillé parallèlement à l'isolement de candidats contre le CHIKV [727]. En particulier, les travaux récents réalisés par Allard *et al.* ont mis en évidence l'activité antivirale de daphnanes de type orthoester présentant des  $CE_{50}$  parfois inférieures au micromolaire [728, 729]. Ces composés ont été isolés d'espèces appartenant à la famille des Euphorbiaceae et au genre *Trigonostemon*.

La présence de diterpènes de type daphnane est mentionnée dans la littérature pour *S. sylvatica* (cf. Figure 26 § 1.2.4 p.121). La suite des investigations sur *S. lineata* a

donc été consacrée à l'isolement éventuel de ces diterpènes. Plusieurs fractionnements ont été réalisés, mais aucun n'a permis l'isolement de ces composés.

## 2.6.2 Relations structure-activité des tonantzitlolones

Les trois diterpènes de type tonantzitlolone isolés diffèrent par la présence ou non d'un substituant oxygéné en position 4'. La Figure 61 met en évidence ces différences structurales ainsi que les valeurs de  $CE_{50}$  obtenues (en  $\mu\text{M}$ ) pour chaque composé. La chloroquine, qui est utilisée comme témoin interne de ce test antiviral, est active à 11  $\mu\text{M}$  contre le CHIKV.

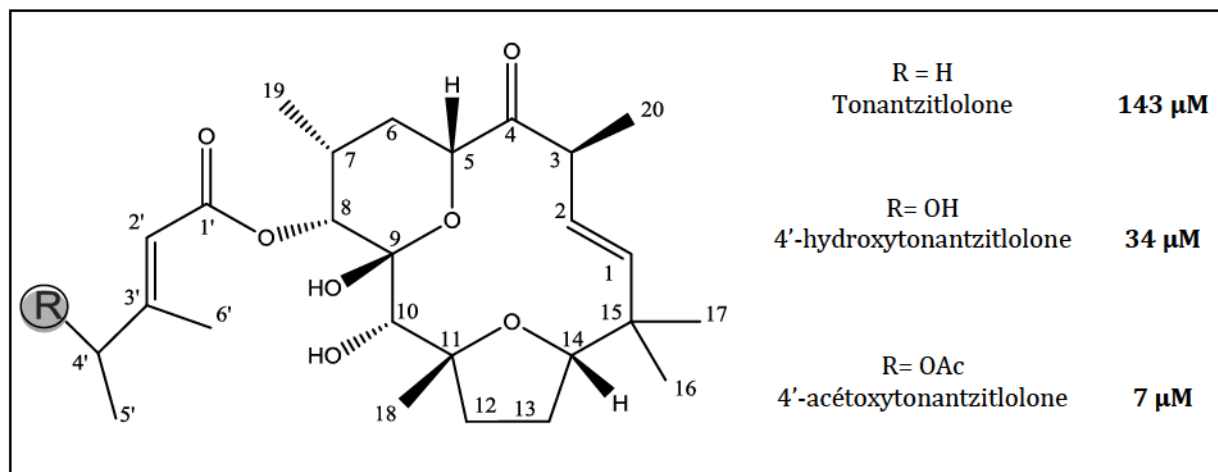


Figure 61 : Différences structurales entre les trois diterpènes de type tonantzitlolone isolés et  $CE_{50}$  (en  $\mu\text{M}$ ) obtenues pour l'activité antivirale (CHIKV)

Tout d'abord, les hydroxyles en position C-9 et C-10 ne semblent pas jouer de rôle dans l'activité antivirale de cette famille de molécules. Ils sont en effet présents dans les structures des trois tonantzitlolones, or seule la 4'-acétoxytonantzitlolone est antivirale.

De plus, la position C-4' joue un rôle particulièrement intéressant quant à la modulation de l'activité antivirale de la molécule. La substitution de l'hydrogène en position C-4' par un groupement hydroxyle multiplie en effet par quatre son activité antivirale. Cette activité est multipliée par vingt si la substitution est effectuée par un groupement acétoxy.

Ces résultats mettent en exergue l'importance de la présence d'un oxygène en position C-4'. Des efforts de synthèse devraient être entrepris dans le but d'accroître l'activité antivirale de cette famille de molécules, en particulier des modifications de la chaîne latérale pourraient être envisagées.

## Conclusion

Les investigations phytochimiques menées sur l'espèce *Stillingia lineata* ssp. *lineata* ont permis de mettre en évidence différents résultats :

- **L'activité antivirale ciblant le CHIKV** a été mise en évidence principalement dans les **extraits d'écorce**. En effet, les extraits de feuilles n'ont pas été retenus comme candidats contre le CHIKV. En revanche, tous les extraits d'écorce (extrait DCM, AcOEt, MeOH) ont présenté une capacité à inhiber sélectivement la réplication du CHIKV. En particulier, une activité plus prononcée a été retrouvée pour les extraits apolaires et notamment l'extrait AcOEt ( $CE_{50} < 0,8 \mu\text{g/mL}$ ).
- Le fractionnement réalisé sur l'extrait AcOEt d'écorce a permis d'identifier les **composés majoritaires** de la plante. Deux molécules ont été identifiées comme principaux métabolites : la **tonantzitlolone** et la **4'-acétoxytonantzitlolone**. Ces molécules de structures diterpéniques rares présentent l'originalité d'être des macrocycles à quinze carbones. Selon les données de la littérature, elles ont déjà été isolées à partir des extraits de racines de l'espèce *S. sanguinolenta* [355]. Ce sont, avec le flexibilène (métabolite isolé d'une éponge), les deux seuls macrocycles de ce type isolés de substances naturelles. La caractérisation de ces molécules a été permise grâce à la spectrométrie de masse haute résolution et la résonance magnétique nucléaire. Par ailleurs, des cristaux de tonantzitlolone ayant été obtenus, les configurations absolues de cette molécule ont pu être confirmées, pour la première fois, grâce à l'analyse aux rayons X.
- **Deux molécules nouvelles** ont été isolées. Il s'agit de la **4'-hydroxytonantzitlolone** et de l'**ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène**. L'élucidation structurale de ces molécules a été effectuée grâce à la spectrométrie de masse haute résolution, la résonance magnétique nucléaire mais aussi à l'aide de la spectroscopie IR et UV-Visible.

La 4'-hydroxytonantzitlolone représente le quatrième macrocycle à quinze membres identifié à ce jour dans le domaine des substances naturelles.



- Le test antiviral réalisé sur ces composés a permis d'identifier **une molécule candidate contre le CHIKV**. Parmi les trois diterpènes de type tonantzitlolone isolés, la **4'-acétoxytonantzitlolone**, issue de toutes les fractions actives, a présenté une capacité à inhiber sélectivement la réplication virale du CHIKV ( $CE_{50} = 7 \mu M$ ). L'activité de cette molécule est semblable à celle de la chloroquine ( $CE_{50} = 11 \mu M$ ) et n'a jusque-là pas été décrite dans la littérature.
- Des relations structure/activité ont pu être établies en fonction des tonantzitlolones isolées. Les hydroxyles en position C-9 et C-10 ne jouent pas de rôle dans l'activité antivirale de cette famille de molécules.

La position C-4' est, en revanche, déterminante quant à la modulation de cette activité. L'absence de groupement oxygéné en C-4' ne confère aucune activité à la molécule (tonantzitlolone  $CE_{50} = 143 \mu M$ ). La présence d'un groupement hydroxyle multiplie par quatre le potentiel antiviral (4'-hydroxytonantzitlolone  $CE_{50} = 34 \mu M$ ). Ce potentiel est multiplié par vingt si la substitution est effectuée par un groupement acétoxy (4'-acétoxytonantzitlolone  $CE_{50} = 7 \mu M$ ).



Conclusion générale

*Pyrostria orbicularis* A. Rich. ex. DC.  
Rubiaceae

## Conclusion générale

Depuis une cinquantaine d'années, le bouleversement rapide des modes de vie à l'île de La Réunion est à l'origine de l'apparition de pathologies métaboliques, telles que le diabète, dont le taux de prévalence est quatre fois supérieur à celui observé en Métropole. De plus, l'île, située en zone afro-tropicale, est soumise à une exposition permanente aux maladies vectorielles et virus émergents, comme l'a rappelé la récente épidémie due au virus du chikungunya (CHIKV). Ces nouvelles pathologies ont ouvert aux différents laboratoires locaux de nouvelles pistes pour la recherche de molécules actives contre plus particulièrement les maladies chroniques non transmissibles comme le diabète ou l'obésité et les maladies vectorielles virales réémergentes.

C'est dans ce contexte que ce travail de thèse s'est inscrit dans le but d'identifier de nouvelles sources (plantes et/ou molécules) à activités anti-oxydante, anti-inflammatoire et également antivirale contre le virus du chikungunya.

**La première partie du travail a été consacrée à la recherche de propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et cytotoxique de dix-huit plantes endémiques et indigènes** de La Réunion à l'aide de tests *in cellulo* et chimiques. Ces résultats préliminaires obtenus au cours de criblage ont permis :

- Tout d'abord, d'identifier des extraits à forte cytotoxicité. En particulier, l'extrait acétate d'éthyle de l'écorce de *Carissa spinarum* s'est révélé le plus cytotoxique contre les cellules humaines THP-1.

- Puis de mettre en évidence des extraits antioxydants et anti-inflammatoires, biologiquement intéressants vis-à-vis du stress oxydatif et de l'inflammation, mécanismes jouant un rôle non négligeable dans le processus de certaines pathologies graves telles le diabète ou l'obésité. Il faut en particulier citer les extraits méthanoliques

de feuilles de *Agarista buxifolia* et de penes de *Dryopteris wallichiana* qui ont montré les résultats les plus significatifs aux différents tests antioxydants réalisés (tests d'hémolyse et TEAC/DPPH/FRAP/ORAC). Les principes actifs, des composés phénoliques, de type phloroglucinols pour *D. wallichiana*, pourraient être responsables de cette activité.

- Enfin, les extraits AcOEt des feuilles et MeOH de l'écorce de *Stillingia lineata* ainsi que les extraits d'écorce (DCM, MeOH) de *Indigofera amnoxylum* ont été les plus anti-inflammatoires lors de l'évaluation biologique sur des macrophages murins (cellules RAW-Blue™).

***Ces plantes représentent donc des sources encore non exploitées de métabolites secondaires biologiquement actifs. La consultation des données de la littérature indique, en outre, qu'à l'exception de Carissa spinarum, aucune investigation phytochimique n'a été réalisée sur ces espèces. Cependant, pour exploiter ce potentiel, une série d'investigations complémentaires sont à envisager. Il serait intéressant :***

- ✓ *de réaliser un fractionnement bioguidé pour chacune des plantes révélées par ce criblage, dans le but d'identifier les molécules responsables de ces activités. En particulier, il serait judicieux d'identifier les principes actifs cytotoxiques de Carissa spinarum et de réévaluer l'extrait de cette plante sur d'autres lignées cellulaires.*
- ✓ *de caractériser les composés phénoliques de D. wallichiana responsables de son activité antioxydante remarquable.*
- ✓ *d'associer les propriétés anti-inflammatoires de Stillingia lineata et de Indigofera amnoxylum à la présence de métabolites secondaires particuliers. De plus, les mécanismes d'actions de ces composés sur la voie NF-κB devraient être définis : inhibition de cytokines pro-inflammatoires et/ou stimulation de cytokines anti-inflammatoires*
- ✓ *d'évaluer in vivo l'activité de ces extraits bruts ou des composés isolés.*

La deuxième partie du travail a été consacrée à l'étude phytochimique d'une espèce indigène, *Stillingia lineata*. Le choix de cette espèce résulte du croisement des résultats obtenus dans la première partie de cette thèse et de ceux obtenus dans le programme Phytochik mené en parallèle au LCSNSA. L'absence de données bibliographiques ayant trait à cette espèce de La Réunion a également été un facteur déterminant. Il faut, de plus, préciser que la remarquable activité antivirale de l'extrait d'écorce de cette espèce (inhibition de 90 % de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules Vero pour une concentration inférieure à 0,8 µg/mL (CE<sub>90</sub>)) ainsi que le savoir-faire acquis au cours de ce programme ont justifié le choix du test antiviral pour suivre les différentes étapes de fractionnement des extraits. Des résultats intéressants ont été obtenus à l'issue de ces étapes de fractionnement et d'isolement :

- Tout d'abord, l'**activité antivirale ciblant le CHIKV** a été mise en évidence principalement dans les **extraits d'écorce**. Tous les extraits d'écorce (extrait DCM, AcOEt, MeOH) ont présenté une capacité à inhiber la réplication du CHIKV. En particulier, une activité plus prononcée a été retrouvée pour les extraits apolaires et notamment l'extrait AcOEt (CE<sub>50</sub> < 0,8 µg/mL).

- Puis, le fractionnement réalisé sur l'extrait AcOEt d'écorce a permis d'identifier les **composés majoritaires** de la plante, la **tonantzitlolone** et la **4'-acétoxytonantzitlolone**. Ces molécules de structures diterpéniques rares présentent l'originalité d'être des macrocycles à quinze carbones. Ce sont, avec le flexibilène (métabolite isolé d'un corail mou), les deux seuls macrocycles de ce type isolés de substances naturelles.

- En parallèle, **deux molécules nouvelles** ont été isolées, la **4'-hydroxytonantzitlolone** et l'**ent-12α-hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène**. La 4'-hydroxytonantzitlolone représente le quatrième macrocycle à quinze membres identifié à ce jour dans le domaine des substances naturelles.

- Ensuite, le test antiviral réalisé sur ces composés a permis d'identifier **une molécule candidate contre le CHIKV**, la **4'-acétoxytonantzitlolone**, issue de toutes les fractions actives, et qui a présenté une capacité à inhiber sélectivement la réplication virale du CHIKV (CE<sub>50</sub> = 7 µM). L'activité de cette molécule est semblable à celle de la chloroquine (CE<sub>50</sub> = 11 µM).

- Enfin, des relations structure/activité ont pu être établies en fonction des tonantzitlolones isolées. Les hydroxyles en position C-9 et C-10 ne jouent pas de rôle dans l'activité antivirale de cette famille de molécules. La position C-4' est, en revanche, déterminante quant à la modulation de cette activité. L'absence de groupement oxygéné en C-4' ne confère aucune activité à la molécule (tonantzitlolone  $CE_{50} = 143 \mu M$ ). La présence d'un groupement hydroxyle multiplie par quatre le potentiel antiviral (4'-hydroxytonantzitlolone  $CE_{50} = 34 \mu M$ ). Ce potentiel est multiplié par vingt si la substitution est effectuée par un groupement acétoxy (4'-acétoxytonantzitlolone  $CE_{50} = 7 \mu M$ ).

***Le travail de phytochimie réalisé à partir de *Stillingia lineata* a permis d'identifier une famille de molécules dont certaines sont actives et représentent donc des candidats potentiels contre le CHIKV. Cependant, pour optimiser ce potentiel antiviral, des travaux complémentaires sont à envisager :***

- ✓ *Il serait intéressant d'entreprendre des travaux structure-activité par la synthèse d'analogues dans le but de mieux cibler le ou les sites actifs de ces molécules.*
- ✓ *Il serait opportun de réaliser des tests *in vivo* afin d'apprécier l'activité réelle de ces molécules et de comprendre leur mécanisme d'action.*
- ✓ *Il faudrait isoler les composés minoritaires de cette plante, sources également possibles de candidats antiviraux, contribuant à l'activité de la plante.*

**Enfin, si les difficultés rencontrées dans le cadre de cette thèse sont à souligner, ...**

- La réalisation manuelle des tests *in cellulo* d'activités cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire, et le temps parfois très long demandé (test dépendant d'une culture cellulaire, statistiques effectuées pour trois expériences indépendantes) ont limité l'utilisation de ces tests pour la réalisation de fractionnements bioguidés. Ainsi, la recherche d'inhibiteurs de la réplication du CHIKV a été privilégiée, ce test étant réalisé par le Laboratoire de Virologie et de Chimiothérapie du Rega Institute for Medical Research (Louvain, Belgique).

- L'isolement des composés minoritaires a nécessité de nombreux fractionnements successifs qui n'ont néanmoins pas conduit à l'obtention de produits purs en quantité suffisante.

**... les possibilités d'exploration de nouvelles voies à partir des résultats obtenus méritent aussi d'être signalées.**

- L'intérêt d'isoler et de caractériser des molécules nouvelles et/ou bioactives d'espèces végétales est multiple. Il contribue à accroître les connaissances sur ces plantes, mettant parfois en évidence des marqueurs chimiotaxonomiques. Il est à noter qu'il existe une réelle demande en ce sens afin de vérifier leur statut d'endémicité. Ce problème se pose pour *Carissa xylopicron*, espèce endémique de La Réunion, regroupée taxonomiquement à l'espèce *Carissa spinarum*, indigène de l'île, bien que des différences morphologiques existent entre elles. Une des autres problématiques est par exemple de confirmer l'identification de nouvelles espèces, ce qui avait été supposé pour *Dryopteris wallichiana* ssp. *madagascariensis* lors de sa découverte sur un site de collecte encore inconnu.
- Dans un second temps, l'isolement de molécules bioactives permet également de valider les savoir-faire locaux. Ce type d'étude chimique est relativement récent à La Réunion. Différents programmes de recherche allant dans ce sens ont vu le jour ces dernières années : le programme Phytochik qui s'appuyait sur des connaissances ethnopharmacologiques, le programme ATEM (Activités des préparations traditionnelles anti-diabétiques à base de plantes : approche ethno-métabolomique) visant à caractériser métaboliquement des tisanes à activité anti-inflammatoire.



*Ce travail s'inscrit dans la continuité de mon parcours d'études. Les travaux que j'ai menés et notamment la réalisation des tests in cellulo, m'ont permis d'acquérir une double compétence chimique et biologique indispensable à la réalisation de l'objectif que je souhaitais atteindre, à savoir la valorisation des plantes de La Réunion. Grâce aux collaborations fédératives et extérieures, j'ai pu intégrer différents laboratoires, experts dans leur domaine d'activité, et me former à des disciplines complémentaires. Cette thèse souligne l'intérêt d'un sujet de recherche pluridisciplinaire allant de la mise en évidence de l'activité biologique pour un extrait, par le biais de criblage, jusqu'à l'isolement d'une molécule candidat-médicament par la réalisation de fractionnements bioguidés.*





A close-up photograph of a Vernonia fimbrillifera plant. The image shows several large, vibrant green, lanceolate leaves with prominent venation. In the center, there is a large, spherical, white, fluffy flower head composed of numerous small, individual flowers. The background is a soft-focus green, suggesting a natural outdoor setting.

**Partie expérimentale**

*Vernonia fimbrillifera* (Cass.) Less.  
Apocynaceae

# 1 : Procédures générales

## 1.1 Matériel végétal

Treize plantes utilisées pour le criblage d'activités biologiques proviennent du programme Phytochik. Ces plantes ont été collectées de mai 2009 à mars 2011. Elles ont été botaniquement identifiées par le Pr. D. Strasberg de l'UMR PVBMT (Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical) de l'Université de La Réunion.

Cinq plantes ont été collectées de novembre 2009 à mars 2011 par I. Grondin, E. Girard-Valenciennes, J.M. Tamon, E. Boyer et S. Técher.

Les lieux de collecte, les dates et les données GPS sont listés dans le Tableau XIV.

Tableau XIV  
Date de récolte et points GPS des dix-huit plantes collectées

| Plantes   | Lieu                 | Date     | GPS Sud   | GPS Est   |
|---|----------------------|----------|-----------|-----------|
| <i>Acalypha integrifolia</i> Willd.   | Grand Etang          | 09/07/09 | 21.05.816 | 55.39.303 |
| <i>Agarista buxifolia</i> (Comm. ex Lam.) G. Don  | Plaine des Palmistes | 21/07/10 | 21.07.54  | 55.34.36  |
| <i>Cassine orientalis</i> (Cav.) Harms  | Vincendo             | 20/06/09 | 21.22.859 | 55.40.108 |
| <i>Carissa spinarum</i> L.  | Vincendo             | 20/06/09 | 21.22.859 | 55.40.108 |
| <i>Clerodendrum heterophyllum</i> (Poir.) R.Br.   | Vincendo             | 20/06/09 | 21.22.859 | 55.40.108 |
| <i>Coptosperma borbonica</i> De Block   | Langevin             | 06/06/09 | 21.22.912 | 55.38.828 |
| <i>Dryopteris wallichiana</i> (Spreng.) Hyl. ssp.<br><i>madagascariensis</i> (C. Chr.) J.P. Roux. | Col du Taïbit        | 29/05/10 | NC        | NC        |
| <i>Eugenia buxifolia</i> Lam.   | Langevin             | 09/05/09 | 21.22.91  | 55.38.83  |
| <i>Indigofera amnoxylum</i> (DC.) Polhill   | Langevin             | 19/11/09 | 21.22.91  | 55.38.83  |
| <i>Myonima obovata</i> Lam.   | Mare Longue          | 21/05/09 | 21.21.191 | 55.44.522 |
| <i>Phyllanthus casticum</i> Soy.-Will.  | Vincendo             | 20/06/09 | 21.22.859 | 55.40.108 |
| <i>Polyscias repanda</i> (DC.) Baker  | Mare Longue          | 21/05/09 | 21.21.191 | 55.44.522 |
| <i>Pyrostria orbicularis</i> A.Rich. ex DC.   | Langevin             | 06/06/09 | 21.22.912 | 55.38.828 |
| <i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll.Arg. ssp. <i>lineata</i>                                    | Langevin             | 07/07/10 | 21.22.91  | 55.38.83  |
|   | Langevin             | 18/03/11 | 21.22.91  | 55.38.83  |
| <i>Syzygium borbonicum</i> J.Gueho et A.J.Scott.  | Mare Longue          | 21/05/09 | 21.20.937 | 55.44.665 |
| <i>Turraea casimiriana</i> Harms  | Langevin             | 19/11/09 | 21.22.912 | 55.38.83  |
| <i>Vernonia fimbrillifera</i> (Cav.) Less   | Plaine des Palmistes | 21/07/10 | 21.08.62  | 55.35.18  |
| <i>Xylopia richardii</i> Boivin ex Baill.   | Mare Longue          | 21/05/09 | 21.20.937 | 55.44.665 |

**Légende :** NC, données qui ne peuvent être communiquées

*Stillingia lineata* a été collectée en deux fois. La première collecte (07/07/2010) a servi à la réalisation des extraits AcOEt, DCM et MeOH pour le criblage d'activités cytotoxique/antioxydant/anti-inflammatoire. La deuxième collecte (18/03/2011) a été réalisée dans le but de récupérer une quantité plus importante en matière végétale et de pouvoir réaliser le fractionnement bioguidé par le test antiviral. Un numéro d'herbier a été enregistré pour ce second lot (REU09532).

Une fois collectées, les plantes ont été séchées à l'air libre puis à l'étuve (40°C) et broyées.

### **1.2 Extraction accélérée par solvant (ASE® 300) (LCSNSA, Université de La Réunion)**

Toutes les extractions ont été réalisées grâce au système d'extraction accélérée par solvant (ASE® 300, Accelerated Solvent Extractor, Dionex) disponible au LCSNSA (Université de La Réunion, Réunion). Les paramètres utilisés ont été une température de 40°C, une pression de 1500 psi (10,34 MPa), cinq phases statiques de 6 min et un temps de purge de 120 s.

#### **1.2.1 Réalisation des extraits pour les criblages d'activités biologiques**

Pour chaque plante, environ 45 g de matière pulvérisée ont été utilisés pour remplir une cellule d'extraction de 100 mL. La matière végétale est soumise à une extraction à l'acétate d'éthyle (vingt-deux extraits AcOEt) ou à une extraction successive au dichlorométhane et au méthanol (sept extraits DCM et sept extraits MeOH). Pour *Dryopteris wallichiana*, seuls les extraits MeOH ont été testés (deux extraits MeOH).

#### **1.2.2 Réalisation de l'extrait AcOEt de l'écorce de *Stillingia lineata***

La poudre végétale (769 g) a été extraite à l'acétate d'éthyle au moyen de l'ASE® 300. Dix-sept cellules d'extraction de 100 mL ont été remplies. Dans le but d'extraire au maximum la matière végétale, le programme d'extraction a été répété en trois fois pour une même cellule. Un rendement de 4,4 % a été obtenu soit 33,9 grammes d'extrait AcOEt.

Les solvants organiques ont été évaporés sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi) muni d'un régulateur de vide (V-850, Büchi), d'un rotavapor® (R-210, Büchi), d'une pompe à vide (V-700, Büchi) et d'un bain thermostaté (B-491, Büchi). Les températures utilisées n'ont pas dépassé 40 °C afin d'éviter des détériorations de composés.

Les extractions et les fractionnements par Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP) ont été réalisés par des solvants (SDS) de pureté 99 %. Ils proviennent de Fisher Scientific Korea Ltd. (Séoul, République de Corée). Les purifications par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) ont été réalisées avec des solvants de qualité CLHP ou 100 % SDS.

### **1.3 Fractionnement de *Stillingia lineata***

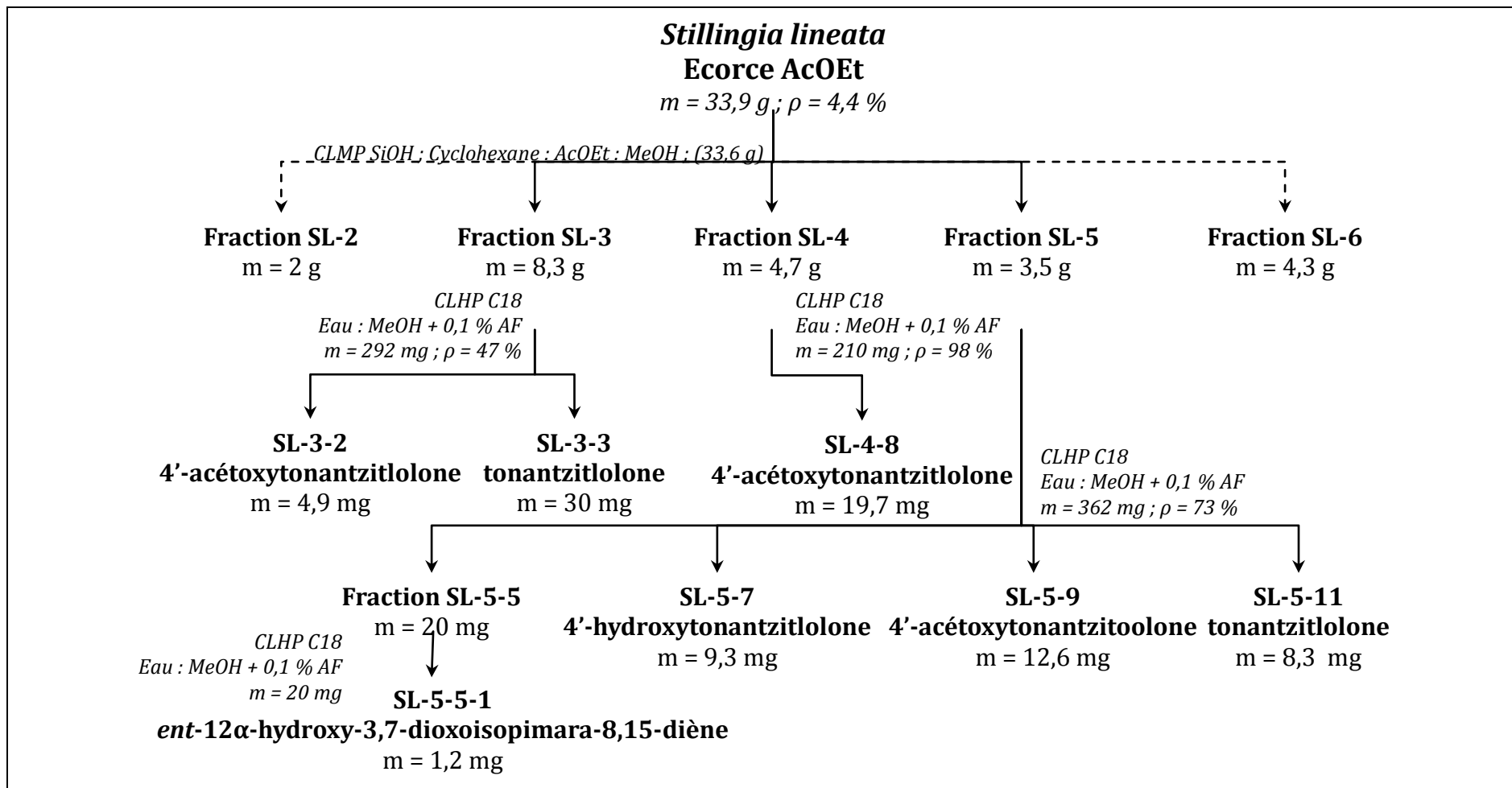
L'extrait AcOEt d'écorce de *Stillingia lineata* (33,9 g) a été fractionné sur colonne de silice, sous moyenne pression (460 mm × 26 mm ;  $m_{Si} = 3 \times 120$  g, Silica Gel 60 – 0,2 mm), avec un gradient de polarité croissante en utilisant les solvants cyclohexane, AcOEt, MeOH aux proportions de 95:5:0 à 0:50:50. Sept fractions ont été obtenues sur la base des profils CCM.

Une partie (292 mg) de la fraction SL-3 (8,3 g ; cyclohexane-AcOEt, 80:20) a été soumise à une CLHP préparative sur une phase C18 Kromasil® en utilisant un gradient MeOH/H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique (80:20 à 100:00 en 20 min, puis 100:00 en isocratique en 10 min) à 21 mL/min. Cette purification a permis l'isolement de la tonantzitolone (**24**, 30 mg) et dans une moindre mesure de la 4'-acétoxytonantzitlolone (**25**, 4,9 mg).

Une partie (210 mg) de la fraction SL-4 (4,7 g ; cyclohexane-AcOEt, 80:20) a été purifiée par CLHP sur colonne préparative C18 Kromasil® en utilisant un gradient MeOH/H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique (70:30 à 100:00 en 30 min, puis 100:00 en 10 min) à 15 mL/min. La 4'-acétoxytonantzitlolone (**25**, 19,7 mg) a ainsi été obtenue.

Une partie (362 mg) de la fraction SL-5 (3,5 g ; cyclohexane-AcOEt, 70:30 à 50:50) a été purifiée par CLHP sur colonne préparative C18 Kromasil® en utilisant un gradient MeOH/H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique (70:30 à 100:00 en 30 min, puis 100:00 en isocratique en 10 min) à 15 mL/min. La tonantzitolone (**24**, 8,3 mg), la 4'-

acétoxytonantzitlolone (**25**, 12,6 mg) et la 4'-hydroxytonantzitlolone (**26**, 9,3 mg) ont ainsi été isolées. La fraction SL-5-5 (20 mg) a été soumise à une purification par CLHP sur colonne semi-préparative C18 Kromasil® en utilisant un gradient MeOH/H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique (60:40 à 100:00 en 50 min) à 4,7 mL/min. Cette purification a permis l'isolement de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène (**27**, 1,2 mg).

Figure 62 : Fractionnement de l'extrait AOEt de l'écorce de *Stillingia lineata*

## 2 : Tests biologiques

### **2.1 Evaluation de la cytotoxicité (GEICO, Université de La Réunion)**

#### **2.1.1 Préparation des extraits végétaux**

Les extraits végétaux ont été pesés et dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) dans le but de réaliser une gamme de six concentrations (0,2 , 2, 5, 10, 15 et 20 mg/mL). Ces concentrations ont été diluées au 1/50<sup>ème</sup> avec du milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute).

#### **2.1.2 Test au MTT**

Les cellules THP-1 ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits végétaux. Dans une plaque de 96 puits (Nunclon™), 150 µL de cellules (suspension de 10<sup>4</sup> cellules/200 µL) sont mis en contact avec 50 µL d'extrait (concentration finale de 1 à 100 µg/mL). La plaque est mise à incuber pendant 24 h (à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>). Trois heures avant la fin de l'incubation, 20 µL de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium sont ajoutés (MTT à 5 mg/mL dans du PBS 1X). La plaque est ensuite remise à incuber. Après centrifugation (500 × g, 4 min, 25 °C), le milieu est délicatement éliminé et les cristaux de formazan sont dissous dans 100 µL de DMSO. L'absorbance est lue à 595 nm au moyen d'un spectrophotomètre de marque Fluostar (BMG France). La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport au contrôle négatif (DMSO dilué au 1/50<sup>ème</sup> avec du milieu de culture RPMI). Le contrôle positif est le taxotère préparé et testé dans les mêmes conditions que les extraits (soit des concentrations finales de 1 à 100 µg/mL).

#### **2.1.3 Culture cellulaire des cellules THP-1**

Les THP-1 sont des cellules non adhérentes (ATCC #TIB-202). Elles sont cultivées dans du milieu RPMI à 10 % de SVF (Sérum de Vœu Fœtal) et additionné de L-glutamine (2 mM), de streptomycine (100 µg/mL) et de pénicilline (100 µl/mL). Les cellules sont cultivées dans des flasques (80 cm<sup>3</sup>), dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Des passages sont régulièrement effectués afin d'éviter une concentration cellulaire supérieure 6.10<sup>5</sup> cellules/mL.

### **2.1.4 Numération cellulaire**

Une suspension de  $10^4$  cellules/200  $\mu\text{L}$  est réalisée pour effectuer le test de cytotoxicité. Pour compter les cellules, 20  $\mu\text{L}$  de bleu de trypan sont additionnés à 20  $\mu\text{L}$  de milieu cellulaire à doser. Après homogénéisation, l'ensemble est transféré sur une cellule de numération (Quick Read Precision Cell, Globe Scientific INC). Le comptage manuel s'effectue au microscope.

Le bleu de trypan est un réactif de couleur bleue qui interagit uniquement avec les cellules endommagées. La coloration en bleu de ces dernières permet de déterminer le nombre de cellules mortes et de cellules vivantes.

Après avoir déterminé la concentration en cellules, des dilutions sont effectuées pour obtenir la suspension souhaitée ( $10^4$  cellules/200  $\mu\text{L}$ ).

## **2.2 Evaluation du pouvoir antioxydant (GEICO, Université de La Réunion)**

### **2.2.1 Préparation des extraits végétaux**

Les extraits végétaux ont été pesés et dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) dans le but de réaliser une gamme de six concentrations (dilution de 10 de 17 mg/mL à 1,7  $\mu\text{g/mL}$ ).

### **2.2.1 Test d'hémolyse**

La capacité des extraits à inhiber l'hémolyse induite par les radicaux libres est évaluée en accord avec Prost [597]. Les échantillons de sang humain ont été obtenus auprès du département de biochimie du CHU Felix Guyon (St Denis, Réunion). Le plasma est éliminé par centrifugation. Les érythrocytes sont lavés trois fois avec une solution isotonique (0,15 M NaCl) à température ambiante. Les cellules sont ensuite re-suspendues au même niveau hématocrite en utilisant la solution isotonique. Chaque puits de la plaque de 96 puits est rempli avec 100  $\mu\text{L}$  de la solution de cellules sanguines diluée au 1/50<sup>ème</sup> dans 0,15 M NaCl. Puis, 55  $\mu\text{L}$  de solution isotonique est rajoutée ainsi que 5  $\mu\text{L}$  d'extrait de plantes à différentes concentrations (concentrations finales de 425  $\mu\text{g/mL}$  à 4,25 ng/mL). Enfin, l'hémolyse est initiée en ajoutant 40  $\mu\text{L}$  d'AAPH (0,33 M) dans chaque puits. L'absorbance à 450 nm est notée toutes les 10 min pendant 830 min,



en utilisant un spectrophotomètre thermostaté à 37 °C Fluostar (BMG France). Les résultats sont exprimés en HT<sub>50</sub>, temps de demi-hémolyse.

Le contrôle négatif est le DMSO (5 µL). Le contrôle positif est l'acide gallique à la concentration de 42,5 µg/mL.

## **2.3 Evaluation du pouvoir anti-inflammatoire (GEICO, Université de La Réunion)**

### **2.3.1 Préparation des extraits et vérification de leur cytotoxicité sur cellules RAW-Blue™**

Les extraits végétaux ont été pesés et dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) dans le but de réaliser deux concentrations (0,2 et 2 mg/mL). Ces concentrations ont été diluées au 1/50<sup>ème</sup> avec du milieu de culture DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium).

Un test de cytotoxicité a préalablement été effectué sur les cellules RAW-Blue™. Le test au MTT détaillé précédemment à été utilisé. Deux concentrations en extraits ont été testées (concentration finale 1 et 10 µg/mL). La concentration de 10 µg/mL, pour laquelle aucune cytotoxicité n'a été observée sur les cellules RAW-Blue™, a été sélectionnée pour la réalisation du test anti-inflammatoire.

### **2.3.2 Culture cellulaire**

Les cellules RAW-Blue™ sont des dérivées de macrophages de souris RAW 264,7 exprimant de façon stable le gène codant pour une forme embryonnaire sécrétée de la phosphatase alcaline (SEAP) dont l'expression est sous la dépendance de NF-κB. Ce sont des cellules adhérentes qui sont maintenues dans du DMEM supplémenté avec 10% de FBS dans un incubateur humidifié sous 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.3.3 Test anti-inflammatoire

Dans une plaque de 96 puits (Nunclon™),  $10^5$  cellules sont ajoutées par puits avec différents milieux : milieu de culture normal ou contenant du LPS ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Les extraits de plantes (concentration finale  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) sont additionnés. La plaque est mise à incuber pendant 24 h. Après incubation, on ajoute  $10^{-3}$  M de *p*-nitrophényl-phosphate (PNPP, Sigma, France) (dissous dans 0,1 M de tampon glycine contenant 1 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM de  $\text{ZnCl}_2$ , pH 10,4) au surnageant de chaque puits, puis la plaque est incubée à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1 heure. L'hydrolyse du PNPP en *p*-nitrophénol (PNP) et phosphate rend compte de la présence dans le milieu de culture de SEAP (SEcreted Alkaline Phosphatase). L'absorbance mesurée à 460 nm au moyen d'un spectrophotomètre de marque Fluostar (BMG France) permet d'évaluer la quantité de SEAP sécrétée. Le contrôle négatif correspond à des cellules traitées par du LPS sans extraits ; le contrôle positif est l'adiponectine.

### 2.4 Exploitations des résultats

Les résultats des tests d'activités cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire ont été analysés au moyen du logiciel GraphPad Prism version 3. Le test *t* de Student a été utilisé pour comparer les résultats. Les résultats significatifs sont marqués par une ou plusieurs étoiles selon le degré de significativité : \*  $p < 0,05$  , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,005$ .

### 2.5 Evaluation de l'inhibition du CHIKV *in cellulo* (Rega Institute for Medical Research, Louvain, Belgique)

Le test antiviral a été réalisé par l'équipe de P. Leyssen dans une enceinte de sûreté biologique (Bigneat) au sein du Laboratoire de Virologie et de Chimiothérapie du Rega Institut for Medicinal Research à Louvain en Belgique.

#### 2.5.1 Préparation de la plaque

Dans une plaque de 96 puits sont additionnés successivement  $100 \mu\text{L}$  d'extrait de plantes (à différentes concentrations, de 0,8 à  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) puis  $50 \mu\text{L}$  de milieu sans virus (test anti-métabolique) ou  $50 \mu\text{L}$  de milieu contenant le virus (test antiviral, virus non titré) puis  $50 \mu\text{L}$  de cellules Vero en suspension ( $25\,000$  cellules/ puits).

La plaque est ensuite mise à incuber à 37°C, sous 5 % de CO<sub>2</sub> et sous une atmosphère humide pendant cinq jours correspondant au temps pour lequel 100 % de l'effet cytopathique induit par le virus peut être observé pour des cultures cellulaires infectées non traitées.

