



HAL
open science

Contribution à l'étude de l'origine naturelle du tramadol et étude phytochimique de deux plantes alpines

Mathieu Agostini

► **To cite this version:**

Mathieu Agostini. Contribution à l'étude de l'origine naturelle du tramadol et étude phytochimique de deux plantes alpines. Chimie organique. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV007 . tel-03122786

HAL Id: tel-03122786

<https://theses.hal.science/tel-03122786v1>

Submitted on 27 Jan 2021

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Phytochimie - Pharmacognosie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Mathieu AGOSTINI

Thèse dirigée par **Pr. Ahcène BOUMENDJEL**

Co-encadrée par **Dr. Benjamin BOUCHERLE**

préparée au sein du **Département de Pharmacochimie
Moléculaire**

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Contribution à l'étude de l'origine naturelle du tramadol et étude phytochimique de deux plantes alpines

Thèse soutenue publiquement le **7 septembre 2020**,
devant le jury composé de :

Madame Martine DEMEUNYNCK

Directrice de Recherche, Université Grenoble-Alpes, Présidente du jury

Madame Angèle Lengo MAMBU

Professeur des Universités, Université de Limoges, Rapporteur

Monsieur Nicolas FABRE

Professeur des Universités, Université de Toulouse, Rapporteur

Madame Isabelle HININGER-FAVIER

Maître de Conférences, Université Grenoble-Alpes, Examineur

Monsieur Emerson FERREIRA QUEIROZ

Maître de Conférences, Université de Genève, Examineur

Monsieur Ahcène BOUMENDJEL

PREX, Université Grenoble-Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Benjamin BOUCHERLE

Maître de Conférences, Université Grenoble-Alpes, Invité, Co-encadrant
de thèse



*Cette thèse est dédiée à ma famille,
à mon Papa, parti beaucoup trop tôt...*

Remerciements

Je tiens, tout d'abord, à exprimer ma gratitude au Pr. Ahcène Boumendjel de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette thèse pendant ces trois années. Son expertise et sa constante attention m'ont permis d'obtenir la meilleure aide possible. Sa gentillesse, sa patience, sa sympathie ainsi que sa bonne humeur ont su me rassurer lors des moments de doute et de difficulté pendant ce doctorat. Je ne pouvais pas rêver mieux pour un directeur de thèse. Nos cafés le matin me manqueront, chef !

Je souhaite également remercier mon co-encadrant de choc, le Dr. Benjamin Boucherle, pour son aide et son encadrement. Félicitations à toi pour m'avoir supporté pendant cette première année dans le même bureau ! Ton humour, ta gentillesse, nos discussions scientifiques (Dis-moi, Ben...) et sur la vie (et les pintes en afterwork) vont indéniablement me manquer. Je n'aurai pas pu réussir sans ton aide, Ben !

Je voudrais remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de lire mon manuscrit et de juger mes travaux : Dr. Martine Demeunynck et Dr. Isabelle Hininger de l'Université de Grenoble-Alpes, Pr. Angèle Lengo de l'Université de Limoges, Pr. Nicolas Fabre de l'Université de Toulouse et Dr. Emerson Ferreira Queiroz de l'Université de Genève.

Un grand merci à tout le Département de Pharmacochimie Moléculaire pour leur soutien. Je n'oublierai jamais le grand et fameux humour de Basile, la gentillesse de Marine, les longues discussions avec Romain ainsi que tout le reste du laboratoire. Une petite mention spéciale pour « le cœur du DPM » : la bonne humeur de Pascale et la douceur d'Angèle.

Je remercie bien évidemment tous mes amis du laboratoire pour leur soutien (mes acolytes Emile et Braylan, ma petite Farda, notre basque incontournable Jaione, mes italiennes préférées : Silvia et Lorena, Florian, Julie, Rayssa, Sara, Léandro, Kim-Anh, Anthonin, Cyril, Bastien, Pascal et sans oublier nos meilleurs stagiaires Alexandra, Justine et Younès. Un énorme merci à tous les doctorants et docteurs que j'ai pu rencontrer pendant cette thèse : Pierre, Vincent, Romy, Marie, Delphine et Diana ! Je vous souhaite à tous une bonne continuation.

Je souhaite remercier l'IDEX pour sa contribution au financement de mon séjour scientifique au laboratoire de Phytochimie et produits naturels bioactifs à l'Université de Genève dirigé par le Pr. Jean-Luc Wolfender.

Merci au Pr. Jean-Luc Wolfender de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour mener à bien mes travaux de purification d'extraits et d'isolement de molécules. Une sincère gratitude au Dr. Emerson Ferreira Queiroz pour son encadrement pendant mon séjour, au Dre. Laurence Marcourt pour son aide dans l'identification structurale des molécules, à Frédéric Borlat pour son assistance et Nathalie pour son aide administrative.

J'adresse également mes remerciements à tous mes nouveaux amis genevois pour leur soutien : Hugo, Robin, Alice, Luis, Arnaud, Leonardo, Léonie, Pierre-Marie, Adriano, Angelica, Ozlem, Noémie, Aymeric, Davide, Carlotta, Sara et Rebecca.

Merci au Dr. Jean-Jacques Filippi pour son encadrement pendant mes stages de Master 1 et 2, qui m'a permis de découvrir et d'apprécier la chimie des substances naturelles ; merci au Dr. Loic Tissandié pour son aide et son soutien. Je vous souhaite une bonne continuation !

Que seraient mes remerciements sans penser à tous mes amis compatriotes de Corse : Johanna, Camille, Julie et Anaïs qui me suivent et me soutiennent maintenant depuis 10 ans ; ma seconde petite famille : Stefano, Maria, Marie, Alicia, Julie, Andrea et notre nouveau membre Marc'Andria ! On n'oubliera jamais toutes nos aventures et ce beau confinement de l'enfer dans la House. A Roberto, mon meilleur ami d'enfance ; à Adrien, mon ami et grand rival de la Licence 1 à Corte jusqu'au Master 2 à Nice ainsi que sa copine Emilie ; à Ange-François, mon grand ami de Corte ; à Gabriel, mon ami et confident ; à Alexis, mon ami compatriote et une pensée à mes amis Lucia, Maria et Christophe.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille pour leur soutien, ma Maman qui a toujours été à mes côtés et qui a toujours fait passer les besoins de ses enfants avant les siens, ma sœur Stella ma fière complice, ma grand-mère Marie-Madeleine et mon grand-père Antoine, mon frère Fabien et ma belle-sœur Line, mes nièces Ava et Blanche, mes oncles et tantes, mes cousines Marie, Andrea et Lara, mon cousin Ludovic et le reste de ma famille.

Enfin, je voudrais remercier infiniment l'homme, sans qui je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui, mon héros, mon Papa. Ses sacrifices, son soutien et sa force m'ont permis d'être la personne que je suis aujourd'hui. Je continuerai de tracer mon chemin pour devenir le même homme que l'exemple qu'il m'a laissé. Je suis fier d'être ton fils. Tu me manques. Je t'aime.

Table des matières

Remerciements.....	2
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures	12
Liste des tableaux	15
Liste des schémas	16
Liste des Annexes	17
Liste des molécules citées.....	22
CHAPITRE 1 : Introduction Générale	41
CHAPITRE 2 : Classes de molécules naturelles.....	51
2.1. Les métabolites primaires.....	52
2.2. Les métabolites secondaires	52
2.2.1. Les terpènes et dérivés.....	53
2.2.2. Les polyphénols	54
2.2.3. Les alcaloïdes	55
CHAPITRE 3 : La médecine traditionnelle dans le monde	57
3.1. Médecine traditionnelle africaine.....	58
3.2. Médecine traditionnelle en Amérique.....	59
3.3. Médecine Ayurvédique	59
3.4. Médecine traditionnelle chinoise	60
CHAPITRE 4 : Présentation des projets de thèse.....	61
CHAPITRE 5 : Travaux personnels.....	65
5. 1. Isolement du Tramadol des racines de <i>Nauclea latifolia</i>	66
5.1.1. Le genre <i>Nauclea</i> en Afrique sub-saharienne.....	66
5.1.2. Découverte du tramadol dans les racines de <i>Nauclea latifolia</i>	74
5.1.3. Etude de nouveaux lots de racines de <i>Nauclea latifolia</i>	82
5.1.3.1. Etude du lot 8-NL.....	84

5.1.3.2.	Etude du lot 10-NL.....	86
5.1.3.3.	Etude des lots 5-NL et 12-NL.....	88
5.1.3.4.	Etude du lot 11-NL.....	90
5.1.4.	Datation par le carbone 14.....	91
5.1.5.	Analyses isotopiques ¹⁴ C comparatives des tramadol isolé et synthétique	92
5.1.6.	Conclusion.....	95
5.2.	Etude phytochimique des plantes alpines	97
5.2.1.	Etude phytochimique d' <i>Helianthemum nummularium</i>	101
5.2.1.1.	Résultats et Discussion.....	103
	A. Mesure de la teneur en protéines et en glucides	103
	B. Etudes phytochimiques	104
	C. Vers un potentiel cas de zoopharmacognosie	106
5.2.1.2.	Valorisation biologique des extraits et molécules isolées de HN	108
5.1.2.3.	Conclusion.....	112
5.2.2.	Etude phytochimique de <i>Chenopodium bonus-henricus</i>	113
5.2.2.1.	Résultats et Discussion.....	115
	A. Extrait Dichlorométhane : purification et analyse structurale	115
	B. Extrait éthanolique : purification et analyse structurale.....	118
5.2.2.2.	Evaluation des extraits de <i>C. bonus-henricus</i> sur Nrf2	123
5.2.2.3.	Conclusion.....	124
5.2.3.	Modifications chimiques de Produits Naturels	125
Introduction of dimethylaminomethyl on flavonoids: a simple transformation for diversity and potential better bioavailability and pharmacodynamic		
	Abstract.....	127
	Introduction.....	127
	Results and Discussion	129
	Experimental section.....	130
	General protocol of synthesis	130

Structural determination	131
CHAPITRE 6 : Conclusions générales et Perspectives	136
6.1. <i>Nauclea latifolia</i>	137
6.2. Les plantes alpines	139
6.2.1. <i>Helianthemum nummularium</i>	139
6.2.2. <i>Chenopodium bonus-henricus</i>	141
Valorisation des travaux de thèse	144
Présentation de posters.....	145
Publications	146
Partie expérimentale	160
1. General protocol	161
1.1. NMR analysis.....	161
1.2. UHPLC-HRMS analysis	161
1.3. HPLC-PDA-ELSD.....	161
1.3.1. Method A: Sample 8-NL from the roots of <i>Nauclea latifolia</i>	162
1.3.2. Method B: Ethanolic extract of <i>Helianthemum nummularium</i>	162
1.3.3. Method C: Ethanolic extract of <i>Chenopodium bonus-henricus</i>	162
1.4. General protocol of purification of alpine plants.....	162
1.4.1. Method D: Ethanolic extract of <i>H. nummularium</i>	162
1.4.2. Method E: Ethanolic extract of <i>C. bonus-henricus</i>	163
1.5. Solutions of compounds used for Nrf2 activation.....	163
1.5.1. Cell culture	163
1.5.2. Nrf2 Reporter Gene Assays.....	163
1.5.3. Cells viability.....	164
1.5.4. Statistical analysis.....	164
2. <i>Nauclea latifolia</i>	165
2.1. Sample 8-NL: Extraction and fractionation	165

2.2.	Samples 5-NL, 10-NL, 11-NL and 12-NL	165
2.2.1.	General protocol of extraction	165
2.2.2.	General protocol of HPLC-PDA.....	165
2.3.	General protocol of fractionation of the samples 5-NL, 10-NL, 11-NL and 12-NL.	166
2.4.	Purification of a fraction 10-NL by UHPLC	166
3.	<i>Helianthemum nummularium</i>	167
3.1.	Extraction.....	167
3.2.	Structural determination	167
4.	<i>Chenopodium bonus-henricus</i>	172
4.1.	Plant material	172
4.2.	Dichloromethane extract	172
4.2.1.	Extraction and fractionation.....	172
4.2.2.	Structural determination	172
4.3.	Ethanollic extract	173
4.3.1.	Extraction.....	173
4.3.2.	Structural determination	173
	Références Bibliographiques.....	178
	ANNEXES.....	198
1.	<i>Nauclea latifolia</i>	199
2.	<i>Helianthemum nummularium</i>	207
3.	<i>Chenopodium bonus-henricus</i>	225
4.	Modifications chimiques de polyphénols	242
	Résumé de la thèse (Français).....	250
	Résumé de la thèse (Anglais).....	251

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

ADN : Acide désoxiribonucléique

AH : Aire d'intensité

ARE : Eléments de réponse antioxydants

ATP : Adénosine triphosphate

CCK8 : *Cell Counting Kit-8*

CF : Chromatographie Flash

CNRS : Centre national de la recherche scientifique

COSY : *Correlation Spectroscopy*

Cyclo : Cyclohexane

DCM : Dichlorométhane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

ELSD/DEDL : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière

ESI : *Electrospray Ionization*

EtOH : Ethanol

FDA : *Food and Drug Administration*

GPS : *Global Positioning System*

h : Heures

HepG2 : Lignée cellulaire cancéreuse de foie humain

HMBC : *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*

HN : *Helianthemum nummularium*

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution

HSQC : *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

Hz : Hertz

Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*

kV : Kilovolts

LC : Chromatographie liquide

LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine

m/z : Masse/Charge

MHz : Mégahertz

min : Minutes

mL : Millilitres

mm : Millimètres

mM : Millimolaire

MTC : Médecine Traditionnelle Chinoise

nm : Nanomètres

NOESY : *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

Nrf2 : *Nuclear Factor Erythroid-2-related Factor 2*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORAC : Capacité d'absorbance des radicaux oxygénés

ppm : Partie par million

prep-CCM : Chromatographie sur couche mince préparative

RLU : Unités de lumière relative

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Espèce réactive à l'oxygène

SEM : Erreur type

SM : Spectrométrie de masse

T : Température

TMD : Tramadol

UHPLC : Chromatographie liquide à ultra haute performance

UV : Ultraviolet

V : Volume

VLC : Chromatographie liquide sous-vide

µg : microgrammes

µL : microlitres

µm : micromètres

Liste des figures

Figure 1. Exemples de deux médicaments d'origine végétale.

Figure 2. Structures de la vinblastine, du taxol, et de l'artémisinine.

Figure 3. Structures de la pénicilline G et de la ciclosporine.

Figure 4. Quelques exemples de molécules isolées à partir d'organismes marins.

Figure 5. Exemples de molécules isolées à partir d'endophytes.

Figure 6. Statistiques sur les médicaments approuvés par la FDA (entre 1981 et 2014).

Figure 7. Fractionnement bio-guidé d'un extrait issu de ressources naturelles.

Figure 8. Développement d'un médicament à partir d'un principe actif naturel.

Figure 9. Quelques exemples de structures de terpènes et terpénoïdes.

Figure 10. Exemples de polyphénols.

Figure 11. Exemples de flavonoïdes.

Figure 12. Exemples d'alcaloïdes.

Figure 13. Répartition géographique des espèces de *Nauclea* en Afrique.

Figure 14. Exemples de terpènes isolés à partir du genre *Nauclea*.

Figure 15. Structures des polyphénols isolés dans le genre *Nauclea*.

Figure 16. Structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Nauclea*. Adapté à partir de Boucherle et al.

Figure 17. *Nauclea latifolia* : 1) Arbre, 2) Parties aériennes et fruits, 3) Racines.

Figure 18. Structure du tramadol et exemples de spécialités contenant du tramadol.

Figure 19. Conception et synthèse du tramadol.

Figure 20. Carte des zones de collecte des nouveaux lots de *Nauclea latifolia*.

Figure 21. Détection du tramadol dans lots NL. Les lots présentant les plus grandes quantités sont les lots 5-NL, 8-NL, 10-NL, 11-NL et 12-NL. HNC Herbier correspond au lot de racines des premières investigations portées sur l'isolement du tramadol.

Figure 22. Zoom du diagramme. Détection du tramadol dans les extraits de *Nauclea latifolia*. HNC Herbière correspond au lot de racines des premières investigations portées sur l'isolement du tramadol (Référence Voucher : 20144/SRF/Cam).

Figure 23. Schéma de purification de l'extrait issu du lot 8-NL.

Figure 24. Spectre RMN ^1H de la fraction F_{Tra} avant traitement acido-basique.

Figure 25. Spectre RMN ^1H de la fraction F_{Tra} après traitement acido-basique.

Figure 26. Chromatogrammes UV (1), ELSD (2) et MS (3) de l'extrait alcaloïdique 10-NL.

Figure 27. Spectre RMN ^1H du tramadol isolé de l'extrait 10-NL.

Figure 28. Chromatogrammes UV (1), ELSD (2) et MS (3) de l'extrait alcaloïdique 5-NL.

Figure 29. Chromatogrammes UV (1), ELSD (2) et MS (3) de l'extrait alcaloïdique 12-NL.

Figure 30. Chromatogrammes UV (1), ELSD (2) et MS (3) de l'extrait alcaloïdique 11-NL.

Figure 31. Etagement de végétation dans les Alpes.

Figure 32. Structures de la porphine, noyau de la structure des chlorophylles et de la β -carotène.

Figure 33. Structure de quelques molécules non phénoliques apportant une protection à la plante contre le stress oxydant.

Figure 34. *Helianthemum nummularium* (Parties aériennes) et *Rupicapra rupicapra* (chamois).

Figure 35. Interactions entre *Helianthemum nummularium* avec les ongulés dans un environnement climatique contraignant.

Figure 36. Schéma d'extraction des parties aériennes d'*Helianthemum nummularium*.

Figure 37. Chromatogramme UHPLC-ELSD de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium* avant VLC (1), fraction aqueuse (2) et fraction méthanolique (3) après VLC.

Figure 38. Chromatogramme HPLC-ELSD de la fraction méthanolique.

Figure 39. Structures des polyphénols isolés à partir de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium*.

Figure 40. Etude d'activation de Nrf2 par différentes concentrations de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium*. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M. RLU représente les Unités Relatives de Luminescence.

Figure 41. Activation de la voie Nrf2 par les composés 1, 4, 5, 7 et 8 aux concentrations 5 et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le test a été conduit dans les mêmes conditions que l'évaluation biologique de l'extrait. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M.

Figure 42. Voie d'activation de Nrf2 (concentrations de 0 à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium* et de la quercétine. Les données sont exprimées en moyenne \pm S.E.M.

Figure 43. Prolifération des cellules mesurée par le test CCK8. Les cellules ont été traitées toute la nuit avec 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de composé comparé au blanc de contrôle (DMSO).

Figure 44. Parties aériennes de *Chenopodium bonus-henricus*.

Figure 45. Spectre RMN ^1H de l'extrait DCM de *Chenopodium bonus-henricus*. Identification d'un dérivé de la chlorophylle. R représente une longue chaîne aliphatique non déterminée.

Figure 46. Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de *Chenopodium bonus-henricus*.

Figure 47. Identification de *para*-coumarate de n-docosanol dans le spectre RMN ^1H de la sous-fraction F_{4d}-F_{3c}.

Figure 48. Structures des molécules identifiées à partir de l'extrait DCM.

Figure 49. Chromatogramme UHPLC-ELSD de l'extrait éthanolique *Chenopodium bonus-henricus* (1) avant VLC, (2) fraction aqueuse et (3) fraction méthanolique après VLC.

Figure 50. Chromatogramme HPLC-ELSD de la fraction méthanolique.

Figure 51. Structures des molécules isolées de *C. bonus-henricus* par HPLC semi-préparative et caractérisées par SM, RMN 1D et 2D.

Figure 52. Evaluation biologique des extraits de *C. bonus-henricus* sur Nrf2.

Liste des tableaux

Tableau 1. Utilisations médicinales des espèces Africaines du genre *Nauclea*.

Tableau 2. Pourcentages de radiocarbone des échantillons de tramadol isolés des lots 8-NL et 10-NL.

Tableau 3. Pourcentage du poids sec des protéines solubles, des glucides totaux et de la somme glucose + fructose dans les feuilles de cinq population (n = 3) d'*Helianthemum nummularium*.

Tableau 4. Conditions of synthesis.

Liste des schémas

Schéma 1. Schéma de biosynthèse supposée du tramadol.

Schéma 2. Schéma de synthèse biomimétique du tramadol.

Schéma 3. The procedure of flavones transformation.

Liste des Annexes

- Figure S1.** Spectres RMN ^1H des fractions issues de la purification de l'extrait 5-NL.
- Figure S2.** Spectres RMN ^1H des fractions issues de la 1^{ère} purification de l'extrait 10-NL.
- Figure S3.** Spectres RMN ^1H des fractions issues de la 2^{ème} purification de l'extrait 10-NL.
- Figure S4.** Spectres RMN ^1H des fractions issues de la 3^{ème} purification de l'extrait 10-NL.
- Figure S5.** Spectres RMN ^1H des fractions issues de la purification de l'extrait 11-NL.
- Figure S6.** Spectres RMN ^1H des fractions issues de la purification de l'extrait 12-NL.
- Figure S7.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 1-NL.
- Figure S8.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 2-NL.
- Figure S9.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 3-NL.
- Figure S10.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 4-NL.
- Figure S11.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 5-NL.
- Figure S12.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 6-NL.
- Figure S13.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 7-NL.
- Figure S14.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 8-NL.
- Figure S15.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 9-NL.
- Figure S16.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 10-NL.
- Figure S17.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 11-NL.
- Figure S18.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 12-NL.
- Figure S19.** Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique HNC-Herbier.
- Figure S20.** Spectre HRMS-Orbitrap (MH⁻) du tramadol.
- Figure S21.** Spectre RMN ^1H de l'acide *p*-hydroxybenzoïque.
- Figure S22.** Spectre HRMS-Orbitrap (MH⁻) de l'acide *p*-hydroxybenzoïque.
- Figure S23.** Spectre RMN ^1H du Tiliroside.

Figure S24. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY du Tiliroside.

Figure S25. Spectre RMN ^{13}C du Tiliroside.

Figure S26. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC du Tiliroside.

Figure S27. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du Tiliroside.

Figure S28. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) du Tiliroside.

Figure S29. Spectre RMN ^1H du Kaempférol.

Figure S30. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) du Kaempférol.

Figure S31. Spectre RMN ^1H de l'Astragaline.

Figure S32. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de l'Astragaline.

Figure S33. Spectre RMN ^{13}C de l'Astragaline.

Figure S34. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de l'Astragaline.

Figure S35. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de l'Astragaline.

Figure S36. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de l'Astragaline.

Figure S37. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) de l'Astragaline.

Figure S38. Spectre RMN ^1H de la Quercétine.

Figure S39. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) de la Quercétine.

Figure S40. Spectre RMN ^1H de la Quercétine-3-*O*-glucoside.

Figure S41. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) de la Quercétine-3-*O*-glucoside.

Figure S42. Spectre RMN ^1H de la Quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S43. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de la Quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S44. Spectre RMN ^{13}C de la Quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S45. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de la Quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S46. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de la Quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S47. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de la Quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S48. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) de la quercétine-3-*O*-glucuronide.

Figure S49. Spectre RMN ^1H du Plantainoside B.

Figure S50. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY du Plantainoside B.

Figure S51. Spectre RMN ^{13}C du Plantainoside B.

Figure S52. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC du Plantainoside B.

Figure S53. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du Plantainoside B.

Figure S54. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY du Plantainoside B.

Figure S55. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^-$) du Plantainoside B.

Figure S56. Spectre RMN ^1H de n-Docosanol-*E-p*-coumarate.

Figure S57. Spectre RMN ^{13}C de n-Docosanol-*E-p*-coumarate.

Figure S58. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de n-Docosanol-*E-p*-coumarate.

Figure S59. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de n-Docosanol-*E-p*-coumarate.

Figure S60. Spectre RMN ^1H de l'Acide palmitique.

Figure S61. Spectre RMN ^1H de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside.

Figure S62. Spectre RMN ^{13}C de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside

Figure S63. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside.

Figure S64. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside.

Figure S65. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside.

Figure S66. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside.

Figure S67. Spectre HRMS-Orbitrap de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside.

Figure S68. Spectre RMN ^1H de Bonushenricoside A.

Figure S69. Spectre RMN ^{13}C de Bonushenricoside A.

Figure S70. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de Bonushenricoside A.

Figure S71. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de Bonushenricoside A.

Figure S72. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de Bonushenricoside A.

Figure S73. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de Bonushenricoside A.

Figure S74. Spectre HRMS-Orbitrap de Bonushenricoside A.

Figure S75. Spectre RMN ^1H de Zygophyloside I.

Figure S76. Spectre RMN ^{13}C de Zygophyloside I.

Figure S77. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de Zygophyloside I.

Figure S78. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de Zygophyloside I.

Figure S79. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de Zygophyloside I.

Figure S80. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de Zygophyloside I.

Figure S81. Spectre HRMS-Orbitrap de Zygophyloside I.

Figure S82. Spectre RMN ^1H de l'Acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique.

Figure S83. Spectre RMN ^{13}C de l'Acide 3-O- β - arabinosyl-bayogeninique.

Figure S84. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de l'Acide 3-O- β - arabinosyl-bayogeninique.

Figure S85. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de l'Acide 3-O- β - arabinosyl-bayogeninique.

Figure S86. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de l'Acide 3-O- β - arabinosyl-bayogeninique.

Figure S87. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de l'Acide 3-O- β - arabinosyl-bayogeninique.

Figure S88. Spectre HRMS-Orbitrap de l'Acide 3-O- β - arabinosyl-bayogeninique.

Figure S89. Spectre RMN ^1H de 6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S90. Spectre RMN ^{13}C de 6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S91. Spectre RMN ^1H de 8-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S92. Spectre RMN ^{13}C de 8-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S93. Spectre RMN ^1H de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S94. Spectre RMN ^{13}C de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S95. Spectre RMN ^1H de 8-((diméthylamino)méthyl)-7-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S96. Spectre RMN ^{13}C de 8-((diméthylamino)méthyl)-7-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S97. Spectre RMN ^1H de 5-((diméthylamino)méthyl)-6-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S98. Spectre RMN ^{13}C de 5-((diméthylamino)méthyl)-6-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S99. Spectre RMN ^1H de 2-(3,4-dihydroxyphényl)-6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromén-4-one.

Figure S100. Spectre RMN ^{13}C de 2-(3,4-dihydroxyphényl)-6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromén-4-one.

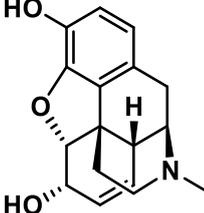
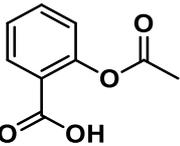
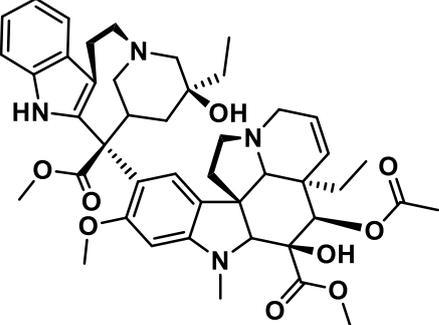
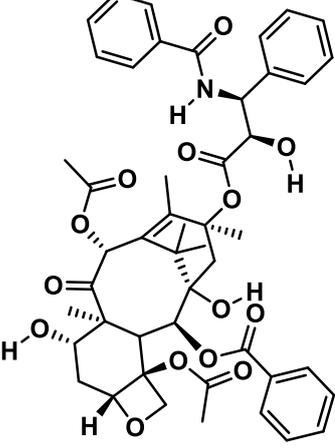
Figure S101. Spectre RMN ^1H de 2-(3,4-dihydroxyphényl)-6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromén-4-one.

Figure S102. Spectre RMN ^{13}C de 2-(3,4-dihydroxyphényl)-6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromén-4-one.

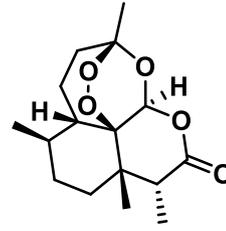
Figure S103. Spectre RMN ^1H de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

Figure S104. Spectre RMN ^{13}C de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one.

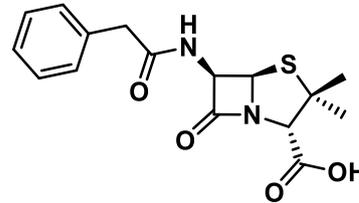
Liste des molécules citées

N°	Nom de la molécule	Structure
1	Morphine	 <p>The chemical structure of morphine is a complex pentacyclic alkaloid. It features a morphine skeleton with two hydroxyl groups (one at the 3-position and one at the 6-position), a tertiary amine nitrogen at the 17-position, and a double bond between C5 and C6. The structure is shown with stereochemistry: the 3-OH is dashed, the 6-OH is wedged, and the bridgehead hydrogens at C4 and C5 are both wedged.</p>
2	Aspirine	 <p>The chemical structure of aspirin (acetylsalicylic acid) consists of a benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at the 1-position and an acetoxy group (-O-CO-CH3) at the 2-position.</p>
3	Vinblastine	 <p>The chemical structure of vinblastine is a highly complex, multi-ring alkaloid. It features a central indole ring system fused to a tropane-like bicyclic system, with various side chains including a phenyl group, a methyl group, and several hydroxyl and ester groups. The structure is shown with extensive stereochemistry using wedges and dashes.</p>
4	Taxol	 <p>The chemical structure of taxol (paclitaxel) is a complex tetracyclic diterpenoid. It features a complex ring system with multiple stereocenters, including a decalin core, a cyclopropane ring, and a lactone ring. It is substituted with a phenyl group, a benzoyl group, and a side chain containing a hydroxyl group and a methyl group. The structure is shown with detailed stereochemistry.</p>

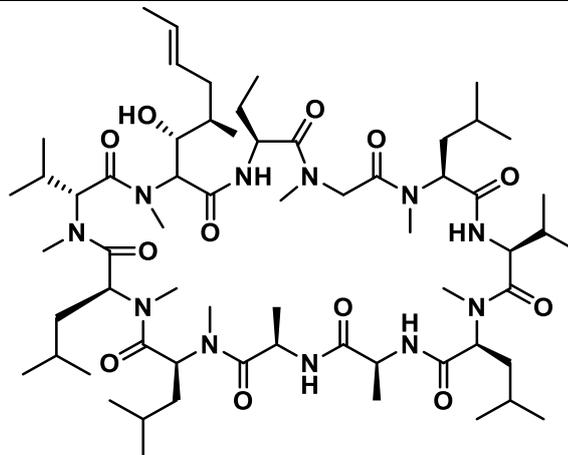
5 Artémisinine



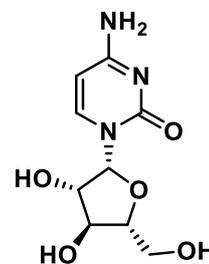
6 Pénicilline G



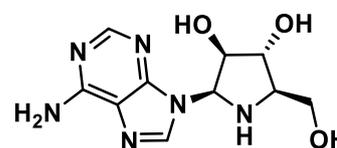
7 Ciclosporine



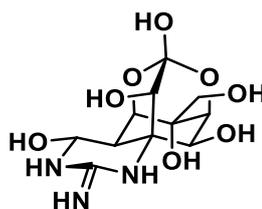
8 Cytarabine



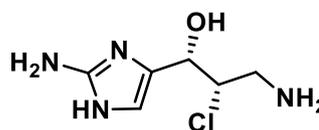
9 Vidarabine



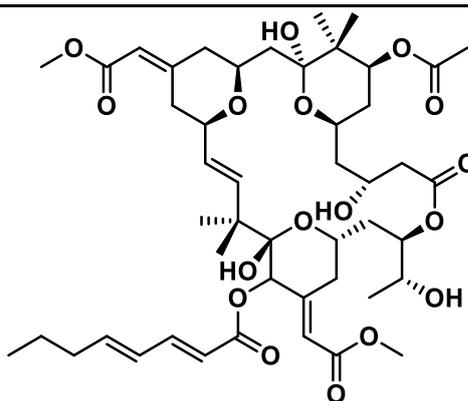
10 Tétrodotoxine



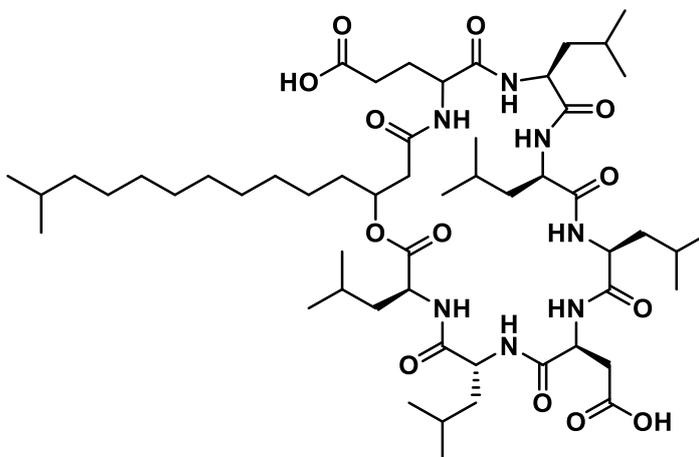
11 Girolline



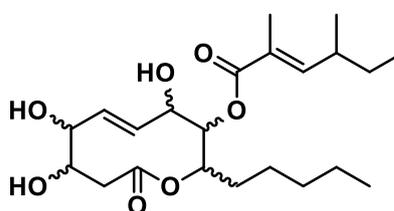
12 Bryostatine 1



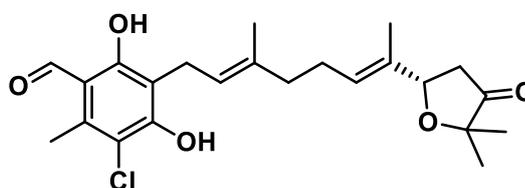
13 Surfactine

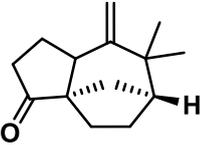
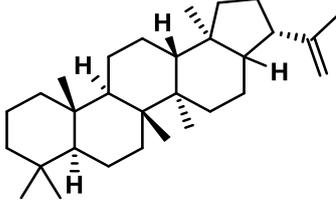
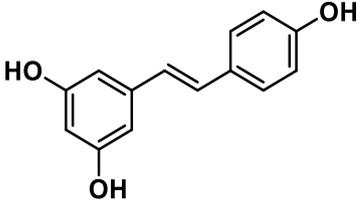
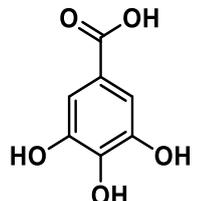
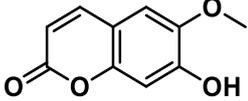
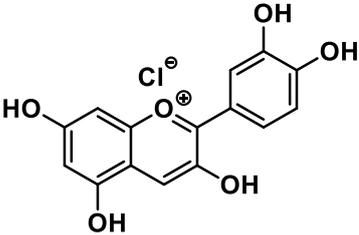
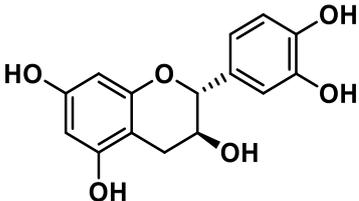


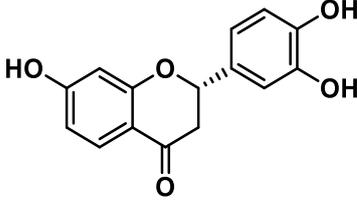
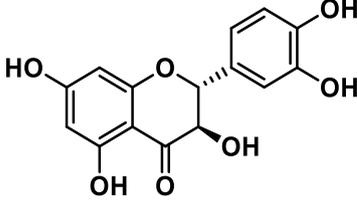
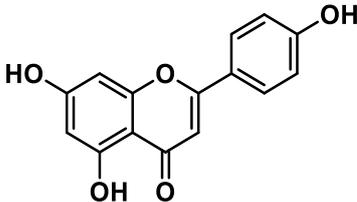
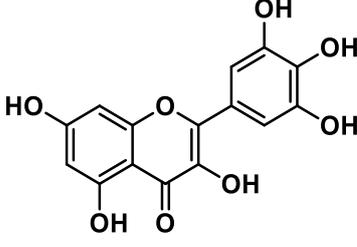
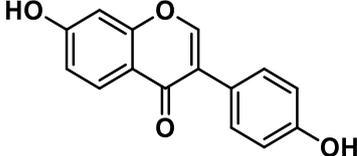
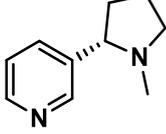
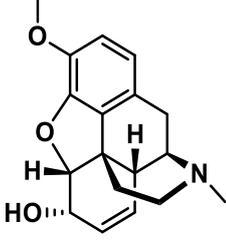
14 Phomol



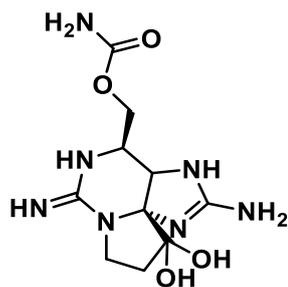
15 Ascofuranone



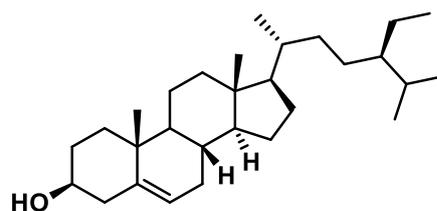
16	alpha-Pinène	
17	Khusimone	
18	Diploptène	
19	<i>trans</i> -Résveratrol	
20	Acide gallique	
21	Scopolétole	
22	Pélagonidine	
23	Catéchine	

24	Butine	
25	Taxifoline	
26	Apigénine	
27	Myricétine	
28	Daïdzéine	
29	Nicotine	
30	Codéine	

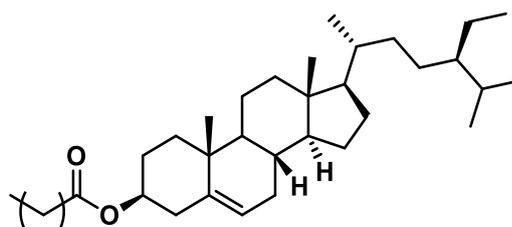
31 Saxitoxine



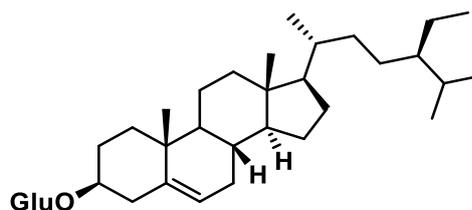
32 β -Sitostérol



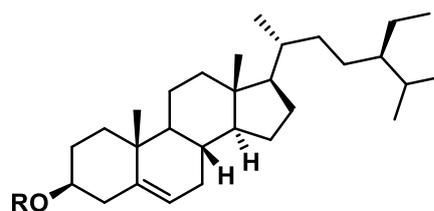
33 Palmitate de β -Sitostérol



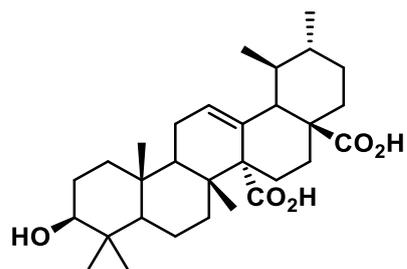
34 β -Sitostérol glucoside



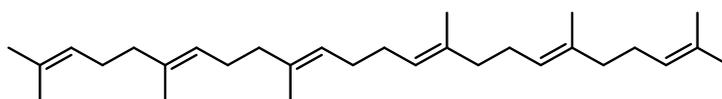
35 β -Sitosterol 6'-
stearoylglucoside
(R = stearoyl-Glu)



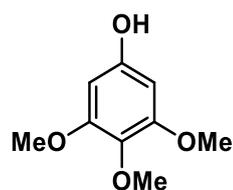
36 Acide quinovique



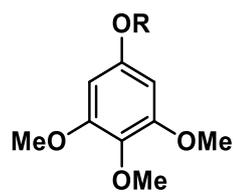
37 Squalène



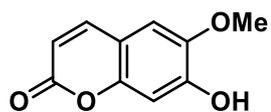
38 Antiarol



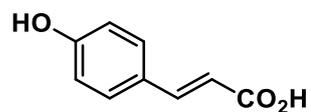
39 Kelampayoside A
(R = Apiosyl-(1-6)-Glu)



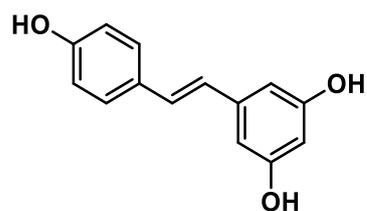
40 Scopolétine



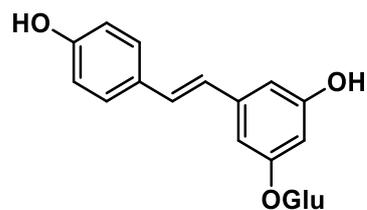
41 Acide *p*-coumarique



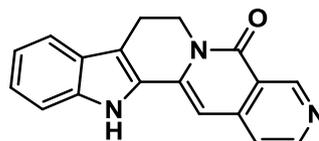
42 *trans*-Resvératrol



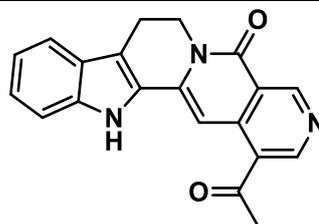
43 Resvératrol glucoside



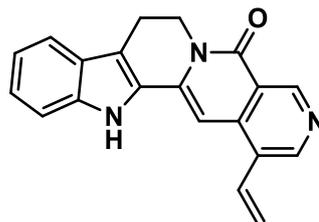
44 Naocléfine



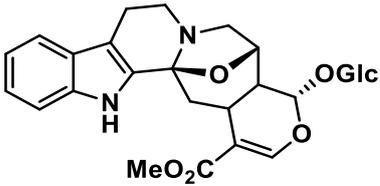
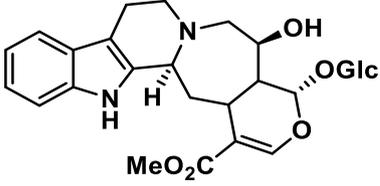
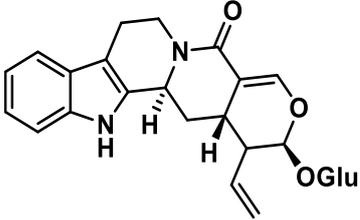
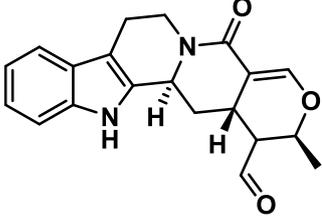
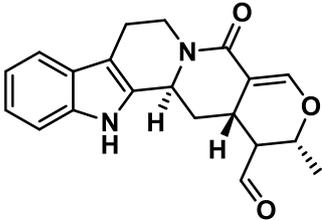
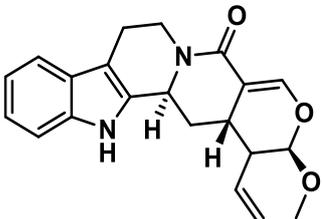
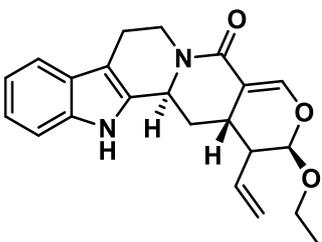
45 Naoclétine

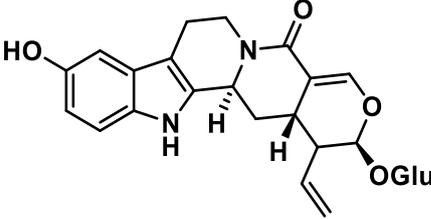
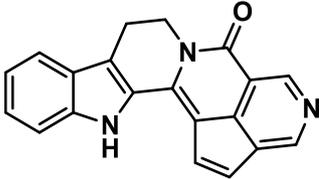
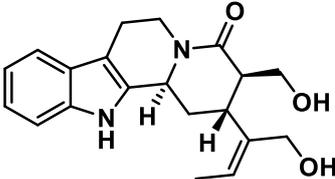
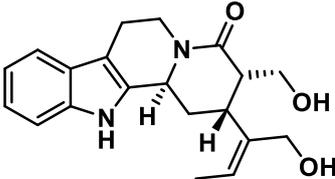
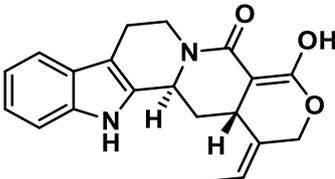
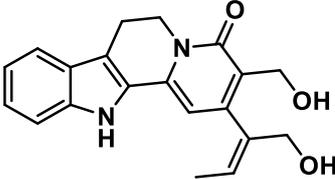
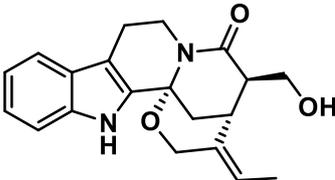


46 Angustine

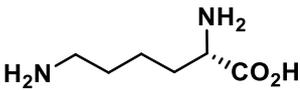
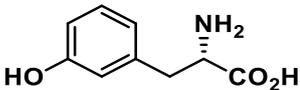
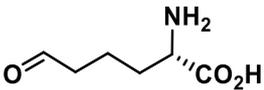
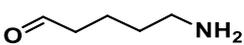
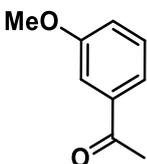
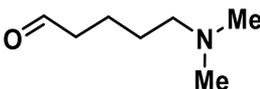
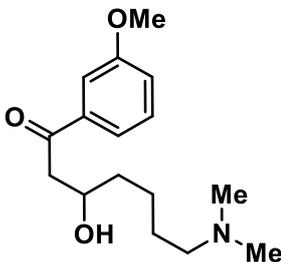
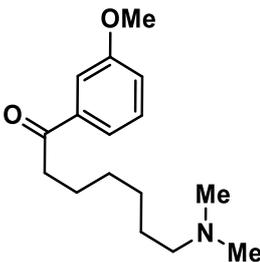
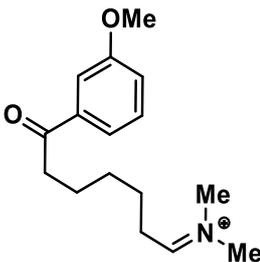


47	Angustoline	
48	19-O-Ethylangustoline	
49	Angustidine	
50	Naufoline	
51	Nauléchine	
52	Descarbo- méthoxynauléchine	
53	Nauléfoline	

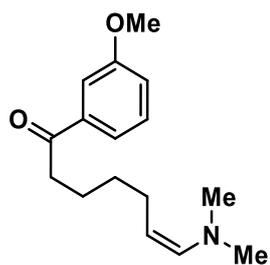
54	Cadambine	
55	3 α -Dihydro-cadambine	
56	Strictosamide	
57	Naucléidinal	
58	19- <i>épi</i> -Naucléidinal	
59	21-O-Méthylstrictosamide aglycone	
60	21-O-Ethylstrictosamide aglycone	

61	10-HydroxystRICTOSamide	
62	Naufaline	
63	Nauléamide A	
64	Nauléamide B	
65	Nauléamide C	
66	Nauléamide D	
67	Nauléamide E	

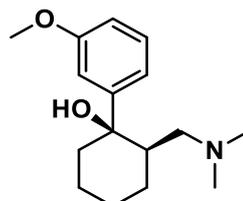
68	Nauléamide F	
69	Nauléfolinine	
70	Latifoliamide A	
71	Latifoliamide B	
72	Latifoliamide C	
73	Latifoliamide D	
74	Latifoliamide E	
75	L-Phénylalanine	

76	L-Lysine	
77	L-3'-hydroxy-phénylalanine	
78	L-2-amino-adipic-6-semialdéhyde	
79	5-aminopentanal	
80	1-(3-méthoxyphényl)éthan-1-one	
81	5-(diméthylamino)pentanal	
82	7-(diméthylamino)-3-hydroxy-1-(3-méthoxyphényl)heptan-1-one	
83	7-(diméthylamino)-1-(3-méthoxyphényl)heptan-1-one	
84a	N-(7-(3-méthoxyphényl)-7-oxoheptylidene)-N-méthylmethanaminium	

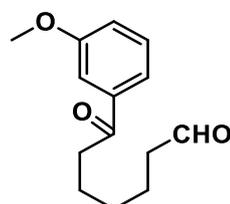
84b (Z)-7-(diméthylamino)-1-(3-méthoxyphényl)hept-6-en-1-one



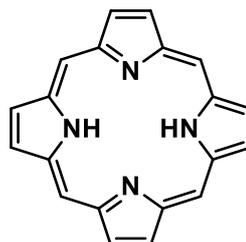
85 Tramadol



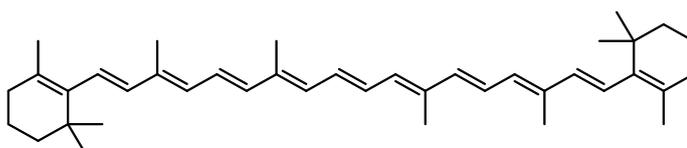
86 7-(3-méthoxyphényl)-7-oxoheptanal



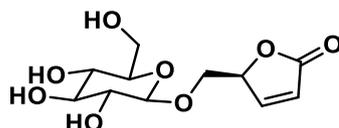
87 Porphine



88 β -carotène

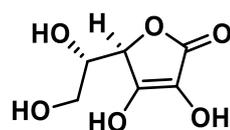


89 Ranunculine



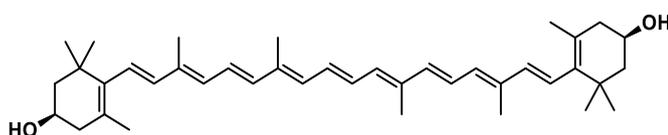
90

Vitamine C

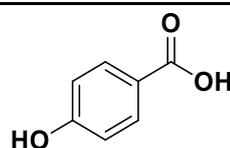


91

Zéaxanthine

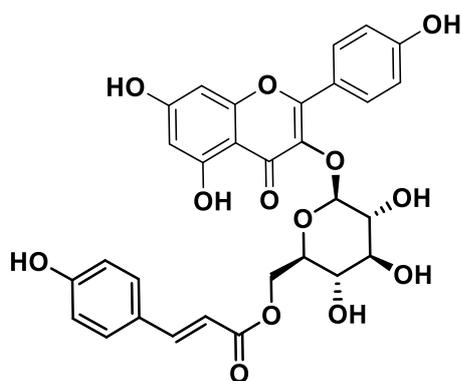


92

acide *p*-hydroxybenzoïque

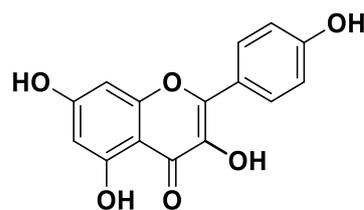
93

Tiliroside



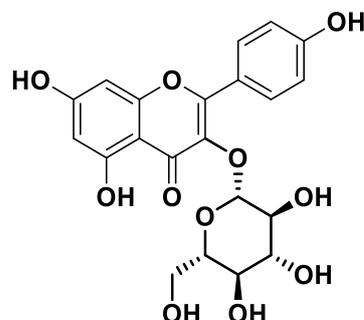
94

Kaempférol



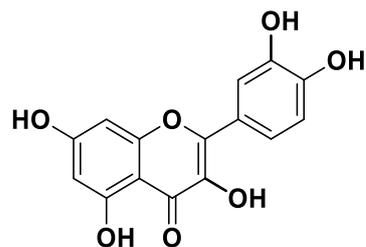
95

Astragaline



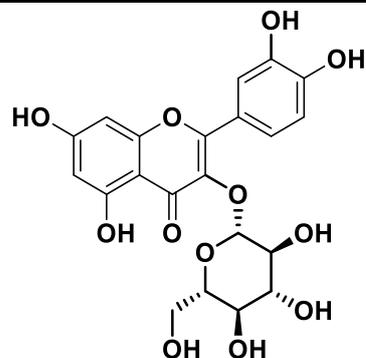
96

Quercétine



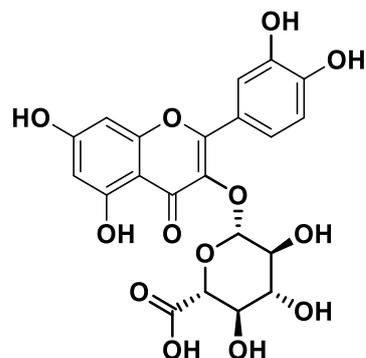
97

Quercétine-3-O-Glucose



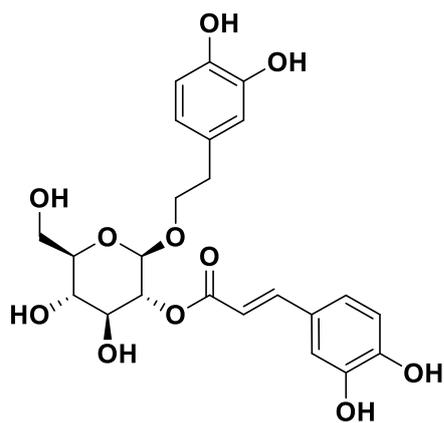
98

Quercétine-3-O-Glucuronide

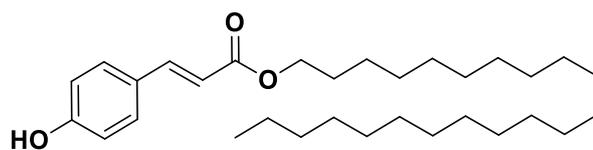


99

Plantainoside B

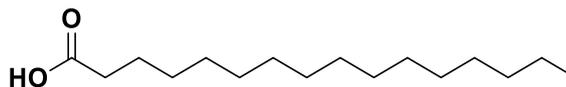


100

para-coumarate de *n*-docosanol

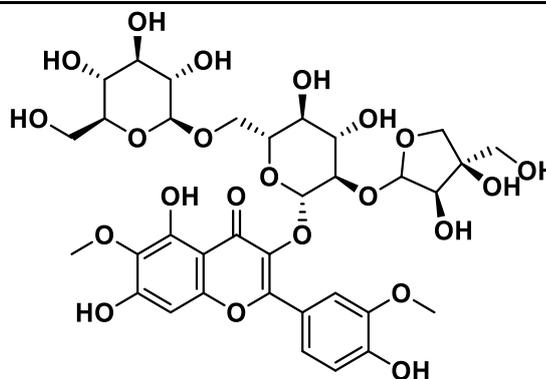
101

Acide palmitique



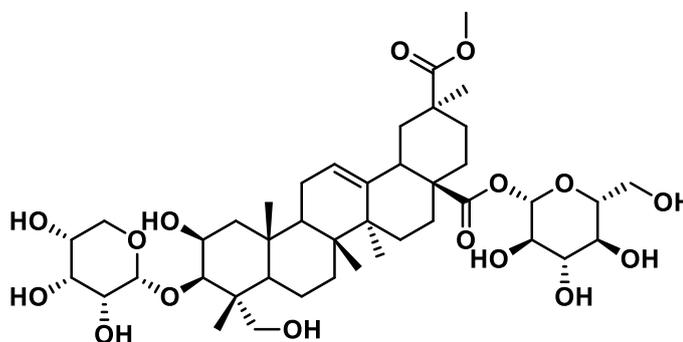
102

Spinacétine-3-O-β-D-glucopyranosyle(1→6)-[β-D-apiofuranosyle(1→2)]-β-D-glucopyranoside



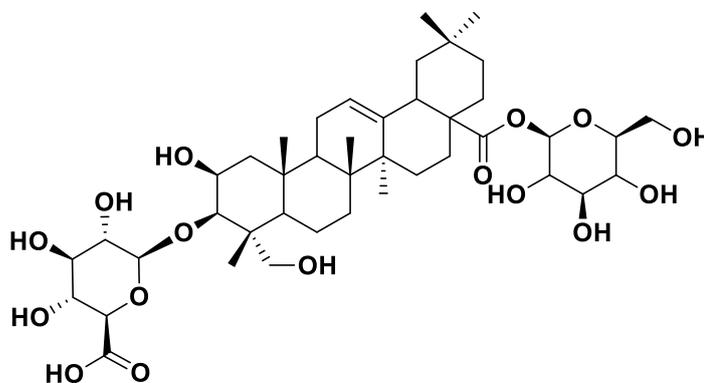
103

Bonushenricoside A



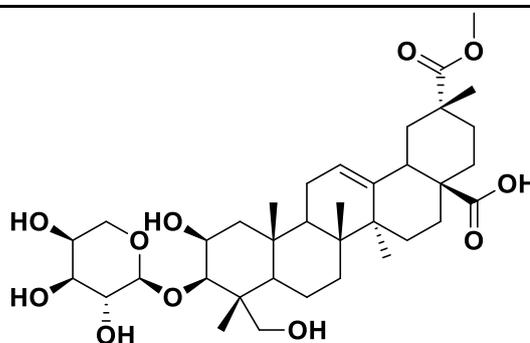
104

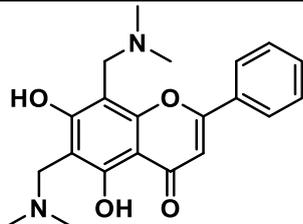
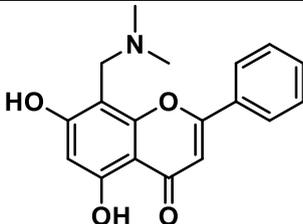
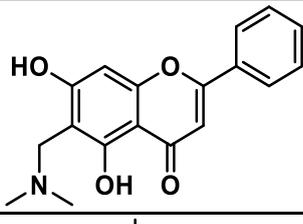
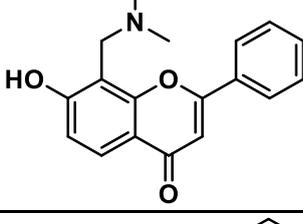
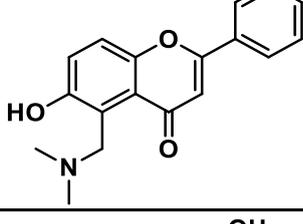
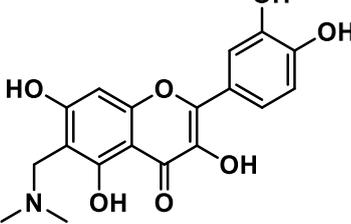
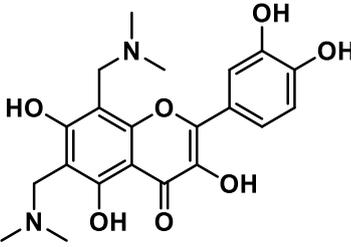
Zygophyloside I



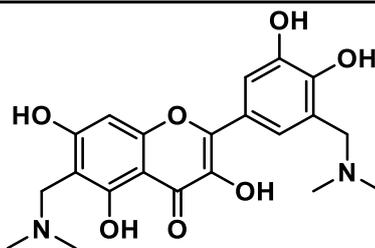
105

Acide 3-O-β-arabinosyl-bayogéninique



106	6,8- bis((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	
107	8-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	
108	6-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	
109	8-((dimethylamino)methyl)-7-hydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	
110	5-((dimethylamino)methyl)-6-hydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one	
111	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one	
112	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,8-bis((dimethylamino)methyl)-5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one	

6-
((dimethylamino)methyl)-
2-(3-
113 ((dimethylamino)methyl)-
4,5-trihydroxyphenyl)-5,7-
dihydroxy-4*H*-chromen-4-
one



CHAPITRE 1 : Introduction Générale

Depuis des millénaires, les hommes ont toujours exploité les plantes comme une des sources les plus importantes d'agents thérapeutiques. Les documents les plus anciens ont été reportés il y a 2600 années avant J-C indiquant l'utilisation en Mésopotamie de 1000 préparations médicales à base de plantes¹.

En 1862, Edwin Smith découvrit le papyrus d'Ebers à Louxor (Egypte) datant de 1550 ans avant J-C. Ce papyrus contient plus de 700 formules et remèdes à base de plantes, montrant l'importance de la médecine traditionnelle en Egypte antique. Pedanius Discorde, un médecin grec a écrit l'ouvrage référence « *Materia Medica* » répertoriant en 800 chapitres, plus de 600 végétaux, 35 animaux ainsi que 90 minéraux utilisés par les Grecs, les Romains et d'autres populations d'Asie, d'Egypte ou encore de Syrie. Ce n'est que 1500 ans plus tard que Pierandrea Mattioli, médecin et botaniste italien compléta et enrichit le manuscrit¹⁻³.

Jusqu'au 19^{ème} siècle, les plantes médicinales n'étaient utilisées que de manière empirique, sans connaître les principes actifs contenus dans ces végétaux. Les apothicaires étaient les pionniers en termes de purifications d'extraits. En 1806, l'allemand Friedrich Sertürner isola l'un des premiers alcaloïdes : la morphine à partir du pavot somnifère (*Papaver somniferum*) qui était utilisé en tant qu'analgésique avant d'identifier le principe actif de la plante⁴. L'isolement de la salicyline (1829) puis de l'acide salicylique (1838) à partir de *Salix alba* a permis la synthèse du dérivé acétylé connu sous le nom d'aspirine dont Bayer déposa le brevet en 1898⁵ (**Figure 1**).

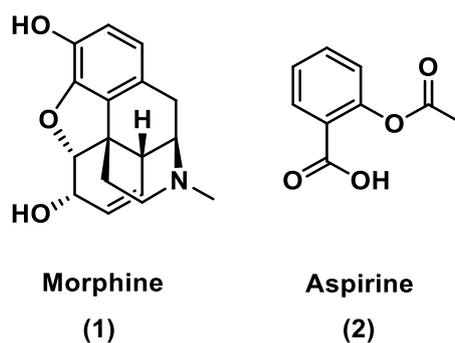


Figure 1. Exemples de deux médicaments d'origine végétale.

On ne peut bien évidemment pas évoquer les médicaments d'origine naturelle sans mentionner les anticancéreux, tels que les alcaloïdes (vinblastine et vincristine) de la pervenche de Madagascar (*Cathartus roseus*) ou le taxol de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*). Enfin, on

peut également citer l'extraction de l'artémisinine à partir d'*Artemisia annua* possédant une activité antipaludique encore inégalée et qui valut le prix Nobel de Médecine au Prof. Yu-yu Tu⁶⁻⁸ (Figure 2).

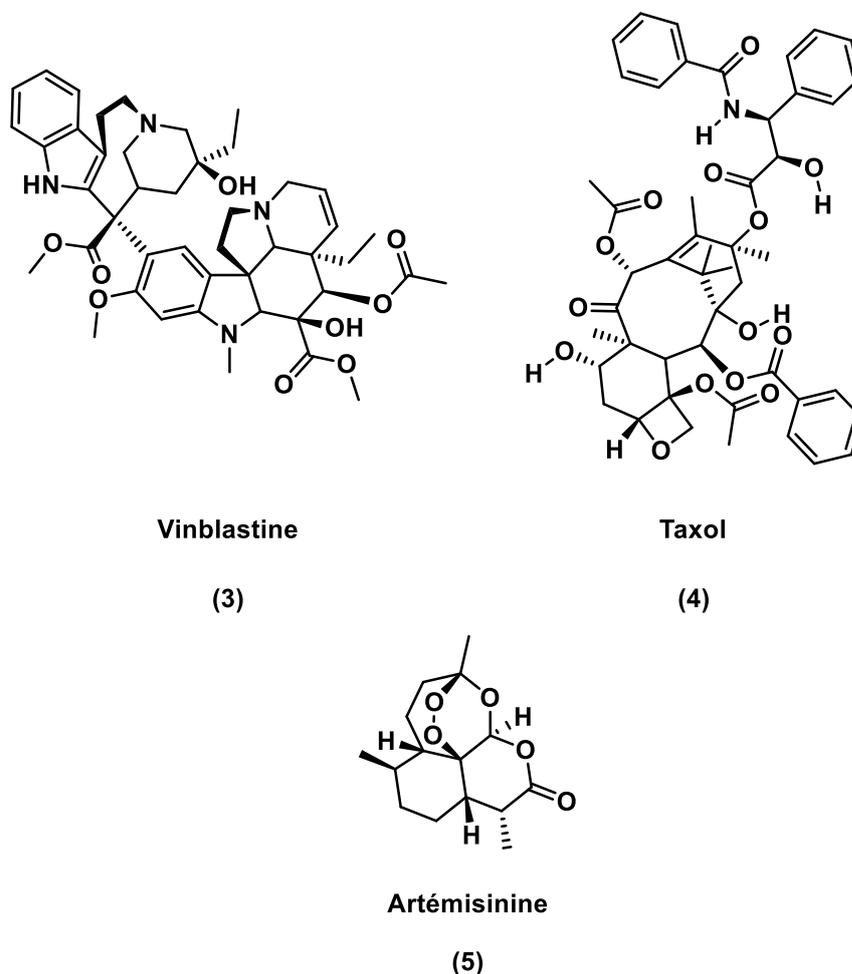


Figure 2. Structures de la vinblastine, du taxol et de l'artémisinine.

Les plantes médicinales ne constituent pas la seule source de produits naturels bioactifs. Par exemple, au début du 20^{ème} siècle, la découverte de la pénicilline (1928), un antibiotique isolé à partir du champignon *Penicillium chrysogenum*, engendra une nouvelle ère dans la découverte de médicaments inédits¹. On peut également citer la ciclosporine, un agent immunosuppresseur utilisé contre les rejets lors des transplantations d'organes, isolée à partir du champignon *Tolypocladium inflatum*^{9,10} (Figure 3).

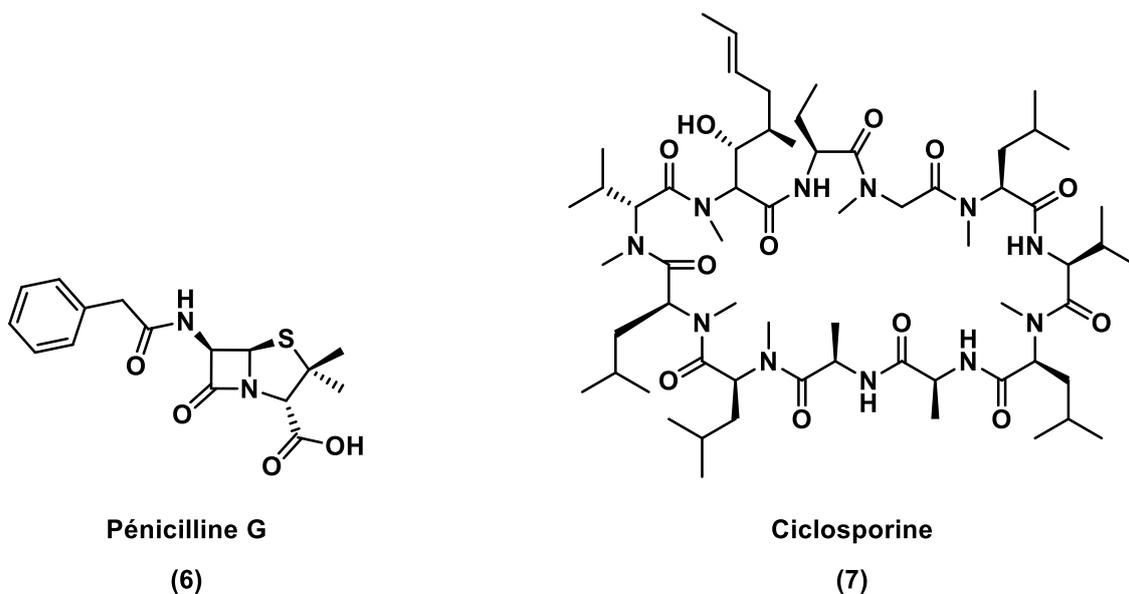


Figure 3. Structures de la pénicilline G et de la ciclosporine.

Par ailleurs, les organismes marins représentent une source de molécules de plus en plus étudiée. En effet, 71 % de la surface de la Terre est couverte d'eau. Dans cet environnement, les organismes marins sont soumis à des conditions extrêmes telles qu'une haute salinité, une forte pression, une importante variation de la concentration des nutriments, une pénétration limitée du soleil ou une teneur faible en oxygène. La particularité la plus intéressante dans les organismes marins est la biosynthèse des molécules chlorées ou bromées, ce qui n'est pas commun dans les produits terrestres. Les premiers travaux menés sur les molécules d'origine marine consistaient à étudier les toxines. Une des découvertes pionnières a porté sur l'investigation du poisson-coffre fugu que les japonais raffolent cuisiner. Seulement quelques cuisiniers professionnels sont habilités à la découpe de ce poisson afin d'éviter des problèmes d'intoxication. En effet, la tétródotoxine contenu dans certains organes du poisson (le foie, la peau et les viscères) est un bloqueur des canaux calciques provoquant la mort par atteinte du système nerveux central et arrêt respiratoire¹¹ (**Figure 4**).

Plusieurs revues ont mis en avant la faune et la flore marine renfermant des molécules dotées de différentes activités biologiques telles qu'antitumorales ou antipaludiques¹². Par exemple, les tests *in vitro* des extraits obtenus à partir de la bugule du nom de *Bugula neritina* ont pu montrer de fortes activités antitumorales. Par la suite, les purifications des extraits ont permis l'identification de la Bryostatine 1 qui a pu être développée au niveau clinique. En 2009, une étude montra que le principe actif en association avec d'autres anticancéreux accroît la

guérison chez les patients^{13,14}. En 1988, Pierre Potier a extrait la girolline à partir de l'éponge *Pseudaxinyssa cantharella* et dont les tests de toxicité ont laissé percevoir un avenir thérapeutique pour la molécule. Cependant, des effets négatifs observés sur le système nerveux central de certains patients ont conduit à l'arrêt de l'étude^{11,15}. En 2004, deux molécules découvertes dans des éponges dans les années 1950, étaient les seuls principes actifs d'origine marine utilisés en clinique. En effet, la cytarabine qui a été isolée à partir d'une éponge du nom de *Cryptotethia crypta*, est utilisée à ce jour dans le traitement de cancers hématologiques. En deuxième exemple, il s'agit de la vidarabine, un antiviral isolé d'une éponge (*Tethya crypta*) et dérivé de nucléoside^{11,14,16} (Figure 4).

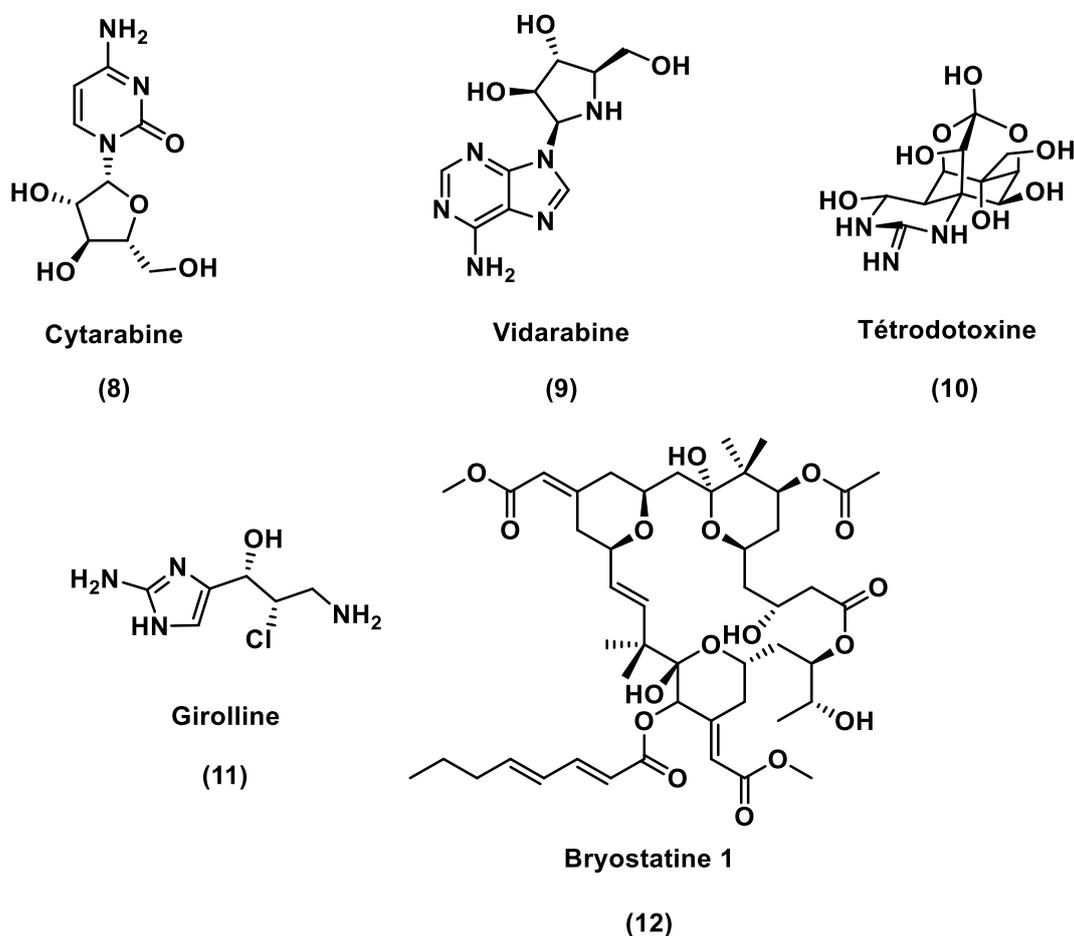


Figure 4. Quelques exemples de molécules isolées à partir d'organismes marins.

Enfin, les micro-organismes endophytes résidant dans les tissus des plantes, tels que les bactéries ou encore les champignons, constituent une source de principes actifs. Sur les centaines de milliers de plantes connues, chaque espèce contient un ou plusieurs endophytes

dont très peu ont été investigués. Il est estimé que seulement 1 % des bactéries et 5 % des champignons endophytes sont connus. Par conséquent, la chance de découvrir de nouveaux composés d'intérêt reste très forte¹⁷⁻²⁰.

Les investigations portées sur les endophytes de plantes ont montré que les composés extraits présentaient des activités intéressantes telles qu'antivirales, antibactériennes ou encore anticancéreuses²¹⁻²³. Quelques exemples de molécules extraites d'endophytes sont représentées dans la **Figure 5**.

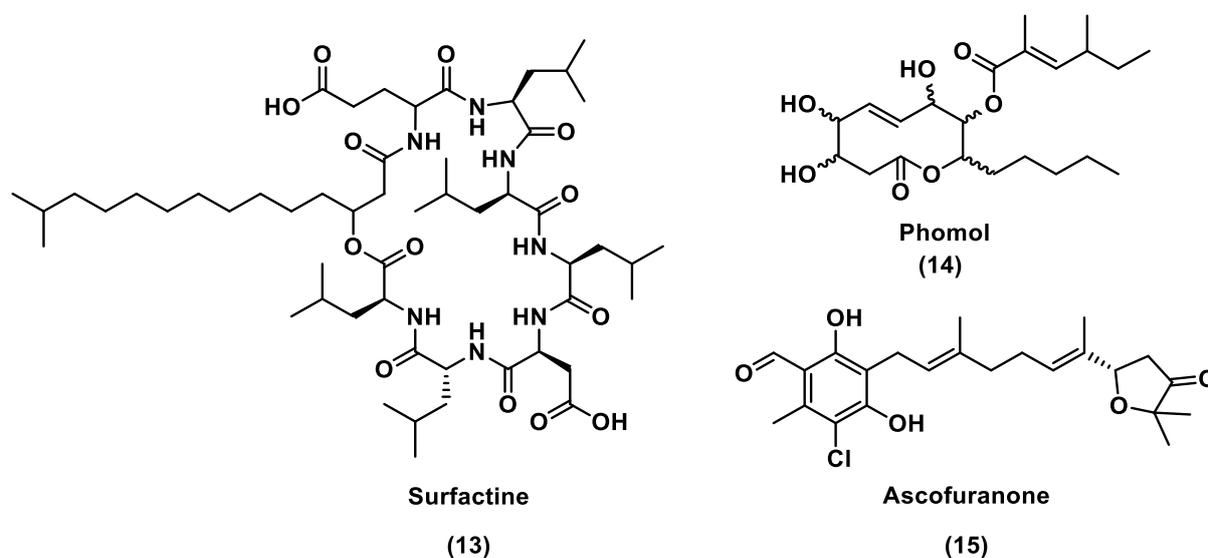


Figure 5. Exemples de molécules isolées à partir d'endophytes.

Au fil des années, les études phytochimiques ont pu mettre en valeur des molécules comportant des structures variées et présentant des activités biologiques importantes. Par conséquent, la médecine dite moderne trouve dans la nature une grande source d'inspiration et a recours à des principes actifs naturels ou dérivés de produits naturels.

De l'année 1981 à 2014, la FDA (*Food and Drug Administration*) a accordé la mise sur le marché de plus de 1000 médicaments comprenant des macromolécules biologiques, des produits naturels bruts, des préparations à base de plantes, des dérivés de produits naturels, des médicaments purement synthétiques, des produits synthétiques avec un pharmacophore d'origine naturelle et des vaccins (**Figure 6**)^{24,25}. La somme des pourcentages (N, NB, ND et S/NM) prouve bel et bien que les produits naturels ont une importance capitale dans le développement de médicaments.

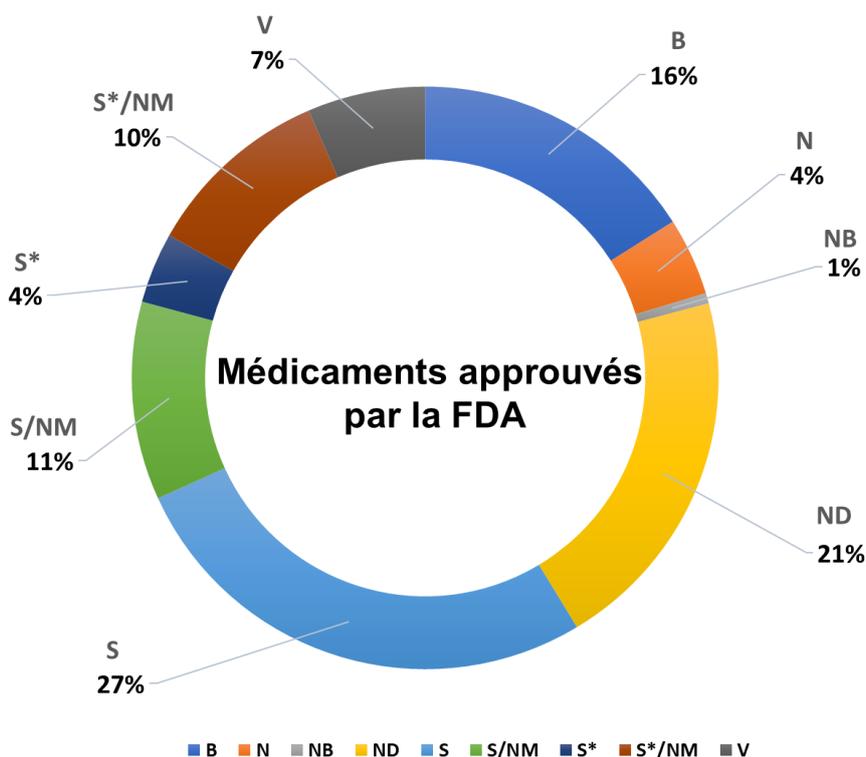


Figure 6. Statistiques sur les médicaments approuvés par la FDA (entre 1981 et 2014)²⁴. B : Biological macromolecule, N : Unaltered natural product, NB : Botanical drug (defined mixture), ND : Natural product derivative, S : Synthetic drug, S* : Synthetic drug (NP pharmacophore), V : Vaccine, /NM : Mimic of natural product. Figure adaptée à partir de Newman, J. Nat. Prod., 2016.

Au-delà du médicament, les substances naturelles sont omniprésentes dans plusieurs domaines tels que la parfumerie, la cosmétique, les pesticides et l'alimentaire. De ce fait, les substances naturelles présentent un enjeu économique important. Cependant, sur les 374 000 espèces de plantes connues, seulement 6 % ont été étudiées d'un point de vue pharmacologique et 15 % ont été soumises à des investigations phytochimiques, montrant ainsi que la biodiversité reste largement inexploitée²⁶.

Le développement d'un principe actif médicamenteux est un long processus qui nécessite une durée moyenne de 10 ans et un coût de plusieurs centaines de millions de dollars²⁷. Le processus de découverte d'un principe actif naturel suit deux approches classiques : la première comporte une extraction et un fractionnement guidé par l'activité pharmacologique de l'extrait ou de la fraction sur la cible biologique d'intérêt (**Figure 7**).

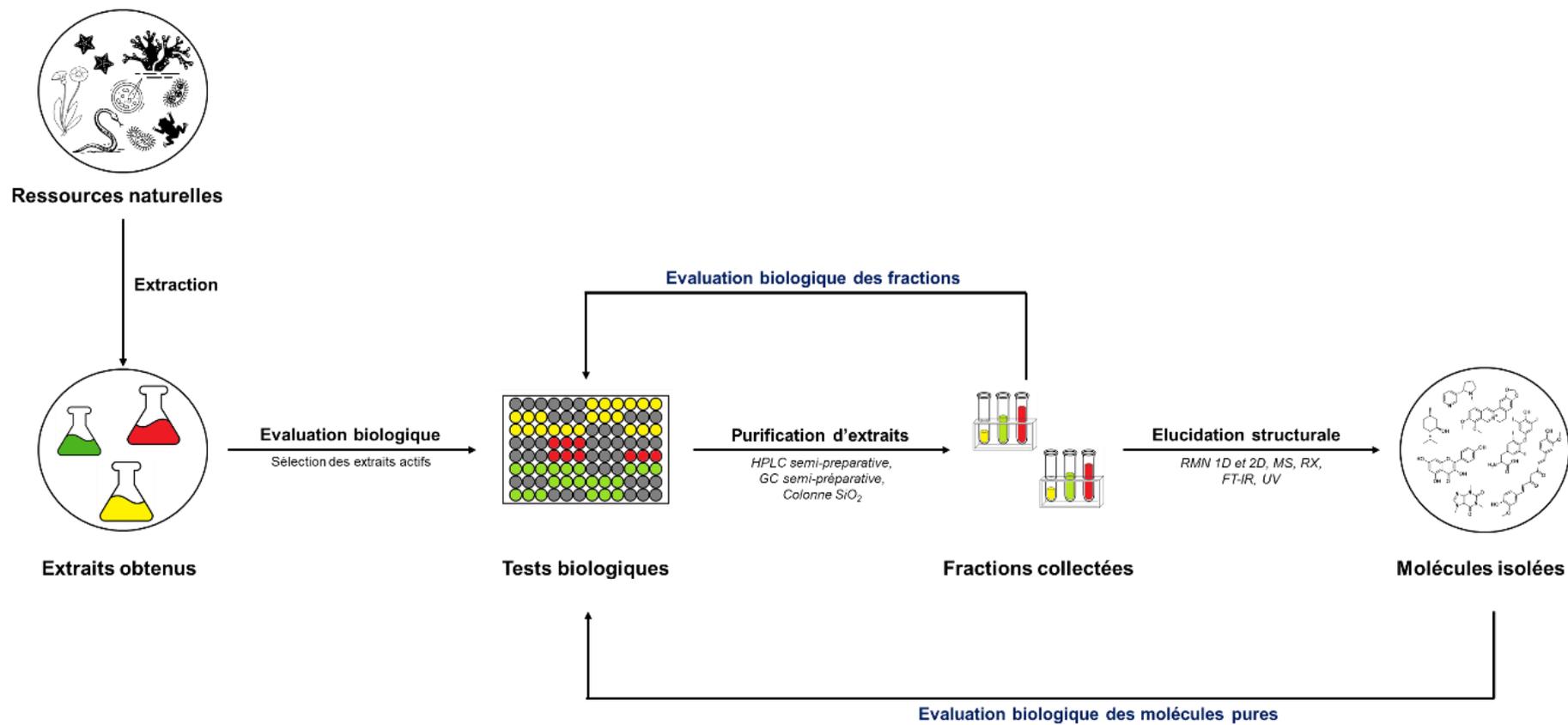


Figure 7. Fractionnement bio-guidé d'un extrait issu de ressources naturelles.

La deuxième approche consiste à isoler et purifier les molécules puis effectuer un criblage sur des cibles biologiques afin d'identifier la molécule active (**Figure 8**).

Il est important de souligner que de nouvelles approches plus modernes sont de plus en plus utilisées telles que la déréplication. Cette méthode moderne permet d'identifier plusieurs molécules dans un extrait avant de commencer les purifications, ceci permet d'avoir un premier aperçu de la composition chimique²⁸.

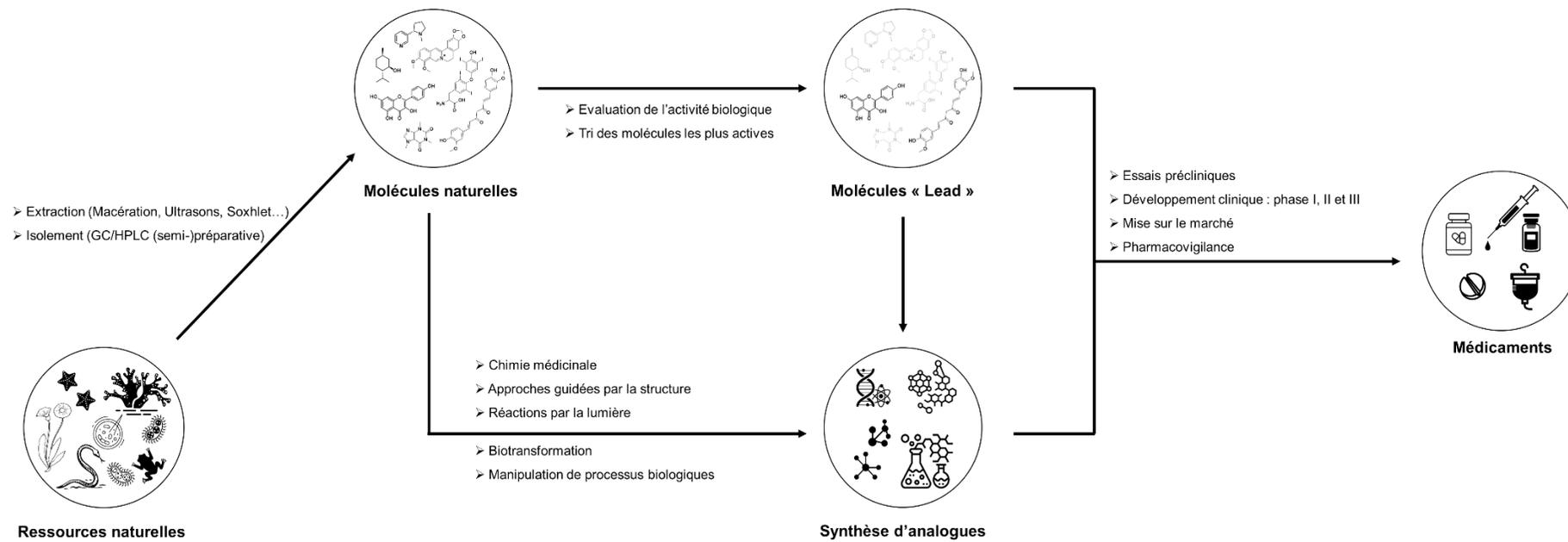


Figure 8. Développement d'un candidat médicamenteux à partir d'une source naturelle.

CHAPITRE 2 : Classes de molécules naturelles

Dans le règne végétal, on distingue deux catégories de métabolites : 1) les métabolites primaires et 2) les métabolites secondaires.

2.1. Les métabolites primaires

Les métabolites primaires, produits en grande quantité, sont des composés organiques nécessaires à la vie de la plante. Ils sont répartis en cinq classes : les lipides, les pigments, les glucides, les protéines et les acides nucléiques.

Les lipides ou acides gras se situent généralement dans les feuilles et les fruits de la plante et servent à stocker l'énergie. Les acides gras les plus importants sont l'acide oléique, linoléique, linoléique (oméga-3), palmitique et stéarique.

Les glucides sont une importante source d'énergie pour le bon développement de la plante et sont distribués par la sève.

Les pigments tels que les chlorophylles sont des molécules essentielles, ils sont responsables de la photosynthèse et par conséquent permettent la biosynthèse des composés présents dans la plante.

Les acides aminés constituent les unités structurelles des protéines végétales nécessaires à la croissance et développement des végétaux.

Enfin, il existe deux types d'acides nucléiques :

1) l'ADN (acide désoxyribonucléique) se trouvant dans le noyau et contenant le génôme, qui est nécessaire à la formation des protéines.

2) l'ARN (acide ribonucléique) est transcrit à partir de l'ADN puis traduit en protéines.

2.2. Les métabolites secondaires

A l'inverse, les métabolites secondaires sont biosynthétisés en faibles quantités comparés aux métabolites primaires et n'assurent pas de fonctions essentielles et directes à la croissance de la plante mais sont impliqués dans les interactions entre les végétaux et leur environnement. Les métabolites secondaires constituent un réservoir unique de molécules

bioactives pour la recherche de principes actifs. Selon leur structure chimique, les métabolites secondaires sont répartis en trois familles : les terpènes, les polyphénols et les alcaloïdes.

Ci-après, nous citerons des exemples de molécules représentatives appartenant à ces trois familles.