### 2.5.2 Test au MTS

Le sel de tétrazolium utilisé est le MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium). Dans chaque puits, 75 µL d'une solution à 5% sont ajoutés. La plaque est mise à incuber pendant 1h30. Les cellules vivantes, initialement jaunes, deviennent brunes. L'absorbance est mesurée à 498 nm par un lecteur de microplaques Safire2™ (Tecan).

Les résultats sont donnés sous la forme de CC<sub>50</sub> (concentration cytotoxique, pour laquelle on observe 50 % d'inhibition du métabolisme de cellules saines), CE<sub>50</sub> et CE<sub>90</sub> (concentration efficace, pour laquelle on observe 50 % ou 90 % d'inhibition de l'effet cytopathique induit par le virus sur les cellules infectées).

### 2.5.3 Vérification de l'activité antivirale par microscopie

Dans le but d'exclure les faux positifs, une vérification de la viabilité cellulaire est effectuée par microscopie. Plusieurs paramètres sont observés : la morphologie de la monocouche cellulaire (cellules confluentes ou non), la morphologie de la cellule traitée (similaire aux cellules saines ou effet toxique observé), l'effet cytopathique induit par le virus. Chaque observation est notée de 0 (cellules saines) à 5 (cellules infectées).

L'activité antivirale d'un extrait sélectif, présentant une CE<sub>50</sub> faible et une CC<sub>50</sub> élevée, est jugée intéressante (différent d'un faux positif) si au moins une concentration testée présente deux notes proches de zéro (observation du test antiviral et du test anti-métabolique). Pour les extraits et/ou molécules qui inhibent de façon sélective la réplication du CHIKV, le test est réalisé en duplicat pour vérifier la répétabilité de l'effet antiviral.

### 2.5.4 Culture cellulaire des cellules Vero

Les cellules Vero (cellules rénales de singes vert africain, *Cercopithecus aethiops*) sont cultivées dans des erlenmeyers (150 cm<sup>3</sup>) pendant sept jours. Le milieu de culture

utilisé est le MEM Rega3 (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de FCS (Intrego), 5 mL de L-glutamine (200 mM) et 5 mL de bicarbonate de sodium (7,5 %). La trypsine est utilisée pour décoller les cellules et pour permettre une remise en suspension dans du milieu supplémenté à 2 %. La numération cellulaire s'effectue de manière automatique.

## 3 : Fractionnements et purifications

### **3.1 Techniques chromatographiques**

L'ensemble des fractionnements et des purifications ont été réalisés au LCSNSA (Université de La Réunion) et à l'ICSN (CNRS, Gif-sur-Yvette, France).

#### **3.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Les Chromatographies sur Couche Mince (CCM) ont été effectuées sur plaques Alugram® SIL G/UV254 (Macherey-Nagel), Alugram® RP-18 W/UV254 (Macherey-Nagel) ou Gel de silice 60G F254 (Merck) de 0,2 mm d'épaisseur.

Les plaques ont été révélées sous UV ( $\lambda = 254$  et  $360$  nm) puis pulvérisées par différents réactifs. Le molybdate sulfurique et la vanilline sulfurique ont principalement été utilisés.

- Réactif à l'acide sulfomolybdique : 10 g de molybdate d'ammonium dans 900 mL d'eau + 100 mL d'acide sulfurique

- Réactif à la vanilline : 10 g de vanilline dans 1 L d'éthanol + 20 mL d'acide sulfurique

#### **3.1.2 Chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP)**

Les séparations par Chromatographie Liquide à Moyenne Pression (CLMP) ont été réalisées soit :

- au moyen du système Sepacore® (Büchi) muni d'un collecteur de fraction C-660, d'un programmateur de pompe C-615 et de deux modules de pompe C-605. Une colonne en verre de dimension 460 mm × 26 mm, remplie de 120 g de gel de silice (Silica Gel 60 – 0,2 mm) a été utilisée.

- au moyen du système CombiFlash® Companion® (Teledyne Isco) en utilisant des colonnes prépackées en phase normale (colonnes de gel de silice : Silicycle® 15-40  $\mu\text{m}$  (4 g), Redisep® 15-60  $\mu\text{m}$  (4 et 12 g), Redisep® 35-70  $\mu\text{m}$  (12 et 40 g), ou Versapack® 45-75  $\mu\text{m}$  (102 g)).

Les extraits ont été déposés par dépôt liquide en utilisant une boucle d'échantillonnage de 20 mL (Sepacore®) ou par dépôt solide en les adsorbant sur de la célite (Clarcel, SDS).

### **3.1.3 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)**

Les CLHP analytiques, semi-préparatives ou préparatives ont été effectuées sur des chaînes Waters™ (Alliance Waters® 2695 et *Autopurification system* Waters® - Waters 2767 Sample Manager) équipées de pompe binaire (Waters 2525) et couplées en série à un détecteur UV à barrette de diodes (190 – 600 nm, Waters 2996) et un détecteur évaporatif à diffusion de lumière DEDL (Polymer Laboratoire PL-ELS 1000). Pour les CLHP semi-préparatives et préparatives, la chaîne comprend également un collecteur Waters 2767. Le logiciel pilote utilisé est MassLynx®.

Plusieurs colonnes Thermohypersil™ Kromasil ont été utilisées : colonne analytique C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 4,6 mm), colonne semi-préparative C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 10 mm) et colonne préparative C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 21,2 mm).

## **3.2 Analyses physiques et spectrales des composés**

### **3.2.1 Pouvoir rotatoire**

Les pouvoirs rotatoires  $[\alpha]_D$  ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre Jasco® P1010 (logiciel Spectro Manager®) ou d'un polarimètre Anton Paar® MCP200. La source lumineuse monochromatique est la raie D du sodium. Les expériences ont été réalisées avec une cuve de 1 cm et les composés ont été solubilisés dans du chloroforme.

### **3.2.2 Spectroscopie UV-Visible**

Les spectres d'absorption UV-Visible ont été mesurés dans une cuve en quartz de 1 cm, avec un spectromètre Varian Cary 100 Scan équipé du logiciel CaryWing (programme Scan). Les composés ont été solubilisés dans du chloroforme.

### 3.2.3 Spectroscopie InfraRouge (IR)

Les spectres d'absorption IR ont été mesurés sur un spectromètre Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR, équipé du logiciel Spectrum Perkin Elmer (version 6.3.5).

### 3.2.4 Spectrométrie de masse couplée à l'UPLC

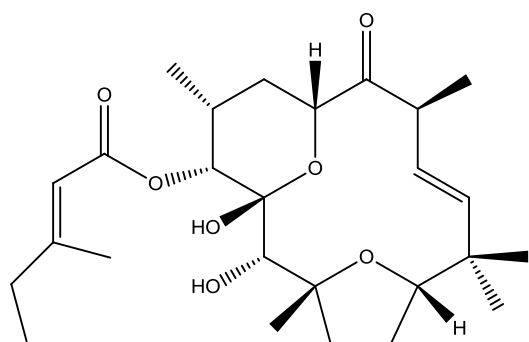
Les spectres de masse haute résolution (SM-HR) ESI (ElectroSpray Ionisation) en mode positif et/ou négatif (ESI<sup>+</sup>/ESI<sup>-</sup>) ont été réalisés sur un spectromètre à trappe d'ion Thermoquest TLM LCQ. Une chaîne UPLC (Acquity, Waters) (colonne BEH C18, 1.0, 50 mm, 1.7  $\mu$ m) couplée à un spectromètre de masse ESI-TOF (LCT Premier XE) et à un détecteur UV PDA (Acquity, Waters) a été utilisée.

### 3.2.5 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

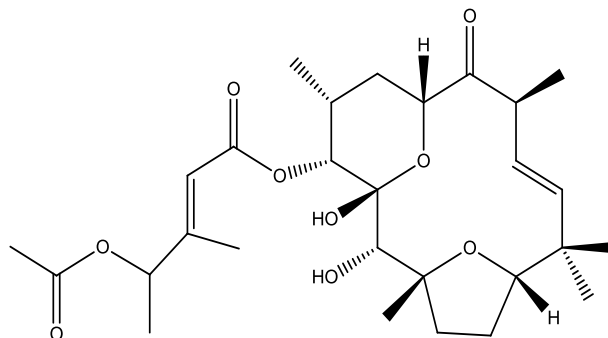
Les spectres RMN ont été réalisés sur des appareils Bruker Avance<sup>®</sup> 300, 500 ou 600 MHz en utilisant le chloroforme deutéré. Les déplacements chimiques, exprimés en partie par million (ppm), ont été référencés sur les pics de solvants  $\delta_{\text{H}}$  7,26 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  77,00 ppm. Ces valeurs ont été choisies d'après Dräger *et al.* [355]. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est donnée par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), dd (doublet de doublet), ddd (doublet de doublet de doublet), t (triplet), q (quadruplet), br. (broad *i.e* large) et m (multiplet).

L'attribution des signaux des protons et des carbones a été effectuée à partir des expériences 1D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT-135, associées aux expériences 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC ou HMQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC et <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY, en utilisant le logiciel NMR Notebook<sup>®</sup>.

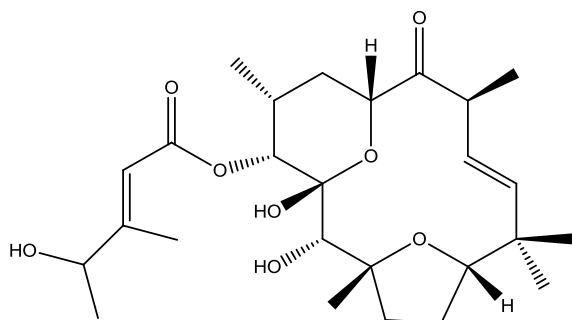
## 4. Caractéristiques physiques et spectrales des produits isolés



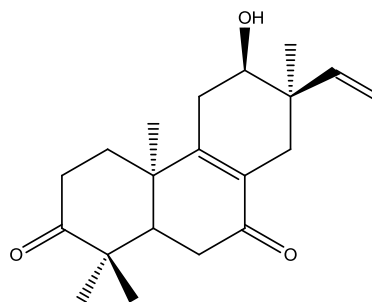
24 : tonantzitlone



25 : 4'-acétoxytonantzitlone



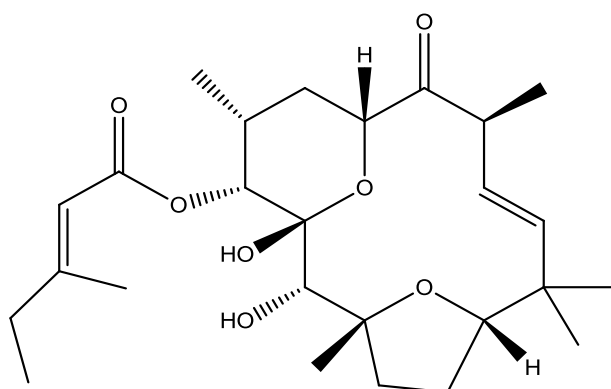
26 : 4'-hydroxytonantzitlone



27 : ent-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène



## Tonantzitlone (24)



M : 464,59 g.mol<sup>-1</sup>

**Origine:** *Stillingia lineata* (Lam.) Müll.

Arg, extrait AcOEt d'écorce

**Activité biologique :**

CHIKV : 66,3 µg.mL<sup>-1</sup> (142 µM)

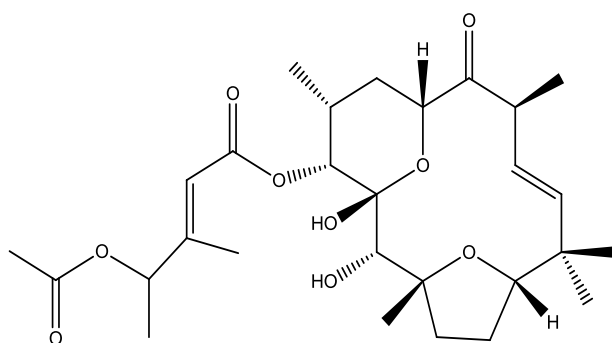
**Aspect :** poudre blanche

**SM-HR (ES<sup>+</sup>) :** [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 487,2688 (calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>7</sub>Na = 487,2672)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 5,85 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H-1) ; 5,69 (q, 1H, J = 1.5 Hz, H-2') ; 5,65 (s, 1H, OH-9) ; 5,23 (dd, 1H, J = 15.5 Hz, 9,5 Hz, H-2) ; 4,89 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-8) ; 4,62 (dd, 1H, J = 12.0, 3.0 Hz, H-5) ; 3,76 (dd, 1H, J = 11.5, 5.0 Hz, H-14) ; 3,43 (d, 1H, J = 6.0 Hz, H-10) ; 3,33 (dq, 1H, J = 9.5, 7.0 Hz, H-3) ; 3,10 (d, 1H, J = 6.0 Hz, OH-10) ; 2,44 (dd, 1H, J = 12.5, 7.5 Hz, H-12β) ; 2,33 (dddq, 1H, J = 12.5, 7.0, 4.0, 2.5 Hz, H-7) ; 2,17 (q, 2H, J = 7.0 Hz, H-4') ; 2,15 (d, 3H, J = 1.5 Hz, H-6') ; 2,04 (dddd, 1H, J = 12.5, 12.5, 12.5, 7.5 Hz, H-13β) ; 1,84 (dt, J = 13.5, 3.5 Hz, H-6α) ; 1,76 (ddd, 1H, J = 12.5, 7.5, 5.0 Hz, H-13α) ; 1,53 (ddd, 1H, J = 12.5, 12.5, 7.5 Hz, H-12α) ; 1,40 (ddd, 1H, J = 13.5, 12.5, 3.0 Hz, H-6β) ; 1,37 (s, 3H, H-18) ; 1,14 (s, 3H, H-17) ; 1,11 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-20) ; 1,07 (t, 3H, J = 7.5 Hz, H-5') ; 0,91 (s, 3H, H-16) ; 0,84 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-19)

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :** 211,3 (C-4) ; 166,6 (C-1') ; 163,0 (C-3') ; 140,1 (C-1) ; 126,8 (C-2) ; 113,9 (C-2') ; 97,1 (C-9) ; 88,9 (C-14) ; 87,6 (C-11) ; 78,2 (C-10) ; 74,1 (C-5) ; 73,2 (C-8) ; 49,5 (C-3) ; 38,7 (C-15) ; 37,3 (C-12) ; 33,9 (C-4') ; 29,0 (C-7) ; 28,8 (C-6) ; 28,1 (C-18) ; 28,0 (C-13) ; 25,4 (C-16) ; 25,1 (C-17) ; 19,0 (C-6'') ; 17,0 (C-19) ; 16,0 (C-20) ; 11,8 (C-5')

## 4'-Acétoxytonantzitlone (25)



**C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>9</sub>**

**M** : 522,63 g.mol<sup>-1</sup>

**Origine**: *Stillingia lineata* (Lam.) Müll.

Arg, extrait AcOEt d'écorce

**Activité biologique** :

**CHIKV** : 4,1 µg.mL<sup>-1</sup> (7 µM)

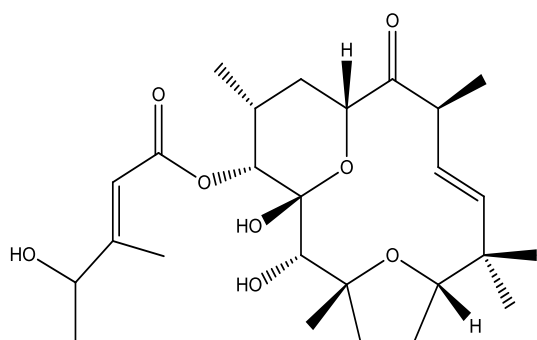
**Aspect** : poudre blanche

**SM-HR (ES<sup>+</sup>)** : [M+Na]<sup>+</sup> *m/z* = 545,2717 (calculée pour C<sub>28</sub>H<sub>42</sub>O<sub>9</sub>Na = 545,2727)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 5,90 (q, 1H, J = 1.2 Hz, H-2') ; 5,85 (d, 1H, J = 15.0 Hz, H-1) ; 5,70 (s, 1H, OH-9) ; 5,27 (q, 1H, J = 6.5 Hz, H-4') ; 5,24 (dd, 1H, J = 15.5, 9.5 Hz, H-2) ; 4,90 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-8) ; 4,62 (dd, 1H, J = 12.0, 3.0 Hz, H-5) ; 3,76 (dd, 1H, J = 11.5, 5.0 Hz, H-14) ; 3,40 (br.d, 1H, J = 6.0 Hz, H-10) ; 3,32 (dq, 1H, J = 9.5, 7.0 Hz, H-3) ; 3,05 (br.d, 1H, J = 6.5 Hz, OH-10) ; 2,43 (dd, 1H, J = 12.5, 7.5 Hz, H-12β) ; 2,32 (dddq, 1H, J = 12.5, 7.0, 4.0, 2.5 Hz, H-7) ; 2,13 (d, 3H, J = 1.5 Hz, H-6') ; 2,09 (s, 3H, H-2'') ; 2,03 (dddd, 1H, J = 13.0, 13.0, 11.5, 7.5 Hz, H-13β) ; 1,84 (dt, 1H, J = 13.5, 3.5 Hz, H-6) ; 1,76 (ddd, 2H, J = 12.5, 7.5, 5.0 Hz, H-13) ; 1,53 (ddd, 3H, J = 12.5, 12.5, 7.5 Hz, H-12) ; 1,40 (ddd, 1H, J = 13.5, 12.5, 3.0 Hz, H-6β) ; 1,37 (s, 3H, H-18) ; 1,35 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-5') ; 1,13 (s, 3H, H-17) ; 1,12 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-20) ; 0,91 (s, 3H, H-16) ; 0,84 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-19)

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 211,2 (C-4) ; 170,1 (OAc) ; 166,3 (C-1') ; 157,6 (C-3') ; 140,1 (C-1) ; 126,8 (C-2) ; 115,2 (C-2') ; 97,1 (C-9) ; 88,9 (C-14) ; 87,7 (C-11) ; 78,1 (C-10) ; 74,1 (C-5) ; 73,8 (C-4') ; 73,7 (C-8) ; 49,5 (C-3) ; 38,7 (C-15) ; 37,3 (C-12) ; 29,0 (C-7) ; 28,7 (C-6) ; 28,1 (C-18) ; 28,0 (C-13) ; 25,4 (C-16) ; 25,1 (C-17) ; 21,2 (OAc) ; 19,1 (C-5') ; 17,0 (C-19) ; 16,0 (C-20) ; 15,2 (C-6')

## 4'-Hydroxytonantzitlone (26)



**C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>**

**M** : 480,59 g.mol<sup>-1</sup>

**Origine** : *Stillingia lineata* (Lam.)

Müll. Arg, extrait AcOEt d'écorce

**Activité biologique** :

**CHIKV** : 16,3 µg.mL<sup>-1</sup> (34 µM)

**Aspect** : poudre blanche

**SM-HR (ES<sup>-</sup>)** : [M+Cl]<sup>-</sup> *m/z* = 515,2410 (calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub>Cl = 515,2412)

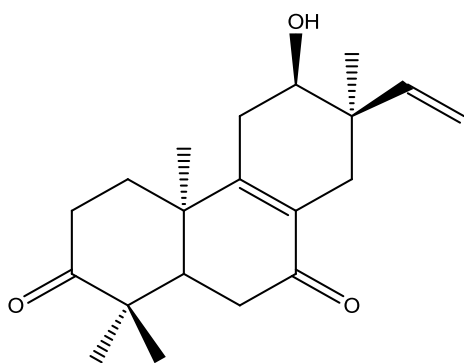
**[α]<sub>D</sub><sup>23</sup>** : + 76 (c 0,25 ; CHCl<sub>3</sub>)

**UV (CHCl<sub>3</sub>)**, λ<sub>max</sub> (log ε) : 240 (2,46) nm

**IR<sub>max</sub>** : 3372, 2967, 2933, 1712 cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 6,00 (s, 1H, H-2') ; 5,85 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H-1) ; 5,63 (s, 1H, OH-9) ; 5,23 (dd, 1H, J = 15.5, 9.5 Hz, H-2) ; 4,90 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-8) ; 4,62 (dd, 1H, J = 12.0, 3.0 Hz, H-5) ; 4,62 (dq, 1H, J = 6.5, 2.5 Hz, H-4') ; 3,76 (dd, 1H, J = 11.5, 5.0 Hz, H-14) ; 3,41 (br.d, 1H, J = 2.5 Hz, H-10) ; 3,34 (dq, 1H, J = 9.5, 7.0 Hz, H-3) ; 3,15 (d, 1H, J = 5.5 Hz, OH-10) ; 2,41 (dd, 1H, J = 12.5, 7.5 Hz, H-12β) ; 2,33 (dddq, 1H, J = 11.5, 7.0, 4.0, 2.5 Hz, H-7) ; 2,03 (dddd, 2H, J = 11.5, 11.5, 11.5, 7.5 Hz, H-13β) ; 2,12 (s, 1H, H-6') ; 1,85 (ddd, 1H, J = 13.0, 3.0, 2.5 Hz, H-6α) ; 1,76 (ddd, 1H, J = 12.5, 7.5, 5.0 Hz, H-13α) ; 1,53 (ddd, 2H, J = 12.5, 12.5, 7.5 Hz, H-12α) ; 1,39 (ddd, 1H, J = 13.5, 12.5, 3.0 Hz, H-6β) ; 1,37 (s, 3H, H-18) ; 1,32 (d, 1H, J = 6.5 Hz, H-5') ; 1,14 (s, 3H, H-17) ; 1,12 (d, 3H, J = 7.0 Hz, CH<sub>20</sub>) ; 0,85 (d, 3H, J = 7.0 Hz, H-19) ; 0,91 (s, 3H, H-16)

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 113,3 (C-2') ; 140,0 (C-1) ; 126,8 (C-2) ; 73,5 (C-8) ; 74,1 (C-5) ; 72,4 (C-4') ; 88,9 (C-14) ; 78,2 (C-10) ; 49,5 (C-3) ; 29,0 (C-7) ; 15,3 (C-6') ; 28,8 (C-6) ; 28,0 (C-13) ; 37,3 (C-12) ; 28,1 (C-18) ; 21,5 (C-5') ; 25,1 (C-17) ; 16,0 (C-20) ; 17,0 (C-19) ; 25,4 (C-16) ; 211,2 (C-4) ; 87,6 (C-11) ; 38,7 (C-15) ; 162,8 (C-3') ; 97,0 (C-9)

**ent-12 $\alpha$ -Hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène (27)****M** : 316,43 g.mol<sup>-1</sup>**Origine** : *Stillingia lineata* (Lam.)

Müll. Arg, extrait AcOEt d'écorce

**Aspect** : poudre blanche**SM-HR (ES<sup>+</sup>)** : [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 317,2131 (calculée pour C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub> = 317,2117)**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup>** : - 225 (c 0,20 ; CHCl<sub>3</sub>)**UV (CHCl<sub>3</sub>)**,  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) : 201 (1,83), 227 (2,01), 243 (2,36) nm**IR** <sub>max</sub> : 3457, 2924, 1707, 1663, 1380 cm<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 5,74 (dd, 1H, J = 17.5, 11.0 Hz, H-15) ; 5,22 (dd, 1H, J = 11.0, 1.0 Hz, H-16<sub>cis</sub>) ; 5,18 (dd, 1H, J = 17.5, 1.0 Hz, H-16<sub>trans</sub>) ; 3,61 (dd, 1H, J = 9.5, 5.5 Hz, H-12) ; 2,74 (ddd, 1H, J = 16.0, 12.5, 6.5 Hz, H-2 $\alpha$ ) ; 2,58 (dd, 1H, J = 15.5, 5.5 Hz, H-11 $\alpha$ ) ; 2,54 (m, 1H, H-6 $\beta$ ) ; 2,48 (ddd, 1H, J = 16.0, 6.5, 3.0 Hz, H-2 $\beta$ ) ; 2,46 (dd, 1H, J = 13.5, 3.5 Hz, H-6 $\alpha$ ) ; 2,35 (d, 1H, J = 17.0 Hz, H-14 $\alpha$ ) ; 2,24 (br.s, 1H, OH-12) ; 2,23 (d, J = 17.0 Hz, H-14 $\beta$ ) ; 2,22 (dd, 1H, J = 17.5, 7.0 Hz, H-11 $\beta$ ) ; 2,20 (dd, 1H, J = 13.5, 4.0 Hz, H-5) ; 2,17 (ddd, 1H, J = 13.0, 6.5, 3.0 Hz, H-1 $\alpha$ ) ; 1,78 (dd, 1H, J = 13.5, 12.5, 6.5 Hz, H-1 $\beta$ ) ; 1,30 (s, 3H, H-20) ; 1,14 (s, 3H, H-19) ; 1,11 (s, 3H, H-18) ; 0,93 (s, 3H, H-15)

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : 218,8 (C3) ; 204,8 (C7) ; 160,8 (C9) ; 144,7 (C-15) ; 133,0 (C8) ; 115,5 (C-16) ; 71,0 (C-12) ; 49,8 (C-5) ; 46,5 (C4) ; 38,8 (C10) ; 40,0 (C13) ; 35,4 (C-6) ; 34,6 (C-2) ; 34,5 (C-1) ; 34,2 (C-14) ; 30,3 (C-11) ; 25,2 (C-19) ; 21,4 (C-18) ; 17,3 (C-20) ; 15,0 (C-17) ;

# Bibliographie

1. Collectif, 2012. *Secrets & vertus des plantes médicinales 200 plantes - 150 maladies* France Loisir ed. Paris, France. 334p.
2. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*. Journal of Natural Products, 2012, **75**(3), 311-335.
3. Gentry, A.H., *Tropical Forest Biodiversity and the Potential for New Medicinal Plants*, in *Human Medicinal Agents from Plants*. 1993, American Chemical Society symposium series. p. 13-24.
4. Cadet, T., 1980. *La végétation de l'île de La Réunion. Etude phytoécologique et phytosociologique*. Imprimerie Cazal ed. Saint-Denis, Réunion. 312p.
5. Conservatoire National Botanique de Mascarin - Boulet, V. *Habitats, flore et végétation : diversité et originalité*. Available from: [http://www.regionreunion.com/fr/spip/IMG/pdf/CNBM\\_UNESCO.pdf](http://www.regionreunion.com/fr/spip/IMG/pdf/CNBM_UNESCO.pdf), consultée le 7 février 2012
6. Conservatoire National Botanique de Mascarin - Boulet V., c. *Index de la flore vasculaire de La Réunion (Trachéophytes) : statuts, menaces et protections (version 2012)*. Available from: <http://flore.cbnm.org/>, consultée le 10 décembre 2012
7. Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J., *Biodiversity hotspots for conservation priorities*. Nature, 2000, **403**(6772), 853-858.
8. Strasberg, D., Rouget, M., Richardson, D.M., Baret, S., Dupont, J., and Cowling, R.M, *An assessment of habitat diversity and transformation on La Réunion Island (Mascarene Islands, Indian Ocean) as a basis for identifying broad-scale conservation priorities*. Biodiversity and Conservation, 2005, **14**, 3015-3032.
9. UICN France, M., FCBN & CBNM (2010). *La liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Flore vasculaire de la Réunion*. Available from: [http://www.uicn.fr/IMG/pdf/Dossier\\_presse\\_Liste\\_rouge\\_flore\\_vasculaire\\_de\\_La\\_Reunion.pdf](http://www.uicn.fr/IMG/pdf/Dossier_presse_Liste_rouge_flore_vasculaire_de_La_Reunion.pdf), consultée le 27 février 2012
10. Desprès, C. *Anthropologie et santé : « Soigner par la nature à la Réunion : l'usage des plantes médicinales comme recours thérapeutique dans la prise en charge du cancer »*. Available from: <http://anthropologiesante.revues.org/710>, consultée le 24 juin 2011
11. Imhaus, G., 1858. *Notice sur les principales productions naturelles et fabriquées de cette île, île de La Réunion*, ed. P. Dupont. Paris, France. 82p.
12. LeClerc, J., 1864. *Des plantes médicinales de l'île de La Réunion et de leur application à la thérapeutique*. Imprimerie du Journal La Malle ed. Saint-Denis, Réunion. 84p.
13. Daruty, C.L., 1886. *Plantes médicinales de l'île Maurice et des pays intertropicaux*. General Steam printing Company ed. Port Louis, Maurice. 123p.
14. Vinson, J.F.D.E., 1855. *Essai sur quelques plantes utiles de l'île de La Réunion*. Imprimerie E. Thunot. ed. Paris, France. 25p.
15. Bouissou, A., *Le vocabulaire des plantes médicinales et leur utilisation à La Réunion*. 1977.
16. Cadet, T., 1984. *Plantes rares ou remarquables des Mascareignes*. Agence de Coopération Culturelle et Technique ed. Paris, France. 132p.
17. Lebrun, L., 1984. *Les plantes médicinales des tisaniers de l'île de La Réunion*. Thèse d'exercice de Pharmacie de l'Université de Poitiers
18. Sidambarom, J., 1986. *Contribution à l'étude des pharmacopées empiriques de La Réunion*. Thèse de Doctorat d'Etat de Pharmacie de l'Université de Nancy
19. Chaudenson, S., 1987. *Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle à l'île de La Réunion*. Thèse de Docteur en Pharmacie de l'Université d'Aix-Marseille
20. Nantas, P., 1984. *Le Père Raimbault et les plantes médicinales de La Réunion*. Nouvelle Imprimerie Dionysienne ed. Saint-Denis, Réunion. 85p.
21. Lavergne, R., 2004. *Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui*. Orphie ed. Sainte-Clotilde, Réunion. 101p.
22. Lucas, R., 2006. *Cent plantes endémiques et indigènes de La Réunion*. Azalées édition ed. Sainte-Marie, Réunion. 205p.
23. Rivière, M., 2007. *Les plantes médicinales de l'île de La Réunion - Leurs amis et leurs faux amis - Tome I - Homonymes des plantes locales*. Azalées Editions ed. Sainte-Marie, Réunion. 174p.
24. Quoniam, C., Porcel, P., 2009. *Des plantes et des hommes - Plantes aromatiques et médicinales de La Réunion*. Editions K ed. Saint-Denis, Réunion. 311p.
25. *Les plantes médicinales ont la côte à La Réunion*. Available from: <http://www.linfo.re/Les-plantes-medicinales-ont-la-cote-a-La-Reunion>, consultée le 21 novembre 2012
26. ImazPress. *Plantes médicinales - Vous prendrez bien une tisane ?* Available from: <http://www.ipreunion.com/archives/reportage/0000/00/00/ipreunion.reportage.2965.html>, consultée le 26 février 2011
27. Aplamedom, 2011. *Zerbaz Péi - Pratiques et utilisations des tisanes à l'île de La Réunion*. Azalées éditions ed. Sainte-Marie, Réunion. 77p.
28. Clémencin, C. *L'inscription des plantes médicinales d'Outre-Mer à la pharmacopée française*. in *Congrès International des Plantes Aromatiques et Médicinales (CIPAM)*. 6-9 novembre 2012. Réunion, France.
29. Smadja, J., Vera, R., Conan, J.Y., *Essais préliminaires sur quelques plantes à flavonoïdes de La Réunion*. Plantes médicinales et phytothérapie, 1989, **XXII**(4), 251-257.
30. Vera, R., Smadja, J., Conan, J.Y., *Essais préliminaires sur quelques plantes à alcaloïdes de l'île de La Réunion*. Plantes médicinales et phytothérapie, 1990, **XXIV**(1), 50-65.
31. Smadja, J., Vera, R., *Essais préliminaires sur quelques plantes de La Réunion*. Plantes médicinales et phytothérapie, 1991, **XXV**(4), 212-241.
32. Lavergne, R., 1989. *Plantes médicinales indigènes - Tisanerie et tisaneurs de La Réunion*. Thèse de doctorat en Botanique tropicale appliquée de l'Université des sciences et techniques du Languedoc, Académie de Montpellier
33. Valenciennes, E., 1997. *Étude d'hétérocycles azotés : contribution à l'étude de la réaction d'imino-Diels-Alder asymétrique - synthèse de décahydroquinoléine-4-ones ; étude de plantes médicinales endémiques et indigènes de l'île de la Réunion - recherche d'alcaloïdes*. Thèse de Doctorat de Chimie de l'Université de Paris Sud

34. Adersen, A., Adersen, H., *Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects—an experimental and ethnobotanical evaluation*. Journal of Ethnopharmacology, 1997, **58**(3), 189-206.
35. Lund, A.K., Lemmich, J., Adersen, A., Olsen, C.E., *Benzoquinones from Embelia angustifolia*. Phytochemistry, 1997, **44**(4), 679-681.
36. Lund, A.K., Adersen, A., Nyman, U., *Biological activities of benzoquinones from Badula barthesia and Embelia angustifolia*. Phytomedicine, 1998, **5**(3), 199-203.
37. Valenciennes, E., Smadja, J., Conan, J.Y., *Screening for biological activity and chemical composition of Euodia borbonica var. borbonica (Rutaceae), a medicinal plant in Reunion Island*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **64**(3), 283-288.
38. Simonsen, H.T., Larsen, M.D., Nielsen, M.W., Adersen, A., Olsen, C.E., Strasberg, D., Smitt, U.W., Jaroszewski, J.W., *Methylenedioxy- and methoxyflavones from Melicope coodeana syn. Euodia simplex*. Phytochemistry, 2002, **60**(8), 817-820.
39. Simonsen, H.T., Adersen, A., Smitt, U.W., Strasberg, D., Jaroszewski, J.W., *Methoxyflavones from Melicope borbonica and M. obscura (Rutaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, **31**(3), 327-330.
40. Adersen, A., Smitt, U.W., Simonsen, H.T., Christensen, S.B., Jaroszewski, J.W., *Prenylated acetophenones from Melicope obscura and Melicope obtusifolia ssp. obtusifolia var. arborea and their distribution in Rutaceae*. Biochemical Systematics and Ecology, 2007, **35**(7), 447-453.
41. Simonsen, H.T., *Four novel geminally dialkylated, non-aromatic acetophenone derivatives from Melicope coodeana*. Phytochemistry Letters, 2012, **5**(2), 371-375.
42. Jakobsen, T.H., Marcussen, H.V., Adersen, A., Strasberg, D., Smitt, U.W., Jaroszewski, J.W., *3-Methoxyflavones and a novel coumarin from Psidium dentata*. Biochemical Systematics and Ecology, 2001, **29**(9), 963-965.
43. Fortin, H., Vigor, C., Lohézic-Le Dévéhat, F., Robin, V., Le Bossé, B., Boustie, J., Amoros, M., *In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island*. Fitoterapia, 2002, **73**(4), 346-350.
44. Poullain, C., 2004. *Contribution à l'étude des plantes endémiques et indigènes de La Réunion, recherche d'activités biologiques et de principes actifs dans 75 plantes*. Thèse de Doctorat en Sciences de l'Université de La Réunion
45. Poullain, C., Girard-Valenciennes, E., Smadja, J., *Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **95**(1), 19-26.
46. Jonville, M.C., Kodja, H., Humeau, L., Fournel, J., De Mol, P., Cao, M., Angenot, L., Frédéric, M., *Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **120**(3), 382-386.
47. Jonville, M.C., Kodja, H., Strasberg, D., Pichette, A., Olivier, E., Frédéric, M., Angenot, L., Legault, J., *Antiplasmodial, anti-inflammatory and cytotoxic activities of various plant extracts from the Mascarene Archipelago*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **136**(3), 525-531.
48. Marodon, C., 2011. *Contribution à l'étude de Eupatorium ayapana Ventenat de l'île de La Réunion*. Thèse de Doctorat d'Etat de Pharmacie de l'Université de Montpellier I
49. ORS. *Le diabète à la Réunion*. Available from: [http://www.ors-reunion.org/IMG/file/tableaux\\_bord/tb\\_diabete\\_2009.pdf](http://www.ors-reunion.org/IMG/file/tableaux_bord/tb_diabete_2009.pdf), consultée le 10 janvier 2012
50. Kusnik-Joinville, O., Weill, A., Salanave, B., Ricordeau, P., Allemand, H., *Prevalence and treatment of diabetes in France: Trends between 2000 and 2005*. Diabetes & Metabolism, 2008, **34**(3), 266-272.
51. Kusnik-Joinville, O., Weill, A., Ricordeau, P., Allemand, H., *Diabète traité en France en 2007 : un taux de prévalence proche de 4% et des disparités géographiques croissantes*. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2008, **43**, 425-439.
52. ORS. *Les maladies cardiovasculaires à La Réunion*. Available from: [http://www.ors-reunion.org/IMG/file/tableaux\\_bord/tb\\_cardio\\_2009.pdf](http://www.ors-reunion.org/IMG/file/tableaux_bord/tb_cardio_2009.pdf), consultée le 10 janvier 2012
53. ORS. *Surpoids et obésité à La Réunion*. Available from: [http://www.ors-reunion.org/IMG/file/tableaux\\_bord/TDB\\_obesite\\_juin\\_2009.pdf](http://www.ors-reunion.org/IMG/file/tableaux_bord/TDB_obesite_juin_2009.pdf), consultée le 10 janvier 2012
54. Dangelser, G., Besson, S., Gatina, J. H., Blicklé, J. F., *Amputations among diabetics in Reunion Island*. Diabetes & Metabolism, 2003, **29**(6), 628-634.
55. Favier, F., Rachou, E., Ricquebourg, M., Fianu, A. *Comportements alimentaires et activité physique des Réunionnais. Étude RECONSAL. INSERM-ORS La Réunion*. Available from: [http://www.ors-reunion.org/IMG/file/etudes/RECONSAL\\_2002.pdf](http://www.ors-reunion.org/IMG/file/etudes/RECONSAL_2002.pdf), consultée le 10 janvier 2012
56. Pierre, V., Thiria, J., Rachou, E., Sissoko, D., Lassalle, C., Renault P. *Epidémie de dengue 1 à la Réunion en 2004*. Journées de veille sanitaire Available from: [http://www.invs.sante.fr/publications/2005/jvs\\_2005/poster\\_13.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2005/jvs_2005/poster_13.pdf), consultée le 25 juillet 2011
57. Larrieu, S., Dehecq, J.S., Balleydier, E., Jaffar, M.C., Michault, A., Vilain, P., Leparç-Goffart, I., Polycarpe, D., Filleul, L., *Re-emergence of dengue in Réunion, France, January to April 2012*. Eurosurveillance 2012, **17**(20), 1-3.
58. ARS. *Situation de la dengue à La Réunion*. Point épidémiologique, 35, 13 juin 2012. Available from: [http://www.ars.ocean-indien.sante.fr/fileadmin/OceanIndien/Internet/Actualites/35\\_2012\\_PE\\_Dengue\\_Run.pdf](http://www.ars.ocean-indien.sante.fr/fileadmin/OceanIndien/Internet/Actualites/35_2012_PE_Dengue_Run.pdf), consultée le 26 novembre 2012
59. ARS. *Situation de la dengue à La Réunion*. Point épidémiologique, 20, 20 avril 2012. Available from: [http://www.ars.ocean-indien.sante.fr/fileadmin/OceanIndien/Internet/Veille\\_et\\_securite\\_sanitaire/Gestion\\_de\\_crise\\_sanitaire/CIRE/Points\\_epidemiologiques/20\\_2012\\_PE\\_dengue\\_Run.pdf](http://www.ars.ocean-indien.sante.fr/fileadmin/OceanIndien/Internet/Veille_et_securite_sanitaire/Gestion_de_crise_sanitaire/CIRE/Points_epidemiologiques/20_2012_PE_dengue_Run.pdf), consultée le 26 novembre 2012
60. ARS. *Situation de la dengue à La Réunion*. Point épidémiologique, 55, 7 septembre 2012. Available from: [http://www.urml-oi.net/ARS/2012-ARS/20120907\\_PE\\_dengue\\_Run.pdf](http://www.urml-oi.net/ARS/2012-ARS/20120907_PE_dengue_Run.pdf), consultée le 26 novembre 2012
61. Simon, F., Tolou, H., Jeandel, P., *Chikungunya, l'épidémie que l'on n'attendait pas*. La Revue de médecine interne, 2006, **27**, 437-441.
62. Pialoux, G., Gauzere, B.A., Strobel, M., *Chikungunya virus infection: review through an epidemic*. Médecine et Maladies Infectieuses, 2006, **36**(5), 253-263.
63. Renault, P., Solet, J. L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., Lassalle, C., Thiria, J., Rachou, E., de Valk, H., Ilef, D., Ledrans, M., Quatresous, I., Quenel, P., Pierre, V., *A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, **77**(4), 727-731.
64. Lhotellerie, H., Bourde, A., Kalifa, G., Djardem, Y., Geisert, P., Henrion, G., *La crise sanitaire du Chikungunya sur l'île de la Réunion*. Journal Européen des Urgences, 2008, **21**, 10-13.
65. Balleydier, E., Margueron, T., Grandadam, M., Baviile, M., Renault, P., Filleul, L., *Réintroduction du chikungunya à La Réunion, une menace permanente*. Ve Congrès International d'Épidémiologie Adelf-Epiter / Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique, 2012, **60S**, S97-S148.

66. Kovacic, P., Pozos, R.S., Somanathan, R., Shangari, N., O'Brien, P.J., *Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships*. Current Medicinal Chemistry, 2005, **12**(22), 2601-2623.
67. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiological reviews, 2002, **82**(1), 47-95.
68. Favier, F., *Le stress oxydant*. L'actualité chimique, Novembre-décembre 2003, 108-115.
69. Halliwell, B., *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radical Research, 1999, **31**(4), 261-272.
70. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, **39**(1), 44-84.
71. Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh Z., and Jore, D., *Espèces réactives de l'oxygène*. L'actualité chimique, novembre-décembre 2003, 91-96.
72. *Respiratory Burst*. Available from: [sparkcards.com/standalone/respiratory\\_burst.htm](http://sparkcards.com/standalone/respiratory_burst.htm), consultée le 16 juillet 2011
73. Kamal-Eldin, A., 2003. *Lipid oxidation pathways*. American Oil Chemists' Society ed. Champaign, Illinois. 323p.
74. Lindau-Shepard, B.A., Shaffer, J.B., *Expression of human catalase in acatalasemic murine SV-B<sub>2</sub> cells confers protection from oxidative damage*. Free Radical Biology and Medicine, 1993, **15**(6), 581-588.
75. Baker, M.A., Aitken, R.J., *Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility*. Reproductive Biology and Endocrinology, 2005, **3**(1), 67.
76. Edge, R., McGarvey, D.J., Truscott, T.G., *The carotenoids as anti-oxidants — a review*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1997, **41**(3), 189-200.
77. Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q., and Singal, P.K., *Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease*. Free Radical Biology & Medicine, 1999, **26**(5/6), 746-761.
78. Burton, G.W., Ingold, K.U., *beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant*. Science, 1984, **11**(224), 569-573.
79. Denisov, E.T., Afanas'ev, I.B., 2010. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*: Taylor & Francis. 1024p.
80. Pietta, P.G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of Natural Products, 2000, **63**(7), 1035-1042.
81. Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G., *Flavonoids as antioxidants*. Journal of the American Chemical Society, 1994, **116**, 4846-4851.
82. Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* Tec & Doc Lavoisier ed. Paris, France. 1269p.
83. Diallo, A. *Etude de la phytochimie et des activités biologiques de Syzygium guineense Willd.(Myrtaceae)*. Thèse de Doctorat d'Etat de Pharmacie de l'Université de Bamako
84. *Réaction inflammatoire: aspects biologiques et cliniques. Conduite à tenir*. Available from: <http://www.medecine.ups-tlse.fr/DCEM2/module8/item112/texte11.htm>, consultée le 12 août 2011
85. Pasquier, C., *Stress oxydatif et inflammation*. Revue française des laboratoires, 1995, **276**, 87-92.
86. Baynes, J.W., *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*. Diabetes 1991, **40**, 405-412.
87. Pelicano, H., Carney, D. and Huang, P., *ROS stress in cancer cells and therapeutic implications*. Drug Resistance Updates, 2004, **7**, 97-110.
88. Kadenbach, B., Ramzan, R. and Vogt, S., *Degenerative diseases, oxidative stress and cytochrome c oxidase function*. Trends in Molecular Medicine, 2009, **15**, 139-140.
89. Mladenka, P., Zatloukalova, L., Filipicky, T. and Hrdina, R., *Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity*. Free Radical Biology & Medicine, 2010, **49** (6), 963-975.
90. Styskal, J.L., Van Remmen, H., Richardson, A., Salmon, A.B., *Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models?* Free Radical Biology and Medicine, 2012, **52**(1), 46-58.
91. Rains, J.L., Jain, S.K., *Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes*. Free Radical Biology and Medicine, 2011, **50**(5), 567-575.
92. Goodman, M., Bostick, R.M., Kucuk, O., Jones, D.P., *Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present, and future*. Free Radical Biology and Medicine, 2011, **51**(5), 1068-1084.
93. Cai, Z., Yan, Y., Yan, L., Wang, F., Huang, H., Wang, Y., Zhao, Y., *Serum level of MMP-2, MMP-9 and Ox-LDL in Alzheimer's disease with hyperlipoidemia*. Journal of Medical Colleges of PLA, 2007, **22**(6), 352-356.
94. Markesbery, W.R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radical Biology & Medicine, 1997, **23**(1), 134-147.
95. Mueller, C.F., Laude, K., McNally, J.S., and Harrison, D.G., *Redox mechanisms in blood vessels*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005, **2**, 274-278.
96. Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S. and Runge, M.S., *Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes*. Journal of Thrombosis and Haemostasis 2005, **2**, 254-267.
97. Fearon, I.M., Faux, S.P., *Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2009, **47**(3), 372-381.
98. Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudoux, J.L., Thérond, P., Legrand, A., Delattre, J., *Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose*. Nutrition clinique et métabolisme, 2002, **16**(4), 260-267.
99. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. The Journal of Clinical Investigation, 2004, **114**(12), 1752-1761.
100. Suhrbier, A., Jaffar-Bandjee, M.C., Gasque, P., *Arthritogenic alphaviruses - an overview*. Nature Reviews Rheumatology, 2012, **8**(7), 420-429.
101. Robinson, M.C., *An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952-1953*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1955, **49**(1), 28-32.
102. Carey, D.E., Myers, R.M., DeRanitz, C.M., Jadhav, M., Reuben, R., *The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1969, **63**(4), 434-445.
103. Sergon, K., Yahaya, A.A., Brown, J., Bedja, S.A., Mlindasse, M., Agata, N., Allaranger, Y., Ball, M.D., Powers, A.M., Ofula, V., Onyango, C., Konongoi, L.S., Sang, R., Njenga, M.K., Breiman, R.F., *Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2007, **76**(6), 1189-1193.
104. Burt, F.J., Rolph, M.S., Rulli, N.E., Mahalingam, S., Heise, M.T., *Chikungunya: a re-emerging virus*. Lancet, 2012, **379**(9816), 662-671.

105. Ng, L.C., Hapuarachchi, H.C., *Tracing the path of Chikungunya virus--evolution and adaptation*. Infection, Genetics and Evolution, 2010, **10**(7), 876-885.
106. Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A.C., Panning, M., Cordioli, P., Fortuna, C., Boros, S., Magurano, F., Silvi, G., Angelini, P., Dottori, M., Ciufolini, M.G., Majori, G.C., Cassone, A., *Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region*. Lancet, 2007, **370**(9602), 1840-1846.
107. Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J.M., Souarès, Y., Failloux, A.B., Tolou, H.J., Budelot, M., Cosserat, D., Leparco-Goffart, I., and Desprès P., *Chikungunya virus, southeastern France*. Emerging Infectious Diseases journal, 2011, **17**, 910-913.
108. Zayed, A., Awash, A.A., Esmail, M.A., Al-Mohamadi, H.A., Al-Salwai, M., Al-Jasari, A., Medhat, I., Morales-Betoulle, M.E., Mnzava, A., *Detection of Chikungunya virus in Aedes aegypti during 2011 outbreak in Al Hodayda, Yemen*. Acta Tropica, 2012, **123**(1), 62-66.
109. Dupuis-Maguiraga, L., Brun, S., Noret, M., Gras, G., Roques, P., *Physiopathologie du chikungunya: les marqueurs de l'infection de la phase aiguë ; l'atteinte chronique*. Virologie, 2011, **15**(4), 251-268.
110. Powers, A.M., Brault, A.C., Tesh, R.B. and Weaver, S.C., *Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses : evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships*. Journal of General Virology, 2000, **81**, 417-479.
111. Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., Higgs, S., *A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential*. PLoS Pathogens, 2007, **3**(12), e201.
112. Pialoux, G., Gauzere, B.A., Jaureguiberry, S., Strobel, M., *Chikungunya, an epidemic arbovirolosis*. The Lancet Infectious Diseases, 2007, **7**(5), 319-327.
113. Kam, Y.W., Ong, E.K., Renia, L., Tong, J.C., Ng, L.F., *Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention*. Microbes and Infection, 2009, **11**(14-15), 1186-1196.
114. Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Le Roux, K., Prevost, M.C., Fsihi, H., Frenkiel, M.P., Blanchet, F., Afonso, P. V., Ceccaldi, P.E., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., Saib, A., Rey, F.A., Arenzana-Seisdedos, F., Despres, P., Michault, A., Albert, M.L., Schwartz, O., *Characterization of reemerging chikungunya virus*. PLOS Pathogens, 2007, **3**(6), e89.
115. Ozden, S., Huerre, M., Riviere, J.P., Coffey, L.L., Afonso, P.V., Mouly, V., de Monredon, J., Roger, J.C., El Amrani, M., Yvin, J.L., Jaffar, M.C., Frenkiel, M.P., Sourisseau, M., Schwartz, O., Butler-Browne, G., Despres, P., Gessain, A., Ceccaldi, P.E., *Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection*. PLoS One, 2007, **2**(6), e527.
116. Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., Guigand, L., Dubreil, L., Lebon, P., Verrier, B., de Lamballerie, X., Suhrbier, A., Cherel, Y., Le Grand, R., Roques, P., *Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages*. The Journal of Clinical Investigation, 2010, **120**(3), 894-906.
117. Ledrans, M., *L'utilisation des traitements insecticides dans la lutte contre les arboviroses : un mal pour un bien ?* Environnement, Risques & Santé, 2008, **7**(2), 83-86.
118. Jacquier, C., Simon, F., Mura, M., Roméo, E., Savini, H., Landais, C., Javelle, E., Carli, P., *Efficacité du méthotrexate dans le traitement du rhumatisme chronique post-chikungunya*. La Revue de médecine interne, 2010, **31**(0), S441.
119. Das, T., Jaffar-Bandjee, M.C., Hoarau, J. J., Krejlich Trotot, P., Denizot, M., Lee-Pat-Yuen, G., Sahoo, R., Guiraud, P., Ramful, D., Robin, S., Alessandri, J.L., Gauzere, B.A., Gasque, P., *Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus*. Progress in Neurobiology, 2010, **91**(2), 121-129.
120. Briolant, S., Garin, D., Scaramozzino, N., Jouan, A., Crance, J.M., *In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin combination*. Antiviral Research, 2004, **61**(2), 111-117.
121. Khan, M., Santhosh, S.R., Tiwari, M., Lakshmana Rao, P.V., Parida, M., *Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells*. Journal Of Medical Virology, 2010, **82**(5), 817-824.
122. Delogu, I., Pastorino, B., Baronti, C., Nougairède, A., Bonnet, E., de Lamballerie, X., *In vitro antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant*. Antiviral Research, 2011, **90**(3), 99-107.
123. Bassetto, M., De Burghgraeve, T., Leyssen, P., Neyts, J., Branciale, A., *Computer-aided Design and Evaluation of Novel Anti-CHIKV Compounds*. Antiviral Research, 2011, **90**(2), A67.
124. Ahola, T., Pohjala, L., Kaukinen, P., Utt, A., Varjak, M., Merits, A., Tammela, P., *Identification of Alphavirus Inhibitors by Using Virus-Based Assays and a Chikungunya Replicon Cell Line*. Antiviral Research, 2011, **90**(2), A52-A53.
125. Neergheen, V.S., Soobrattee, M. A., Bahorun, T., Aruoma, O. I., *Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro*. Journal of Plant Physiology 2006, **163**, 787-799.
126. Ramful, D., Aumjaud, B., Neergheen, V.S., Soobrattee, M.A., Googoolye, K., Aruoma, O.I., Bahorun, T., *Polyphenolic content and antioxidant activity of Eugenia pollicina leaf extract in vitro and in model emulsion systems*. Food Research International 2011, **44**, 1190-1196.
127. Puvanendran, S., Wickramasinghe, A., Karunaratne, D.N., Carr, G., Wijesundara, D.S.A., Andersen, R.J., Karunaratne, V., *Antioxidant Constituents from Xylopiya championii*. Pharmaceutical Biology, 2008, **46**(5), 352-355.
128. N'dri, K., Bosson, A.K., Mamyrbekova-Bekro J.A, Jean, N., Bekro, Y.A., *Chemical Composition and Antioxidant Activities of Essential Oils of Xylopiya Aethiopica (Dunal) a. Rich*. European Journal of Scientific Research, 2009, **37**(2), 311-318.
129. Adaramoye, O.A., Okiti, O.O., Farombi, E.O., *Dried fruit extract from Xylopiya aethiopica (Annonaceae) protects Wistar albino rats from adverse effects of whole body radiation*. Experimental and Toxicologic Pathology, **63**(7-8), 635-643.
130. Adefegha, S.A., Oboh, G., *Effect of diets supplemented with Ethiopian pepper [Xylopiya aethiopica (Dun.) A. Rich (Annonaceae)] and Ashanti pepper [Piper guineense Schumach. et Thonn (Piperaceae)] on some biochemical parameters in normal rats*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, **2**(2), S558-S566.
131. Braga, F.C., Wagner, H., Lombardi, J.A., de Oliveira, A.B., *Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase*. Phytomedicine, 2000, **6**(6), 447-452.
132. Lajide, L., Escoubas, P., Mizutani, J., *Termite antifeedant activity in Xylopiya aethiopica*. Phytochemistry, 1995, **40**(4), 1105-1112.
133. Kehinde, K., Angela, O., *Comparative Biological Activity of Synzygium aromaticum (L) and Xylopiya ethiopica on Rhizopetha dominica F (Coleoptera: Bostrychidae) and Sitophilus zeamais Motsch (Coleoptera: Cuculionidae) in Maize Grains*. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2004, **7**(3), 339-342.
134. Tekwu, E.M., Askun, T., Kuete, V., Nkengfack, A.E., Nyasse, B., Etoa, F.X., Beng, V.P., *Antibacterial activity of selected Cameroonian dietary spices ethno-medically used against strains of Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Ethnopharmacology **142**(2), 374-382.



135. Asekun, O.T., Adeniyi, B.A., *Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of Xylopi aethiopia from Nigeria*. Fitoterapia, 2004, **75**(3-4), 368-370.
136. Tatsadjieu, L.N., Essia Ngang, J.J., Ngassoum, M.B., Etoa, F.X., *Antibacterial and antifungal activity of Xylopi aethiopia, Monodora myristica, Zanthoxylum xanthoxyloides and Zanthoxylum lepreurii from Cameroon*. Fitoterapia, 2003, **74**(5), 469-472.
137. Osorio, E., Arango, G.J., Jimenez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutierrez, D., Paco, M.A., Gimenez, A., Robledo, S., *Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae*. Journal of Ethnopharmacology, 2007, **111**(3), 630-635.
138. de Mesquita, M.L., Grellier, P., Mambu, L., de Paula, J.E., Espindola, L.S., *In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies*. Journal of Ethnopharmacology, 2007, **110**(1), 165-170.
139. Alfonso, D., Colman-Saizarbitoria, T., Zhao, G.X., Shi, G., Ye, Q., Schwedler, J.T., McLaughlin, J.L., *Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, possessing an unusual bis-THF ring structure, from Xylopi aromatica (Annonaceae)*. Tetrahedron, 1996, **52**(12), 4215-4224.
140. Suffredini, I.B., Paciencia, M.L., Varella, A.D., Younes, R.N., *In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia*. Fitoterapia, 2007, **78**(3), 223-226.
141. Cavalcanti, B.C., Ferreira, J.R., Moura, D.J., Rosa, R.M., Furtado, G.V., Burbano, R.R., Silveira, E.R., Lima, M.A., Camara, C.A., Saffi, J., Henriques, J.A., Rao, V.S., Costa-Lotufo, L.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., *Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from Xylopi sericeae (Annonaceae)*. Mutation Research, 2010, **701**(2), 153-163.
142. Boyom, F.F., Fokou, P.V.T., Yamthe, L.R.T., Mfopa, A.N., Kemgne, E.M., Mbacham, W.F., Tsamo, E., Zollo, P.H.A., Gut, J., Rosenthal, P.J., *Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **134**(3), 717-724.
143. Boyom, F.F., Nguouana, V., Zollo, P.H., Menut, C., Bessiere, J.M., Gut, J., Rosenthal, P.J., *Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants*. Phytochemistry, 2003, **64**(7), 1269-1275.
144. Garavito, G., Rincon, J., Arteaga, L., Hata, Y., Bourdy, G., Gimenez, A., Pinzon, R., Deharo, E., *Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology 2006, **107**(3), 460-462.
145. de Oliveira, A.P., Furtado, F.F., da Silva, M.S., Tavares, J.F., Mafra, R.A., Araujo, D.A., Cruz, J.S., de Medeiros, I.A., *Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302)*. Vascular Pharmacology, 2006, **44**(5), 338-344.
146. Somova, L.I., Shode, F.O., Moodley, K., Govender, Y., *Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of Xylopi aethiopia and Alepidea amatymbica*. Journal of Ethnopharmacology, 2001, **77**(2-3), 165-174.
147. Martins, D., Osshiro, E., Roque, N.F., Marks, V., Gottlieb, H.E., *A sesquiterpene dimer from Xylopi aromatica*. Phytochemistry, 1998, **48**(4), 677-680.
148. Kamperdick, C., Phuong, N.M., Van Sung, T., Adam, G., *Guaiane dimers from Xylopi vielana*. Phytochemistry, 2001, **56**(4), 335-340.
149. Kamperdick, C., Phuong, N.M., Adam, G., Van Sung, T., *Guaiane dimers from Xylopi vielana*. Phytochemistry, 2003, **64**(4), 811-816.
150. Martins, D., Hamerski, L., Alvarenga, S.A.V., Roque, N.F., *Labdane dimers from Xylopi aromatica*. Phytochemistry, 1999, **51**, 813-817.
151. Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Roque, N.F., *Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of Xylopi brasiliensis Spreng (Annonaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, **33**(9), 948-951.
152. Nik Abdullah Zawawi, N.K., Ahmat, N., Ahmad, R., Jaafar, F.M., Ghani, N.A., *Oxoaporphine alkaloids and flavonols from Xylopi ferruginea (Annonaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, **43**, 7-9.
153. Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Roque, N.F., *Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of Xylopi emarginata (Annonaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, **31**(5), 535-537.
154. Campos de Andrade, N., Barbosa-Filho, J.M., Da-Silva, M.S., da-Cunha, E.V. L., Maia, J.G.S., *Diterpenes and volatile constituents from the leaves of Xylopi cayennensis Maas*. Biochemical Systematics and Ecology, 2004, **32**(11), 1055-1058.
155. Moreira, I.C., Roque, N.F., Lago, J.H.G., *Diterpene adducts from branches of Xylopi emarginata*. Biochemical Systematics and Ecology, 2006, **34**(11), 833-837.
156. de Melo, A.C., Cota, B.B., de Oliveira, A.B., Braga, F.C., *HPLC quantitation of kaurane diterpenes in Xylopi species*. Fitoterapia, 2001, **72**(1), 40-45.
157. Wijeratne, E.M.K., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Tezuka Y., Gunatilaka, A.A.L., *A dioxoaporphine and other alkaloids of two annonaceous plants of Sri Lanka*. Phytochemistry, 1996, **42**(6), 1703-1706.
158. Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Iwasa, K., Kato, A., Mathenge, S.G., Chalo Mutiso, P.B., Juma, F.D., *Quaternary isoquinoline alkaloids from Xylopi parviflora*. Phytochemistry, 2004, **65**(7), 939-944.
159. Nishiyama, Y., Moriyasu, M., Ichimaru, M., Iwasa, K., Kato, A., Mathenge, S.G., Chalo Mutiso, P.B., Juma, F. D., *Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from Xylopi parviflora*. Phytochemistry, 2006, **67**(24), 2671-2675.
160. Hegde, K., Satyanarayana, D., Joshi, A.B., *Phytochemical investigation of root extract of the plant Carissa spinarum*. RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, **2**(1), 55-59.
161. Rao, R.J., Kumar, U.S., Reddy, S.V., Tiwari, A.K., Rao, J.M., *Antioxidants and a new germacrane sesquiterpene from Carissa spinarum*. Natural Product Research, 2005, **19**(8), 763-769.
162. Sahreen, S., Khan, M.R., Khan, R.A., *Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits*. Food Chemistry, 2010, **122**, 1205-1211.
163. Sahreen, S., Khan, M. Khan, R., *Hepatoprotective effects of methanol extract of Carissa opaca leaves on CCl4-induced damage in rat*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2011, **11**(1), 48.
164. Wangteeraprasert, R., Likhitwitayawuid, K., *Lignans and a Sesquiterpene Glucoside from Carissa carandas Stem*. Helvetica Chimica Acta, 2009, **92**(6), 1217-1223.
165. Sanwal, R., Chaudhary, A.K., *Wound healing and antimicrobial potential of Carissa spinarum Linn. in albino mice*. Journal of Ethnopharmacology 2011, **135**, 792-796.
166. Ya'u, J., Yaro, A.H., Abubakar, M.S., Anuka, J.A., Hussaini, I.M., *Anticonvulsant activity of Carissa edulis (Vahl) (Apocynaceae) root bark extract*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **120**(2), 255-258.
167. Hegde, K., Satyanarayana D., and Joshi, A.B., *Evaluation of Anticonvulsant Activity of Carissa spinarum Root Extract*. RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, **1**(1), 64-68.
168. Nedi, T., Mekonnen, N., Urga, K., *Diuretic effect of the crude extracts of Carissa edulis in rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **95**(1), 57-61.

169. Lindsay, E.A., Berry, Y., Jamie, J.F., Bremner, J.B., *Antibacterial compounds from Carissa lanceolata R.Br.* Phytochemistry, 2000, **55**(5), 403-406.
170. Itankar, P.R., Lokhande, S.J., Verma, P.R., Arora, S.K., Sahu, R.A., Patil, A.T., *Antidiabetic potential of unripe Carissa carandas Linn. fruit extract.* Journal of Ethnopharmacology, 2011, **135**(2), 430-433.
171. Sumbul, S., and Ahmed, S.I., *Anti-hyperlipidemic Activity of Carissa carandas (Auct.) Leaves Extract in Egg Yolk Induced Hyperlipidemic Rats* Journal of Basic & Applied Sciences, 2012, **8**, 124-134.
172. El-Fiky, F.K., Abou-Karam, M.A., Afify, E.A., *Effect of Luffa aegyptiaca (seeds) and Carissa edulis (leaves) extracts on blood glucose level of normal and streptozotocin diabetic rats.* Journal of Ethnopharmacology, 1996, **50**(1), 43-47.
173. Begum, S., Syed, S.A., Siddiqui, B.S., Sattar, S.A., Choudhary, M.I., *Carandinol: First isohopane triterpene from the leaves of Carissa carandas L. and its cytotoxicity against cancer cell lines.* Phytochemistry Letters, 2013, **6**, 91-95.
174. Taylor, R.S., Hudson, J.B., Manandhar, N.P., Towers, G.H., *Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal.* Journal of Ethnopharmacology, 1996, **53**(2), 97-104.
175. Tolo, F.M., Rukunga, G.M., Muli, F.W., Njagi, E.N., Njue, W., Kumon, K., Mungai, G.M., Muthaura, C.N., Muli, J.M., Keter, L.K., Oishi, E., Kofi-Tsekpo, M.W., *Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant Carissa edulis against herpes simplex virus.* Journal of Ethnopharmacology, 2006, **104**(1-2), 92-99.
176. Hegde, K., Joshi, A.B., *Hepatoprotective and antioxidant effect of Carissa spinarum root extract against CCl4 and paracetamol-induced hepatic damage in rats.* Bangladesh Journal of Pharmacology, 2010, **5**, 73-76.
177. Hegde, K., Joshi, A.B., *Hepatoprotective effect of Carissa carandas Linn root extract against CCl4 and paracetamol induced hepatic oxidative stress.* Indian Journal of Experimental Biology, 2009, **47**(8), 660-667.
178. Hegde, K., Joshi, A.B., *Preliminary Phytochemical Screening and Antipyretic Activity of Carissa Spinarum Root Extract.* Der Pharmacia Lettre, 2010, **2**(3), 255-260.
179. Hegde, K., Issac, C., Joshi, A.B., *Antiarthritic activity of Carissa spinarum root extract in Freund's adjuvant induced polyarthritis in rats.* Pharmacologyonline, 2010, **2**, 713-718.
180. Achenbach, H., Waibel, R., Addae-Mensah, I., *Sesquiterpenes from carissa edulis.* Phytochemistry, 1985, **24**(10), 2325-2328.
181. Achenbach, H., Waibel, R., Addae-Mensah, I., *Lignans and other constituents from Carissa edulis.* Phytochemistry, 1983, **22**(3), 749-753.
182. Pal, R., Kulshreshtha, D.K., Rastogi, R.P., *A new lignan from Carissa carandas.* Phytochemistry, 1975, **14**(10), 2302-2303.
183. Singh, B., Rastogi, R.P., *The structure of carindone.* Phytochemistry, 1972, **11**(5), 1797-1801.
184. Johns, T., Mahunnah, R.L., Sanaya, P., Chapman, L., Ticktin, T., *Saponins and phenolic content in plant dietary additives of a traditional subsistence community, the Batemi of Ngorongoro District, Tanzania.* Journal of Ethnopharmacology, 1999, **66**(1), 1-10.
185. Divakar, C.M., Sheela, S., Sandhya, S., Vinod, K.R., Pillai, N.R., Rao, S.B., *Anti-inflammatory and Antioxidant activities of Polyscias filicifolia saponins.* Der Pharmacia Lettre, 2010, **2**(1), 41-47.
186. Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bolling, B., Wijaya, H., *Flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia.* Food Chemistry, 2010, **121**(4), 1231-1235.
187. Buchanan, M.S., Carroll, A.R., Edser, A., Parisot, J., Addepalli, R., Quinn, R.J., *Tyrosine kinase inhibitors from the rainforest tree Polyscias murrayi.* Phytochemistry, 2005, **66**(4), 481-485.
188. Chaiyana, W., Okonogi, S., *Inhibition of cholinesterase by essential oil from food plant.* Phytomedicine, 2012, **19**(8-9), 836-839.
189. Gopalsamy, N., Gueho, J., Julien, H.R., Owasally, A.W., and Hostettmann, K., *Molluscicidal saponins of Polyscias dichroostachya.* Phytochemistry, 1990, **29**(3), 797-795.
190. Huan, V.D., Yamamura, S., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., Nham, N.T., Chau, H.M., *Oleanane saponins from Polyscias fruticosa.* Phytochemistry, 1998, **47**(3), 451-457.
191. Mitaine-Offfer, A.C., Taponjoui, L.A., Lontsi, D., Sondengam, B.L., Choudhary, M.I., Atta ur, Rahman, Lacaille-Dubois, M.A., *Constituents isolated from Polyscias fulva.* Biochemical Systematics and Ecology, 2004, **32**(6), 607-610.
192. Fasakin, C.F., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., *Antioxidant properties of chlorophyll-enriched and chlorophyll-depleted polyphenolic fractions from leaves of Vernonia amygdalina and Gongronema latifolium.* Food Research International, 2011, **44**(8), 2435-2441.
193. Erasto, P., Grierson, D.S., Afolayan, A.J., *Evaluation of antioxidant activity and the fatty acid profile of the leaves of Vernonia amygdalina growing in South Africa.* Food Chemistry, 2007, **104**(2), 636-642.
194. Adesanoye, O.A., Farombi, E.O., *Hepatoprotective effects of Vernonia amygdalina (Asteraceae) in rats treated with carbon tetrachloride.* Experimental and Toxicologic Pathology, 2010, **62**(2), 197-206.
195. Rauh, L.K., Horinouchi, C.D., Loddi, A.M., Pietrovski, E.F., Neris, R., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Buchi, D.F., Biavatti, M.W., Otuki, M.F., Cabrini, D.A., *Effectiveness of Vernonia scorpioides ethanolic extract against skin inflammatory processes.* Journal of Ethnopharmacology 2011, **138**(2), 390-397.
196. Leite, S.N., Palhano, G., Almeida, S., Biavatti, M.W., *Wound healing activity and systemic effects of Vernonia scorpioides extract in guinea pig.* Fitoterapia, 2002, **73**(6), 496-500.
197. Youn, U.J., Park, E.J., Kondratyuk, T.P., Simmons, C.J., Borris, R.P., Tanamatayarat, P., Wongwiwatthanakut, S., Toyama, O., Songsak, T., Pezzuto, J.M., Chang, L.C., *Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from the flower of Vernonia cinerea.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, **22**(17), 5559-5562.
198. Mazumder, U.K., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P.K., Roy, S., *Evaluation of anti-inflammatory activity of Vernonia cinerea Less. extract in rats.* Phytomedicine, 2003, **10**(2-3), 185-188.
199. Iwalewa, E.O., Iwalewa, O.J., Adeboye, J.O., *Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of Vernonia cinerea less leaf.* Journal of Ethnopharmacology, 2003, **86**(2-3), 229-234.
200. Latha, R.M., Geetha, T., Varalakshmi, P., *Effect of Vernonia cinerea Less flower extract in adjuvant-induced arthritis.* General Pharmacology, 1998, **31**(4), 601-606.
201. Georgewill, O.A., Georgewill, U.O., *Evaluation of the anti-inflammatory activity of extract of Vernonia amygdalina.* Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2010, **3**(2), 150-151.
202. Kos, O., Castro, V., Murillo, R., Poveda, L., Merfort, I., *Ent-kaurane glycosides and sesquiterpene lactones of the hirsutinolide type from Vernonia triflosculosa.* Phytochemistry, 2006, **67**(1), 62-69.
203. Liu, J., Ma, S., Yu, S., Lv, H., Li, Y., Wu, X., Liu, Y., *Seven new vernocuminosides from the stem bark of Vernonia cumingiana Benth.* Carbohydrate Research, 2010, **345**(9), 1156-1162.

204. Liu, J., Liu, Y., Si, Y., Yu, S., Qu, J., Xu, S., Hu, Y., Ma, S., *New vernocuminosides from the stem barks of Vernonia cumingiana Benth.* Steroids, 2009, **74**(1), 51-61.
205. Romanezi da Silveira, R., Foglio, M.A., and Gontijo, J.A.R. , *Effect of the crude extract of Vernonia polyanthes Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats.* Phytomedicine, 2003, **10**(2), 127-131.
206. Germano, M.P., De Pasquale, R., Iauk, L., Galati, E.M, Keita, A., Sanogo, R., *Antiulcer activity of Vernonia kotschyana Sch. Bip.* Phytomedicine, 1996, **2**(3), 229-233.
207. Barbastefano, V., Cola, M., Luiz-Ferreira, A., Farias-Silva, E., Hiruma-Lima, C.A, Rinaldo, D., Vilegas, W., Souza-Brito, A.R., *Vernonia polyanthes as a new source of antiulcer drugs.* Fitoterapia, 2007, **78**(7), 545-551.
208. Erasto, P., Grierson, D.S., Afolayan, A.J., *Bioactive sesquiterpene lactones from the leaves of Vernonia amygdalina* Journal of Ethnopharmacology, 2006, **106**(1), 117-120.
209. Akinpelu, D.A., *Antimicrobial activity of Vernonia amygdalina leaves.* Fitoterapia, 1999, **70**(4), 432-434.
210. Donfack, A.R.N., Toyang, N.J, Wabo, H.K., Tane, T., Awouafack, M.D, Kikuchi, H., Tamokou, J.D.D, Kuiate, J.R, Oshima, Y., *Stigmastane derivatives from the roots of Vernonia guineensis and their antimicrobial activity* Phytochemistry Letters, 2012, **5**, 596-599.
211. Toyang, N.J, Ateh, E.N., Keiser, J., Vargas, M., Bach, H., Tane, P., Sondengam, L.B., Davis, H., Bryant, J., Verpoorte, R., *Toxicity, antimicrobial and anthelmintic activities of Vernonia guineensis Benth. (Asteraceae) crude extracts.* Journal of Ethnopharmacology, 2012, **144**(3), 700-704.
212. Rabe, T., Mullholland, D., Van Staden, J., *Isolation and identification of antibacterial compounds from Vernonia colorata leaves.* Journal of Ethnopharmacology, 2002, **80**(1), 91-94.
213. Hua, L., Li, Y., Wang, F., Lu, D.F, Gao, K., *Biologically active steroids from the aerial parts of Vernonia anthelmintica Willd.* Fitoterapia, 2012, **83**, 1036-1041.
214. Gupta, M., Mazumder, U.K, Manikandan, L., Haldar, P.K, Bhattacharya, S., Kandar, C.C., *Antibacterial activity of Vernonia cinerea.* Fitoterapia, 2003, **74**(1), 148-150.
215. Krishna Kumari, G.S., Masilamani, S., Ganesh, M.R., Aravind, S., Sridhar, S.R., *Zaluzanin D: a fungistatic sesquiterpene from Vernonia arborea.* Fitoterapia, 2003, **74**(5), 479-482.
216. Chukwujekwu, J.C., Lategan, C.A., Smith, P.J., Van Heerden, F.R., Van Staden, J., *Antiplasmodial and cytotoxic activity of isolated sesquiterpene lactones from the acetone leaf extract of Vernonia colorata* South African Journal of Botany, 2009, **75**(1), 176-179.
217. Pillay, P., Vleggaar, R., Maharaj, V.J., Smith, P.J., Lategan, C.A., Chouteau, F., Chibale, K. , *Antiplasmodial hirsutinolides from Vernonia staehelinoides and their utilization towards a simplified pharmacophore.* Phytochemistry, 2007, **68**(8), 1200-1205.
218. Ong, K.W., Hsu, A., Song, L., Huang, D., Tan, B. K., *Polyphenols-rich Vernonia amygdalina shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats.* Journal of Ethnopharmacology, 2011, **133**(2), 598-607.
219. Adaramoye, O.A., Akintayo, O., Achem, J., & Fafunso, M. A., *Lipid-lowering effects of methanolic extract of Vernonia amygdalina leaves in rats fed on high cholesterol diet.* Vascular health and risk management, 2008, **4**(1), 235-241.
220. Fatima, S.S., Rajasekhar, M.D., Kumar, K.V., Kumar, M.T.S., Babu, K.R., Rao, C.A. , *Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate:isopropanol (1:1) fraction of Vernonia anthelmintica seeds in Streptozotocin induced diabetic rats.* Food and Chemical Toxicology, 2010, **48**(2), 495-501.
221. Sy, G.Y., Cissé, A., Nongonierma, R. B., Sarr, M., Mbodj, N. A., Faye, B., *Hypoglycaemic and antidiabetic activity of acetonic extract of Vernonia colorata leaves in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats.* Journal of Ethnopharmacology, 2005, **98**(1), 171-175.
222. Liao, S.G., Wang, Z., Li, J., Liu, Y., Li, Y.T., Zhang, L.J., Long, Q.D., Wang, Y.L., *Cytotoxic sesquiterpene lactones from Vernonia bockiana.* Chinese Journal of Natural Medicines, 2012, **10**(3), 230-233.
223. Buskuhl, H., de Oliveira, F.L., Blind, L.Z., de Freitas, R.A., Barison, A., Campos, F.R., Corilo, Y.E., Eberlin, M.N., Caramori, G.F., Biavatti, M.W., *Sesquiterpene lactones from Vernonia scorpioides and their in vitro cytotoxicity.* Phytochemistry, 2010, **71**(13), 1539-1544.
224. Liu, Y., Nugroho, A.E., Hirasawa, Y., Nakata, A., Kaneda, T., Uchiyama, N, Goda, Y., Shiota, O., Morita, H., Aisa, H.A., *Vernodalidimers A and B, novel orthoester elemanolide dimers from seeds of Vernonia anthelmintica.* Tetrahedron Letters, 2010, **51**(50), 6584-6587.
225. Cameron, K.S., Howard, C.B., Izevbigie, E.B., Hill, B.J., Tchounwou, P.B. , *Sensitivity and mechanisms of taxol-resistant prostate adenocarcinoma cells to Vernonia amygdalina extract.* Experimental and Toxicologic Pathology, 2012, in press.
226. Toyang, N.J., Wabo, H.K., Ateh, E.N., Davis, H., Tane, P., Kimbu, S.F, Sondengam, L.B., Bryant J., *In vitro anti-prostate cancer and ex vivo antiangiogenic activity of Vernonia guineensis Benth. (Asteraceae) tuber extracts.* Journal of Ethnopharmacology, 2012, **141**(3), 866-871.
227. Atangwho, I.J., Edet, E.E., Uti, D.E., Obi, A.U., Asmawi, M.Z., Ahmad, M. , *Biochemical and histological impact of Vernonia amygdalina supplemented diet in obese rats.* Saudi Journal of Biological Sciences, 2012, **19**, 385-392.
228. Owu, D.U., Ben, E.E., Antai, A.B., Ekpe, E.A., Udia, P.M, *Stimulation of gastric acid secretion and intestinal motility by Vernonia amygdalina extract.* Fitoterapia, 2008, **79**(2), 97-100.
229. Awe, S.O., Makinde, J.M., Olajide, O.A., *Cathartic effect of the leaf extract of Vernonia amygdalina.* Fitoterapia, 1999, **70**(2), 161-165.
230. Muregi, F.W., Ishih, A., Miyase, T., Suzuki, T., Kino, H., Amano, T., Mkoji, G.M., Terada, M., *Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ-tolerant rodent parasite, in mice* Journal of Ethnopharmacology, 2007, **111**(1), 190-195.
231. Omoregie, E.S., Pal, A., and Sisodia, B., *In vitro Antimalarial and Cytotoxic Activities of Leaf Extracts of Vernonia amygdalina (Del.).* Nigerian Journal of Basic and Applied Science, 2011, **19**(1), 121-126.
232. Suo, M.R., Yang, J.S., and Zhang, Z.S. , *Two new compounds from the stem of Vernonia cumingiana.* Chinese Chemical Letters, 2008, **19**(2), 180-182.
233. Bazon, J., Lopes, J.L.C., Vichnewski, W., Dias, D.A., Nagamiti, K., Cunha, W.R., and Herz, W., *Cadinanolides and other constituents from Vernonia fruticulosa and Vernonanthuria discolor.* Phytochemistry, 1997, **44**(8), 1535-1536.
234. Tian, G., Zhang, U., Zhang, T., Yang, F., and Ito, Y., *Separation of flavonoids from the seeds of Vernonia anthelmintica Willd by high-speed counter-current chromatography.* Journal of Chromatography A, 2004, **1049**(1), 219-222.
235. Miserez, F., Potterat, O., Marston, A., Mungai, G.M., and Hostettmann, K., *Flavonol glycosides from Vernonia galamensis ssp. nairobiensis.* Phytochemistry, 1996, **43**(1), 283-286.