2.2.1. Les terpènes et dérivés

Les terpènes sont une classe de molécules dérivant de l'isoprène. Otto Wallach, un chimiste allemand, découvrit que les terpènes étaient tous constitués d'un motif de base, l'isoprène. Une unité isoprénique comporte un squelette de cinq carbones de type 2-méthyl-1,3-butadiène. Il existe plusieurs familles de terpénoïdes selon le nombre d'unités isopréniques présentes. Parmi ces familles, on retrouve les monoterpènes (C_{10}), les sesquiterpènes (C_{15}), les diterpènes (C_{20}), les sesterterpènes (C_{25}), les triterpènes (C_{30}), les tétraterpènes (C_{40})²⁹.

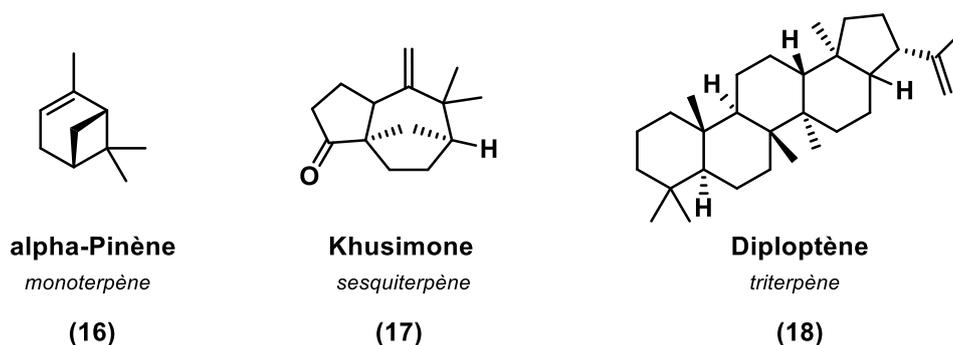


Figure 9. Quelques exemples de structures de terpènes.

Les huiles essentielles sont constituées de dérivés de terpènes et constituent des ingrédients nécessaires dans la conception de fragrances. Par exemple, l' α -pinène est un monoterpène très présent dans les huiles essentielles de menthe, de lavande et de l'essence de térébenthine³⁰. Il est prescrit pour ses activités antiseptiques. La khusimone est un sesquiterpène que l'on retrouve dans l'huile essentielle de Vétiver, matière première à odeur boisée, et fait partie des molécules donnant l'odeur caractéristique de la matière première^{31,32}. Le diploptène est un triterpène classique non volatil et non fonctionnalisé³³ (Figure 9).

2.2.2. Les polyphénols

Les polyphénols représentent une vaste famille de molécules comprenant au moins deux groupes phénoliques (ou groupements méthoxylés). Parmi les polyphénols, on retrouve les tanins, les coumarines, les anthocyanes et les stilbénoides (**Figure 10**).

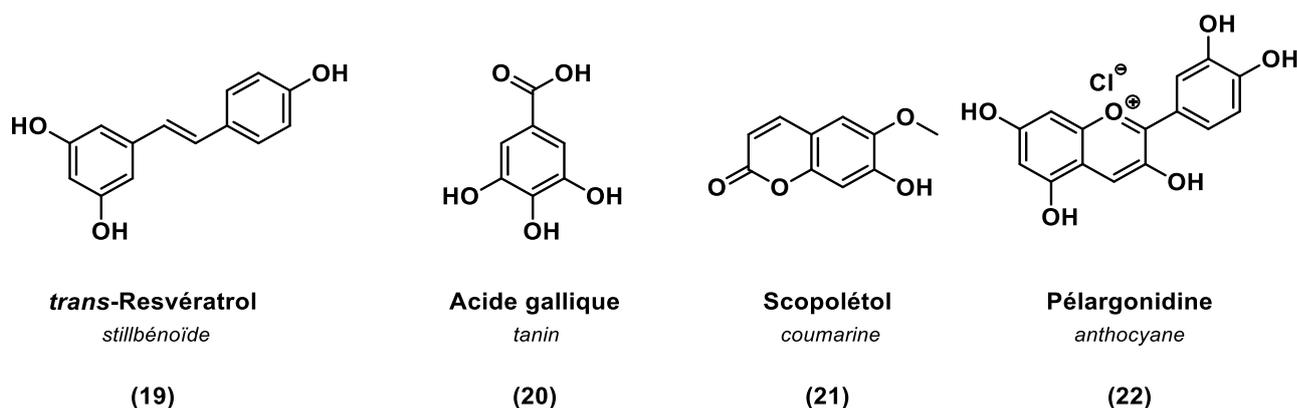


Figure 10. Exemples de polyphénols.

La classe de molécules la plus importante est représentée par les flavonoïdes. Ces composés ont pour squelette commun le motif 2-phénylchromane, ils sont responsables de la coloration des fruits et des fleurs des végétaux. A ce jour, des milliers de structures ont pu être identifiés. Les flavonoïdes sont catégorisés en six familles : les flavan-3-ols, les flavanones, les flavanonols, les flavones, les flavonols et les isoflavones. La famille des flavonoïdes est largement présente dans les fruits, les légumes, les fleurs et certaines boissons. Les activités biologiques associées à cette famille de molécules sont très nombreuses. Grâce aux groupements fonctionnels phénoliques, ils possèdent un pouvoir anti-âge très important grâce à leurs activités antioxydantes. Plusieurs exemples de flavonoïdes sont représentés dans la **Figure 11**.

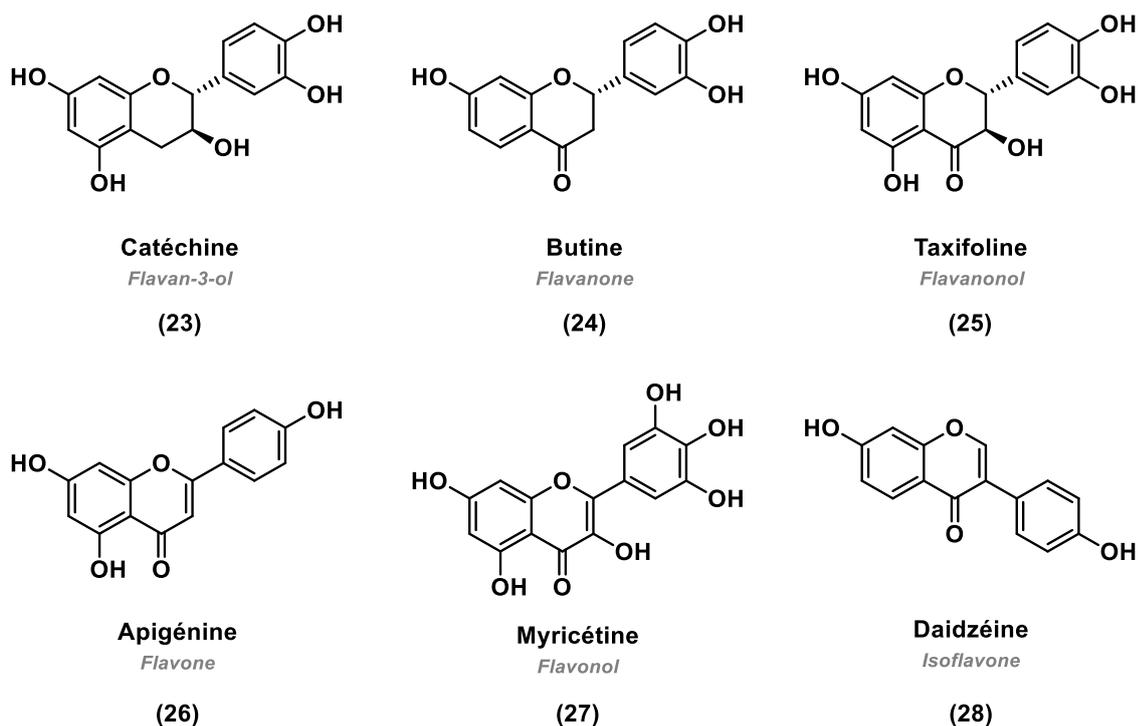
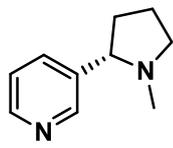


Figure 11. Exemples de flavonoïdes.

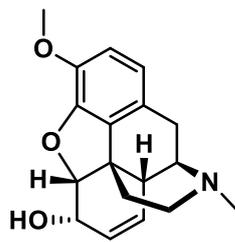
2.2.3. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules azotées, généralement hétérocycliques. Ils sont réputés pour posséder de fortes activités toxiques à haute concentration. Cependant, quand ils sont utilisés à faibles doses on peut observer des effets thérapeutiques. Par exemple, la morphine ou la codéine possèdent des activités analgésiques ou encore la vinblastine et la vincristine sont utilisées comme anticancéreux. On retrouve les alcaloïdes aussi bien dans les plantes que dans les substances marines. Par exemple, la saxitoxine isolée à partir de micro-organismes marins est une toxine puissante qui inflige une paralysie respiratoire entraînant par la suite la mort³⁴. La nicotine que l'on retrouve dans la plante de tabac (*Nicotiana tabacum*) est utilisé en tant que psychotrope³⁵ (Figure 12).



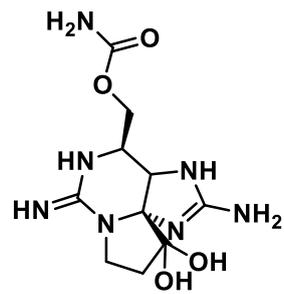
Nicotine

(29)



Codéine

(30)



Saxitoxine

(31)

Figure 12. Exemples d'alcaloïdes.

CHAPITRE 3 : La médecine traditionnelle dans le monde

La médecine traditionnelle se base sur des théories, des croyances, des expériences des cultures pour prévenir, diagnostiquer, traiter et/ou guérir les pathologies (mentales ou physiques). Elle œuvre pour retrouver un équilibre physique ou psychique par l'utilisation d'une ou plusieurs plantes avec une composition chimique complexe dans le but de maximiser l'effet synergique ou améliorer la probabilité d'interactions avec une cible biologique^{36,37}. Les populations utilisant les préparations médicinales traditionnelles n'ont pas souvent connaissance du raisonnement scientifique derrière l'emploi de ces remèdes mais ont conscience de leur efficacité quand ces derniers sont utilisés à doses thérapeutiques.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale n'ayant pas accès à la médecine moderne, utilisent les plantes et des préparations médicinales pour traiter des cas primaires de santé. Les 20 % restants représentent principalement les populations habitant dans des pays développés, dont les végétaux jouent également un rôle important dans leurs systèmes de santé^{6,36}.

Dans les régions du monde où le système de santé dominant est la médecine allopathique, la médecine traditionnelle est souvent nommée « alternative », « parallèle » ou encore « douce »³⁸. Un grand nombre de principes actifs sont issus des investigations menées sur l'usage traditionnel des plantes. Il a été démontré que sur 119 médicaments issus de plantes, 74 % sont utilisés pour soigner les mêmes pathologies que celles pour laquelle la plante était utilisée^{38,39}.

3.1. Médecine traditionnelle africaine

La médecine traditionnelle africaine se présente sous plusieurs formes impliquant les soins du corps et de l'esprit. Avant de prescrire un traitement, le guérisseur traditionnel va diagnostiquer et traiter les traits psychologiques de la maladie. Cette médecine est l'une des plus anciennes et probablement une des plus riches en préparations médicinales de tous les systèmes de médecine. Dans certaines régions d'Afrique, la médecine traditionnelle est le quasi-seul système de santé disponible, elle est accessible, abordable et acceptée par les populations. Cependant, l'enregistrement de l'utilisation des plantes médicinales sur le continent Africain est mal entretenu et la documentation sur les espèces utilisées devient rapidement un besoin.

Par ailleurs, la dégradation de certaines régions du continent africain due aux catastrophes naturelles telles que des inondations, des tempêtes, la sécheresse ou encore

causée par l'activité des hommes comme la pollution ou la déforestation pourrait entraîner des effets néfastes sur la biodiversité et la santé humaine. Cette perte de biodiversité pourrait altérer l'accessibilité à des plantes médicinales importantes dans les préparations de remèdes et favoriser la propagation des maladies ainsi que la diminution de production de nourriture et d'eau potable^{36,38}.

Parmi les espèces utilisées en médecine traditionnelle, *Acacia senegal* (Gommier blanc), *Commiphora myrrha* (Myrrhe), *Harpagophytum procumbens* (Harpagophyton) font partie des plus connues. On retrouve aussi *Artemisia afra*, une espèce cousine d'*Artemisia annua* (Armoise annuelle, également utilisée pour traiter le paludisme). Cependant, l'absence d'artémisinine laisse soupçonner que son effet thérapeutique proviendrait de l'arginine qu'elle contient^{36,40}.

3.2. Médecine traditionnelle américaine

En Amérique du Nord, l'usage traditionnel des plantes en médecine est également basé sur les connaissances indigènes. Comme dans n'importe quelle culture, les shamans des tribus guérissent les maladies en traitant le côté physique et psychique des patients. Les cérémonies shamaniques impliquent des chants, des danses ainsi que des rituels permettant de guérir le malade individuellement ou la tribu entière en tant qu'entité. Une des espèces les plus utilisées par les Amérindiens est *Echinacea purpurea* (Echinacée pourpre) afin de lutter contre les infections lors des blessures, la toux ou encore les maux d'estomac. Plusieurs études ont montré que la consommation préventive de la plante permet de stimuler les défenses immunitaires⁴¹⁻⁴³. Une autre espèce très consommée par les populations est *Hydrastis canadensis* (Hydraste du Canada) qui à ce jour est utilisée en homéopathie. De nombreuses études phytochimiques ont permis de mettre en avant une importante richesse en alcaloïdes contenus dans la plante, particulièrement l'hydrastine utilisé en antihémorragique et dont la synthèse a été brevetée par Bayer⁴⁴.

Comme en Afrique, l'Amérique centrale et du sud, possèdent des cultures en lien avec la médecine traditionnelle très riches. On retrouve une grande variété de plantes utilisées telles que *Ilex paraguariensis* (Yerba mate), *Spilanthes acmella* (Brède mafane) ou encore *Erythroxylum coca* (Coca) dont provient la cocaïne, un puissant psychotrope⁴⁵.

3.3. Médecine Ayurvédique

L'Ayurveda est une médecine alternative originaire de l'Inde. Etymologiquement, « Ayar » signifie vie et « veda » se traduit par sciences, par conséquent Ayurveda signifierait « Sciences de la Vie ». Elle est considérée comme étant à l'origine de toute médecine. Toutes les connaissances et pratiques sont transmises de génération en génération et sont retranscrits dans des milliers de poèmes contenus dans un ancien manuscrit de quatre parties (Rig Veda, Sama Veda, Yajur Veda, Atharva Veda) appelé Veda. Les plantes médicinales les plus célèbres sont par exemple *Cinnamomum camphora* (Camphrier), *Elettaria cardamomum* (Cardamome) ou encore *Santalum album* (Bois de Santal). Les principes utilisés dans cette médecine se basent également sur l'équilibre entre le corps et l'esprit³⁶.

3.4. Médecine traditionnelle chinoise

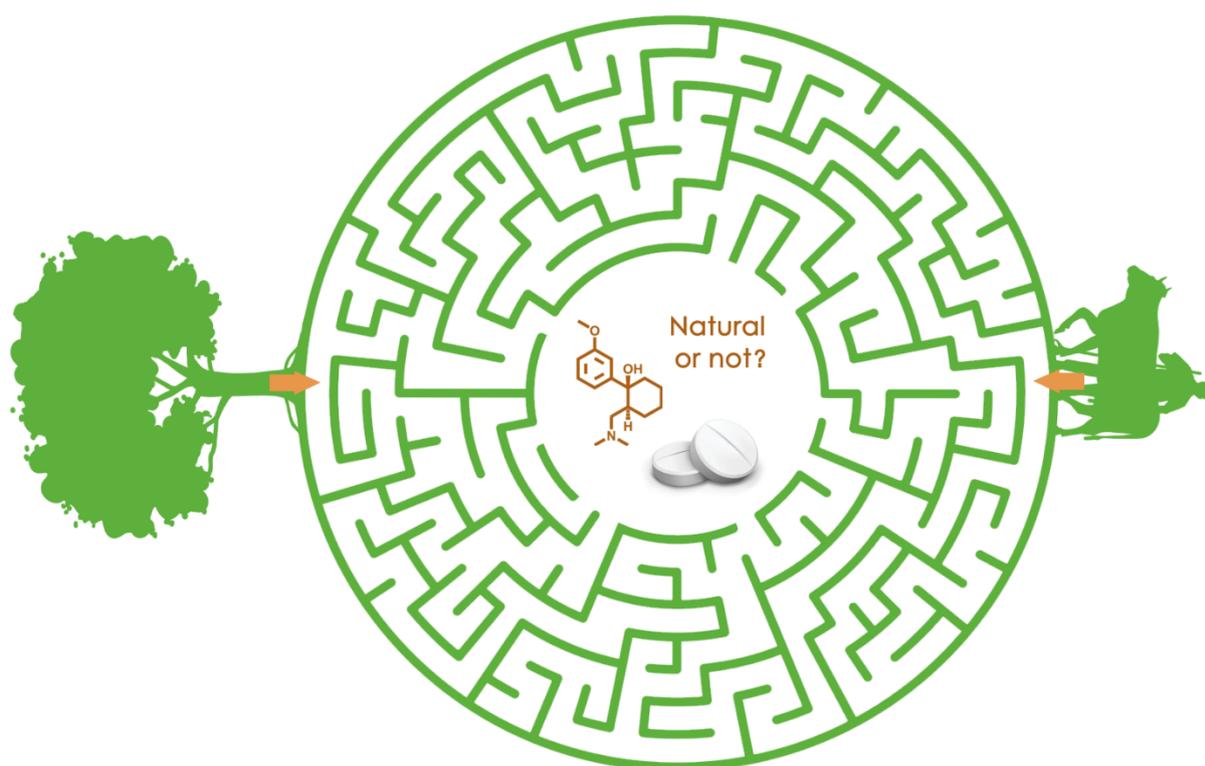
La médecine traditionnelle chinoise (MTC) date de plus de 5000 ans. Elle se base sur deux théories distinctes basées sur la longévité et les lois de la nature : le yin et le yang ainsi que les cinq éléments. Cette médecine est aussi basée sur l'équilibre entre énergie interne et la santé physique. Le manuscrit « Zhong Yao Da Ci Dian » signifiant « Encyclopédie de *Materia Medica* Chinois » est l'œuvre la plus récente et recense environ 6000 médicaments dont 4800 sont issus de plantes.

La MTC se mondialise et attire de plus en plus l'attention des populations occidentales. En 2012, un extrait de *Dioscorea nipponica*, une espèce utilisée en médecine traditionnelle chinoise contre les maux de tête, les crampes et les douleurs musculaires, a été accepté par le *Dutch Medicines Evaluation Board*. Ce fût le premier cas où un produit utilisé dans le domaine de la médecine chinoise ait été introduit en Europe⁴⁶. A ce jour, la MTC est indissociable du système de santé chinois, de plus elle a réussi à obtenir une approbation importante en tant que médecine alternative dans les pays occidentaux. Dans le monde, il est estimé que 1,5 milliards de personnes y a recours⁴⁷. Evidemment, on ne peut pas évoquer la MTC sans mentionner une nouvelle fois l'*Artemisia annua* dont l'investigation a permis l'isolement de l'artémisinine, puissant antipaludique.

CHAPITRE 4 : Présentation des projets de thèse

Cette thèse s'inscrit dans le domaine de la phytochimie et de la pharmacognosie. Elle a été entreprise dans le cadre de l'intérêt du Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Grenoble-Alpes pour les composés bioactifs d'origine naturelle.

Le premier volet forme la part majeure et le cadre initial de ce travail. Il consiste en l'étude phytochimique de *Nauclea latifolia*, plante africaine utilisée dans la médecine traditionnelle. En particulier, ce volet est axé sur l'isolement du tramadol à partir des racines de cette plante et confirmation de l'origine naturelle de ce composé. En effet, en 2013, l'investigation phytochimique d'un extrait méthanolique des racines de l'arbuste a permis l'isolement du tramadol, analgésique commercial depuis les années 1970⁴⁸. Ce cas a été très largement médiatisé, ce qui engendra la curiosité de nombreux laboratoires, spécifiquement un laboratoire de l'université de Dortmund suggérant que la présence du composé serait due à une contamination anthropogénique^{49,50}. L'objectif de notre projet est de démontrer l'origine naturelle ou synthétique du composé par la purification d'extraits de nouveaux lots de *Nauclea latifolia* et effectuer des analyses de masse isotopique ¹⁴C sur les échantillons isolés.



Représentation de la controverse sur l'origine du tramadol.

Le second volet de cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet mené par le laboratoire en vue de la valorisation de la flore alpine locale en tant que source de molécules bioactives. Nous avons initié l'étude de deux plantes alpines vivant dans un environnement contraignant. La première est une espèce de la famille des *Cistaceae* appelée *Helianthemum nummularium* dont les parties aériennes sont surreprésentées dans le régime alimentaire des ongulés des Alpes^{51,52}. Cette surconsommation peut être expliquée par deux hypothèses : 1) les valeurs nutritionnelles de la plante ou 2) les ongulés consomment cette plante dans un but d'automédication. Notre objectif était de conduire une étude phytochimique afin de faire la lumière sur un lien entre une possible automédication des ongulés et des métabolites secondaires exprimés par la plante.



Helianthemum nummularium (parties aériennes) et *Rupicapra rupicapra* (chamois).

La deuxième plante visée est *Chenopodium bonus-henricus*, une espèce utilisée dans le secteur alimentaire traditionnel et dont la composition chimique est encore peu connue. L'objectif est d'isoler de nouveaux métabolites biologiquement actifs afin de valoriser la flore alpine en tant que réservoir de composés d'intérêt.



Parties aériennes de *Chenopodium bonus-henricus*. (Source photos : Creative Commons SL-NC-SA)

Enfin, quelques travaux connexes ont été développés en marge des deux volets soulignés ci-dessus. Une étude a été portée sur la modification chimique de molécules naturelles bioactives en vue de produire de la diversité moléculaire tout en améliorant les propriétés physicochimiques.

Ces projets ont été réalisés dans le cadre d'un réseau de collaboration national et international.

**Collaborateurs
*Nauclea latifolia***

Pr. Jean-Luc Wolfender
Dr. Richard Robins
Dr. Michel De Waard
Pr. Mchèle Boitel
Dr. Germain Sotoing Taiwe

Université de Genève
 Université de Nantes
 Université de Nantes
 Université d'Amiens
 Université de Buea

**Collaborateurs
Plantes alpines**

Pr. Christiane Gallet
Maxime Rome
Dr. Isabelle Hininger

Université Savoie-Mont Blanc
 Station Alpine Joseph Fourier
 Université Grenoble-Alpes/Denver

CHAPITRE 5 : Travaux personnels

5. 1. Isolement du Tramadol des racines de *Nauclea latifolia*

5.1.1. Le genre *Nauclea* en Afrique sub-saharienne

L'Afrique sub-saharienne possède l'un des écosystèmes les plus riches de la planète avec une diversité unique de plantes médicinales⁵³. Depuis des siècles, les populations locales utilisent ces plantes en médecine traditionnelle⁵⁴. Parmi ces plantes, on retrouve la famille des *Rubiaceae* incluant le genre *Nauclea* qui compte sept espèces en Afrique : *N. latifolia*, *N. diderrichii*, *N. pobeguinii*, *N. vanderguchtii*, *N. gilletti*, *N. nyasica* et *N. xanthoxylon*⁵⁵. En Afrique subsaharienne, on retrouve essentiellement les espèces *N. latifolia*, *N. diderrichii* ainsi que *N. pobeguinii*, et à moindre mesure les espèces *N. vanderguchtii*, *N. gilletti* et *N. xanthoxylon*. Une seule espèce, le *N. nyasica* est retrouvé dans les pays d'Afrique orientale tels que la Tanzanie, le Mozambique et le Malawi⁵⁶ (**Figure 13**). En ethnopharmacologie africaine, le genre *Nauclea* est très représenté à travers les espèces les plus répandues *N. latifolia*, *N. diderrichii* et *N. pobeguinii* tandis qu'on ne retrouve que très peu de données sur les autres.

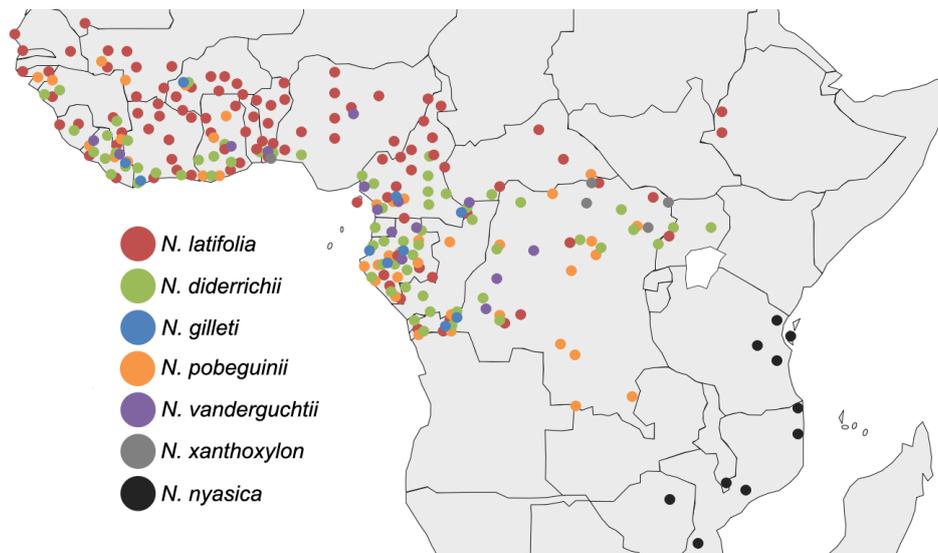


Figure 13. Répartition géographique des espèces de *Nauclea* en Afrique⁵⁵.

Les guérisseurs traditionnels ainsi que les herboristes recommandent fortement la consommation des espèces phares *N. diderrichii*, *N. pobeguinii* et *N. latifolia*, seules ou en préparation avec d'autres plantes, En effet, ces trois espèces sont très utilisées pour lutter contre de multiples pathologies qui sont représentées dans le **Tableau 1**. Dans ce manuscrit,

nous nous intéresserons à leurs utilisations dans le traitement de la malaria ainsi qu'à leurs usages en tant qu'analgésiques.

L'usage traditionnel le plus répandu est celui qui concerne le traitement du paludisme. A ce jour, cette pathologie parasitaire est l'une des maladies les plus meurtrières en Afrique sub-saharienne. En 2018, il a été estimé que 228 millions de personnes sont atteintes de paludisme dont la grande majorité est en Afrique⁵⁷. Afin de lutter contre cette maladie, plusieurs études cliniques ont été réalisées sur des préparations médicinales antipaludiques à base de *Nauclea*. En effet, au Nigéria le *National Institute for Pharmaceutical Research and Development* en collaboration avec l'Organisation Mondiale de la Santé a créé NIPRD-AM1® à base d'extrait aqueux lyophilisé des racines de *Nauclea latifolia*^{58,59}. Les essais cliniques ont pu démontrer des effets antipaludiques de l'extrait standardisé ingéré seul ou en combinaison avec le métronidazole, un médicament antiparasitaire⁶⁰. Par ailleurs, deux autres médicaments traditionnels sont proposés en République Démocratique du Congo, le premier est une combinaison d'un extrait de *N. latifolia* avec *Cassia occidentalis* commercialisé sur le marché local sous le nom de Manalaria®^{61,62}. Le deuxième phytomédicament contient principalement des extraits de *N. pobeguinii* et est commercialisé sous le nom de PR 259 CT1⁶³⁻⁶⁵.

Le genre *Nauclea* est également très reconnu pour ses propriétés analgésiques. Par exemple, les extraits de *N. latifolia* sont consommés pour traiter les maux de ventre et d'estomac⁵⁵ tandis que *N. diderrichii* (racines, feuilles et fruits) est utilisé pour les traitements de maux crâniens et dentaires⁶⁶. Par ailleurs, les espèces *N. latifolia* (feuilles et sève) et *N. diderrichii* (tronc, écorces, racines et fruits) sont consommées pour traiter des problèmes digestifs tels que les maux d'estomac⁶⁶⁻⁷².

En 2004, Okiemy-Andissa et al. ont réalisé la première évaluation de l'activité analgésique des extraits aqueux et hydroalcoolique des parties aériennes de *N. latifolia* via l'induction de douleurs par l'acide acétique et le test de la plaque chauffante sur des souris. Le premier test a montré que les souris ayant ingéré les extraits de la plante avaient un nombre de réactions à la douleur inférieur comparé aux souris traitées avec du paracétamol⁷³. Par ailleurs, un macérât aqueux des écorces des racines a montré une inhibition de contractions abdominales (induites par l'acide acétique) des souris similaire à celle de l'aspirine⁷⁴. Seule le strictosamide, composé majoritaire retrouvé dans les extraits de *Nauclea* a été évalué pour ses propriétés analgésiques et n'a malheureusement présenté aucune activité⁵⁵.

Tableau 1. Utilisations médicinales principales des espèces Africaines du genre *Nauclea*. Adapté à partir de Haudecoeur et al.⁵⁵.

Pathologies	Espèces	Partie de la plante	Pays	Mode d'administration
Antipaludique	<i>N. diderrichii</i>	E	Bénin	Voie orale
		E, R, Fr	Cameroun	nd
		nd	Côte d'Ivoire	nd
		E, R, Fr	Nigéria	nd
	<i>N. latifolia</i>	R	Bénin	Voie orale
		R, T, Fl	Burkina Faso	nd
		E, R	Cameroun	Voie orale*
		R	R. D. Congo	nd
		R, E	Ghana	Voie orale
		R, E, Fl	Guinée	nd
		E, Fl, R	Mali	Voie orale et bains
		R, E, Fl, T	Nigéria	Voie orale*
		nd	Sénégal	nd
		F	Sierra Leone	Voie orale* et bains
R, PA	Togo	Voie orale		
<i>N. pobeguinii</i>	E	R. D. Congo	nd	
	E	Guinée	nd	
	Fl	Mali	Voie orale et bains	
Anthelminthique	<i>N. diderrichii</i>	E	R. D. Congo	Lavement et voie orale
	<i>N. latifolia</i>	R, E	Angola	Lavement et voie orale
R		Congo	nd	
T, Fl		Nigéria	nd	
Fl, R		Sierra Leone	Voie orale et application sur le ventre	
PA		Togo	nd	
	<i>N. pobeguinii</i>	E	R. D. Congo	nd
	Jaunisse	<i>N. diderrichii</i>	B	Gabon
<i>N. latifolia</i>		Fl, R, T, Fr	Nigéria	Voie orale

Fièvre jaune	<i>N. latifolia</i>	R, F	Nigéria	Voie orale
Antimicrobien	<i>N. latifolia</i>	E	Guinée	Voie orale
		Fl, Fr, E, R	Mali	nd
		R	Ouganda	Voie orale
		nd	Nigéria	nd
		R, Fl	Burkina Faso	nd
		<i>N. pobeguinii</i>	E	Guinée
Maux d'estomac	<i>N. diderrichii</i>	E, R, Fr, T	Cameroun	nd
		<i>N. latifolia</i>	Fr, E, R	Cameroun
		R, T, R, Fr	Nigéria	nd
		E, T, R, Fr	Ghana	Voie orale et bains
		Fl	Burkina Faso	nd
		R	Togo	Voie orale
Maux de tête	<i>N. diderrichii</i>	E, R, Fr	Cameroun	nd
		<i>N. latifolia</i>	Fl	Mali
		nd	Gabon	nd
Maux abdominaux	<i>N. latifolia</i>	E	Nigéria	nd
		nd	Gabon	nd
		R, Fl, Fr	Burkina Faso	nd
		E, R	Mali	Voie orale et lavement
		R	R. D. Congo	nd
		Fl, R	Sénégal	nd
		R	Angola	Voie orale et lavement
		R	Gambie	nd
		<i>N. pobeguinii</i>	E	R. D. Congo
Fièvre	<i>N. diderrichii</i>	nd	Cameroun	nd
		E, R, T	Afrique centrale	nd
		nd	R. D. Congo	nd
	<i>N. latifolia</i>	E, T, R, Fr, Fl	Nigéria	nd
		E, R	Gambie	nd

Anti-diabétique	<i>N. diderrichii</i>	E	Cameroun	Voie orale
	<i>N. latifolia</i>	R	Bénin	nd
		R	R. D. Congo	Voie orale
		E	Côte d'Ivoire	Voie orale
		E, Fl, R, Fr	Guinée	nd
	<i>N. pobeguinii</i>	E, Fl	Guinée	nd

E : Ecorces, R : Racines, Fl : Feuilles, Fr : Fruits, T : Tronc, PA : Parties Aériennes, B : Bois, nd : pas de données. *Combinaison avec d'autres espèces

Le genre *Nauclea*, très utilisé en médecine traditionnelle, a suscité beaucoup d'intérêt visant l'investigation phytochimique de ses différentes espèces. L'analyse de la littérature scientifique a révélé la présence de plusieurs familles de métabolites secondaires comme des stéroïdes, des saponines, des composés phénoliques et des alcaloïdes⁵⁵.

En 1953, les premières molécules découvertes dans le genre *Nauclea* ont été des stéroïdes : β -sitostérol ainsi que son dérivé palmitate à partir du bois de *N. diderrichii*⁷⁵. Par la suite, des investigations plus approfondies ont permis d'identifier de nombreux esters gras, dérivés du β -sitostérol⁷⁶ ainsi que deux formes glycosylées à partir des racines de *N. latifolia*^{77,78}. De plus, le squalène, le précurseur biogénétique des stéroïdes a également pu être isolé de ce dernier⁷⁸. Parmi les terpènes retrouvés, plus d'une dizaine sont des saponines dérivant de l'acide quinovique, isolées à partir de *N. diderrichii* (écorces)⁵⁵, *N. pobeguinii* (racines et écorces)^{79,80} et *N. latifolia* (racines)^{78,81} (**Figure 14**).

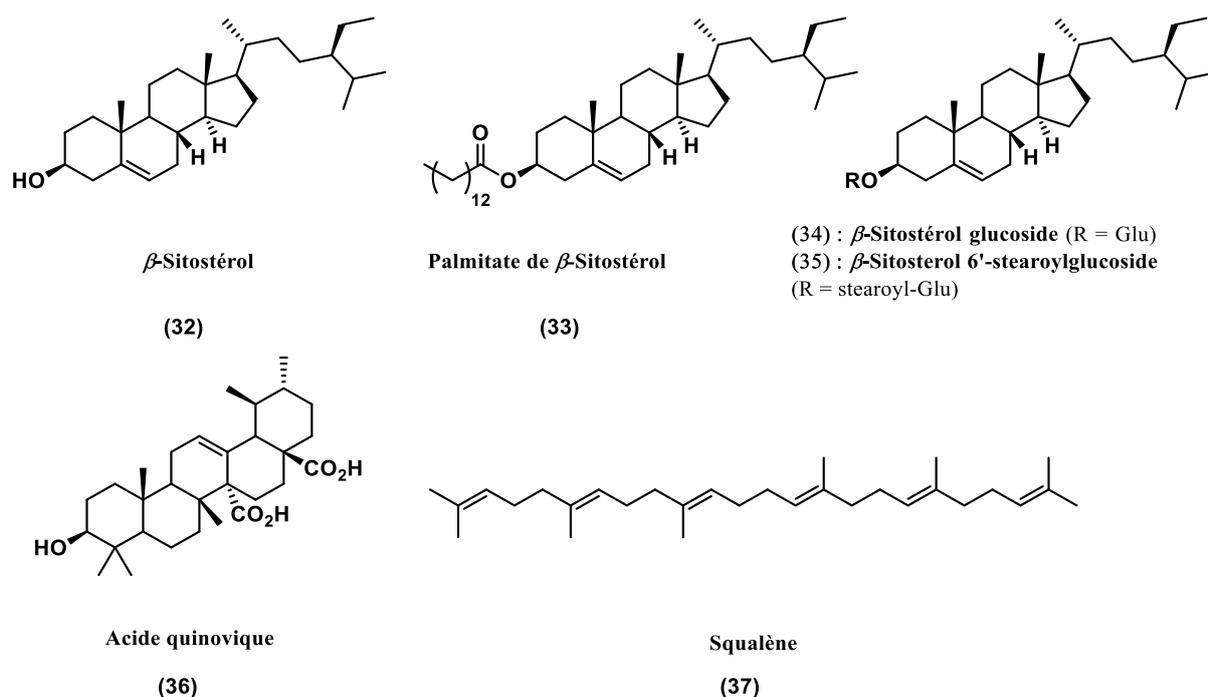


Figure 14. Exemples de terpènes isolés à partir du genre *Nauclea*.

A ce jour, seulement six composés phénoliques ont été rapportés dans les espèces de *Nauclea* : le resvératrol et son dérivé glycosylé, l'acide *para*-coumarique, l'antiarol, le kelampayoside A ainsi que la scopolétine⁸²⁻⁸⁵ (Figure 15).

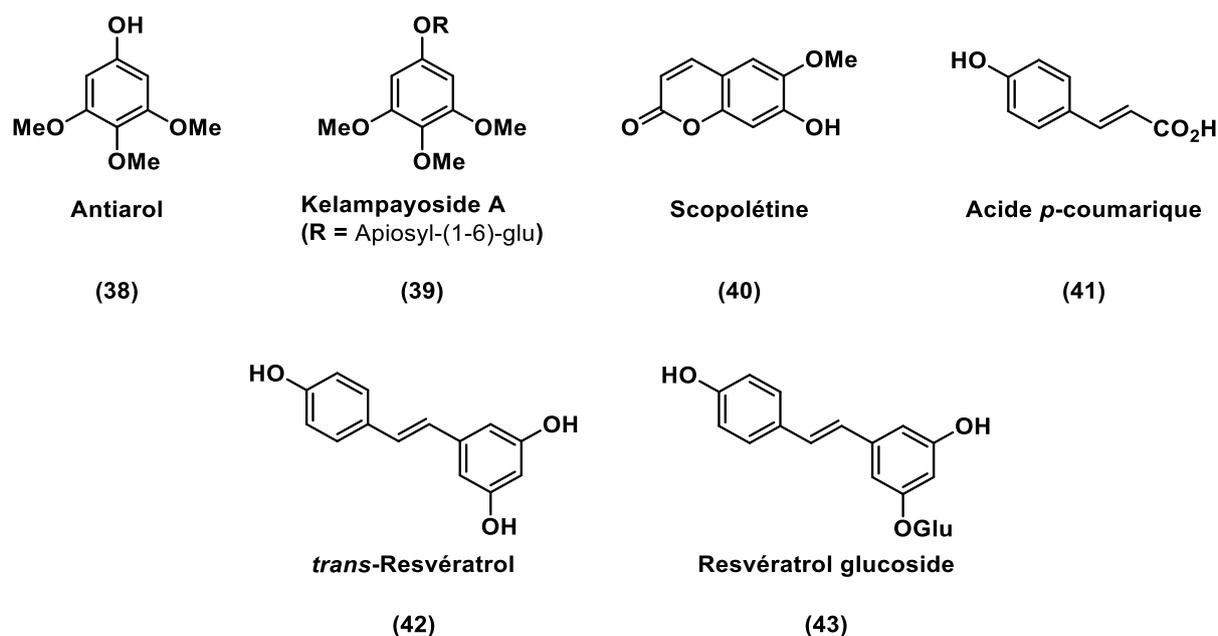


Figure 15. Structures des polyphénols isolés dans le genre *Nauclea*.

L'investigation phytochimique des espèces *N. diderrichii*, *N. latifolia* et *N. pobeguinii* a permis de mettre en évidence la présence d'une large variété d'alcaloïdes indoliques dérivés de β -carbolines et notamment des indolo[2,3-a]quinolizidines^{79,84,86-89}.

Parmi cette classe de molécules, on retrouve 14 structures dérivées de la naocléfine telles que l'angustoline, l'angustine ou encore les latifoliamides D et E. Une grande partie de ces alcaloïdes ont comme précurseur biosynthétique le strictosamide dont les quantités retrouvées sont de l'ordre de 0,85 % dans *N. pobeguinii* et 1,7 % dans *N. latifolia*. Ces grands rendements laissent soupçonner que le strictosamide serait le principe actif responsable de plusieurs activités pharmacologiques. De nombreux analogues ont pu être identifiés comme par exemple les latifoliamides B et C (troncs et écorces de *N. latifolia*)⁸⁹, la naocléidinal (racines de *N. latifolia* et écorces du tronc de *N. pobeguinii*)^{83,84} et la naocléfolinine (racines de *N. latifolia*)⁷⁸ (**Figure 16**).

D'autres alcaloïdes indolo[2,3-a]quinolizidines avec des structures variées ont été isolés dans différentes parties de *N. latifolia* et *N. pobeguinii*. Parmi ces molécules, on retrouve les naocléamides A, B, D et E (écorces, bois et racines de *N. latifolia*)^{81,90}, la latifoliamide A (écorces et tronc de *N. latifolia*)⁸⁹ ainsi que la naocléquiniine (racines de *N. pobeguinii*)⁵⁵ (**Figure 16**).

De nombreux alcaloïdes voisins des indolo[2,3-a]quinolizidines avec une structure comportant un cycle à sept atomes ont également pu être mis en évidence. On peut citer les analogues proches de la cadambine (feuilles de *N. latifolia*) ou de la naufoline (feuilles de *N. latifolia*)⁸⁷. Les structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Nauclea* sont représentées dans la **Figure 16**.

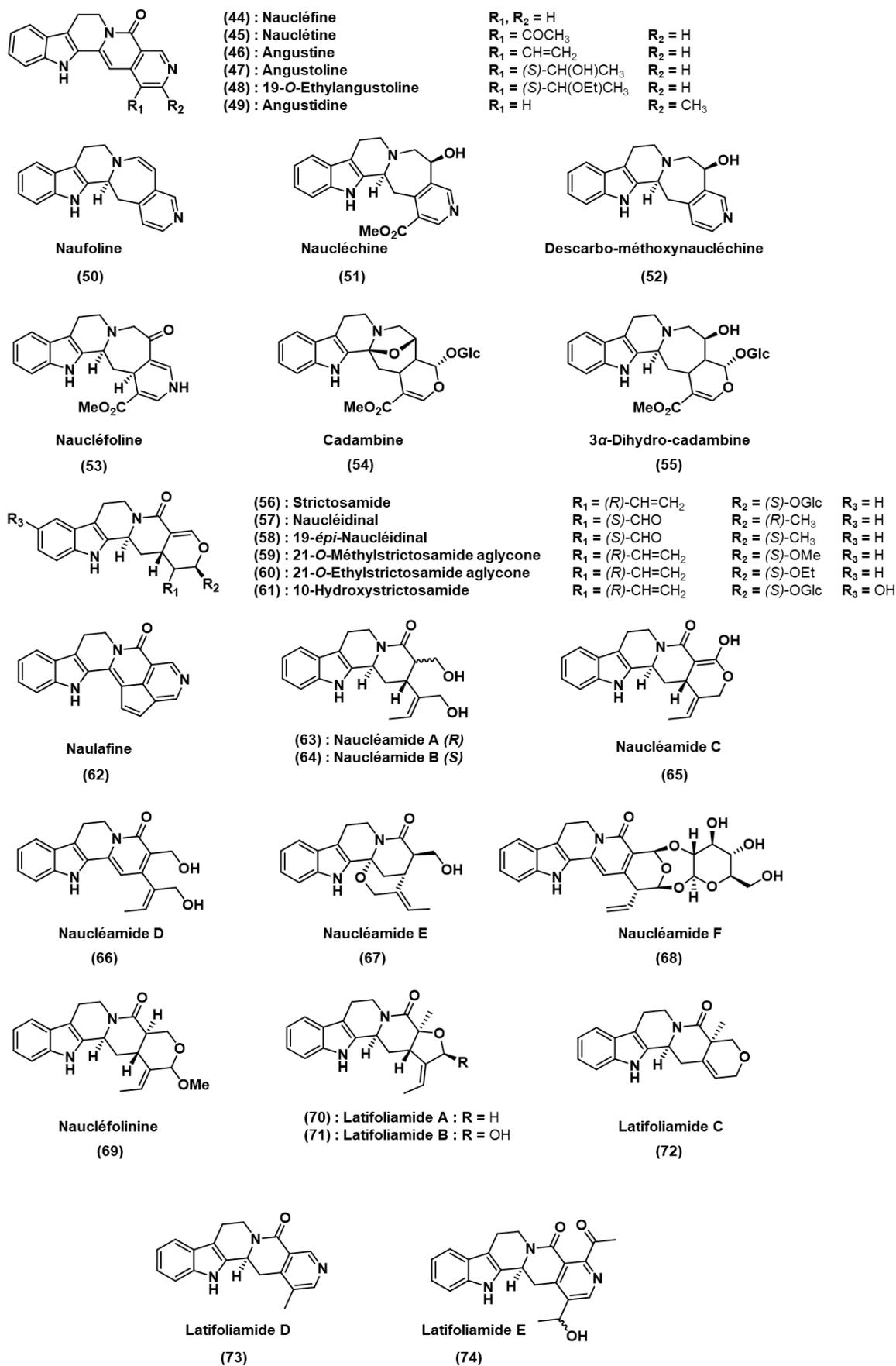


Figure 16. Structures des alcaloïdes isolés dans le genre *Nauclea*. Adapté à partir de Boucherle et al⁹¹.

5.1.2. Découverte du tramadol dans les racines de *Nauclea latifolia*

Nauclea latifolia (Sm.) est un arbuste appartenant à la famille des *Rubiaceae*, très répandu en Afrique subsaharienne. Il peut mesurer jusqu'à 12 mètres de haut et ses feuilles sont présentes toute l'année. D'avril jusqu'à juin, les arbres commencent à fleurir et les fleurs se présentent sous forme sphérique et de couleur jaunâtre. Elles sont regroupées en inflorescence de type cyme multipare. A partir de juillet, les fruits ressemblant à des pêches commencent à mûrir, d'où son appellation de « pêcher africain » (**Figure 17**).

Comme énoncé précédemment dans le genre *Nauclea*, plusieurs parties de la plante (racines, écorces, feuilles, fruits) sont utilisées dans des infusions ou décoctions pour traiter différentes pathologies telles que la malaria, la fièvre, les crises d'épilepsie ou encore en tant qu'antidouleur⁹¹.



Figure 17. *Nauclea latifolia* : 1) Arbre, 2) Parties aériennes et fruits, 3) Racines.

En Afrique sub-saharienne, les décoctions des racines et des écorces de racines sont utilisées pour traiter les douleurs⁹². Les études que l'on retrouve sur l'activité anti-nociceptive de *N. latifolia* portent sur des tests effectués sur des souris ayant ingéré une certaine quantité d'extraits puis soumises au test de la plaque chauffante. Par exemple, les résultats obtenus avec les extraits hydroalcoolique et alcoolique des parties aériennes (les temps de réaction à la

douleur induite sont de respectivement 35 et 33 secondes et de 5,2 secondes pour une souris non traitée) démontrent une grande activité de la plante sur la perception de la douleur⁷⁴. Par ailleurs, d'autres études ont montré une bonne activité analgésique d'un extrait aqueux des écorces de racines de *N. latifolia*⁹².

L'investigation d'un extrait méthanolique des racines de *Nauclea latifolia* guidé par des tests réalisés sur plusieurs modèles de la douleur chez la souris, a permis d'identifier une fraction fortement active. La purification et l'analyse structurale des molécules contenues dans la fraction active a permis l'identification du (±)-2-[(diméthylamino)méthyl]-1-(3-méthoxyphényl)cyclohexanol. Ce dernier correspond à la structure du tramadol, un analgésique développé et commercialisé par la société Grünenthal GmbH (Allemagne) depuis 1977 sous sa forme racémique⁴⁸. Il est commercialisé sous plusieurs noms de spécialités : Nobligan[®], Tiparol[®], Topalgic[®], Tradolan[®], Tramal[®], Ultram[®] et Ixprim[®] (**Figure 18**).

Le tramadol est à ce jour mondialement utilisé pour traiter les douleurs d'intensité moyenne à intense^{93,94}. Il agit sur les mêmes types de récepteurs que la codéine ou la morphine. Ses effets anti-nociceptifs sont due à un double mécanisme d'action : 1) agoniste des récepteurs opiacés et 2) inhibiteur de la recapture de la norépinéphrine et de la sérotonine⁹⁵. Il peut être administré par voie orale, intraveineuse, voie sous-cutanée, ou intramusculaire. Il possède des propriétés analgésiques 6000 fois moins puissantes que celles de la morphine et 10 fois moins puissantes que la codéine^{94,96}.



Figure 18. Structure du tramadol et exemples de spécialités contenant du tramadol.

Le tramadol a été conçu à partir de la structure d'un analgésique majeur d'origine végétale, la codéine. A partir des éléments pharmacophoriques de la codéine et dans une démarche de simplification moléculaire, la structure du tramadol a été proposée puis synthétisée (**Figure 19**).

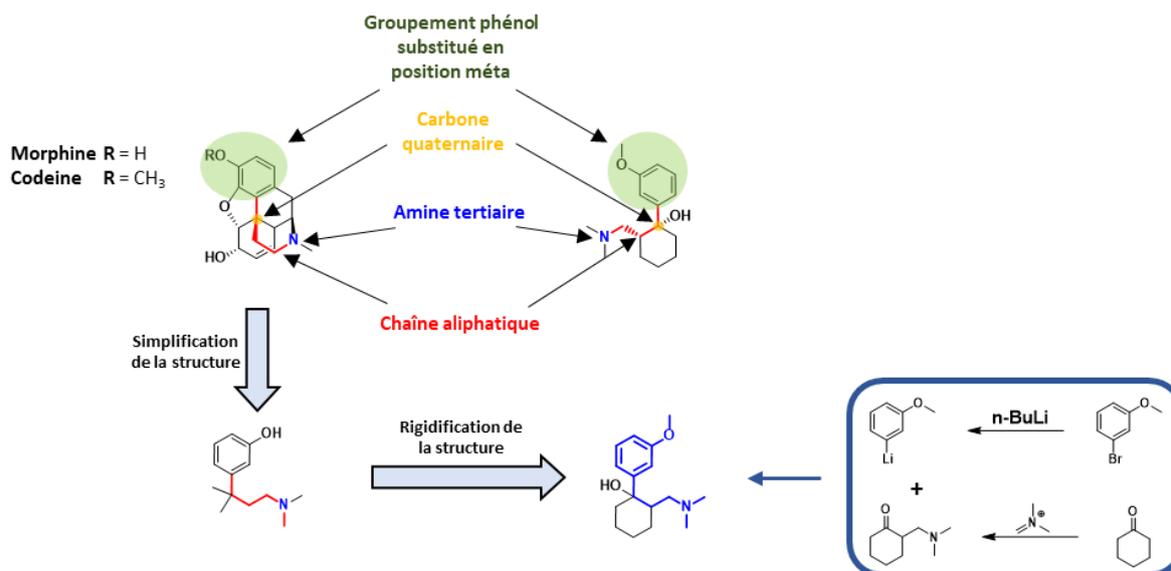


Figure 19. Conception et synthèse du tramadol⁹³.

Contrairement aux antidouleurs tels que le paracétamol ou l'aspirine, les opiacés comme la morphine, la codéine, le fentanyl et le tramadol peuvent entraîner de fortes dépendances⁹⁷. L'usage abusif de ces substances est devenu un problème majeur dans notre société. Plusieurs régions du monde (Amérique du Nord, Europe, Moyen-Orient et Afrique) sont particulièrement concernées par les problèmes d'addiction aux opiacées. En Afrique de l'Ouest, le tramadol est de loin le plus répandu et le plus consommé, il est vendu au marché noir où on peut l'acheter à des dosages non conventionnels⁹⁸.

A ce jour, deux modes de consommation sont connus : 1) une consommation collective principalement par des jeunes (regroupements festifs, travaux collectifs, pratiques toxicomanes de groupe) et 2) une consommation individuelle (augmentation de la force ou de l'endurance pour un travail physique, résistance à la chaleur, recherche de performances sexuelles...)⁹⁹.

Plusieurs critères peuvent expliquer le succès du trafic et de l'usage du tramadol comparés à d'autres drogues : les sensations obtenues quand il est associé à un autre

médicament, sa facilité de transport et de dissimulation, sa disponibilité dans les officines clandestines et l'indulgence des sanctions auprès des possesseurs de tramadol comparés aux possesseurs de drogues dures. Cependant, son coût est la raison principale de cette consommation. En effet, dans certains pays, le tramadol est vendu à un prix très bas d'où sa qualification de « cocaïne du pauvre »⁹⁹.

Pendant cette décennie, les saisies de tramadol dans les pays d'Afrique de l'Ouest n'ont cessé d'augmenter. Depuis 2012, les saisies ne sont plus comptées en kilogrammes mais en dizaines de tonnes. En 2014, les services mixtes de contrôle portuaire de Cotonou (Bénin) et Tema (Ghana) ont pu saisir 43,5 tonnes de comprimés de tramadol. Plus récemment, les autorités nigériennes ont saisi plus de 50 tonnes en 2016 et 90 tonnes en 2017. Ces chiffres permettent de mettre en évidence la gravité de l'ampleur du trafic de tramadol. Néanmoins, malgré des chiffres plus qu'inquiétants, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) n'a toujours pas placé le tramadol sous contrôle international. Elle aurait plutôt tendance à se focaliser sur les trafics de cocaïne et de méthamphétamines^{98,99}.

Afin de lutter contre ce fléau, en 2010, le Nigéria instaura des conditions plus strictes concernant la distribution du tramadol comme la nécessité d'une prescription médicale pour obtenir le médicament. Le Niger suivit le même exemple en 2013⁹⁹.

En France, en 2017, le tramadol était l'opioïde le plus consommé. Dans le but d'éviter des dépendances au médicament, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a limité les prescriptions de tramadol à trois mois au lieu de douze mois à partir du 15 avril 2020⁹⁷.

L'extraction du tramadol à partir des racines de *Nauclea latifolia* a évidemment été mise à l'épreuve. Premièrement, par sa structure chimique qui à première vue n'est pas évocatrice d'une voie usuelle de biosynthèse chez les végétaux. De plus, la molécule isolée ne dévie pas la lumière polarisée tout comme le tramadol de synthèse, ce qui est rare dans le domaine des produits naturels. En effet, la présence de deux carbones asymétriques devrait conférer à la molécule une activité optique. L'analyse par diffraction des rayons X a révélé que la molécule extraite se présente sous la forme de deux énantiomères, les mêmes présents dans le tramadol de synthèse. Il est rare mais n'est pas exceptionnel que les plantes biosynthétisent des mélanges racémiques.

Afin de s'assurer que le tramadol isolé n'est pas dû à une contamination par du tramadol synthétique, plusieurs études ont été menées. Des prélèvements au cœur de la racine

ont été effectués et ont révélé la présence du tramadol. Par ailleurs, l'isolement a été effectué sur différents lots de *Nauclea latifolia* récoltés de manière indépendante et confirmés par deux autres laboratoires⁴⁸.

Une réflexion sur la voie de biosynthèse du tramadol a également été menée. Il est bien établi que la biosynthèse des alcaloïdes a pour origine le métabolisme d'acides aminés comme la L-lysine, la L-arginine, la L-tyrosine ou le L-tryptophane. Par exemple, dans le cas des alcaloïdes quinolizidiniques, représentés dans le genre *Nauclea*, c'est la L-lysine qui est décarboxylée en cadavérine suivie de la formation d'imines qui conduisent à une réaction entre une molécule de cadavérine sous forme iminium, et une molécule de cadavérine sous forme énamine. Il s'en suit alors une cascade de réactions qui mène à la formation du noyau quinolizidine¹⁰⁰. La biosynthèse du tramadol suivrait donc une voie similaire et résulterait de la réaction entre le dérivé de *N,N*-diméthylaminopentane (**81**), présentée dans le **Schéma 1**, et un partenaire la 3-méthoxyacétophénone, issue de la L-phénylalanine^{100,101}.

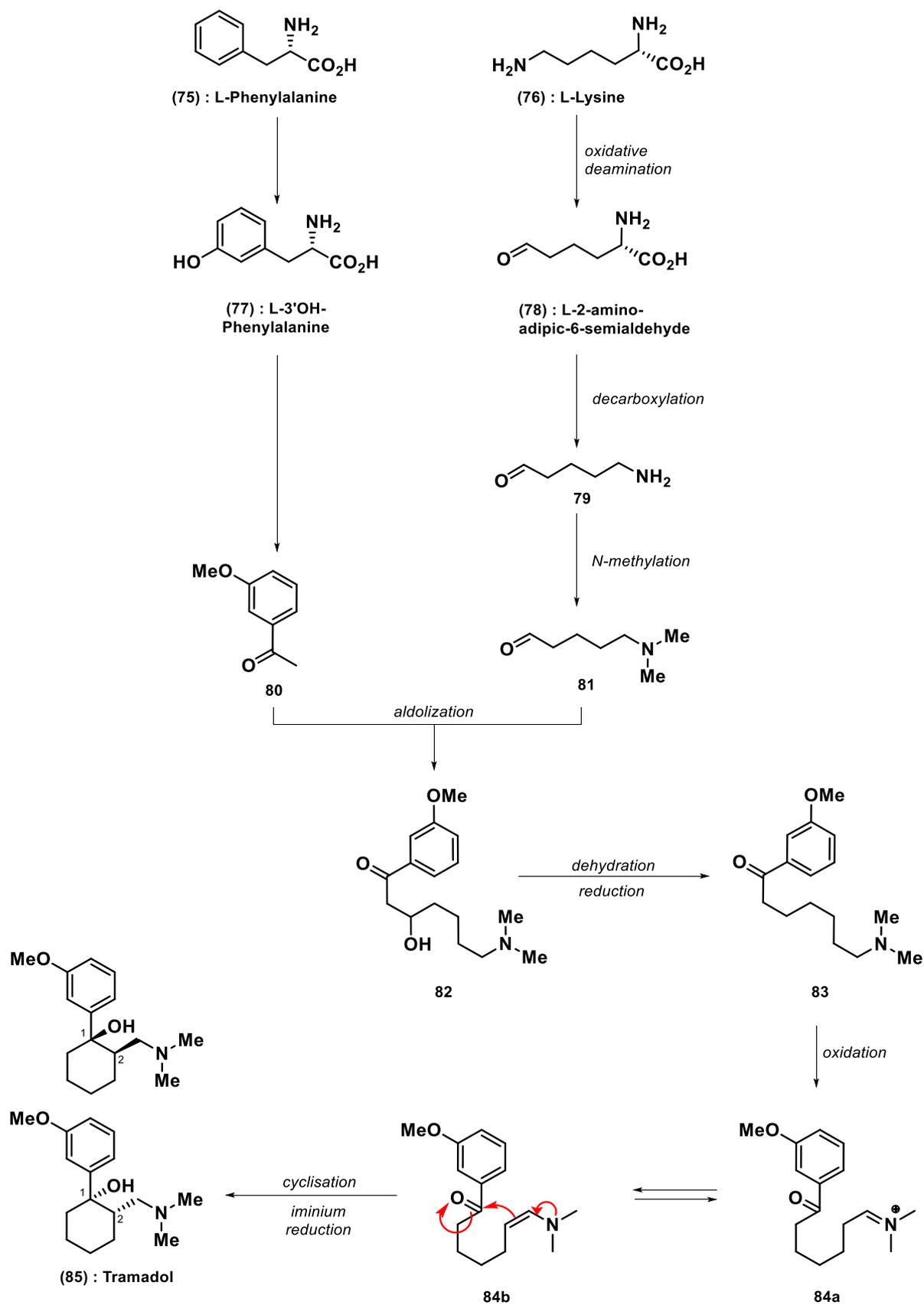


Schéma 1. Schéma de biosynthèse supposée du tramadol¹⁰⁰.

Sur la base de l'hypothèse biosynthétique ci-dessus, une synthèse biomimétique a été menée, notamment pour valider l'étape clé de la biosynthèse : la cyclisation de l'intermédiaire **84b** en tramadol. Pour ce faire, le composé dicarboxylé **86** a été préparé puis transformé en iminium **84a** par une réaction avec la diméthylamine (**Schéma 2**). Le dérivé **84a** peut se transformer en énamine **84b**. Il sera par la suite traité dans des conditions réductrices *via* l'utilisation de NaBH₃CN pour tout d'abord subir une cyclisation suivie d'une réduction pour obtenir le tramadol sous la forme de deux énantiomères, identiques au tramadol isolé. Par conséquent, l'étape clé dans le schéma de biosynthèse du tramadol est possible^{100,101}.

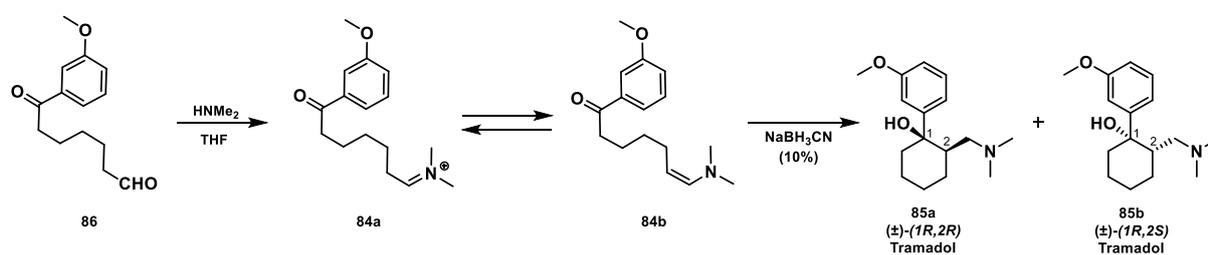


Schéma 2. Schéma de synthèse biomimétique du tramadol¹⁰⁰.

Afin d'investiguer davantage l'origine du tramadol, une analyse isotopique mesurant les ratios ¹⁵N/¹⁴N et ¹³C/¹²C a été effectuée sur le tramadol, isolé et synthétique. Cette étude est basée sur le fait que dans les produits naturels, les isotopes légers tels que le ¹²C et le ¹⁴N sont plus importants face aux isotopes lourds ¹³C et le ¹⁵N par rapport à leurs équivalents synthétiques. Ainsi, les rapports isotopiques ¹⁵N/¹⁴N et ¹³C/¹²C sont souvent utilisés comme un traceur pour différencier l'origine naturelle de l'origine synthétique de la même molécule. Par conséquent, les rapports isotopiques du même composé de deux origines différentes ne doivent pas converger. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire CEISAM (Dr. Richard ROBINS, CNRS et Université de Nantes) et a permis de mettre en évidence une différence de rapports isotopiques entre le tramadol extrait de *N. latifolia* et celui de synthèse¹⁰¹.

Cette découverte a intéressé plusieurs groupes de recherche, notamment une équipe de l'Université de Dortmund dirigée par le Pr. Michael Spiteller qui a retrouvé le tramadol dans des échantillons de *N. latifolia* récoltés au nord du Cameroun mais pas dans des échantillons collectés au sud du pays. Le même laboratoire a mené des enquêtes auprès des habitants du nord pour conclure que le tramadol serait donné au bétail comme produit dopant. Par conséquent, l'étude du groupe de Dortmund a suggéré que la présence du tramadol serait d'origine anthropogénique et proviendrait de la contamination de la plante et de son

environnement (sol et eau) par les déjections des animaux dopés au tramadol^{49,50}. Néanmoins, deux éléments viennent s'opposer à cette hypothèse. Le premier concerne les quantités importantes de tramadol retrouvées dans les racines des lots de *N. latifolia* étudiées à Grenoble (jusqu'à 0,4 %), ce qui n'est pas en accord avec une contamination anthropogénique⁴⁸. En effet, les quantités détectées par le groupe de Dortmund sont 12 000 fois inférieures aux quantités isolées par l'équipe de Grenoble.

Le deuxième élément est lié à l'origine géographique des cueillettes des lots de Grenoble. En effet, les travaux du groupe allemand ont porté sur des échantillons venant de la partie extrême nord du Cameroun tandis que les premiers travaux entrepris par notre laboratoire ont porté sur des lots de *N. latifolia* venant d'une région centrale où les pratiques de dopage des animaux par le tramadol ne sont pas connues. De plus, les collectes de nos échantillons ont été effectués au sein d'un parc protégé (parc naturel de la Bénoué) où les animaux domestiques sont absents. Il est également important de rajouter qu'une telle pratique, si jamais elle existe, serait extrêmement coûteuse pour les fermiers dont les maigres revenus ne permettent pas l'achat du médicament en quantité si importante dans le but de doper leur bétail.

Cette découverte inédite et les réactions contradictoires de la communauté scientifique nous ont conduit à poursuivre nos travaux avec pour objectif de faire la lumière sur l'origine naturelle (ou non) du tramadol. Pour cela, nous avons décidé de mener de nouvelles études selon deux axes :

- 1) Reconduire des travaux d'extraction et de purification sur de nouveaux lots de *Nauclea latifolia* récoltés dans des zones où il n'y a aucune présence humaine ou d'animaux domestiques.
- 2) Réaliser des analyses du taux de ¹⁴C dans le tramadol isolé en comparaison avec le tramadol de synthèse. Cette méthode est actuellement la technique de choix utilisée dans la différenciation de l'origine des molécules naturelles *versus* molécules de synthèse.

5.1.3. Etude de nouveaux lots de racines de *Nauclea latifolia*

Dans l'objectif d'apporter de nouveaux éléments de réponse concernant l'origine du tramadol, douze nouveaux lots de racines de *Nauclea latifolia* ont été récoltés à différents endroits du centre du Cameroun. Les points GPS de récolte de ces nouveaux lots sont représentés dans la **Figure 20**.

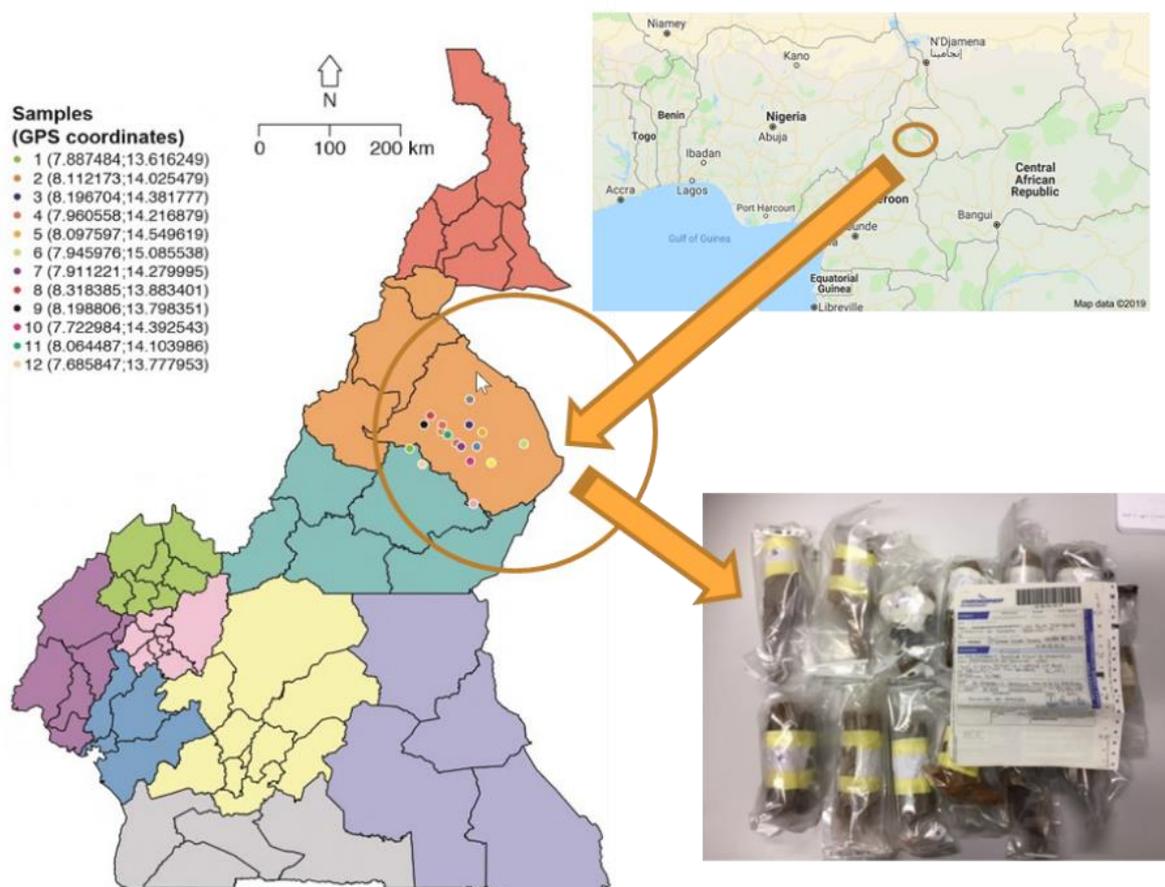


Figure 20. Carte des zones de collecte des nouveaux lots de *Nauclea latifolia*, coordonnées GPS et conditionnement des nouveaux échantillons.

1 g de chaque lot de racines a été broyé en utilisant des systèmes à usage unique pour éviter les contaminations croisées entre échantillons. Par la suite, plusieurs extractions avec du MeOH ont été effectuées puis analysées par UHPLC-HRMS-Orbitrap afin de détecter la présence du tramadol.

Les analyses UHPLC-HRMS effectuées ont montré la présence du tramadol dans tous les lots dont les quantités, mesurées par HRMS (aire du pic), varient selon les échantillons (**Figures 21 et 22**). Ces résultats ont été comparés avec le lot de *Nauclea latifolia* étudié en 2013

à l'origine de la découverte du tramadol (nommé ici HCN herbier, Référence Voucher : 20144/SRF/Cam).

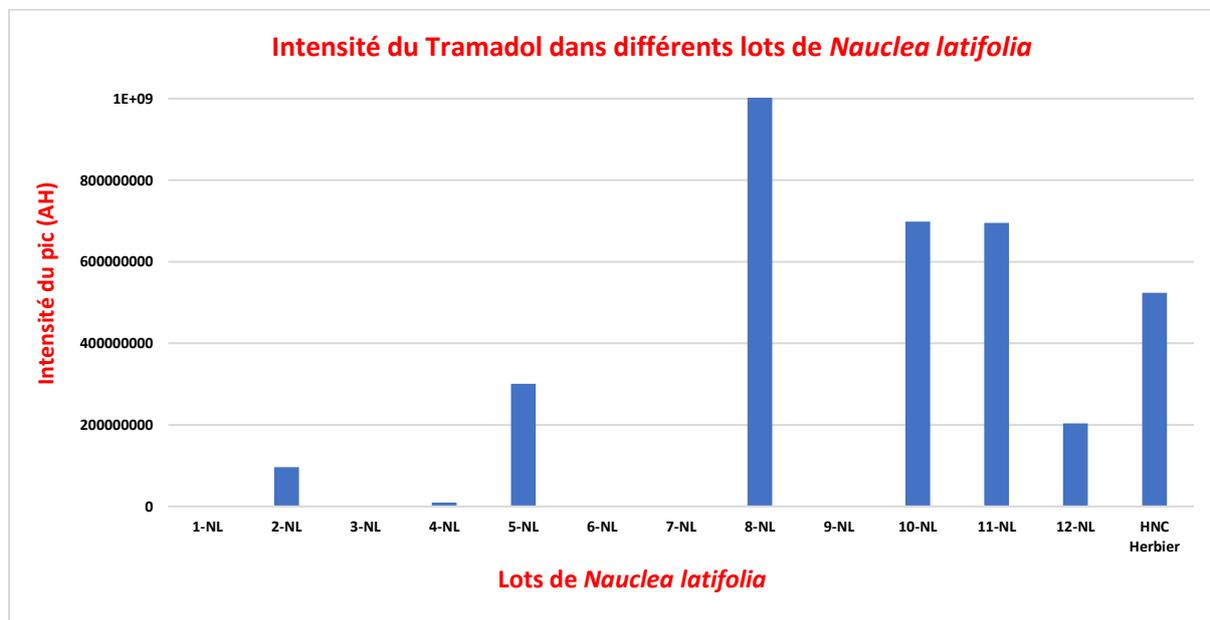


Figure 21. Détection du tramadol dans lots NL. Les lots présentant les plus grandes quantités sont les lots 5-NL, 8-NL, 10-NL, 11-NL et 12-NL. HNC Herbier correspond au lot de racines des premières investigations portées sur l'isolement du tramadol. AH représente l'intensité du pic (*Area Height*).

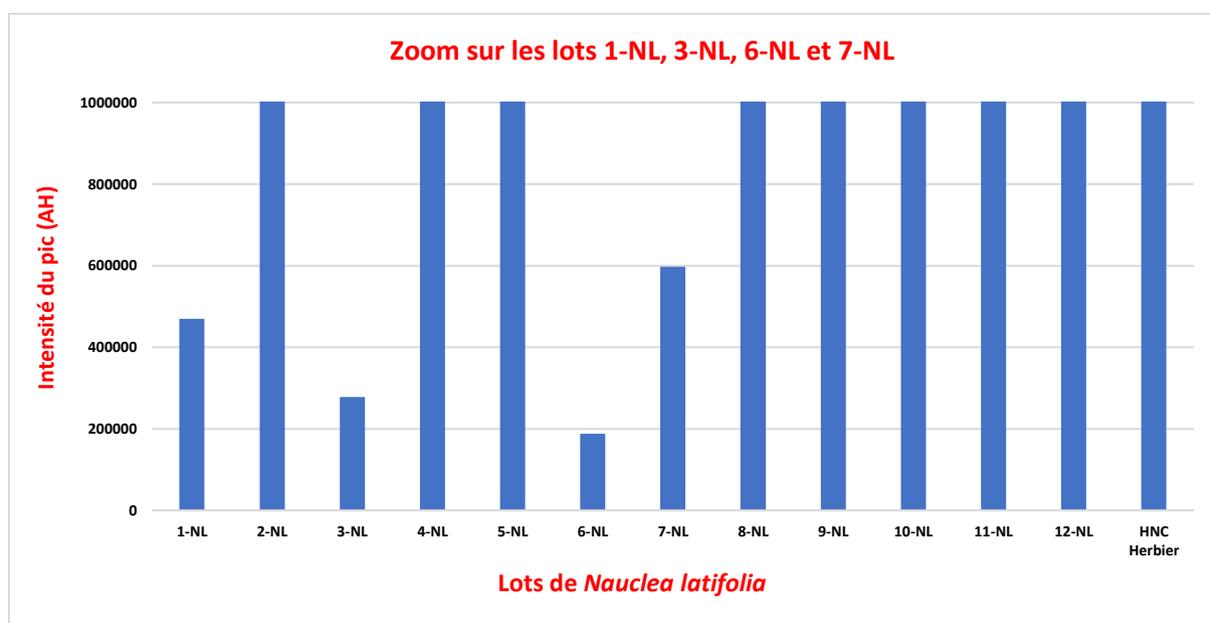


Figure 22. Zoom du diagramme. Détection du tramadol dans les extraits de *Nauclea latifolia*. HNC Herbier correspond au lot de racines des premières investigations portées sur l'isolement du tramadol (Référence Voucher : 20144/SRF/Cam). AH représente l'intensité du pic (*Area Height*).

Le bilan de ce travail extractif a permis de mettre en évidence la présence du tramadol dans tous les lots étudiés, mais à des concentrations très variables. En effet, les profils chromatographiques d'une même plante peuvent différer lorsque celles-ci sont récoltées dans plusieurs zones de collecte. Les conditions environnementales étant différentes (chaleur, fertilité du sol, apport en eau...etc.), la plante peut biosynthétiser préférentiellement une molécule par rapport à une autre, justifiant ainsi la différence de concentration du tramadol dans les différents lots.

Ces résultats présentent un intérêt capital et satisfaisant à notre premier objectif. Afin d'aller plus loin dans l'investigation de l'origine du composé, nous avons sélectionné les lots **5-NL**, **8-NL**, **10-NL**, **11-NL** et **12-NL** qui présentent les plus grandes teneurs en tramadol pour effectuer des purifications.

Les travaux d'extraction et de purification ont été réalisés dans le cadre d'une mobilité sortante soutenue financièrement par l'IDEX.

Ces séjours scientifiques (sept mois au total) ont été supervisés par les Drs. Laurence Marcourt et Emerson Ferreira Queiroz à l'Université de Genève dans le laboratoire de Phytochimie et de Produits naturels bioactifs dirigé par le Pr. Jean-Luc Wolfender. Les quantifications par RMN ^1H (600 MHz) des échantillons ont été réalisées, dans le CD_3OD , suivant la méthode ERETIC (*Electronic REference To access In vivo Concentrations*) de chez Bruker¹⁰².

5.1.3.1. Etude du lot 8-NL

Les racines séchées (50 g) et broyées du lot **8-NL** ont été extraites successivement 6 fois avec 750 mL de MeOH pour obtenir 1,7 grammes d'extrait brut. L'extrait a tout d'abord été soumis à un premier fractionnement par Chromatographie Flash (CF). L'analyse en UHPLC-MS des fractions a permis la réunion de ces dernières en 3 fractions enrichies en tramadol (**8-NL-F₁**, **F₂** et **F₃**). Les purifications des fractions **8-NL-F₁** et **F₂** ont été réalisées par HPLC semi-préparative couplée à un détecteur UV pour obtenir 191 fractions dont 111 contenaient le tramadol. Ce nombre important de fractions collectées est dû au choix du tampon utilisé (Acide formique) dans les solvants HPLC. En effet, la protonation de l'amine tertiaire du tramadol induit une trop grande rétention du composé dans la colonne et a pour conséquence de retrouver le tramadol dans un très grand nombre de fractions (**Figure 23**).

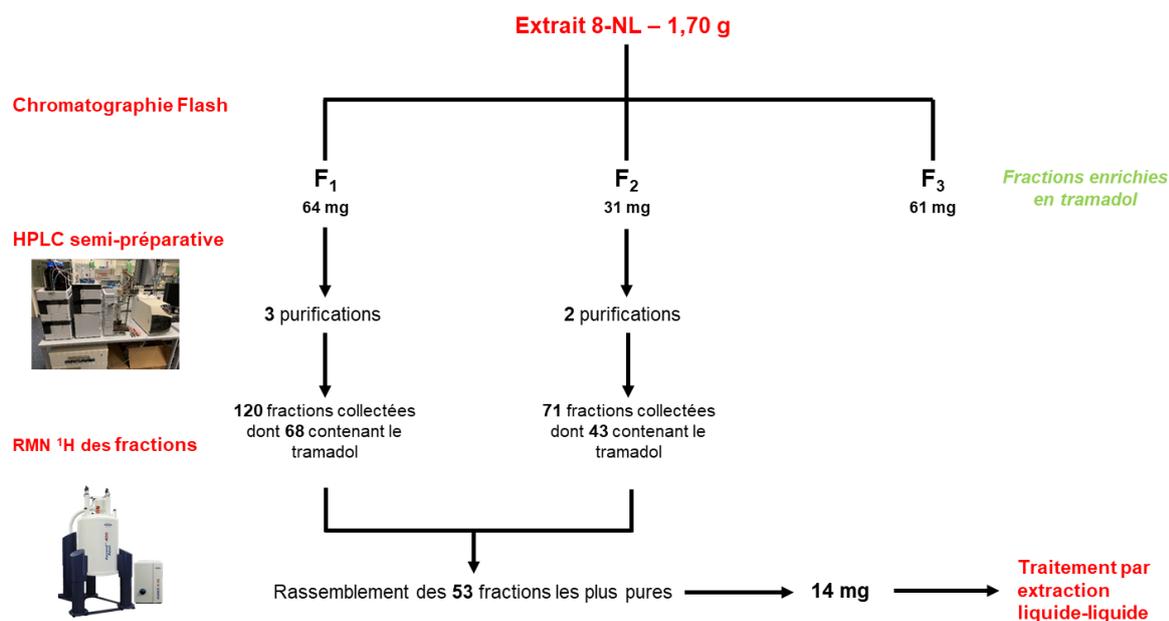


Figure 23. Schéma de purification de l'extrait issu du lot 8-NL.

Le rassemblement des 53 fractions contenant majoritairement le tramadol a permis d'obtenir la fraction F_{Tra} (14 mg) dont le spectre RMN ¹H montre la présence du composé mais contaminé par des impuretés mineures. Devant les difficultés d'élimination des impuretés par chromatographie, nous avons décidé de tirer profit du caractère basique du tramadol et opté pour un traitement acido-basique de la fraction F_{Tra} , similaire à celle utilisée lors de l'extraction des alcaloïdes (1^{ère} étape : Acidification avec HCl à 5%, 2^{ème} étape : traitement par un solvant organique, 3^{ème} étape : Basification de la phase aqueuse avec une solution saturée de Na₂CO₃, 4^{ème} étape : extraction de la phase aqueuse basique par un solvant organique). Ainsi, la fraction F_{Tra} (0,1 – 0,2 mg) dont la quantification par RMN ¹H montra la teneur en tramadol à 0,13 mg (**Figure 24 et 25**).

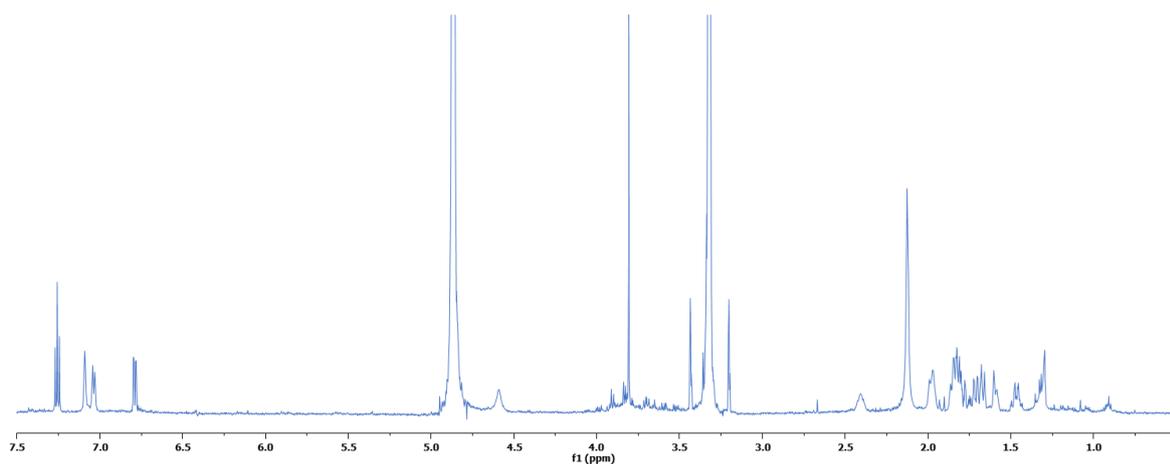


Figure 24. Spectre RMN ^1H de la fraction F_{Tra} avant traitement acido-basique (RMN 600 MHz, CD_3OD).

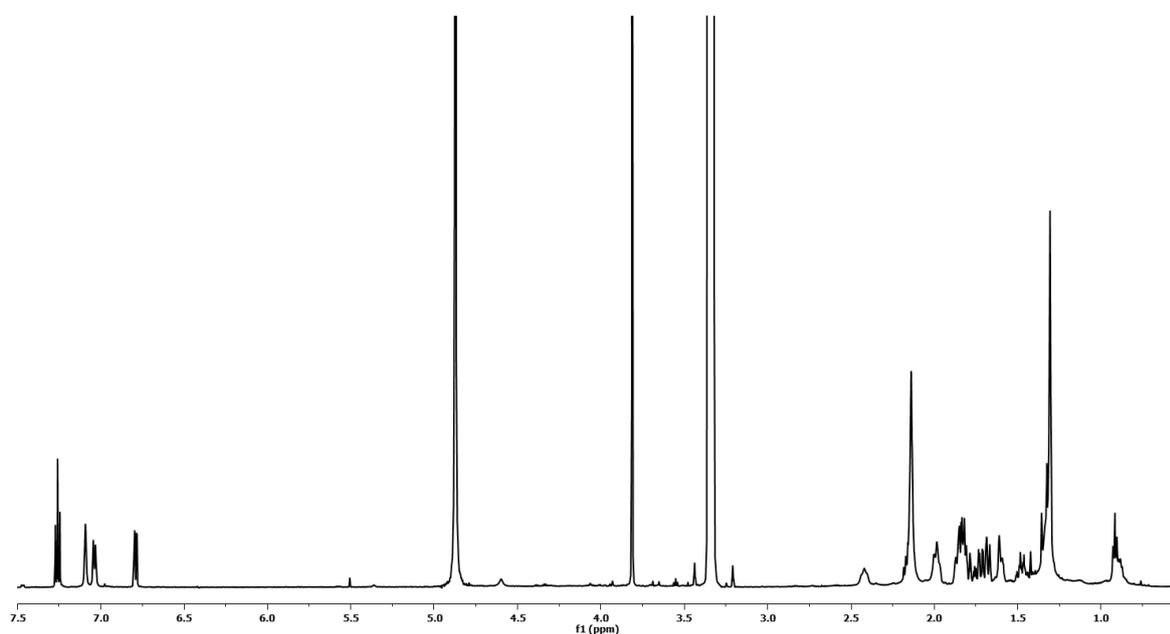


Figure 25. Spectre RMN ^1H de la fraction F_{Tra} après traitement acido-basique (RMN 600 MHz, CD_3OD).

5.1.3.2. Étude du lot 10-NL

Afin d'éliminer un maximum d'impuretés, le lot **10-NL** a été traité de manière à n'extraire que les alcaloïdes (1^{ère} étape : Extraction au MeOH, 2^{ème} étape : acidification avec HCl à 5% de l'extrait, 3^{ème} étape : traitement par un solvant organique, 4^{ème} étape : Basification de la phase aqueuse avec une solution saturée de Na_2CO_3 , 5^{ème} étape : extraction de la phase aqueuse basique par un solvant organique). L'analyse de l'extrait par UHPLC couplée à un spectromètre de masse quadripolaire a montré la présence du tramadol, validant ainsi la nouvelle méthode d'extraction (**Figure 26**).

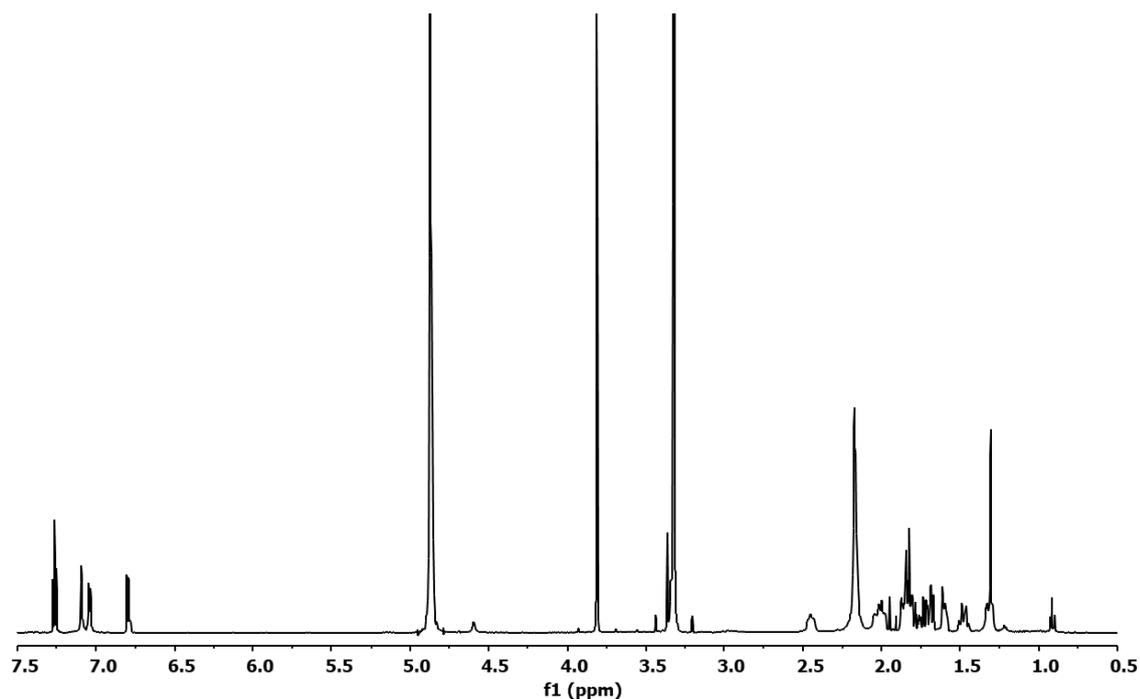


Figure 27. Spectre RMN ^1H du tramadol isolé de l'extrait 10-NL (RMN 600 MHz, CD_3OD).

5.1.3.3. Etude des lots 5-NL et 12-NL

Les extraits méthanoliques issus des lots 5-NL et 12-NL ont été soumis au même traitement que le lot 10-NL afin d'obtenir des extraits alcaloïdiques. Ils ont ensuite été analysés par UHPLC-MS pour s'assurer de la présence du tramadol (**Figure 28 et 29**).

La purification de l'extrait alcaloïdique 5-NL par HPLC semi-préparative a permis l'obtention de 4 fractions contenant du tramadol dont la quantification par RMN a montré une quantité totale de 0,05 mg du composé.

5.1.3.4. Etude du lot 11-NL

Par manque de temps, l'extrait alcaloïdique **11-NL** (132 mg) n'a été soumis qu'à une seule purification (effectuée sur 50 mg) par HPLC semi-préparative dont la quantification des fractions obtenues montre une quantité globale de 0,09 mg de tramadol. Compte tenu de la masse restante de l'extrait, des efforts de purification sont encore possibles pour obtenir une quantité suffisante pour les analyses de masse isotopique.

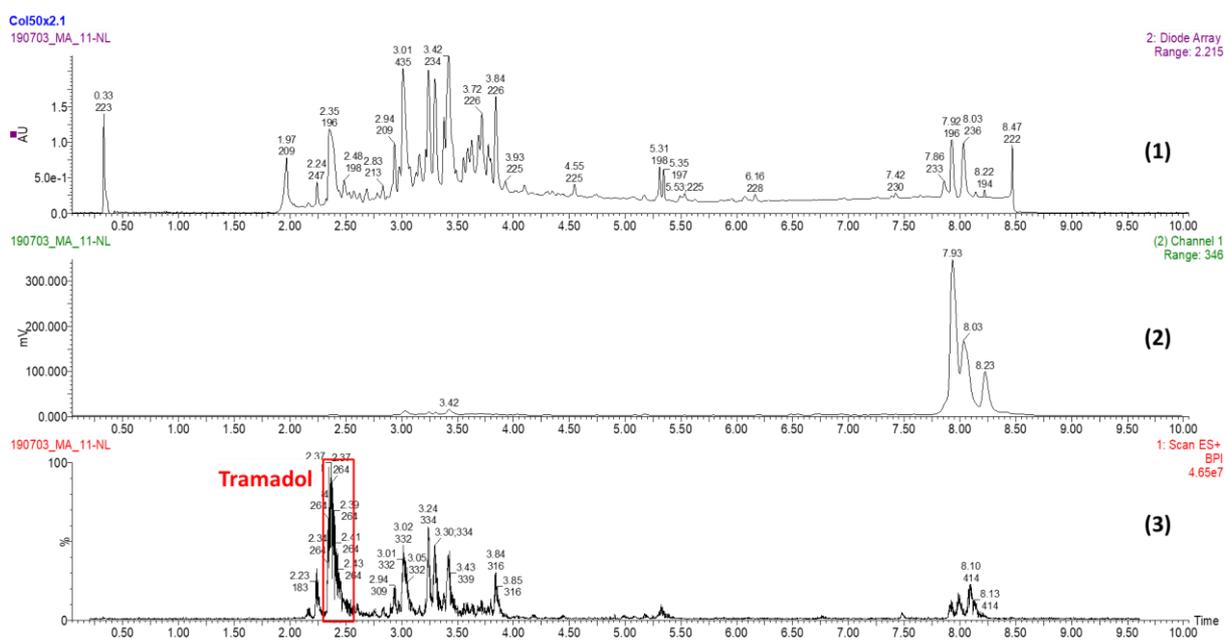
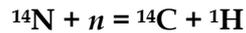


Figure 30. Chromatogrammes UV (1), ELSD (2) et MS (3) de l'extrait alcaloïdique **11-NL**.

Comme souligné précédemment, notre objectif ultime dans le cadre de ce projet est d'apporter des arguments pour élucider l'origine du tramadol extrait. Si la synthèse biomimétique et l'analyse des rapports isotopiques $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ et $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ sont en faveur d'une origine naturelle, ces données demeurent insuffisantes et doivent être renforcées par d'autres analyses. Une d'elle est l'analyse du carbone 14 qui permet d'identifier la présence de produits synthétiques dérivés de la pétrochimie dans un produit censé être d'origine naturelle.

5.1.4. Datation par le carbone 14

Le carbone 14 (^{14}C), appelé radiocarbone, est un isotope radioactif du carbone 12 (^{12}C). Le ^{14}C se produit à la suite des bombardements de l'atmosphère par le rayonnement cosmique. Ces bombardements produisent des neutrons qui interagissent avec les noyaux d'azote de l'air pour produire du ^{14}C et de l'hydrogène selon l'équation ci-dessous. La demi-vie du ^{14}C est estimé à 5730 années¹⁰³.



Par oxydation du ^{14}C par l'oxygène que l'on retrouve dans l'atmosphère, se forme du $^{14}\text{CO}_2$. Il est estimé que la teneur en ^{14}C contenu dans le CO_2 atmosphérique est de l'ordre de 10^{-12} comparée aux isotopes non radioactifs ^{12}C (99 %) et ^{13}C (1 %). Le $^{14}\text{CO}_2$ sera par la suite assimilé par les plantes via le processus de photosynthèse. Ceci a pour résultat, le ^{14}C est retrouvé dans les métabolites primaires et secondaires produits par les plantes

Dans les années 1950, Willard Franck Libby, un physico-chimiste américain, découvrit une nouvelle méthode (datation par l'analyse du carbone 14) permettant de déterminer l'âge d'une matière première en se basant sur sa teneur en ^{14}C et reçut en 1960 le prix Nobel de Chimie¹⁰⁴. Quand un organisme meurt, il cesse d'absorber du carbone et par conséquent sa teneur en ^{14}C diminue avec le temps. En mesurant la teneur en radiocarbone et connaissant le taux de déclin du ^{14}C ainsi que le ratio $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ atmosphérique à l'époque où l'organisme est mort, il est possible de déterminer son âge.

À ce jour, la datation par le carbone 14 est une méthode utilisée dans de nombreux domaines telles que l'environnement, l'archéologie, la microbiologie, l'industrie alimentaire ou encore la géochimie^{105,106}. Cette technique peut également être employée sur un bon nombre de matériaux tels que le bois, les os, le charbon, les plantes ou encore les sédiments dans le but de déterminer leurs âges¹⁰⁷.

A titre d'exemple, dans l'industrie alimentaire, pour des raisons économiques et de manufacture, la demande de caféine issue des grains de café, des feuilles de thé ou encore du maté est tellement importante que les entreprises ont recours à la synthèse de la caféine afin de répondre aux demandes. En utilisant la datation par le carbone 14, Albert Allen effectua des analyses sur plusieurs lots de caféine venant de différents fabricants localisés dans de nombreux pays et rapporta que certains lots de caféine sont issus de la chimie organique et non de substances naturelles¹⁰⁸. Il existe de nombreux exemples dans ce domaine comme le vinaigre, l'acide citrique ou encore les liqueurs fermentées^{105,109}.

Le carbone issu de produits fossiles comme le charbon ou le pétrole, ne présente aucune trace de ^{14}C car ils ont été produits depuis des millions d'années (durée largement supérieure à la demi-vie du ^{14}C). Ainsi, les produits de synthèse dérivant du pétrole ne devraient pas contenir d'isotope ^{14}C . Par opposition, les carbones issus de ressources naturelles montrent une présence du ^{14}C ^{103,108,110}.

Il est important de souligner qu'au fil des années, deux facteurs majeurs ont perturbé l'équilibre naturel du radiocarbone dans l'atmosphère. Le premier porte sur le développement et la combustion d'énormes quantités de pétrole. L'introduction de carbones issus de la combustion des produits d'origine fossile dans l'atmosphère a significativement dilué la teneur en radiocarbone atmosphérique. On parle d'effet Suess. Inversement, l'usage et les essais d'armes nucléaires présentant des mécanismes similaires aux procédés naturels, ont produit une quantité considérable de ^{14}C augmentant ainsi la quantité totale et l'activité de radiocarbone dans l'atmosphère^{105,109}.

Ainsi, nous avons eu recours à cette méthode pour analyser la teneur en ^{14}C des tramadols isolés de *Nauclea latifolia* et du tramadol de synthèse. La présence de ^{14}C dans le tramadol isolé serait une preuve très solide qui consolidera les données déjà obtenus et qui sont en faveur d'une origine naturelle.

5.1.5. Analyses isotopiques ^{14}C comparatives des tramadol isolé et synthétique

Deux échantillons provenant des lots **8-NL** et **10-NL** (référencés ici **TMD-8** et **TMD-10a**), isolés en pureté optimale, ont été envoyés dans un premier temps à un laboratoire à l'Université d'Arizona (*Accelerator Mass Spectrometry Laboratory* : (<https://ams.arizona.edu>)).

Un deuxième échantillon isolé à partir du lot **10-NL** (**TMD-10b**) a été envoyé au Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement à Gif-sur-Yvette (<https://www.lsce.ipsl.fr/>). Pour les deux laboratoires, deux échantillons de tramadol de synthèse commerciale (**TMD-S1** et **S2**) ont été envoyés en guise de référence. Le premier témoin **TMD-S1** est un tramadol commercialisé en pharmacie sous le nom de Tramal® et utilisé sous formes de gouttes dont les excipients ont été retirés par extraction acido-basique. Le deuxième témoin est le chlorhydrate de tramadol commercial acheté chez Sigma-Aldrich, et préalablement traité pour régénérer sa forme de base libre.

Les résultats de l'analyse sont exprimés en % biosourcé allant de 0 à 100% avec une marge d'erreur autour de $\pm 3\%$. Ainsi, il est possible de déterminer la teneur en ^{14}C d'une molécule naturelle pure en se basant sur le taux du ^{14}C présent dans l'atmosphère. En conséquence, une molécule naturelle pure devrait donner une valeur autour de 100%. Une substance naturelle renfermant des molécules d'origine fossile devrait montrer une valeur nettement inférieure à 100%.

Plusieurs protocoles analytiques sont utilisés pour ce type de manipulations et sont renouvelées chaque année. Le protocole appliqué sur nos échantillons est : ASTM D-6866-18 (<https://www.astm.org/Standards/D6866>). Les résultats obtenus sont regroupés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Résultats du pourcentage de carbone moderne (pMC) des échantillons de tramadol isolés des lots 8-NL et 10-NL. TMD-8, TMD-10a et 10b représentent les échantillons isolés à partir des lots 8-NL et 10-NL. TMD-S1 et S2 correspondent aux échantillons commerciaux de tramadol de synthèse.

Laboratoire	Echantillon	pMC (%)	Masse de tramadol isolé (mg)
<i>Accelerator Mass Spectrometry Laboratory</i>	TMD - 8	$97,0 \pm 3,0$	0,13
	TMD - 10a	$1100 \pm 22,0$	0,18
	TMD - S1	$65,3 \pm 3,0$	3,20
Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement	TMD - 10b	$74,0 \pm 0,7$	0,20
	TMD - S2	$0,1 \pm 0,1$	5,30

Les échantillons envoyés à l'*Accelerator Mass Spectrometry Laboratory* ont tout d'abord été comburés pour obtenir le CO_2 nécessaire pour déterminer leurs teneurs en ^{14}C . L'échantillon TMD-8 présente une teneur en ^{14}C de $97,0 \pm 1,8\%$, montrant ainsi une teneur en ^{14}C conforme à celle attendue. Cependant, les analyses effectuées sur l'échantillon TMD-10a présentent une concentration 11 fois supérieure à des niveaux naturels, ce qui ne permet pas d'interpréter ce résultat. Le tramadol commercial TMD-S1 analysé en tant que référence présente également une présence de ^{14}C alors qu'il devrait contenir un taux nul. L'explication la plus probante concernant le TMD-S1 serait dû d'après le laboratoire à la chronologie

d'analyse. En effet, lors de l'analyse, le **TMD-S1** est introduit dans la capsule d'analyse après **TMD-10a**. Des traces de ce dernier ont dû persister et ont contaminé le **TMD-S1** qui est analysé juste après. Toujours, concernant le tramadol de synthèse, une autre hypothèse serait que les réactifs intervenant dans la synthèse du tramadol commercial sont issus de ressources naturelles d'où la présence du ^{14}C dans l'échantillon. Cependant, cette hypothèse est très peu probable car d'après le schéma et les réactifs requis pour la synthèse du tramadol, aucun n'évoque une origine naturelle.

Un deuxième échantillon **TMD-10b** issu du même lot **10-NL** a été analysé au Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement. Après combustion, l'analyse de l'échantillon a pu montrer une teneur en radiocarbone de $74,0 \pm 0,7\%$, ce qui est inférieur au taux attendu, indiquant la présence de molécules d'origine fossile. Ceci pourrait être dû à la présence de traces persistantes de graisses présentes dans les solvants utilisés lors des purifications. Comme attendu, les analyses de **TMD-S2** (tramadol commercial) montrent une teneur nulle en ^{14}C qui est conforme avec une origine purement fossile.

Les résultats d'analyse du carbone 14 sont intéressants mais pas concluants. En effet sur les trois échantillons de tramadol extraits de *Nauclea latifolia*, un seul (**TMD-8**) a montré une valeur conforme. Les deux autres sont soit trop riche (**TMD-10a**) ou légèrement pauvre (**TMD-10b**) en ^{14}C . Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats, néanmoins le facteur commun entre les trois échantillons du tramadol isolé est : les faibles quantités analysées. La combustion de telles quantités engendre inévitablement des déperditions de masse qui seront d'autant importantes en proportion que la quantité de l'échantillon est faible. Le laboratoire AMS (Arizona) nous a indiqué que c'est la première fois dans l'histoire de ce laboratoire qu'ils ont travaillé sur des échantillons aussi faibles. Par conséquent, l'analyse isotopique ^{14}C d'autres échantillons est nécessaire.

5.1.6. Conclusion

Nauclea latifolia est un arbuste répandu en Afrique sub-saharienne et fréquemment utilisé dans la médecine traditionnelle africaine. Les parties aériennes ainsi que les racines sont consommées en tant qu'infusions ou décoctions pour lutter contre plusieurs pathologies. De nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques des extraits ont permis de valider l'utilisation ethnopharmacologique de cette plante, utilisée notamment pour ses propriétés antipaludiques et analgésiques. Un phytomédicament antipaludique à base d'extrait de la plante a d'ailleurs pu voir le jour sous le nom de NIRPD-AM1®.

En ce qui concerne l'activité analgésique, aucune étude n'a pu montrer le composé responsable de cette activité jusqu'en 2013, où l'investigation phytochimique d'un extrait des racines a permis l'isolement du tramadol. Par la suite, la grande médiatisation de cette découverte a engendré des interrogations portant sur l'origine naturelle du tramadol extrait.

Afin d'apporter des éléments de réponse à cette controverse, des travaux supplémentaires axés sur l'isolement du tramadol ont été menés sur de nouveaux lots de racines. Les investigations menées au cours de cette thèse ont permis la mise en évidence de la présence du tramadol dans tous les lots étudiés. Trois échantillons de tramadol (**TMD-8**, **10a** et **10b**) ont été préparés avec des puretés optimales permettant des analyses isotopiques du ¹⁴C.

Les premiers échantillons isolés **TMD-8** et **TMD-10a** ont été analysés à l'*Accelerator Mass Spectrometry Laboratory* de l'Université d'Arizona dont les résultats ont montré que l'échantillon **TMD-8** est en parfaite accord avec une origine naturelle. Cependant, l'analyse réalisée sur l'échantillon **TMD-10a** montre une teneur en radiocarbone trop importante, ce qui n'est pas cohérent. De plus, l'échantillon du tramadol témoin **TMD-S1** présente une teneur en radiocarbone alors qu'il ne devrait pas posséder de carbone biosourcé. Ces résultats étant peu concluants, nous avons donc émis différentes hypothèses permettant d'interpréter les résultats obtenus avec les échantillons **TMD-10a** et **TMD-S1**.

Afin d'obtenir des résultats plus clairs et représentatifs, le deuxième échantillon **TMD-10b** également issu du même lot **10-NL**, ainsi qu'un échantillon de tramadol synthétique **TMD-S2** ont été analysés dans un autre laboratoire. Comme attendu, le témoin **TMD-S2** comporte un taux en carbone 14 proche de zéro, ce qui est conforme au résultat attendu, alors que le **TMD-10b** tend à montrer une origine naturelle, mais avec une teneur plus faible.

En conclusion, des analyses isotopiques ^{14}C supplémentaires sur de nouveaux échantillons isolés à partir d'autres lots sont nécessaires afin d'apporter une réponse que nous espérons définitive quant à l'origine du tramadol extrait

5.2. Etude phytochimique des plantes alpines

En altitude, les plantes sont soumises à des conditions environnementales extrêmes dont les paramètres (luminosité, rayons UV intenses, faible concentration de CO₂ et importante différence de température) varient au cours des saisons et peuvent altérer la photosynthèse et la biosynthèse. En effet, l'excès d'énergie apportée par la lumière peut conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour la plante. Afin de survivre dans ce milieu montagnard, les plantes ont recours à plusieurs stratégies pour s'adapter : production de métabolites antioxydants, protection contre les radiations UV, morphologies protectrices (petite taille, forme des parties aériennes...), stratégies pour éliminer l'excès d'énergie lumineuse, élimination des composés sensibles à l'oxydation¹¹¹.

La température est un des facteurs essentiels qui permet de conditionner la physiologie et la biologie des plantes. Dans les montagnes, tous les 100 mètres parcourus en altitude, la température chute de 0,65 °C. Cette différence de température a permis de définir à partir de la plaine jusqu'au sommet plusieurs niveaux avec différents facteurs environnementaux. On parle « d'étagement de végétation »¹¹¹.

Dans les Alpes, on retrouve à la base le niveau collinéen pouvant aller jusqu'entre 900 et 1100 mètres d'altitude où se situent les forêts d'arbres feuillus. Le second étage est appelé « étage montagnard » et peut monter jusqu'à 1700 mètres, on y trouve des forêts contenant des arbres feuillus ainsi que des conifères. A partir de 2000 mètres, on peut souvent y observer une ceinture d'arbres composée de conifères appelée « étage subalpin ».

A une certaine altitude, la biodiversité alpine diminue, les conditions environnementales semblent altérer le développement des plantes. Au-delà de l'étage subalpin, on peut observer l'absence de forêts qui sont remplacés par des pelouses en continu, ce niveau s'appelle « l'étage alpin ». Et enfin, le dernier niveau, l'étage nival, montre une végétation disjointe composée de mousses et de lichens dont les parcelles sont fractionnées par des rochers et des éboulis^{111,112} (**Figure 31**).

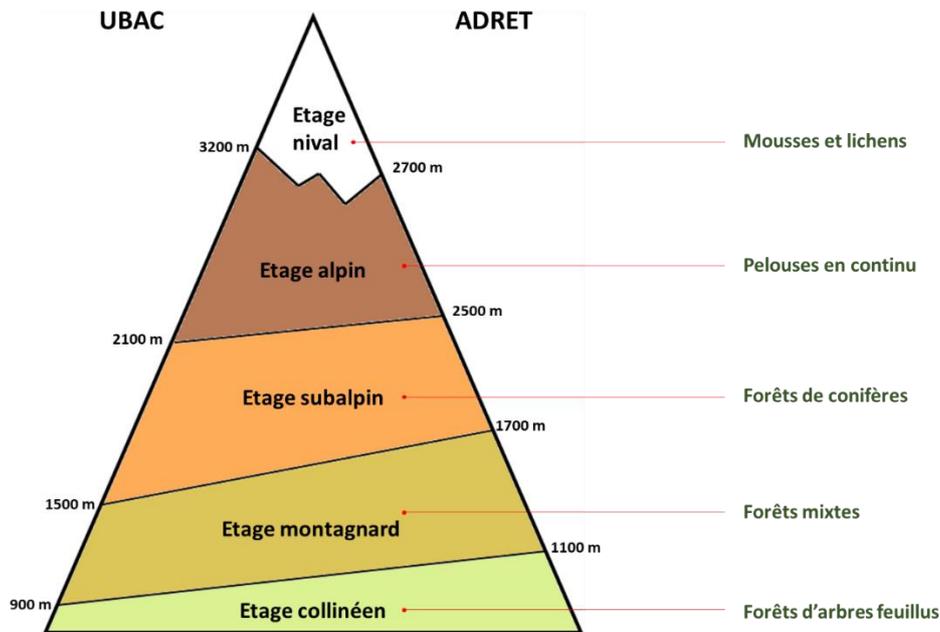


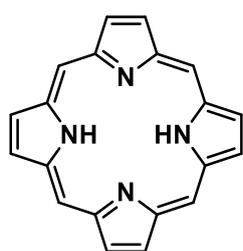
Figure 31. Etagement de végétation dans les Alpes.

En comparaison avec les plantes de plaines, les plantes d'altitude sont confrontées à de nombreuses contraintes comme la forte variation de **température**, l'intensité de la **luminosité** ou encore un **stress oxydant** accru. Pour lutter contre ces contraintes environnementales, les plantes mettent en place des mécanismes de défense et d'évitement qui peuvent être séparés en deux catégories.

Comme énoncé précédemment, la variation de température est un facteur environnemental essentiel dans le développement des végétaux. En effet, à température basse, la synthèse des sucres pendant la photosynthèse est fortement affectée car la lumière absorbée par les feuilles ne sera pas complètement utilisable pour les réactions biochimiques.

Afin de résister à ce phénomène, les végétaux se développent en petites tailles. En effet, en étant plus proches du sol, les températures sont plus élevées et vont favoriser la photosynthèse. Les plantes ont également recours à une morphologie en coussin, car la forme expose moins de surface et réduit les pertes de chaleur et d'eau. De plus, cette forme permet de résister aux bourrasques de vents. Cette morphologie particulière a été rapportée pour plus de 1000 espèces dans une cinquantaine de familles, on parle de convergence adaptative. Ce terme est utilisé quand des plantes qui n'ont aucun lien de parenté mais exposées aux mêmes conditions environnementales adoptent un caractère commun^{111,113}.

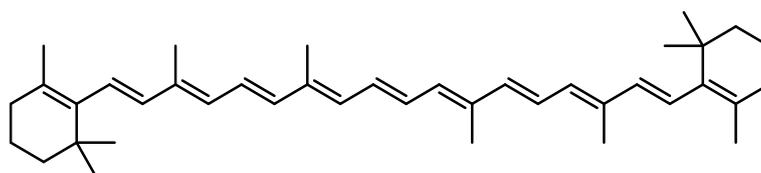
La température n'est pas le seul facteur qui peut être affecté par de brusques variations, l'intensité lumineuse peut également changer au cours d'une journée. Par un ciel couvert, l'intensité n'est pas très différente entre les plaines et les hautes altitudes, cependant au cours d'une journée très ensoleillée, la lumière peut être très forte et excéder les capacités de photosynthèse des végétaux. L'excès d'énergie demandée dans les chloroplastes lors d'une baisse de température ou d'une forte luminosité peut entraîner des dommages dans les photosystèmes. De plus, les rayonnements UV peuvent impacter les structures des cellules et l'ADN des chloroplastes. Afin d'éviter cela, les antennes collectrices (chlorophylles) changent de conformation, parallèlement une partie des chlorophylles transfèrent l'énergie aux caroténoïdes permettant ainsi au surplus d'énergie d'être dissipée sous une autre forme. Ainsi, l'énergie arrivant sur les centres réactionnels est mieux contrôlée. Enfin, la dissipation de la lumière sous forme de chaleur peut également être une solution pour protéger les photosystèmes¹¹¹.



Porphine

Noyau des chlorophylles

(87)



Bêta-carotène

(88)

Figure 32. Structures de la porphine, noyau de la structure des chlorophylles et de la β -carotène.

Un des remparts mis en place par les plantes d'altitude concerne la biosynthèse de métabolites secondaires capables de neutraliser les radicaux libres et en particulier les espèces réactives de l'oxygène. On retrouve principalement la famille des polyphénols qui exercent un rôle d'antioxydant. Dans le même contexte, on trouve plusieurs cas de molécules non-polyphénoliques pouvant assumer un rôle protecteur dans les plantes d'altitude. Ainsi, *Soldanella alpina* biosynthétise la zéaxanthine pour ses propriétés photo-protectrices ainsi que de fortes quantités de vitamine C pour ses activités antioxydantes^{114,115}. Par ailleurs,

Ranunculus glacialis, une plante alpine, accumule de fortes quantités de ranunculine qui possède un goût amer, permettant ainsi de repousser les animaux.

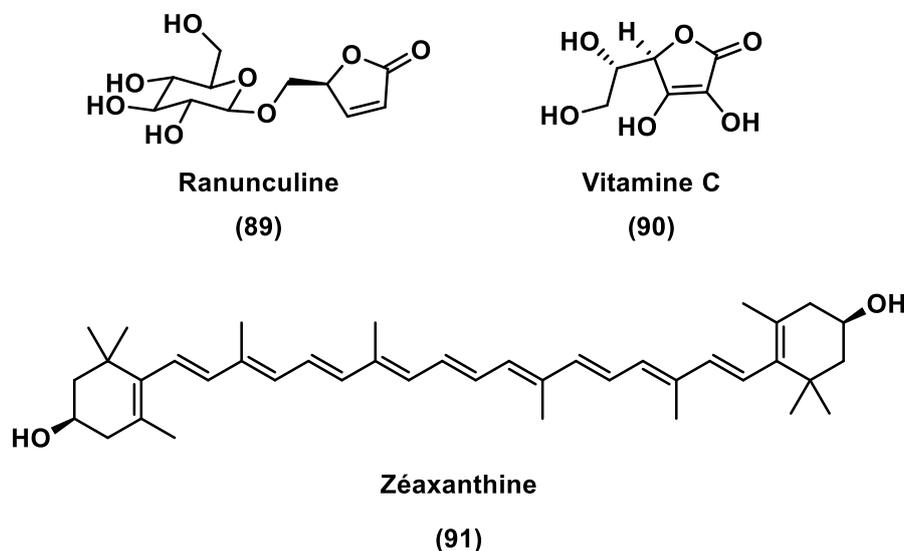


Figure 33. Structure de quelques molécules non phénoliques apportant une protection à la plante contre le stress oxydant.

Dans le cadre d'une thématique visant la valorisation de la flore alpine, en s'appuyant sur une collaboration forte avec la Station Alpine Joseph Fourier (M. Maxime ROME) qui se situe au col du Lautaret (2100 m) et qui accueille une flore alpine très variée, nous nous sommes intéressés à deux plantes locales : *Helianthemum nummularium* et *Chenopodium bonus-henricus*. L'objectif est de mener des études phytochimiques sur leurs parties aériennes et conduire des investigations pharmacologiques sur les extraits et les molécules isolées.

5.2.1. Etude phytochimique d'*Helianthemum nummularium*

Helianthemum nummularium (L.) Mill est une plante vivace que l'on retrouve dans plusieurs régions européennes comme la péninsule ibérique, le Danemark, la Suède et en Europe centrale. Cette petite espèce ligneuse est une des rares espèces de la famille des *Cistaceae* que l'on retrouve dans les Alpes, notamment dans les sols pauvres et rocailloux. Cette plante présente des variations morphologiques particulières notamment au niveau de la couleur de ses fleurs (rose, blanche ou jaune)¹¹⁶⁻¹¹⁸ (**Figure 34**). Le genre *Helianthemum* comporte un nombre important d'espèces utilisées dans la préparation de remèdes traditionnels¹¹⁹. Par exemple, en Espagne les parties aériennes fleuries du genre *Helianthemum* sont utilisées pour leurs activités anti-inflammatoire, antiparasitaire, analgésique ou encore pour la cicatrisation des blessures¹¹⁹. Néanmoins, on ne retrouve que très peu de données concernant la composition chimique ou l'évaluation biologique des extraits d'*H. nummularium*.

Dans le cadre d'un projet portant sur l'investigation des relations complexes entre ongulés montagnards et communautés végétales, le Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) de l'Université Savoie Mont-Blanc et du CNRS s'est intéressé à cette plante. Grâce à des techniques telles que l'ADN *bar-coding*, il est possible de procéder à l'identification des espèces végétales dans les excréments des animaux grâce à leurs séquences ADN¹²⁰. Ainsi, en 2013, des travaux menés sur les excréments de chamois dans le massif du Reculet (Jura) ont pu mettre en avant la surconsommation par les ongulés d'*H. nummularium* comparée à d'autres plantes environnantes et plus abondantes. Lors de cette étude, des séquences ADN d'*H. nummularium* ont pu être retrouvées dans 99 % des fèces de chamois¹²¹. De plus, des investigations similaires ont pu également confirmer cette surconsommation dans le régime alimentaire de plusieurs ongulés du parc naturel régional des Bauges. La signature génétique d'*H. nummularium* a été retrouvée dans 63 % des excréments de chamois ainsi que dans 27 % des excréments de mouflons^{51,52}. Dans le même contexte, les séquences d'*H. nummularium* représentent 60 % de la totalité des séquences identifiées dans les fèces de vaches élevées sur un pâturage des Monts d'Auvergne de l'INRA¹²².



Figure 34. *Helianthemum nummularium* (parties aériennes) et *Rupicapra rupicapra* (chamois).

La palatabilité des ongulés, l'adaptation de la plante à l'altitude ainsi que le peu de publications réalisées sur cette espèce sont trois éléments qui nous ont motivé pour l'étude phytochimique d'*H. nummularium* (Figure 35).

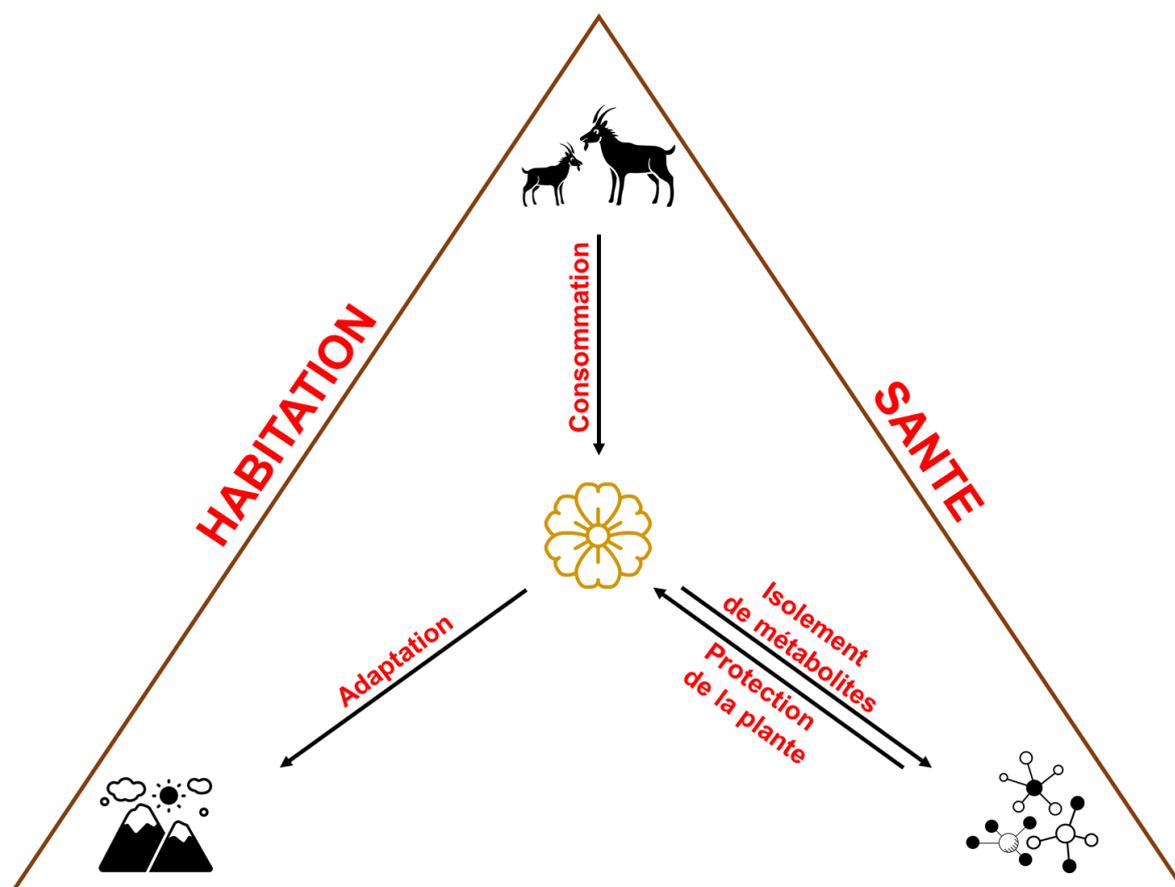


Figure 35. Interactions d'*Helianthemum nummularium* avec son environnement contraignant (conditions climatiques et présence d'ongulés).

5.2.1.1. Résultats et Discussion

La préférence des ongulés pour *H. nummularium* peut être expliquée par deux hypothèses : 1) l'abondance de composés à fortes valeurs nutritionnelles ce qui en ferait une bonne source d'alimentation ou, 2) la présence de métabolites secondaires (molécules spécialisées) avec une activité biologique spécifique que les animaux utilisent dans un but d'automédication.

A. Mesure de la teneur en protéines et en glucides

Afin d'étudier la première hypothèse, la teneur en protéines solubles et glucides a été analysée par le LECA sur cinq populations (trois individus par population) d'*H. nummularium* collectées à différentes altitudes dans les Alpes françaises en juillet 2017 (**Tableau 3**)¹²³. En comparaison avec les teneurs en protéines de plusieurs espèces collectées sur des sols gypsifères, les résultats obtenus pour les échantillons issus de sols riches en calcaires présentent des valeurs plus faibles¹²⁴. La teneur en glucides retrouvée dans *H. nummularium* est largement inférieure à celle des 18 espèces les plus abondantes et poussant dans la même zone géographique que *H. nummularium* (valeur moyenne de 16 % \pm 4.2)¹²³. Ces résultats confirment que les valeurs nutritionnelles d'*H. nummularium* sont trop faibles pour expliquer la préférence alimentaire des ongulés¹²⁵.

Tableau 3. Pourcentage du poids sec des protéines solubles, des glucides totaux et de la somme glucose + fructose dans les feuilles de cinq population (n = 3) d'*Helianthemum nummularium*¹²³.

Lieu de collecte	Localisation	Altitude (m)	Protéines solubles (%)	Glucides totaux (%)	Glucose + Fructose (%)
Yenne	45.703/5.748	280	0.30 \pm 0.11	11.7 \pm 1.6	0.72 \pm 0.18
Arith	45.430/6.384	1020	0.50 \pm 0.01	13.8 \pm 2.1	0.70 \pm 0.38
Arclusaz	45.609/6.183	1520	0.36 \pm 0.10	14.5 \pm 3.7	0.63 \pm 0.22
Dent Des Portes	45.426/6.113	1905	0.56 \pm 0.08	15.5 \pm 4.7	1.29 \pm 0.43
Roche de Chabrières	44.579/6.329	2000	0.25 \pm 0.06	10.2 \pm 1.7	0.53 \pm 0.25

B. Etudes phytochimiques

La première hypothèse liée à une teneur élevée en protéines et/ou en glucides semblant être peu probable, nous nous sommes intéressés à la composition chimique de la plante avec comme objectif d'isoler des molécules et de les évaluer comme possibles composés thérapeutiques utilisés par les ongulés en automédication. Dans ce contexte, les parties aériennes fleuries (consommées par les animaux) ont été soumises à des extractions successives avec des solvants de polarité croissante (cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et eau) (Figure 36).

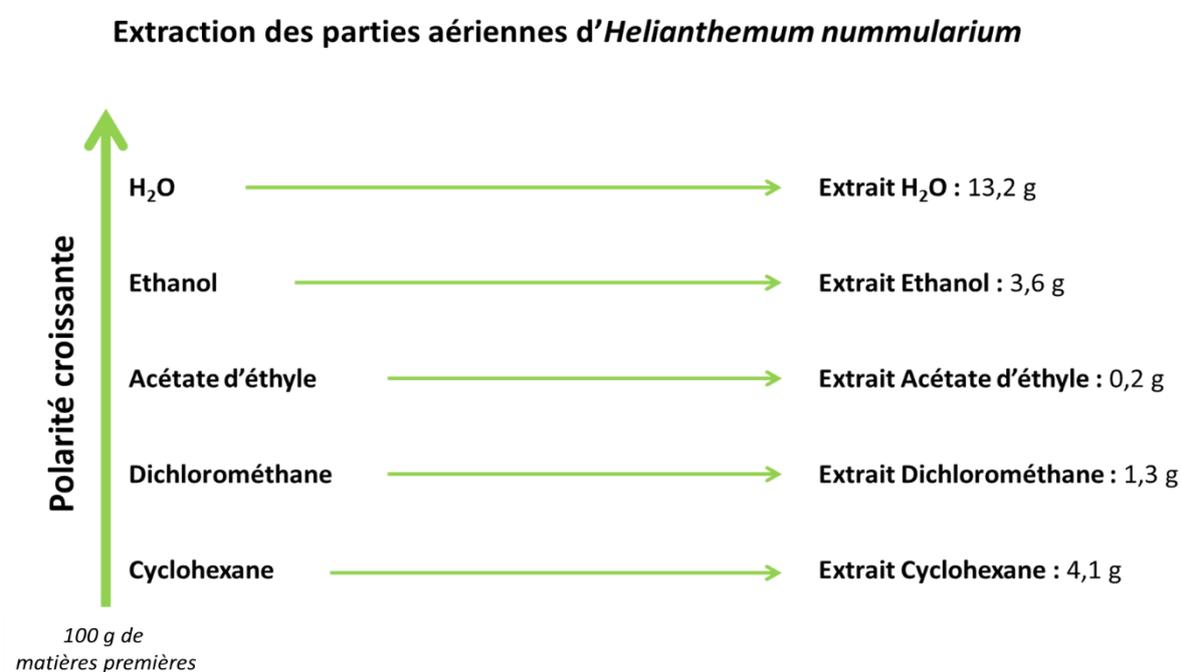


Figure 36. Schéma d'extraction des parties aériennes d'*Helianthemum nummularium*.

Au cours de ce travail, l'investigation phytochimique s'est principalement portée sur l'extrait le plus riche en molécules : l'extrait éthanolique.

Afin d'obtenir un premier aperçu de la composition chimique de l'extrait brut, il a premièrement été analysé par UHPLC couplée à un détecteur UV et un détecteur ELSD. Néanmoins, la présence importante de polysaccharides dans l'extrait sature le signal et ne permet pas de détecter les composés présents en plus faibles quantités. Pour permettre la détection des molécules, l'extrait a été soumis à un premier fractionnement par

chromatographie liquide sous vide (*Vacuum Liquid Chromatography*, VLC) en utilisant comme phase stationnaire une silice greffée C₁₈ et un système d'élution isocratique en deux étapes : 1) H₂O pour éluer les polysaccharides et 2) MeOH pour désorber les molécules d'intérêt. Les deux fractions ont ensuite été analysées par UHPLC pour s'assurer de l'élimination des sucres dans la première fraction (**Figure 37**).

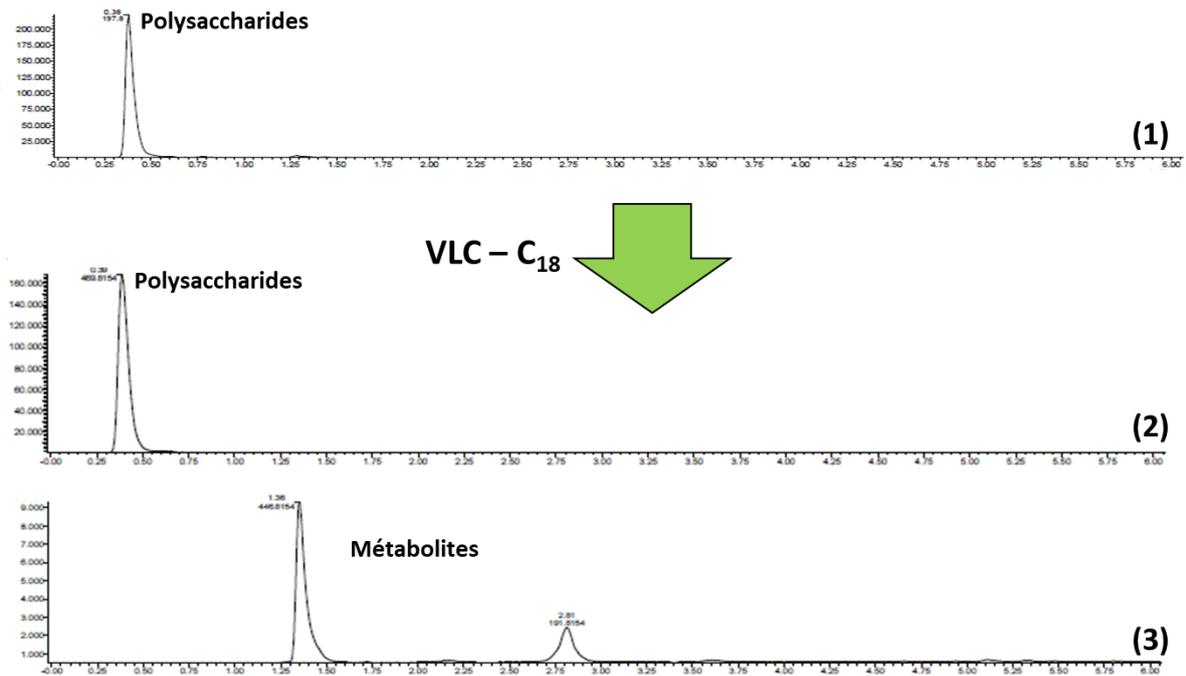


Figure 37. Chromatogramme UHPLC-ELSD de l'extrait éthanolique d'*H. nummularium* avant VLC (1), fraction aqueuse (2) et fraction méthanolique (3) après VLC.

La fraction méthanolique a été analysée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) afin de déterminer les meilleures conditions de séparation dans le but de les transposer à l'échelle semi-préparative pour les purifications (**Figure 38**).

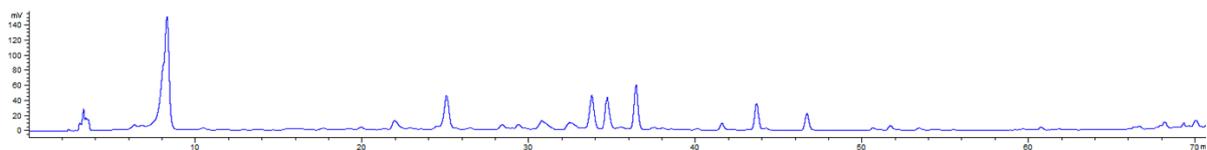


Figure 38. Chromatogramme HPLC-ELSD de la fraction méthanolique.

Après optimisation de la méthode de séparation, 4 fois 50 mg de l'extrait ont été purifiés en utilisant une HPLC semi-préparative et une colonne C₁₈ (250 x 21,2 mm ; 10 µm) pour permettre l'isolement de huit molécules dont les structures ont été déterminées par analyse spectrométrique (MS), spectroscopique (RMN 1D et 2D) et en comparaison avec les données de la littérature (**Figure 39**). Parmi les huit molécules isolées on retrouve : six dérivés de flavonoïdes, un dérivé d'acide benzoïque et un dérivé d'acide caféïque.

Les composés (92) à (96) ont déjà été identifiées dans d'autres espèces du genre *Helianthemum* dont *H. canum*, *H. sessiflorum*, *H. glomeratum* et *H. ruficonum*¹²⁶⁻¹²⁹. Le kaempférol a déjà été retrouvé dans les parties aériennes de couleur rose d'*H. nummularium*¹³⁰. Cependant, les composés (97) à (99) n'ont jamais été identifiés dans aucune espèce d'*Helianthemum*.

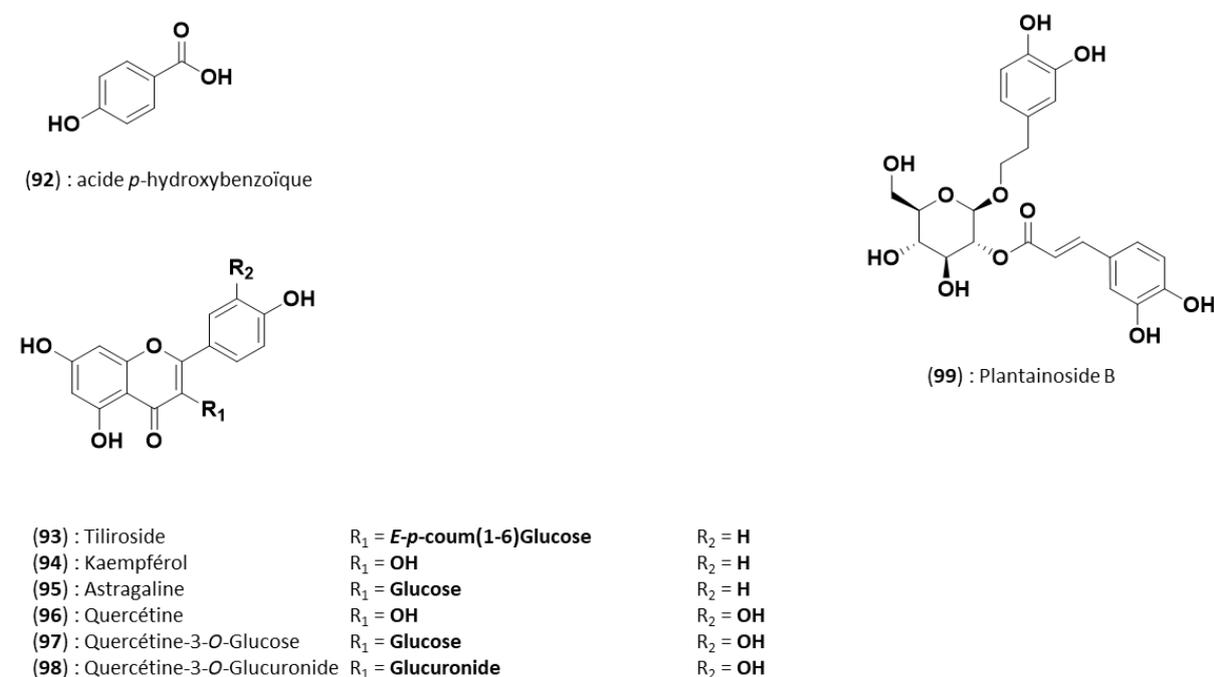


Figure 39. Structures des molécules isolés à partir de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium*.

C. Vers un potentiel cas de zoopharmacognosie

Les métabolites secondaires des plantes peuvent être utilisés dans un mécanisme de défense contre les mammifères herbivores¹³¹ et certains prédateurs. Inversement, un ou plusieurs composés peuvent être responsables de l'attraction de l'animal pour la plante, mettant ainsi en lumière le rôle des métabolites secondaires dans l'attraction ou l'aversion alimentaire¹³²⁻¹³⁴. L'automédication des animaux par les plantes est devenue un domaine de recherche émergent nommé zoopharmacognosie. Dans ce contexte, de nombreuses

observations scientifiques, essentiellement sur des primates, ont été rapportées durant ces dernières décennies¹³⁵⁻¹³⁸. Par exemple, il a été montré que les singes consomment des plantes possédant des propriétés thérapeutiques dans le but de prévenir et/ou guérir des infections de vers parasites intestinaux¹³⁶. A ce jour, l'automédication animale par les plantes émerge comme une source d'inspiration pour des recherches scientifiques dans le but de développer de nouveaux médicaments¹³⁹.

La préférence alimentaire des ongulés pour *H. nummularium* malgré sa faible abondance dans les prairies, comparée aux autres plantes environnantes est très intéressante. Comme énoncé précédemment, cette préférence alimentaire ne peut pas être expliquée par des valeurs nutritionnelles importantes car l'analyse de la quantité de nutriments n'est pas en faveur d'*H. nummularium* comparées aux autres espèces présentes sur le site. La seconde hypothèse suggérerait la présence de molécules bioactives dans la plante qui seraient donc utilisées par les chamois pour s'automédiquer. En effet, les ongulés sont souvent exposés à des infections parasites (nématodes et protozoaires) au niveau de leurs systèmes digestifs¹⁴⁰. Dans certains cas, l'automédication la plus courante par les animaux serait liée à des activités antiparasitaire et vermicide d'un composé ou d'un mélange de composés présent(s) dans la plante. Dans le cadre de ce projet, la recherche bibliographique sur les molécules identifiées (87-94) a révélé une activité antiparasitaire connue de la quercétine, du kaempférol, de l'astragaline, du tiliroside et de la quercétine-3-O-glucoside contre des parasites protozoaires unicellulaires du genre *Trypanosoma* connu pour infecter les animaux et humains¹⁴¹⁻¹⁴³. De plus, le kaempférol et l'astragaline ont été décrits comme des agents antihelminthiques selon des tests *in vitro* contre plusieurs vers parasites tels que *Fasciolopsis buski*, *Fasciola gigantical*, *Taenia solium*, *Schistosoma mansoni* et *Pheritima posthuman*¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. La quercétine-3-O-glucoside possède également une activité antihelminthique contre les larves de trichostrongyloses présents dans le système digestif des moutons¹⁴⁷. Néanmoins, il est à noter que hormis le *Taenia solium*, ces molécules ont été testées sur des parasites peu connus en Europe. De plus, l'activité antiparasitaire des polyphénols décrite ci-dessus rend possible une activité synergique ou additive due à la combinaison de deux ou plusieurs d'entre elles. Par conséquent, l'analyse des activités antiparasitaire et vermicide des polyphénols contenus dans cette plante est nécessaire car elle pourrait expliquer la préférence des ongulés pour *H. nummularium* et ainsi révéler un nouveau cas de zoopharmacognosie.

5.2.1.2. Valorisation biologique des extraits et molécules isolées de HN

Les échantillons d'*H. nummularium* ont été récoltés en zone d'altitude, par conséquent la plante doit développer plusieurs mécanismes pour sa survie dans un environnement hostile. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés au potentiel antioxydant des extraits (DCM, AcOEt et EtOH) et molécules extraites d'HN.

En effet, les molécules (92) à (99) isolés à partir de l'extrait éthanolique sont connus pour posséder des activités antioxydantes mises en évidence par des tests classiques tels que ORAC ou DPPH¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Il est bien établi que certaines molécules naturelles possèdent un effet remarquable contre les effets du stress oxydant chez l'homme et en particulier chez les personnes âgées diminuées de leurs défenses antioxydantes¹⁵²⁻¹⁵⁴. En se basant sur le fait que les molécules qui protègent les tissus de la plante contre le stress oxydatif pourraient aussi bien protéger les humains, nous avons donc étudié le potentiel protecteur contre le stress antioxydant de l'extrait éthanolique et des molécules isolées. En particulier, nous nous sommes intéressés au facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) qui a un rôle de protecteur contre le stress oxydant en induisant des gènes antioxydants. L'activation du Nrf2 est considérée comme une approche privilégiée pour le traitement de certaines maladies neuro-dégénératives où le stress oxydant est un facteur aggravant¹⁵⁵.

Nrf2 est lié à la protéine Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), une protéine possédant le rôle de détecteur de stress oxydatif, ce complexe Nrf2-Keap1 est retenu dans le cytosol. Lors d'une exposition à un stress oxydatif ou d'une activation des éléments de réponse antioxydants (ARE), Nrf2 est libéré de Keap1 lui permettant de se déplacer jusqu'au noyau où elle peut se lier aux ARE entraînant ainsi l'expression des enzymes antioxydantes qui protègent la cellule contre des effets oxydatifs.

La recherche de molécules activatrices de Nrf2 se base sur un test *in vitro* ARE-Nrf2 Luciférase. Il s'agit d'une méthode utilisée pour analyser l'activation de la voie protectrice ARE-Nrf2 par détection lumineuse. Lors d'une exposition à un composé oxydant, les gènes endogènes dépendant de Nrf2 sont activés entraînant également l'expression de la luciférase. Il s'agit d'une enzyme de luciole (*Photinus pyralis*) qui catalyse la production de lumière par oxydation de la luciférine, en présence d'ATP et d'oxygène¹⁵⁶. La luminescence engendrée par la luciférase est donc ici dépendante de l'expression de Nrf2^{156,157}. Par conséquent, un inducteur de Nrf2 entraînera une augmentation de la lumière produite par l'oxydation. Le test d'activation de Nrf2 a été mené en collaboration avec le Dr. Isabelle Hininger-Favier

(Université Grenoble Alpes et Université de Denver) sur des lignées cellulaires HepG2 (carcinome cellulaire) transfectées par le gène luciférase ont été utilisées¹⁵⁸. Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué l'extrait éthanolique et les molécules isolées (**92**, **95**, **96**, **98** et **99**) sur l'activation de Nrf2. Les molécules **93**, **94** et **97** n'ont pas pu être testées car isolées en trop faible quantité.

Les résultats obtenus sur l'extrait éthanolique d'*H. nummularium* présentent une activation dose-dépendante de Nrf2 jusqu'à 1000 µg/mL sans effet toxique (**Figure 40**).

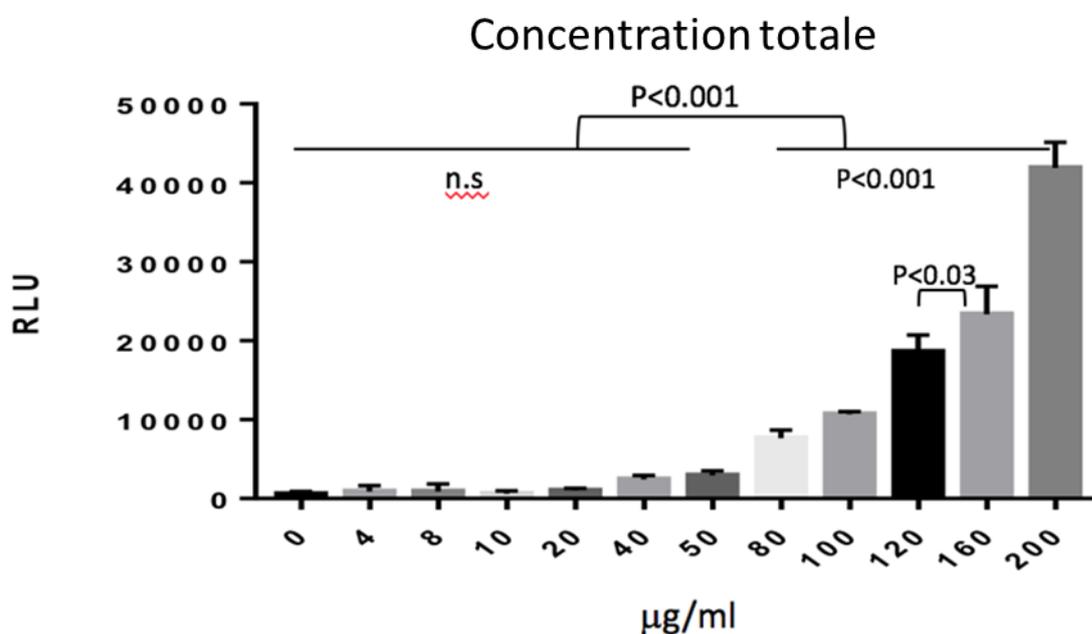


Figure 40. Etude d'activation de Nrf2 par différentes concentrations de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium*. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. RLU représente les Unités Relatives de Luminescence.

Par la suite, nous avons évalué individuellement les composés isolés en quantité suffisante (**92**, **95**, **96**, **98** et **99**) (**Figure 41**). Seule la quercétine a présenté une activité activatrice de Nrf2. Cependant, l'activation de Nrf2 induite par la quercétine est beaucoup plus faible que l'effet observé avec l'extrait brut. A une concentration supérieure à 50 µg/mL, on peut observer une diminution de l'activité de la quercétine. Un effet en cloche communément décrit avec les polyphénols antioxydants¹⁵⁹. Un effet synergique des différentes molécules a donc été investigué mais le mélange des molécules pures testées (**92**, **95**, **96**, **98** et **99**) à une concentration de 10 µg/mL n'a pas présenté d'activité supérieure à la quercétine seule. Il est également

important de souligner que le tiliroside (93) a déjà été rapporté comme neuroprotecteur à travers l'activation de Nrf2¹⁶⁰.

Comme montré dans la **Figure 41**, l'activité de la quercétine-3-O-glucuronide est beaucoup plus faible que celle de la quercétine. Ce résultat est en accord avec d'autres études menées sur un modèle de stress oxydatif induit par l'éthanol sur les hépatocytes, où l'on observe une activité hépato-protectrice plus prononcée avec la quercétine que celle de son dérivé glycoside¹⁶¹. Ce phénomène peut s'expliquer par la propriété lipophile plus importante de la quercétine permettant ainsi une meilleure pénétration dans la cellule. Ceci suggère l'importance de tester le kaempférol, possédant une structure très proche, sur la même gamme de tests pour évaluer son activité.

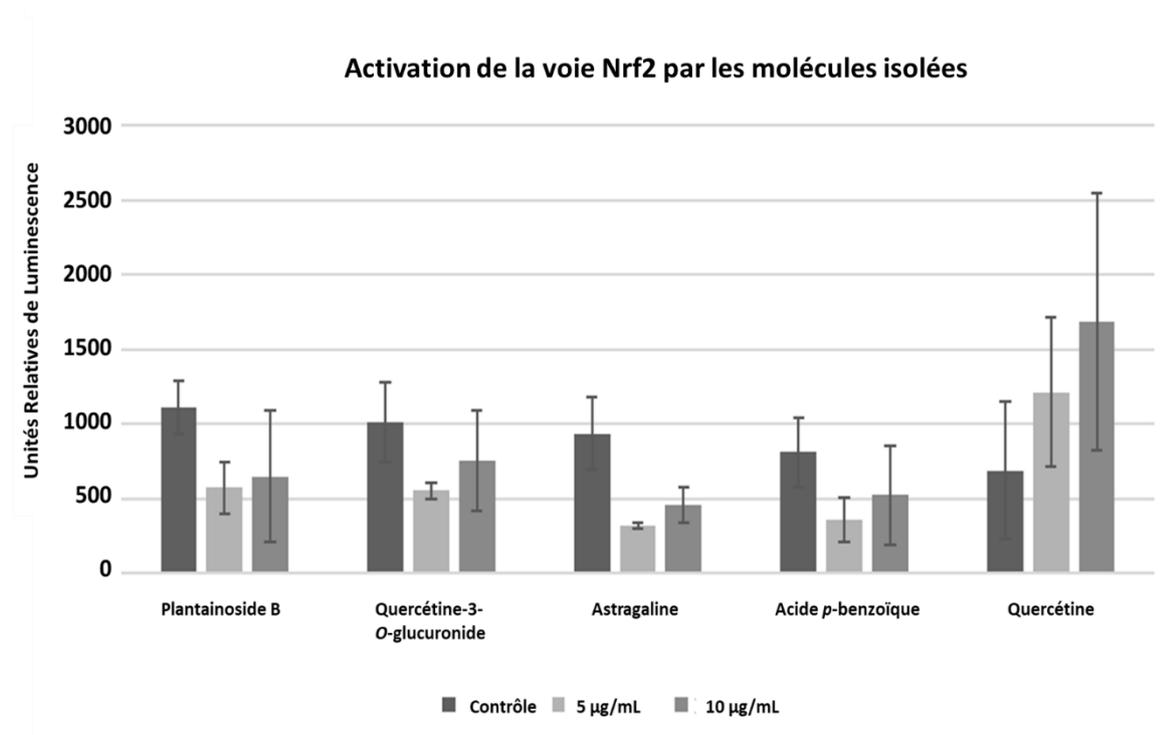


Figure 41. Activation de la voie Nrf2 par les composés 92, 95, 96, 98 et 99 aux concentrations 5 et 10 µg/mL. Le test a été conduit dans les mêmes conditions que l'évaluation biologique de l'extrait. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. RLU représente les Unités Relatives de Luminescence.

Toutefois, considérant la faible quantité de la quercétine dans l'extrait éthanolique, elle ne peut pas expliquer la forte activité de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium* (**Figure 42**). Ceci laisse suggérer que d'autres composés non isolés pourraient être impliqués dans la voie d'activation de Nrf2.

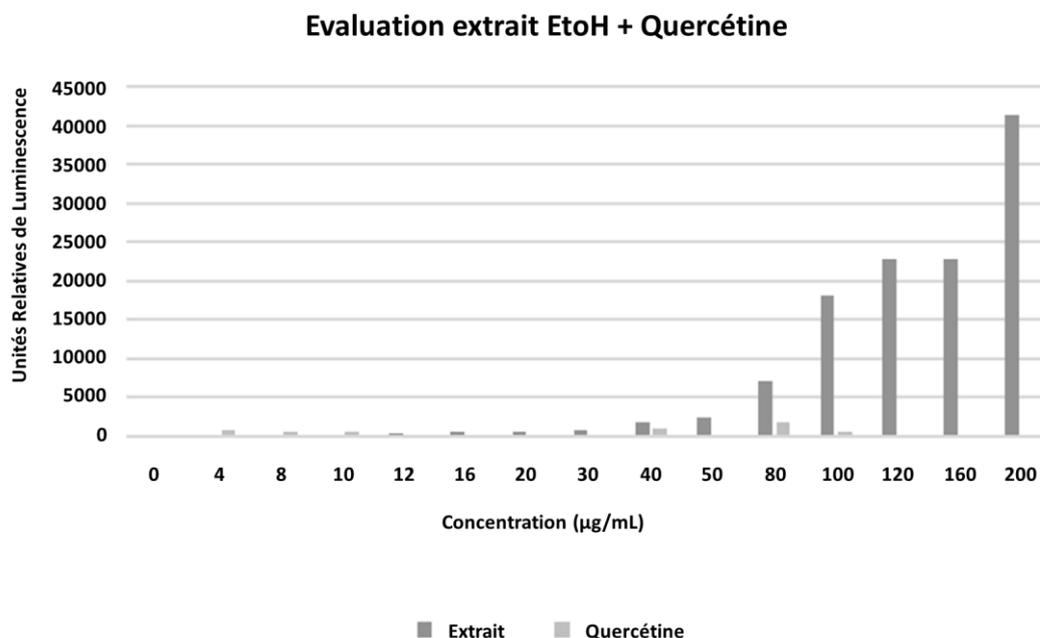


Figure 42. Voie d'activation de Nrf2 (concentrations de 0 à 200 µg/mL) de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium* et de la quercétine. Les données sont exprimées en moyenne ± S.E.M. RLU représente les Unités Relatives de Luminescence.

Etonnamment, les autres molécules ont tendance à diminuer cette activité, ce qui n'est pas due à une mort cellulaire puisqu'aucun effet n'a pu être observé lors du test de viabilité cellulaire. En effet, les molécules (92, 95, 96, 98 et 99) ont été testées sur des lignées cellulaires HepG2 pour vérifier leur activité cytotoxique et n'ont montré aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire (Figure 43).

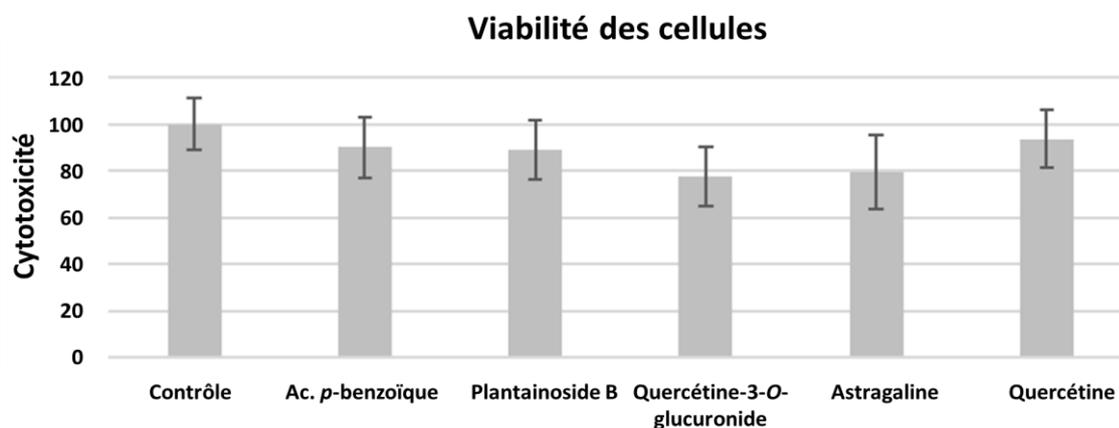


Figure 43. Prolifération des cellules HepG2 mesurée par le test CCK8. Les cellules sont traitées avec 10 µg/mL de composé comparé au blanc de contrôle (DMSO).

5.1.2.3. Conclusion

Le premier objectif des travaux menés sur *Helianthemum nummularium* était de mener une étude phytochimique afin d'isoler des molécules pouvant expliquer la surconsommation de la plante dans le régime alimentaire des ongulés montagnards. Pour cela, deux hypothèses avaient été émises : 1) la plante possède des valeurs nutritionnelles importantes ou 2) les ongulés la consomment dans un but d'automédication. La faible teneur en nutriments de la plante a permis d'écarter la première hypothèse. L'investigation phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes de l'espèce a permis l'isolement de huit molécules, toutes connues, parmi lesquelles plusieurs possèdent des activités antihelminthiques connues. La surconsommation d'*H. nummularium* par les ongulés pourrait donc être liée à une stratégie d'automédication, ce qui constituerait le premier cas de zoopharmacognosie alpin. Cette hypothèse doit être validée par des tests antiparasitaires sur les extraits et les molécules isolées. Cette étude est en cours de mise en place en collaboration avec des laboratoires de l'INRA, spécialisés dans les études antiparasitaires en milieu vétérinaire.

Par ailleurs, l'extrait éthanolique ainsi que des composés purs ont été testés pour leur effet activateur de Nrf2 dans le but de les valoriser dans le domaine thérapeutique et/ou dermo-cosmétique. L'extrait éthanolique a présenté une meilleure activité sur Nrf2 que les composés isolés, suggérant ainsi que des efforts supplémentaires de purification de molécules sont à fournir afin d'identifier des composés avec une forte induction d'activation.

5.2.2. Etude phytochimique de *Chenopodium bonus-henricus*

Chenopodium bonus-henricus (L.) ou *Blitum bonus-henricus* est une espèce de plantes appartenant à la famille des *Chenopodiaceae*, que l'on retrouve principalement à l'état sauvage en Europe, en Asie de l'ouest et en Amérique du Nord. Elle est communément appelée « Chénopode Bon-Henri » en hommage au roi Henri IV qui serait à l'origine de sa découverte culinaire. Plusieurs espèces du genre *Chenopodium* sont utilisées dans le secteur alimentaire, pour la production de multiples pâtisseries, pains ou encore des boissons fermentées conçus à partir des graines de *Chenopodium pallidicaule* ou *Chenopodium quinoa*. Dans certains pays d'Europe, les parties aériennes de *C. bonus-henricus* sont consommées comme des épinards, en tant que soupe, salades ou tourtes, d'où sa deuxième appellation « épinard sauvage ». De plus, les extraits d'autres parties de la plante telles que les racines sont utilisés dans la préparation de plats traditionnels bulgares¹⁶².



Figure 44. Parties aériennes de *Chenopodium bonus-henricus*. (Source photos : Creative Commons SL-NC-SA)

En plus de son utilisation alimentaire, le genre *Chenopodium* regorge d'espèces utilisées dans le traitement de différentes pathologies telles que *C. ambrosioides* dont l'infusion est consommée dans le but d'éliminer les vers parasites intestinaux ou encore la mastication des graines de *C. album* dans le traitement de problèmes urinaires¹⁶³. Concernant *C. bonus-*

henricus, son utilisation en médecine traditionnelle est vaste, par exemple en Italie et en Bulgarie, les racines et les feuilles sont utilisées pour leurs propriétés analgésiques mais également pour le traitement d'inflammations de la peau, de blessures ou encore de brûlures¹⁶². Néanmoins, des alertes concernant la consommation de cette plante ont été émises à cause de sa grande teneur en acide oxalique spécialement dans les feuilles¹⁶⁴.

D'un point de vue chimique, la littérature révèle que la famille des *Chenopodiaceae* renferme une large variété de métabolites primaires (hydrocarbures, acides aminés, protéines, cytokinines aromatiques et hormones) et secondaires (saponines, flavonoïdes, terpènes et alcaloïdes)¹⁶³. À ce jour, les premières études phytochimiques réalisées sur *C. bonus-henricus* portent sur la purification des extraits hydro-alcooliques des parties aériennes et des racines de la plante qui ont mené à l'isolement de composés dérivés de flavonoïdes et de saponines^{162,165}.

Considérant son grand usage alimentaire ainsi que le très peu de données que l'on retrouve sur cette plante, nous nous sommes intéressés à *C. bonus-henricus* afin d'obtenir une caractérisation plus profonde de sa composition chimique.

5.2.2.1. Résultats et Discussion

Les collectes ont été réalisées dans une zone d'altitude plus précisément au Col du Lautaret, en collaboration avec la Station Alpine Joseph Fourier. L'objectif étant d'effectuer des extractions des parties aériennes de la plante afin d'isoler de nouveaux métabolites biologiquement actifs. La plante a été broyée et extraite successivement avec différents solvants de polarité croissante : cyclohexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, éthanol et eau. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux extraits dichlorométhane et éthanol.

A. Extrait Dichlorométhane : purification et analyse structurale

Dans l'objectif de réaliser une analyse chimique qualitative, l'extrait a d'abord été analysé par RMN ^1H . On peut remarquer la présence d'acides gras ainsi que des signaux à 8,55 ; 9,40 et 9,50 ppm caractéristiques de doubles liaisons évocatrices de dérivés de phéophytine, ce qui correspond à un dérivé de chlorophylle dépourvue de son cation magnésium¹⁶⁶ (Figure 45).

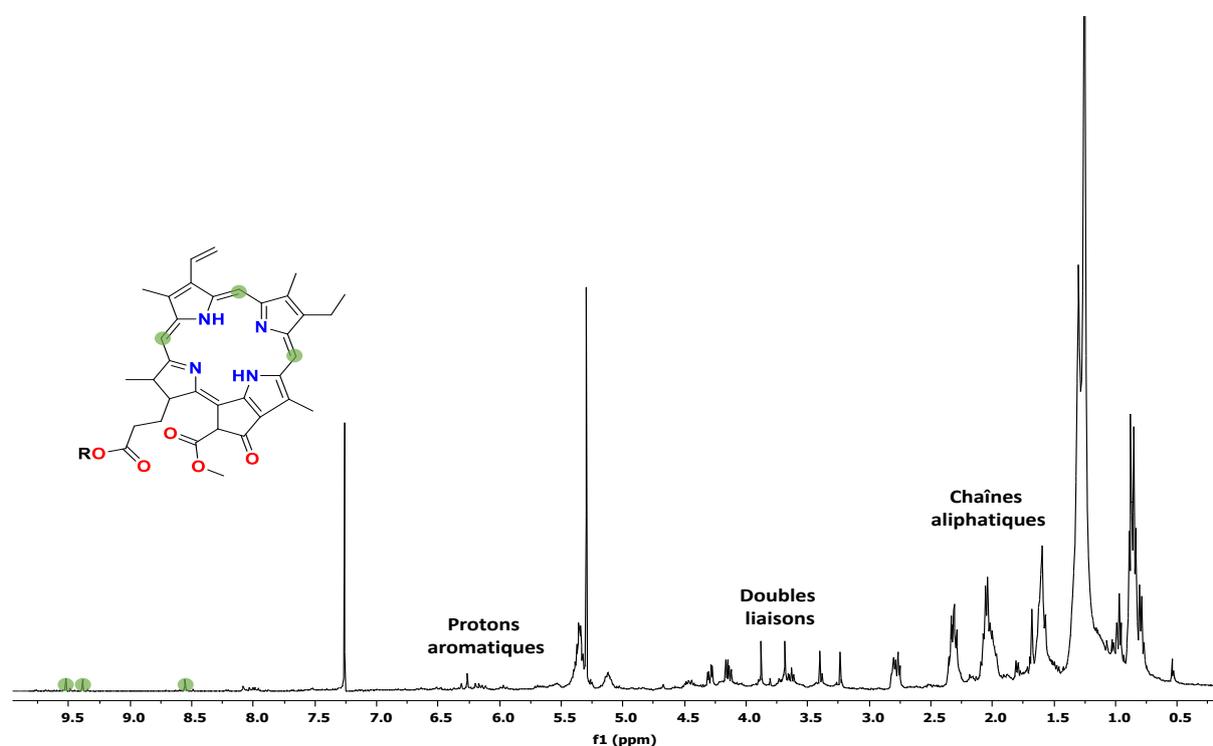


Figure 45. Spectre RMN ^1H de l'extrait DCM de *Chenopodium bonus-henricus*. Identification d'un dérivé de la chlorophylle. R représente une longue chaîne aliphatique non déterminée¹⁶⁶ (RMN 400 MHz, CDCl_3).

Afin de simplifier l'extrait, ce dernier a été fractionné sur colonne de chromatographie sur silice (40-60 μm) permettant d'obtenir plusieurs fractions. Un total de 8 fractions et 39 sous-fractions ont été obtenues par plusieurs purifications successives (**Figure 47**). Les analyses RMN ^1H effectuées sur les fraction F_{4d} et notamment les fractions filles $F_{4d}\text{-}F_{3c}$ et $F_{4d}\text{-}F_{4e}\text{-}F_4$ ont permis l'identification de deux composés.

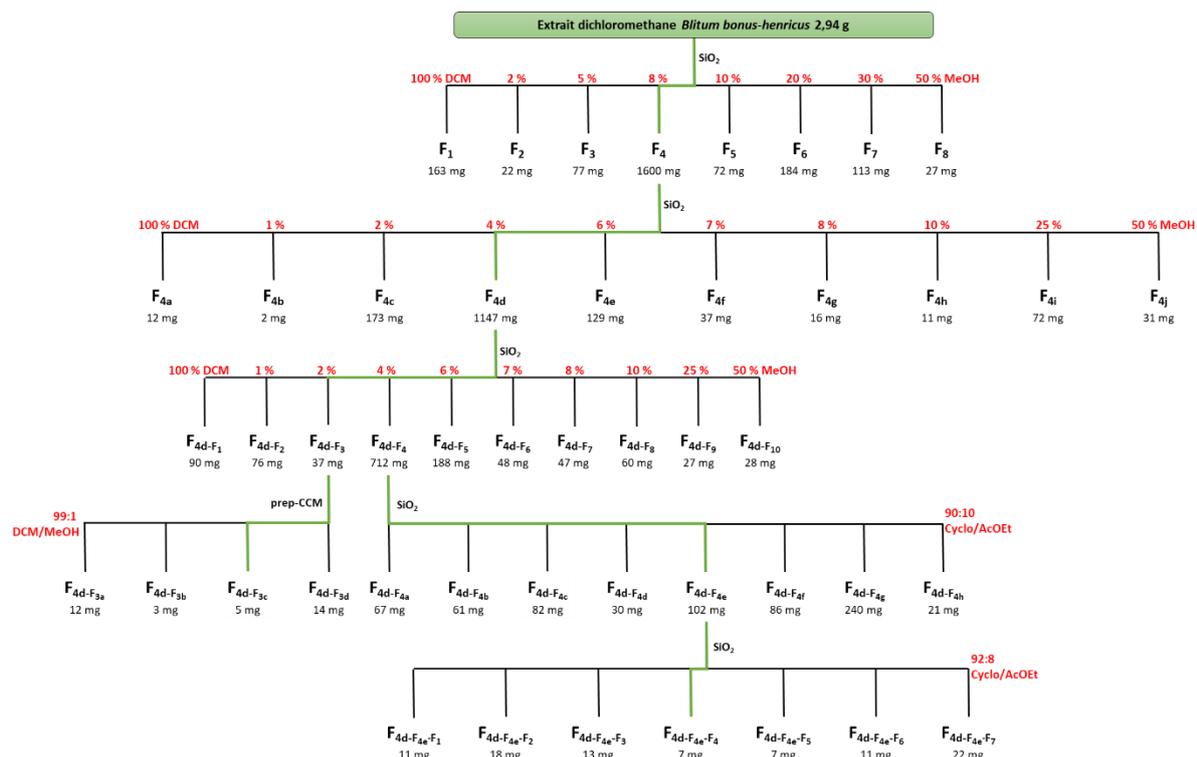


Figure 46. Schéma de fractionnement de l'extrait DCM de *Chenopodium bonus-henricus*.

Le spectre RMN ^1H de la sous-fraction $F_{4d}\text{-}F_{3c}$ a montré la présence de deux molécules structurellement proches. Le chromatogramme obtenu par UHPLC couplée à un spectromètre de masse équipée d'une source d'ionisation ESI en mode négatif indique un rapport m/z pour la molécule majoritaire de 472,41. L'interprétation du spectre RMN ^1H de la molécule (**100**) révèle la présence d'un système aromatique para-substitué caractérisé par deux doublets à 7,43 ppm ($J = 8,5$ Hz) et 6,84 ppm ($J = 8,5$ Hz) ainsi qu'une double liaison -CH=CH- (7,64 et 6,30 ppm, $J = 15,9$ Hz) dont la constante de couplage indique une configuration trans. On constate la présence d'un triplet à 4,18 ppm correspondant à un CH_2 relié à un oxygène, ainsi que les signaux d'une longue chaîne aliphatique entre 1,70 et 1,20 ppm. En se basant sur les masses déterminées par UHPLC-MS, on peut déterminer une structure dérivée d'acide coumarique :

le *para*-coumarate de *n*-docosanol (**Figure 47**). Ce composé a déjà été isolé à partir d'un extrait dichlorométhane des racines de *Myoschilos oblongum*, une plante d'altitude collectée au Chili¹⁶⁷.

On observe dans le même spectre RMN ¹H la présence d'un deuxième composé dont la structure comporte des similarités avec la première molécule élucidée. On retrouve un système aromatique *para*-substitué caractérisé par deux doublets à 7,43 et 6,80 ppm ($J = 8,6$ Hz) ainsi qu'une double liaison (7,62 et 5,83 ppm, $J = 11,6$ Hz) dont la constante de couplage indique une configuration *cis*. A la différence du premier dérivé d'acide coumarique, on remarque, dans ce cas, deux triplets à 4,12 et 3,64 ppm ($J = 6,8$ Hz et $J = 6,6$ Hz, respectivement) correspondant à deux groupements CH₂ rattachés à un hétéroatome ainsi que les signaux d'une longue chaîne aliphatique entre 1,70 et 1,20 ppm. Malheureusement, il nous était impossible de déterminer la structure de ce produit et les faibles quantités ne nous ont pas permis de séparer les deux molécules pour faciliter l'identification du deuxième produit.

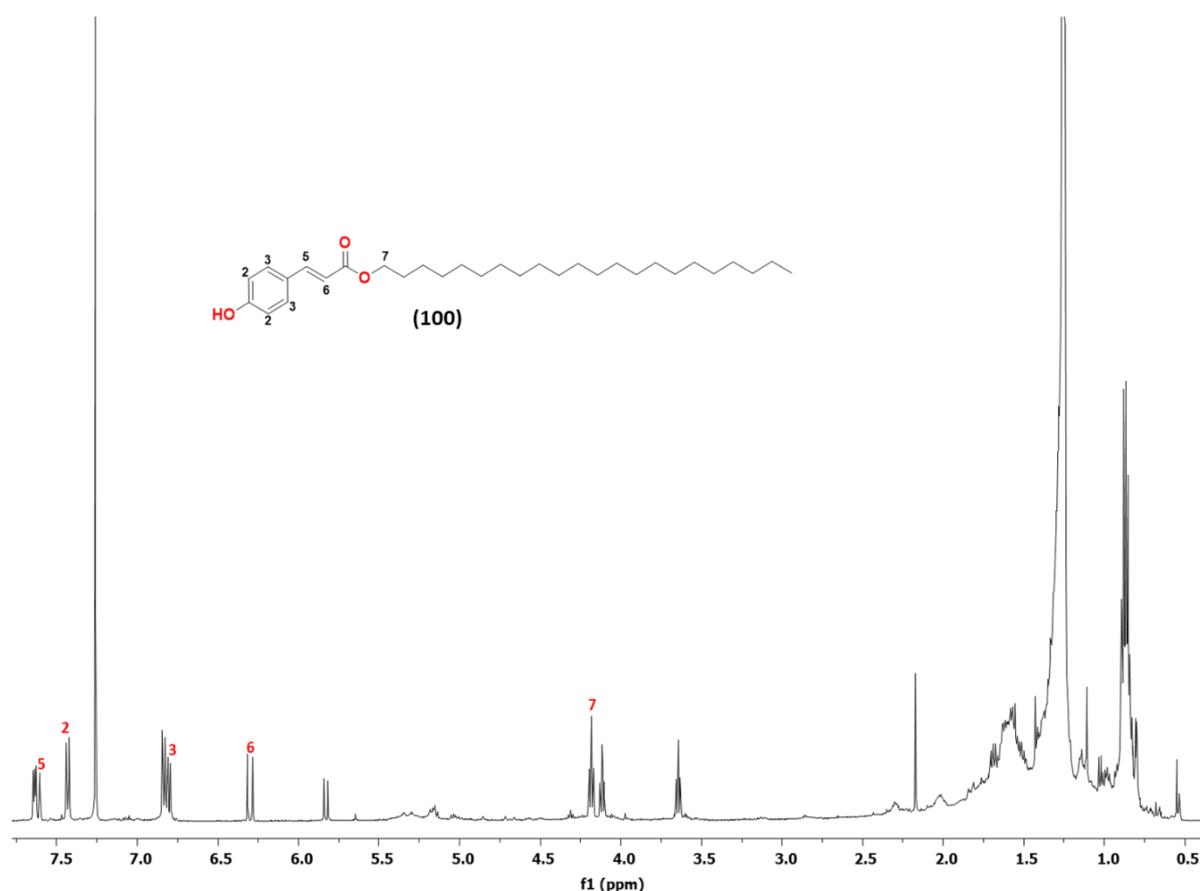


Figure 47. Spectre RMN ¹H et structure de *para*-coumarate de *n*-docosanol dans le spectre RMN ¹H de la sous-fraction F_{4d}-F_{3c} (RMN 600 MHz, CDCl₃).

Le spectre RMN ^1H de la sous fraction $\text{F}_{4d}\text{-F}_{4e}\text{-F}_4$ révèle la présence d'un groupement méthyle à 0,88 ppm, deux CH_2 sous forme de triplet à 2,35 ppm ($J = 7,5$ Hz) et d'un quadruplet à 1,63 ppm ($J = 7,5$ Hz). On peut également apercevoir un large multiplet représentant une longue chaîne aliphatique. Afin d'identifier le composé, la sous-fraction a été analysée par GC-MS. L'identification de la molécule a été effectuée par comparaison avec les spectres MS de bibliothèques de molécules connues afin de déterminer l'acide palmitique (**101**). Dans l'objectif de s'assurer de son identification, un standard a été analysé dans les mêmes conditions.

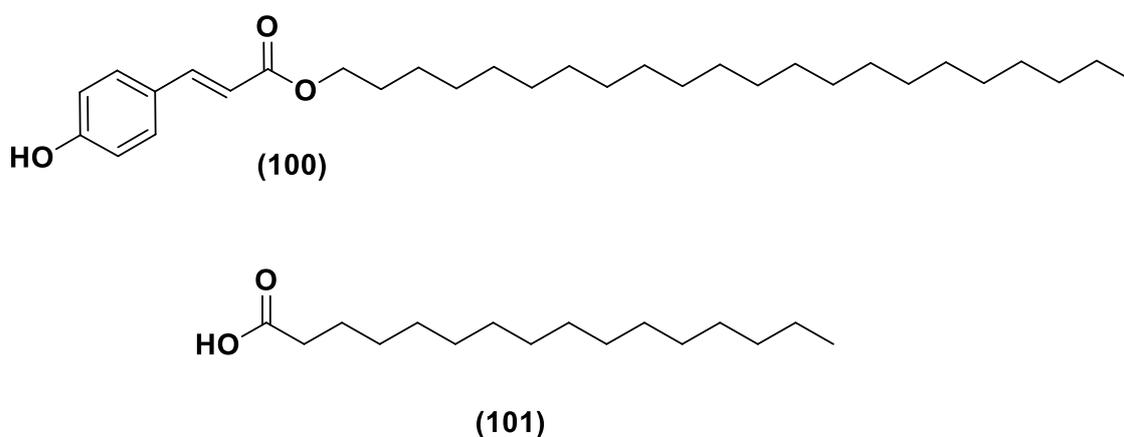


Figure 48. Structures des molécules identifiées dans l'extrait DCM.

B. Extrait éthanolique : purification et analyse structurale

Dans le but d'obtenir un premier aperçu de la composition chimique de l'extrait brut, il a tout d'abord été analysé par UHPLC couplée à un détecteur UV et ELSD, cependant le chromatogramme ne présente qu'un seul pic en début d'élution. En effet, ce pic correspondrait aux polysaccharides présents dans l'extrait saturant le signal et empêchant la détection des autres composés. Afin de faciliter la détection, l'extrait brut (2,1 g) a été soumis à une première séparation par VLC pour éliminer les polysaccharides, en utilisant une silice C_{18} et un système d'élution isocratique en deux étapes : 1) H_2O pour éluer les sucres (1,1 g ; 52%) et 2) MeOH pour désorber les molécules d'intérêt (0,7 g ; 33%). Les deux fractions ont ensuite été analysées par UHPLC pour confirmer la séparation des polysaccharides dans l'extrait (**Figure 49**).

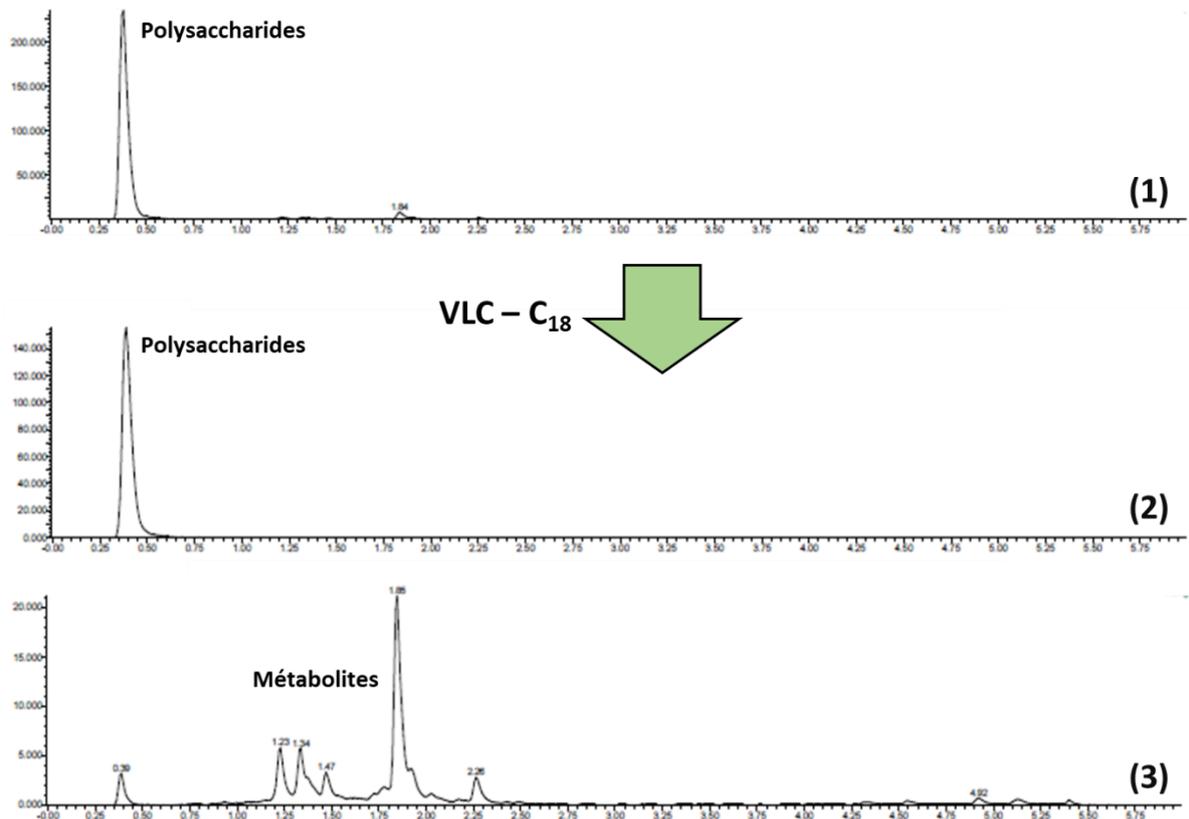


Figure 49. Chromatogramme UHPLC-ELSD de l'extrait éthanolique *Chenopodium bonus-henricus* (1) avant VLC, (2) fraction aqueuse et (3) fraction méthanolique après VLC.

La fraction méthanolique a ensuite été analysée par HPLC afin de déterminer les meilleures conditions séparatives dans le but de les transposer à l'échelle semi-préparative pour les purifications à venir (Figure 50).

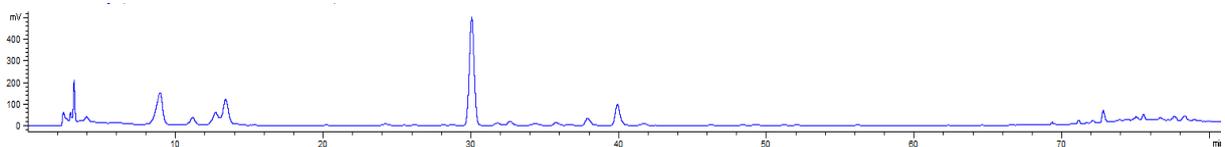
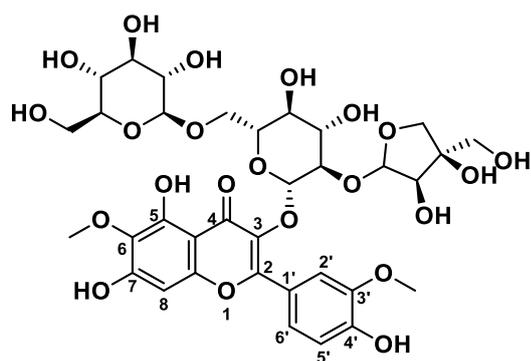


Figure 50. Chromatogramme HPLC-ELSD de la fraction méthanolique.