236. Ola, S.S., Catia, G., Marzia, I., Francesco, V.F., Afolabi, A.A., and Nadia, M., *HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cinnamoyl derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables*. Food Chemistry, 2009, **115**(4), 1568-1574.
237. Hua, L., Qi, W.Y., Hussain, S.H., Gao, K., and Arfan, M., *Highly oxygenated stigmastane-type steroids from the aerial parts of Vernonia anthelmintica Willd.* Steroids, 2012, **77**, 811-818.
238. Tchinda, A.T., Tsopmo, A., Tane, P., Ayafor, J.F., Connolly, J.D., and Sterner, O., *Vernoguinoesterol and vernoguinoside, trypanocidal stigmastane derivatives from Vernonia guineensis (Asteraceae)*. Phytochemistry, 2002, **59**(4), 371-374.
239. Tchinda, A.T., Tane, P., Ayafor, J.F., and Connolly, J.D., *Stigmastane derivatives and isovaleryl sucrose esters from Vernonia guineensis (Asteraceae)*. Phytochemistry, 2003, **63**(7), 841-846.
240. Sanogo, R., Germano, M.P., De Tommasi, N., Pizzi, C., Aquino, R., *Vernoniosides and an androstane glycoside from Vernonia kotschyana*. Phytochemistry, 1998, **47**(1), 73-78.
241. Soobrattee, M.A., Bahorun, T., Neergheen, V.S., Googoolye, K., Aruoma, O.I., *Assessment of the content of phenolics and antioxidant actions of the Rubiaceae, Ebenaceae, Celastraceae, Erythroxylaceae and Sterculaceae families of Mauritian endemic plants*. Toxicology in Vitro, 2008, **22**(1), 45-56.
242. Motlhanka, D.M.T.a.B., U. *Phytochemical investigations and economic value of selected medicinal plants of Botswana*. in Joint Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy & the Phytochemical Society of North America. July 10 - 14, 2010. Tradewinds Island Grand St Petersburg Beach, Florida
243. Masevhe, *South African Association of Botanists (SAAB) Annual Meeting 2012: Abstracts of papers and posters presented at the 38th Annual Congress of the South African Association of Botanists held at the University of Pretoria, Pretoria, 15-18 January 2012*. South African Journal of Botany, 2012, **79**, 173-240.
244. Tshikalange, T.E., Meyer, J.J., Lall, N., Munoz, E., Sancho, R., Van de Venter, M., Oosthuizen, V., *In vitro anti-HIV-1 properties of ethnobotanically selected South African plants used in the treatment of sexually transmitted diseases*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **119**(3), 478-481.
245. McGaw, L.J., Jager, A.K., van Staden, J., *Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2000, **72**(1-2), 247-263.
246. Maregesi, S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., Berghe, D.A.V., Vlietinck, A.J., *Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **119**(1), 58-66.
247. Hamza, O.J., van den Bout-van den Beukel, C.J., Matee, M.I., Moshi, M.J., Mikx, F.H., Selemani, H.O., Mbwambo, Z.H., Van der Ven, A.J., Verweij, P.E., *Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections*. Journal of Ethnopharmacology, 2006, **108**(1), 124-132.
248. Lall, N., Meyer, J.J., *In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of Mycobacterium tuberculosis by ethnobotanically selected South African plants*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **66**(3), 347-354.
249. Deutschlander, M.S., van de Venter, M., Roux, S., Louw, J., Lall, N., *Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes*. Journal of Ethnopharmacology, 2009, **124**(3), 619-624.
250. Hou, Y., Cao, S., Brodie, P., Callmander, M., Ratovoson, F., Randrianaivo, R., Rakotobe, E., Rasamison, V.E., Rakotonandrasana, S., TenDyke, K., Suh, E. M., Kingston, D.G., *Antiproliferative cardenolide glycosides of Elaeodendron alluaudianum from the Madagascar Rainforest*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2009, **17**(6), 2215-2218.
251. Yelani, T., Hussein, A.A., Meyer, J.J.M., *Potent poisonous compounds from Elaeodendron croceum*. South African Journal of Botany, 2008, **74**(2), 384.
252. Maregesi, S.M., Hermans, N., Dhooghe, L., Cimanga, K., Ferreira, D., Pannecouque, C., Vanden Berghe, D.A., Cos, P., Maes, L., Vlietinck, A.J., Apers, S., Pieters, L., *Phytochemical and biological investigations of Elaeodendron schlechteranum*. Journal of Ethnopharmacology 2010, **129**(3), 319-326.
253. Osorio, A.A., Munoz, A., Torres-Romero, D., Bedoya, L.M., Perestelo, N.R., Jimenez, I.A., Alcami, J., Bazzocchi, I.L., *Olean-18-ene triterpenoids from Celastraceae species inhibit HIV replication targeting NF- $\kappa$ B and Sp1 dependent transcription*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012, **52**, 295-303.
254. Prinsloo, G., Meyer, J. M., Hussein, A. A., Munoz, E., Sanchez, R., *A cardiac glucoside with in vitro anti-HIV activity isolated from Elaeodendron croceum*. Natural Product Research, 2010, **24**(18), 1743-1746.
255. Tsujino, Y., Ogoche, J. I., Tazaki, H., Fujimori, T., Mori, K., *Buchaninoid, a steroidal glycoside from Elaeodendron buchananii*. Phytochemistry, 1995, **40**(3), 753-756.
256. E Drewes, S., Mashimbye, M. J., Field, J. S., Ramesar, N., *11,11-dimethyl-1,3,8,10-tetrahydroxy-9-methoxypeltogynan and three pentacyclic triterpenes from Cassine transvaalensis*. Phytochemistry, 1991, **30**(10), 3490-3493.
257. Drewes, S.E., Mashimbye, M.J., *Flavanoids and triterpenoids from Cassine papillosa and the absolute configuration of 11,11-dimethyl-1,3,8,10-tetra-hydroxy-9-methoxypeltogynan*. Phytochemistry, 1993, **32**(4), 1041-1044.
258. Núñez, M.J., Ardiles, A.E., Martínez, M.L., Torres-Romero, D., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., *Triterpenoids from Cassine xylocarpa and Celastrus vulcanicola (Celastraceae)*. Phytochemistry Letters, 2012, **6**(1), 148-151.
259. Fernando, H.C., Gunatilaka, A. A., Kumar, V., Weeratunga, G., Tezuka, Y., Kikuchi, T., *Two new quinone-methides from cassine balae: Revised structure of balaenonol*. Tetrahedron Letters, 1988, **29**(3), 387-390.
260. Chandrasiri Fernando, H., Leslie Gunatilaka, A. A., Tezuka, Y., Kikuchi, T., *Studies on terpenoids and steroids - 18 balaenonol, balaenol and isobalaendiol: Three new 14(15)-ene-quinone-methide triterpenoids from cassine balae*. Tetrahedron, 1989, **45**(18), 5867-5876.
261. Gamlath, C.B., Leslie Gunatilaka, A.A., Tezuka, Y., Kikuchi, T., *The structure of celastranhydride: A novel triterpene anhydride of Celastraceae*. Tetrahedron Letters, 1988, **29**(1), 109-112.
262. Gamlath, C.B., Leslie Gunatilaka, A.A., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Balasubramaniam, S., *Quinone-methide, phenolic and related triterpenoids of plants of Celastraceae: further evidence for the structure of Celastranhydride*. Phytochemistry, 1990, **29**(10), 3189-3192.
263. Weeratunga, G., Kumar, V., *D: B-friedoolean-5-ene-3 $\beta$ ,29-diol, an angular methyl oxygenated D: B-friedooleanene from Elaeodendron balae*. Phytochemistry, 1985, **24**(10), 2369-2372.
264. Shimada, K., Kyuno, T., Nambara, T., Uchida, I., *Structures of elaeodendrosides B, C, F, G, K and L, a series of cardiac glycosides isolated from Elaeodendron glaucum*. Phytochemistry, 1985, **24**(6), 1345-1350.
265. Tsanuo, M.K., Hassanali, A., Jondiko, I. J., Torto, B., *Mutangin, a dihydroagarofuranoid sesquiterpene insect antifeedant from Elaeodendron buchananii*. Phytochemistry, 1993, **34**(3), 665-667.
266. Lee, S.M., Na, M. K., An, R. B., Min, B. S., Lee, H. K., *Antioxidant Activity of Two Phloroglucinol Derivatives from Dryopteris crassirhizoma*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2003, **26**(9), 1354-1356.

267. Zhang, M., Cao, J., Dai, X., Chen, X., Wang, Q., *Flavonoid Contents and Free Radical Scavenging Activity of Extracts from Leaves, Stems, Rachis and Roots of Dryopteris erythrosora*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2012, **11**(3), 991-997.
268. Cao, J., Xia, X., Chen, X., Xiao, J., Wang, Q., *Characterization of flavonoids from Dryopteris erythrosora and evaluation of their antioxidant, anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities*. Food and Chemical Toxicology, 2012, **51**, 242-250.
269. Jiao, J., Gai, Q.Y., Fu, Y.J., Zu, Y.G., Luo, M., Wang, W., Zhao, C.J., *Microwave-assisted ionic liquids pretreatment followed by hydro-distillation for the efficient extraction of essential oil from Dryopteris fragrans and evaluation of its antioxidant efficacy in sunflower oil storage*. Journal of Food Engineering, 2012, in press.
270. Li, X.J., Wang, W., Luo, M., Li, C.Y., Zu, Y.G., Mu, P.S., Fu, Y.J., *Solvent-free microwave extraction of essential oil from Dryopteris fragrans and evaluation of antioxidant activity*. Food Chemistry, 2012, **133**(2), 437-444.
271. Kathirvel, A., Sujatha, V., *Phytochemical studies, antioxidant activities and identification of active compounds using GC-MS of Dryopteris cochleata leaves*. Arabian Journal of Chemistry, 2012, in press.
272. Soare, L.C., Ferdes, M., Stefanov, S., Denkova, Z., Nicolova, R., Denev, P., Bejan, C., Paunescu, A., *Antioxidant Activity, Polyphenols Content and Antimicrobial Activity of Several Native Pteridophytes of Romania*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2012, **40**(1), 53-57.
273. Ahmad, M., Jahan, N., Mehjabeen, A.B.R., Ahmad, M., Ullah, O., Mohammad, N., *Differential inhibitory potencies of alcoholic extract of different parts of Dryopteris chrysocoma on inflammation in mice and rats*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, **24**(4), 559.
274. Yang, Y., Lee, G.J., Yoon, D.H., Yu, T., Oh, J., Jeong, D., Lee, J., Kim, S.H., Kim, T.W., Cho, J.Y., *ERK1- and TBK1-targeted anti-inflammatory activity of an ethanol extract of Dryopteris crassirhizoma*. Journal of Ethnopharmacology, 2013, **145**(2), 499-508.
275. Ito, H., Muranaka, T., Mori, K., Jin, Z.X., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T., *Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from Dryopteris fragrans and their anti-tumor promoting activity*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2000, **48**(8), 1190-1195.
276. Ito, H., Muranaka, T., Mori, K., Jin, Z.X., Yoshida, T., *Dryofragin and aspidin PB, piscicidal components from Dryopteris fragrans*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1997, **45**(10), 1720-1722.
277. Min, B.S., Tomiyama, M., Ma, C.M., Nakamura, N., Hattori, M., *Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of Dryopteris crassirhizoma and their inhibitory effects on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2001, **49**(5), 546-550.
278. Lee, J.S., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., *Two new triterpenes from the Rhizome of Dryopteris crassirhizoma, and inhibitory activities of its constituents on human immunodeficiency virus-1 protease*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2008, **56**(5), 711-714.
279. Kwon, D.Y., Kang, O.H., Choi, J.G., Lee, Y.S., Oh, Y.C., Chae, H.S., Lee, G.H., Park, P.S., Kim, Y.C., Sohn, D.H., Park, H., Lee, J.H., *Antibacterial effect of Dryopteris crassirhizoma against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Fitoterapia, 2007, **78**(6), 430-433.
280. Lu, C., Zhang, H.Y., Ji, J., Wang, G.X., *In vivo anthelmintic activity of Dryopteris crassirhizoma, Kochia scoparia, and Polygala tenuifolia against Dactylogyrus intermedius (Monogenea) in goldfish (Carassius auratus)*. Parasitology research, 2012, **110**(3), 1085-1090.
281. Magalhaes, L.G., Kapadia, G.J., Da Silva Tonuci, L.R., Caixeta, S.C., Parreira, N.A., Rodrigues, V., Da Silva Filho, A., *In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from Dryopteris species against Schistosoma mansoni adult worms (English)*. Parasitology research, 2010, **106**(2), 395-401.
282. Socolsky, C., Domínguez, L., Asakawa, Y., Bardón, A., *Unusual terpenylated acylphloroglucinols from Dryopteris wallichiana*. Phytochemistry, 2012, **80**, 115-122.
283. Khoorkhor, O., Bolin, Q., Oshida, Y., Sato, Y., *Effect of Mongolian plants on in vivo insulin action in diabetic rats*. Diabetes Research and Clinical Practice 2007, **75**(2), 135-140.
284. Chang, S.H., Bae, J. H., Hong, D. P., Choi, K. D., Kim, S. C., Her, E., Kim, S.H., Kang, C.D., *Dryopteris crassirhizoma has anti-cancer effects through both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways and G0/G1 phase arrest in human prostate cancer cells*. Journal of Ethnopharmacology, 2010, **130**(2), 248-254.
285. Zhang, Y., Luo, M., Zu, Y., Fu, Y., Gu, C., Wang, W., Yao, L., Efferth, T., *Dryofragin, a phloroglucinol derivative, induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through ROS-mediated mitochondrial pathway*. Chemico-Biological Interactions, 2012, **199**, 129-136.
286. Kapadia, G.J., Tokuda, H., Konoshima, T., Takasaki, M., Takayasu, J., Nishino, H., *Anti-tumor promoting activity of Dryopteris phlorophenone derivatives*. Cancer Letters, 1996, **105**(2), 161-165.
287. Hisada, S., Yasuno, S., Inagaki, I., *Pharmaceutical studies on Japanese ferns containing phloroglucinol derivatives. 7. On the constituents of Dryopteris bissetiana*. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1971, **91**(6), 687-689.
288. Hisada, S., Shiraishi, K., Inagaki, I., *Pharmaceutical studies on Japanese ferns containing phloroglucinol derivatives. 9. On the constituents of Dryopteris dickinsii. (1)*. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1972, **92**(9), 1124-1128.
289. Wollenweber, E., Stevens, J.F., Ivancic, M., Deinzer, M.L., *Acylphloroglucinols and flavonoid aglycones produced by external glands on the leaves of two Dryopteris ferns and Currania robertiana*. Phytochemistry, 1998, **48**(6), 931-939.
290. Widen, C., Fraser-Jenkins, C., Reichstein, T., Sarvela, J., *A survey of phenolic compounds in Dryopteris and related fern genera. Part III*. Annals Botany Fennici, 2001, **38**, 99-138.
291. Coşkun, M., Sakushima, A., Nishibe, S., Hisada, S., Tanker, N., *A phloroglucinol derivative of Dryopteris abbreviata*. Phytochemistry, 1982, **21**(6), 1453-1454.
292. Widén, C.J., Fraser-Jenkins, C.R., Reichstein, T., *New phloroglucinol derivatives in Dryopteris subimpressa (Pteridophyta, Dryopteridaceae)*. Annales Botanici Fennici, 1997, **34**, 21-26.
293. Fuchino, H., Nakamura, H., Wada, H., Hakamatsuka, T., Tanaka, N., *Two new acyl-phloroglucinols from Dryopteris atrata*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1997, **45**(6), 1101-1102.
294. Na, M., Jang, J., Min, B.S., Lee, S.J., Lee, M.S., Kim, B.Y., Oh, W.K., Ahn, J.S., *Fatty acid synthase inhibitory activity of acylphloroglucinols isolated from Dryopteris crassirhizoma*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, **16**(18), 4738-4742.
295. Gao, Z., Ali, Z., Zhao, J., Qiao, L., Lei, H., Lu, Y., Khan, I. A., *Phytochemical investigation of the rhizomes of Dryopteris crassirhizoma*. Phytochemistry Letters, 2008, **1**(4), 188-190.
296. Tryon, R., Widén, C. J., Huhtikangas, A., Lounasmaa, M., *Phloroglucinol derivatives in Dryopteris parallelogramma and D. patula*. Phytochemistry, 1973, **12**(3), 683-687.

297. Patama, T.T., Widen, C.J., *Phloroglucinol derivatives from Dryopteris fusco-atra and D. hawaiiensis*. Phytochemistry, 1991, **30**(10), 3305-3310.
298. Hiraoka, A., *Flavonoid Patterns in Athyriaceae and Dryopteridaceae*. Biochemical Systematics and Ecology, 1978, **6**(3), 171-175.
299. Feng, W.S., Cao, X.W., Zheng, X.K., Kuang, H.X., *A new flavanone from Dryopteris sublaeta*. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica, 2005, **40**(5), 443-446.
300. Shiojima, K., Suzuki, M., Matsumura, T., Ageta, H., *Fern constituent : a new triterpenoid hydrocarbon, trisnorhopane, isolated from the leaves of Dryopteris crassirhizoma and Gleichenia japonica*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 1994, **42**(2), 377-378.
301. Shiojima, K., Arai, Y., Ageta, H., *Seasonal fluctuation of triterpenoid constituents from dried leaflets of Dryopteris crassirhizoma*. Phytochemistry, 1990, **29**(4), 1079-1082.
302. Kuang, H., Sun, C., Zhang, Y., Chen, D., Yang, B., Xia, Y., *Three drimane sesquiterpene glucoside from the aerial parts of Dryopteris fragrans (L.) schot*. Fitoterapia, 2009, **80**(2), 134-137.
303. Feng, W.S., Cao, X.W., Kuang, H.X., Zheng, X.K., *A new stilbene glycoside from Dryopteris sublaeta*. Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica, 2005, **40**(12), 1131-1134.
304. Chang, X., Li, W., Koike, K., Wu, L., Nikaido, T., *Phenolic constituents from the rhizomes of Dryopteris crassirhizoma*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2006, **54**(5), 748-750.
305. Kang, W.Y., Li, C.Q., Ji, Z.Q., *A new carbamic acid from Dryopteris wallichiana*. Chemistry of Natural Compounds, 2011, **47**(1), 91-93.
306. de Cordemoy, E.J., 1895. *Flore de l'île de La Réunion*. J. Cramer & H.K. Swann Editions ed. New York, USAp.
307. Kebenei, J.S., Ndalut, P. K. and Bett, C. K., *Insecticidal activity of 3-acetyl moraldehyde and agauriasterone from Agauria salicifolia*. Scientific Research and Essay, 2007, **2**(7), 256-258.
308. Ewane-Nyambi, G., Raymond, G., *The effect of Agauria salicifolia leaf extract on the sodium current of tetrodotoxin-treated frog skeletal muscle fibres*. Journal of Ethnopharmacology, 1993, **38**(1), 49-53.
309. Ewane-Nyambi, G., Bois, P., Raymond, G., *The voltage-dependent effect of Agauria salicifolia leaf extract on the sodium current of isolated frog skeletal and cardiac muscle cells*. Journal of Ethnopharmacology, 1993, **38**(1), 39-47.
310. Ewane-Nyambi, G., Bois, P., Raymond, G., *The effects of Agauria salicifolia leaf extract on calcium current and excitation-contraction coupling of isolated frog muscle cells*. Journal of Ethnopharmacology, 1993, **38**(1), 55-61.
311. Martinet, O., Pommier, P., Sclossmacher, P., Develay, A., de Haro, L., *Intoxication par bois de gale (Agauria salicifolia)*. La Presse Médicale, 2005, **34**(11), 797-798.
312. M. Weber, A.C., V. Chappel, F. binaber, A. Le Gallo, S. Ragonneau, C. Verdier, C. Lassalle, E. Metas and E. D'Ortenzio, *Intoxication collective par "miel fou" à l'île de La Réunion (Océan Indien)*. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 2009, **102**(1), 7-8.
313. Perez G., R.M., Perez G., S., Zavala, M.A., Perez G., S.C., *Effect of Agauria mexicana and Verbesina persicifolia on blood level of normoglycaemic and alloxan-diabetic mice and rats*. Phytotherapy Research, 1996, **10**, 351-353.
314. Perez G., R.M., Vargas S., R., *Triterpenes from Agarista mexicana as Potential Antidiabetic Agents*. Phytotherapy Research, 2002, **16**(1), 55-58.
315. Loriaux, I., Boiteau, P., Husson, H.P., *Isolement des grayanotoxines des feuilles d'Agauria polyphylla*. Phytochemistry, 1973, **12**(6), 1500.
316. Lhuillier, A., Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fouraste, I., Moulis, C., *Comparison of flavonoid profiles of Agauria salicifolia (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2007, **1160**(1-2), 13-20.
317. Grégoire, J., Nyembo, L., *Triterpenoides d'Agauria salicifolia*. Phytochemistry, 1977, **16**, 1609-1610.
318. Perez G., R.M., *Identification of triterpenoids in chloroform extract of Agauria mexicana by MS and NMR*. Natural Product Research, 2006, **20**(2), 181-185.
319. Shirwaikar, A., Rajendran, K., Bodla, R., Kumar, C.D., *Neutralization potential of Viper russelli russelli (Russell's viper) venom by ethanol leaf extracts of Acalypha indica*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **94**(2), 267-273.
320. Rajkumar, V., Guha, G., Ashok Kumar, R., *Therapeutic potential of Acalypha fruticosa*. Food and Chemical Toxicology, 2010, **48**(6), 1709-1713.
321. Thambiraj, J., Paulsamy, S., Sevukaperumal, R., *Evaluation of in vitro antioxidant activity in the traditional medicinal shrub of western districts of Tamilnadu, India, Acalypha fruticosa Forssk. (Euphorbiaceae)*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, **2**(1), S127-S130.
322. Mothana, R.A., Abdo, S.A., Hasson, S., Althawab, F., Alaghabari, S.A., Lindequist, U., *Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants*. Evidence-based Complementary and alternative medicine, 2010, **7**(3), 323-330.
323. Ikewuchi, J.C., Onyeike, E.N., Uwakwe, A.A., Ikewuchi, C.C., *Effect of aqueous extract of the leaves of Acalypha wilkesiana 'Godseffiana' Muell Arg (Euphorbiaceae) on the hematology, plasma biochemistry and ocular indices of oxidative stress in alloxan induced diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **137**(3), 1415-1424.
324. Onocha, P.A., Oloyede, G.K., Afolabi, Q.O., *Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activity of essential oils of Acalypha hispida flowers*. International journal of pharmacology, 2011, **7**(1), 144-148.
325. Onaocha, P.A., Oloyede, G.K., Afolabi, Q.O., *Phytochemical investigation, cytotoxicity and free radical scavenging activities of non-polar fractions of Acalypha hispida (leaves and twigs)*. EXCLI Journal, 2011, **10**, 1-8.
326. Hafeez, I., *Bioactivity studies of Acalypha brachystachya hornem*, in *Ravian Forensic Newsletter* 2012. p. 31.
327. Mosquera, O.M., Correa, Y.M., Buitrago, D.C., Niño, J., *Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2007, **102**(5), 631-634.
328. Owoyele, B.V., Okoye, O.C., Dolor, R.O., Oloruntola, O.P., Soladoye, A.O., *Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic effects of the ethanol extract of Acalypha wilkesiana leaves in rats*. Nigerian journal of physiological sciences: official publication of the Physiological Society of Nigeria, 2011, **26**(1), 77-82.
329. Rahman, M.A., Bachar, S.C., Rahmatullah, M., *Analgesic and antiinflammatory activity of methanolic extract of Acalypha indica Linn*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, **23**(3), 256-258.
330. Anitha, S., Rehaman, A., Manjunath, P.M., Goli, D., *Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of Acalypha indica Linn*. Biomed, 2008, **2**(4), 363-366.

331. Madlener, S., Svacinová, J., Kitner, M., Kopecky, J., Eytner, R., Lackner, A., Vo, T.P.N., Frisch, R., Grusch, M., De Martin, R., Dolezal, K., Strnad, M., Krupitza, G., *In vitro anti-inflammatory and anticancer activities of extracts of Acalypha alopecuroides (Euphorbiaceae)*. International Journal of Oncology, 2009, **35**(4), 881-892.
332. Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-González, C., Arias-García, L., Pérez-Gutiérrez, S., *Anti-inflammatory activity of Wigandia urens and Acalypha alopecuroides*. African Journal of Biotechnology, 2009, **8**(21), 5901-5905.
333. Johnkennedy, N., Adamma, E., Nnedimma, N.C., *Hypolipidemic effects of Acalypha capitata leaves in rats fed on high cholesterol diet*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2011, **1**(2), S183-S185.
334. Lim, S.W., Ting, K. N., Bradshaw, T. D., Zeenathul, N. A., Wiart, C., Khoo, T. J., Lim, K.H., Loh, H.S., *Acalypha wilkesiana extracts induce apoptosis by causing single strand and double strand DNA breaks*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **138**, 616- 623.
335. Ganeshkumar, M., Ponrasu, T., Krithika, R., Iyappan, K., Gayathri, V. S., Suguna, L., *Topical application of Acalypha indica accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **142**(1), 14-22.
336. Reddy, J.S., Rao, P.R., & Reddy, M.S., *Wound healing effects of Heliotropium indicum, Plumbago zeylanicum and Acalypha indica in rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2002, **79**(2), 249-251.
337. Perez Gutierrez, R.M., & Vargas S, R., *Evaluation of the wound healing properties of Acalypha langiana in diabetic rats*. Fitoterapia, 2006, **77**(4), 286-289.
338. Bussing, A., Stein, G.M., Herterich-Akinpelu, I., Fuller, U., *Apoptosis-associated generation of reactive oxygen intermediates and release of pro-inflammatory cytokines in human lymphocytes and granulocytes by extracts from the seeds of Acalypha wilkesiana*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **66**(3), 301-309.
339. Udobang, J.A., Nwafor, P.A., Okokon, J.E., *Analgesic and antimalarial activities of crude leaf extract and fractions of Acalypha wilkesiana*. Journal of Ethnopharmacology, 2010, **127**(2), 373-378.
340. Alade, P.I., Irobi, O.N., *Antimicrobial activities of crude leaf extracts of Acalypha wilkesiana*. Journal of Ethnopharmacology, 1993, **39**(3), 171-174.
341. Haruna, M.T., Anokwuru, C.P., Akeredolu, A.A., Akinsemolu, A.A., Alabi, O.A., *Antibacterial and Antifungal Activity of Acalypha wilkesiana*. European Journal of Medicinal Plants, 2013, **3**(1), 52-64.
342. Wiart, C., Hannah, A., Yassim, M., Hamimah, H., Sulaiman, M., *Antimicrobial activity of Acalypha siamensis Oliv. ex Gage*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **95**, 285-286.
343. Emeka, P.M., Badger-Emeka, L.I., Fateru, F., *In vitro antimicrobial activities of Acalypha ornate leaf extracts on bacterial and fungal clinical isolates*. Journal of herbal medicine, 2012, **2**(4), 136-142.
344. Siems, K., Jakupovic, J., Castro, V., Poveda, L., *Constituents of two Acalypha species*. Phytochemistry, 1996, **41**(3), 851-853.
345. Reiersen, B., Kiremire, B.T., Byamukama, R., & Andersen, Ø.M., *Anthocyanins acylated with gallic acid from chenille plant, Acalypha hispida*. Phytochemistry, 2003, **64**(4), 867-871.
346. Nahrstedt, A., Hungeling, M., Petereit, F., *Flavonoids from Acalypha indica*. Fitoterapia, 2006, **77**(6), 484-486.
347. Hungeling, M., Lechtenberg, M., Fronczek, F. R., Nahrstedt, A., *Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from Acalypha indica (Euphorbiaceae)*. Phytochemistry, 2009, **70**(2), 270-277.
348. Fan, J.D., Song, B.A., Yang, S., *Phenolic compounds from Acalypha australis*. Chemistry of Natural Compounds, 2012, **48**(3), 1-2.
349. Batterson, V.C., Potts, W.M., *The analysis and characterization of the oil from the seed of Stillingia sylvatica*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1951, **28**(3), 87-88.
350. Adolf, W., Hecker, E., *New irritant diterpene-esters from roots of Stillingia sylvatica L.(Euphorbiaceae)*. Tetrahedron Letters, 1980, **21**(30), 2887-2890.
351. Chapuis, J.C., Sordat, B., Hostettmann, K., *Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine*. Journal of Ethnopharmacology, 1988, **23**(2), 273-284.
352. Cota, B.B., Johann, S., Oliveira, D.M., Siqueira, E.P., Souza-Fagundes, E.M., Cisalpino, P.S., Alves, T.M.A., Zani, C.L., *Biological potential of Stillingia oppositifolia*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2011, **21**(2), 70-77.
353. Sequeiros, C., López, L.M., Caffini, N.O., Natalucci, C.L., *Proteolytic activity in some Patagonian plants from Argentina*. Fitoterapia, 2003, **74**(6), 570-577.
354. Bichy, W., *Analysis of the root of Stillingia sylvatica, Lin.* American journal of pharmacy, 1885, **57**(11), 529-531.
355. Dräger, G., Jeske, F., Kunst, E., Lopez, E.G., Sanchez, H.V., Tschritzis, F., Kirschning, A., Jakupovic, J., *Tonantzilolone and other Diterpenes from Stillingia sanguinolenta*. European Journal of Organic Chemistry, 2007, **30**, 5020-5026.
356. Sreepriya, M., Devaki, T., Balakrishna, K., Apparannantham, T., *Effect of Indigofera tinctoria Linn on liver antioxidant defense system during D-galactosamine/endotoxin-induced acute hepatitis in rodents*. Indian journal of experimental biology, 2001, **39**(2), 181-184.
357. Malarvannan, L., Devaki, T., *Protective effect of Indigofera tinctoria on tissue antioxidant defence system against D-galactosamine and endotoxin-induced hepatopathy in rats*. Journal of Natural Remedies, 2003, **3**(1), 49-53.
358. Balamurugan, G., Muralidharan, P., *Effect of Indigofera tinctoria on  $\alpha$ -amyloid (25-35) mediated Alzheimer's disease in mice: Relationship to antioxidant activity*. Bangladesh Journal of Pharmacology, 2010, **5**(1), 51-56.
359. Selvam, C., Jachak, S.M., Thilagavathi, R., Chakraborti, A.K., Bhutani, K.K., *A new cyclooxygenase (COX) inhibitory pterocarpan from Indigofera aspalathoides: structure elucidation and determination of binding orientations in the active sites of the enzyme by molecular docking*. Tetrahedron Letters, 2004, **45**(22), 4311-4314.
360. Philips, A., Philip, S., Arul, V., Padmakeerthiga, B., Renju, V., Santha, S., Sethupathy, S., *Free Radical Scavenging Activity of Leaf Extracts of Indigofera Aspalathoides-An in vitro Analysis*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2010, **2**(6), 322-328.
361. Shahjahan, M., Vani, G., Devi, C.S., *Protective effect of Indigofera oblongifolia in CCl4-induced hepatotoxicity*. Journal of Medicinal Food, 2005, **8**(2), 261-265.
362. Bakasso, S., Lamien-Meda, A., Lamien, C.E., Kiendrebeogo, M., Millogo, J., Ouedraogo, A.G., Nacoulma, O.G., *Polyphenol contents and antioxidant activities of five Indigofera species (Fabaceae) from Burkina Faso*. Pakistan journal of biological sciences, 2008, **11**(11), 1429-1435.
363. Kumar, R.S., Manivannan, R., Balasubramaniam, A., Rajkapoor, B., *Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanol extract of Indigofera trita Linn. on CCl4 induced hepatotoxicity in rats*. Journal of Pharmacology and Toxicology, 2008, **3**(5), 344-350.

364. Kumar, R.S., Rajkapoor, B., Perumal, P. , *In vitro and in vivo anticancer activity of Indigofera cassioides Rottl. Ex. DC.* Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2011, **4**(5), 379-385.
365. Kumar, R.S., Rajkapoor, B., Perumal, P., *Antitumor and cytotoxic activities of methanol extract of Indigofera linnaei Ali.* Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2011, **12**(3), 613-618.
366. Guruvaiah, P., Arunachalam, A., Velan, L.P.T. , *Evaluation of phytochemical constituents and antioxidant activities of successive solvent extracts of leaves of Indigofera caerulea Roxb using various in vitro antioxidant assay systems.* Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, **2**, S118-S123.
367. Amala, B.E., Ganga, N., Arivudainambi, R., Santhanam, G., *Anti-inflammatory activity of Indigofera aspalathoides Vahl.* The Indian journal of medical research, 1982, **76**, 115-118.
368. Malik, A., Riaz, N., Ahmad, H., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I., *Lipoxygenase inhibiting flavonoids from Indigofera hetrantha.* Heterocycles, 2004, **63**(2), 359-366.
369. Malik, A., Riaz, N., Ahmad, H., Nawaz, S.A., Choudhary, M.I., *Lipoxygenase inhibiting constituents from Indigofera hetrantha.* Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, **53**(3), 263-266.
370. Musa, A.M., Sule, M.I., Ilyas, M., Iliya I. Yaro, A.H., Magaji, M.G. Aliyu, A.B. Adbullahi, M.I., Hassan, H.S., *Analgesic and Anti-inflammatory Studies of the Methanol Extract of Indigofera Pulchra.* Research Journal of Medicine and Medical Sciences, 2010, **5**(1), 106-110.
371. Chen, T.Y., Sun, H. L., Yao, H. T., Lii, C. K., Chen, H. W., Chen, P. Y., Li, C.C., Liu, K.L., *Suppressive effects of Indigofera suffruticosa Mill extracts on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine RAW 264.7 macrophages.* Food and Chemical Toxicology, 2013, **55**, 257-264.
372. Esimone, C.O., Adikwu, M.U., Muko, K.N. , *Antimicrobial properties of Indigofera dendroides leaves.* Fitoterapia, 1999, **70**(5), 517-520.
373. Dahot, M.U., *Antibacterial and antifungal activity of small protein of Indigofera oblongifolia leaves.* Journal of Ethnopharmacology, 1999, **64**(3), 277-82.
374. Ali, N.A., Jülich, W.D., Kusnick, C., Lindequist, U. , *Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities.* Journal of Ethnopharmacology, 2001, **74**(2), 173-179.
375. Leite, S.P., Vieira, J.R., de Medeiros, P.L., Leite, R.M., de Menezes Lima, VL., Xavier, H.S., de Oliveira Lima, E., *Antimicrobial Activity of Indigofera suffruticosa.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2006, **3**(2), 261-265.
376. Mathabe, M.C., Nikolova, R.V., Lall, N., Nyazema, N.Z., *Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo Province, South Africa.* Journal of Ethnopharmacology, 2006, **105**(1), 286-293.
377. Puratchikody, A., Swarnalath, S., *Pharmacognostical, Pharmacological, Investigation on Indigofera aspalathoides Vahl: A Review.* Journal of pharmaceutical and biomedical sciences, 2011, **5**(5), 1-4.
378. Kamal, R., Mangla, M., *In vivo and in vitro investigations on rotenoids from Indigofera tinctoria and their bioefficacy against the larvae of Anopheles stephensi and adults of Callosobruchus chinensis.* Journal of biosciences, 1993, **18**(1), 93-101.
379. Ibrahim, S., Ibrahim, M.A., Musa, A.M., Aliyu, A.B., Haruna, N.S., Okafor, A.I., *Indigofera pulchra leaves extracts contain anti-Plasmodium berghei agents.* Bangladesh Journal of Pharmacology, 2011, **6**(2), 69-73.
380. Thangadurai, D., Viswanathan, M. B., Ramesh, N., *Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from Indigofera longiracemosa with potential antituberculous and antibacterial activity.* Pharmazie, 2002, **57**(10), 714-715.
381. Waako, P.J., Katsuura, E., Smith, P., Folb, P., *East African medicinal plants as a source of lead compounds for the development of new antimalarial drugs.* African Journal of Ecology, 2007, **45**(s1), 102-106.
382. Singh, B., Saxena, A.K., Chandan, B.K., Bhardwaj, V., Gupta, V.N., Suri, O.P., Handa, S.S., *Hepatoprotective activity of indigtone-a bioactive fraction from Indigofera tinctoria Linn.* Phytotherapy research, 2001, **15**(4), 294-297.
383. Sreepriya, M., Devaki, T., Nayeem, M., *Protective effects of Indigofera tinctoria L. against D-Galactosamine and carbon tetrachloride challenge on 'in situ' perfused rat liver.* Indian journal of physiology and pharmacology, 2001, **45**(4), 428-434.
384. Singh, B., Chandan, B.K., Sharma, N., Bhardwaj, V., Satti, N.K., Gupta, V.N., Gupta, B.D., Suri, K.A., Suri, O.P., *Isolation, structure elucidation and in vivo hepatoprotective potential of trans-tetracos-15-enoic acid from Indigofera tinctoria Linn.* Phytotherapy research, 2006, **20**(10), 831-839.
385. Niraiikulam, A., Natarajan, V., Hyungdon, Y., *Effect of Indigofera tinctoria against Carbon Tetrachloride Induced Hepatic Damage in Albino Rats.* Research Journal of Biotechnology, 2010, **5**(1), 5-8.
386. Muthulingam, M., Mohandoss, P., Indra, N., Sethupathy, S., *Antihepatotoxic efficacy of Indigofera tinctoria (Linn.) on paracetamol induced liver damage in rats.* International Journal of Pharmaceutical and Biomedical research, 2010, **1**(1), 13-18.
387. Rajkapoor, B., Jayakar, B., Kavimani, S., Muruges, N., *Protective effect of Indigofera aspalathoides against CCl4-induced hepatic damage in rats.* Journal of Herbal Pharmacotherapy, 2006, **6**(1), 49-54.
388. Palani, S., Kumar, R.P., Kumar, B.S., *Effect of the ethanolic extract of Indigofera barberi (L.) in acute acetaminophen induced nephrotoxic rats.* Advanced Biotech, 2009, **7**(3), 28-31.
389. Rajendra Kopalli, S., Koppula, S., Young Shin, K., Noh, S.J., Jin, Q., Yeon Hwang, B., Suh, Y.H. , *SF-6 attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: an in vitro and in vivo investigation in experimental models of Parkinson's disease.* Journal of Ethnopharmacology, 2012, **143**(2), 686-694.
390. Rajkapoor, B., Jayakar, B., Muruges, N. , *Antitumor activity of Indigofera aspalathoides on Ehrlich ascites carcinoma in mice.* Indian Journal of Pharmacology, 2004, **36**(1), 38-40.
391. Christina, A.J., Alwin Jose, M., Heison Robert, S.J., Kothai, R., Chidambaranathan, N., Muthumani, P., *Effect of Indigofera aspalathoides against Dalton's ascitic lymphoma.* Fitoterapia, 2003, **74**(3), 280-283.
392. Kumar, S.S., Rao, M.R.K., Balasubramanian, M.P. , *Antiproliferative role of Indigofera aspalathoides on 20-methylcholanthrene induced fibrosarcoma in rats.* Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, **2**(12), 966-974.
393. Vieira, J.R., de Souza, I.A., do Nascimento, S.C., Leite, S.P., *Indigofera suffruticosa: an alternative anticancer therapy.* Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2007, **4**(3), 355-359.
394. Kumar, R.S., Jayakar, B., Rajkapoor, B. , *Antitumor activities of Indigofera trita on Ehrlich ascites carcinoma induced mice.* International Journal of Cancer Research, 2007, **3**(4), 180-185.
395. Kameswaran, T.R., Ramanibai, R. , *The antiproliferative activity of flavanoid fraction of Indigofera tinctoria is through cell cycle arrest and apoptotic pathway in A-549 cells.* Journal of biological Science, 2008, **8**(3), 584-590.
396. Rajkapoor, B., Muruges, N., Chodon, D., Sakthisekaran, D. , *Chemoprevention of N-Nitrosodiethylamine Induced Phenobarbitol Promoted Liver Tumors in Rat by Extract of Indigofera aspalathoides.* Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2005, **28**(2), 364-366.