Après optimisation de la méthode de séparation, l'extrait (4 x 50 mg) a été purifié en utilisant une HPLC semi-préparative et une colonne C₁₈ (250 x 21,2 mm ; 10 µm) qui a permis l'isolement de quatre composés (Figure 51).



(102)

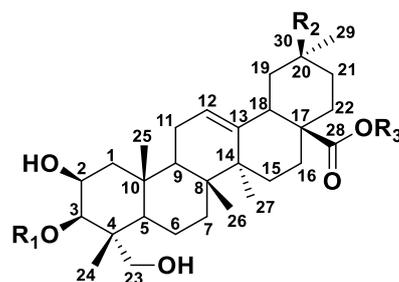
(103) R₁ = Arabinose R₂ = COOMe R₃ = Glucose(104) R₁ = Glucuronide R₂ = Me R₃ = Glucose(105) R₁ = Arabinose R₂ = COOMe R₃ = H

Figure 51. Structures des molécules isolées de *C. bonus-henricus* par HPLC semi-préparative et caractérisées par SM, RMN 1D et 2D.

Le spectre RMN ¹H du composé (102) montre deux singulets à 3,89 et 3,74 ppm caractéristiques de groupements méthoxyles. Il révèle également la présence de quatre protons appartenant à deux noyaux aromatiques différents. D'une part, un singulet (6,54 ppm) et d'autre part, trois protons correspondant à un noyau benzénique tri-substitué caractérisés par deux doublets (8,03 ppm ; $J = 2,1$ Hz et 6,93 ppm ; $J = 8,5$ Hz) et un doublet dédoublé (7,66 ppm ; $J = 8,5$ et 2,1 Hz). L'examen approfondi du spectre RMN ¹³C combiné avec celui du HSQC a permis d'identifier la présence d'une cétone conjuguée (179,5 ppm) ainsi qu'un motif éthylénique de deux carbones quaternaires (158,4 et 134,5 ppm). Le spectre HMBC a permis de mettre en évidence un squelette spinacétine (3',6-diméthoxy-3,4',5,7-tetrahydroxyflavone). La combinaison des spectres HMBC, COSY et NOESY a permis de déterminer l'enchaînement de trois sucres : glucose-glucose-apiose dont le glucose central est rattaché au carbone C-3 de la flavone, ce qui a permis d'identifier la spinacétine-3-*O*-β-*D*-glucopyranosyle(1→6)-[β-*D*-apiofuranosyle(1→2)]-β-*D*-glucopyranoside dont le rapport masse/charge en ESI-HRMS(-) confirme son identification. L'analyse de la littérature a permis d'observer que ce composé a déjà été retrouvé dans les feuilles de *Spinacia oleracea*¹⁶⁷.

Le spectre RMN ¹H du composé (103) montre la présence de six singulets correspondant à 5 groupements méthyles (1,30 ; 1,20 ; 1,16 ; 0,96 et 0,82 ppm) et un O-méthyle (3,70 ppm). On observe également la présence d'un signal sous la forme d'un triplet (5,35 ppm ; $J = 3,5$ Hz) correspondant à un motif -CH₂-CH=(C_q)-. Le doublet dédoublé présent à 4,31 ppm ($J = 6,8$; 3,6 Hz) révèle un proton relié à un oxygène correspondant à un motif -CH-CH(O)-CH₂-. Le signal du proton H₁₈ à 2,73 ppm sous forme de doublet dédoublé dont les constantes de couplage ($^3J_{18,19_{eq}} = 3,9$ Hz, $^3J_{18,19_{ax}} = 13,7$ Hz) avec les protons du carbone C₁₉ révèlent que le

proton H₁₈ est en position axiale. La présence des doublets à 4,36 ($J = 7,4$ Hz) et 5,37 ppm ($J = 8,2$ Hz) évoque des protons anomériques de deux monosaccharides dont la différence de déplacements chimiques démontre que le premier est relié par une simple liaison osidique (4,36 ppm) et le deuxième par une liaison ester-osidique (5,37 ppm). L'analyse des spectres RMN ¹³C et HSQC a permis de confirmer le motif de la double liaison ainsi que la présence de deux carbones d'esters. Au total, les spectres révèlent les signaux de 6 méthyles, 12 méthylènes, 15 méthines et 9 carbones quaternaires. L'analyse combinée du spectre HMBC avec le spectre COSY a permis de déterminer le squelette triterpénique de type (3β)-oléane-12-ène-3,28-diol de la molécule, dont le C-3 est rattaché à un arabinose et le C-28 à un glucose permettant ainsi d'identifier le dérivé saponoside : 2S-3R-23-trihydroxyoléane-12-èn-30-méthylester-3-O-α-L-arabinopyranosyle-28-O-β-D-glucopyranoside ester. La masse examinée en ESI-HRMS(-) a permis de confirmer cette structure. Cette dernière est déjà connue sous le nom de bonushenricoside A isolée des racines de *C. bonus-henricus* collectées dans une zone montagnarde en Bulgarie¹⁶⁵.

Les caractéristiques des spectres RMN 1D et 2D de la molécule (**104**) comporte de très proches similitudes au bonushenricoside A. Le rapport m/z du composé étant identique à la molécule (**103**) laisse supposer que nous sommes en présence d'un isomère. Le spectre RMN ¹H révèle la présence de 6 méthyles singulets (1,30 ; 1,18 ; 0,96 ; 0,95 ; 0,93 ; 0,83 ppm) ainsi qu'un triplet à 5,28 ppm ($J = 3,4$ Hz) correspondant à une double liaison d'un motif -CH₂-CH=(C_q)-. On retrouve également le proton H₂, lié à un groupement hydroxy, sous forme de doublet dédoublé à 4,30 ppm ($J = 10,8$ Hz). A 5,40 et 4,50 ppm, on perçoit respectivement les doublets ($J = 8,2$ et 7,8 Hz) des protons anomériques de deux monosaccharides dont l'un est rattaché au squelette triterpénique par une simple liaison osidique (4,50 ppm) et l'autre via une fonction ester (5,40 ppm). L'étude détaillée du spectre RMN ¹³C combinée avec le spectre HSQC confirme la présence d'une double liaison comportant un carbone quaternaire (145,0 ppm) ainsi qu'un ester (178,1 ppm). Au total, on perçoit les signaux de 6 méthyls, 11 méthylènes, 15 méthines et 9 carbones quaternaires. Les spectres HMBC et COSY mettent en évidence un glucose rattaché au C-28 et un glucuronide relié au C-3. L'ensemble des données RMN (1D et 2D) permettent d'identifier le troisième composé comme étant le 3-O-β-glucuronopyranosyle-bayogénine-28-O-β-glucopyranosylester également nommé zygophyloside I¹⁶⁸. Comme le bonushenricoside A, cette saponine a également été isolée à partir des racines de *C. bonus-henricus* par le même groupe de chercheurs.

Le spectre RMN ^1H du composé **(105)** présente des signaux similaires aux deux molécules **(103)** et **(104)** tels que la présence de 6 méthyles singulets (1,29 ; 1,14 ; 0,94 ; 0,91 ; 0,82 ppm) dont un méthoxy (3,72 ppm), un triplet à 5,34 ppm représentant un proton oléfinique et un proton anomérique (4,36 ppm). Les spectres RMN ^{13}C et HSQC montrent les signaux de 6 méthyls, 11 méthylènes, 10 méthines et 9 carbones quaternaires dont un acide carboxylique (179,9 ppm), un ester (177,4 ppm) et un carbone engagé dans une double liaison à 143,5 ppm. L'étude détaillée du spectre COSY couplé avec le spectre HMBC montre la présence d'un arabinose relié au carbone C-3 et le carbone C-28 porte la fonction acide carboxylique. Les données RMN et la masse obtenue par HRMS permettent d'identifier le composé **(105)** comme étant l'acide 3-O- β - arabinosyl-bayogéninique, une nouvelle molécule qui n'a jamais été isolée auparavant.

5.2.2.2. Evaluation des extraits de *C. bonus-henricus* sur Nrf2

Les trois extraits de plante (DCM, AcOEt et EtOH) ont été testés à différentes concentrations sur leurs effets inducteurs de Nrf2 dans les mêmes conditions que les tests réalisés sur *Helianthemum nummularium*.

Comme montré dans la **Figure 52**, les extraits de *C. bonus-henricus* présentent de faibles activités, même à haute concentration. Malgré une faible réponse, on observe que l'extrait éthanolique a tendance à présenter la meilleure activité. Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas pu évaluer l'activité des molécules isolées de l'extrait éthanolique. Par conséquent, il serait intéressant de réaliser le même test sur ces composés afin de déterminer s'ils sont responsables de cette activité.

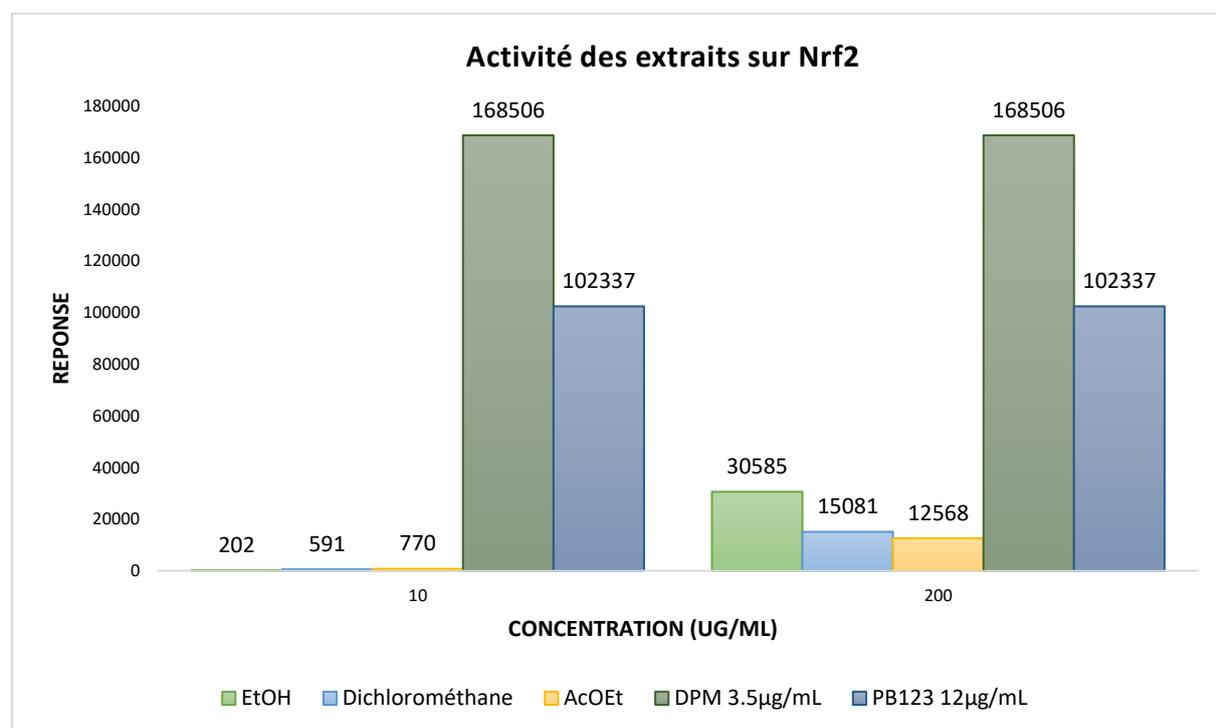


Figure 52. Evaluation d'activation de Nrf2 par les extraits de *C. bonus-henricus*. DBM et PB123 représentent les molécules utilisées pour le contrôle positif. DBM représente le dibenzoylméthane et PB123 est un mélange de molécules bioactives comprenant le carnosol, le 6-gingérol, et la lutéoline.

5.2.2.3. Conclusion

L'investigation phytochimique de deux extraits de *Chenopodium bonus-henricus* a permis d'approfondir nos connaissances sur la composition chimique de la plante. Le premier extrait apolaire a permis l'identification de deux molécules : un acide gras ainsi qu'un ester dérivé de l'acide *para*-coumarique déjà retrouvé dans une plante d'altitude originaire du Chili.

La deuxième investigation a porté sur l'extrait éthanolique dont la purification par HPLC semi-préparative a permis l'isolement de quatre composés. L'élucidation structurale par MS, RMN 1D et 2D a permis de mettre en évidence un dérivé de flavonoïde ainsi que trois saponines. De récents articles publiés en 2019 ont montré la présence du flavonoïde et de deux des dérivés saponines dans les extraits hydro-alcooliques de la plante. Cependant, l'acide 3-*O*- β -arabinosyl-bayogéninique (**105**) n'a jamais été isolé dans aucune source naturelle.

L'évaluation biologique sur l'activation de Nrf2 par les extraits de *Blitum bonus-henricus* n'a montré que de faibles activités. Selon les résultats obtenus, l'extrait alcoolique a montré la plus forte induction. Par conséquent, il serait intéressant de tester les molécules isolées afin d'identifier d'éventuelle activité inductrice de Nrf2 et permettre une valorisation de la plante.

5.2.3. Modifications chimiques de Produits Naturels

Parallèlement à notre projet principal qui vise la phytochimie, nous avons conduit des travaux connexes dont l'objectif ultime porte sur l'accès à de nouvelles entités chimiques bioactives. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la modification chimique d'une des plus grandes familles de polyphénols : les flavonoïdes. De nos jours, les flavonoïdes sont des ingrédients essentiels dans les domaines nutritionnelles, pharmaceutiques et cosmétiques. Les flavonoïdes sont associés particulièrement à des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antitumorales ainsi qu'à une capacité à moduler certaines enzymes indispensables aux cellules. Ils sont largement représentés dans notre régime alimentaire et sont préconisés pour la prévention de plusieurs maladies chroniques comme par exemple des maladies cardiovasculaires, le cancer ou encore des troubles cérébraux¹⁶⁹⁻¹⁷². De récentes études ont montré que ces flavonoïdes ont un effet bénéfique sur les maladies coronariennes, on parle de « *French Paradox* ». Ce terme fait référence au taux bas de maladies coronariennes dans la population méditerranéenne¹⁷³. De nombreux nutritionnistes et organismes de santé recommandent une alimentation riche en flavonoïdes¹⁷⁴.

L'abondance des flavonoïdes dans le règne végétal et leurs activités biologiques très variées font de cette famille de composés une source inestimable d'inspiration dans la recherche de nouveaux principes actifs¹⁷⁵.

L'un des problèmes liés à l'utilisation des flavonoïdes en tant que candidats médicamenteux est leur faible solubilité dans les milieux aqueux, y compris pour les flavonoïdes glycosylés. Afin de remédier à ce problème, il est possible de salifier en milieu basique un ou plusieurs groupes phénols de la structure flavonoïdique. Une autre stratégie pourrait être d'introduire des motifs salifiables sur le squelette de flavonoïdes. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes penchés sur l'introduction d'un motif *N,N*-diméthylamino méthylène sur un ou plusieurs carbones de flavonoïdes. Ainsi, la présence d'une amine tertiaire permettrait de préparer des sels d'ammonium hydrosolubles. Par ailleurs, la présence de ce motif et notamment l'azote peut renforcer l'interaction de la molécule avec la cible biologique via des liaisons hydrogènes, par exemple. Notons que cette approche a été appliquée et s'est révélée particulièrement efficace dans la synthèse du topotécan (anticancéreux hydrosoluble) par l'introduction du diméthylaminométhyl sur le produit naturel, 10-hydroxycamptothecin peu soluble¹⁷⁶.

Les résultats seront présentés et discutés sous la forme d'une publication qui est en cours de préparation.

Introduction of dimethylaminomethyl on flavonoids: a simple transformation for diversity and potential better bioavailability and pharmacodynamic

Mathieu AGOSTINI, Fatma Ezzahra BENJEMIA, Benjamin BOUCHERLE and Ahcène BOUMENDJEL

Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DPM, Grenoble, France

Abstract

A one step transformation of flavonoids to generate multiple flavonoid derivatives bearing a *N,N*-dimethylaminomethyl group. The latter was introduced at the carbons of the flavone scaffold through simple and one step reaction between a flavone and *N,N,N',N'*-tetramethyldiaminomethane. The transformation is applicable to a panel of flavonoids and offer an interesting tool for molecular diversity with potential output for enhancing solubility and pharmacodynamic profiles.

Introduction

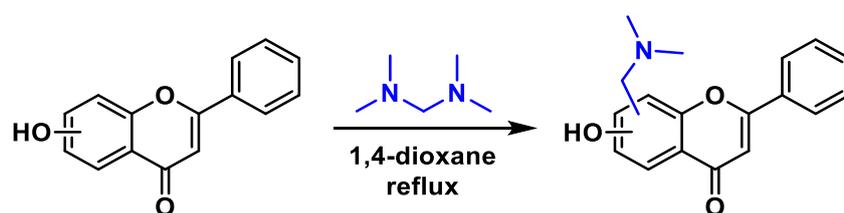
Natural products are an important source of lead molecules in drug discovery²⁴. The structural diversity of natural products is as much as varied as synthetic compounds but also better represent the “chemical space” of drug-like molecules¹⁷⁷. Consequently, a significant number of new chemical entities registered as drugs are natural products or inspired from natural products. Generally, natural products analogs are obtained by the introduction of new functionalities on the natural product skeleton or substitution of one moiety present in the natural products by a new one. In the field of natural products, polyphenols and especially flavonoids represent an important class. They are largely represented in daily diet and are preconized for the prevention of many chronic diseases such as cardiovascular, cancer and brain disorders. For these reasons grape flavonoids are considered as nutraceuticals, commonly referenced as “the French Paradox”¹⁷³. There is a general consensus among nutritionists and health organisms recommending daily consumption of flavonoids-rich foods¹⁷⁴.

The chemical structure of flavonoids allows them to interact with many biological targets including, receptors, enzymes, proteins. However, the antioxidant activity still by far the hallmark of flavonoids where it is preconized to play key roles in the effect against chronic diseases highlighted above¹⁷⁴. The presence of phenols on the scaffold of flavonoids have a dual role: it exerts the antioxidant effect by trapping free radical species and establish hydrogen bonding interactions with the active site of the biological target.

The positive impact of flavonoids on human health led the scientific community to use flavonoids as lead compounds in the design of new drugs. In this context, the literature is extremely rich in scientific reports and patent. In most cases, the design of flavonoid-derived drug candidates starts from a naturally occurring flavonoid that is subjected to chemical modification by grafting chemical motifs at one or more phenol group. In the latter case, the chemistry is straightforward and allows to access a variety of structures. However, it sacrifices the phenol groups which are required for preserving the activity of the native flavonoid. Besides, one of the drawbacks of using flavonoids as drugs or as drug precursors is the low solubility in aqueous media¹⁷⁸. Methods involving either making salts on the phenol groups or formulation the compound in solubilizing systems were used. Unfortunately, both strategies may lead to partially or totally loss of action of the native compound. Herewith, we have undertaken a study with the aim to introduce a *N,N*-dimethylaminomethyl motif that act as a “swiss knife” tool. It allows to make diversity in one single step, used for enhancing the flavonoid solubility through making ammonium salts on the introduced nitrogen and create an additional point of interaction with the active site. The feature of this motif for enhancing water solubility of drugs was used in the early 90s. Indeed, topotecan, a water-soluble drug was synthesized via the introduction of a dimethylaminomethyl motif at 9-position of the naturally occurring 10-hydroxycamptothecin¹⁷⁶. The introduction of the *N,N*-dimethylaminomethyl on biomolecules has proven its positive effect¹⁷⁹. To reach this goal, we propose a simple, generic and one step introduction of *N,N*-dimethylaminomethylen at carbons of flavonoids.

Results and Discussion

In the present study, we selected four flavonoids having either, one, two or five hydroxyl groups, in order to check the broadness of the method (**Scheme 3**). Hence, refluxing of a mixture of flavone and *N,N,N',N'*-tetramethyldiaminomethane in 1,4-dioxane under the conditions summarized in **Table 4** led to the formation of differently substituted flavones that were easily separated in their pure form and characterized by spectrometric and spectroscopic means.



Scheme 3. The procedure of flavones transformation.

As expected the newly introduced *N,N*-dimethylaminomethyl takes place at the C-H carbons adjacent to a phenol group (**Table 4**). When 6- or 7-hydroxyflavones were used as the starting flavone, each provided one single derivative. However, the compound bearing two substituents was not observed. It is presumed that the latter can be reached by using more excess of reagent. In the case of chrysin (5,7-dihydroxyflavone), three derivatives were isolated being the two monosubstituted and the disubstituted compounds. The same reaction procedure was applied to quercetin. Being polyhydroxylated, quercetin provided one monosubstituted and two disubstituted derivatives. The site of substitution was unambiguously identified by NMR.

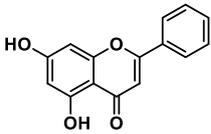
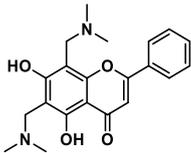
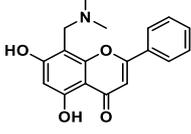
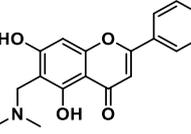
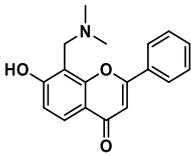
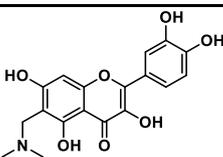
In conclusion, we report here that the introduction of the *N,N*-dimethylaminomethyl group on flavones can be explored as a way for making diversity of flavones with added values regarding better solubility and tighter interaction with the biological targets without losing the antioxidant effect. The method can be applied in a combinatorial approach by treating a mixture of flavones in the same conditions disclosed above.

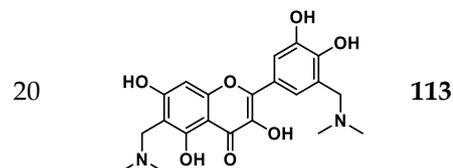
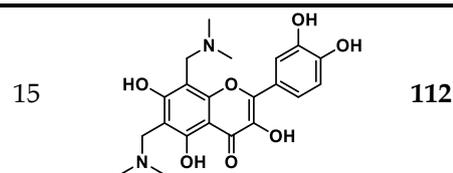
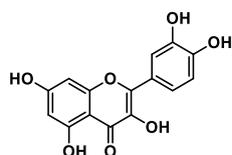
Experimental section

General protocol of synthesis

The reagent *N,N,N',N'*-tetramethyldiaminomethane was added to a solution of a polyphenol solubilized in 1,4-dioxane (10 mL per 1 mmol). The mixture was refluxed then cooled to room temperature and the solvent was evaporated under vacuum. The structures were elucidated by NMR and MS after purification. The different features for each synthesis performed are displayed in the following table. The conditions of purification will be indicated with the NMR data (see below).

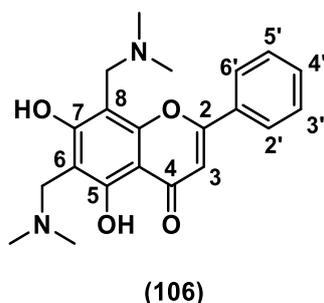
Table 4. Conditions of synthesis.

Starting material	Amount of substance (mmol)	Eq. of reagent	Time of reaction (h)	Yield (%)	Final product	N°
 Chrysin	0.2	5.4	24	97		106
	1	1.1	4	13		107
				30		108
7-hydroxyflavon	0.2	1.7	16	97		109
6-hydroxyflavon					0.4	1.7
Quercetin	0.75	1	4	34		111



Structural determination

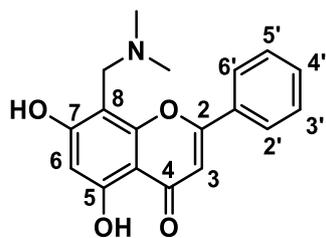
6,8-bis((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one (106)



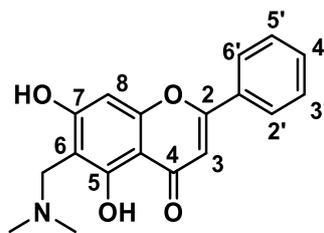
No purification needed. Pale yellow powder. $C_{21}H_{24}N_2O_4$. 96% yield (71 mg). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.96 - 7.89 (2H, m, $H_{3',4',5'}$), 7.53 (3H, dd, $H_{2',6'}$, $J = 5.3, 2.0$ Hz), 6.58 (1H, s, H_3), 3.96 (2H, s), 3.83 (2H, s), 2.61 (6H, s), 2.41 (6H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 182.6, 176.8, 164.2, 163.0, 133.0, 132.7, 130.3, 127.4, 105.9, 103.4, 100.7, 98.2, 54.1, 53.1, 43.1. HRMS: m/z 369.1800 [MH^+] (calc. for $C_{21}H_{25}N_2O_4$, 369.1809).

NMR data of compounds (107) and (108)

The mixture was separated with an open column chromatography using an isocratic elution using 95:5 (DCM:MeOH) to afford the compound (107) as a yellow solid ($C_{18}H_{17}N_1O_4$; 34 mg, 13 % yield) and 90:10 (DCM:MeOH) to afford compound (108) as a yellow solid ($C_{18}H_{17}NO_4$; 76 mg, 30 % yield).



(107)



(108)

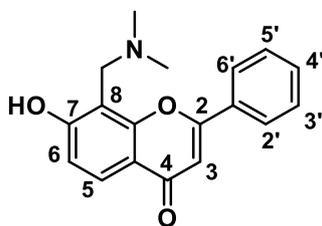
8-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (107)

Yellow solid. $C_{18}H_{17}NO_4$. 13 % yield (34 mg). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.01 – 7.91 (3H, m, $H_{3',4',5'}$), 7.58 – 7.49 (2H, m, $H_{2',6'}$), 6.61 (1H, s), 6.25 (1H, s, H_3), 4.19 (2H, s, H_6), 2.79 (6H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 182.8, 164.6, 160.5, 132.9, 132.7, 130.2, 127.3, 105.2, 104.2, 53.7, 43.2. HRMS: m/z 312.1222 [MH^+] (calc. for $C_{18}H_{18}NO_4$, 312.1230).

6-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (108)

Yellow solid. $C_{18}H_{17}NO_4$. 30 % yield (76 mg). 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 8.14 – 7.97 (3H, m, $H_{3',4',5'}$), 7.66 – 7.46 (2H, m, $H_{2',6'}$), 6.93 (1H, s, H_3), 6.08 (1H, s, H_8), 3.97 (2H, s), 2.42 (6H, s). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$): 191.0, 177.3, 171.8, 170.1, 164.4, 141.4, 140.5, 138.7, 135.8, 114.4, 112.5, 109.3, 109.0, 62.5, 53.0. HRMS: m/z 312.1223 [MH^+] (calc. for $C_{18}H_{18}NO_4$, 312.1230).

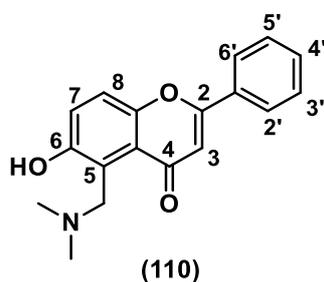
8-((dimethylamino)methyl)-7-hydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (109)



(109)

No purification needed. Yellow pale solid. $C_{18}H_{17}NO_3$. 97 % yield (49 mg). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.96 – 7.90 (3H, m, $H_{3',4',5'}$), 7.85 (1H, d, H_5 , $J = 8.9$ Hz), 7.54 (2H, dd, $H_{2',6'}$, $J = 5.1, 1.9$ Hz), 6.75 (1H, d, H_6 , $J = 8.9$ Hz), 6.67 (1H, s, H_3), 4.28 (2H, s), 2.66 (6H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 180.0, 171.6, 164.4, 158.1, 154.0, 133.2, 132.7, 130.3, 127.5, 119.2, 114.3, 107.3, 107.1, 54.9, 43.8. HRMS: m/z 296.1273 [MH^+] (calc. for $C_{18}H_{18}NO_3$, 296.1281).

5-((dimethylamino)methyl)-6-hydroxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (110)

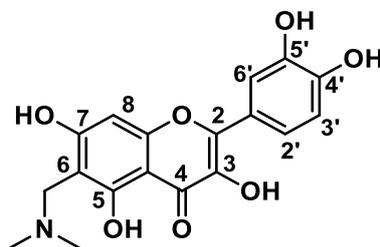


No purification needed. Yellow solid. $C_{18}H_{17}NO_3$. 93 % yield (117 mg). 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.03 – 7.94 (3H, m, $H_{3',4',5'}$), 7.66 (1H, d, H_8 , $J = 9.2$ Hz), 7.55 (2H, m, $H_{2',6'}$), 7.34 (1H, d, H_7 , $J = 9.2$ Hz), 6.82 (1H, s, H_3), 4.75 (2H, s), 2.84 (6H, s). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): 182.8, 163.8, 163.0, 154.2, 151.2, 132.7, 132.6, 127.3, 127.2, 123.5, 121.0, 116.0, 107.6, 57.2, 43.6. HRMS: m/z 296.1276 [MH^+] (calc. for $C_{18}H_{18}NO$, 296.1281).

NMR data of compounds (111), (112) and (113)

The three following compounds (**111** : $C_{18}H_{17}NO_6$; 87 mg, 34 % yield, **112** : $C_{21}H_{24}N_2O_6$; 38 g, 15 % yield and **113** : $C_{21}H_{24}N_2O_6$; 50 mg, 20 % yield) were purified by using a semi-preparative HPLC and a reverse-phase column C_{18} (250x21.2 mm, 10 μm) with the following elution system: $H_2O/MeOH$ containing both 0.1 % formic acid (95:5 \rightarrow 0:100 v/v).

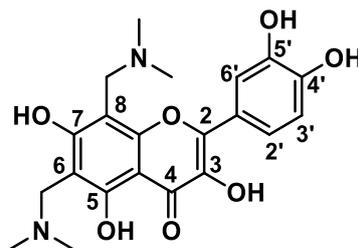
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one
(111)



(111)

Orange powder. C₁₈H₁₇NO₆. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.69 (1H, d, H_{6'}, J = 2.2 Hz), 7.55 (1H, dd, H_{2'}, J = 8.5, 2.2 Hz), 6.90 (1H, d, H_{3'}, J = 8.5 Hz), 6.09 (1H, s, H₈), 3.57 (2H, s), 2.38 (6H, s). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): 175.6, 161.3, 159.7, 153.6, 147.6, 146.0, 145.1, 135.52, 122.2, 119.8, 115.7, 114.8, 101.9, 99.3, 66.3, 53.0, 43.7. HRMS: *In progress*.

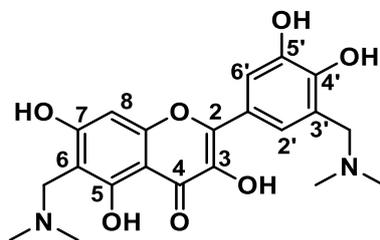
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,8-bis((dimethylamino)methyl)-5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one (112)



(112)

Pale orange solid. C₂₁H₂₄N₂O₆. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) 7.70 (1H, d, H_{6'}, J = 2.2 Hz), 7.61 (1H, dd, H_{2'}, J = 8.5, 2.2 Hz), 6.91 (1H, d, H_{3'}, J = 8.5 Hz), 4.39 (2H, s), 4.26 (2H, s), 2.87 (6H, s), 2.86 (6H, s). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 176.4, 175.8, 170.1, 162.2, 157.6, 148.6, 146.4, 146.3, 136.8, 124.3, 121.3, 116.4, 115.6, 102.6, 99.8, 97.1, 54.1, 53.2, 42.9. HRMS: *In progress*.

6-((dimethylamino)methyl)-2-(3-((dimethylamino)methyl)-4,5-trihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one (113)



(113)

Orange solid. C₂₁H₂₄N₂O₆. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.83 (1H, s, H_{6'}), 7.75 (1H, s, H_{2'}), 6.31 (1H, s, H₈), 4.49 (2H, s), 4.35 (2H, s), 2.88 (6H, s), 2.87 (6H, s). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): 177.1, 169.9, 166.8, 163.7, 156.6, 148.9, 146.9, 146.8, 138.0, 123.6, 118.8, 116.4, 104.1, 96.6, 58.3, 51.5, 43.2. HRMS: *In progress*.

CHAPITRE 6 : Conclusions générales et Perspectives

6.1. *Nauclea latifolia*

L'objectif principal de ce projet était de contribuer à l'étude de l'origine controversée du tramadol isolé à partir des racines de *Nauclea latifolia*. Nous avons entrepris l'analyse phytochimique de douze lots de racines de *N. latifolia* qui ont été collectés au Cameroun. Le but est d'isoler plusieurs échantillons de pureté optimale pour des analyses isotopiques ^{14}C . Cette méthode permet de mesurer le ratio $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ contenu dans le tramadol et ainsi d'en déterminer son origine.

Les multiples étapes de purification de l'extrait méthanolique du lot **8-NL** par Chromatographie Flash et HPLC semi-préparative ont permis l'isolement d'un premier échantillon de tramadol (**TMD-8**) dont la quantité et la pureté ont été déterminées par RMN ^1H . Les purifications réalisées sur l'extrait alcaloïdique **10-NL** ont permis d'obtenir deux échantillons supplémentaires de tramadol (**TMD-10a** et **10b**).

Les échantillons **TMD-8** et **10a** ont été analysés au laboratoire « *Accelerator Mass Spectrometry Laboratory* » de l'Université d'Arizona, en parallèle avec un échantillon de tramadol commercial purifié à partir d'un médicament disponible en pharmacie. Les données obtenues montrent des résultats contradictoires. L'échantillon **TMD-8** présente une teneur en ^{14}C conforme à une origine naturelle. En opposition, les résultats obtenus pour **TMD-10a** montre une teneur beaucoup trop importante par rapport à ce qui est attendu. Le tramadol de synthèse analysée présente également un taux en radiocarbone assez conséquent, alors qu'il devrait posséder un taux nul.

Ces résultats difficiles à interpréter nous ont conduit à faire réaliser des analyses par un autre laboratoire. Nous avons envoyé le deuxième échantillon **TMD-10b** avec un témoin de tramadol de synthèse (**TMD-S2**) obtenu chez Sigma-Aldrich, au laboratoire du Climat et de l'Environnement à Gif-sur-Yvette. Comme attendu, le tramadol de synthèse **TMD-S2** présente un taux en carbone 14 nul. Les résultats obtenus pour **TMD-10b** présente une teneur importante de carbone 14 mais reste inférieur au taux attendu.

Devant ces résultats qui ne confirme ou infirme l'origine naturelle du tamadol extrait, il est impératif d'isoler d'autres échantillons et effectuer des analyses isotopiques ^{14}C supplémentaires.

Si l'origine du tramadol s'avère effectivement naturelle, cela pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans les domaines de la chimie, de la biologie, de la médecine et de l'environnement, car plusieurs interrogations subsistent :

- **Pourquoi *N. latifolia* biosynthétise le tramadol en grande quantité ?**

Le tramadol pourrait jouer un rôle dans un mécanisme de défense contre des prédateurs nuisant au développement de la plante.

- **Est-ce que *N. latifolia* est la seule espèce de *Nauclea* pouvant biosynthétiser du tramadol ?**

Le tramadol pourrait être un composé seulement biosynthétisé par les enzymes présentes dans *N. latifolia*. Il n'est pas impossible qu'une molécule soit produite par une seule espèce d'une famille. Par exemple, l'artémisinine est seulement biosynthétisée par *Artemisia annua*, on ne la retrouve pas dans d'autres espèces du même genre.

- **Est-ce que le tramadol serait biosynthétisé par des endophytes et/ou des bactéries plutôt que par la plante elle-même ?**

Les micro-organismes et les endophytes sont une source riche en molécules bioactives largement inexploitées. Il n'est donc pas impossible que des endophytes présents dans la plante, veillant au développement de cette dernière soient responsables de la biosynthèse du tramadol

Le cadre de ce projet a permis de mettre en place plusieurs collaborations avec des laboratoires scientifiques spécialisés dans différents domaines, ayant chacun un objectif précis. Par exemple, une de ces collaborations a porté sur la culture *in vitro* de plantules de *N. latifolia* dans des milieux de culture enrichies en tramadol dans le but d'observer une absorption du tramadol par la plante. Cette étude est réalisée par le laboratoire de Biologie des Plantes et Innovation dirigé par la Pr. Michèle Boitel, à l'Université d'Amiens. A ce jour, les cultures de plusieurs plantules à partir des graines de *Nauclea latifolia* sont en cours. Une fois, leurs développements finis, les différentes parties des plantules seront extraites et analysées afin d'observer une quelconque teneur en tramadol.

6.2. Les plantes alpines

Un des projets de cette thèse porta sur un nouveau thème entrepris par notre laboratoire : l'étude phytochimique de la flore alpine en vue d'une valorisation en tant que source molécules bioactives. Nous nous sommes intéressés à deux plantes collectés au Col du Lautaret, en collaboration avec la Station Alpine Joseph Fourier. La première est une espèce nommée *Helianthemum nummularium* dont les parties aériennes sont surreprésentées dans le régime alimentaire des ongulés alpins. La deuxième espèce est *Chenopodium bonus-henricus*, une plante très utilisée dans le domaine alimentaire local, elle est généralement consommée en tourtes. L'objectif de ce deuxième volet est d'isoler de nouveaux métabolites pouvant posséder des activités biologiques.

6.2.1. *Helianthemum nummularium*

La surconsommation de cette plante dans le régime des ongulés peut être expliquée par deux hypothèses : 1) les valeurs nutritionnelles de la plante ou 2) les ongulés consomment cette plante dans un but d'automédication.

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons mesuré la teneur en protéines et glucides de la plante. Les expériences ont été réalisées sur cinq populations d'*H. nummularium* (trois individus par population) collectées à différentes altitudes. Les résultats obtenus ont pu mettre en évidence que la plante ne possède pas de valeurs nutritionnelles plus importantes que les plantes que l'on retrouve dans le même environnement. Ceci permet donc de rejeter la première hypothèse pour expliquer cette surconsommation.

Par conséquent, nous nous sommes intéressés à l'identification de métabolites présents dans la plante pouvant présenter des activités biologiques et que les ongulés utiliseraient à des buts d'automédication. Afin d'atteindre ces objectifs, nous nous sommes penchés sur la purification de l'extrait alcoolique de la plante, qui a permis d'isoler 8 dérivés polyphénoliques principalement des flavonoïdes.

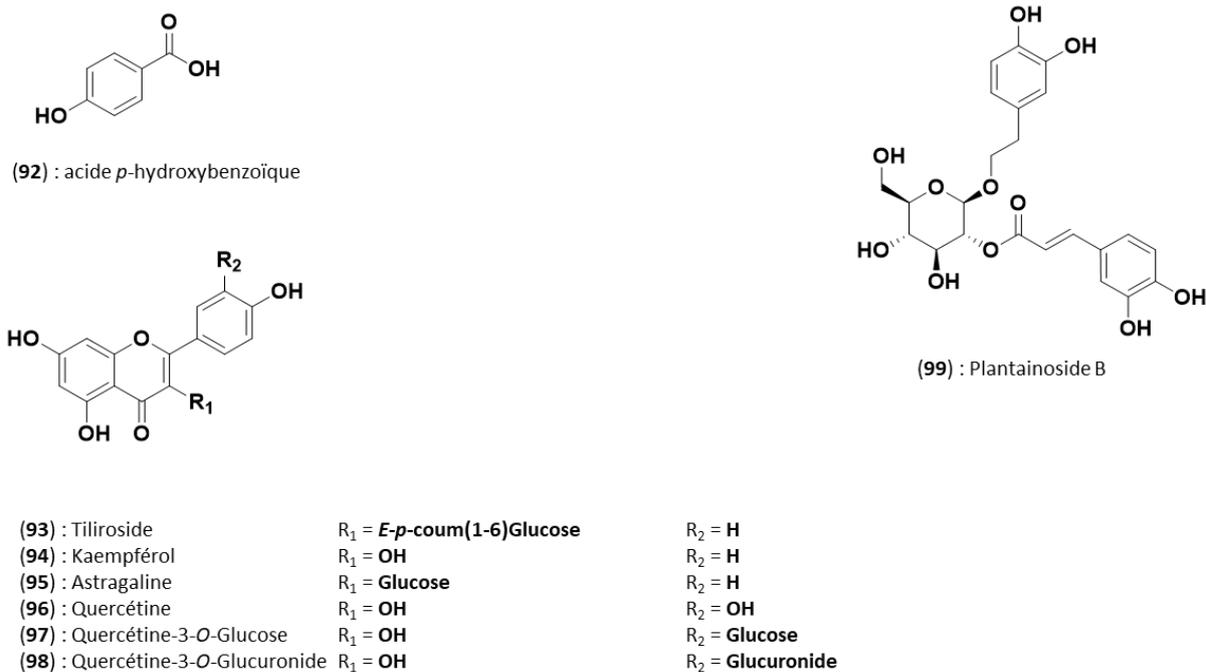


Figure 39. Structures des molécules isolés à partir de l'extrait éthanolique d'*Helianthemum nummularium*.

Selon la littérature, la quercétine, le kaempférol, l'astragaline, le tiliroside et la quercétine-3-*O*-glucoside ont été testées contre des parasites protozoaires unicellulaires du genre *Trypanosoma* connu pour infecter les animaux et les humains. L'ensemble de ces données sont donc en faveur de l'hypothèse d'automédication des ongulés par la consommation d'*H. nummularium*. Cette hypothèse devra être validée par des tests biologiques. Une collaboration avec un laboratoire de l'INRA spécialisé est en cours de mise en place.

Dans le cadre de ce projet, nous nous sommes aussi penchés sur l'activité biologique des extraits et molécules pures issus de cette plante et en particulier l'activité antioxydante via l'activation du facteur de transcription Nrf2.

L'extrait éthanolique a montré une activité d'activation de Nrf2. Afin de déterminer les molécules responsables de cette activité dans l'extrait, nous avons analysé les molécules isolées. La quercétine a clairement montré l'activité la plus forte, mais s'est révélée beaucoup moins active que l'extrait.

6.2.2. *Chenopodium bonus-henricus*

Dans le but de valoriser *Chenopodium bonus-henricus*, une plante collectée dans une zone d'altitude, en tant que source de molécules bioactives, nous nous sommes intéressés à deux extraits de la plante : un apolaire (DCM) et un polaire (EtOH). La purification de l'extrait apolaire par l'utilisation successive de colonnes de chromatographie et de SiO₂ a permis l'identification par RMN et MS de deux molécules connues. La première est un dérivé d'acide *p*-coumarique (**100**) déjà isolé à partir d'un extrait DCM de *Myoschilos oblongum*, qui est également une plante d'altitude du Chili. La deuxième molécule isolée est l'acide palmitique (**101**), un acide gras que l'on retrouve communément dans les plantes.

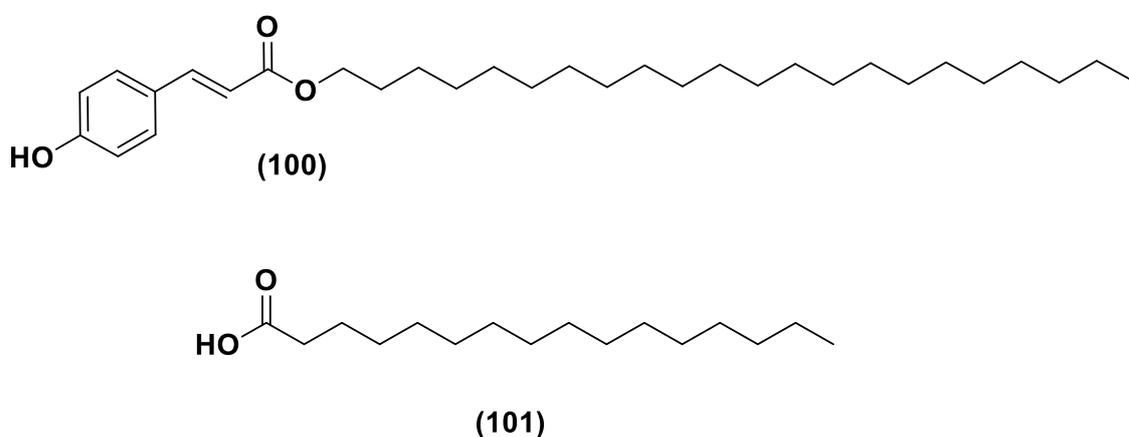
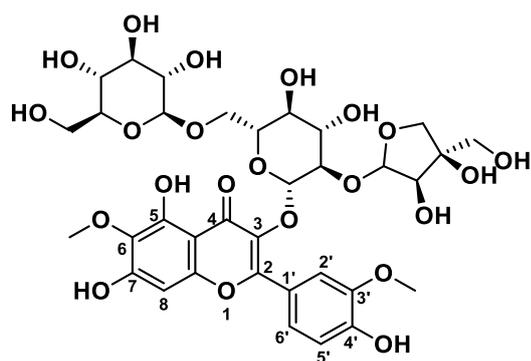
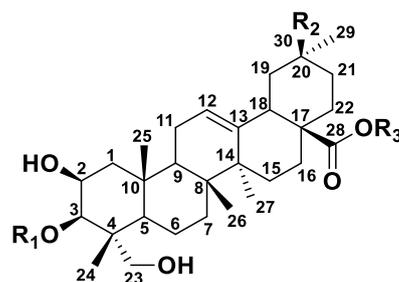


Figure 48. Structures des molécules identifiées dans l'extrait DCM.

L'étude phytochimique de l'extrait éthanolique a permis de mettre en évidence quatre molécules comprenant un dérivé de flavonoïde (**102**) et trois dérivés saponiques (**103-105**). Malheureusement, un article publié en 2019 décrit la présence des composés (**103**) à (**105**) dans des extraits hydro-alcooliques des parties aériennes et des racines de la plante. Cependant, la molécule (**105**) est nouvelle, et n'a jamais été retrouvée dans aucun organisme.



(102)



- (103) $R_1 = \text{Arabinose}$ $R_2 = \text{COOMe}$ $R_3 = \text{Glucose}$
 (104) $R_1 = \text{Glucuronide}$ $R_2 = \text{Me}$ $R_3 = \text{Glucose}$
 (105) $R_1 = \text{Arabinose}$ $R_2 = \text{COOMe}$ $R_3 = \text{H}$

Figure 51. Structures des molécules isolées de *C. bonus-henricus* par HPLC semi-préparative et caractérisées par SM, RMN 1D et 2D.

De même que pour *H. nummularium*, nous avons évalué l'activité antioxydante de plusieurs extraits de *C. bonus-henricus* via la voie d'activation de Nrf2. Parmi tous les extraits testés, l'extrait éthanolique s'est avéré être le plus actif. Par conséquent, afin de déterminer les molécules responsables de cette activité, les composés isolés à partir de cet extrait seront testés sur leurs capacités à induire l'activation de Nrf2.

Par manque de temps, toutes les molécules présentes dans l'extrait n'ont pas pu être isolées et caractérisées.

De plus, il serait intéressant d'entreprendre l'étude phytochimique d'une espèce cousine de *C. bonus-henricus* également collectée dans les mêmes zones d'altitude comme par exemple *Chenopodium album*. Le but serait de comparer les compositions chimiques des deux plantes et observer les variations de concentrations des molécules ainsi que celles biosynthétisées par une espèce et non par l'autre.

Pour terminer, voici quelques photos de la région, plus précisément au Col du Lautaret.



Photos prises pendant nos récoltes au Col du Lautaret

Valorisation des travaux de thèse

Présentation de posters

Mathieu Agostini, Benjamin Boucherle, Jean-Luc Wolfender, Emerson F. Queiroz and Ahcène Boumendjel. ***Nauclea latifolia*: An African medicinal plant as a source of bioactive compounds.** Presented at the 8^{ème} Journée Scientifique du Médicament, 7 Juin 2018, Grenoble (France).

Mathieu Agostini, Laurence Marcourt, Germain Sotoing Taiïwe, Benjamin Boucherle, Michel De Waard, Jean-Luc Wolfender, Emerson F. Queiroz and Ahcène Boumendjel. **The Tramadol origin: the end of a story or an endless controversy?** Presented at 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 1 – 4 septembre 2019, Innsbruck (Austria). *Planta Medica* 85(18), DOI: 10.1055/s-0039-3400414.

Publications

Les publications seront présentées après cette partie.

Mathieu Agostini, Isabelle Hininger-Favier, Laurence Marcourt, Benjamin Boucherle, Bifeng Gao, Brooks M. Hybertson, Swapan K Bose, Joe M. McCord, Annie Millery, Maxime Rome, Emerson Ferreira Queiroz, Jean-Luc Wolfender, Christiane Gallet and Ahcène Boumendjel. **Phytochemical and Biological Investigation of *Helianthemum nummularium* a High Altitude Growing Alpine Plant Overrepresented in Ungulates Diets.** *Planta Medica*, accepted. (2020).

Mathieu Agostini, Fatma Ezzahra Benjemia, Benjamin Boucherle and Ahcène Boumendjel. **Introduction of dimethylaminomethyl on flavonoids: a one-step transformation for diversity and potential better bioavailability.** In progress (2020).

Phytochemical and Biological Investigation of *Helianthemum nummularium* a High Altitude Growing Alpine Plant Overrepresented in Ungulates Diets

Authors

Mathieu Agostini¹, Isabelle Hininger-Favier^{2,4*}, Laurence Marcourt^{3*}, Benjamin Boucherle^{1*}, Bifeng Gao^{4,5}, Brooks M. Hybertson⁵, Swapan K Bose⁵, Joe M. McCord⁵, Annie Millery⁶, Maxime Rome⁷, Emerson Ferreira Queiroz³, Jean-Luc Wolfender³, Christiane Gallet⁶ and Ahcène Boumendjel¹

*Equal contribution

Affiliations

- 1 Univ. Grenoble Alpes, CNRS, DPM, Grenoble, France
- 2 Univ. Grenoble Alpes, Inserm, LBFA, Grenoble, France
- 3 School of Pharmaceutical Sciences, EPGL, University of Geneva, University of Lausanne, CMU, Geneva, Switzerland
- 4 University of Colorado Anschutz Medical Campus, Aurora, CO, USA;
- 5 Pathways Bioscience, Aurora, CO, USA
- 6 Univ. Grenoble Alpes, Univ. Savoie Mont Blanc, CNRS, LECA, Grenoble, France
- 7 Univ. Grenoble Alpes, CNRS, SAJF, Grenoble, France

ABSTRACT

Helianthemum nummularium is an European shrub growing at high altitude where it cops with high level of stress. It was found to be overexpressed in ungulates diets compared to more abundant surrounding plants. These elements combined with the fact that *Helianthemum nummularium* from the Alps has never been investigated prompted us to study the phytochemical composition of its aerial parts. The analysis of the polar extract allowed the isolation of eight compounds: p-hydroxybenzoic acid, tiliroside, kaempferol, astragalin, quercetin, plantainoside B, quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-glucuronide.

We investigated the effect of polar extract and isolated compounds on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) transcription factor, which regulates the expression of a wide variety of cytoprotective genes. We found that the ethanolic extract activate the expression of Nrf2 in a dose-dependent manner whereas the pure compounds were much less active. The activation of the Nrf2 pathway by the plant extract could pave the way for studies to promote healthy aging through protection of cells against oxidative stress. Moreover, the isolated compounds could be investigated alone or in combination in the perspective of making the link between the ungulate's preference for this plant and possible use of it for self-medication.

Keywords

Cistaceae, *Helianthemum nummularium*, Nrf2, polyphenols, zoopharmacognosy

Introduction

Helianthemum nummularium (L.) Mill. (Cistaceae) is a European dwarf shrub distributed in many regions of Europe. In European Alps, it is one of the few representatives of the Cistaceae family in mountain areas, where it grows preferentially on rocky areas and poor soils (Fig. 1). This species exhibits complex morphological variations^{117,180} illustrated by unusual white or pink colored flowers¹¹⁸. *Helianthemum nummularium* grows in locations where it is exposed to drastic environments: cold, UV radiations, oxidative stress and short growth period. The survival in such conditions could be due to many factors: specialized physiological responses that modify plant metabolism, triggering the synthesis of specific molecules that act as regulators of membranes permeability, ultraviolet filters and free radical scavengers. Despite its scarcity, this plant was found to be overconsumed by ungulates. Indeed, recent studies conducted on *Helianthemum nummularium* showed that this species was overrepresented in the diets of chamois (*Rupicapra rupicapra*), mouflon (*Ovis gmelini* subsp. *Musimom* x *Ovis* sp.)^{51,52} and cow (*Bos taurus*)¹⁸¹. This overrepresentation could result from the persistence of its evergreen leaves all over autumn but other evergreen plants are more available in the studied grasslands without being particularly recovered in animal feces. The preference could also be due to the abundance of compounds with high nutritional values (proteins, carbohydrates and fatty acids). The latter hypothesis was checked and showed that the forage value of the plant is too low to explain its selectivity by ungulates^{123-125,182}.

The adaptation of *Helianthemum nummularium* to high altitude stress and its palatability for ungulates could be due to the occurrence of specialized secondary metabolites that may contribute to the plant protection against stress and also to the use of these metabolites for self-medication among ungulates.

Due to the absence of exhaustive phytochemical studies realized on *Helianthemum nummularium*, we aimed at searching for compounds that could be investigated as possible tools used by the plant for its adaptation to high altitude stress and/or as possible molecules used by the ungulates for self-medication. Moreover, our interest toward oxidative stress in health and disease, we have been investigating the therapeutic potential of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation molecules¹⁸³. Hence, we aimed to evaluate the activity of extracts and compounds isolated from *Helianthemum nummularium* on Nrf2, assuming that compounds that may protect the plant tissue against oxidative stress can do as well for humans^{184,185}.



Fig. 1 Aerial parts of *Helianthemum nummularium*.

Results

The aerial parts of the plant were collected in the French Alps at over 2000 m altitude and were extracted by different solvents: cyclohexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and water. A NMR profiling, realized on the crude extracts showed that the ethanolic extract was the richest in secondary metabolites. Hence, our investigation was focused on this extract. The purification using chromatography methods. High-performance liquid chromatography-photodiode array detector-evaporative Light-scattering Detector (HPLC-PDA-ELSD) hyphenated techniques were used to compensate for the use of a single detector. Following successive purifications, we isolated 8 compounds. The full structures of the isolated compounds were determined by means of mass spectrometry, 1D and 2D NMR and comparison with literature data (**Fig. 2**, NMR data, see Supporting information). Except for p-hydroxybenzoic acid (**1**) and plantainoside B (**8**), the remaining compounds are flavonoid derivatives. Compounds **1** - **5** were already identified in species of the genus *Helianthemum*, including *H. canum*, *H. sessiflorum*, *H. glomeratum* and *H. ruficomum*¹²⁶⁻¹²⁹. However, quercetin-3-*O*-glucoside (**6**), quercetin-3-*O*-glucuronide (**7**) and plantainoside B (**8**) have never been reported in any species of *Helianthemum*¹⁸⁶.

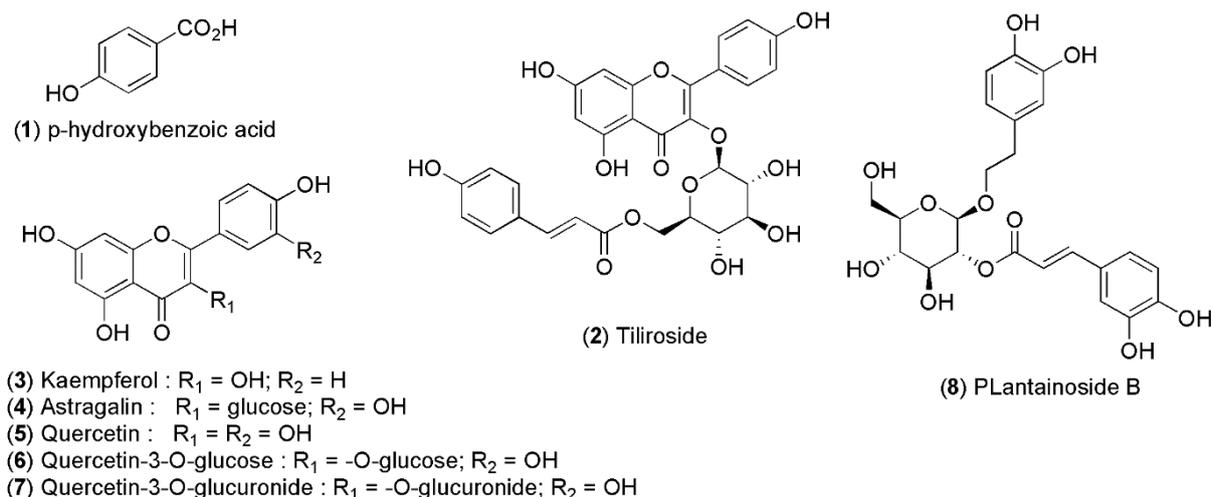


Fig. 2. Structures of compounds isolated from the ethanolic extract of *Helianthemum nummularium*

We investigated the effect of the ethanolic extract and pure compounds on the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway. Under basal conditions, Nrf2 bind to Keap1 protein (Kelch-like ECH-associated protein 1), a protein acting as a key sensor of oxidative stress. The Nrf2-Keap1 complex is targeted for proteasomal degradation in the cytosol and upon exposure to oxidative stress and other ARE activators, then, Nrf2 is released from Keap1 and translocates to nucleus, where it can bind to the ARE, leading to the expression of antioxidant enzymes. For the evaluation of the ethanol extract and pure compounds, we used the ARE-Nrf2 Luciferase test which is an *in vitro* method conducted for the measurement of the activation of this protective ARE-Nrf2 using a reporter gene such as firefly luciferase driven by a promoter containing one or more ARE sequences.

In this study, we used the hepatocellular carcinoma HepG2 cell line transfected with luciferase gene (pARE-luciferase reporter) under the transcriptional control of a constitutive promoter fused with the ARE element¹⁸⁷. The firefly luciferase is an enzyme that catalyzes the light-producing oxidation of luciferin in the presence of ATP and oxygen¹⁸⁸. When exposed to an oxidant compound, endogenous Nrf2-dependent genes are activated. Since, the luciferase-driven luminescence is dependent on Nrf2 expression, an increase of light will be produced in the presence of a Nrf2 inducer^{188,189}.

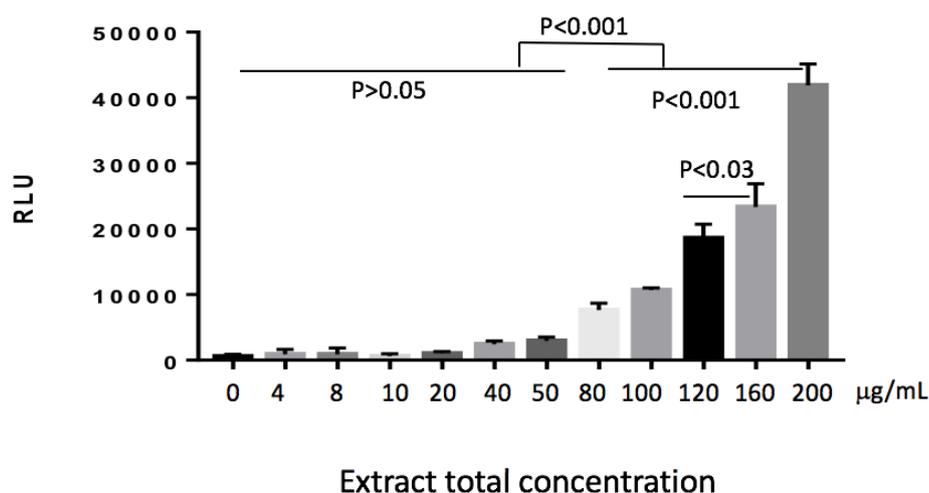


Fig. 3 Activation of the Nrf2 pathway by the ethanolic extract. The activity was measured through the relative light units (RLU) of chemiluminescence observed with added luciferin after ARE-driven luciferase gene expression and following treatment with range of concentrations of *Helianthemum nummularium* in the HepG2 cells. Results are the mean of 3 separate experiments. Data are expressed as mean S.E.M.

The ethanolic extract (**Fig. 3**) exhibits Nrf2 activation in a dose-response manner (up to 200 µg/mL). With the aim to link the latter activation to a compound, we evaluated derivatives **1**, **4**, **5**, **7** and **8** that were available in sufficient quantities (**Fig. 4**). Among the tested compounds, quercetin was the only compound that showed significant activity where the maximum activity was reached at concentration of 5 µg/mL. In order to see if compounds work synergistically to activate the Nrf2, we tested compounds **1**, **4**, **5**, **7** and **8** in combination at concentration of 10 µg/mL each. Unfortunately, no significant activity was observed (data not shown).

Finally, we checked the cytotoxicity of the extract and pure compounds on the HepG2 cell line and found no significant effect on cell viability (**Fig. 1S**, Supporting information).

Fig.4

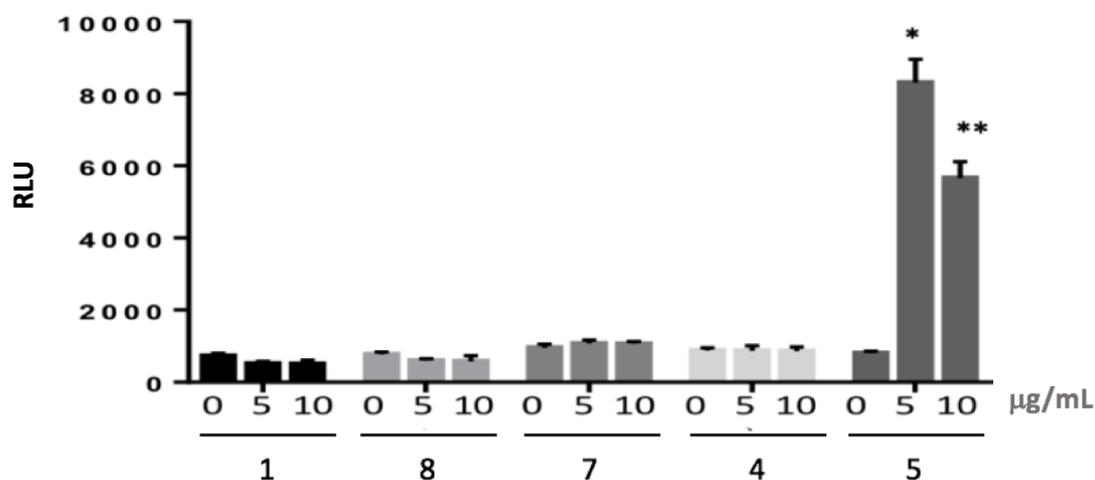


Fig. 4 Activation of the Nrf2 pathway by compounds 1, 4, 5, 7 and 8 at 5 and 10 µg/mL concentration. The test was conducted in the same conditions and similarly as for the extract. The data are expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.0001$ vs control. ** $p < 0.05$ vs 5 µg/mL quercetin.

Discussion

Our interest in *Helianthemum nummularium* was motivated by its over-representation in ungulates diets, its adaptation to high altitude conditions and the potential valorization of this species for human use. The phytochemical investigation may give clues for understanding the above facts. The ungulates preference for *Helianthemum nummularium* despite its low density in grassland and in the absence of high nutritional value^{123-125,182}, compared to other surrounding plant is quite interesting and could be due to the use of this plant by animals for self-medication. Indeed, animal self-medication has become an emergent field of research, namely zoopharmacognosy. In this context, many fascinated scientific observations supported by experimental evidences were reported over the last decade. Moreover, the animal self-medication by plants is being explored as a source of inspiration for scientists for their search for new drug candidates¹³⁹.

The hypothesis that we subjected was that the preference could be explicated by the probable accumulation of bioactive secondary metabolites used by the ungulates for self-medication. Ungulates are indeed often affected by parasitic infections (nematodes and protozoa),

especially in their digestive tract¹⁴⁰. The literature survey realized on the antiparasitic activity of the identified compounds (**1-8**) revealed the antiparasitic activity of quercetin, kaempferol, astragalin, tiliroside and quercetin-3-O-glucoside against the unicellular parasitic protozoa belonging to the *Trypanosoma* genus, known to parasitize animals and humans¹⁴¹⁻¹⁴³. Kaempferol and astragalin were reported to be the most potent anthelmintic agents (vermicides) against several animal parasite worms such as *Fasciolopsis buski*, *Fasciola gigantical*, *Taenia solium*, *Schistosoma mansoni* or *Pheretima posthuma*¹⁴⁴⁻¹⁴⁶, whereas quercetin-3-O-glucoside was found to possess significant anthelmintic activity against trichostrongylose larvae present in sheep¹⁴⁷. Hence, it is worth hypothesizing that the ungulates preference for *Helianthemum nummularium* could be explained by the anthelmintic effect of the reported compounds that animals use for self-medication.

The expression of compounds **1-8**, all known antioxidants could explain the plant defense against the high-altitude oxidative stress. Also, it is well established that plant extract has remarkable effect on humans to fight against oxidative stress, especially in seniors that are concerned by diminishment of the body's antioxidant defenses¹⁹⁰⁻¹⁹². In this context, *Helianthemum nummularium* extracts can be explored as Nrf2 inducers. As shown above, the Nrf2 activation by the extract of *Helianthemum nummularium* is dose-dependent up to 200 µg/mL without toxic effect may pave the way for further investigation of this plant in dietary intake. Among the pure compounds tested for triggering Nrf2 activation, only quercetin has a significant effect. Regarding the activation of Nrf2 by quercetin, since it is present at a very low quantity in the plant, we assume that quercetin is not responsible for the strong effect of *Helianthemum nummularium*. Furthermore, over 5 µg/mL concentration, we observed a decrease on Nrf2 activation. A paradoxical effect is commonly found among polyphenols which are both anti or pro-oxidant, depending on the concentrations¹⁵⁹. We notice that this behavior is not observed with the whole extract of *Helianthemum nummularium* which could suggest that other compounds than those tested.

In conclusion, in this work, we carried out the first phytochemical and biological investigations of *Helianthemum nummularium*. The chemical composition of the polar extract has led to the isolation of 8 polyphenols derivatives. Taken alone or in combination may explain the ungulates preference that use such natural products for self-medication, that would constitute the first zoopharmacognosy case related to alpine plants. The obtained results can pave the way for development of new treatments. The settlement of the treatment would be viable, thanks to the commercial availability of the most extracted compounds. The activation of Nrf2

pathway by *Helianthemum nummularium* extract constitute a milestone for further studies toward the development of dietary component to protect human cells against oxidative stress and promote healthy aging.

Materials and Methods

Plant material

The plant was collected in the French Alps in the *Col du Lautaret* (2058 m, 45°20'N, 6°24E) and identified by Dr. Rolland Douzet from Station Alpine Joseph Fourier (SAJF, www.jardinalpindulautaret.fr). In order to estimate the nutritional value of *Helianthemum nummularium* and its natural variability, soluble proteins and carbohydrates content were investigated on five populations (3 individuals per population) of *Helianthemum nummularium* collected in French Alps on July 2017 (Table 1S, Supporting Information). After sampling, leaves were separated from the shoots and submitted to air-drying during 5 days. Leaves were ground in a Qiagen mill (30Hz, 1min).

Nutriments analysis

Soluble proteins

Soluble proteins were extracted from 50 mg of ground leaves in 1 mL of extraction buffer (0.05 M Phosphate, pH = 7) and protein assay was carried out according to the method of Bradford¹⁹³ using Kit Coomassie plus Fisher using BSA as a standard.

Carbohydrates

Total carbohydrates were extracted from 50 mg of ground power by 10 mL HCl 2 N at 100°C during 90 min. After cooling, 1 mL aliquot was analyzed using Anthrone reactant¹⁹⁴. Soluble carbohydrates were extracted twice from 50 mg of ground leaves by 1 mL of water under agitation at 5 °C. After centrifugation (12000 g, 5 min, 5 °C), the supernatant was heated at 100 °C for 3 min and then freeze-dried at 0 °C. This extract was centrifuged (12000 g, 5 min, 5°C) and 0.1 mL of the supernatant was used for glucose and fructose dosage by kit Megazyme Libios (ref K-FRUGL).

Extraction, fractionation and structural elucidation

The air-dried plant material (100 g) was pulverized and extracted with EtOH 98 %. The extract was concentrated under vacuum then lyophilized to provide 3.64 g of residue. The residue

was fractionated by reverse-phase Vacuum Liquid Chromatography in a sintered glass filter funnel (1000 mL) following a two isocratic steps elution with H₂O (1500 mL) and MeOH (1500 mL). 4 fractionations of 50 mg of MeOH layers were injected in a semi preparative HPLC (Spot Prep Liquid Chromatography, Armen Instrument) for separation by using C₁₈ column (250 x 10 mm i.d., 10 μm, Interchim) with the following solvent system: H₂O/MeOH both containing 0.1 % formic acid (70:30 → 33:67 v/v) to afford 15 fractions each. The fractions were evaporated to dryness using SpeedVac (HT-4X Genevac) and gathered. The dried fractions were submitted to 1D and 2D-NMR analysis to afford the identification of compounds **1-8** (for 1D and 2D NMR, see Figures 3S-40S, Supporting Information).

HPLC-PDA-ELSD analysis

HPLC-PDA-ELSD analyses were performed on an HP 1260 system connected to a photodiode array detector (Agilent Technologies) and to an ELSD Sedex 85 (Sedere). The analyses were realized by using Interchim PF10 C18 column (250 × 4.6 mm i.d., 10 μm) with H₂O + 0.1 % formic acid (A) and MeOH + 0.1 % formic acid (B), under the following conditions: 30 % B → 67 % B during 60 min. Flow rate 1 mL/min; injection volume 15 μL and sample concentration 10 mg/mL in the mobile phase. The UV absorbance was measured at 210, 280, 254 and 366 nm. The ELSD detection parameters were: pressure 3.5 bar, 40 °C, gain 8 (**Fig. 2S**, Supporting information).

NMR analysis

1D-NMR (¹H and ¹³C-NMR) and 2D-NMR (COSY, NOESY, HSQC and HMBC) analyses were recorded on a Bruker Avance III HD 600 MHz NMR spectrometer equipped with a QCI 5 mm Cryoprobe and a SampleJet automation sample changer (Bruker BioSpin) at 600 MHz and 125 MHz for ¹H and ¹³C respectively. Chemical shifts are reported in ppm relative to the solvent in which the spectra were recorded [¹H: δ (CD₃OD) = 3.31 ppm; ¹³C: δ (CD₃OD) = 49.0 ppm].

Solutions of compounds used for the Nrf2 activation

The solution of tested samples (crude extract and pure compounds) were made by mixing 50 mg of material in 1 mL of ethanol overnight and the supernatant was separated to

be used for the Nrf2 activation tests. Dibenzoylmethane (DBM) was obtained from Sigma-Aldrich. Cell culture: media and antibiotics were purchased from Thermo Fisher Scientific.

Cell Culture

We used the human HepG2 cell line (hepatocellular carcinoma) that had been stably transfected with a Nrf2-responsive, ARE-regulated firefly luciferase gene construct, to evaluate Nrf2/ARE activation (HepG2-ARE) as previously described ¹⁹⁵. The stably transfected HepG2-ARE Nrf2 reporter gene cell line was kindly provided by Steven Simmons [28,38]. The HepG2 and HepG2-ARE cells were cultured and maintained by standard methods using Opti-MEM medium with 4% fetal bovine serum (FBS) and geneticin/penicillin/streptomycin.

Nrf2 Reporter Gene Assays

Briefly, the HepG2-ARE cells were seeded (20,000 cells in 400 μ L of Opti-MEM medium, 4% FBS, with geneticin/penicillin/streptomycin) in 24-well plates and incubated at 37 °C with 10% CO₂. After 24 h, the cells were treated with the tested extract/compound. After 18 h of incubation, the cells were lysed in their wells with 100 μ L of a lysing buffer that contains 3.5 mM sodium pyrophosphate to stabilize light output by luciferase. A 20 μ L aliquot of cell lysate was removed to a clear glass test tube, placed in a BD Monolight 3010 luminometer (BD Biosciences), background luminescence was measured, then 50 μ L of 1 mM luciferin was injected into the tube and luciferase-dependent chemiluminescence was measured and reported as Relative Light Units (RLU).

Cells viability

Cell viability was measured using a cell counting kit-8 (CCK8) assay (Dojindo Molecular Technologies, Inc.) based on a water-soluble tetrazolium salt. Briefly, cells were seeded into 96-well plates at 10,000 cells/well and cultured overnight. After the indicated treatments, CCK8 solution was added to each well according to the manufacturer's

instructions and incubated at 37 °C for 2 h. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate spectrophotometer (Bio-Tek). Absorbance values were normalized to control-treated cells, and the data was reported as percentage viable cells relative to control-treated cells.

Statistical Analysis

The data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significant differences were determined by one-way ANOVA and post hoc Tukey multiple comparisons testing, using GraphPad Prism 7.00 Software. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

Supporting information

Soluble proteins and carbohydrates content; cytotoxicity of the extract and pure compounds; HPLC profiles, NMR and Mass spectra of purified compounds are available as Supporting information.

Acknowledgments

This work has been partially supported by CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Partie expérimentale

1. General protocol

1.1. NMR analysis

1D and 2D NMR experiments were realized on a Bruker Avance III HD 600 MHz NMR spectrometer equipped with a QCI 5 mm Cryoprobe and a SampleJet automated sample changer (Bruker BioSpin) at 600 MHz and 125 MHz for ^1H and ^{13}C respectively. Chemical shifts of the solvent in the spectra were recorded [^1H : δ (CD_3OD) = 3.31 ppm; ^{13}C : δ (CD_3OD) = 49.0 ppm].

1.2. UHPLC-HRMS analysis

The chromatographic separations were performed on a LC system, Thermo Dionex Ultimate 3000 UHPLC system coupled to a Q-Exactive Plus mass heated electrospray ionization (HESI-II) source. The separation was realized by using a column Waters BEH C_{18} , 50 x 2.1 mm, 1.7 μm , with mobile phase (A) containing water with 0.1 % formic acid and (B) containing acetonitrile with 0.1 % formic acid; flow rate 600 $\mu\text{L}/\text{min}$; injection volume, 1 μL ; gradient, linear gradient of 2 %-98 % B over 8 min. The optimized HESI-II parameters were as follows: source voltage, 2.5 kV (neg); sheath gas flow rate (N_2), 50 units; auxiliary gas flow rate, 12 units; spare gas flow rate, 2.5; capillary temperature, 275 Celsius degrees (neg), S-Lens RF Level, 50.

1.3. HPLC-PDA-ELSD

The HPLC-PDA-ELSD analyses were performed on an HP 1260 system hyphenated to a photodiode array detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and to an ELSD Sedex 85 (Sedere). The analyses were realized by using XBridge C_{18} column (250 x 4.6mm i.d., 5 μm) with H_2O (A) and MeOH (B) both containing 0.1% formic acid. Several methods were optimized to provide the best separation:

1.3.1. Method A: Sample 8-NL from the roots of *Nauclea latifolia*

30% B → 77% B during 60 minutes. Flow rate 1 mL/min; injection volume 15 µL and sample concentration 10 mg/mL in the mobile phase. The UV absorbance was measured at 210, 280, 254 and 366 nm. The ELSD detection parameters were: pressure 3.5 bar, 40 °C, gain 8.

1.3.2. Method B: Ethanolic extract of *Helianthemum nummularium*

30 % B → 67 % B during 60 min. Flow rate 1 mL/min; injection volume 15 µL and sample concentration 10 mg/mL in the mobile phase. The UV absorbance was measured at 210, 280, 254 and 366 nm. The ELSD detection parameters were: pressure 3.5 bar, 40 °C, gain 8.

1.3.3. Method C: Ethanolic extract of *Chenopodium bonus-henricus*

40 % B → 85 % B during 60 min. Flow rate 1 mL/min; injection volume 15 µL and sample concentration 10 mg/mL in the mobile phase. The UV absorbance was measured at 210, 280, 254 and 366 nm. The ELSD detection parameters were: pressure 3.5 bar, 40 °C, gain 8.

1.4. General protocol of purification of alpine plants

The residue was fractionated by reverse-phase Vacuum Liquid Chromatography in a sintered glass filter funnel (1000 mL) following a two isocratic steps elution with H₂O (1500 mL) and MeOH (1500 mL), respectively. 3 fractionations of 50 mg of MeOH layers were injected in a semi preparative HPLC (Spot Prep Liquid Chromatography, Armen Instrument) for separation by using C₁₈ column (250x10 mm, 10 µm, Interchim). The fractions were evaporated to dryness using SpeedVac (HT-4X Genevac®, Stone Ridge, NY, USA) and gathered.

1.4.1. Method D: Ethanolic extract of *H. nummularium*

H₂O/MeOH both containing 0.1 % formic acid (70:30 → 33:67 v/v) to afford 15 fractions each. The dried fractions were submitted to 1D and 2D-NMR and mass spectrometry, allowing the identification of compounds **92-99** (NMR analyses and MS spectra are provided in the Supporting Information section).

1.4.2. Method E: Ethanolic extract of *C. bonus-henricus*

H₂O/MeOH both containing 0.1 % formic acid (60:40 → 15:85 v/v) to afford 8 fractions each. The dried fractions were submitted to 1D and 2D-NMR analysis to afford the identification of compounds **102-105** (NMR analyses and MS spectra are provided in the Supporting Information section).

1.5. Solutions of compounds used for Nrf2 activation

This experimental section is from our soon to be published article "Phytochemical and Biological Investigation of Helianthemum nummularium a High Altitude Growing Alpine Plant Overrepresented in Ungulates Diets" in Planta Medica (2020).

The crude extracts of *H. nummularium* and *C. bonus-henricus* (50 mg) and pure compounds were mixing in 1 mL of ethanol overnight to obtain the samples to be tested, then the supernatant was collected to be used for the biological evaluation. Dibenzoylmethane (DBM) was obtained from Sigma (Saint Louis, MO, USA). Cell culture: media and antibiotics were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

1.5.1. Cell culture

We utilized the human HepG2 cell line (hepatocellular carcinoma) that had been stably transfected with a Nrf2-responsive, ARE-regulated firefly luciferase gene construct, to evaluate Nrf2/ARE activation (HepG2-ARE). The method was previously described in (Hybertson et al. 2019)¹⁵⁸. The stably transfected HepG2-ARE Nrf2 reporter gene cell line was kindly provided by Steven Simmons¹⁸⁷. The HepG2 and HepG2-ARE cells were cultured and maintained by standard methods using Opti-MEM medium with 4% fetal bovine serum (FBS) and geneticin/penicillin/streptomycin.

1.5.2. Nrf2 Reporter Gene Assays

Briefly, the HepG2-ARE cells were seeded (20,000 cells in 400 µL of Opti-MEM medium, 4% FBS, with geneticin/penicillin/streptomycin) in 24-well plates and incubated at

37 °C with 10% CO₂. After 24 h the cells were treated with individual agents or combinations of agents. Cells were treated with *H. nummularium* and *C. bonus-henricus* extracts, *p*-hydroxybenzoic acid, astragalol, quercetin, quercetin-3-*O*-glucuronide and plantainoside.

The cells were treated with 0–200 µg/mL of the ethanolic extract (*H. nummularium* and *C. bonus-henricus*) or with the isolated compounds (**92**, **95**, **96**, **98** and **99**, from 0 to 10 µg/mL). Quercetin was tested at (0–100 µg/mL). After 18 h of incubation, the cells were lysed in their wells with 100 µL of a lysing buffer that contains 3.5 mM sodium pyrophosphate to stabilize light output by luciferase. A 20 µL aliquot of cell lysate was removed to a clear glass test tube, placed in a BD Monolight 3010 luminometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), background luminescence was measured, then 50 µL of 1 mM luciferin was injected into the tube and luciferase-dependent chemiluminescence was measured and reported as Relative Light Units (RLU).

1.5.3. Cells viability

Cell viability was measured using a cell counting kit-8 (CCK8) assay (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) based on a water-soluble tetrazolium salt. Briefly, cells were seeded into 96-well plates at 10,000 cells/well and cultured overnight. After the indicated treatments, CCK8 solution was added to each well according to the manufacturer's instructions and incubated for 2 h at 37 °C. Absorbance was measured at 450 nm using a microplate spectrophotometer (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Absorbance values were normalized to control-treated cells, and the data was reported as percentage viable cells relative to control-treated cells.

1.5.4. Statistical analysis

The data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Significant differences were determined by one-way ANOVA and post hoc Tukey multiple comparisons testing, using GraphPad Prism Software (San Diego, CA 92108, USA). A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

2. *Nauclea latifolia*

2.1. Sample 8-NL: Extraction and fractionation

The air-dried plant material (50 g) was pulverized and extracted with MeOH. The extract was concentrated under vacuum then lyophilized to provide 1.7 g of residue. The latter was submitted to successive chromatographic purifications by using a semi preparative HPLC and a RP-C₁₈ column (250x10 mm, 5 μm, XBridge) with the following solvent system: H₂O/MeOH both containing 0.1% formic acid. The fractions were evaporated to dryness using SpeedVac (HT-4X Genevac®, Stone Ridge, NY, USA) and gathered. The dried fractions were submitted to ¹H NMR analysis to afford the identification of tramadol in several fractions. The fractions containing tramadol were gathered (14 mg) and suspended in a solution of HCl (5%) and extracted with 4x25 mL of DCM. The aqueous layer was basified with a saturated solution of Na₂CO₃ until pH= 8-9, then washed with 4x25 mL of DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and evaporated under reduced vacuum to provide pure tramadol. The structure was confirmed by 1D and 2D NMR experiments. (NMR spectra are provided in the Supporting Information section).

2.2. Samples 5-NL, 10-NL, 11-NL and 12-NL

2.2.1. General protocol of extraction

The air-dried plant material (50 g) was pulverized and extracted with MeOH under sonication during several hours. The extract was concentrated under vacuum then lyophilized to provide the crude extract. The residue was suspended in an aqueous solution of HCl (5%) and stirred during 30 minutes at room temperature then extracted with DCM. The aqueous layer was basified with a saturated solution of Na₂CO₃ until pH = 9, then extracted with DCM. The organic layer was dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under vacuum.

2.2.2. General protocol of HPLC-PDA

HPLC-PDA analyses were performed on an Agilent 1100 system connected to a photodiode array detector (Agilent Technologies). The analyses were realized by using XBridge C₁₈ column (250 × 4.6 mm i.d., 5 μm, XBridge) with H₂O + 2 mM triethylamine (A) and MeOH + 2 mM triethylamine (B), under the following conditions: 5 % B → 58 % B for 60 minutes. Flow

rate 1 mL/min; injection volume 15 μ L and sample concentration 10 mg/mL in the mobile phase. The UV absorbance was measured at 210, 280, 254 and 366 nm

2.3. General protocol of fractionation of the samples 5-NL, 10-NL, 11-NL and 12-NL

The fractionations of the latter extract were injected in a semi preparative HPLC by using C₁₈ column (250x10 mm, 5 μ m, XBridge) with the following solvent system: H₂O/ACN both containing 2mM of triethylamine (5:95 \rightarrow 58:42 v/v) to afford several fractions each. The fractions were then evaporated to dryness using SpeedVac (HT-4X Genevac®, Stone Ridge, NY, USA). ¹H NMR experiments showed that several fractions contained tramadol, it was quantified by using the ERETIC method.

2.4. Purification of a fraction 10-NL by UHPLC

A fraction (10-1-NL-T₃) containing 0,56 mg of tramadol (quantified by NMR) was injected 100 times in an UHPLC hyphenated to a fractions collector for separation by using C₁₈ column (150x2.1 mm, 1.7 μ m, XBridge) with the following system:

Method F: H₂O/ACN both containing 0.1 % of formic acid (5:95 \rightarrow 100:0 v/v) to afford tramadol in high purity (0,20 mg).

3. *Helianthemum nummularium*

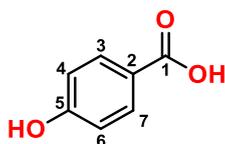
3.1. Extraction

The air-dried plant material (100 g) was pulverized and extracted successively with 2L of Cyclohexane, DCM, AcOEt, EtOH (98 %) and water during 24 hours at room temperature each. These extracts were concentrated under vacuum to provide the residue. The analyses and purifications were carried on the ethanolic extract.

3.2. Structural determination

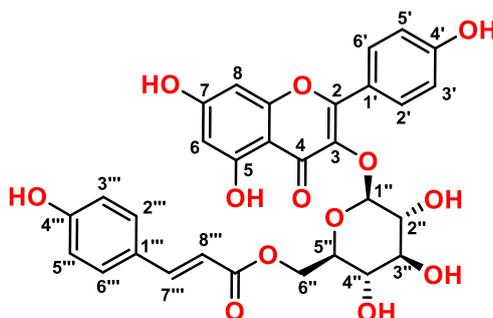
The isolated compounds were identified through NMR and mass spectrometry and compared with literature spectral data.

p-Hydroxybenzoic acid (92)



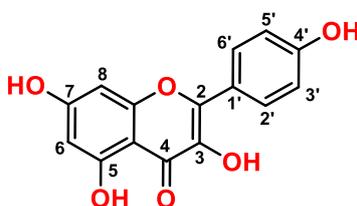
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, MeOD): δ 7.89 (2H, d, H_{3-7} , $J = 8.7$ Hz), 6.83 (2H, d, H_{4-6} , $J = 8.7$ Hz). **HRMS**: m/z 137.0232 [MH $^-$] (calc. for $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3$, 137.0233).

Tiliroside¹⁹⁶ (93) ([$(2R,3S,4S,5R,6S)$]-6-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxochromen-3-yl]oxy-3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)methyl (*E*)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoate)



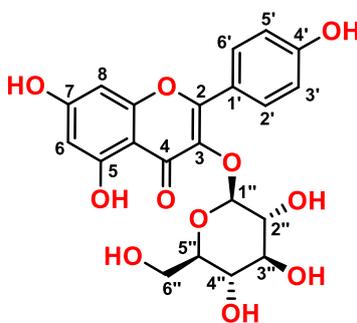
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 8.02 (2H, d, $\text{H}_{2''-6''}$, $J = 8.9$ Hz), 7.42 (1H, d, $\text{H}_{7''}$, $J = 15.9$ Hz), 7.34 (2H, d, $\text{H}_{2'-6'}$, $J = 8.7$ Hz), 6.85 (2H, d, $\text{H}_{3''-5''}$, $J = 8.9$ Hz), 6.82 (2H, d, $\text{H}_{3'-5'}$, $J = 8.7$ Hz), 6.35 (1H, d, H_8 , $J = 2.1$ Hz), 6.16 (1H, d, H_6 , $J = 2.1$ Hz), 6.10 (1H, d, $\text{H}_{8''}$, $J = 15.9$ Hz), 5.27 (1H, d, $\text{H}_{1''}$, $J = 7.4$ Hz), 4.31 (1H, dd, $\text{H}_{6a''}$, $J = 11.8, 2.3$ Hz), 4.25 – 4.17 (1H, m, $\text{H}_{6b''}$), 3.53 – 3.42 (3H, m, $\text{H}_{2'', 3'', 4'', 5''}$). **HRMS**: m/z 593.1296 [MH^-] (calc. for $\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{O}_{13}$, 593.1295).

Kaempferol¹⁹⁷ (**94**) (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one)



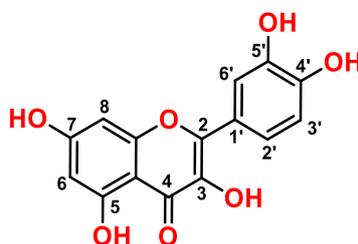
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 8.09 (2H, d, $\text{H}_{2'-6'}$, $J = 8.9$ Hz), 6.91 (2H, d, $\text{H}_{3'-5'}$, $J = 8.9$ Hz), 6.40 (1H, d, H_8 , $J = 2.1$ Hz), 6.19 (1H, d, H_6 , $J = 2.1$ Hz). **HRMS**: m/z 285.0406 [MH^-] (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$, 285.0399).

Astragalin¹⁹⁸ (**95**) (5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one)



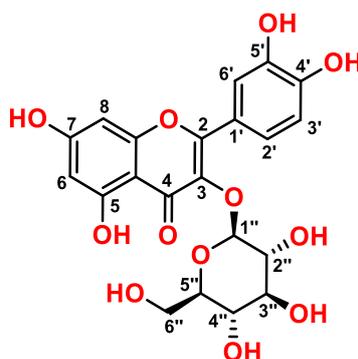
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 8.06 (2H, d, $\text{H}_{2'-6'}$, $J = 8.9$ Hz), 6.89 (2H, d, $\text{H}_{3'-5'}$, $J = 8.9$ Hz), 6.41 (1H, d, H_8 , $J = 2.1$ Hz), 6.21 (1H, d, H_6 , $J = 2.1$ Hz), 5.26 (1H, d, $\text{H}_{1''}$, $J = 7.3$ Hz), 3.69 (1H, dd, $\text{H}_{6a''}$, $J = 11.9, 2.3$ Hz), 3.53 (1H, dd, $\text{H}_{6b''}$, $J = 11.9, 5.6$ Hz), 3.46 – 3.39 (3H, m, $\text{H}_{2'',3'',4''}$), 3.20 (1H, ddd, $\text{H}_{5''}$, $J = 9.7, 5.6, 2.3$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): 179.6, 166.0, 163.1, 161.6, 159.1, 158.6, 135.2, 132.3, 132.3, 122.8, 116.1, 116.1, 105.7, 104.1, 99.9, 94.7, 78.5, 78.1, 75.8, 71.4, 62.6. **HRMS**: m/z 447.0924 [MH $^-$] (calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$, 447.0922).

Quercetin¹⁹⁹ (**96**) (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one)



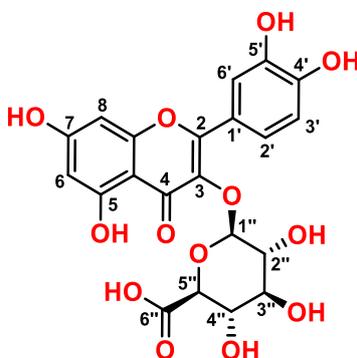
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 7.76 (1H, d, $\text{H}_{6'}$, $J = 2.2$ Hz), 7.66 (1H, dd, $\text{H}_{2'}$, $J = 8.5, 2.2$ Hz), 6.90 (1H, d, $\text{H}_{3'}$, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.41 (1H, d, H_8 , $J = 2.1$ Hz), 6.20 (1H, d, H_6 , $J = 2.1$ Hz). **HRMS**: m/z 301.0355 [MH $^-$] (calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_7$, 301.0348).

Quercetin-3-O-glucoside²⁰⁰ (**97**) (2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one)



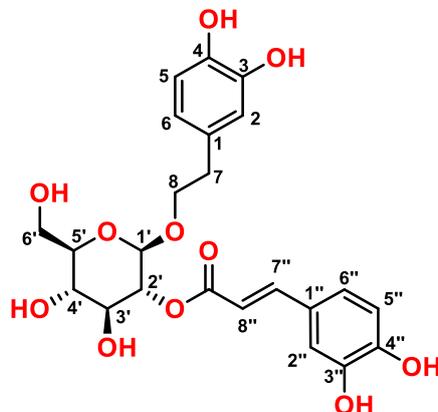
$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 7.84 (1H, d, $\text{H}_{6'}$, $J = 2.2$ Hz), 7.58 (1H, dd, $\text{H}_{2'}$, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H), 6.85 (1H, d, $\text{H}_{3'}$, $J = 8.3$ Hz), 6.40 (1H, d, H_8 , $J = 2.1$ Hz), 6.21 (1H, d, H_6 , $J = 2.1$ Hz), 5.18 (1H, d, $\text{H}_{1''}$, $J = 7.8$ Hz), 3.86 – 3.42 (6H, m, $\text{H}_{2''-6''}$). **HRMS**: m/z 463.0877 [MH^-] (calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$, 463.0871).

Quercetin-3-O-glucuronide²⁰¹ (98) (2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl β -D-glucopyranosiduronic acid)



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 7.92 (1H, m, $\text{H}_{6'}$), 7.55 (1H, dd, $\text{H}_{2'}$, $J = 8.4, 2.2$ Hz), 6.87 (1H, d, $\text{H}_{3'}$, $J = 8.4$ Hz), 6.42 (1H, d, H_8 , $J = 2.2$ Hz), 6.22 (1H, d, H_6 , $J = 2.2$ Hz), 5.43 (1H, d, $\text{H}_{1''}$, $J = 7.5$ Hz), 3.67 – 3.49 (4H, m). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): 179.3, 171.6, 166.1, 163.1, 159.1, 158.5, 149.9, 146.0, 135.5, 123.3, 122.9, 117.4, 116.1, 105.4, 104.3, 99.9, 94.7, 77.8, 75.5, 75.1, 73.2. **HRMS**: m/z 477.0664 [MH^-] (calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{O}_{13}$, 477.0675).

Plantainoside B²⁰² (99) ([[(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-3-yl] (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate)



$C_{23}H_{26}O_{11}$. 1H NMR (600 MHz, CD_3OD): δ 7.57 (1H, d, $H_{7''}$, $J = 15.9$ Hz), 7.07 (1H, d, $H_{2''}$, $J = 2.1$ Hz), 6.97 (1H, dd, $H_{6''}$, $J = 8.2, 2.1$ Hz), 6.79 (1H, d, $H_{5''}$, $J = 8.2$ Hz), 6.61 (1H, d, H_2 , $J = 2.0$ Hz), 6.59 (1H, d, H_5 , $J = 8.1$ Hz), 6.49 (1H, dd, H_6 , $J = 8.1, 2.0$ Hz), 6.29 (1H, d, $H_{8''}$, $J = 15.9$ Hz), 4.51 (1H, d, $H_{1'}$, $J = 8.0$ Hz), 4.03 – 3.97 (1H, m, $H_{6a'}$), 3.92 – 3.85 (1H, m, $H_{6b'}$), 3.73 – 3.61 (4H, m, $H_{2',3',4',5'}$), 3.60 – 3.36 (4H, m, H_{7-8}). ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD): 168.5, 149.6, 147.2, 146.8, 144.6, 131.6, 127.9, 123.1, 121.4, 117.1, 116.5, 116.2, 115.3, 115.2, 102.4, 78.1, 76.3, 75.2, 71.9, 71.7, 62.7, 49.6, 36.6. HRMS: m/z 477.1401 [MH⁻] (calc. for $C_{23}H_{25}O_{11}$, 477.1391).

4. *Chenopodium bonus-henricus*

4.1. Plant material

The aerial parts of *Chenopodium bonus-henricus* were collected in the French Alps in the *Col du Lautaret* with the collaboration of *Station Alpine Joseph Fourier*. The air-dried plant material (100 g) was pulverized and extracted successively with 2L of Cyclohexane, DCM, AcOEt, EtOH (98 %) and water during 24 hours at room temperature each. These extracts were concentrated under vacuum to provide the residue. The analyses and purifications were carried on the dichloromethane and ethanolic extract.

4.2. Dichloromethane extract

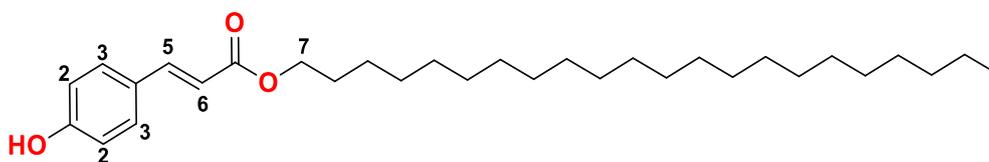
4.2.1. Extraction and fractionation

The extract was concentrated under vacuum to provide 2.9 g of residue. The residue was fractionated by successive chromatography steps using a conventional silica-gel column chromatography (SiO₂, 40-60 μm). The fractions and sub-fractions were submitted to 1D and 2D-NMR analysis to afford the identification of one derivative of *p*-coumaric acid ester and palmitic acid.

4.2.2. Structural determination

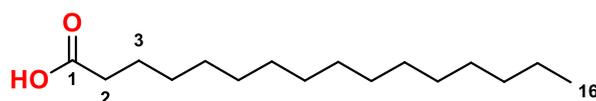
Chemical shifts are reported in ppm relative to the solvent in which the spectra were recorded [¹H: δ (CDCl₃) = 7.26 ppm; ¹³C: δ (CDCl₃) = 77.1 ppm].

n-Docosanol-*E*-*p*-coumarate¹⁶⁷ (100)



$C_{31}H_{52}O_3$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.64 (1H, d, H_5 , $J = 15.9$ Hz), 7.43 (2H, d, H_3 , $J = 8.5$ Hz), 6.84 (2H, d, H_2 , $J = 8.5$ Hz), 6.30 (1H, d, H_6 , $J = 15.9$ Hz), 4.18 (2H, t, H_7 , $J = 6.7$ Hz), 1.20-1.70 (40H, H_8 - H_{28}).

Palmitic acid (101)



$C_{16}H_{32}O_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 2.35 (2H, t, H_2 , $J = 7.5$ Hz), 1.63 (2H, qt, H_3 , $J = 7.6$ Hz), 1.26 (24H, m, H_4 - H_{15}), 0.88 (3H, t, H_{16} , $J = 6.9$ Hz). **EI-MS 70 eV** (m/z) : 256,43.

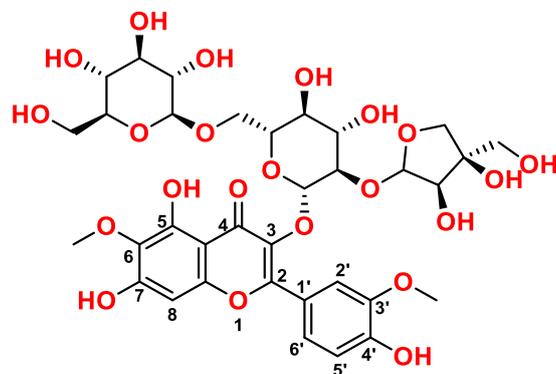
4.3. Ethanolic extract

4.3.1. Extraction

The extract was concentrated under vacuum to provide 10.7 g of residue.

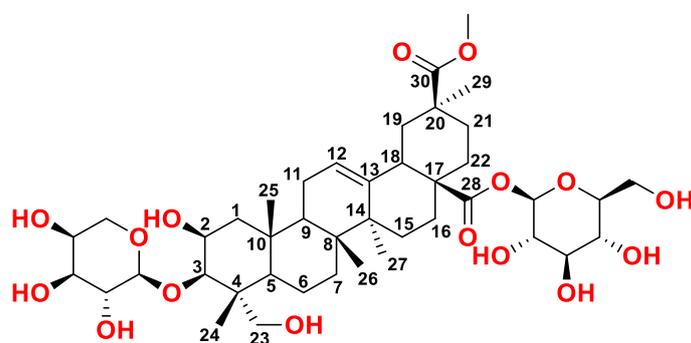
4.3.2. Structural determination

Spinacetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -*D*-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -*D*-glucopyranoside¹⁶² (102)



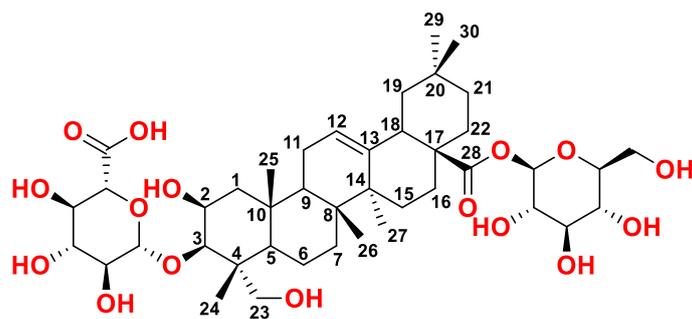
¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ 8.03 (1H, d, H₂, *J* = 2.1 Hz), 7.66 (1H, dd, H₆, *J* = 8.5, 2.1 Hz), 6.93 (1H, d, H₅, *J* = 8.5 Hz), 6.54 (1H, s, H₈), 5.63 (1H, d, H₁-inner glucose, *J* = 7.7 Hz), 5.48 (1H, s, H₁-apiose), 4.14 (1H, d, H₁-terminal glucose, *J* = 7.7 Hz), 3.89 (3H, m, 6-Me), 3.74 (3H, m, 3'-Me). **¹³C NMR** (150 MHz, CD₃OD): δ **Flavonoid**: 179.5, 158.5, 158.4, 153.8, 153.7, 150.7, 148.4, 134.5, 132.5, 123.7, 123.3, 116.1, 114.5, 106.5, 95.0, 61.0, 57.0. δ **Inner glucose**: 100.8, 78.0, 77.7, 77.6, 71.8, 69.3. δ **Apiose**: 110.5, 78.6, 78.5, 75.0, 66.6. δ **Terminal glucose**: 104.4, 77.8, 77.6, 75.0, 71.3, 60.9. **HRMS**: *m/z* 801.2114 [MH⁻] (calc. for C₃₄H₄₁O₂₂, 801.2144).

Bonushenricoside A¹⁶⁵ (103)



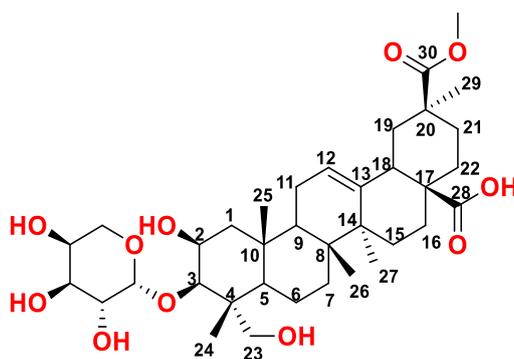
¹H NMR (600 MHz, CD₃OD): δ **Triterpene**: 5.37 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H₁''), 5.35 (1H, t, H₁₂, *J* = 3.5 Hz), 4.36 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H₁'), 4.31 (1H, dd, H₂, *J* = 6.8, 3.6 Hz), 3.86 – 3.22 (11H, 3.82, H_{sugars}) (1H, bs, H₃), 3.70 (3H, s, 30-OMe), 2.73 (1H, dd, H₁₈, *J* = 13.7, 3.9 Hz), 1.30 (3H, s, H₂₉), 1.20 (3H, s, H₂₄), 1.16 (3H, s, H₂₅), 0.96 (3H, s, H₂₇), 0.82 (3H, s, H₂₆). **¹³C NMR** (150 MHz, CD₃OD): δ 178.7, 177.5, 144.5, 124.4, 106.5, 95.7, 83.5, 78.7, 78.3, 74.5, 74.0, 73.0, 71.5, 71.0, 70.0, 67.3, 65.4, 62.3, 52.3, 49.3, 48.0, 47.4, 45.0, 44.4, 43.9, 43.3, 43.2, 43.0, 40.7, 37.5, 34.4, 33.4, 31.3, 28.8, 28.6, 26.3, 24.7, 24.1, 18.6, 17.7, 17.5, 14.7. **HRMS**: *m/z* 825.4261 [MH⁻] (calc. for C₄₂H₆₅O₁₆, 825.4280).

Zygophyloside I¹⁶⁵ (104)



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ **Triterpene**: 5.28 (1H, dd, H_{12} , $J = 7.2, 3.6$ Hz), 4.30 (1H, d, H_2 , $J = 10.8$ Hz), 3.70 (1H, m, H_3), 2.87 (1H, dd, H_{18} , $J = 13.9, 4.0$ Hz), 1.30 (3H, s, H_{24}), 1.18 (3H, s, H_{25}), 0.96 (3H, s, H_{29}), 0.95 (3H, s, H_{30}), 0.93 (3H, s, H_{27}), 0.83 (3H, s, H_{26}). δ **Glucose**: 5.40 (1H, d, $\text{H}_{1'}$, $J = 8.2$ Hz) δ **Glucuronide**: 4.50 (1H, d, $\text{H}_{1''}$, $J = 7.8$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CD_3OD): δ 178.1, 145.0, 123.9, 105.4, 95.7, 83.8, 78.7, 78.3, 77.8, 75.1, 74.0, 73.4, 71.1, 65.5, 65.4, 62.4, 49.8, 49.6, 49.3, 48.1, 48.0, 47.2, 44.5, 43.2, 42.6, 40.8, 37.5, 34.9, 33.5, 33.4, 33.2, 31.5, 28.8, 26.4, 24.7, 24.0, 23.9, 18.6, 17.8, 17.5, 14.6. No shift corresponding to the quaternary carbon of the carboxylic acid was detected, which confirmed the data of Pollmann¹⁶⁸. **HRMS**: m/z 825.4185 [MH⁻] (calc. for $\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{O}_{16}$, 825.4267)

3-O- β -arabynosyl-bayogeninic-acid (105)



$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ **Triterpene**: 5.34 (1H, dd, H_{12} , $J = 6.9, 3.6$ Hz), 3.86 (1H, dd, H_2 , $J = 12.5, 2.5$ Hz), 3.83 (2H, m, H_{23}), 3.72 (3H, s, 30-OMe), 3.57 (1H, d, H_3 , $J = 12.5$ Hz), 3.52 (1H, dd, H_5 , $J = 9.3, 3.4$ Hz), 2.72 (1H, dd, H_{18} , $J = 13.6, 3.6$ Hz), 2.06 (1H, m, H_{1a}), 2.01 (2H, m, H_{11}), 2.00 (1H, m, H_{15a}), 1.93 (1H, m, H_{19a}), 1.77 (1H, m, H_{16a}), 1.68 (1H, m, H_{19b}), 1.62 (2H, m, H_{21}), 1.62 (2H, m, H_7), 1.60 (1H, m, H_9), 1.51 (2H, m, H_6), 1.39 (1H, m, H_{7b}), 1.39 (1H, m, H_{22a}), 1.38

(1H, m, H_{15b}), 1.29 (3H, s, H₂₅), 1.22 (1H, m, H_{22a}), 1.15 (1H, m, H_{1b}), 1.14 (3H, s, H₂₇), 1.39 (1H, m, H_{22b}), 1.09 (1H, m, H_{16b}), 0.94 (3H, s, H₂₄), 0.91 (3H, s, H₂₉), 0.82 (3H, s, H₂₆). δ **Arabinose**: 4.36 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H_{1'}), 3.80 (1H, m, H_{2'}), 3.51 (1H, dd, H_{3'}, $J = 9.3, 3.4$ Hz), 3.40 (2H, m, H_{5'}), 3.35 (1H, m, H_{4'}). ^{13}C **NMR** (150 MHz, CD₃OD): δ **Triterpene**: 179.9 (C-28), 177.4 (C-30), 143.5 (C-13), 122.9 (C-12), 82.0 (C-3), 72.5 (C-2), 65.9 (C-23), 51.0 (OMe), 50.9 (C-5), 48.1 (C-9), 45.6 (C-17), 43.6 (C-14), 42.9 (C-1), 42.6 (C-18), 41.9 (C-4), 41.8 (C-8), 41.6 (C-20), 39.1 (C-19), 39.0 (C-10), 36.1 (C-22), 33.6 (C-7), 32.0 (C-21), 29.9 (C-29), 27.4 (C-16), 27.3 (C-27), 23.2 (C-11), 17.1 (C-6), 16.3 (C-26), 16.1 (C-25), 13.2 (C-24). δ **Arabinose**: 105.1 (C-1'), 76.9 (C-3'), 73.1 (C-2'), 70.1 (C-4'), 68.6 (C-5'). **HRMS**: m/z 663.3755 [MH⁻] (calc. for C₃₆H₅₅O₁₁, 663.3823).

Références Bibliographiques

1. Atanasov, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1582–1614 (2015).
2. *Pharmacopoles et apothicaires: les pharmaciens de l'Antiquité au Grand siècle.* (L'Harmattan, 2006).
3. Staub, P. O., Casu, L. & Leonti, M. Back to the roots: A quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' De Materia Medica (ex Matthioli, 1568). *Phytomedicine* **23**, 1043–1052 (2016).
4. Bernardini, S., Tiezzi, A., Laghezza Masci, V. & Ovidi, E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Nat. Prod. Res.* **32**, 1926–1950 (2018).
5. Sneader, W. The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ* **321**, 1591–1594 (2000).
6. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharm. Biol.* **39**, 8–17 (2001).
7. Igoli, J. O., Ogaji, O. G., Tor-Anyiin, T. A. & Igoli, N. P. Traditional Medicine Practice amongst the Igede People of Nigeria. Part II. *Afr. J. Trad. Compl. Alt. Med.* **2**, (2005).
8. Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. & McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325–2327 (1971).
9. von Wartburg, A. & Traber, R. 1 Cyclosporins, Fungal Metabolites with Immunosuppressive Activities. in *Progress in Medicinal Chemistry* vol. 25 1–33 (Elsevier, 1988).
10. Dunn, C. J., Wagstaff, A. J., Perry, C. M., Plosker, G. L. & Goa, K. L. Cyclosporin: An Updated Review of the Pharmacokinetic Properties, Clinical Efficacy and Tolerability of a Microemulsion-Based Formulation (Neoral®)* in Organ Transplantation. *Drugs* **61**, 1957–2016 (2001).
11. Blain, S. *La chimie et la mer: ensemble au service de l'homme.* (EDP Sciences, 2009).

12. Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. & Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 196–268 (2011).
13. Da Silva, P. P. J., Bendjeddou, L. Z. & Meijer, L. Recherche de substances naturelles à activité thérapeutique (2): George R. Pettit. *Med. Sci. (Paris)* **30**, 319–328 (2014).
14. Kijjoo, A. & Sawangwong, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Marine Drugs* **2**, 73–82 (2004).
15. Ahond, A. *et al.* La girolline, nouvelle substance antitumorale extraite de l'éponge, *Pseudaxinyssa cantharella* n. sp. (Axinellidae). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.Série 2 : Mécanique...* **307**, 145–148 (1988).
16. Raviña Rubira, E. *The evolution of drug discovery: from traditional medicines to modern drugs.* (Wiley-VCH, 2011).
17. Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F. & Sessitsch, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr. Opin. biotech.* **27**, 30–37 (2014).
18. Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends Biotechnol.* **32**, 297–303 (2014).
19. Piel, J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 338–362 (2009).
20. Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J. Nat. Prod.* **67**, 257–268 (2004).
21. Weber, D. *et al.* Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibiot.* **57**, 559–563 (2004).
22. Sun, L., Lu, Z., Bie, X., Lu, F. & Yang, S. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1259–1266 (2006).
23. Woodruff, H. Natural products from microorganisms. *Science* **208**, 1225–1229 (1980).
24. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **79**, 629–661 (2016).

25. Li, G. & Lou, H.-X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med. Res. Rev.* **38**, 1255–1294 (2018).
26. Pieters, L. & Vlietinck, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *J. Ethnopharmacol.* **100**, 57–60 (2005).
27. Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Persp.* **109**, 69–75 (2001).
28. Lang, G. *et al.* Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts. *J. Nat. Prod.* **71**, 1595–1599 (2008).
29. Teisseire, P. J. *Chimie des substances odorantes*. (Technique et Documentation - Lavoisier, 1991).
30. Mercier, B., Prost, J. & Prost, M. The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -pinenes): a review. *Int. J. Occup. Med. Env.* **22**, (2009).
31. Belhassen, E., Baldovini, N., Filippi, J.-J. & Brevard, H. Method for the synthesis of khusimone. (2017).
32. Belhassen, E., Baldovini, N., Brevard, H., Meierhenrich, U. J. & Filippi, J.-J. Unravelling the Scent of Vetiver: Identification of Character-Impact Compounds. *Chem. Biodivers.* **11**, 1821–1842 (2014).
33. Ageta, H., Iwata, K. & Yonezawa, K. Fern Constituents : Fernene and Diploptene, Triterpenoid Hydrocarbons Isolated from *Dryopteris crassirhizoma* NAKAI. *Chem. Pharm. Bull.* **11**, 408–409 (1963).
34. Svrcek, C. & Smith, D. W. Cyanobacteria toxins and the current state of knowledge on water treatment options: a review. *J. Environ. Eng. Sci.* **3**, 155–185 (2004).
35. Benowitz, N. L. Nicotine Addiction. *N Engl J Med* **362**, 2295–2303 (2010).

36. Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.* **27**, 1–93 (2006).
37. Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **14**, 111–129 (2015).
38. Alves, R. R. & Rosa, I. M. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **3**, 14 (2007).
39. Wilson, E. O. & Peter, F. M. *Screening Plants for New Medicines. Biodiversity* (National Academies Press (US), 1988).
40. Lutgen, P. *Artemisia afra* and hypertension. *Pharm. Pharmacol. Int. J.* **7**, 297–300 (2019).
41. Goel, V. *et al.* Efficacy of a standardized echinacea preparation (Echinilin™) for the treatment of the common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Pharm. Ther.* **29**, 75–83 (2004).
42. Shah, S. A., Sander, S., White, C. M., Rinaldi, M. & Coleman, C. I. Evaluation of echinacea for the prevention and treatment of the common cold: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **7**, 473–480 (2007).
43. Sadigh-Eteghad, S. *et al.* Synergetic effects of oral administration of levamisole and *Echinacea purpurea* on immune response in Wistar rat. *Res. Vet. Sci.* **91**, 82–85 (2011).
44. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. & Pharmaceutical Society of Great Britain. *Pharmaceutical journal;: A weekly record of pharmacy and allied sciences. Pharm. J.* (1841).
45. Richard, D. *Dictionnaire des drogues et des dépendances.* (Larousse, 2006).
46. David, B., Wolfender, J.-L. & Dias, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.* **14**, 299–315 (2015).
47. Zeković, Z. *et al.* Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Ind. Crop. Prod.* **108**, 423–430 (2017).

48. Boumendjel, A. *et al.* Occurrence of the Synthetic Analgesic Tramadol in an African Medicinal Plant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 11780–11784 (2013).
49. Kusari, S. *et al.* Tramadol-A True Natural Product? *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 12073–12076 (2014).
50. Kusari, S., Tatsimo, S. J. N., Zühlke, S. & Spitteller, M. Synthetic Origin of Tramadol in the Environment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 240–243 (2016).
51. Bison, M. Taxonomic and functional approaches of trophic interactions between large herbivores and plant communities in a mountain ecosystem. (Université Grenoble Alpes, 2015).
52. Rayé, G. *et al.* New insights on diet variability revealed by DNA barcoding and high-throughput pyrosequencing: chamois diet in autumn as a case study. *Ecol. Res.* **26**, 265–276 (2011).
53. Moyo, M., Aremu, A. O. & Van Staden, J. Medicinal plants: An invaluable, dwindling resource in sub-Saharan Africa. *J. Ethnopharmacol.* **174**, 595–606 (2015).
54. Moyo, M., Aremu, A. O. & van Staden, J. Ethnopharmacology in Sub-Sahara Africa: Current Trends and Future Perspectives. in *Ethnopharmacology* (eds. Heinrich, M. & Jäger, A. K.) 263–278 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015).
55. Haudecoeur, R. *et al.* Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of African Nauclea species: A review. *J. Ethnopharmacol.* **212**, 106–136 (2018).
56. Löfstrand, S. D., Krüger, Å., Razafimandimbison, S. G. & Bremer, B. Phylogeny and Generic Delimitations in the Sister Tribes Hymenodictyeae and Naucleaeae (Rubiaceae). *Syst. Bot.* **39**, 304–315 (2014).
57. Paludisme. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.
58. K. Gamaniel. A comparative randomized clinical trial of NIPRD-AM1 against a chloroquine and sulphadoxine/pyrimethamine combination in symptomatic but uncomplicated malaria. *Afri. J. Plant. Sci. Trad. Compl. Alt. Med.* **6**, (2009).

59. Adzu, B. *et al.* Simulation of metabolism-based herb-drug interaction: towards safe and efficacious use of NIPRD-AM1. *Avicenna J. Phytomed.* **3**, 201–204 (2013).
60. Obodozie, O. O. *et al.* The effects of an investigational antimalarial agent, NIPRD-AM1 on the single dose pharmacokinetics of metronidazole in healthy human volunteers. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* **35**, 103–108 (2011).
61. Pousset, J. L. Place des médicaments traditionnels en Afrique; Role of traditional medicines in Africa. *Méd. trop.* **66**, 606–609 (2006).
62. Memvanga, P. B., Tona, G. L., Mesia, G. K., Lusakibanza, M. M. & Cimanga, R. K. Antimalarial activity of medicinal plants from the Democratic Republic of Congo: A review. *J. Ethnopharmacol.* **169**, 76–98 (2015).
63. Mesia, K. *et al.* Assessment of the Short-Term Safety and Tolerability of a Quantified 80 % Ethanol Extract from the Stem Bark of *Nauclea pobeguinii* (PR 259 CT1) in Healthy Volunteers: A Clinical Phase I Study. *Planta Med.* **77**, 111–116 (2011).
64. Mesia, K. *et al.* Antimalarial Efficacy of a Quantified Extract of *Nauclea pobeguinii* Stem Bark in Human Adult Volunteers with Diagnosed Uncomplicated Falciparum Malaria. Part 1: A Clinical Phase IIA Trial. *Planta Med.* **78**, 211–218 (2012).
65. Mesia, K. *et al.* Antimalarial Efficacy of a Quantified Extract of *Nauclea pobeguinii* Stem Bark in Human Adult Volunteers with Diagnosed Uncomplicated falciparum Malaria. Part 2: A Clinical Phase IIB Trial. *Planta Med* **78**, 853–860 (2012).
66. Ndenecho, E. N. Herbalism and resources for the development of ethnopharmacology in Mount Cameroon region. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **3**, 78–86 (2009).
67. Eyong, C. T. CHAPTER 12 *Indigenous Knowledge and Sustainable Development in Africa: Case Study on Central Africa.*
68. Sainge, M. N. Biodiversity Assessment and Conservation Status of Plants in the Mbembe Forest Reserve of Donga Mantung Division in the North West Region (NWR) of Cameroon. **90** (2012).

69. Olowokudejo, J., Kadiri, A. & Travih, V. An Ethnobotanical Survey of Herbal Markets and Medicinal Plants in Lagos State of Nigeria. *Ethnobotanical Leaflets* **2008**, (2008).
70. Insoll, T. Substance and materiality? The archaeology of Talensi medicine shrines and medicinal practices. *Anthropology & Medicine* **18**, 181–203 (2011).
71. Taïta, P. Use of woody plants by locals in Mare aux Hippopotames Biosphere Reserve in western Burkina Faso. *Biodiversity and Conservation* **12**, 1205–1217 (2003).
72. Tchacondo, T. *et al.* Herbal Remedies And Their Adverse Effects In Tem Tribe Traditional Medicine In Togo. *Afr. J. Trad. Compl. Alt. Med.* **8**, (2010).
73. Analgesic Effect of Aqueous and Hydroalcoholic Extracts of Three Congolese Medicinal Plants: *Hyptis suaveolens*, *Nauclea latifolia* and *Ocimum gratissimum*.
<https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2004.1613.1615> doi:10.3923/pjbs.2004.1613.1615.
74. Abbah, J. *et al.* Pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy: Effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* **127**, 85–90 (2010).
75. King, F. E. & Jurd, L. 239. The Chemistry of extractives from hardwoods. Part XII. The cyclitols and steroids of opepe (*Sarcocephalus diderrichii*). *J. Chem. Soc.* 1192 (1953).
76. Adeoye, A. O., Hemingway, S. R. & Waigh, R. D. A rapid method for the identification of fatty acid and sterol constituents of complex sterol esters mixtures. *J. Pharm. Pharmacol* **33**, 53P-53P (1981).
77. Abreu, P. Characterisation of a sugar fraction from *Sarcocephalus latifolius* stem bark extract. *Carbohydr. Polym.* **45**, 155–160 (2001).
78. Ngnokam, D., Ayafor, J. F., Connolly, J. D. & Nuzillard, J. M. Nauclefolinine: A new alkaloid from the roots of *Nauclea latifolia*. *Bull. Chem. Soc. Eth.* **17**, (2004).
79. Zeches, M., Richard, B., Gueye-M'Bahia, L., Le Men-Olivier, L. & Delaude, C. Constituants des Ecorces de Racine de *Nauclea pobeguini*. *J. Nat. Prod.* **48**, 42–46 (1985).

80. Mesia, K. *et al.* Antimalarial activity and toxicity evaluation of a quantified *Nauclea pobeguini* extract. *J. Ethnopharmacol.* **131**, 10–16 (2010).
81. Ata, A. *et al.* Chemical Constituents of *Nauclea latifolia* and their Anti-GST and Anti-Fungal Activities. *Nat. Prod. Comm.* **4**, 1934578X0900400 (2009).
82. McLean, S. & Murray, D. G. The Constituents of *Nauclea diderrichii* . Part IV. Miscellaneous Substances; Biogenetic Considerations. *Can. J. Chem.* **50**, 1496–1501 (1972).
83. Xu, Y.-J. *et al.* Chromatographic profiling and identification of two new iridoid-indole alkaloids by UPLC-MS and HPLC-SPE-NMR analysis of an antimalarial extract from *Nauclea pobeguini*. *Phytochem. Lett.* **5**, 316–319 (2012).
84. Abreu, P. & Pereira, A. New Indole Alkaloids from *Sarcocephalus latifolius*. *Nat. Prod. Lett.* **15**, 43–48 (2001).
85. Kuete, V. *et al.* Cytotoxicity of selected Cameroonian medicinal plants and *Nauclea pobeguini* towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **15**, 309 (2015).
86. Hotellier, F., Delaveau, P. & Pousset, J.-L. Nauclefine et nauclefine deux nouveaux alcaloïdes de type indoloquinolizidine isolés du *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry* **14**, 1407–1409 (1975).
87. Hotellier, F., Delaveau, P. & Pousset, J. Alcaloïdes et Gluco-Alcaloïdes des Feuilles de *Nauclea latifolia* SM. *Planta Med.* **35**, 242–246 (1979).
88. Abreu, P. & Pereira, A. A new indole alkaloid from *Sarcocephalus latifolius*. *Heterocycles* **48**, 885–891 (1998).
89. Agomuoh, A. A., Ata, A., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. & Irenus, I. Novel Indole Alkaloids from *Nauclea latifolia* and Their Renin-Inhibitory Activities. *Chem. Biodivers.* **10**, 401–410 (2013).

90. Shigemori, H. *et al.* Naucleamides A – E, New Monoterpene Indole Alkaloids from *Nauclea latifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 58–61 (2003).
91. Boucherle, B. *et al.* *Nauclea latifolia*: biological activity and alkaloid phytochemistry of a West African tree. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 1034–1043 (2016).
92. Taiwe, G. S. *et al.* Antipyretic and antinociceptive effects of *Nauclea latifolia* root decoction and possible mechanisms of action. *Pharm. Biol.* **49**, 15–25 (2011).
93. Flick, K. & Frankus, E. 1-(m-substituted phenyl)-2-aminomethyl cyclohexanols. (1972).
94. Leppert, W. Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain. *Pharmacol. Rep.* **61**, 978–992 (2009).
95. Scott, L. J. & Perry, C. M. Tramadol: A Review of its Use in Perioperative Pain. *Drugs* **60**, 139–176 (2000).
96. Vazzana, M. *et al.* Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. *Biomed. Pharmacother.* **70**, 234–238 (2015).
97. L'Agence du médicament limite les prescriptions de Tramadol, opioïde le plus consommé de France. https://www.francetvinfo.fr/societe/drogue/l-agence-du-medicament-limite-les-prescriptions-de-tramadol-opioide-le-plus-consomme-de-france_3787153.html.
98. Drogue du travailleur : le Tramadol, le nouveau trafic très lucratif... et terriblement mortel qui ravage l'Afrique. *Atlantico.fr*
<https://www.atlantico.fr/decryptage/3573957/drogue-du-travailleur--le-tramadol-le-nouveau-traffic-tres-lucratif--et-terriblement-mortel-qui-ravage-l-afrique-antonin-tisseron>.
99. Tramadol, médicament et drogue du pauvre en Afrique de l'Ouest et au Sahel.
<https://www.ifri.org/fr/publications/editoriaux-de-lifri/lafrique-questions/tramadol-medicament-drogue-pauvre-afrique-de>.

100. Lecerf-Schmidt, F. *et al.* Biomimetic synthesis of Tramadol. *Chem. Commun.* **51**, 14451–14453 (2015).
101. Romek, K. M. *et al.* A retro-biosynthetic approach to the prediction of biosynthetic pathways from position-specific isotope analysis as shown for tramadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **112**, 8296–8301 (2015).
102. Akoka, S., Barantin, L. & Trierweiler, M. Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method. *Anal. Chem.* **71**, 2554–2557 (1999).
103. Currie, L. A. The remarkable metrological history of radiocarbon dating [II]. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **109**, 185 (2004).
104. Patrut, A. *et al.* Radiocarbon dating of two old African baobabs from India. *PLOS ONE* **15**, e0227352 (2020).
105. Byrne, B., Wengenroth, K. J. & Kruger, D. A. Determination of adulterated natural ethyl butyrate by carbon isotopes. *J. Agric. Food Chem.* **34**, 736–738 (1986).
106. Mollenhauer, G., Montluçon, D. & Eglinton, T. I. Radiocarbon Dating of Alkenones from Marine Sediments: II. Assessment of Carbon Process Blanks. *Radiocarbon* **47**, 413–424 (2005).
107. Dee, M. W. *et al.* Radiocarbon Dating at Groningen: New and Updated Chemical Pretreatment Procedures. *Radiocarbon* **62**, 63–74 (2020).
108. Allen, A. B. Caffeine Identification, Differentiation of Synthetic and Natural Caffeine. *J. Agric. Food Chem.* **9**, 294–295 (1961).
109. Osina, P., Berk, H. & Moghissi, A. A. Determination of the origin and the age of alcoholic beverages by liquid scintillation counting. in *Liquid Scintillation Counting, Recent Applications and Development* 469–475 (Elsevier, 1980).
110. Norton, G. A. & Devlin, S. L. Determining the modern carbon content of biobased products using radiocarbon analysis. *Bioresource Technol.* **97**, 2084–2090 (2006).

111. Comment les plantes supportent les stress alpins ? *Encyclopédie de l'environnement*
<https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/plantes-supportent-stress-alpins/> (2017).
112. Dion, J. P. Ozenda. — La végétation de la chaîne alpine dans l'espace montagnard européen. *Revue Géographique de l'Est* **29**, 322–324 (1989).
113. Les plantes et le froid : adaptation obligée. *Jardins de France*
<https://www.jardinsdefrance.org/les-plantes-et-le-froid-adaptation-obligee/>.
114. Streb, P., Aubert, S., Gout, E. & Bligny, R. Reversibility of cold- and light-stress tolerance and accompanying changes of metabolite and antioxidant levels in the two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis*. *J. Exp. Bot.* **54**, 405–418 (2003).
115. Lütz, C. *Plants in alpine regions: cell physiology of adaption and survival strategies*. (Springer, 2012).
116. Aparicio, A. *et al.* Phylogenetic reconstruction of the genus *Helianthemum* (Cistaceae) using plastid and nuclear DNA-sequences: Systematic and evolutionary inferences. *Taxon* **66**, 868–885 (2017).
117. Volkova, P. A., Schanzer, I. A., Soubani, E., Meschersky, I. G. & Widén, B. Phylogeography of the European rock rose *Helianthemum nummularium* s.l. (Cistaceae): western richness and eastern poverty. *Plant Syst. Evol.* **302**, 781–794 (2016).
118. Narbona, E., Wang, H., Ortiz, P. L., Arista, M. & Imbert, E. Flower colour polymorphism in the Mediterranean Basin: occurrence, maintenance and implications for speciation. *Plant Biol.* **20**, 8–20 (2018).
119. Rubio-Moraga, Á. *et al.* Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J. Ethnopharmacol.* **148**, 287–296 (2013).

120. Redjadj, C. Etude inter-et intra-spécifique des variations spatio-temporelles de l'utilisation des ressources alimentaires au sein d'une communauté de grands herbivores de montagne. (2010).
121. *Du Reculet aux sommets alpins : quels changements sur les crêtes ? : [actes du colloque scientifique international des 10 et 11 mars 2016. (Réserve naturelle nationale de la Haute Chaîne du Jura : Communauté de communes du pays de Gex, 2017).*
122. Farruggia, A. *et al.* Reconstituer la composition du régime alimentaire des herbivores domestiques au pâturage : l'approche par métabarcoding. 10 (2012).
123. Lebreton, P., Jeangros, B., Gallet, C. & Scehovic, J. Sur l'organisation phytochimique de formations prairiales permanentes. *Can. J. Bot.* **79**, 510–519 (2001).
124. Alvarado, J. J., Ruiz, J. M., López-Cantarero, I., Molero, J. & Romero, L. Nitrogen Metabolism in Five Plant Species Characteristic of Gypsiferous Soils. *J. Plant Physiol* **156**, 612–616 (2000).
125. Milotić, T., Suyoto, H. N., Provoost, S. & Hoffmann, M. Herbivore-induced expansion of *Helianthemum nummularium* in grassland–scrub mosaic vegetation: circumstantial evidence for zoochory and indirect grazing impact. *Plant Ecol.* **218**, 867–884 (2017).
126. Baldemir, A., Gökşen, N., Ildız, N., Karatoprak, G. Ş. & Koşar, M. Phytochemical Profile and Biological Activities of *Helianthemum canum* L. BAUMG. from Turkey. *Chem. Biodivers.* **14**, e1700052 (2017).
127. Benabdelaziz, I., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D. & Benkhaled, M. Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Rec. Nat. Prod.* **9(3)**, 342–348 (2015).
128. Chemam, Y. *et al.* On-Line Screening, Isolation and Identification of Antioxidant Compounds of *Helianthemum ruficomum*. *Molecules* **22**, 239 (2017).
129. Meckes, M., Calzada, F., Tapia-Contreras, A. & Cedillo-Rivera, R. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.* **13**, 102–105 (1999).

130. Pirvu, L. & Nicu, I. Polyphenols Content, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Ethanol Extracts from the Aerial Part of Rock Rose (*Helianthemum nummularium*) Species. *J. Agric. Sci. Technol.* **7**, (2017).
131. *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. 1: The chemical participants.* (Acad. Press, 1991).
132. Forbey, J. S. *et al.* A Pharm-Ecological Perspective of Terrestrial and Aquatic Plant-Herbivore Interactions. *J. Chem. Ecol.* **39**, 465–480 (2013).
133. Provenza, F. D. *et al.* The Value to Herbivores of Plant Physical and Chemical Diversity in Time and Space. *Crop Sci.* **47**, 382 (2007).
134. Provenza, F. D., Villalba, J. J., Dziba, L. E., Atwood, S. B. & Banner, R. E. Linking herbivore experience, varied diets, and plant biochemical diversity. *Small Ruminant Res.* **49**, 257–274 (2003).
135. Krief, S., Hladik, C. M. & Haxaire, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology* **101**, 1–15 (2005).
136. Krief, S. *et al.* Clinical and pathologic manifestation of oesophagostomosis in African great apes: does self-medication in wild apes influence disease progression? *J. Med. Primatol.* **37**, 188–195 (2008).
137. Gustafsson, E., Krief, S. & Saint Jalme, M. Neophobia and Learning Mechanisms: How Captive Orangutans Discover Medicinal Plants. *Folia Primatol.* **82**, 45–55 (2011).
138. Lacroix, D. *et al.* Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees. *Phytochemistry* **70**, 1239–1245 (2009).
139. de Roode, J. C., Lefevre, T. & Hunter, M. D. Self-Medication: A Learning Process?--Response. *Science* **340**, 1042–1042 (2013).
140. Templeton, T. J. *et al.* Ungulate malaria parasites. *Sci. Rep.* **6**, (2016).

141. Mamani-Matsuda, M. *et al.* Quercetin Induces Apoptosis of *Trypanosoma brucei* gambiense and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. *Antimicrob. Agents. Ch.* **48**, 924–929 (2004).
142. Marín, C. *et al.* In Vitro and in Vivo Trypanocidal Activity of Flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas Disease. *J. Nat. Prod.* **74**, 744–750 (2011).
143. Tasdemir, D. *et al.* Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrob. Agents. Ch.* **50**, 1352–1364 (2006).
144. Braguine, C. G. *et al.* Schistosomicidal evaluation of flavonoids from two species of *Styrax* against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Pharm. Biol.* **50**, 925–929 (2012).
145. Lasisi, A. A. & Kareem, S. O. Evaluation of anthelmintic activity of the stem bark extract and chemical constituents of *Bridelia ferruginae* (Benth) Euphorbiaceae. *Afri. J. Plant. Sci.* **5(8)**, 469–474 (2011).
146. Swargiary, A. & Roy, B. In vitro anthelmintic efficacy of *Alpinia Nigra* and its bioactive compound, astragalol against *Fasciolopsis Buski*. *Int. J. Pharm. Pharmaceutic. Sci.* **7**, 30–35 (2015).
147. Kozan, E., Anul, S. A. & Tatli, I. I. In vitro anthelmintic effect of *Vicia pannonica* var. *purpurascens* on trichostrongylosis in sheep. *Exp. Parasitol.* **134**, 299–303 (2013).
148. Chatzigeorgiou, S. *et al.* Isolation of natural products with anti-ageing activity from the fruits of *Platanus orientalis*. *Phytomedicine* **33**, 53–61 (2017).
149. Yen, G.-C. *et al.* Antioxidant activity and anticancer effect of ethanolic and aqueous extracts of the roots of *Ficus beecheyana* and their phenolic components. *J. Food Drug Anal.* **26**, 182–192 (2018).
150. Tomczyk, M., Tumanov, A., Zaniowska, A. & Surazynski, A. The Potential Mechanism of Tiliroside-Dependent Inhibition of t-Butylhydroperoxide-Induced Oxidative Stress in Endometrial Carcinoma Cells. *Planta Med.* **76**, 963–968 (2010).

151. Zhao, X., Shen, J., Chang, K. J. & Kim, S. H. Comparative Analysis of Antioxidant Activity and Functional Components of the Ethanol Extract of Lotus (*Nelumbo nucifera*) from Various Growing Regions. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 6227–6235 (2014).
152. Harman, D. Nutritional implications of the free-radical theory of aging. *J. Am. Coll. Nutr.* **1**, 27–34 (1982).
153. Harman, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 7124–7128 (1981).
154. Beckman, K. B. & Ames, B. N. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* **78**, 547–581 (1998).
155. Joshi, G. & A. Johnson, J. The Nrf2-ARE Pathway: A Valuable Therapeutic Target for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Recent Pat. CNS Drugs Disc.* **7**, 218–229 (2012).
156. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 725–737 (1987).
157. Ow, D. W. *et al.* Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science* **234**, 856–859 (1986).
158. Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. & McCord, J. M. Phytochemical Combination PB125 Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection against Oxidative Injury. *Antioxidants* **8**, 119 (2019).
159. Russo, G. L., Tedesco, I., Spagnuolo, C. & Russo, M. Antioxidant polyphenols in cancer treatment: Friend, foe or foil? *Semin. Cancer Biol.* **46**, 1–13 (2017).
160. Velagapudi, R., El-Bakoush, A. & Olajide, O. A. Activation of Nrf2 Pathway Contributes to Neuroprotection by the Dietary Flavonoid Tiliroside. *Mol. Neurobiol.* **55**, 8103–8123 (2018).
161. Lee, S., Lee, J., Lee, H. & Sung, J. Relative protective activities of quercetin, quercetin-3-glucoside, and rutin in alcohol-induced liver injury. *J. Food Biochem.* **43**, (2019).

162. Kokanova-Nedialkova, Z. *et al.* *Chenopodium bonus - henricus* L. – A source of hepatoprotective flavonoids. *Fitoterapia* **118**, 13–20 (2017).
163. Kokanova-Nedialkova, Z., Nedialkov, P. & Nikolov, S. The genus *Chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. *Pharmacognosy Reviews* **3**, 280–306 (2009).
164. Li, W. & Savage, G. Oxalate Content of the Herb Good-King-Henry, *Blitum Bonus-Henricus*. *Foods* **4**, 140–147 (2015).
165. Kokanova-Nedialkova, Z., Nedialkov, P. T. & Momekov, G. Saponins from the roots of *Chenopodium bonus - henricus* L. *Natural Product Research* **33**, 2024–2031 (2019).
166. Matsuo, A., Ono, K., Hamasaki, K. & Nozaki, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. *Phytochemistry* **42**, 427–430 (1996).
167. Piovano, M. *et al.* Cytotoxic activity of the root extract from *Myoschilos oblongum*. *Fitoterapia* **74**, 497–500 (2003).
168. Pöllmann, K. *et al.* Triterpenoid saponins from *Zygophyllum decumbens*. *Phytochemistry* **48**, 875–880 (1998).
169. Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, e47 (2016).
170. Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W. & Kang, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* **96**, 229–245 (2004).
171. Pietta, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035–1042 (2000).
172. Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L. & Zhang, L. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.* **23**, 519–534 (2003).
173. Georgiev, V., Ananga, A. & Tsoleva, V. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients* **6**, 391–415 (2014).
174. Watson, R. R. *Polyphenols: mechanisms of action in human health and disease*. (Elsevier, 2018).

175. Polyakov, V. V. Chemical modification of the natural flavonoid myricetin. *Chem. Nat. Compd.* **35**, 21–28 (1999).
176. Kingsbury, W. D. *et al.* Synthesis of water-soluble (aminoalkyl)camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J. Med. Chem.* **34**, 98–107 (1991).
177. Larsson, J., Gottfries, J., Muresan, S. & Backlund, A. ChemGPS-NP: Tuned for Navigation in Biologically Relevant Chemical Space. *J. Nat. Prod.* **70**, 789–794 (2007).
178. Yao, H., Liu, J., Xu, S., Zhu, Z. & Xu, J. The structural modification of natural products for novel drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **12**, 121–140 (2017).
179. Frasinuk, M. S. *et al.* Application of Mannich bases to the synthesis of hydroxymethylated isoflavonoids as potential antineoplastic agents. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 11292–11301 (2015).
180. Aparicio, A. *et al.* Phylogenetic reconstruction of the genus *Helianthemum* (Cistaceae) using plastid and nuclear DNA-sequences: Systematic and evolutionary inferences. *taxon* **66**, 868–885 (2017).
181. Farruggia, A. *et al.* Reconstituer la composition du régime alimentaire des herbivores domestiques au pâturage: l’approche par métabarcoding. *Fourrages* **209**, 43–51 (2012).
182. Baumont, R. *et al.* *Valeur alimentaire des fourrages et des matières premières : tables et prévision.* (2007).
183. Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K. & McCord, J. M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine* **32**, 234–246 (2011).
184. Cardozo, L. F. M. F. *et al.* Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie* **95**, 1525–1533 (2013).

185. Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q. & Sha, H. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging and disease* **10**, 637 (2019).
186. Yildiz, I., Sen, O., Erenler, R., Demirtas, I. & Behcet, L. Bioactivity-guided isolation of flavonoids from *Cynanchum acutum* L. subsp. *sibiricum* (willd.) Rech. f. and investigation of their antiproliferative activity. *Nat. Prod. Res.* **31**, 2629–2633 (2017).
187. Simmons, S. O., Fan, C.-Y., Yeoman, K., Wakefield, J. & Ramabhadran, R. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr. Chem. Genomics* **5**, 1–12 (2011).
188. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 725–737 (1987).
189. Ow, D. W. *et al.* Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. *Science* **234**, 856–859 (1986).
190. Harman, D. The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78**, 7124–7128 (1981).
191. Harman, D. Nutritional implications of the free-radical theory of aging. *Journal of the American College of Nutrition* **1**, 27–34 (1982).
192. Beckman, K. B. & Ames, B. N. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews* **78**, 547–581 (1998).
193. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254 (1976).
194. Jermyn, M. A. Increasing the sensitivity of the anthrone method for carbohydrate. *Analytical Biochemistry* **68**, 332–335 (1975).

195. Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. & McCord, J. M. Phytochemical Combination PB125 Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection against Oxidative Injury. *Antioxidants* **8**, 119 (2019).
196. Devi, S. & Kumar, V. Comprehensive structural analysis of cis- and trans-tiliroside and quercetrin from *Malvastrum coromandelianum* and their antioxidant activities. *Arab. J. Chem.* **13**, 1720–1730 (2020).
197. Nguyen, T. V. & Dinh, V. Isolation of Kaempferol from Vietnamese Ginkgo biloba Leaves by Preparative Column Chromatography. *Asian J. Chem.* **32**, 515–518 (2020).
198. Mok, S.-Y., Kim, H. M. & Lee, S. Isolation of astragalín from flowers of *Rhododendron mucronulatum* for. *albiflorum*. *Hortic. Environ. Biotechnol.* **54**, 450–455 (2013).
199. Gil Romero, J. F., Milton, G. & Trejos, J. Cytotoxicity and anticarcinogenic activity of two flavonoids isolated and purified from *Brownea ariza* Brenth. *Vitae* **16**, 93–101 (2009).
200. Shokoohinia, Y., Rashidi, M., Hosseinzadeh, L. & Jelodarian, Z. Quercetin-3-O- β -d-glucopyranoside, a dietary flavonoid, protects PC12 cells from H₂O₂-induced cytotoxicity through inhibition of reactive oxygen species. *Food Chem.* **167**, 162–167 (2015).
201. Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M. & Santos-Buelga, C. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 103–111 (2011).
202. Miyase, T. *et al.* Phenylethanoid glycosides from *Plantago asiatica*. *Phytochemistry* **30**, 2015–2018 (1991).

ANNEXES

1. *Nauclea latifolia*

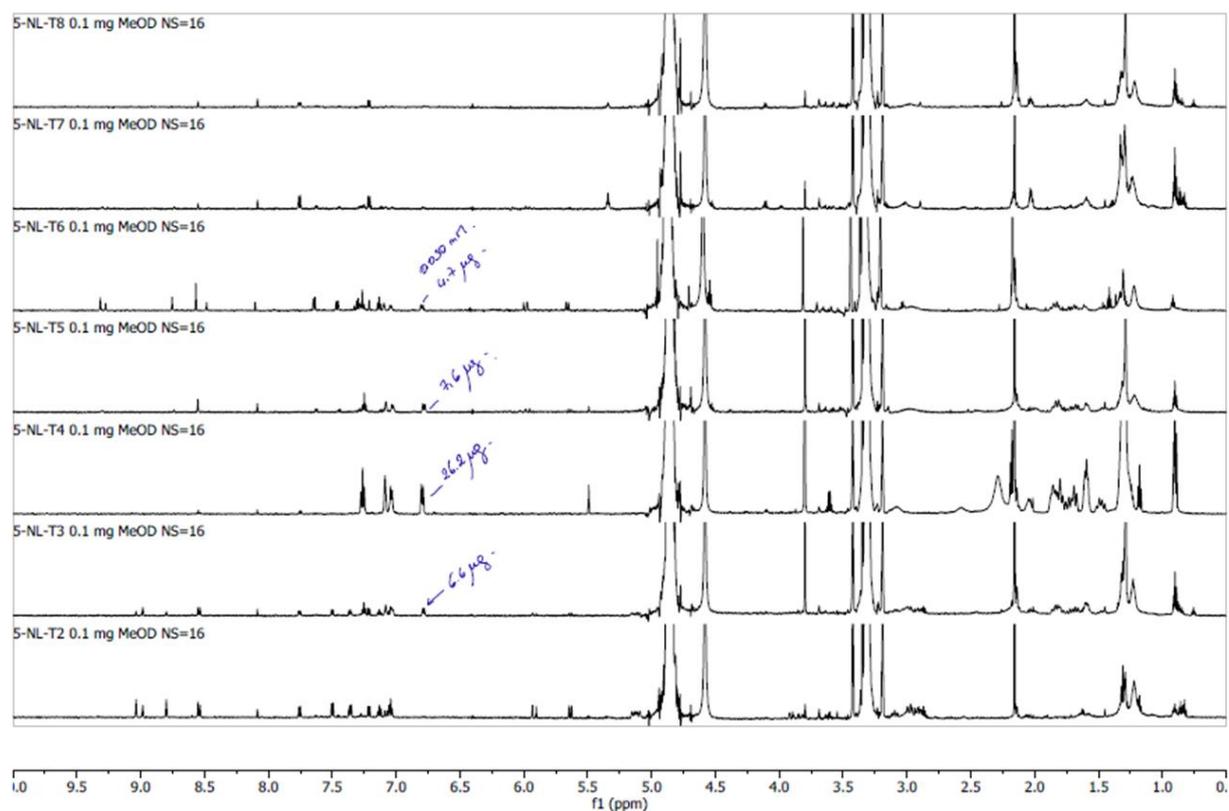


Figure S1. Spectres RMN ^1H des fractions issues de la purification de l'extract 5-NL (CD_3OD).

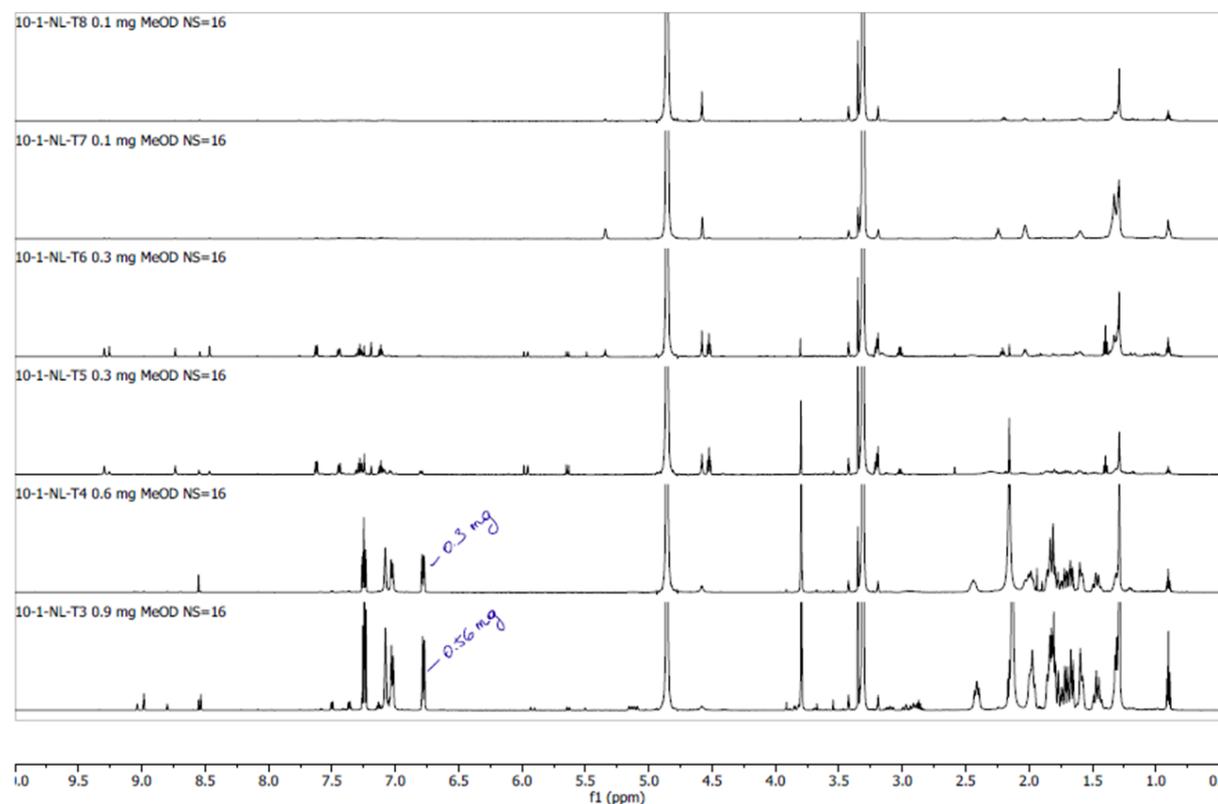


Figure S2. Spectres RMN ^1H des fractions issues de la 1^{ère} purification de l'extract 10-NL (CD_3OD).

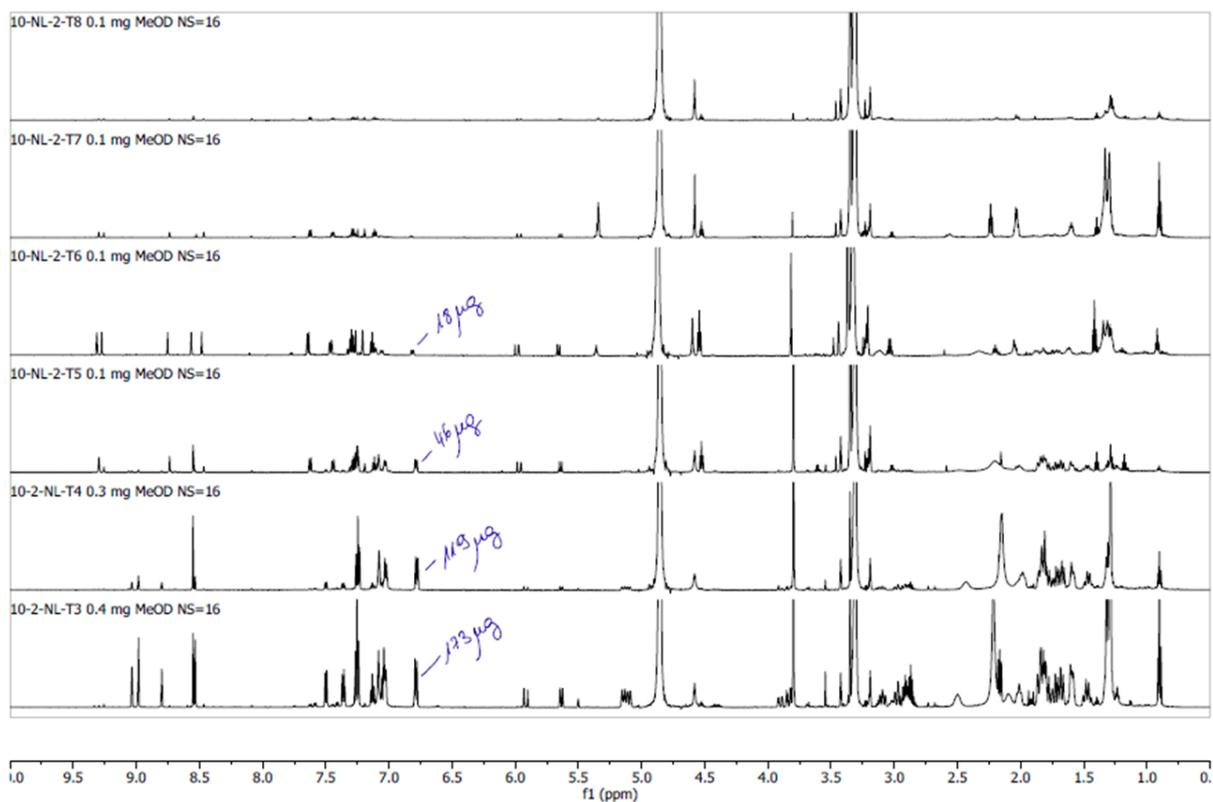


Figure S3. Spectres RMN ^1H des fractions issues de la 2^{ème} purification de l'extract 10-NL (CD_3OD).

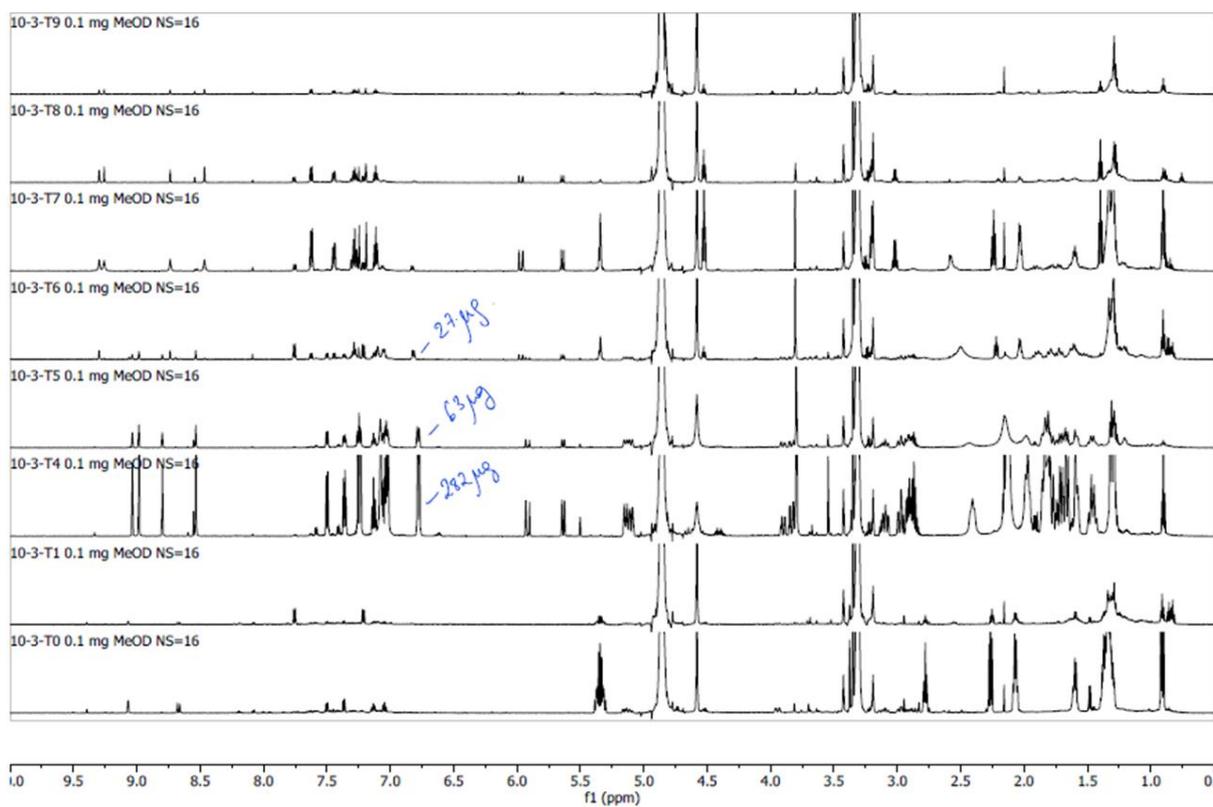


Figure S4. Spectres RMN ^1H des fractions issues de la 3^{ème} purification de l'extract 10-NL (CD_3OD).

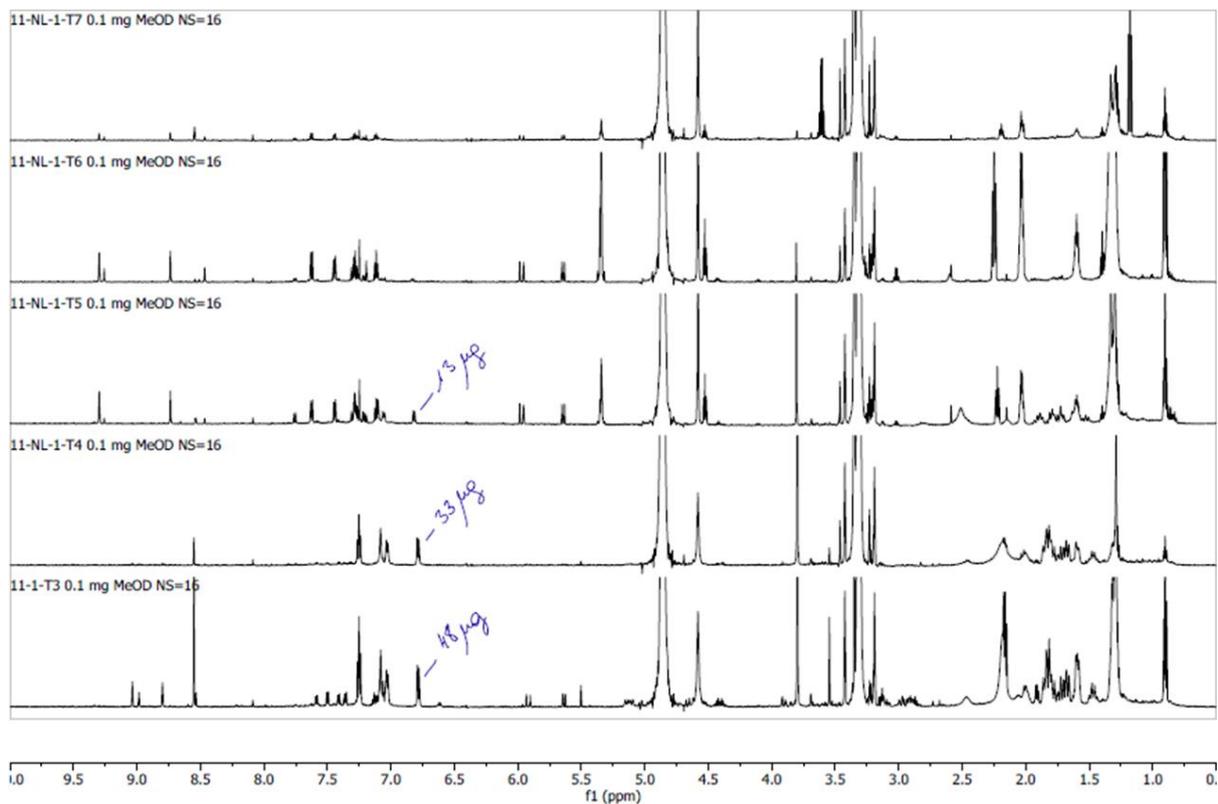


Figure S5. Spectres RMN ^1H des fractions issues de la purification de l'extrait 11-NL (CD_3OD).

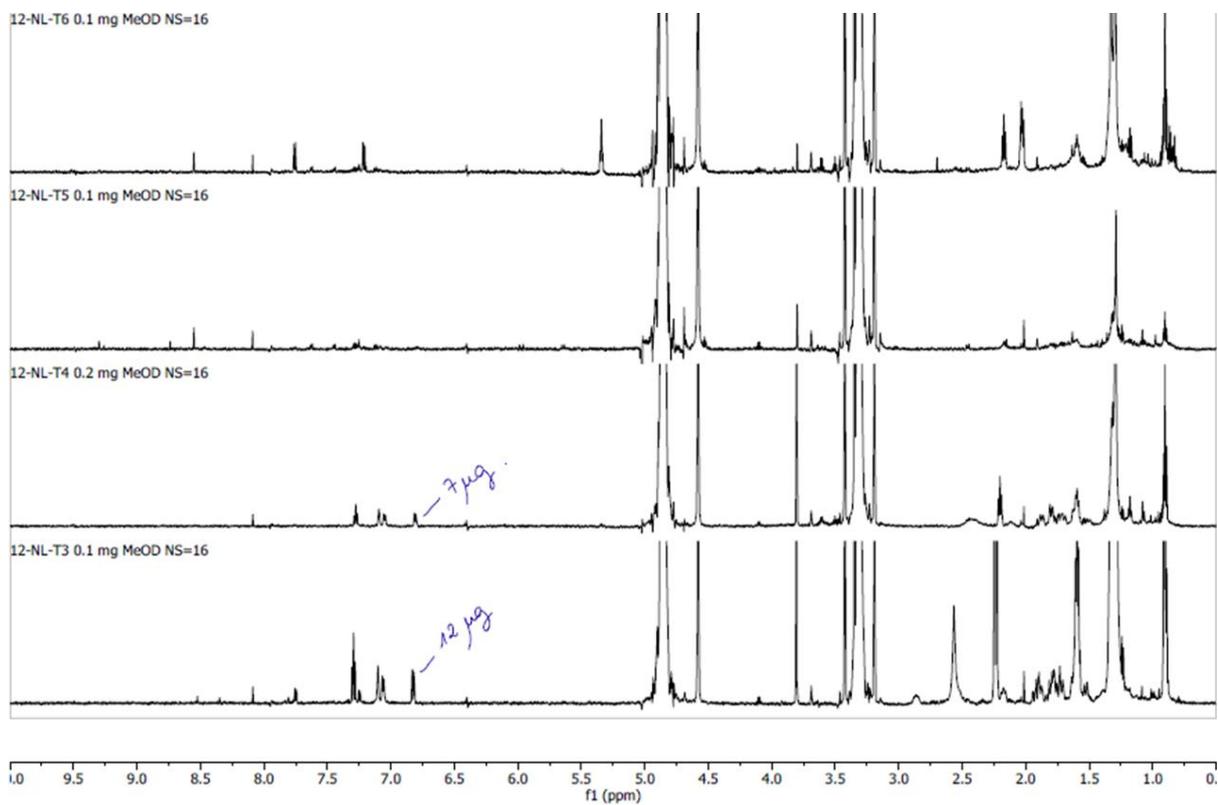


Figure S6. Spectres RMN ^1H des fractions issues de la purification de l'extrait 12-NL (CD_3OD).

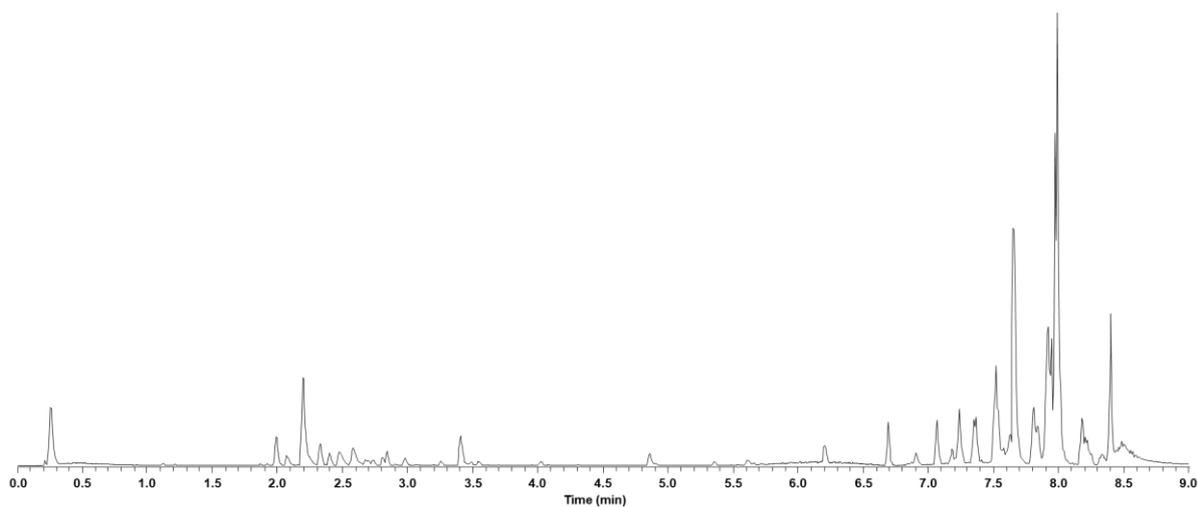


Figure S7. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 1-NL.

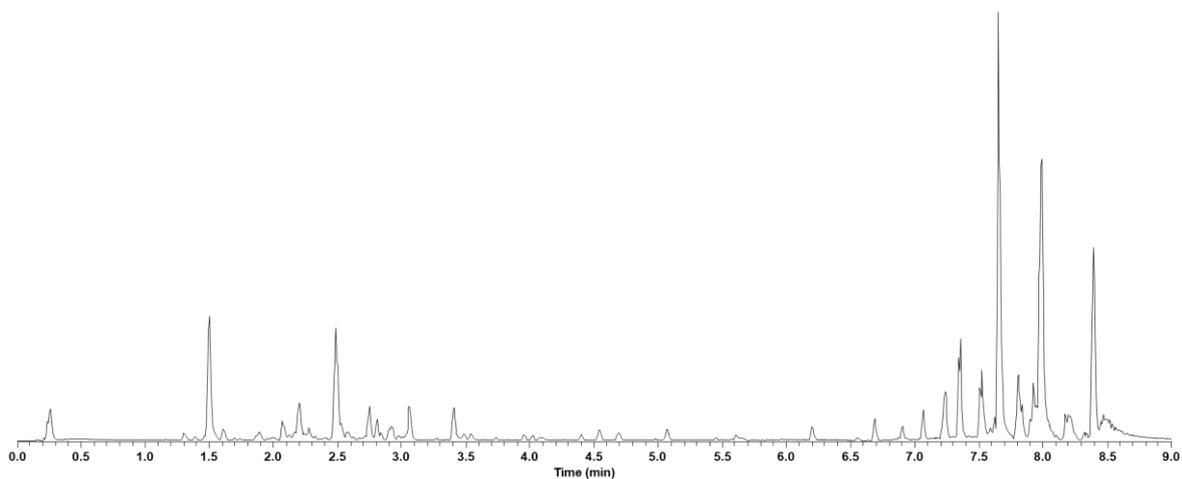


Figure S8. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 2-NL.

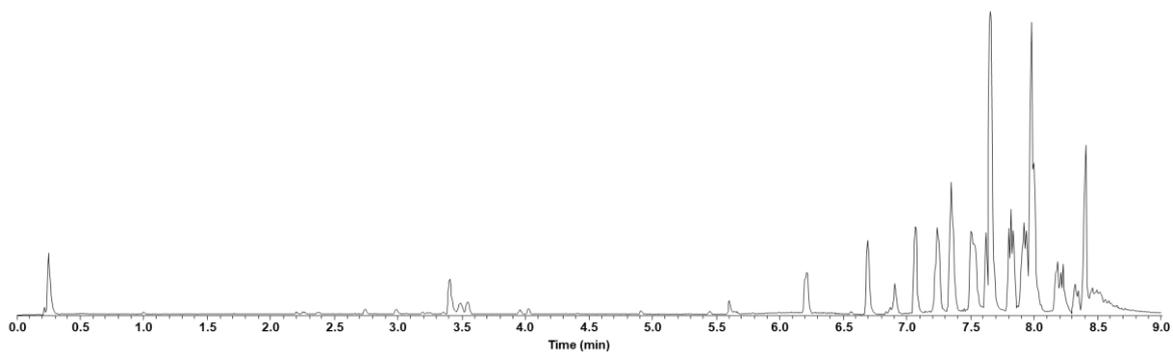


Figure S9. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 3-NL.

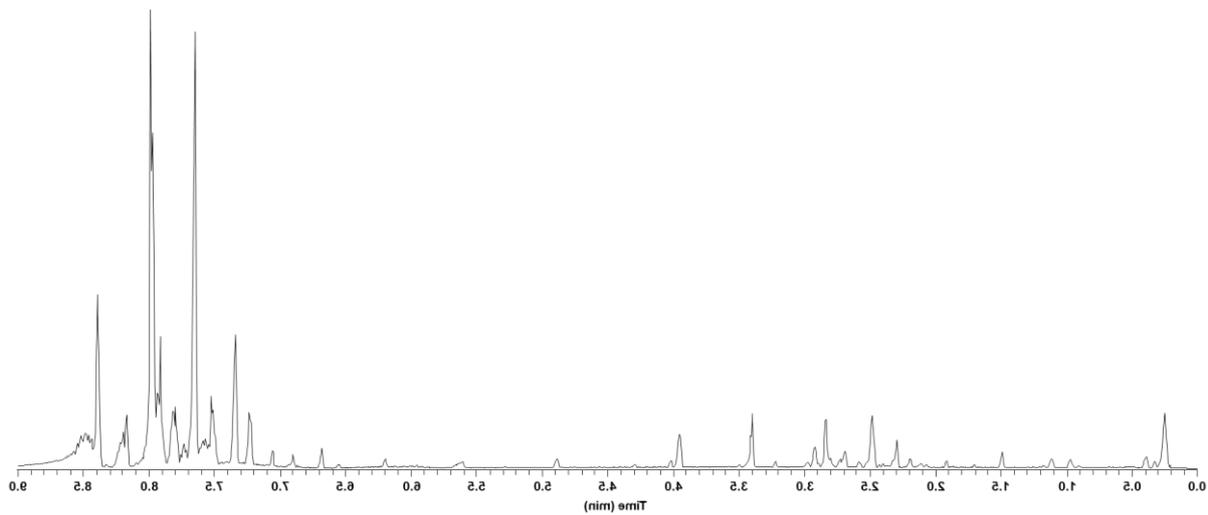


Figure S10. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 4-NL.

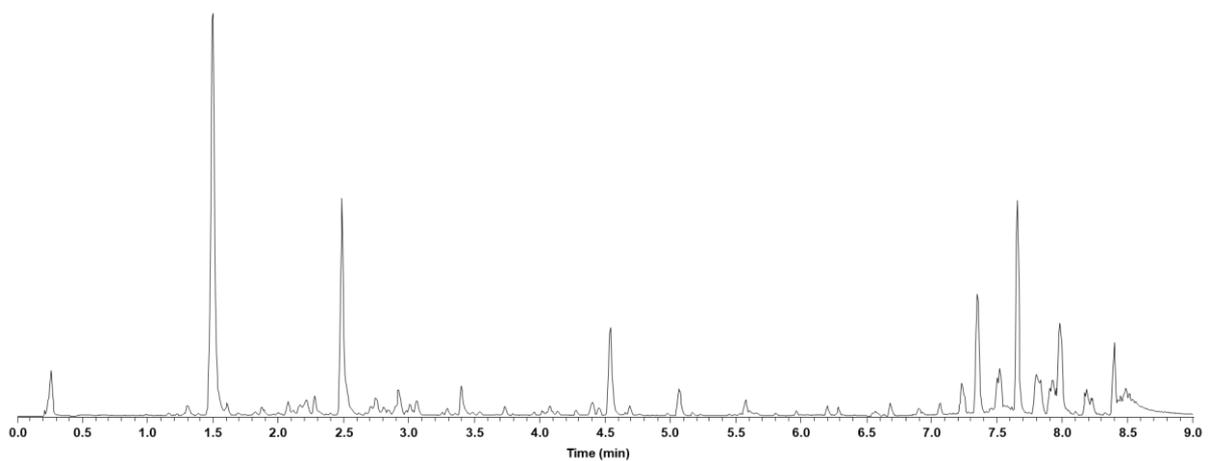


Figure S11. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 5-NL.

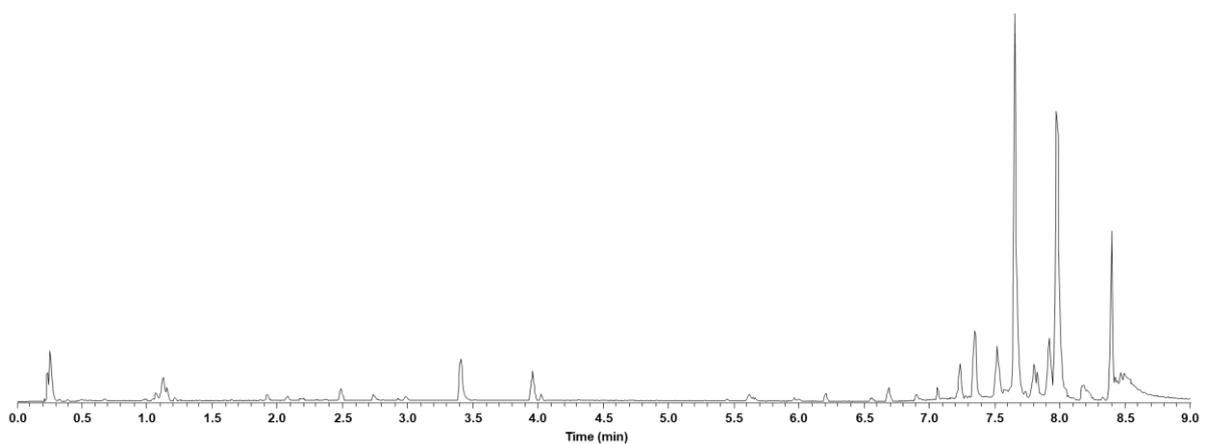


Figure S12. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 6-NL.

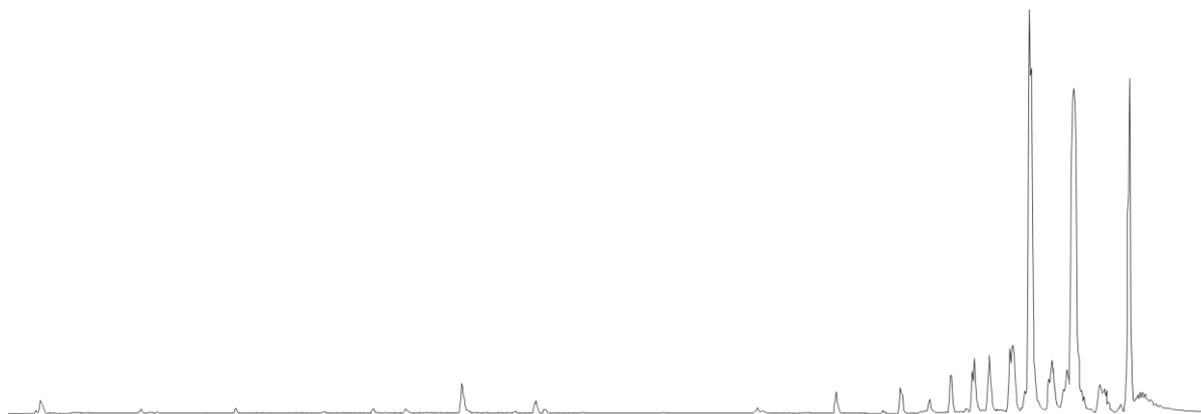


Figure S13. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 7-NL.

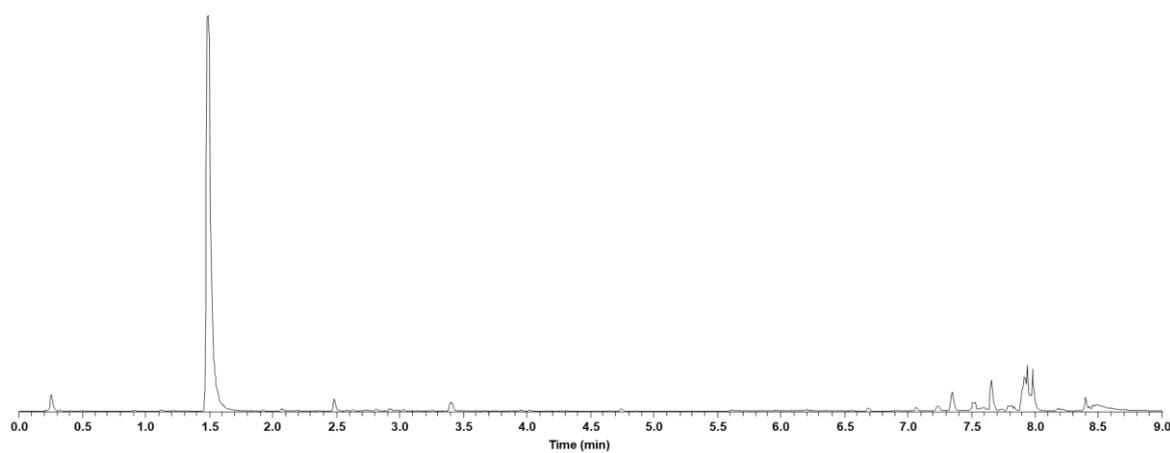


Figure S14. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 8-NL.

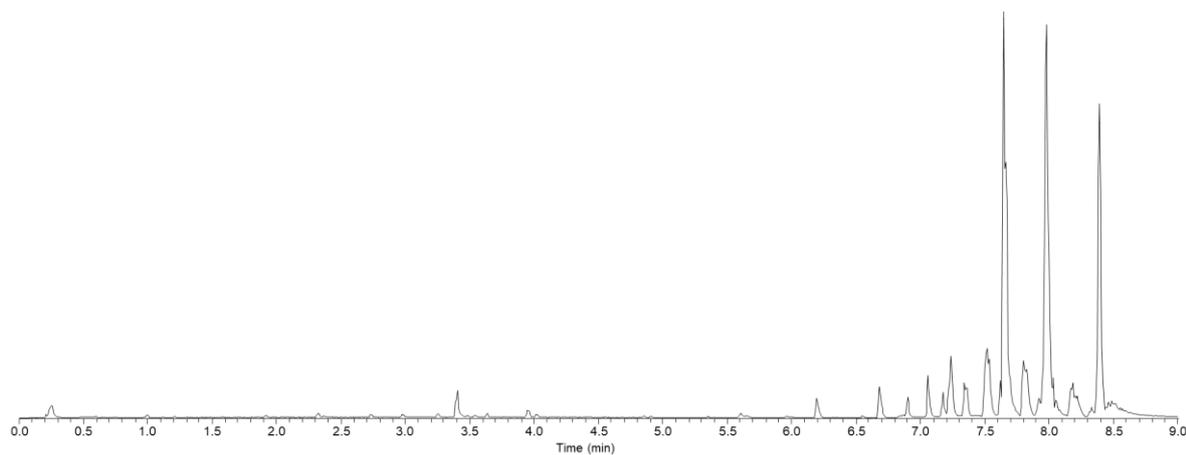


Figure S15. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 9-NL.

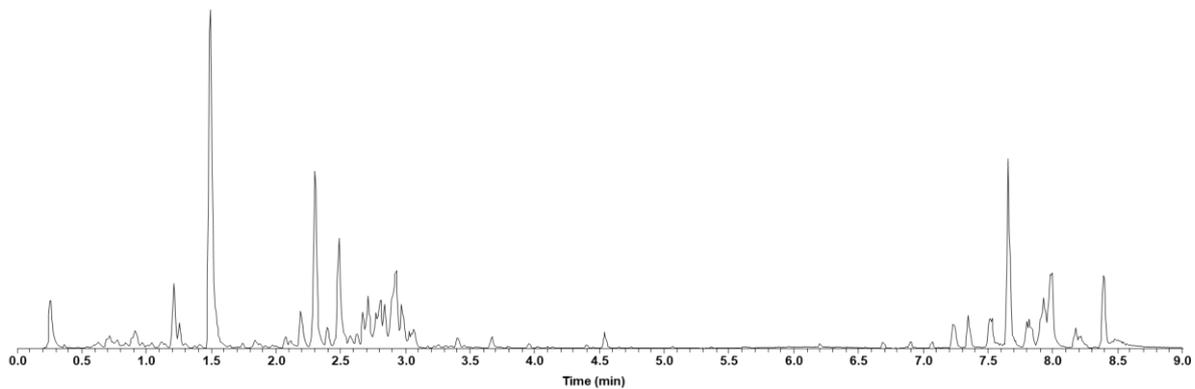


Figure S16. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 10-NL.