397. Kumar, S.S., Rao, M.R.K., Balasubramanian, M.P. , *Chemopreventive effects of Indigofera aspalathoides on 20-methylcholanthrene induced fibrosarcoma in rats*. International Journal of Cancer Research, 2011, **7**(2), 144-151.
398. Balasubramanian, R., Narayanan, M., Kedalgovindaram, L., Devarakonda Rama, K., *Cytotoxic activity of flavone glycoside from the stem of Indigofera aspalathoides Vahl*. Journal of Natural Medicines, 2007, **61**(1), 80-83.
399. Morris, M.P., Pagan, C., Warmke, H.E. , *Hiptagenic Acid, a Toxic Component of Indigofera endecaphylla*. Science, 1954, **119**(3088), 322-323.
400. Cooke, A.R., *The toxic constituent of Indigofera endecaphylla*. Archives of biochemistry and biophysics, 1955, **55**(1), 114-120.
401. Hutton, E.M., Windrum, G.M., Kratzing, C.C. , *Studies on the toxicity of Indigofera endecaphylla. I. Toxicity for rabbits*. The Journal of Nutrition, 1958, **64**(3), 321-337.
402. Coleman, R.G., Windrum, G.M., Hutton, E.M., *Studies on the toxicity of Indigofera endecaphylla. III. Separation of toxic fractions from seed and herbage*. Journal of Nutrition, 1960, **70**, 267-70.
403. Murray, L.R., Moore, T., Sharman, I.M. , *The toxicity of Indigofera enneaphylla L. in rats*. Australian Journal of Agricultural Research, 1965, **16**(4), 713-720.
404. Suliman, H.B., Wasfi, I.A., Tartour, G., Adam, S.E., *The effects of Indigofera hochstetteri on goats*. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 1983, **36**(4), 393-402.
405. Labib, S., Berdai, M.A., Bendadi, A., Achour, S., Harandou, M., *Intoxication mortelle à l'Indigofera*. Archives de Pédiatrie, 2012, **19**(1), 59-61.
406. Pearn, J.H., Hegarty, M.P., *Indospicine—The Teratogenic Factor from Indigofera spicata Extract Causing cleft Palate*. British journal of experimental pathology, 1970, **51**(1), 34-37.
407. Leite, S.P., de Medeiros, P.L., da Silva, E.C., de Souza Maia, M.B., de Menezes Lima, V.L., Saul, D.E., *Embryotoxicity in vitro with extract of Indigofera suffruticosa leaves*. Reproductive Toxicology, 2004, **18**(5), 701-705.
408. Kumar, S.S., Karrunakaran, C.M., Rao, M., Balasubramanian, M.P., *Inhibitory effects of Indigofera aspalathoides on 20-methylcholanthrene-induced chemical carcinogenesis in rats*. Journal of Carcinogenesis, 2011, **10**(1), 1.
409. Luiz-Ferreira, A., Cola, M., Barbastefano, V., Farias-Silva, E., Calvo, T.R., de Almeida, A.B.A., Pellizzon, C.H., Hiruma-Lima, C.A., Vilegas, W., Souza-Brito, A.R.M. , *Indigofera suffruticosa Mill as new source of healing agent: involvement of prostaglandin and mucus and heat shock proteins*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **137**(1), 192-198.
410. Thangadurai, D., Viswanathan, M., *Antiulcerogenic activity of Indigofera longracemosa*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000, **62**(4), 287-290.
411. Narender, T., Khaliq, T., Puri, A., *Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from Indigofera tinctoria*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2006, **16**(13), 3411-3414.
412. Addy, M.E., Nyarko, A.K. , *Diabetic patients' response to oral administration of aqueous extract of Indigofera arrecta*. Phytotherapy Research, 1988, **2**(4), 192-195.
413. Addy, M.E., Addo, P., Nyarko, A.K. , *Indigofera arrecta prevents the development of hyperglycaemia in the db/db mouse*. Phytotherapy Research, 1992, **6**(1), 25-28.
414. Nyarko, A.K., Sittie, A.A., Addy, M.E., *The basis for the antihyperglycemic activity of Indigofera arrecta in the rat*. Phytotherapy Research, 1993, **7**(1), 1-4.
415. Chakrabarti, R., Damarla, R.K., Mullangi, R., Sharma, V.M., Vikramadithyan, R.K., Rajagopalan, R., *Insulin sensitizing property of Indigofera mysorensis extract*. Journal of Ethnopharmacology, 2006, **105**(1), 102-106.
416. Tanko, Y., Abdelaziz, M.M., Adelaiye, A.B., Fatihu, M.Y., Musa, K.Y., *Effects of Hydromethanolic leaves extract of Indigofera pulchra on blood glucose levels of normoglycemic and alloxan-induced diabetic Wistar rats*. International Journal of Applied Research in Natural Products, 2008, **1**(4), 13-18.
417. Tanko, Y., Abdelaziz, M.M., Adelaiye, A.B., Fatihu, M.Y., Musa, K.Y., *Effects of N-Butanol Portion of Indigofera Pulchra Leaves Extract on Blood Glucose Levels of Alloxan-Induced Diabetic and Normoglycemic Wistar Rats*. European Journal of Scientific Research, 2008, **22**(4), 501-507.
418. Hasan, A., Farman, M., Ahmed, I. , *Flavonoid glycosides from Indigofera hebeptala*. Phytochemistry, 1993, **35**(1), 275-276.
419. Hasan, A., Ahmad, I., Khan, M.A., Chudhary, M.I. , *Two flavonol triglycosides from flowers of Indigofera hebeptala*. Phytochemistry, 1996, **43**(5), 1115-1118.
420. Prasad, Y.R., Chakradhar, V., *A new isoflavone from Indigofera linnaei*. Indian Journal of Chemistry-B, 2004, **43B**, 1807-1808.
421. Rehman, A., Malik, A., Mehmood, S., Jahan, E., Ahmad, H., *Phytochemical studies on Indigofera hatrantha*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2005, **27**(4), 440-442.
422. Hisaeda, A., Matsunami, K., Otsuka, H., Takeda, Y., *Flavonol glycosides from the leaves of Indigofera zollingeriana*. Journal of natural medicines, 2010, **65**(2), 360-363.
423. Dominguez, X.A., Martinez, C., Calero, A., Hinojosa, M., Zamudio, A., Zabel, V., Smith, W.B., Watson, W.H. , *Louisfieserone, an unusual flavanone derivative from Indigofera suffruticosa Mill*. Tetrahedron Letters, 1978, **19**(5), 429-432.
424. Kamal, R., Mangla, M., *Rotenoids from indigofera tinctoria and their bio-efficacy against cyclops, the carrier of dracunculiasis*. Die Pharmazie, 1987, **42**(5), 356.
425. De Moraes e Souza, M.A., Bieber, L.W., Chiappeta, A.A., Maciel, G.M., De Mello, J.F., Delle Monache, F., Messana, I. , *Arylbenzofurans from Indigofera microcarpa*. Phytochemistry, 1988, **27**(6), 1817-1819.
426. Lodha, V., Khan, H.A., Ghanim, A. , *5, 7, 4'-trimethoxy-4-phenylcoumarin from roots of Indigofera oblongifolia*. Journal of the Indian Chemical Society, 1998, **75**(8), 1.
427. Thangadurai, D., Viswanathan, M.B., Ramesh, N., *Characterization of a new decahydroxyridoquinoline from Indigofera longracemosa Boiv. ex Baill. (Fabaceae)*. Natural product letters, 2001, **15**(4), 287-290.
428. Sharif, A., Malik, A., Riaz, N., Ahmed, E., Yawer, M.A., Afza, N., *Phytochemical Investigations on Indigofera oblongifolia*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2006, **28**(1), 101-104.
429. Barros, G.M.S.C., Teixeira, S.D.P., *Estudo farmacobotânico de duas espécies de Anileira (Indigofera suffruticosa e Indigofera truxillensis, Leguminosae) com propriedades farmacológicas*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008, **18**, 287-294.
430. Arriaga, A.M., Andrade-Neto, M., Malcher, G.T., Gomes, T.B., Vasconcelos, J.N., Rodrigues, A.C., de Oliveira, M.C.F, Santiago, G.M, *Composition of the essential oil of Indigofera microcarpa from the Northeast of Brazil*. Chemistry of Natural Compounds, 2008, **44**(2), 245-246.
431. Miller, R.W., Smith Jr, C.R. , *Seeds of Indigofera species: their content of amino acids that may be deleterious*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1973, **21**(5), 909-912.

432. Ford, C.W., *Galactomannan from the seed of Indigofera spicata*. Australian Journal of Chemistry, 1969, **22**(9), 2005-2009.
433. Sen, A.K., Banerjee, N., Farooqi, M.I. , *A water-soluble galactomannan from the seeds of Indigofera tinctoria* Linn. Carbohydrate research, 1986, **157**, 251-256.
434. Finnegan, R.A., Mueller, W.H., *Chemical examination of a toxic extract of Indigofera endecaphylla. The endecaphyllins*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1965, **54**(8), 1136-1144.
435. Garcez, W.S., Garcez, F.R., Honda, N.K., da Silva, A.J.R., *A nitropropanoyl-glucoopyranoside from Indigofera suffruticosa*. Phytochemistry, 1989, **28**(4), 1251-1252.
436. Benn, M., McEwan, D., Pass, M.A., Majak, W., *Three nitropropanoyl esters of glucose from Indigofera linnaei*. Phytochemistry, 1992, **31**(7), 2393-2395.
437. Zhang, X.X., Zhang, Z.X., Chen, L., Su, Y.F. , *New aliphatic nitro-compounds from Indigofera carlesii*. Fitoterapia, 2006, **77**(1), 15-18.
438. Yang, F., Lu, M., Su, Y. , *New 3-nitropropanoyl-D-glucoopyranoses in root of Indigofera kirilowii*. Chinese traditional and herbal drugs, 2007, **38**(10), 1448-1449.
439. Garcez, W.S., Garcez, F.R., Barison, A., *Additional 3-nitropropanoyl esters of glucose from Indigofera suffruticosa (Leguminosae)*. Biochemical systematics and ecology, 2003, **31**(2), 207-209.
440. Su, Y., Li, C., Gao, Y., Di, L., Zhang, X., Guo, D., *Acryloylated Glucose 3-Nitropropanoates from Indigofera kirilowii*. Journal of Natural Products, 2005, **68**(12), 1785-1786.
441. Su, Y., Lü, M., Yang, F., Li, C., Di, L., Wu, D., Guo, Z., Lü, J., Guo, D., *Six new glucose esters of 3-nitropropanoic acid from Indigofera kirilowii*. Fitoterapia, 2008, **79**(6), 451-455.
442. Lodha, V., Khan, H.A., Ghanim, A., *An Acylated Glucoopyranoside from Indigofera oblongifolia*. Indian Chemical Society, 1997, **74**(5), 1.
443. Thangadurai, D., Ramesh, N., Viswanathan, M.B., Prasad, D.X., *A novel xanthene from Indigofera longeracemosa stem*. Fitoterapia, 2001, **72**(1), 92-94.
444. Ducheman, B. *Les plantes médicinales in Exposition universelle de 1900. Colonies et pays protectorats. 1900. Colonies francaises. La Reunion*.
445. Arokiyaraj, S., Sripriya, N., Bhagya, R., Radhika, B., Prameela, L., Udayaprakash, N.K., *Phytochemical screening, antibacterial and free radical scavenging effects of Artemisia nilagirica, Mimosa pudica and Clerodendrum siphonanthus, An in vitro study*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, **2**(2), S601-S604.
446. Gouthamchandra, K., Mahmood, R., Manjunatha, H., *Free radical scavenging, antioxidant enzymes and wound healing activities of leaves extracts from Clerodendrum infortunatum L*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2010, **30**(1), 11-18.
447. Jadeja, R.N., Thounaojam, M.C., Singh, T.B., Devkar, R.V., Ramachandran, A., *Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Clerodendron glandulosum Coleb-a review*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2012, **5**(1), 1-6.
448. Prasad, M.P., Sushant, S., Chikkaswamy, B.K., *Phytochemical analysis, antioxidant potential, antibacterial activity and molecular characterization of Clerodendrum species*. International Journal of Molecular Biology, 2012, **3**(3), 71-76.
449. Rajlakshmi, D., Banerjee, S.K., Sood, S., Maulik, S.K. , *In-vitro and in-vivo antioxidant activity of different extracts of the leaves of Clerodendron colebrookianum Walp in the rat*. Journal of Pharmacy and Pharmacology 2003, **55**, 1681-1686.
450. Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y., Takeda, Y., Tanaka, T., Andoh, T., Shinohara, A., Nakata, M., *Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants*. Journal of Agriculture and Food Chemistry 1999, **47**, 1749-1754.
451. Chae, S., Kim, J.S., Kang, K.A., Bu, H.D., Lee, Y., Hyun, J.W., Kang, S.S., *Antioxidant activity of jionoside D from Clerodendron trichotomum*. Biological and Pharmaceutical Bulletin 2004, **27**, 1504-1508.
452. Chae, S., Kim, J.S., Kang, K.A., Bu, H.D., Lee, Y., Seo, Y.R., Hyun, J.W., Kang, S.S. , *Antioxidant activity of isoacteoside from Clerodendron trichotomum* Journal of Toxicology and Environmental Health A, 2005, **68**, 389-400.
453. Chae, S., Kang, K.A., Kim, J.S., Hyun, J.W., Kang, S.S. , *Trichotomoside: A new antioxidative phenylpropanoid glycoside from Clerodendron trichotomum*. Chemistry and Biodiversity 2006, **3**, 41-48.
454. Kumar KC, S., Müller, K. , *Medicinal plants from Nepal; II. Evaluation as inhibitors of lipid peroxidation in biological membranes*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **64**(2), 135-139.
455. Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Wongcome, T., Reutrakul, V., *Anti-inflammatory and antipyretic properties of Clerodendrum petasites S. Moore*. Journal of Ethnopharmacology, 2003, **85**(1), 151-156.
456. Babu, N.P., Pandikumar, P., Ignacimuthu, S., *Lysosomal membrane stabilization and anti-inflammatory activity of Clerodendrum phlomidis L.f, a traditional medicinal plant*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **135**(3), 779-785.
457. Sweeney, A.P., Wyllie, S.G., Shalliker, R.A., Markham, J.L., *Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2001, **75**(2-3), 273-277.
458. Wang, P., Sun, L., Tan, J., Xu, J., Guo, F., Li, Y., *Two new glycosidated coumaramides from Clerodendron cyrtophyllum*. Fitoterapia, 2012, **83**(8), 1494-1499.
459. Shrivastava, N., Patel, T., *Clerodendrum and Healthcare: An Overview*. Medicinal and aromatic plant science and biotechnology, 2007, **1**(1), 142-150.
460. Rani, S., Ahamed, N., Rajaram, S., Saluja, R., Thenmozhi, S., Murugesan, T., *Anti-diarrhoeal evaluation of Clerodendrum phlomidis Linn. leaf extract in rats*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **68**(1), 315-319.
461. Hazekamp, A., Verpoorte, R., Panthong, A., *Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant Clerodendrum petasites*. Journal of Ethnopharmacology, 2001, **78**(1), 45-49.
462. Reid, K.A., Maes, J., Maes, A., van Staden, J., De Kimpe, N., Mulholland, D.A., Verschaeve, L., *Evaluation of the mutagenic and antimutagenic effects of South African plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2006, **106**(1), 44-50.
463. Verschaeve, L., Van Staden, J., *Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **119**(3), 575-587.
464. Kamuhabwa, A., Nshimo, C., de Witte, P., *Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine*. Journal of Ethnopharmacology, 2000, **70**(2), 143-149.
465. Nguyen-Pouplin, J., Tran, H., Tran, H., Phan, T.A., Dolecek, C., Farrar, J., Tran, T.H., Caron, P., Bodo, B., and P. Grellier, *Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam*. Journal of Ethnopharmacology, 2007, **109**(3), 417-427.
466. Gopal, N., Sengottuvelu, S., *Hepatoprotective activity of Clerodendrum inerme against CCl4 induced hepatic injury in rats*. Fitoterapia, 2008, **79**(1), 24-26.

467. Lokesh, D., Amitsankar, D., *Evaluation of mechanism for antihypertensive action of Clerodendrum colebrookianum Walp., used by folklore healers in north-east India*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **143**(1), 207-212.
468. Adeneye, A.A., Adeleke, T.I., Adeneye, A.K., *Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the aqueous fresh leaves extract of Clerodendrum capitatum in Wistar rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **116**(1), 7-10.
469. Pandey, R., Verma, R.K., Singh, S.C., Gupta, M.M., *4alpha-methyl-24beta-ethyl-5alpha-cholesta-14,25-dien-3beta-ol and 24beta-ethylcholesta-5,9(11), 22E-trien-3beta-ol, sterols from Clerodendrum inerme*. Phytochemistry, 2003, **63**(4), 415-420.
470. Miller, R.E., McConville, M.J., Woodrow, I.E., *Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree Clerodendrum grayi (Lamiaceae)*. Phytochemistry, 2006, **67**(1), 43-51.
471. Pandey, R., Verma, R.K., Gupta, M.M., *Neo-clerodane diterpenoids from Clerodendrum inerme*. Phytochemistry, 2005, **66**(6), 643-648.
472. Fan, T., Min, Z., Song, G., Iinuma, M., Tanaka, T., *Abietane diterpenoids from Clerodendrum mandarinorum*. Phytochemistry, 1999, **51**(8), 1005-1008.
473. Kanchanapoom, T., Kasai, R., Chumsri, P., Hiraga, Y., Yamasaki, K., *Megastigmane and iridoid glucosides from Clerodendrum inerme*. Phytochemistry, 2001, **58**(2), 333-336.
474. Yang, H., Wang, J., Hou, A.J., Guo, Y.P., Lin, Z.W., Sun, H.D., *New steroids from Clerodendrum colebrookianum*. Fitoterapia, 2000, **71**(6), 641-648.
475. Macabeo, A.P.G., Villafranca, M.C.G., Aguinaldo, A.M., Hussain, H., Krohn, K., *Clerosterols from Clerodendrum quadriloculare*. Biochemical Systematics and Ecology, 2008, **36**(8), 659-660.
476. Gupta, S., Gupta, R., *Detection and quantification of quercetin in roots, leaves and flowers of Clerodendrum infortunatum L.* Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, **2**, S940-S943.
477. Fawole, O.A., Amoo, S.O., Ndhlala, A.R., Light, M.E., Finnie, J.F., Van Staden, J., *Anti-inflammatory, anticholinesterase, antioxidant and phytochemical properties of medicinal plants used for pain-related ailments in South Africa*. Journal of Ethnopharmacology, 2010, **127**(2), 235-241.
478. Ndung'u, M., Hassanali, A., Hooper, A.M., Chhabra, S., Miller, T.A., Paul, R.L., Torto, B., *Ring A-seco mosquito larvicidal limonoids from Turraea wakefieldii*. Phytochemistry, 2003, **64**(4), 817-823.
479. Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M.G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P. I., *In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalised in South Africa*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **92**(2), 177-191.
480. Gathirwa, J.W., Rukunga, G.M., Njagi, E.N., Omar, S.A., Mwitari, P.G., Guantai, A.N., Tolo, F.M., Kimani, C.W., Muthaura, C.N., Kirira, P.G., Ndunda, T.N., Amalemba, G., Mungai, G.M., Ndiege, I.O., *The in vitro anti-plasmodial and in vivo anti-malarial efficacy of combinations of some medicinal plants used traditionally for treatment of malaria by the Meru community in Kenya*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **115**(2), 223-231.
481. McFarland, K., Mulholland, D.A., Fraser, L.A., *Limonoids from Turraea floribunda (Meliaceae)*. Phytochemistry, 2004, **65**(14), 2031-2037.
482. Torto, B., Bentley, M.D., Cole, Barbara J.W., Hassanali, A., Huang, F.Y., Gelbaum, L., Vanderveer, D.G., *Limonoids from Turraea floribunda*. Phytochemistry, 1995, **40**(1), 239-243.
483. Torto, B., Hassanali, A., Nyandat, E., Bentley, M.D., *A limonoid from Turraea floribunda*. Phytochemistry, 1996, **42**(4), 1235-1237.
484. Mulholland, D.A., Monkhe, T.V., Coombes, P.H., Rajab, M.S., *Limonoids from Turraea holstii and Turraea floribunda*. Phytochemistry, 1998, **49**(8), 2585-2590.
485. Mulholland, D.A., Monkhe, T.V., Taylor, D.A.H., Rajab, M.S., *Triterpenoids from Turraea holstii*. Phytochemistry, 1999, **52**(1), 123-126.
486. Cheplogoi, P.K., Mulholland, D.A., *Limonoids from Turraea parvifolia (Meliaceae)*. Biochemical Systematics and Ecology, 2003, **31**(7), 799-803.
487. Cheplogoi, P.K., Mulholland, D.A., *Tetranortriterpenoid derivatives from Turraea parvifolia (Meliaceae)*. Phytochemistry, 2003, **62**(8), 1173-1178.
488. Wang, X.N., Yin, S., Fan, C.Q., Lin, L.P., Ding, J., Yue, J.M., *Eight new limonoids from Turraea pubescens*. Tetrahedron, 2007, **63**(34), 8234-8241.
489. Baliga, M.S., Bhat, H.P., Baliga, B.R.V., Wilson, R. B., Palatty, P. L., *Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of Eugenia jambolana Lam. (black plum): A review*. Food Research International, 2011, **44**(7), 1776-1789.
490. Ravi, K., Ramachandran, B., Subramanian, S., *Effect of Eugenia Jambolana seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats*. Life Sciences, 2004, **75**(22), 2717-2731.
491. Sultana, B., Anwar, F., Przybylski, R., *Antioxidant activity of phenolic components present in barks of Azadirachta indica, Terminalia arjuna, Acacia nilotica, and Eugenia jambolana Lam. trees*. Food Chemistry, 2007, **104**(3), 1106-1114.
492. Gülçin, İ., Güngör Şat, İ, Beydemir, Ş., Elmastaş, M., İrfan Küfrevioğlu, Ö, *Comparison of antioxidant activity of clove (Eugenia caryophyllata Thunb) buds and lavender (Lavandula stoechas L.)*. Food Chemistry, 2004, **87**(3), 393-400.
493. Reynertson, K.A., Yang, H., Jiang, B., Basile, M.J., Kennelly, E.J., *Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits*. Food Chemistry, 2008, **109**(4), 883-890.
494. Martinez-Correa, H.A., Magalhães, P.M., Queiroga, C.L., Peixoto, C.A., Oliveira, A.L., Cabral, F.A., *Extracts from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds*. The Journal of Supercritical Fluids, 2011, **55**(3), 998-1006.
495. Victoria, F.N., Lenardão, E.J., Savegnago, L., Perin, G., Jacob, R.G., Alves, D., Silva, W.P.D., Motta, A.D.S.D., Nascente, P.D.S., *Essential oil of the leaves of Eugenia uniflora L.: Antioxidant and antimicrobial properties*. Food and Chemical Toxicology, 2012, **50**(8), 2668-2674.
496. Gu, J.Q., Park, E.J., Luyengi, L., Hawthorne, M.E., Mehta, R.G., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., *Constituents of Eugenia sandwicensis with potential cancer chemopreventive activity*. Phytochemistry, 2001, **58**(1), 121-127.
497. Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., *Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of Eugenia jambolana in experimental diabetes mellitus*. Journal of Ethnopharmacology, 2006, **104**(3), 367-373.
498. Sharma, S.B., Nasir, A., Prabhu, K.M., Murthy, P.S., Dev, G., *Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of Eugenia jambolana in alloxan-induced diabetic rabbits*. Journal of Ethnopharmacology, 2003, **85**(2), 201-206.
499. Sharma, B., Balomajumder, C., Roy, P., *Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from Eugenia jambolana seeds on streptozotocin induced diabetic rats*. Food and Chemical Toxicology, 2008, **46**(7), 2376-2383.

500. Arai, I., Amagaya, S., Komatsu, Y., Okada, M., Hayashi, T., Kasai, M., Arisawa, M., Momose, Y., *Improving effects of the extracts from Eugenia uniflora on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **68**(1), 307-314.
501. Consolini, A.E., O.A.N. Baldini, and A.G. Amat, *Pharmacological basis for the empirical use of Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) as antihypertensive*. Journal of Ethnopharmacology, 1999, **66**(1), 33-39.
502. Consolini, A.E., Sarubbio, M.G., *Pharmacological effects of Eugenia uniflora (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart*. Journal of Ethnopharmacology, 2002, **81**(1), 57-63.
503. Bag, A., Bhattacharyya, S.K., Pal, N.K., Chattopadhyay, R.R., *In vitro antibacterial potential of Eugenia jambolana seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens*. Microbiological Research, 2012, **167**(6), 352-357.
504. Costa, T.R., Fernandes, O.F.L., Santos, S.C., Oliveira, C.M.A., Lião, L.M., Ferri, P.H., Paula, J.R., Ferreira, H.D., Sales, B.H.N., Silva, M.D.R.R., *Antifungal activity of volatile constituents of Eugenia dysenterica leaf oil*. Journal of Ethnopharmacology, 2000, **72**(1), 111-117.
505. Kelkar, S.M., Kaklij, G.S., *A simple two-step purification of antidiabetic compounds from Eugenia jambolana fruit-pulp: proteolytic resistance and other properties*. Phytomedicine, 1997, **3**(4), 353-359.
506. Colla, A.R.S., Machado, D.G., Bettio, L.E.B., Colla, G., Magina, M.D.A., Brighente, I.M.C., Rodrigues, A.L.S., *Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **143**(2), 720-731.
507. Dan, C., Liang, J., Bai, B.R., Peng, S.L., Ding, L.S., *A New Phenolic Glucoside Gallate from the Flower Buds of Eugenia caryophyllate*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2010, **8**(3), 180-182.
508. Filho, G.L., De Rosso, V.V., Meireles, M.A.A., Rosa, P.T.V., Oliveira, A.L., Mercadante, A.Z., Cabral, F.A., *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids from pitanga fruits (Eugenia uniflora L.)*. The Journal of Supercritical Fluids, 2008, **46**(1), 33-39.
509. Arun, R., Prakash, M., Abraham, S. K., Premkumar, K., *Role of Syzygium cumini seed extract in the chemoprevention of in vivo genomic damage and oxidative stress*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **134**(2), 329-333.
510. Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B., *In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit*. Food Chemistry, 2005, **90**(4), 727-733.
511. Veigas, J.M., Narayan, M.S., Laxman, P.M., Neelwarne, B., *Chemical nature, stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of syzygium cumini Skeels*. Food Chemistry, 2007, **105**(2), 619-627.
512. Goyal, P.K., Verma, P., Sharma, P., Parmar, J., Agarwal, A., *Evaluation of anti-cancer and anti-oxidative potential of Syzygium Cumini against benzo[a]pyrene (BaP) induced gastric carcinogenesis in mice*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2010, **11**(3), 753-758.
513. Samadder, A., Chakraborty, D., De, A., Bhattacharyya, S.S., Bhadra, K., Khuda-Bukhsh, A.R., *Possible signaling cascades involved in attenuation of alloxan-induced oxidative stress and hyperglycemia in mice by ethanolic extract of Syzygium jambolanum: drug-DNA interaction with calf thymus DNA as target*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, **44**(3), 207-217.
514. Kusuma, I.W., Kuspradini, H., Arung, E.T., Aryani, F., Min, Y.H., Kim, J.S., Kim, Y.U., *Biological activity and phytochemical analysis of three Indonesian medicinal plants, Murraya koenigii, Syzygium polyanthum and Zingiber purpurea*. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2011, **4**(1), 75-79.
515. Lee, K.G., Shibamoto, T., *Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [Syzygium aromaticum (L.) Merr. et Perry]*. Food Chemistry, 2001, **74**(4), 443-448.
516. Muruganandan, S., Srinivasan, K., Chandra, S., Tandan, S.K., Lal, J., Raviprakash, V., *Anti-inflammatory activity of Syzygium cumini bark*. Fitoterapia, 2001, **72**(4), 369-375.
517. Kumar, A., Ilavarasan, R., Jayachandran, T., Deecaraman, M., Kumar, R. M., Aravindan, P., Padmanabhan, N., Krishan, M.R.V., *Anti-inflammatory activity of Syzygium cumini seed*. African Journal of Biotechnology, 2008, **7**(8), 941-943.
518. D.C. Modi, J.K.P., B. N. Shah and B. S. Nayak, *Anti-inflammatory activity of seeds of Syzygium cumini linn*. Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2010, **1**(1), 68-70.
519. Kim, Y.J., Kim, H.C., Ko, H., Amor, E.C., Lee, J.W., Yang, H.O., *Inhibitory effects of aurentiacin from Syzygium samarangense on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages*. Food and Chemical Toxicology, 2012, **50**(3), 1027-1035.
520. Zaidi, S.F., Muhammad, J.S., Shahryar, S., Usmanhani, K., Gilani, A.H., Jafri, W., Sugiyama, T., *Anti-inflammatory and cytoprotective effects of selected Pakistani medicinal plants in Helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **141**(1), 403-410.
521. Daniel, A.N., Sartoretto, S.M., Schmidt, G., Caparroz-Assef, S.M., Bersani-Amado, C.A., & Cuman, R.K.N., *Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2009, **19**(1B), 212-217.
522. Kandati, V., Govardhan, P., Reddy, C.S., Nath, A.R., Reddy, R.R., *In-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity of Syzygium alternifolium (wt) Walp*. Journal of Medicinal Plants Research, 2012, **6**(36), 4995-5001.
523. Avila-Peña, D., Peña, N., Quintero, L., Suárez-Roca, H., *Antinociceptive activity of Syzygium jambos leaves extract on rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2007, **112**(2), 380-385.
524. Manaharan, T., Appleton, D., Cheng, H.M., Palanisamy, U.D., *Flavonoids isolated from Syzygium aqueum leaf extract as potential antihyperglycaemic agents*. Food Chemistry, 2012, **132**(4), 1802-1807.
525. Kameswara Rao, B., Appa Rao, C.H., *Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of Syzygium alternifolium (Wt.) Walp. seed extracts in normal and diabetic rats*. Phytomedicine, 2001, **8**(2), 88-93.
526. Anandharajan, R., Jaiganesh, S., Shankernarayanan, N.P., Viswakarma, R.A., Balakrishnan, A., *In vitro glucose uptake activity of Aegles marmelos and Syzygium cumini by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPARgamma in L6 myotubes*. Phytomedicine, 2006, **13**(6), 434-441.
527. Musabayane, C.T., Mahlalela, N., Shode, F.O., Ojewole, J.A., *Effects of Syzygium cordatum (Hochst.) [Myrtaceae] leaf extract on plasma glucose and hepatic glycogen in streptozotocin-induced diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2005, **97**(3), 485-490.
528. Manaharan, T., Ming, C.H., Palanisamy, U.D., *Syzygium aqueum leaf extract and its bioactive compounds enhances pre-adipocyte differentiation and 2-NBDG uptake in 3T3-L1 cells*. Food Chemistry, 2013, **136**(2), 354-363.
529. Kasetti, R.B., Nabi, S.A., Swapna, S., Apparao, C., *Cinnamic acid as one of the antidiabetic active principle(s) from the seeds of Syzygium alternifolium*. Food and Chemical Toxicology, 2012, **50**(5), 1425-1431.

530. Chang, W.C., Shen, S.C., *Hypotriglyceridemic and hypoglycemic effects of vescalagin from Pink wax apple [Syzygium samarangense (Blume) Merrill and Perry cv. Pink] in high-fructose diet-induced diabetic rats* Food Chemistry, 2013, **136**(2), 858-863.
531. Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Hu, B., Kumar, S., Placido, J., Zito, S.W., *Alpha-glucosidase inhibitory activity of Syzygium cumini (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats*. Carbohydrate Research, 2008, **343**(7), 1278-1281.
532. Djoukeng, J.D., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Taponjdjou, A.L., Bouda, H., Lontsi, D., *Antibacterial triterpenes from Syzygium guineense (Myrtaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2005, **101**(1), 283-286.
533. Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V., *Antibacterial and antifungal activity of Syzygium jambolanum seeds*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **91**(1), 105-108.
534. Djija, C.D., Delmée, M., Quetin-Leclercq, J., *Antimicrobial activity of bark extracts of Syzygium jambos (L.) Alston (Myrtaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2000, **71**(1), 307-313.
535. Kumar, P., Singh, D.K., *Molluscicidal activity of Ferula asafoetida, Syzygium aromaticum and Carum carvi and their active components against the snail Lymnaea acuminata*. Chemosphere, 2006, **63**(9), 1568-1574.
536. Jeyasankar, A., Raja, N., Ignacimuthu, S., *Insecticidal compound isolated from Syzygium lineare Wall. (Myrtaceae) against Spodoptera litura (Lepidoptera: Noctuidae)*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2011, **18**(4), 329-332.
537. El-Moneim M.R.A., E.-B., H.S., Fayed, S.A., Shalaby, E.A., *Acaricidal activity of different extracts from Syzygium cumini L. Skeels (Pomposia) against Tetranychus urticae Koch*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2011, **1**(5), 359-364.
538. Kim, H.M., Lee, H., Hong, S.H., Song, H.J., Shin, M.K., Kim, S.H., Shin, T.Y., *Effect of Syzygium aromaticum extract on immediate hypersensitivity in rats*. Journal of Ethnopharmacology, 1998, **60**(2), 125-131.
539. Simirgiotis, M.J., Adachi, S., To, S., Yang, H., Reynertson, K. A., Basile, M. J., Gil, R.R., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J., *Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of Syzygium samarangense (Wax Jambu)*. Food Chemistry, 2008, **107**(2), 813-819.
540. Nair, A.G.R., Krishnan, S., Ravikrishna, C., Madhusudanan, K.P., *New and rare flavonol glycosides from leaves of Syzygium samarangense*. Fitoterapia, 1999, **70**(2), 148-151.
541. Nassar, M.I., *Flavonoid triglycosides from the seeds of Syzygium aromaticum*. Carbohydrate Research, 2006, **341**(1), 160-163.
542. Tian, L.W., Xu, M., Wang, D., Zhu, H.T., Yang, C.R., Zhang, Y.J., *Phenolic constituents from the leaves of Syzygium forrestii Merr. and Perry*. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, **39**(2), 156-158.
543. Tanaka, T., Orii, Y., Nonaka, G.I., Nishioka, I., Kouno, I., *Syzyginins A and B, two ellagitannins from Syzygium aromaticum*. Phytochemistry, 1996, **43**(6), 1345-1348.
544. Srivastava, R., Shaw, A.K., Kulshreshtha, D.K., *Triterpenoids and chalcone from Syzygium samarangense*. Phytochemistry, 1995, **38**(3), 687-689.
545. Han, Q.H., Wang, D.M., Cheng, Z.B., Yang, X., Xu, X.J., Wang, J., Yin, S., *Chemical constituents from the leaves and twigs of Syzygium tetragonum Wall*. Biochemical Systematics and Ecology, 2012, **41**, 3-5.
546. Yao, N., Yao, W., Lei, J., Wang, K., *Lignans from Syzygium grijsii and their chemotaxonomic significance*. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, **46**, 79-82.
547. Charles, R., Garg, S.N., Kumar, S., *An orsellinic acid glucoside from syzygium aromatica*. Phytochemistry, 1998, **49**(5), 1375-1376.
548. Indrajith, A., Ravindran, K.C., *Antioxidant potential of Indian medicinal plant in Phyllanthus amarus L. under supplementary UV-B radiation*. Recent Research in Science and Technology, 2009, **1**, 34-42.
549. Lim, Y.Y., Murtijaya, J., *Antioxidant properties of Phyllanthus amarus extracts as affected by different drying methods*. LWT - Food Science and Technology, 2007, **40**(9), 1664-1669.
550. Khopde, S.M., Priyadarsini, K.L., Mohan, H., Gawandi, V.B., Satav, J.G., Yakhmi, J.V., Banavaliker, M.M., Biyani, M.K., Mittal, J.P., *Characterizing the antioxidant activity of amla (Phyllanthus emblica) extract*. Current Science, 2001, **81**(2), 185-190.
551. Liu, X., Cui, C., Zhao, M., Wang, J., Luo, W., Yang, B., Jiang, Y., *Identification of phenolics in the fruit of emblica (Phyllanthus emblica L.) and their antioxidant activities*. Food Chemistry 2008, **109**, 909-915.
552. Shabeer, J., Srivastava, R.S., Singh, S.K., *Antidiabetic and antioxidant effect of various fractions of Phyllanthus simplex in alloxan diabetic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2009, **124**(1), 34-38.
553. Priya, O.S., Viswanathan, M.B.G., Balakrishna, K., Venkatesan, M., *Chemical constituents and in vitro antioxidant activity of Phyllanthus wightianus*. Natural Product Research 2011, **25** (10), 949-958.
554. Fang, S.H., Rao, Y.K., Tzeng, Y.M., *Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from Phyllanthus urinaria*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **116**(2), 333-340.
555. Kumaran, A., Joel Karunakaran, R., *In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India*. LWT - Food Science and Technology, 2007, **40**(2), 344-352.
556. Eldeen, I.M.S., Seow, E.M., Abdullah, R., Sulaiman, S.F., *In vitro antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven Phyllanthus sp.* South African Journal of Botany, 2011, **77**(1), 75-79.
557. Chakraborty, R., Biplab, D., Devanna, N., Sen, S., *Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of Phyllanthus acidus L. extracts*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, **2**(2), S953-S961.
558. Raphael, K.R., Kuttan, R., *Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by Phyllanthus amarus extract*. Journal of Ethnopharmacology, 2003, **87**(2), 193-197.
559. Kumar, S., Sharma, S., Kumar, D., Kumar, T., Arya, R., Kumar, K., *Pharmacognostic study and anti-inflammatory activity of Phyllanthus reticulatus Poir. fruit*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2012, **2**, S332-S335.
560. Murugaiyah, V., Chan, K.L., *Mechanisms of antihyperuricemic effect of Phyllanthus niruri and its lignan constituents*. Journal of Ethnopharmacology, 2009, **124**(2), 233-239.
561. Brusotti, G., Cesari, I., Gilardoni, G., Tosi, S., Grisoli, P., Picco, A.M., Caccialanza, G., *Chemical composition and antimicrobial activity of Phyllanthus muellerianus (Kuntze) Excel essential oil*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **142**, 657-662.
562. Ajala, T.O., Igwilo, C.I., Oreagba, I.A., Odeku, O.A., *The antiplasmodial effect of the extracts and formulated capsules of Phyllanthus amarus on Plasmodium yoelii infection in mice*. Asian Pacific journal of tropical medicine, 2011, **4**(4), 283-287.
563. Naaz, F., Javed, S., Abidin, M.Z., *Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Phyllanthus amarus Schum. et Thonn. on aflatoxin B1-induced liver damage in mice*. Journal of Ethnopharmacology, 2007, **113**(3), 503-509.