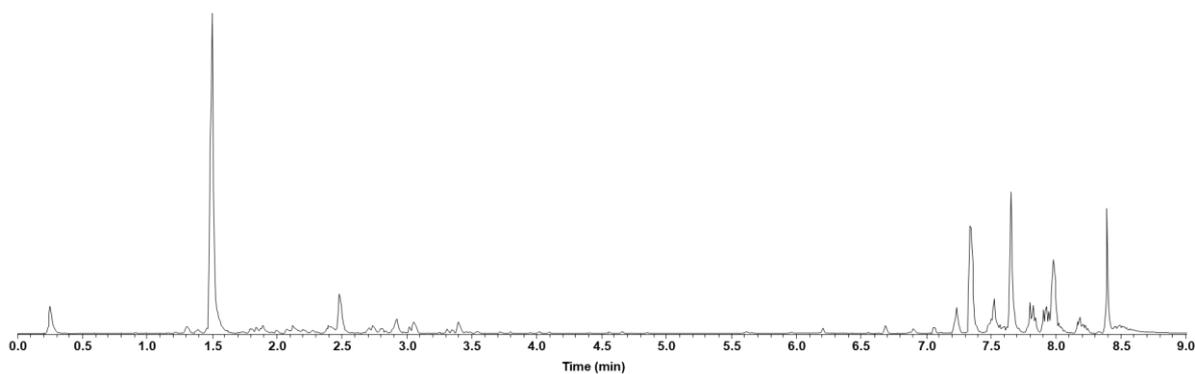


Figure S17. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 11-NL.

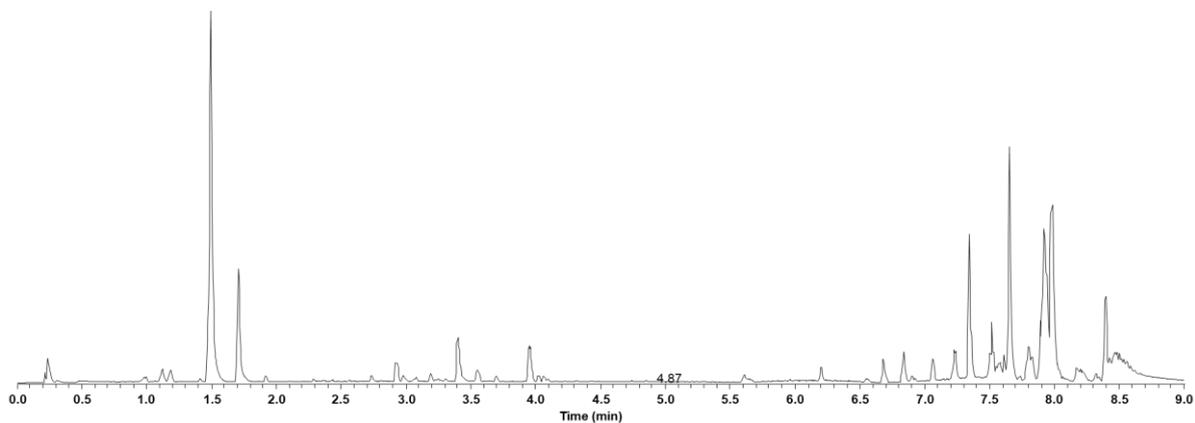


Figure S18. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique 12-NL.

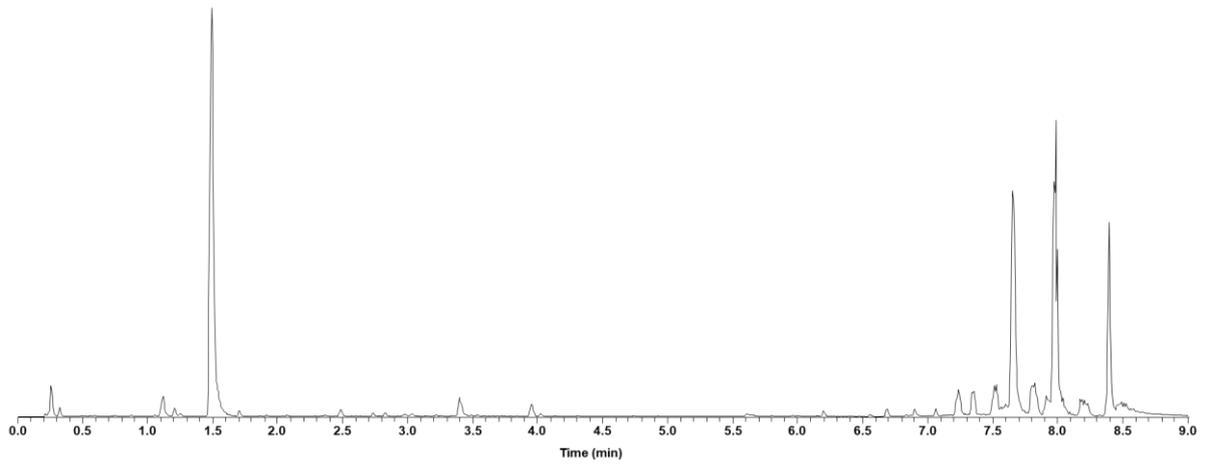


Figure S19. Chromatogramme UHPLC-HRMS-Orbitrap de l'extrait méthanolique HNC-Herbier.

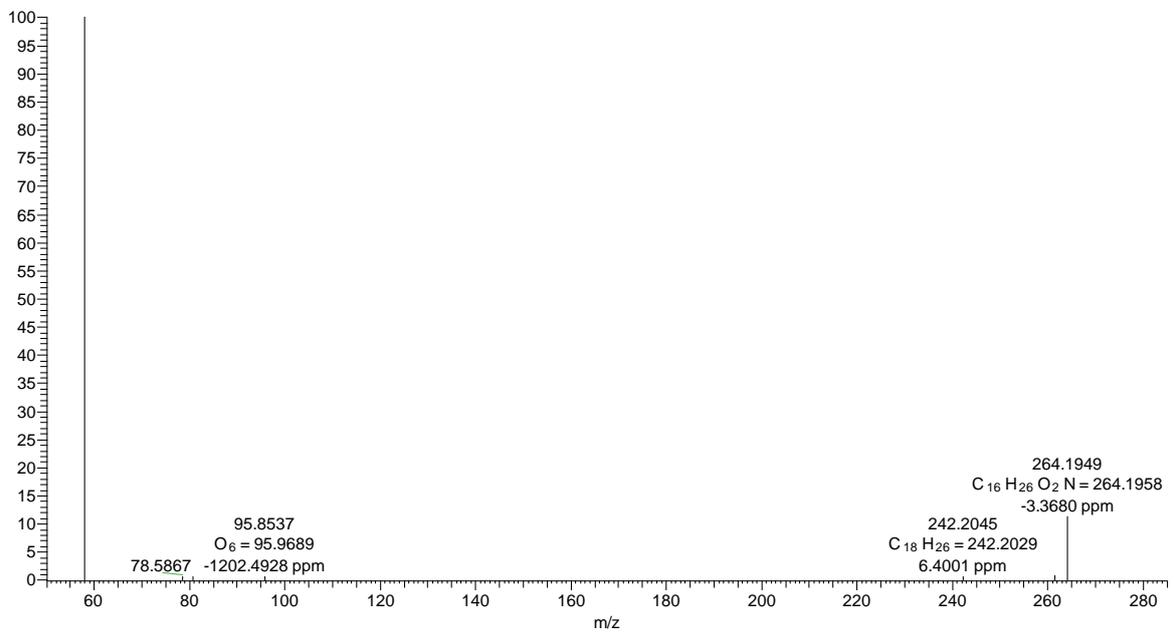


Figure S20. Spectre HRMS-Orbitrap (MH⁻) du tramadol.

2. *Helianthemum nummularium*

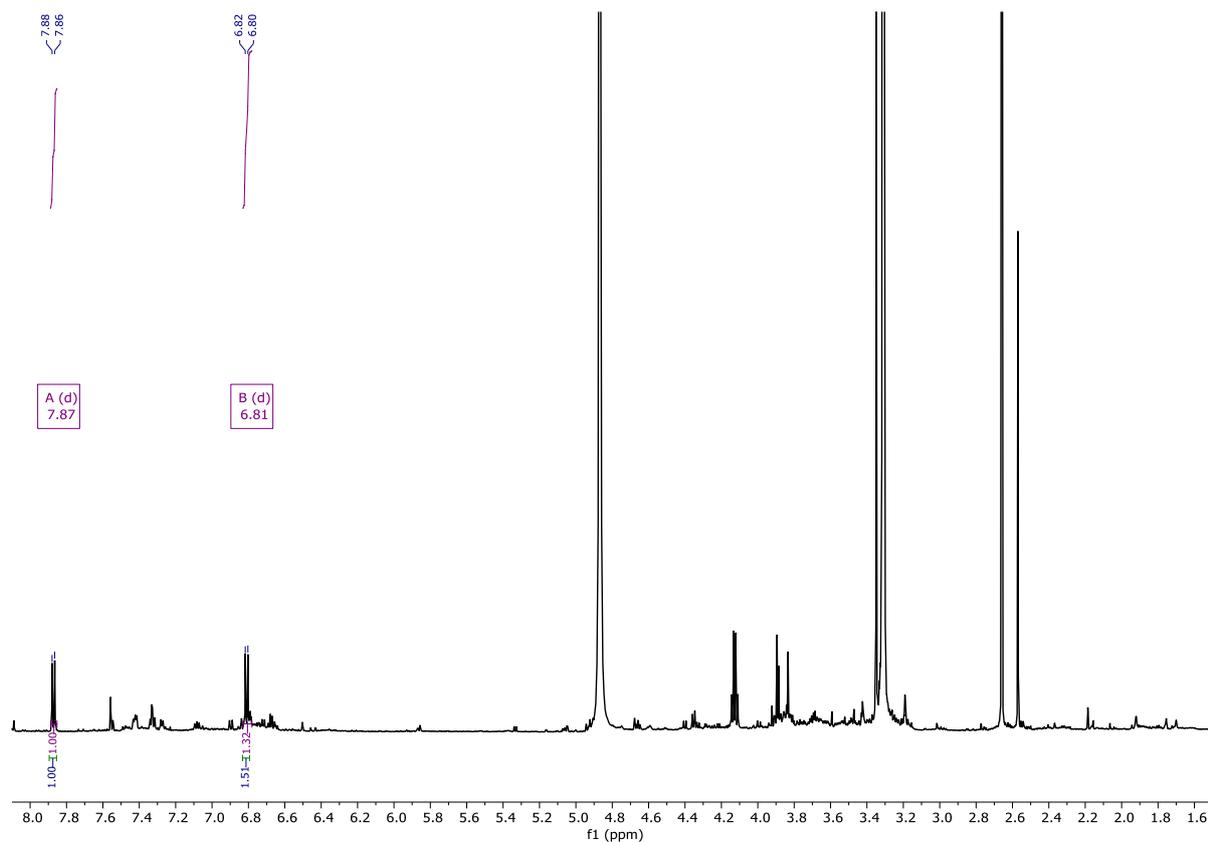


Figure S21. Spectre RMN ^1H de l'Acide *p*-hydroxybenzoïque (92) (CD_3OD).

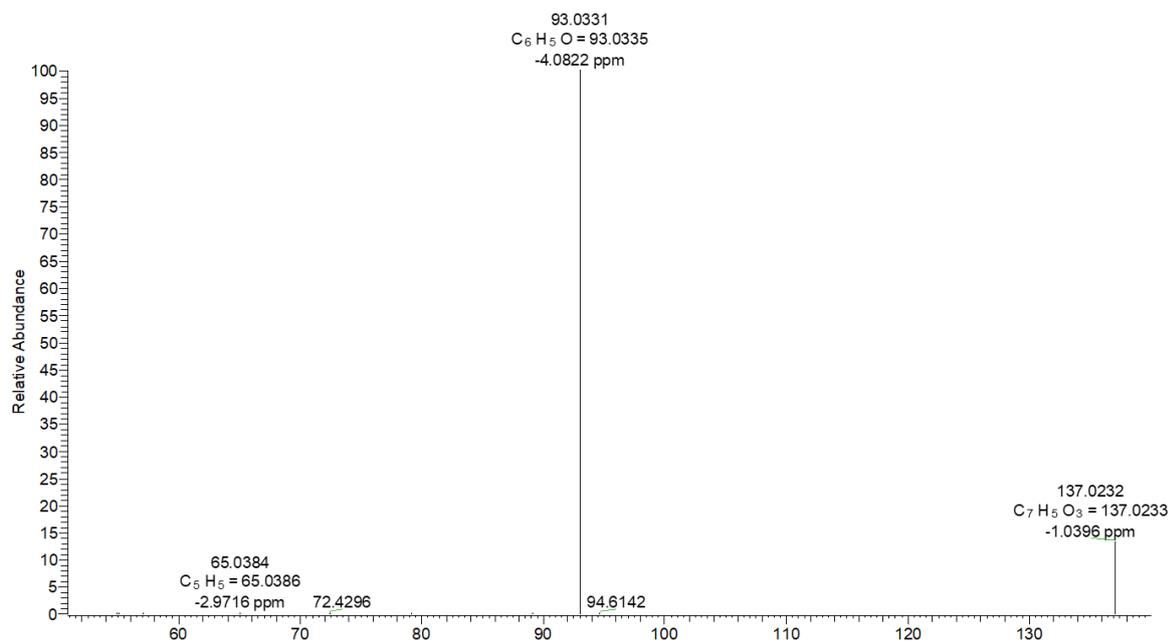


Figure S22. Spectre HRMS-Orbitrap (MH^+) de l'Acide *p*-hydroxybenzoïque (92).

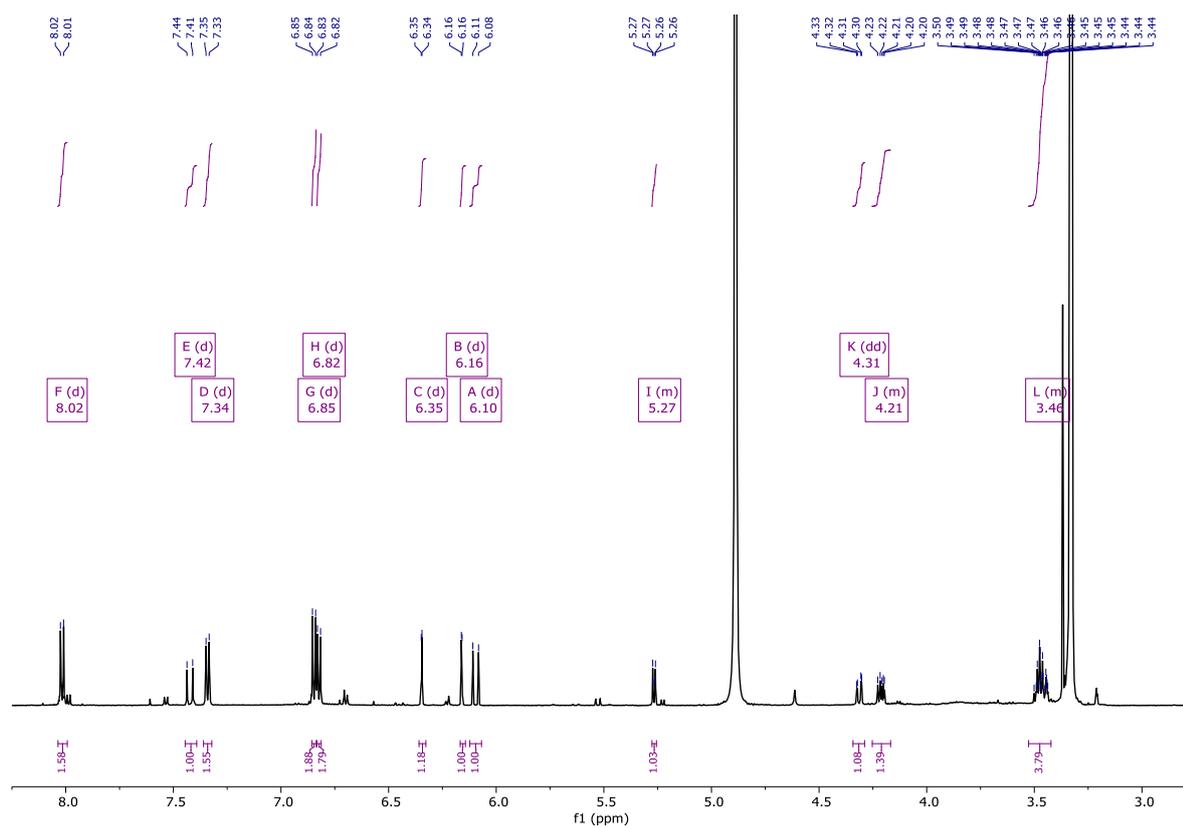


Figure S23. Spectre RMN ^1H du Tiliroside (93) (CD_3OD).

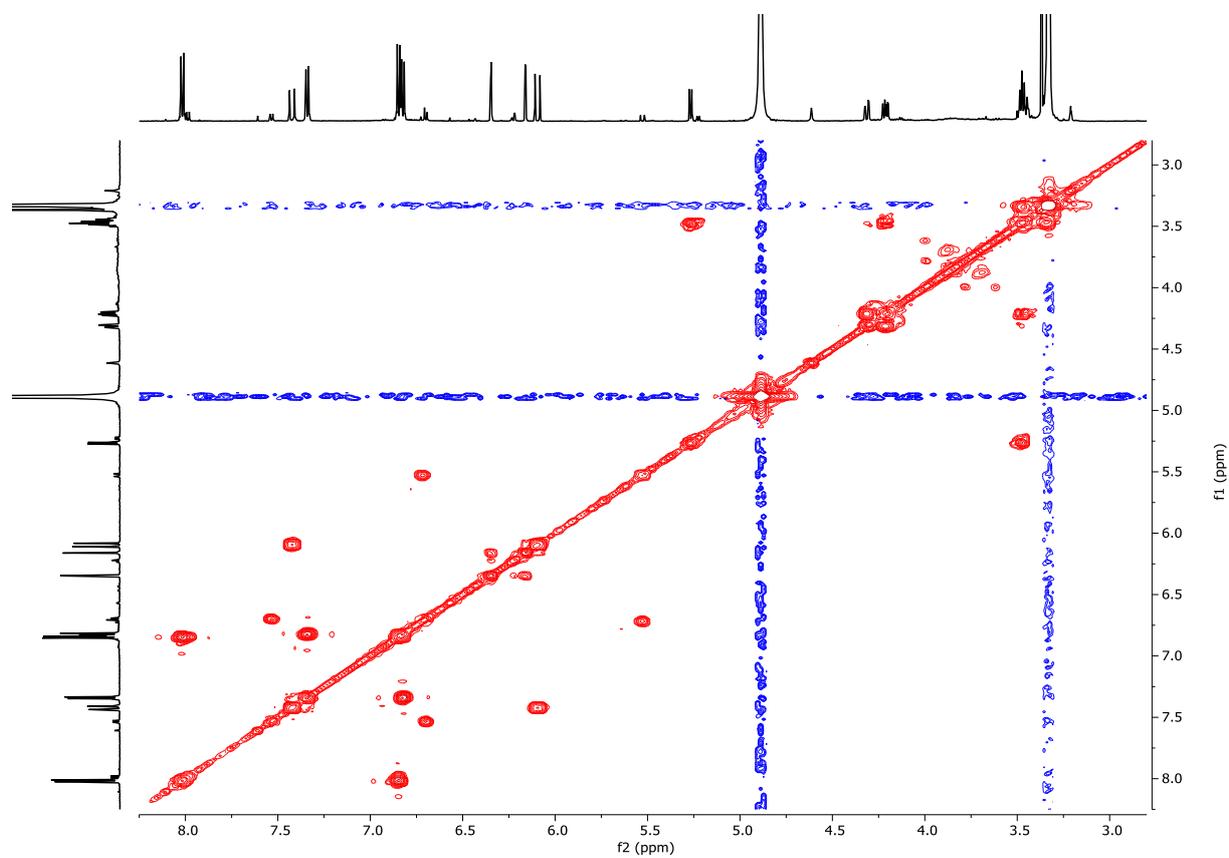


Figure S24. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY du Tiliroside (93) (CD_3OD).

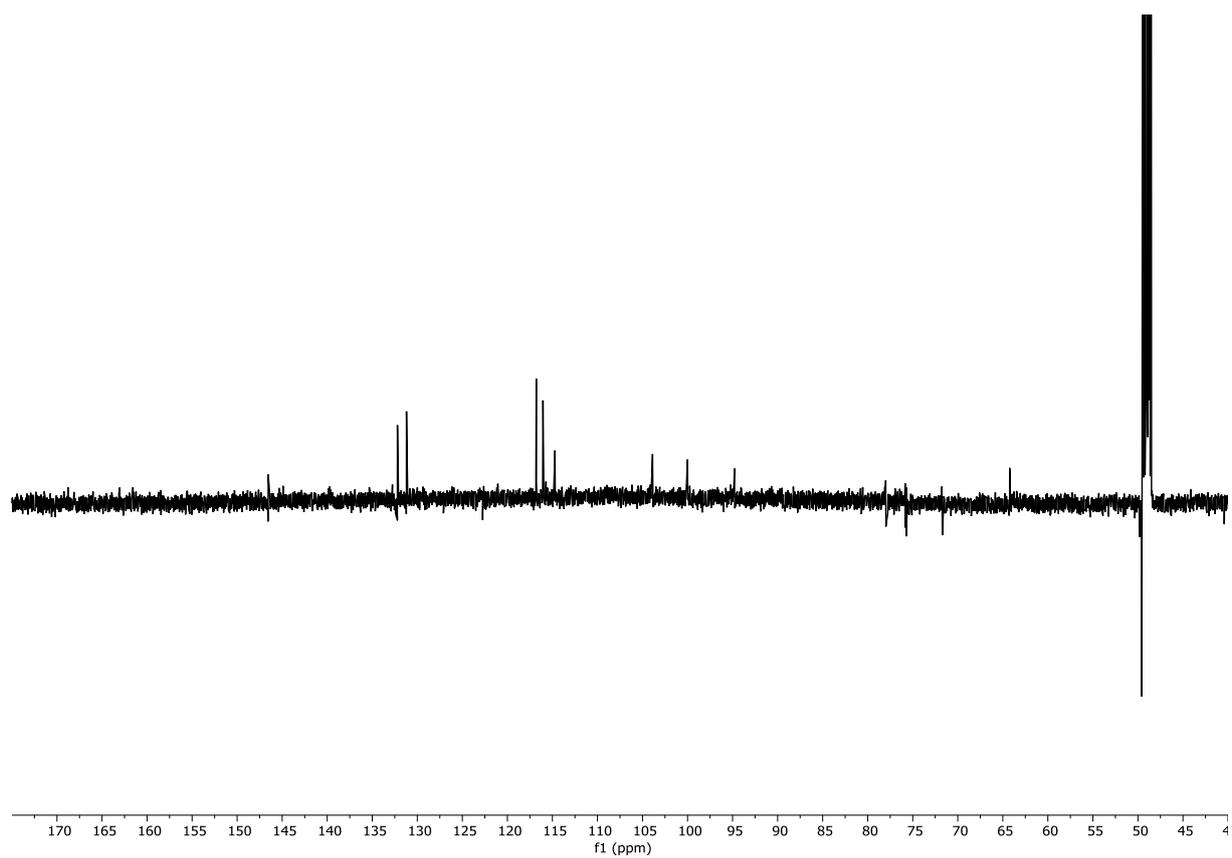


Figure S25. Spectre RMN ^{13}C du Tiliroside (93) (CD_3OD).

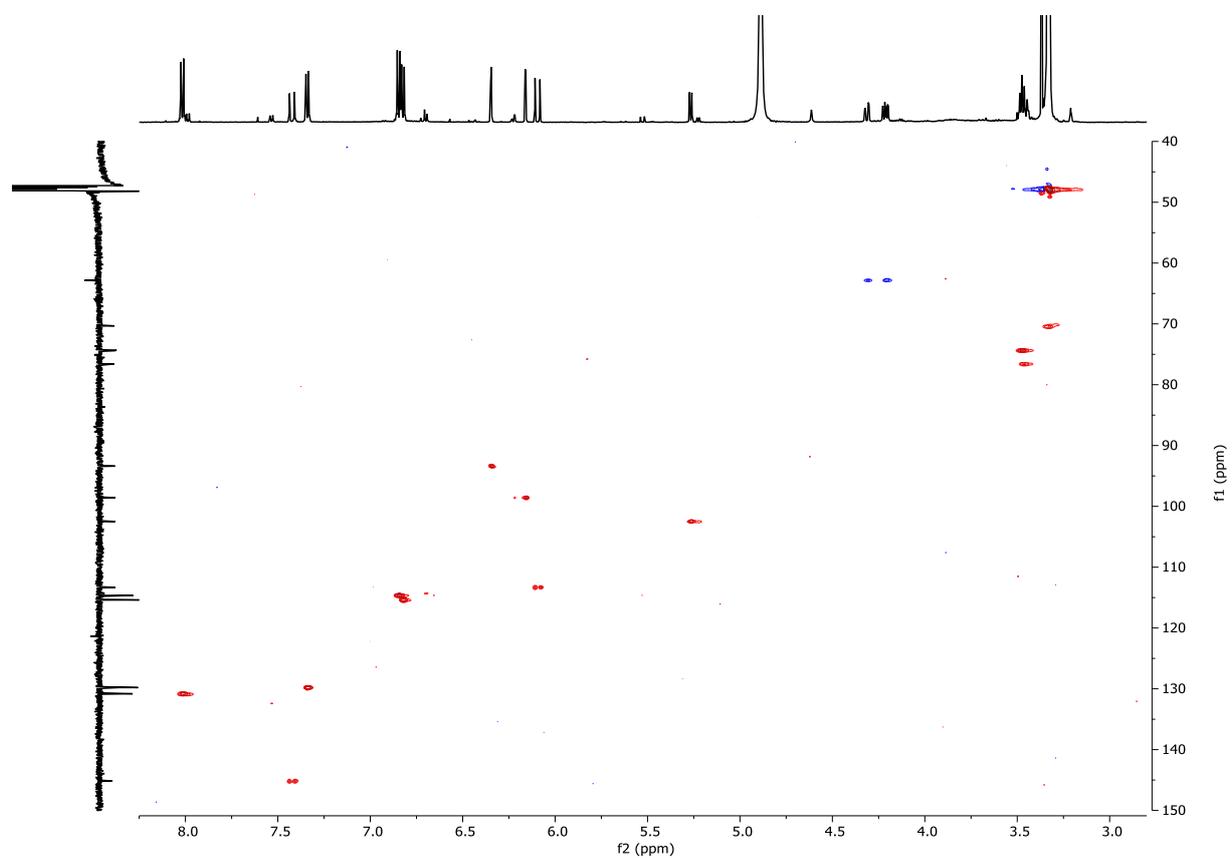


Figure S26. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC du Tiliroside (93) (CD_3OD).

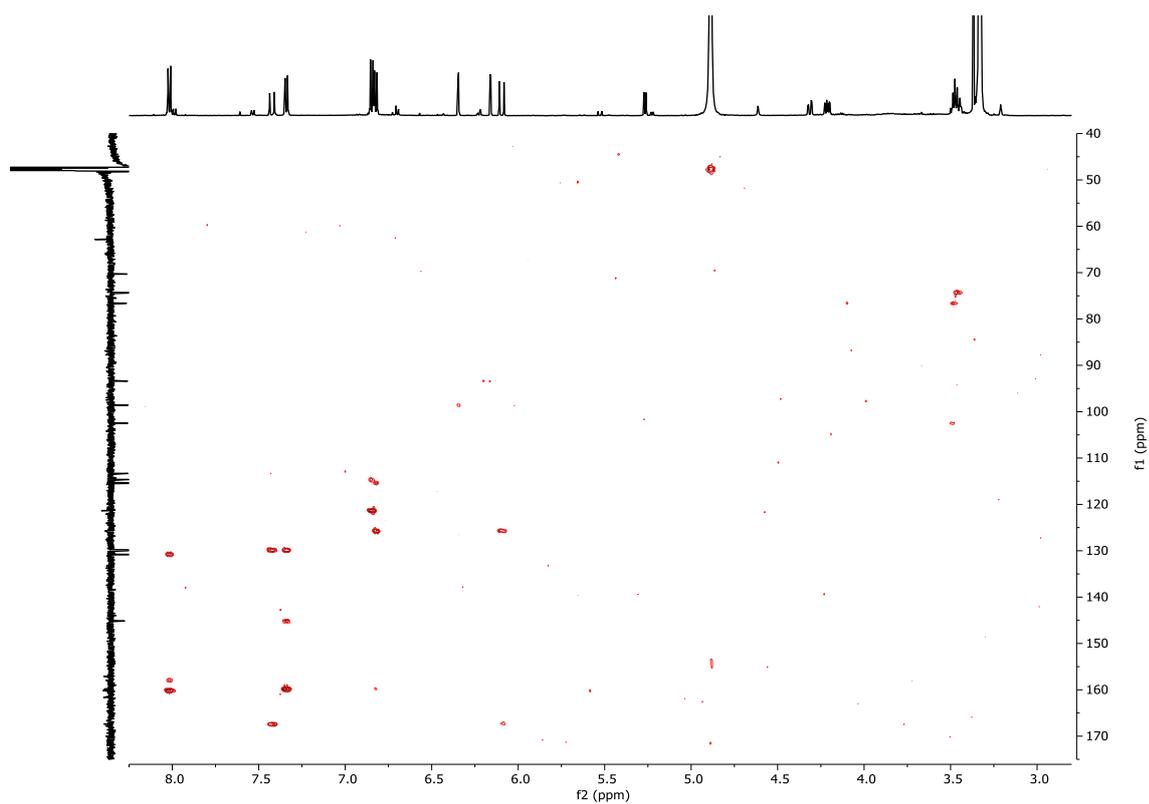


Figure S27. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du Tiliroside (**93**) (CD_3OD).

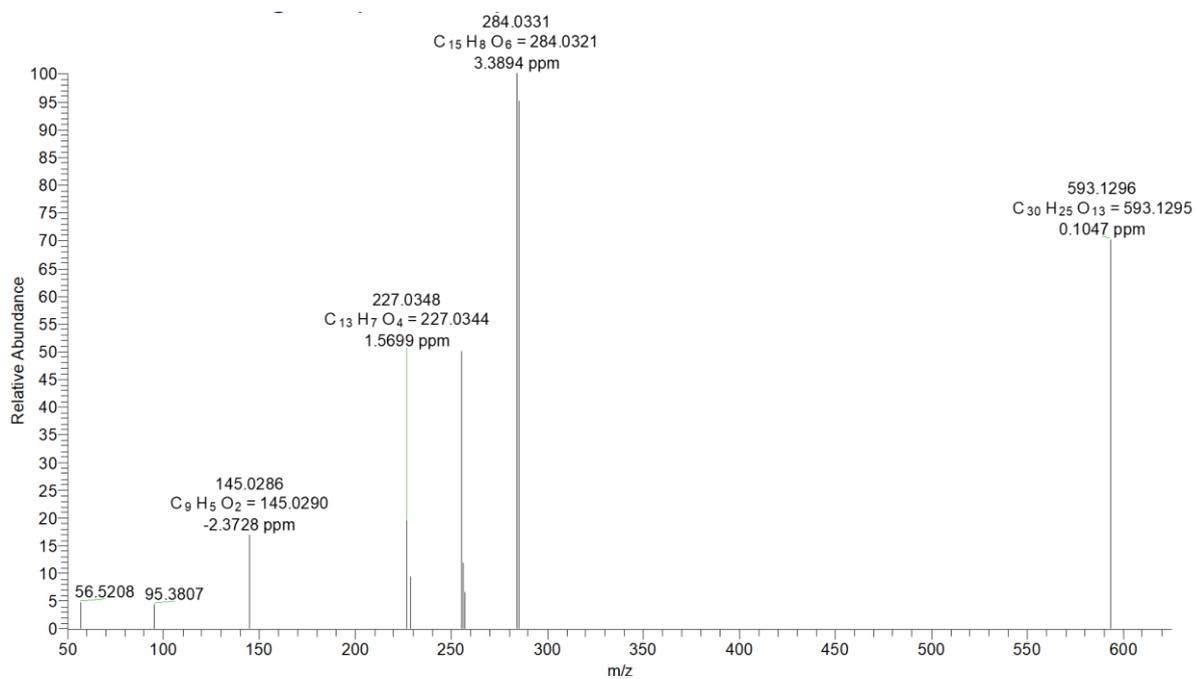


Figure S28. Spectre HRMS-Orbitrap (MH $^+$) du Tiliroside (**93**).

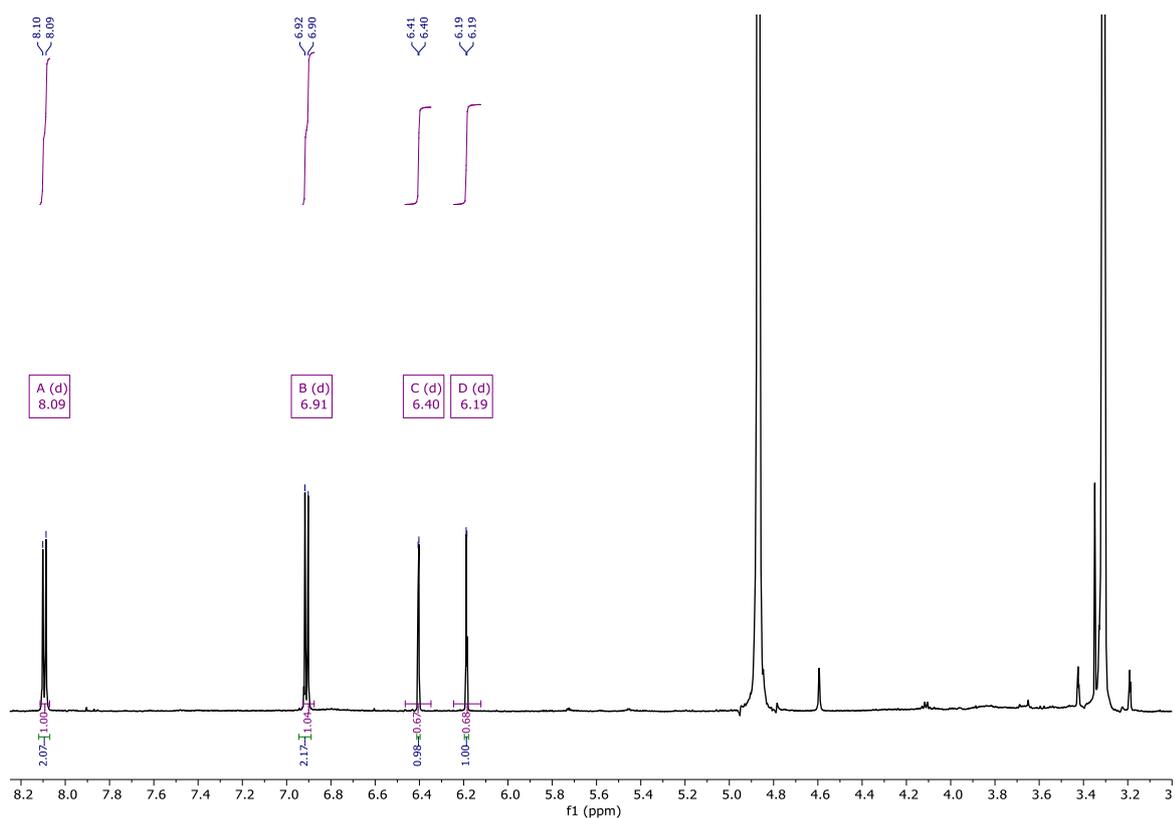


Figure S29. Spectre RMN ^1H du kaempférol (**94**) (CD_3OD).

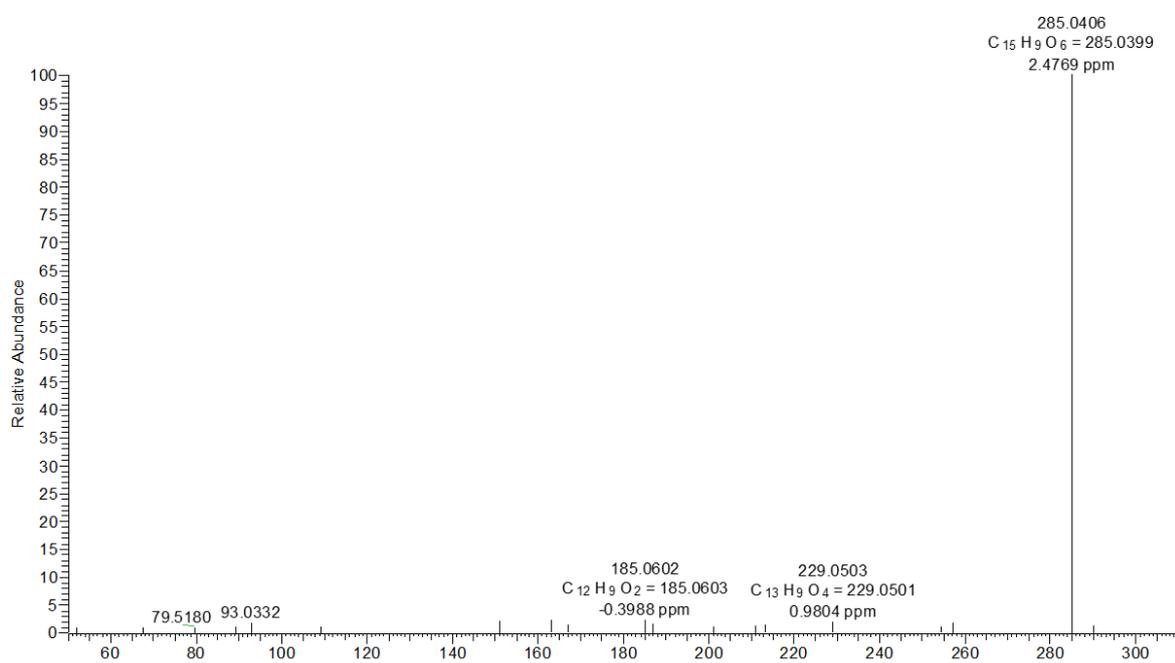


Figure S30. Spectre HRMS-Orbitrap (MH^-) du kaempférol (**94**) (CD_3OD).

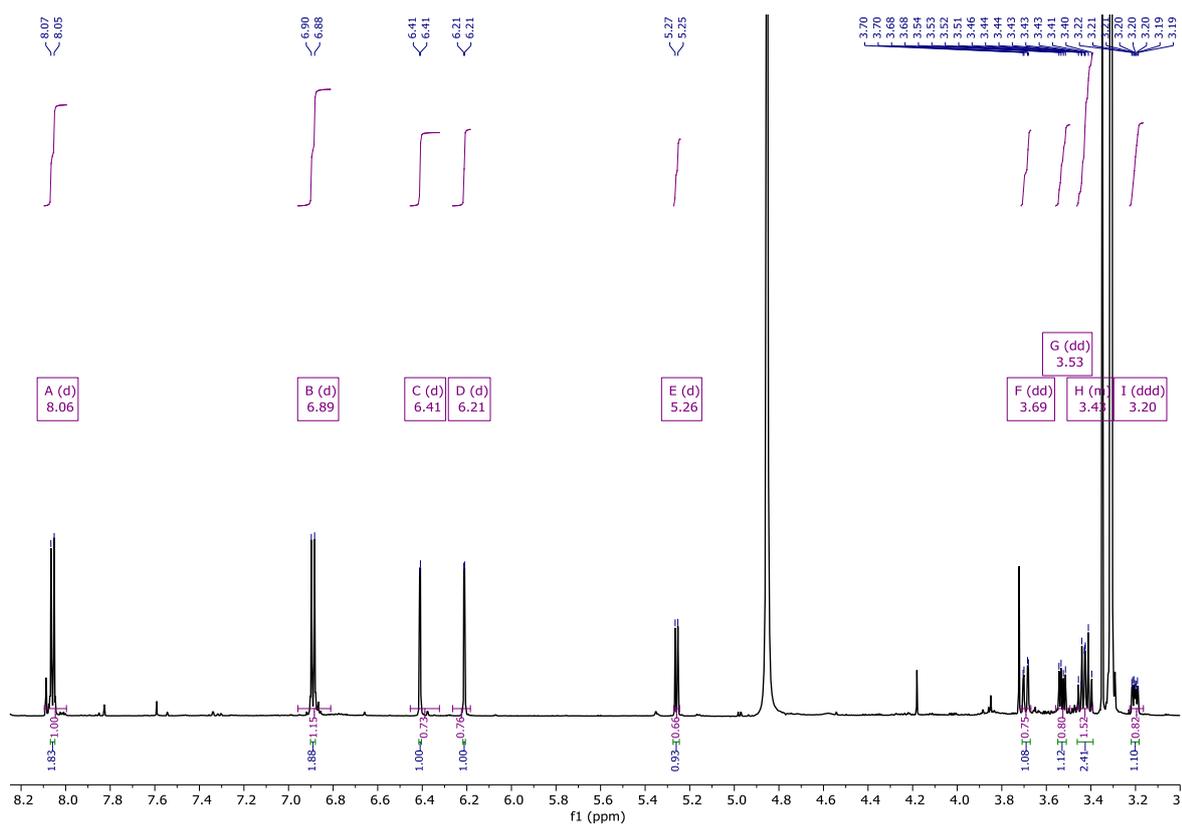


Figure S31. Spectre RMN ^1H de l'Astragaline (95) (CD_3OD).

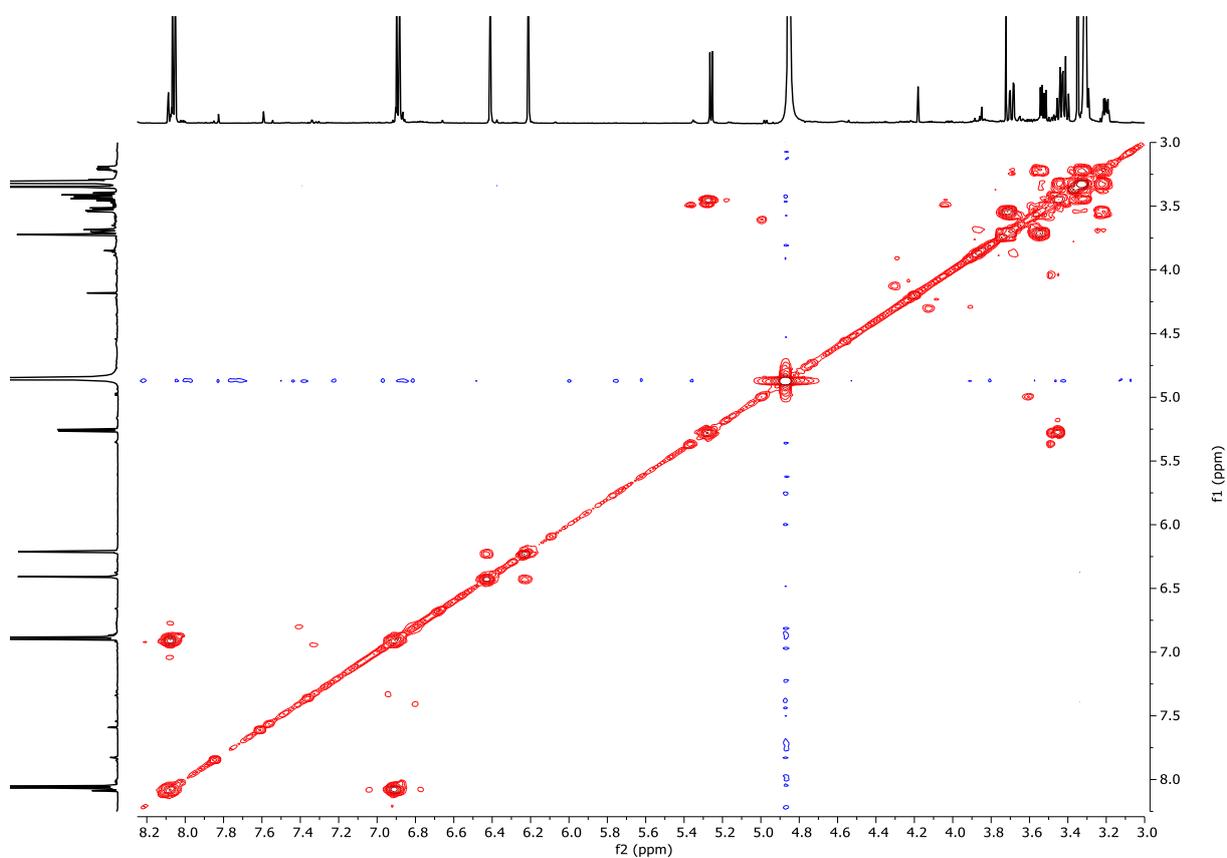


Figure S32. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de l'Astragaline (95) (CD_3OD).

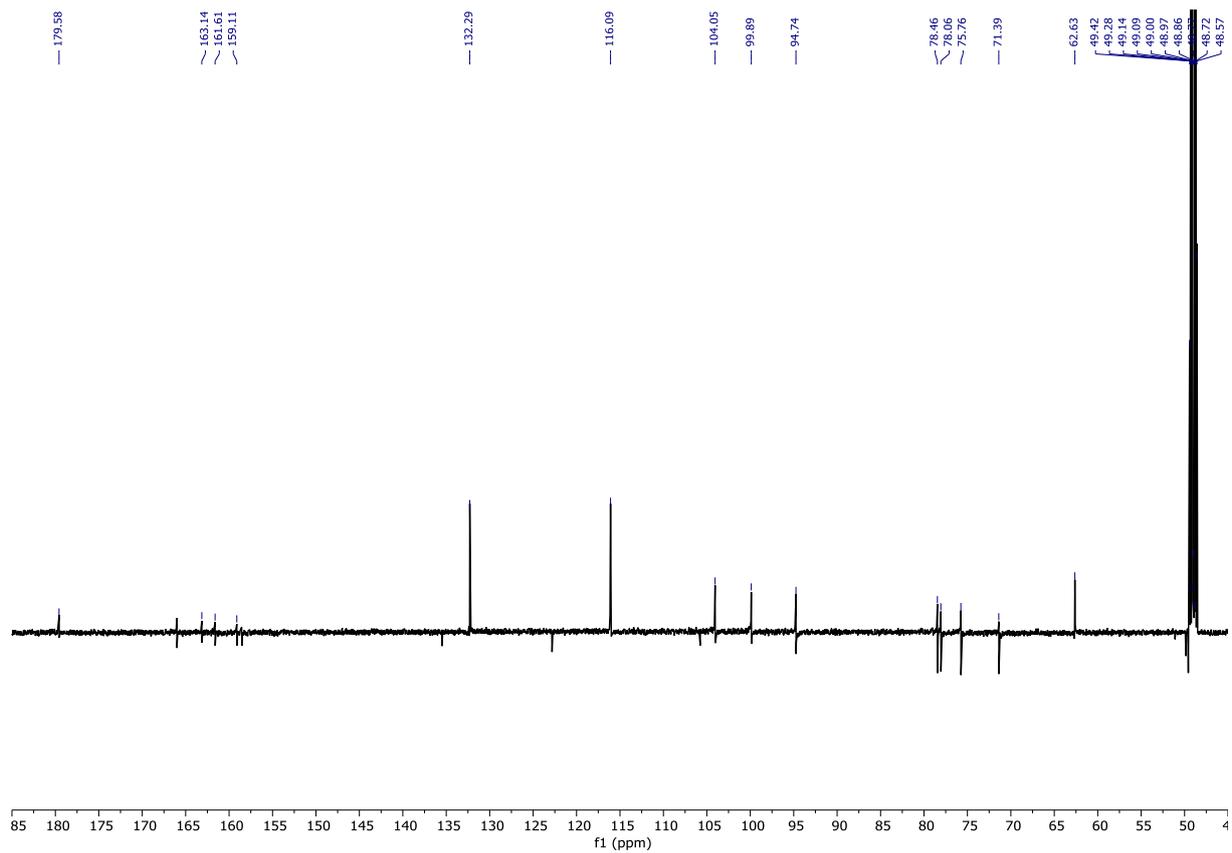


Figure S33. Spectre RMN ^{13}C de l'Astragaline (95) (CD_3OD).

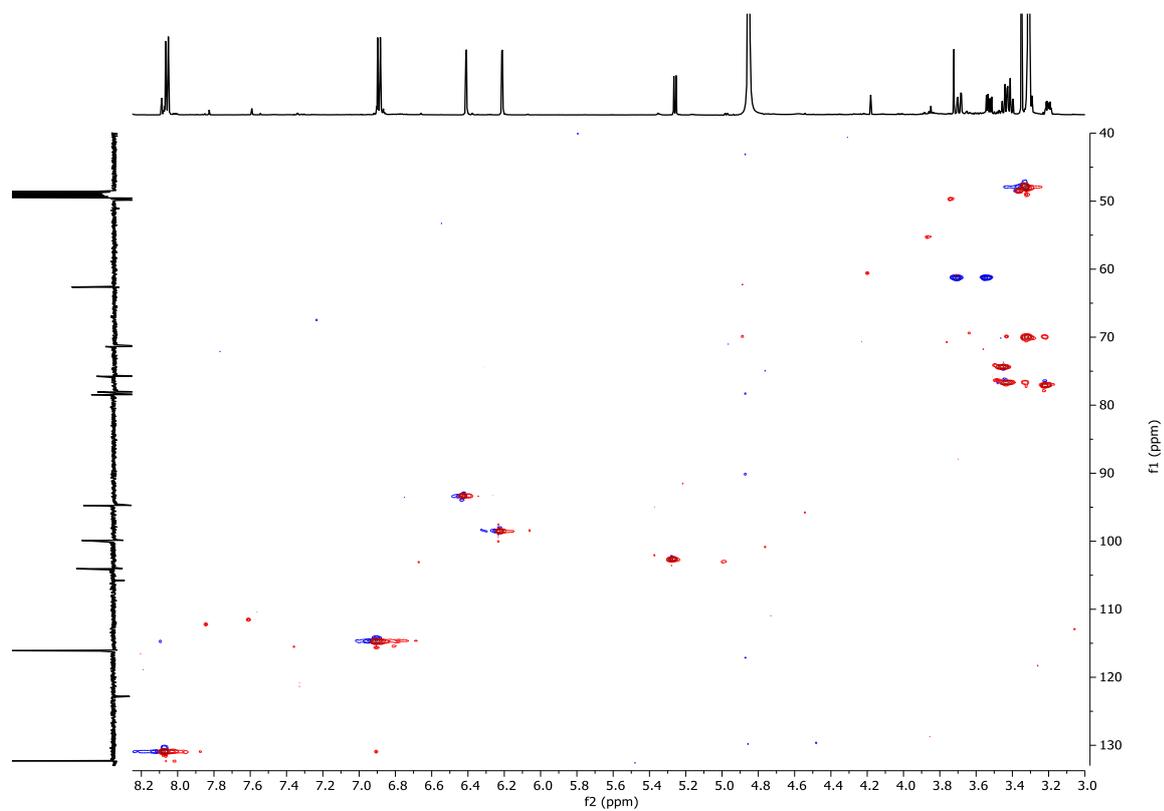


Figure S34. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de l'Astragaline (95) (CD_3OD).

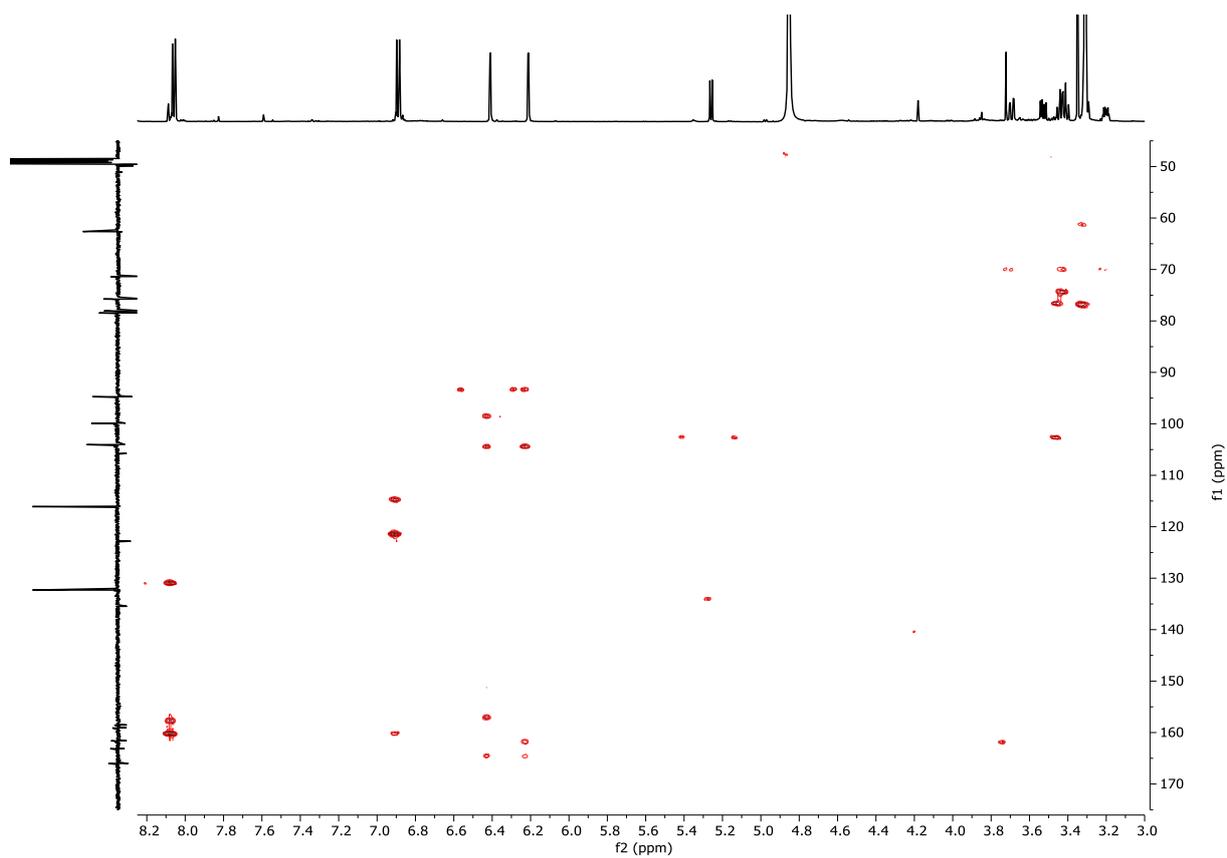


Figure S35. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de l'Astragaline (**95**) (CD_3OD).

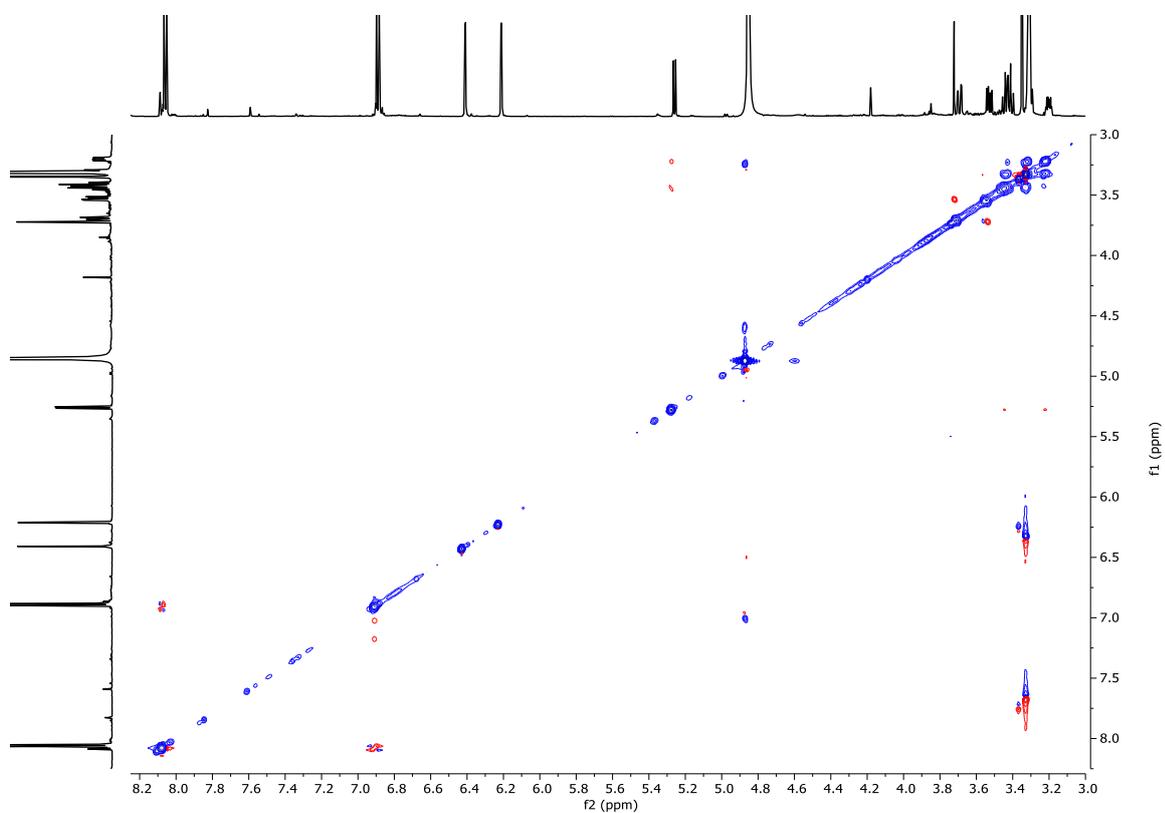


Figure S36. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de l'Astragaline (**95**) (CD_3OD).

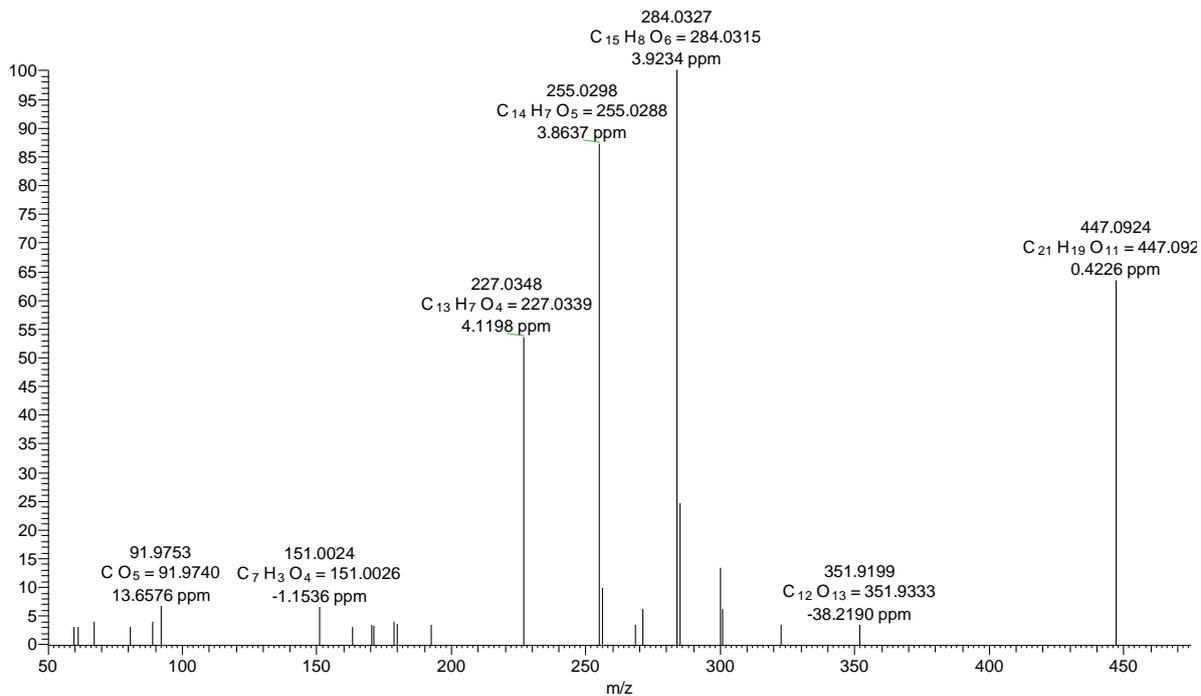


Figure S37. Spectre HRMS-Orbitrap (MH⁻) de l'Astragaline (95) (CD₃OD).

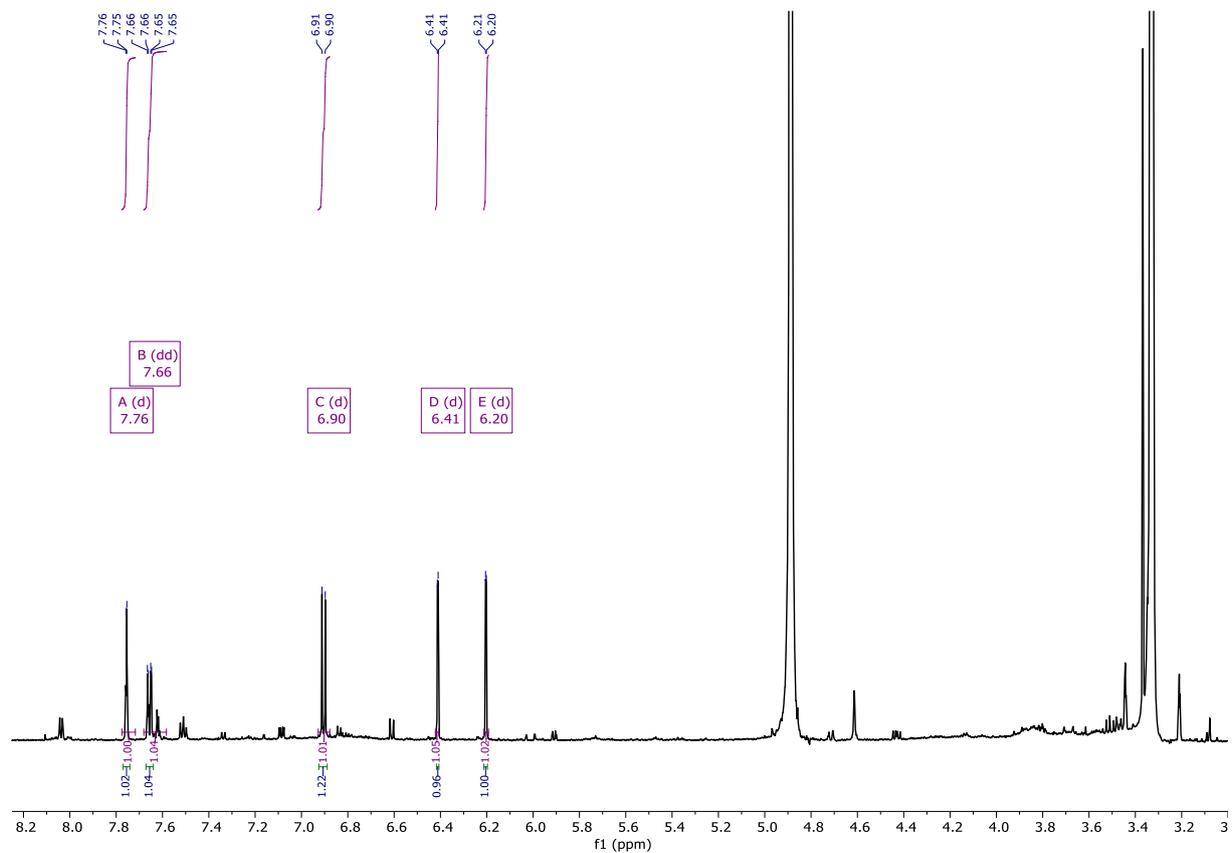


Figure S38. Spectre RMN ¹H de la Quercétine (96) (CD₃OD).

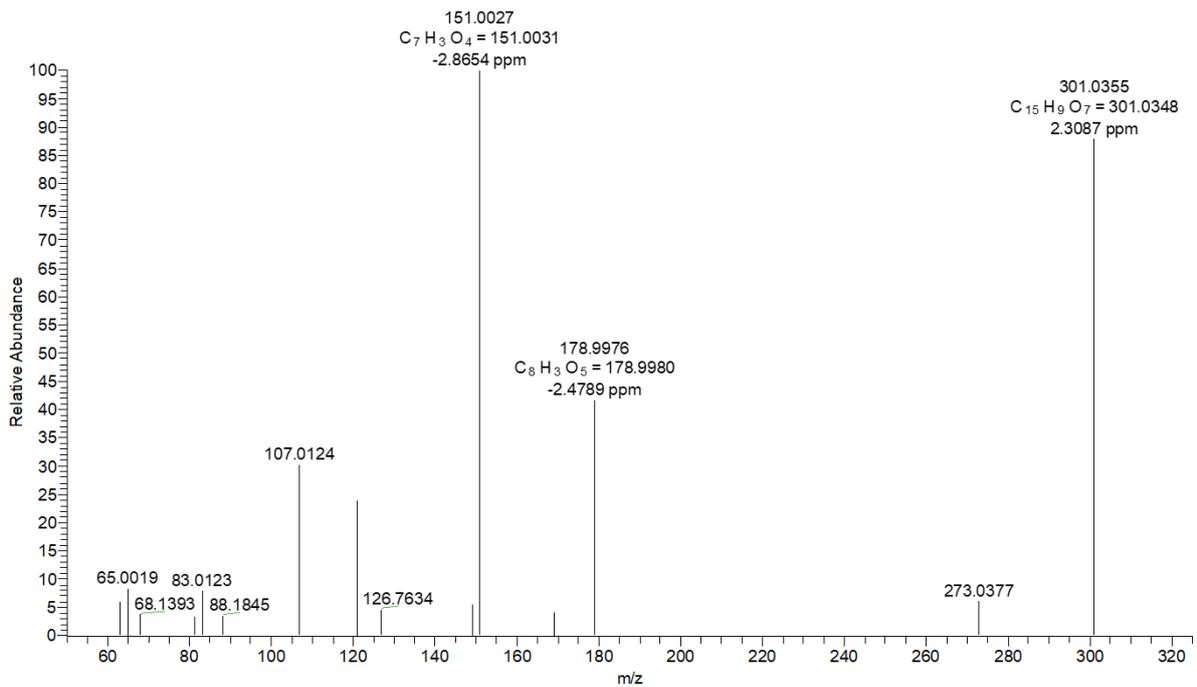


Figure S39. Spectre HRMS-Orbitrap (MH⁺) de la Quercétine (96).

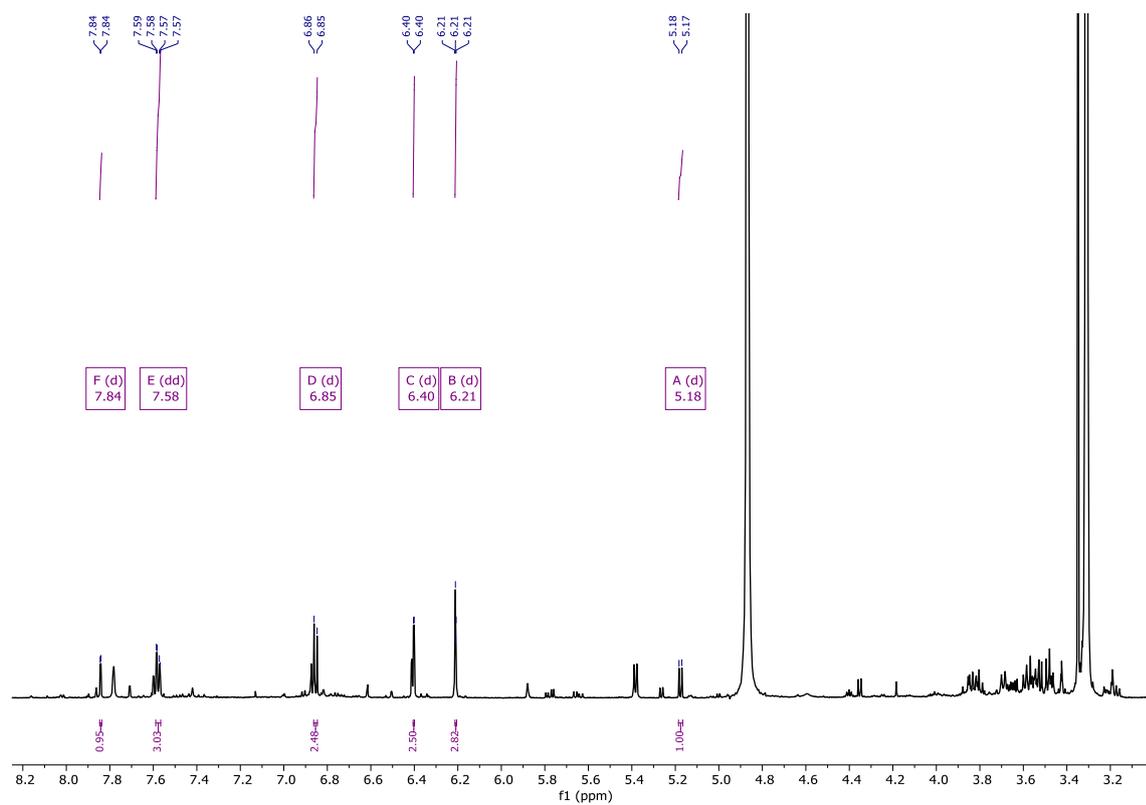


Figure S40. Spectre RMN ¹H de la Quercétine-3-O-glucoside (97) (CD₃OD).

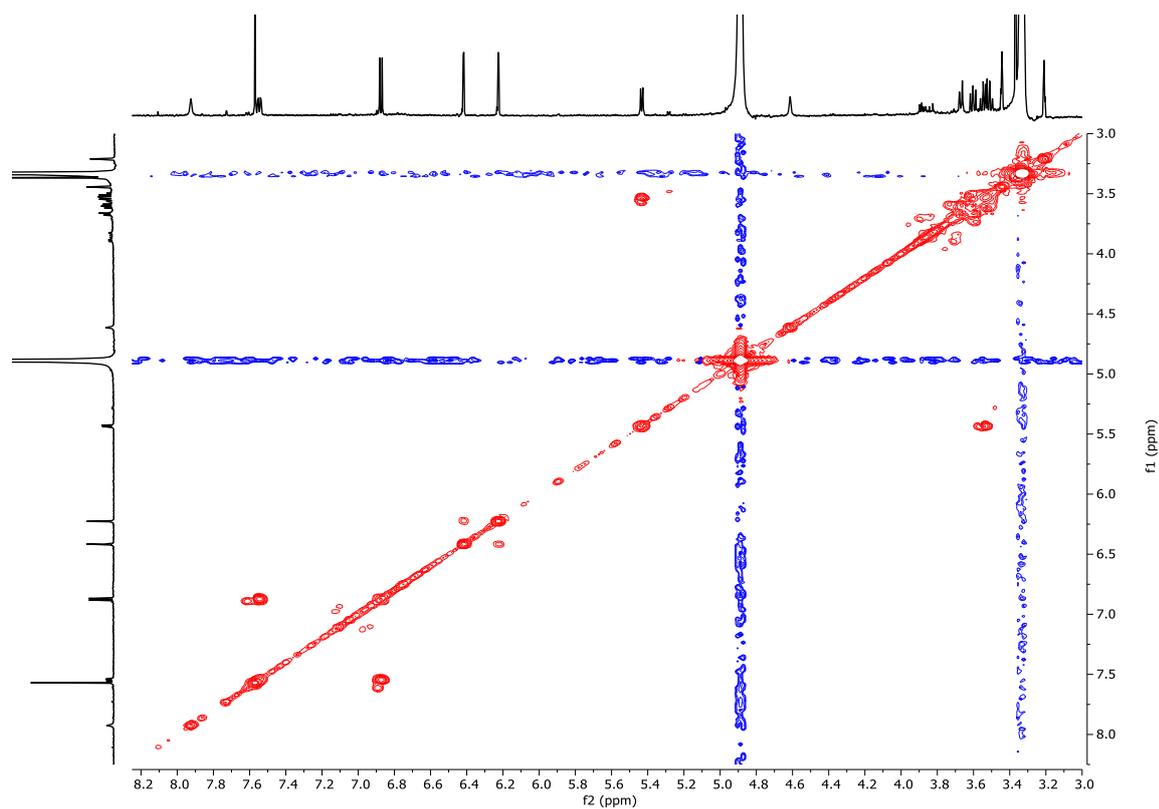


Figure S43. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de la Quercétine-3-*O*-glucuronide (**98**) (CD_3OD).

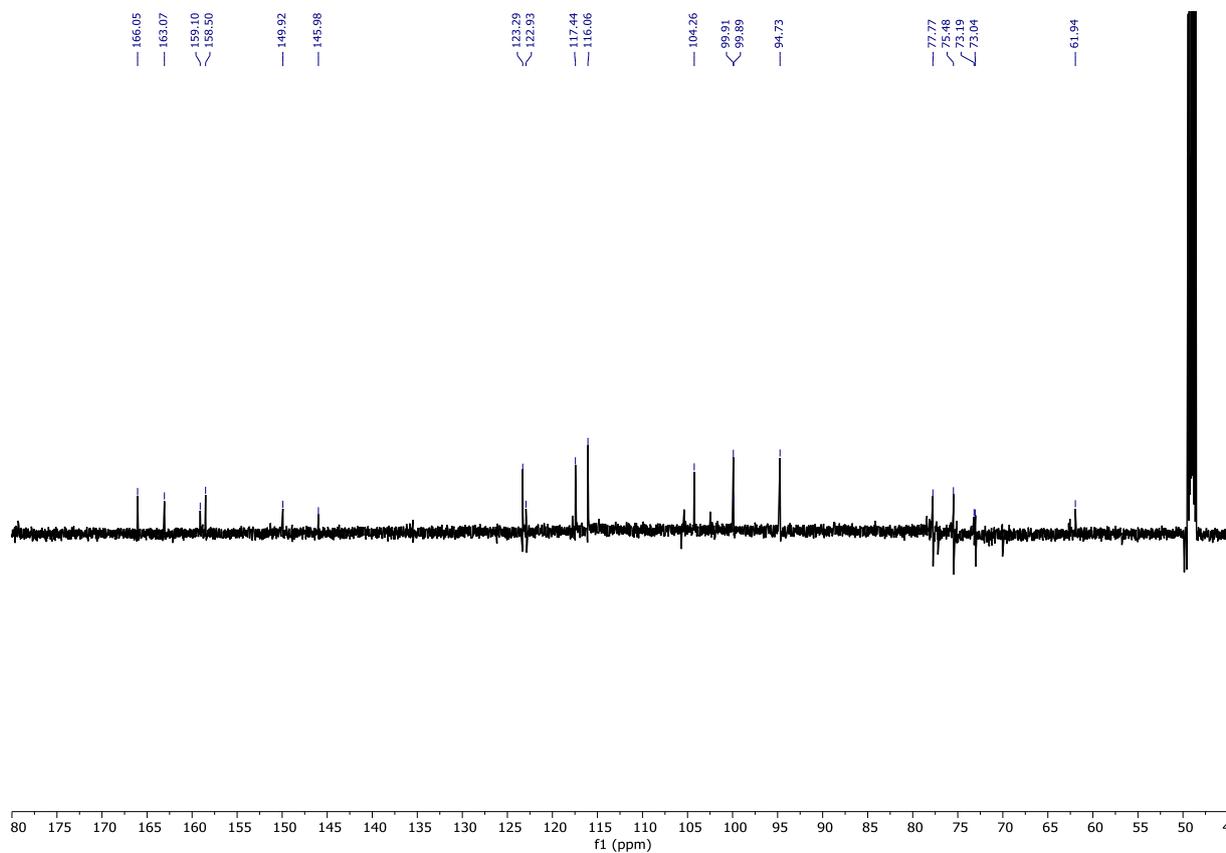


Figure S44. Spectre RMN ^{13}C de la Quercétine-3-*O*-glucuronide (**98**) (CD_3OD).

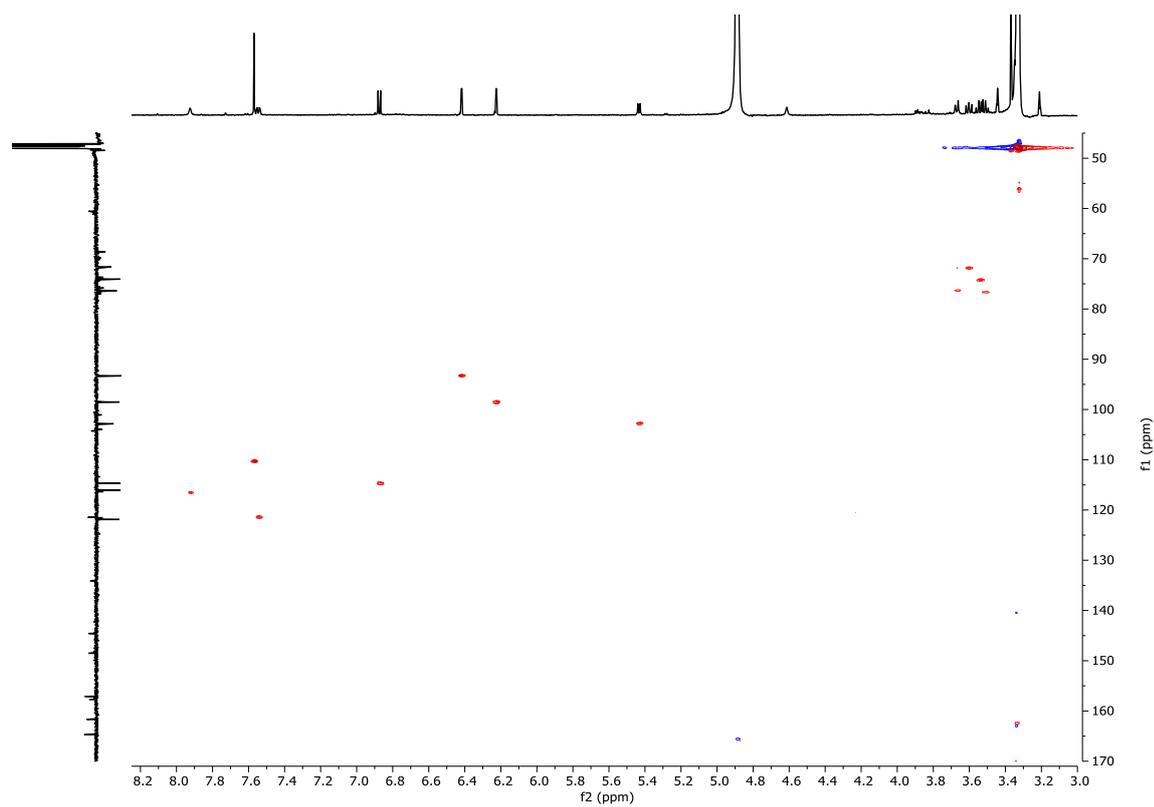


Figure S45. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de la Quercétine-3-*O*-glucuronide (98) (CD_3OD).

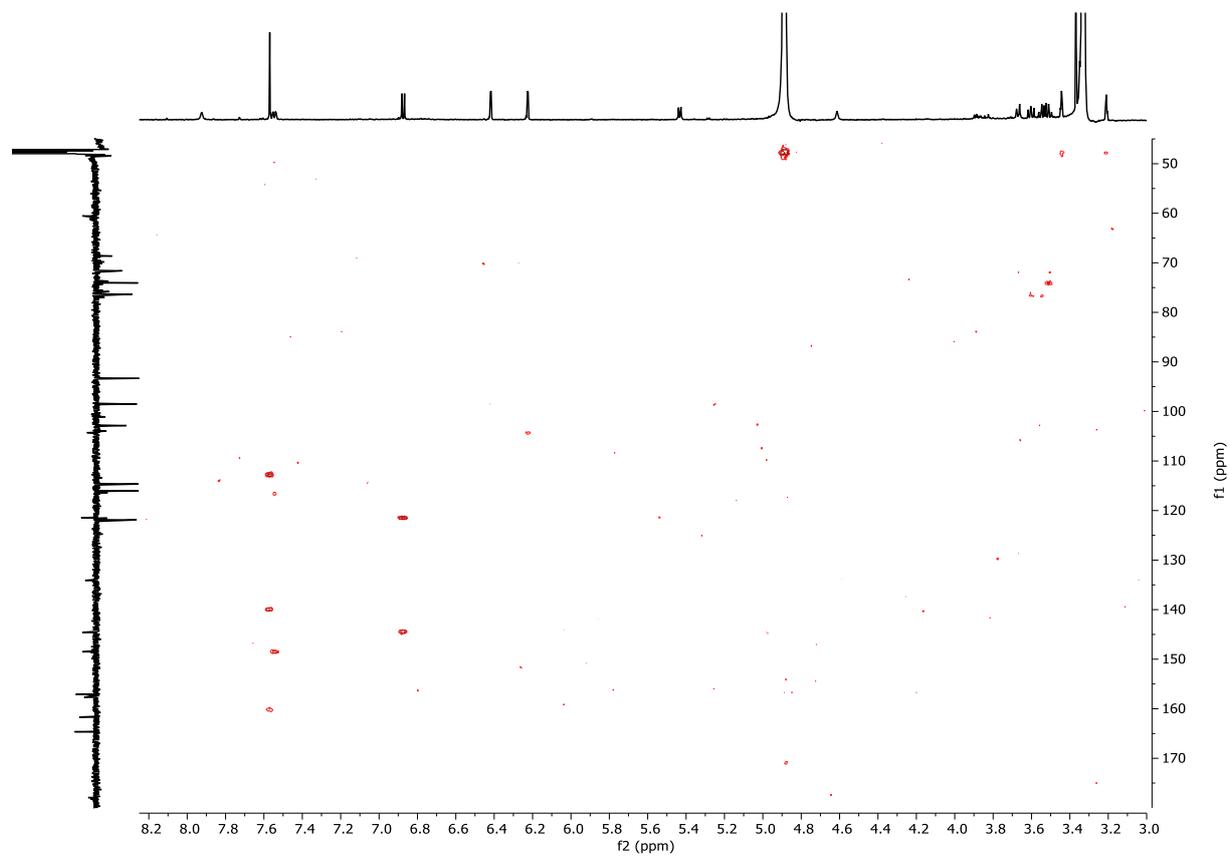


Figure S46. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de la Quercétine-3-*O*-glucuronide (98) (CD_3OD).

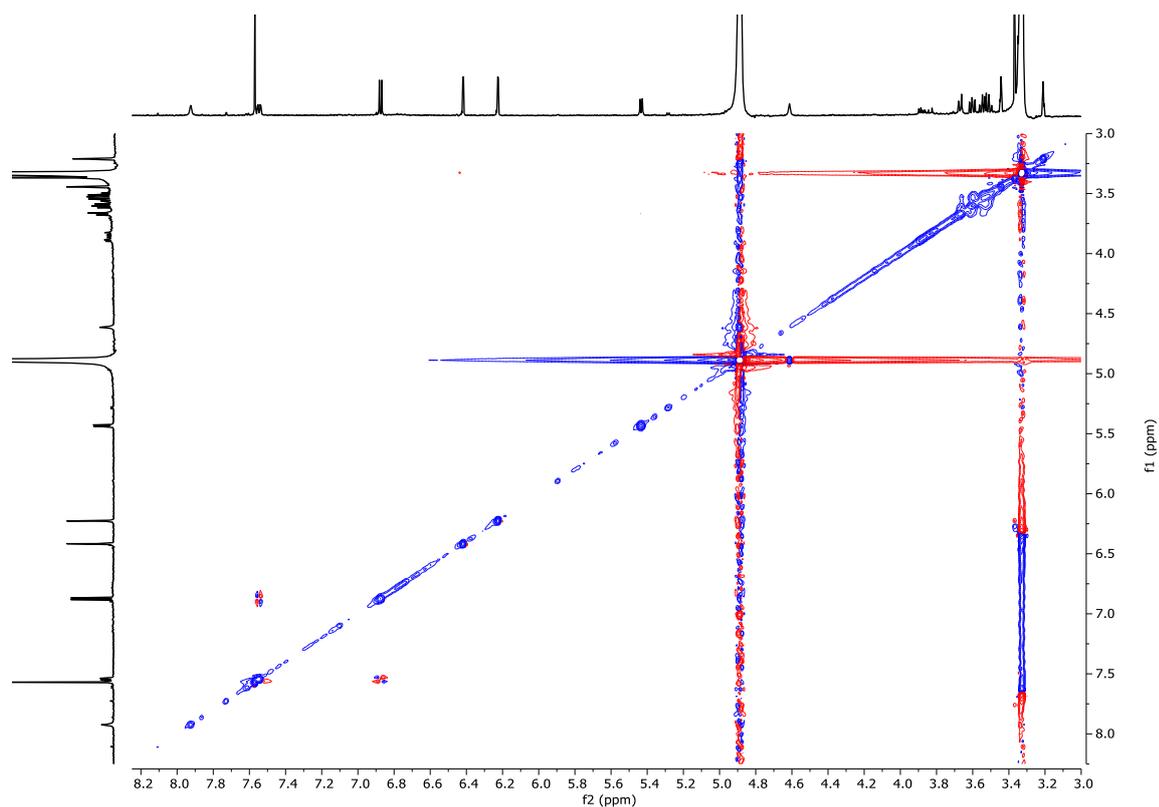


Figure S47. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de la Quercétine-3-*O*-glucuronide (**98**) (CD_3OD).

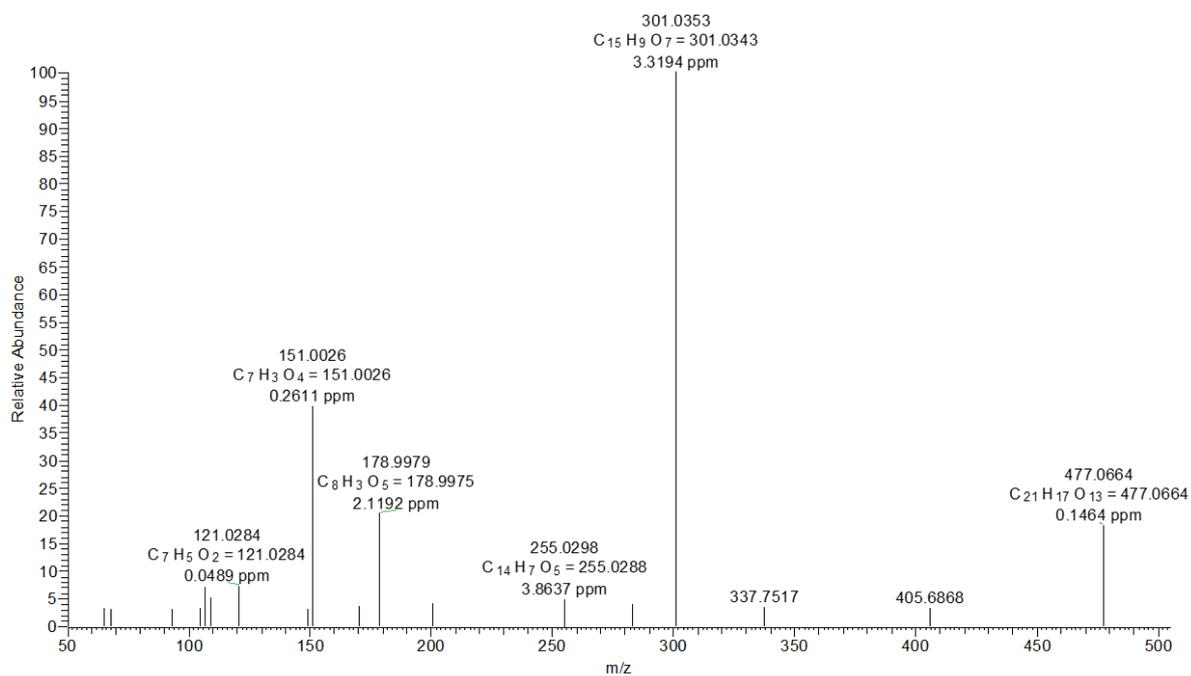


Figure S48. Spectre HRMS-Orbitrap (MH) de la quercétine-3-*O*-glucuronide (**98**).

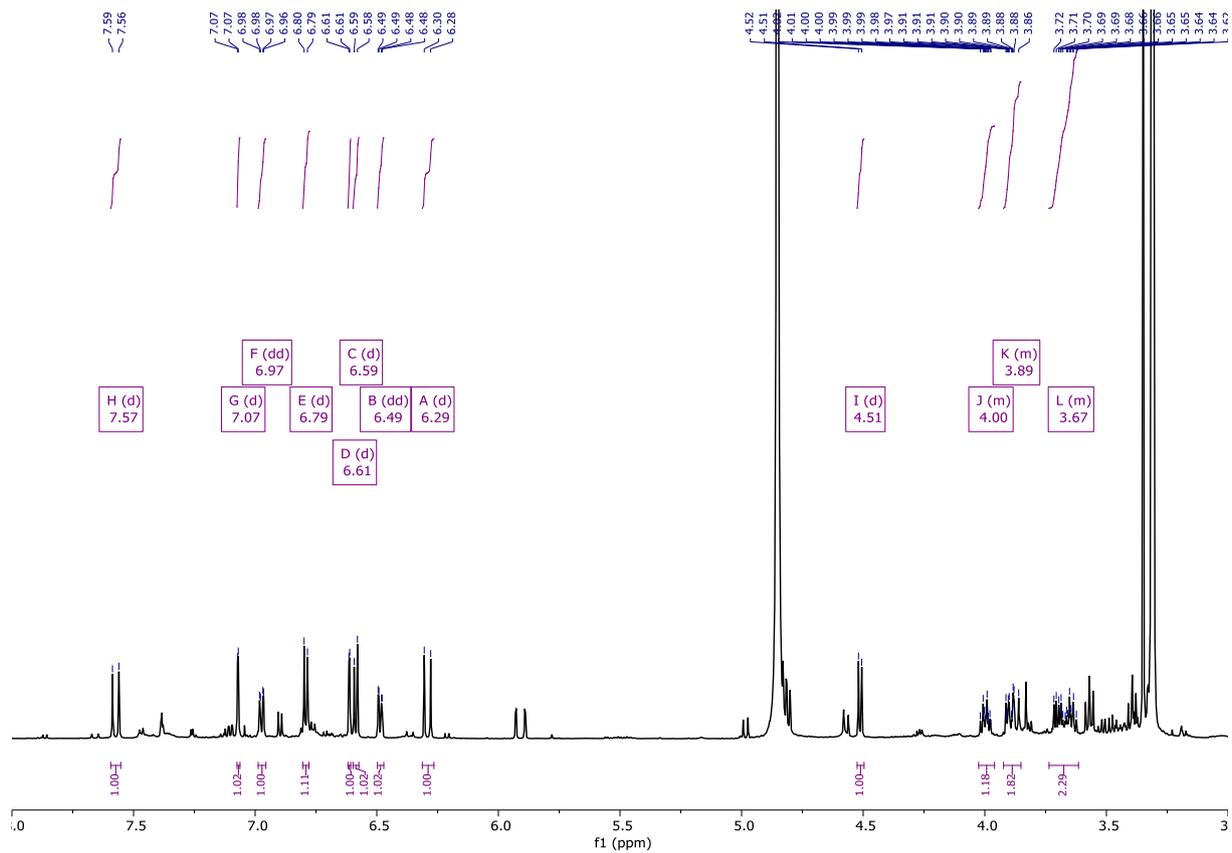


Figure S49. Spectre RMN ^1H du Plantainoside B (99) (CD_3OD).