564. Jain, N.K., Singhai, A. K., *Protective effects of Phyllanthus acidus (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2011, **4**(6), 470-474.
565. Asha, V.V., Akhila, S., Wills, P.J., Subramoniam, A., *Further studies on the antihepatotoxic activity of Phyllanthus maderaspatensis Linn*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **92**(1), 67-70.
566. Yang, C.M., Cheng, H.Y., Lin, T.C., Chiang, L.C., Lin, C.C., *The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose isolated from Phyllanthus urinaria against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection*. Journal of Ethnopharmacology, 2007, **110**(3), 555-558.
567. Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A., Calixto, J.B., *Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus Phyllanthus*. General Pharmacology : The Vascular System, 1995, **26**(7), 1499-1506.
568. Ramakrishna, V., Gopi, S., Setty, O.H., *Protective effect of Phyllanthus fraternus against bromobenzene-induced mitochondrial dysfunction in rat kidney*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2012, **10**(5), 328-333.
569. Adeneye, A.A., Benebo, A.S., *Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of Phyllanthus amarus on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2008, **118**(2), 318-323.
570. Sripanidkulchai, B., Tattawasart, U., Laupatarakasem, P., Vinitketkumneun, U., Sripanidkulchai, K., Furihata, C., Matsushima, T., *Antimutagenic and anticarcinogenic effects of Phyllanthus amarus*. Phytomedicine, 2002, **9**(1), 26-32.
571. Adeneye, A.A., *The leaf and seed aqueous extract of Phyllanthus amarus improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **144**(3), 705-711.
572. Ali, H., Houghton, P.J., Soumyanath, A., *alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus*. Journal of Ethnopharmacology, 2006, **107**, 449-455.
573. Hnatyszyn, O., Mino, J., Gorzalczy, S., Ferraro, G., Coussio, J., Acevedo, C., *Antidiabetic activity of Phyllanthus sellowianus in streptozotocin-induced diabetic rats*. Phytomedicine, 1997, **4**(3), 251-253.
574. Hnatyszyn, O., Mino, J., Gorzalczy, S., Opezzo, J., Ferraro, G., Coussio, J., Acevedo, C., *Diuretic activity of an aqueous extract of Phyllanthus sellowianus*. Phytomedicine, 1999, **6**(3), 177-179.
575. Mehmood, M.H., Siddiqi, H.S., Gilani, A.H., *The antiarrhythmic and spasmolytic activities of Phyllanthus emblica are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca<sup>2+</sup> channels*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **133**(2), 856-865.
576. Chang, C.C., Lien, Y.C., Liu, K., Lee, S.S., *Lignans from Phyllanthus urinaria*. Phytochemistry, 2003, **63** (7), 825-833.
577. Sutthivaiyakit, S., Nakorn, N.N., Kraus, W., Sutthivaiyakit, P., *A novel 29-nor-3,4-seco-friedelane triterpene and a new guaiane sesquiterpene from the roots of Phyllanthus oxyphyllus*. Tetrahedron, 2003, **59**(50), 9991-9995.
578. Rao, Y.K., Fang, S.H., Tzeng, Y.M., *Anti-inflammatory activities of constituents isolated from Phyllanthus polyphyllus*. Journal of Ethnopharmacology, 2006, **103**(2), 181-186.
579. Yeap Foo, L., *Amariinic acid and related ellagitannins from Phyllanthus amarus* Phytochemistry, 1995, **39**(1), 217-224.
580. Shakil, N.A., Kumar, J., Pandey, R.K., Saxena, D.B., *Nematicidal prenylated flavanones from Phyllanthus niruri*. Phytochemistry, 2008, **69**(3), 759-764.
581. Agyare, C., Lechtenberg, M., Deters, A., Petereit, F., Hensel, A., *Ellagitannins from Phyllanthus muellerianus (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts*. Phytomedicine, 2011, **18**(7), 617-624.
582. Moreira, J., Klein-Júnior, L.C., Buzzi, F.D.C., *Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2012, **146**(1), 318-323.
583. Houghton, P.J., Woldemariam, T.Z., O'Shea, S., Thyagarajan, S.P., *Two securiniga-type alkaloids from Phyllanthus amarus*. Phytochemistry, 1996, **43**(3), 715-717.
584. Babady, B., Gedris, T.E., Herz, W., *Niruroidine, a norsecurinine-type alkaloid from Phyllanthus niruroides*. Phytochemistry, 1996, **41**(5), 1441-1443.
585. Ndlebe, V.J., Crouch, N.R., Mulholland, D.A., *Triterpenoids from the African tree Phyllanthus polyanthus*. Phytochemistry Letters, 2008, **1**(1), 11-17.
586. Qi, W.Y., Li, Y., Hua, L., Wang, K., Gao, K., *Cytotoxicity and structure activity relationships of phytosterol from Phyllanthus emblica*. Fitoterapia, 2013, **84**, 252-256.
587. Ueda, M., Shigemori-Suzuki, T., Yamamura, S., *Phyllanthurinolactone, a leaf-closing factor of nyctinastic plant, Phyllanthus urinaria L.* Tetrahedron Letters, 1995, **36**(35), 6267-6270.
588. Takayama, H., Katsura, M., Seki, N., Kitajima, M., Aimi, N., Sakai, S., Santiarworn, D., Liawruangrath, B., *Elaeocarpidine, a Naturally Occurring Racemate, from Tarenna vanprukii*. Planta medica, 1992, **58**(3), 289-291.
589. Yang, X.W., Zhao, P.J., Ma, Y.L., Xiao, H.T., Zuo, Y.Q., He, H.P., Li, L., Hao, X.J., *Mixed lignan-neolignans from Tarenna attenuata*. Journal of Natural Products, 2007, **70**(4), 521-525.
590. Yang, X.W., He, H.P., Du, Z.Z., Liu, H.Y., Di, Y.T., Ma, Y.L., Wang, F., Lin, H., Zuo, Y.Q., Li, L., *Tarennanosides A-H, Eight New Lignan Glucosides from Tarenna attenuata and Their Protective Effect on H2O2 Induced Impairment in PC12 Cells*. Chemistry & Biodiversity, 2009, **6**(4), 540-550.
591. Zhao, Z., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T., Takeda, Y., *Tarecilioides H-M: Further Cycloartane Glycosides from Leaves of Tarenna gracilipes*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2011, **59**(7), 902-905.
592. Zhao, Z., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T., Takeda, Y., *Tarecilioides A-G: Cycloartane Glycosides from Leaves of Tarenna gracilipes (Hay.) Ohwi*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2008, **56**(8), 1153-1158.
593. Djoudi, R., Bertrand, C., Fiasson, K., Fiasson, J.L., Comte, G., Fenet, B., Antoine Rabesa, Z., *Polyphenolics and iridoid glycosides from Tarenna madagascariensis*. Biochemical Systematics and Ecology, 2007, **35**(5), 314-316.
594. Salmoun, M., Braekman, J.C., Ranarivelo, Y., Rasamoelindra, R., Ralambomanana, D., Dewelle, J., Darro, F., Kiss, R., *New calamenene sesquiterpenes from Tarenna madagascariensis*. Natural Product Research, 2007, **21**(2), 111-120.
595. Beniddir, M.A., Grellier, P., Rasoanaivo, P., Loiseau, P.M., Bories, C., Dumontet, V., Guéritte, F., Litaudon, M., *Diarylheptanoid Glucosides from Pyrostria major and Their Antiprotozoal Activities*. European Journal of Organic Chemistry, 2012, **5**, 1039-1046.
596. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983, **65**(1-2), 55-63.
597. Prost, M., *Process for the determination by means of free radicals of the antioxidant properties of a living organism or a potentially aggressive agents*. 1992. US Patent 5 135 850.
598. International, K. *Test Biologique de Mesure du Pouvoir de Défense Antiradicalaire Global*. Available from: [http://www.vilacplus.eu/IMG/pdf/krl\\_test\\_presentation\\_fr.pdf](http://www.vilacplus.eu/IMG/pdf/krl_test_presentation_fr.pdf) consultée le 20 janvier 2010

599. Hseu, Y.C., Chang, W. H., Chen, C. S., Liao, J. W., Huang, C. J., Lu, F. J., Chia, Y.C., Hsu, H.K., Wu, J.J., Yang, H.L., *Antioxidant activities of Toona Sinensis leaves extracts using different antioxidant models*. Food and Chemical Toxicology, 2008, **46**(1), 105-114.
600. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology and Medicine, 1999, **26**(9-10), 1231-1237.
601. Payet, B., Shum Cheong Sing, A., Smadja, J., *Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities*. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, **54**(19), 7270-7276.
602. Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., Fritsch, P. *Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments*. Available from: <http://id.erudit.org/iderudit/008122ar>, consultée le 20 janvier 2010
603. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Science and Technology, 1995, **28**(1), 25-30.
604. Benzie, I.F., Strain, J.J., *Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*. Methods in enzymology, 1999, **299**, 15-27.
605. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, **53**(6), 1841-1856.
606. Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, **48**(8), 3396-3402.
607. Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., 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**(16), 4437-4444.
608. Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., Bartolome, B., *Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, **52**(1), 48-54.
609. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., *[14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*. Methods in Enzymology, 1999, **299**, 152-178.
610. Villarreal-Molina, M.T., Antuna-Puente, B., *Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects*. Biochimie, 2012, **94**(10), 2143-2149.
611. Rivière, M., 2012. *Les plantes toxiques et dangereuses de l'île de La Réunion*. Edition Poisson Rouge.01 ed. Sainte-Clotilde, Réunion. 100p.
612. Wittenberg, R., Beier, C., Dräger, G., Jas, G., Jasper, C., Monenschein, H., Kirschning, A., *Towards the total synthesis of tonantzitlolone-preparation of key fragments and the complete carbon backbone*. Tetrahedron Letters, 2004, **45**(23), 4457-4460.
613. Weber, M., Cadivel, A., Chappel, V., Abinaber, F., Le Gallo, A., Ragonneau, S., Verdier, C., Lassalle, C., Metas, E., D'Ortenzio, É., *Intoxication collective par «miel fou» à l'île de la Réunion (océan Indien)*. Bull Soc Pathol Exot, 2009, **102**(1), 7-8.
614. Paphassarang, S., Raynaud, J., Lussignol, M., Becchi, M., *Triterpenic glycosides from Polyscias scutellaria*. Phytochemistry, 1989, **28**(5), 1539-1541.
615. Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., *Biological activities and distribution of plant saponins*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **94**(2), 219-243.
616. Kuete, V., Efferth, T., *Pharmacogenomics of Cameroonian traditional herbal medicine for cancer therapy*. Journal of Ethnopharmacology, 2011, **137**(1), 752-766.
617. Marczewska, J., Karwicka, E., Drozd, J., Anuszczywska, E., *Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Activity of Alcohol Extract of Polyscias Filicifolia Shoot, Leaf, Cell Biomass of Suspension Culture and Saponin Fraction*. Acta Poloniae Pharmaceutica, 2011, **68**(5), 703-710.
618. Bick, I.R.C., *Chapter One Alkaloids from Australian Flora*, in *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, S.W. Pelletier, Editor. 1996, Pergamon. p. 1-154.
619. Kam, T.S., *Chapter two : Alkaloids from Malaysian Flora*, in *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, S.W. Pelletier, Editor. 1999: Pergamon. p. 285-438.
620. Joglekar, S.N., Gaitonde, B.B., *Histamine releasing activity of Carissa carandas roots (Apocyanaceae)*. The Japanese Journal of Pharmacology, 1970, **20**(3), 367-372.
621. Wangteeraprasert, R., Likhitwitayawuid, K., *Lignans and a Sesquiterpene Glucoside from Carissa carandas Stem*. Helvetica Chimica Acta, 2009, **92**(6), 1217-1223.
622. Sehar, I., Pal, H.C., Shukla, S., Bhushan, S., Hamid, A., Gupta, B.D., Saxena, A.K., *Cytotoxic evaluation and induction of mitochondria-mediated apoptosis in human leukaemia HL-60 cells by Carissa spinarum stem isolate*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011, **63**(8), 1078-1090.
623. Liu, S., Zhu, H., Zhang, S., Zhang, X., Yu, Q., Xuan, L., *Abietane diterpenoids from Clerodendrum bungei*. Journal of Natural Products, 2008, **71**(5), 755-759.
624. Liu, S.S., Zhou, T., Zhang, S.W., Xuan, L.J., *Chemical Constituents from Clerodendrum bungei and Their Cytotoxic Activities*. Helvetica Chimica Acta, 2009, **92**(6), 1070-1079.
625. Cheng, H.H., Wang, H.K., Ito, J., Bastow, K.F., Tachibana, Y., Nakanishi, Y., Xu, Z., Luo, T.Y., Lee, K.H., *Cytotoxic Pheophorbide-Related Compounds from Clerodendrum calamitosum and C. cyrtophyllum*. Journal of Natural Products, 2001, **64**(7), 915-919.
626. Xu, M., Shen, L., Wang, K., Du, Q., Wang, N., *Bioactive diterpenes from Clerodendrum kaichianum*. Natural product communications, 2011, **6**(1), 3-5.
627. TalMahmoud, T.S., Marques, M. R., Pessoa, C. D. Ó., Lotufo, L. V., Magalhães, H. I., Moraes, M. O. D, Lima, D.P.D., Tininis, A.G., Oliveira, J.D.E., *In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts* Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2011, **21**(3), 456-464.
628. Yang, L.L., Lee, C.Y., Yen, K.Y., *Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from Eugenia jambos L. on human leukemia cells*. Cancer Letters, 2000, **157**(1), 65-75.
629. Gertsch, J., Niomawë, Gertsch-Roost, K., Sticher, O., *Phyllanthus piscatorum, ethnopharmacological studies on a women's medicinal plant of the Yanomami Amerindians*. Journal of Ethnopharmacology, 2004, **91**(2-3), 181-188.
630. Stanslas, J., Bagalkotkar, G., Tang, S.C., Hamzah, A.S., Shaari, K., Lajis, N.H., Saad, M.S., *POSTER New antitumour agents from Phyllanthus pulcher, a tropical medicinal plant*. European Journal of Cancer Supplements, 2008, **6**(12), 58-59.

631. Wu, S.J., Wu, T.S., *Cytotoxic Arylnaphthalene Lignans from Phyllanthus oligospermus*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2006, **54**(8), 1223-1225.
632. Maneerat, W., Laphookhieo, S., Koysomboon, S., Chantrapromma, K., *Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from Chisocheon siamensis*. Phytomedicine, 2008, **15**(12), 1130-1134.
633. Deng, Z.P., Liu, S.C., Cui, S.X., Zhou, L., Yao, Q.Q., *Cytotoxic activity of five limonoids from Meliae cortex and their structure-activity relationship*. Chinese Journal of Natural Medicines, 2012, **10**(3), 238-240.
634. Awang, K., Lim, C. S., Mohamad, K., Morita, H., Hirasawa, Y., Takeya, K., Thoison, O., Hadia, A.H.A., *Erythrocarpines A-E, new cytotoxic limonoids from Chisocheon erythrocarpus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, **15**(17), 5997-6002.
635. Tada, K., Takido, M., Kitanaka, S., *Limonoids from fruit of Melia toosendan and their cytotoxic activity*. Phytochemistry, 1999, **51**(6), 787-791.
636. Cui, B., Chai, H., Constant, H.L., Santisuk, T., Reutrakul, V., Beecher, C.W., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., *Limonoids from Azadirachta excelsa*. Phytochemistry, 1998, **47**(7), 1283-1287.
637. Takeya, K., Quio, Z.S., Hirobe, C., Itokawa, H., *Cytotoxic trichilin-type limonoids from Melia azedarach*. Bioorganic & medicinal chemistry, 1996, **4**(8), 1355-1359.
638. Khan, M.A., Shahwar, D., Ahmad, N., Khan, Z.U.D., Ajaib, M., *Chemical Constituents of Carissa opaca Extracts and Their Evaluation as Antioxidants and Preservatives in Edible Oils*. Asian Journal of Chemistry 2010, **22**(1), 379-388
639. De Block, P., Degreef, J., Robbrecht, E., *Reinstatement of the Afro-Malagasy genus Coptosperma (Rubiaceae, Ixoroideae, Pavetteae)*. Systematics and Geography of Plants, 2001, **71**, 455-492.
640. Degreef, J., De Block, P., Robbrecht, E., *A survey of continental African Coptosperma (Rubiaceae, Pavetteae)*. Systematics and Geography of Plants, 2001, **71**, 367-382.
641. Kupeli, E., Erdemoglu, N., Yesilada, E., Sener, B., *Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of Taxus baccata L*. Journal of Ethnopharmacology, 2003, **89**(2-3), 265-270.
642. Cho, J.Y., Park, J., Kim, P.S., Yoo, E.S., Baik, K.U., Park, M.H., *Savinin, a lignan from Pterocarpus santalinus inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2001, **24**(2), 167-171.
643. Cho, J.Y., Kim, A.R., Park, M.H., *Lignans from the rhizomes of Coptis japonica differentially act as anti-inflammatory principles*. Planta Medica, 2001, **67**(4), 312-316.
644. Raina, M.K., Bhatnagar, J.K., Atal, C.K., *Isolation of caffeic acid from the roots of Carissa spinarum L.*. Indian journal of pharmacy, 1971, **33**(4), 76-77.
645. Mathuram, V., Brahmahayalaselvam, A., Jaffar Hussain, A., Bhima Rao, R., Patra, A., *Chemical constituents of Carissa spinarum and their antibacterial activity*. Journal of the Indian Chemical Society, 1998, **75**(4), 262-264.
646. Rastogi, R.C., Kulshreshtha, D.K., Rastogi, R.P., *Cardioactive constituents from Carissa spinarum*. Indian Journal of Chemistry, 1969, **7**, 1102-1104.
647. Geetha, T., Varalakshmi, P., *Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats*. Journal of Ethnopharmacology, 2001, **76**(1), 77-80.
648. Wang, Y.J., Lu, J., Wu, D.M., Zheng, Z.H., Zheng, Y.L., Wang, X.H., Ruan, J., Sun, X., Shan, Q., Zhang, Z.F., *Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in mouse brain through suppressing p38/NF-kappaB mediated inflammatory pathways*. Neurobiology of learning and memory, 2011, **96**(2), 156-165.
649. Prinsloo, G., 2006. *Isolation of an anti-HIV compound from Eleaodendron croceum (Thunb.) DC*. Philosophiae Doctorae of the University of Pretoria
650. Ishii, R., Horie, M., Saito, K., Arisawa, M., Kitanaka, S., *Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from Mallotus japonicus on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon-gamma*. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, **1568**(1), 74-82.
651. Ishii, R., Horie, M., Saito, K., Arisawa, M., Kitanaka, S., *Inhibition of lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation by Mallotus japonicus phloroglucinol derivatives*. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, **1620**(1-3), 108-118.
652. Crockett, S.L., Wenzig, E.M., Kunert, O., Bauer, R., *Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from Hypericum empetrifolium*. Phytochemistry letters, 2008, **1**(1), 37-43.
653. Chang, M.C., Chang, H.H., Chan, C.P., Chou, H.Y., Chang, B.E., Yeung, S.Y., Wang, T.M., Jeng, J.H., *Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, **263**(3), 287-295.
654. Bauer, J., Koeberle, A., Dehm, F., Pollastro, F., Appendino, G., Northoff, H., Rossi, A., Sautebin, L., Werz, O., *Arzanol, a prenylated heterodimeric phloroglucinyl pyrone, inhibits eicosanoid biosynthesis and exhibits anti-inflammatory efficacy in vivo*. Biochemical pharmacology, 2011, **81**(2), 259-268.
655. Shaari, K., Suppaiah, V., Wai, L.K., Stanslas, J., Tejo, B.A., Israf, D.A., Abas, F., Ismail, I. S., Shuaib, N.H., Zareen, S., Lajis, N.H., *Bioassay-guided identification of an anti-inflammatory prenylated acylphloroglucinol from Melicope ptelefolia and molecular insights into its interaction with 5-lipoxygenase*. Bioorganic & medicinal chemistry, 2011, **19**(21), 6340-6347.
656. Kim, A.R., Lee, M.S., Shin, T.S., Hua, H., Jang, B.C., Choi, J.S., Byun, D.S., Utsuki, T., Ingram, D., Kim, H. R., *Phlorofucofuroeckol A inhibits the LPS-stimulated iNOS and COX-2 expressions in macrophages via inhibition of NF-kappaB, Akt, and p38 MAPK*. Toxicology In Vitro, 2011, **25**(8), 1789-1795.
657. Kang, Y.M., Eom, S.H., Kim, Y.M., *Protective effect of phlorotannins from Eisenia bicyclis against lipopolysaccharide-stimulated inflammation in HepG2 cells*. Environmental Toxicology and Pharmacology 2013, **35**(3), 395-401.
658. Choi, R.J., Shin, E.M., Jung, H.A., Choi, J.S., Kim, Y.S., *Inhibitory effects of kaurenoic acid from Aralia continentalis on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages*. Phytomedicine, 2011, **18**(8-9), 677-682.
659. Li, Y., Liu, J., Yu, S., Proksch, P., Gu, J., Lin, W., *TNF- $\alpha$  inhibitor diterpenoids from the Chinese mangrove plant Excoecaria agallocha L*. Phytochemistry, 2010, **71**(17-18), 2124-2131.
660. Giang, P.M., Jin, H.Z., Son, P.T., Lee, J.H., Hong, Y.S., Lee, J.J., *ent-Kaurane diterpenoids from Croton tonkinensis inhibit LPS-induced NF-kappaB activation and NO production*. Journal of Natural Products, 2003, **66**(9), 1217-1220.
661. Hong, S.S., Lee, S.A., Han, X.H., Hwang, J.S., Lee, C., Lee, D., Hong, J.T., Kim, Y., Lee, H., Hwang, B.Y., *ent-Kaurane diterpenoids from Isodon japonicus*. Journal of Natural Products, 2008, **71**(6), 1055-1058.
662. Aquila, S., Weng, Z.Y., Zeng, Y.Q., Sun, H.D., Ríos, J.L., *Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation and iNOS Induction by ent-Kaurane Diterpenoids in LPS-Stimulated RAW264.7 Murine Macrophages*. Journal of Natural Products, 2009, **72**(7), 1269-1272.



663. Lee, J.H., Koo, T.H., Hwang, B.Y., Lee, J.J., *Kaurane Diterpene, Kamebakaurin, Inhibits NF- $\kappa$ B by Directly Targeting the DNA-binding Activity of p50 and Blocks the Expression of Antiapoptotic NF- $\kappa$ B Target Genes*. Journal of Biological Chemistry, 2002, **277**(21), 18411-18420.
664. Costantino, V., Fattorusso, E., Mangoni, A., Perinu, C., Cirino, G., De Gruttola, L., Roviezzo, F., *Tedanol: A potent anti-inflammatory ent-pimarane diterpene from the Caribbean Sponge Tedania ignis*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009, **17**(21), 7542-7547.
665. Suh, Y.G., Lee, K.O., Moon, S.H., Seo, S.Y., Lee, Y.S., Kim, S.H., Lee, Y.S., Jeong, J.M., Lee, S.J., Kim, S.G., *Synthesis and anti-inflammatory effects of novel pimarane diterpenoid analogs*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, **14**(13), 3487-3490.
666. Suh, Y.G., Kim, Y. H., Park, M. H., Choi, Y. H., Lee, H. K., Moon, J. Y., Min, K.H., Shin, D.Y., Jung, J.K., Park, O.H., Jeon, R.O., Park, H.S., Kang, S.A., *Pimarane cyclooxygenase 2 (COX-2) inhibitor and its structure-activity relationship*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001, **11**(4), 559-562.
667. Suh, Y.G., Choi, Y.H., Lee, H.K., Kim, Y.H., Park, H.S., *Diterpene derivatives and anti-inflammatory analgesic agents comprising the same*. U.S. Patent No. 6,593,363. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office., 1999.
668. Ding, Y., Liang, C., Kim, J.H., Lee, Y.M., Hyun, J.H., Kang, H.K., Kim, J.A., Min, B.S., Kim, Y.H., *Triterpene compounds isolated from Acer mandshuricum and their anti-inflammatory activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010, **20**(5), 1528-1531.
669. Aguirre, M.C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M.E., Cassels, B.K., Silva, X., Alegría, S., Negrete, R., *Topical anti-inflammatory activity of 2 $\alpha$ -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of Ugni molinae*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, **14**(16), 5673-5677.
670. Simão da Silva, K.A., Paszcuk, A.F., Passos, G.F., Silva, E.S., Bento, A.F., Meotti, F.C., Calixto, J.B., *Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice*. Pain, 2011, **152**(8), 1872-1887.
671. Shen, S.C., Chang, W.C., *Hypotriglyceridemic and hypoglycemic effects of vescalagin from Pink wax apple [Syzygium samarangense (Blume) Merrill and Perry cv. Pink] in high-fructose diet-induced diabetic rats*. Food Chemistry, 2012, **136**(2), 858-863.
672. Kithsiri Wijeratne, E.M., Hatanaka, Y., Kikuchi, T., Tezuka, Y., Leslie Gunatilaka, A.A., *A dioxoaporphine and other alkaloids of two annonaceous plants of sri lanka*. Phytochemistry, 1996, **42**(6), 1703-1706.
673. Mwine, T.J., Van Damme, P., *Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features*. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, **5**(5), 652-662.
674. de Montor, A. *Encyclopédie des gens du monde: répertoire universel des sciences, des lettres et des arts; avec des notices sur les principales familles historiques et sur les personnages célèbres, morts et vivans*. Available from: <http://books.google.com/books?id=E0T0AAAAMAAJ>, consultée le 21 janvier 2010
675. Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. *Botanique systématique: Une perspective phylogénétique*. Available from: <http://books.google.com/books?id=AfDj6i1kj5wC>, consultée le 5 mars 2012
676. *Euphorbiacées - Flore de La Réunion*. Available from: <http://www.mi-aime-a-ou.com/Euphorbiaceae.php>, consultée le 08 octobre 2010
677. Sabandar, C.W., Ahmat, N., Jaafar, F.M., Sahidin, I., *Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several Jatropha species (Euphorbiaceae): A review*. Phytochemistry, 2013, **85**, 7-29.
678. Jassbi, A.R., *Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia from Iran*. Phytochemistry, 2006, **67**(18), 1977-1984.
679. Shi, Q.W., Su, X.H., Kiyota, H., *Chemical and Pharmacological Research of the Plants in Genus Euphorbia*. Chemical Reviews, 2008, **108**, 4295-4327.
680. Rogers, D.J., *A Revision of Stillingia in the New World*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1951, **38**(3), 207-259.
681. Schmelzer, G.H., Gurib-Fakim, A., Arroo, R., Bosch, C.H., Ruijter, de A., Simmonds, M.S.J., Lemmens, R.H.M.J., Oyen, L.P.A. *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(1) : Plantes médicinales 1*. Available from: <http://database.prota.org>, consultée le 08 octobre 2010
682. Dupont, J., Girard, J.C., Guinet, M., 1989. *Flore en détresse: le livre rouge des plantes indigènes menacées à la Réunion*: Société réunionnaise d'étude et de protection de l'environnement. 133p.
683. Esser, H.J., *A partial revision of the Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Malesia*. Blumea 1999, **44**(1), 149-215.
684. Cirad, R. *Arbres, arbustes...de la forêt réunionnaise - Description et méthodes de multiplication - Stillingia lineata (Lam.) Müll. Arg.* Available from: [http://arbres-reunion.cirad.fr/especes/euphorbiaceae/stillingia\\_lineata\\_lam\\_muell\\_arg](http://arbres-reunion.cirad.fr/especes/euphorbiaceae/stillingia_lineata_lam_muell_arg)
685. Bosser, J., Cadet, T., Guého, J., Marais, W., *Flore des Mascareignes : la Réunion, Maurice, Rodrigues. 160. EUPHORBIACEAE, The Sugar industry research institute (Mauritius), L'office de la recherche scientifique et technique outre-mer (Paris), The Royal Botanic Gardens (Kew), septembre 1982.*, 87-89.
686. Knight, A.P., Walter, R.G. *Plants Causing Sudden Death* Available from: [http://www.ivis.org/special\\_books/knight/chap1/ivis.pdf](http://www.ivis.org/special_books/knight/chap1/ivis.pdf), consultée le 26 février 2012
687. Harding, A.R. *Ginseng and Other Medicinal Plants Section*. Available from: <http://www.swsbm.com/Ephemera/Ginseng-Harding-1.pdf>, consultée le 23 avril 2012
688. Taylor, L.A. *Plants used as curatives by certain southeastern tribes*. Available from: <http://www.herbaltherapeutics.net/PlantsUsedAsCuratives.pdf>, consultée le 13 mai 2010
689. Millspaugh, C.F., 1887. *American medicinal plants; an illustrated and descriptive guide to the American plants used as homopathic remedies: their history, preparation, chemistry and physiological effects*, ed. B. Tafel. Vol. 2. Michigan, USA. 488p.
690. Deschauer, T. *Illustrated phytotherapy*. Available from: <http://www.swsbm.com/Ephemera/Deschauer-2.pdf>, consultée le 5 mai 2010
691. Winston, D., Dattner, A.M., *The American system of medicine*. Clinics in dermatology, 1999, **17**(1), 53-56.
692. Smith, M., Boon, H.S., *Counseling cancer patients about herbal medicine*. Patient education and counseling, 1999, **38**(2), 109-120.
693. Jansen, P.C.M. *Triadica sebifera (L.) Small*. Available from: [http://database.prota.org/protahtml/triadica%20sebifera\\_fr.htm](http://database.prota.org/protahtml/triadica%20sebifera_fr.htm), consultée le 25 septembre 2010
694. Morris, L.J., *A synthetic optically active trialiphatic triglyceride and a method for the detection of optical activity in natural asymmetric triglycerides* Biochemical and biophysical research communications, 1965, **18**, 495.

695. Maier, R., Holman, R.T., *Naturally Occurring Triglycerides Possessing Optical Activity in the Glycerol Moiety*. *Biochemistry*, 1964, **3**(2), 270-274.
696. Sprecher, H.W., Maier, R., Barber, M., Holman, R.T., *Structure of an Optically Active Allene-containing Tetraester Triglyceride Isolated from the Seed Oil of Sapium sebiferum*. *Biochemistry*, 1965, **4**(9), 1856-1863.
697. Aitzetmüller, K., Xin, Y., Werner, G., Grönheim, M., *High-performance liquid chromatographic investigations of stillingia oil*. *Journal of Chromatography A*, 1992, **603**(1), 165-173.
698. Eberhardt, T.L., Li, X., Shupe, T.F., Hse, C.Y., *Chinese Tallow Tree (Sapium Sebiferum) utilization: Characterization of extractives and cell-wall chemistry*. *Wood and Fiber Science*, 2007, **39**(2), 319-324.
699. Liu, Y., Xin, H.L., Yan, Y.J., *Physicochemical properties of stillingia oil: Feasibility for biodiesel production by enzyme transesterification*. *Industrial Crops and Products*, 2009, **30**(3), 431-436.
700. Newton, S.M., Lau, C., Gurcha, S.S., Besra, G.S., Wright, C.W., *The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from Psoralea corylifolia and Sanguinaria canadensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, **79**(1), 57-67.
701. Hérin, M., Colin, M., Tursch, B., *Chemical studies of marine invertebrates. XXVI. Flexibilene, an unprecedented fifteen-membered ring diterpene hydrocarbon from the soft coral Sinularia flexibilis (Coelenterata, Octocorallia, Alcyonacea)*. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 1976, **85**(10), 801-803.
702. McMurry, J., Matz, J.R., Kees, K. L., Bock, P.A., *Synthesis of flexibilene, a naturally occurring 15-membered-ring diterpene*. *Tetrahedron Letters*, 1982, **23**(17), 1777-1780.
703. Lima, M.A., Lima, J. Q., Arriaga, A., Andrade-Neto, M., Santiago, G. M., Bezerra, B. P., Ferreira, Y.S., Veras, H.N.H., Braz-Filho, R., *Chemical constituents from Sebastiania macrocarpa Muell. Arg.(Euphorbiaceae)*. *Química Nova*, 2009, **32**(2), 348-353.
704. Porto, T.S., Furtado, N.A., Heleno, V.C., Martins, C.H., Da Costa, F.B., Severiano, M.E., Silva, A.N., Veneziani, R.C.S., Ambrósio, S.R., *Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from Viguiera arenaria against Gram-positive bacteria*. *Fitoterapia*, 2009, **80**(7), 432-436.
705. Thongphasuk, P., Suttisri, R., Bavovada, R., Verpoorte, R. , *Alkaloids and a pimarane diterpenoid from Strychnos vanprukii*. *Phytochemistry*, 2003, **64**(4), 897-901.
706. Suthivaiyakit, S., Nareeboon, P., Ruangrangsri, N., Ruchirawat, S., Pisutjaroenpong, S., Mahidol, C., *Labdane and pimarane diterpenes from Croton joufra*. *Phytochemistry*, 2001, **56**(8), 811-814.
707. Block, S., Baccelli, C., Tinant, B., Van Meervelt, L., Rozenberg, R., Habib Jiwan, J. L., Llabrès, G., De Pauw-Gillet, M.C., Quetin-Leclercq, J., *Diterpenes from the leaves of Croton zambesicus*. *Phytochemistry*, 2004, **65**(8), 1165-1171.
708. Luo, X.D., Wu, S.H., Ma, Y.B., Wu, D.G., *ent-Pimarane derivatives from Dysoxylum hainanense*. *Phytochemistry*, 2001, **57**(1), 131-134.
709. Borkosky, S., Bardón, A., Catalán, C.A.N., Díaz, J. G., Herz, W., *Diterpenes from Vernonia amplexicaulis*. *Phytochemistry*, 1995, **40**(5), 1477-1479.
710. Chamy, M.C., Piovano, M., Garbarino, J.A., Améstica, M. P., *Diterpenoids from Calceolaria glandulifera*. *Phytochemistry*, 1998, **49**(8), 2595-2597.
711. Chamy, M.C., Piovano, M., Garbarino, J.A., Vargas, C., *Diterpenoids from Calceolaria dentata*. *Phytochemistry*, 1995, **40**(6), 1751-1754.
712. Chamy, M.C., Piovano, M., Garbarino, J.A., Chaparro, A., *Diterpenoids from Calceolaria hypericina*. *Phytochemistry*, 1995, **40**(4), 1209-1212.
713. Buchanan, M.S., Connolly, J.D., Kadir, A.A., Rycroft, D.S., *Sesquiterpenoids and diterpenoids from the liverwort Jungermannia truncata*. *Phytochemistry*, 1996, **42**(6), 1641-1646.
714. Meragelman, T.L., Silva, G.L., Mongelli, E., Gil, R.R., *ent-Pimarane type diterpenes from Gnaphalium gaudichaudianum*. *Phytochemistry*, 2003, **62**(4), 569-572.
715. Yalçın, F.N., Ersöz, T., Bedir, E., Dönmez, A.A., Stavri, M.Z., Gibbons, S., Çalış, İ., *Amanicadol, a pimarane-type diterpene from Phlomis amonica Vierch.* *Zeitschrift für Naturforschung*, 2006, **61b**, 1433 -1436.
716. Evidente, A., Sparapano, L., Fierro, O., Bruno, G., Giordano, F., Motta, A., *Sphaeropsidins B and C, phytotoxic pimarane diterpenes from Sphaeropsis sapinea f. sp. cupressi and Diplodia mutila*. *Phytochemistry*, 1997, **45**(4), 705-713.
717. Evidente, A., Sparapano, L., Motta, A., Giordano, F., Fierro, O., Frisullo, S., *A phytotoxic pimarane diterpene of Sphaeropsis sapinea f. sp. cupressi, the pathogen of a canker disease of cypress*. *Phytochemistry*, 1996, **42**(6), 1541-1546.
718. Dettrakul, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Nopichai, S., Suyarnsestakorn, C., Tanticharoen, M., Thebtaranonth, Y., *Antimycobacterial pimarane diterpenes from the Fungus Diaporthe sp.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003, **13**(7), 1253-1255.
719. Porto, T., Rangel, R., Furtado, N., De Carvalho, T., Martins, C., Veneziani, R., Da Costa, F., Vinholis, A., Cunha, W., Heleno, V., Ambrosio, S., *Pimarane-type Diterpenes: Antimicrobial Activity against Oral Pathogens*. *Molecules*, 2009, **14**(1), 191-199.
720. Rasoamiaranjanahary, L., Guilet, D., Marston, A., Randimbivololona, F., Hostettmann, K., *Antifungal isopimaranes from Hypoestes serpens*. *Phytochemistry*, 2003, **64**(2), 543-548.
721. Sparapano, L., Bruno, G., Fierro, O., Evidente, A., , *Studies on structure-activity relationship of sphaeropsidins A-F, phytotoxins produced by Sphaeropsis sapinea f. sp. cupressi*. *Phytochemistry*, 2004, **65**(2), 189-198.
722. Ohashi, K., Bohgaki, T., Matsubara, T., Shibuya, H., *Indonesian medicinal plants XXIII. Chemical structures of two new migrated pimarane-type diterpenes, neoorthosiphols A and B, and suppressive effects on rat thoracic aorta of chemical constituents isolated from the leaves of Ortosiphon aristatus (Lamiaceae)*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2000, **48**, 433-435.
723. Ulubelen, A., Topcu, G., Johansson, C.B., *Norditerpenoids and Diterpenoids from Salvia multicaulis with Antituberculous Activity*. *Journal of Natural Products*, 1997, **60**(12), 1275-1280.
724. Chang, L.C., Song, L.L., Park, E.J., Luyengi, L., Lee, K.J., Farnsworth, N.R., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., *Bioactive Constituents of Thuja occidentalis*. *Journal of Natural Products*, 2000, **63**(9), 1235-1238.
725. Lallemand, B., Masi, M., Maddau, L., De Lorenzi, M., Dam, R., Cimmino, A., Moreno y Banuls, L., Andolfi, A., Kiss, R., Mathieu, V., Evidente, A., *Evaluation of in vitro anticancer activity of sphaeropsidins A-C, fungal rearranged pimarane diterpenes, and semisynthetic derivatives*. *Phytochemistry Letters*, 2012, **5**(4), 770-775.
726. Busch, T., Schuster, H., Kirschning, A., *Determination of the absolute configuration of the diterpene tonantzitlolone B*. *Tetrahedron Letters*, 2008, **49**(36), 5273-5275.
727. Bourjot, M., Leyssen, P., Eydoux, C., Guillemot, J.C., Canard, B., Rasoanaivo, P., Guéritte, F., Litaudon, M., *Chemical constituents of Anacolosa pervilleana and their antiviral activities*. *Fitoterapia*, 2012, **83**(6), 1076-1080.

728. Allard, P.M., Martin, M.T., Tran Huu Dau, M.E., Leyssen, P., Guéritte, F., Litaudon, M., *Trigocherrin A, the First Natural Chlorinated Daphnane Diterpene Orthoester from Trigonostemon cherrieri*. *Organic Letters*, 2011, **14**(1), 342-345.
729. Allard, P.M., Leyssen, P., Martin, M.T., Bourjot, M., Dumontet, V., Eydoux, C., Guillemot, J.C., Canard, B., Poullain, C., Guéritte, F., Litaudon, M., *Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry*, 2012, **84**(0), 160-168.