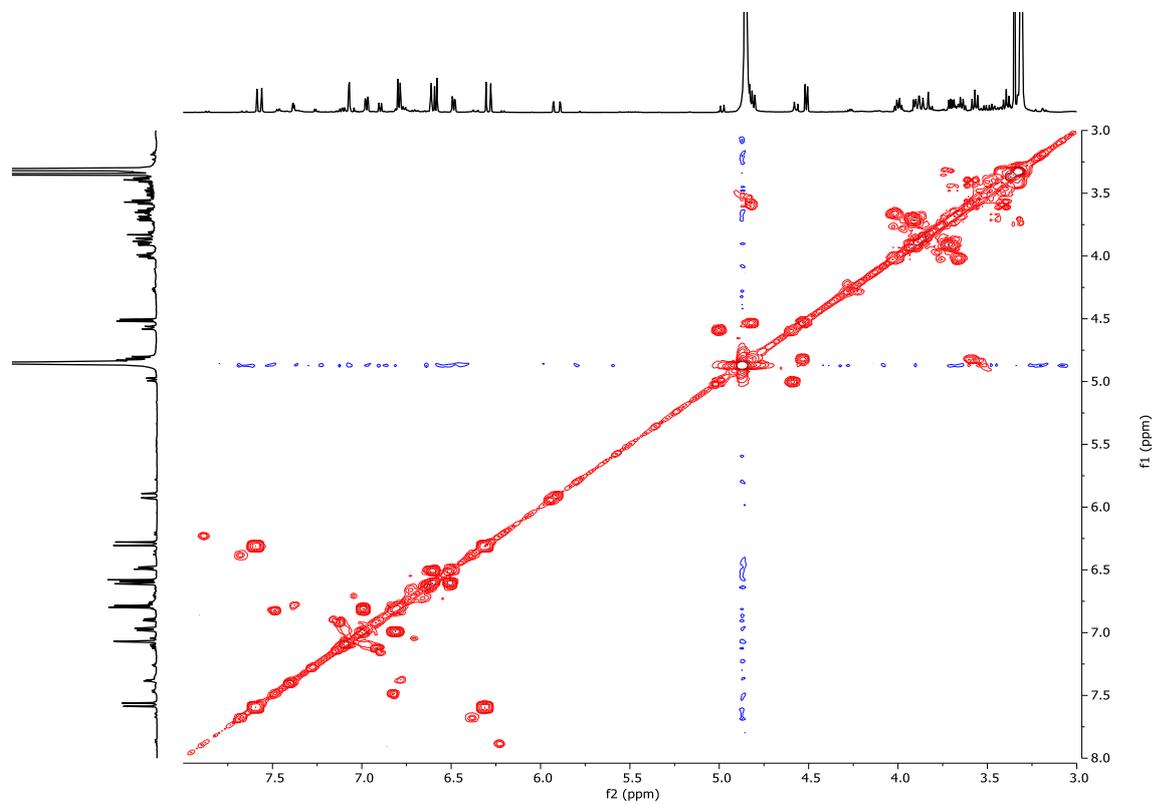


Figure S50. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY du Plantainoside B (99) (CD_3OD).

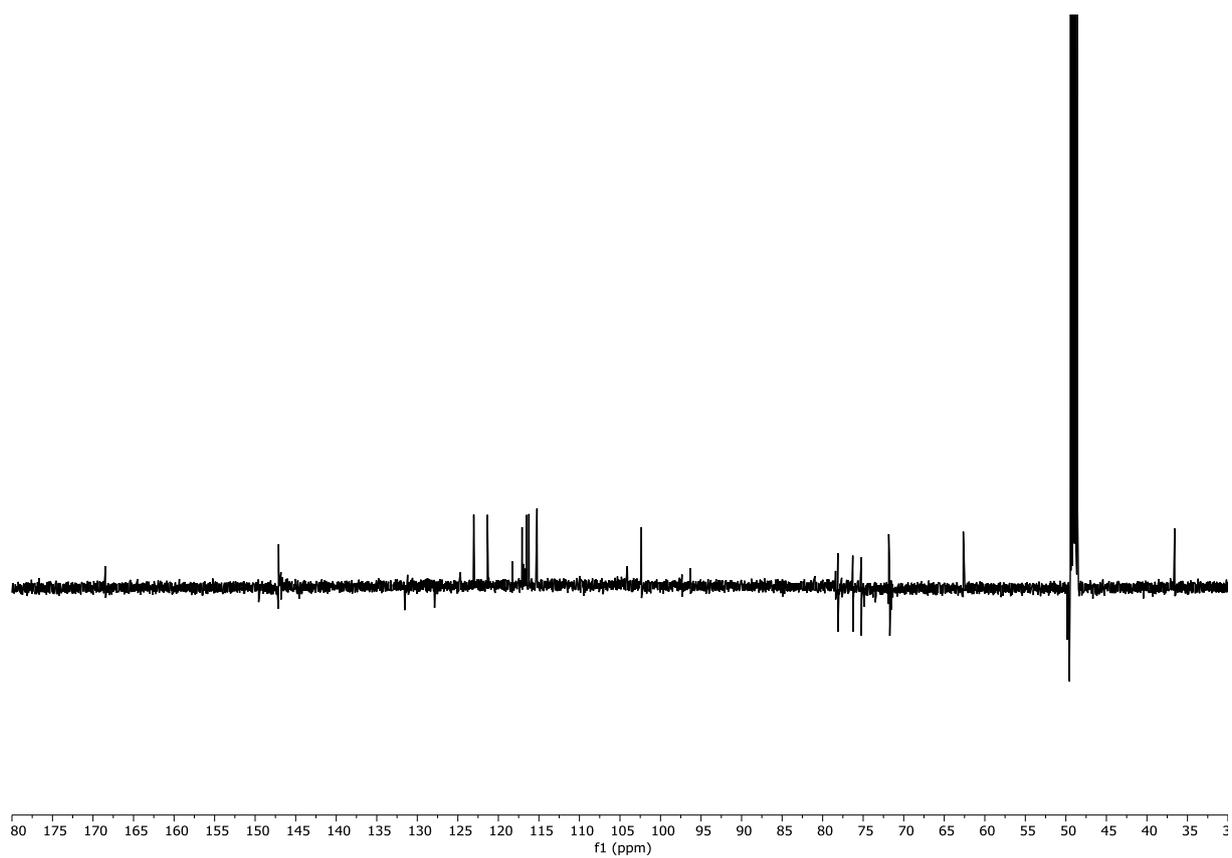


Figure S51. Spectre RMN ^{13}C du Plantainoside B (**99**) (CD_3OD).

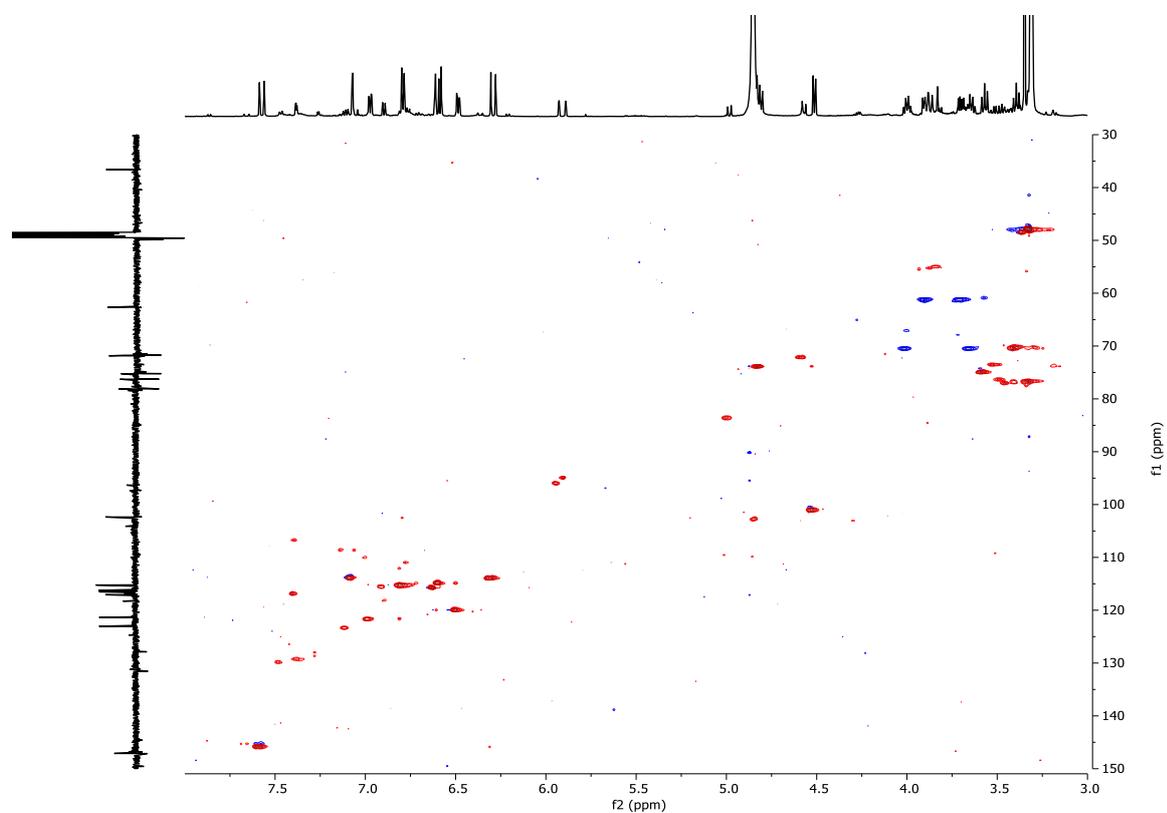


Figure S52. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC du Plantainoside B (**99**) (CD_3OD).

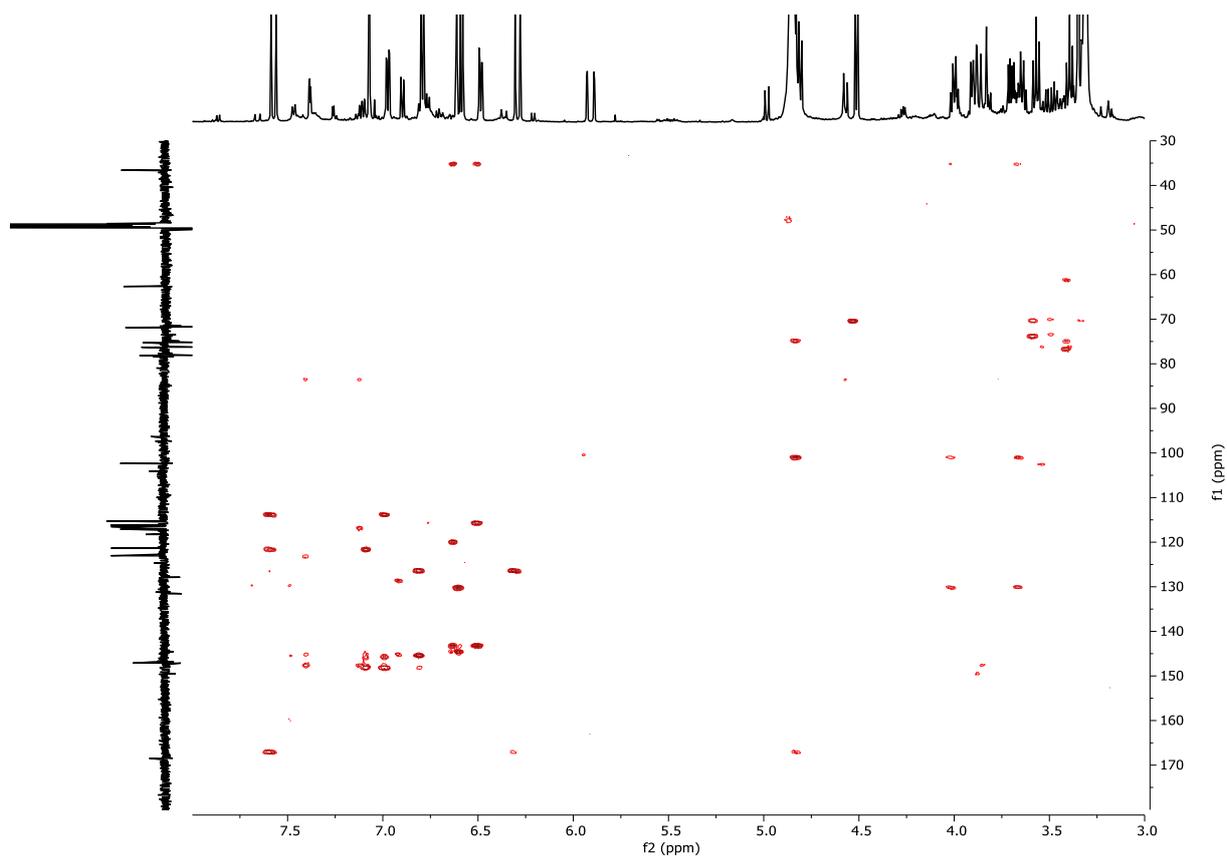


Figure S53. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC du Plantainoside B (**99**) (CD_3OD).

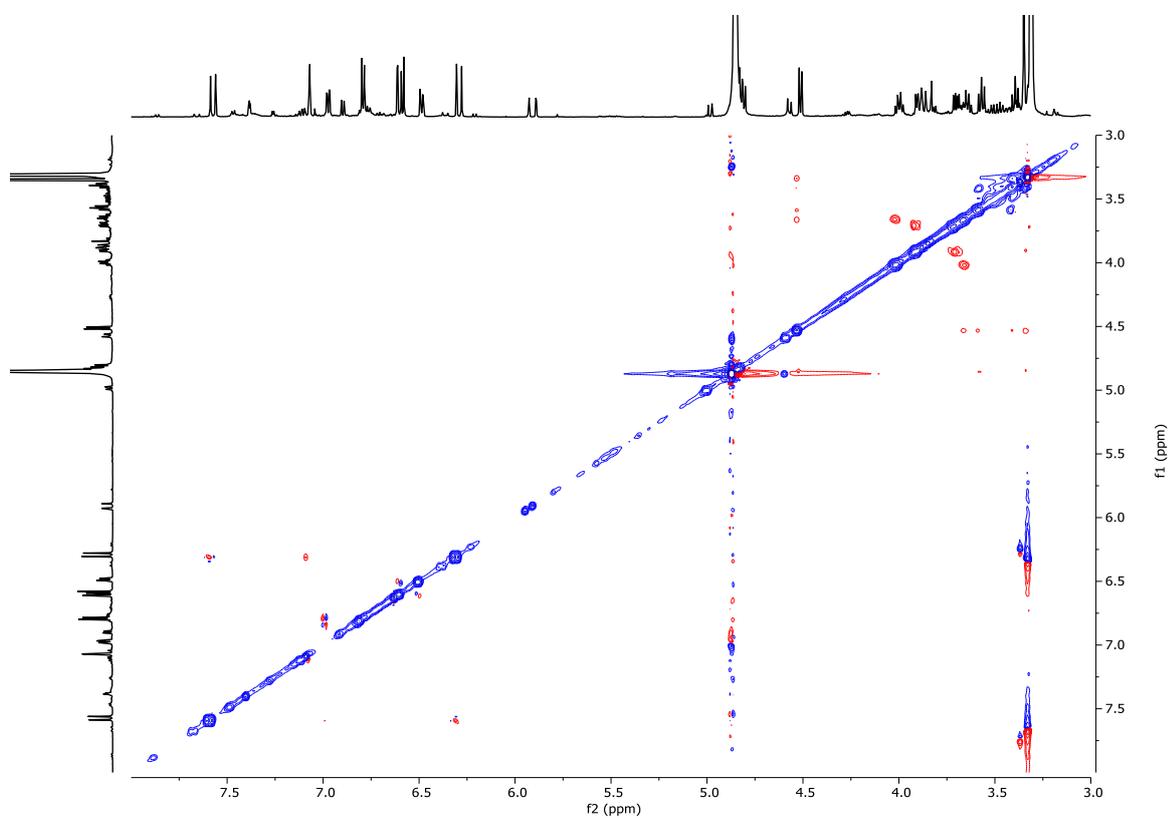


Figure S54. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY du Plantainoside B (**99**) (CD_3OD).

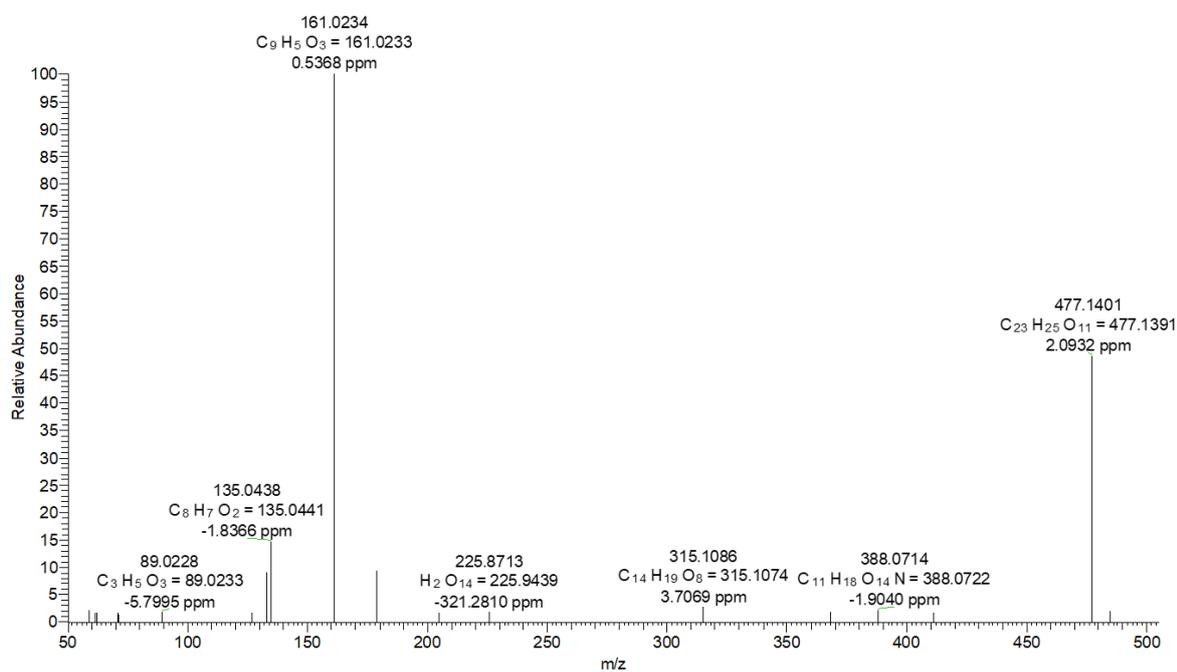


Figure S55. Spectre HRMS-Orbitrap (MH⁺) du Plantainoside B (99).

3. *Chenopodium bonus-henricus*

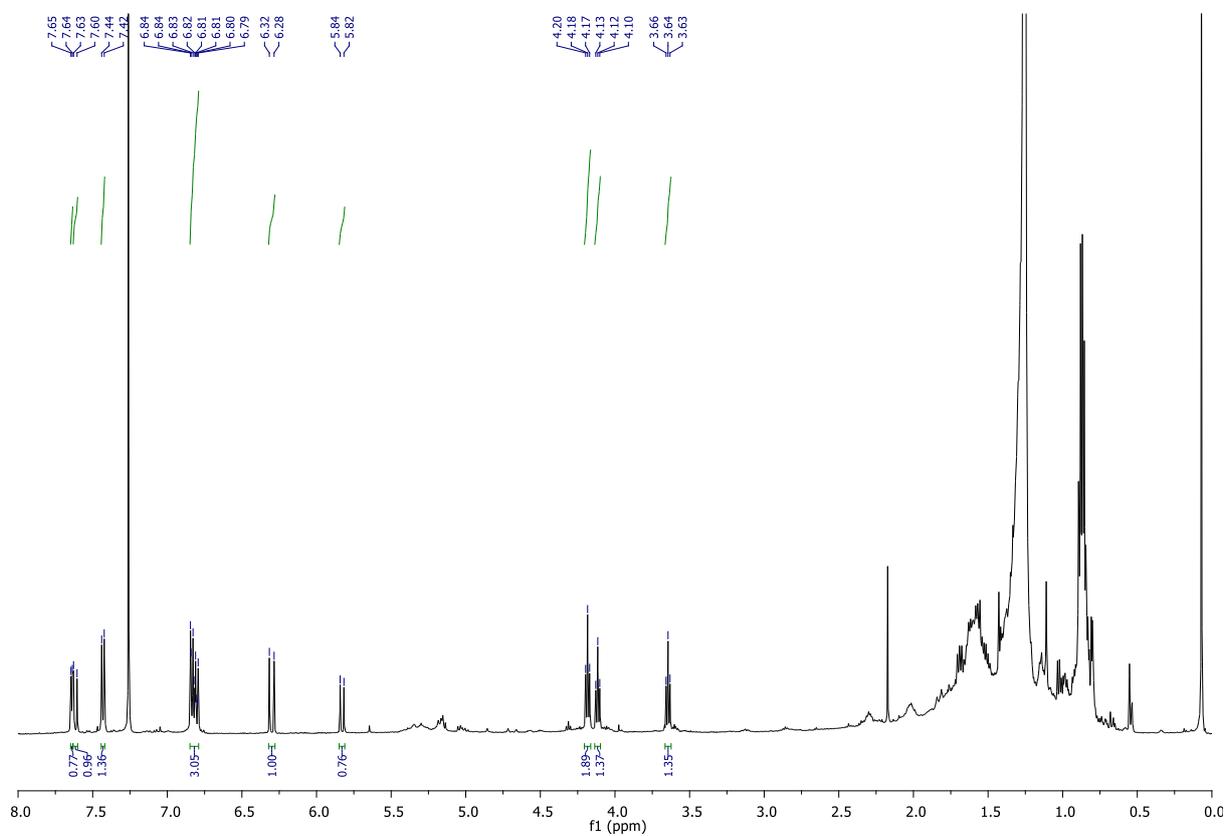


Figure S56. Spectre RMN ^1H de n-Docosanol-*E-p*-coumarate (**100**) (CDCl_3).

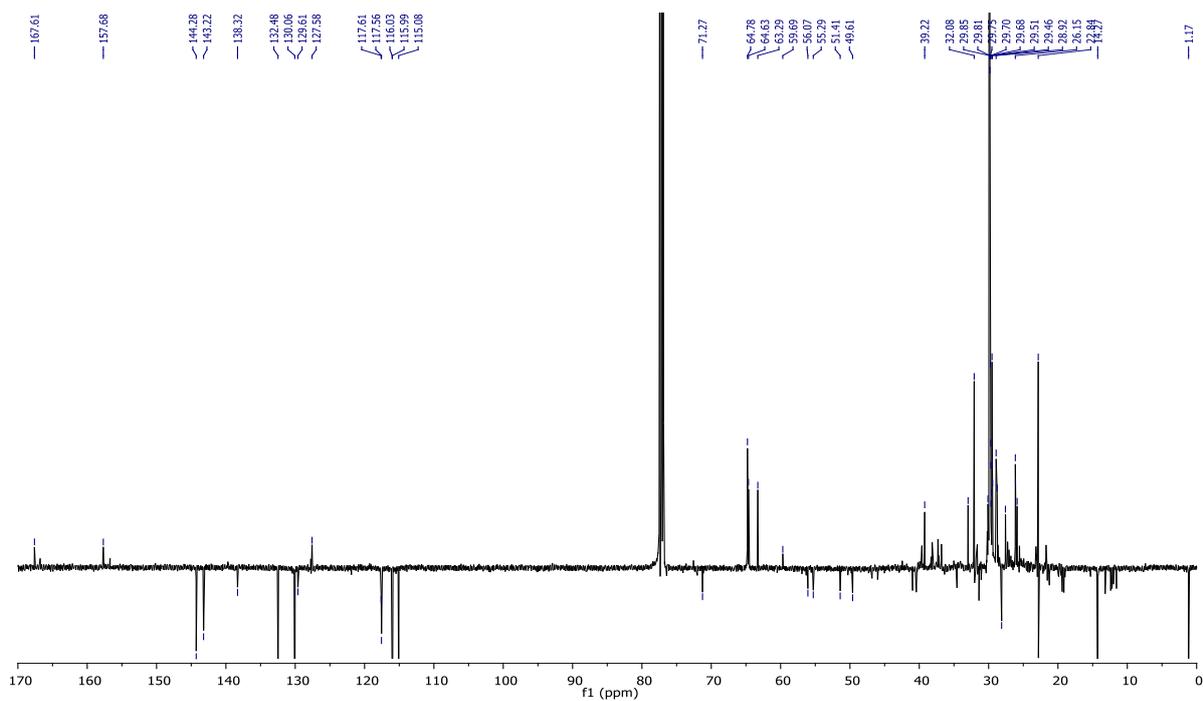


Figure S57. Spectre RMN ^{13}C de n-Docosanol-*E-p*-coumarate (**100**) (CDCl_3).

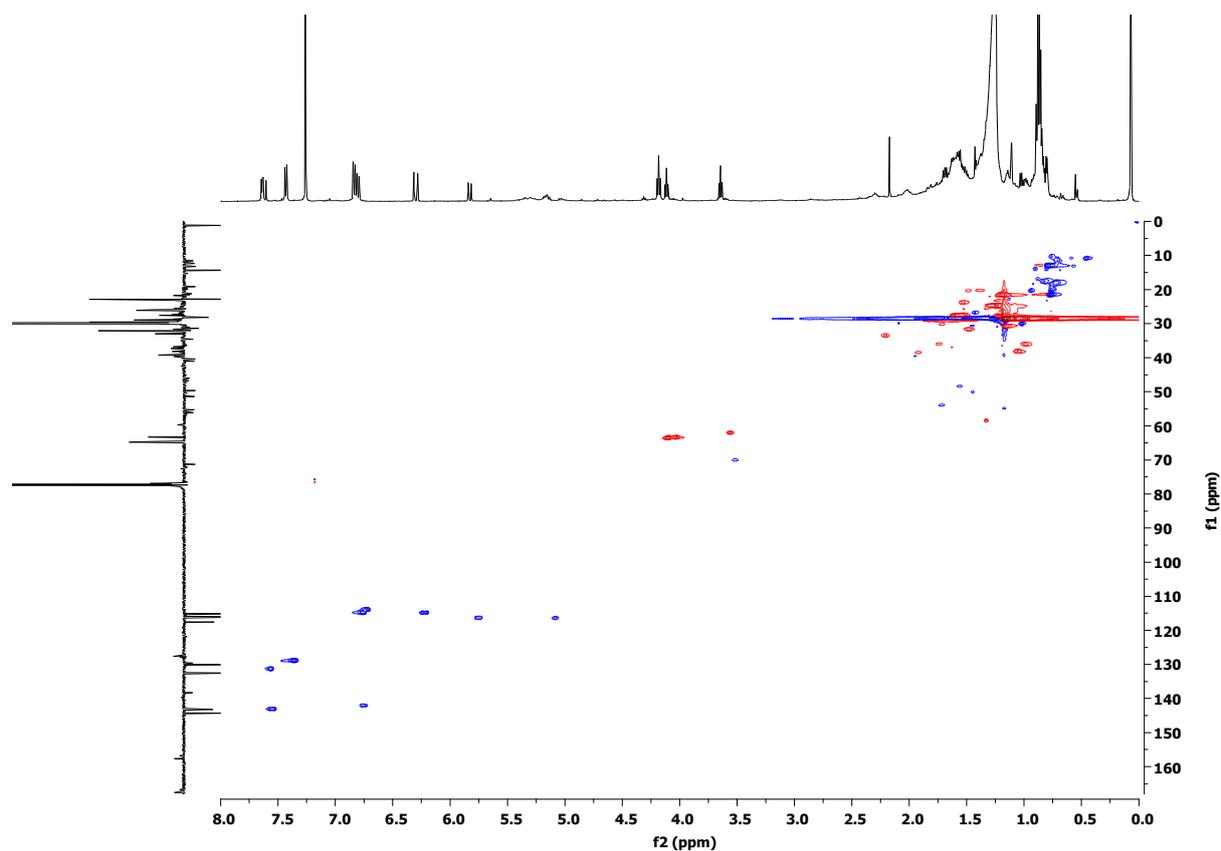


Figure S58. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de n-Docosanol-*E*-*p*-coumarate (**100**) (CDCl_3).

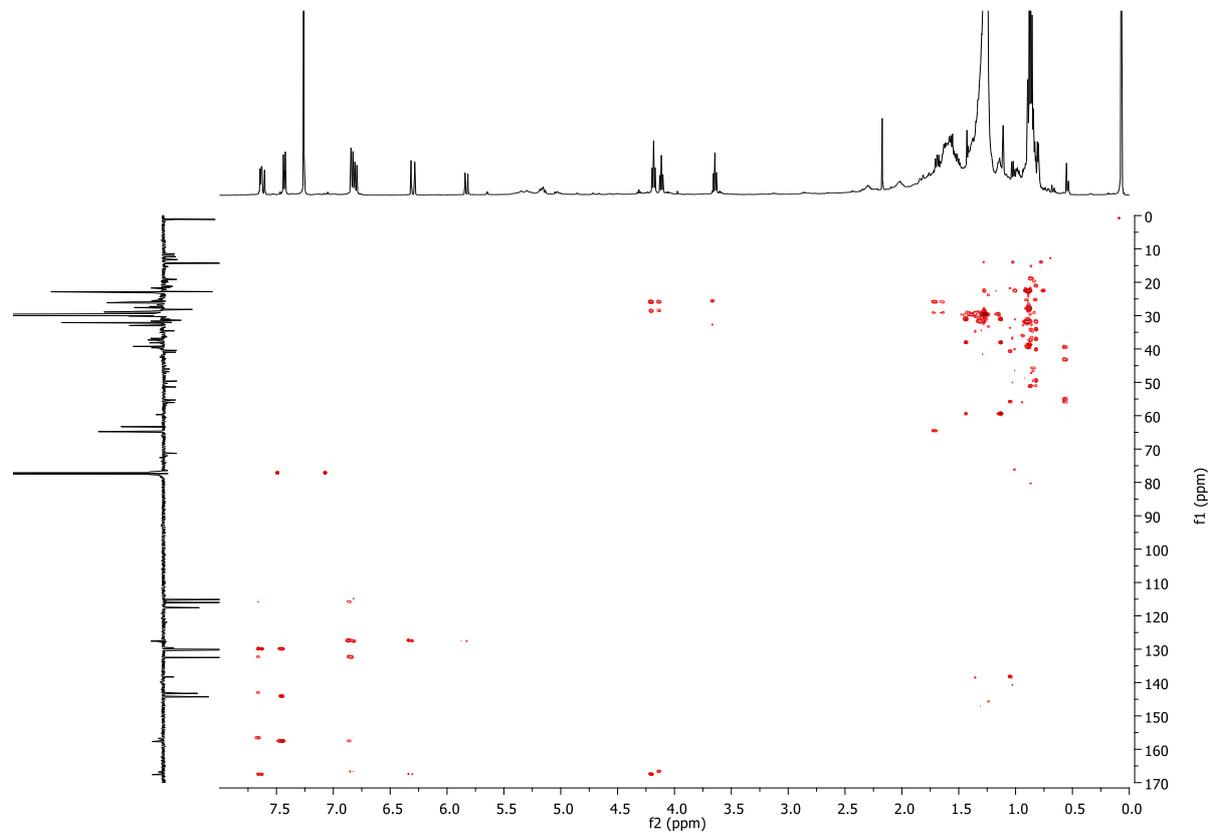


Figure S59. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de n-Docosanol-*E*-*p*-coumarate (**100**) (CDCl_3).

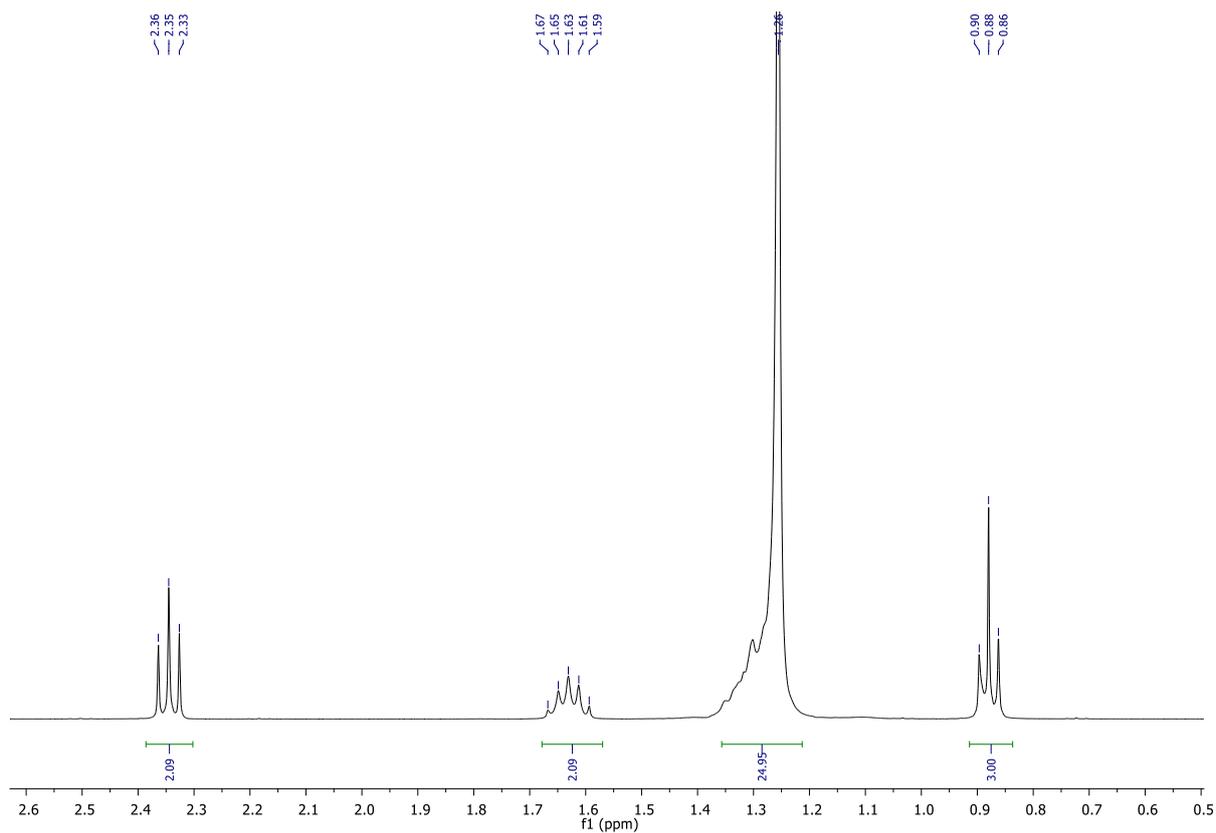


Figure S60. Spectre RMN ^1H de l'acide palmitique (**101**) (CDCl_3).

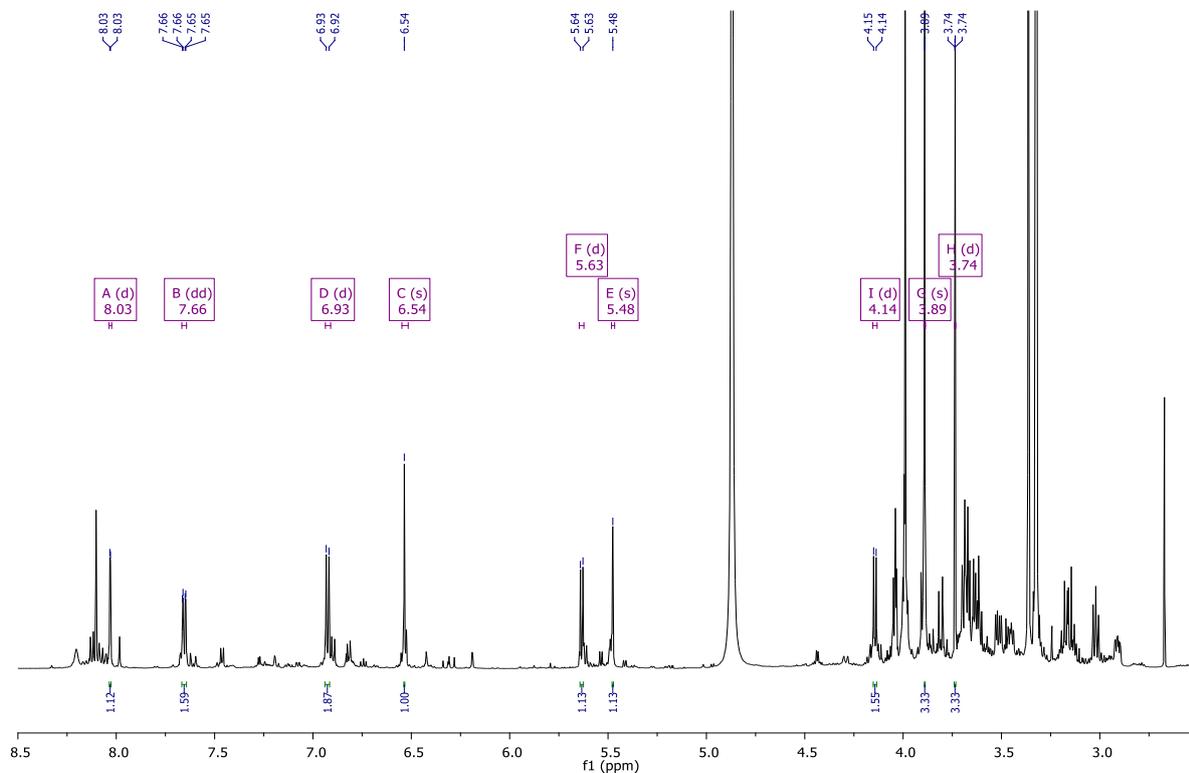


Figure S61. Spectre RMN ^1H de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**) (CD_3OD).

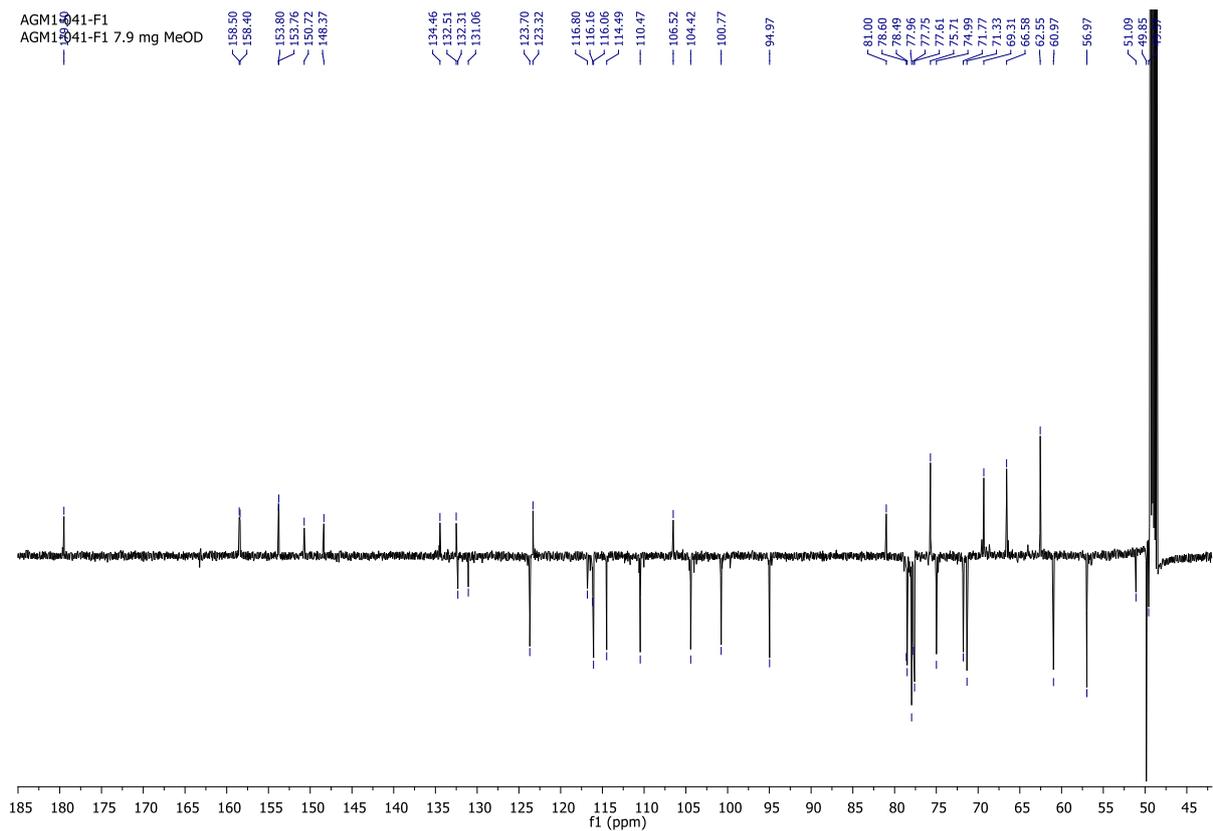


Figure S62. Spectre RMN ^{13}C de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**) (CD_3OD).

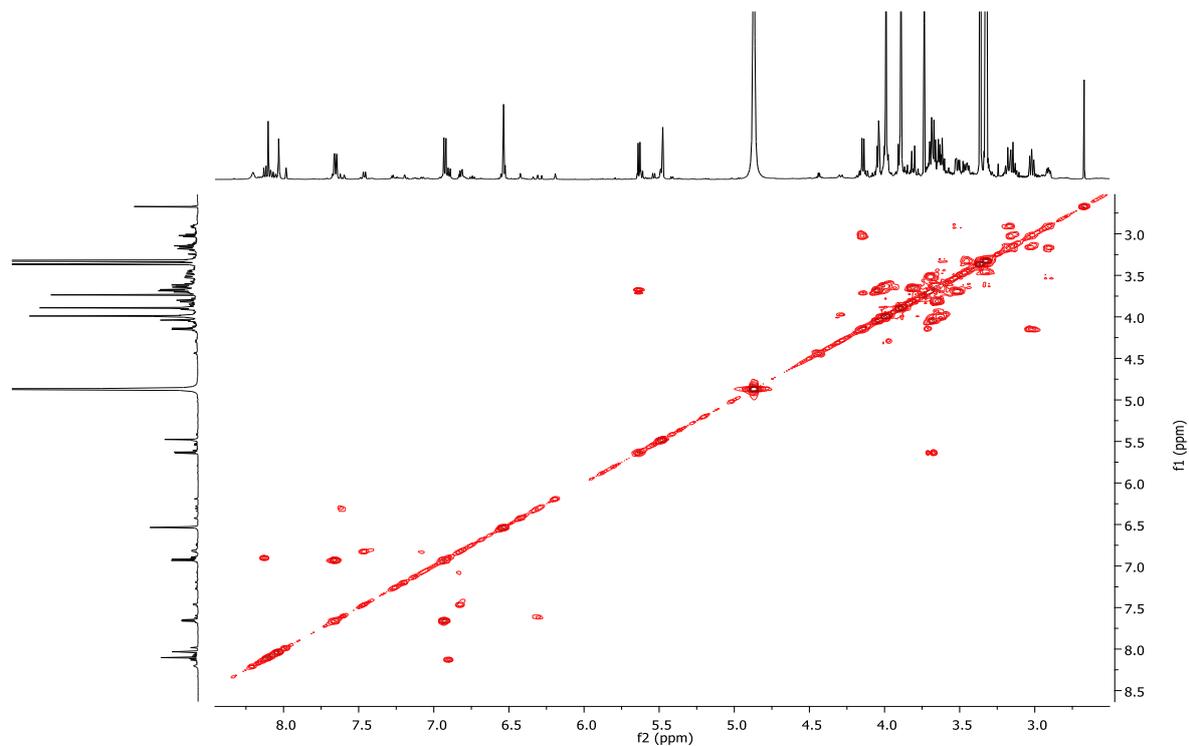


Figure S63. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**) (CD_3OD).

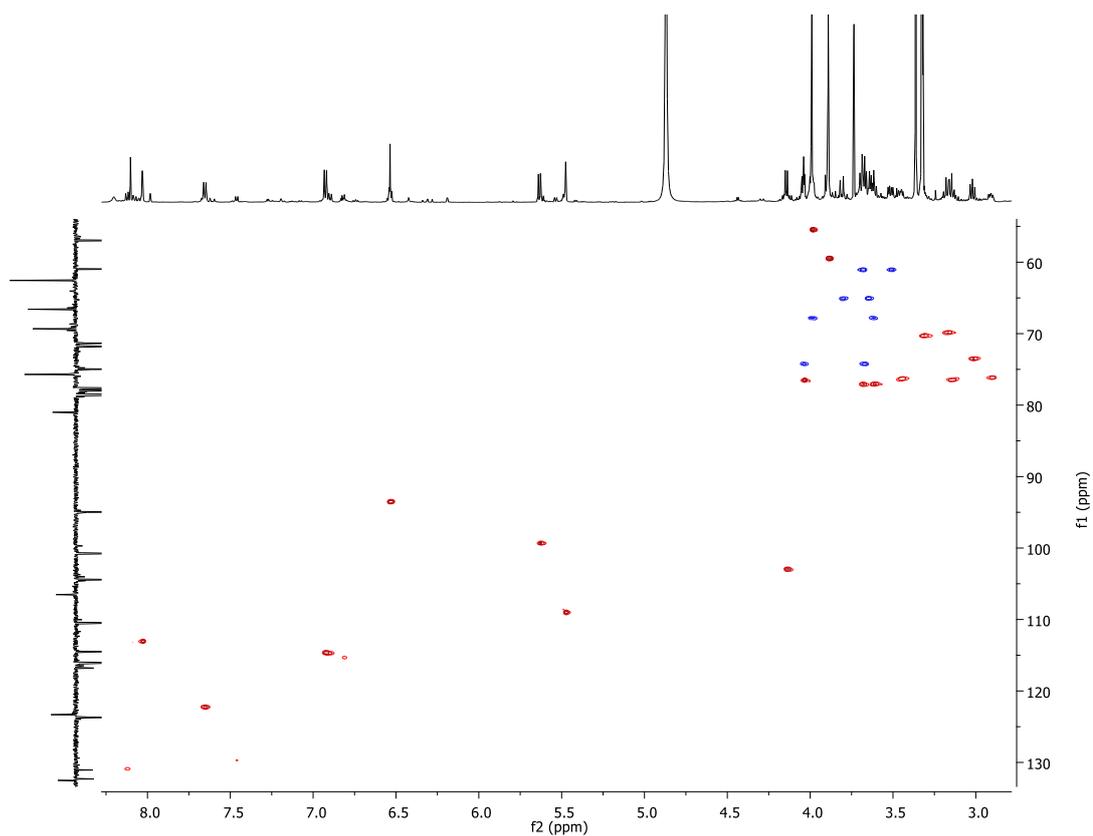


Figure S64. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**) (CD_3OD).

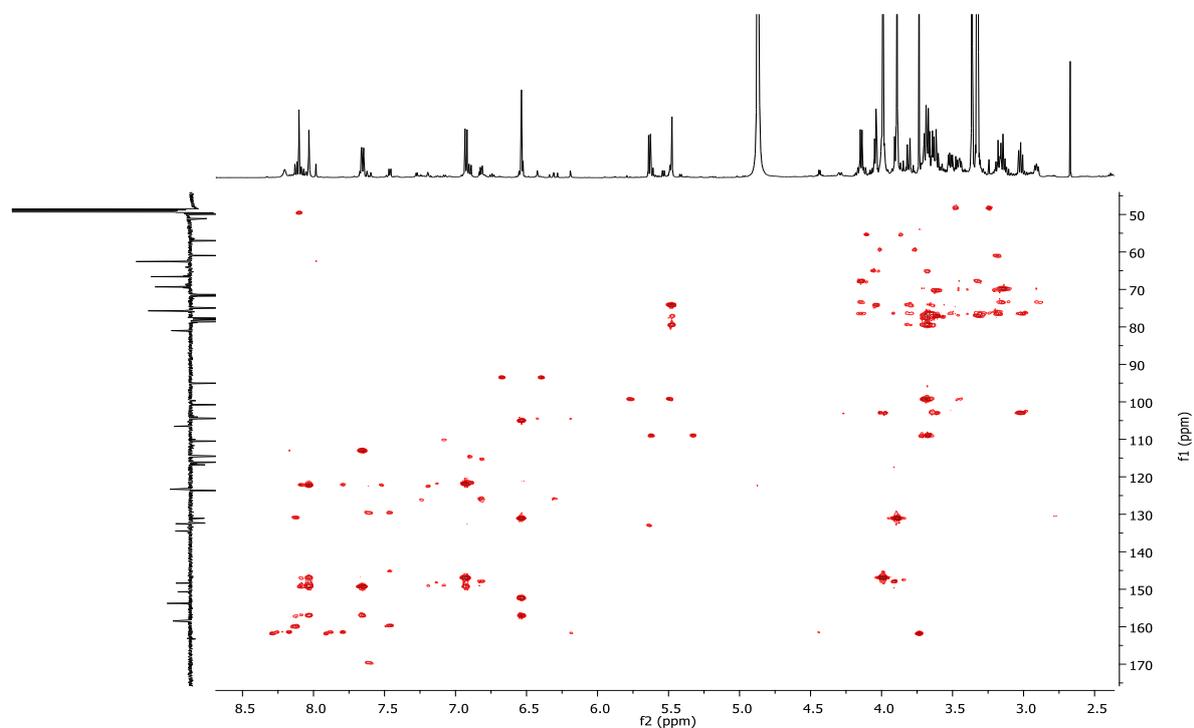


Figure S65. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de Spinacetin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**) (CD_3OD).

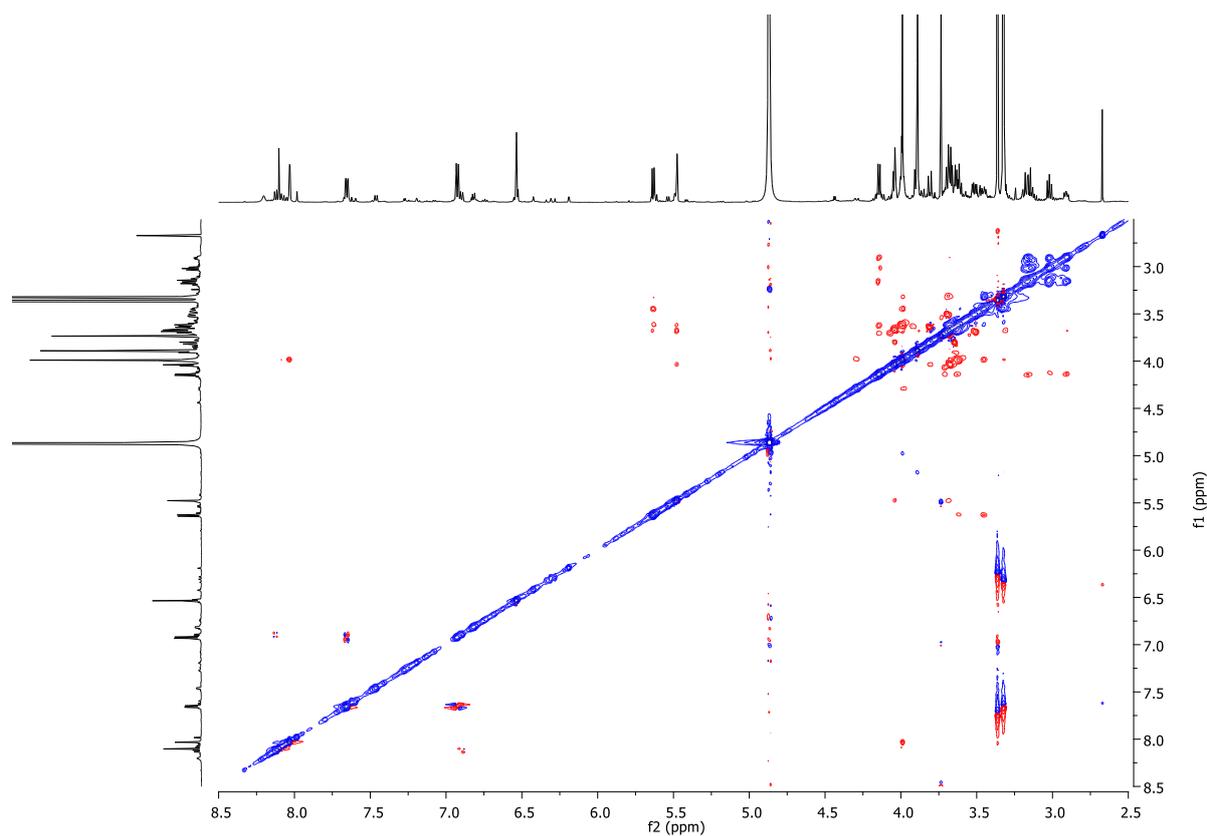


Figure S66. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de Spinacétin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**) (CD_3OD).

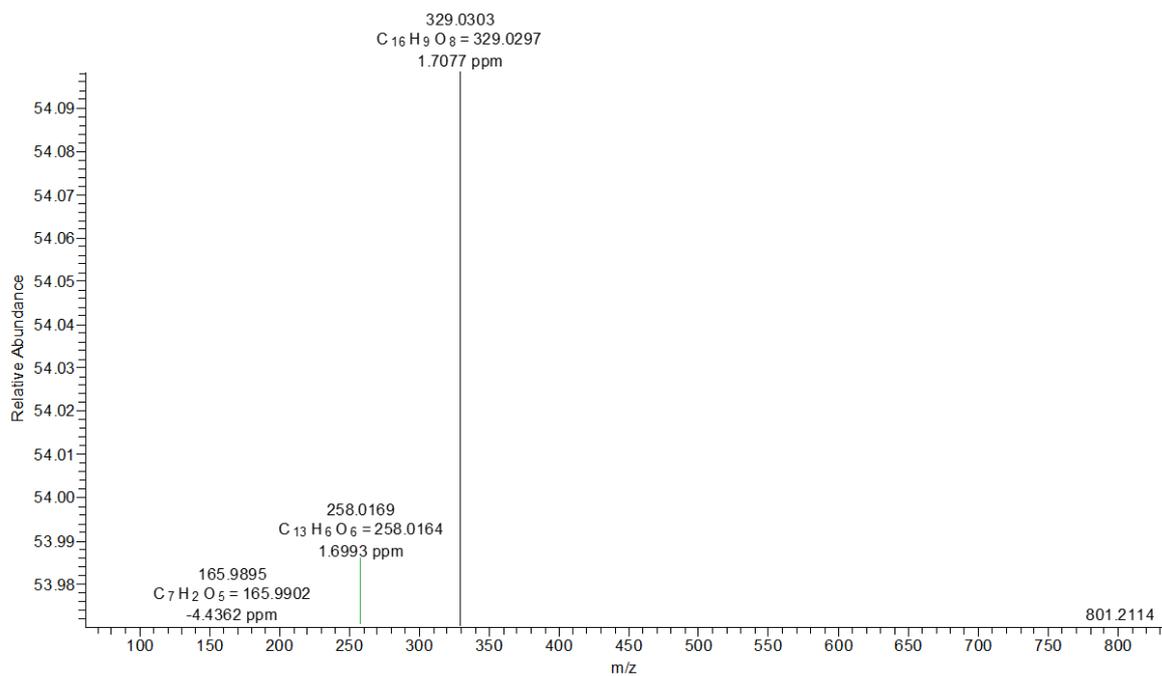


Figure S67. Spectre HRMS-Orbitrap de Spinacétin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 6)-[β -D-apiofuranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (**102**).

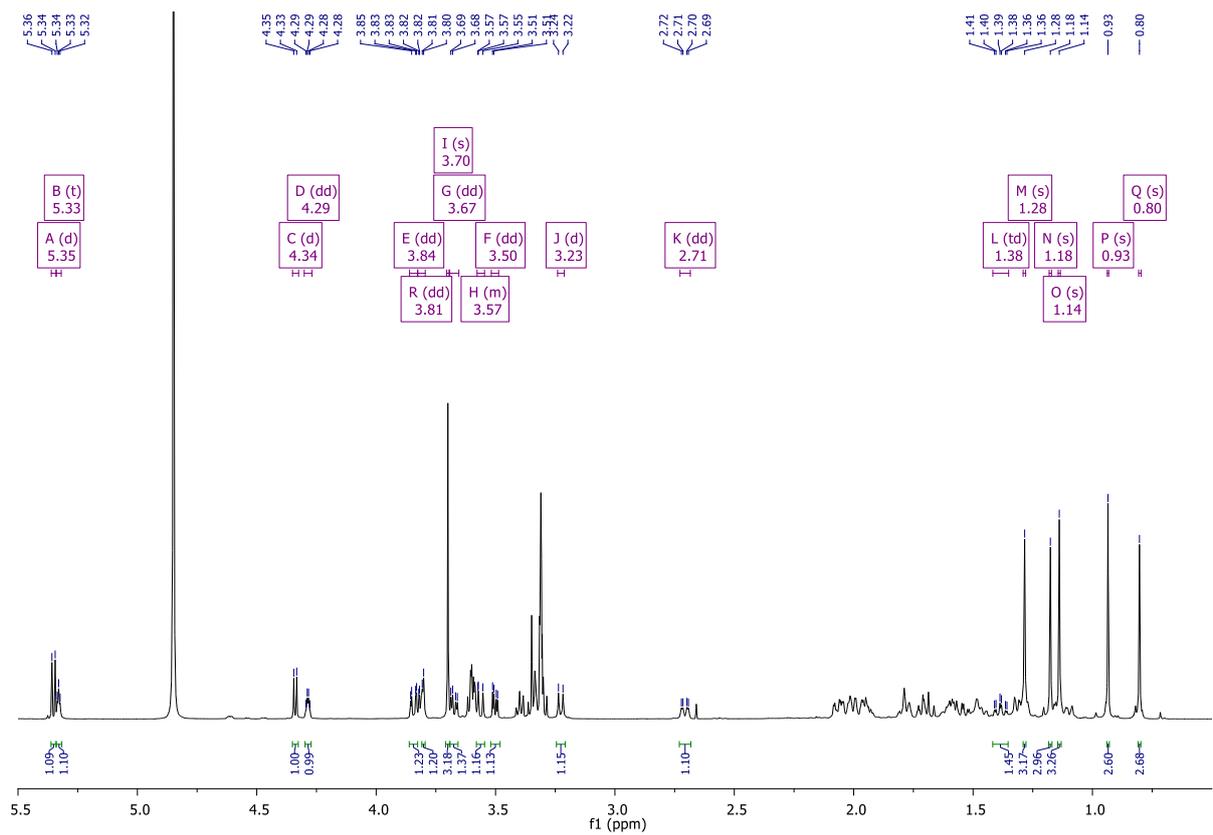


Figure S68. Spectre RMN ^1H de Bonushenricoside A (103) (CD_3OD).

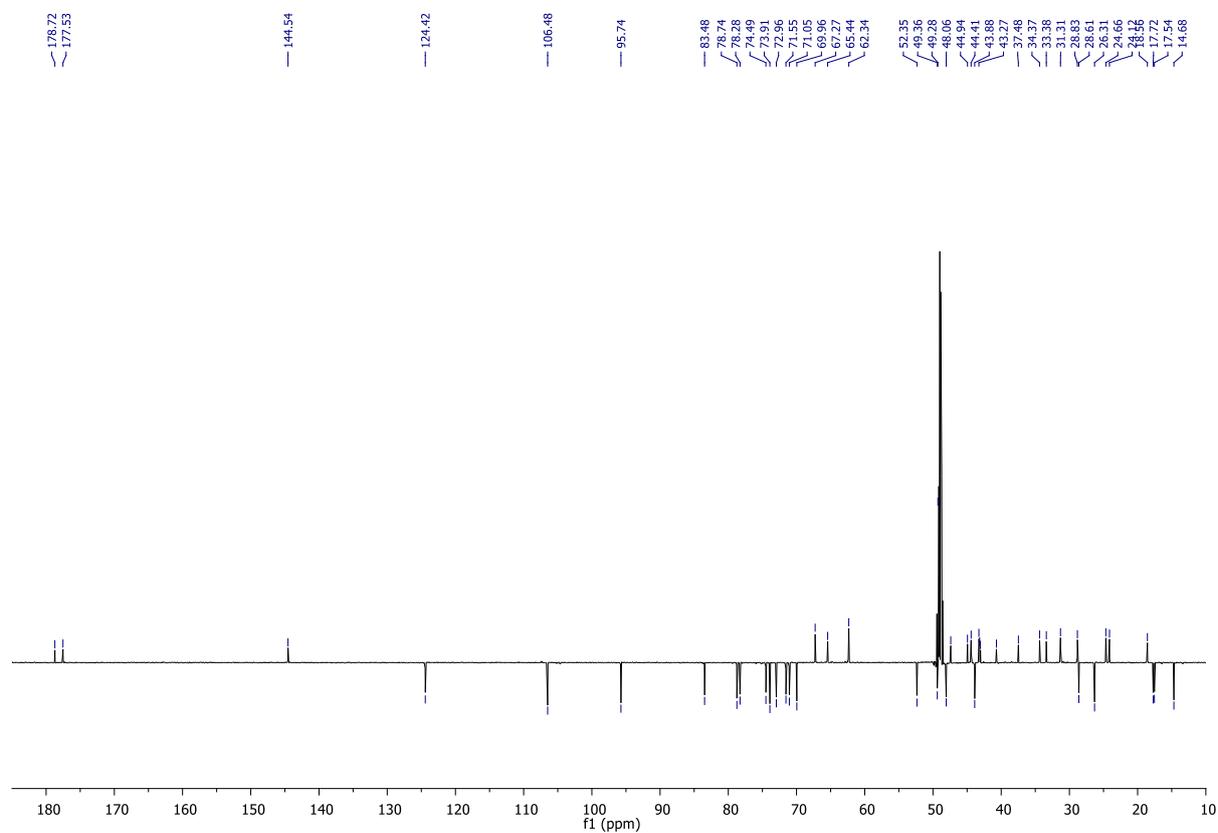


Figure S69. Spectre RMN ^{13}C de Bonushenricoside A (103) (CD_3OD).

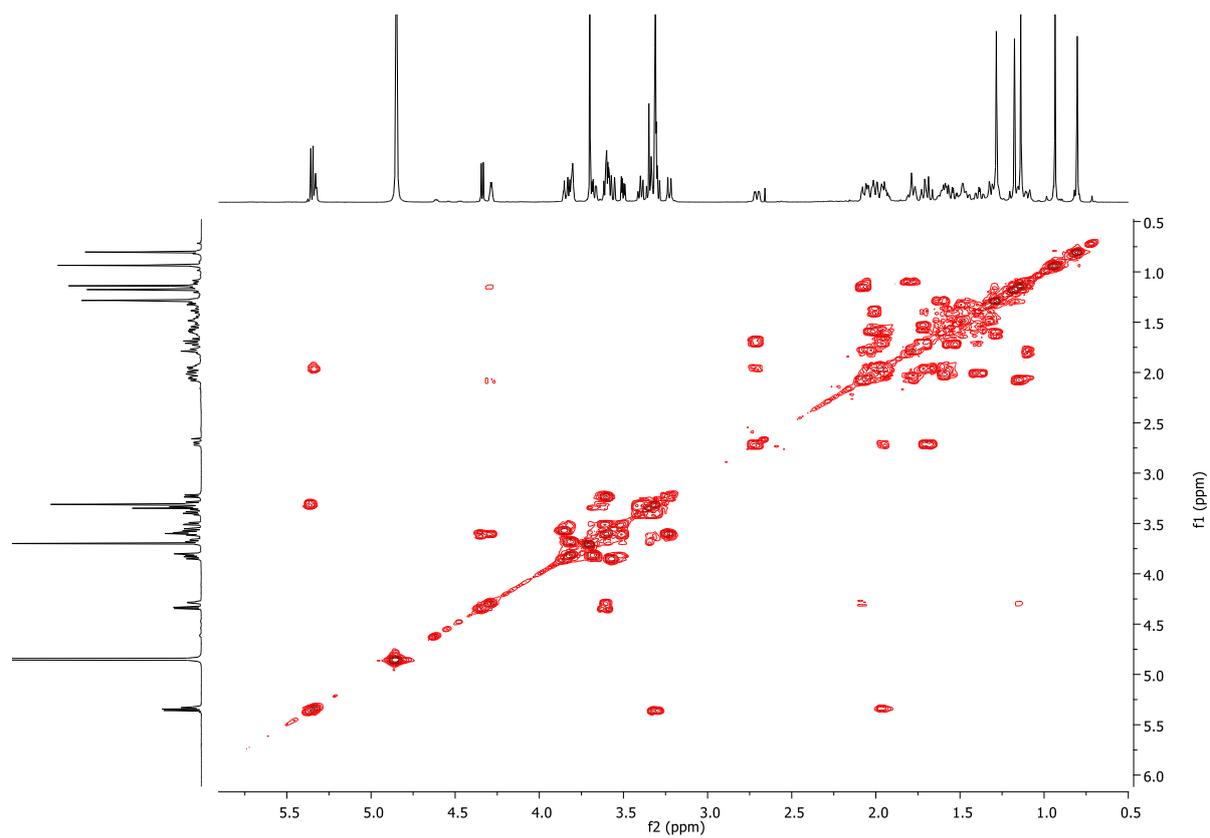


Figure S70. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de Bonushenricoside A (**103**) (CD_3OD).

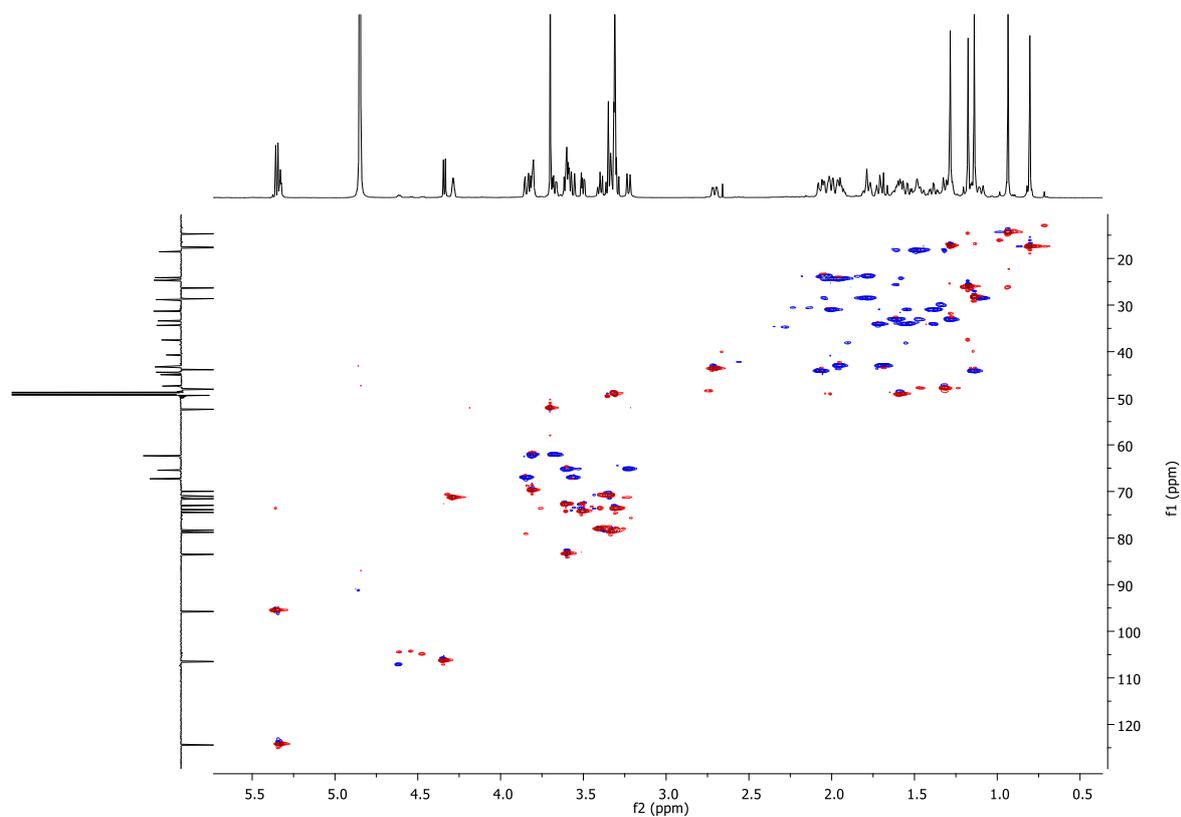


Figure S71. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de Bonushenricoside A (**103**) (CD_3OD).

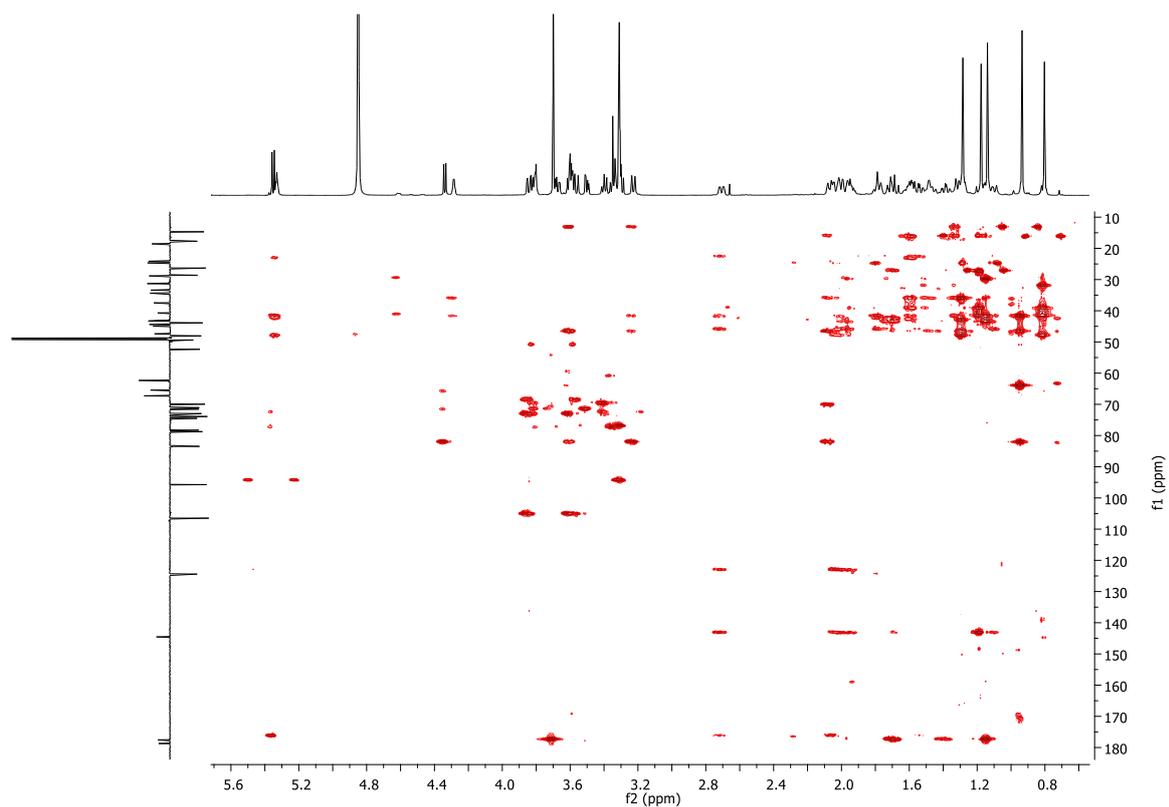


Figure S72. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de Bonushenricoside A (**103**) (CD_3OD).

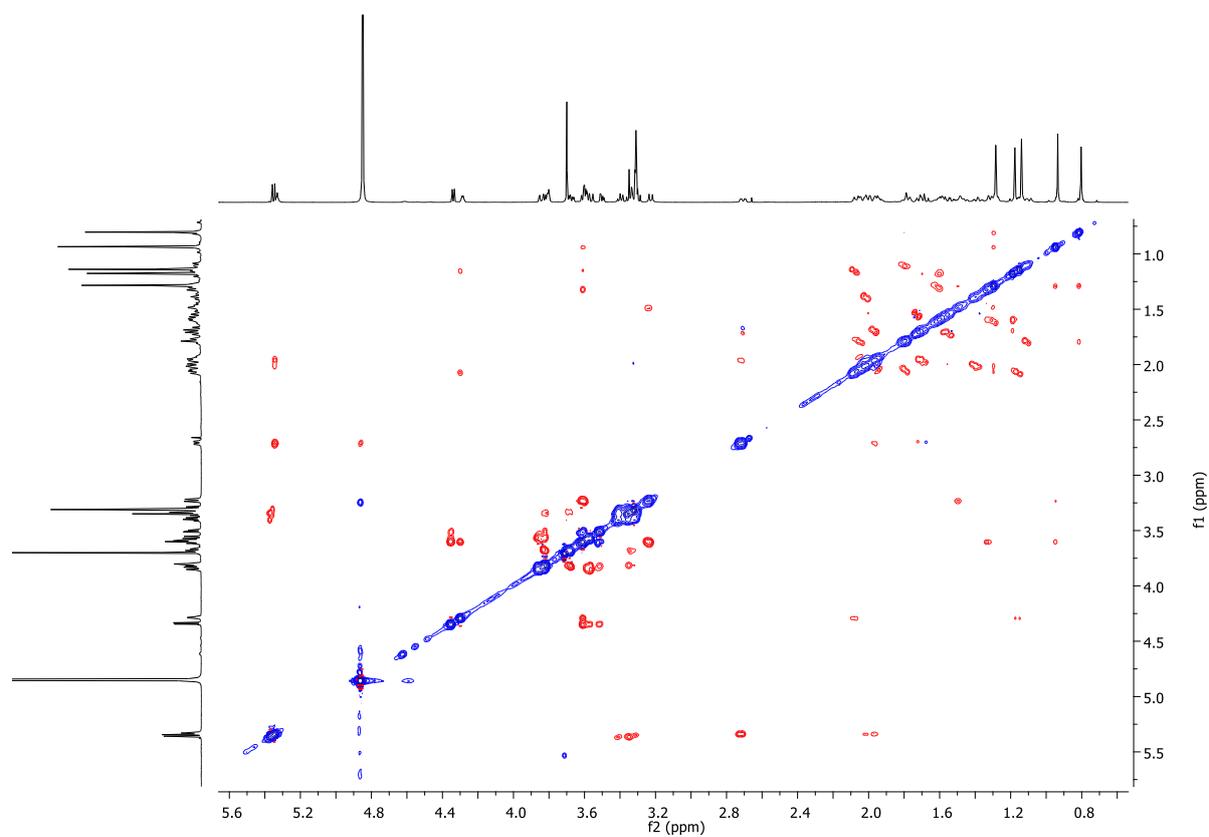


Figure S73. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de Bonushenricoside A (**103**) (CD_3OD).

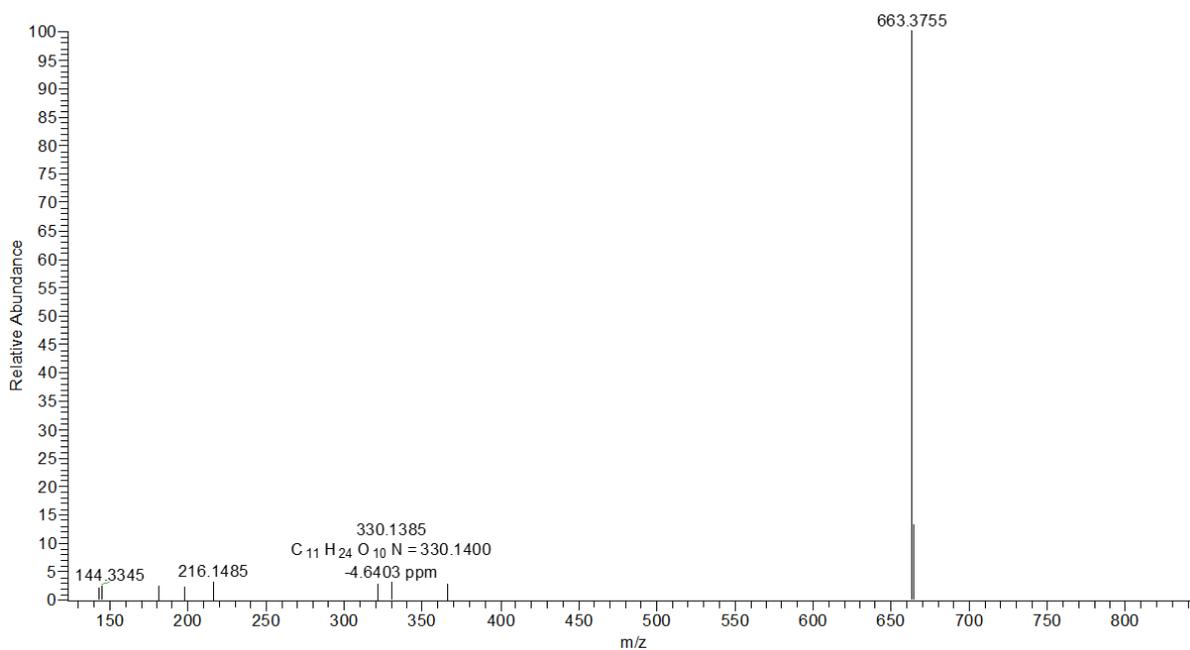


Figure S74. Spectre HRMS-Orbitrap de Bonushenricoside A (103).

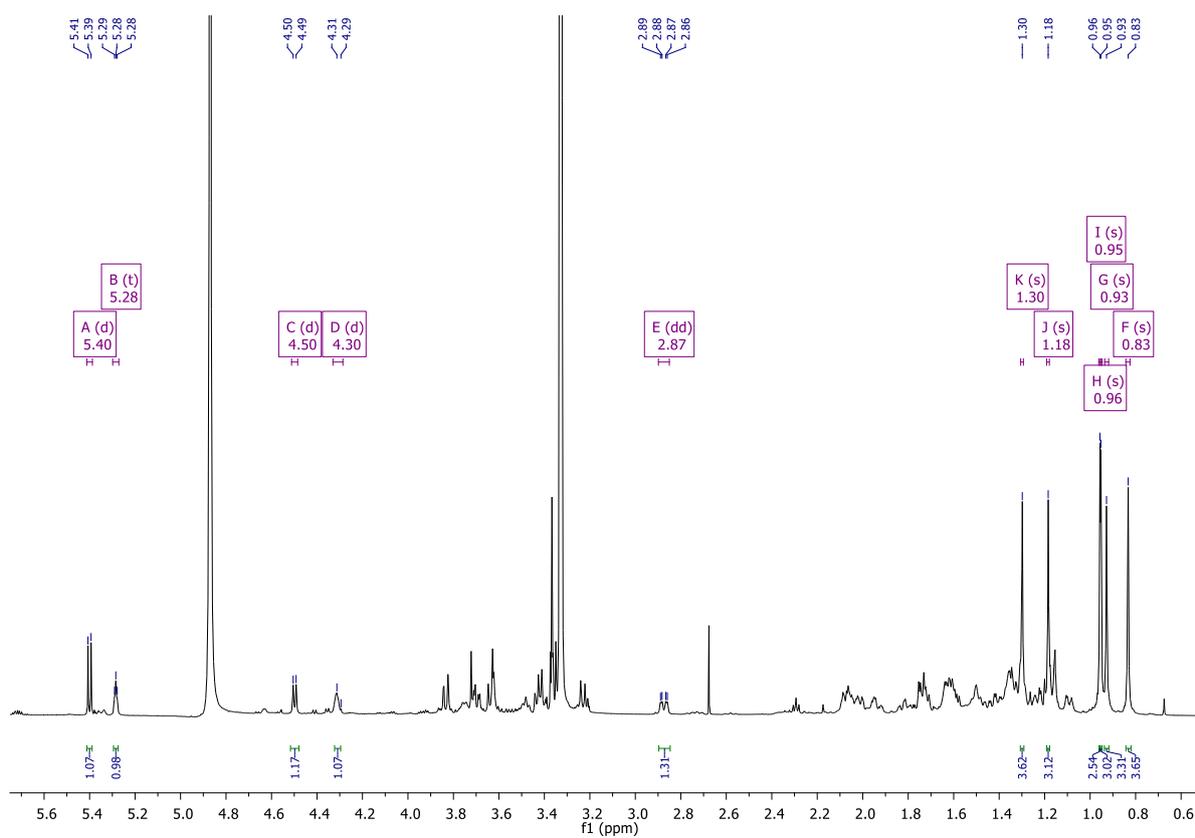


Figure S75. Spectre RMN ¹H de Zygophyloside I (104) (CD₃OD).

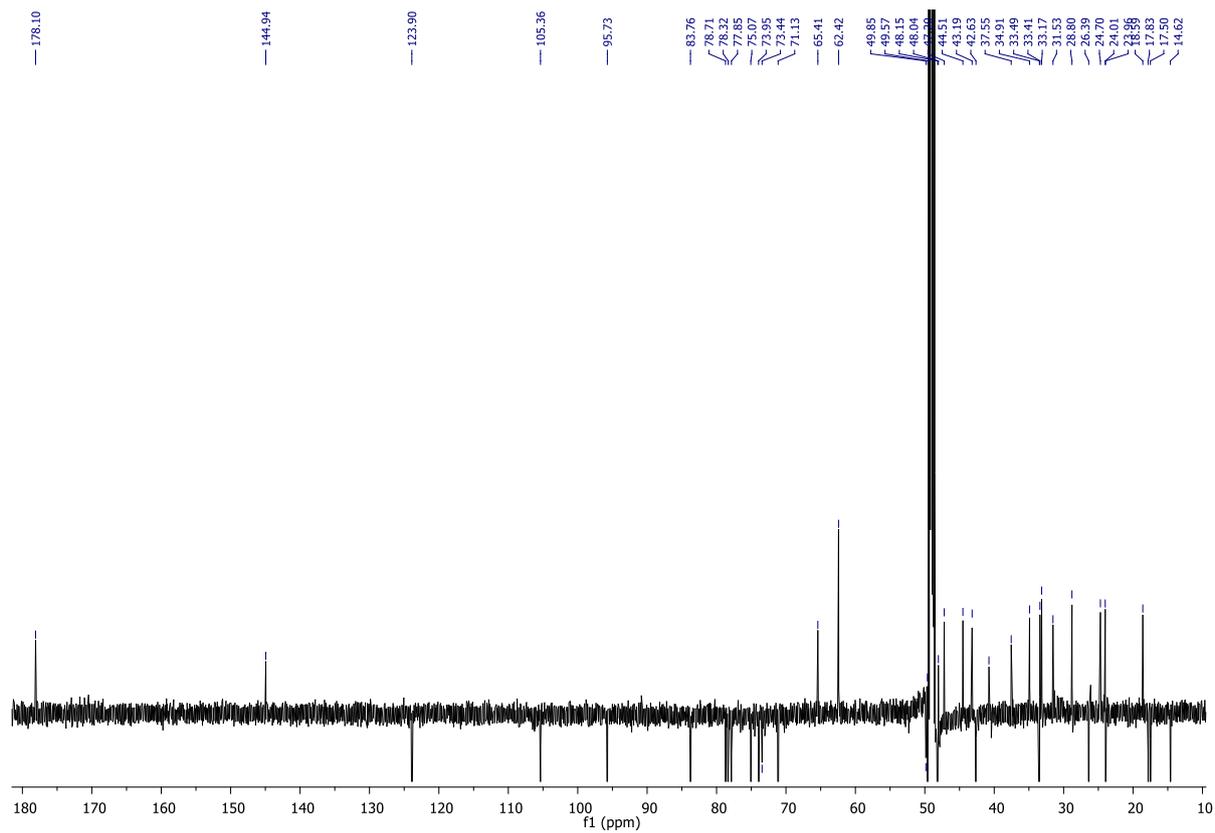


Figure S76. Spectre RMN ^{13}C de Zygophyloside I (**104**) (CD_3OD).

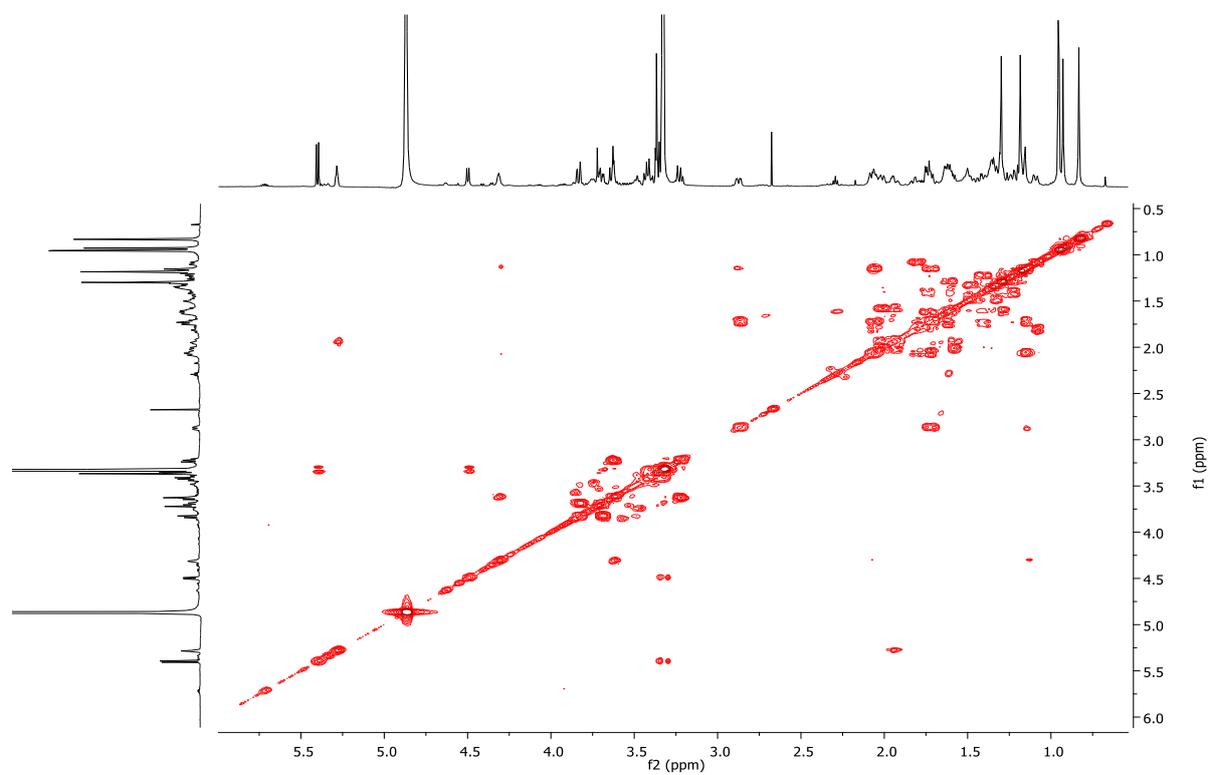


Figure S77. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de Zygophyloside I (**104**) (CD_3OD).

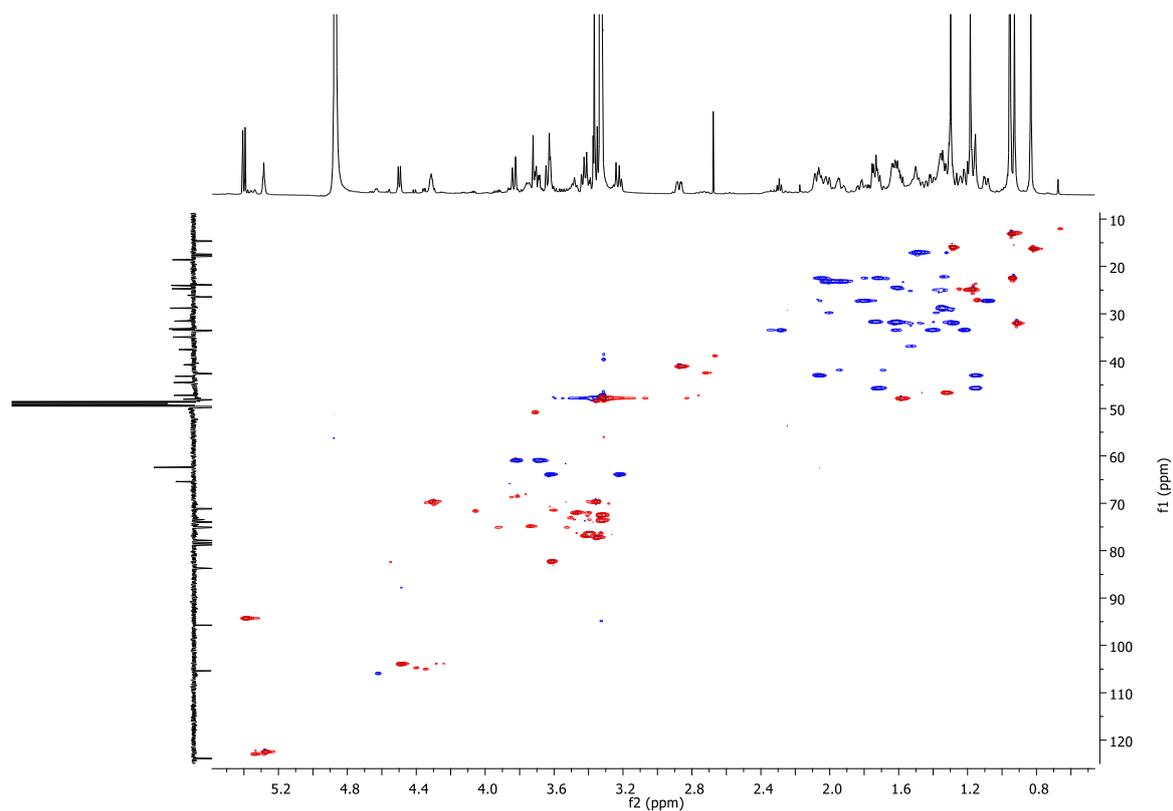


Figure S78. Spectre RMN ¹H-¹³C HSQC de Zygophyloside I (**104**) (CD₃OD).

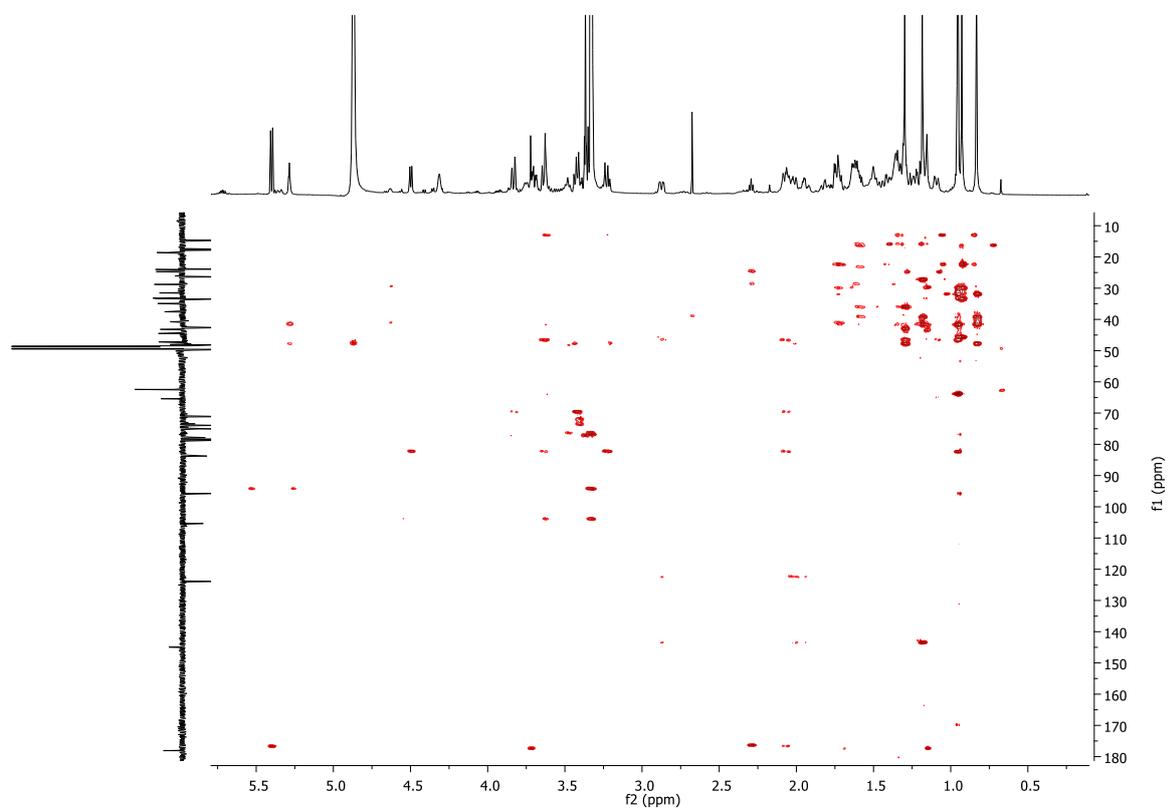


Figure S79. Spectre RMN ¹H-¹³C HMBC de Zygophyloside I (**104**) (CD₃OD).

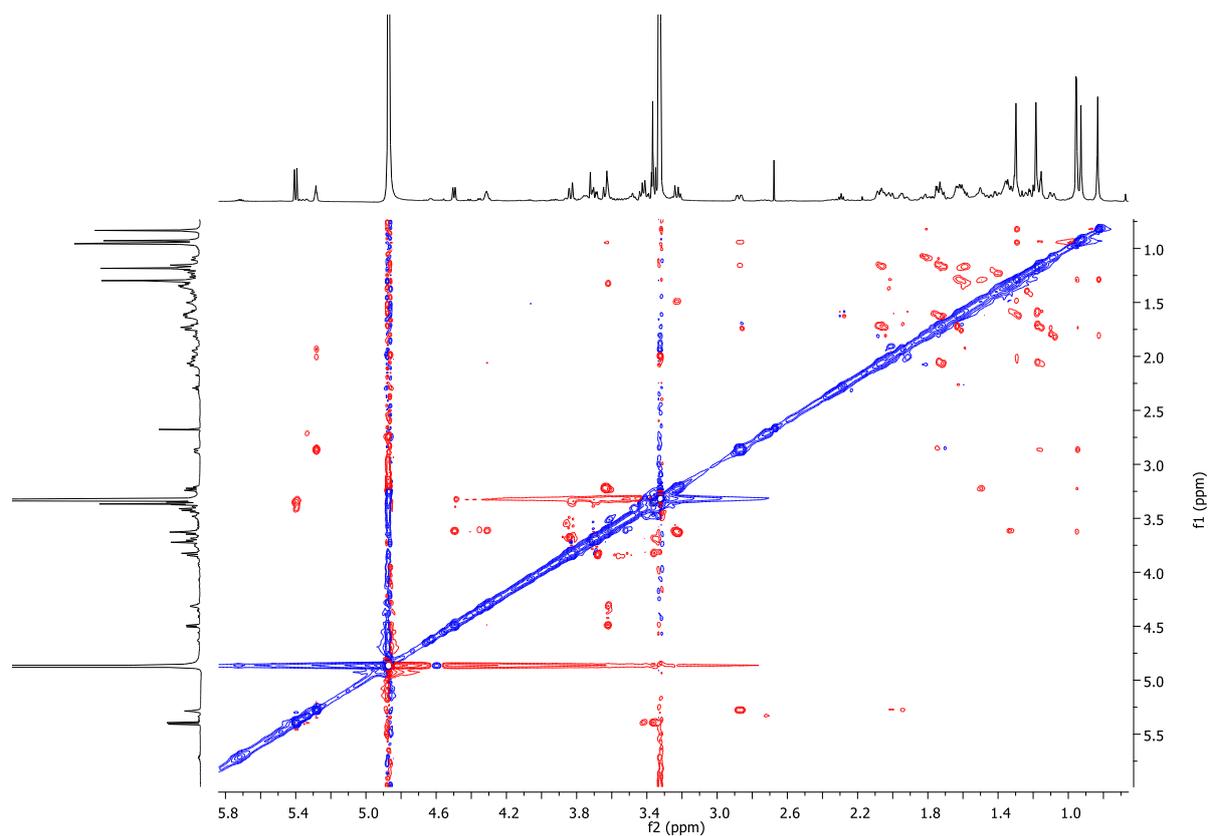


Figure S80. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de Zygophyloside I (**104**) (CD_3OD).

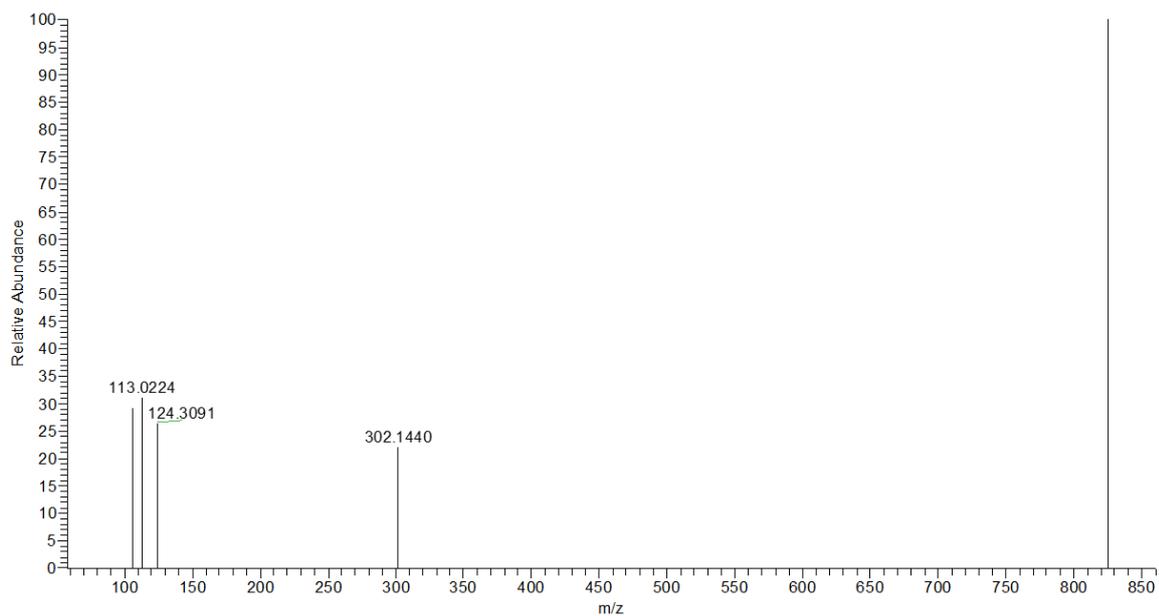


Figure S81. Spectre HRMS-Orbitrap de Zygophyloside I (**104**).

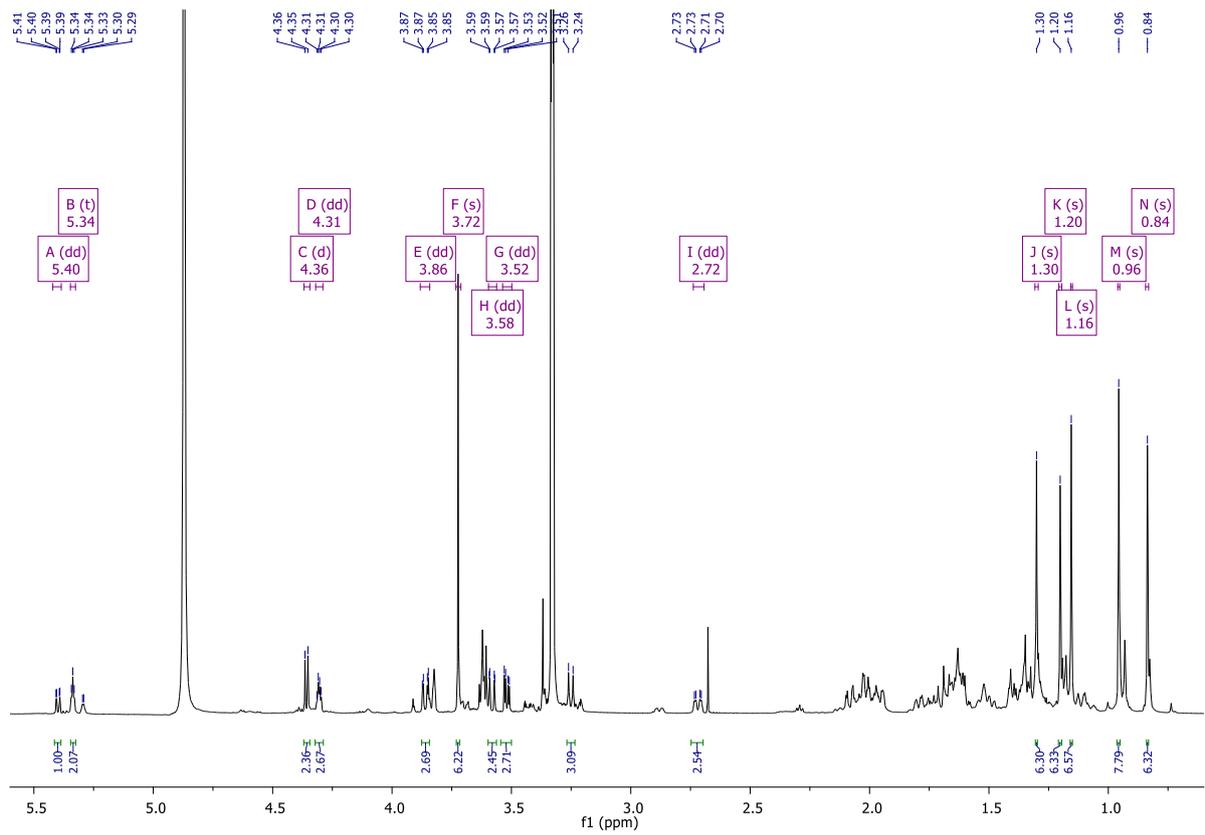


Figure S82. Spectre RMN ^1H de l'acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique (**105**) (CD_3OD).

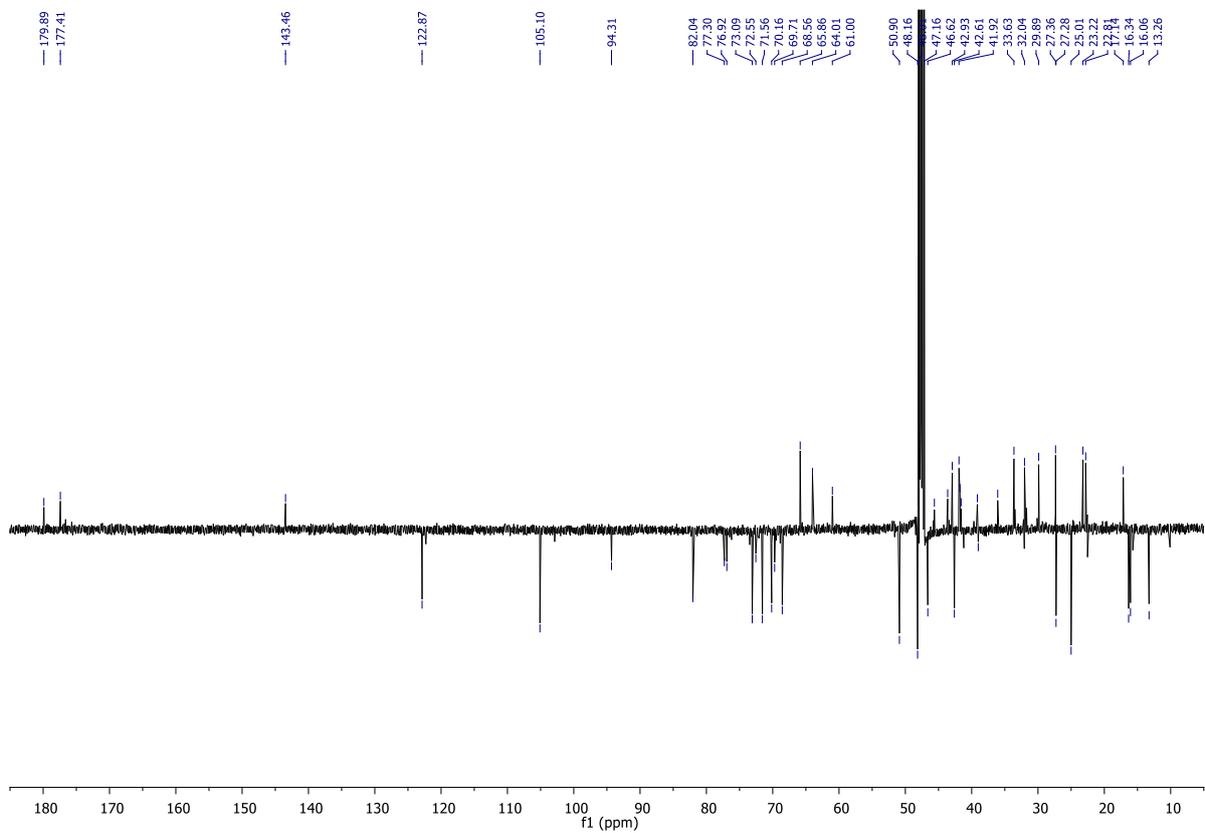


Figure S83. Spectre RMN ^{13}C de l'acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique (**105**) (CD_3OD).

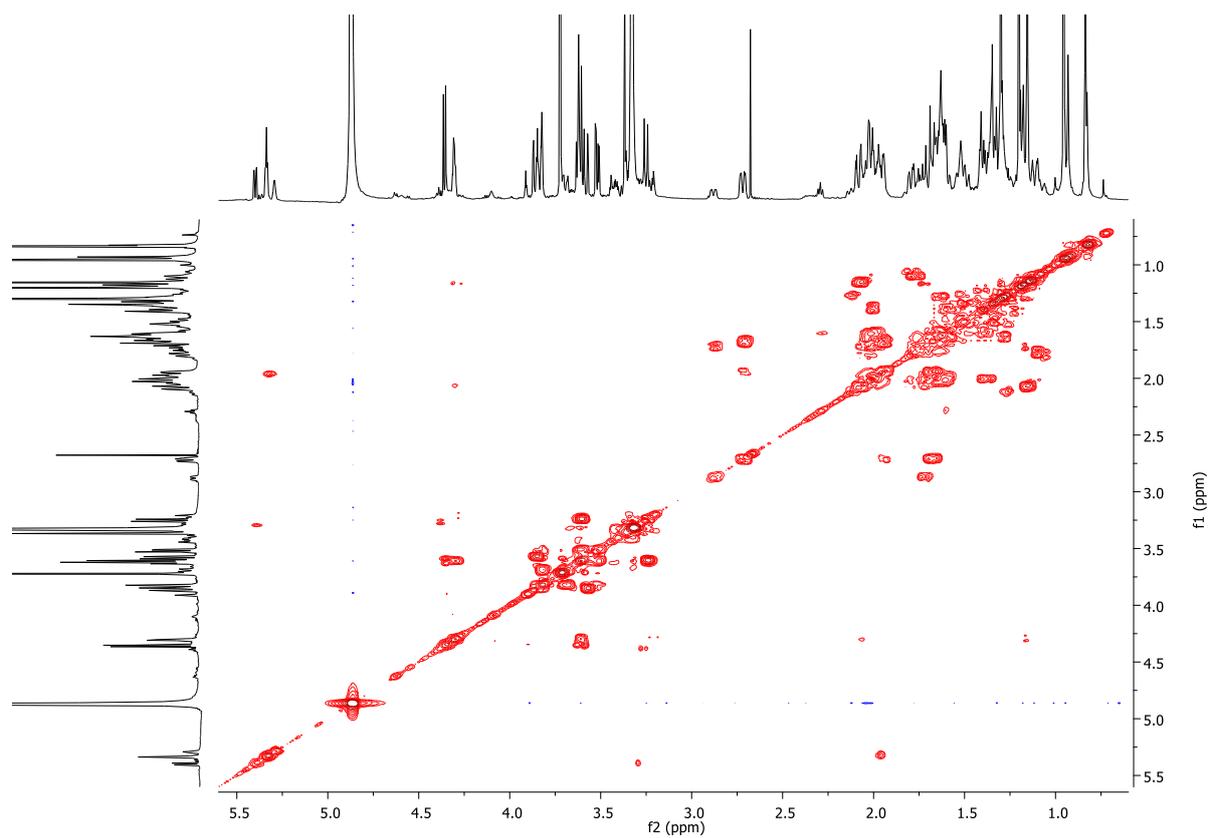


Figure S84. Spectre RMN ^1H - ^1H COSY de l'acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique (**105**) (CD_3OD).

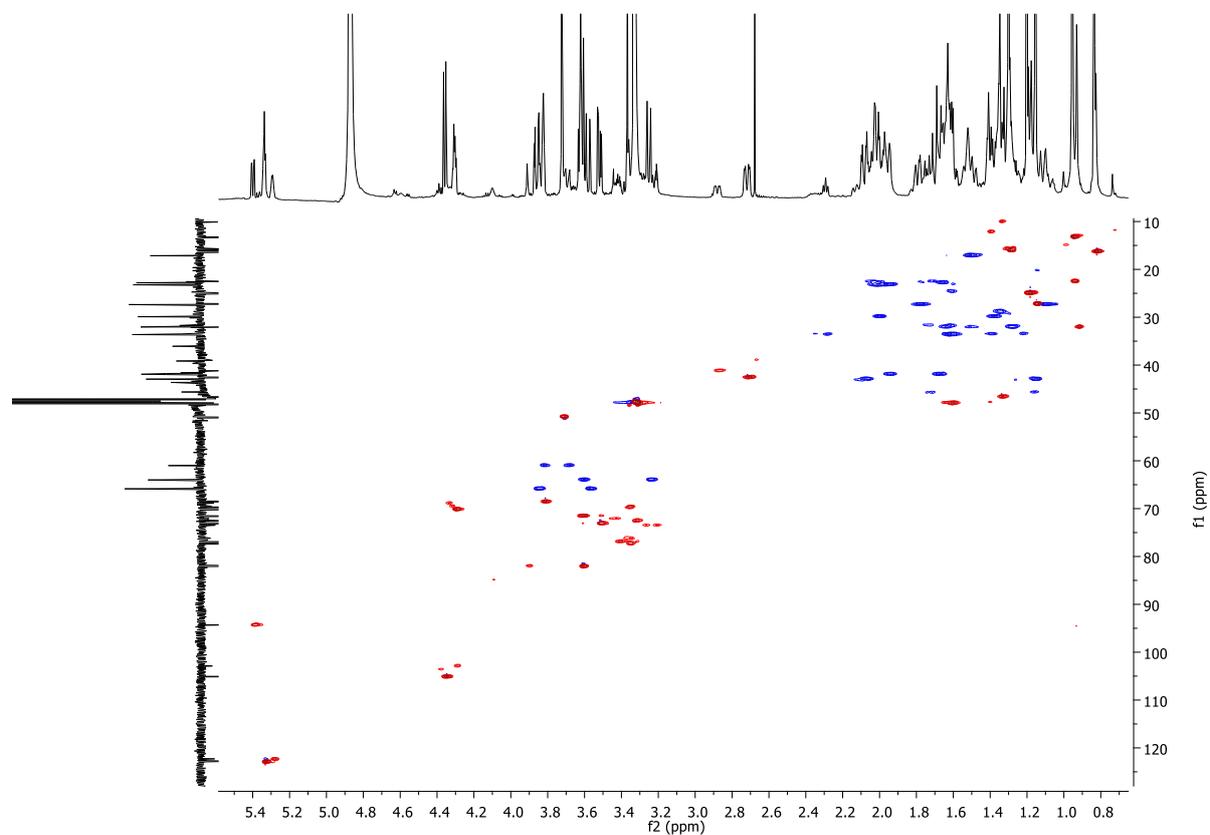


Figure S85. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HSQC de l'acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique (**105**) (CD_3OD).

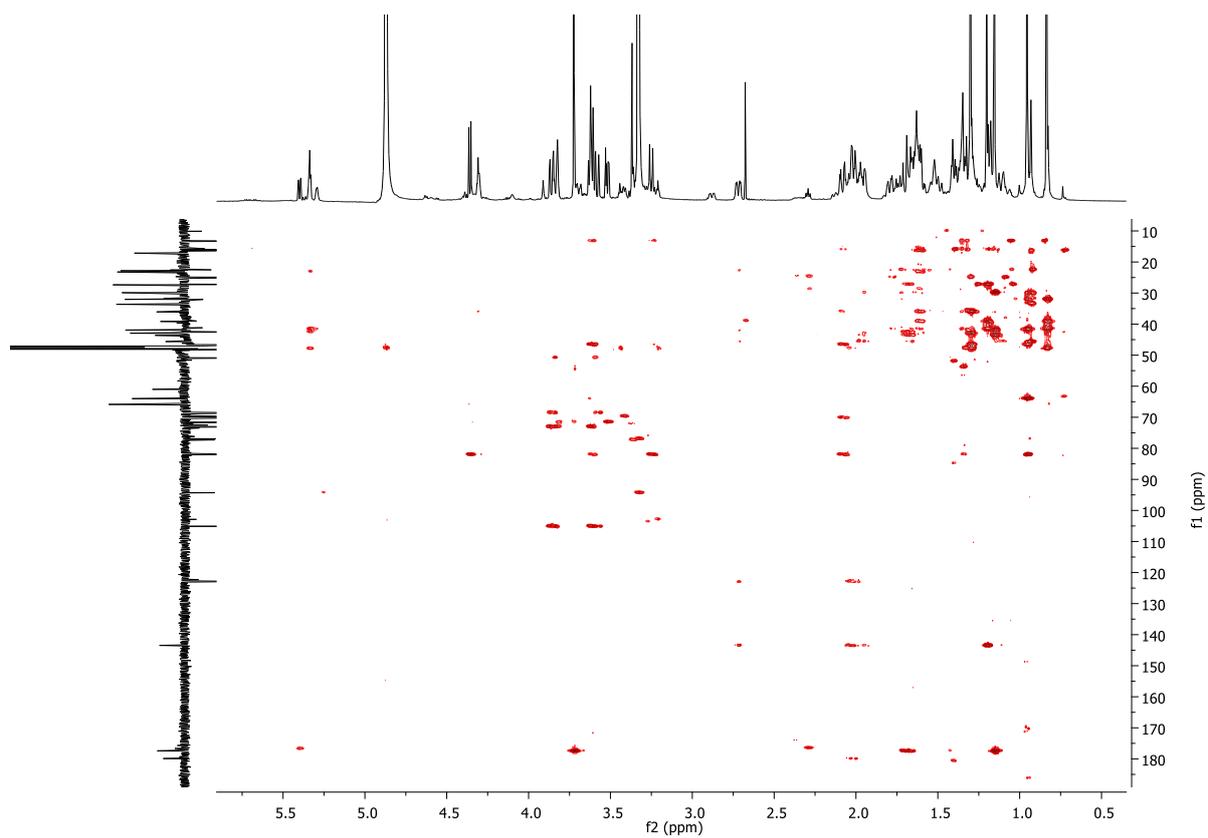


Figure S86. Spectre RMN ^1H - ^{13}C HMBC de l'acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique (**105**) (CD_3OD).

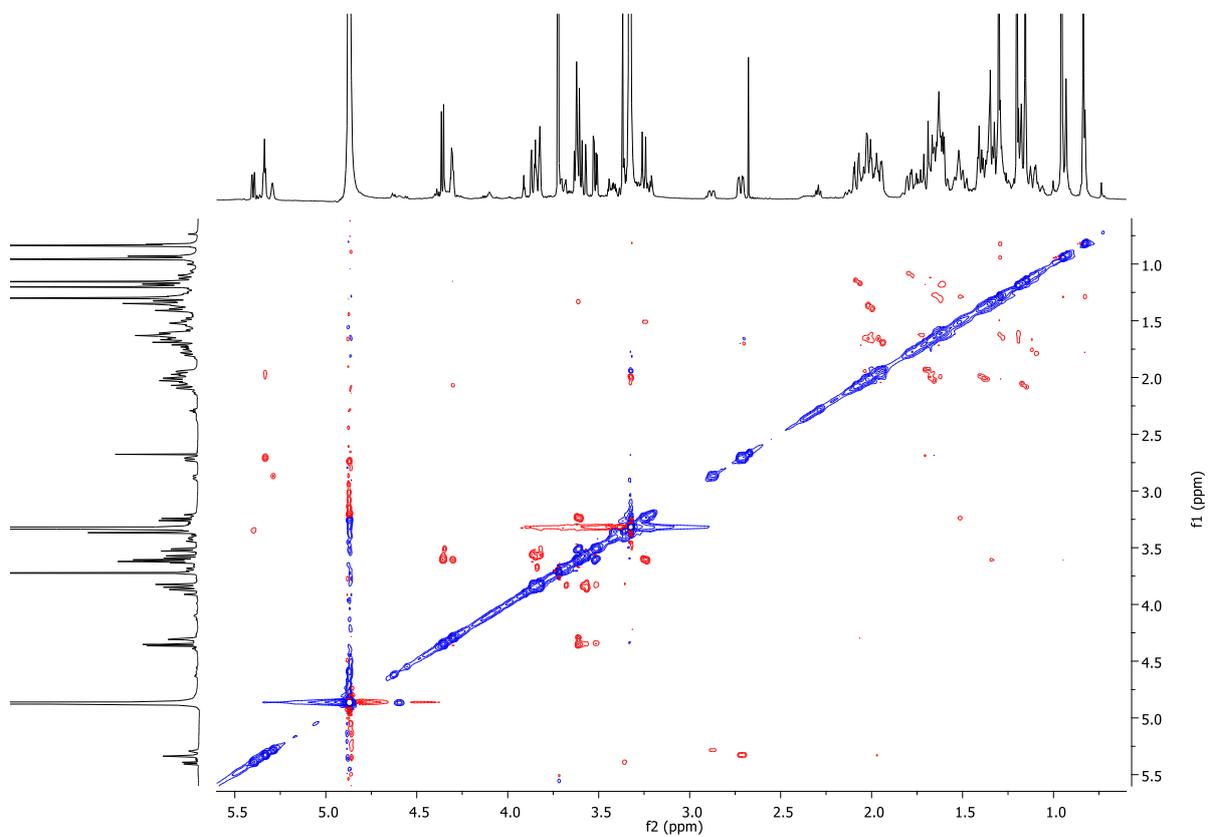


Figure S87. Spectre RMN ^1H - ^1H NOESY de l'acide 3-O- β -arabinosyl-bayogeninique (**105**) (CD_3OD).

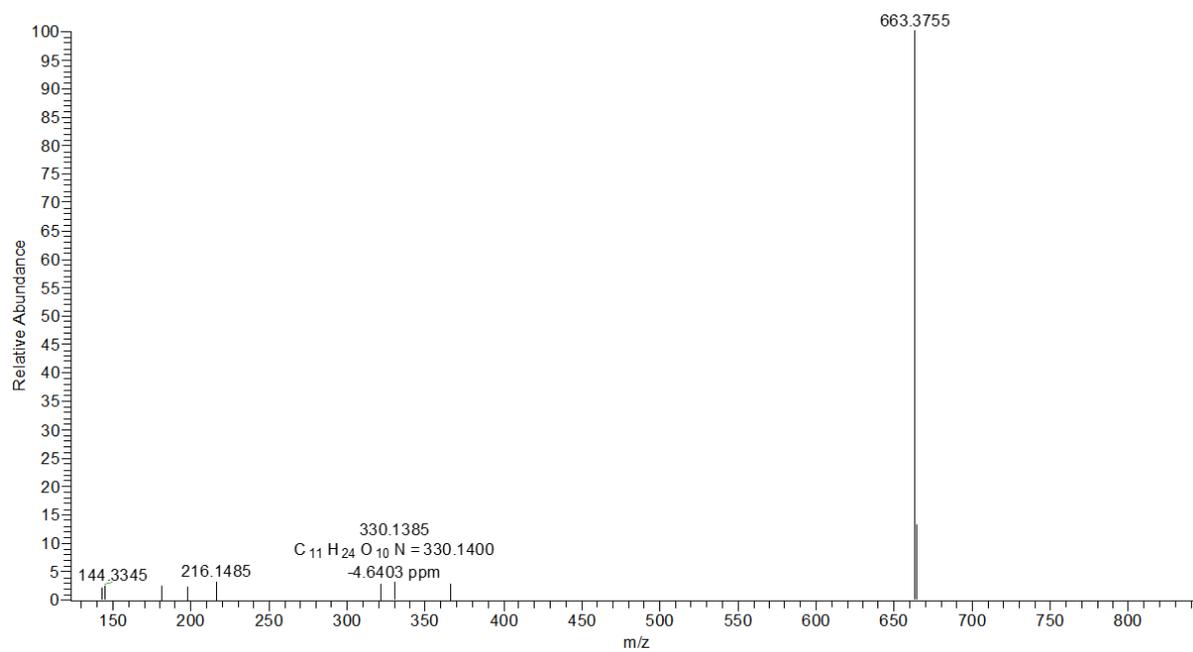


Figure S88. Spectre HRMS-Orbitrap de l'acide 3-O-β-arabinosyl-bayogeninique (105).

4. Modifications chimiques de polyphénols

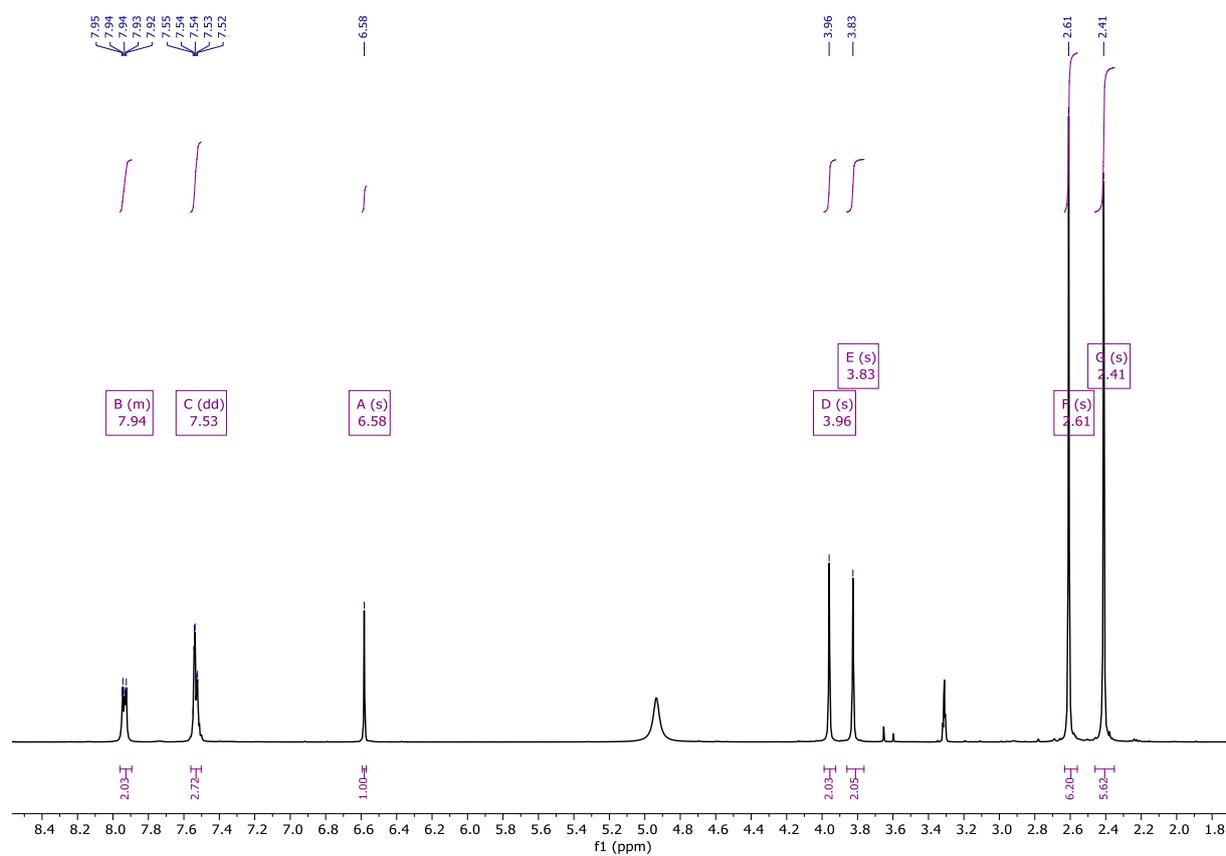


Figure S89. Spectre RMN ^1H de 6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4H-chromén-4-one (**106**) (CD_3OD).

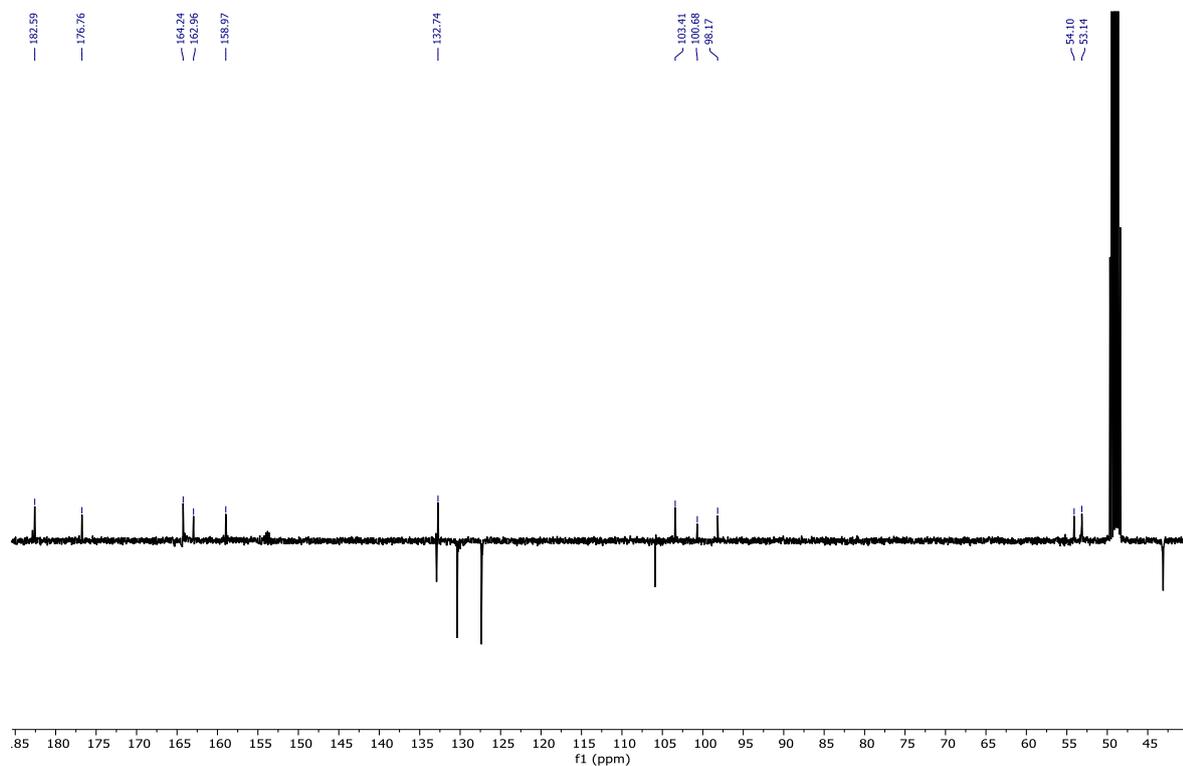


Figure S90. Spectre RMN ^{13}C de 6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4H-chromén-4-one (**106**) (CD_3OD).

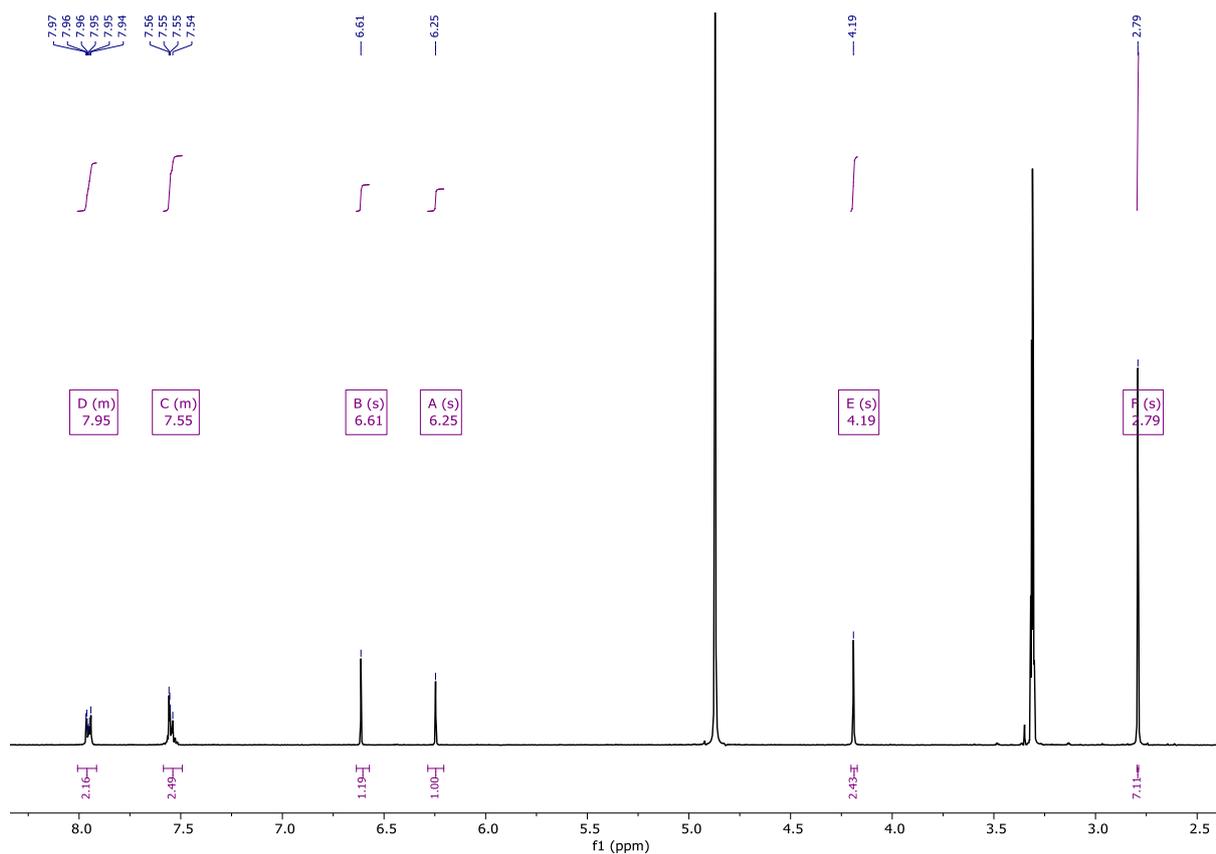


Figure S91. Spectre RMN ^1H de 8-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**107**) (CD_3OD).

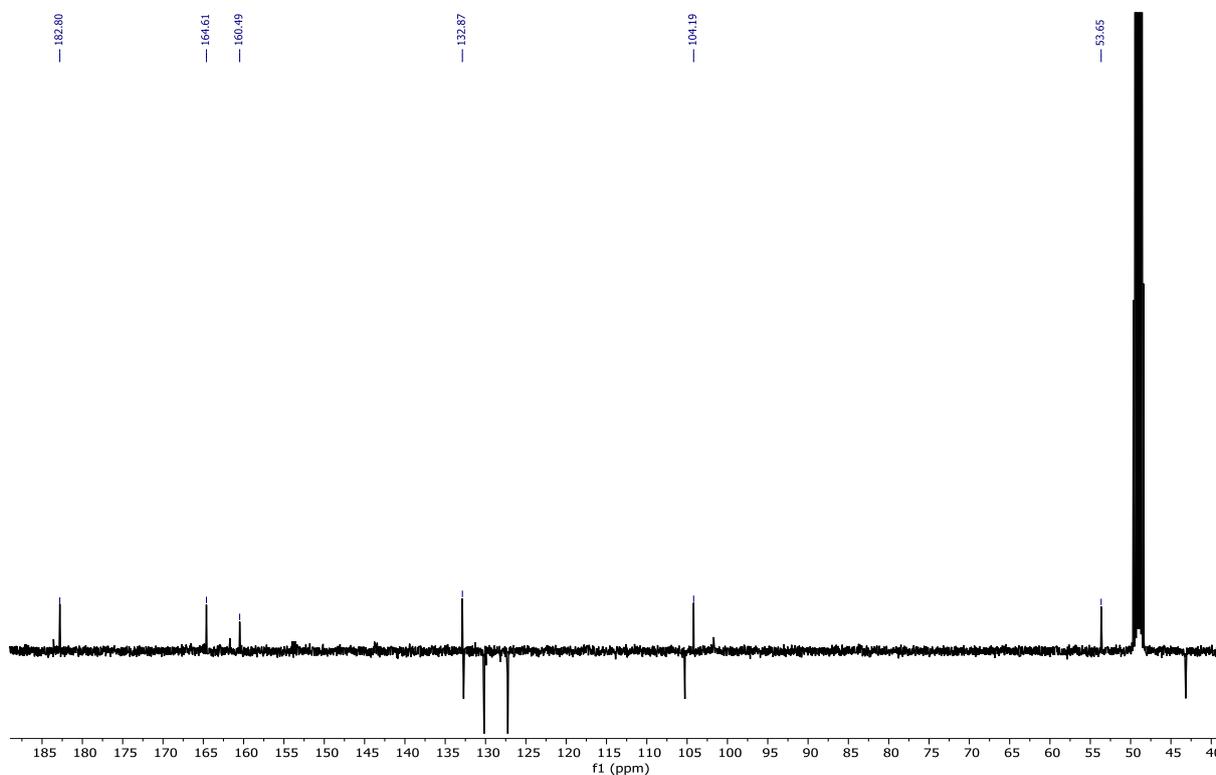


Figure S92. Spectre RMN ^{13}C de 8-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**107**) (CD_3OD).

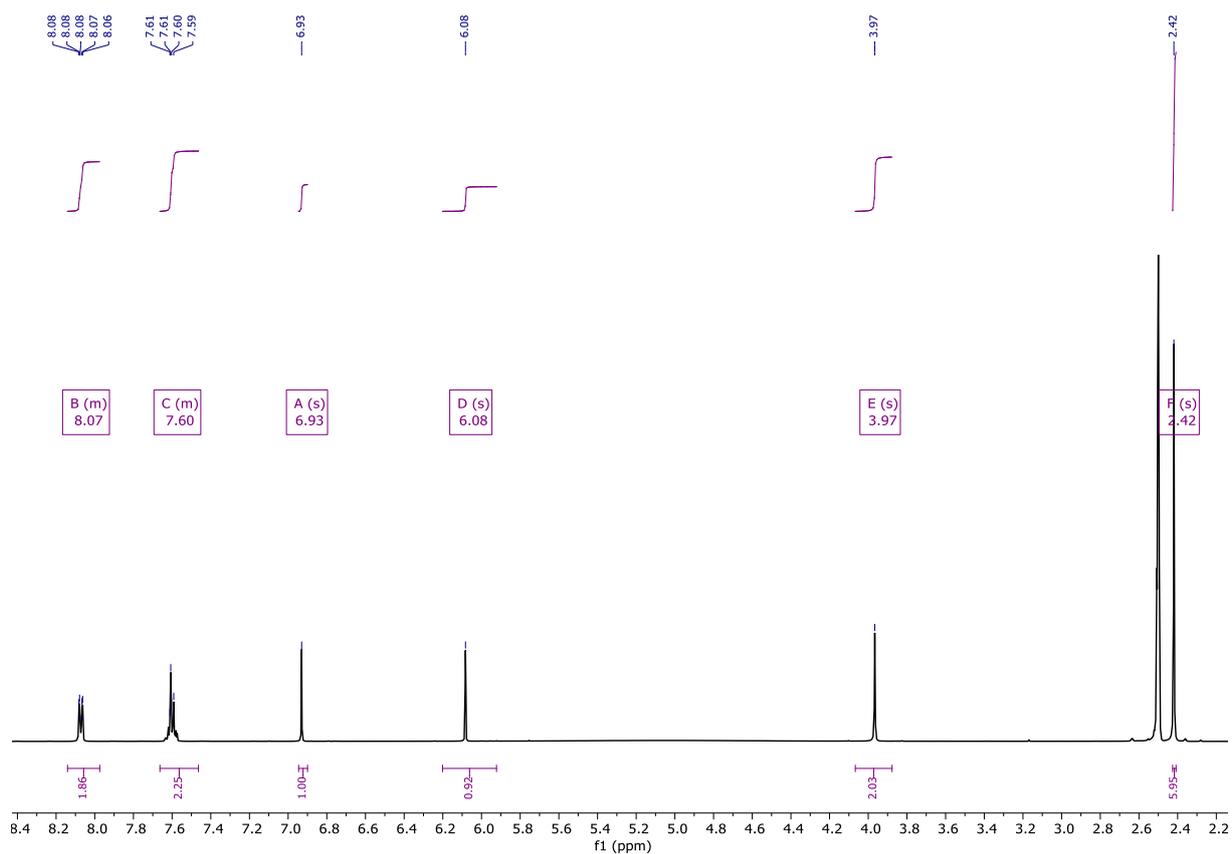


Figure S93. Spectre RMN ^1H de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**108**) (CD_3OD).

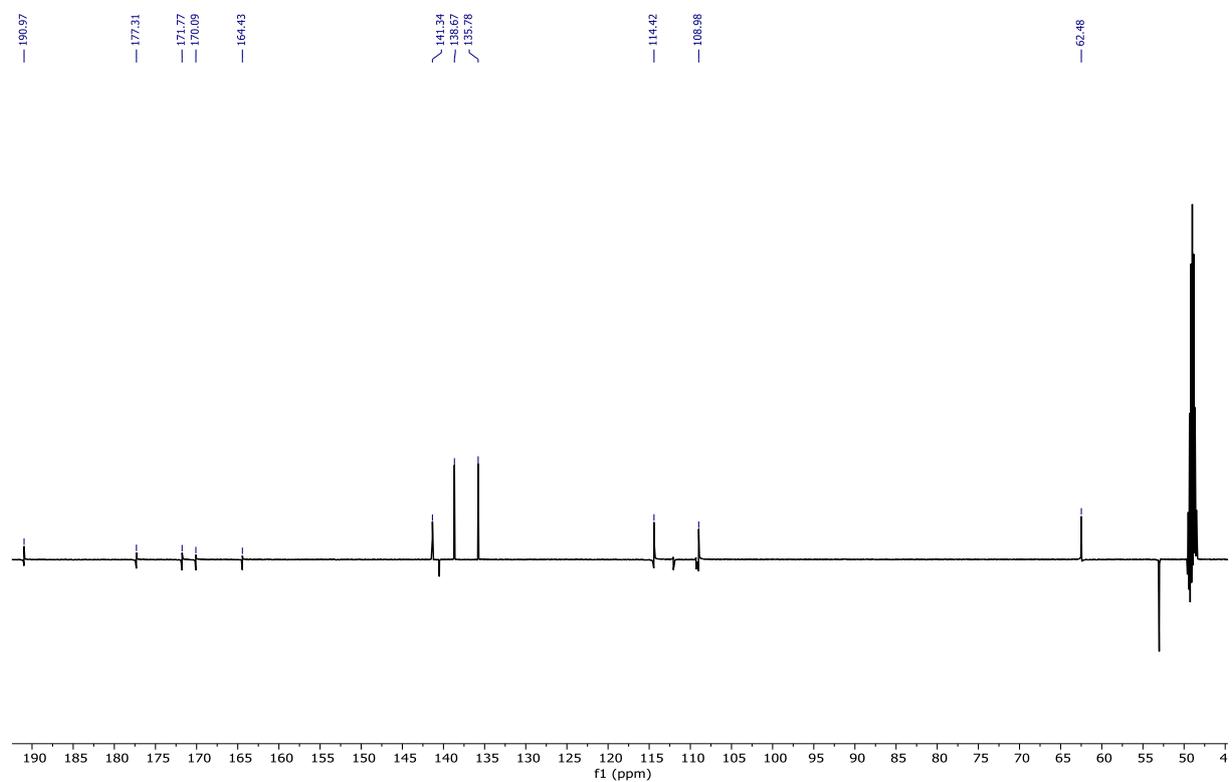


Figure S94. Spectre RMN ^{13}C de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**108**) (CD_3OD).

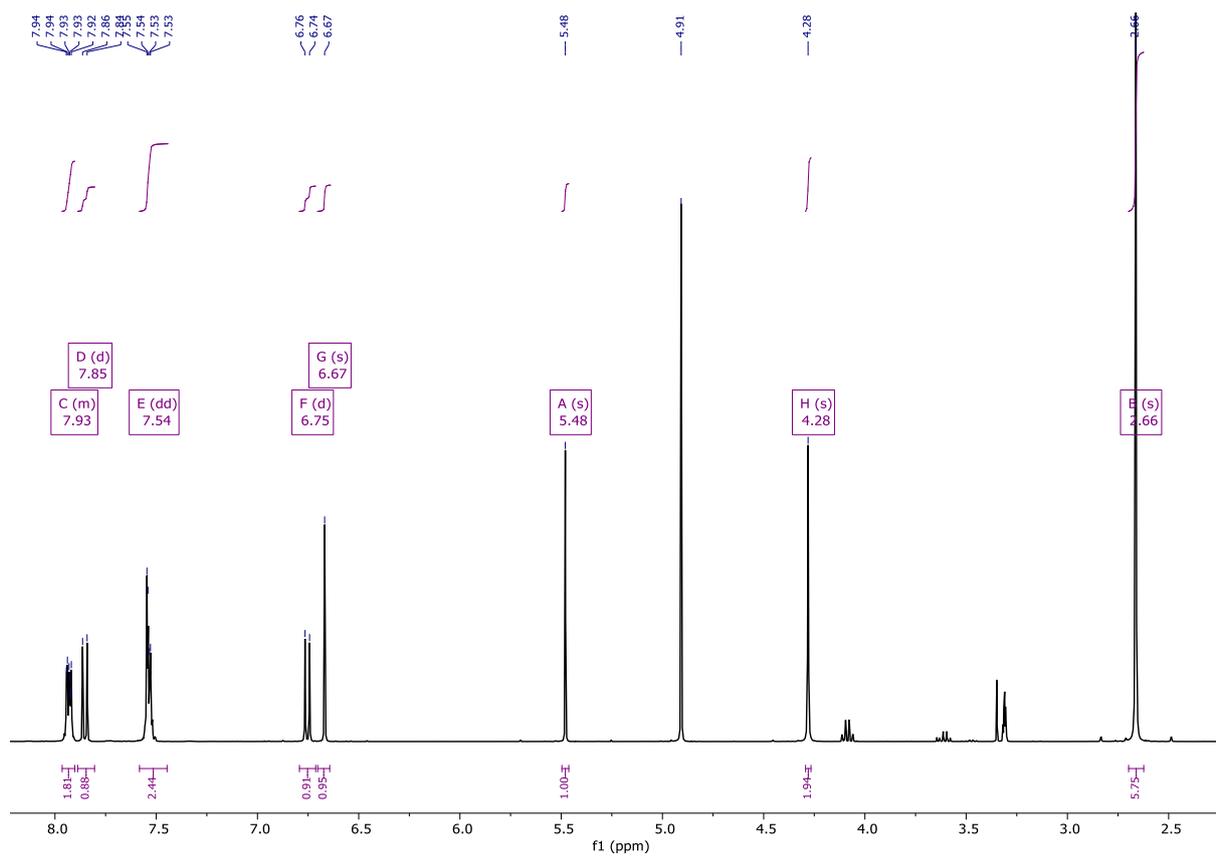


Figure S95. Spectre RMN ^1H de 8-((diméthylamino)méthyl)-7-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**109**) (CD_3OD).

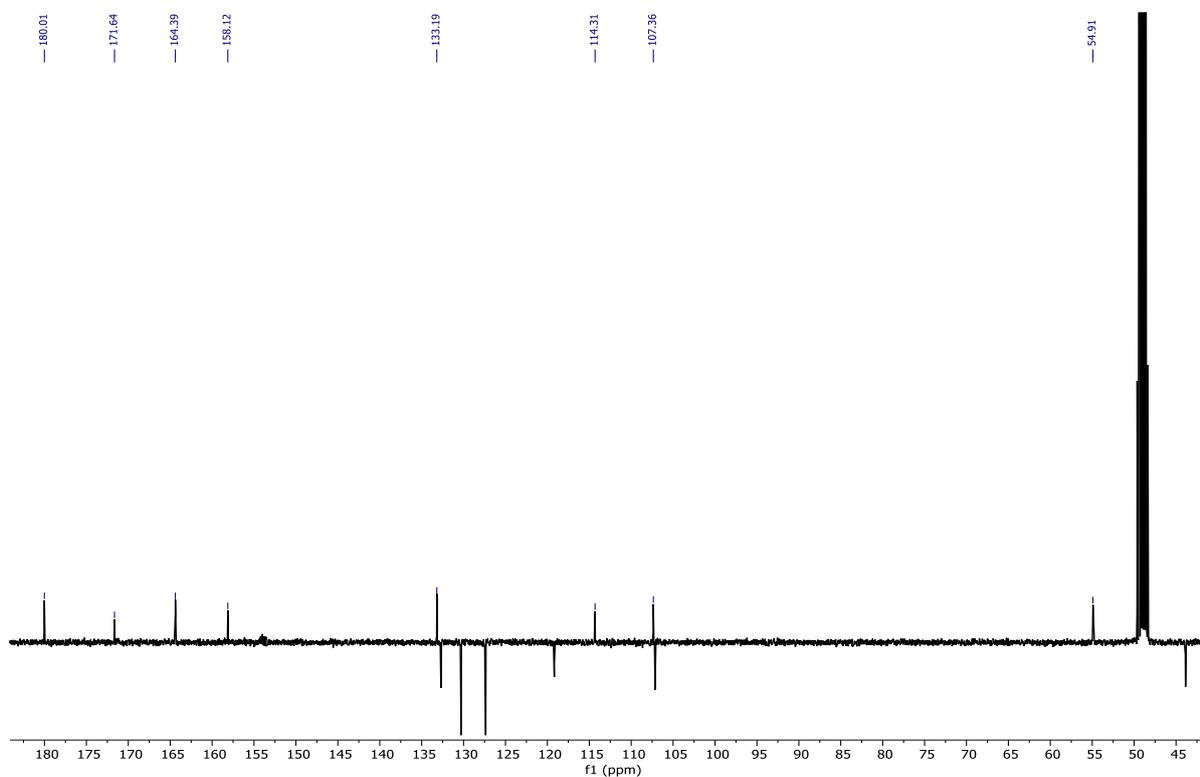


Figure S96. Spectre RMN ^{13}C de 8-((diméthylamino)méthyl)-7-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**109**) (CD_3OD).

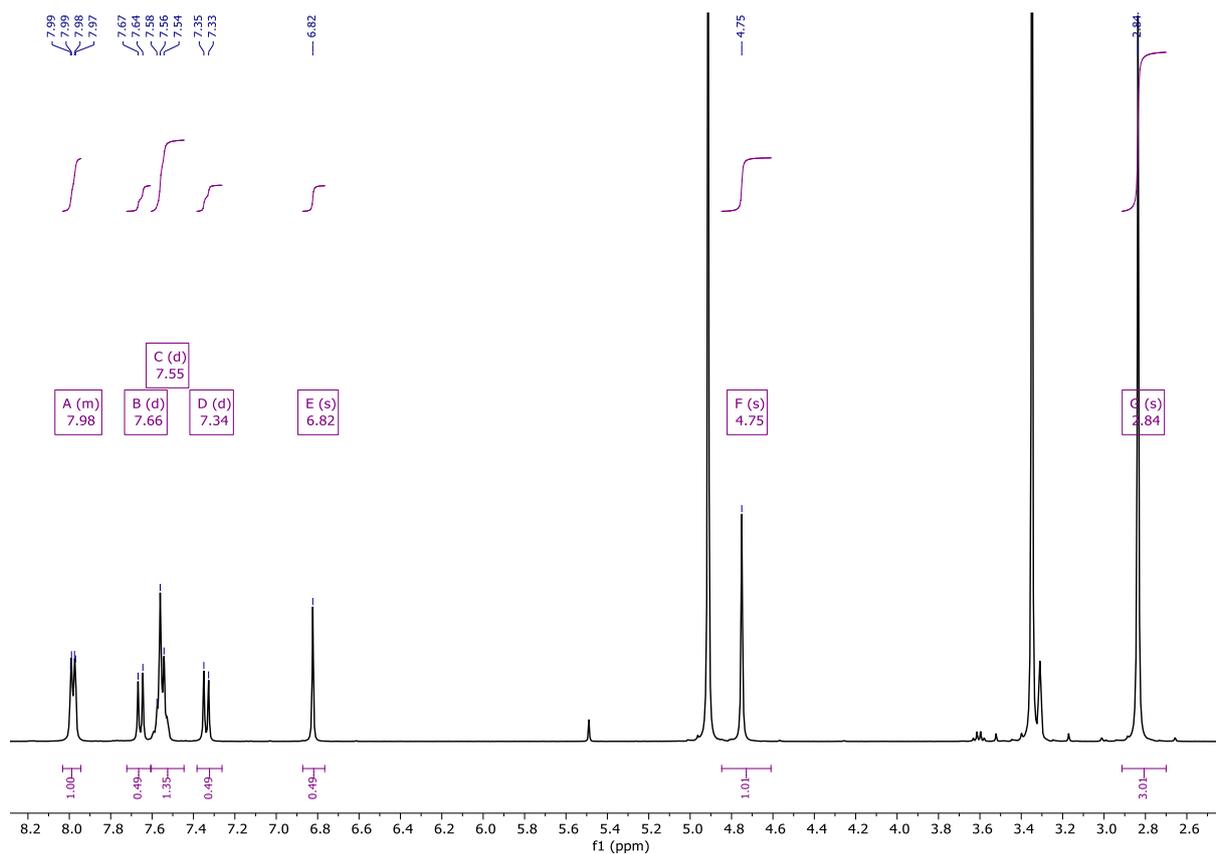


Figure S97. Spectre RMN ^1H de 5-((diméthylamino)méthyl)-6-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**110**) (CD_3OD).

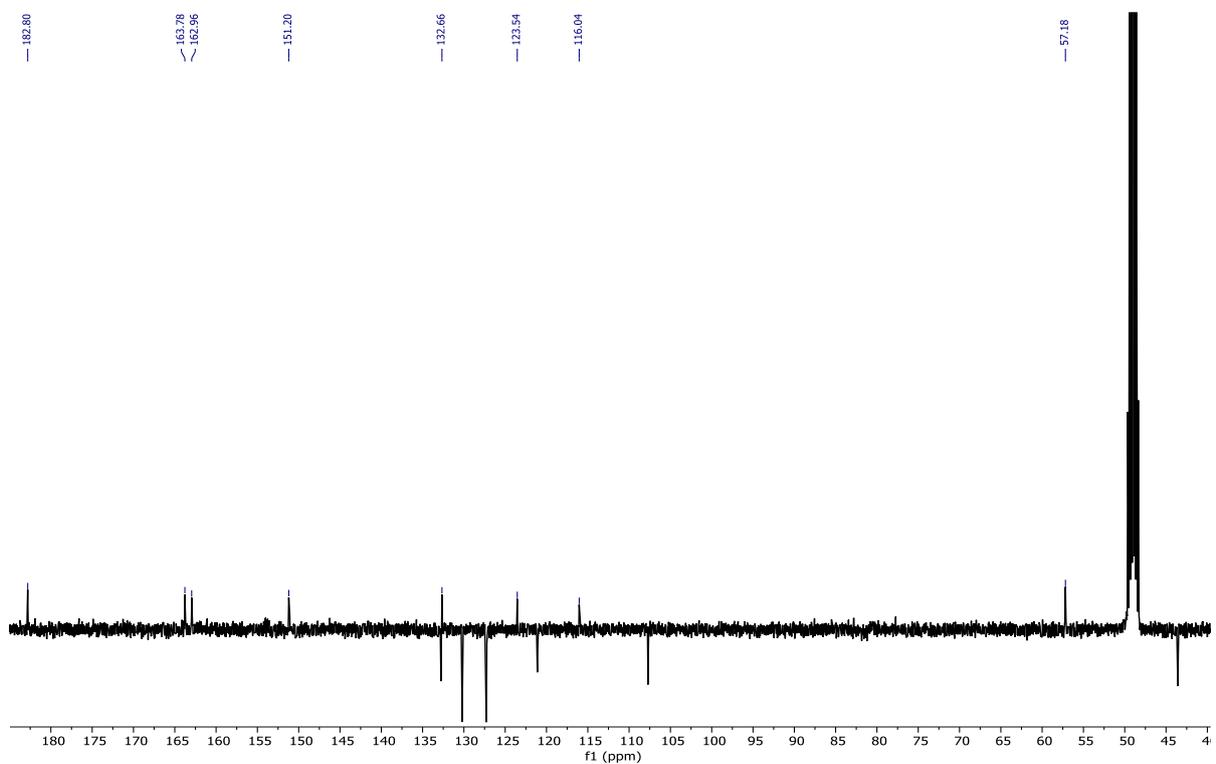


Figure S98. Spectre RMN ^{13}C de 5-((diméthylamino)méthyl)-6-hydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**110**) (CD_3OD).

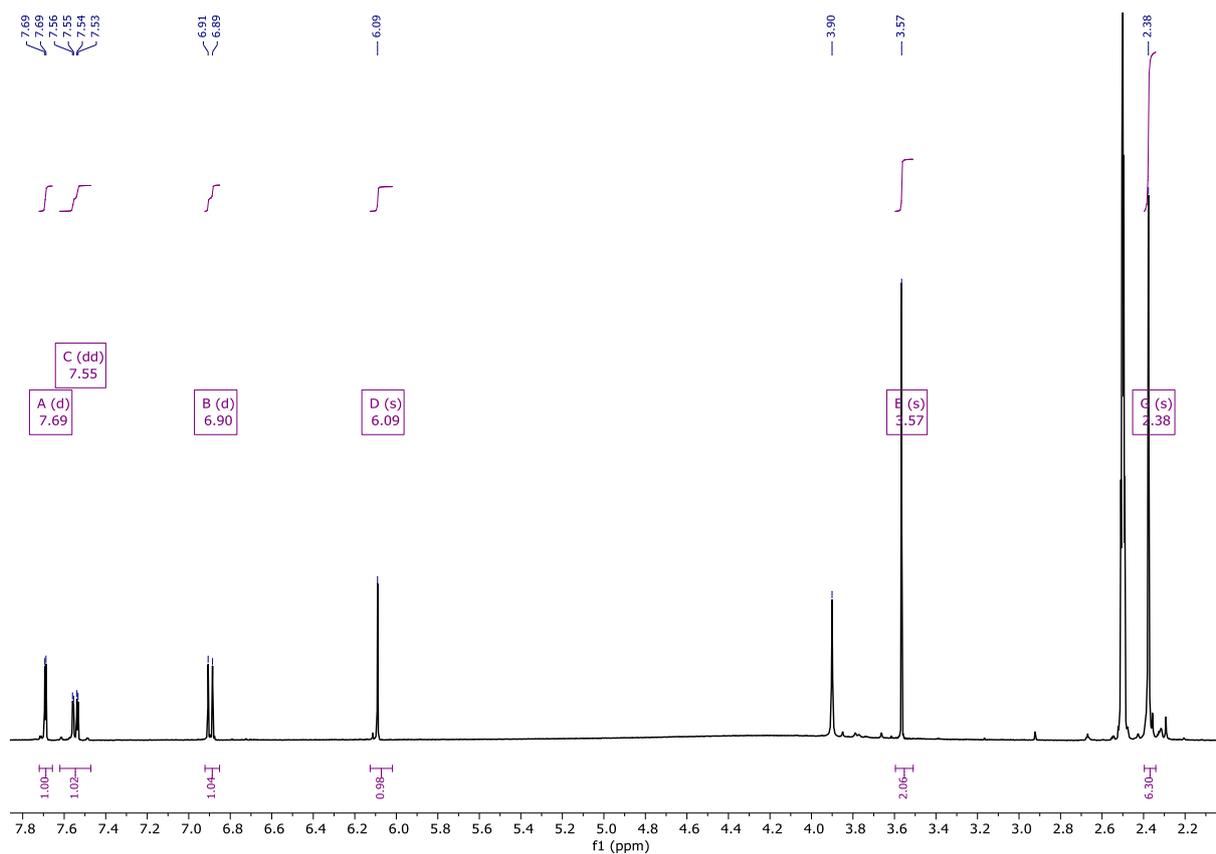


Figure S99. Spectre RMN ¹H de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one (**111**) (CD₃OD).

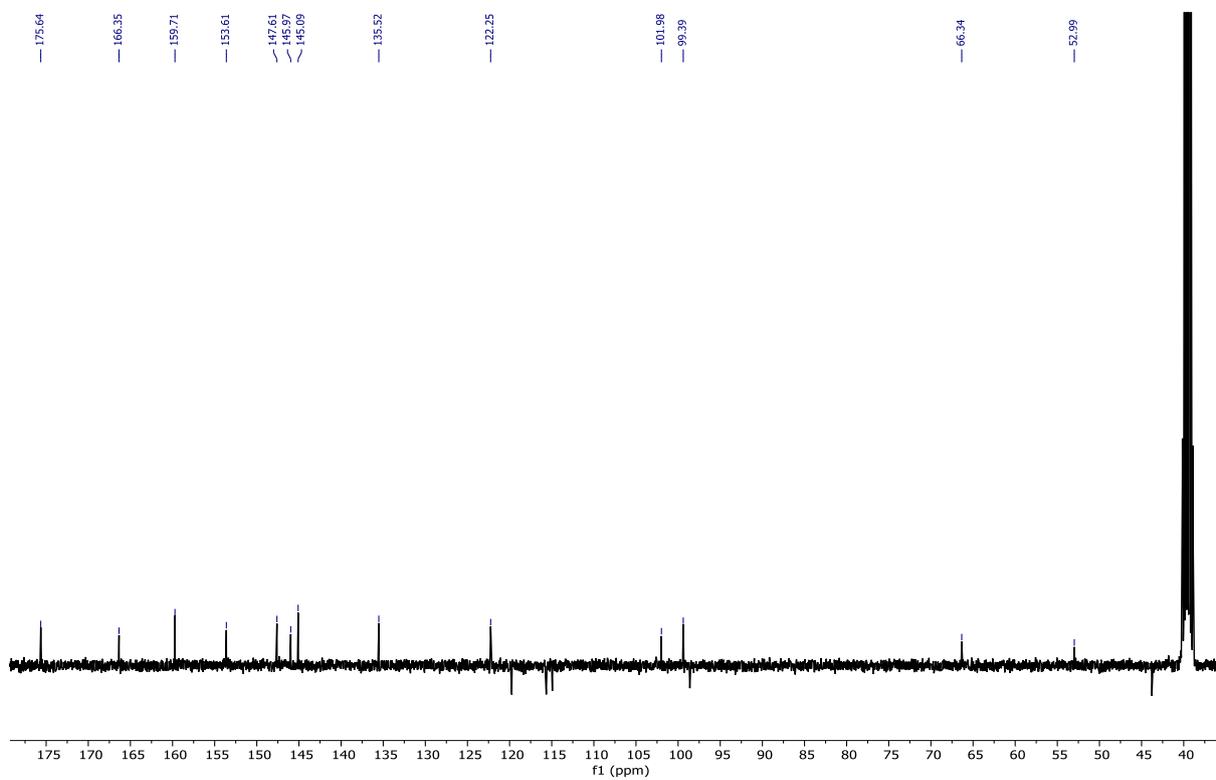


Figure S100. Spectre RMN ¹³C de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6-((dimethylamino)methyl)-5,7-dihydroxy-4H-chromen-4-one (**111**) (CD₃OD).

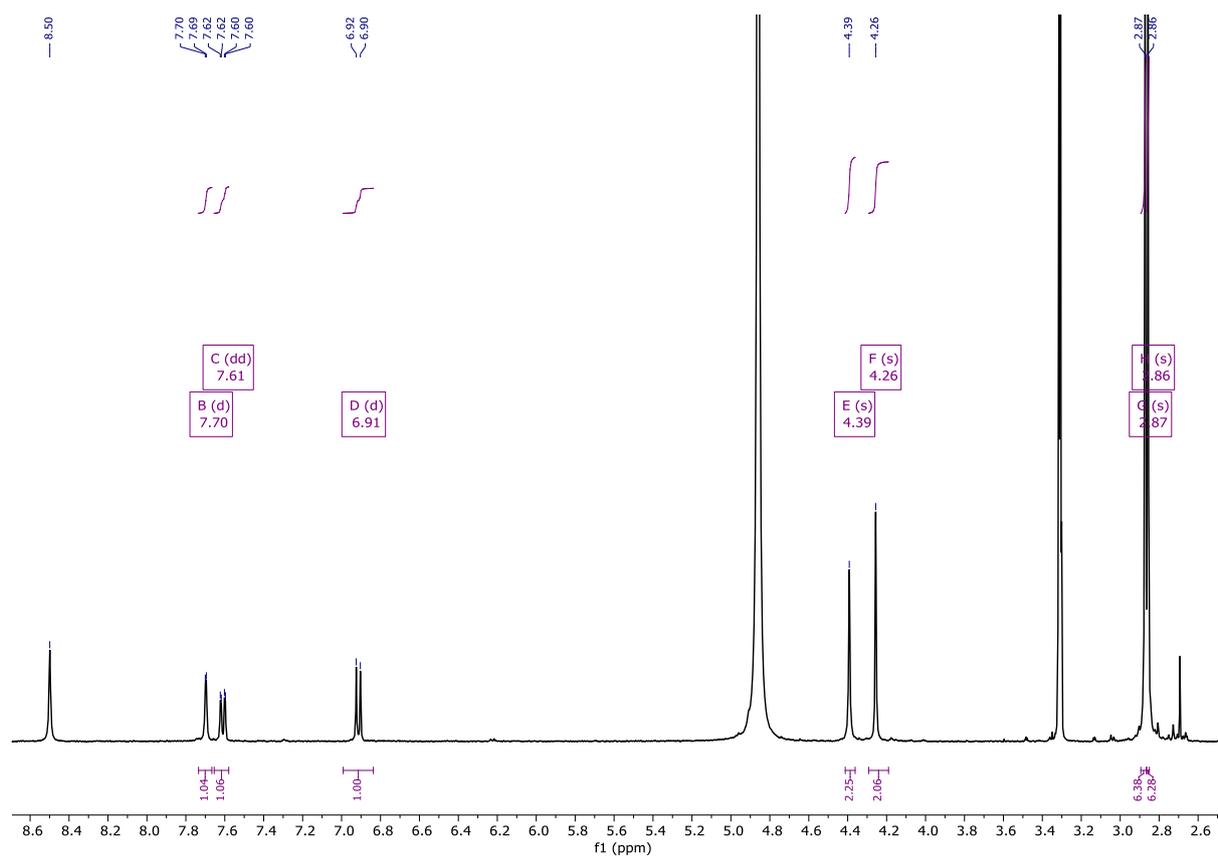


Figure S101. Spectre RMN ^1H de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one (**112**) (CD_3OD).

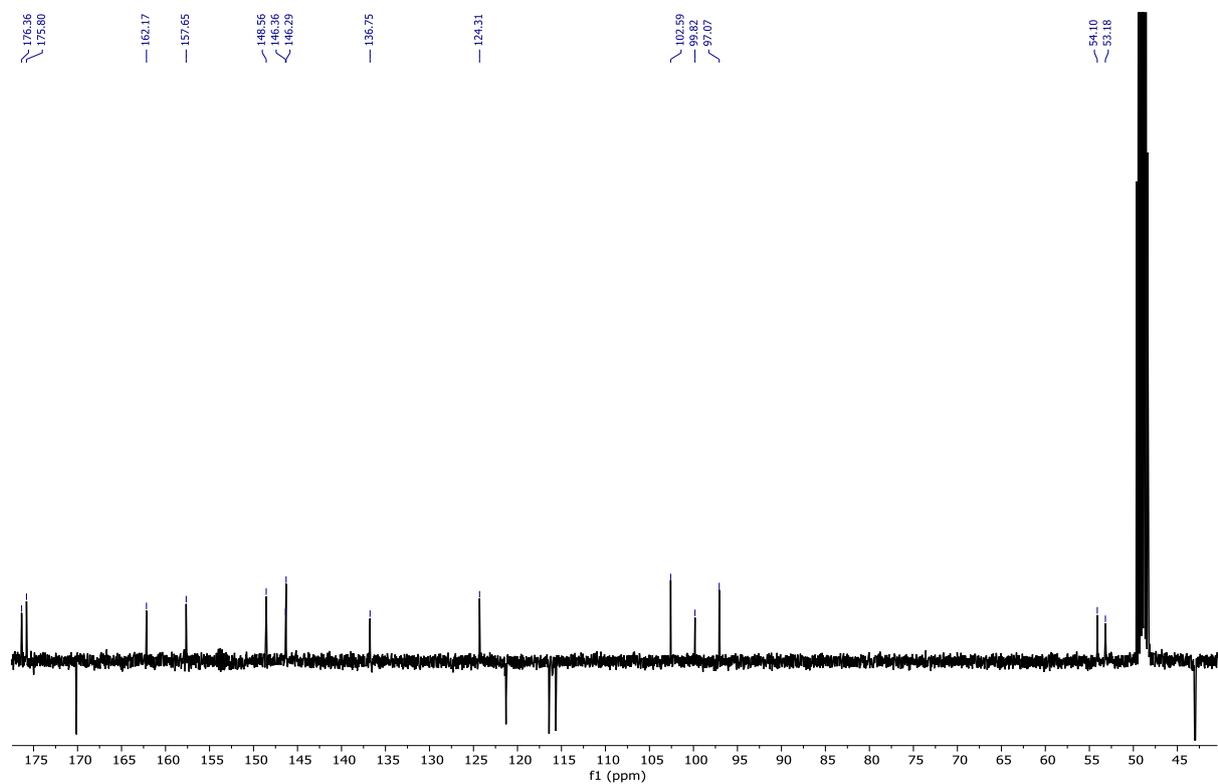


Figure S102. Spectre RMN ^{13}C de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-6,8-bis((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-4*H*-chromen-4-one (**112**) (CD_3OD).

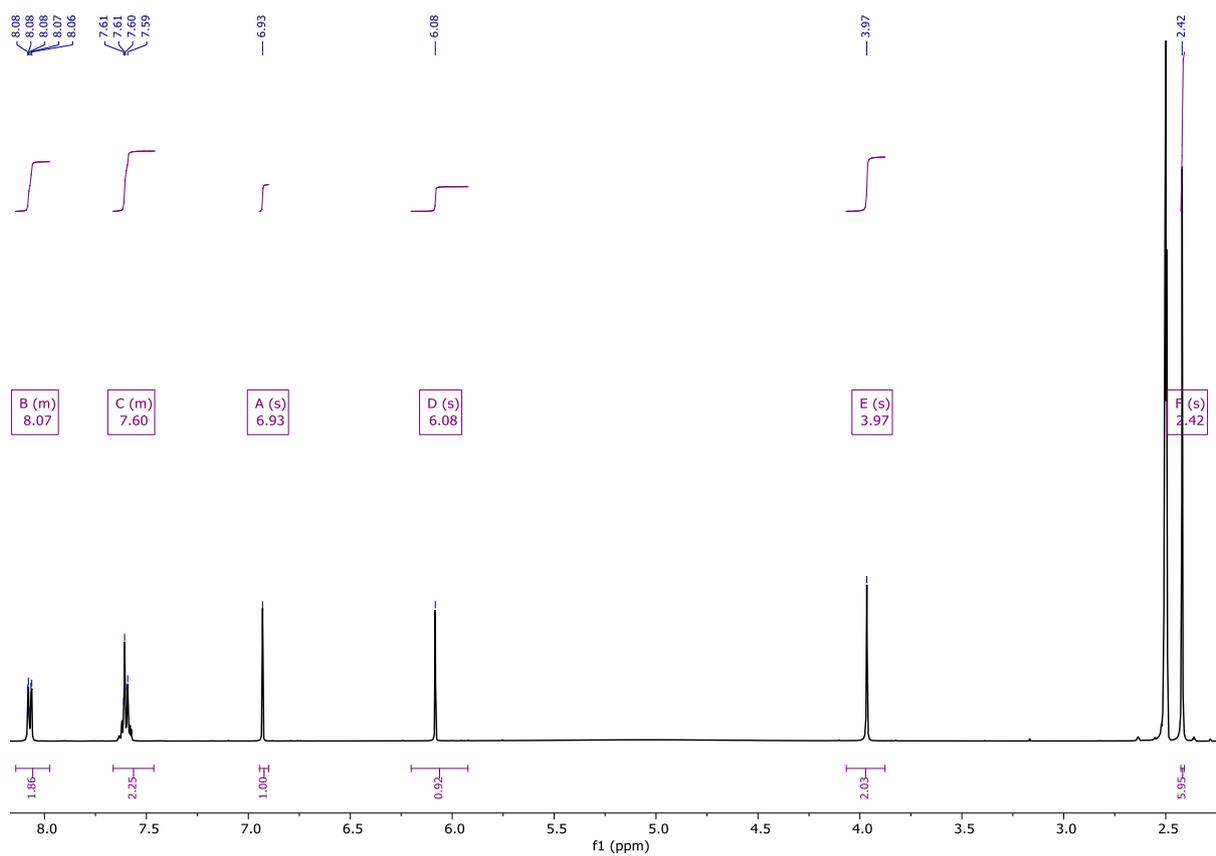


Figure S103. Spectre RMN ^1H de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**113**) (CD_3OD).

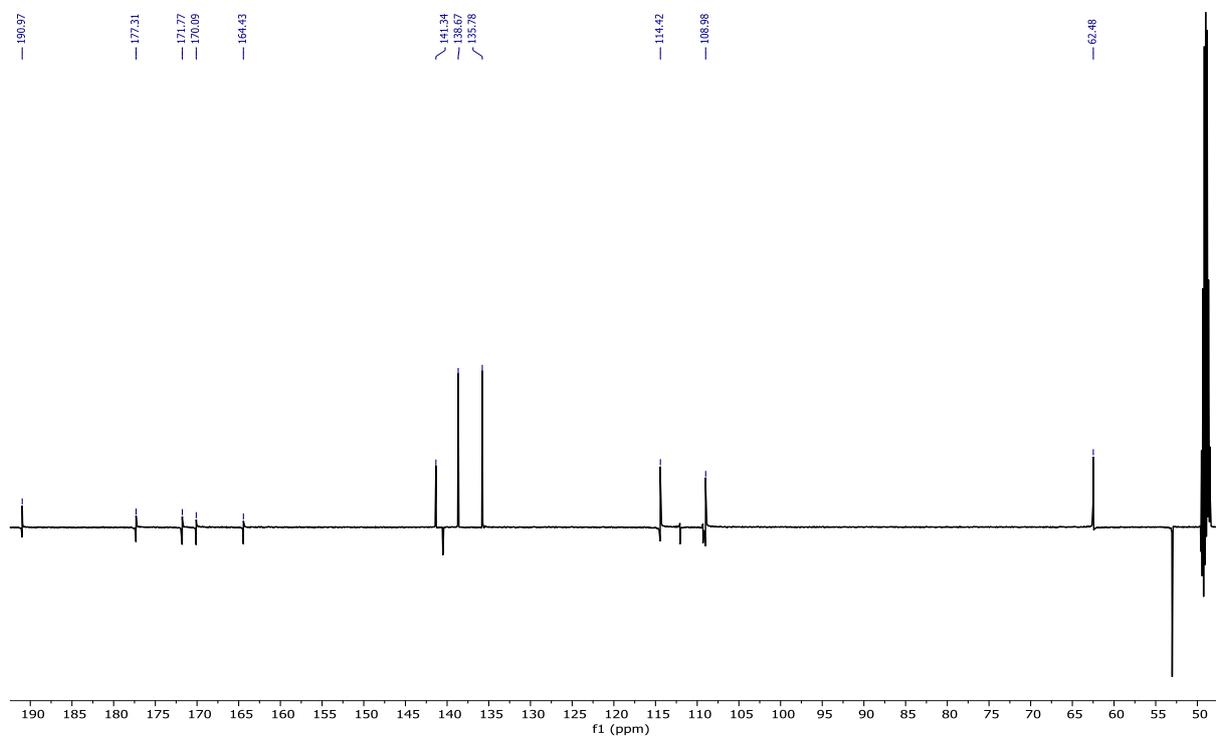


Figure S104. Spectre RMN ^{13}C de 6-((diméthylamino)méthyl)-5,7-dihydroxy-2-phényl-4*H*-chromén-4-one (**113**) (CD_3OD).

Résumé de la thèse (Français)

Cette thèse s'inscrit dans le domaine de la phytochimie et de la pharmacognosie, et comprend deux parties majeures. La première porte sur l'investigation phytochimique des racines de *Nauclea latifolia*, un arbuste utilisé en médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques. En 2013, la découverte du tramadol, un médicament de synthèse dans les racines de *Nauclea latifolia* a été exposée à une couverture médiatique inédite. De ce fait, l'origine naturelle du tramadol a été remise en question. L'objectif principal de ce projet est d'isoler du tramadol à partir de nouveaux lots de racines de *Nauclea latifolia* dans le but de réaliser des analyses isotopiques ^{14}C pour déterminer l'origine naturelle (ou non) du composé.

La purification d'extraits de ces racines par HPLC semi-préparative a permis l'isolement de deux échantillons de tramadol. Les analyses isotopiques en carbone 14 des échantillons ont montré des résultats qui tendent à montrer une origine naturelle. Cependant, l'analyse d'un nouvel échantillon de tramadol issu d'un troisième lot est nécessaire pour confirmer/affirmer son origine.

Le deuxième volet de cette thèse a porté sur l'étude phytochimique de deux plantes alpines dans le but de valoriser la flore locale en tant que sources de molécules bioactives. La première plante est l'*Helianthemum nummularium*, une espèce que l'on retrouve en surprésentation dans le régime alimentaire des ongulés montagnards. Afin d'expliquer cette surconsommation, deux hypothèses étaient possibles : 1) valeurs nutritionnelles importantes et 2) consommation de la plante dans un but d'automédication. Dans ce contexte, nous nous sommes principalement intéressés à la deuxième hypothèse en réalisant une analyse phytochimique des parties aériennes de plante. La purification de l'extrait éthanolique des parties aériennes ont permis l'isolement de 8 dérivés polyphénoliques dont certains ont été rapportés comme de potentiels agents antiparasitaires et pourraient présenter un intérêt pour les ongulés. La deuxième plante est le *Chenopodium bonus-henricus*, une espèce alpine très utilisée dans le secteur alimentaire local. L'étude phytochimique des extraits dichlorométhane et éthanolique des parties aériennes a permis l'isolement de 6 molécules dont une est nouvelle.

La valorisation thérapeutique des extraits et molécules issus des plantes alpines, nous a conduit à conduire des tests biologiques. Dans ce contexte, nous nous sommes penchés sur l'induction d'activation du facteur de transcription Nrf2 par les extraits et les molécules isolées.

Résumé de la thèse (Anglais)

This PhD. Thesis was carried out in the field of phytochemistry and pharmacognosy, including two major parts. The first part is dedicated to the phytochemical investigation of the roots of *Nauclea latifolia*, an African shrub largely used in traditional medicine. In 2013, tramadol, a fully synthetic drug was isolated from the roots of *Nauclea latifolia*. This unprecedented discovery was largely covered by media worldwide. As it can be expected, the natural origin of tramadol was inevitably the subject to some discrepancies. The main goal of this project is to isolate tramadol from new samples of *N. latifolia* in order to perform isotopic ^{14}C analyses to determine the natural origin of compound.

The purification of the root extracts by using semi-preparative HPLC led to the isolation of two tramadol. The isotopic ^{14}C analyses of the samples tend to show a natural origin. However, the analysis of a new sample of tramadol from a third batch is necessary to confirm/affirm its origin.

The second part of this thesis was dedicated to the phytochemical study of two alpine plants in order to valorize the local flora as a source of bioactive molecules. The first plant was *Helianthemum nummularium*, which is a specie very present in the alimentary diet of ungulates. In order to explain the preference of ungulates for this species over-consumption, two hypotheses were evoked: 1) nutritional values of the plant, 2) consumption of the plant for self-medication. In this context, we were interested by the second hypothesis by performing a phytochemical analysis of the aerial parts of the plant. The purification of the ethanolic extract allowed to obtain 8 compounds among which some were reported as potential anthelmintic agents.

The second plant is *Chenopodium bonus-henricus*, an alpine specie popular in the local alimentary diet. The phytochemical study of the dichloromethane and ethanolic extracts of the aerial parts led to the isolation of six molecules among which one was never described in any natural resources.

Furthermore, the plants of altitude grow in drastic environmental conditions and must develop some defense mechanisms. In this context, the alpine plants extract and the pure molecules were tested on their effect on the activation pathway of Nuclear Factor Erythroid-2-related Factor 2 (Nrf2).