# Liste des figures

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1 : Carte de la végétation indigène présente à La Réunion.....  | 21  |
| Figure 2 : Plantes de la pharmacopée réunionnaise .....  | 24  |
| Figure 3 : Formation de radicaux libres à partir de l'oxygène.....   | 29  |
| Figure 4 : Phénomène de « burst oxydatif ».....  | 30  |
| Figure 5 : Peroxydation lipidique .....  | 31  |
| Figure 6 : Actions des radicaux libres sur l'ADN.....  | 32  |
| Figure 7 : Réaction de la glutathion peroxydase sur différents radicaux libres .....   | 33  |
| Figure 8 : Répartition des épidémies de CHIKV dans le monde.....   | 42  |
| Figure 9 : Enveloppe lipoprotéique du CHIKV.....   | 42  |
| Figure 10 : Cycle de réplication du CHIKV .....  | 43  |
| Figure 11 : Cellules cibles du CHIKV.....  | 45  |
| Figure 12 : Représentation schématique des CC <sub>50</sub> , CE <sub>50</sub> et CE <sub>90</sub> pour le test antiviral (CHIKV) .....                            | 51  |
| Figure 13 : Activité cytotoxique du Taxotère (contrôle positif) sur les cellules THP-1 .....   | 61  |
| Figure 14 : Suivi de lyse de globules rouges .....   | 63  |
| Figure 15 : Temps de demi-hémolyse obtenu pour l'acide gallique à 42,5 µg/mL (contrôle positif).....   | 63  |
| Figure 16 : Activité anti-inflammatoire de l'adiponectine (contrôle positif).....  | 68  |
| Figure 17 : Courbes de cytotoxicité obtenues pour trois extraits de plantes testés sur des cellules THP-1 .....  | 69  |
| Figure 18 : Comparaison de l'activité cytotoxique de quatorze extraits végétaux par rapport au contrôle négatif et au contrôle positif (Taxotère) à 100 µg/mL..... | 72  |
| Figure 19 : Courbes de cytotoxicité sur THP-1 obtenues pour onze plantes réunionnaises .....   | 74  |
| Figure 20 : Courbes d'hémolyse et HT <sub>50</sub> calculés pour l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Carissa spinarum</i> .....                                      | 79  |
| Figure 21 : Valeurs des HT <sub>50</sub> obtenus pour les extraits végétaux antioxydants .....   | 83  |
| Figure 22 : Résultats des tests TEAC/ DPPH/ FRAP/ FOLIN / ORAC pour les trente-huit extraits végétaux .....  | 85  |
| Figure 23 : Résultats du test anti-inflammatoire pour les trente-huit extraits testés à 10 µg/mL.....  | 97  |
| Figure 24 : Planches botaniques des deux sous-espèces de <i>Stillingia lineata</i> (Lam.) Müll. Arg.....   | 115 |
| Figure 25 : Planche botanique de l'espèce <i>Stillingia lineata</i> .....  | 117 |
| Figure 26 : Molécules isolées de <i>Stillingia sylvatica</i> .....   | 121 |
| Figure 27 : Molécules isolées de <i>Stillingia sanguinolenta</i> .....   | 122 |
| Figure 28 : Molécules isolées de <i>Stillingia oppositifolia</i> .....   | 123 |
| Figure 29 : Premier mode de cyclisation du GGPP.....   | 124 |
| Figure 30 : Second mode de cyclisation du GGPP, formation des diterpènes bicycliques .....   | 125 |
| Figure 31 : Second mode de cyclisation du GGPP, formation des diterpènes tri- et tétracycliques .....  | 126 |
| Figure 32 : Structure des diterpènes de type tonantzitlolone.....  | 127 |
| Figure 33 : Structure des diterpènes de type <i>ent</i> -pimarane.....   | 128 |
| Figure 34 : Extractions des feuilles et des écorces de <i>Stillingia lineata</i> .....   | 131 |
| Figure 35 : Fractionnement bioguidé (test antiviral CHIKV) de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....                                       | 134 |
| Figure 36 : CLHP de la fraction SL-3 de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....   | 135 |
| Figure 37 : CLHP de la fraction SL-4 de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....   | 136 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 38 : CLHP de la fraction SL-5 de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....  | 137 |
| Figure 39 : Molécules isolées de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....   | 138 |
| Figure 40 : Spectre <sup>1</sup> H de la tonantzitlolone et motifs établis en fonction des corrélations COSY .....  | 141 |
| Figure 41 : Corrélations HMBC établissant les liaisons entre les motifs <b>1, 3 et 6</b> de la tonantzitlolone.....   | 142 |
| Figure 42 : Corrélations HMBC établissant les liaisons entre les motifs <b>1, 4 et 5</b> de la tonantzitlolone.....   | 143 |
| Figure 43 : Corrélations HMBC établissant les liaisons entre les motifs <b>2 et 7</b> de la tonantzitlolone .....   | 144 |
| Figure 44 : Corrélations HMBC du C-9 et structure finale de la tonantzitlolone .....  | 145 |
| Figure 45 : Principales corrélations NOESY de la tonantzitlolone.....   | 145 |
| Figure 46 : Représentation ORTEP de la tonantzitlolone .....  | 146 |
| Figure 47 : Macrocycle de la 4'-acétoxytonantzitlolone .....  | 149 |
| Figure 48 : Motifs de la chaîne latérale de la 4'-acétoxytonantzitlolone établis en fonction des corrélations COSY.....   | 149 |
| Figure 49 : Corrélations HMBC de la chaîne latérale de la 4'-acétoxytonantzitlolone.....  | 150 |
| Figure 50 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la 4'-hydroxytonantzitlolone et comparaison avec les spectres RMN <sup>1</sup> H de la tonantzitlolone et de la 4'-acétoxytonantzitlolone ..... | 152 |
| Figure 51 : Corrélations HMBC de la chaîne latérale de la 4'-hydroxytonantzitlolone .....   | 154 |
| Figure 52 : Corrélations HMBC du <i>gem</i> -diméthyle de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène. 157  |     |
| Figure 53 : Corrélations HMBC du groupement vinylique de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène .....  | 158 |
| Figure 54 : Fermeture des trois cycles hexaniques de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène .....  | 158 |
| Figure 55 : Spectre IR de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène .....   | 159 |
| Figure 56 : Spectre UV-Visible de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène .....   | 160 |
| Figure 57 : Structure plane du 12-hydroxy-3,7-dioxopimara-8,15-diène.....   | 160 |
| Figure 58 : Corrélations NOESY de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène .....   | 161 |
| Figure 59 : Vérification de la pureté de la 4'-acétoxytonantzitlolone .....   | 163 |
| Figure 60 : CCM récapitulative du fractionnement de la fraction SL-4 de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....  | 164 |
| Figure 61 : Différences structurales entre les trois diterpènes de type tonantzitlolone isolés et CE <sub>50</sub> (en $\mu$ M) obtenues pour l'activité antivirale (CHIKV) .....         | 166 |
| Figure 62 : Fractionnement de l'extrait AOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....   | 181 |

# Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau I : Menaces d'extinction de la flore indigène de la Réunion selon les critères UICN.....  | 22  |
| Tableau II : Résultats du criblage antiviral ciblant le CHIKV des plantes sélectionnées.....  | 52  |
| Tableau III : Recherche bibliographique sur les dix-huit plantes réunionnaises sélectionnées pour les criblages d'activités cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire ..... | 57  |
| Tableau IV : Résultats de l'activité cytotoxique des extraits végétaux sur cellules THP-1 .....   | 70  |
| Tableau V : Réponses au test d'activité antioxydante (test d'hémolyse) obtenues pour les trente-huit extraits végétaux étudiés.....   | 81  |
| Tableau VI : Résultats des tests FRAP/FOLIN/TEAC/DPPH/ORAC pour les trente-huit extraits testés .....   | 88  |
| Tableau VII : Tableau récapitulatif des activités biologiques obtenues pour les dix-huit plantes criblées   | 106 |
| Tableau VIII : Résultats du test antiviral pour les six fractions obtenues lors du fractionnement de l'extrait AcOEt de l'écorce de <i>Stillingia lineata</i> .....               | 133 |
| Tableau IX : RMN <sup>13</sup> C et <sup>1</sup> H de la tonantzitlolone .....  | 140 |
| Tableau X : RMN <sup>13</sup> C et <sup>1</sup> H de la 4'-acétoxytonantzitlolone.....  | 148 |
| Tableau XI : Données RMN <sup>13</sup> C et <sup>1</sup> H de la 4'-hydroxytonantzitlolone.....   | 153 |
| Tableau XII : Données RMN <sup>13</sup> C et <sup>1</sup> H de l' <i>ent</i> -12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène.....   | 156 |
| Tableau XIII : Evaluation biologique des molécules isolées de <i>Stillingia lineata</i> sur le CHIKV.....   | 162 |
| Tableau XIV : Date de récolte et points GPS des dix-huit plantes collectées .....   | 177 |

# Lexique

## A

**Aménorrhée** : absence des règles ou menstruation.

**Andropause** : ensemble des symptômes physiologiques liés à la baisse de sécrétion de testostérone chez l'homme (syn. « déficit androgénique lié à l'âge », DALA).

**Anthelminthique** : qui éradique les parasites intestinaux ou vers, larves (syn. vermifuge).

**Antiappétant** : qui empêche, par inhibition des réflexes de mastication et de déglutition, la prise de nourriture, en particulier chez les insectes, et qui peut être employée pour lutter contre eux.

**Antidyslipidémique** : qui inhibe la dyslipidémie (maladie induisant un taux anormal de lipides sanguins).

**Antinociceptif** : qui inhibe la nociception (la sensibilité à la douleur).

## B

**Blennorragie** : infection microbienne due à un microbe, le gonocoque, maladie très contagieuse qui se transmet par les relations sexuelles (syn. chaude-pisse/gonorrhée).

## C

**Carpophore** : organe qui, sur le fruit mûr, représente le gynophore (support né du réceptacle de la fleur et qui ne contient que les organes femelles) dans l'ovaire.

**Céphalées** : maux de tête.

**Chancre** : ulcération, le plus souvent génitale, souvent provoquée par une maladie sexuellement transmissible.

**Cryptogène** : Plantes dont le caractère indigène ou introduit semble impossible à trancher

**Cystite** : inflammation de la vessie.

## D

**Dépuratif** : qui élimine les déchets, qui désintoxique l'organisme.

**Diurétique** : qui augmente la sécrétion urinaire.

**Dysenterie** : inflammation intestinale grave.

**Dysménorrhée** : règles difficiles et douloureuses.

## E

**Emergent (virus)** : apparition dans le monde ou dans une région donnée d'une maladie n'ayant jamais existé.

**Emétique** : qui provoque le vomissement.

**Expectorant** : qui facilite l'expression des crachats.

## F

**Fébrifuge** : qui fait baisser la fièvre.

## G

**Gastralgie** : douleur d'estomac.

**Goitre** : augmentation de volume, souvent visible, de la glande thyroïde.

## H

**Hépatotoxique** : toxique pour le foie.

## L

**Leucorrhée** : écoulement non sanglant provenant de l'appareil génital féminin (syn. pertes blanches).

**Limbe** : pièce foliaire désignant la partie de cet organe situé à la suite du pétiole.

## M

**Marrons (esclaves)** : esclaves en fuite.

**Myalgie** : douleurs musculaires.

## N

**Néphrite** : inflammation du rein.

**Néphroprotecteur** : protection du rein contre des mécanismes d'autodestruction.

## P

**Phytotoxique** : toxique pour les végétaux, en provoquant par exemple une nécrose des boutures.

**Purgative** : qui a la propriété de purger, de stimuler les évacuations intestinales.

## R

**Raffraichissant** : anti-inflammatoire, dépuratif.

**Réémergent (virus)** : réapparition après plusieurs années d'une maladie ayant existé auparavant.

## S

**Schistosomiase** : parasitose chronique provoquée par des vers.

**Siccative** : substance qui accélère la dessiccation des couleurs auxquelles on les mélange.

**Stipule** : pièces foliaires, au nombre de deux, en forme de feuilles réduites situées de part et d'autre du pétiole, à sa base, au point d'insertion sur la tige.

**Stomachique** : qui favorise la digestion.

## T

**Tisaneurs** : Tradipraticiens de La Réunion

## V

**Vectorielles (maladies)** : maladies causées par un agent parasite qui est inoculé ou déposé par un vecteur vivant. Ce vecteur est un organisme qui ne provoque pas lui-même la maladie mais qui est nécessaire à la dispersion de l'infection en transportant les agents pathogènes d'un hôte à l'autre.

**Vénériennes (maladies)** : maladies qui se transmet par voie sexuelle.



A close-up photograph of a plant stem. The stem is green and has a central inflorescence (annex) consisting of a vertical stalk with small, green, rounded buds. The leaves are long, narrow, and green with prominent reddish-brown veins. The background is blurred, showing more of the plant and some greyish ground.

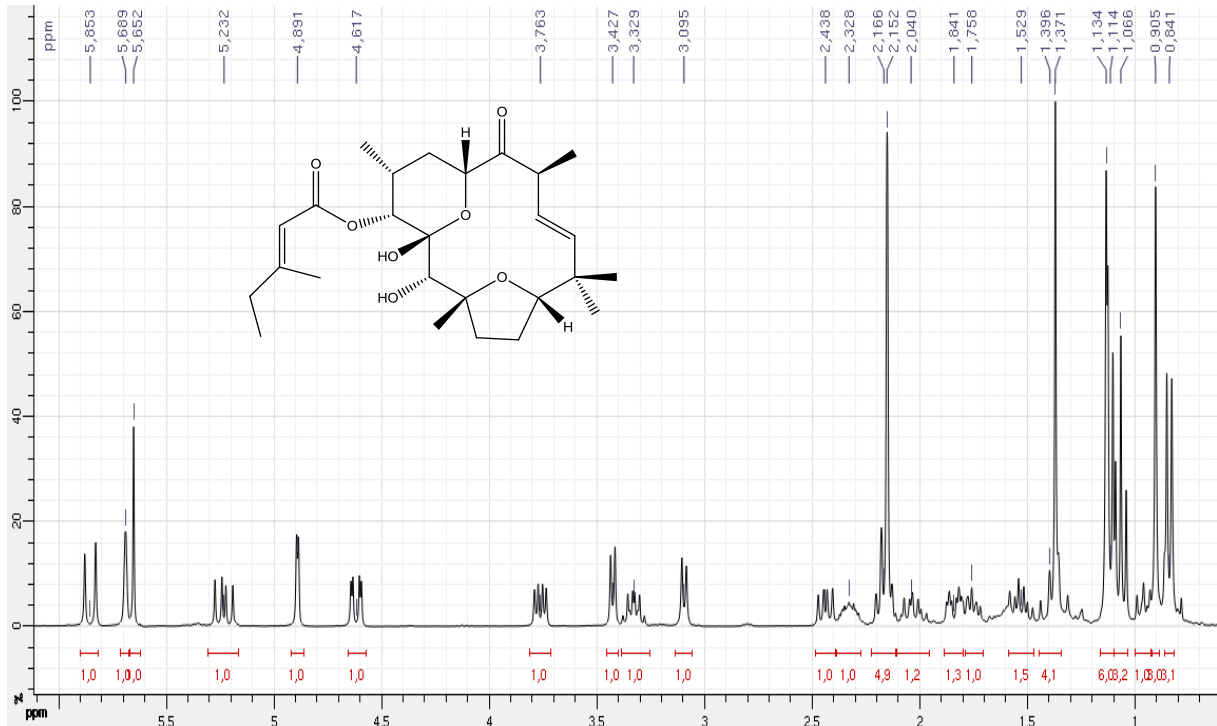
**Annexes**

*Stillingia lineata* (Lam.) Müll.Arg. ssp. *lineata*  
Euphorbiaceae

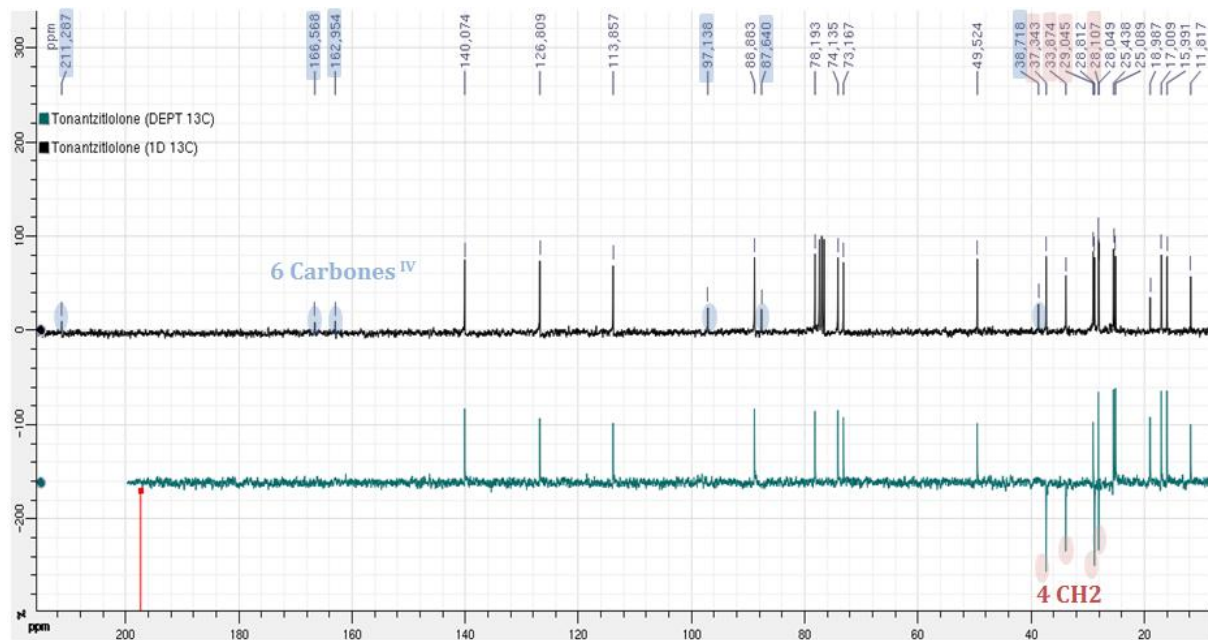
## ANNEXE 1 :

Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) de la tonantzitlolone (**24**)

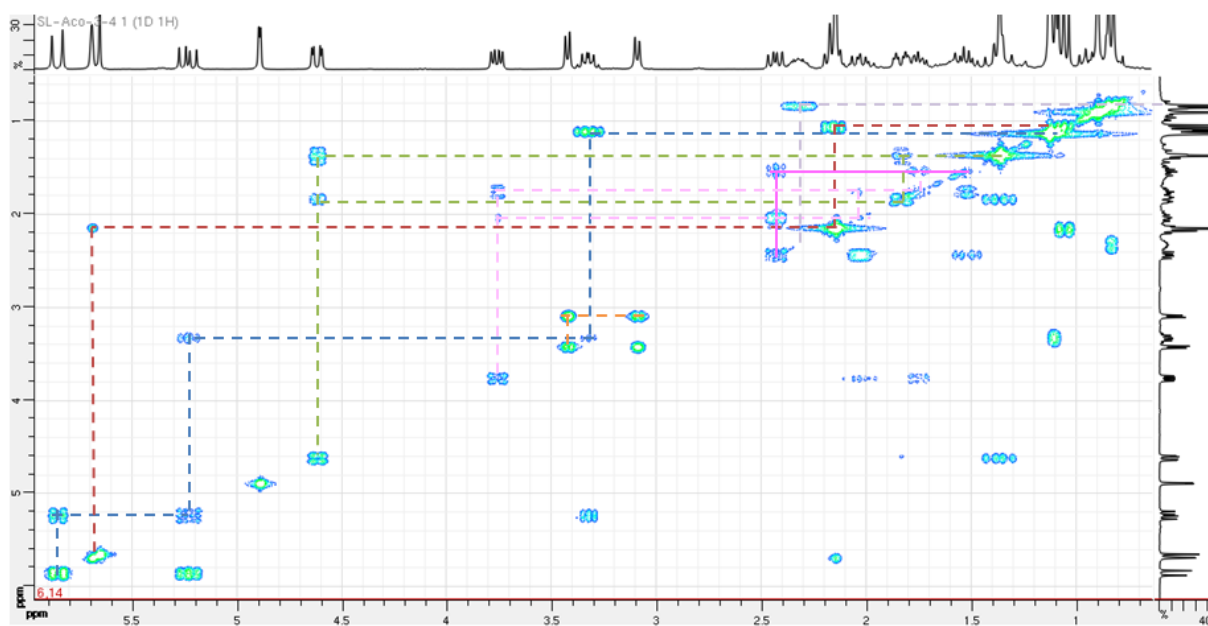
## Spectre $^1\text{H}$ de la tonantzitlolone (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



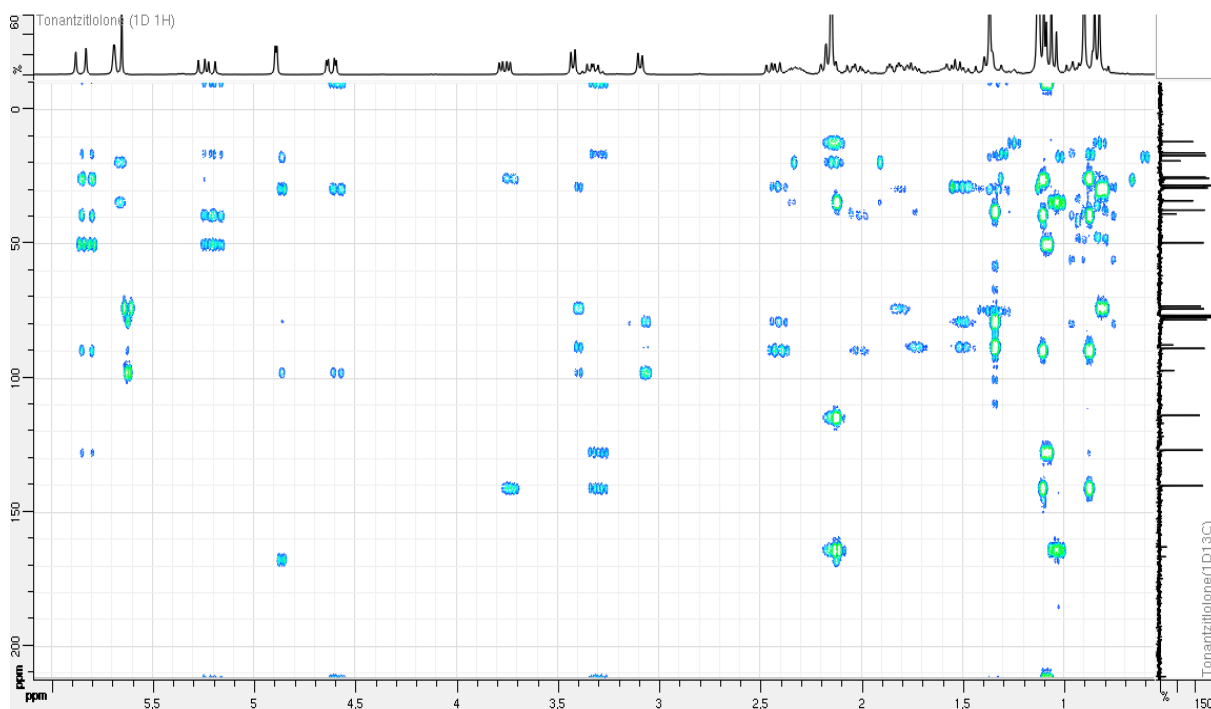
## Spectres $^{13}\text{C}$ et DEPT-135 de la tonantzitlolone (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



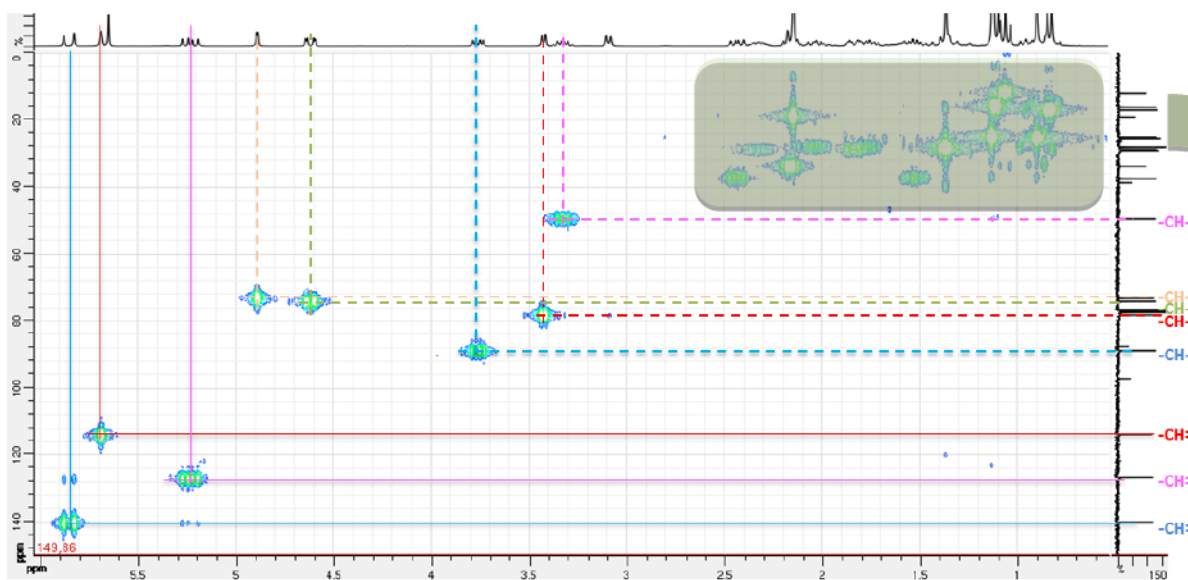
### Spectre COSY de la tonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



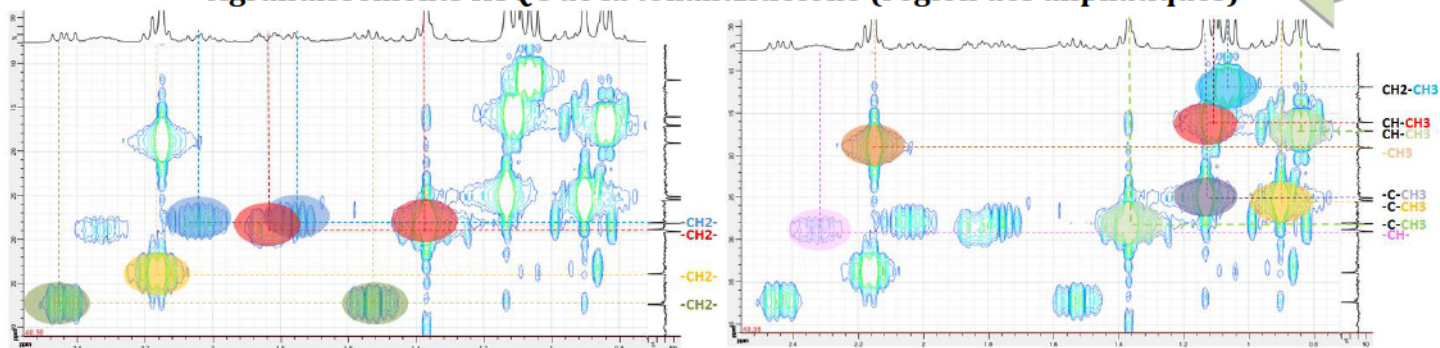
### Spectre HMBC de la tonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



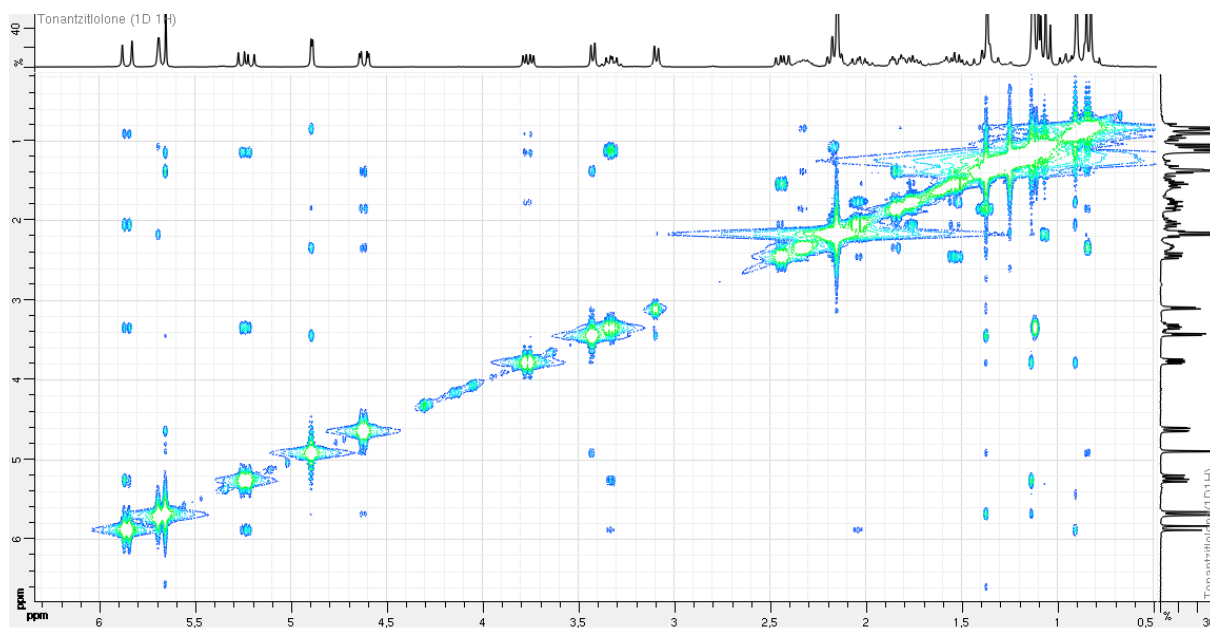
## Spectre HSQC de la tonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



## Agrandissements HSQC de la tonantzitlone (région des aliphatiques)

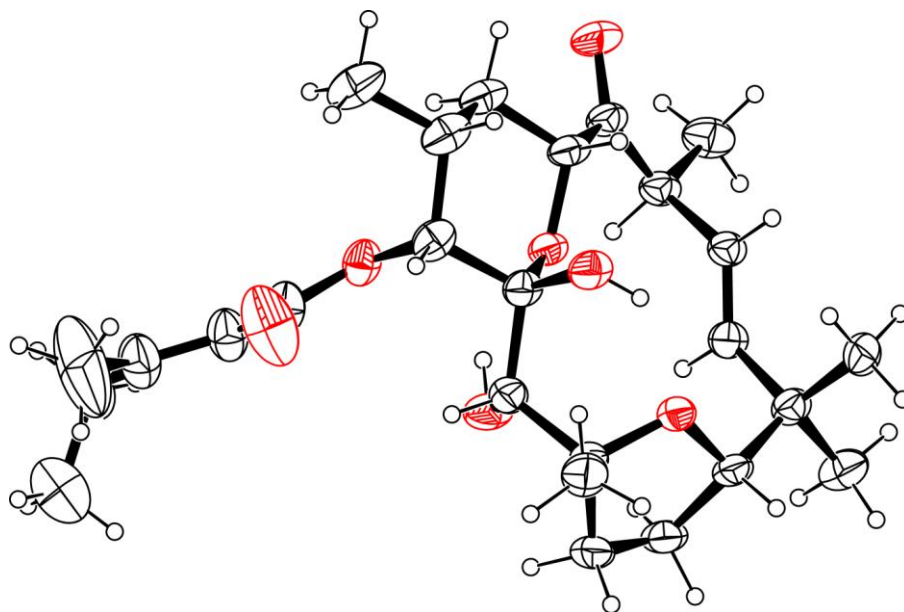


## Spectre NOESY de la tonantzitolone (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



## Tonantzitlone (24) (suite)

Représentation ORTEP :



Analyse aux rayons X :

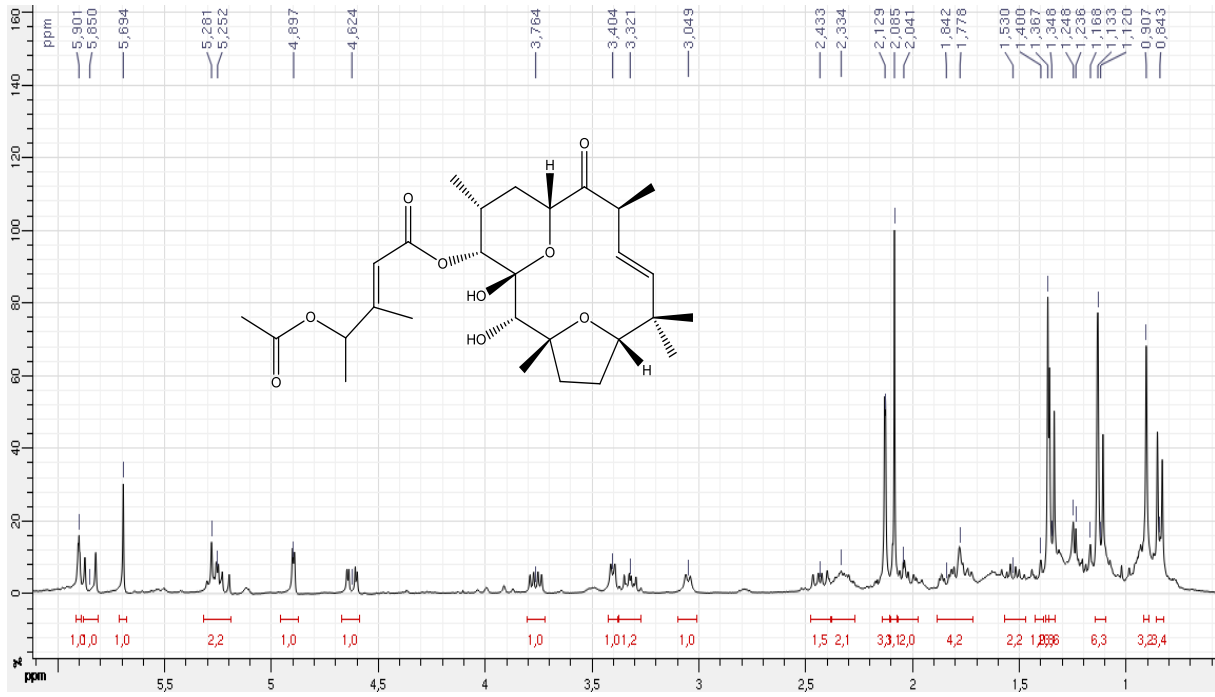
|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| Formule brute                        | C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub> |
| Masse Molaire (g.mol <sup>-1</sup> ) | 464,59   |
| Système cristallin                   | Orthorhombique                                 |
| Groupe spatial                       | P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> |
| a (Å)                                | 10,1348(2)                                     |
| b (Å)                                | 10,2248(2)                                     |
| c (Å)                                | 25,1440(18)                                    |
| α (°)                                | 90   |
| β (°)                                | 90   |
| β (°)                                | 90   |
| V (Å <sup>3</sup> )                  | 2605,58  |
| Z                                    | 4  |

## **ANNEXE 2**

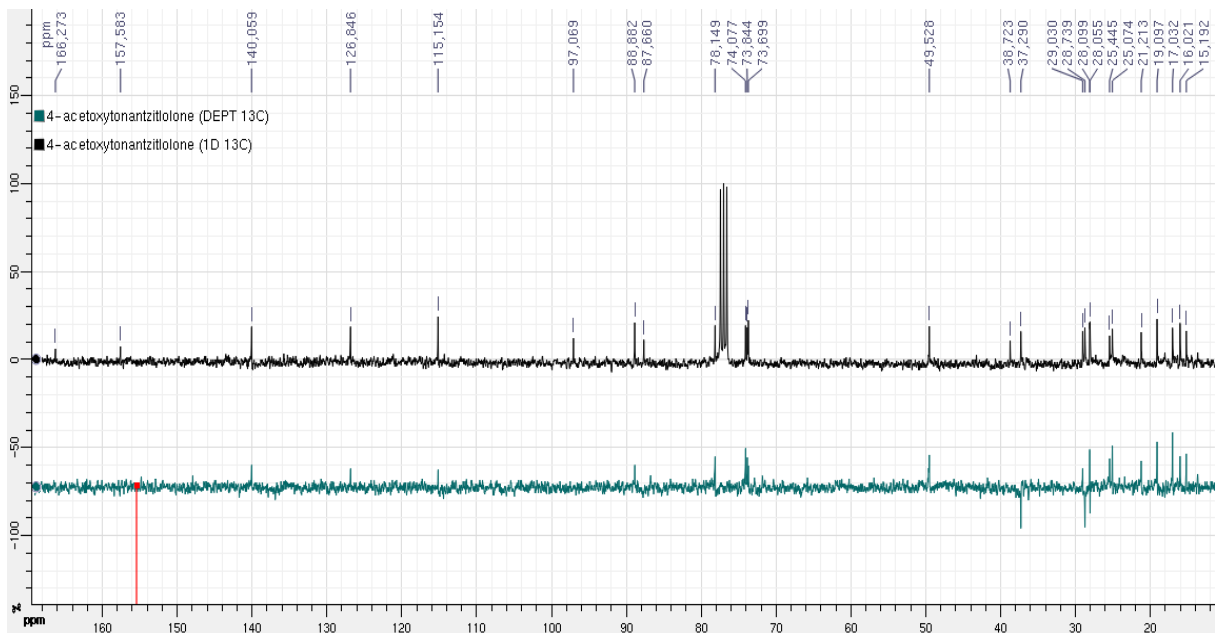
Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT-135) et 2D (COSY, HMQC et HMBC) de la 4'-acétoxytonantzitlolone



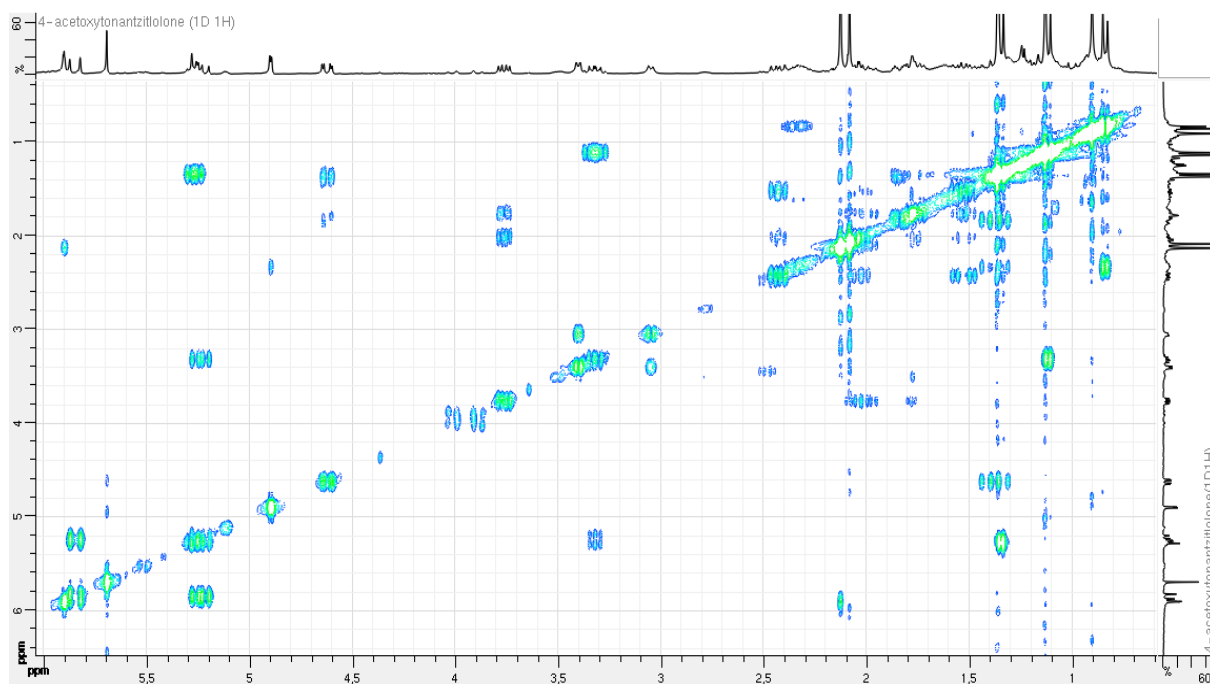
### Spectre <sup>1</sup>H de la 4'-acétoxytonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



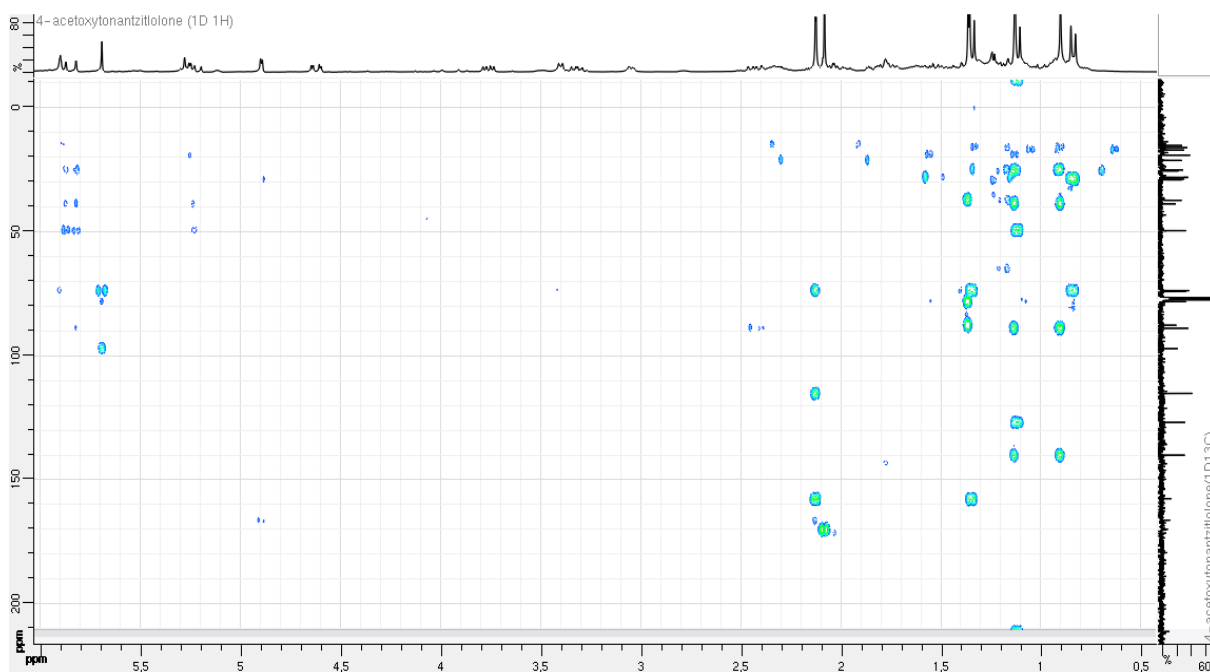
### Spectres <sup>13</sup>C et DEPT-135 de la 4'-acétoxytonantzitlone (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



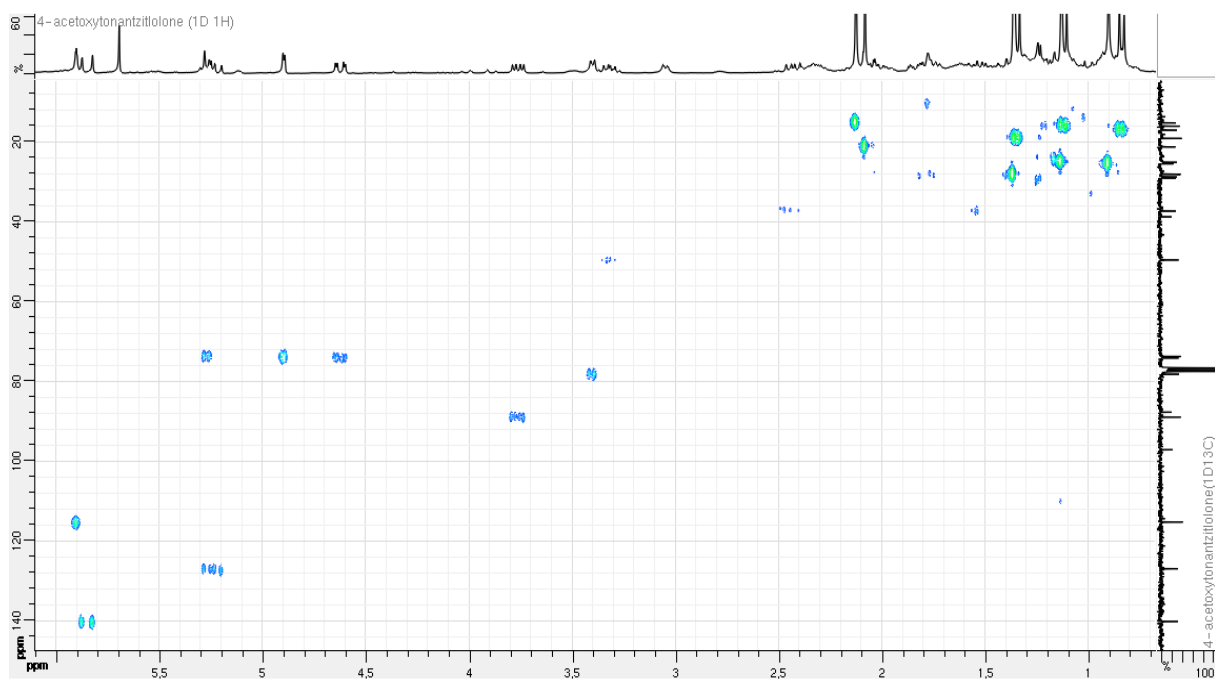
### Spectre COSY de la 4'-acétoxytonantzitolone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



### Spectre HMBC de la 4'-acétoxytonantzitolone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



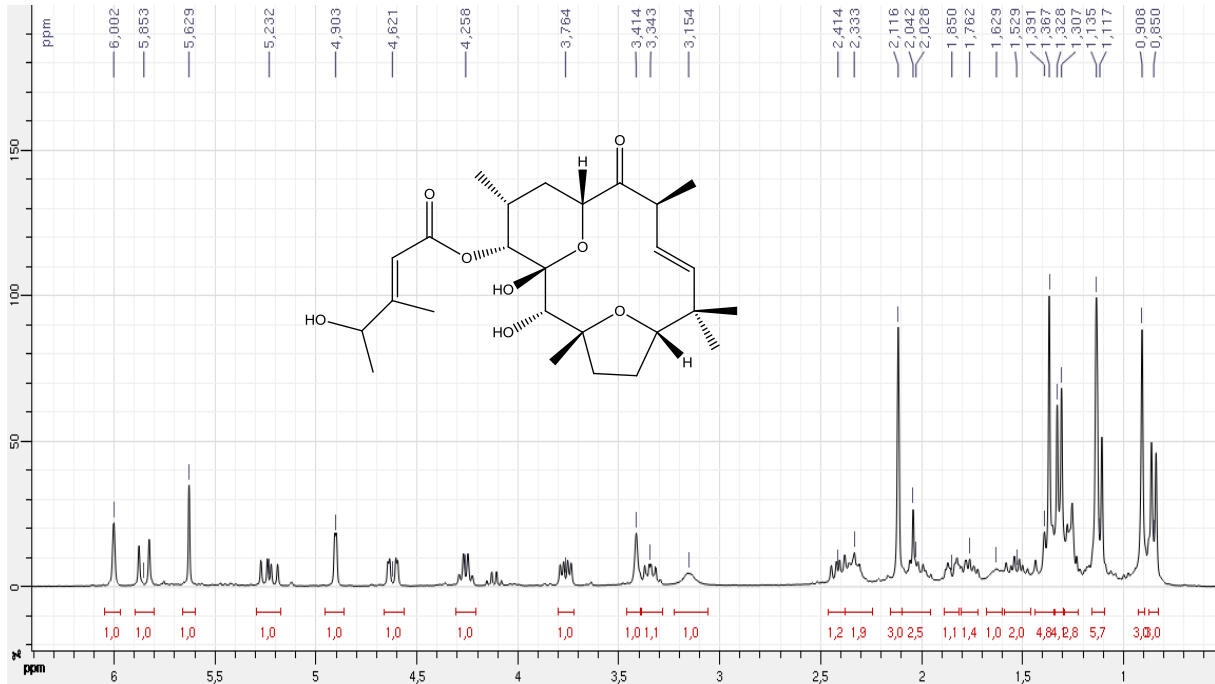
## Spectre HMQC de la 4'-acétoxytonantzilolone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



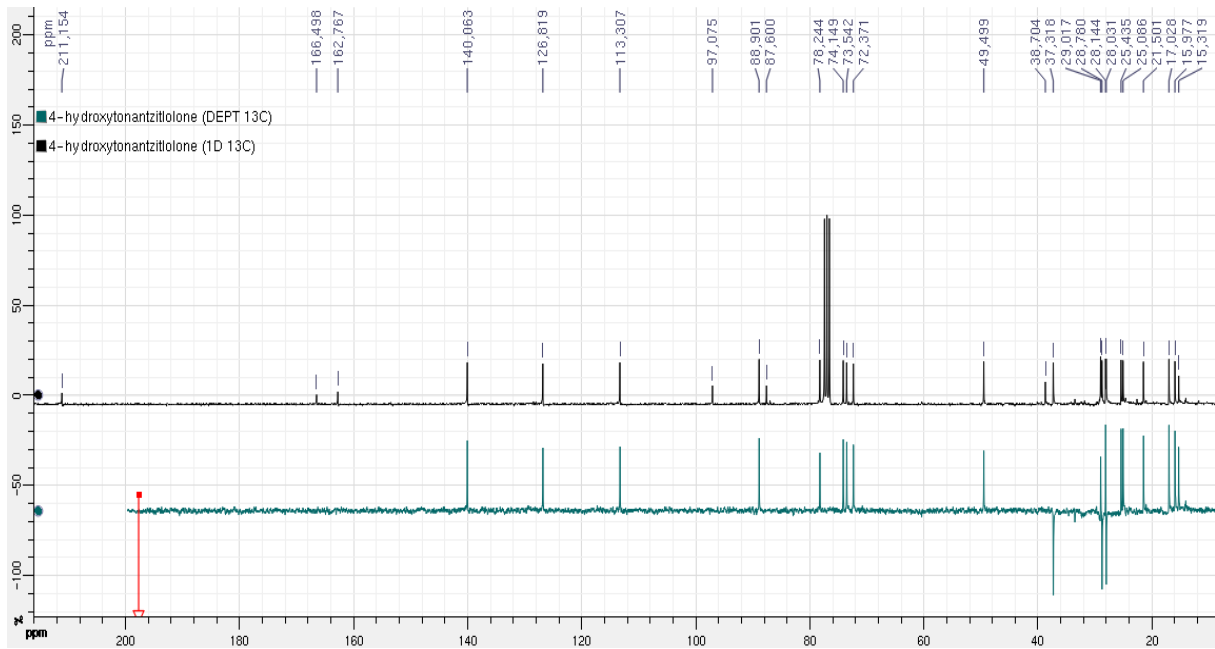
### **ANNEXE 3**

Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC et HMBC) de la 4'-hydroxytonantzitlone

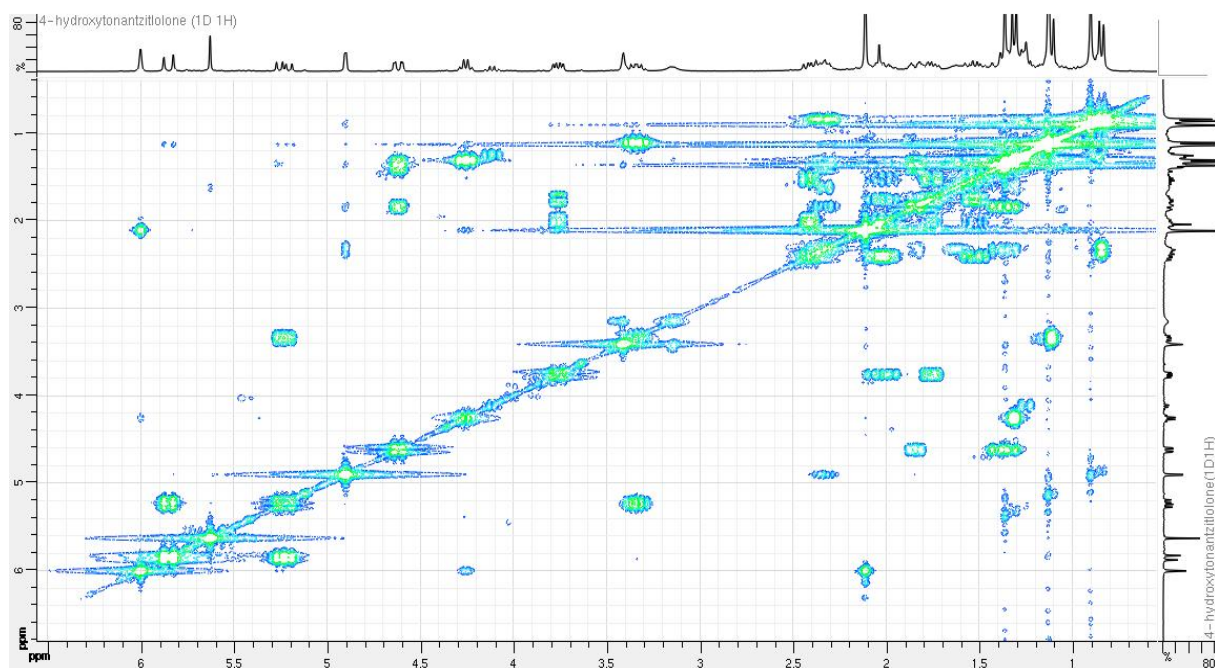
### Spectre $^1\text{H}$ de la 4'-hydroxytonantzitlone (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



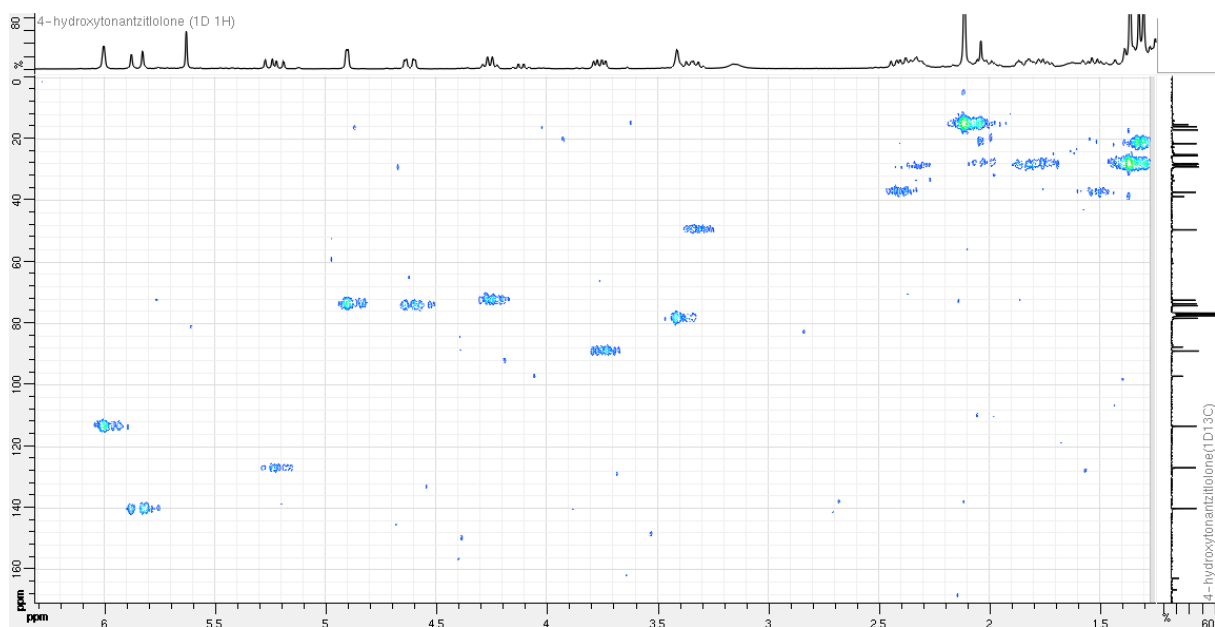
### Spectres $^{13}\text{C}$ et DEPT-135 de la 4'-hydroxytonantzitlone (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ )



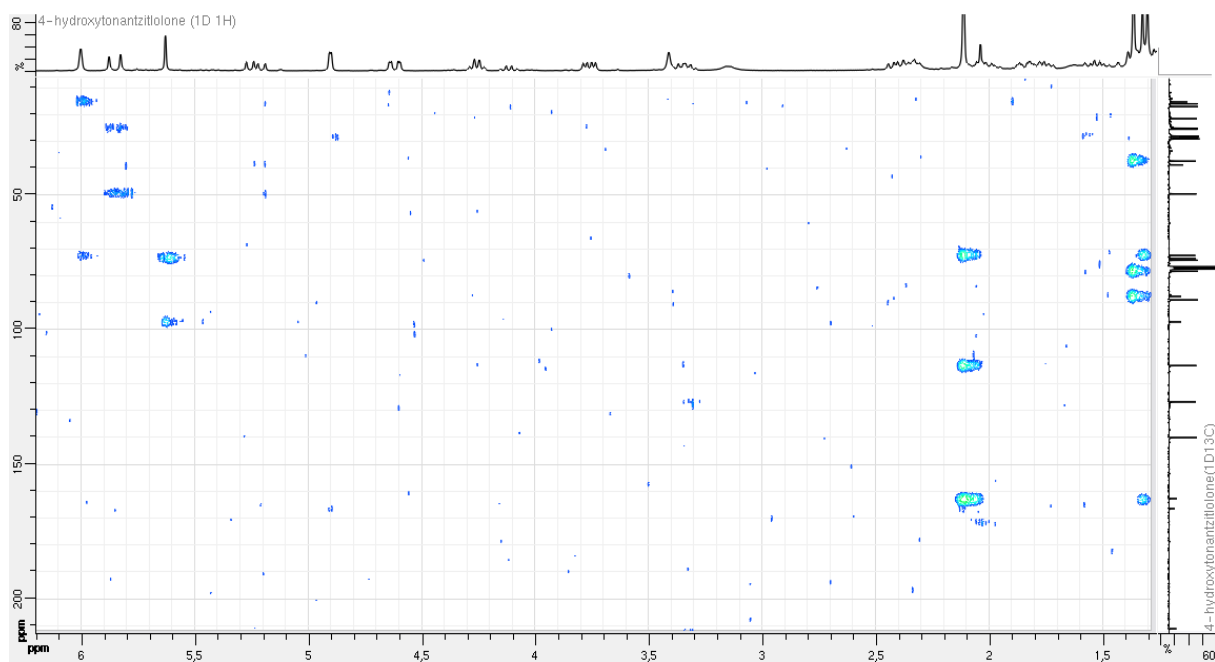
## Spectre COSY de la 4'-hydroxytonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



## Spectre HSQC de la 4'-hydroxytonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



## Spectre HMBC de la 4'-hydroxytonantzitlone (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

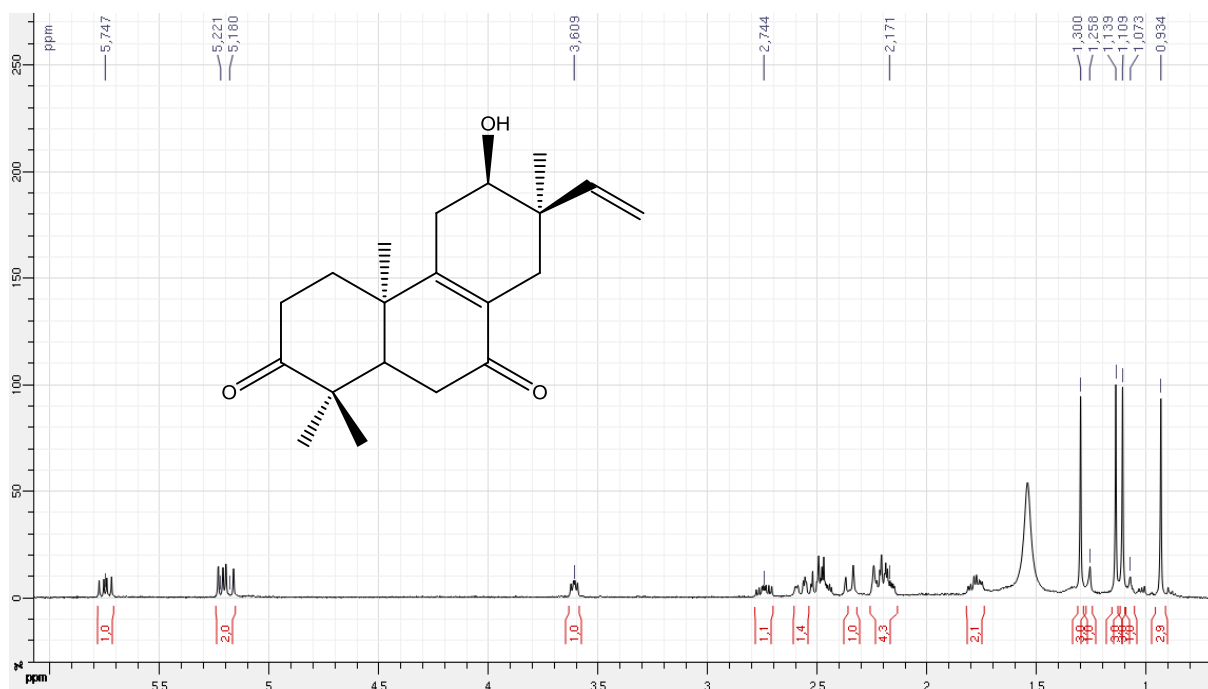


## ANNEXE 4

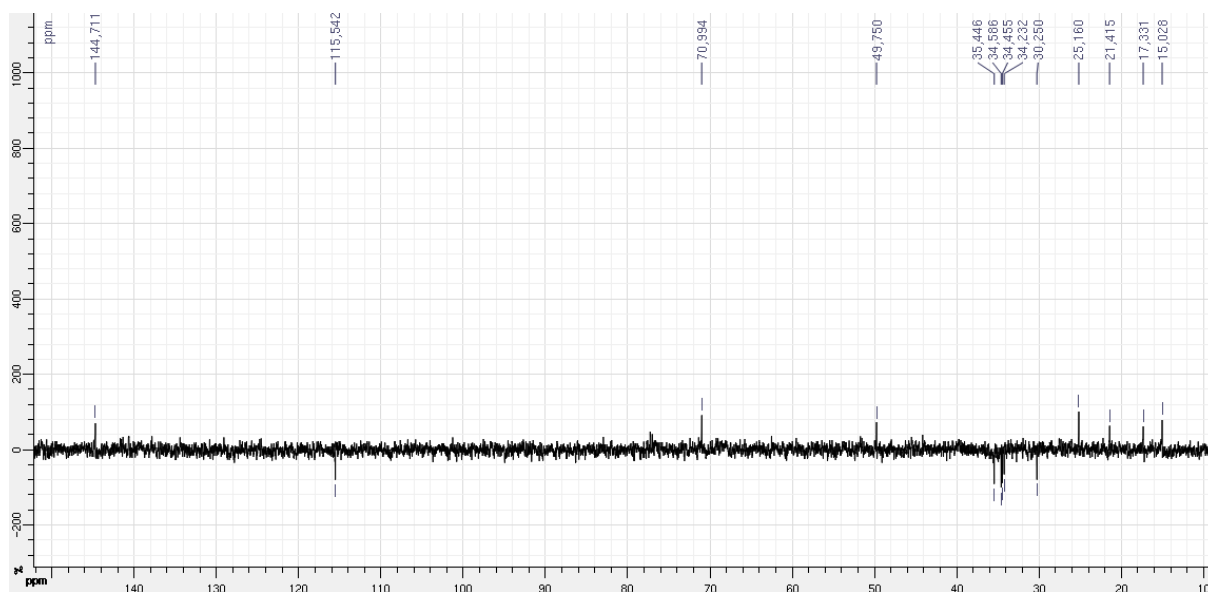
Spectres RMN 1D ( $^1\text{H}$  et DEPT-135) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY) de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène (**27**)



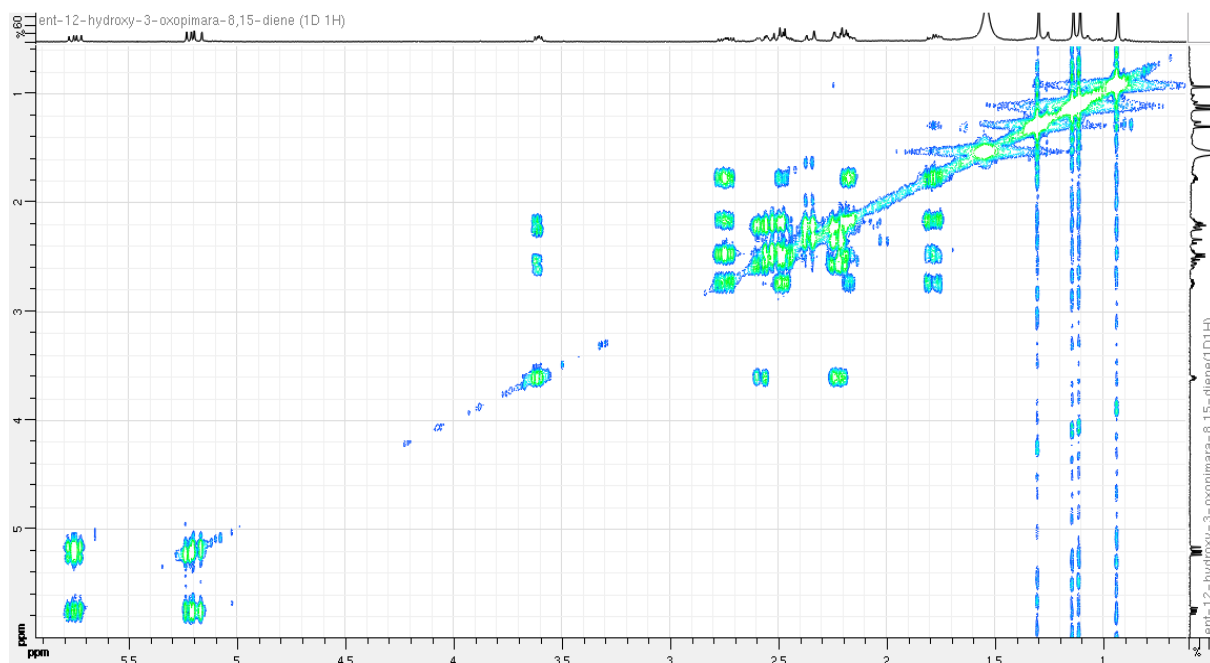
**Spectre  $^1\text{H}$  de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



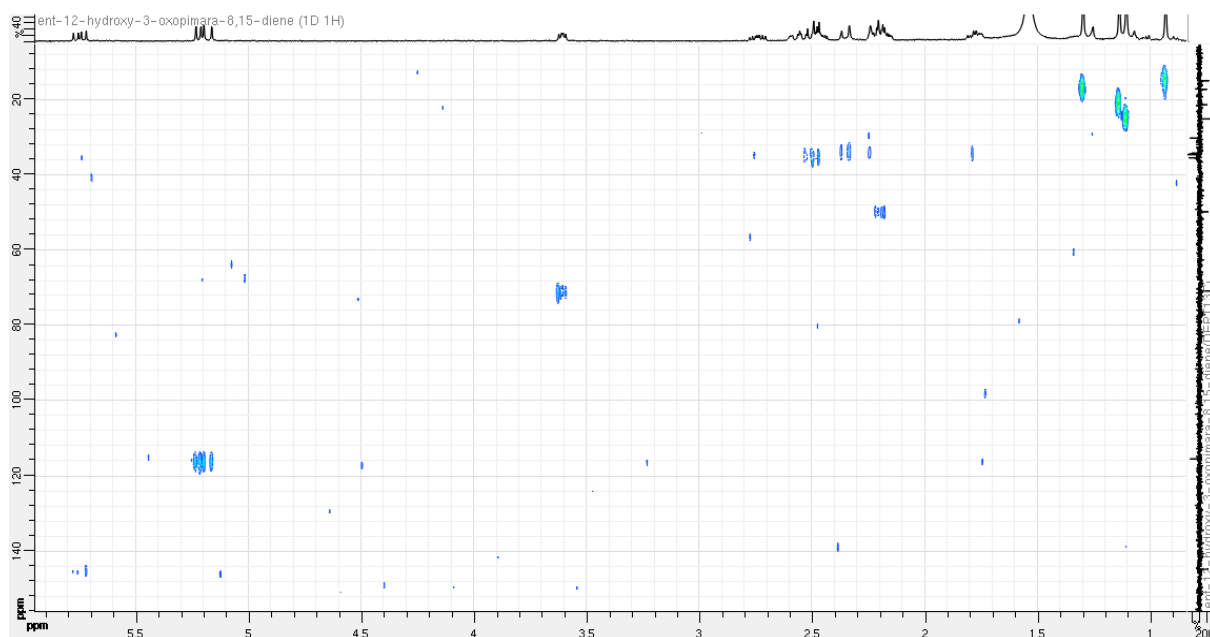
**Spectre DEPT-135 de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



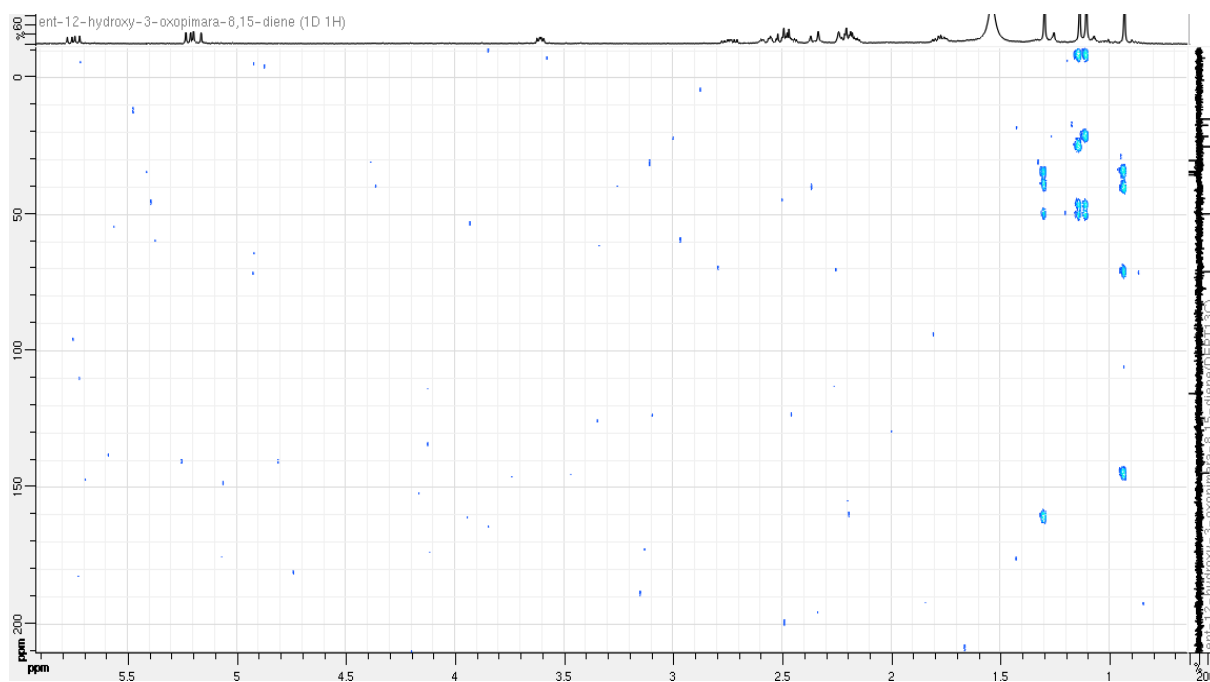
**Spectre COSY de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène**  
**(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**



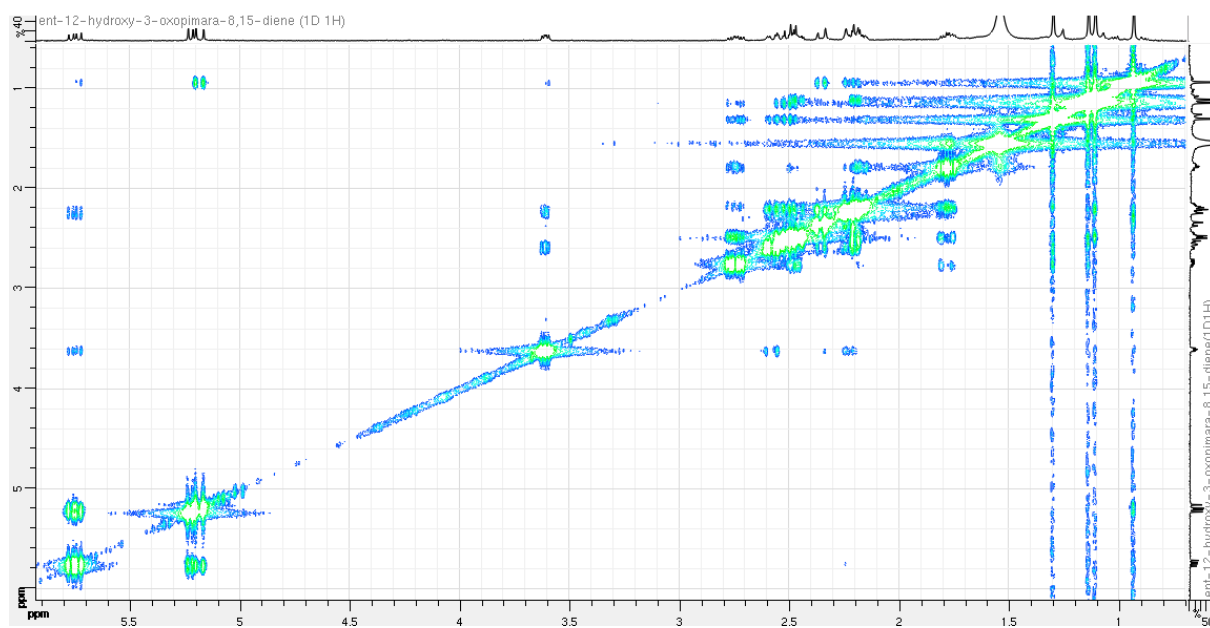
**Spectre HSQC de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène**  
**(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**



**Spectre HMBC de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène**  
**(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**



**Spectre NOESY de l'*ent*-12 $\alpha$ -hydroxy-3,7-dioxoisopimara-8,15-diène**  
**(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**





---

## Criblage d'activités biologiques de plantes endémiques ou indigènes de La Réunion - Recherche de molécules antivirales ciblant le virus du chikungunya

---

Ce travail de thèse s'attache à identifier des plantes et/ou molécules à activités cytotoxique, antioxydante, anti-inflammatoire et antivirale ciblant le virus du chikungunya (CHIKV) dans le but de trouver des alternatives thérapeutiques vis-à-vis du stress oxydatif et de l'inflammation, mécanismes impliqués dans les maladies chroniques non transmissibles (diabète, obésité...), et de la maladie du chikungunya, maladie vectorielle réémergente. La première partie de ces travaux présente les résultats obtenus lors d'un criblage d'activités biologiques réalisé sur une sélection de dix-huit plantes endémiques et indigènes de La Réunion. Les activités ciblées ont été les activités cytotoxiques sur une lignée cellulaire humaine (cellules THP-1), les activités antioxydantes évaluées par un test *in cellulo* d'hémolyse et par quatre tests chimiques (TEAC/DPPH/FRAP/ORAC) ainsi qu'une évaluation de la teneur en composés phénoliques (test FOLIN) et les activités anti-inflammatoires testées sur des macrophages murins (cellules RAW-Blue™). Les résultats obtenus ont permis de mettre, plus particulièrement, en évidence les activités de différents extraits : cytotoxique pour *Carissa spinarum*, antioxydantes pour *Agarista buxifolia* et *Dryopteris wallichiana* et anti-inflammatoire pour *Stillingia lineata* et *Indigofera amnoxylum*. La deuxième partie du travail est consacrée à l'étude phytochimique d'une espèce indigène de La Réunion, *Stillingia lineata*, choisie en raison des résultats obtenus lors de ce criblage biologique préliminaire et de ceux du programme Phytochik. Un fractionnement bioguidé par un test antiviral, réalisé sur des cellules Vero (cellules rénales de singe vert *Cercopithecus aethiops*) contaminées par le CHIKV, a conduit à l'isolement de trois macrocycles diterpéniques rares de type tonantzitlolone dont l'un présente une structure non caractérisée jusque-là, et d'un pimarane de structure nouvelle. La 4'-acétoxytonantzitlolone a été identifiée comme molécule candidate contre le CHIKV ( $CE_{50} = 7 \mu M$ ). Des relations structure-activité ont pu être définies ; la présence d'un groupement oxygéné sur la chaîne latérale des tonantzitlolones semble jouer un rôle important sur la réponse antivirale de ces squelettes diterpéniques.

**Mots-clés :** criblage, plantes endémiques/indigènes de La Réunion, cytotoxique, cellules THP-1, antioxydant, hémolyse, TEAC, DPPH, FRAP, ORAC, FOLIN, anti-inflammatoire, cellules RAW-Blue™, antiviral, cellules Vero, Chikungunya, *Stillingia lineata*, fractionnement bioguidé, macrocycle, tonantzitlolone, pimarane.

---

## Screening of biological activities of endemic or indigenous plants of La Réunion - Research of antiviral molecules targeting the chikungunya virus

---

The aims of this PhD work were to identify plants and/or molecules with cytotoxic, antioxidant, anti-inflammatory or antiviral (chikungunya virus, CHIKV) activities in order to find therapeutic alternatives towards oxidative stress and inflammation, mechanisms involved in chronic noncommunicable diseases (diabetes, obesity ...), and chikungunya disease, reemerging vector-borne disease. The first part of this work presents the results obtained from a biological screening carried out on a selection of eighteen endemic and indigenous plants of La Réunion. The targeted activities were cytotoxicity on a human cell line (THP-1), antioxidant activities evaluated using an *in cellulo* hemolysis assay and four chemical tests (TEAC / DPPH / FRAP / ORAC) together with an evaluation of the content of phenolic compounds (FOLIN test) and anti-inflammatory activity tested in murine macrophages (RAW cells-Blue™). The results allowed to highlight activities of different extracts in particular : cytotoxic for *Carissa spinarum*, antioxidant for *Dryopteris wallichiana* and *Agarista buxifolia* and anti-inflammatory for *Stillingia lineata* and *Indigofera amnoxylum*. The second part of this work is devoted to the phytochemical study of *Stillingia lineata*, an indigenous species of La Réunion chosen because of the results obtained in this preliminary biological screening and those carried out in Phytochik programme. Bioassay-guided fractionation performed on Vero cells (green monkey kidney cells *Cercopithecus aethiops*) infected with CHIKV led to the isolation of three rare macrocycle-type diterpenes called tonantzitlolone and a new pimarane. The 4'-acetoxytonantzitlolone was identified as a candidate molecule against CHIKV ( $EC_{50} = 7 \mu M$ ). Structure-activity relationships have been defined, the presence of an oxygenated group on the side chain of tonantzitlolones seems to play an important role in the antiviral response of the diterpene skeleton.

**Keywords :** screening, endemic / indigenous plants of La Réunion, cytotoxic, THP-1 cells, antioxidant, hemolysis, TEAC, DPPH, FRAP, ORAC, FOLIN, anti-inflammatory, RAW-Blue™ cells, antiviral, Vero cells, Chikungunya, *Stillingia lineata*, bioassay-guided fractionation, macrocycle, tonantzitlolone, pimarane.